

がん細胞選択的細胞死の誘導を目的とした

高い DNA 切断活性を有する

新規二核銅(II)錯体の開発に関する研究

(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)

2018 年度 1702 番

角谷 優樹

目次

第一章：序論.....	1
1-1. はじめに	1
1-2. がん細胞	1
1-2-1. がん細胞の微小環境.....	1
1-2-2. がん細胞の小胞体ストレス.....	2
1-3. 抗がん剤としての金属錯体.....	3
1-3-1. DNA の複製阻害を引き起こすことで抗がん活性を示す薬剤.....	3
1-3-2. DNA を切断して抗がん活性を示す金属錯体.....	4
1-3-2-1. 鉄錯体.....	4
1-3-2-2. 銅錯体.....	6
1-3-3. ミトコンドリアを標的にした金属錯体.....	8
1-3-4. 小胞体及びゴルジ体を標的にした抗がん剤の研究.....	9
1-3-4-1. 小胞体に局在化するイリジウム(III)錯体.....	9
1-3-4-2. ゴルジ体に局在化するイリジウム(III)錯体.....	10
1-4. 研究概要	12
1-5. 参考文献	14
第二章： <i>p</i> -cresol から誘導された二核化配位子の二核銅(II)錯体による弱酸性 pH 領域 で加速される加水分解的 DNA 切断とその推定機構.....	21
2-1. 要約	21
2-2. 緒言	22
2-3. 結果と考察	24
2-3-1. 二核銅(II)錯体の合成.....	24
2-3-2. 水溶液中(pH 5–9)における二核銅中心の構造.....	30
2-3-3. 二核銅(II)錯体の DNA 結合能.....	35
2-3-4. 弱酸性 pH 領域において二核銅(II)錯体が促進するスーパーコイルドプラス ミド pUC19 DNA の加水分解的切断.....	37

2-3-5.	DNA に特異的に結合する DNA binder を用いた DNA 切断阻害実験.....	39
2-3-6.	1a の加水分解的 DNA 切断の pH 依存的活性制御の推定機構.....	42
2-4.	結論.....	46
2-5.	実験方法.....	47
2-5-1.	試薬及び測定装置.....	47
2-5-2.	配位子及び二核銅(II)錯体合成.....	47
2-5-3.	Hbcmp, HMe ₄ bcmp, Hbcc の錯形成過程における pH 変化と分光学的測定 50	
2-5-4.	等温滴定型熱量(ITC)測定.....	51
2-5-5.	DNA 切断実験.....	51
2-5-6.	1a の DNA 切断阻害実験.....	51
2-6.	参考文献.....	52
2-7.	謝辞.....	56
2-8.	Supporting Information.....	57
第三章 : <i>p</i>-cresol から誘導された amide-tether 型配位子の二核銅(II)錯体による酸化的 DNA 切断, μ-1,1-hydroperoxo species の生成, 及び細胞毒性.....		
3-1.	要約.....	66
3-2.	緒言.....	67
3-3.	結果と考察.....	69
3-3-1.	二核銅(II)錯体の合成.....	69
3-3-2.	水溶液中における二核銅中心の構造.....	72
3-3-3.	二核銅(II)錯体の酸化的 DNA 切断活性.....	73
3-3-4.	二核銅(II)錯体の酸化的 DNA 切断の pH 応答性.....	75
3-3-5.	様々な阻害剤存在下での酸化的 DNA 切断活性.....	78
3-3-6.	分光学的測定による二核銅(II)錯体と過酸化水素が反応して生成する活性種の検出.....	79
3-3-7.	MTT assay を用いた HeLa 細胞に対する細胞毒性の評価.....	85
3-4.	結論.....	87
3-5.	実験方法.....	88

3-5-1.	試薬及び測定装置	88
3-5-2.	配位子及び二核銅(II)錯体合成	89
3-5-3.	DNA 切断実験	91
3-5-4.	4 の DNA 切断阻害実験	91
3-5-5.	μ -1,1-hydroperoxodicopper(II) species の UV-vis スペクトル測定	91
3-5-6.	μ -1,1-hydroperoxodicopper(II) species の CSI MS スペクトル測定	92
3-5-7.	共鳴ラマンスペクトルの測定	92
3-5-8.	MTT assay による細胞毒性の評価	92
3-6.	参考文献	93
3-7.	謝辞	97
3-8.	Supporting Information	98
第四章 : <i>p</i> -cresol-2,6-bis(dpa) amide-tether 配位子の二核銅(II)錯体により大きく向上された DNA 酸化切断, 細胞毒性, 及び細胞内可視化による細胞毒性発現の推定機構 105		
4-1.	要約	105
4-2.	緒言	106
4-3.	結果と考察	108
4-3-1.	配位子及び二核銅(II)錯体の合成	108
4-3-2.	6, 7a 及び 7b の構造	109
4-3-3.	DNA 切断活性評価	115
4-3-4.	酸化的 DNA 切断阻害実験	118
4-3-5.	分光学的測定による活性種の検出	120
4-3-6.	MTT assay による細胞毒性の評価	122
4-3-7.	蛍光標識を有する金属錯体の合成及びそれを用いた細胞内挙動の解明 ...	125
4-3-8.	Comet assay による核内 DNA 損傷の検出	128
4-3-9.	フローサイトメトリー	128
4-4.	結論	130
4-5.	実験方法	131
4-5-1.	試薬及び測定装置	131

4-5-2.	配位子及び二核銅(II)錯体合成	132
4-5-3.	DNA 切断実験	136
4-5-4.	7b の DNA 切断阻害実験	136
4-5-5.	7b と過酸化水素の反応によって生成する反応中間体の CSI MS スペクトル測定.....	137
4-5-6.	MTT assay による細胞毒性の評価.....	137
4-5-7.	細胞内イメージング実験.....	137
4-5-8.	フローサイトメトリー	137
4-5-9.	Comet assay による核内 DNA 損傷の検出.....	138
4-6.	参考文献	139
4-7.	Supporting Information	142
第五章 : <i>p</i>-cresol-2,6-bis(dpa^{4-X}) amide-tether 配位子の二核銅(II)錯体の細胞毒性に及ぼす電子効果及び細胞内可視化による細胞毒性発現の推定機構.....		
5-1.	要約	152
5-2.	緒言	153
5-3.	結果と考察	155
5-3-1.	配位子及び二核銅(II)錯体の合成	155
5-3-2.	10a 及び 11a の構造.....	156
5-3-3.	MTT assay による細胞毒性の評価.....	164
5-3-4.	蛍光標識を有する金属錯体の合成及びそれらを用いた細胞内挙動の解明.....	166
5-3-5.	Comet assay による核内 DNA 損傷の検出.....	170
5-4.	結論	171
5-5.	実験方法	172
5-5-1.	試薬及び測定装置.....	172
5-5-2.	配位子及び二核銅(II)錯体合成	173
5-5-3.	MTT assay による細胞毒性の評価.....	182
5-5-4.	細胞内イメージング実験.....	183
5-5-5.	フローサイトメトリー	183

5-5-6. Comet assay による核内 DNA 損傷の検出	184
5-6. 参考文献	185
第六章 : <i>p</i>-cresol-2,6-bis(dpa^{4X}) amide-tether 配位子の二核銅(II)錯体による DNA 酸化切断	187
6-1. 要約	187
6-2. 緒言	188
6-3. 結果と考察	191
6-3-1. 過酸化水素存在下における DNA 切断活性の評価	191
6-3-2. 過酸化水素存在下における DNA 切断阻害実験	197
6-3-3. 分光学的測定による活性種の検出	199
6-3-4. AscNa 存在下における DNA 切断活性の評価	201
6-3-5. DMSO 存在下における DNA 切断阻害実験	210
6-3-6. 還元剤存在下における 7b, 10b, 11b の挙動	211
6-3-7. 二核銅(II)錯体 7b, 8, 10b 及び 11b の Cyclic voltammetry (CV)	213
6-3-8. 水溶液中における AscNa 存在下での質量測定	215
6-4. 結論	217
6-5. 実験方法	218
6-5-1. 過酸化水素存在下における DNA 切断実験	218
6-5-2. AscNa 存在下における DNA 切断実験	218
6-5-3. 過酸化水素存在下における 10b 及び 11b の DNA 切断阻害実験	218
6-5-4. 過酸化水素との反応によって生成する反応中間体の CSI MS スペクトル測定	218
6-5-5. AscNa 存在下における 7b, 10b 及び 11b の DNA 切断阻害実験	219
6-5-6. 二核銅(I)錯体の UV-vis スペクトル測定	219
6-5-7. 7b, 10b, 11b の cyclic voltammetry (CV)測定	219
6-5-8. 二核銅(I)錯体の CSI MS スペクトル測定	219
6-6. 参考文献	220
6-7. Supporting Information	222

第七章：総括.....	258
謝辞.....	261

第一章：序論

1-1. はじめに

現在，がん患者は日本国内に留まらず世界規模で増加傾向にある^[1]ため，抗がん剤の研究・開発が盛んに行われている．しかしながら，その多くは正常細胞とがん細胞の選択性を持たないため，人体に深刻な副作用を引き起こすことが問題点として挙げられている．このため，がん細胞を選択的に細胞死へ導く抗がん剤の開発が期待されている．

1-2. がん細胞

がん細胞を選択的に細胞死へ導く抗がん剤の開発には，がん細胞の生存環境を理解する必要がある．以下に，特徴的ながん細胞の生存環境について述べる．

1-2-1. がん細胞の微小環境

がん細胞の微小環境は，正常細胞と比較して著しく異なる．がん細胞は，酸素(O₂)が十分にある状態でもミトコンドリアの呼吸によるエネルギー(ATP)生産(酸化的リン酸化, oxidative phosphorylation, OXPHOS)はせず，解糖系によって ATP を生産しており，これはワールブルグ効果と呼ばれている(Figure 1-1)^[2]．この現象により，解糖系で生産されたピルビン酸がクエン酸回路に入ることなく乳酸脱水素酵素によって乳酸に還元されて細胞外に排出されるため，がん細胞周辺の pH は弱酸性に保たれている^[3]．

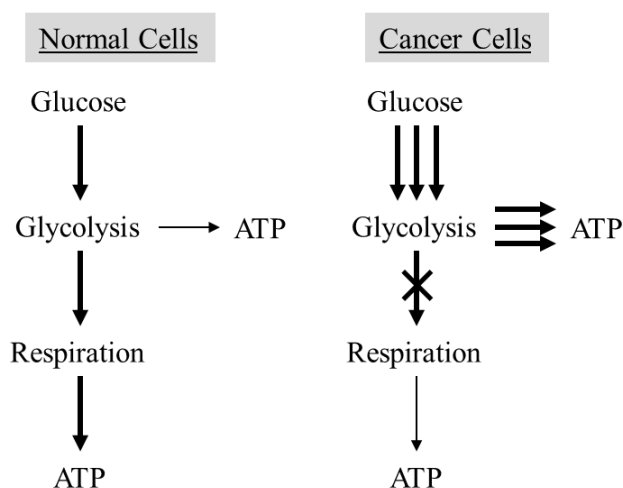


Figure 1-1. Metabolism differences between normal and cancer cells.

我々の細胞に存在するミトコンドリアは，ミトコンドリア電子伝達系(mitochondrial electron transport, ETC)を通じて OXPHOS を行うため，酸素の消費量が多い^[4]．ミトコンドリアの ETC は，その内膜に存在する 4 つの複合体(complex I-IV)から構成され，これが解糖系やクエン酸回路から得られる電子を利用し，OXPHOS の過程を経てエネルギー

一生成を行っている^[5]。正常細胞におけるこの過程では、ミトコンドリアで消費される酸素のうち約 99%が complex IV によって 4 電子還元されて H₂O を生成するが、酸素の 0.1–1.0%は complex I, II, III で 1 電子還元され、O₂^{•-} (スーパーオキシドアニオンラジカル)に変換される^[4a,6]。また、O₂^{•-}は SOD (スーパーオキシドディスムターゼ)やカタラーゼなどによって不均化され、過酸化水素(H₂O₂)と O₂に変換される。O₂^{•-}や過酸化水素は活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)の一種である。ROS は、正常な細胞の運命決定に対して重要な役割を果たしており、低濃度の ROS は自己複製などに必要であることなどが知られている^[7]。その一方で、ROS 濃度が高くなると細胞の急増、分化、老化やアポトーシスを誘導することなどによって細胞を消耗するため、細胞における ROS の濃度は厳密に制御されている^[7]。しかしながら、がん細胞内の ROS 濃度は正常細胞と比較して高く発現していることが報告されている^[8]。幾つかの研究によると、がん細胞内の ETC において、complex II のサブユニットである C や D に変異が起こっており、電子が溜まりやすくなっているため、酸素が 1 電子還元を受けることで O₂^{•-}や過酸化水素の生成が増加し、遺伝子の不安定化及び細胞のがん化に対して大きな寄与を及ぼしていることが報告されている^[9]。

上述したようにがん細胞では ROS が高く発現しているため、細胞の恒常性を維持するために抗酸化物質(還元剤)濃度もまた、正常細胞と比較して高く発現していることが知られている^[10]。そのため、近年では、がん細胞内の ROS 濃度を低下/還元剤濃度を増加させる、また、ROS 濃度を増加/還元剤濃度を低下させることでがん細胞の恒常性を破壊し、それぞれ細胞停止及び細胞死を誘導する研究が盛んに行われている^[10a]。

1-2-2. がん細胞の小胞体ストレス^[11]

小胞体は、細胞内で最大の細胞小器官である。小胞体の主な役割は細胞のタンパク質調節であり、多くの内在性膜タンパク質及び細胞質ゾルタンパク質を合成する^[12]。小胞体で合成されたタンパク質は小胞体内腔に移動し、適切な形に折りたたまれ、膜タンパク質はそれぞれの膜に組み込まれ、細胞質ゾルタンパク質は適当な目的地に輸送される。しかしながら、しばしばタンパク質が適切に折りたたまれない、または凝集しないことがある^[12c]。このようなタンパク質は、ほとんどの場合 SEL1L-HRD1 タンパク質複合体によってタグ付けされ、プロテアソームによって分解される。ERAD (endoplasmic reticulum-associated degradation)と呼ばれるこの経路は、小胞体のタンパク質恒常性機構における重要な成分であり、近年では、アルツハイマー病^[13]やがん^[14]などの疾患において注目されている。タンパク質に関する役割以外にも、小胞体はホスファチジルコリン、トリアシルグリセリド、コレステロールなどの細胞脂質の合成、及び細胞内カルシウムイオンの調節に深く関与している^[12b,15]。

このような小胞体の機能が毒素または環境変化などの傷害によって破壊されると、小胞体ストレスが生じる^[11]。小胞体ストレスは上述した小胞体の 3 つの重要な機能である

タンパク質の折りたたみや輸送, 脂質の合成, カルシウム濃度の調節に異常をきたす^[11]. この場合, UPR (unfolded protein response)や ISR (integrated stress response)などのストレス応答が生じ, しばしばアポトーシスなどが引き起こされる^[11]. このため, 近年では化学療法によって意図的に小胞体ストレスを生じさせ, アポトーシスを引き起こすことを目的とした抗がん剤の研究が盛んに行われている^[11].

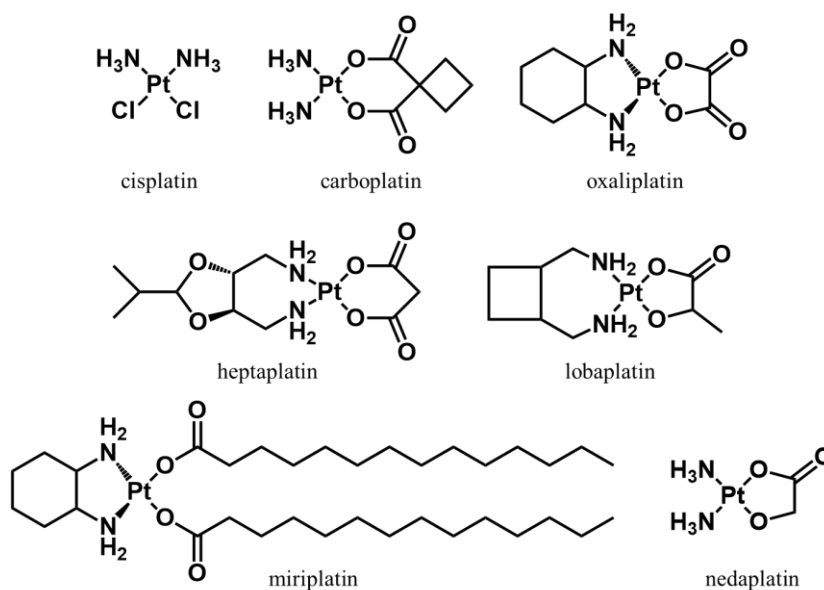
1-3. 抗がん剤としての金属錯体^[16]

薬学の分野において金属錯体は, 単純な有機化合物では困難な治療薬の設計・開発に対して重要な役割を果たしてきた^[17]. これは, 金属錯体の広範囲にわたる配位数及び幾何学構造, 酸化還元状態, 熱力学的及び速度論的特性が, その反応性に多様性を与えているからである. 以下に, 抗がん剤の開発を目的とした金属錯体の例を中心金属ごとに示す.

1-3-1. DNA の複製阻害を引き起こすことで抗がん活性を示す薬剤

現在, 世界で承認されている白金ベースの抗がん剤は, cisplatin^[19], carboplatin^[20], oxaliplatin^[21]の3種類である(Chart 1-1). また, 韓国では heptaplatin^[18], 中国では lobaplatin^[22], 日本では miriplatin^[23]と nedaplatin^[24]がそれぞれ抗がん剤として使用が承認されている(Chart 1-1). これらの白金薬剤は静脈注射を通して投与され, 銅トランスポーターを通して細胞に取り込まれる^[25]. 細胞に取り込まれた白金薬剤は, そのクロロ基またはカルボキシラト基がアクア化され, 主に核内 DNA のグアニン N7 位と共有結合し, この結果, DNA を歪曲させ, 転写及び複製を妨げることでアポトーシスを引き起こす. がん細胞は正常細胞と比較して急速に分裂するため, 高い栄養を要求する. このため, 白金薬剤はがん細胞に取り込まれやすいが, 口, 喉, 胃, 腸の粘膜などを含む, 急速に成長する他の正常細胞にも同様に取り込まれやすい^[18]. また, 白金薬剤は腎臓及び肝臓にも取り込まれ, 腎臓では尿による排泄, 肝臓では薬物の代謝を通して薬剤を無毒化しようとする. これらのことから, 白金薬剤は正常細胞とがん細胞に対して選択性なく同様に作用するため, 脱毛, 嘔吐, 腎毒性などの深刻な副作用を引き起こすことが問題となっている.

Chart 1-1. Chemical structures of platinum(II) anticancer drugs



1-3-2. DNA を切断して抗がん活性を示す金属錯体

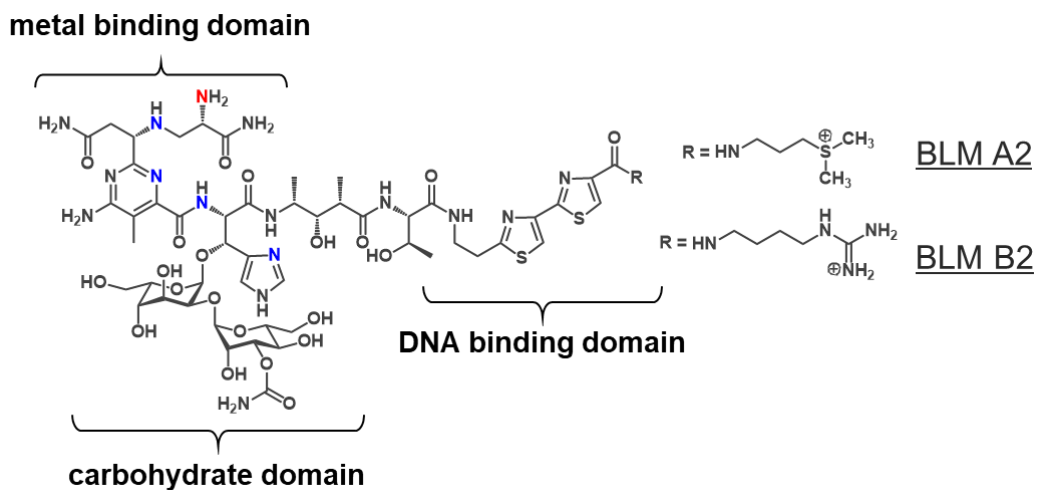
1-3-2-1. 鉄錯体

ブレオマイシン(Chart 1-2)は、1966年に報告された *Streptomyces verticillus* によって産生される抗生物質の1つである^[26]。ブレオマイシンは、体内に投与後、その金属結合部位で鉄(II)錯体を形成した後、酸素分子または過酸化水素と反応して Fe(III)-OOH species を生成する(activated bleomycin, ABLM)^[27]。この ABLM は DNA 二本鎖切断の活性が高く、高い抗がん活性を示す。ABLM の DNA 切断機構に関して様々な研究がされているが、その切断機構は不明な点が多い。その中でも、Solomon らは、ABLM の O-O のホモリティック開裂で生じるヒドロキシラジカル HO•が DNA 主鎖の 4'位のプロトンを引き抜き、Fe(IV)=O species と H₂O の生成を伴い、DNA 切断が進行することを様々な実験手法から提案している(Scheme 1-1)^[27]。現在、BLM は子宮頸がん、睾丸がんなど、様々ながん細胞に対して臨床利用されている。しかしながら、BLM は正常細胞とがん細胞の選択性がないため、長期使用による肺炎や肺線維症などの副作用を引き起こすことが問題となっている^[28]。

副作用の少ない抗がん剤への応用を目指し、がん細胞選択的及び高い抗がん活性を示す BLM モデル金属錯体の研究が盛んに行われている^[28]。その中でも、BLM の活性中心の構造を模倣した N4Py 配位子の研究例が挙げられる(Chart 1-3)^[29]。N4Py は N5 型五座キレート配位子であり、その単核鉄(II)錯体[Fe(N4Py)(MeCN)](ClO₄)₂ は還元剤存在下で酸素分子を活性化し、ヒドロペルオキシド鉄(III)錯体 Fe(III)-OOH を生成して DNA 切断活性を示す、良好な Fe-BLM モデル錯体と報告されている^[30]。しかし、がん細胞選択的に高い DNA 切断活性を示す BLM モデル金属錯体の研究は報告例がなく、その開発

が求められている。

Chart 1-2. Chemical structure of bleomycin (likely metal ligating atoms indicated in blue (equatorial) and red (axial))



Scheme 1-1. Proposal reaction pathway for ABLM

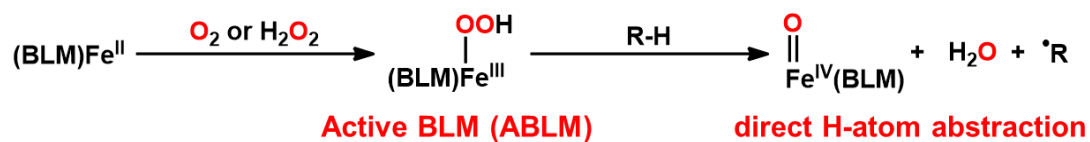
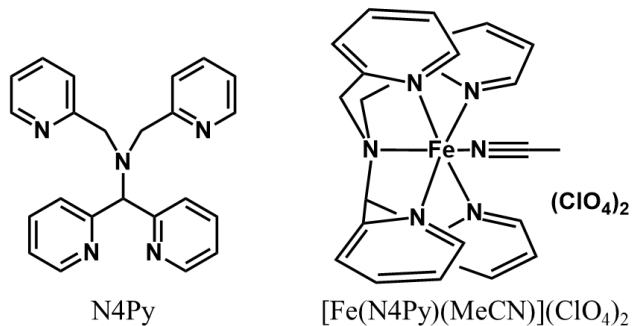


Chart 1-3. Chemical structures of N4Py ligand (left) and [Fe(N4Py)(MeCN)](ClO₄)₂ (right)



1-3-2-2. 銅錯体

銅は、多くの好気性生物が構造的及び触媒的な補因子として使用している必須元素であり、様々な生体内反応経路に関わっている^[31]。従って、がんや他の疾患に関する銅の役割だけでなく、銅の吸収^[32]、分布^[33]、代謝や排泄^[34]の機構に関する研究が盛んに行われてきた。フリーの銅イオンは潜在的に毒性を持っているため、体内における銅濃度は精密に制御されている^[35]。しかしながら、多数のがん組織において、銅濃度が正常細胞と比較して過剰に発現していることが知られている^[36]。がん細胞に関連した銅イオン濃度の増加に対する詳細な分子機構は解明されていないが、血管新生、腫瘍増殖^[37]、浸潤及び転移^[38]に関して銅が中心的な役割を果たしていると考えられている。このように、銅イオンは我々の体内に存在して様々な重要な役割を果たしている金属イオンであるため、がん細胞と比較して正常細胞には毒性が低いと考えられ、抗がん剤開発のための研究に銅錯体が広く用いられてきた。その中でも、Montagner らは、*p*-cresol の 2,6 位に環状アミンの tacn (1,4,7-triazacyclononane) を methylene-tether で導入した Hbcmp 配位子の二核銅(II)錯体 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{bcmp})](\text{NO}_3)_2$ が加水分解的 DNA 切断活性を有することを報告している(Figure 1-2)^[39]。

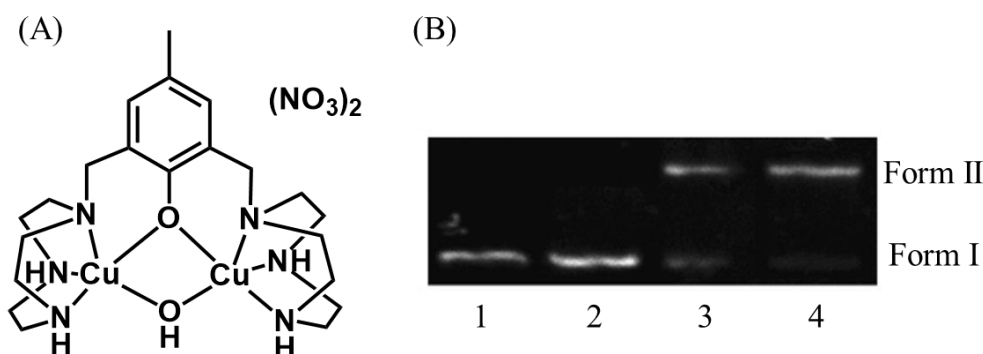
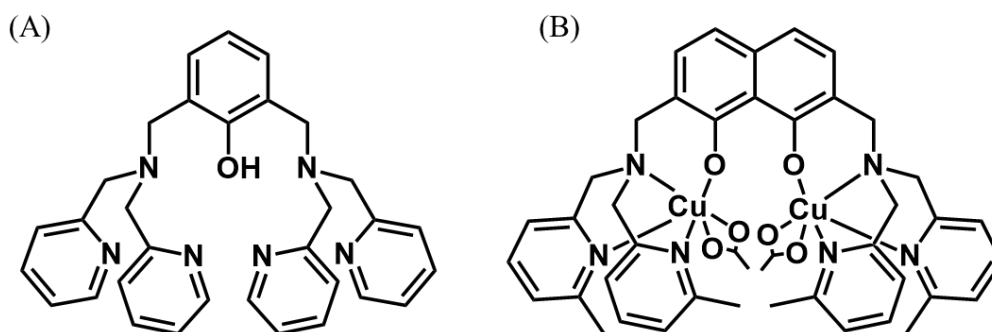


Figure 1-2. (A) Chemical structure of $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{bcmp})](\text{NO}_3)_2$. (B) The results of DNA cleavage by the complex. Agarose gel electrophoresis patterns of SC pUC19 DNA incubated with the complex in Tris buffer at 37°C for 3 h. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA + 5 μM complex; lane 3: DNA + 25 μM complex; lane 4: DNA + 50 μM complex.

フェノールの 2,6 位に di(2-pyridylmethyl)amine を持つ Robson 型配位子(Chart 1-4 (A))の二核金属錯体はリン酸エステルと容易に結合し、そのリン酸エステルを切断することから酵素模倣モデル金属錯体として大きな注目を集めてきた^[40]。Glaser らは、この Robson 型配位子を改良し、銅-銅間距離を長くして隣接する 2 つのリン酸エステルと結合することで加水分解的 DNA 切断活性を向上させた二核銅(II)錯体 $[(\text{tom}^{\text{Me}})\{\text{Cu}(\text{OAc})\}_2]$ (Chart 1-4 (B))を報告している^[41]。この二核銅(II)錯体は、HeLa 細胞に対して高い細胞毒性を示し、その毒性は cisplatin よりも高いことが見出されている。

Chart 1-4. Chemical structures of Robson-type ligand (A) and [(tom^{Me}){Cu(OAc)}₂] (B)

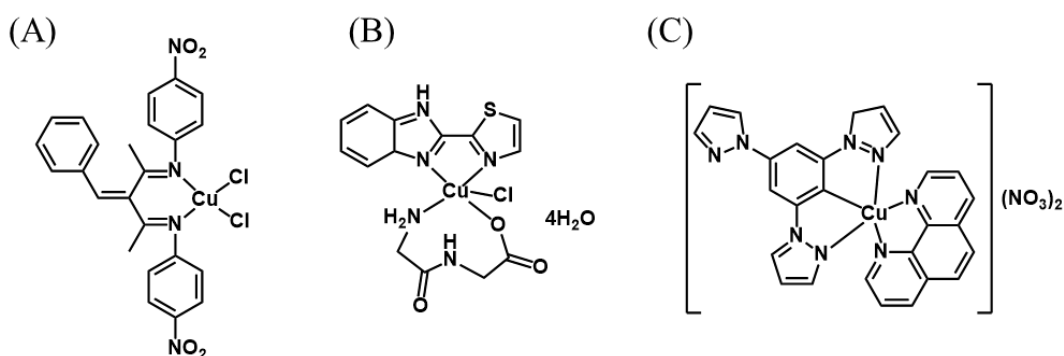


銅錯体は、加水分解的 DNA 切断活性だけでなく、酸化剤や還元剤存在下における酸化的 DNA 切断の研究に対しても大きな注目を集めてきた。その例の一部を [Table 1-1](#) 及び [Chart 1-5](#) に示す。

Table 1-1. Copper(II) complexes which have cleavage ability of plasmid DNA

Complex	plasmid DNA cleavage	DNA scission activators implicated	Reference
[CuL ¹ Cl ₂]	Oxidative	Hydroxyl radical	42
[Cu(Gly-Gly)(TBZ)(Cl)]•4H ₂ O	Oxidative	Hydroxyl radical	43
[Cu(phen)L](NO ₃) ₂	Oxidative	Singlet oxygen	44

Chart 1-5. Chemical structures of copper(II) complexes described in Table 1-1



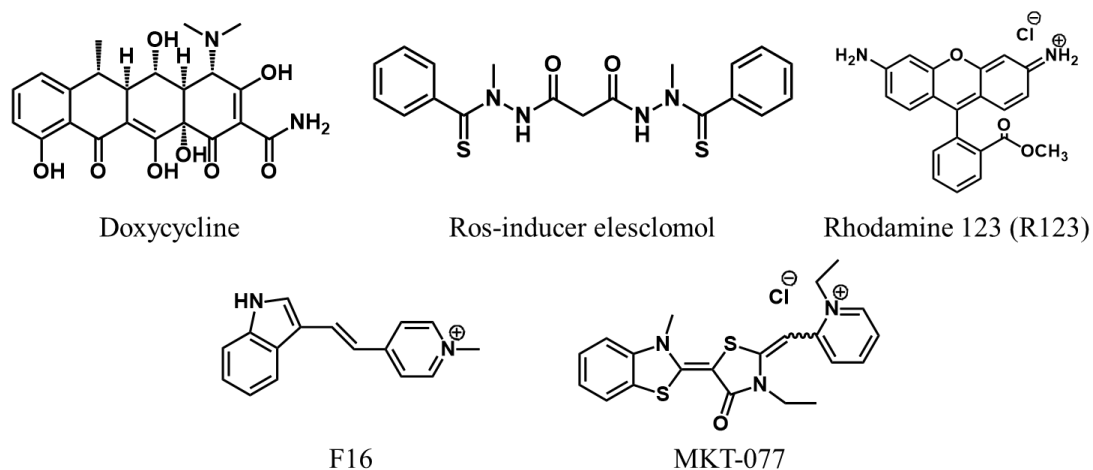
Raman らは、[CuL¹Cl₂] (L1; Knoevenagel condensate β-diketimine Schiff base ligand) ([Chart 1-5\(A\)](#))が過酸化水素存在下において酸化的 DNA 切断活性を示し、ヒドロキシラジカルが DNA 切断の酸化活性種であると結論付けている^[42]。また、HeLa, Hep-2, HepG-2 及び MCF-7 細胞株に対して、cisplatin と同程度の細胞毒性を示すことも明らかにしている。Le らは、[Cu(Gly-Gly)(TBZ)(Cl)]•4H₂O (TBZ = 2-(4'-thiazolyl)benzimidazole) ([Chart 1-5\(B\)](#))は、アスコルビン酸ナトリウム存在下においてヒドロキシラジカルを生成し、プラスミド

DNA を切断することを見出した^[43]. この銅(II)錯体はスーパーオキシド消去剤として働くため, HeLa, A549, HepG-2 細胞株に対しては IC₅₀ 値が 33 μM–100 μM と低い細胞毒性しか示さないことが明らかになっている. Tabassum らは, [Cu(phen)L](NO₃)₂ (L; derived from pharmacophore scaffold barbituric acid and pyrazole) (Chart 1-5(C))が, 静電相互作用によって DNA と結合し, 一重項酸素を酸化活性種として DNA 切断を引き起こすことを報告している^[44]. この銅(II)錯体は Topoisomerase-I を低濃度で阻害する能力を有しており, また様々ながん細胞株に対して高い細胞毒性を発現することも見出されている. このように, 銅錯体は様々な酸化活性種を生成することで DNA 切断や高い細胞毒性を発現することが見出されてきた. しかしながら, がん細胞選択的に細胞毒性を示す銅錯体の報告例は極めて少なく, 現在でも多くの研究がなされている.

1-3-3. ミトコンドリアを標的にした金属錯体

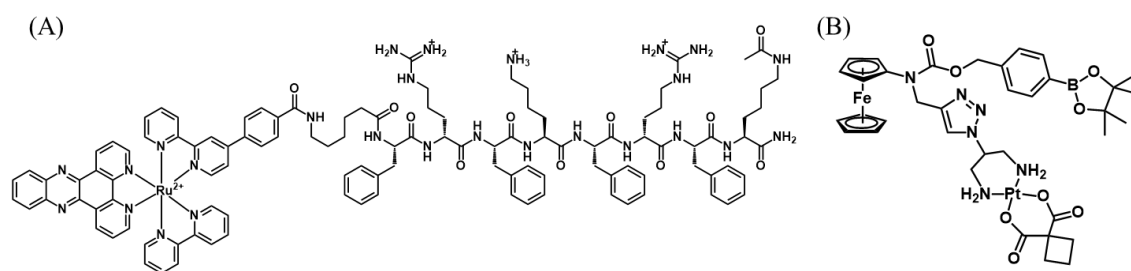
抗がん剤によるがん治療の長期的な使用により, がん細胞は変異して耐性を獲得するため, 抗がん剤が効かなくなることが問題点になっている. この問題点に対して, 近年では, ATP やヌクレオチドの合成, 代謝過程の調節, 細胞シグナル, 遺伝子発現といった生化学プロセスに必要なミトコンドリアを標的にした抗がん剤の開発が盛んに行われている^[45]. その中には, 抗生物質の doxycycline^[46], ROS 誘導剤の elesclomol^[47], 染色剤として使用されている rhodamine 123 (R123)^[48], MKT-077^[49]や N-メチル化ピリジン誘導体の F16^[50] (Chart 1-6)などが含まれているが, 副作用や低い効力といった問題から, 実用化には至っていない.

Chart 1-6. The candidates of mitochondria-target anticancer drugs



近年では、同様の着眼点からミトコンドリアをターゲットにした金属錯体の開発が盛んに行われている。Keyesらは、ルテニウムポリピリジル錯体にミトコンドリア膜透過ペプチド(mitochondria penetrating peptide, MPP)を導入した錯体(Chart 1-7(A))がミトコンドリアに局在化し、光照射することでミトコンドリア DNA を切断して細胞毒性を示すことを報告している^[51]。また、Mokhirらは、正常細胞とがん細胞の選択性を持たせるため、ミトコンドリアキャリアーとして *N*-carboxyloxymethylphenylboronic acid pinacol ester を導入したフェロセン誘導体プロドラッグ(Chart 1-7(B))を合成した^[52]。細胞内可視化実験を行った結果、このプロドラッグはミトコンドリアに局在化した後、がん細胞内で比較的多く発現している過酸化水素と反応することで活性型に変化することが明らかになった。また、A2780 細胞に対しては cisplatin と同程度の細胞毒性を、また cisplatin 耐性細胞 A2780cis に対しては cisplatin よりも高い細胞毒性を示し、正常細胞には毒性を示さないことを報告している。その他にも、イリジウム錯体などもミトコンドリア標的の抗がん剤として盛んに研究が行われている^[53]。

Chart 1-7. Chemical structures of mitochondria-target metal complexes



1-3-4. 小胞体及びゴルジ体を標的にした抗がん剤の研究

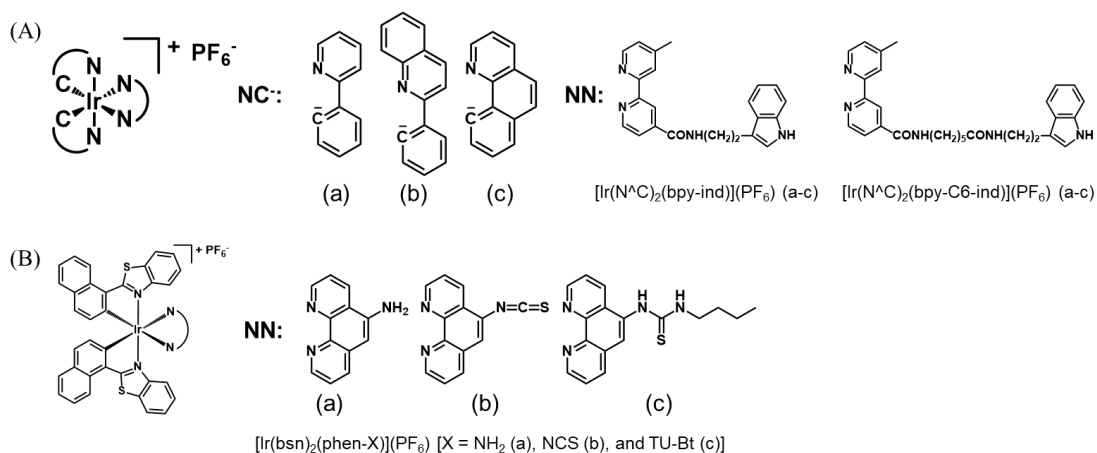
小胞体またはゴルジ体に局在化する金属錯体は、主にプローブとしての研究例が多い。中でもイリジウム(III)錯体がよく用いられており、正電荷を持つ金属錯体は小胞体またはゴルジ体に局在化して高い細胞毒性を示す。一方、中性の金属錯体は長時間のインキュベーションを行った際でも低い細胞毒性しか示さないという知見が得られている^[40]。以下に、イリジウム(III)錯体の研究例を示す。

1-3-4-1. 小胞体に局在化するイリジウム(III)錯体^[54]

Loらによって報告されたインドール部位が配位したイリジウム(III)錯体は、小胞体プローブとして用いられている金属錯体の最初の例である(Chart 1-8(A))^[55]。インドールが用いられている理由としては、6つの特定の基質結合部位を有する血清アルブミンなどのタンパク質との結合特性を有するからである^[56]。これらの金属錯体はがん細胞のHeLa細胞に対して高い細胞毒性を示し、そのIC₅₀値は48時間後に1.1–6.3 μMであることが示され、また[Ir(N[∧]C)₂(bpy-C6-ind)](PF₆)₃ (c)は核周辺にも局在化することが明らか

になっている^[55]. Lo らは, 1,10-phenanthroline が配位したイリジウム(III)錯体が, ウシ血清アルブミンやヒト血清アルブミンなどのタンパク質とバイオコンジュゲートできる唯一のプロープであることを報告した(Chart 1-8(B))^[57]. これら金属錯体の HeLa 細胞内における分布は全て同じであり, 核を取り囲むように発光リングが形成されることが見出され, また, IC₅₀ 値は 48 時間後に 1.0–4.2 μM であり, 高い細胞毒性を発現することが示されている^[57].

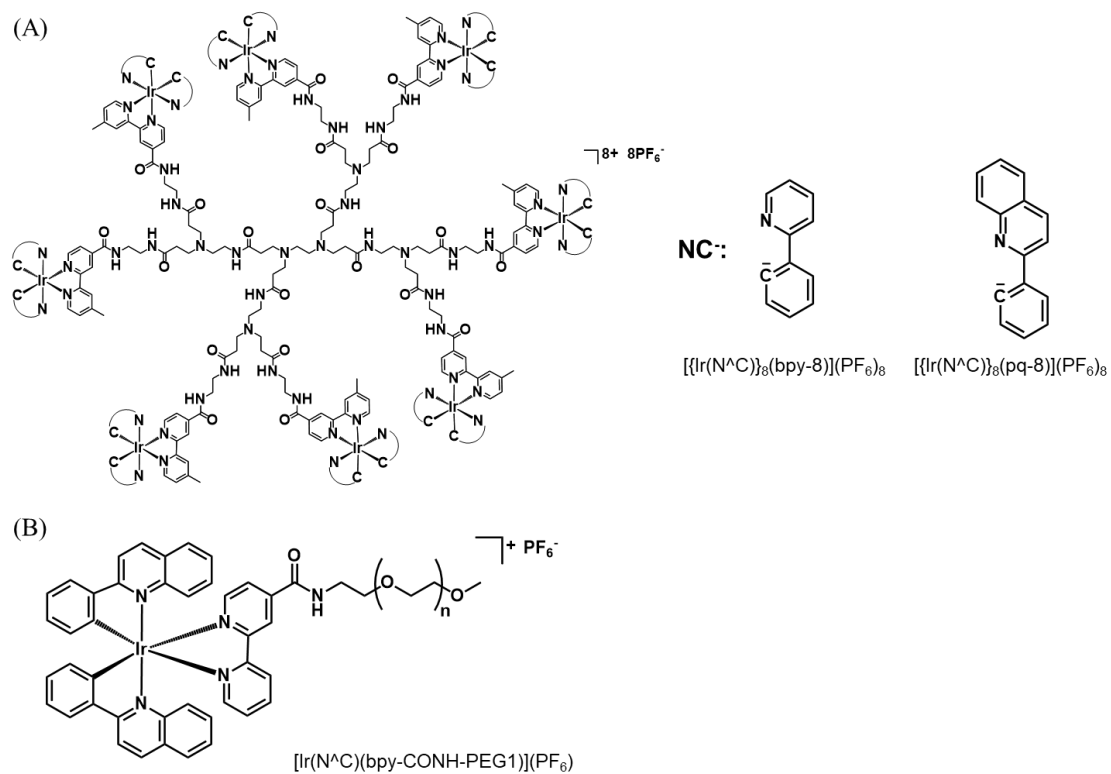
Chart 1-8. Chemical structures of Iridium(III) complexes proposed for localizing in endoplasmic reticulum



1-3-4-2. ゴルジ体に局在化するイリジウム(III)錯体

Zhang らは, 樹状イリジウム(III)ポリピリジン錯体を合成し, その性質を詳細に検討した(Chart 1-9(A))^[58]. その結果, HeLa 細胞内の分布では核周辺及びゴルジ体に局在化していることが明らかになり, また, IC₅₀ 値は 48 時間後に 1.4–2.1 μM であり, 高い細胞毒性を有していることが示された. Lo らは, 配位子に PEG 鎖を導入したイリジウム(III)錯体を開発し, PEG 鎖の長さを変化させることで細胞毒性などの生物学的特性を調節できることを報告した(Chart 1-9(B))^[59]. [Ir(N^C)(bpy-CONH-PEG1)](PF₆)は, HeLa 細胞に対する IC₅₀ 値が 565.9 μM (48 時間)であり, 低い細胞毒性を示すことから, 小胞体またはゴルジ体に対するプロープとして有用であることが見出されている.

Chart 1-9. Chemical structures of Iridium(III) complexes proposed for localizing in Golgi apparatus



1-4. 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(II)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、*p*-cresol の 2,6 位に tacn (1,4,7-triazacyclononane), Me₂tacn (1,4,7-triaza-4,7-dimethylcyclononane), cyclen (1,4,7,10-tetraazacyclododecane) を methylene-tether で導入した 3 種類の二核化配位子 2,6-bis(1,4,7-triazacyclononylmethyl)-4-methylphenol (Hbcmp), 2,6-bis(1,4,7-triaza-4,7-dimethylcyclononylmethyl)-4-methylphenol (HMe₄bcmp), 2,6-bis(1,4,7,10-tetraazacyclododecylmethyl)-4-methylphenol (Hbcc) の二核銅錯体 [Cu₂(μ-X)(bcmp)](ClO₄)₂ [X = OH (**1a**) and Cl (**1b**)], [Cu₂(μ-OH)(Me₄bcmp)](ClO₄)₂ (**2**), 及び [Cu₂(bcc)](ClO₄)₃ (**3**) を合成し、その構造を様々な分光学的測定によって明らかにした。また、これら金属錯体の加水分解的 DNA 切断活性の pH 依存性を詳細に検討した。さらに、DNA 結合能測定、DNA binder を用いた DNA 切断阻害実験などの結果を併せて pH 依存的 DNA 切断の推定機構を提案した。

第三章では、*p*-cresol から誘導される新たな amide-tether 型配位子 2,6-bis(1,4,7,10-tetraazacyclododecyl-1-carboxamide)-*p*-cresol (Hbcamide) 及びその二核銅(II)錯体 [Cu₂(μ-OH)(bcamide)]²⁺ (**4**) を合成し、その構造を様々な分光学的測定によって明らかにした。また、過酸化水素存在下における **4** の酸化的 DNA 切断活性について詳細に検討した。**4** は過酸化水素と反応することで μ-1,1-hydroperoxo species (**5**) を生成し、これが酸化的 DNA 切断の直接的な活性種であることを明らかにした。がん細胞の HeLa 細胞に対する細胞毒性を MTT assay によって評価した結果、**4** は **3** と比較して約 1.6 倍高い細胞毒性を示したことから、*p*-cresol の 2,6 位にペンダント基を amide-tether で導入する手法に対する有益な知見が得られた。

第四章では、*p*-cresol の 2,6 位に di(2-pyridylmethyl)amine (dpa) 三座配位子を amide-tether で導入した新規二核化配位子 HL1^{4+H} (2,6-bis[*N,N*-di(2-pyridylmethyl)carboxamido]-*p*-cresol) 及びその二核銅(II)錯体 [Cu₂(μ-OH₂)(μ-1,3-OAc)(L1^{4+H})](ClO₄)₂ (**6**), [Cu₂(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L1^{4+H})]X [X = ClO₄ (**7a**) and OAc (**7b**)] を合成し、様々な分光学的測定によってこれらの構造を明らかにした。**7b** は、中性付近の pH で過酸化水素を活性化して酸化的 DNA 切断活性を大きく加速するとともに、関連する錯体の中では高い細胞毒性を示し、がん細胞選択的に細胞死を導くことが見出された。これらの活性は、対応する methylene-tether 型錯体 [Cu₂(μ-OH)(bpmp)]²⁺ (**8**) (Hbpmp = 2,6-bis[di(2-pyridylmethylaminomethyl)]-*p*-cresol) と比較して高活性であった。細胞内挙動を可視化するため、**7b** を boron dipyrromethene (Bodipy) で修飾した新規二核銅(II)錯体 [Cu₂(μ-OAc)₂(L2^{4+H})](OAc) (**9**) を合成し、その細胞内挙動を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、**9** は核小体やミトコンドリアに局在することが明らかになった。また、フローサイトメトリーの測定結果から、**7b** は

HeLa 細胞をアポトーシス経路で細胞死に導くことが示された。これらの結果から、**7b** は細胞内で核小体やミトコンドリアに局在し、それぞれの RNA や DNA を切断してアポトーシスを誘導したと考えられる。また **7b** は、関連する錯体の中では高い細胞毒性を示し、がん細胞選択的に細胞死を導くことが見出された。

第五章では、**7b** の側鎖ピリジル基の 4 位に電子供与基として OMe 基を、電子求引基として Cl 基を導入した新規二核化配位子 HL1^{4-X} [X = OMe and Cl] とその二核銅(II)錯体 [Cu₂(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L1^{4-OMe})]X [X = PF₆ (**10a**) and OAc (**10b**)] 及び [Cu₂(μ-1,3-OAc)₂(L1^{4-Cl})]X [X = ClO₄ (**11a**) and OAc (**11b**)] を合成し、単結晶 X 線構造解析や様々な分光学的測定によって構造を決定した。HeLa 細胞に対する細胞毒性を MTT assay によって評価したところ、**10b** 及び **11b** は **7b** と比較して約 7 倍及び 5 倍高い細胞毒性を示した。また、ヒト肺・膵臓細胞を用いた細胞毒性を評価した結果、**10b** 及び **11b** はがん細胞選択的に細胞毒性を及ぼすことが明らかになった。これらの錯体の細胞内挙動を可視化するため、**10b** 及び **11b** を Bodipy で修飾した新規二核銅錯体 [Cu₂(μ-OAc)₂(L2^{4-X})]⁺ [X = OMe (**12**) and Cl (**13**)] を合成し、その細胞内挙動を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、**12** 及び **13** は核やミトコンドリアではなく、ゴルジ体や小胞体に局在することが明らかになった。これらの結果、**10b** や **11b** はゴルジ体や小胞体において、ストレス応答を誘導して細胞毒性を発現していることが示唆された。

第六章では、**7b**, **10b** 及び **11b** を用いて、過酸化水素及び還元剤存在下での DNA 切断活性を評価した。これらの錯体は中性付近の pH で過酸化水素を活性化してスーパーコイルドプラスミド DNA の酸化切断を大きく加速することが見出され、電子求引基を持つ **11b** が最も高い活性を示した。また、還元剤存在下で DNA 切断実験では、これらの錯体は過酸化水素を酸化剤とする反応よりもはるかに高い DNA 切断活性を示した。特に、測定開始 1 分後には DNA Form III がそれぞれ 30, 57, 21% 生成することが明らかになり、電子供与基を持つ **10b** が最も高い活性を示した。この活性は、**7b** に対応する methylene-tether 錯体 **8** や、ブレオマイシンの活性中心を模倣した N4Py (*N,N*-bis(2-pyridylmethyl)-*N*-bis(2-pyridyl)methylamine) 配位子の単核鉄(II)錯体 [Fe(N4Py)(MeCN)]²⁺ (**14**) と比較して非常に高いことが見出された。

第七章では、以上の結果を総括としてまとめ、今後の展望について言及した。

1-5. 参考文献

- [1] (a) Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siefel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. (b) Parkin, M.; Bray, F.; Ferlay, J.; Pisani, P. Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.* **2005**, *55*, 74–108. (c) Jemal, A.; Bray, F.; Center, M. M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 69–90. (d) Torre, L. A.; Bray, F.; Siegel, R. L.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J.; Jemal, A. Global cancer statistics, 2012. *CA cancer J. Clin.* **2015**, *65*, 87–108.
- [2] Warburg, O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* **1956**, *123*, 309–314.
- [3] (a) Gillies, R. J.; Raghunand, N.; Karczmar G. S.; Bhujwalla, Z. M. MRI of the tumor microenvironment. *J. Magn. Reson. Imaging* **2002**, *16*, 430–450. (b) Lin, H.-J.; Herman, P.; Lakowicz, J. R. Fluorescence lifetime-resolved pH imaging of living cells. *Cytometry A* **2003**, *52*, 77–89. (c) Kato, Y.; Ozawa, S.; Miyamoto, C.; Maehata, Y.; Suzuki, A.; Maeba, T. Baba Y. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int.* **2013**, *13*:89.
- [4] (a) Boveris, A. Mitochondrial Production of Superoxide Radical and Hydrogen Peroxide. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1977**, *78*, 67–82. (b) Chance, B.; Sies, H.; Boveris, A. Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs. *Physiol. Rev.* **1979**, *59*, 527–605. (c) Forman, H. J.; Kennedy, J. A. Role of superoxide radical in mitochondrial dehydrogenase reactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1974**, *60*, 1044–1050. (d) Forman, H. J.; Kennedy, J. A. Superoxide production and electron transport in mitochondrial oxidation of dihydroorotic acid. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 4322–4326. (e) Fridovich, I. The biology of oxygen radicals. *Science* **1978**, *201*, 875–880. (f) Balaban, R. S.; Nemoto, S.; Finkel, T. Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell* **2005**, *120*, 483–495. (g) Finkel, T.; Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **2000**, *408*, 239–247.
- [5] Zhou, D.; Shao, L.; Spitz, R. Reactive Oxygen Species in Normal and Tumor Stem Cells. *Adv. Cancer Res.* **2014**, *122*, 1–67.
- [6] (a) Ahmad, I. M.; Aykin-Burns, N.; Sim, J. E.; Walsh, S. A.; Higashikubo, R.; Buettner, G. R.; Venkataraman, S.; Mackey, M. A.; Flanagan, S. W.; Oberley, L. W.; Spitz, D. R. Mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 Mediate Glucose Deprivation-induced Stress in Human Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 4254–4263. (b) Boveris, A.; Cadenas, E. Production of superoxide in mitochondria. *Superoxide Dismutase*; CRC Press, Boca Raton, **1982**, 15–30.
- [7] Schieber, M.; Chandel, N. S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr. Biol.* **2014**, *24*, R453–R462.
- [8] Aykin-Burns, N.; Ahmad, I. M.; Zhu, Y.; Oberley, L. W.; Spitz, D. R. Increased levels of superoxide and H_2O_2 mediate the differential susceptibility of cancer versus normal cells to glucose deprivation. *Biochem. J.* **2009**, *418*, 29–37.

- [9] (a) Aykin-Burns, N.; Slane, B. G.; Liu, A. T.; Owens, K. M.; O'Malley, M. S.; Smith, B. J.; Domann, F. E.; Spitz, D. R. Sensitivity to Low-Dose/Low-LET Ionizing Radiation in Mammalian Cells Harboring Mutations in Succinate Dehydrogenase Subunit C is Governed by Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species. *Radiat. Res.* **2011**, *175*, 150–158. (b) Ishii, N.; Fujii, M.; Hartman, P. S.; Tsuda, M.; Yasuda, K.; Senoo-Matsuda, N.; Yanase, S.; Ayusawa, D.; Suzuki, K. A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome *b* causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature* **1998**, *394*, 694–697. (c) Owens, K. M.; Aykin-Burns, N.; Dayal, D.; Coleman, M. C.; Domann, F. E.; Spitz, D. R. Genomic instability induced by mutant succinate dehydrogenase subunit D (SDHD) is mediated by $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 . *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *52*, 160–166. (d) Slane, B. G.; Aykin-Burns, N.; Smith, B. J.; Kalen, A. L.; Goswami, P. C.; Domann, F. E.; Spitz, D. R. Mutation of Succinate Dehydrogenase Subunit C Results in Increased $O_2^{\cdot-}$, Oxidative Stress, and Genomic Instability. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 7615–7620.
- [10] (a) Sullivan, L. B.; Chandel, N. S. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab.* **2014**, *2*:17. (b) Gorrini, C.; Harris, I.; Mak, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 931–947.
- [11] King, A. P.; Wilson, J. J. Endoplasmic reticulum stress: an arising target for metal-based anticancer agents. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, in press.
- [12] (a) Liu, Y.; Ye, Y. Proteostasis regulation at the endoplasmic reticulum: a new perturbation site for targeted cancer therapy. *Cell. Res.* **2011**, *21*, 867–883. (b) Schwarz, D. S.; Blower, M. D. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 79–94. (c) Ellgaard, L.; Helenius, A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 181–191.
- [13] Gadhave, K.; Bolshette, N.; Ahire, A.; Pardeshi, R.; Thakur, K.; Trandafir, C.; Istrate, A.; Ahmed, S.; Lahkar, M.; Muresanu, D. F.; Balea, M. The ubiquitin proteasomal system: a potential target for the management of Alzheimer's disease. *J. Cell. Mol. Med.* **2016**, *20*, 1392–1407.
- [14] (a) Soave, C. L.; Guerin, T.; Liu, J.; Dou, Q. P. Targeting ubiquitin-proteasome system for cancer treatment: discovering novel inhibitors from nature and drug repurposing. *Cancer Metastasis Rev.* **2017**, *36*, 717–736. (b) Borg, N. A.; Dixit, V. M. Ubiquitin in Cell-Cycle Regulation and Dysregulation in Cancer. *Annu. Rev. Cancer Biol.* **2017**, *1*, 59–77.
- [15] (a) Jacquemyn, J.; Cascalho, A.; Goodchild, R. E. The ins and outs of endoplasmic reticulum-controlled lipid biosynthesis. *EMBO Rep.* **2017**, *18*, 1905–1921. (b) Raffaello, A.; Mammucari, C.; Gherardi, G.; Rizzuto, R. Calcium at the Center of Cell Signaling: Interplay between Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Lysosomes. *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41*, 1035–1049.
- [16] Santini, C.; Pellei, M.; Gandin, V.; Porchia, M.; Tisato, F.; Marzano, C. Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 815–862.
- [17] (a) Hambley, T. W. Developing new metal-based therapeutics: challenges and opportunities.

- Dalton Trans.* **2007**, 4929–4937. (b) Orvig, C.; Abrams, M. J. Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2201–2203. (c) Thompson, K. H.; Orvig, C. Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design. *Dalton Trans.* **2006**, 761–764.
- [18] Oun, R.; Moussa, Y. E.; Wheate, N. J. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans.* **2018**, *47*, 6645–6653.
- [19] (a) Johnstone, T. C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S. J. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 3436–3486. (b) Rosenberg, B. Fundamental studies with cisplatin. *Cancer* **1985**, *55*, 2303–2316.
- [20] Cleare, M. J.; Hoeschele, J. D. Studies on the Antitumor Activity of Group VIII Transition Metal Complexes. Part I. Platinum(II) Complexes. *Bioinorg. Chem.* **1973**, *2*, 187–210.
- [21] Kidani, Y.; Inagaki, K.; Iigo, M.; Hoshi, A.; Kuretani, K. Antitumor activity of 1,2-diaminocyclohexaneplatinum complexes against Sarcoma-180 ascites form. *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 1315–1318.
- [22] Mckeage, M. J. Lobaplatin: a new antitumor platinum drug. *Expert Opin. Investg. Drugs* **2001**, *10*, 119–128.
- [23] Hanada, M.; Baba, A.; Tsutsumishita, Y.; Noguchi, T.; Yamaoka, T. Intra-hepatic arterial administration with miriplatin suspended in an oily lymphographic agent inhibits the growth of human hepatoma cells orthotopically implanted in nude rats. *Cancer Sci.* **2009**, *100*, 189–194.
- [24] Shimada, M.; Itamochi, H.; Kigawa, J. Nedaplatin: a cisplatin derivative in cancer chemotherapy. *Cancer Manag. Res.* **2013**, *5*, 67–76.
- [25] (a) Kalayda, G. V.; Wagner, C. H.; Jaehde, U. Relevance of copper transporter 1 for cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *116*, 1–10. (b) Liang, Z. D.; Long, Y.; Chen, H. H. W.; Savaraj, N.; Kuo, M. T. Regulation of the high-affinity copper transporter (hCtr1) expression by cisplatin and heavy metals. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2014**, *19*, 17–27.
- [26] Umezawa, H.; Maeda, K.; Takeuchi, T.; Okami, Y. New antibiotics, bleomycin A and B. *J. Antibiot.* **1966**, *19*, 200–209.
- [27] (a) Decker, A.; Chow, M. S.; Kemsley, J. N.; Lehnert, N.; Solomon, E. I. Direct Hydrogen-Atom Abstraction by Activated Bleomycin: An Experimental and Computational Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4719–4733. (b) Liu, L. V.; Bel III, C. B.; Wong, S. D.; Wilson, S. A.; Kwak, Y.; Chow, M. S.; Zhao, J.; Hodgson, K. O.; Hedman, B.; Solomon, E. I. Definition of the intermediates and mechanism of the anticancer drug bleomycin using nuclear resonance vibrational spectroscopy and related methods. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 22419–22424.
- [28] (a) Chen, J.; Stubbe, J. Bleomycin: towards better therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 102–112. (b) Galm, U.; Hager, M. H.; Lanen, S. G. V.; Ju, J.; Thorson, J. S.; Shen, B. Antitumor Antibiotics: Bleomycin, Eneidyne, and Mitomycin. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 739–758. (c) Hecht,

- S. M. Bleomycin: New Perspectives on the Mechanism of Action. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 158–168. (d) Einhorn, L. H. Curing metastatic testicular cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *99*, 4592–4595. (e) Sleijfer, S. Bleomycin-Induced Pneumonitis. *Chest* **2001**, *120*, 617–624. (f) Huang, S.-X.; Feng, Z.; Wang, L.; Galm, U.; Wendt-Pienkowski, E.; Yang, D.; Tao, M.; Coughlin, J. M.; Duan, Y.; Shen, B. A Designer Bleomycin with Significantly Improved DNA Cleavage Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13501–13509.
- [29] Lubben, M.; Meetsma, A.; Wilkinson, E. C.; Feringa, B.; Que, L. Nonheme Iron Centers in Oxygen Activation: Characterization of an Iron(III) Hydroperoxide Intermediate. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1512–1514.
- [30] (a) van der Berg, T. A.; Feringa, B. L.; Roelfes, G. Double strand DNA cleavage with a binuclear iron complex. *Chem. Commun.* **2007**, 180–182. (b) Li, Q.; van der Berg, T. A.; Feringa, B. L.; Roelfes, G. Mononuclear Fe(II)-N4Py complexes in oxidative DNA cleavage: structure, activity and mechanism. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 8012–8021.
- [31] (a) Kraatz, H.-B.; Metzler-Nolte, N.; *Concepts and Models in Bioinorganic Chemistry*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2006**. (b) Lippard, S. J.; Berg, J. M. *Principles of Bioinorganic Chemistry*; University Science Books: Mill Valley, CA, **1994**. (c) Frausto da Silva, J. J. R.; Williams, R. J. P. *The Biological Chemistry of the Elements*; Clarendon: Oxford, U. K., **1991**.
- [32] (a) Wang, T.; Guo, Z. Copper in Medicine: Homeostasis, Chelation Therapy and Antitumor Drug Design. *J. Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 525–537. (b) Lönnnerdal, B. *Am. J. Clin. Nutr.* **1996**, *63*, 821S–829S. (c) Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M. T. D. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 1161–1208.
- [33] (a) Tapiero, H.; Townsend, D. M.; Tew, K. D. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomed. Pharmacother.* **2003**, *57*, 386–398. (b) Hellman, N. E.; Gitlin, J. D. Ceruloplasmin Metabolism and Function. *Annu. Rev. Nutr.* **2002**, *22*, 439–458. (c) Linder, M. C.; Wooten, L.; Cerveza, P.; Cotton, S.; Shulze, R.; Lomeli, N. Copper transport. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *67*, 965S–971S.
- [34] (a) Kim, B.-E.; Nevitt, T.; Thiele, D. J. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 176–185. (b) Arredondo, M.; Núñez, M. T. Iron and copper metabolism. *Mol. Aspects Med.* **2005**, *26*, 313–327. (c) Gupte, A.; Mumper, R. J. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat. Rev.* **2009**, *35*, 32–46.
- [35] Labbé, S.; Thiele, D. J. Pipes and wiring: the regulation of copper uptake and distribution in yeast. *Trends Microbiol.* **1999**, *7*, 500–505.
- [36] (a) Diez, M.; Arroyo, M.; Cerdán, F. J.; Muñoz, M.; Martín, M. A.; Balibrea, J. L. Serum and Tissue Trace Metal Levels in Lung Cancer. *Oncology* **1989**, *46*, 230–234. (b) Geraki, K.; Farquharson, M. J.; Bradley, D. A. Concentrations of Fe, Cu and Zn in breast tissue; a synchrotron

- XRF study. *Phys. Med. Biol.* **2002**, *47*, 2327–2340. (c) Yoshida, D.; Ikeda, Y.; Nakazawa, S. Quantitative analysis of copper, zinc and copper/zinc ratio in selected human brain tumors. *J. Neurooncol.* **1993**, *16*, 109–115. (d) Nayak, S. B.; Bhat, V. R.; Upadhyay, D.; Udupa, S. L. Copper and Ceruloplasmin Status in Serum of Prostate and Colon Cancer Patients. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **2003**, *47*, 108–110.
- [37] (a) Brewer, G. J. Copper Control as an Antiangiogenic Anticancer Therapy: Lessons from Treating Wilson’s Disease. *Exp. Biol. Med.* **2001**, *226*, 665–673. (b) Eatock, M. M.; Schätzlein, A.; Kaye, S. B. Tumour vasculature as a target for anticancer therapy. *Cancer Treat. Rev.* **2000**, *26*, 191–204. (c) Xie, H.; Kang, Y. J. Role of Copper in Angiogenesis and Its Medicinal Implications. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 1304–1314.
- [38] Hassouneh, B.; Islam, M.; Nagel, T.; Pan, Q.; Merajver, S. D.; Teknos, T. N. Tetrathiomolybdate promotes tumor necrosis and prevents distant metastases by suppressing angiogenesis in head and neck cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 1039–1045.
- [39] Montagner, D.; Gandin, V.; Marzano, C.; Erxleben, A. DNA damage and induction of apoptosis in pancreatic cancer cells by a new dinuclear bis(triazacyclonane) copper complex. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *145*, 101–107.
- [40] (a) Robson, R. Complexes of binucleating ligands I. Two novel binuclear cupric complexes. *Inorg. Nucl. Chem. Lett.* **1970**, *6*, 125–128. (b) Robson, R. Complexes of binucleating ligands. II. Geometrical models for potential nitrogen fixing systems. *Aust. J. Chem.* **1970**, *23*, 2217–2224. (c) Pilkington, N. H.; Robson, R. Complexes of binucleating ligands. III. Novel complexes of a macrocyclic binucleating ligand. *Aust. J. Chem.* **1970**, *23*, 2225–2236.
- [41] Jany, T.; Moreth, A.; Gruschka, C.; Sischka, A.; Spiering, A.; Dieding, M.; Wang, Y.; Samo, S. H.; Stammer, A.; Bögge, H.; Mollard, G. F. V.; Anselmetti, D.; Glaser, T. Rational Design of a Cytotoxic Dinuclear Cu₂ Complex That Binds by Molecular Recognition at Two Neighboring Phosphates of the DNA Backbone. *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 2679–2690.
- [42] Raman, N.; Pravin, N. Lasing the DNA fragments through β -diketimine framed Knoevenagel condensed Cu(II) and Zn(II) complexes – An *in vitro* and *in vivo* approach. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *118*, 867–882.
- [43] Fu, X.-B.; Zhang, J.-J.; Liu, D.-D.; Gan, Q.; Gao, H.-W.; Mao, Z.-W.; Le, X.-Y. Cu(II)-di-peptide complexes of 2-(4'-thiazolyl)benzimidazole: Synthesis, DNA oxidative damage, antioxidant and *in vitro* antitumor activity. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *143*, 77–87.
- [44] Tabassum, S.; Zaki, M.; Afzal, M.; Arjmand, F. Synthesis and characterization of Cu(II)-based anticancer chemotherapeutic agent targeting topoisomerase I α : *In vitro* DNA binding, pBR322 cleavage, molecular docking studies and cytotoxicity against human cancer cell lines. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *74*, 509–523.
- [45] Heiden, M. G. V.; DeBerardinis, R. J. Understanding the Intersections between Metabolism

and Cancer Biology. *Cell* **2017**, *168*, 657–669.

[46] Peiris-Pagès, M.; Sotgia, F.; Lisanti, M. P. Doxycycline and therapeutic targeting of the DNA damage response in cancer cells: old drug, new purpose. *Oncoscience* **2015**, *2*, 696–699.

[47] O’Day, S. J.; Eggermont, A. M. M.; Chiarion-Sileni, V.; Kefford, R.; Grob, J. J.; Mortier, L.; Robert, C.; Schachter, J.; Testori, A.; Mackiewicz, J.; Friedlander, P.; Garbe, C.; Ugurel, S.; Collichio, F.; Guo, W.; Lufkin, J.; Bahcall, S.; Vukovic, V.; Hauschild, A. Final Results of Phase III SYMMETRY study: Randomized, Double-Blind Trial of Elesclomol Plus Paclitaxel Versus Paclitaxel Alone As Treatment for Chemotherapy-Naive Patients With Advanced Melanoma. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 1211–1218.

[48] Modica-Napolitano, J. S.; Aprille, J. R. Basis for the Selective Cytotoxicity of Rhodamine 123. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 4361–4365.

[49] Britten, C. D.; Rowinsky, E. K.; Baker, S. D.; Weiss, G. R.; Smith, L.; Stephenson, J.; Rothenberg, M.; Smetzer, L.; Cramer, J.; Collins, W.; Hoff, D. D. V.; Eckhardt, S. G. A Phase I and Pharmacokinetic Study of the Mitochondrial-specific Rhodamine Dye Analog MKT 077. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 42–49.

[50] Fantin, V. R.; Berardi, M. J.; Scorrano, L.; Korsmeyer, S. J.; Leder, P. A novel mitochondriotoxic small molecule that selectively inhibits tumor cell growth. *Cancer Cell* **2002**, *2*, 29–42.

[51] Burke, C. S.; Byrne, A.; Keyes, T. E. Highly Selective Mitochondrial Targeting by a Ruthenium(II) Peptide Conjugate: Imaging and Photoinduced Damage of Mitochondrial DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 12420–12424.

[52] Reshetnikov, V.; Daum, S.; Janko, C.; Karawacka, W.; Tietze, R.; Alexiou, C.; Paryzhak, S.; Dumych, T.; Bilyy, R.; Tripal, P.; Schmid, B.; Palmisano, R.; Mokhir, A. ROS-Responsive N-Alkylaminoferrocenes for Cancer-Cell-Specific Targeting of Mitochondria. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 11943–11946.

[53] (a) Cao, J. J.; Tan, C.-P.; Chen, M.-H.; Wu, N.; Yao, D.-Y.; Liu, X.-G.; Ji, L.-N.; Mao, Z.-W. Targeting cancer cell metabolism with mitochondria-immobilized phosphorescent cyclometalated iridium(III) complexes. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 631–640. (b) McKenzie, L. K.; Sazanovich, I. V.; Baggaley, E.; Bonneau, M.; Guerschais, V.; Williams, J. A. G.; Weinstein, J. A.; Bryant, H. E. Metal Complexes for Two-Photon Photodynamic Therapy: A Cyclometallated Iridium Complex Induces Two-Photon Photosensitization of Cancer Cells under Near-IR Light. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 234–238. (c) Lv, W.; Zhang, Z.; Zhang, K. Y.; Yang, H.; Liu, S.; Xu, A.; Guo, S.; Zhao, Q.; Huang, W. A Mitochondria-Targeted Photosensitizer Showing Improved Photodynamic Therapy Effects Under Hypoxia. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 9947–9951. (d) Chen, M.-H.; Wang, F.-X.; Cao, J.-J.; Tan, C.-P.; Ji, L.-N.; Mao, Z.-W. Light-Up Mitophagy in Live Cells with Dual-Functional Theranostic Phosphorescent Iridium(III) Complexes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 13304–13314. (e) Liu, J.; Jin, C.; Yuan, B.; Liu, X.; Chen, Y.; Ji, L.; Chao, H. Selectively

lighting up two-photon photodynamic activity in mitochondria with AIE-active iridium(III) complexes. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 2052–2055. (f) Jin, C.; Liu, J.; Chen, Y.; Guan, R.; Ouyang, C.; Zhu, Y.; Ji, L.; Chao, H. Cyclometalated Iridium(III) Complexes as AIE Phosphorescent Probes for Real-Time Monitoring of Mitophagy in Living Cells. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 22039–22051.

[54] Caporale, C.; Massi, M. Cyclometalated iridium(III) complexes for life science. *Cood. Chem. Rev.* **2018**, *363*, 71–91.

[55] Lau, J. S.-Y.; Lee, P.-K.; Tsang, K. H.-K.; Ng, C. H.-C.; Lam, Y.-W.; Cheng, S.-H.; Lo, K. K.-W. Luminescent Cyclometalated Iridium(III) Polypyridine Indole Complexes—Synthesis, Photophysics, Electrochemistry, Protein-Binding Properties, Cytotoxicity, and Cellular Uptake. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 708–718.

[56] (a) McMenemy, R. H. Binding of indole analogues to human serum albumin. Effects of fatty acids. *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 4235–4243. (b) Bertuzzi, A.; Mingrone, G.; Gandolfi, A.; Greco, A. V.; Ringoir, S.; Vanholder, R. Binding of indole-3-acetic acid to human serum albumin and competition with L-tryptophan. *Clin. Chim. Acta* **1997**, *265*, 183–192.

[57] Lo, K. K.-W.; Leung, S.-K.; Pan, C.-Y. Luminescent iridium(III) arylbenzothiazole complexes: Photophysics, electrochemistry, bioconjugation, and cellular uptake. *Inorg. Chim. Acta* **2012**, *380*, 343–349.

[58] Zhang, K. Y.; Liu, H.-W.; Fong, T. T.-H.; Chen, X.-G.; Lo, K. K.-W. Luminescent Dendritic Cyclometalated Iridium(III) Polypyridine Complexes: Synthesis, Emission Behavior, and Biological Properties. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 5432–5443.

[59] Li, S. P.-Y.; Liu, H.-W.; Zhang, K. Y.; Lo, K. K.-W. Modification of Luminescent Iridium(III) Polypyridine Complexes with Discrete Poly(ethylene glycol) (PEG) Pendants: Synthesis, Emissive Behavior, Intracellular Uptake, and PEGylation Properties. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 8329–8339.

第二章：*p*-cresol から誘導された二核化配位子の二核銅(II)錯体による弱酸性 pH 領域で加速される加水分解的 DNA 切断とその推定機構

2-1. 要約

p-cresol 誘導体配位子である 2,6-bis(1,4,7-triazacyclononylmethyl)-4-methylphenol (Hbcmp), 2,6-bis(1,4,7-triaza-4,7-dimethylcyclononylmethyl)-4-methylphenol (HMe₄bcmp), 2,6-bis(1,4,7,10-tetraazacyclododecylmethyl)-4-methylphenol (Hbcc) の二核銅(II)錯体 [Cu₂(μ-X)(bcmp)](ClO₄)₂ [X = OH (**1a**) and X = Cl (**1b**)], [Cu₂(μ-OH)(Me₄bcmp)](ClO₄)₂ (**2**), 及び [Cu₂(bcc)](ClO₄)₃ (**3**) をそれぞれ合成し, DNA の加水分解による切断活性を調査した. **1a**, **1b**, **2** 及び **3** の結晶構造は, 単結晶 X 線構造解析によって決定した. 固体中の **1a**, **1b**, **2** 及び **3** の二核銅中心構造が pH 5–9 の水溶液中において維持されていることが各配位子と過塩素酸銅(II)との錯形成過程の pH 滴定及び分光学的測定によって明らかになった. **1a**, **2** 及び **3** の DNA 結合能を等温滴定型熱量(ITC)測定によって測定した. DNA 切断実験は, スーパーコイルドプラスミド pUC19 DNA を用いて行った. **1a** は, pH 5–6 の範囲で加水分解的 DNA 切断を大きく加速するが, pH 7–8 の範囲では切断活性を示さなかった. 本研究は, 二核銅(II)錯体による pH 依存的 DNA 切断についての初めての例である. 特異的な DNA binder である 4',6-diamidino-2-phenylindole 及び methyl green を用いた阻害実験から, **1a** は GC 特異的な結合を通して DNA 切断を大きく加速することが示唆された. pH 依存的 DNA 切断の推定機構を, **1a**, **1b**, **2** 及び **3** の結晶構造, 水溶液中の構造, DNA 結合モデル, 及び DNA 切断活性に基づいて提案した.

Masahito Kodera, Yuki Kadoya, Kenta Aso, Katsuki Fukui, Akiko Nomura, Yutaka Hitomi, and Hiroaki Kitagishi “Acceleration of Hydrolytic DNA Cleavage by Dicopper(II) Complexes with *p*-Cresol-Derived Dinucleating Ligands at Slightly Acidic pH and the Mechanistic Insights” (Selected Paper) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2019**, *92*, 729–747.

2-2. 緒言

近年、DNA と結合してこれを切断し、複製を妨げる金属錯体の開発が注目されている^[1]. cisplatin^[2]やその誘導体である oxaliplatin^[3], lobaplatin^[4], nedaplatin^[5]のような様々な白金(II)錯体が抗がん剤として使用されているが、これらの抗がん剤は深刻な副作用を伴うことや薬剤耐性が問題となっている。そこで、選択的にがん細胞の DNA と結合して切断できる金属錯体の開発が求められている。

がん細胞の微小環境は正常細胞と比較して幾つかの点で異なることが知られている^[6]. その1つとして、がん細胞周辺の pH が酸性であることが挙げられる^[7]. この主な原因は好気性解糖である。その一方で、がん細胞内の pH は中性から塩基性の範囲にある^[7]. 加水分解的 DNA 切断活性を有する様々な二核金属錯体が、新しいタイプの抗がん剤の開発を目的として合成されてきた^[1a-c,8]. Montagner らは、Hbcmp 配位子の二核銅(II)錯体[Cu₂(μ-OH)(bcmp)](NO₃)₂ (**1c**) (Figure 2-1(A))が pH 8.2 においてスーパーコイルドプラスミド pUC19 DNA を加水分解的に切断(Figure 2-1(B))し、アポトーシス経路で高い細胞毒性を示すことを報告した^[9]. しかしながら、**1c** による加水分解的 DNA 切断の pH 依存性は報告されていない。金属錯体の pH 依存的 DNA 切断によってがん細胞選択的にアポトーシスを起こすことは、がん細胞特異的であり、副作用が少ない抗がん剤の開発に対して望ましい。加水分解的 DNA 切断が、がん細胞の DNA 修復酵素によって可逆的であるとしても、pH に依存する加水分解的 DNA 切断は、抗がん剤の開発と同様に DNA 切断の新たなコンセプトを提供する可能性がある。

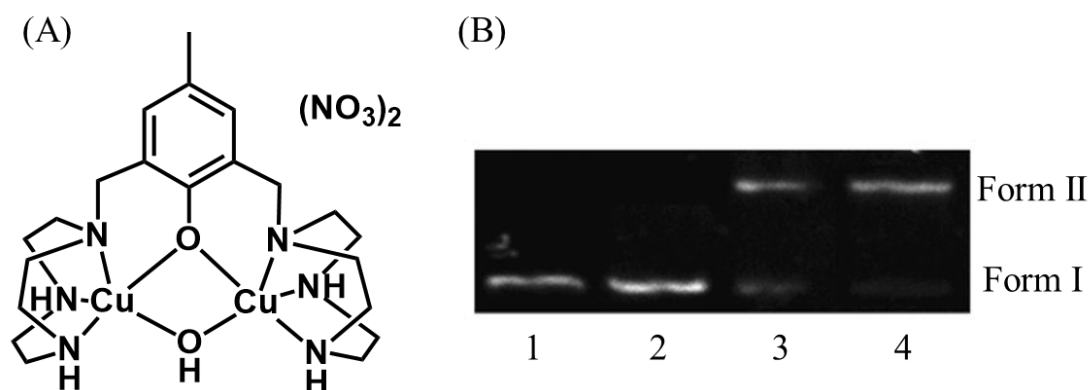
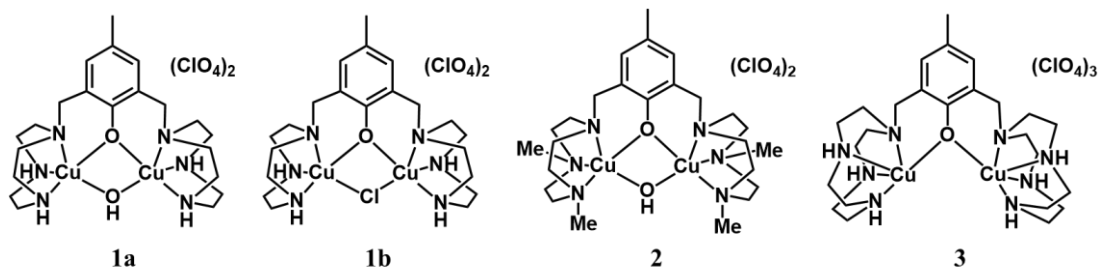


Figure 2-1. (A) Chemical structure of **1c**. (B) The results of DNA cleavage by **1c**. Agarose gel electrophoresis patterns of SC pUC19 DNA incubated with **1c** in Tris buffer at 37°C for 3 h. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA + 5 μM **1c**; lane 3: DNA + 25 μM **1c**; lane 4: DNA + 50 μM **1c**.

本研究で、我々は $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{bcmp})](\text{ClO}_4)_2$ (**1a**), $[\text{Cu}_2(\mu\text{-Cl})(\text{bcmp})](\text{ClO}_4)_2$ (**1b**), $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{Me}_4\text{bcmp})](\text{ClO}_4)_2$ (**2**), $[\text{Cu}_2(\text{bcc})](\text{ClO}_4)_3$ (**3**) (Chart 2-1)の4つの二核銅(II)錯体を合成し、加水分解的DNA切断のpH依存性を調べた。その結果、**1a**がpH 5.0–6.0においてスーパーコイルドプラスミドpUC19 DNAの切断を大きく加速することを見出し、またその切断はpH 7.0–8.0においては起こらないことを見出した。一般的に、DNAの加水分解的切断は塩基性条件下において加速されるため、pH 5–6の条件下における大きな加速は例が少ないが、活性中心に鉄を持つpurple acid phosphataseは酸性pH領域においてリン酸エステルの加水分解を促進することが知られている。最後に、我々は**1a**の加水分解的DNA切断のpH依存性に基づいてDNA切断機構を提案した。

Chart 2-1. Chemical structures of **1a**, **1b**, **2**, and **3**, respectively

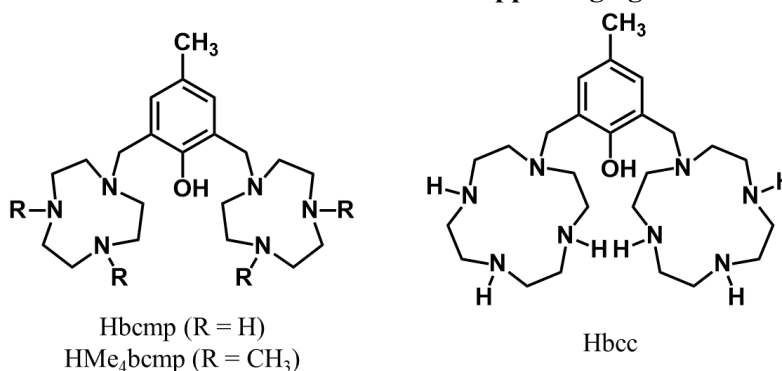


2-3. 結果と考察

2-3-1. 二核銅(II)錯体の合成

2,6-bis(1,4,7-triazacyclononylmethyl)-4-methylphenol (Hbcmp), 2,6-bis(1,4,7-triaza-4,7-dimethylcyclononylmethyl)-4-methylphenol (HMe₄bcmp), 2,6-bis(1,4,7,10-tetraazacyclododecylmethyl)-4-methylphenol (Hbcc)の化学構造を [Chart 2-2](#) に示す. Hbcmp と Hbcc は, *p*-cresol の2,6位にペンダント基としてそれぞれ triazacyclononane (tacn)及び tetraazacyclododecane (cyclen)を有しており, 参考文献に従って合成した^[10]. HMe₄bcmp は, Hbcmp の4つの環状 NH 部位を全てメチル化した新規二核化配位子である. HMe₄bcmp の合成経路を [Scheme 2-1](#) に示す. これらの二核化配位子は, それぞれ[Cu₂(μ-X)(bcmp)](ClO₄)₂ [X = OH (**1a**) and X = Cl (**1b**)], [Cu₂(μ-OH)(Me₄bcmp)](ClO₄)₂ (**2**), [Cu₂(bcc)](ClO₄)₃ (**3**)の二核銅(II)錯体を形成する. これらの錯体構造は, 単結晶 X 線構造解析によって決定し, 元素分析や様々な分光学的測定によって特徴付けた. 以下に記述するように, これらの二核化配位子は pH 5–9 の水溶液中における二核構造を安定化する.

Chart 2-2. Chemical structures of supporting ligands



Scheme 2-1. Synthetic scheme of HMe₄bcmp

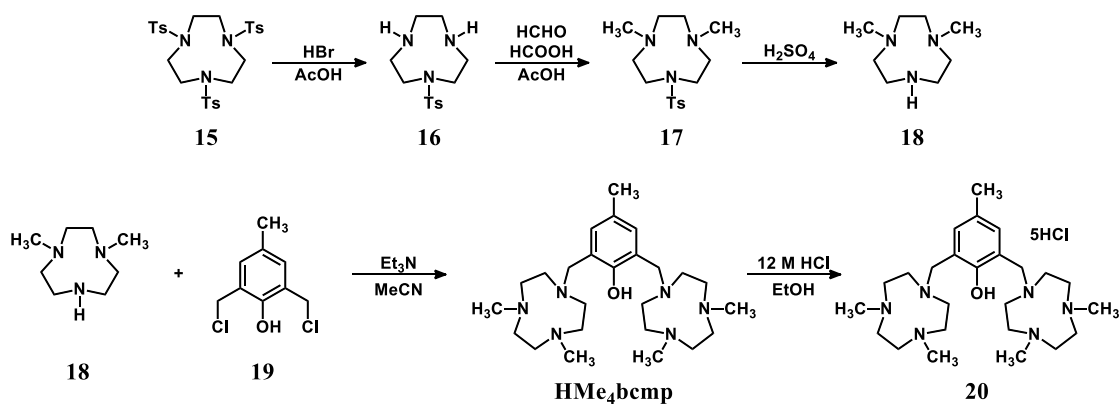


Figure 2-2 に **1a**, **1b**, **2** 及び **3** の ORTEP 図, Table 2-1 に結晶構造の詳細, Table 2-2 に二核銅周辺の結合距離と結合角を示す. **1a** は, 2つの銅(II)イオンが外因性の μ -OPh- μ -OH の2つの架橋とともに bcmp 配位子に組み込まれており, 銅(II)イオンは配位子の3つの窒素原子と μ -OPh- μ -OH の2つの酸素原子によって歪んだ四角錐構造を取っている. **1b** の構造は **1a** とほとんど同じではあるが, μ -OH が μ -Cl に置き換わっている. **2** については, 2つの銅(II)イオンが μ -OPh- μ -OH の2つの架橋とともに Me₄bcmp 配位子に組み込まれている. **1a** と **2** の全体的な構造は **2** の環状アミン部位の4つのメチル基を除き, ほとんど同じである. **3** については, 2つの銅(II)イオンが μ -OPh 架橋とともに bcc 配位子に組み込まれており, それぞれの銅(II)イオンは配位子の4つの窒素原子, 及び μ -OPh の酸素原子によって四角錐構造を取っている. **1a** と **2** の Cu \cdots Cu 間距離は, それぞれ 2.9985(7) Å, 3.033(1) Å で同程度であるが, **3** の 3.878(1) Å と比較して小さい. これは, **1a** と **2** は μ -OPh- μ -OH の二架橋構造で Cu \cdots Cu 間が近く, **3** は μ -OPh の単架橋構造で Cu \cdots Cu 間が広がっていることを反映している. これらの錯体の銅(II)イオン周りの幾何学構造は結合角から算出した τ 値によって決定した. τ 値が 0 であれば四角錐構造, 1 であれば三方両錐構造であると決定できる^[1]. **1a** の τ 値は $\tau_{\text{Cu}(1)}=0.243$, $\tau_{\text{Cu}(2)}=0.228$, **2** では $\tau_{\text{Cu}(1)}=0.217$, $\tau_{\text{Cu}(2)}=0.206$, **3** では $\tau_{\text{Cu}(1)}=0.038$, $\tau_{\text{Cu}(2)}=0.066$ であった. これらのことから, **1a** と **2** は歪んだ四角錐構造を, **3** は非常に四角錐に近い構造を取っていることが明らかになった.

1a と **2** は同じような架橋構造をしているにも関わらず, μ -OH の外部基質への接近しやすさには顕著な差がある. **1a** における μ -OH の酸素原子は, 環状アミンの4つの NH 基の N 原子から定義される平均面から 0.842 Å 突き出ている(Figure 2-3(A)). その一方で, **2** における μ -OH の酸素原子は, 環状アミン部位の4つの NCH₃ 基の C 原子から定義される平均面から 0.001 Å しか突き出していないことが明らかになった(Figure 2-3(B)). 従って, **2** の4つの NCH₃ 基は立体障害として μ -OH へのアクセスを阻害すると考えられる. また, **1a** における Cu-O $_{\mu\text{-OH}}$ 結合の距離は 1.971(2), 1.980(3) Å であり, これは **2** における 1.930(3), 1.925(4) Å と比較して著しく長い. これらの結果は, **1a** の μ -OH は **2** と比較して2つの銅(II)イオンと弱く結合していることを意味している. このような構造の特性は, **1a** の μ -OH が **2** の μ -OH と比較してリン酸のような外部基質に対する求核攻撃の反応性が高いことを示唆している.

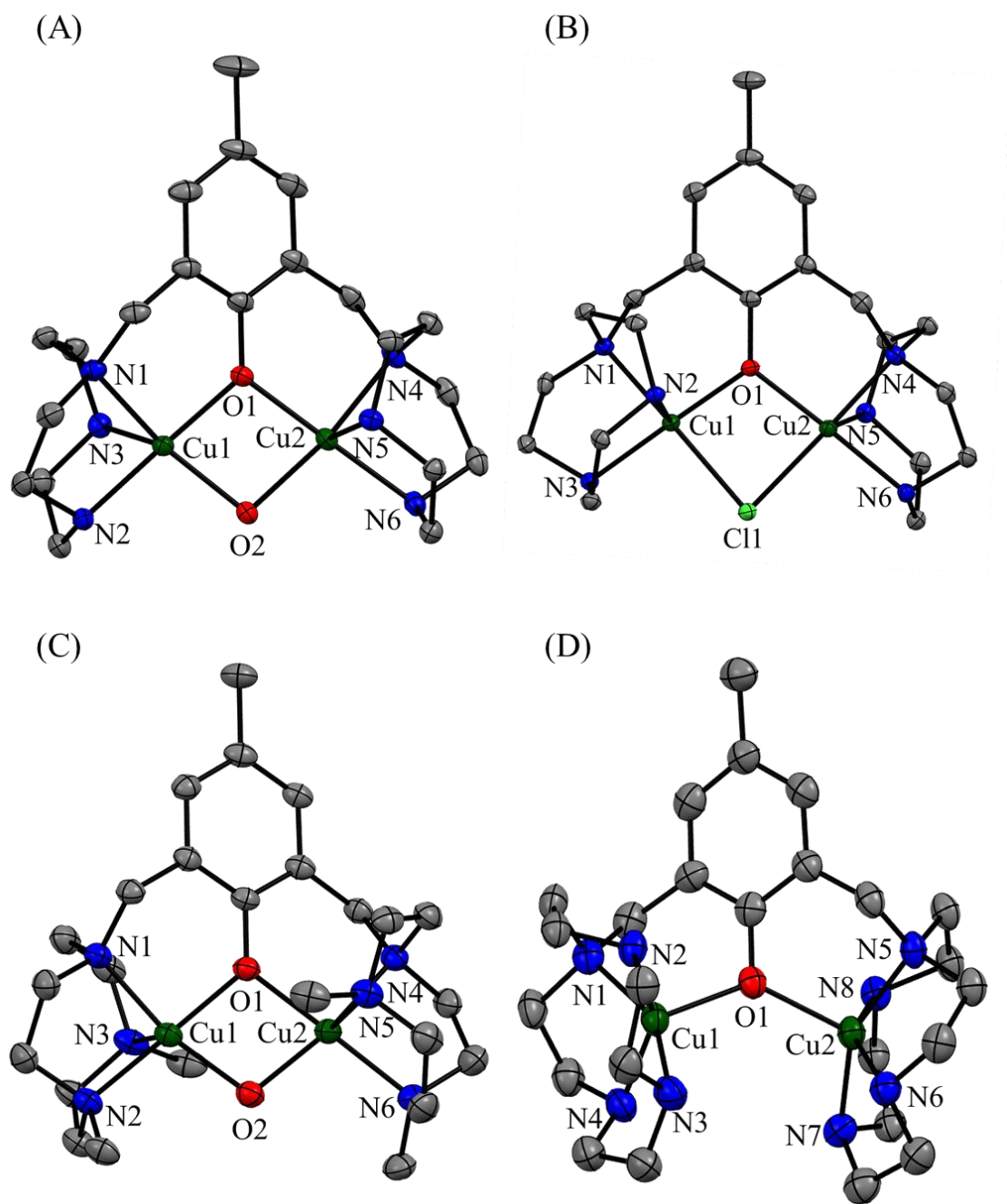


Figure 2-2. ORTEP diagrams of the cationic parts of (A) **1a**, (B) **1b**, (C) **2**, and (D) **3** (ORTEP plot; unlabeled open ellipsoids represent carbon atoms).

Table 2-1. Crystallographic data for 1a, 1b, 2, and 3

Complex	1a•MeCN	1b•MeCN	2•3MeCN•H ₂ O	(3•0.5MeOH•H ₂ O) ₂
Empirical formula	C ₂₃ H ₄₀ Cl ₂ Cu ₂ N ₇ O ₁₀	C ₂₃ H ₄₀ Cl ₃ Cu ₂ N ₇ O ₉	C ₂₅ H ₄₅ Cl ₂ Cu ₂ N ₆ O ₁₀	C _{26.5} H ₄₃ Cl ₃ Cu ₂ N _{8.5} O _{13.5}
Formula weight	772.61	792.06	787.66	930.13
Temperature	113(2)K	113(2)K	93(2)K	113(2)K
Wavelength	CuK α (1.54187 Å)	CuK α (1.54187 Å)	CuK α (1.54187 Å)	CuK α (1.54187 Å)
Crystal system	trigonal	trigonal	hexagonal	monoclinic
Crystal size (mm ³)	0.30 × 0.10 × 0.06	0.20 × 0.10 × 0.10	0.10 × 0.10 × 0.10	0.25 × 0.24 × 0.05
Space group	R-3	R-3	P6 ₃ /m	P2 ₁ /n
a (Å)	35.2508(10)	35.5390(10)	23.1740(6)	15.5543(2)
b (Å)	35.2508(10)	35.5390(10)	23.1740(6)	15.6847(2)
c (Å)	12.9703(4)	13.0787(4)	24.1454(6)	31.2218(5)
α (deg)	90.0000	90.0000	90.0000	90.0000
β (deg)	90.0000	90.0000	90.0000	93.6893(8)
γ (deg)	120.0000	120.0000	120.0000	90.0000
Volume (Å ³)	13957.9(7)	14305.6(7)	11229.6(5)	7601.23(18)
Z value	18	18	12	8
Density (calculated)	1.654 g/cm ³	1.655 g/cm ³	1.398 g/cm ³	1.625 g/cm ³
Absorption coefficient	3.839 mm ⁻¹	4.493 mm ⁻¹	3.183 mm ⁻¹	3.963 mm ⁻¹
F(000)	7182	7344	4908	3828
R1 ^a , wR2 ^b)	0.0402, 0.1245	0.0472, 0.1134	0.0665, 0.2063	0.0761, 0.2390
GOF index	1.062	1.045	1.107	1.029

a) $R1 = \sum ||F_o| - |F_c| / \sum |F_o|$, b) $wR2 = [\sum (w(F_o^2 - F_c^2)^2) / \sum w(F_o^2)]^{1/2}$

Table 2-2. Selected bond distances (Å) and angles (deg) for 1a, 1b, 2, and 3

Bond distances (Å)			
1a	1b	2	3
Cu(1) ••• Cu(2) : 2.9985(7)	Cu(1) ••• Cu(2) : 3.1383(8)	Cu(1) ••• Cu(2) : 3.033(1)	Cu(1) ••• Cu(2) : 3.878(1)
Cu(1) – N(1) : 2.034(3)	Cu(1) – N(1) : 2.031(5)	Cu(1) – N(1) : 2.019(4)	Cu(1) – N(1) : 2.017(5)
Cu(1) – N(2) : 2.007(3)	Cu(1) – N(2) : 2.216(3)	Cu(1) – N(2) : 2.026(5)	Cu(1) – N(2) : 2.025(5)
Cu(1) – N(3) : 2.233(2)	Cu(1) – N(3) : 2.000(4)	Cu(1) – N(3) : 2.222(4)	Cu(1) – N(3) : 2.053(5)
Cu(2) – N(4) : 2.026(3)	Cu(2) – N(4) : 2.032(4)	Cu(2) – N(4) : 2.022(4)	Cu(1) – N(4) : 2.044(5)
Cu(2) – N(5) : 2.250(2)	Cu(2) – N(5) : 2.001(5)	Cu(2) – N(5) : 2.219(4)	Cu(2) – N(5) : 2.035(4)
Cu(2) – N(6) : 2.002(3)	Cu(2) – N(6) : 2.176(3)	Cu(2) – N(6) : 2.039(5)	Cu(2) – N(6) : 2.041(5)
Cu(1) – O(1) : 1.928(3)	Cu(1) – O(1) : 1.945(3)	Cu(1) – O(1) : 1.963(4)	Cu(2) – N(7) : 2.018(5)
Cu(1) – O(2) : 1.971(2)	Cu(1) – Cl(1) : 2.3210(15)	Cu(1) – O(2) : 1.930(3)	Cu(2) – N(8) : 2.055(4)
Cu(2) – O(1) : 1.931(2)	Cu(2) – O(1) : 1.948(4)	Cu(2) – O(1) : 1.960(3)	Cu(1) – O(1) : 2.103(4)
Cu(2) – O(2) : 1.980(3)	Cu(2) – Cl(1) : 2.3090(13)	Cu(2) – O(2) : 1.925(4)	Cu(2) – O(1) : 2.113(4)
Bond angles (deg)			
Cu(1) – O(1) – Cu(2) :	Cu(1) – O(1) – Cu(2) :	Cu(1) – O(1) – Cu(2) :	Cu(1) – O(1) – Cu(2) :
101.96(14)	107.44(18)	101.30(17)	133.84(19)
Cu(1) – O(2) – Cu(2) :	Cu(1) – Cl(1) – Cu(2) :	Cu(1) – O(2) – Cu(2) :	O(1) – Cu(1) – N(1) :
98.75(11)	85.35(5)	103.78(18)	96.48(17)
O(1) – Cu(1) – N(1) :	O(1) – Cu(1) – N(1) :	O(1) – Cu(1) – N(1) :	O(1) – Cu(1) – N(2) :
92.86(12)	94.01(15)	92.08(16)	105.35(16)
O(1) – Cu(1) – N(2) :	O(1) – Cu(1) – N(2) :	O(1) – Cu(1) – N(2) :	O(1) – Cu(1) – N(3) :
175.25(9)	100.47(12)	177.10(14)	113.34(18)
O(1) – Cu(1) – N(3) :	O(1) – Cu(1) – N(3) :	O(1) – Cu(1) – N(3) :	O(1) – Cu(1) – N(4) :
102.00(11)	175.42(11)	98.15(14)	106.55(17)
O(2) – Cu(2) – N(4) :	Cl(1) – Cu(2) – N(4) :	O(2) – Cu(2) – N(4) :	O(1) – Cu(2) – N(5) :
164.19(9)	156.81(9)	164.49(13)	94.46(16)
O(2) – Cu(2) – N(5) :	Cl(1) – Cu(2) – N(5) :	O(2) – Cu(2) – N(5) :	O(1) – Cu(2) – N(6) :
110.01(10)	94.06(12)	108.86(14)	107.71(17)
O(2) – Cu(2) – N(6) :	Cl(1) – Cu(2) – N(6) :	O(2) – Cu(2) – N(6) :	O(1) – Cu(2) – N(7) :
101.22(12)	117.44(9)	102.20(18)	113.87(17)
O(1) – Cu(2) – N(4) :	O(1) – Cu(2) – N(4) :	O(1) – Cu(2) – N(4) :	O(1) – Cu(2) – N(8) :
92.60(12)	94.02(15)	92.19(15)	104.02(16)
O(1) – Cu(2) – N(5) :	O(1) – Cu(2) – N(5) :	O(1) – Cu(2) – N(5) :	N(1) – Cu(1) – N(2) :
98.42(9)	174.48(12)	99.09(15)	84.9(2)

O(1) – Cu(2) – N(6) :	O(1) – Cu(2) – N(6) :	O(1) – Cu(2) – N(6) :	N(1) – Cu(1) – N(3) :
177.87(10)	102.22(14)	176.82(14)	150.1(2)
O(2) – Cu(1) – N(1) :	Cl(1) – Cu(1) – N(1) :	O(2) – Cu(1) – N(1) :	N(1) – Cu(1) – N(4) :
160.69(8)	164.70(8)	164.06(17)	87.5(2)
O(2) – Cu(1) – N(2) :	Cl(1) – Cu(1) – N(2) :	O(2) – Cu(1) – N(2) :	N(2) – Cu(1) – N(3) :
99.60(11)	110.37(11)	102.80(17)	85.2(2)
O(2) – Cu(1) – N(3) :	Cl(1) – Cu(1) – N(3) :	O(2) – Cu(1) – N(3) :	N(2) – Cu(1) – N(4) :
115.01(8)	95.33(14)	108.44(15)	147.82(19)
O(1) – Cu(1) – O(2) :	O(1) – Cu(1) – Cl(1) :	O(1) – Cu(1) – O(2) :	N(3) – Cu(1) – N(4) :
79.72(10)	83.31(12)	77.38(15)	86.1(2)
O(1) – Cu(2) – O(2) :	O(1) – Cu(2) – Cl(1) :	O(1) – Cu(2) – O(2) :	N(5) – Cu(2) – N(6) :
79.44(11)	83.58(10)	77.55(15)	86.05(19)
N(1) – Cu(1) – N(2) :	N(1) – Cu(1) – N(2) :	N(1) – Cu(1) – N(2) :	N(5) – Cu(2) – N(7) :
86.32(12)	84.93(13)	87.13(18)	151.64(19)
N(1) – Cu(1) – N(3) :	N(1) – Cu(1) – N(3) :	N(1) – Cu(1) – N(3) :	N(5) – Cu(2) – N(8) :
84.87(9)	86.15(17)	84.64(16)	85.50(18)
N(2) – Cu(1) – N(3) :	N(2) – Cu(1) – N(3) :	N(2) – Cu(1) – N(3) :	N(6) – Cu(2) – N(7) :
82.58(11)	84.10(12)	84.56(15)	86.51(19)
N(4) – Cu(2) – N(5) :	N(4) – Cu(2) – N(5) :	N(4) – Cu(2) – N(5) :	N(6) – Cu(2) – N(8) :
84.52(11)	86.19(16)	84.02(15)	147.67(19)
N(4) – Cu(2) – N(6) :	N(4) – Cu(2) – N(6) :	N(4) – Cu(2) – N(6) :	N(7) – Cu(2) – N(8) :
86.27(13)	85.66(12)	87.40(18)	86.30(18)
N(5) – Cu(2) – N(6) :	N(5) – Cu(2) – N(6) :	N(5) – Cu(2) – N(6) :	
83.27(9)	83.30(14)	84.01(17)	
$\tau_{\text{Cu}(1)} = 0.243,$	$\tau_{\text{Cu}(1)} = 0.179,$	$\tau_{\text{Cu}(1)} = 0.217,$	$\tau_{\text{Cu}(1)} = 0.038,$
$\tau_{\text{Cu}(2)} = 0.228$	$\tau_{\text{Cu}(2)} = 0.295$	$\tau_{\text{Cu}(2)} = 0.206$	$\tau_{\text{Cu}(2)} = 0.066$

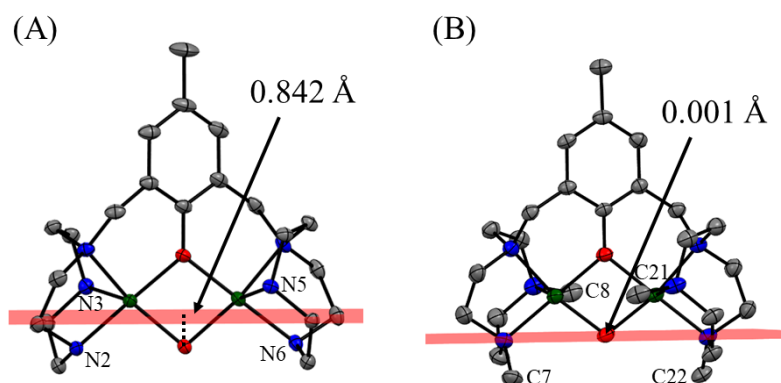


Figure 2-3. (A) Distance of the *O*-atom of the μ -OH bridge from the mean plane defined by four *N*-atoms of macrocyclic NH groups (N2, N3, N5, N6) in **1a**. (B) Distance of the *O*-atom of the μ -OH bridge from the mean plane defined by four *C*-atoms of NCH₃ groups (C7, C8, C21, C22) in **2**.

2-3-2. 水溶液中(pH 5–9)における二核銅中心の構造

水溶液中(pH 5–9)の二核銅中心の構造を調べるため、配位子の錯形成過程を pH 測定及び分光学的測定によって追跡した。配位子と Cu(ClO₄)₂•6H₂O の濃度比が 1 : 2 の水溶液に NaOH 水溶液を加えていき、その際の pH 変化、及びその pH における錯体の構造を電子スペクトル、ESI MS スペクトルによって測定した。pH の変化に対して加えた NaOH の当量をプロットしたグラフを Figure 2-4 に示す。様々な pH における電子スペクトル及び ESI MS スペクトルを Figure 2-5, 2-6 に示す。

Hbcmp と HMe₄bcmp の錯形成過程では、Figure 2-4(A), (C)に示すように、2 当量の OH⁻ が pH 5.0 の時点で消費された。これは、各配位子のフェノールプロトン及び二核銅(II)中心に配位した水分子のプロトンが解離したことが示唆され、この条件下において μ -OPh- μ -OH 架橋が生成したと考えられる。これは、Montagner らが報告しているように、**1c** の二核銅(II)中心に架橋した水分子の pK_a が 4.69 であることと一致している^[9]。Hbcmp と HMe₄bcmp の pH 5–9 における錯形成過程の電子スペクトルは、pH によって変化はなく、それぞれ水溶液中における錯体 **1a** 及び **2** の電子スペクトルとほとんど同じであった(Figure 2-5(A)–(D))。 **1a** 及び **2** のスペクトルには、340–380 nm 付近に 2 つのピークが現れる。構造が類似した二核銅(II)錯体の UV-vis スペクトルを考慮すると、これら 2 つのピークはフェノキソ-Cu(II)とヒドロキソ-Cu(II)の LMCT (ligand-to-metal charge transfer) に帰属できる^[12]。さらに、**1a** 及び **2** の架橋構造は Figure 2-6(A), (B)に示す ESI MS スペクトルによって確認した。pH 5–9 の水溶液中における **1a** と **2** の ESI MS は、それぞれ質量電荷比 631 と 687 にメインピークが出現し、これらは [bpmp + 2Cu(II) + OH + ClO₄]⁺ 及び [Me₄bcmp + 2Cu(II) + OH + ClO₄]⁺ に帰属できる。これらの結果は、**1a** 及び **2** の μ -OPh- μ -OH 架橋構造は pH 5–9 において維持されていることを示している。

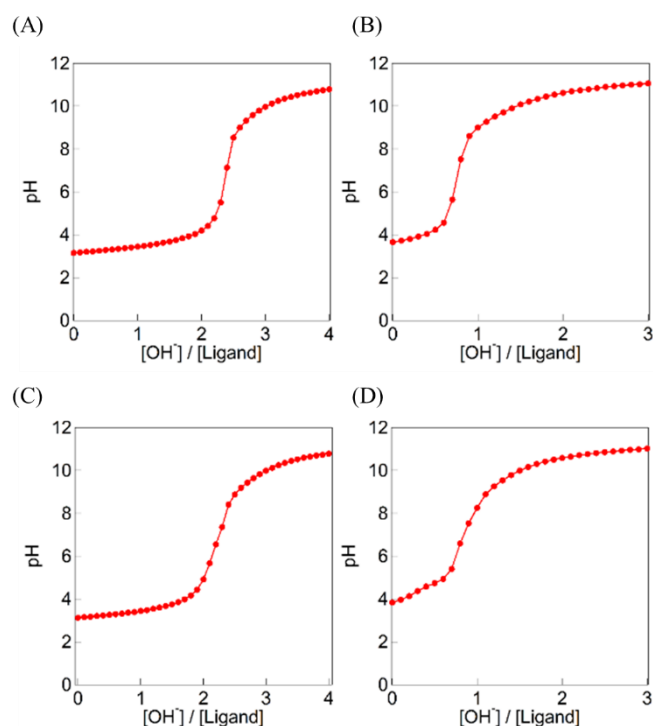


Figure 2-4. pH change of an aqueous solution containing each ligand (0.5 mM), (A) **Hbcmp**, (C) **HMe₄bcmp**, or (D) **Hbcc**, and $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1.0 mM) upon titration with an aqueous NaOH solution (0.05 M) at 25°C. In the case of (B), **1b** was used instead of the ligand, and the pH change was monitored in the same way.

1b の水溶液に NaOH 水溶液を加えると、pH 5.0 の時点で 1 当量の OH^- が消費される (Figure 2-4(B)). この結果は、**1b** の $\mu\text{-Cl}$ が $\mu\text{-OH}$ に交換していることを示しており、従って水溶液中において **1b** は **1a** に変換されていることが明らかになった。

Hbcc の錯形成過程では、1 当量の OH^- が pH 5.0 の時点で消費される (Figure 2-4(D)). pH 5–9 における Hbcc の錯形成過程の電子スペクトルは、水中で測定した **3** の電子スペクトルと同じであり (Figure 2-5(E)), 410 nm にフェノキソ-Cu(II) の LMCT に帰属できる弱いピークが観測された^[13]. 水中における pH 5–9 の ESI MS スペクトルは、質量電荷比 799 にメインピークが出現し、これは $[\text{bcc} + 2\text{Cu}(\text{II}) + 2\text{ClO}_4]^+$ に帰属できる (Figure 2-6(C)). これらの結果は、**3** の $\mu\text{-OPh}$ 架橋構造は pH 5–9 の水溶液中において維持されていることを示している。

従って、**1a** 及び **2** の $\mu\text{-OPh}\text{-}\mu\text{-OH}$ 架橋構造、**3** の $\mu\text{-OPh}$ 架橋構造は pH 5–9 の水中において維持されていることが明らかになった. *p*-cresol 誘導体の 7 座二核化配位子である 2,6-bis(dipyridylmethylaminomethyl)-4-methyl-phenol の二核銅(II)錯体は、pH 5–12 において $\mu\text{-OPh}\text{-}\mu\text{-OH}$ 架橋構造が維持されていることが報告されている^[14a]. このことから、幅広い pH 領域において $\mu\text{-OPh}\text{-}\mu\text{-OH}$ 架橋構造が維持されることは、*p*-cresol 誘導体の 7

座配位子において一般的であると考えられる。一方で、**3**における1つの μ -OPh架橋構造も、同様の条件下において維持されることが明らかになった。

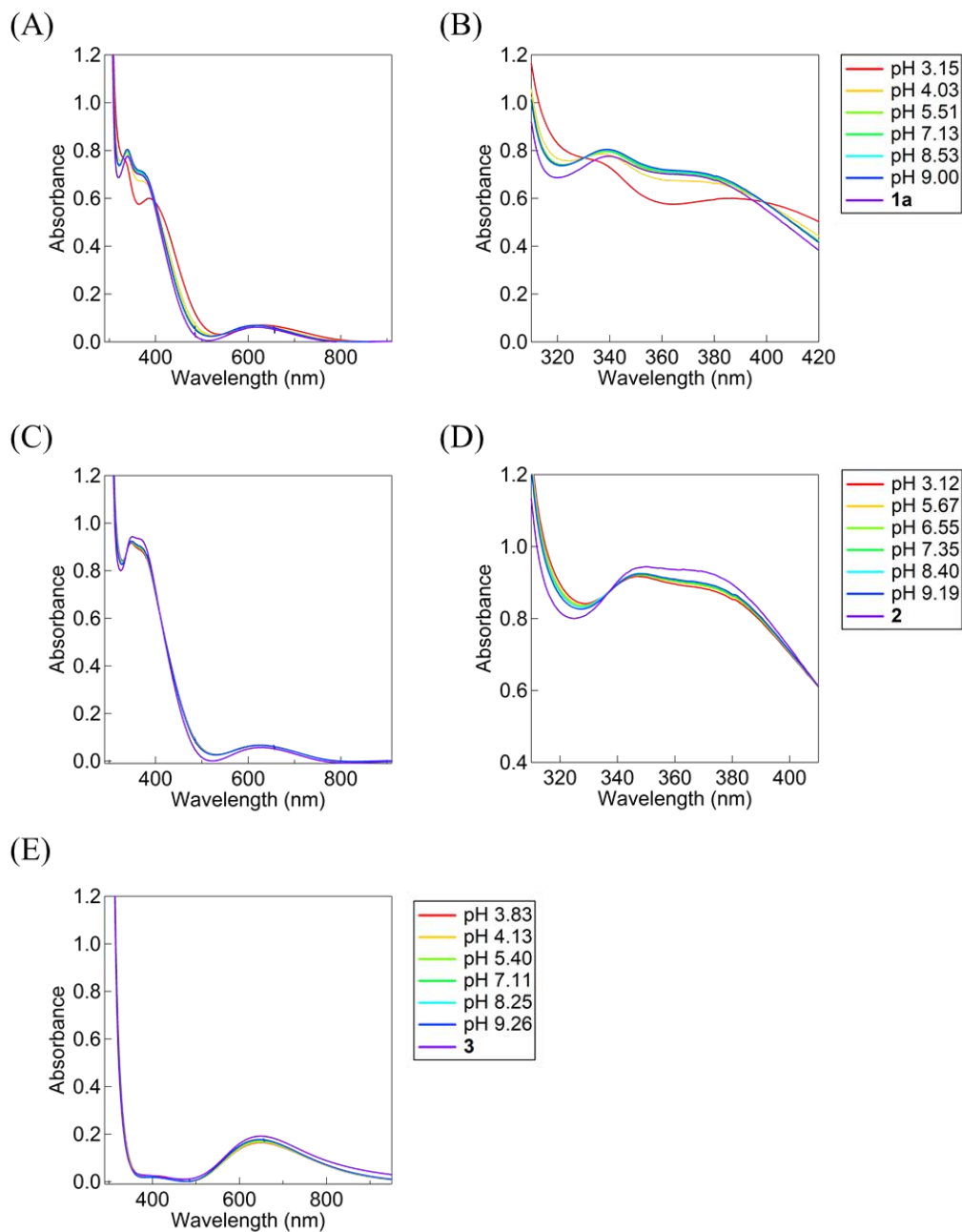
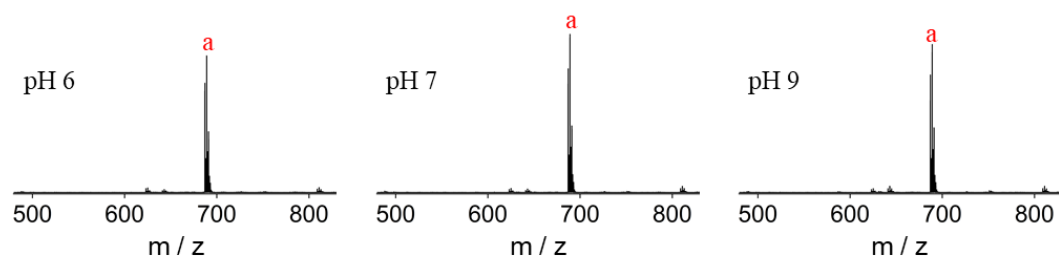
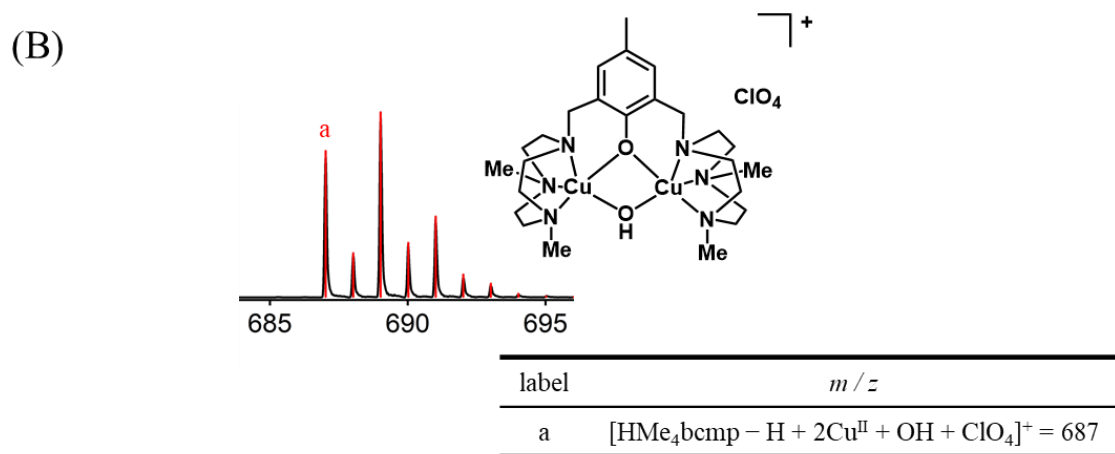
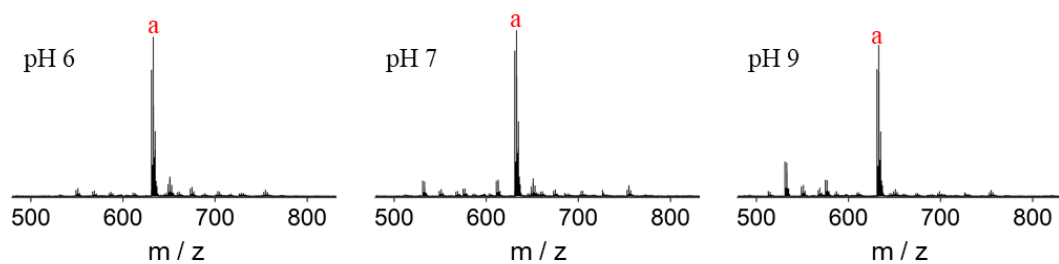
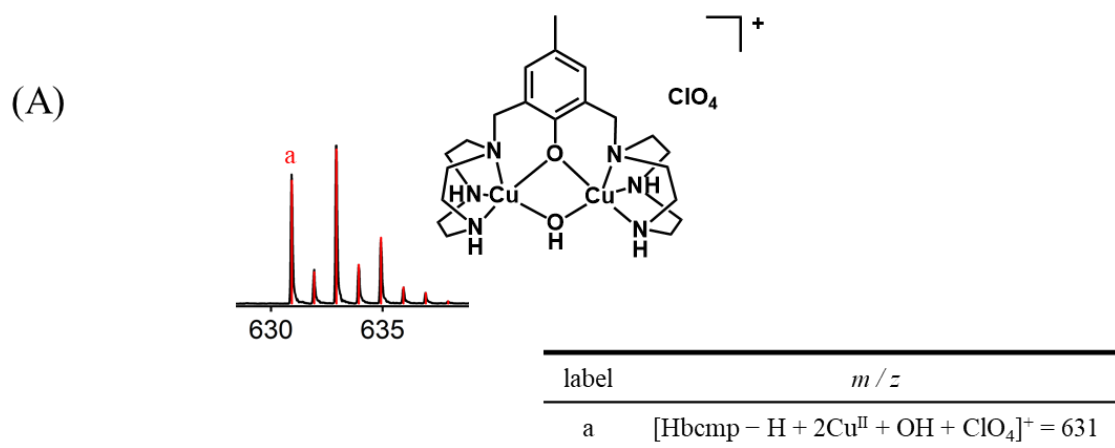


Figure 2-5. Electronic absorption spectra of (A) **1a**, (C) **2**, and (E) **3** (0.5 mM) at different pH at room temperature. The enlarged views around 310–420 nm (B) and (D) corresponding to (A) and (C), respectively. The electronic absorption spectra of **1a**, **2**, and **3** in aqueous solutions, shown by purple lines, were measured in the absence of buffer.



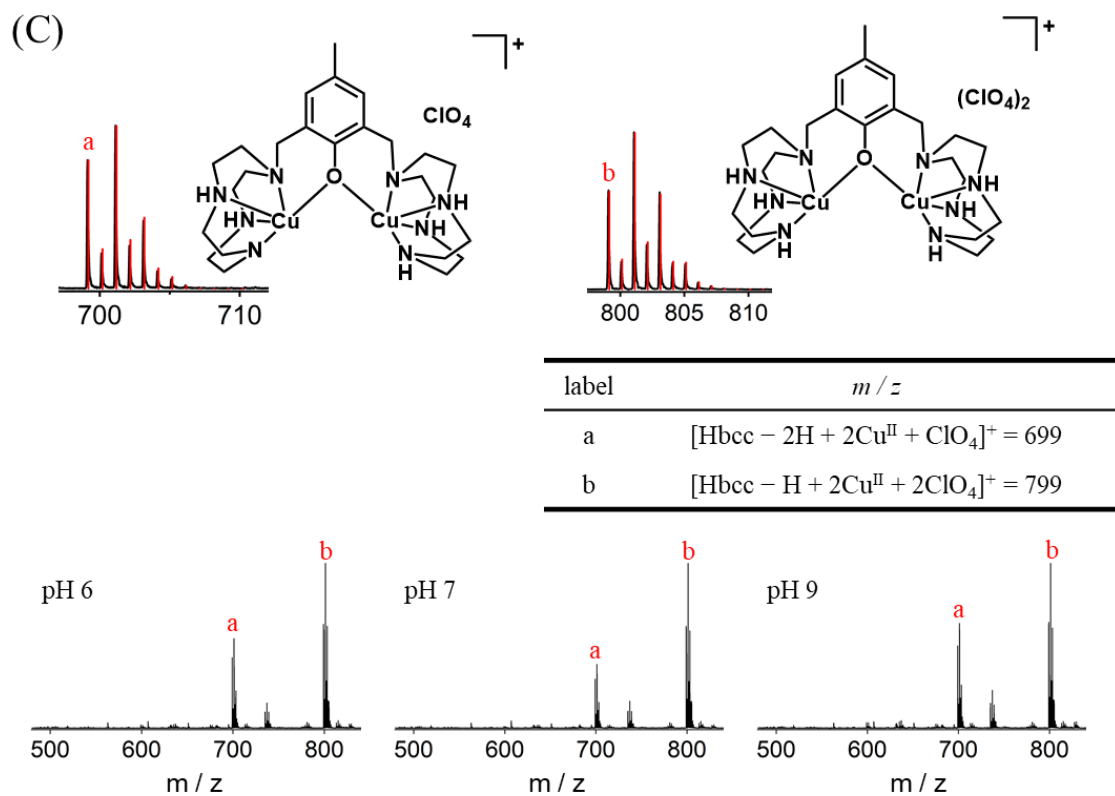


Figure 2-6. ESI MS spectrum of (A) **1a**, (B) **2**, and (C) **3** at different pH conditions at room temperature at orifice 1: 10 V, orifice 2: 10 V, ring lens voltage: 10 V.

2-3-3. 二核銅(II)錯体の DNA 結合能

1a, 2, 3 の DNA 結合における pH 及び構造の効果を調べるため、等温滴下型熱量 (Isothermal Titration Calorimetry, ITC)測定を行った。ITC 測定では、結合エンタルピー(ΔH°)を直接的に測定し、エントロピー(ΔS°)及び結合定数(K)は曲線のフィッティングと自由エネルギーの関係から求めた。ITC 測定では、直鎖の 33 mer オリゴ二重鎖 DNA を使用した。これは、直鎖 DNA に対する二核銅(II)錯体の加水分解的 DNA 切断活性が低いため、DNA 切断の際に発生する熱量を無視することができるからである。ITC 曲線は、**1a** の水溶液を 33 mer オリゴ二重鎖 DNA 溶液に滴下していくことで得た。**1a** 及び 33 mer オリゴ DNA 二重鎖水溶液は、それぞれ pH 5.0, 5.5, 6.0 に調製した MES buffer (10 mM), またイオン強度を一定にするために NaCl (10 mM)が含有した水溶液を用いた。**2, 3** の測定においては、pH 6.0 の水溶液中、同様の条件下において測定を行った。熱力学的パラメーターである $\Delta H^\circ, \Delta S^\circ, K$ を Table 2-3 に示す。全ての測定において ΔH° は負の値, ΔS° は正の値で得られた。これは、**1a, 2, 3** の DNA 結合がエンタルピー及びエントロピー的に有利であることを示している。ITC 測定プロファイル及び濃度比プロットを Figure 2-7 に示す。

Table 2-3. Thermodynamic parameters of the calorimetric titrations for the binding of 1a, 2, and 3 with the linear 33 mer ds-DNA

Complex	1a			2	3
pH	5.0	5.5	6.0	6.0	6.0
N (sites)	1.29 ± 0.13	0.652 ± 0.12	0.617 ± 0.07	1.14 ± 0.10	1.63 ± 0.06
$K \times 10^5$ (M^{-1})	1.81 ± 0.84	1.23 ± 0.43	1.05 ± 0.20	2.64 ± 0.97	2.63 ± 0.53
ΔH° ($kcal \cdot mol^{-1}$)	-0.57 ± 0.08	-1.08 ± 0.24	-1.39 ± 0.19	-0.48 ± 0.06	-2.26 ± 0.11
ΔS° ($cal \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$)	22.2	19.8	18.5	23.2	17.5

pH 5.0, 5.5, 6.0 における **1a** の DNA 結合定数は、それぞれ $(1.81 \pm 0.84) \times 10^5$, $(1.23 \pm 0.43) \times 10^5$, $(1.05 \pm 0.20) \times 10^5 M^{-1}$ であり (Table 2-3), pH が低くなるにつれて結合定数はわずかに高くなることが明らかになった。これは、**1a** と DNA の複合体が、プロトン化によって安定化されることを意味している。pH 5.0–9.0 の範囲において **1a** の構造は維持されたままであるため、**1a** にプロトン化は起こらないと考えられる。従って、プロトン化は **1a** と DNA の複合体に起こることが示唆された。pH 5.0, 5.5, 6.0 における $\Delta H^\circ, \Delta S^\circ$ の値は、それぞれ -0.57 ± 0.08 , -1.08 ± 0.24 , -1.39 ± 0.19 ($kcal \cdot mol^{-1}$), 及び 22.2, 19.8, 18.5 ($cal \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$) であった (Table 2-3)。 $\Delta H^\circ, \Delta S^\circ$ のどちらの値も pH が低くなるにつれて増加することが明らかとなった。これは、**1a** と DNA の複合体における DNA 主鎖にプロトン化が起こり、脱水和が誘導されていることを示唆している。従って、**1a** と DNA の結合定数が弱酸性 pH 領域で増加するのは、エントロピー駆動であることが明らかにな

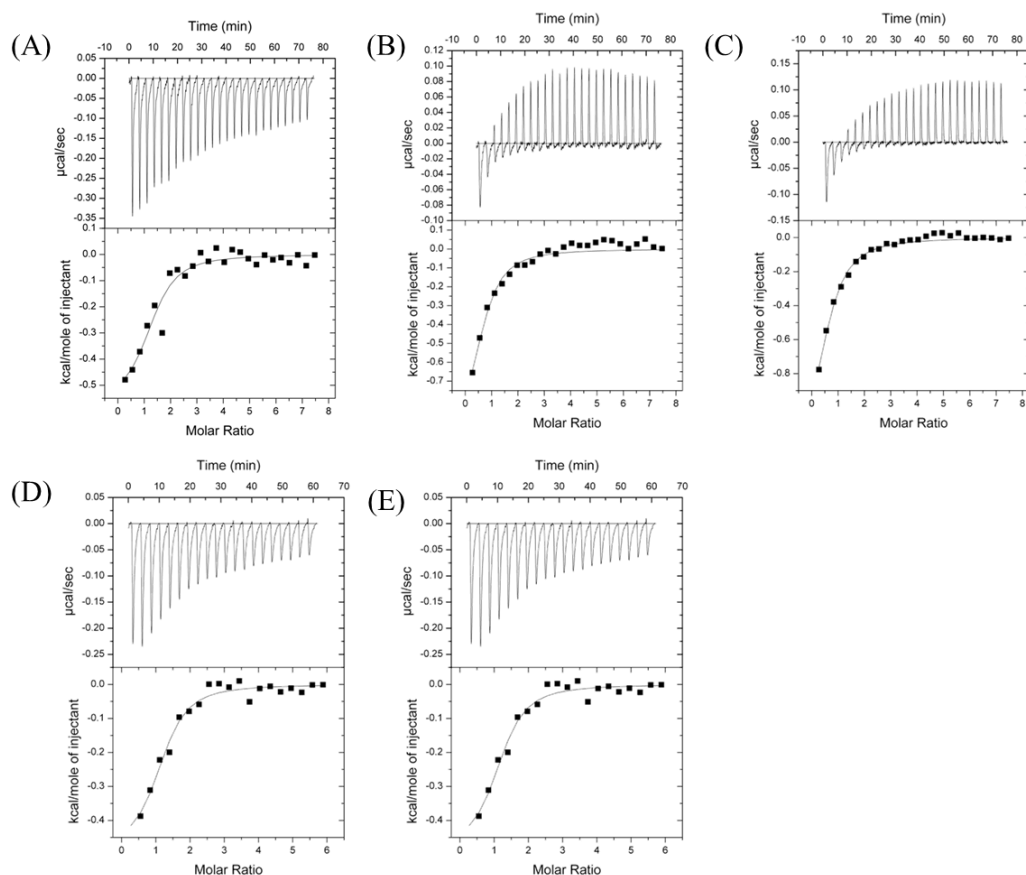


Figure 2-7. Isothermal calorimetric titration curves: **1a** at pH 5.0 (A), 5.5 (B), 6.0 (C), **2** at pH 6.0 (D), and **3** at pH 6.0 (E). Experimental conditions: A solution of **1a** (1 μM) in a syringe was added, in an equal interval 25 times, to a solution of the linear 33 mer ds-DNA (25 μM) in the cell in the presence of NaCl (10 mM) in an aqueous buffer solution at pH 5.0, 5.5, and 6.0 (MES, 10 mM) at 37°C. In the case of **2** and **3**, titrations were conducted in the same manner at pH 6.0 (MES, 10 mM).

った。

さらに、**2** 及び **3** の DNA 結合能は、それぞれ疎水相互作用及び静電的相互作用によるものだと説明することができる。**2** 及び **3** の DNA 結合定数は、それぞれ $(2.64 \pm 0.97) \times 10^5$, $(2.63 \pm 0.53) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ であり (Table 2-3), これらの値はほとんど同じであった。しかしながら、興味深いことに、 ΔH° , ΔS° の値に関して、**2** の $-0.48 \pm 0.06 \text{ (kcal} \cdot \text{mol}^{-1})$, $23.2 \text{ (cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$ と、**3** の $-2.26 \pm 0.11 \text{ (kcal} \cdot \text{mol}^{-1})$, $17.5 \text{ (cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$ を比較すると、大きく異なることがわかった。エントロピーの増大は、系の自由度の増大を示す。そのため、最も大きな ΔS° の値である $23.2 \text{ (cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$ は、**2** と DNA の脱水を伴う疎水相互作用が複合体形成に重要な役割を果たしていることを示している。**2** は **1a**, **1b**, **2**, **3** の中で

最も疎水的であるため、疎水相互作用は重要である。負のエンタルピー値は、水素結合や静電的相互作用を含む新たな結合が形成されたことを示す。本研究の場合、**2**とDNAの複合体形成に観測された最も少ない発熱量 $\Delta H^\circ = -0.48$ (kcal \cdot mol $^{-1}$)は、結合を介した相互作用は重要でないことを示唆している。**2**は水素結合形成可能なNH基を有していないため、この結果は理に適っている。同じ考察をベースにして考えると、**3**とDNAの複合体形成の際に観測された $\Delta H^\circ = -2.26$ (kcal \cdot mol $^{-1}$), $\Delta S^\circ = 17.5$ (cal \cdot mol $^{-1}\cdot$ K $^{-1}$)は、水素結合及び静電的相互作用が大きな寄与をしており、疎水相互作用が重要でないことがわかる。**3**は水素結合可能なNH基を6つ有しており、正味の電荷は3+であり、最も親水的であるため、この結果もまた理に適っている。pH 6.0における**1a**, **2**, **3**の ΔH° は、それぞれ-1.39, -0.48, -2.26 (kcal \cdot mol $^{-1}$)である。**1a**及び**3**は、**2**と比較してより発熱的であることがわかる。これは、NH基の水素結合を介した相互作用がDNA結合に対して重要な役割を果たしていることを示している。従って、DNA結合能の化学的な理解は、熱力学的パラメーターである ΔH° , ΔS° によって推測される。さらに、これらの結果は、**1a**, **2**, **3**とDNAとの相互作用は、ペンダント基である環状分子を修飾することによって制御できることを示している。

2-3-4. 弱酸性 pH 領域において二核銅(II)錯体が促進するスーパーコイルドプラスミド pUC19 DNA の加水分解的切断

2015年にMontagnerらは**1c**が37°C, pH 8.2の緩衝溶液中においてスーパーコイルドプラスミド pUC19 DNA (SC-DNA, Form I)の加水分解的切断を促進することを報告した^[9]。また、この反応は錯体濃度依存であり、**1c**の濃度が50 μ Mの際、3時間後にはほとんどのsupercoiled DNA (Form I)がnicked DNA (Form II)に変換されたが、5 μ Mの条件下においてはForm IIは観測されないと報告した。本研究では、37°C, pH 5.0, 5.5, 5.9, 6.0, 7.4, 8.2の緩衝溶液中において、SC-DNAとの反応を10 μ Mの二核銅(II)錯体を用いて行った。この結果をFigure 2-8に、ゲル写真及び詳細なデータをFigure S2-1及びTable S2-1に示す。二核銅(II)錯体非存在下におけるブランク実験では、DNA切断は全く観測されなかった(Figure 2-8(A))。**1a**を用いた時の、pH 5.0–8.2におけるDNA Form Iの減少を時間に対してプロットしたグラフをFigure 2-8(B)に示す。pH 5.0–6.0において、DNA切断は大きく加速された。pH 5.0において、10 μ Mという少量の**1a**によって、5時間後には80%のDNA Form IがDNA Form IIに変換されていることが明らかになった。しかしながら、興味深いことに、pH 7.4と8.2の条件下ではDNA切断は観測されなかった。pH 7.4の条件で使用しているTris緩衝液は銅(II)イオンに配位することが知られている^[46]が、**1a**の水溶液中、MES水溶液中、Tris-HCl水溶液中、TAPS水溶液中のそれぞれにおいて、電子スペクトルは全く同一であることから、**1a**の構造は緩衝液の種類には影響されないことがわかっている(Figure 2-9)。Figure 2-8(C)に示しているように、**1b**は**1a**と全く同様のDNA切断活性を示した。これは、pH 5–9の水溶液中において、**1b**が

直ちに **1a** に変換されていることを示唆している。

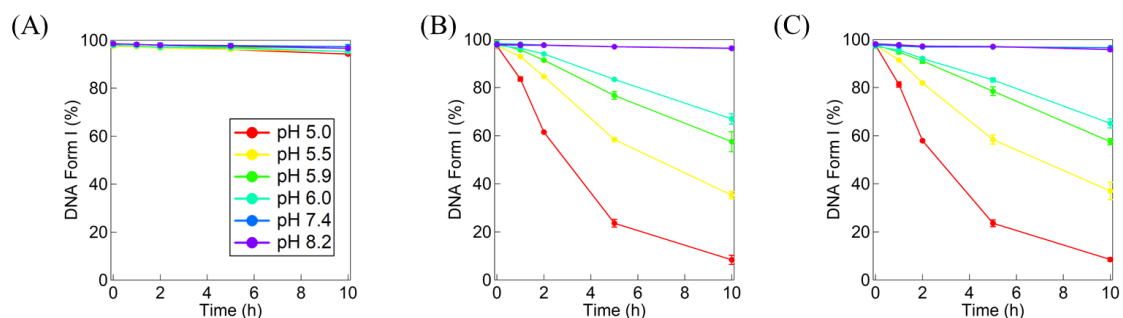


Figure 2-8. pH-dependent profile for DNA cleavage promoted by (A) Blank, (B) **1a**, (C) **1b**, respectively. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 5.0, 5.5, 5.9, 6.0 (MES), 7.4 (Tris-HCl), and 8.2 (TAPS)), [pUC19 DNA] = 50 μ M bp, [complex] = 10 μ M at 37°C for 0, 1, 2, 5, and 10 h. Experiments were carried out at least three times.

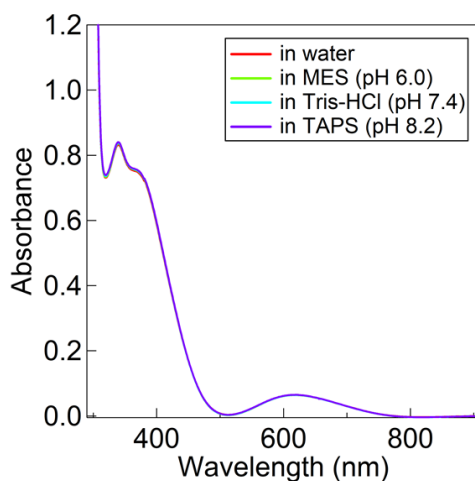


Figure 2-9. Electronic absorption spectra of **1a** (0.5 mM) at different pH (6.0 (MES), 7.4 (Tris-HCl), 8.2 (TAPS), 10 mM) at room temperature shown by green line, light blue line, and purple line, respectively. The spectra in Milli-Q water, shown by red line, was measured in the absence of buffer.

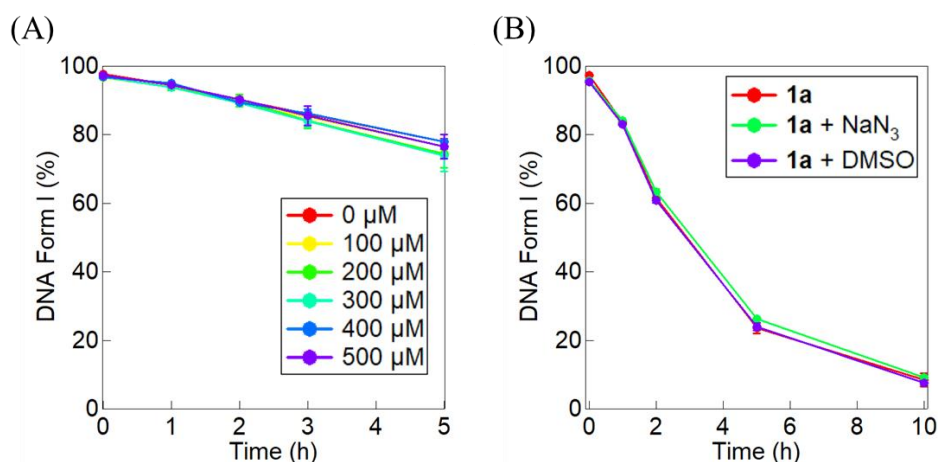


Figure 2-10. DNA cleavage by **1a** in the presence of (A) H_2O_2 at pH 6.0 (MES) and (B) NaN_3 and DMSO at pH 5.0 (MES). Experimental conditions: (A) $[\text{NaCl}] = 10 \text{ mM}$, $[\text{buffer}] = 10 \text{ mM}$ (MES), $[\text{pUC19 DNA}] = 50 \text{ } \mu\text{M bp}$, $[\mathbf{1a}] = 50 \text{ } \mu\text{M}$, and $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100\text{--}500 \text{ } \mu\text{M}$ at 37°C for 0, 1, 2, 3, and 5 h. (B) $[\text{NaCl}] = 10 \text{ mM}$, $[\text{buffer}] = 10 \text{ mM}$ (MES), $[\text{pUC19 DNA}] = 50 \text{ } \mu\text{M bp}$, $[\mathbf{1a}] = 10 \text{ } \mu\text{M}$, and $[\text{NaN}_3] = [\text{DMSO}] = 100 \text{ } \mu\text{M}$ at 37°C for 0, 1, 2, 5, and 10 h.. Experiments were carried out at least three times.

1a による酸化的 DNA 切断の可能性を調べるため、過酸化水素(100–500 μM)を加えて反応を行ったが、DNA 切断は全く促進されなかった(Figure 2-10(A)). さらに、一重項酸素阻害剤の NaN_3 、ヒドロキシラジカル阻害剤の DMSO 存在下において反応を行ったが、**1a** による DNA 切断は阻害されなかった(Figure 2-10(B)). 従って、**1a** による DNA 切断は酸化的切断ではないことが実証された. この実験におけるゲル写真及び詳細なデータを Figure S2-2 及び Table S2-2, S2-3 に示す.

従って、**1a** の反応は、合成された金属錯体による加水分解的 DNA 切断が pH 依存的に加速された初めての例である. がん細胞の特徴的な性質の 1 つとして、周辺環境の pH^[7a-c]やがん細胞内の活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)の濃度^[15]が正常細胞と比較して著しく異なることが知られている. もし、我々が pH や ROS 濃度依存的に金属錯体の DNA 切断活性を制御することができれば、正常細胞には影響を及ぼさず、がん細胞選択的に死滅させるような新しいタイプの抗がん剤の開発に寄与することができるかもしれない. そのため、**1a** による加水分解的 DNA 切断が pH 依存的に加速することは、副作用の少ない抗がん剤の開発に何らかの知見を与えるかもしれない.

2-3-5. DNA に特異的に結合する DNA binder を用いた DNA 切断阻害実験

1a の DNA 結合定数から見積もると、DNA 切断実験の反応条件において **1a** 全体の約 80–90%が DNA と結合していることが明らかとなった. 従って、**1a** の加水分解的 DNA

切断の大きな加速が、DNA と特異的に結合することを介して起こると考えることができる。

金属錯体と ds-DNA との非共有結合性の結合には、主にインターカレーション、DNA 主鎖への静電的相互作用、及び minor groove または major groove への結合といった、4 つの様式が存在する。千程度の分子量を有する金属錯体は、その groove サイズと適合するため、minor groove binder に適していることが報告されている^[16]。一般的に、minor groove binder は三日月型の構造をしており、その両末端にはカチオンを有する。これらの構造の特徴は、**1a** の全体的な構造と良く似ている。major groove への結合の可能性も同様に考えられるが、**1a** の分子サイズが major groove よりも非常に小さいことを考慮すると、それほど重要ではないと考えられる。**1a** の DNA 結合様式を証明するため、我々は minor groove binder である 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)^[17]、major groove binder である methyl green^[18]を用いた阻害実験を行った。DAPI 及び methyl green の化学構造を Figure 2-11 に示す。

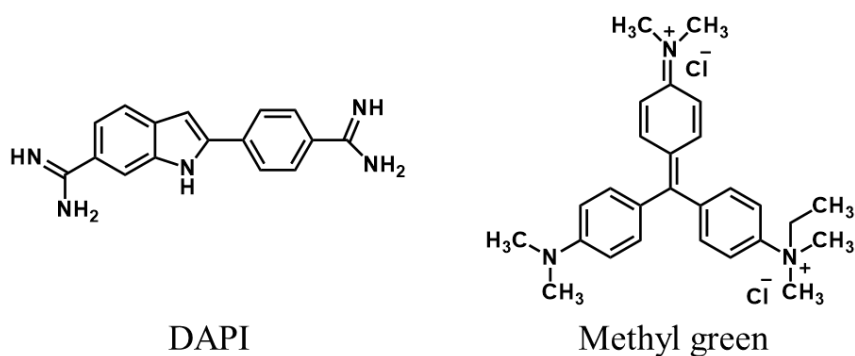


Figure 2-11. Chemical structures of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and methyl green.

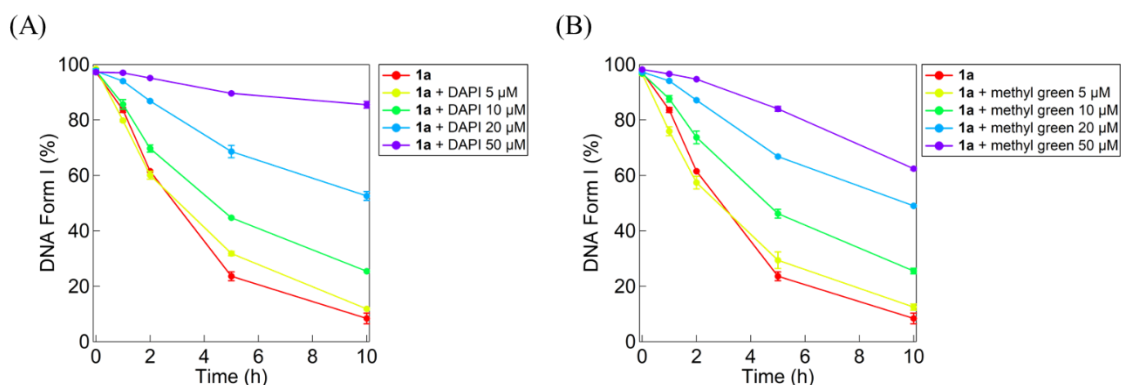


Figure 2-12. DNA cleavage by **1a** in the presence of (A) DAPI and (B) methyl green at pH 5.0. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (MES), [pUC19 DNA] = 50 μ M bp, [**1a**] = 10 μ M, and [DAPI] = [methyl green] = 5, 10, 20, and 50 μ M at 37°C for 0, 1, 2, 5, and 10 h. Experiments were carried out at least three times.

1a を用いた pH 5.0 における DAPI (5.0–50 μ M) 存在下での DNA 切断実験の経時変化を Figure 2-12(A) に示す。また、ゲル写真及び詳細なデータを Figure S2-3(A) 及び Table S2-4 に示す。これらのデータから算出した 10 時間後の阻害割合は、DAPI の濃度が 10, 20, 50 μ M のそれぞれにおいて、19, 50, 87% であり、DAPI の濃度が増加するにつれて阻害割合も増加することが明らかになった。従って、DAPI は **1a** の DNA 切断を阻害すると言える。しかしながら、25°C の酢酸緩衝溶液中、pH 5.0 において報告されている DAPI と ct-DNA の結合定数 $(4.7 \pm 0.3) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ と、本研究で決定した 37°C の MES 緩衝溶液中、pH 5.0 における **1a** と 33 mer オリゴ DNA との結合定数 $(1.81 \pm 0.84) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ を考慮すると、その阻害割合は非常に小さいことがわかる^[19]。DAPI の DNA 結合定数は **1a** の 25 倍近い値を取る。これは、**1a** と同じ濃度の DAPI が存在する条件では、**1a** の DNA 切断はほとんど完全に阻害される値である。しかしながら、**1a** と同じ濃度の DAPI が存在する条件(どちらも 10 μ M) で、その阻害割合はわずか 19% でしかなかった。DAPI は minor groove に多く存在する AT-rich な部位に強く結合する一方で、GC-rich な部位に対しては弱いインターカレーターとして働くことが知られている^[20]。GC-DNA に対する DAPI の結合定数は $1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ という報告があり^[20]、これは **1a** の $1.81 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ と比較してわずかに小さい。従って、これらの DAPI と DNA の結合定数の報告から、DAPI による DNA 切断の低い阻害割合は、DAPI が GC-site に結合することによって **1a** と DNA の結合を阻害していることが原因であると考えられる。そのため、**1a** による DNA 切断の加速は、おそらく GC-site へのインターカレーションを通じて起こるものだと考えられる。

major groove binder である methyl green を用いた阻害実験の経時変化を Figure 2-12(B) に示す。また、ゲル写真及び詳細なデータを Figure S2-3(B) 及び Table S2-4 に示す。10 時間後における阻害割合は、methyl green が 10, 20, 50 μ M 存在下において、それぞれ 12,

26, 64%であり, これは DAPI を用いた阻害実験の結果(19, 50, 87%)と比較してわずかに低い. 従って, DAPI は methyl green よりも強い阻害剤であることがわかる. methyl green は major groove binder である一方で^[17b], deoxyribonuclease I の DNA 切断を阻害する際には minor groove binder として働くことも報告されている^[17b]. 従って, methyl green は **1a** の DNA 切断を major groove で阻害するとともに, minor groove においても同様に阻害すると考えられる. これが, methyl green が DAPI と比較してわずかに弱く **1a** の DNA 切断を阻害する理由である.

1a の cresol 部位がインターカレーターとして働くことは, おそらく理に適っている. しかしながら, **1a** の cresol 環は DAPI の芳香族環よりも小さい. DNA 結合実験より, **1a** の NH 基は DNA 主鎖のリン酸部位と水素結合を形成することが示されている. 従って, **1a** の DNA 結合能は cresol 部位のインターカレーションだけでなく, NH 基の水素結合形成によっても向上することが考えられる.

2-3-6. **1a** の加水分解的 DNA 切断の pH 依存的活性制御の推定機構

purple acid phosphatases は生体系における酵素に対して幅広い寄与をしており, 弱酸性 pH 条件下においてリン酸エステルの切断を触媒する^[21]. これは μ -OH 架橋を持つ二核金属活性中心をしており, μ -OH 架橋が直接リン酸エステルに求核攻撃を行い, 加水分解を促進する^[22]. 従って, μ -OH 架橋は **1a** の加水分解的 DNA 切断を大きく加速することについて, 鍵となる構造だと考えられる. そこで, 我々は加水分解的 DNA 切断を加速する機構を推定するために, **1a** と同様の条件下において, μ -OH 架橋を持ち **1a** と非常によく似た構造を持った **2** を用いて DNA 切断実験を行った. DNA Form I の減少をプロットした経時変化を Figure 2-13(A)に示す. また, ゲル写真及び詳細なデータを Figure S2-4(A)及び Table S2-5 に示す. 予想に反して, pH 5-8 において, **2** は全く DNA 切断活性を示さないことが明らかになった. このことから, **1a** と **2** は同様の構造をしているにも関わらず, それらの加水分解的 DNA 切断については完全に異なることがわかった. この顕著な違いは, **1a** における μ -OH 架橋の求核性及びその隣接位にある NH 基によって説明できる. **1a** 及び **2** の単結晶構造にも示したように, **1a** の μ -OH 架橋は 4 つの NH 基から定義される平均面から 0.842 Å 突き出ている一方で, **2** の μ -OH 架橋は 4 つの NCH₃ 基から定義される平均面から 0.001 Å しか突き出していないことが明らかになっている. 従って, **1a** は DNA のリン酸エステル部位に容易にアクセスできるが, **2** はその NCH₃ 基の立体障害のためにアクセスが困難であると考えられる. このような μ -OH 架橋の求核性の違いが, **1a** と **2** の加水分解的 DNA 切断活性の違いに繋がっていると考えられる. 従って, **1a** の加水分解的 DNA 切断は, μ -OH 架橋の求核攻撃を経て進行していることが考えられる.

1a の環状アミン部位が DNA 切断で重要な役割を果たすことが考えられる. これは **1a** と DNA の結合で示したように, **1a** と DNA との結合では **1a** の環状アミン部位と DNA

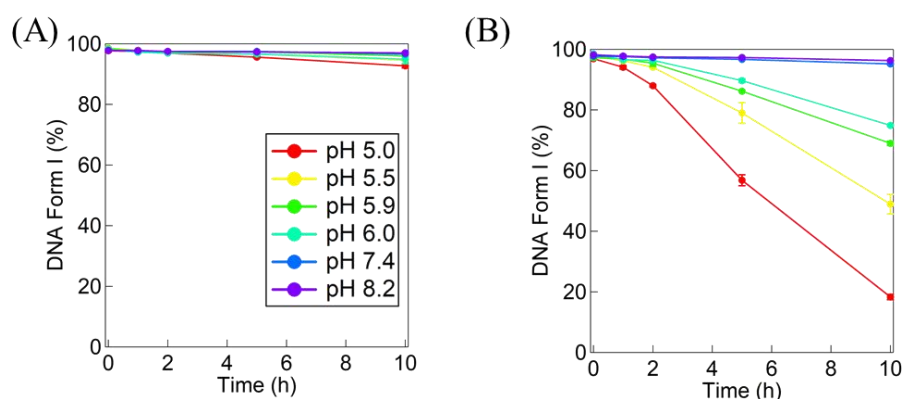


Figure 2-13. pH-dependent profile for DNA cleavage promoted by (A) **2** and (B) **3**, respectively. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 5.0, 5.5, 5.9, 6.0 (MES), 7.4 (Tris-HCl), and 8.2 (TAPS)), [pUC19 DNA] = 50 μ M bp, [complex] = 10 μ M at 37°C for 0, 1, 2, 5, and 10 h.

の水素結合が関与しているためである。また、金属錯体によるリン酸エステルの加水分解的切断は金属中心の近接位にある NH 基により加速されることが報告されている^[23]。そこで、環状アミン部位の役割を明らかにするため、NH 基を 6 つ有する **3** を用いた DNA 切断実験を行った。**3** による pH 5.0–8.2 における DNA Form I の減少の経時変化を Figure 2-13(B) に示す。また、ゲル写真及び詳細なデータを Figure S2-4(B) 及び Table S2-5 に示す。**1a** の経時変化(Figure 2-8(B))と **3** の経時変化(Figure 2-13(B))を比較すると、**1a** は **3** よりも反応性が高いことがわかる。**3** の比較的低い反応性は、 μ -OH 架橋が存在していないことが原因だと考えられる。これは、加水分解的 DNA 切断において、 μ -OH 架橋が重要であることの更なる証拠である。しかしながら、興味深いことに、**3** は μ -OH 架橋が存在していないにも関わらず加水分解的 DNA 切断を加速した。これは、NH 基が DNA 主鎖との水素結合を介してリン酸エステル部位を活性化し、そこに水分子が求核攻撃を行うことによって加水分解的 DNA 切断が起こるためではないかと考えられる。一方で、**2** においては、 NCH_3 基はリン酸エステルと水素結合を形成できない。その結果、**2** は加水分解的 DNA 切断活性を全く示さないと考えられる。これらの結果の **1a**, **2**, **3** の加水分解的 DNA 切断活性の比較から、 μ -OH 架橋及び NH 基が加水分解的 DNA 切断において重要な役割を果たすことが明らかとなった。

DNA 結合実験から推測される機構の 1 つは、**1a** と DNA の複合体におけるリン酸部位にプロトン化が起こり、脱水が起こるといものである。他の推定される機構は、**1a** の NH 基が DNA 主鎖のリン酸エステル部位と水素結合形成を介して相互作用し、DNA 切断を促進するためにその部位を活性化するというものである。これらの特徴に基づいて推測した **1a** の加水分解的 DNA の切断機構を Figure 2-14 に示す。加水分解的 DNA 切断の最初のステップは、**1a** が GC-site にインターカレーターとして結合し、DNA との

複合体を形成する段階である。DNA との複合体は，**1a** の NH 基が DNA 主鎖のリン酸部位と水素結合を形成することで安定化される。この段階で，複合体は弱くプロトン化され，脱水によってエントロピー的に安定化され，またリン酸エステル部位はプロトン化によって活性化される。プロトン化は， μ -OH 架橋のリン酸エステル部位への求核攻撃における活性化エネルギーを低下させるはずである。ここで，pH 5-6 における **1a** の加水分解的 DNA 切断の大きな加速は，リン酸モノエステルの pK_a によって説明できる。デオキシリボースのリン酸モノエステルの pK_{a1} 及び pK_{a2} の値は，それぞれ 1-2, 5-6 と報告されている^[24]。 pK_{a2} の値である 5-6 は，**1a** の加水分解的 DNA 切断が加速される pH 領域と完全に一致する。従って，生成するモノエステルの安定化は，pH 5-6 における **1a** の加水分解的 DNA 切断の駆動力だと考えられる。最後に，**1a** が生成したモノエステルから離れる。従って，**1a** による加水分解的 DNA 切断は，以下の 3 つのステップを介して進行する。(1) DNA との結合，(2) プロトン化による遷移状態の安定化によるリン酸モノエステルの生成，(3) **1a** の DNA からの解離の 3 段階である。

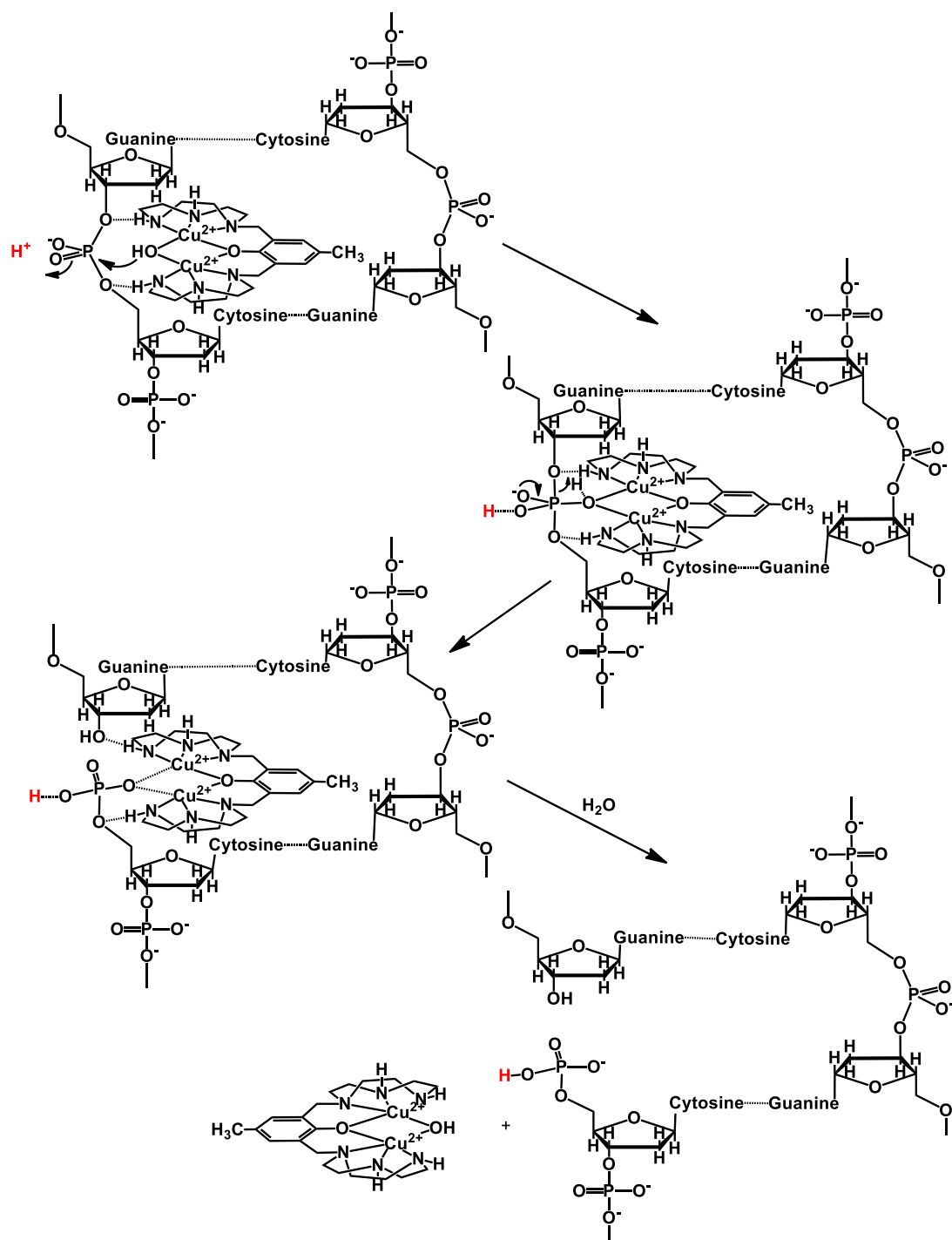


Figure 2-14. Proposed mechanism of the hydrolytic DNA cleavage by **1a**.

2-4. 結論

本研究において、我々は *p*-cresol 誘導体配位子を用いた二核銅(II)錯体 **1a**, **1b**, **2**, **3** を合成した。単結晶 X 線構造解析から、**1a** と **2** の全体構造は互いに類似しているが、 μ -OH 架橋の外部基質への反応性は異なることが示された。配位子と銅(II)イオンの混合溶液に NaOH 水溶液を加えていくことによって錯形成過程を pH 滴定及び分光学的測定によって追跡した結果、全ての二核銅(II)錯体において、結晶中の二核銅中心構造は pH 5–9 の水溶液中において維持されることが明らかになった。**1a** の DNA 結合様式は ITC 測定及び DNA binder である DAPI, methyl green を用いた阻害実験によって測定を行った。その結果、**1a** は DNA 主鎖のリン酸部位と NH 基の水素結合形成によってアシストを受け、DNA の GC-site にインターカレーターとして結合することが明らかになった。さらに、熱力学的パラメーターである ΔH° , ΔS° , K を測定した結果、DNA 結合はエントロピー及びエンタルピー的に有利であり、また **1a** の DNA 結合能は pH 5–6 においてプロトン化が起こることによってわずかに向上することを見出した。**1a** は、弱酸性 pH 領域である pH 5–6 において、スーパーコイルドプラスミド pUC19 DNA (Form I) を DNA Form II に切断する反応を加速することがわかった。purple acid phosphatases が弱酸性 pH 領域でリン酸エステルの加水分解を促進することが報告されているが、本研究は、合成された金属錯体による加水分解的 DNA 切断が pH 依存的に加速された初めての例である。**1a**, **2**, **3** における加水分解的 DNA 切断活性を比較した結果、 μ -OH 架橋が求核剤として DNA 切断を加速し、NH 基が加水分解的 DNA 切断に必要不可欠であることが明らかになった。**1a** による DNA 切断の遷移状態は DNA 結合及びその複合体へのプロトン化によって安定化される。推定した機構は、これらの実験事実に基づいている。**1a** の DNA 切断活性が pH 依存的に制御できたことは、副作用の少ない新しい抗がん剤の開発に対していくつかの知見を与えるかもしれない。

2-5. 実験方法

2-5-1. 試薬及び測定装置

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。33 mer オリゴ DNA は、Thermo Fisher Scientific 社から購入した 5'-d(GAC TCC ACA GTG CAT ACG TGG GCT CCA ACA GGT)-3' 及びその相補鎖を使用し、95°C で 1 分間加熱した後、ゆっくりと室温まで下げることによってアニーリングさせた。1,4,7-triazacyclononane tritosylate (**15**) 2,6-bis(chloromethyl)-4-methylphenol (**19**), *p*-cresol 誘導体配位子の 2,6-bis(1,4,7-triazacyclononylmethyl)-4-methylphenol hexahydrochloride (Hbcmp•6HCl) 及び 2,6-bis(1,4,7,10-tetraazacyclododecylmethyl)-4-methylphenol octahydrochloride (Hbcc•8HCl) は参考文献^[10]に従って合成した。

元素分析(C, H, N)は、Perkin-Elmer 社製 Elemental Analyzer 2400 II を用いて測定した。¹H 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*₄ (TSP) を用いて測定した。Electron spray ionization MS (ESI MS) スペクトルは、日本電子製 JMS-T100CSRX the AccuTOF CS を用いて、MeOH または MeCN を溶媒として測定した。pH 測定は、HORIBA 製 LAQUA electrode を用い、標準緩衝溶液を用いて構成した後に測定を行った。UV-vis スペクトルは、Agilent 社製 8453 紫外可視分光光度計を用いて測定した。等温滴定型熱量(ITC)測定は、Malvern 社製 MicroCal Isothermal Titration Calorimeter VP-ITC を用いて測定を行った。IR スペクトルは、Shimadzu Single Reflection HATR IR Affinity-1 MIRacle 10 を用いて測定した。単結晶 X 線構造解析は、リガク社製 R-Axis RAPID II/RAPID AUTO X 線単結晶 X 線構造解析装置で解析データを測定し、直接法により初期位相を決定した後、フーリエ合成により構造を解析し、Yadokari による完全行列最小二乗法により精密化した。

2-5-2. 配位子及び二核銅(II)錯体合成

1-Tosyl-1,4,7-triazacyclononane (**16**)の合成^[10]

300 mL ナスフラスコに回転子を入れ、**15** (7.84 g, 13.2 mmol), phenol (9.43 g, 100 mmol), 30% solution of HBr in AcOH (110 mL) を加え、30°C の油浴に浸し、開放系で還流しながら反応させた。油浴の温度を 90 分かけて 90°C にし、2 日間反応させた。2 日後、反応容器を室温に戻し、Et₂O で洗いこみながらヌッチェで濾過し、得られた白～薄赤色固体を真空乾燥した。この固体を 1.5 M NaOH 水溶液(100 mL)に溶解させ、CHCl₃ (4 × 15 mL) で分液した。有機層に Na₂SO₄ を加えて脱水した後、桐山漏斗で濾過し、濾液をロータリーエバポレーターで濃縮、真空乾燥すると白色の固体が得られた(2.70 g, Yield: 72%)。 ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃); δ/ppm: 7.69 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ph), 7.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ph),

3.16–3.21 (m, 4H, CH₂), 3.05–3.11 (m, 4H, CH₂), 2.89 (s, 4H, CH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃).

1,4-Dimethyl-7-tosyl-1,4,7-triazacyclononane (17)の合成^[10]

50 mL ナスフラスコに回転子を入れ, **16** (2.62 g, 9.25 mmol), H₂O (3 mL)を加えた. 反応容器を氷浴に浸し, HCHO (10 mL)を 10 分以上かけて滴下した. 次に, HCOOH (10 mL)を 10 分以上かけて滴下し, 0°C で 30 分間反応させた. 反応容器を室温に戻した後, 110°C で 15 時間加熱還流した. 反応容器を室温に戻した後, 12 M HCl (6 mL)を加えて 5 分間反応させた後, ロータリーエバポレーターで濃縮, 真空乾燥した. 得られた固体を 1.5 M NaOH 水溶液(20 mL)に溶解させ, CHCl₃ (4×20 mL)で分液した. 有機層に Na₂SO₄ を加えて脱水した後, 桐山漏斗で濾過し, 濾液をロータリーエバポレーターで濃縮, 真空乾燥すると薄黄色の固体が得られた(2.83 g, Yield: 98%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃); δ/ppm: 7.67 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ph), 7.30 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ph), 3.21–3.29 (m, 4H, CH₂), 2.87–2.94 (m, 4H, CH₂), 2.69 (s, 4H, CH₂), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 6H, CH₃).

1,4-Dimethyl-1,4,7-triazacyclononane (18)の合成^[10]

100 mL ナスフラスコに回転子を入れ, **17** (3.24 g, 10.4 mmol)を加え, 氷浴に浸した. この反応溶液に conc. H₂SO₄ (15 mL)を加え, 脱気窒素置換した後, 120°C で 36 時間加熱還流した. 反応容器を室温に戻した後, 氷浴に浸し, 12 M NaOH 水溶液を伸長に加えながら pH を 10 にした. 析出した Na₂SO₄ をヌッチェで濾過した後, その Na₂SO₄ を CHCl₃ (5×40 mL)で洗い込んだ. さらに, 濾液を CHCl₃ (1×40 mL)で分液し, 有機層に Na₂SO₄ 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し, 真空乾燥すると黄色の油状物質が得られた(0.933 g, Yield: 57%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃); δ/ppm: 2.65–2.71 (m, 4H, CH₂), 2.50–2.57 (m, 8H, CH₂), 2.41 (s, 6H, CH₃).

2,6-Bis(*N,N'*-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyclonon-1-ylmethyl)-4-methylphenol pentahydrochloride (HMe₄bcmp•5HCl, 20)の合成

300 mL ナスフラスコに回転子を入れ, **18** (0.365 g, 2.32 mmol), **19** (0.215 g, 1.05 mmol), Et₃N (0.34 mL, 2.44 mmol)を加え, 脱気窒素置換した後, 90°C で一晩加熱還流した. 反応容器を室温に戻した後, 反応溶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. これを再少量の CHCl₃ に溶解させ, アルミナカラムクロマトグラフィー (gradient CHCl₃/MeOH from 100/0 to 0/100)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 (2,6-Bis(*N,N'*-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyclonon-1-ylmethyl)-4-methylphenol (HMe₄bcmp), 0.330 g, Yield: 70%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃); δ/ppm: 6.87 (s, 2H, Ph), 3.72 (s, 4H, CH₂), 2.84–2.89 (m, 8H, CH₂), 2.63–2.69 (m, 16H, CH₂), 2.35 (s, 12H, CH₃), 2.23 (s, 3H, CH₃).

先程得られた黄色の油状物質(1.19 g, 2.67 mmol)を EtOH (27 mL), 12 M HCl (9 mL)に溶解させ、脱気窒素置換した後、室温で一晩攪拌した。反応が進行すると、反応容器は白濁していた。反応溶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の固体が得られた(1.41 g, Yield: 84%)。¹H NMR (500 MHz, D₂O); δ/ppm: 7.39 (s, 2H, Ph), 4.21 (s, 4H, CH₂), 3.10–3.79 (m, 24H, CH₂), 2.94 (s, 12H, CH₃), 2.34 (s, 3H, CH₃)。Anal. Calcd. for 20•5H₂O: C, 41.76; H, 8.55; N, 11.69. Found: C, 41.69; H, 8.83; N, 12.22.

二核銅(II)錯体 1a の合成

20 mL ナスフラスコに Hbcmp•6HCl (100 mg, 0.165 mmol)を入れ、Milli-Q 水(4 mL)に溶解させた。conc. NaOH 水溶液で pH を 12 にした後、CH₂Cl₂ (3 × 5 mL)で分液した。有機層に Na₂SO₄ を加えて脱水した後、ヌッチェを用いてセライト濾過し、濾液をロータリーエバポレーターで濃縮、真空感動すると黄色の油状物質が得られた(Hbcmp, 56.8 mg, Yield: 88%)。この油状物質を Milli-Q 水(10 mL)に溶解させ、Cu(ClO₄)₂•6H₂O (127 mg, 0.342 mmol)を Milli-Q 水(4 mL)に溶解させた水溶液を加えた。脱気窒素置換した後、0.1 M NaOH 水溶液(4.36 mL, 0.436 mmol)を加え、しばらく攪拌した。反応溶液をロータリーエバポレーターを用いて濃縮した後、真空乾燥すると緑色の固体が得られた。この固体をグローブボックスに入れ、MeCN (10 mL)に溶解させ、簡易濾過した後、Et₂O と液々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を得た(34.8 mg, Yield: 30%)。ESI MS (H₂O/MeCN *m/z*, positive mode). calcd for [1a – ClO₄]⁺: 633.11. Found: 632.93. Anal. Calcd for [Cu₂(μ-OH)bcmp](ClO₄)₂•MeCN•0.5 H₂O: C, 35.30; H, 5.41; N, 12.53. Found: C, 35.48; H, 5.50; N, 12.21. IR (KBr): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3586–2864, 1613, 1479, 1458, 1375, 1082.

二核銅(II)錯体 1b の合成

30 mL ニロナスフラスコに回転子, Hbcmp•6HCl (32.3 mg, 0.0530 mmol)を入れ、Milli-Q 水(2 mL)に溶解させた。この溶液に 1.5 M NaOH 水溶液を加えていき、pH を 7 にした。この溶液を、Milli-Q 水(2 mL)に溶解させた Cu(ClO₄)₂•6H₂O (50.1 mg, 0.135 mmol)の溶液に加え、5 分間攪拌した。析出した固体を桐山漏斗で濾過し、真空乾燥すると緑色の固体を得た。この固体を MeCN/EtOH = 1/1 の溶液(4 mL)に溶解させ、Et₂O 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を得た(11.9 mg, Yield: 31%)。ESI MS (H₂O/MeCN *m/z*, positive mode). calcd for [1b – ClO₄]⁺: 651.08. Found: 650.89. Anal. Calcd. for [Cu₂(μ-Cl)bcmp](ClO₄)₂•MeCN: C, 34.88; H, 5.09; N, 12.38. Found: C, 35.00; H, 5.14; N, 12.20. IR (KBr): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3620–2872, 1614, 1476, 1446, 1354, 1103.

二核銅(II)錯体 2 の合成

20 mL ナスフラスコに **20** (99.0 mg, 0.222 mmol) を入れ, Milli-Q 水(2 mL) に溶解させた. 1 M NaOH 水溶液を用いて pH を 12 にした後, CH₂Cl₂ (3 × 5 mL) で分液した. 有機層に Na₂SO₄ を加えて脱水した後, ヌッチェでセライト濾過し, 濾液をロータリーエバポレーターで濃縮, 真空乾燥すると薄黄色の油状物質が得られた(HMe₄bcmp, 34.6 mg, Yield: 80%). この油状物質を Milli-Q 水/MeCN = 25/1 の溶液(10 mL) に溶解させ, この溶液に Cu(ClO₄)₂•6H₂O (68.5 mg, 0.185 mmol) を Milli-Q 水(2 mL) に溶解させた水溶液を加えた. 脱気窒素置換した後, 0.1 M NaOH 水溶液(2.32 mL, 0.232 mmol) を加え, しばらく攪拌した. 反応溶液をロータリーエバポレーターで濃縮し, 真空乾燥させると緑色の固体を得た. この固体をグローブボックスに入れ, MeCN (5 mL) に溶解させ, 簡易濾過した後, Et₂O と液々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を得た(94.3 mg, 52%). ESI MS (H₂O/MeCN *m/z*, positive mode). calcd for [**2** – ClO₄]⁺: 689.17. Found: 689.04. Anal. Calcd for [Cu₂(μ-OH)Me₄bcmp](ClO₄)₂•MeCN•2H₂O: C, 37.46; H, 6.17; N, 11.33. Found: C, 37.72; H, 6.26; N, 11.08. IR (KBr): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3613–2868, 1614, 1481, 1472, 1431, 1366, 1082.

二核銅(II)錯体 3 の合成

20 mL ナスフラスコに Hbcc•8HCl (0.200 g, 0.260 mmol) を入れ, Milli-Q 水(6 mL) に溶解させた. 1 M NaOH 水溶液を用いて pH を 7 にした後, Milli-Q 水(2 mL) に溶解させた Cu(ClO₄)₂•6H₂O (0.241 g, 0.650 mmol) の水溶液を加え, 1 M NaOH 水溶液を用いて再度 pH を 7 に調整した. この溶液に少量の NaClO₄ を加え, ロータリーエバポレーターで濃縮した. 得られた青色の粉末を少量の MeOH に溶解させ, Et₂O 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青色の固体を得た(0.119 g, Yield: 50%). ESI MS (H₂O/MeCN *m/z*, positive mode). calcd for [**3** – ClO₄]⁺: 801.14. Found: 801.12. calcd for [**3** – 2ClO₄]²⁺: 351.10. Found: 351.08. Anal. Calcd for [Cu₂bcc](ClO₄)₃•MeOH•H₂O: C, 32.52; H, 5.67; N, 11.67. Found: C, 32.46; H, 5.41, N; 11.81. IR (KBr): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3620–2938, 1616, 1470, 1441, 1381–1306, 1099.

2-5-3. Hbcmp, HMe₄bcmp, Hbcc の錯形成過程における pH 変化と分光学的測定

各配位子(0.5 mM)及び Cu(ClO₄)₂•6H₂O (1.0 mM) を Milli-Q 水(2.0 mL) に溶解させ, 2 面セルに入れた. この溶液の温度を 25°C に保ちながら NaOH (0.05 M) を滴下していき, その際の pH 変化を pH メーターで, また電子スペクトル及び ESI MS スペクトルをそれぞれ測定した.

2-5-4. 等温滴定量熱法(ITC)測定

ITC 測定は, Malvern 社製 MicroCal Isothermal Titration Calorimeter VP-ITC を用いた。セルに, 33 mer オリゴ二重鎖 DNA (25 μ M), 緩衝溶液(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, 各錯体(1.0 mM), 緩衝溶液(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 25 回(10 μ 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。

2-5-5. DNA 切断実験

各錯体の加水分解的 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 5.0, 5.5, 5.9, 6.0 (MES), 7.4 (Tris-HCl), 8.2 (TAPS), 10 mM), pUC19 DNA (0.05 mM bp), complex (10 μ 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, 5, 10 時間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 染色を 1 時間行い, Vilber Lourmat ECX-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 の染色補正要因 1.06 を用い, ImageJ ソフトウェアによって解析を行った。

2-5-6. 1a の DNA 切断阻害実験

1.5 mL エッペンチューブに NaCl (10 mM), buffer (pH 5.0, 5.5 (MES), 10 mM), pUC19 DNA (0.05 mM bp), DAPI or methyl green (5, 10, 50 μ M)となるように調製した溶液を加え, 37°C の暗所で 1 時間プレインキュベーションした。この溶液に **1a** の最終濃度が 10 μ M になるように加え, 37°C の暗所でインキュベーションした。この後の手順は DNA 切断実験に記載したものと同様である。

2-6. 参考文献

- [1] (a) Kettenmann, S. D.; Louka, F. R.; Marine, E.; Fischer, R. C.; Mautner, F. A.; Kulak, N.; Massoud, S. S. Efficient Artificial Nucleases for Mediating DNA Cleavage Based on Tuning the Steric Effect in the Pyridyl Derivatives of Tripod Tetraamine-Cobalt(II) Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2018**, 2322–2338. (b) McGivern, T. J. P.; Afshapour, S.; Marmion, C. J. Copper complexes as artificial DNA metallonucleases: From Sigman's reagent to next generation ant-cancer agent? *Inorganica Chim. Acta* **2018**, 472, 12–39. (c) Santini, C.; Pellei, M.; Gandin, V.; Porchia, M.; Tisato, F.; Marzano, C. Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents. *Chem. Rev.* **2014**, 114, 815–862. (d) Dasari, S.; Tchounwou, P. B. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, 740, 364–378. (e) Qian, J.; Gu, W.; Liu, H.; Gao, F.; Feng, L.; Yan, S.; Liao, D.; Cheng, P. The first dinuclear copper(II) and zinc(II) complexes containing novel Bis-TACN: syntheses, structures, and DNA cleavage activities. *Dalton Trans.* **2007**, 10, 1060–1066. (f) Copeland, K. D.; Fitzsimons, M. P.; Houser, R. P.; Barton, J. K. DNA Hydrolysis and Oxidative Cleavage by Metal-Binding Peptides Tethered to Rhodium Intercalators. *Biochemistry* **2002**, 41, 343–356.
- [2] (a) Johnstone, T. C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S. J. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chem. Rev.* **2016**, 116, 3436–3486. (b) Rosenberg, B. Fundamental studies with cisplatin. *Cancer* **1985**, 55, 2303–2316.
- [3] Kidani, Y.; Inagaki, K.; Iigo, M.; Hoshi, A.; Kuretani, K. Antitumor activity of 1,2-diaminocyclohexaneplatinum complexes against Sarcoma-180 ascites form. *J. Med. Chem.* **1978**, 21, 1315–1318.
- [4] Mckeage, M. J. Lobaplatin: a new antitumor platinum drug. *Expert Opin. Investg. Drugs* **2001**, 10, 119–128.
- [5] Shimada, M.; Itamochi, H.; Kigawa, J. Nedaplatin: a cisplatin derivative in cancer chemotherapy. *Cancer Manag. Res.* **2013**, 5, 67–76.
- [6] (a) Zhou, D.; Shao, L.; Spitz, D. R. Chapter One – Reactive Oxygen Species in Normal and Tumor Stem Cells. *Adv. Cancer Res.* **2014**, 122, 1–67. (b) Weidemann, A.; Johnson, R. S. Biology of HIF-1 α . *Cell Death Differ.* **2008**, 15, 621–627. (c) Kato, Y.; Ozawa, S.; Miyamoto, C.; Maehata, Y.; Suzuki, A.; Maeda, T. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int.* **2013**, 13, 89–96.
- [7] (a) Gillies, R. J.; Raghunand, N.; Karczmar, G. S.; Bhujwala, Z. M. MRI of the tumor microenvironment. *J. Magn. Reson. Imaging* **2002**, 16, 430–450. (b) Kondo, A.; Yamamoto, S.; Nakaki, R.; Shimamura, T.; Hamakubo, T.; Sakai, J.; Kodama, T.; Yoshida, T.; Aburatani, H.; Osawa, T. Extracellular Acidic pH Activates the Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2 to Promote Tumor Progression. *Cell Reports* **2007**, 18, 2228–2242. (c) Lin, H.-J.; Herman, P;

Lakowicz, J. R. Fluorescence lifetime-resolved pH imaging of living cells. *Cytometry* **2003**, *52A*, 77–89.

[8] (a) Massoud, S. S.; Ledet, C. C.; Junk, T.; Bosch, S.; Comba, P.; Herchel, R.; Hošek, J.; Trávníček, Z.; Fischer, R. C.; Mautner, F. A. Dinuclear metal(II)-acetato complexes based on bi-compartmental 4-chlorophenolate: syntheses, structures, magnetic properties, DNA interactions and phosphodiester hydrolysis. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 12933–12950. (b) Boerner, L. J. K.; Zaleski, J. M. Metal complex-DNA interactions: from transcription inhibition to photoactivated cleavage. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 135–144.

[9] Montagner, D.; Gandin, V.; Marzano, C.; Erxleben, A. DNA damage and induction of apoptosis in pancreatic cancer cells by a new dinuclear bis(triazacyclononane) copper complex. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *145*, 101–107.

[10] (a) Barta, C. A.; Bayly, S. R.; Read, P. W.; Patrick, B. O.; Thompson, R. C.; Orvig, C. Molecular Architectures for Trimetallic d/f/d Complexes: Structural and Magnetic Properties of a LnNi₂ Core. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 2280–2293. (b) Benniston, A. C.; Gunning, P.; Peacock, R. D. Synthesis and Binding Properties of Hybrid Cyclophane-Azamacrocyclic Receptors. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 115–123. (c) Goswami, S.; Das, A. K.; Maity, A. K.; Manna, A.; Aich, K.; Maity, S.; Saha, P.; Mandal, T. K. Visual and near IR (NIR) fluorescence detection of Cr³⁺ in aqueous media via spirobenzopyran ring opening with application in logic gate and bio-imaging. *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 231–239. (d) Chirakul, P.; Hampton, P. D.; Bencze, Z. A Convergent Synthesis of Hexahomotriazacalix[3]arene Macrocycles. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8297–8300. (e) Valyaev, D. A.; Clair, S.; Patrone, L.; Abel, M.; Porte, L.; Chuzel, O.; Parrain, J.-L. Grafting a homogeneous transition metal catalyst onto a silicon AFM probe: a promising strategy for chemically constructive nanolithography. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 2815–2821. (f) Wilson, J. M.; Giordani, F.; Farrugia, L. J.; Barrett, M. P.; Robins, D. J.; Sutherland, A. Synthesis, characterization and anti-protozoal activity of carbamate-derived polyazamacrocycles. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3651–3656. (g) Kimura, E.; Aoki, S.; Koike, T.; Shiro, M. A Tris(ZnII-1,4,7,10-tetraazacyclododecane) Complex as a New Receptor for Phosphate Dianions in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3068–3076.

[11] Addison, A. W.; Rao, T. N.; Reedijk, J.; Rijn, J. V.; Verschoor, G. C. Synthesis, structure, and spectroscopic properties of copper(II) compounds containing nitrogen-sulphur donor ligands; the crystal and molecular structure of aqua[1,7-bis(*N*-methylbenzimidazol-2'-yl)-2,6-dithiaheptane]copper(II) perchlorate. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1984**, 1349–1356.

[12] (a) Rey, N. A.; Neves, A.; Bortoluzzi, A. J.; Pich, C. T.; Terenzi, H. Catalytic Promiscuity in Biomimetic Systems: Catecholase-like Activity, Phosphatase-like Activity, and Hydrolytic DNA Cleavage Promoted by a New Dicopper(II) Hydroxo-Bridged Complex. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 348–350. (b) Rajendiran, T. M.; Mahalakshmy, R.; Kannappan, R.; Rajeswari, J.; Venkatesan, R.;

- Rao, P. Synthesis of flexible ligands for assembling two metals in close proximity. Magnetic, electrochemical and spectral properties of binuclear copper (II) complexes with different exogenous bridging motifs. *Trans. Met. Chem.* **2003**, *28*, 280–287. (c) Amudha, P.; Kandaswamy, M.; Govindasamy, L.; Velmurugan, D. Synthesis and Characterization of New Symmetrical Ligands and Their μ -Phenoxo-Bridged Bicopper(II) Complexes: Structural, Electrochemical, and Magnetic Studies. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 4486–4492.
- [13] (a) Choudhury, C. R.; Dey, S. K.; Karmakar, R.; Wu, C.-D.; Lu, C.-Z.; Fallah, M. S. E.; Mitra First report of singly phenoxo-bridged copper(II) dimeric complexes: synthesis, crystal structure and low-temperature magnetic behaviour study. *New J. Chem.* **2003**, *27*, 1360–1366. (b) Smith, S. J.; Noble, C. J.; Palmer, R. C.; Hanson, G. R.; Schenk, G.; Gahan, L. R.; Riley, M. J. Structural and spectroscopic studies of a model for catechol oxidase. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 499–510.
- [14] (a) Torelli, S.; Belle, C.; Gautier-Luneau, I.; Pierre, J. L.; Saint-Aman, E.; Latour, J. M.; Pape, L. L.; Luneau, D. pH-Controlled Change of the Metal Coordination in a Dicopper(II) Complex of the Ligand H-BPMP: Crystal Structures, Magnetic Properties, and Catecholase Activity. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 3526–3536. (b) Nagaj, J.; Stokowa-Sołtys, K.; Kurowska, E.; Frączyk, T.; Jeżowska-Bojczuk, M.; Bal, W. Revised Coordination Model and Stability Constants of Cu(II) Complexes of Tris Buffer. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 13927–13933.
- [15] (a) Szatrowski, T. P.; Nathan, C. F. Production of Large Amounts of Hydrogen Peroxide by Human Tumor Cells. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 794–798. (b) Nogueira, V.; Hay, N. Molecular Pathways: Reactive Oxygen Species Homeostasis in Cancer Cells and Implications for Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 4309–4314. (c) Liou, G.-Y.; Storz, P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.* **2010**, *44*, 479–496.
- [16] (a) Tuite, E.; Lincoln, P.; Nordén, B. Photophysical Evidence That Δ - and Λ -[Ru(phen)₂(dppz)]²⁺ Intercalate DNA from the Minor Groove. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 239–240. (b) Eriksson, M.; Leijon, M.; Hiort, C.; Norden, B.; Graeslund, A.; Minor groove binding of [Ru(phen)₃]²⁺ to [d(CGCGATCGCG)]₂ evidenced by two-dimensional NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4933–4934.
- [17] (a) Manzini, G.; Barcellona, M. L.; Avitabile, M.; Quadrifoglio, F. Interaction of diamidino-2-phenylindole (DAPI) with natural and synthetic nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **1983**, *11*, 8861–8876. (b) Tuite, E.; Sehlstedt, U.; Hagmar, P.; Nordén, B.; Takahashi, M. Effects of Minor and Major Groove-Binding Drugs and Intercalators on the DNA Association of Minor Groove-Binding Proteins RecA and Deoxyribonuclease I Detected by Flow Linear Dichroism. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 482–492. (c) Wittung, P.; Nielsen, P.; Nordén, B. Direct Observation of Strand Invasion by Peptide Nucleic Acid (PNA) into Double-Stranded DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7049–7054.

- [18] Kim, S. K.; Nordén, B. Methyl green: A DNA major-groove binding drug. *FEBS Lett.* **1993**, *315*, 61–64.
- [19] Williams, A. K.; Dasilva, S. C.; Bhatta, A.; Rawal, B.; Liu, M.; Korobkova, E. A. Determination of the drug-DNA binding modes using fluorescence-based assays. *Anal. Biochem.* **2012**, *422*, 66–73.
- [20] Wilson, W. D.; Tanious, F. A.; Barton, H. J.; Jones, R. L.; Streckowski, L.; Boykin, D. W. Binding of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to GC and mixed sequences in DNA: intercalation of a classical groove-binding molecule. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5008–5010.
- [21] (a) Sadler, N. P.; Chuang, C.-C.; Milburn, R. M. Iron(III)-Promoted Hydrolysis of 4-Nitrophenyl Phosphate. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 402–404. (b) Schlosnagle, D. C.; Bazer, F. W.; Tsibris, J. C. M.; Roberts R. M. An Iron-containing Phosphatase Induced by Progesterone in the Uterine Fluids of Pigs. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 7574–7579.
- [22] Schenk, G.; Mitić, N.; Hanson, G. R.; Comba, P. Purple acid phosphatase: A journey into the function and mechanism of a colorful enzymes. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 473–482.
- [23] Feng, G.; Natale, D.; Prabakaran, R.; Mareque-Rivas, J. C.; Williams, N. H. Efficient Phosphodiester Binding and Cleavage by ZnII Complex Combining Hydrogen-Bonding Interactions and Double Lewis Acid Activation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7056–7059.
- [24] Thaplyal, P.; Bevilacqua, P. C. Chapter Nine – Experimental Approaches for Measuring pK_a 's in RNA and DNA. *Methods Enzymol.* **2014**, *549*, 189–219.

2-7. 謝辞

本研究を行うにあたり, ITC 測定の協力を快く引き受けてくださいました同志社大学の北岸 宏亮 教授に心より感謝申し上げます.

2-8. Supporting Information

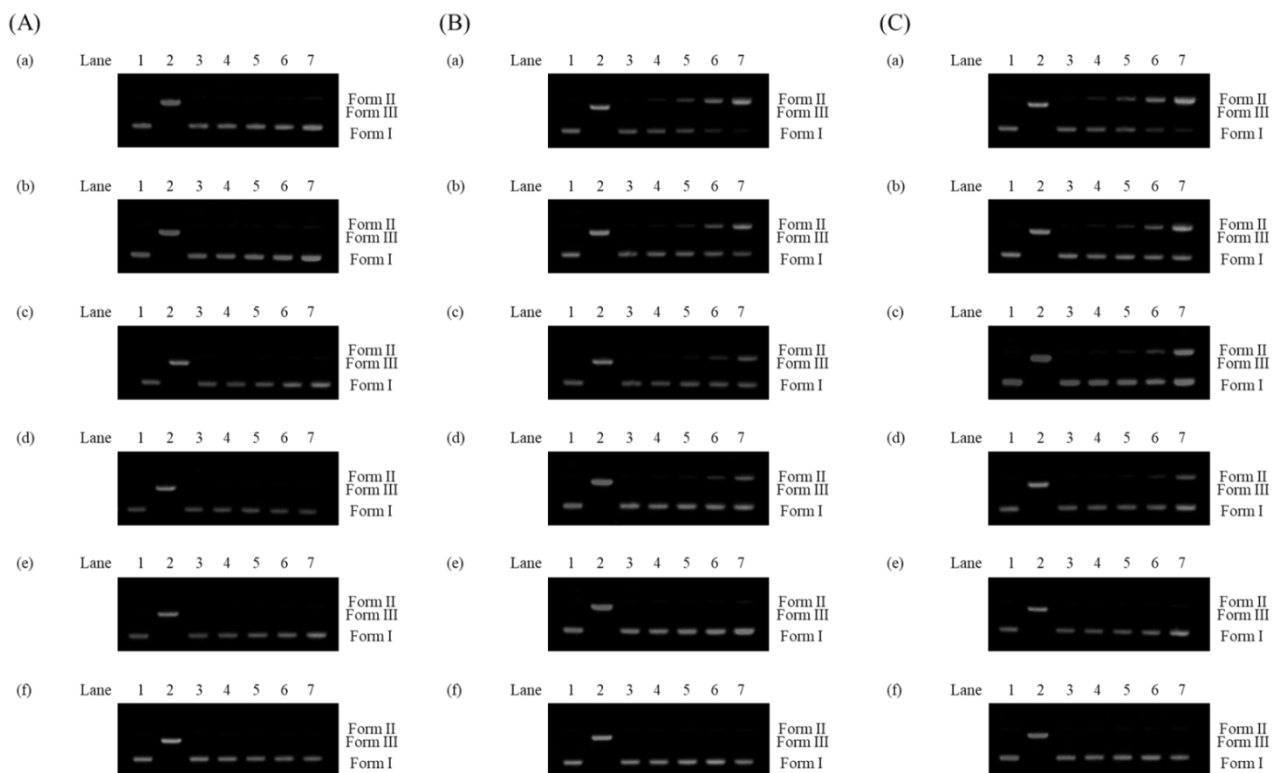


Figure S2-1. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) (A) in the absence of complex, (B) in the presence of **1a**, and (C) in the presence of **1b**, respectively. (a) pH 5.0 (MES), (b) pH 5.5 (MES), (c) pH 5.9 (MES), (d) pH 6.0 (MES), (e) pH 7.4 (Tris- HCl), and (f) pH 8.2 (TAPS). Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lane 3–7: corresponding to the time of 0, 1, 2, 5, and 10 h, respectively.

Table S2-1. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed without dicopper complex, and in the presence of 1a and 1b

Complex		None			1a			1b		
pH	Time (h)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
5.0	0	98.1 ± 0.3	1.9 ± 0.3	-	97.3 ± 0.6	2.7 ± 0.6	-	97.6 ± 0.5	2.4 ± 0.5	-
	1	97.3 ± 0.2	2.7 ± 0.2	-	83.6 ± 0.9	16.4 ± 0.9	-	81.3 ± 1.1	18.7 ± 1.1	-
	2	97.1 ± 0.3	2.9 ± 0.3	-	61.5 ± 0.2	38.5 ± 0.2	-	57.9 ± 0.1	42.1 ± 0.1	-
	5	96.1 ± 0.3	3.9 ± 0.3	-	23.6 ± 1.6	76.4 ± 1.6	-	23.6 ± 1.4	76.4 ± 1.4	-
	10	94.2 ± 0.5	5.8 ± 0.5	-	8.4 ± 1.9	91.6 ± 1.9	-	8.5 ± 0.7	91.5 ± 0.7	-
5.5	0	97.5 ± 0.4	2.5 ± 0.4	-	97.5 ± 0.3	2.5 ± 0.3	-	97.7 ± 0.1	2.3 ± 0.1	-
	1	97.2 ± 0.1	2.8 ± 0.1	-	92.9 ± 0.3	7.1 ± 0.3	-	91.5 ± 0.3	8.5 ± 0.3	-
	2	96.7 ± 0.2	3.3 ± 0.2	-	84.6 ± 0.2	15.4 ± 0.2	-	81.9 ± 0.2	18.1 ± 0.2	-
	5	96.1 ± 0.7	3.9 ± 0.7	-	58.4 ± 0.8	41.6 ± 0.8	-	58.4 ± 1.9	41.6 ± 1.9	-
	10	95.4 ± 0.0	4.6 ± 0.0	-	35.3 ± 1.5	64.7 ± 1.5	-	37.0 ± 3.6	63.0 ± 3.6	-
5.9	0	98.5 ± 0.3	1.5 ± 0.3	-	98.2 ± 1.3	1.8 ± 1.3	-	97.7 ± 1.0	2.3 ± 1.0	-
	1	98.3 ± 0.2	1.7 ± 0.2	-	95.7 ± 0.2	4.3 ± 0.2	-	94.8 ± 0.7	5.2 ± 0.7	-
	2	97.8 ± 0.6	2.2 ± 0.6	-	91.4 ± 0.3	8.6 ± 0.3	-	91.1 ± 1.0	8.9 ± 1.0	-
	5	97.1 ± 0.2	2.9 ± 0.2	-	76.7 ± 1.6	23.3 ± 1.6	-	78.5 ± 1.8	21.5 ± 1.8	-
	10	96.7 ± 0.6	3.3 ± 0.6	-	57.5 ± 4.2	42.5 ± 4.2	-	57.5 ± 1.3	42.5 ± 1.3	-
6.0	0	97.9 ± 0.6	2.1 ± 0.6	-	97.6 ± 0.4	2.4 ± 0.4	-	97.2 ± 0.1	2.8 ± 0.1	-
	1	97.6 ± 0.4	2.4 ± 0.4	-	96.4 ± 0.3	3.6 ± 0.3	-	95.6 ± 0.5	4.4 ± 0.5	-
	2	97.0 ± 0.4	3.0 ± 0.4	-	94.0 ± 0.2	6.0 ± 0.2	-	92.1 ± 0.5	7.9 ± 0.5	-
	5	96.8 ± 0.3	3.2 ± 0.3	-	83.4 ± 0.3	16.6 ± 0.3	-	83.2 ± 0.9	16.8 ± 0.9	-
	10	95.3 ± 0.5	4.7 ± 0.5	-	67.0 ± 2.2	33.0 ± 2.2	-	65.1 ± 1.9	34.9 ± 1.9	-
7.4	0	98.6 ± 0.6	1.4 ± 0.6	-	98.3 ± 0.0	1.7 ± 0.0	-	97.8 ± 0.1	2.2 ± 0.1	-
	1	98.2 ± 0.7	1.8 ± 0.7	-	98.0 ± 0.2	2.0 ± 0.2	-	97.3 ± 0.2	2.7 ± 0.2	-
	2	98.0 ± 0.8	2.0 ± 0.8	-	97.7 ± 0.4	2.3 ± 0.4	-	96.9 ± 0.1	3.1 ± 0.1	-
	5	97.8 ± 0.8	2.2 ± 0.8	-	97.0 ± 0.2	3.0 ± 0.2	-	96.9 ± 0.1	3.1 ± 0.1	-
	10	97.3 ± 0.9	2.7 ± 0.9	-	96.3 ± 0.2	3.7 ± 0.2	-	96.6 ± 0.1	3.4 ± 0.1	-
8.2	0	98.5 ± 0.6	1.5 ± 0.6	-	97.8 ± 0.2	2.2 ± 0.2	-	98.2 ± 0.3	1.8 ± 0.3	-
	1	98.3 ± 0.5	1.7 ± 0.5	-	97.6 ± 0.2	2.4 ± 0.2	-	97.8 ± 0.4	2.2 ± 0.4	-
	2	97.9 ± 0.6	2.1 ± 0.6	-	97.6 ± 0.2	2.4 ± 0.2	-	97.2 ± 0.0	2.8 ± 0.0	-
	5	97.6 ± 0.5	2.4 ± 0.5	-	97.0 ± 0.2	3.0 ± 0.2	-	97.1 ± 0.0	2.9 ± 0.0	-
	10	96.6 ± 0.7	3.4 ± 0.7	-	96.4 ± 0.6	3.6 ± 0.6	-	95.8 ± 0.6	4.2 ± 0.6	-

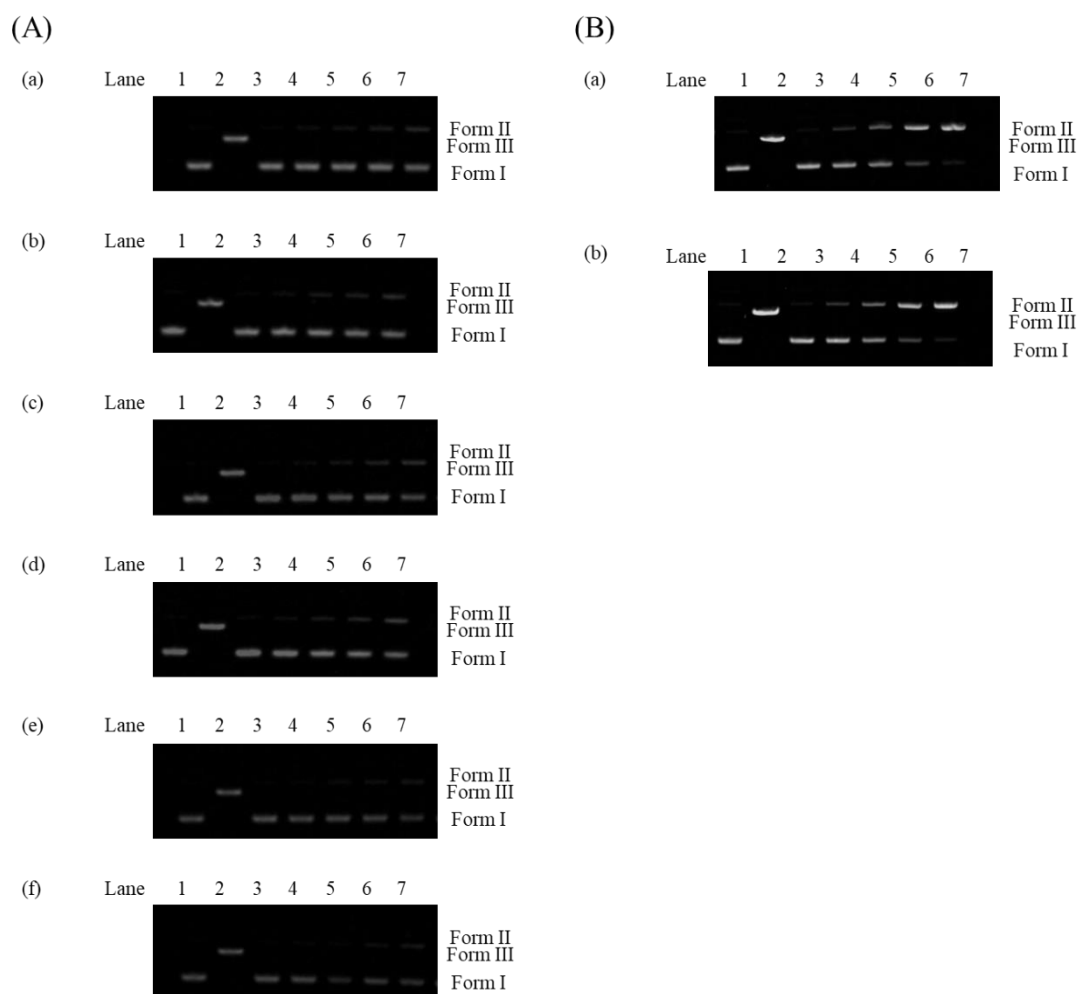


Figure S2-2. (A) Agarose gel electrophoresis of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of **1a** (50 μ M) and H₂O₂. (a)–(f) corresponded to H₂O₂ concentrations of 0, 100, 200, 300, 400, and 500 μ M, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lane 3–7: corresponding to the time of 0, 1, 2, 3, and 5 h, respectively. (B) Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of **1a** (10 μ M) and NaN₃ or DMSO. (a) NaN₃ (100 μ M), (b) DMSO (100 μ M). Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lane 3–7: corresponding to the time of 0, 1, 2, 5, and 10 h, respectively.

Table S2-2. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 1a (50 μM) in the presence of H_2O_2 at pH 6.0

H_2O_2 Conc. (μM)	Time (h)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
0	0	97.7 ± 0.4	2.3 ± 0.4	-
	1	94.5 ± 0.5	5.5 ± 0.5	-
	2	90.1 ± 0.9	9.9 ± 0.9	-
	3	86.1 ± 0.6	13.9 ± 0.6	-
	5	77.9 ± 0.9	22.1 ± 0.9	-
100	0	96.6 ± 0.3	3.4 ± 0.3	-
	1	94.0 ± 0.5	6.0 ± 0.5	-
	2	89.3 ± 0.8	10.7 ± 0.8	-
	3	85.2 ± 0.9	14.8 ± 0.9	-
	5	76.6 ± 1.1	23.4 ± 1.1	-
200	0	96.9 ± 0.5	3.1 ± 0.5	-
	1	93.9 ± 0.9	6.1 ± 0.9	-
	2	89.9 ± 1.7	10.1 ± 1.7	-
	3	84.1 ± 2.3	15.9 ± 2.3	-
	5	74.4 ± 4.1	25.6 ± 4.1	-
300	0	96.8 ± 0.4	3.2 ± 0.4	-
	1	93.9 ± 0.4	6.1 ± 0.4	-
	2	89.3 ± 0.4	10.7 ± 0.4	-
	3	84.0 ± 1.7	16.0 ± 1.7	-
	5	73.9 ± 4.6	26.1 ± 4.6	-
400	0	96.8 ± 0.3	3.2 ± 0.3	-
	1	95.1 ± 0.3	4.9 ± 0.3	-
	2	89.5 ± 0.4	10.5 ± 0.4	-
	3	86.2 ± 1.2	13.8 ± 1.2	-
	5	78.0 ± 2.2	22.0 ± 2.2	-
500	0	97.4 ± 0.1	2.6 ± 0.1	-
	1	94.6 ± 0.4	5.4 ± 0.4	-
	2	90.3 ± 0.2	9.7 ± 0.2	-
	3	85.6 ± 2.9	14.4 ± 2.9	-
	5	76.5 ± 3.5	23.5 ± 3.5	-

Table S2-3. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 1a in the presence of NaN₃ or DMSO at pH 5.0

Compound	Conc. (μM)	Time (h)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
NaN ₃	100	0	95.7 \pm 0.4	4.3 \pm 0.4	-
		1	84.2 \pm 0.6	15.8 \pm 0.6	-
		2	63.3 \pm 0.8	36.7 \pm 0.8	-
		5	26.2 \pm 0.4	73.8 \pm 0.4	-
		10	9.2 \pm 0.5	90.8 \pm 0.5	-
		DMSO	100	0	95.4 \pm 0.3
1	83.1 \pm 0.3			16.9 \pm 0.3	-
2	60.8 \pm 0.7			39.2 \pm 0.7	-
5	24.0 \pm 1.1			76.0 \pm 1.1	-
10	7.6 \pm 0.6			92.4 \pm 0.6	-

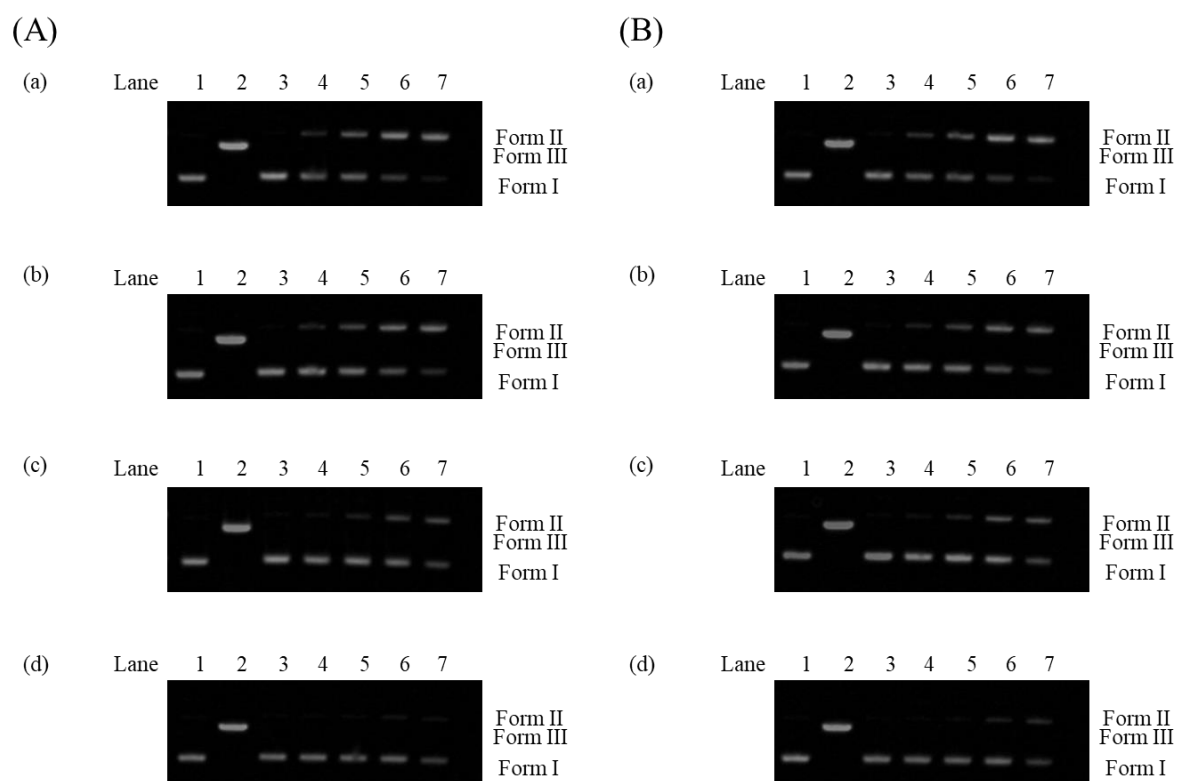


Figure S2-3. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of **1a** (10 μ M) and (A) DAPI, and (B) methyl green, respectively. (a)–(d) corresponded to DAPI or methyl green concentration of 5, 10, 20, and 50 μ M, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lane 3–7: corresponding to the time of 0, 1, 2, 5, and 10 h, respectively.

Table S2-4. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 1a in the presence of DAPI and methyl green at pH 5.0

Compound		DAPI			Methyl green		
Conc. (μM)	Time (h)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
5	0	98.5 \pm 0.0	1.5 \pm 0.0	-	96.6 \pm 0.5	3.4 \pm 0.5	-
	1	79.8 \pm 0.5	20.2 \pm 0.5	-	75.9 \pm 1.6	24.1 \pm 1.6	-
	2	60.1 \pm 1.4	39.9 \pm 1.4	-	57.4 \pm 2.3	42.6 \pm 2.3	-
	5	31.8 \pm 0.8	68.2 \pm 0.8	-	29.4 \pm 3.0	70.6 \pm 3.0	-
	10	11.8 \pm 0.2	88.2 \pm 0.2	-	12.5 \pm 1.1	87.5 \pm 1.1	-
10	0	97.8 \pm 0.2	2.2 \pm 0.2	-	96.8 \pm 0.3	3.2 \pm 0.3	-
	1	85.6 \pm 1.7	14.4 \pm 1.7	-	87.6 \pm 1.2	12.4 \pm 1.2	-
	2	69.7 \pm 1.3	30.3 \pm 1.3	-	73.7 \pm 2.3	26.3 \pm 2.3	-
	5	44.7 \pm 0.1	55.3 \pm 0.1	-	46.2 \pm 1.6	53.8 \pm 1.6	-
	10	25.4 \pm 0.2	74.6 \pm 0.2	-	25.5 \pm 1.0	74.5 \pm 1.0	-
20	0	97.6 \pm 0.9	2.4 \pm 0.9	-	97.3 \pm 0.2	2.7 \pm 0.2	-
	1	94.0 \pm 0.1	6.0 \pm 0.1	-	94.1 \pm 0.1	5.9 \pm 0.1	-
	2	86.8 \pm 0.3	13.2 \pm 0.3	-	87.1 \pm 0.2	12.9 \pm 0.2	-
	5	68.6 \pm 2.2	31.4 \pm 2.2	-	66.8 \pm 0.0	33.2 \pm 0.0	-
	10	52.6 \pm 1.6	47.4 \pm 1.6	-	49.0 \pm 0.2	51.0 \pm 0.2	-
50	0	97.2 \pm 0.6	2.8 \pm 0.6	-	98.2 \pm 0.2	1.8 \pm 0.2	-
	1	97.0 \pm 0.4	3.0 \pm 0.4	-	96.6 \pm 0.3	3.4 \pm 0.3	-
	2	95.1 \pm 0.1	4.9 \pm 0.1	-	94.7 \pm 0.1	5.3 \pm 0.1	-
	5	89.6 \pm 0.2	10.4 \pm 0.2	-	84.0 \pm 0.9	16.0 \pm 0.9	-
	10	85.5 \pm 1.2	14.5 \pm 1.2	-	62.4 \pm 0.5	37.6 \pm 0.5	-

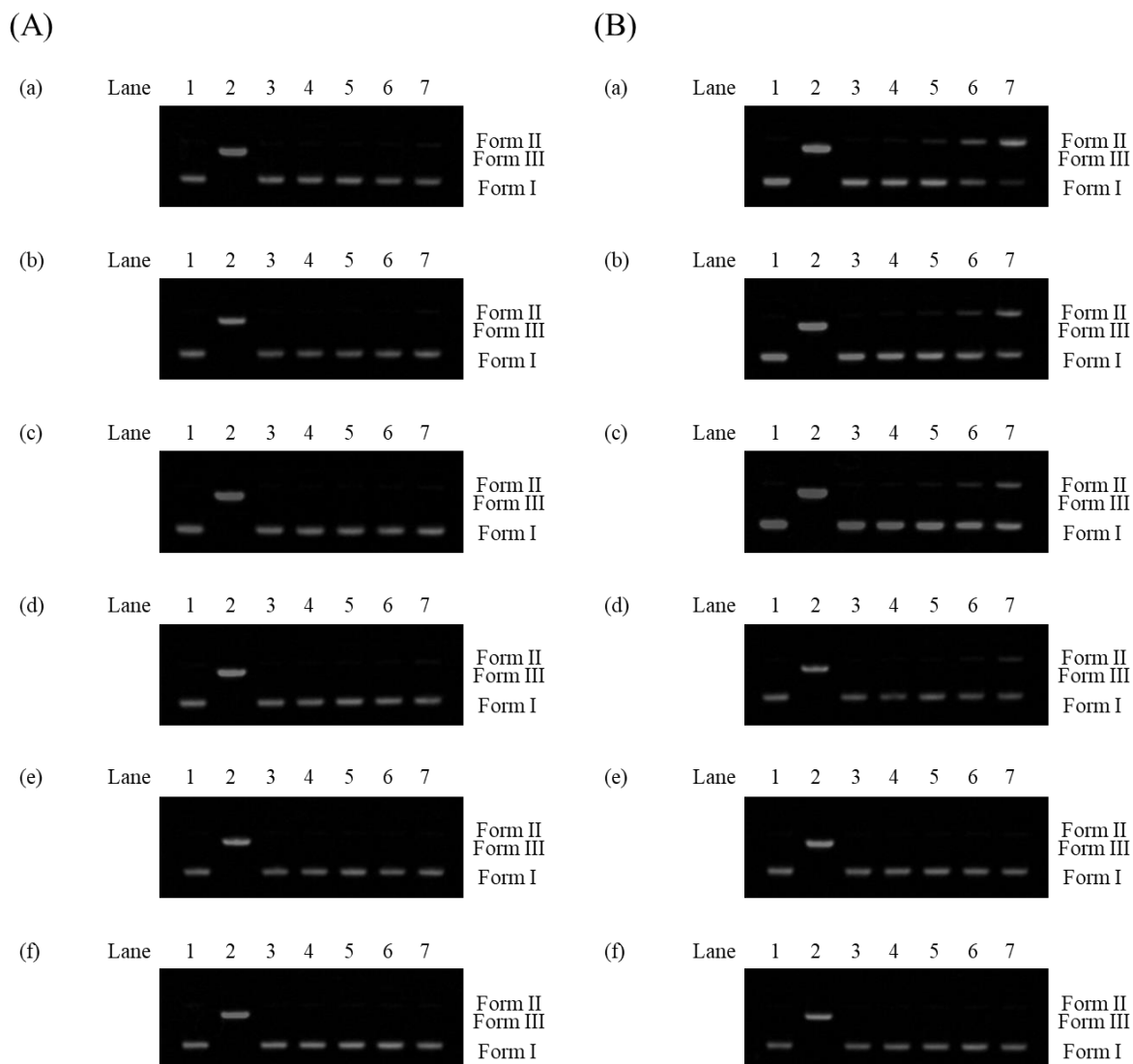


Figure S2-4. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of (A) **2** and (B) **3**, respectively. (a) pH 5.0 (MES), (b) pH 5.5 (MES), (c) pH 5.9 (MES), (d) pH 6.0 (MES), (e) pH 7.4 (Tris-HCl), and (f) pH 8.2 (TAPS). Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lane 3–7: corresponding to the time of 0, 1, 2, 5, and 10 h, respectively.

Table S2-5. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed in the presence of 2 and 3

Complex		2			3		
pH	Time (h)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
5.0	0	97.7 ± 0.5	2.3 ± 0.5	-	96.9 ± 0.3	3.1 ± 0.3	-
	1	97.4 ± 0.5	2.6 ± 0.5	-	94.1 ± 0.6	5.9 ± 0.6	-
	2	96.9 ± 0.1	3.1 ± 0.1	-	88.0 ± 0.4	12.0 ± 0.4	-
	5	95.6 ± 0.3	4.4 ± 0.3	-	56.8 ± 1.8	43.2 ± 1.8	-
	10	92.7 ± 0.7	7.3 ± 0.7	-	18.3 ± 0.9	81.7 ± 0.9	-
5.5	0	98.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	-	98.0 ± 0.2	2.0 ± 0.2	-
	1	97.9 ± 0.3	2.1 ± 0.3	-	96.2 ± 0.5	3.8 ± 0.5	-
	2	97.2 ± 0.1	2.8 ± 0.1	-	94.1 ± 0.3	5.9 ± 0.3	-
	5	96.6 ± 0.3	3.4 ± 0.3	-	79.0 ± 3.4	21.0 ± 3.4	-
	10	94.6 ± 0.3	5.4 ± 0.3	-	48.9 ± 3.2	51.1 ± 3.2	-
5.9	0	98.4 ± 0.0	1.6 ± 0.0	-	97.3 ± 0.7	2.7 ± 0.7	-
	1	97.7 ± 0.4	2.3 ± 0.4	-	96.8 ± 0.6	3.2 ± 0.6	-
	2	97.3 ± 0.2	2.7 ± 0.2	-	95.4 ± 1.0	4.6 ± 1.0	-
	5	97.3 ± 0.3	2.7 ± 0.3	-	86.2 ± 0.2	13.8 ± 0.2	-
	10	96.0 ± 0.3	4.0 ± 0.3	-	69.0 ± 0.7	31.0 ± 0.7	-
6.0	0	98.1 ± 0.0	1.9 ± 0.0	-	98.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	-
	1	97.2 ± 0.3	2.8 ± 0.3	-	96.5 ± 0.2	3.5 ± 0.2	-
	2	96.9 ± 0.2	3.1 ± 0.2	-	96.4 ± 0.2	3.6 ± 0.2	-
	5	96.6 ± 0.4	3.4 ± 0.4	-	89.7 ± 0.6	10.3 ± 0.6	-
	10	94.9 ± 1.5	5.1 ± 1.5	-	74.9 ± 0.3	25.1 ± 0.3	-
7.4	0	97.8 ± 0.2	2.2 ± 0.2	-	97.7 ± 0.5	2.3 ± 0.5	-
	1	97.6 ± 0.2	2.4 ± 0.2	-	97.6 ± 0.6	2.4 ± 0.6	-
	2	97.5 ± 0.1	2.5 ± 0.1	-	97.2 ± 0.2	2.8 ± 0.2	-
	5	97.5 ± 0.1	2.5 ± 0.1	-	96.7 ± 0.1	3.3 ± 0.1	-
	10	96.6 ± 0.1	3.4 ± 0.1	-	95.2 ± 0.2	4.8 ± 0.2	-
8.2	0	97.8 ± 0.4	2.2 ± 0.4	-	98.2 ± 0.1	1.8 ± 0.1	-
	1	97.8 ± 0.3	2.2 ± 0.3	-	97.8 ± 0.4	2.2 ± 0.4	-
	2	97.5 ± 0.4	2.5 ± 0.4	-	97.5 ± 0.3	2.5 ± 0.3	-
	5	97.3 ± 0.4	2.7 ± 0.4	-	97.3 ± 0.3	2.7 ± 0.3	-
	10	97.0 ± 0.3	3.0 ± 0.3	-	96.3 ± 0.1	3.7 ± 0.1	-

第三章： *p*-cresol から誘導された amide-tether 型配位子の二核銅(II)錯体による酸化的 DNA 切断, μ -1,1-hydroperoxo species の生成, 及び細胞毒性

3-1. 要約

近年, 過酸化水素による酸化的 DNA 切断を促進する金属錯体は DNA を切断してがん細胞をアポトーシスへ導く抗がん剤として期待されている. 第二章で述べたように, 我々は *p*-cresol 誘導体である methylene-tether 配位子 Hbcc の二核銅(II)錯体[Cu₂(bcc)]³⁺ (**3**)が過酸化水素による DNA 切断を加速しないことを見出した. 本研究では, 我々は *p*-cresol から誘導される新たな amide-tether 型配位子 2,6-bis(1,4,7,10-tetraazacyclododecyl-1-carboxamide)-*p*-cresol (Hbcamide)を合成した. その二核銅(II)錯体[Cu₂(μ -OH)(bcamide)]²⁺ (**4**)を合成し, 単結晶 X 線構造解析や様々な分光学的測定によって構造を明らかにした. 錯体 **4** は, pH 6.0–8.2 の条件下, 過酸化水素存在下でスーパーコイルドプラスミド pUC19 DNA (Form I)の酸化的切断を促進し, nicked DNA (Form II), linear DNA (Form III)に変換した. また, この切断反応は pH が高い領域で大きく加速された. 様々な分光学的測定により, **4** は過酸化水素との反応で μ -1,1-hydroperoxo species を生成し, これが DNA の酸化切断における直接の活性種であることを明らかにした. さらに, amide-tether 錯体 **4** が methylene-tether 錯体 **3** と比較して HeLa 細胞に対してより高い細胞毒性を及ぼすことを見出した.

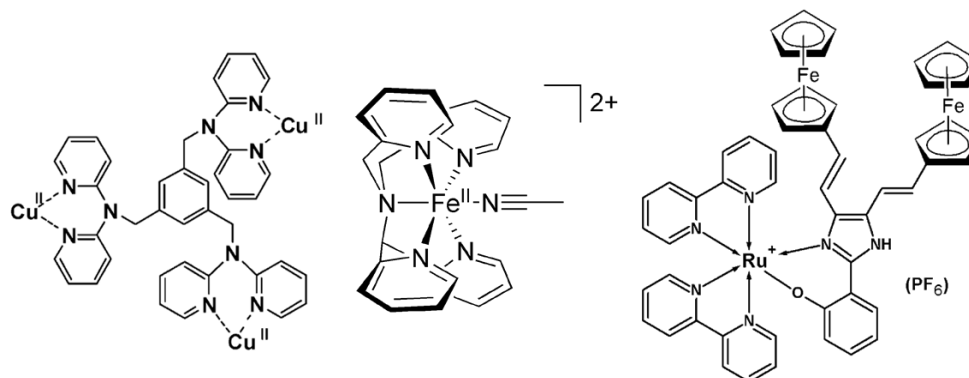
Yuki Kadoya, Katsuki Fukui, Machi Hata, Risa Miyano, Yutaka Hitomi, Sachiko Yanagisawa, Minoru Kubo, and Masahito Kodera “Oxidative DNA Cleavage, Formation of μ -1,1-Hydroperoxo Species, and Cytotoxicity of Dicopper(II) Complex Supported by a *p*-Cresol-Derived Amide-Tether Ligand” *Inorg. Chem.*, **2019**, *58*, 14294–14298.

3-2. 緒言

DNA と結合したり，これを切断したりして，その複製を妨げる抗がん剤として様々な金属錯体が開発されてきた^[1]. 特に，臨床利用されている cisplatin^[2]やその誘導体である oxaliplatin^[3], lobaplatin^[4], nedaplatin^[5]などの白金(II)錯体は DNA と強く結合して DNA 複製を妨げ，がん細胞をアポトーシスに導くことにより抗がん活性を示すことが知られている^[6]. しかしながら，このタイプの抗がん剤は，嘔吐，脱毛といった深刻な副作用や白金耐性がんの発現などの観点から，用量制限の問題点が付随している^[7]. これらとは異なるタイプの抗がん剤の 1 つにブレオマイシンがある. ブレオマイシンは，二重鎖 DNA (ds-DNA) を切断して抗がん活性を示す^[8]. これは，amide donor を含む五座の金属結合部位を有している. ブレオマイシンの鉄(II)錯体は酸素分子や過酸化水素を活性化して Fe(III)-OOH (activated bleomycin, ABLM) を形成する. この ABLM が活性種となり，DNA の糖部位の水素を直接引き抜いて二重鎖 DNA を酸化的に切断し，抗がん活性を示すと報告されている^[9]. しかしながら，ブレオマイシンもまた，長期に渡って使用すると肺に毒性を示す^[10].

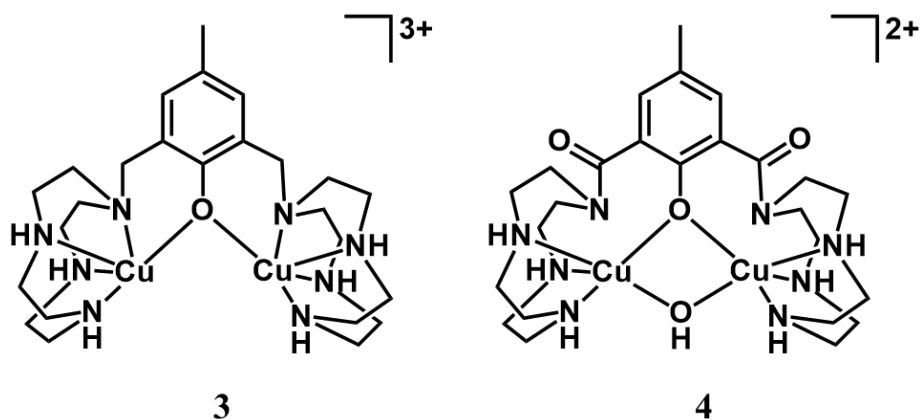
がん細胞の微小環境は，正常細胞と比較して顕著に異なることが知られている^[11]. がん細胞の特徴の 1 つとして，過酸化水素を含む活性酸素種(reactive oxygen species, ROS) の濃度が正常細胞内の濃度と比較して高いことが挙げられる^[12]. これは，主ながん細胞内のミトコンドリア異常によって引き起こされている^[13]. 従って，がん細胞内で過剰発現している過酸化水素を活性化する金属錯体の開発ができれば，副作用の少ない抗がん剤の開発に繋がる可能性がある. これまで，銅^[1a,14]，鉄^[15]，それ以外の金属^[14,16]を用いた多くの金属錯体が酸化的 DNA 切断を促進するという報告がある(Chart 3-1). しかし，これらの多くは，3-メルカプトプロピオン酸^[14d]，グルタチオン^[14d,e]，ジチオスレイトール^[15b,d]，アスコルビン酸^[14a-c,15a]などの還元剤を多量に必要とする. そのため，過酸化水素のみで酸化的 DNA 切断を加速する金属錯体の開発が強く求められている.

Chart 3-1. Metal complexes which promote oxidative DNA cleavage



第二章で述べたように、我々は *p*-cresol 誘導体 methylene-tether 配位子 Hbcc の二核銅(II)錯体[Cu₂(bcc)](ClO₄)₃ (**3**) (Chart 3-2)及び関連する二核銅(II)錯体が、pH 5–6 において加水分解的 DNA 切断を促進するが、過酸化水素を酸化剤とする DNA の酸化切断は全く加速しないことを報告した^[17]。本研究では、我々は新たに *p*-cresol 誘導体配位子である 2,6-bis(1,4,7,10-tetraazacyclododecyl-1-carboxamide)-*p*-cresol (Hbcamide)を合成し、その二核銅(II)錯体[Cu₂(μ-OH)(bcamide)](ClO₄)₂ (**4**) (Chart 3-2)が還元剤非存在下において、過酸化水素によって酸化的 DNA 切断を大きく加速することを見出した。

Chart 3-2. Chemical structures of **3** and **4**

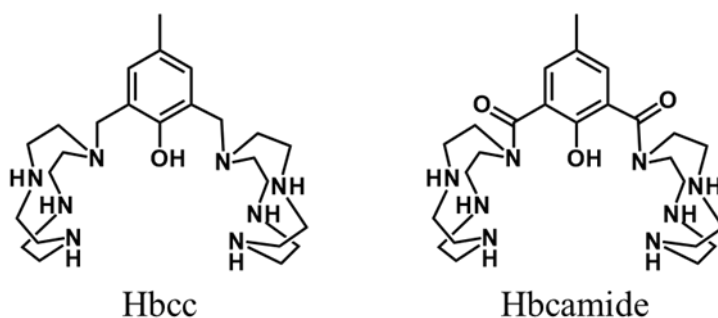


3-3. 結果と考察

3-3-1. 二核銅(II)錯体の合成

本研究で使用した二核化配位子 Hbcc と Hbcamide は、*p*-cresol の 2,6 位にペンダント基として 2 つの tetraazacyclododecane (cyclen) を、それぞれ methylene tether ($-\text{CH}_2-$) または amide tether ($-\text{CO}-$) で導入した構造を持つ(Chart 3-3). Hbcc 配位子及びその二核銅錯体 $[\text{Cu}_2(\text{bcc})](\text{ClO}_4)_3$ (**3**) は、第二章で述べた方法で合成した^[17]. Hbcamide 配位子及びその二核銅錯体 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{bcamide})](\text{ClO}_4)_2$ (**4**) は新規化合物であり、本章第 5 節で述べる実験手順に従って合成した.

Chart 3-3. Chemical Structures of Hbcc and Hbcamide



amide-tether 二核銅(II)錯体である **4** は、単結晶 X 線構造解析により構造を決定した. Figure 3-1 に **3**, **4** の ORTEP 図, Table 3-1 に結晶構造の詳細, Table 3-2 に二核銅周辺の結合距離と結合角を示す.

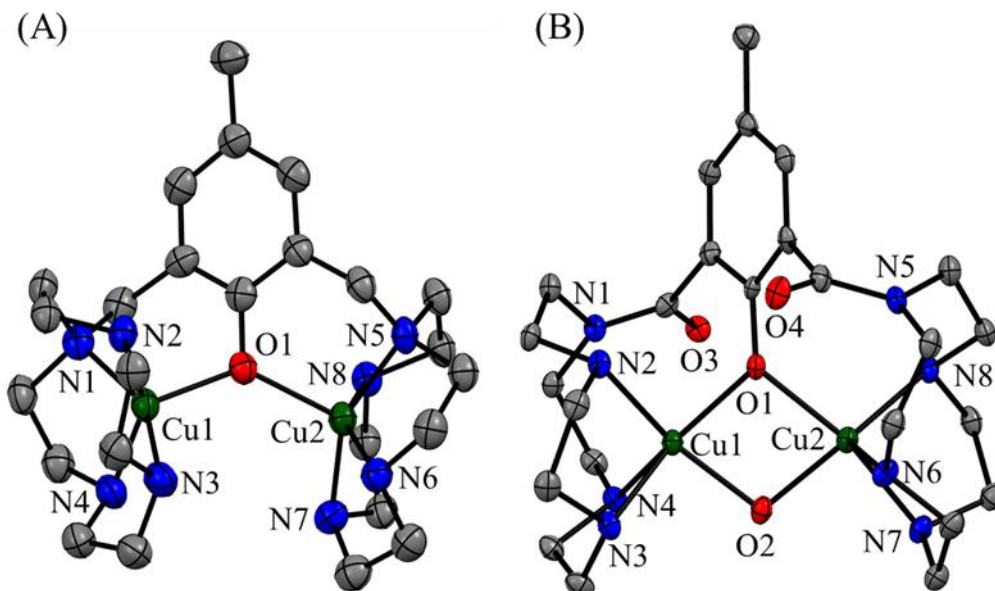


Figure 3-1. ORTEP diagrams of each cationic part of **3** (A) and **4** (B). Hydrogen atoms are omitted for clarity.

Table 3-1. Crystallographic data for 4

Empirical formula	C ₂₇ H _{37.33} Cl _{1.33} Cu _{1.33} N _{5.33} O _{9.32}
Formula weight	717.73
Temperature (K)	93
Wavelength	CuK α (1.54187 Å)
Crystal system	Triclinic
Crystal size (mm ³)	0.20 × 0.10 × 0.10
Space group	P-1
a (Å)	15.8538(3)
b (Å)	18.0557(3)
c (Å)	20.2809(4)
α (deg)	97.232(7)
β (deg)	109.374(8)
γ (deg)	115.625(8)
Volume (Å ³)	4683.9(4)
Z value	6
Density (calculated)	1.527 g/cm ³
Absorption coefficient	2.795 mm ⁻¹
F(000)	2235.0
R1 ^a , wR2 ^b)	0.0729, 0.1816
GOF index	1.041

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

Table 3-2. Selected bond distances (Å) and angles (deg) for 4

Cu(1) ••• Cu(2) : 3.0471(11)	Cu(3) ••• Cu(4) : 3.065(1)
Cu(1) – N(2) : 2.031(5)	Cu(3) – N(10) : 2.021(4)
Cu(1) – N(3) : 2.030(5)	Cu(3) – N(11) : 2.060(5)
Cu(1) – N(4) : 2.333(5)	Cu(3) – N(12) : 2.310(5)
Cu(2) – N(6) : 2.359(5)	Cu(4) – N(14) : 2.371(5)
Cu(2) – N(7) : 2.038(5)	Cu(4) – N(15) : 2.046(5)
Cu(2) – N(8) : 2.014(4)	Cu(4) – N(16) : 2.012(5)
Cu(1) – O(1) : 1.985(4)	Cu(3) – O(5) : 2.016(4)
Cu(1) – O(2) : 1.929(4)	Cu(3) – O(6) : 1.907(4)
Cu(2) – O(1) : 2.012(4)	Cu(4) – O(5) : 2.025(4)
Cu(2) – O(2) : 1.934(4)	Cu(4) – O(6) : 1.914(4)
Cu(1) – O(1) – Cu(2) : 99.36(16)	Cu(3) – O(5) – Cu(4) : 98.65(16)
Cu(1) – O(2) – Cu(2) : 104.15(18)	Cu(3) – O(6) – Cu(4) : 106.63(18)
O(1) – Cu(1) – N(2) : 95.86(17)	O(5) – Cu(3) – N(10) : 96.42(17)
O(1) – Cu(1) – N(3) : 161.45(18)	O(5) – Cu(3) – N(11) : 162.29(17)
O(1) – Cu(1) – N(4) : 114.29(16)	O(5) – Cu(3) – N(12) : 113.64(16)
O(2) – Cu(2) – N(6) : 84.73(17)	O(6) – Cu(4) – N(14) : 86.62(17)
O(2) – Cu(2) – N(7) : 92.31(18)	O(6) – Cu(4) – N(15) : 92.90(18)
O(2) – Cu(2) – N(8) : 166.50(18)	O(6) – Cu(4) – N(16) : 164.12(18)
O(1) – Cu(2) – N(6) : 109.64(16)	O(5) – Cu(4) – N(14) : 110.81(16)
O(1) – Cu(2) – N(7) : 164.20(18)	O(5) – Cu(4) – N(15) : 163.62(18)
O(1) – Cu(2) – N(8) : 100.37(17)	O(5) – Cu(4) – N(16) : 99.53(17)
O(2) – Cu(1) – N(2) : 158.05(18)	O(6) – Cu(3) – N(10) : 156.61(18)
O(2) – Cu(1) – N(3) : 92.47(18)	O(6) – Cu(3) – N(11) : 93.17(17)
O(2) – Cu(1) – N(4) : 90.70(17)	O(6) – Cu(3) – N(12) : 91.95(16)
O(1) – Cu(1) – O(2) : 78.55(15)	O(5) – Cu(3) – O(6) : 77.52(15)
O(1) – Cu(2) – O(2) : 77.80(15)	O(5) – Cu(4) – O(6) : 77.14(15)
N(2) – Cu(1) – N(3) : 86.42(19)	N(10) – Cu(3) – N(11) : 86.16(18)
N(2) – Cu(1) – N(4) : 110.77(18)	N(10) – Cu(3) – N(12) : 111.00(17)
N(3) – Cu(1) – N(4) : 81.69(17)	N(11) – Cu(3) – N(12) : 81.35(17)
N(6) – Cu(2) – N(7) : 81.27(18)	N(14) – Cu(4) – N(15) : 81.11(18)
N(6) – Cu(2) – N(8) : 108.29(18)	N(14) – Cu(4) – N(16) : 108.91(18)
N(7) – Cu(2) – N(8) : 86.35(19)	N(15) – Cu(4) – N(16) : 86.48(19)
$\tau_{\text{Cu}(1)} = 0.057$	$\tau_{\text{Cu}(3)} = 0.095$
$\tau_{\text{Cu}(2)} = 0.038$	$\tau_{\text{Cu}(4)} = 0.008$

錯体 **4** では、2つの銅(II)イオンが1つの内因性の μ -OPh 架橋と1つの外因性の μ -OH 架橋とともに bcamide 配位子に組み込まれており、それぞれの銅イオンはペンダント基の cyclen の3つの窒素原子及び μ -OPh- μ -OH 架橋の2つの酸素原子によって四角錐構造を形成していることが明らかになった。一方、第二章でも述べたように、**3** ではペンダント基の cyclen の4つの窒素原子と内因性の μ -OPh 架橋によって5配位構造を形成して配位飽和となり、外因性の μ -OH 架橋は存在しない。**4** の Cu \cdots Cu 間距離は 3.047(11) Å であり、**3** の 3.878(1) Å と比較して短い。これは、**4** が有する μ -OPh- μ -OH の二重架橋に起因する。これらのことから、tether の種類によってこのような **3** と **4** の配位構造の顕著な違いが現れることが見出された。

3-3-2. 水溶液中における二核銅中心の構造

水溶液中における **4** の構造は、分光学的測定により決定された。水溶液中における **4** の ESIMS スペクトルを Figure 3-2 に示す。質量電荷比 745 に出現したピークは、[bcamide + 2Cu(II) + OH + ClO₄]⁺ に帰属できる。これは、水中において **4** が μ -OPh- μ -OH 架橋を維持していることを示している。**4** の電子スペクトル(Figure 3-3)では、HO⁻ 及び OPh⁻ から銅(II)イオンへの LMCT バンドに帰属できる 326 nm, 390 nm の特徴的なバンドを示した。これらのバンドは、これまでに報告された関連する μ -OPh- μ -OH 二重架橋の二核銅(II)錯体で見られた 340–400 nm の LMCT バンドと類似している^[17,18]。また、**4** の水溶液

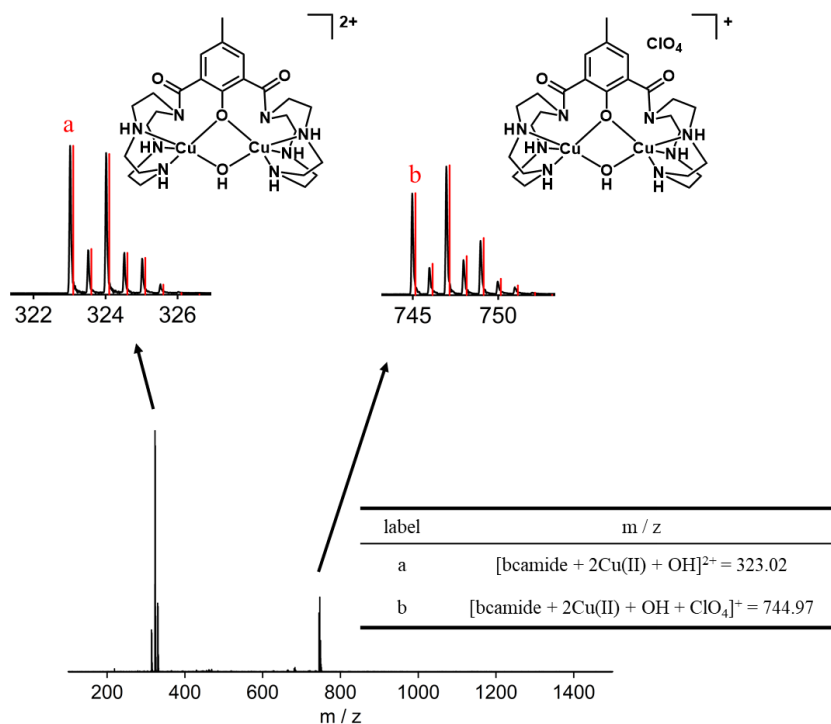


Figure 3-2. ESI MS spectrum of **4** measured in H₂O at room temperature at orifice 1: 10 V, orifice 2: 10 V, ring lens voltage: 10 V.

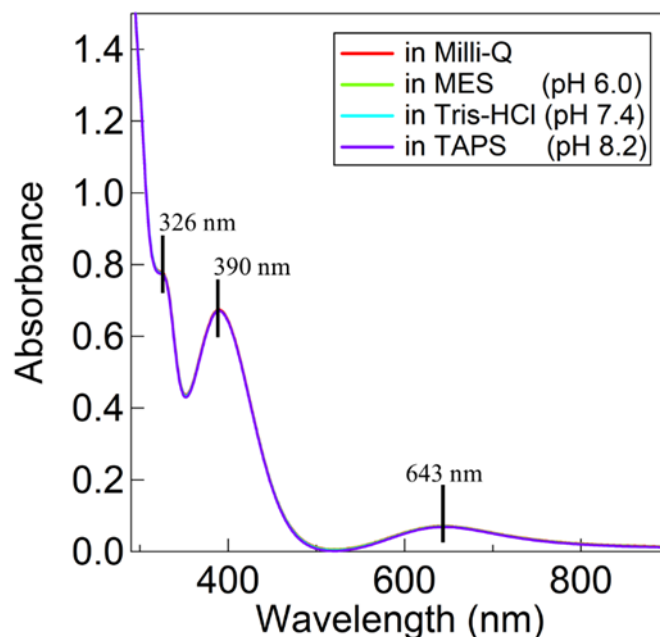


Figure 3-3. Electronic absorption spectra of **4** in aqueous solutions at pH 6.0 (MES) (green), pH 7.4 (Tris-HCl) (pale blue), and pH 8.2 (TAPS) (purple) at room temperature. [**4**] = 0.25 mM.

中, MES 水溶液中, Tris-HCl 水溶液中, TAPS 水溶液中のそれぞれにおいて, UV-vis スペクトルは全く同一であることから, **4** の構造は緩衝液の種類には影響されないことが示された(Figure 3-3).

3-3-3. 二核銅(II)錯体の酸化的 DNA 切断活性

錯体 **3, 4** を用いた DNA 切断実験は, スーパーコイルドプラスミド pUC19 DNA (DNA Form I) を基質として使用し, pH 6.0–8.2 の条件下, 37°C で行った. Form I, II, III は, それぞれスーパーコイルド状, 1 本鎖切断の環状, 2 本鎖切断の直線状 DNA を示す. これらの生成量は, アガロースゲル電気泳動法によって分析・定量した. 過酸化水素(0.5 mM) 存在下, pH 6.0 における **3** と **4** (50 μM) の DNA 切断実験において, Form I の割合を時間に対してプロットした図を Figure 3-4 に示す. また, これらの実験におけるゲル写真及びその詳細なデータを Figure S3-1, S3-2 及び Table S3-1, S3-2 に示す. 過酸化水素存在下における methylene-tether 錯体 **3** による Form I の切断割合は, 過酸化水素非存在下とほとんど同じであった. 従って, **3** は, 過酸化水素による酸化的 DNA 切断を全く加速しないことが明らかになった. 錯体 **3** による Form I の切断は, 第二章でも述べた通り, 加水分解的 DNA 切断である^[17]. 一方, 過酸化水素存在下, amide-tether 錯体 **4** は Form I の切断を大きく加速した(Figure 3-4). この **4** による DNA 切断は酸化的切断であり, 加水分解切断ではない. 何故ならば, 加水分解的 DNA 切断活性は, **3** と **4** でほとんど同じであり(Figure 3-5), また, 過酸化水素存在下で **4** の反応で生成した Form III を T4 DNA

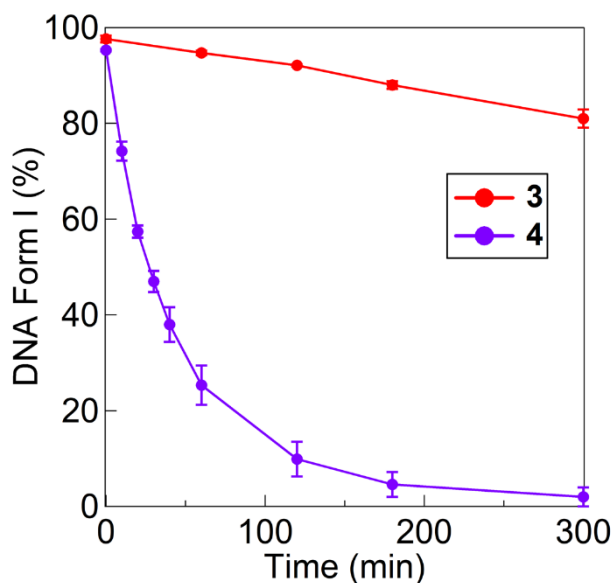


Figure 3-4. Time courses for the decrease of percent of Form I upon reaction of pUC19 DNA (50 μ M bp) with **3** (red) or **4** (purple; 50 μ M) in the presence of H₂O₂ (0.5 mM) at pH 6.0 (10 mM MES, 10 mM NaCl) at 37°C.

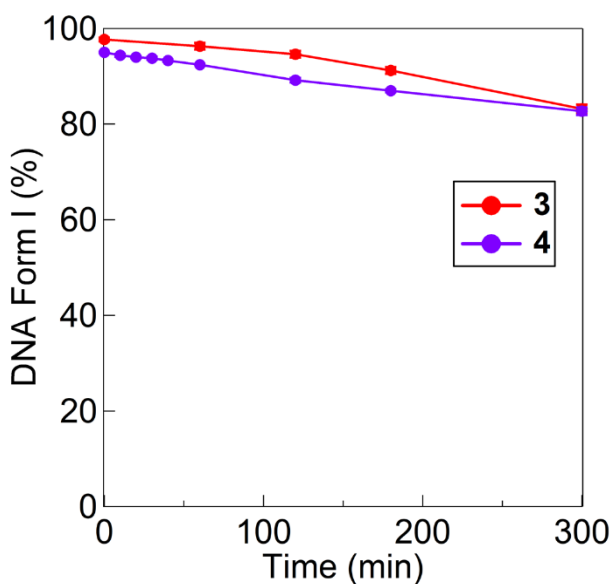
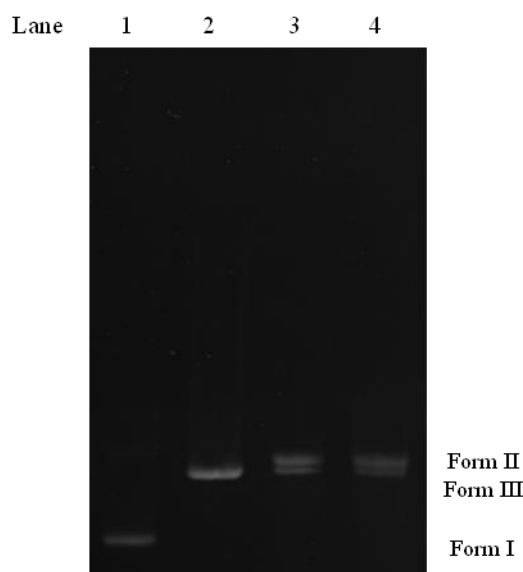


Figure 3-5. Time courses for the decrease of % of Form I upon reaction of pUC19 DNA (50 μ M bp) with **3** (red) or **4** (purple) (50 μ M) in the absence of H₂O₂ at pH 6.0 (10 mM MES, NaCl) at 37 °C.



Lane	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
3	0.0 ± 0.0	63.8 ± 0.6	36.2 ± 0.6
4	0.0 ± 0.0	66.3 ± 1.5	33.7 ± 1.5

Figure 3-6. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) for the reaction with **4** in the presence of H_2O_2 (300 μ M) at pH 8.2, and after treatment of the reaction mixture with a ligase. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lane 3: the reaction for 300 min; lane 4: after treatment of the reaction mixture with T4 DNA ligase.

ligase で処理しても Form II は再生されなかったからである(Figure 3-6). 従って, **4** は過酸化水素を酸化剤として用いる酸化的 DNA 切断を特異的に促進することが示された. 錯体を加えずに過酸化水素のみで行われたブランク実験では DNA 切断は全く進行しなかったことから, **4** が加速する酸化的 DNA 切断は過酸化水素の活性化を経て進行するものと考えられる. さらに, 酸化的 DNA 切断活性は, **4** の濃度と過酸化水素の濃度が増加するにつれて高くなることがわかった(Figure 3-7, 3-8). これらの結果は, 酸化的 DNA 切断が **4** と過酸化水素が反応して生成した活性種によって進行していることを示唆している. 以下に, この活性種の様々な分光光学測定による同定を示す.

3-3-4. 二核銅(II)錯体の酸化的 DNA 切断の pH 応答性

amide-tether 錯体 **4** を用いて, 酸化的 DNA 切断の pH 依存性を詳細に調べた. pH 6.0, 7.4, 8.2 の条件下, 過酸化水素濃度が 0.3 mM の時の Form I と Form III の変化量を時間に対してプロットした図を Figure 3-9 に示す. Figure 3-9(A) に示したように, Form I の減少は pH が高くなるにつれて速くなった. また, Form III 生成速度は, 高い pH 領域で

著しく加速されることが明らかになった(Figure 3-9(B)). このとき pH 8.2 では, 5 時間後に 50%の Form I が Form III に変換された. 一方, pH 6.0 では無視できるほどの割合の Form III しか生成しなかった. この結果は, 高 pH 側で酸化的 DNA 切断の活性種生成が加速されることを示している. Form III は, 二重鎖 DNA の近接する 2 つのリン酸エステル部位が切断されることによって生成する. 実際に, 酸化的 DNA 切断において, 以前に報告された三核銅(II)錯体^[14]と比較して **4** は高い活性を示した. 従って, **4** が過酸化水素と反応して生成する活性種は, ブレオマイシンの鉄錯体から生成する Fe(III)-OOH と同様に, 二重鎖 DNA の高い切断能力を示すことが明らかになった.

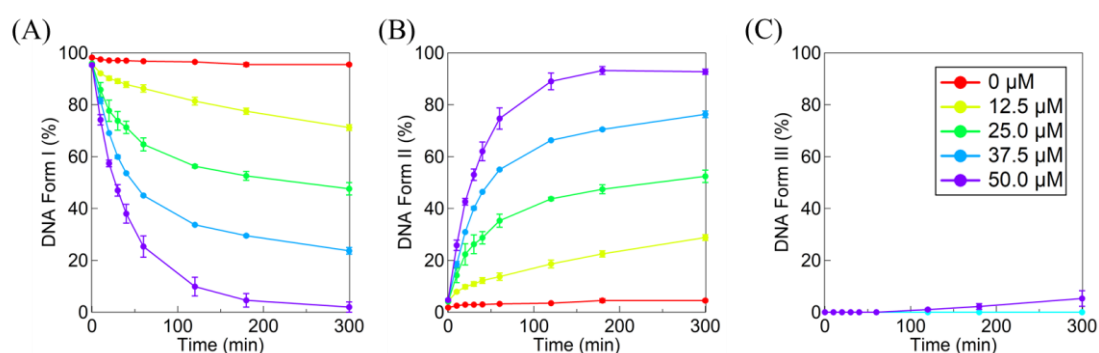


Figure 3-7. Complex concentration-dependent profile for DNA cleavage promoted by **4**. Time courses for decrease of % of (A) Form I, increase of % of (B) Form II, and (C) Form III, respectively. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [pUC19 DNA] = 50 μM bp, [complex] = 0–50.0 μM, [H₂O₂] = 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.

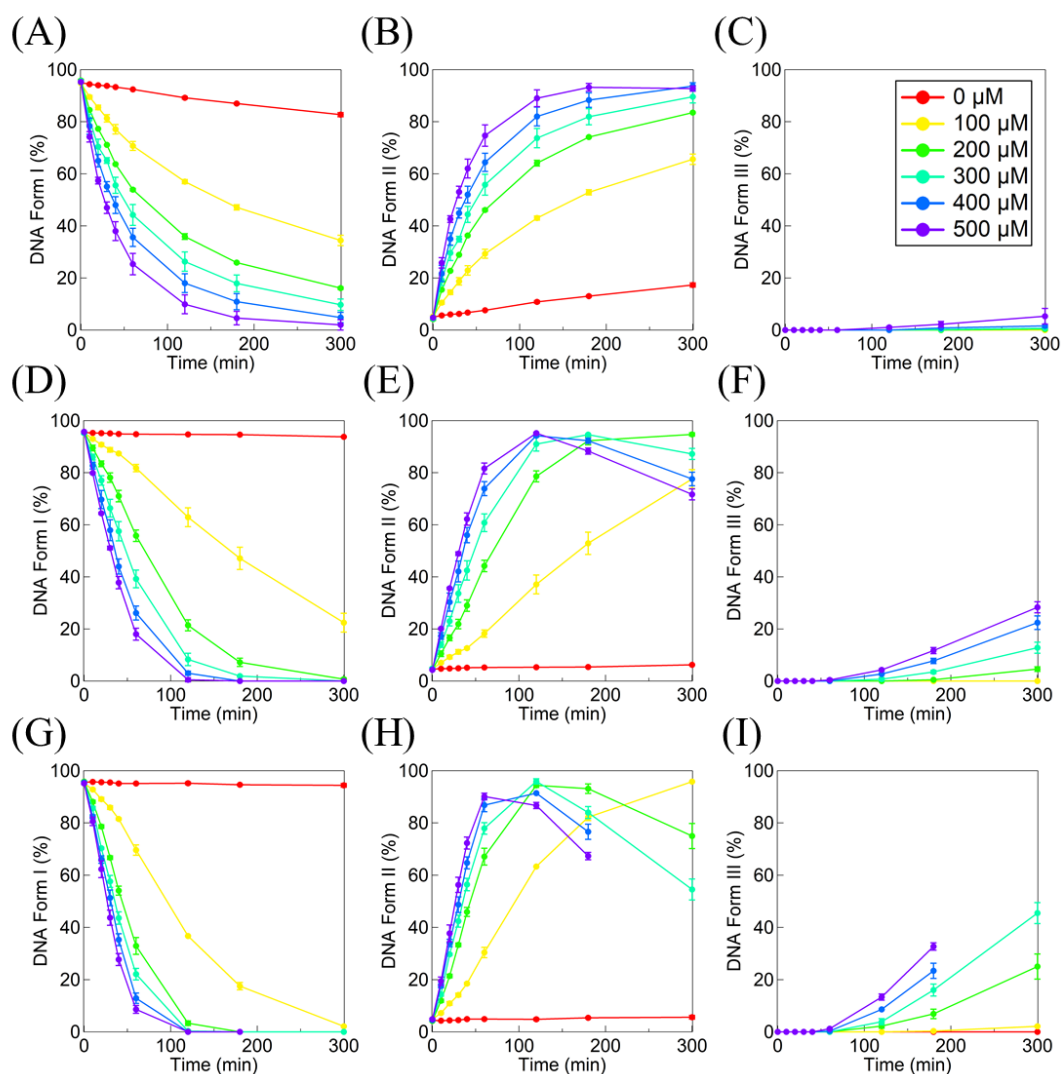


Figure 3-8. H_2O_2 concentration-dependent profile for DNA cleavage promoted by **4**. (A)–(C); Time courses for the decrease of % of Form I, increase of % of Form II, and Form III at pH 6.0. (D)–(F); Time courses for the decrease of % of Form I, increase of % of Form II, and Form III at pH 7.4. (G)–(I); Time courses for the decrease of % of Form I, increase of % of Form II, and Form III at pH 8.2. Experimental conditions: $[\text{NaCl}] = 10 \text{ mM}$, $[\text{buffer}] = 10 \text{ mM}$ (pH 6.0 (MES), 7.4 (Tris-HCl), 8.2 (TAPS)), $[\text{pUC19 DNA}] = 50 \text{ } \mu\text{M}$ bp, $[\text{complex}] = 50 \text{ } \mu\text{M}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0\text{--}500 \text{ } \mu\text{M}$ at 37°C for 0, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min. Experiments were carried out at least three times.

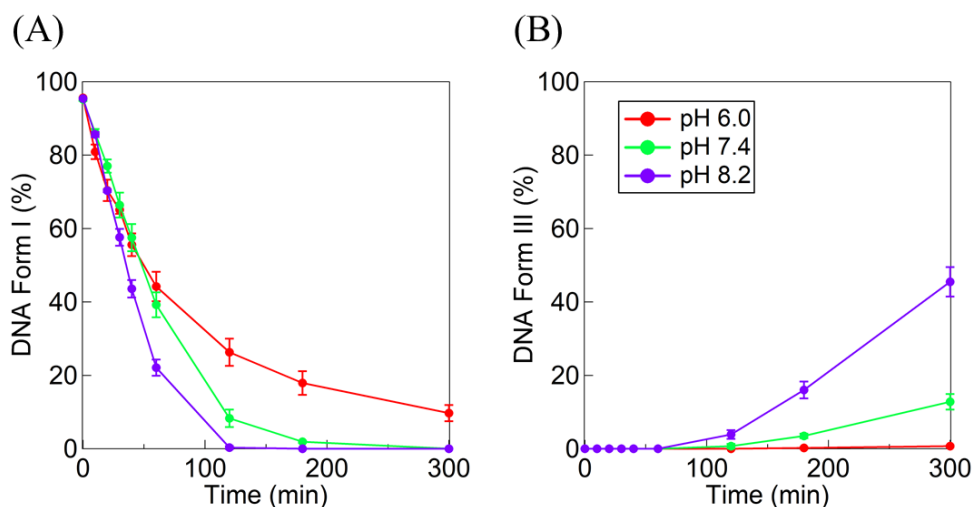


Figure 3-9. pH dependence on the oxidative DNA cleavage by **4**: time courses for the decrease of % of Form I (A) and the increase of Form III (B) at pH 6.0 (red), 7.4 (green), and 8.2 (purple). Experimental conditions: [**4**] = 50 μ M, [pUC19 DNA] = 50 μ M bp, [H_2O_2] = 0.3 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES), 7.4 (Tris-HCl), 8.2 (TAPS)), [NaCl] = 10 mM at 37°C.

3-3-5. 様々な阻害剤存在下での酸化的 DNA 切断活性

錯体 **4** と過酸化水素の反応で生成する活性種についての情報を得るために、 NaN_3 (一重項酸素阻害剤), DMSO (ヒドロキシラジカル阻害剤), KI (過酸化水素阻害剤) 存在下での酸化的 DNA 切断実験を行った。その結果を Figure 3-10 に示す。また、これらの実験

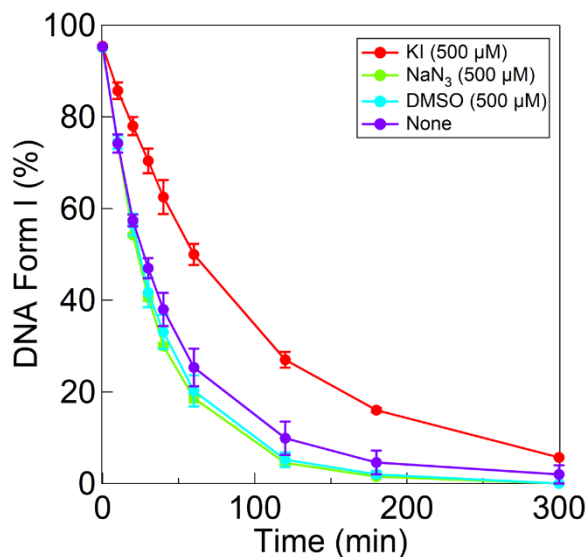


Figure 3-10. Time courses for the decrease of % of Form I in the reaction of **4** with inhibitors. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [pUC19 DNA] = 50 μ M bp, [complex] = 50 μ M, [H_2O_2] = 500 μ M, [inhibitor] = 500 μ M at 37°C for 0, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min. Experiments were carried out at least three times.

におけるゲル写真及びその詳細なデータを Figure S3-3 及び Table S3-3 に示す. NaN_3 (0.5 mM) 及び DMSO (0.5 mM) 存在下における **4** の酸化的 DNA 切断活性は、わずかに向上し、阻害効果は全く見られなかった. これは、一重項酸素及びヒドロキシラジカルのどちらも酸化的 DNA 切断の活性種ではないことを示している. 酸化的 DNA 切断活性は、KI (0.5 mM) 存在下においてわずかに阻害された. KI は還元剤として働くため、過酸化水素そのものかもしくは **4** と過酸化水素の反応で生じる錯体が DNA 切断の直接の活性種であると考えられる. しかし、過酸化水素のみでは酸化的 DNA 切断は起こらないことから、過酸化水素が活性種である可能性は否定できる. 従って、酸化的 DNA 切断には **4** と過酸化水素の両方が必要不可欠であり、**4** と過酸化水素の反応で、酸化的 DNA 切断の直接の活性種が生じると言える.

3-3-6. 分光学的測定による二核銅(II)錯体と過酸化水素が反応して生成する活性種の検出

錯体 **3** と **4** が過酸化水素と反応して生じる錯体を検出するため、UV-vis スペクトルで追跡した. methylene-tether 錯体 **3** の MeCN 溶液に過酸化水素を加えてもスペクトルは全く変化しなかった(Figure 3-11). これは、過酸化水素は **3** に配位しないことを示している. これは **3** が過酸化水素を加えても DNA の切断を加速しない事実と一致する. 一方、amide-tether 錯体 **4** の MeCN 溶液中に過酸化水素を加えると、340 ($\epsilon = 5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) 及び 398 ($\epsilon = 4800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nm に新たな吸収帯が出現した(Figure 3-12(A)). 398 nm のバンドは、様々な μ -1,1-hydroperoxodicopper(II) species において報告されている 390–400 nm 付近の HO_2^- から銅(II)イオンへの LMCT バンドと類似している^[19].

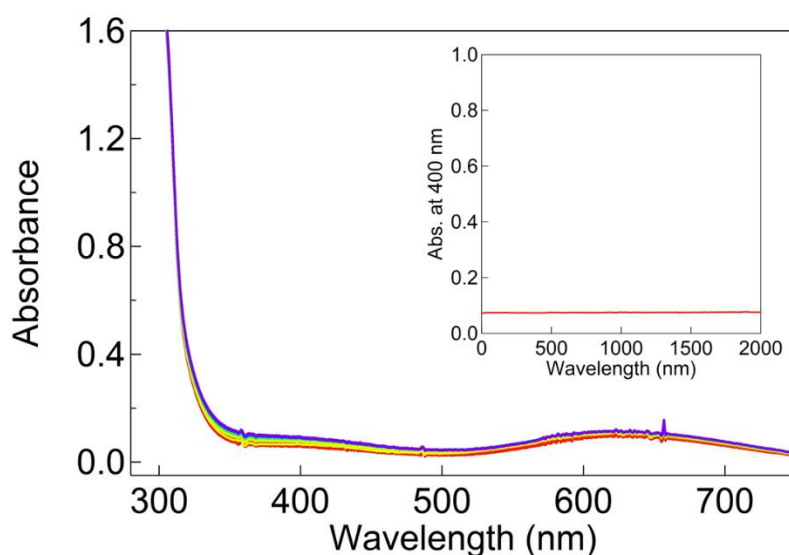


Figure 3-11. Electronic absorption spectral changes upon addition of H_2O_2 (10 eq) to **3** (0.25 mM) in MeCN at -30°C (inset: time trace of absorbance at 400 nm).

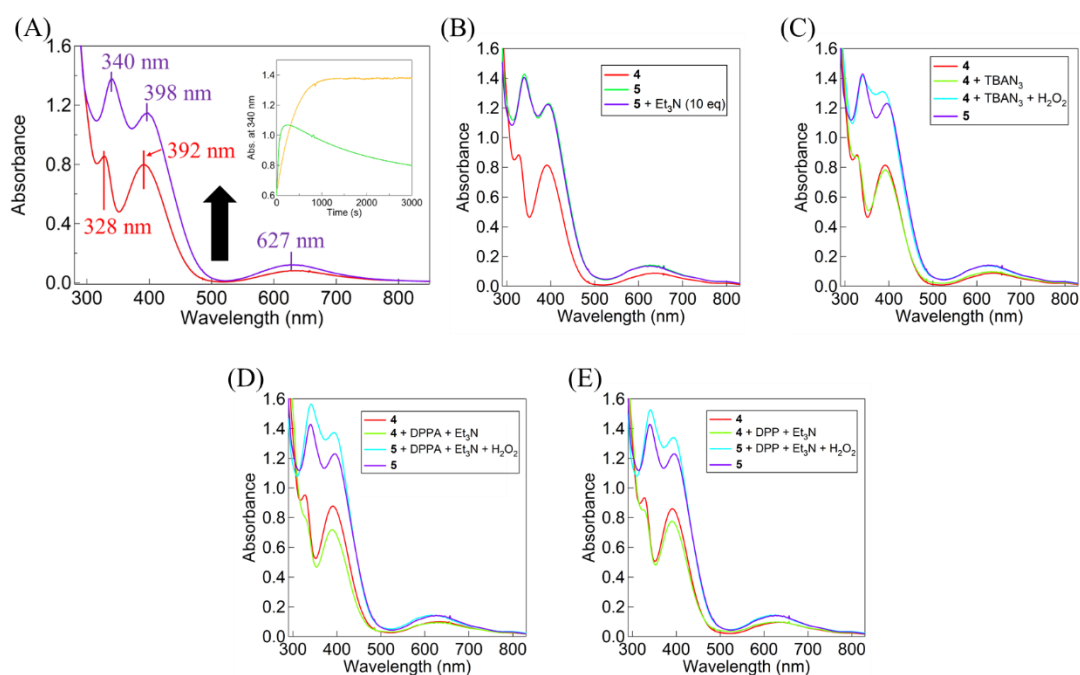


Figure 3-12. (A) Electronic absorption spectra of **4** (0.25 mM) (red) and hydroperoxo species **5** (purple) generated upon addition of H_2O_2 (10 eq) in MeCN at -30°C (inset: time courses for the formation and decay of **5** monitored at 340 nm at room temperature (green) and at -30°C (orange)), (B) electronic absorption spectra of **4** (0.25 mM) and **5** in the absence (green) and the presence (purple) of Et_3N (2.5 mM, 10 eq) at -30°C , (C) electronic absorption spectra of **4** (0.25 mM) in the absence (red) and presence (green) of tetra-*n*-butylammonium azide (TBAN_3 , 0.50 mM) and **5** in the absence (purple) and presence (pale blue) of tetra-*n*-butylammonium azide (TBAN_3 , 0.50 mM) in MeCN at -30°C , (D) electronic absorption spectra of **4** (0.25 mM) in the absence (red) and presence (green) of diphenyl phosphinic acid (DPPA, 0.25 mM)/ Et_3N (0.25 mM) and **5** in the absence (purple) and presence (pale blue) of diphenyl phosphinic acid (DPPA, 0.25 mM)/ Et_3N (0.25 mM) in MeCN at -30°C , (E) electronic absorption spectra of **4** (0.25 mM) in the absence (red) and presence (green) of diphenyl phosphate (DPP, 0.25 mM)/ Et_3N (0.25 mM) and **5** in the absence (purple) and presence (pale blue) of diphenyl phosphate (DPP, 0.25 mM)/ Et_3N (0.25 mM) in MeCN at -30°C .

この結果、**4** から μ -1,1-hydroperoxodicopper(II) species である $[\text{Cu}_2(\mu\text{-O}_2\text{H})(\text{bcamide})]^{2+}$ (**5**) が生成したと推定された。また **5** の生成は、 Et_3N 、リン酸アニオン、及び N_3^- イオンが共存しても全く影響を受けなかった (Figure 3-12(B)–(E))。中間体 **5** の MeCN 中の CSI MS スペクトルは m/z : 331, 761 にピークを与え、それぞれ $[\text{bcamide} + 2\text{Cu(II)} + \text{O}_2\text{H}]^{2+}$ 及び $[\text{bcamide} + 2\text{Cu(II)} + \text{O}_2\text{H} + \text{ClO}_4]^+$ の質量に相当した (Figure 3-13)。また ^{18}O ラベルした過酸化水素 ($\text{H}_2^{18}\text{O}_2$) を用いると、これらのピークはそれぞれ 333, 765 に 2 マス、4 マスシフトした (Figure 3-14) ことから、**5** の二核銅(II) に結合した 2 つの酸素原子は過酸化水素

由来であることが証明された。また水中で **4** と過酸化水素の反応を CSI MS スペクトルで追跡し、MeCN 中と同様に m/z : 331, 761 にピークが出現した(Figure 3-15)。これは、水中で行われた酸化的 DNA 切断でも **5** が生成することを示している。さらに、水中での **5** の生成は UV-vis スペクトルでも確認され、 μ -1,1-hydroperoxodicopper(II) species に帰属できるピークが 390 nm に現れた(Figure 3-16)。

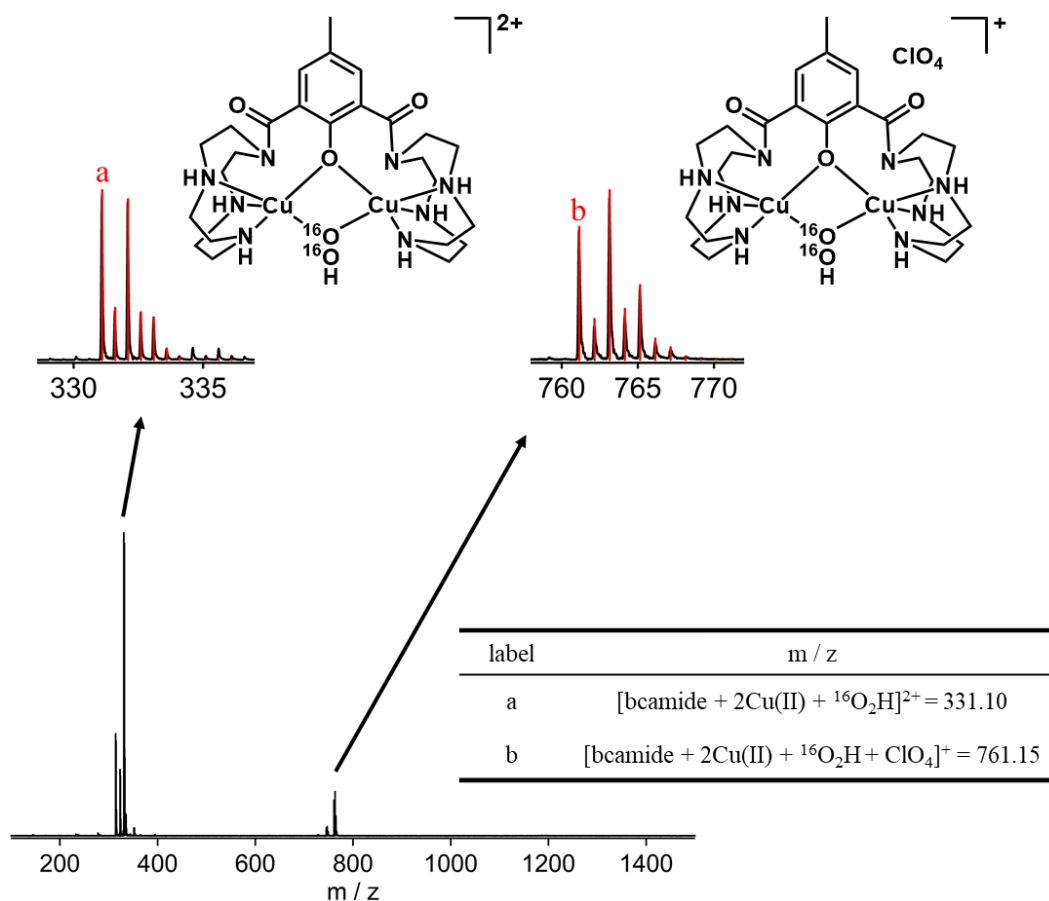


Figure 3-13. CSI MS spectrum of complex **5** measured in MeCN at -30°C at orifice 1: 0 V, orifice 2: 10 V, ring lens voltage: 10 V. Experimental conditions: $[\mathbf{4}] = 0.25 \text{ mM}$, $[\text{H}_2^{16}\text{O}_2] = 2.5 \text{ mM}$.

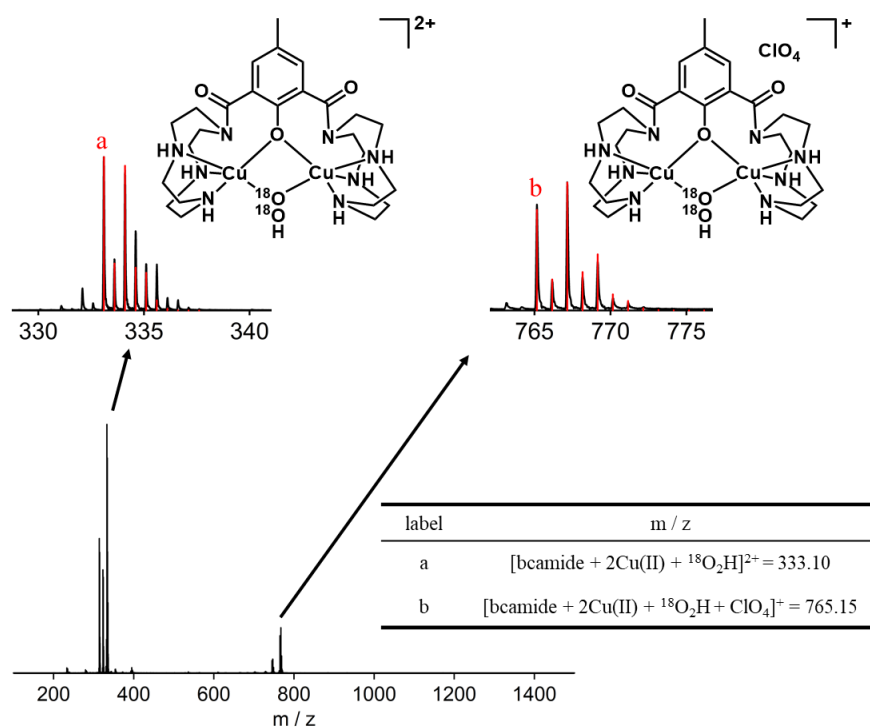


Figure 3-14. CSI MS spectrum of complex **5** measured in MeCN at -30°C at orifice 1: 0 V, orifice 2: 10 V, ring lens voltage: 10 V. Experimental conditions: $[\mathbf{4}] = 0.25 \text{ mM}$, $[\text{H}_2^{18}\text{O}_2] = 2.5 \text{ mM}$.

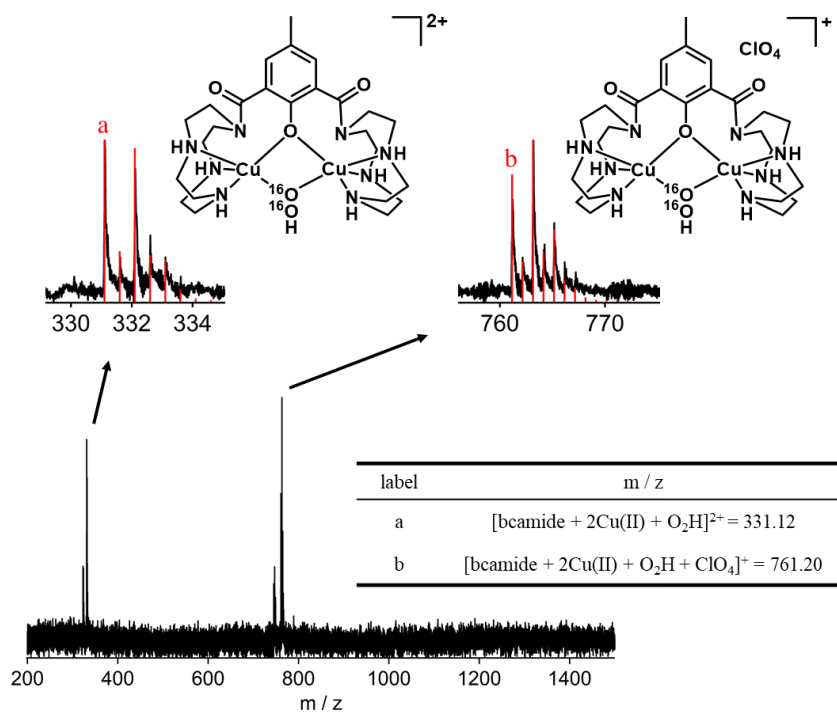


Figure 3-15. CSI MS spectrum of **5** formed upon reaction **4** with H_2O_2 in H_2O at 0°C . The orifice 1: 20 V, orifice 2: 5 V, ring lens voltage: 10 V. Experimental conditions: $[\mathbf{4}] = 0.50 \text{ mM}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \text{ mM}$.

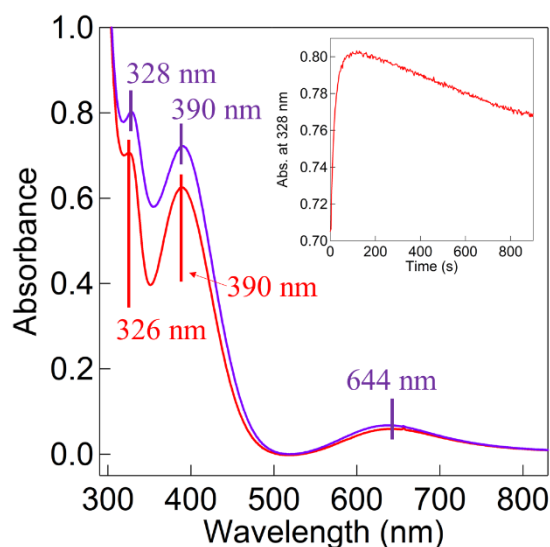


Figure 3-16. Electronic absorption spectra of **4** (red) and **5** (purple) formed upon reaction of **4** (0.25 mM) with H_2O_2 (200 eq) in H_2O at 0°C (inset: time course monitored at 328 nm).

中間体 **5** の共鳴ラマンスペクトルの結果を **Figure 3-17** に示す。**4** と過酸化水素($\text{H}_2^{16}\text{O}_2$) の反応では、 897 cm^{-1} に明確なラマンバンドが現れた。 ^{18}O でラベル化した過酸化水素($\text{H}_2^{18}\text{O}_2$)を用いると、 $\nu_{\text{O-O}}$ バンドは 842 cm^{-1} にシフトし、同位体シフトは 55 cm^{-1} であった。これらは既知の μ -1,1-hydroperoxodicopper(II) species で報告された 892 cm^{-1} の $\nu_{\text{O-O}}$ バンドと同位体シフト 52 cm^{-1} とよく一致した^[20]。以上の様に UV-vis, CSI MS, 共鳴ラマンスペクトルから、**5** は **Figure 3-18** に示す μ -1,1-hydroperoxodicopper(II) species であると結論される。

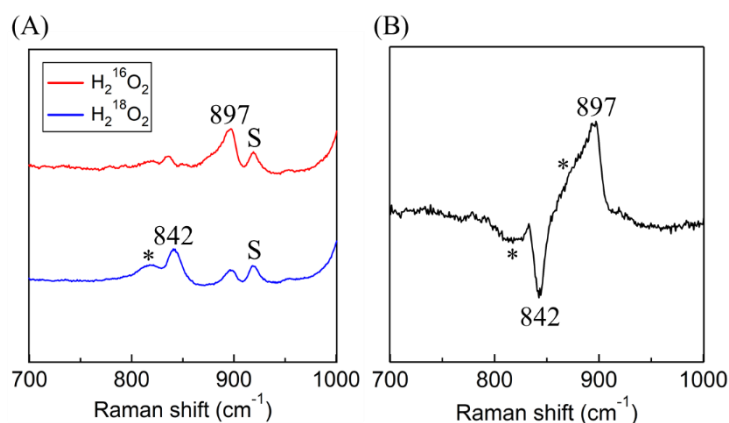


Figure 3-17. (A) Resonance Raman spectra of **5** prepared from **4** and excess amounts of $\text{H}_2^{16}\text{O}_2$ (red) or $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ (blue) in MeOH at -30°C with excitation at 405 nm. (B) A difference spectrum of A. S and * mean solvent and H_2O_2 .

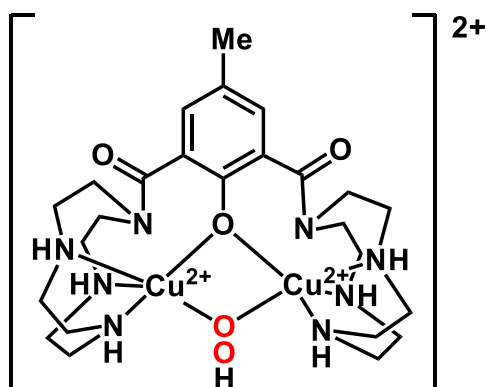


Figure 3-18. A proposed chemical structure of the μ -1,1-hydroperoxodicopper(II) complex **5**.

次に、**5** が DNA 切断の直接の活性種であるかを調べるため、guaiacol (7.5 mM)と **5** (0.25 mM)の反応を UV-vis スペクトルで追跡したところ、guaiacol の酸化で生成する tetraguaiacol に帰属できる特徴的なバンド^[21]が 412, 470 nm に出現した(Figure 3-19). 470 nm ($\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)^[21a,22]から算出した tetraguaiacol の濃度は 0.05 mM であった(Figure 3-19(B)). tetraguaiacol の生成には 4 当量の **5** が必要であるため、0.2 mM の **5** がこの反応で消費されたことがわかる. 従って、**5** に対する tetraguaiacol の収率は約 80%であった. この結果は、**5** がこの反応の活性種であることを明確にした. tetraguaiacol の増加を 500 nm で追跡し、その擬一次反応速度定数は、 $2.93 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ と決定された(Figure 3-19(C)). guaiacol は過酸化水素だけでは酸化されない(Figure 3-20), 以上の結果から **5** が酸化的 DNA 切断の直接の活性種である可能性が高い.

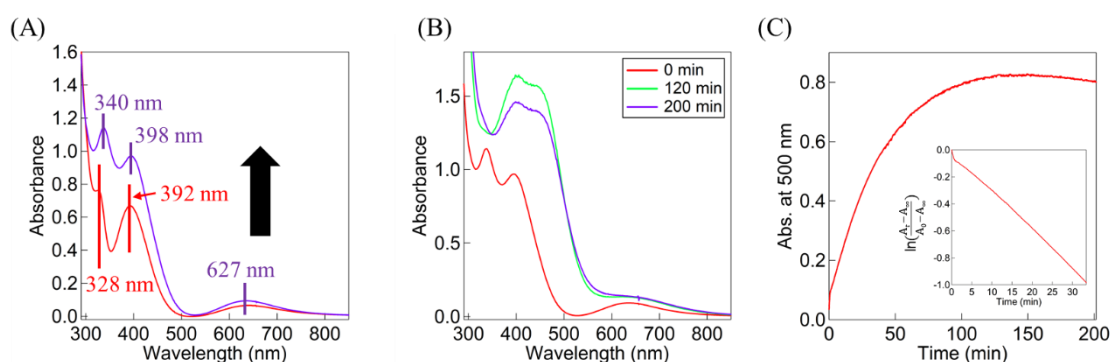


Figure 3-19. (A) Electronic absorption spectra changes in the formation of **5** upon addition of H_2O_2 (10 eq) to **4** (0.25 mM) in MeCN at room temperature. (B) Electronic absorption spectra changes after guaiacol (30 eq) was added to the solution of **5** in MeCN at room temperature. (C) Time trace of absorbance at 500 nm (inset: First-order plot based on the absorbance change at 500 nm).

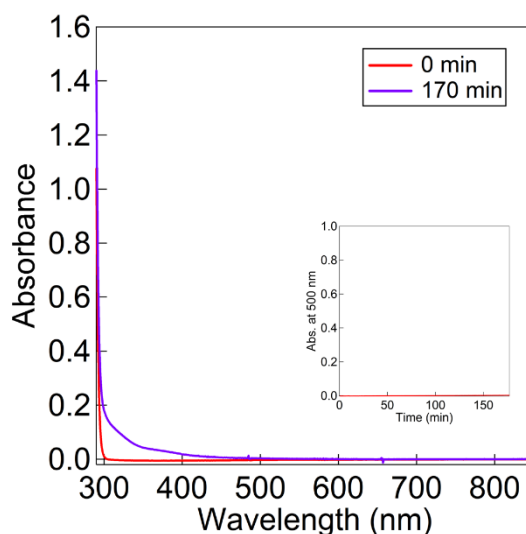


Figure 3-20. Electronic absorption spectra changes after H₂O₂ (2.5 mM) was added to a solution of guaiacol (7.5 mM) in MeCN at room temperature (inset: time trace of absorbance at 500 nm).

3-3-7. MTT assay を用いた HeLa 細胞に対する細胞毒性の評価

最後に、methylene-tether 錯体である **3** と amide-tether 錯体である **4** を用いて、HeLa 細胞に対する細胞毒性を MTT assay^[23]によって評価した。HeLa 細胞は Henrietta Lacks から得られたヒト子宮頸がん細胞である。この結果を [Table 3-3](#) 及び [Figure 3-21](#) に示す。methylene-tether 錯体 **3** の IC₅₀ 値が 2710 μM であるのに対し、amide-tether 錯体 **4** の IC₅₀ 値は 1740 μM であった。この結果は、**4** の細胞毒性が **3** と比較して効率的に発現していることを示唆しており、また **3** と比較して **4** の高い酸化的 DNA 切断活性の結果とも一致している。

Table 3-3. In vitro cytotoxicity for complexes 3 and 4 against the HeLa cell measured by MTT assay after 24 h

Complex	IC ₅₀ values for HeLa cell (μM)
3	2710 ± 230
4	1740 ± 114

IC₅₀: concentration of the drug required to inhibit growth of 50% of the cells.

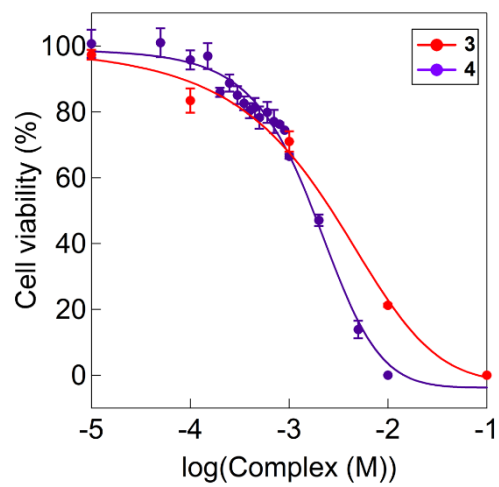


Figure 3-21. Cell viability data for HeLa cells treated with complexes **3** and **4** analyzed by MTT assay. Experiments were carried out at least three times.

3-4. 結論

本研究において、我々は新規 amide-tether 配位子及びその二核銅(II)錯体[$\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{bcamide})](\text{ClO}_4)_2$ (**4**)を合成し、**4**が過酸化水素存在下において酸化的 DNA 切断を大きく加速することを見出した。さらに、**4**は過酸化水素と反応して活性種を生成すること、また様々な分光学的測定によって、その活性種が $\mu\text{-1,1-hydroperoxodicopper(II) species}$ (**5**)であることを明らかにした。これらの結果は、副作用の少ない新しい抗がん剤の開発に対して光をもたらす可能性がある。

3-5. 実験方法

3-5-1. 試薬及び測定装置

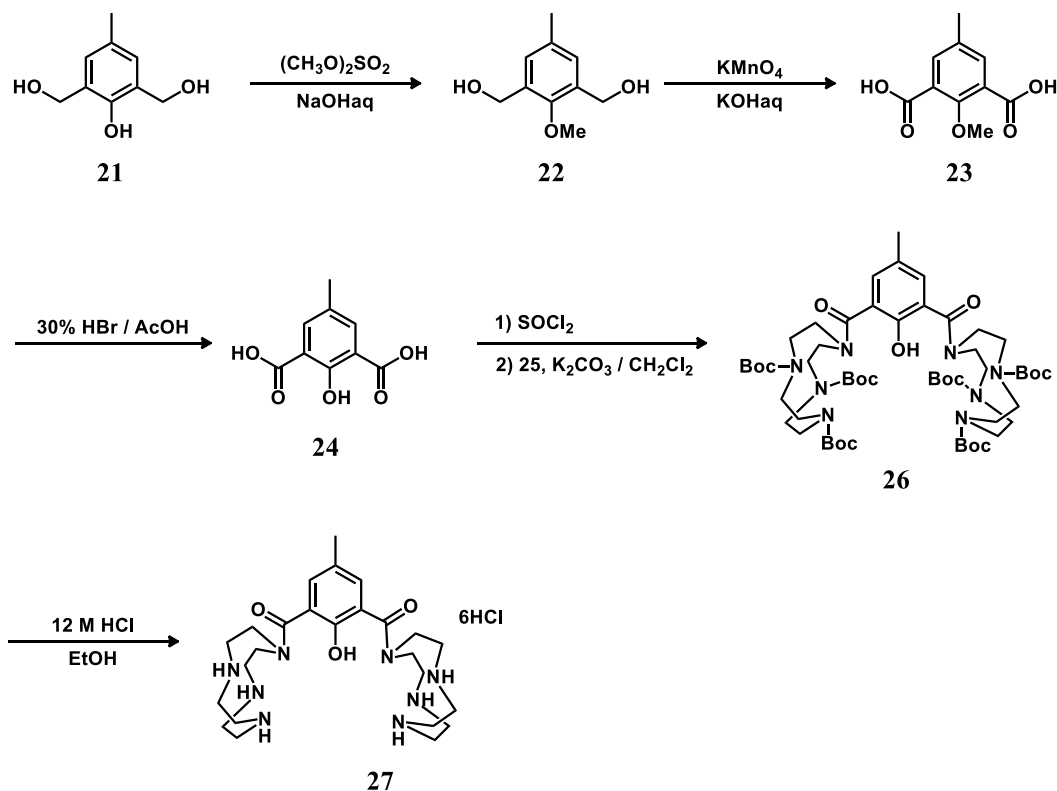
試薬については、合成中間体や錯体を除き、高純度製品を和光純薬工業、東京化成、シグマアルドリッチ社製から選択して購入した。溶媒については、合成に用いるものは必要に応じて乾燥蒸留した。スーパーコイルドプラスミド pUC19 DNA は、ニッポンジーン社から購入した試薬を使用した。2,6-Bis(hydroxymethyl)-*p*-cresol (**21**)及び *N,N',N''*-4,7,10-tris(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (**25**)は、参考文献^[17]に従って合成した。

元素分析(C, H, N)は、Perkin-Elmer 社製 Elemental Analyzer 2400 II を用いて測定した。¹H 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*₄ (TSP)を用いて測定した。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 H₂O を溶媒として測定した。pH 測定は、HORIBA 製 LAQUA electrode を用い、標準緩衝溶液を用いて構成した後に測定を行った。UV-vis スペクトルは、Agilent 社製 8453 紫外可視分光光度計を用いて測定した。IR スペクトルは、Shimadzu Single Reflection HATR IR Affinity-1 MIRacle 10 を用いて測定した。単結晶 X 線構造解析は、リガク社製 R-AXIS RAPID II/RAPID AUTO X 線単結晶 X 線構造解析装置で解析データを測定し、直接法により初期位相を決定した後、フーリエ合成により構造を解析し、Yadokari による完全行列最小二乗法により精密化した。共鳴ラマンスペクトルは、EKSPLANT242-SH/SFG-2U レーザーによる励起波長 405 nm を用いて測定を行った。ラマンシフトは indene を用いて校正を行い、ラマンバンドの正確性を±1 cm⁻¹ の範囲に設定した。MTT assay は、Thermo Scientific Multiskan FC を用いて測定を行った。

3-5-2. 配位子及び二核銅(II)錯体合成

Scheme 3-1 に Hbcamide 配位子の合成経路を示す.

Scheme 3-1. Synthetic route to Hbcamide



1,3-Dihydroxymethyl-2-methoxy-5-methylbenzene (22)の合成^[24]

H₂O (33 mL)に溶解させた NaOH (3.57 g, 89.3 mmol)水溶液に **21** (10.3 g, 61.2 mmol)を溶解させ、dimethyl sulfate (6.0 mL, 63.3 mmol)を加えた後、室温で30分間攪拌した。析出した固体を濾過して除いた後、濾液にdimethyl sulfate (3.0 mL, 31.6 mmol)を加え、室温で90分間攪拌した。析出した固体を濾過し、真空乾燥すると白色の固体が得られた(4.33 g, Yield: 39%)。¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆): δ/ppm = 7.18 (s, 2H, Ph), 4.64 (s, 4H, CH₂), 3.74 (s, 3H, CH₃), 2.28 (s, 3H, CH₃)。

2-Methoxy-5-methylbenzene-1,3-dicarboxylic acid (23)の合成^[24]

H₂O (95 mL)に溶解させた KOH (0.420 g, 7.49 mmol)水溶液に **22** (3.72 g, 20.4 mmol)を溶解させ、氷浴に浸した。KMnO₄ (8.86 g, 56.1 mmol)を慎重に加えていき、0°で30分間攪拌した。室温に戻して1時間攪拌した後、HCHO (68 μL, 1.85 mmol)を反応溶液に加えて30分間攪拌した。反応溶液をセライト濾過した後、濾液が1 mL程度になるまでロータリーエバポレーターで濃縮した。ここに12 M HClを加えると固体が析出したので、

桐山漏斗で濾過し、真空乾燥すると白色の固体が得られた(2.24 g, Yield: 52%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta/\text{ppm} = 7.62$ (s, 2H, Ph), 3.76 (s, 3H, CH_3), 2.31 (s, 3H, CH_3).

4-Methylphenol-2,6-dicarboxylic acid (24)の合成^[25]

23 (2.57 g, 12.2 mmol)を 30% HBr 酢酸溶液(12 mL)に溶解させた. この反応溶液を 50°C で攪拌し, HBr ガスが出なくなることを確認した後, 徐々に 120°C まで温度を上昇させた. 2 時間攪拌した後, 室温に戻した. 反応溶液に H_2O を加えると固体が析出したので, 桐山漏斗で濾過し, 真空乾燥すると紫色の固体が得られた(1.93 g, Yield: 80%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{acetone-}d_6$): $\delta/\text{ppm} = 7.77$ (s, 2H, Ph), 2.25 (s, 3H, CH_3).

2,6-Di((*N,N',N''*-4,7,10-tris(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraaza-cyclodecan-1-yl)carbamoyl-4-methylphenol (26)の合成

24 (2.26 g, 11.5 mmol)を SOCl_2 (50 mL)に溶解させ, 60°C で 4 時間攪拌した. 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. **25** (11.8 g, 25.0 mmol)及び K_2CO_3 (13.8 g, 99.8 mmol)を CH_2Cl_2 (200 mL)に溶解させた. この溶液に, 先程の油状物質を CH_2Cl_2 (200 mL)に溶解させた溶液を 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 H_2O (3 × 100 mL)で分液した. 有機層に 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, 真空乾燥すると黄色の固体が得られた. これを最少量の CHCl_3 に溶解させ, シリカゲルカラムクロマトグラフィー(EtOAc)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, 真空乾燥すると薄黄色の固体が得られた (10.7 g, Yield: 84%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 7.12$ (s, 2H, Ph), 3.23–3.86 (m, 32H, CH_2), 2.28 (s, 3H, CH_3), 1.31–1.52 (m, 54H, CH_2).

2,6-Di(1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)carbamoyl-4-methylphenol hexahydrochloride (27)の合成

26 (1.08 g, 0.977 mmol)を $\text{EtOH}/12 \text{ M HCl} = 3/1$ (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. 析出した固体を桐山漏斗で濾過し, 真空乾燥すると白色の固体が得られた(0.687 g, Yield: 97%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, D_2O): $\delta/\text{ppm} = 7.36$ (s, 2H, Ph), 3.72–3.88 (m, 8H, CH_2), 3.26–3.41 (m, 16H, CH_2), 3.09–3.25 (m, 8H, CH_2), 2.35 (s, 3H, CH_3).

二核銅(II)錯体 4 の合成

27 (99.9 mg, 0.138 mmol)を 1.0 M NaOH 水溶液(843 μL)に溶解させた後, 濃縮し, 真空乾燥すると薄黄色の固体が得られた. CH_2Cl_2 (10 mL)に溶解させ, Na_2SO_4 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し, 真空乾燥する

と薄黄色の Hbcamide 配位子が得られた(69.5 mg). $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (113 mg, 0.304 mmol) を Milli-Q 水(1 mL)に溶解し, この溶液に Milli-Q 水(2 mL)に溶解させた Hbcamide 配位子を N_2 flow しながら加えた. 1.0 M NaOH 水溶液を pH が 8 になるまで加えた後, 反応溶液をロータリーエバポレーターで濃縮, 真空乾燥すると緑色の固体が得られた. この固体を MeOH に溶解させ, 少量のベンゼンを加えた後, Et_2O 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を得た(43.6 mg, Yield: 34%). Anal. calcd for $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{bcamide})](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: C, 32.68; H, 5.70; N, 12.20. Found: C, 32.78; H, 5.52; N, 11.90. ESI MS (H_2O m/z , positive mode). Calcd for $[\mathbf{4} - 2\text{ClO}_4]^{2+}$: 323.10. Found: 323.02. $[\mathbf{4} - \text{ClO}_4]^+$: 745.16. Found: 744.97. IR (KBr): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3586, 3291, 2922, 2876, 1614, 1472, 1443, 1362, 1265, 1250, 1219, 1194, 1165, 1072, 986, 949, 930, 883, 837, 808, 737, 714, 644, 621$.

3-5-3. DNA 切断実験

各錯体の 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), 7.4 (Tris-HCl), 8.2 (TAPS), 10 mM), pUC19 DNA (50 μM bp), complex (0–50 μM), H_2O_2 (0–500 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, 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 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 の染色補正要因 1.06 を用い, ImageJ ソフトウェアによって解析を行った.

3-5-4. 4 の DNA 切断阻害実験

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 μM bp), **4** (50 μM), H_2O_2 (500 μM), inhibitor (500 μM)に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. この後の手順は DNA 切断実験に記載したものと同様である.

3-5-5. $\mu\text{-1,1-hydroperoxodicopper(II)}$ species の UV-vis スペクトル測定

3 及び **4** 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. H_2O_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, **4** の水溶液(0.25 mM)を 2 面セルに入れ, 0°C に保った後, H_2O_2 水溶液(錯体に対して 200 eq)を加え, 290–850 nm の範囲でスペクトルを追跡した.

3-5-6. μ -1,1-hydroperoxodicopper(II) species の CSI MS スペクトル測定

4 の MeCN 溶液(0.25 mM)を 20 mL ニロナスフラスコに入れ、 $-30 \pm 0.2^\circ\text{C}$ に保った。H₂O₂ の MeCN 溶液(錯体に対して 10 eq)を加え、スペクトルを測定した。また、4 の水溶液(0.50 mM)を 20 mL ナスフラスコに入れ、 $-30 \pm 0.2^\circ\text{C}$ に保った。H₂O₂ 水溶液(錯体に対して 200 eq)を加え、スペクトルを測定した。

3-5-7. 共鳴ラマンスペクトルの測定

MeOH に 4 を溶解させ、1 mM の溶液(1 mL)を調製し、 $-30 \pm 0.2^\circ\text{C}$ に保った。ここに、H₂¹⁶O₂ または H₂¹⁸O₂ の MeCN 溶液 (30 or 10 eq)を加え、420 nm の励起波長を照射してスペクトルを測定した。

3-5-8. MTT assay による細胞毒性の評価

96 well プレートに blank として培地のみを 1 列と、培地に 10×10^4 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、インキュベーター(37°C, 5% CO₂)でインキュベーションした。24 時間後、PBS(-)で洗浄した。その後、サンプル列にはそれぞれの濃度に調製した錯体のサンプル(10–1000 μM)を、blank と control 列には培地のみを 1 well につき 100 μL ずつ加え、インキュベーターでインキュベーションした。24 時間後、PBS(-)で洗浄し、5 mg/mL に調製した MTT reagent 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ターで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。その後、570 nm の波長を用いて吸光度測定器で吸光度を測定し、細胞毒性を評価した。

3-6. 参考文献

- [1] (a) Santini, C.; Pelli, M.; Gandin, V.; Porchia, M.; Tisato, F.; Marzano, C. Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 815–862. (b) Kettenmann, S. D.; Louka, F. R.; Marine, E.; Fischer, R. C.; Mautner, F. A.; Kulak, N.; Massoud, S. S. Efficient Artificial Nucleases for Mediating DNA Cleavage Based on Tuning the Steric Effect in the Pyridyl Derivatives of Tripod Tetraamine-Cobalt(II) Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2018**, 2322–2338. (c) Dasari, S.; Tchounwou, P. B. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *740*, 364–378. (d) Copeland, K. D.; Fitzsimons, M. P.; Houser, R. P.; Barton, J. K. DNA Hydrolysis and Oxidative Cleavage by Metal-Binding Peptides Tethered to Rhodium Intercalators. *Biochemistry* **2002**, *41*, 343–356.
- [2] (a) Johnstone, T. C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S. J. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 3436–3486. (b) Rosenberg, B. Fundamental Studies With Cisplatin. *Cancer* **1985**, *55*, 2303–2316.
- [3] Kidani, Y.; Inagaki, K.; Iigo, M.; Hoshi, A.; Kuretani, K. Antitumor activity of 1,2-diaminocyclohexaneplatinum complexes against Sarcoma-180 ascites form. *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 1315–1318.
- [4] McKeage, M. J. Lobaplatin: a new antitumor platinum drug. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2001**, *10*, 119–128.
- [5] Shimada, M.; Itamochi, H.; Kigawa, J. Nedaplatin: a cisplatin derivative in cancer chemotherapy. *Cancer Manag. Res.* **2013**, *5*, 67–76.
- [6] Jamieson, E. R.; Lippard, S. J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467–2498.
- [7] Florea, A.-M.; Büsselberg, D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induces Side Effects. *Cancers* **2011**, *3*, 1351–1371.
- [8] (a) Burger, R. M. Cleavage of Nucleic Acids by Bleomycin. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1153–1169. (b) Abraham, A. T.; Zhou, X.; Hecht, S. M. DNA Cleavage by Fe(II)•Bleomycin Conjugated to a Solid Support. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1982–1983. (c) Huang, S.-X.; Feng, Z.; Wang, L.; Galm, U.; Wendt-Pienkowski, E.; Yang, D.; Tao, M.; Coughlin, J. M.; Duan, Y.; Shen, B. A Designer Bleomycin with Significantly Improved DNA Cleavage Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13501–13509.
- [9] (a) Decker, A.; Chow, M. S.; Kemsley, J. N.; Lehnert, N.; Solomon, E. I. Direct Hydrogen-Atom Abstraction by Activated Bleomycin: An Experimental and Computational Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4719–4733. (b) Liu, L. V.; Bell III, C. B.; Wong, S. D.; Wilson, S. A.; Kwak, Y.; Chow, M. S.; Zhao, J.; Hodgson, K. O.; Hedman, B.; Solomon, E. I. Definition of the intermediates and mechanism of the anticancer drug bleomycin using nuclear resonance vibrational spectroscopy and related methods. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 22419–22424.

- [10] Adamson, I. Y. R. Pulmonary toxicity of bleomycin. *Environ. Health Perspect.* **1976**, *16*, 119–126.
- [11] Zhou, D.; Shao, L.; Spitz, D. R. Reactive Oxygen Species in Normal and Tumor Stem Cells. *Adv. Cancer Res.* **2014**, *122*, 1–67.
- [12] (a) Nogueria, V.; Hay, N. Molecular Pathways: Reactive Oxygen Species Homeostasis in Cancer Cells and Implications for Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 4309–4314. (b) Szatrowski, T. P.; Nathan, C. F. Production of Large Amounts of hydrogen peroxide by Human Tumor Cells. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 794–798.
- [13] (a) Aykin-Burns, N.; Ahmad, I. M.; Zhu, Y.; Oberley, L. W.; Spitz, D. R. Increased levels of superoxide and H₂O₂ mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation. *Biochem. J.* **2009**, *418*, 29–37. (b) Ishii, N.; Fujii, M.; Hartman, P. S.; Tsuda, M.; Yasuda, K.; Senoo-Matsuda, N.; Yanase, S.; Ayusawa, D.; Suzuki, K. A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome *b* causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature*, **1998**, *394*, 694–697.
- [14] (a) Tu, C.; Shao, Y.; Gan, N.; Xu, Q.; Guo, Z. Oxidative DNA Strand Scission Induced by a Trinuclear Copper(II) Complex. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 4761–4766. (b) González-Álvarez, M.; Alzuet, G.; Borrás, J.; Macías, B.; Castiñeiras, A. Oxidative Cleavage of DNA by a New Ferromagnetic Linear Trinuclear Copper(II) Complex in the Presence of H₂O₂/Sodium Ascorbate. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 2992–2998. (c) Santra, B. K.; Reddy, P. A. N.; Neelakanta, G.; Mahadevan, S.; Nethaji, M.; Chakravarty, A. R. Oxidative cleavage of DNA by a dipyrrodoquinoxaline copper(II) complex in the presence of ascorbic acid. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *89*, 191–196. (d) Borrás, J.; Alzuet, G.; Gonzalez-Alvarez, M.; Garcia-Gimenez, J. L.; Macias, B.; Liu-Gonzalez, M. Efficient DNA Cleavage Induced by Copper(II) Complexes of Hydrolysis Derivatives of 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine in the Presence of Reducing Agents. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, *6*, 822–834. (e) Vaidyanathan, V. G.; Nair, B. U. Oxidative cleavage of DNA by tridentate copper (II) complex. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *96*, 271–276.
- [15] (a) Amrani, F. B. A. E.; Perelló, L.; Real, J. A.; González-Álvarez, M.; Alzuet, G.; Borrás, J.; García-Granda, S.; Montejo-Bernarde, J. Oxidative DNA cleavage induced by an iron(III) flavonoid complex: Synthesis, crystal structure and characterization of chlorobis(flavonolate)(methanol) iron(III) complex. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 1208–1218. (b) Li, Q.; van den Berg, T. A.; Feringa, B. L. Roelfes, G. Mononuclear Fe(II)-N₄Py complexes in oxidative DNA cleavage: structure, activity and mechanism. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 8012–8021. (c) Roelfes, G.; Branum, M. E.; Wang, L.; Que, Jr. L.; Feringa, B. L. Efficient DNA Cleavage with an Iron Complex without Added Reductant. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11517–11518. (d) van den Berg, T. A.; Feringa, B. L.; Roelfes, G. Double strand DNA cleavage with a binuclear iron complex. *Chem. Commun.* **2007**, *2*, 180–182.

- [16] (a) Sathyaraj, G.; Kiruthika, M.; Weyhermüller, T.; Nair, B. U. Oxidative Cleavage of DNA Ruthenium(II) Complexes Containing a Ferrocene/Non-Ferrocene Conjugated Imidazole Phenol Ligand. *Organometallics* **2012**, *31*, 6980–6987. (b) Mack, D. P.; Dervan, P. B. Nickel-mediated sequence-specific oxidative cleavage of DNA by a designed metalloprotein. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4604–4606.
- [17] Kodera, M.; Kadoya, Y.; Aso, K.; Fukui, K.; Nomura, A.; Hitomi, Y.; Kitagishi, H. Acceleration of Hydrolytic DNA Cleavage by Dicopper(II) Complexes with *p*-Cresol-Derived Dinucleating Ligands at Slightly Acidic pH and Mechanistic Insights. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2019**, *92*, 739–747.
- [18] (a) Rey, N. A.; Neves, A.; Bortoluzzi, A. J.; Pich, C. T.; Terenzi, H. Catalytic Promiscuity in Biomimetic Systems: Catecholase-like Activity, Phosphatase-like Activity, and Hydrolytic DNA Cleavage Promoted by a New Dicopper(II) Hydroxo-Bridged Complex. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 348–350. (b) Amudha, P.; Kandaswamy, M.; Govindasamy, L.; Velmurugan, D. Synthesis and Characterization of New Symmetrical Binucleating Ligands and Their μ -Phenoxo-Bridged Bicopper(II) Complexes: Structural, Electrochemical, and Magnetic Studies. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 4486–4492.
- [19] (a) Root, D. E.; Mahroof-Tahir, M.; Karlin, K. D.; Solomon, E. I. Effect of Protonation on Peroxo-Copper Bonding: Spectroscopic and Electronic Structure Study of $[\text{Cu}_2(\text{UN-O})(\text{OOH})]^{2+}$. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 4838–4848. (b) Kindermann, N.; Dechert, S.; Demeshko, S.; Meyer, F. Proton-Induced, Reversible Interconversion of a μ -1,2-Peroxo and a μ -1,1-Hydroperoxo Dicopper(II) Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 8002–8005.
- [20] Li, L.; Sarjeant, A. A. N.; Vance, M. A.; Zakharov, L. N.; Rheingold, A. L.; Solomon, E. I.; Karlin, K. D. Exogenous Nitrile Substrate Hydroxylation by a New Dicopper-Hydroperoxide Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15360–15361.
- [21] (a) Hong, J.; Wang, W.; Huang, K.; Yang, W.-Y.; Zhao, Y.-X.; Xiao, B.-L.; Gao, Y.-F.; Moosavi-Movahedi, Z.; Ahmadian, S.; Bohlooli, M.; Saboury, A. A.; Ghourchian, H.; Sheibani, N.; Moosavi-Movahedi, A. A. A self-assembled nano-cluster complex based on cytochrome *c* and nafion: An efficient nanostructured peroxidase. *Biochem. Eng. J.* **2012**, *65*, 16–22. (b) Hwang, S.; Lee, C.-H.; Ahn, I.-S. Product identification of guaiacol oxidation catalyzed by manganese peroxidase. *J. Ind. Eng. Chem.* **2008**, *14*, 487–492.
- [22] Lopes, L. C.; Brandao, I. V.; Sanchez, O. C.; Franceschi, E.; Borges, G.; Dariva, C.; Fricks, A. T. Horseradish peroxidase biocatalytic reaction monitoring using Near-Infrared (NIR) Spectroscopy. *Process Biochem.* **2018**, *71*, 127–133.
- [23] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
- [24] Samuel, A. P. S.; Xu, J.; Raymond, K. N. Predicting Efficient Antenna Ligands for Tb(III)

Emission. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 687–698.

[25] Fahrni, C. J.; Pfaltz, A. Synthesis of Chiral C_2 -Symmetric Binucleating Ligands. *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 491–506.

3-7. 謝辞

本研究を行うにあたり、共鳴ラマンスペクトル測定の協力を快く引き受けてくださいました兵庫県立大学の久保 稔 教授，柳澤 幸子 准教授に心より感謝申し上げます。

3-8. Supporting Information

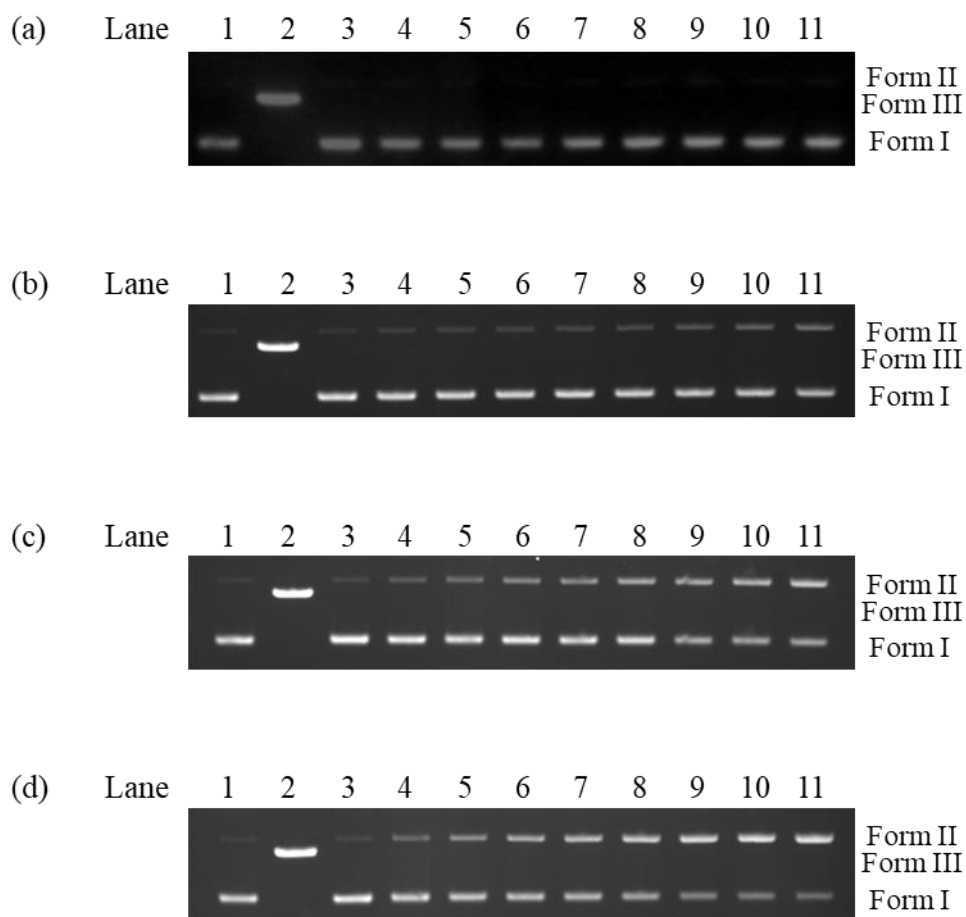


Figure S3-1. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of **4** and H_2O_2 (500 μ M) at pH 6.0. (a)–(d) corresponded to complex concentrations of 0, 12.5, 25.0, and 37.5 μ M, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lane 3–11: corresponding to the time of 0, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min, respectively.

Table S3-1. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 4 at pH 6.0

Complex (μM)	H_2O_2 (μM)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
0	500	0	98.2 ± 0.2	1.8 ± 0.2	-
		10	97.5 ± 0.3	2.5 ± 0.3	-
		20	97.1 ± 0.0	2.9 ± 0.0	-
		30	97.1 ± 0.0	2.9 ± 0.0	-
		40	97.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	-
		60	96.8 ± 0.1	3.2 ± 0.1	-
		120	96.5 ± 0.0	3.5 ± 0.0	-
		180	95.5 ± 0.7	4.5 ± 0.7	-
		300	95.5 ± 0.4	4.5 ± 0.4	-
12.5	500	0	95.7 ± 0.2	4.3 ± 0.2	-
		10	92.1 ± 0.4	7.9 ± 0.4	-
		20	90.2 ± 0.8	9.8 ± 0.8	-
		30	89.1 ± 0.9	10.9 ± 0.9	-
		40	87.8 ± 1.1	12.2 ± 1.1	-
		60	86.3 ± 1.4	13.7 ± 1.4	-
		120	81.4 ± 1.5	18.6 ± 1.5	-
		180	77.5 ± 1.2	22.5 ± 1.2	-
		300	71.2 ± 1.1	28.8 ± 1.1	-
25.0	500	0	95.9 ± 0.0	4.1 ± 0.0	-
		10	85.8 ± 2.8	14.2 ± 2.8	-
		20	77.7 ± 4.1	22.3 ± 4.1	-
		30	73.8 ± 3.6	26.2 ± 3.6	-
		40	71.3 ± 2.4	28.7 ± 2.4	-
		60	64.7 ± 2.5	35.3 ± 2.5	-
		120	56.3 ± 0.6	43.7 ± 0.6	-
		180	52.6 ± 1.7	47.4 ± 1.7	-
		300	47.6 ± 2.4	52.4 ± 2.4	-
37.5	500	0	95.3 ± 0.4	4.7 ± 0.4	-
		10	81.5 ± 1.1	18.5 ± 1.1	-
		20	69.1 ± 0.0	30.9 ± 0.0	-
		30	59.9 ± 0.6	40.1 ± 0.6	-
		40	53.6 ± 0.0	46.4 ± 0.0	-
		60	45.0 ± 0.3	55.0 ± 0.3	-
		120	33.7 ± 0.2	66.3 ± 0.2	-
		180	29.5 ± 0.4	70.5 ± 0.4	-
		300	23.7 ± 1.3	76.3 ± 1.3	-

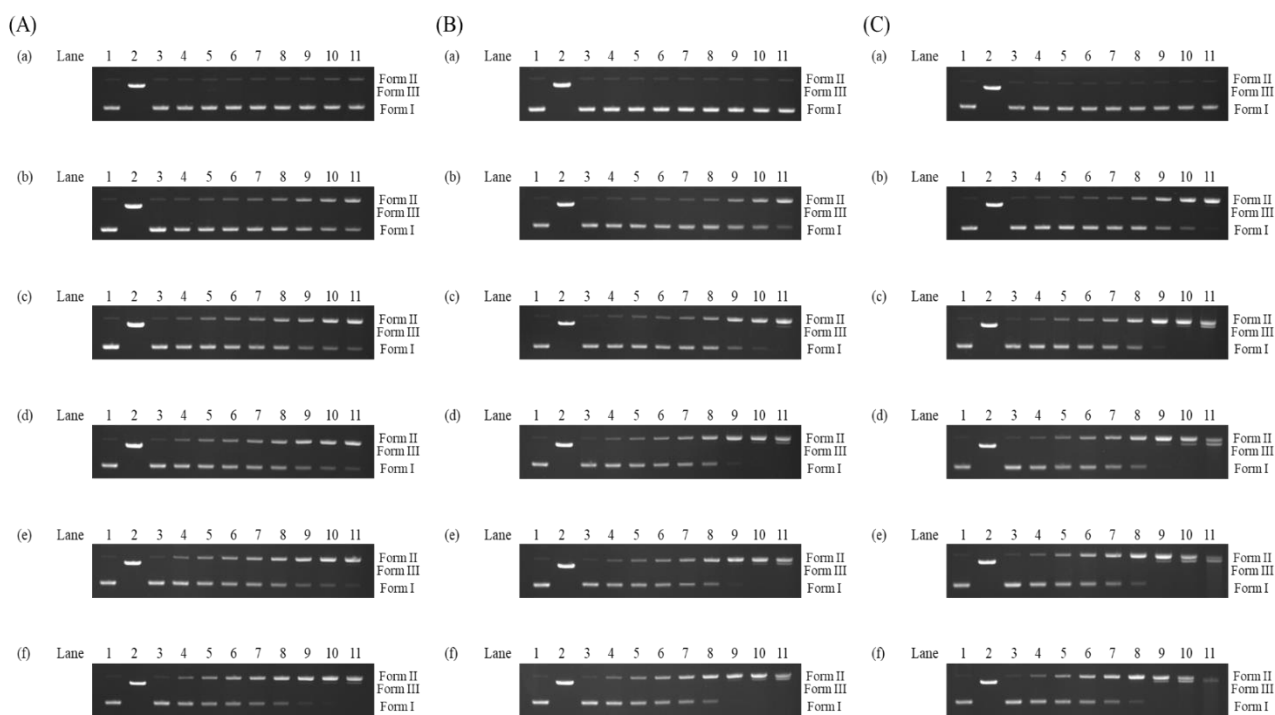


Figure S3-2. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μM bp) in the presence of **4** (50 μM) and H_2O_2 at (A) pH 6.0, (B) pH 7.4, and (C) pH 8.2, respectively. (a)–(f) corresponded to H_2O_2 concentrations of 0, 100, 200, 300, 400, and 500 μM , respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lane 3–11: corresponding to the time of 0, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min, respectively.

Table S3-2. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 4 (50 μM) at pH 6.0, 7.4, and 8.2

pH		6.0			7.4			8.2		
H ₂ O ₂ (μM)	Time (h)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
0	0	95.0 \pm 0.1	5.0 \pm 0.1	-	95.4 \pm 0.1	4.6 \pm 0.1	-	95.8 \pm 0.1	4.2 \pm 0.1	-
	10	94.4 \pm 0.3	5.6 \pm 0.3	-	95.3 \pm 0.1	4.7 \pm 0.1	-	95.7 \pm 0.1	4.3 \pm 0.1	-
	20	94.0 \pm 0.2	6.0 \pm 0.2	-	95.2 \pm 0.1	4.8 \pm 0.1	-	95.6 \pm 0.1	4.4 \pm 0.1	-
	30	93.8 \pm 0.3	6.2 \pm 0.3	-	95.1 \pm 0.1	4.9 \pm 0.1	-	95.5 \pm 0.1	4.5 \pm 0.1	-
	40	93.3 \pm 0.2	6.7 \pm 0.2	-	94.9 \pm 0.1	5.1 \pm 0.1	-	95.4 \pm 0.1	4.6 \pm 0.1	-
	60	92.4 \pm 0.0	7.6 \pm 0.0	-	94.8 \pm 0.0	5.2 \pm 0.0	-	95.2 \pm 0.2	4.8 \pm 0.2	-
	120	89.2 \pm 0.5	10.8 \pm 0.5	-	94.7 \pm 0.0	5.3 \pm 0.0	-	94.9 \pm 0.2	5.1 \pm 0.2	-
	180	87.0 \pm 0.3	13.0 \pm 0.3	-	94.6 \pm 0.0	5.4 \pm 0.0	-	94.6 \pm 0.2	5.4 \pm 0.2	-
	300	82.7 \pm 0.8	17.3 \pm 0.8	-	93.8 \pm 0.2	6.2 \pm 0.2	-	94.2 \pm 0.4	5.8 \pm 0.4	-
100	0	94.8 \pm 0.0	5.2 \pm 0.0	-	95.3 \pm 0.4	4.7 \pm 0.4	-	95.1 \pm 0.1	4.9 \pm 0.1	-
	10	89.5 \pm 0.6	10.5 \pm 0.6	-	93.0 \pm 0.3	7.0 \pm 0.3	-	92.8 \pm 0.4	7.2 \pm 0.4	-
	20	85.5 \pm 0.9	14.5 \pm 0.9	-	90.8 \pm 0.7	9.2 \pm 0.7	-	89.1 \pm 0.7	10.9 \pm 0.7	-
	30	81.3 \pm 1.4	18.7 \pm 1.4	-	88.8 \pm 0.9	11.2 \pm 0.9	-	85.9 \pm 0.7	14.1 \pm 0.7	-
	40	77.1 \pm 1.8	22.9 \pm 1.8	-	87.4 \pm 0.4	12.6 \pm 0.4	-	81.5 \pm 0.4	18.5 \pm 0.4	-
	60	70.7 \pm 1.7	29.3 \pm 1.7	-	81.8 \pm 1.4	18.2 \pm 1.4	-	69.6 \pm 2.0	30.4 \pm 2.0	-
	120	57.0 \pm 0.8	43.0 \pm 0.8	-	62.9 \pm 3.6	37.1 \pm 3.6	-	36.7 \pm 0.0	63.3 \pm 0.0	-
	180	47.1 \pm 1.0	52.9 \pm 1.0	-	47.1 \pm 4.3	52.9 \pm 4.3	-	17.5 \pm 1.4	82.2 \pm 1.3	0.3 \pm 0.1
	300	34.4 \pm 2.0	65.6 \pm 2.0	-	22.4 \pm 3.6	77.6 \pm 3.6	-	2.1 \pm 0.3	95.8 \pm 0.1	2.1 \pm 0.3
200	0	95.8 \pm 0.5	4.2 \pm 0.5	-	95.7 \pm 0.2	4.3 \pm 0.2	-	95.8 \pm 0.2	4.2 \pm 0.2	-
	10	84.5 \pm 0.2	15.5 \pm 0.2	-	89.5 \pm 1.1	10.5 \pm 1.1	-	88.1 \pm 0.6	11.9 \pm 0.6	-
	20	77.3 \pm 0.2	22.7 \pm 0.2	-	83.4 \pm 1.1	16.6 \pm 1.1	-	78.6 \pm 0.7	21.4 \pm 0.7	-
	30	71.1 \pm 0.0	28.9 \pm 0.0	-	78.1 \pm 1.8	21.9 \pm 1.8	-	66.7 \pm 0.7	33.3 \pm 0.7	-
	40	63.7 \pm 0.3	36.3 \pm 0.3	-	71.0 \pm 2.2	29.0 \pm 2.2	-	54.1 \pm 1.7	45.9 \pm 1.7	-
	60	53.9 \pm 0.5	46.1 \pm 0.5	-	55.8 \pm 2.2	44.2 \pm 2.2	-	32.9 \pm 3.2	67.1 \pm 3.2	-
	120	35.9 \pm 1.1	64.1 \pm 1.1	-	21.4 \pm 2.1	78.6 \pm 2.1	-	3.3 \pm 0.9	94.4 \pm 0.8	2.2 \pm 0.8
	180	25.9 \pm 0.2	74.1 \pm 0.2	-	7.2 \pm 1.6	92.3 \pm 1.6	0.5 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	93.1 \pm 1.8	6.9 \pm 1.8
	300	16.1 \pm 0.5	83.5 \pm 0.2	0.4 \pm 0.4	0.7 \pm 0.5	94.7 \pm 0.6	4.6 \pm 0.9	0.0 \pm 0.0	75.0 \pm 4.8	25.0 \pm 4.8
300	0	95.6 \pm 0.1	4.4 \pm 0.1	-	95.2 \pm 0.4	4.8 \pm 0.4	-	95.4 \pm 0.1	4.6 \pm 0.1	-
	10	80.9 \pm 2.0	19.1 \pm 2.0	-	86.0 \pm 1.1	14.0 \pm 1.1	-	85.6 \pm 0.7	14.4 \pm 0.7	-
	20	70.4 \pm 2.9	29.6 \pm 2.9	-	77.0 \pm 1.8	23.0 \pm 1.8	-	70.3 \pm 0.4	29.7 \pm 0.4	-
	30	65.1 \pm 1.1	34.9 \pm 1.1	-	66.4 \pm 3.4	33.6 \pm 3.4	-	57.6 \pm 2.3	42.4 \pm 2.3	-
	40	55.6 \pm 3.1	44.4 \pm 3.1	-	57.5 \pm 3.7	42.5 \pm 3.7	-	43.6 \pm 2.4	56.4 \pm 2.4	-
	60	44.2 \pm 4.0	55.8 \pm 4.0	-	39.2 \pm 3.4	60.8 \pm 3.4	-	22.1 \pm 2.2	77.9 \pm 2.2	-
	120	26.3 \pm 3.7	73.7 \pm 3.7	-	8.3 \pm 2.4	91.0 \pm 2.7	0.7 \pm 0.6	0.3 \pm 0.4	95.9 \pm 2.3	3.9 \pm 1.2
	180	17.9 \pm 3.2	81.9 \pm 3.1	0.2 \pm 0.2	1.9 \pm 0.3	94.6 \pm 0.3	3.5 \pm 0.6	0.0 \pm 0.0	84.0 \pm 2.3	16.0 \pm 2.3
	300	9.7 \pm 2.2	89.6 \pm 2.4	0.7 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	87.2 \pm 2.1	12.8 \pm 2.1	0.0 \pm 0.0	54.5 \pm 4.0	45.5 \pm 4.0

	0	95.2 ± 0.3	4.8 ± 0.3	-	95.5 ± 0.1	4.5 ± 0.1	-	95.5 ± 0.3	4.5 ± 0.3	-
	10	78.3 ± 3.1	21.7 ± 3.1	-	82.7 ± 1.3	17.3 ± 1.3	-	82.4 ± 0.7	17.6 ± 0.7	-
	20	65.0 ± 2.4	35.0 ± 2.4	-	69.7 ± 3.5	30.3 ± 3.5	-	66.0 ± 1.4	34.0 ± 1.4	-
	30	55.1 ± 1.9	44.9 ± 1.9	-	57.9 ± 4.0	42.1 ± 4.0	-	51.3 ± 3.0	48.7 ± 3.0	-
400	40	48.0 ± 3.2	52.0 ± 3.2	-	44.0 ± 2.9	56.0 ± 2.9	-	35.3 ± 2.3	64.7 ± 2.3	-
	60	35.6 ± 3.5	64.4 ± 3.5	-	26.1 ± 2.7	73.9 ± 2.7	-	12.9 ± 2.0	86.8 ± 2.5	0.3 ± 0.4
	120	18.0 ± 3.6	82.0 ± 3.6	-	3.0 ± 0.8	94.2 ± 0.4	2.7 ± 0.4	0.0 ± 0.0	91.4 ± 0.1	8.6 ± 0.1
	180	10.9 ± 3.1	88.3 ± 2.8	0.8 ± 0.3	0.0 ± 0.0	92.3 ± 1.0	7.7 ± 1.0	0.0 ± 0.0	76.6 ± 2.9	23.4 ± 2.9
	300	4.8 ± 2.0	93.7 ± 1.3	1.6 ± 0.7	0.0 ± 0.0	77.6 ± 2.6	22.4 ± 2.6	n. d.*	n. d.*	n. d.*
	0	95.3 ± 0.2	4.7 ± 0.2	-	95.7 ± 0.1	4.3 ± 0.1	-	95.1 ± 0.3	4.9 ± 0.3	-
	10	74.2 ± 2.0	25.8 ± 2.0	-	79.9 ± 0.3	20.1 ± 0.3	-	80.6 ± 1.6	19.4 ± 1.6	-
	20	57.4 ± 1.3	42.6 ± 1.3	-	64.4 ± 0.4	35.6 ± 0.4	-	62.3 ± 3.2	37.7 ± 3.2	-
	30	47.0 ± 2.2	53.0 ± 2.2	-	51.1 ± 0.7	48.9 ± 0.7	-	43.7 ± 2.9	56.3 ± 2.9	-
500	40	38.0 ± 3.6	62.0 ± 3.6	-	37.8 ± 2.4	62.2 ± 2.4	-	27.7 ± 2.3	72.3 ± 2.3	-
	60	25.3 ± 4.1	74.7 ± 4.1	-	18.0 ± 2.3	81.6 ± 2.1	0.4 ± 0.5	8.6 ± 1.5	90.1 ± 1.3	1.2 ± 0.3
	120	9.9 ± 3.6	89.0 ± 3.2	1.0 ± 0.4	0.5 ± 0.8	95.2 ± 0.3	4.3 ± 0.4	0.0 ± 0.0	86.7 ± 1.2	13.3 ± 1.2
	180	4.6 ± 2.6	93.2 ± 1.5	2.2 ± 1.1	0.0 ± 0.0	88.3 ± 1.2	11.7 ± 1.2	0.0 ± 0.0	67.3 ± 1.4	32.7 ± 1.4
	300	2.0 ± 2.0	92.7 ± 1.0	5.3 ± 3.0	0.0 ± 0.0	71.7 ± 2.1	28.3 ± 2.1	n. d.*	n. d.*	n. d.*

*n. d. means cannot determine.

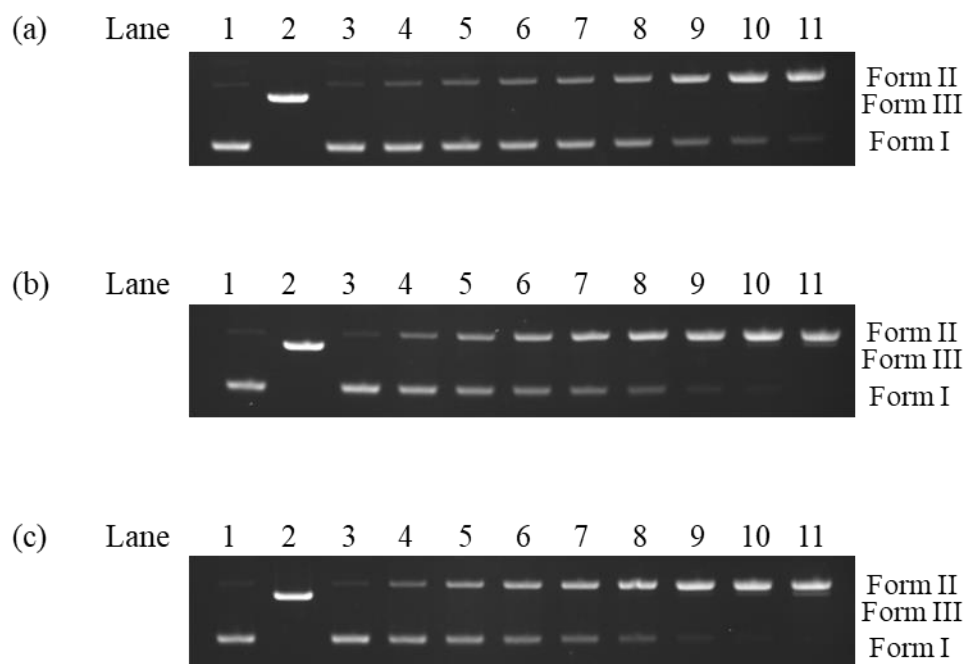


Figure S3-3. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of **4** (50 μ M) and H₂O₂ (500 μ M) at pH 6.0. (a)–(c) corresponded to KI, NaN₃, and DMSO, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lane 3–11: corresponding to the time of 0, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min, respectively.

Table S3-3. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 4 (50 μ M) in the presence of inhibitor at pH 6.0

Inhibitor	Conc. (μ M)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
KI	500	0	95.4 \pm 0.2	4.6 \pm 0.2	-
		10	85.7 \pm 1.8	14.3 \pm 1.8	-
		20	78.0 \pm 2.0	22.0 \pm 2.0	-
		30	70.4 \pm 2.7	29.6 \pm 2.7	-
		40	62.5 \pm 3.7	37.5 \pm 3.7	-
		60	50.0 \pm 2.3	50.0 \pm 2.3	-
		120	27.0 \pm 1.7	73.0 \pm 1.7	-
		180	16.0 \pm 0.5	84.0 \pm 0.5	-
		300	5.7 \pm 0.1	93.5 \pm 0.2	0.8 \pm 0.3
NaN ₃	500	0	95.0 \pm 0.2	5.0 \pm 0.2	-
		10	74.5 \pm 0.1	25.5 \pm 0.1	-
		20	54.2 \pm 0.4	45.8 \pm 0.4	-
		30	40.6 \pm 0.8	59.4 \pm 0.8	-
		40	30.0 \pm 0.7	70.0 \pm 0.7	-
		60	18.6 \pm 0.9	81.4 \pm 0.9	-
		120	4.5 \pm 0.4	93.8 \pm 0.4	1.7 \pm 0.0
		180	1.5 \pm 0.3	95.6 \pm 0.2	3.0 \pm 0.1
		300	0.0 \pm 0.0	93.3 \pm 0.8	6.7 \pm 0.8
DMSO	500	0	95.1 \pm 0.1	4.9 \pm 0.1	-
		10	74.5 \pm 1.5	25.5 \pm 1.5	-
		20	56.5 \pm 2.4	43.5 \pm 2.4	-
		30	41.7 \pm 3.2	58.3 \pm 3.2	-
		40	33.1 \pm 3.7	66.9 \pm 3.7	-
		60	20.2 \pm 3.4	79.8 \pm 3.4	-
		120	5.2 \pm 1.6	92.8 \pm 1.3	2.0 \pm 0.3
		180	2.0 \pm 0.7	95.0 \pm 0.1	3.0 \pm 0.5
		300	0.0 \pm 0.0	93.3 \pm 1.0	6.7 \pm 1.0

第四章：p-cresol-2,6-bis(dpa) amide-tether 配位子の二核銅(II)錯体により大きく向上された DNA 酸化切断，細胞毒性，及び細胞内可視化による細胞毒性発現の推定機構

4-1. 要約

第三章では，ペンダント基として N4 型大環状アミン cyclen を amide-tether で導入した配位子 Hbcamide (2,6-bis(1,4,7,10-tetraazacyclododecyl-1-carboxamide)-p-cresol) の二核銅(II)錯体 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{bcamide})]^{2+}$ (**4**) は対応する methylene-tether の錯体に比べて DNA 酸化切断活性と細胞毒性が大きく向上することを見出した。しかし，**4** の細胞毒性は，臨床利用されている抗がん剤と比較して低く，実用の観点から問題があった。本研究では DNA 酸化切断活性と細胞毒性の向上を目指し，ペンダント基として di(2-pyridylmethyl)amine (dpa) 三座配位子をもつ新規配位子 HL1^{4H} (2,6-bis[N,N-di(2-pyridylmethylcarboxyamido)]-p-cresol) を合成した。また，その二核銅(II)錯体 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH}_2)(\mu\text{-1,3-OAc})(\text{L1}^{4\text{H}})](\text{ClO}_4)_2$ (**6**)， $[\text{Cu}_2(\mu\text{-1,1-OAc})(\mu\text{-1,3-OAc})(\text{L1}^{4\text{H}})]\text{X}$ [X = ClO₄ (**7a**) and OAc (**7b**)] を合成し，単結晶 X 線構造解析や様々な分光学的測定によって構造を決定した。**7b** は，中性付近の pH で過酸化水素を活性化してスーパーコイルドプラスミド DNA の酸化切断を大きく加速するとともに，がん細胞に対して高い細胞毒性を示した。これらは，**4** や methylene-tether で dpa を導入した配位子 Hbpmp (2,6-bis[di(2-pyridylmethylaminomethyl)]-p-cresol) の二核銅(II)錯体 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{bpmp})]^{2+}$ (**8**) に比べて高活性であった。また **7b** の細胞毒性は配位子 HL1^{4H} の細胞毒性よりも高いため，**7b** の構造が細胞内において保持されていることが示唆された。さらに，細胞内挙動を可視化するため，**7b** を boron dipyrromethene (Bodipy) で修飾した新規二核銅(II)錯体 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OAc})_2(\text{L2}^{4\text{H}})](\text{OAc})$ (**9**) を合成し，その細胞内挙動を共焦点顕微鏡で観察した。その結果，**9** は核小体やミトコンドリアに局在することが明らかになった。comet assay の結果から，**7b** は核 DNA を切断していないことが確認された。フローサイトメトリーの測定から，**7b** は HeLa 細胞をアポトーシスで細胞死に導くことが示された。これらの結果から，**7b** は細胞内で核小体やミトコンドリアに局在すると推定され，それぞれの RNA や DNA を切断してアポトーシスを誘導したと考えられる。さらに，**7b** 存在下の正常細胞とがん細胞の MTT assay で決定された IC₅₀ 値の比較から，**7b** はがん細胞選択的に細胞死を導くことが見出された。

Yuki Kadoya, Machi Hata, Yoshiki Tanaka, Atsuhiko Hirohata, Yutaka Hitomi, and Masahito Kodera “Dicopper(II) Complexes of p-Cresol-2,6-Bis(dpa) Amide-Tether Ligands: Large Enhancement of Oxidative DNA Cleavage, Cytotoxicity, and Mechanistic Insight by Intracellular Visualization” *Inorg. Chem.*, in press.

4-2. 緒言

シスプラチンをはじめとする様々な白金(II)錯体^[1]やブレオマイシン^[2]は、DNA との結合や、その切断により、複製を妨げる細胞障害性の抗がん剤であり、様々ながんに適用される。しかしながら、これらはがん細胞と正常細胞に対して同様に作用して選択性を示さないため、深刻な副作用を伴う^[3]。そこで、副作用を軽減させるために、がん細胞を選択的に細胞死に導く抗がん剤の開発が必要である。

がん細胞内の特異環境として、過酸化水素濃度が正常細胞内と比較して高いことが知られている^[4]。これは、がん細胞内のミトコンドリアの機能不全及び代謝活性の増加に起因する^[5,6]。そのため、過酸化水素を活性化して酸化的 DNA 切断を加速する金属錯体は、がん細胞特異的に細胞毒性を発現する可能性がある。

第三章で述べたように、我々は *p*-cresol-2,6-bis(cyclen) amide-tether 配位子(Hbcamide)の二核銅(II)錯体[Cu₂(μ-OH)(bcamide)]²⁺ (**4**)が過酸化水素と反応して μ-1,1-O₂H species を生成し、これが DNA を酸化切断する能力があることを報告した^[7]。しかしながら、**4**のHeLa細胞に対するIC₅₀値は1740 μMと高く、抗がん剤としての実用の観点から問題がある。そこで、本章では二核銅(II)錯体の活性を向上させるために新たな配位子の開発を目指した。

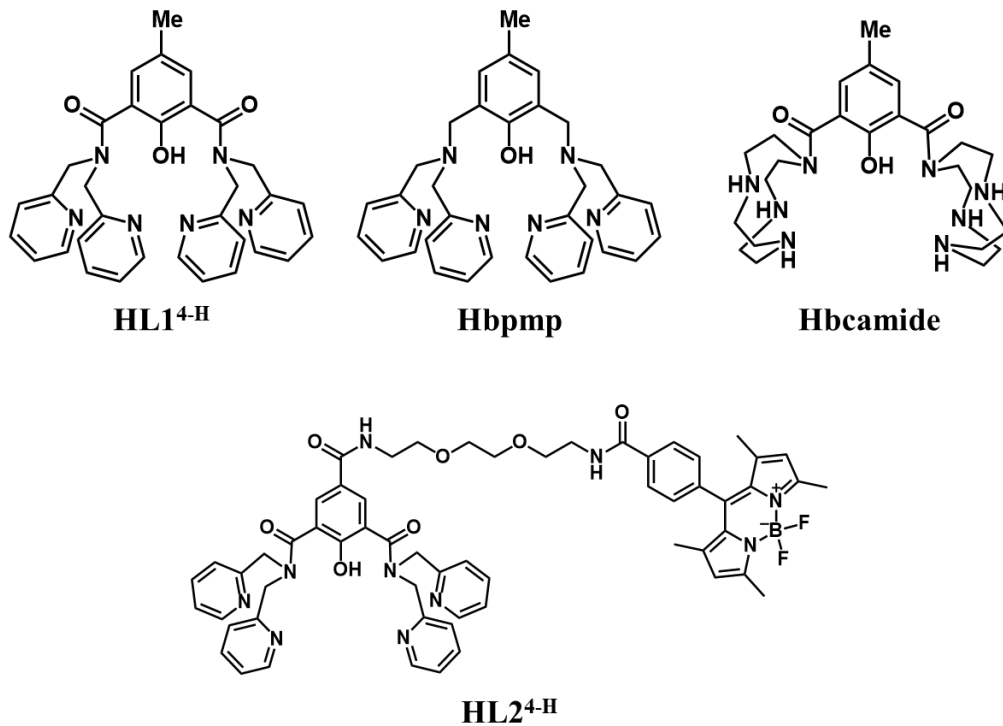
Di(2-pyridylmethyl)amide (dpa)は、安定な金属錯体を与える三座キレート配位子として生物無機化学分野で広く用いられている^[8]。例えば、*p*-cresol-2,6-bis(dpa) methylene-tether 配位子(Hbpmp)の二核銅錯体[Cu₂(μ-OH)(bpmp)]²⁺ (**8**)は、生体内に存在する金属酵素の活性中心を模倣したモデル錯体として、様々な報告例がある^[9]。また、関連する配位子の二核銅錯体と過酸化水素の反応で μ-1,1-O₂H を生成することが報告されている^[10,11]。

従って、amide-tether で dpa をペンダント基として導入した二核銅(II)錯体は、過酸化水素を活性化する能力が高いと期待される。そこで、本章の研究では amide-tether と dpa を持つ *p*-cresol-2,6-bis(dpa) amide-tether 配位子(HL1^{4H})を新たに設計・合成した。HL1^{4H}は二核銅(II)錯体 [Cu₂(μ-OH₂)(μ-1,3-OAc)(L1^{4H})](ClO₄)₂ (**6**), [Cu₂(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L1^{4H})]X [X = ClO₄ (**7a**) and OAc (**7b**)]を形成した。これらの錯体は単結晶 X 線構造解析及び分光学的測定によって構造を決定した。**7b**は、過酸化水素を酸化剤とする DNA の酸化切断において **4**, **8** のそれぞれと比較して 24 及び 72 倍高い活性を示し、HeLa 細胞に対しては 24 及び 8 倍高い細胞毒性を示すことが明らかになった。また **7b** は、配位子 HL1^{4H} に比べて細胞毒性が 7 倍高く、正常細胞よりもがん細胞に対して高い細胞毒性を示した。

さらに **7b** の細胞内での作用機序を明らかにすることを目的として、細胞内可視化を試みた。boron dipyrromethene (Bodipy)は、周囲の環境に依存することなく高い量子収率を示すことから、細胞内挙動を調べる蛍光プローブとして有用である^[12]。そこで、Bodipy で修飾した新規二核化配位子 HL2^{4H} の新規二核銅(II)錯体 **9** を合成した。**9** を用いた細胞内可視化実験は、**7b** の細胞内挙動を明らかにし、その機構の知見を与えた。Chart 4-

1 に、本章で言及する配位子の構造を示す。

Chart 4-1. Chemical structures of HL1^{4-H}, HL2^{4-H}, Hbpmp, and Hbcamide

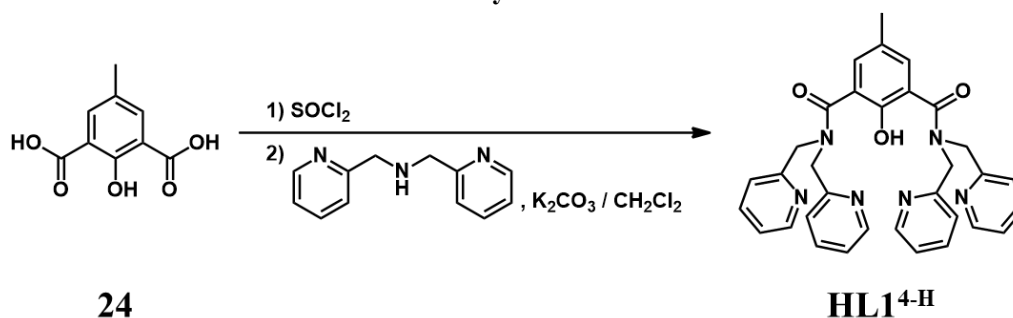


4-3. 結果と考察

4-3-1. 配位子及び二核銅(II)錯体の合成

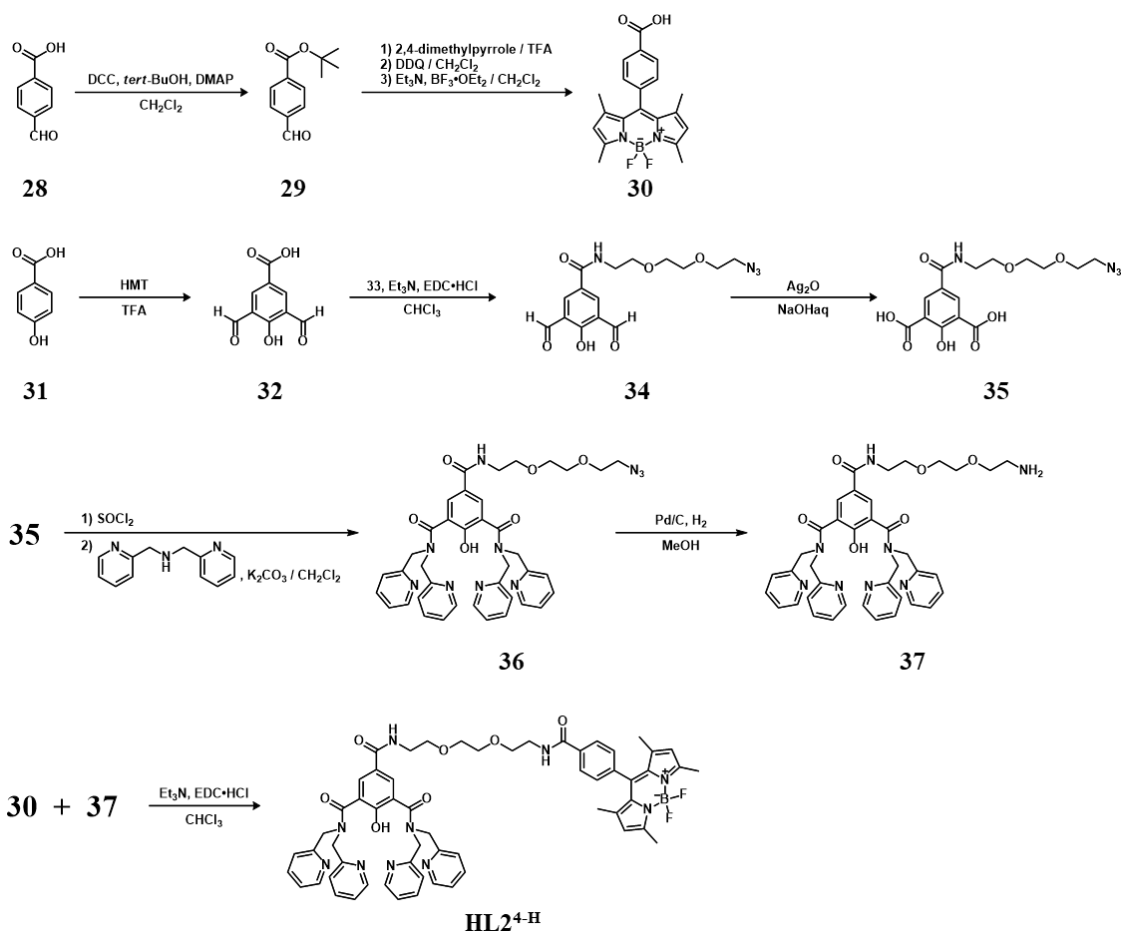
HL1^{4H} 及び HL2^{4H} の合成経路を、それぞれ Scheme 4-1, 4-2 に示す. HL1^{4H}, HL2^{4H}, **6**, **7a**, **7b** 及び **9** の詳細な合成項及び分光学的特徴は本章第 5 節に記載する. 4-methylphenol-2,6-dicarboxylic acid (**24**), 1-amino-8-azido-3,6-dioxaoctane (**33**), Hbpmp, Hbcamide, **4** 及び **8** は、文献^[7,13-14]に従って合成した. HL1^{4H} は、**24** と SOCl₂ との反応で酸クロライドに変換した後、di(2-pyridylmethyl)amine (dpa) と反応させて合成した. その際、酸クロリドは精製せずにそのまま次の反応に用いた. また、酸クロリドと dpa との反応では K₂CO₃ を塩基として用いた. このとき、塩基として Et₃N を用いると収率が著しく減少した. HL1^{4H} と Cu(OAc)₂ の反応を水中で行うと、μ-OH₂-μ-OAc 架橋を有する [Cu₂(μ-OH₂)(μ-1,3-OAc)(L1^{4H})](ClO₄)₂ (**6**) が生成し、MeCN 中では (μ-OAc)₂ 架橋を有する [Cu₂(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L1^{4H})]X [X = ClO₄ (**7a**) and OAc (**7b**)] が生成した. **6** 及び **7a** は単結晶 X 線構造解析に適した結晶が得られ、結晶構造を決定した. その詳細については後述する.

Scheme 4-1. Synthesis of HL1^{4H}



HL2^{4H} は HL1^{4H} と Bodipy を PEG-amide tether をリンカーでつないだ配位子であり、その合成経路を Scheme 4-2 に示す^[15]. HL2^{4H} は MeCN 中、Cu(OAc)₂ と反応して二核銅(II)錯体 [Cu₂(μ-OAc)₂(L2^{4H})](OAc) (**9**) を生成した. **9** の構造は分光学的測定によって明らかにした(本章第 5 節参照).

Scheme 4-2. Synthesis of HL2^{4-H}



4-3-2. 6, 7a 及び 7b の構造

二核銅(II)錯体 **6** と **7a** の構造は、単結晶 X 線構造解析によって決定した。Figure 4-1 に **6** と **7a** の ORTEP 図、Table 4-1 に結晶構造の詳細、Table 4-2 に二核銅周辺の結合距離と結合角を示す。**6** では、2 つの銅(II)イオンが L1^{4-H} に組み込まれ、内因性の $\mu\text{-OPh}$ 及び外因性の $\mu\text{-OH}_2$ と $\mu\text{-1,3-OAc}$ で架橋された構造を取っている。**6** の銅(II)イオン周りの幾何学構造は、結合角から算出した τ 値によって決定した。 τ 値が 0 であれば四角錐構造、1 であれば三方両錐構造であると決定できる^[16]。**6** の τ 値は $\tau_{\text{Cu}(1)} = 0.250$, $\tau_{\text{Cu}(2)} = 0.308$ であるため、それぞれの銅(II)イオンは dpa の 2 つの窒素原子と $\mu\text{-OPh}$ - $\mu\text{-OH}_2$ - $\mu\text{-1,3-OAc}$ 架橋の 3 つの酸素原子によって配位された四角錐構造を取ることが明らかになった。**7a** の τ 値は $\tau_{\text{Cu}(1)} = 0.378$, $\tau_{\text{Cu}(2)} = 0.471$ であるため、**6** と **7a** の結晶構造は類似しているが、**7a** では **6** の $\mu\text{-OH}_2$ 架橋が $\mu\text{-1,1-OAc}$ 架橋に置き換わっている。結晶構造のデータより、それぞれの Cu-O 間距離を比較した。**6** の Cu と $\mu\text{-OH}_2$ 架橋の酸素原子との結合距離はそれぞれ 2.3410(19), 2.376(2) Å, また **7a** の Cu と $\mu\text{-1,1-OAc}$ 架橋の酸素原子との結合距離はそれぞれ 2.210(4), 2.122(4) Å であった。これらの値は、**6** と **7a** における

Cu と μ -1,3-OAc 架橋の酸素原子との結合距離である 1.9244(18)–1.962(4) Å と比較して長い. このように結合距離が長いことが μ -OH₂ と μ -1,1-OAc が互いに置換しやすい理由であると考えられる.

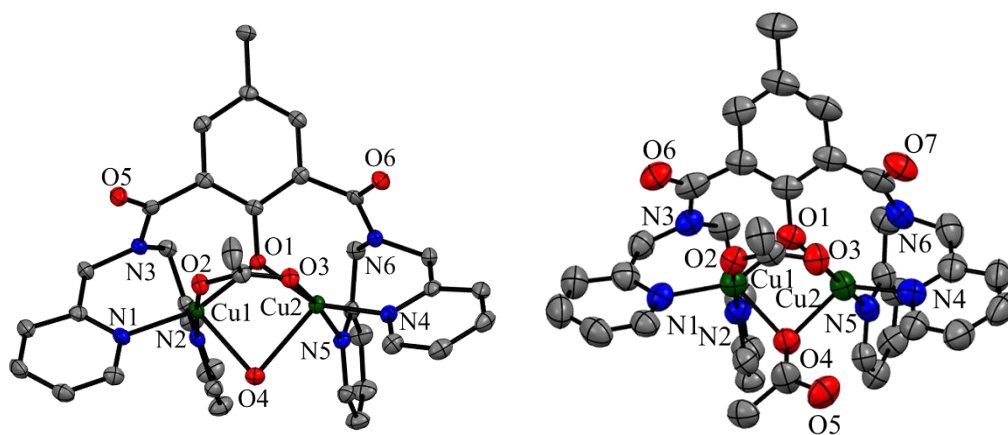


Figure 4-1. ORTEP diagrams of cationic part of **6** (left) and **7a** (right), respectively. Hydrogen atoms and disordered atoms are omitted for clarity.

Table 4-1. Crystallographic data for 6 and 7a

complex	6	7a
Empirical formula	C ₃₅ H ₃₂ Cl ₂ Cu ₂ N ₆ O _{19.39}	C ₃₉ H ₃₈ ClCu ₂ N ₇ O ₁₁
Formula weight	1053.88	939.26
Temperature (K)	93.0	113(2)
Wavelength	CuK α (1.54187 Å)	CuK α (1.54187 Å)
Crystal system	Triclinic	Trigonal
Crystal size (mm ³)	0.3 × 0.2 × 0.2	1.13 × 0.135 × 0.12
Space group	P-1	R-3
a (Å)	11.0304(4)	43.604(6)
b (Å)	11.4189(4)	43.604(6)
c (Å)	18.1207(6)	12.7631(9)
α (deg)	74.470(5)	90
β (deg)	89.129(6)	90
γ (deg)	77.342(5)	120
Volume (Å ³)	2143.32(14)	21016(6)
Z value	2	18
Density (calculated)	1.633 g/cm ³	1.336 g/cm ³
Absorption coefficient	3.128 mm ⁻¹	2.164 mm ⁻¹
F(000)	1080.0	8640.0
R1 ^a , wR2 ^b)	0.0426, 0.1109	0.0749, 0.1937
GOF index	1.035	1.068

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

Table 4-2. Selected bond distances (Å) and angles (deg) for 6 and 7a

6	7a
Cu(1) ••• Cu(2) : 3.0366(6)	Cu(1) ••• Cu(2) : 3.0239(12)
Cu(1) – N(1) : 2.012(2)	Cu(1) – N(1) : 2.014(5)
Cu(1) – N(2) : 2.045(2)	Cu(1) – N(2) : 2.041(5)
Cu(2) – N(4) : 2.007(2)	Cu(2) – N(4) : 2.066(5)
Cu(2) – N(5) : 1.997(2)	Cu(2) – N(5) : 1.976(5)
Cu(1) – O(1) : 1.9885(19)	Cu(1) – O(1) : 2.020(4)
Cu(1) – O(2) : 1.9591(18)	Cu(1) – O(2) : 1.962(4)
Cu(1) – O(4) : 2.3410(19)	Cu(1) – O(4) : 2.210(4)
Cu(2) – O(1) : 2.0456(18)	Cu(2) – O(1) : 2.166(4)
Cu(2) – O(3) : 1.9244(18)	Cu(2) – O(3) : 1.936(4)
Cu(2) – O(4) : 2.376(2)	Cu(2) – O(4) : 2.122(4)
Cu(1) – O(1) – Cu(2) : 97.64(8)	Cu(1) – O(1) – Cu(2) : 92.42(15)
Cu(1) – O(4) – Cu(2) : 80.15(6)	Cu(1) – O(4) – Cu(2) : 88.49(14)
O(1) – Cu(1) – O(2) : 89.36(8)	O(1) – Cu(1) – O(2) : 88.37(16)
O(1) – Cu(1) – O(4) : 91.43(7)	O(1) – Cu(1) – O(4) : 88.95(15)
O(2) – Cu(1) – O(4) : 82.74(7)	O(2) – Cu(1) – O(4) : 86.54(15)
O(1) – Cu(1) – N(1) : 161.53(9)	O(1) – Cu(1) – N(1) : 152.06(19)
O(1) – Cu(1) – N(2) : 88.87(8)	O(1) – Cu(1) – N(2) : 90.94(17)
O(2) – Cu(1) – N(1) : 88.33(9)	O(2) – Cu(1) – N(1) : 87.23(18)
O(2) – Cu(1) – N(2) : 176.50(9)	O(2) – Cu(1) – N(2) : 174.74(17)
O(4) – Cu(1) – N(1) : 106.43(8)	O(4) – Cu(1) – N(1) : 118.27(18)
O(4) – Cu(1) – N(2) : 94.29(8)	O(4) – Cu(1) – N(2) : 88.23(16)
N(1) – Cu(1) – N(2) : 94.30(9)	N(1) – Cu(1) – N(2) : 95.78(19)
O(1) – Cu(2) – O(3) : 89.10(8)	O(1) – Cu(2) – O(3) : 87.08(15)
O(1) – Cu(2) – O(4) : 89.05(7)	O(1) – Cu(2) – O(4) : 87.54(15)
O(3) – Cu(2) – O(4) : 85.24(8)	O(3) – Cu(2) – O(4) : 90.26(16)
O(1) – Cu(2) – N(4) : 155.07(9)	O(1) – Cu(2) – N(4) : 147.07(18)
O(1) – Cu(2) – N(5) : 93.60(8)	O(1) – Cu(2) – N(5) : 88.31(17)
O(3) – Cu(2) – N(4) : 88.15(9)	O(3) – Cu(2) – N(4) : 89.41(18)
O(3) – Cu(2) – N(5) : 173.54(9)	O(3) – Cu(2) – N(5) : 175.30(19)
O(4) – Cu(2) – N(4) : 115.37(8)	O(4) – Cu(2) – N(4) : 125.23(18)
O(4) – Cu(2) – N(5) : 88.93(8)	O(4) – Cu(2) – N(5) : 90.50(17)
N(4) – Cu(2) – N(5) : 91.84(9)	N(4) – Cu(2) – N(5) : 93.9(2)
$\tau\text{Cu}(1) = 0.250$, $\tau\text{Cu}(2) = 0.308$	$\tau\text{Cu}(1) = 0.378$, $\tau\text{Cu}(2) = 0.471$

6 と **7a** は水に難溶なため、DNA 切断実験及び細胞毒性の評価には **7b** を用いた。水溶液中の **7b** の構造は分光学的測定によって明らかにした。水中における **7b** (0.5 mM) の電子スペクトルは、320 ($\epsilon = 4000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 441 nm ($\epsilon = 500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) に、それぞれ Cu(II)-OAc/-Oph の LMCT に帰属できる吸収バンド^[17,18]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 336 ($\epsilon = 4200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 448 nm ($\epsilon = 500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) にシフトした(Figure 4-2)。一方、MeCN 中で電子スペクトルを測定すると、322 ($\epsilon = 5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 457 nm ($\epsilon = 500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) に吸収バンドが現れ、これらは希釈してもシフトしなかった(Figure 4-3)。 **7b** の ESIMS スペクトルは、MeCN 中と水中では異なる質量ピークを与え、MeCN 中では $[\text{L1}^{4\text{H}} + 2\text{Cu(II)} + 2\text{OAc}]^+$ に相当する質量ピークを m/z : 801.12 に与え、水中では、 $[\text{L1}^{4\text{H}} + 2\text{Cu(II)} + \text{OH} + \text{OAc}]^+$ に相当する質量ピークが m/z : 759.11 に現れた(Figure 4-4, 4-5)。これらの事実は、 **7b** の μ -1,1-OAc 架橋は水中で μ -OH₂ 架橋に置き換わる置換活性部位であることを示している。これは、 **6**, **7a** の結晶構造で示された様に μ -OH₂ と μ -1,1-OAc が互いに置換しやすいこととよく一致している。従って、過酸化水素との反応では、この置換活性部位で容易に μ -1,1-O₂H が形成されると推測される。

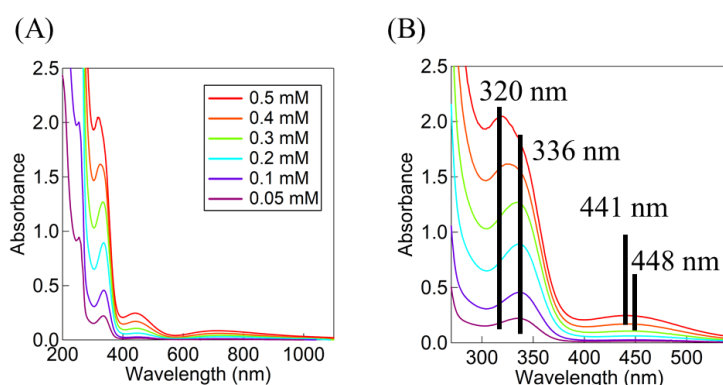


Figure 4-2. (A) Electronic absorption spectra of **7b** (0.05–0.5 mM) in H₂O. (B) An enlarged view of the graph of (A).

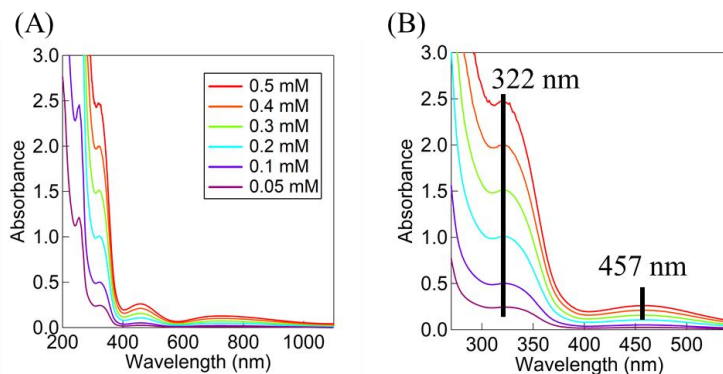


Figure 4-3. (A) Electronic absorption spectra of **7b** (0.05–0.5 mM) in MeCN. (B) An enlarged view of the graph of (A)

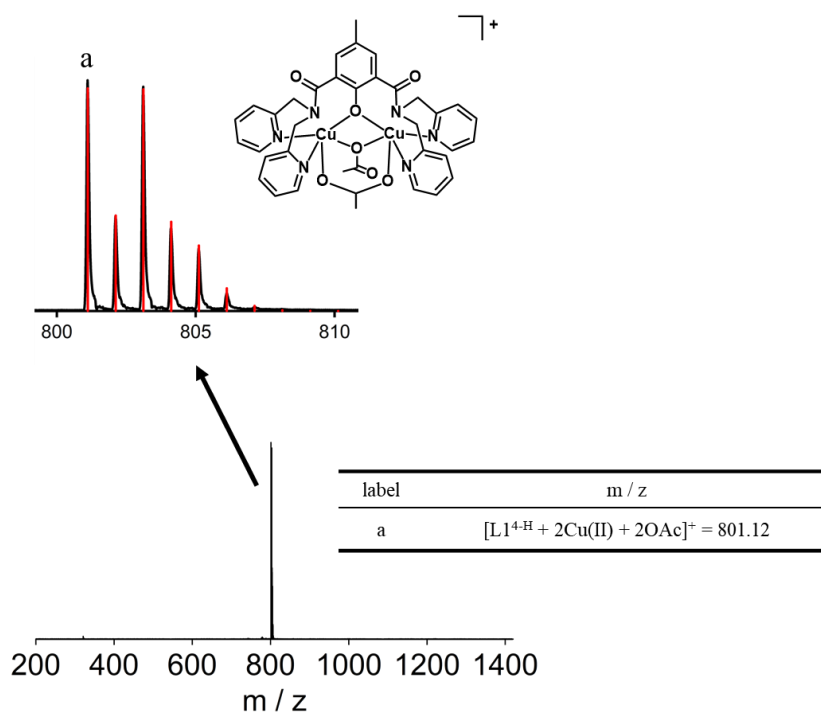


Figure 4-4. ESI MS spectrum of complex **7b** measured in MeCN at room temperature at orifice 1: 10 V, orifice 2: 10 V, ring lens voltage: 10 V.

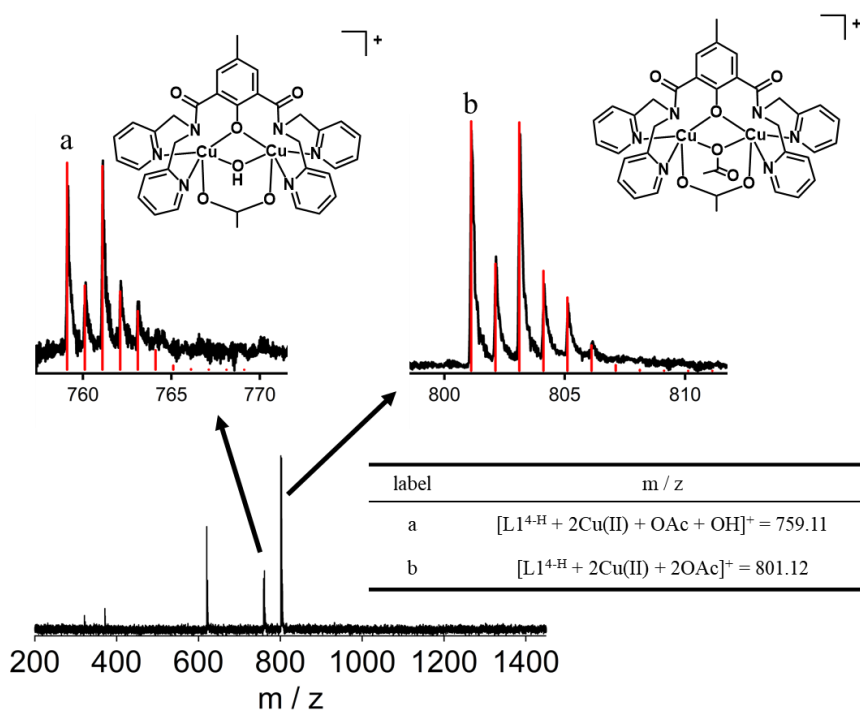


Figure 4-5. CSI MS spectrum of complex **7b** measured in H₂O at 0°C at orifice 1: 0 V, orifice 2: 5 V, ring lens voltage: 10 V.

4-3-3. DNA 切断活性評価

4, **7b** 及び **8** の DNA 酸化切断実験では、スーパーコイルドプラスミド pUC19 DNA (Form I) を基質として用いた。DNA の酸化切断で生じる Form II, III の生成量はアガロースゲル電気泳動法によって分析・定量した。Form I, II, III は、それぞれスーパーコイル状、1 本鎖切断の環状、2 本鎖切断の直線状 DNA である^[9]。

pH 6.0, 37°C における **7b** (0–30 μM) と過酸化水素(0–50 μM) の反応による DNA 切断実験の結果を Figure 4-6, 4-7 に示す。また、これらの実験におけるゲル写真及びその詳細なデータを Figure S4-1, S4-2 及び Table S4-1, S4-2 に示す。**7b** は、少量の過酸化水素存在下で Form I の Form II, III への切断を大きく加速した。しかし、過酸化水素非存在下では DNA は全く切断されなかった。

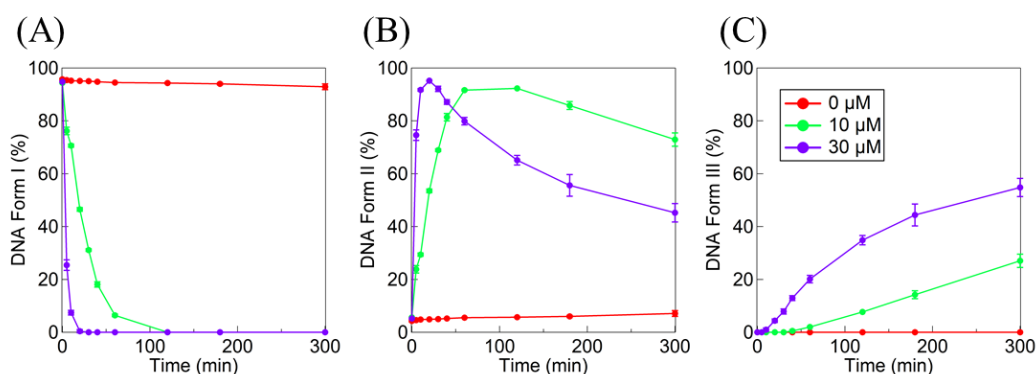


Figure 4-6. Complex concentration-dependent profile for DNA cleavage promoted by **7b**. Time courses for the decrease of % of Form I (A), increase of % of Form II (B), and Form III (C) at pH 6.0. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [pUC19 DNA] = 50 μM bp, [complex] = 0–30 μM , [H_2O_2] = 50 μM , [$\text{Cu}(\text{OAc})_2$] = 70 μM at 37°C for 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min. Experiments were carried out at least three times.

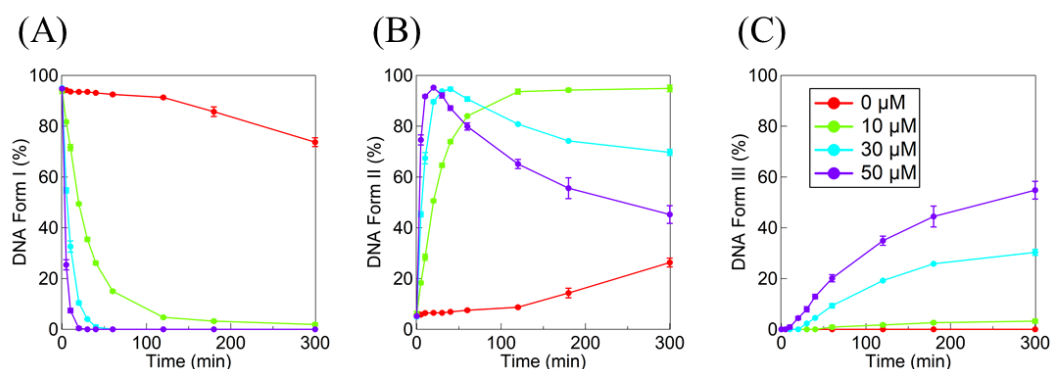


Figure 4-7. H_2O_2 concentration-dependent profile for DNA cleavage promoted by **7b**. Time courses for the decrease of % of Form I (A), increase of % of Form II (B), and Form III (C) at pH 6.0. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [pUC19 DNA] = 50 μM bp, [complex] = 30 μM , [H_2O_2] = 0–50 μM , [$\text{Cu}(\text{OAc})_2$] = 70 μM at 37°C for 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min. Experiments were carried out at least three times.

DNA 切断の反応速度は、**7b** 及び過酸化水素濃度が増加するにつれて加速された。Form I の減少速度は擬一次反応に従った。擬一次反応速度定数は **7b** 及び過酸化水素の濃度に比例して増加したが、**7b** と過酸化水素濃度に対してわずかに 2 次の依存性を示した (Figure 4-8, 4-9)。これは、**7b** が過酸化水素と反応して、主に二核銅パーオキシ錯体が生成するが、これよりも活性の高い四核銅パーオキシ錯体が少量だけ生成することを示唆している。

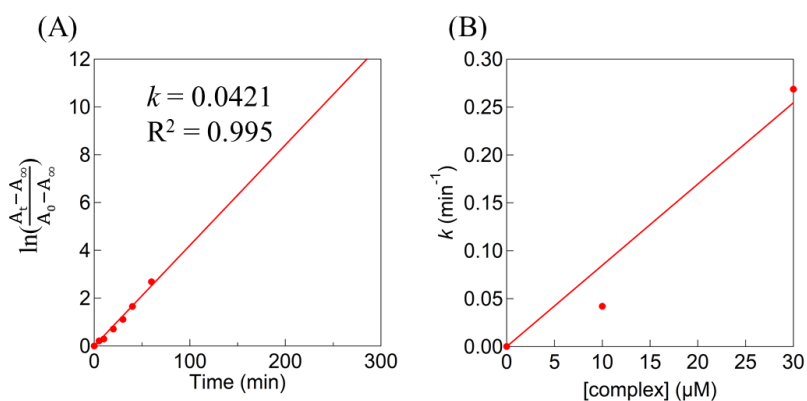


Figure 4-8. (A) A pseudo-first-order plot for the decrease of % of Form I in the reaction with **7b** (10 μM) in the presence of H_2O_2 (50 μM). (B) A plot of the pseudo-first-order constant vs concentration of **7b** (0–30 μM).

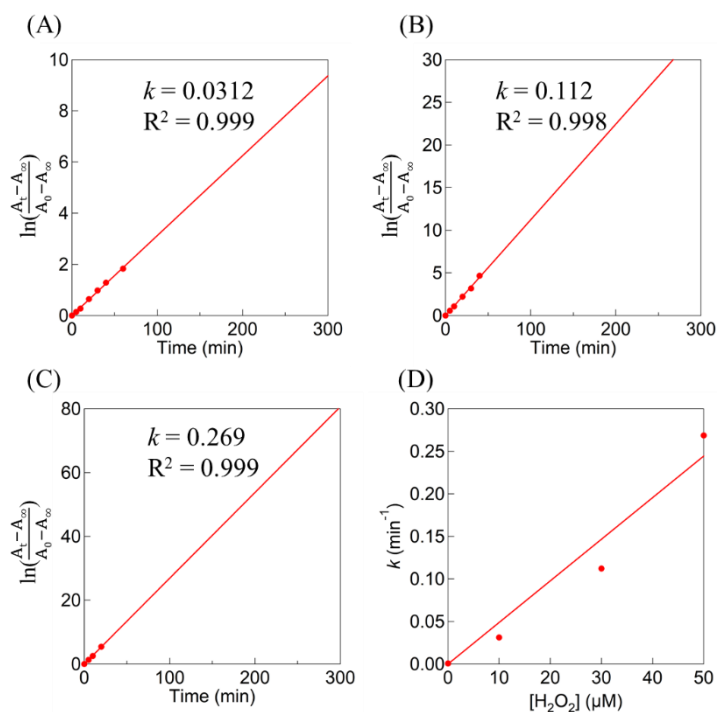


Figure 4-9. Pseudo-first-order plots for the decrease of % of Form I in the reactions with **7b** (10 μM) in the presence of H_2O_2 ((A) 10 μM , (B) 30 μM , and (C) 50 μM). (D) A plot of the pseudo-first-order constant vs concentration of H_2O_2 (0–50 μM).

pH 6.0, 7.4 における, **4**, **7b** 及び **8** (30 μM) による過酸化水素(50 μM)存在下での DNA 酸化切断実験の結果を Figure 4-10 に示す. また, この条件下での **4**, **8** の DNA 切断実験結果, ゲル写真及び詳細なデータを Figure S4-3, S4-4 及び Table S4-3 に示す. **7b** (blue), **4** (green) 及び **8** (yellow) 存在下では Form I の減衰が大きく加速された. しかし, 錯体非存在下(red)では DNA の切断は観測されなかった. Figure 4-10 から Form I の半減期を算出すると, **7b**, **4** 及び **8** で, それぞれ 2.5, 60, 180 分であることがわかった. 従って, **7b** の DNA 酸化切断活性は, **4**, **8** と比較してそれぞれ 24, 72 倍高いことが見出された. さらに, Form III の生成割合では, これらの錯体で大きな違いが見られた(Figure 4-10(B)). pH 6.0 における 120 分間の反応で, **7b**, **4** 及び **8** による Form III の生成割合は, それぞれ 35, 1, 0%であった. この様に **7b** は DNA 酸化切断活性が最も高く, amide-tether と dpa を有する HL1^{4H} 配位子は **7b** の活性を大きく向上させたと言える. Figure 4-10(B, purple) に示しているように, **7b** の Form III の生成割合は pH 7.4 でさらに加速され, 30 分間の反応で 40%の Form III が生成した. Figure 4-11 には, この pH 依存性について Form I の減衰, Form II の増加と減衰, Form III の増加の時間経過を合わせて示した. これらの結果は, **7b** と過酸化水素が反応することによって生成する活性種は, 高い pH 領域で脱プロトン化されて生成が加速されることを示唆している. この実験のゲル写真及び詳細なデータを Figure S4-5 及び Table S4-4 に示す.

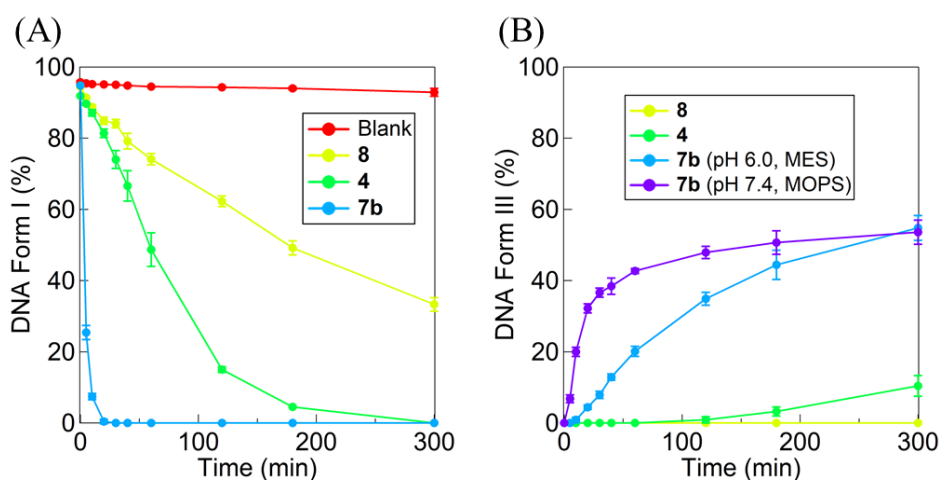


Figure 4-10. Time courses for decrease of percent of Form I (A) and increase of percent of Form III (B) upon reaction of pUC19 DNA (50 μM bp) with **7b** (blue), **4** (green), **8** (yellow) (30 μM), and no complex (red) in the presence of H_2O_2 (50 μM), NaCl (10 mM), and $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (70 μM) at pH 6.0 (MES 10 mM) at 37°C. Purple line in (B) is the reaction with **7b** at pH 7.4 (MOPS 10 mM). The reactions were analyzed at 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min.

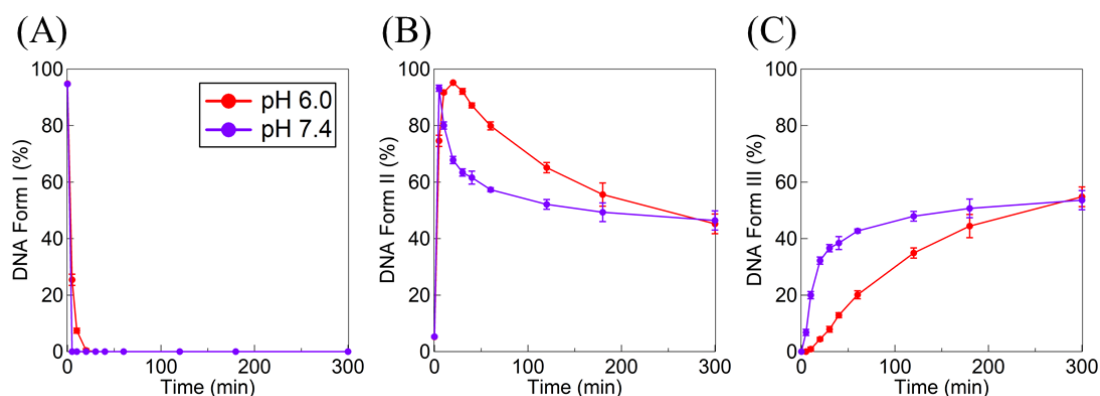


Figure 4-11. pH-dependent profile for DNA cleavage promoted by **7b**. Time courses for the decrease of % of Form I (A), increase of % of Form II (B), and Form III (C) at pH 6.0 and 7.4. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES) and 7.4 (MOPS)), [pUC19 DNA] = 50 μ M bp, [complex] = 30 μ M, [H₂O₂] = 50 μ M, [Cu(OAc)₂] = 70 μ M at 37°C for 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min. Experiments were carried out at least three times.

4-3-4. 酸化的 DNA 切断阻害実験

7b の酸化的 DNA 切断実験を、過酸化水素阻害剤である KI^[20,21]存在下及びヒドロキシラジカル阻害剤である DMSO^[20,22]存在下で行った(Figure 4-12, 4-13). この実験のゲル写真及び詳細なデータを Figure S4-6 及び Table S4-5 に示す. DMSO (1.0, 5.0, 10 mM)存在下における反応では、Form I の減衰と Form III の増加に対して阻害効果は認められなかったため、**7b** の DNA 酸化切断にヒドロキシラジカルは関与していないことが明らかになった. 一方、大過剰の KI (5.0 and 10 mM)存在下では Form III の生成は阻害され、Form I の減衰は阻害されなかった. これは、KI により比較的ゆっくりと過酸化水素が還元分解されて濃度が低下するために、初期の速い反応である Form I の減衰は阻害されず、その後起こる遅い反応である Form III の生成だけが阻害されたと考えられる. これらの結果は、ヒドロキシラジカル及び過酸化水素は酸化的 DNA 切断の直接的な活性種ではなく、錯体由来の二核銅パーオキシ錯体などの活性種が生成していることを示唆している.

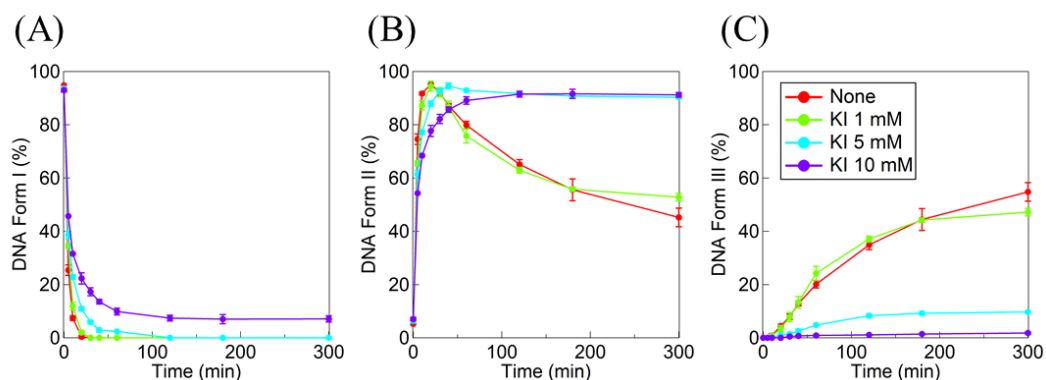


Figure 4-12. Time courses for the decrease of % of Form I (A), increase of % of Form II (B), and Form III (C) in the reaction of **7b** with inhibitors. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [pUC19 DNA] = 50 μ M bp, [complex] = 30 μ M, [H₂O₂] = 50 μ M, [Cu(OAc)₂] = 70 μ M, [KI] = 0–10 mM at 37°C for 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min. Experiments were carried out at least three times.

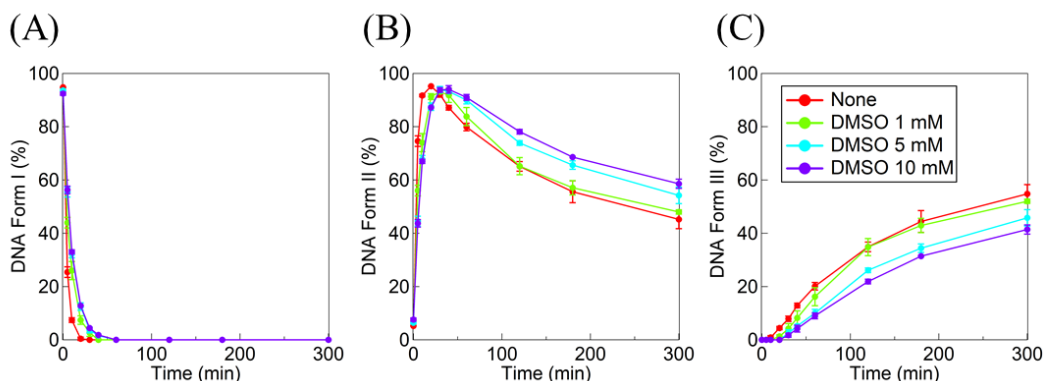


Figure 4-13. Time courses for the decrease of % of Form I (A), increase of % of Form II (B), and Form III (C) in the reaction of **7b** with inhibitors. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [pUC19 DNA] = 50 μ M bp, [complex] = 30 μ M, [H₂O₂] = 50 μ M, [Cu(OAc)₂] = 70 μ M, [DMSO] = 0–10 mM at 37°C for 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min. Experiments were carried out at least three times.

4-3-5. 分光学的測定による活性種の検出

活性種の検出を行うため、**7b** と過酸化水素との反応を電子スペクトル及び CSIMS スペクトルで追跡したが、活性種の反応性が高いために、直接的に分光学的証拠を得ることはできなかった。しかしながら、興味深いことに、MeCN 中、 -40°C で **7b** と過酸化水素との反応を CSI MS スペクトルで追跡すると、MeCN がギ酸に変換されて **7b** に配位したと考えられる質量ピークが m/z : 773.08, 787.10 に観測され、これらはそれぞれ $[\text{L1}^{4\text{H}} + 2\text{Cu}(\text{II}) + 2\text{HCO}_2]^+$ と $[\text{L1}^{4\text{H}} + 2\text{Cu}(\text{II}) + \text{AcO} + \text{HCO}_2]^+$ に相当する (Figure 4-14).

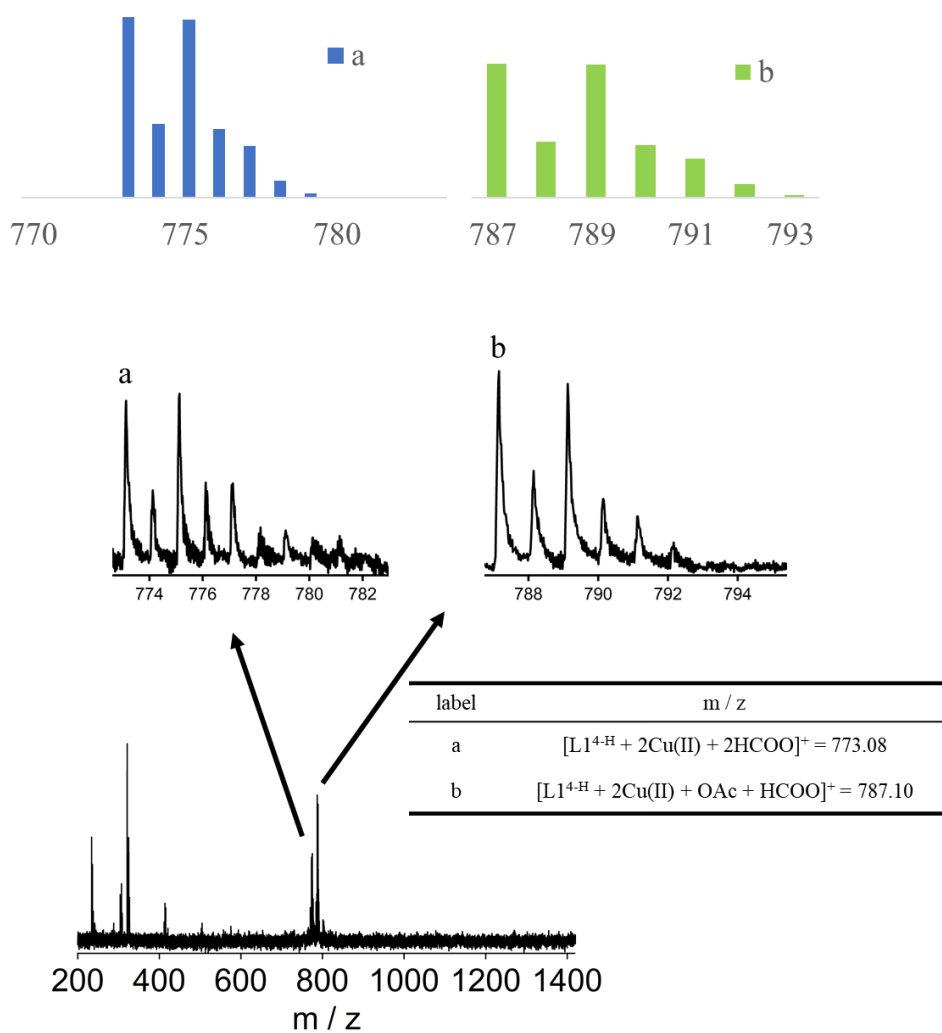


Figure 4-14. CSI MS spectrum of complex **7b** (0.5 mM) reaction with H_2O_2 (100 eq) measured in MeCN at -40°C at orifice 1: 0 V, orifice 2: 5 V, ring lens voltage: 10 V.

また ^{18}O ラベルした過酸化水素 ($\text{H}_2^{18}\text{O}_2$) を用いると、773.08 ($[\text{L1}^{4\text{H}} + 2\text{Cu}(\text{II}) + 2\text{HCO}_2]^+$) と 787.10 ($[\text{L1}^{4\text{H}} + 2\text{Cu}(\text{II}) + \text{AcO} + \text{HCO}_2]^+$) のピークはそれぞれ 777.10 ($[\text{L1}^{4\text{H}} + 2\text{Cu}(\text{II}) + 2\text{HC}^{16}\text{O}^{18}\text{O}]^+$), 789.11 ($[\text{L1}^{4\text{H}} + 2\text{Cu}(\text{II}) + \text{AcO} + \text{HC}^{16}\text{O}^{18}\text{O}]^+$) に 4 マス及び 2 マスシフトしたピークとして観測され、後者のピークはさらに少量ではあるが 791.11 ($[\text{L1}^{4\text{H}} + 2\text{Cu}(\text{II})$

+AcO + HC¹⁸O¹⁸O]⁺)に4マスシフトしたピークとして観測されたことから(Figure 4-15), HCO₂の2つの酸素原子は過酸化水素及び酸素分子由来であることが証明された. この反応で MeCN は活性種により酸化されてシアノヒドリン(HOCH₂CN)に変換された後, HCHO と HCN が生成し, HCHO が空気酸化されるか一部活性種により酸化されてギ酸を生成すると考えられる. これらの反応経路を Scheme 4-3 に示す. Karlin らは, 類似した *p*-cresol-2,6-bis(dpa)型配位子の二核銅錯体から生成する μ-1,1-O₂H species が, MeCN を酸化することを報告している^[23]. 上述したように, **4** と **8** は過酸化水素と反応して μ-1,1-O₂H species を生成し, これが DNA を酸化的に切断することが報告されている^[7,10,11]. これらの事実と DNA 酸化切断の速度論的解析結果から, **7b** と過酸化水素との反応で μ-1,1-O₂H species が生成し, これが直接の酸化活性種であり, また一部二量化してさらに高い活性を示す化学種が反応に関与することが推定される.

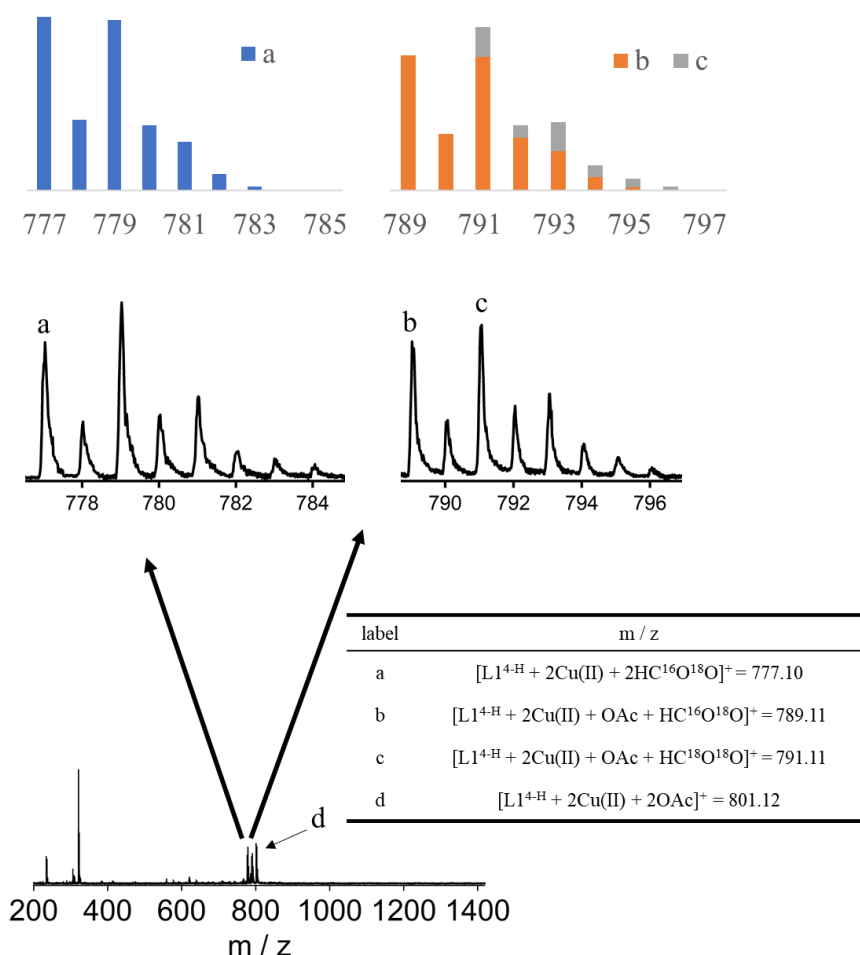
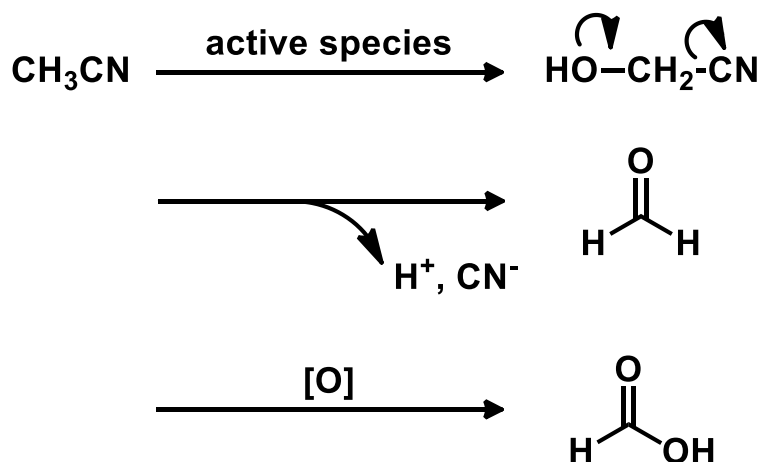


Figure 4-15. CSI MS spectrum of complex **7b** (0.5 mM) reaction with H₂¹⁸O₂ (100 eq) measured in MeCN at -40°C at orifice 1: 0 V, orifice 2: 5 V, ring lens voltage: 10 V.

Scheme 4-3. A propose reaction pathway in the formation of HCOOH from acetonitrile



4-3-6. MTT assay による細胞毒性の評価

HL1^{4H}, **4**, **7b** 及び **8** の抗がん活性を調べるため、HeLa 細胞に対する細胞毒性を MTT assay によって評価した^[24,25]. IC₅₀ 値は縦軸に細胞生存率, 横軸に log[X] (X = HL1^{4H}, **4**, **7b**, and **8**)をプロットしたグラフから算出した. これらを Table 4-3, Figure 4-16 に示す. IC₅₀ 値より, **7b** は HL1^{4H} と比較して 7 倍高い細胞毒性を発現することが明らかになった. **7b** のプロットは急勾配であり, HL1 のプロットは緩やかな勾配であった(Figure 4-16). **7b** がシャープな濃度依存性を示すのは, これが細胞内でも二核銅を維持して高い細胞毒性を保っているためと考えられる. さらに, **7b** は **4**, **8** と比較して, それぞれ 24, 8 倍高い細胞毒性を示した. また, これらの錯体の細胞毒性は化合物の細胞への取り込みの程度に依存すると考えられる. 実際, **8** は **4** よりも DNA 切断活性は低い, **4** よりも細胞毒性は高い. これは, **8** のペンダント基である dpa の疎水性が高く膜透過性が向上しているためと考えられる. これらの結果から, **7b** が最も高い細胞毒性を示すのは, amide-tether と dpa によって高められた DNA 酸化切断活性とともに, その疎水性によって高められた細胞膜透過性によると考えられる.

HL1^{4H}, **4**, **7b** 及び **8** のヒト肺及び膵臓のがん(A549 and PK-59)及び正常(WI-38 and 2C6)細胞に対する細胞毒性を調べた. HL1^{4H}, **4** 及び **8** は正常細胞とがん細胞の選択性を示したが, その IC₅₀ 値は **7b** と比較して非常に高いことが見出された. **7b** のヒト肺がん細胞 A549, ヒト膵臓がん細胞 PK-59 に対する IC₅₀ 値は, それぞれ 92.7, 66.5 μM であり, これらの値はヒト肺正常細胞 WI-38, ヒト膵臓正常細胞 2C6 に対する IC₅₀ 値の 121, 88.2 μM と比較して低い. 従って, **7b** は正常細胞と比較してがん細胞に対して約 1.3 倍高い細胞毒性を発現することがわかった. これは, 正常細胞よりも高い過酸化水素濃度を有するがん細胞内において, **7b** が過酸化水素を利用して DNA や RNA を切断した結果だと考えられる. 従って, 本法は抗がん剤の副作用を軽減できる可能性を持つと言える.

さらに, **7b** の細胞毒性を比較するため, HeLa 細胞に対する cisplatin の細胞毒性を測

定し、また、報告されている銅以外の二核金属錯体 $[\text{Co}_2\text{L}_2]^{2+}$ ($\text{L} = N',N''\text{-bis}[(1E)\text{-1-(2-pyridyl)ethylidene]propanedihydrazide}$)^[26]及び $[\text{Ni}_2(\text{EGTB})(\text{MeCN})]^{4+}$ ($\text{EGTB} = \text{ethylene glycol-bis}(\beta\text{-aminoethyl ether}) N,N,N',N''\text{-tetrakis}(2\text{-benzimidazolyl})$)^[27]を参照した(Table 4-3). cisplatin は 5 つの細胞株に対して高い細胞毒性を示したが、選択性は示さないことが明らかになった. **7b**, $[\text{Co}_2\text{L}_2]^{2+}$, $[\text{Ni}_2(\text{EGTB})(\text{MeCN})]^{4+}$ の細胞毒性を比較すると、**7b** が最も高い細胞毒性を示すことが見出された. これらの結果から、**7b** はがん細胞に対して細胞毒性を示すだけでなく、正常細胞との選択性も示すことが結論付けられた.

Table 4-3. In vitro cytotoxicity for HL1, 4, 7b, 8, 9, cisplatin, and other dimetal complexes against HeLa, A549, WI-38, PK-59, and 2C6 cells by means of MTT assay (24 h)

Compound	IC ₅₀ (μM)				
	Cervical	Lung		Pancreas	
	HeLa	A549	WI-38	PK-59	2C6
HL1	539 ± 123	551 ± 5	282 ± 10	205 ± 1	615 ± 18
4	1740 ± 114	1270 ± 10	2660 ± 190	1060 ± 0	3340 ± 10
7b	72.8 ± 2.1	92.7 ± 1.4	121 ± 11	66.5 ± 3.1	88.2 ± 8.9
8	580 ± 13	402 ± 13	1070 ± 50	364 ± 10	566 ± 23
9	11.3 ± 0.5	29.8 ± 2.4	10.2 ± 0.3	39.7 ± 1.5	21.9 ± 2.8
cisplatin	2.33 ± 0.23	5.35 ± 0.82	6.33 ± 0.13	2.66 ± 0.85	3.16 ± 0.12
$[\text{Co}_2\text{L}_2]^{2+}$ ^[26]	> 100	-	-	-	-
$[\text{Ni}_2(\text{EGTB})(\text{MeCN})]^{4+}$ ^[27]	> 100	-	-	-	-

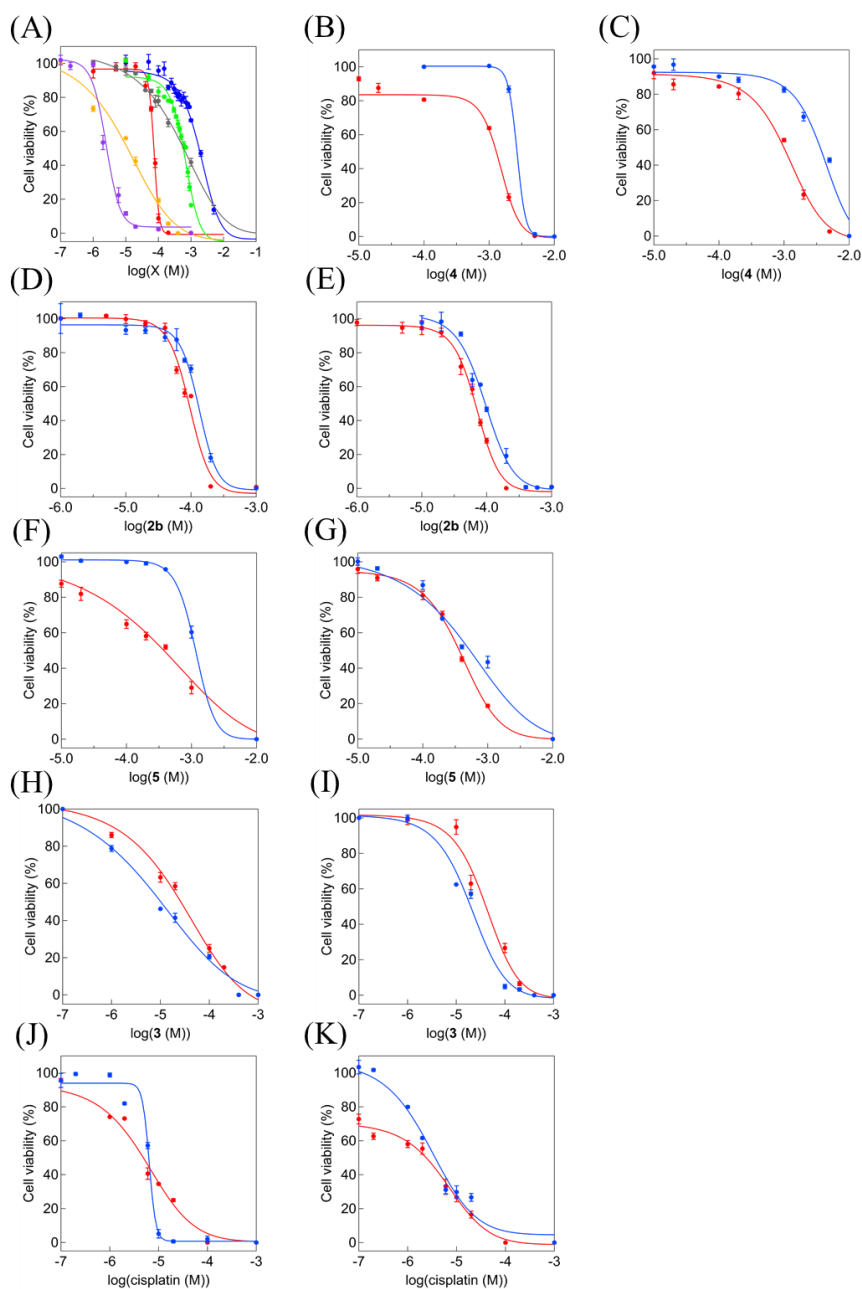


Figure 4-16. (A) Plots of cell viability vs $\log[X]$ ($X = 4$ (light green), **7b** (blue), **8** (red), **9** (orange), and cisplatin (purple)) in the MTT assay of HeLa cells. (B), (D), (F), (H), and (J) are the plots of cell viability vs $\log[4]$, $\log[7b]$, $\log[8]$, $\log[9]$, and $\log[\text{cisplatin}]$ in the MTT assay of A549 (red) and WI-38 (blue) cells treated with **4**, **7b**, **8**, **9**, and cisplatin, respectively. (C), (E), (G), (I), and (K) are the plots of cell viability vs $\log[4]$, $\log[7b]$, $\log[8]$, $\log[9]$, and $\log[\text{cisplatin}]$ in the MTT assay of PK-59 (red) and 2C6 (blue) cells treated with **4**, **7b**, **8**, **9**, and cisplatin, respectively. All experiments were carried out at least three times.

4-3-7. 蛍光標識を有する金属錯体の合成及びそれを用いた細胞内挙動の解明

7b の細胞毒性発現機構を明らかにするためには、その細胞内挙動を可視化する必要がある。そこで、Bodipy と HL1⁴⁺ を化学結合でつないだ HL2⁴⁺ 配位子 (Scheme 4-2) とその二核銅(II)錯体 [Cu₂(μ-OAc)₂(L2⁴⁺)](OAc) (**9**) を合成した。**9** の構造は分光学的測定によって明らかにした。合成及び ¹H NMR スペクトルの詳細は本章第 5 節を参照に記載している。MeCN 中における **9** の ESI MS スペクトルでは、*m/z*: 1311.34 にピークを与え、[L2⁴⁺+2Cu(II)+2OAc]⁺ の質量に相当した (Figure 4-17)。この結果は、溶液中においても **9** が二核銅(II)構造を維持していることを示している。

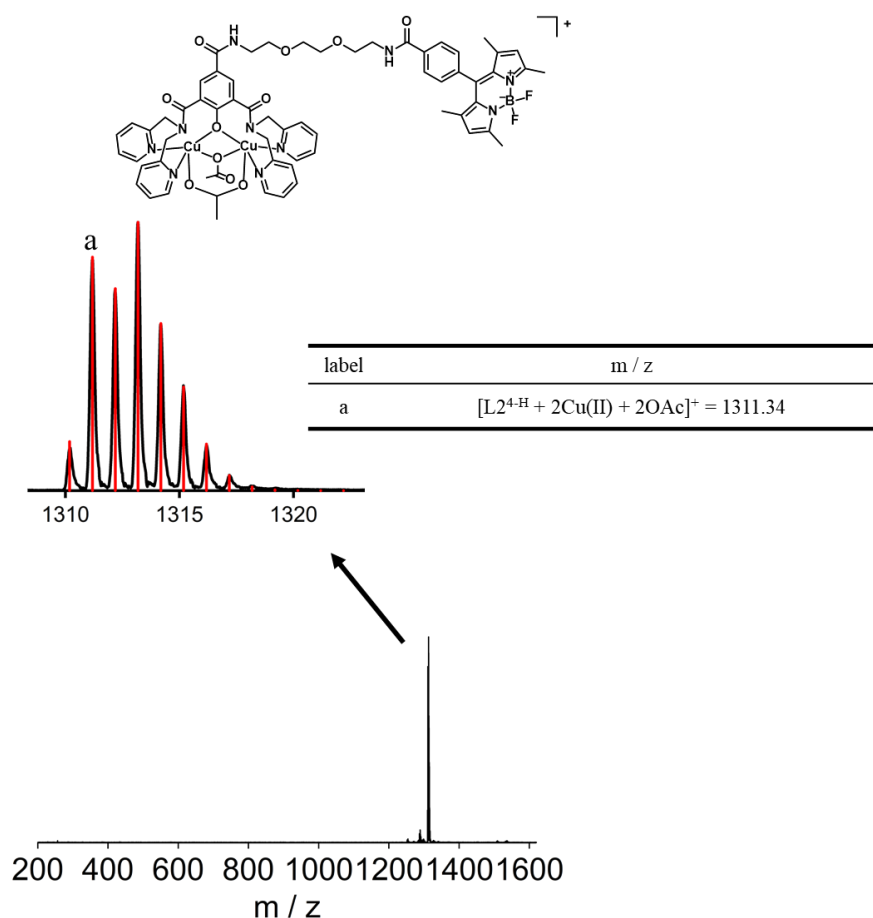


Figure 4-17. ESI MS spectrum of **9** measured in MeCN at room temperature at orifice 1: 10 V, orifice 2: 10 V, ring lens voltage: 10 V.

過酸化水素存在下における **9** の酸化的 DNA 切断活性は、**7b** と比較して高いことが見出された (Figure 4-18, S4-7, Table S4-6)。これは、正常細胞とがん細胞の選択性は無かったが、**9** が **7b** と比較してわずかに高い細胞毒性を示すことと一致している (Table 4-3)。これらの結果は、Bodipy 部位が細胞取り込み及び DNA 結合能を向上させていることを示唆している^[28]。

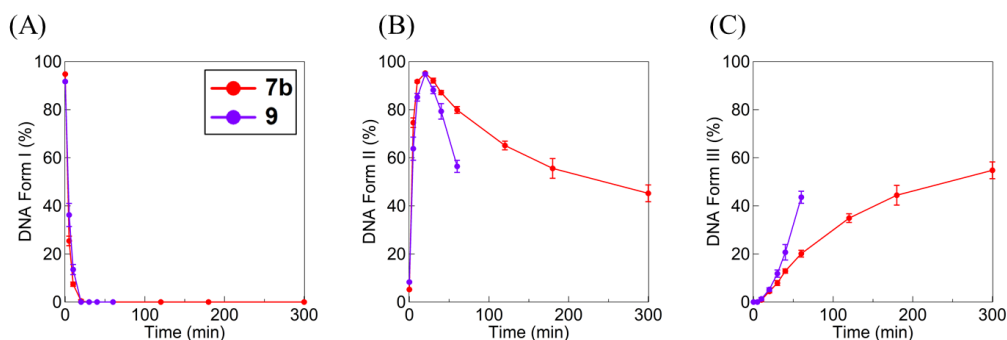


Figure 4-18. Comparison of DNA cleavage activity between **7b** and **9**. Time courses for the decrease of % of Form I (A), increase of % of Form II (B), and Form III (C) at pH 6.0. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [pUC19 DNA] = 50 μ M bp, [complex] = 30 μ M, [H₂O₂] = 50 μ M, [Cu(OAc)₂] = 70 μ M at 37°C for 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min. Experiments were carried out at least three times.

細胞内イメージング実験には HeLa 細胞を用い、**9** を培地に蒔いた後、1, 12, 24 時間インキュベートした。**9** の細胞内取り込み及び細胞内分布は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて測定した(Figure 4-19)。核及びミトコンドリア染色に Hoechst 33342 (8.1 μ M), Mito Tracker Deep Red (50 nM)を用いて細胞を処理した結果、**9** (100 μ M)の細胞内局在化が 12 及び 24 時間後に観測された。24 時間後の蛍光画像を Figure 4-20 に示す。青色及び赤色は、それぞれ核及びミトコンドリアを染色した色である。緑色蛍光は、**9** が細胞内に存在することを示している。これらの画像を合わせた画像(Figure 4-20, Merge)では、黄色及び水色の蛍光を確認することができる。これは、**9** が核及びミトコンドリア内に局在化したため、青色と緑色、赤色と緑色がそれぞれ合わさったと考えられる。興味深いことに、水色の蛍光は小さいスポットとして観測できる。これは、**9** が核小体に局在化していることを示している。

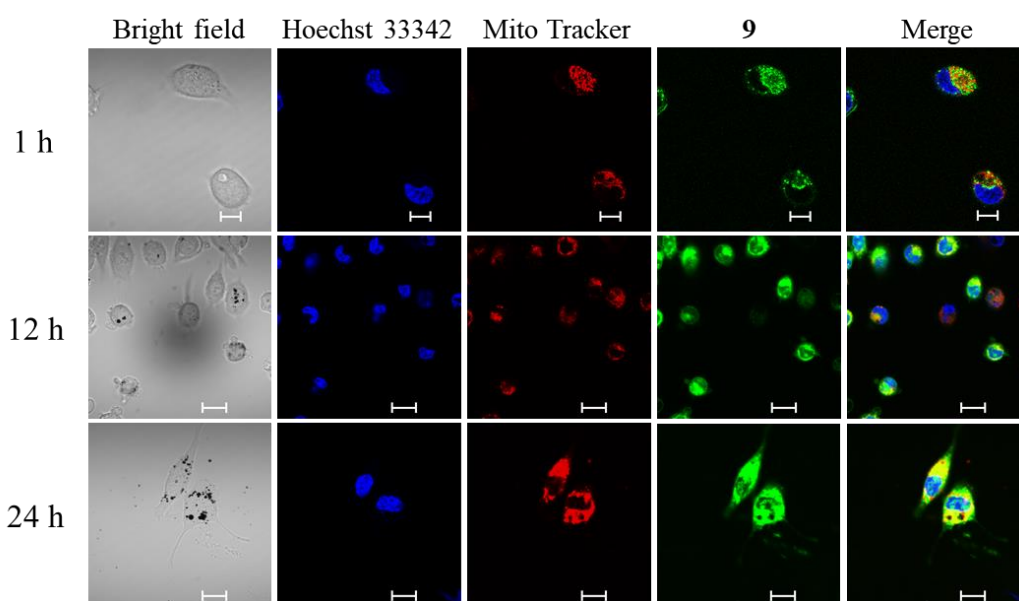


Figure 4-19. Confocal luminescence microscopy images of HeLa cells with treatments of 100 μ M of **9** (green) for 1, 12, and 24 h, stained with Hoechst 33342 (blue) and Mito Tracker (red) as well as merged images. Scale bars represent 20 μ m.

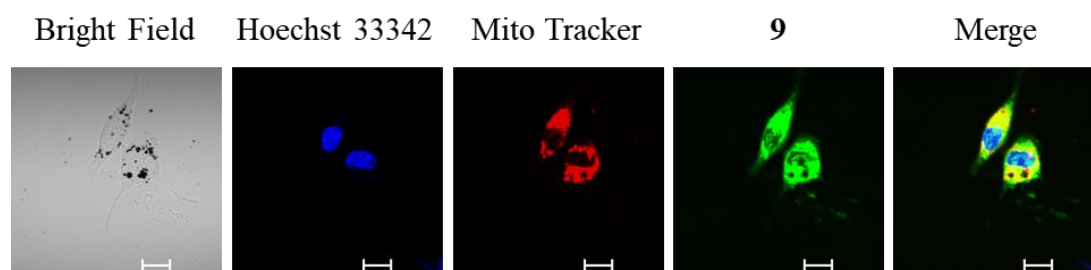


Figure 4-20. Confocal luminescence microscopy images of HeLa cells with treatments of 100 μ M of **9** (green) for 24 h, stained with Hoechst 33342 (blue) and Mito Tracker (red) as well as merged images. Scale bars represent 20 μ m.

4-3-8. Comet assay による核内 DNA 損傷の検出

7b が核内 DNA に到達して酸化的切断を起こしていれば, comet assay によって確認することができる. そこで, 我々は **7b** を用いた comet assay を行った(Figure 4-21). その結果, comet tail を確認することはできなかった. 従って, **7b** は核の DNA を切断していないことが示された. この結果は, 上述の細胞内分布の結果と一致している. これらの結果から, **7b** はミトコンドリア及び核小体の DNA 及び RNA をそれぞれ切断していると考えられる.

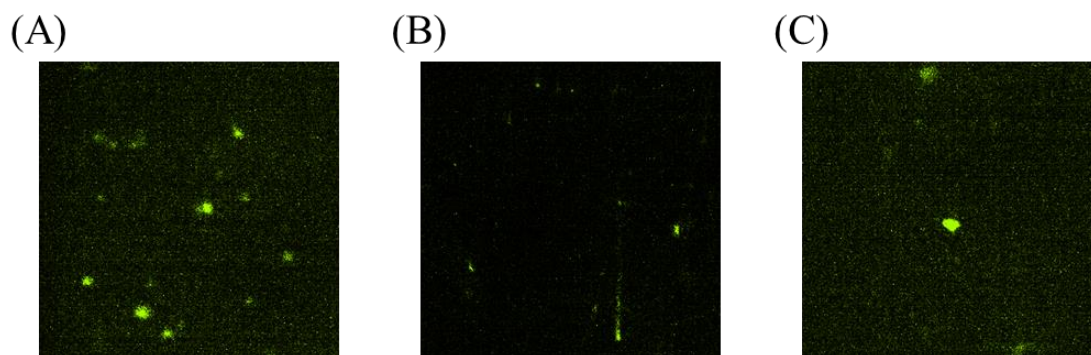


Figure 4-21. Comet assay of SYBR[®] Gold-stained HeLa cells. (A) HeLa cells (untreated), (B) HeLa cells treated with H₂O₂ (100 μM) at 20 min incubation at 4°C, and (C) HeLa cells treated with IC₁₀ concentration of **7b** (45 μM) at 24 h incubation.

4-3-9. フローサイトメトリー

細胞死の形態を調べるため, フローサイトメトリーによって fluorochrome-conjugated annexin V (Annexin V-FITC)/propidium iodide (PI) assay を行った. **7b** (100 μM)を HeLa 細胞の培地に加え, 1 及び 12 時間インキュベーションした. この検定は, フローサイトメトリーによってアポトーシス細胞の定量化を行うことを目的とし, Annexin V-FITC 及び PI の染色溶液を用いて測定した. この結果を Figure 4-22 に示す. 12 時間のインキュベーション後には, 32%の細胞が死滅しており, そのうち 13.6%が初期アポトーシス, 18.2%が後期アポトーシスであることが見出され, ネクローシスは 0.1%だった. ここまでに示してきた, 酸化的 DNA 切断活性, ミトコンドリアと核小体への局在, アポトーシス経路での細胞死などの結果に基づいて考えると, **7b** では amide-tether と dpa 部位が重要な役割を果たし, ミトコンドリア内の DNA または核小体内の RNA 切断を通して細胞死を誘導していると結論付けることができる.

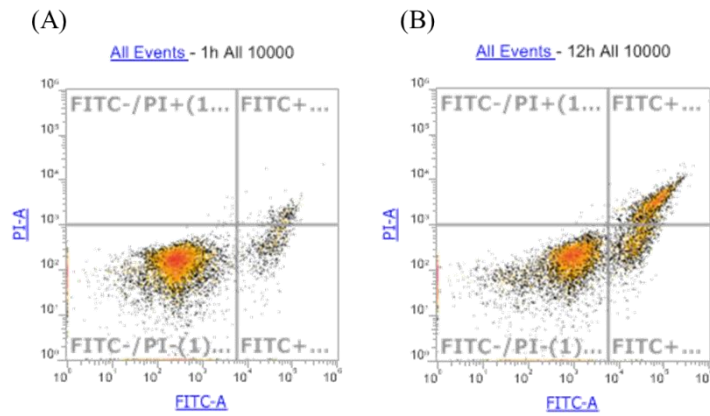


Figure 4-22. Induction of apoptosis by **7b**. Annexin V-FITC and PI fluorescence were measured by flow cytometry. Representative dot plots of dose-dependent effect of **7b** on apoptosis in HeLa cells treated for 1 h (A) and 12 h (B). A total of 10,000 events were collected per sample.

4-4. 結論

本研究では、新規 *p*-cresol-2,6-bis(dpa) amide-tether 配位子 HL1^{4H} 及びその二核銅(II)錯体 [Cu₂(μ-OH₂)(μ-1,3-OAc)(L1^{4H})](ClO₄)₂ (**6**), [Cu₂(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L1^{4H})]X [X = ClO₄ (**7a**) and OAc (**7b**)]を合成し、これらの構造を明らかにした。**7b** は過酸化水素存在下において酸化的 DNA 切断を大きく加速し、また関連する二核銅(II)錯体と比較して高い細胞毒性を示すことが見出された。細胞毒性発現機構を明らかにするため、蛍光団として Bodipy を末端に導入した配位子 HL2^{4H} 及びその二核銅(II)錯体[Cu₂(μ-OAc)₂(L2^{4H})](OAc) (**9**)を合成し、**9** を用いて細胞内可視化実験を行った。その結果、**9** はミトコンドリア及び核小体内に局在することが明らかになった。この結果より、**7b** はミトコンドリア内の DNA または核小体内の DNA を切断することで細胞毒性を発現していると考えられる。本研究で得られた知見は、深刻な副作用を軽減した新しい抗がん剤の開発に対して研究基盤を提供できる可能性がある。

4-5. 実験方法

4-5-1. 試薬及び測定装置

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。4-methylphenol-2,6-dicarboxylic acid (**24**), 1-amino-8-azido-3,6-dioxaoctane (**33**)及び錯体 **8** は参考文献^[7,13-15]に従って合成した。

元素分析(C, H, N)は、Perkin-Elmer 社製 Elemental Analyzer 2400 II を用いて測定した。¹H 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*₄ (TSP)を用いて測定した。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-T100CSRX the AccuTOF CS を用いて、MeOH, MeCN または H₂O を溶媒として測定した。pH 測定は、HORIBA 製 LAQUA electrode を用い、標準緩衝溶液を用いて構成した後に測定を行った。UV-vis スペクトルは、Agilent 社製 8453 紫外可視分光光度計を用いて測定した。IR スペクトルは、Shimadzu Single Reflection HATR IR Affinity-1 MIRacle 10 を用いて測定した。単結晶 X 線構造解析は、リガク社製 R-AXIS RAPID II/RAPID AUTO X 線単結晶 X 線構造解析装置で解析データを測定し、Olex 2 ソフトウェアを用いて解析を行った。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。

4-5-2. 配位子及び二核銅(II)錯体合成

HL1^{4-H}の合成^[13]

24 (1.00 g, 5.10 mmol)を SOCl₂ (50 mL)に溶解させ、60°C で4時間攪拌した。SOCl₂を除去した後、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。Di(2-pyridylmethyl)amine (2.10 g, 10.5 mmol), K₂CO₃ (4.50 g, 32.6 mmol)を CH₂Cl₂ (50 mL)に溶解させた。この溶液に、先程の油状物質を CH₂Cl₂ (50 mL)に溶解させた溶液を N₂ 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 H₂O (3 × 100 mL)で分液した。有機層に Na₂SO₄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固体が得られた。これを最少量の CHCl₃に溶解させ、アルミナカラムクロマトグラフィー (gradient CHCl₃/MeOH from 100/0 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、真空乾燥すると薄黄色の固体得られた (2.64 g, Yield: 93%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 11.6 (s, 1H, OH), 8.49 (d, *J* = 5.2 Hz, 4H, Py), 7.73 (t, *J* = 5.7, 7.5 Hz, 2H, Py), 7.64 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Py), 7.56 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ph), 7.24–7.26 (m, 2H, Py), 7.18 (s, 2H, Ph), 7.15–7.19 (m, 4H, Py), 4.95 (s, 4H, CH₂), 4.66 (s, 4H, CH₂), 2.21 (s, 3H, CH₃)。

tert-Butyl 4-formylbenzoate (**29**)の合成^[16]

4-Formylbenzoic acid (**28**, 3.01 g, 20.0 mmol), DCC (5.35 g, 25.9 mmol), *tert*-BuOH (20.0 mL, 210 mmol), DMAP (20.2 g, 166 mmol)を CH₂Cl₂ (200 mL)に溶解させ、脱気窒素置換した後、30°C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た後、CHCl₃に溶解させ、H₂O (3 × 40 mL), 4 M HCl (3 × 40 mL)で分液した。有機層に Na₂SO₄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、真空乾燥すると白色の固体が得られた。これを最少量の CHCl₃に溶解させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (gradient CHCl₃/hexane from 2/1 to 4/1)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、真空乾燥すると白色の固体が得られた (1.25 g, Yield: 30%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ/ppm = 10.1 (s, 1H, CHO), 8.14 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ph), 7.93 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ph), 1.61 (s, 9H, CH₃)。

4,4-Difluoro-8-(4-carboxyphenyl)-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (**30**)の合成^[16]

29 (368 mg, 1.78 mmol), 2,4-dimethylpyrrole (425 mg, 4.47 mmol)を CH₂Cl₂ (55 mL)に溶解させ、脱気窒素置換した後、室温で3時間攪拌した。この反応溶液に TFA (0.5 mL)を加え、室温でさらに18時間攪拌した。この反応溶液に CH₂Cl₂ (50 mL)に溶解させた DDQ (414 mg, 1.83 mmol)溶液を滴下し、室温で20分間攪拌した。ここに、Et₃N (1.61 mL, 11.6 mmol)及び BF₃•OEt₂ (2.42 mL, 19.1 mmol)の溶液を加え、室温で3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すると紫色の固体が得られた。これを最少量の CH_2Cl_2 に溶解させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (gradient $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ from 3/1 to 2/1) 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、真空乾燥すると赤色の固体が得られた (308 mg, Yield: 47%). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta/\text{ppm} = 13.2$ (brs, 1H, COOH), 8.10 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, Ph), 7.54 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, Ph), 6.20 (s, 2H, CH), 2.46 (s, 6H, CH_3), 1.33 (s, 6H, CH_3).

3,5-Diformyl-4-hydroxybenzoic acid (32)の合成

4-Hydroxy benzoic acid (**31**, 10.1 g, 0.731 mol), hexamethylenetetramine (84.1 g, 0.600 mol) を TFA に溶解させ、 110°C で 2 日間攪拌した。反応溶液を室温に戻した後、4 M HCl (450 mL) を加え、 30°C で一晩攪拌した。析出した固体をヌッチェで濾過し、真空感動すると黄色の固体が得られた (9.88 g, Yield: 70%). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta/\text{ppm} = 10.3$ (s, 2H, Ph), 8.54 (s, 2H, CHO).

N-(8-Azido-3,6-dioxaoctyl)-2,6-diformyl-1-hydroxy-4-benzamide (34)の合成

32 (4.19 g, 21.6 mmol), **33** (16.7 g, 71.4 mmol), EDC•HCl (13.7 g, 71.5 mmol), Et_3N (10.0 mL, 71.7 mmol) を CHCl_3 (400 mL) に溶解させ、脱気窒素置換した後、 0°C で一晩攪拌した。反応溶液に 1 M HCl (270 mL) を加え、 30°C でさらに一晩攪拌した。水層を取り除き、有機層を集め、 Na_2SO_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黄色の固体が得られた。これを CHCl_3 (90 mL) に溶解させ、 H_2O (3×30 mL) で分液した。有機層に Na_2SO_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固体が得られた (5.74 g, Yield: 67%). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ/ppm : 11.9 (s, H, OH), 10.3 (s, 2H, CHO), 8.46 (s, 2H, Ph), 6.84 (s, H, NH), 3.73 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H, CH_2), 3.69–3.72 (m, 8H, CH_2), 3.41 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H, CH_2).

4-(*N*-(8-Azido-3,6-dioxaoctyl)carbamoyl)-2-hydroxyisophthalic acid (35)の合成

NaOH (5.54 g, 139 mmol) を H_2O (110 mL) に溶解させた溶液に、**34** (5.74 g, 14.6 mmol), Ag_2O (10.6 g, 45.6 mmol) を加え、 60°C で一晩攪拌した。反応溶液を最少量の熱水で洗浄しながら桐山漏斗で濾過した。濾液を氷浴に浸し、12 M HCl を pH が 1 になるまで慎重に加えた。析出した固体を桐山漏斗で濾過し、真空乾燥すると白色の固体が得られた (4.30 g, Yield: 69%). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ/ppm : 8.53 (s, H, NH), 8.47 (s, 2H, Ph), 3.60 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H, CH_2), 3.54–3.58 (m, 4H, CH_2), 3.52 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, CH_2), 3.39 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, CH_2), 3.37 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H, CH_2).

N-(8-Azido-3,6-dioxaoctyl)-2,6-di(*N,N*-bis(2-pyridylmethyl)carbamoyl)-1-hydroxy-4-benzamide (36)の合成

35 (0.201 g, 0.525 mmol)を CH₂Cl₂ (5 mL)に溶解させ、SOCl₂ (120 μL)を加えて 60°C で 1 時間攪拌した。SOCl₂ 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。Di(2-pyridylmethyl)amine (0.284 g, 1.42 mmol), K₂CO₃ (0.659 g, 4.76 mmol)を CH₂Cl₂ (10 mL)に溶解させた。この溶液に、先程の油状物質を CH₂Cl₂ (10 mL)に溶解させた溶液を N₂ 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 H₂O (3 × 15 mL)で分液した。有機層に Na₂SO₄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固体が得られた。これを最少量の CHCl₃に溶解させ、アルミナカラムクロマトグラフィー (gradient CHCl₃/MeOH from 100/0 to 30/1)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、真空乾燥すると薄黄色の固体が得られた (0.163 g, Yield: 42%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆); δ/ppm: 8.51 (d, *J* = 3.4 Hz, 2H, Py), 8.44 (d, *J* = 3.4 Hz, 2H, Py), 7.92 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Py), 7.83 (s, 2H, Ph), 7.72 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Py), 7.58 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Py), 7.39 (t, *J* = 3.4, 7.5 Hz, 2H, Py), 7.22–7.25 (m, 4H, Py), 4.81 (s, 4H, CH₂), 4.54 (s, 4H, CH₂), 3.47–3.60 (m, 10H, CH₂).

N-(8-Amino-3,6-dioxaoctyl)-2,6-di(*N,N*-bis(2-pyridylmethyl)carbamoyl)-1-hydroxy-4-benzamide (37)の合成

36 (375 mg, 0.503 mmol), 10% Pd/C (418 mg)を MeOH (5 mL)に溶解させ、脱気水素置換した後、室温で 30 分間攪拌した。反応溶液をセライト濾過した後、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 (301 mg, Yield: 83%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆); δ/ppm: 8.47 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H, Py), 8.37 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H, Py), 7.95 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Py), 7.84 (m, 2H, Py), 7.66 (m, 2H, Py), 7.61 (s, 2H, Ph), 7.25–7.32 (m, 4H, Py), 7.19 (ddd, *J* = 4.6 Hz, 6.3, 7.5 Hz, 2H, Py), 4.50–4.80 (m, 8H, CH₂), 3.44–3.56 (m, 8H, CH₂), 2.80 (t, 2H, CH₂).

HL2^{4H}の合成

CHCl₃ (3 mL)に溶解させた **37** (44.8 mg, 0.0623 mmol)溶液に、CHCl₃ (2 mL)に溶解させた **30** (45.5 mg, 0.124 mmol), EDC·HCl (25.0 mg, 0.130 mmol)の溶液を加えた。この反応溶液に Et₃N (0.10 mL, 0.711 mmol)を加え、脱気窒素置換した後、30°C の暗所で一晩攪拌した。反応溶液に CHCl₃ (10 mL)を加えた後、H₂O (3 × 3 mL)で分液した。有機層に Na₂SO₄を加えて脱水した後、桐山漏斗で濾過し、濾液をロータリーエバポレーターで濃縮すると紫色の固体が得られた。これに最小量の MeCN を加え、不溶物を濾過で取り除き、濾液をロータリーエバポレーターで濃縮すると紫色の固体が得られた。これを最少量の

CHCl₃に溶解させ、アルミナカラムクロマトグラフィー(gradient CHCl₃/MeOH from 1/0 to 10/1)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すると橙色の固体が得られた。これを、GL Science 社製 InetSustain C18 逆相カラム(φ20 mm × 250 mm, H₂O/MeCN)を用いて HPLC を行い、目的物が含まれているフラクションを集め、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固体が得られた(8.2 mg, Yield: 12%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃); δ/ppm: 8.47–8.50 (m, 4H, Py), 7.97 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ph), 7.96 (s, 2H, Ph), 7.72 (m, 2H, Py), 7.65 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, NH), 7.62 (m, 2H, Py), 7.51 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Py), 7.22–7.26 (m, 2H, Py), 7.18 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ph), 7.14–7.18 (m, 4H, Py), 6.89 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, NH), 5.95 (s, 2H, CH), 4.94 (s, 4H, CH₂), 4.62 (s, 4H, CH₂), 3.58–3.72 (m, 12H, CH₂), 2.56 (s, 6H, CH₃), 1.27 (s, 6H, CH₃).

二核銅(II)錯体 6 の合成

Milli-Q 水(4 mL)に Cu(OAc)₂ (48.0 mg, 0.264 mmol)を溶解させた溶液に、Milli-Q 水(4 mL)に HL1⁴⁺H (48.5 mg, 0.0868 mmol)を溶解させた溶液をゆっくり加え、室温で 10 分間攪拌した。カウンターイオンを変えるため、反応溶液に Milli-Q 水(2 mL)に溶解させた NaClO₄•H₂O (64.1 mg, 0.456 mmol)の溶液を加え、室温で 10 分間攪拌した。この反応溶液を放置すると、単結晶 X 線構造解析に適した緑色の固体が得られた(43.1 mg, Yield: 51%). Anal. calcd for [Cu₂(μ-OH₂)(μ-OAc)(L1⁴⁺H)](ClO₄)₂•2H₂O: C, 42.18; H, 3.84; N, 8.43. Found: C, 42.50; H, 3.65; N, 8.43. IR (KBr): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3451, 1645, 1609, 1535, 1489, 1443, 1362, 1300, 1287, 1267, 1240, 1200, 1165, 1092, 1063, 1030, 972, 955, 939, 905, 883, 812, 762, 733, 698, 679, 650, 621.

二核銅(II)錯体 7b の合成

MeCN (7 mL)に Cu(OAc)₂ (67.9 mg, 0.374 mmol)を溶解させた溶液に、MeCN (1.5 mL)に HL1⁴⁺H (104 mg, 0.186 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 Et₂O 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(131 mg, Yield: 81%). Anal. calcd for [Cu₂(μ-OAc)₂(L1⁴⁺H)](OAc)•2.5H₂O: C, 51.65; H, 4.78; N, 9.27. Found: C, 51.67; H, 5.19; N, 9.33. CSI MS (H₂O *m/z*, positive mode). Calcd for [7b – OAc]⁺: 801.12. Found: 801.12. IR (KBr): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3613, 2374, 2347, 2320, 1641, 1609, 1587, 1568, 1543, 1489, 1435, 1370, 1339, 1319, 1269, 1246, 1202, 1161, 1084, 1030, 972, 951, 903, 881, 814, 764, 733, 702, 677, 621.

二核銅(II)錯体 7a の合成

MeCN に溶解させた 7b の溶液に、NaClO₄•H₂O (1 eq)を加え、室温で 10 分間攪拌した。この反応溶液を Et₂O 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。 Anal. calcd for $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OAc})_2(\text{L1}^{4\text{H}})](\text{ClO}_4)\cdot 3.5\text{H}_2\text{O}\cdot 0.5\text{MeCN}$: C, 46.04; H, 4.39; N, 8.71. Found: C, 45.74; H, 4.0; N, 8.99. IR (KBr): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3418, 2928, 1607, 1589, 1568, 1427, 1310, 1242, 1200, 1188, 1159, 1107, 1049, 1026, 995, 974, 945, 880, 829, 766, 733, 679, 617$.

二核銅(II)錯体 9 の合成

MeCN (1 mL)に $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (14.3 mg, 78.7 μmol)を溶解させた溶液に, MeCN (1 mL)に $\text{HL2}^{4\text{H}}$ (41.8 mg, 39.1 μmol)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 0.2 mL 程度にした。この溶液に Et_2O を加えると固体が析出したので, これを濾過し, 真空乾燥すると橙色の固体が得られた (40.8 mg, Yield: 70%)。 Anal. calcd for $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OAc})_2(\mu\text{-1,3-OAc})(\text{L2}^{4\text{H}})](\text{OAc})\cdot 6.5\text{H}_2\text{O}$: C, 52.42; H, 5.41; N, 9.40. Found: C, 51.97; H, 5.20; N, 8.98. IR (KBr): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3769\text{--}3285, 3132\text{--}2756, 2372, 2355, 2324, 1631, 1607, 1549, 1508, 1489, 1472, 1433, 1373, 1339, 1306, 1195, 1157, 1107, 1090, 1055, 1022, 980, 934, 887, 843, 820, 799, 766, 737, 683, 673, 648, 625, 610$. ESI MS (MeCN m/z , positive mode). Calcd for $[\mathbf{9} - \text{OAc}]^+$: 1311.34. Found: 1311.34. UV-vis spectra (MeCN at room temperature, 25 μM): 232 nm ($\epsilon = 50000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 281 nm ($\epsilon = 20000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 312 nm ($\epsilon = 9400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 388 nm ($\epsilon = 3200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), and 499 nm ($\epsilon = 64000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4-5-3. DNA 切断実験

各錯体の 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), 7.4 (MOPS), 10 mM), pUC19 DNA (50 μM bp), $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (70 μM), complex (0–30 μM), H_2O_2 (0–50 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, 5, 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 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 の染色補正要因 1.06 を用い, ImageJ ソフトウェアによって解析を行った。

4-5-4. 7b の DNA 切断阻害実験

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 μM bp), **7b** (30 μM), H_2O_2 (50 μM), inhibitor (1–10 mM)に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。この後の手順は DNA 切断実験に記載した

ものと同様である。

4-5-5. 7b と過酸化水素の反応によって生成する反応中間体の CSI MS スペクトル測定

7b の MeCN 溶液(0.5 mM)を 20 mL ニロナスフラスコに入れ、 $-40 \pm 0.2^\circ\text{C}$ に保った。H₂O₂ の MeCN 溶液(錯体に対して 100 eq)を加え、スペクトルを測定した。

4-5-6. MTT assay による細胞毒性の評価

96 well プレートに blank として培地のみを 1 列と、培地に 10×10^4 cells/mL になるように懸濁させた細胞(HeLa (ヒト子宮頸がん), A549 (ヒト肺がん), WI-38 (ヒト肺正常), PK-59 (ヒト膵臓がん), 2C6 (ヒト膵臓正常))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、インキュベーター(37°C , 5% CO₂)でインキュベーションした。24 時間後、PBS(-)で洗浄した。その後、サンプル列にはそれぞれの濃度に調製した錯体のサンプル(10–1000 μM)を、blank と control 列には培地のみを 1 well につき 100 μL ずつ加え、インキュベーターでインキュベーションした。24 時間後、PBS(-)で洗浄し、5 mg/mL に調製した MTT reagent 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ターで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。その後、570 nm の波長を用いて吸光度測定器で吸光度を測定し、細胞毒性を評価した。

4-5-7. 細胞内イメージング実験

観察用ディッシュ($\phi 14$ mm)に 6×10^4 cells/mL に調製した HeLa 細胞の懸濁液を 600 μL 加え、 37°C , 5% CO₂ 条件下で 24 時間インキュベーションした。培養した HeLa 細胞から培地を除去し、PBS(-)で 2 回洗浄し、錯体 9 (10–100 μM)の D10 培地溶液(600 μL)を加え、 37°C , 5% CO₂ 条件下で 1, 12, 24 時間インキュベーションした。培地を除去し、PBS(-)で 2 回洗浄し、核及びミトコンドリア染色として Hoechst 33342 (600 μL , 8.1 μM)及び Mito Tracker™ Deep Red FM (Thermo Fisher) (600 μL , 50 nM)を培地に加え、 37°C , 5% CO₂ 条件下で 10 分間インキュベーションした。培地を PBS(-)で 2 回洗浄した後、共焦点レーザー顕微鏡で細胞を観察した。

4-5-8. フローサイトメトリー

観察用ディッシュ($\phi 60$ mm)に 1×10^5 cells/mL に調製した HeLa 細胞の懸濁液を 4 mL 加え、 37°C , 5% CO₂ 条件下で 24 時間インキュベーションした。培養した HeLa 細胞から培地を除去し、PBS(-)で 2 回洗浄し、最終濃度が 100 μM になるように錯体 7b 溶液を 4 mL 加え、 37°C , 5% CO₂ 条件下で 1, 12 時間インキュベーションした。培地を PBS(-)で 2 回洗浄し、トリプシン(0.25%)で細胞をはがした。この溶液を遠心分離機にかけ、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、懸濁させ、再度

遠心分離機にかけた。溶液をアスピレーターで吸引した後、 $1 \times \text{BB}$ (1 mL)を細胞に加え、懸濁させた。この溶液を遠心分離機にかけ、溶液をアスピレーターで吸引した後、 $1 \times \text{BB}$ 溶液を加えて 1×10^6 cells/mL (100 μL)を調製した。Annexin V-FITC 溶液(5 μL)を溶液に加え、室温で 10 分間攪拌した後、遠心分離機にかけ、溶液をアスピレーターで吸引した。細胞に $1 \times \text{BB}$ 溶液(500 μL)を加えて懸濁させ、遠心分離機にかけ、アスピレーターで溶液を吸引した。 $1 \times \text{BB}$ 溶液(200 μL)を細胞に加えて懸濁させ、PI (5 μL)を加えてさらに懸濁させた。この細胞溶液(10,000 cells)を、channel BL1 (Filter 530/30, Filter Range 515/545)及び channel BL2 (Filter 574/26, Filter Range 561/587)を用いて、Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer によって観察した。

4-5-9. Comet assay による核内 DNA 損傷の検出

Comet assay は、Trevigen 社製 CometAssay[®] Electrophoresis System II を用いて測定を行った。lysis solution は、使用 20 分前に 4°C で保存した。LMAgarose は使用前に沸騰した水で完全に溶解させた後、20 分間 37°C で維持した。 1×10^5 cells/mL の溶液を溶解させた LMAgarose と 1:10 (v/v)の比率で混合させ、直ちにピペッティングによって攪拌した後、サンプルガラスに広げた。これらのスライドを 1 時間、4°C の暗所で保存すると、0.5 mm 程度の輪が CometSlide[™] に観察された。これらのスライドを 4°C の lysis solution に 30 分間浸し、溶液を除き、pH > 13 のアルカリ溶液に 20 分間、室温の暗所で保存した。約 850 mL のアルカリ電気泳動溶液を CometAssay[®] ES unit に加え、スライドを静置した。この後、30 分間 21 V で電気泳動を行った。電気泳動溶液を除き、5 分間蒸留水に浸す作業を 2 回繰り返した後、5 分間 70%エタノール溶液に浸した。スライドを 37°C で 10–15 分間乾燥させた後、TE buffer に溶解させた SYBR[®] Gold 溶液(100 μL)を加え、暗所で 30 分間染色させた。SYBR 溶液を除き、蒸留水で簡単に洗浄した後、37°C で乾燥させた。最後に、これらのスライドを蛍光顕微鏡で観察した。

4-6. 参考文献

- [1] Boulikas, T.; Pantos, A.; Bellis, E.; Christofis, P. Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms. *Cancer Ther.* **2007**, *5*, 537–583.
- [2] Umezawa, H.; Maeda, K.; Takeuchi, T.; Okami, Y. New antibiotics, bleomycin A and B. *J. Antibiot.* **1966**, *19*, 200–209.
- [3] Florea, A.-M.; Büsselberg, D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induces Side Effects. *Cancers* **2011**, *3*, 1351–1371.
- [4] Zhou, D.; Shao, L.; Spitz, D. R. Reactive Oxygen Species in Normal and Tumor Stem Cells. *Adv. Cancer Res.* **2014**, *122*, 1–67.
- [5] Nogueira, V.; Hay, N. Molecular Pathways: Reactive Oxygen Species Homeostasis in Cancer Cells and Implications for Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 4309–4314.
- [6] Aykin-Burns, N.; Ahmad, I. M.; Zhu, Y.; Oberley, L. W.; Spitz, D. R. Increased levels of superoxide and H₂O₂ mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation. *Biochem. J.* **2009**, *418*, 29–37.
- [7] Kadoya, Y.; Fukui, K.; Hata, M.; Miyano, R.; Hitomi, Y.; Yanagisawa, S.; Kubo, M.; Kodera, M. Oxidative DNA Cleavage, Formation of μ -1,1-Hydroperoxo Species, and Cytotoxicity of Dicationic Copper(II) Complex Supported by a *p*-Cresol-Derived Amide-Tether Ligand. *Inorg. Chem.* **2019**, *58*, 14294–14298.
- [8] (a) Ngo, H. T.; Liu, X.; Jolliffe, K. A. Anion recognition and sensing with Zn(II)–dipicolylamine complexes. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 4928–4965. (b) Elwell, C. E.; Gagnon, N. L.; Neisen, B. D.; Dhar, D.; Spaeth, A. D.; Yee, G. M.; Tolman, W. B. Copper–Oxygen Complexes Revisited: Structures, Spectroscopy, and Reactivity. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 2059–2107.
- [9] (a) Torelli, S.; Belle, C.; Gautier-Luneau, I.; Pierre, J. L.; Sain-Aman, E.; Latour, J. M.; Pape, L. L.; Luneau, L. D. pH-Controlled Change of the Metal Coordination in a Dicopper(II) Complex of the Ligand H-BPMP: Crystal Structures, Magnetic Properties, and Catecholase Activity. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 3526–3536. (b) Nishida, Y.; Shimo, H.; Maehara, H.; Kida, S. Crystal Structures and Magnetic Properties of Binuclear Five-coordinate Copper(II) Complexes with a Phenolate Bridge and their Catalytic Functions in Multielectron Redox Reactions. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1985**, *9*, 1945–1951. (c) Maloney, J. J.; Glowgoski, M.; Rohrbach, D. F.; Urbach, F. L. Structural and spectroscopic aspects of a strained dicopper complex with a tripodal binucleating ligand. *Inorg. Chim. Acta* **1987**, *2*, L33–L35. (d) Smith, S. J.; Noble, C. J.; Palmer, R. C.; Hanson, G. R.; Schenk, G.; Gahan, L. R.; Riley, M. J. Structural and spectroscopic studies of a model for catechol oxidase. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 499–510. (e) Holz, R. C.; Brink, J. M. Proton NMR Spectroscopy as a Probe of Dinuclear Copper(II) Centers. *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 4609–4610. (f) Buitrago, E.; Vuillamy, A.; Boumendjel, A.; Yi, W.; Gellon, G.; Hardré, R.; Philouze, C.; Serratrice, G.; Jamet, H.; Réglie, M.; Belle, C. Exploring the Interaction of N/S Compounds

- with a Dicopper Center: Tyrosinase Inhibition and Model Studies. *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 12848–12858. (g) Massoud, S. S.; Junk, T.; Mikuriya, M.; Naka, Y.; Mautner, F. A. Synthesis, structure and magnetic characterization of dinuclear copper(II) complexes of 2,6-bis[bis(pyridine-2-ylmethyl)aminomethyl]-4-methylphenol. *Inorg. Chem. Commun.* **2014**, *50*, 48–50.
- [10] (a) Root, D. E.; Mahroof-Tahir, M.; Karlin, K. D.; Solomon, E. I. Effect of Protonation on Peroxo-Copper Bonding: Spectroscopic and Electronic Structure Study of $[\text{Cu}_2(\text{UN-O})(\text{OOH})]^{2+}$. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 4838–4848. (b) Kindermann, N.; Dechert, S.; Demeshko, S.; Meyer, F. Proton-Induced, Reversible Interconversion of a μ -1,2-Peroxo and a μ -1,1-Hydroperoxo Dicopper(II) Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 8002–8005.
- [11] Itoh, K.; Hayashi, H.; Furutachi, H.; Matsumoto, T.; Nagatomo, S.; Tosha, T.; Terada, S.; Fujinami, S.; Suzuki, M.; Kitagawa, T. Synthesis and Reactivity of a (μ -1,1-Hydroperoxo)(μ -hydroxo)dicopper(II) Complex: Ligand Hydroxylation by a Bridging Hydroperoxo Ligand. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5212–5223.
- [12] Kaur, P.; Singh, K. Recent advances in the application of BODIPY in bioimaging and chemosensing. *J. Mater. Chem. C.* **2019**, *7*, 11361–11405.
- [13] Kodera, M.; Kadoya, Y.; Fukui, K.; Nomura, A.; Hitomi, Y.; Kitagishi, H. Acceleration of Hydrolytic DNA Cleavage by Dicopper(II) Complexes with *p*-Cresol-Derived Dinucleating Ligands at Slightly Acidic pH and Mechanistic Insights. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2019**, *92*, 739–747.
- [14] (a) Friscourt, F.; Fahrni, C. J.; Boons, G.-J. A Fluorogenic Probe for the Catalyst-Free Detection of Azide-Tagged Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18809–18815. (b) Ma, L.; Tu, C.; Le, P.; Chitoor, S.; Lim, S. J.; Zahid, M. U.; Teng, K. W.; Ge, P.; Selvin, P. R.; Smith, A. M. Multidentate Polymer Coatings for Compact and Homogeneous Quantum Dots with Efficient Bioconjugation. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3382–3394.
- [15] Nepomnyashchii, A. B.; Pistner, A. J.; Bard, A. J.; Rosenthal, J. Synthesis, Photophysics, Electrochemistry and Electrogenenerated Chemiluminescence of PEG-Modified BODIPY Dyes in Organic and Aqueous Solutions. *J. Phys. Chem. C.* **2013**, *117*, 5599–5609.
- [16] Addison, A. W.; Rao, T. N.; Reedijk, J.; Rijn, J. V.; Verschoor, G. C. Synthesis, structure, and spectroscopic properties of copper(II) compounds containing nitrogen-sulphur donor ligands; the crystal and molecular structure of aqua[1,7-bis(*N*-methylbenzimidazol-2'-yl)-2,6-dithiaheptane]copper(II) perchlorate. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1984**, *7*, 1349–1356.
- [17] Kurbah, S. D.; Kumar, A.; Syiemlieh, I.; Dey, A. K.; Lal, R. A. Synthesis, characterization, structure and properties of heterobimetallic complexes $[\text{CuNi}(\mu\text{-OAc})(\mu\text{-OH})(\mu\text{-OH}_2)(\text{bpy})_2](\text{BF}_4)_2$ and $[\text{CuNi}(\text{bz})_3(\text{bpy})_2]\text{ClO}_4$ from 2,2' bipyridine. *J. Mol. Struct.* **2018**, *1154*, 535–542.
- [18] Zhang, Y.; Liu, L.-Z.; Peng, Y.-D.; Li, N.; Dong, W.-K. Structurally characterized trinuclear nickel(II) and copper(II) Salamo-type complexes: syntheses, Hirshfeld analyses and fluorescent

- properties. *Transit. Met. Chem.* **2019**, *44*, 627–639.
- [19] Tjioe, L.; Joshi, T.; Forsyth, C. M.; Mobaraki, B.; Murray, K. S.; Brugger, J.; Graham, B.; Spiccia, L. Phosphodiester Cleavage Properties of Copper(II) Complexes of 1,4,7-Triazacyclononane Ligands Bearing Single Alkyl Guanidine Pendants. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 939–953.
- [20] Dong, X.; Wang, X.; Lin, M.; Sun, H.; Yang, X.; Guo, Z. Promotive Effect of the Platinum Moiety on the DNA Cleavage Activity of Copper-Based Artificial Nucleases. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 2541–2549.
- [21] Aruoma, O. I.; Halliwell, B.; Dizdaroglu, M. Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical-generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 13024–13028.
- [22] Wang, J.-T.; Xia, Q.; Zheng, X.-H.; Chen, H.-Y.; Chao, H.; Mao, Z.-W.; Ji, L.-N. An effective approach to artificial nucleases using copper(II) complexes bearing nucleobases. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 2128–2136.
- [23] Li, L.; Sarjeant, A. A. N.; Vance, M. A.; Zakharov, L. N.; Rheingold, A. L.; Solomon, E. I.; Karlin, K. D. Exogenous Nitrile Substrate Hydroxylation by a New Dicopper-Hydroperoxide Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15360–15361.
- [24] HeLa is a human cell line derived from cervical cancer cells taken from Henrietta Lacks, a patient who died of cancer.
- [25] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
- [26] Eshkourfu, R.; Čobeljić, B.; Vujčić, M.; Turel, I.; Pevec, A.; Špešćić, K.; Zec, M.; Radulović, S.; Srdić-Radić, T.; Mitić, D.; Andjelković, K.; Sladić, D. Synthesis, characterization, cytotoxic activity and DNA binding properties of the novel dinuclear cobalt(III) complex with the condensation product of 2-acetylpyridine and malonic acid dihydrazide. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 1196–1203.
- [27] Chen, Z.; Wang, X.; Zhu, Y.; Li, Y.; Guo, Z. Selective guanosine binding and cytotoxicity of a benzimidazole derived dinickel complex. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 1894–1902.
- [28] Zhao, C.; Zhang, Y.; Wang, X.; Cao, J. Development of BODIPY-based fluorescent DNA intercalating probes. *J. Photochem. Photobiol. A* **2013**, *264*, 41–47.

4-7. Supporting Information

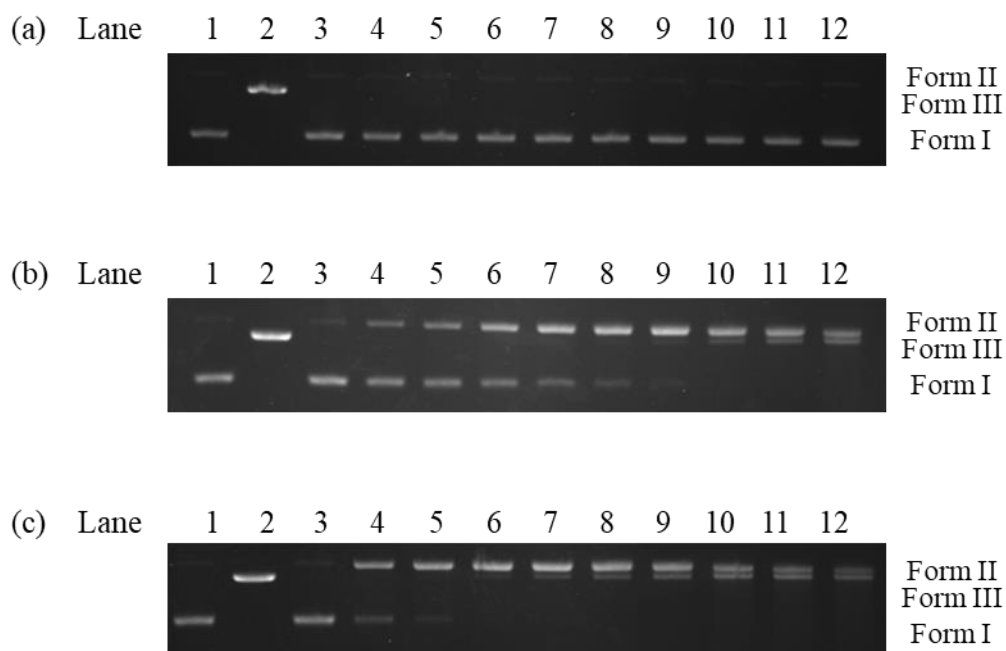


Figure S4-1. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of **7b** and H₂O₂ (50 μ M) at pH 6.0. (a)–(c) corresponded to complex concentration of 0, 10, and 30 μ M, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min, respectively.

Table S4-1. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 7b at pH 6.0

Complex (μM)	H_2O_2 (μM)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
0	50	0	95.7 ± 0.4	4.3 ± 0.4	-
		5	95.4 ± 0.3	4.6 ± 0.3	-
		10	95.2 ± 0.1	4.8 ± 0.1	-
		20	95.1 ± 0.1	4.9 ± 0.1	-
		30	95.0 ± 0.1	5.0 ± 0.1	-
		40	94.8 ± 0.2	5.2 ± 0.2	-
		60	94.5 ± 0.1	5.5 ± 0.1	-
		120	94.3 ± 0.2	5.7 ± 0.2	-
		180	94.0 ± 0.4	6.0 ± 0.4	-
		300	92.9 ± 1.1	7.1 ± 1.1	-
10	50	0	94.4 ± 0.1	5.6 ± 0.1	-
		5	76.2 ± 1.4	23.8 ± 1.4	-
		10	70.6 ± 0.6	29.4 ± 0.6	-
		20	46.5 ± 0.7	53.5 ± 0.7	-
		30	31.1 ± 0.5	68.9 ± 0.5	-
		40	18.1 ± 1.0	81.4 ± 1.4	0.5 ± 0.5
		60	6.4 ± 0.5	91.6 ± 0.3	2.0 ± 0.2
		120	0.0 ± 0.0	92.3 ± 0.1	7.7 ± 0.1
		180	0.0 ± 0.0	85.8 ± 1.5	14.2 ± 1.5
		300	0.0 ± 0.0	72.9 ± 2.5	27.1 ± 2.5
30	50	0	94.8 ± 0.1	5.2 ± 0.1	-
		5	25.4 ± 2.0	74.6 ± 2.0	-
		10	7.4 ± 0.9	91.7 ± 0.5	0.9 ± 0.7
		20	0.4 ± 0.6	95.2 ± 0.1	4.4 ± 0.6
		30	0.0 ± 0.0	92.1 ± 1.0	7.9 ± 1.0
		40	0.0 ± 0.0	87.1 ± 0.9	12.9 ± 0.9
		60	0.0 ± 0.0	79.9 ± 1.4	20.1 ± 1.4
		120	0.0 ± 0.0	65.1 ± 1.8	34.9 ± 1.8
		180	0.0 ± 0.0	55.6 ± 4.1	44.4 ± 4.1
		300	0.0 ± 0.0	45.2 ± 3.5	54.8 ± 3.5

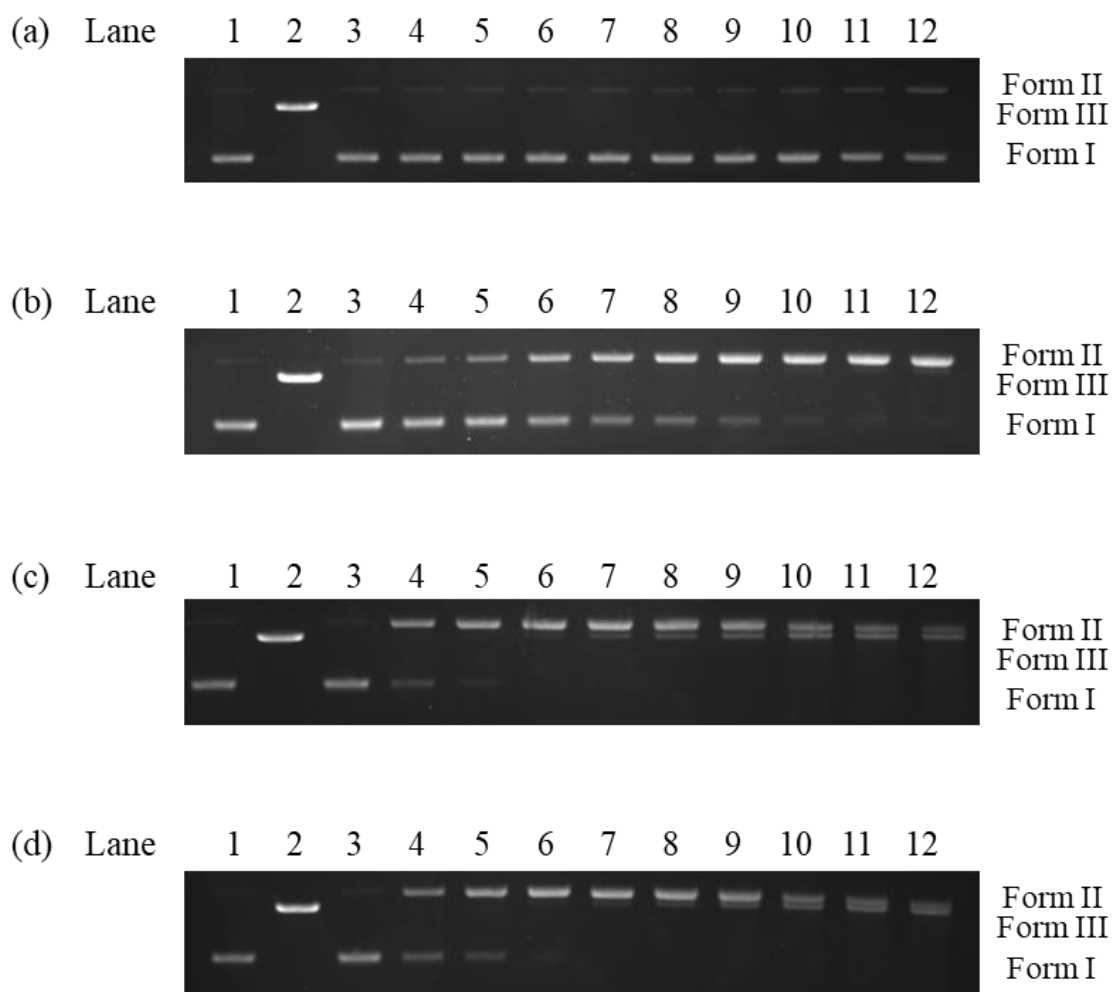


Figure S4-2. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of **7b** (30 μ M) and H₂O₂ at pH 6.0. (a)–(d) corresponded to H₂O₂ concentration of 0, 10, 30, and 50 μ M, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min, respectively.

Table S4-2. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 7b at pH 6.0

Complex (μM)	H_2O_2 (μM)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
30	0	0	94.8 ± 0.4	5.2 ± 0.4	-
		5	94.2 ± 0.4	5.8 ± 0.4	-
		10	93.6 ± 0.3	6.4 ± 0.3	-
		20	93.5 ± 0.3	6.5 ± 0.3	-
		30	93.5 ± 0.2	6.5 ± 0.2	-
		40	93.1 ± 0.1	6.9 ± 0.1	-
		60	92.5 ± 0.4	7.5 ± 0.4	-
		120	91.3 ± 0.4	8.7 ± 0.4	-
		180	85.7 ± 1.9	14.3 ± 1.9	-
		300	73.7 ± 1.7	26.3 ± 1.7	-
30	10	0	94.1 ± 1.2	5.9 ± 1.2	-
		5	81.7 ± 0.6	18.3 ± 0.6	-
		10	71.6 ± 1.2	28.4 ± 1.2	-
		20	49.4 ± 0.6	50.6 ± 0.6	-
		30	35.4 ± 0.8	64.6 ± 0.8	-
		40	26.1 ± 0.7	73.9 ± 0.7	-
		60	15.0 ± 0.5	84.0 ± 0.3	0.9 ± 0.7
		120	4.7 ± 0.5	93.6 ± 1.0	1.7 ± 0.6
		180	3.2 ± 0.5	94.2 ± 0.7	2.6 ± 0.5
		300	1.9 ± 0.6	94.9 ± 1.3	3.2 ± 0.8
30	30	0	95.0 ± 0.1	5.0 ± 0.1	-
		5	54.7 ± 1.0	45.3 ± 1.0	-
		10	32.6 ± 2.2	67.4 ± 2.2	-
		20	10.4 ± 0.7	89.6 ± 0.7	-
		30	4.0 ± 0.2	93.8 ± 0.3	2.3 ± 0.1
		40	0.9 ± 0.9	94.6 ± 0.7	4.5 ± 0.2
		60	0.0 ± 0.0	90.7 ± 0.9	9.3 ± 0.9
		120	0.0 ± 0.0	80.8 ± 0.1	19.2 ± 0.1
		180	0.0 ± 0.0	74.2 ± 0.1	25.8 ± 0.1
		300	0.0 ± 0.0	69.7 ± 1.2	30.3 ± 1.2

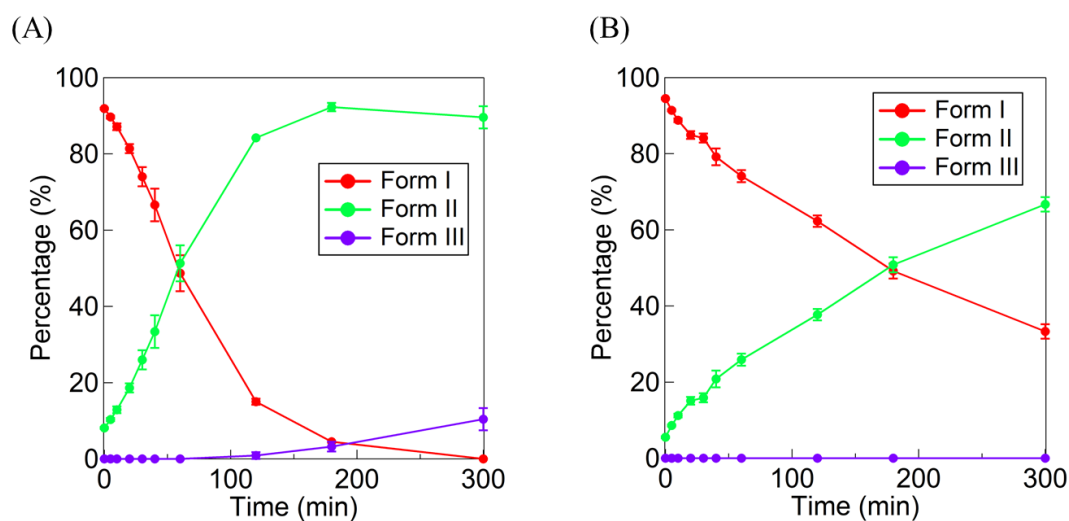


Figure S4-3. DNA cleavage profile promoted by (A) **4** and (B) **8**, respectively. Time courses for the decrease of % of Form I (red), increase of % of Form II (green), and Form III (purple) at pH 6.0. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [pUC19 DNA] = 50 μ M bp, [complex] = 30 μ M, [H₂O₂] = 50 μ M, [Cu(OAc)₂] = 70 μ M at 37°C for 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min. Experiments were carried out at least three times.

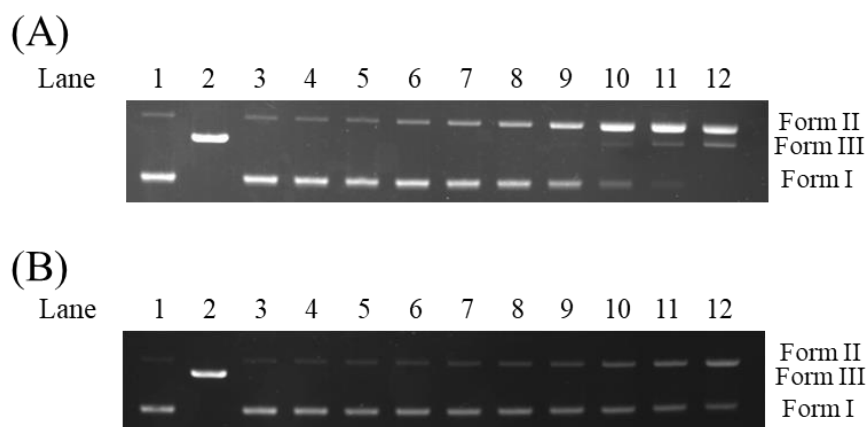


Figure S4-4. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of (A) **4** and (B) **8** (30 μ M) and H₂O₂ (50 μ M) at pH 6.0, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min, respectively.

Table S4-3. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 4 and 8 (30 μ M) in the presence of H₂O₂ (50 μ M) at pH 6.0

Complex	4			8		
Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
0	91.9 \pm 0.2	8.1 \pm 0.2	-	94.5 \pm 0.2	5.5 \pm 0.2	-
5	89.7 \pm 0.4	10.3 \pm 0.4	-	91.4 \pm 0.2	8.6 \pm 0.2	-
10	87.1 \pm 0.9	12.9 \pm 0.9	-	88.8 \pm 0.5	11.2 \pm 0.5	-
20	81.4 \pm 1.2	18.6 \pm 1.2	-	84.9 \pm 1.0	15.1 \pm 1.0	-
30	74.0 \pm 2.5	26.0 \pm 2.5	-	84.1 \pm 1.2	15.9 \pm 1.2	-
40	66.6 \pm 4.3	33.4 \pm 4.3	-	79.2 \pm 2.2	20.8 \pm 2.2	-
60	48.7 \pm 4.7	51.3 \pm 4.7	-	74.1 \pm 1.6	25.9 \pm 1.6	-
120	15.0 \pm 0.8	84.2 \pm 0.1	0.9 \pm 0.9	62.3 \pm 1.5	37.7 \pm 1.5	-
180	4.5 \pm 0.1	92.3 \pm 1.1	3.2 \pm 1.3	49.2 \pm 2.0	50.8 \pm 2.0	-
300	0.0 \pm 0.0	89.6 \pm 2.9	10.4 \pm 2.9	33.3 \pm 1.9	66.7 \pm 1.9	-

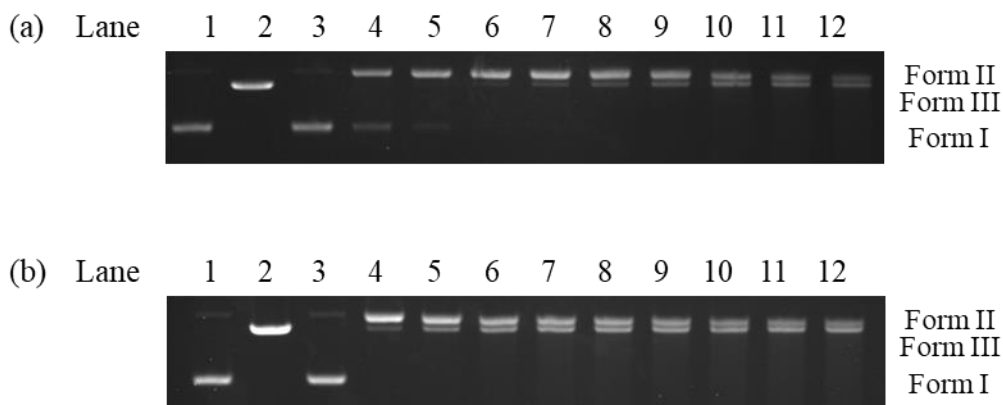


Figure S4-5. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of **7b** (30 μ M) and H₂O₂ (50 μ M) at pH 6.0 (MES) and 7.4 (MOPS). (a), (b) corresponded to pH 6.0 and 7.4, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min, respectively.

Table S4-4. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 7b (30 μ M) in the presence of H₂O₂ (50 μ M) at pH 6.0, and 7.4

pH	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
6.0	0	94.8 \pm 0.1	5.2 \pm 0.1	-
	5	25.4 \pm 2.0	74.6 \pm 2.0	-
	10	7.4 \pm 0.9	91.7 \pm 0.5	0.9 \pm 0.7
	20	0.4 \pm 0.6	95.2 \pm 0.1	4.4 \pm 0.6
	30	0.0 \pm 0.0	92.1 \pm 1.0	7.9 \pm 1.0
	40	0.0 \pm 0.0	87.1 \pm 0.9	12.9 \pm 0.9
	60	0.0 \pm 0.0	79.9 \pm 1.4	20.1 \pm 1.4
	120	0.0 \pm 0.0	65.1 \pm 1.8	34.9 \pm 1.8
	180	0.0 \pm 0.0	55.6 \pm 4.1	44.4 \pm 4.1
	300	0.0 \pm 0.0	45.2 \pm 3.5	54.8 \pm 3.5
7.4	0	94.7 \pm 0.3	5.3 \pm 0.3	-
	5	0.0 \pm 0.0	93.2 \pm 1.1	6.8 \pm 0.1
	10	0.0 \pm 0.0	80.0 \pm 1.3	20.0 \pm 1.8
	20	0.0 \pm 0.0	67.8 \pm 1.3	32.2 \pm 1.3
	30	0.0 \pm 0.0	63.4 \pm 1.3	36.6 \pm 1.6
	40	0.0 \pm 0.0	61.6 \pm 2.3	38.4 \pm 1.4
	60	0.0 \pm 0.0	57.3 \pm 0.7	42.7 \pm 1.5
	120	0.0 \pm 0.0	52.1 \pm 1.7	47.9 \pm 2.7
	180	0.0 \pm 0.0	49.3 \pm 3.3	50.7 \pm 3.5
	300	0.0 \pm 0.0	46.4 \pm 3.4	53.6 \pm 4.2

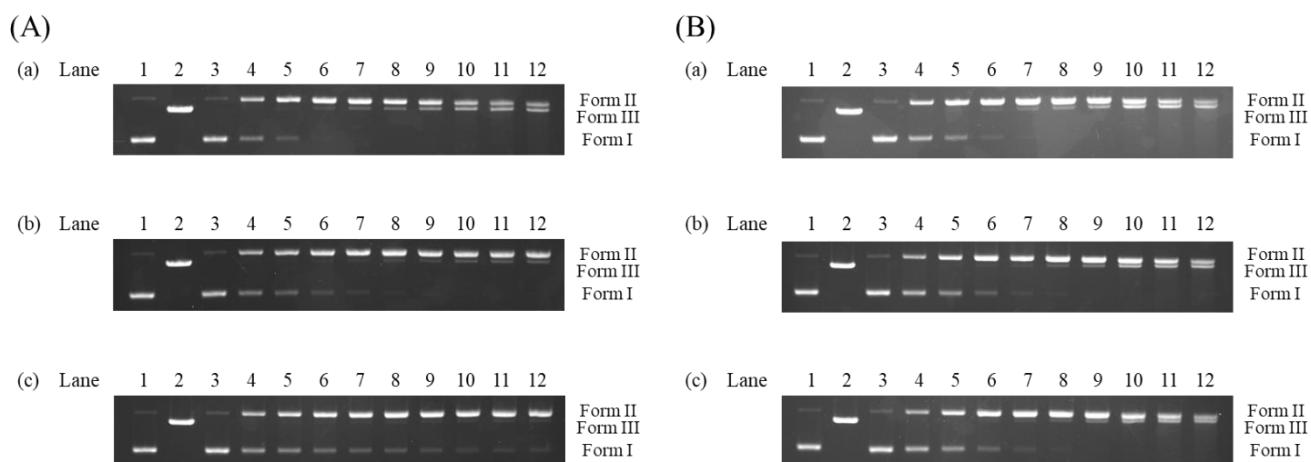


Figure S4-6. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of **7b** (30 μ M) and H₂O₂ (50 μ M) at pH 6.0. (a)–(c) corresponded to (A) KI and (B) DMSO concentrations of 1, 5, and 10 mM, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lane 3–12: corresponding to the time of 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min, respectively.

Table S4-5. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 7b (30 μ M) in the presence of H₂O₂ (50 μ M) and inhibitors at pH 6.0

Inhibitor		KI			DMSO		
Conc. (mM)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
1	0	92.9 \pm 0.7	7.1 \pm 0.7	-	92.7 \pm 0.7	7.3 \pm 0.7	-
	5	34.5 \pm 0.9	65.5 \pm 0.9	-	44.0 \pm 2.0	56.0 \pm 2.0	-
	10	11.9 \pm 1.5	87.3 \pm 1.7	0.8 \pm 0.2	26.0 \pm 3.4	74.0 \pm 3.4	-
	20	2.0 \pm 0.7	94.5 \pm 1.8	3.5 \pm 1.2	7.4 \pm 1.6	91.3 \pm 1.1	1.3 \pm 0.6
	30	0.0 \pm 0.0	92.2 \pm 1.7	7.8 \pm 1.7	2.7 \pm 1.4	93.1 \pm 0.7	4.2 \pm 1.9
	40	0.0 \pm 0.0	86.7 \pm 2.2	13.3 \pm 2.2	0.0 \pm 0.0	91.8 \pm 2.7	8.2 \pm 2.7
	60	0.0 \pm 0.0	75.8 \pm 2.6	24.2 \pm 2.6	0.0 \pm 0.0	83.8 \pm 3.4	16.2 \pm 3.4
	120	0.0 \pm 0.0	62.9 \pm 1.1	37.1 \pm 1.1	0.0 \pm 0.0	65.2 \pm 3.2	34.8 \pm 3.2
	180	0.0 \pm 0.0	55.8 \pm 0.9	44.2 \pm 0.9	0.0 \pm 0.0	57.1 \pm 2.7	42.9 \pm 2.7
	300	0.0 \pm 0.0	52.8 \pm 1.4	47.2 \pm 1.4	0.0 \pm 0.0	48.0 \pm 0.8	52.0 \pm 0.8
5	0	93.4 \pm 1.1	6.6 \pm 1.1	-	93.6 \pm 0.4	6.4 \pm 0.4	-
	5	38.6 \pm 1.4	61.4 \pm 1.4	-	55.5 \pm 1.9	44.5 \pm 1.9	-
	10	22.8 \pm 0.9	77.2 \pm 0.9	-	32.3 \pm 1.5	67.7 \pm 1.5	-
	20	10.9 \pm 0.8	87.9 \pm 1.0	1.1 \pm 0.2	12.5 \pm 1.4	87.5 \pm 1.4	-
	30	5.9 \pm 0.6	92.7 \pm 0.8	1.4 \pm 0.2	3.7 \pm 1.1	93.9 \pm 1.2	2.5 \pm 1.3
	40	2.9 \pm 0.7	94.6 \pm 1.1	2.5 \pm 0.7	1.6 \pm 0.3	93.2 \pm 0.3	5.2 \pm 0.5
	60	2.4 \pm 0.2	92.9 \pm 0.5	4.8 \pm 0.4	0.0 \pm 0.0	90.0 \pm 1.4	10.0 \pm 1.4
	120	0.0 \pm 0.0	91.7 \pm 0.7	8.3 \pm 0.7	0.0 \pm 0.0	73.9 \pm 0.9	26.1 \pm 0.9
	180	0.0 \pm 0.0	90.8 \pm 0.6	9.2 \pm 0.6	0.0 \pm 0.0	65.6 \pm 1.6	34.4 \pm 1.6
	300	0.0 \pm 0.0	90.3 \pm 0.4	9.7 \pm 0.4	0.0 \pm 0.0	54.2 \pm 3.1	45.8 \pm 3.1
10	0	93.0 \pm 0.6	7.0 \pm 0.6	-	92.4 \pm 0.6	7.6 \pm 0.6	-
	5	45.7 \pm 0.1	54.3 \pm 0.1	-	56.3 \pm 1.4	43.7 \pm 1.4	-
	10	31.6 \pm 0.5	68.4 \pm 0.5	-	33.0 \pm 0.8	67.0 \pm 0.8	-
	20	22.3 \pm 2.1	77.7 \pm 2.1	-	12.8 \pm 0.1	87.2 \pm 0.1	-
	30	17.3 \pm 1.5	82.2 \pm 1.7	0.5 \pm 0.3	4.4 \pm 0.2	93.8 \pm 0.9	1.7 \pm 0.8
	40	13.6 \pm 0.9	85.7 \pm 1.0	0.7 \pm 0.2	1.8 \pm 0.2	94.0 \pm 1.4	4.2 \pm 1.3
	60	9.9 \pm 1.3	89.1 \pm 1.4	0.9 \pm 0.3	0.0 \pm 0.0	91.0 \pm 1.1	9.0 \pm 1.1
	120	7.4 \pm 1.1	91.5 \pm 1.1	1.1 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	78.1 \pm 0.9	21.9 \pm 0.9
	180	7.0 \pm 1.7	91.6 \pm 1.7	1.4 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	68.6 \pm 0.2	31.4 \pm 0.2
	300	7.1 \pm 1.2	91.2 \pm 0.9	1.8 \pm 0.4	0.0 \pm 0.0	58.6 \pm 1.7	41.4 \pm 1.7

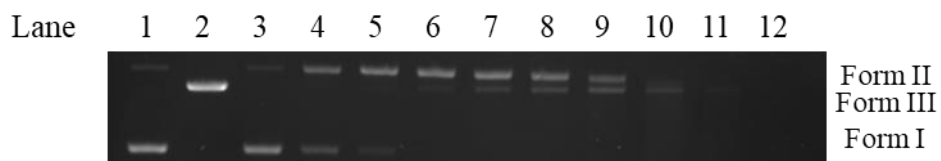


Figure S4-7. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μM bp) in the presence of **9** (30 μM) and H_2O_2 (50 μM) at pH 6.0. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min, respectively.

Table S4-6. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with **9** at pH 6.0

Complex (μM)	H_2O_2 (μM)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
		0	91.7 ± 0.3	8.3 ± 0.3	-
		5	36.2 ± 4.8	63.8 ± 4.8	-
		10	13.5 ± 2.1	85.2 ± 1.6	1.3 ± 0.6
		20	0.0 ± 0.0	94.8 ± 0.7	5.2 ± 0.7
30	50	30	0.0 ± 0.0	88.2 ± 1.5	11.8 ± 1.5
		40	0.0 ± 0.0	79.3 ± 3.2	20.7 ± 3.2
		60	0.0 ± 0.0	56.4 ± 2.5	43.6 ± 2.5
		120	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		180	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		300	n. d.*	n. d.*	n. d.*

*n. d. means cannot determine.

第五章：p-cresol-2,6-bis(dpa^{4-X}) amide-tether 配位子の二核銅(II)錯体の細胞毒性に及ぼす電子効果及び細胞内可視化による細胞毒性発現の推定機構

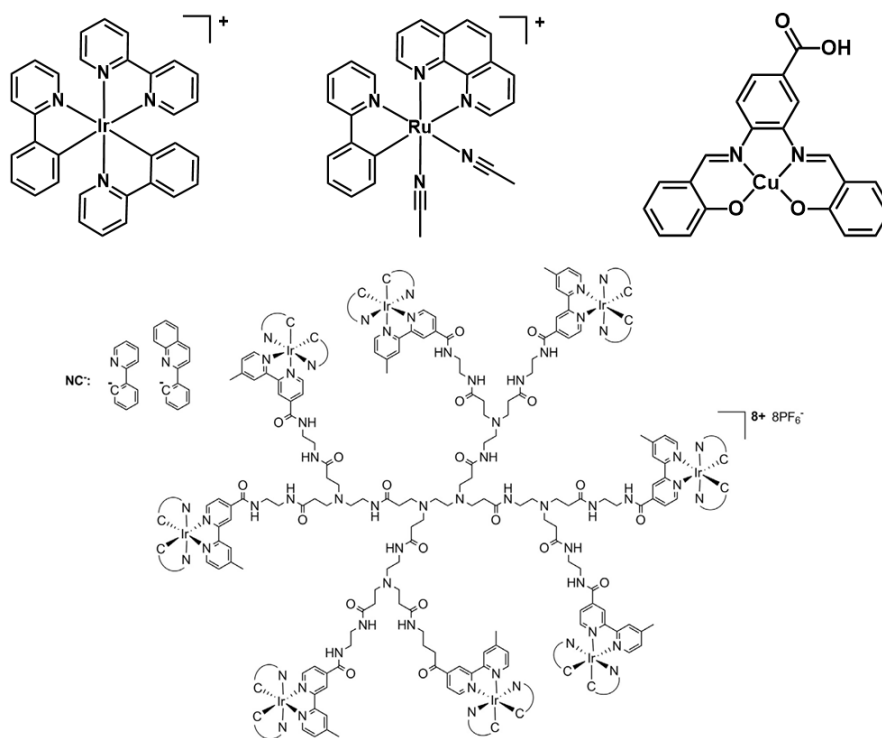
5-1. 要約

第四章では、ペンダント基として di(2-pyridylmethyl)amine (dpa) を amide-tether で導入した配位子 HL1^{4-H} (2,6-bis[N,N-di(2-pyridylmethylcarboxyamido)]-p-cresol) の二核銅(II)錯体 [Cu₂(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L1^{4-H})](OAc) (**7b**) は、対応する methylene-tether 錯体と比較して高い酸化的 DNA 切断活性と細胞毒性を示すこと、及び、肺、膵臓細胞に対してがん細胞選択性を示すことを明らかにした。また、**7b** はミトコンドリア及び核小体内の DNA または RNA を切断することで細胞毒性を示すという知見が得られた。しかしながら、**7b** の HeLa 細胞に対する IC₅₀ 値は 72.8 μM であり、現在臨床利用されている抗がん剤と比較しても依然として高いことが問題点である。我々は、これまで p-cresol の 2,6 位に導入するペンダント基を変更することで細胞毒性が顕著に変化する知見を得ている。本章では、**7b** のペンダント基の構造を変化させることで細胞毒性を向上させることができるのではないかと考え、HL1^{4-H} 配位子の側鎖ピリジル基の 4 位に電子供与基や電子求引基を導入した新規二核化配位子 HL1^{4-X} [X = OMe and Cl] とその二核銅(II)錯体 [Cu₂(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L1^{4-OMe})]X [X = PF₆ (**10a**) and OAc (**10b**)] 及び [Cu₂(μ-1,3-OAc)₂(L1^{4-Cl})]X [X = ClO₄ (**11a**) and OAc (**11b**)] を合成し、単結晶 X 線構造解析や様々な分光学的測定によって構造を決定した。HeLa 細胞に対する細胞毒性を MTT assay によって評価したところ、**10b** 及び **11b** は **7b** と比較して約 7 倍及び 5 倍高い細胞毒性を示した。また、ヒト肺・膵臓細胞を用いた細胞毒性を評価した結果、**10b** 及び **11b** はがん細胞選択的に細胞毒性を及ぼすことが明らかになった。これらの錯体の細胞内挙動を可視化するため、**10b** 及び **11b** を boron dipyrromethene (Bodipy) で修飾した新規二核銅(II)錯体 [Cu₂(μ-OAc)₂(L2^{4-X})]⁺ [X = OMe (**12**) and Cl (**13**)] を合成し、その細胞内挙動を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、**12** 及び **13** は核やミトコンドリアではなく、ゴルジ体や小胞体に局在することが明らかになった。Comet assay を行った結果、**10b** 及び **11b** は核 DNA を切断していないことが確認された。これらの結果から、**10b** 及び **11b** はゴルジ体や小胞体にストレスを与えることでアポトーシスを誘導したと考えられる。

5-2. 緒言

近年、小胞体やゴルジ体に対して細胞毒性を発現するいくつかの化合物は、がん細胞と正常細胞の選択性を示すことから、小胞体やゴルジ体が抗がん剤の有望なターゲットとして注目を集めている^[1]。小胞体は真核細胞内において最大の細胞小器官であり、細胞内ではタンパク質の翻訳後修飾、折りたたみ、脂質及びステロイドの合成、炭水化物の代謝、カルシウムの貯蔵や放出などの様々な役割を担っている^[2]。このような小胞体の機能を妨げると、小胞体ストレス応答が生じ、ミトコンドリアを介したアポトーシスが起ることが知られている^[3]。小胞体と同じく、ゴルジ体もまた分泌経路の中心的な細胞小器官であり、小胞体で合成されたタンパク質の糖鎖修飾や運搬に関与している^[4]。ゴルジ体の構造及び機能の変化は、パーキンソン病やアルツハイマー病などの病理学的特徴として知られている^[4b,5]。これまで、有機化合物が小胞体やゴルジ体にストレスを与える化合物として研究されてきたが、近年では金属錯体に注目が集まっている^[1b]。イリジウムやルテニウムなどの第2遷移系列や第3遷移系列の金属を中心金属に持つ錯体が小胞体やゴルジ体に局在し、ストレスを与えることで細胞死を誘導するという報告例がある^[1a]。しかし、銅や鉄を持つ金属錯体の報告例は少ない(Chart 5-1)^[1b]。前者は生体必須元素ではなく、代謝が困難という問題点があるため、銅や鉄などの生体内に存在する金属の錯体を用いて小胞体やゴルジ体にストレスを与えることができれば、副作用の少ない抗がん剤などの開発に研究基盤を与えることが期待される。

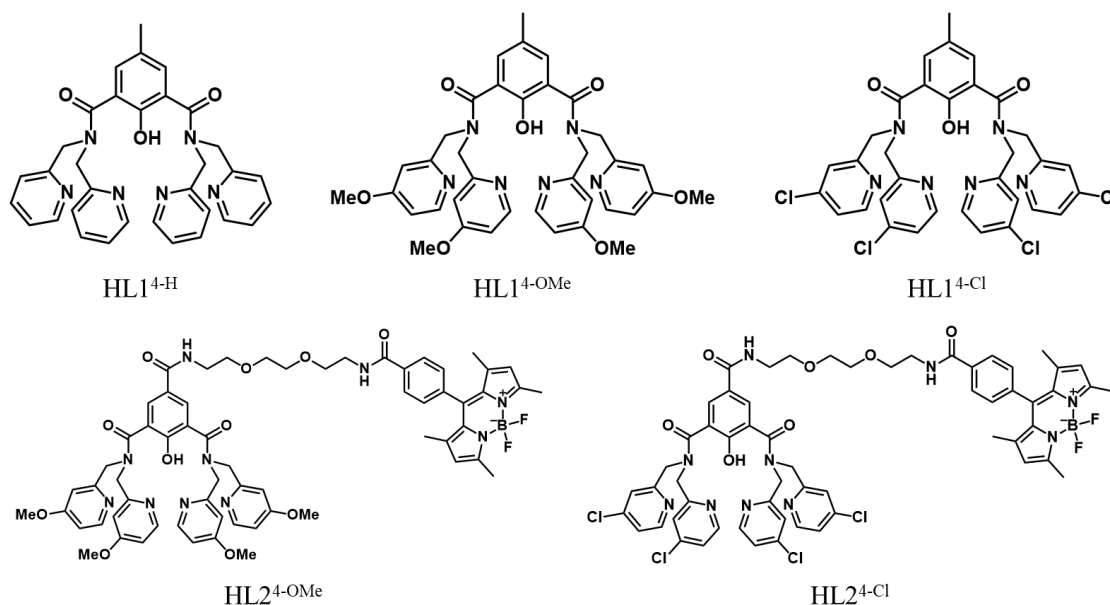
Chart 5-1. Metal complexes proposed for the staining of the endoplasmic and the Golgi apparatus



第四章では、*p*-cresol-2,6-bis(dpa^{4H})配位子(HL1^{4H})の二核銅(II)錯体[Cu₂(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L1^{4H})](OAc) (**7b**)が過酸化水素と反応して活性種を生成し、これが DNA を酸化切断する能力があることを示した。また、**7b** は、ミトコンドリア及び核小体内に局在化し、その DNA や RNA を切断していることが示唆された。本章では、**7b** のペンダント基の電子的環境や親水疎水バランスを変化させることで細胞毒性を向上させることができるのではないかと考え、HL1^{4H} の側鎖ピリジル基の 4 位に電子供与基や電子求引基を導入した新規二核化配位子 HL1^{4X} [X = OMe and Cl]とその二核銅(II)錯体[Cu₂(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L1^{4OMe})]X [X = PF₆ (**10a**) and OAc (**10b**)]及び[Cu₂(μ-1,3-OAc)₂(L1^{4Cl})]X [X = ClO₄ (**11a**) and OAc (**11b**)]を合成した。これらの錯体は単結晶 X 線構造解析及び分光学的測定によって構造を決定した。HeLa 細胞に対しては、**10b**, **11b** のそれぞれが **7b** と比較して 7.3 及び 5.1 倍高い細胞毒性を示すことを見出し、また、**10b**, **11b** は正常細胞よりもがん細胞に対して高い細胞毒性を示した。

10b, **11b** の細胞内での作用機序を明らかにすることを目的として、細胞内可視化を試みた。第四章でも使用した Bodipy (boron dipyrromethene)を蛍光プローブとして用い、Bodipy^[6]で修飾した新規二核銅錯体 **12** 及び **13** を合成した。その結果、**10b** 及び **11b** はゴルジ体または小胞体に局在していることが示された。これらの結果と comet assay の結果より、**10b** 及び **11b** はゴルジ体または小胞体のストレス応答を発現させてアポトーシスを誘導していることが示唆された。Chart 5-2 に、本章で取り扱う配位子 HL1^{4X} [X = H, OMe, and Cl], HL2^{4X} [X = OMe and Cl]の化学構造を示す。

Chart 5-2. Chemical structures of HL1^{4X} [X = H, OMe, and Cl] and HL2^{4X} [X = OMe and Cl]

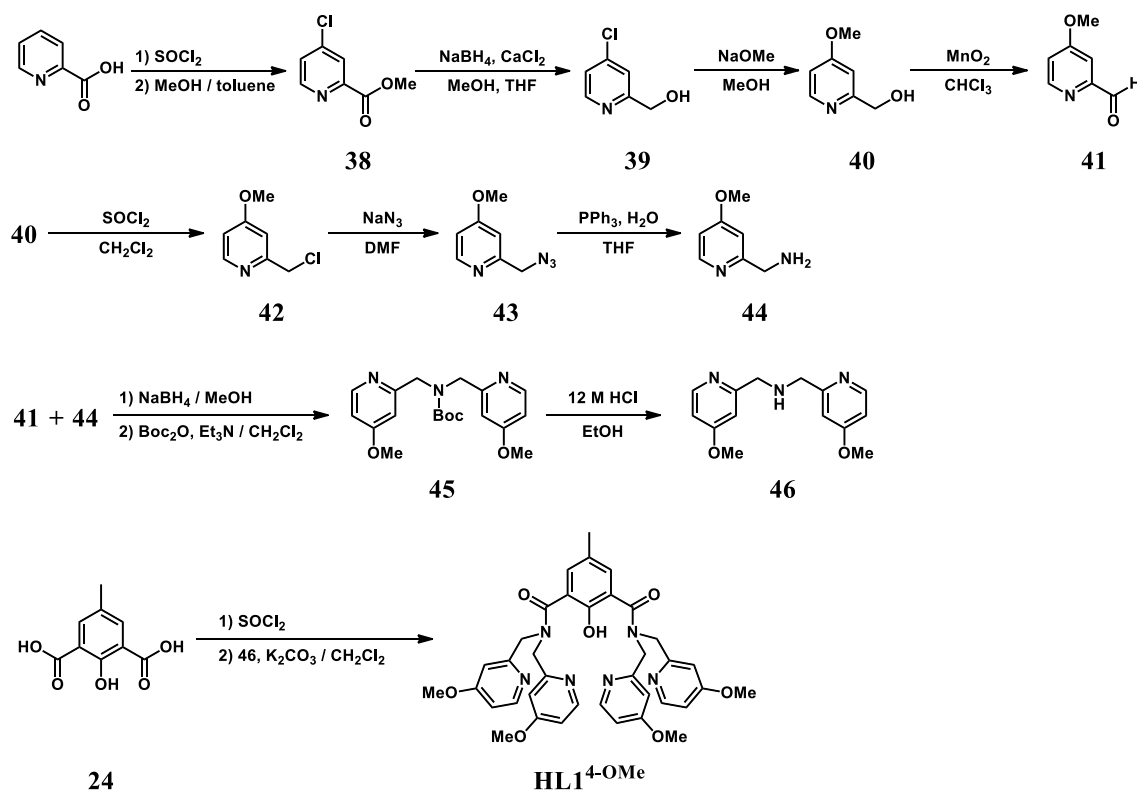


5-3. 結果と考察

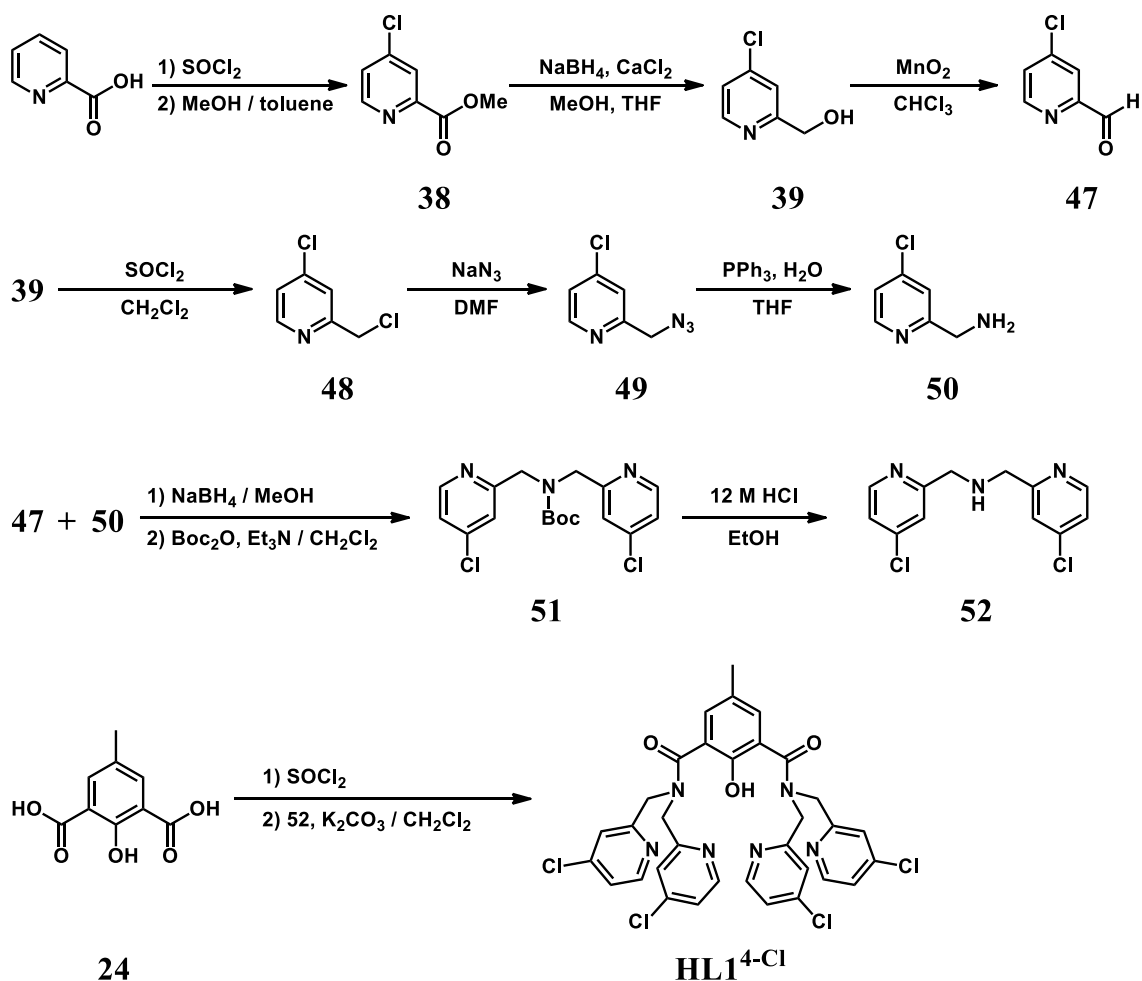
5-3-1. 配位子及び二核銅(II)錯体の合成

HL1^{4-OMe} 及び HL1^{4-Cl} の合成経路^[7,8]を、それぞれ Scheme 5-1, 5-2 に示す. HL1^{4-OMe}, HL1^{4-Cl}, **10a**, **10b**, **11a** 及び **11b** の詳細な合成項及び分光学的特徴は本章第 5 節に記載する. 4-methylphenol-2,6-dicarboxylic acid (**24**)は文献^[9]に従って合成した. HL1^{4-OMe} 及び HL1^{4-Cl}は, **24**を SOCl₂ との反応で酸クロリドに変換した後, di(2-pyridylmethyl)amine 誘導体(dpa^{4-X}) [X = OMe (**46**) and Cl (**52**)]をそれぞれ反応させて合成した. その際, 酸クロリドは精製せずにそのまま反応に用いた. また, 酸クロリドと dpa 誘導体との反応では K₂CO₃ を塩基として用いた. HL1^{4-OMe} と Cu(OAc)₂ の反応を MeCN 中で行うと, μ-1,1-OAc-μ-1,3-OAc 架橋を有する二核銅(II)錯体[Cu₂(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L1^{4-OMe})]X [X = PF₆ (**10a**) and OAc (**10b**)]が生成した. その一方で, HL1^{4-Cl} と Cu(OAc)₂ の反応を MeCN 中に行うと, (μ-1,3-OAc)₂ 架橋を有する二核銅(II)錯体[Cu₂(μ-1,3-OAc)₂(L1^{4-Cl})]X [X = ClO₄ (**11a**) and OAc (**11b**)]が生成した. **10a** 及び **11a** は単結晶 X 線構造解析に適した結晶が得られ, 結晶構造を決定した. その詳細については後述する.

Scheme 5-1. Synthesis of HL1^{4-OMe}



Scheme 5-2. Synthesis of HL1^{4-Cl}



5-3-2. 10a 及び 11a の構造

二核銅(II)錯体 **10a** と **11a** の構造は、単結晶 X 線構造解析によって決定した。Figure 5-1 に **10a** と **11a** の ORTEP 図、Table 5-1 に結晶構造の詳細、Table 5-2 に二核銅周辺の結合距離と結合角を示す。**10a** では、2つの銅(II)イオンが L1^{4-OMe} に組み込まれ、内因性の μ -OPh 及び外因性の μ -1,1-OAc と μ -1,3-OAc で架橋された構造を取っている。**10a** の銅(II)イオン周りの幾何学構造は、結合角から算出した τ 値によって決定した。 τ 値が 0 であれば四角錐構造、1 であれば三方両錐構造であると決定できる^[10]。**10a** の τ 値は $\tau_{\text{Cu}(1)} = 0.295$, $\tau_{\text{Cu}(2)} = 0.613$ であるため、それぞれの銅(II)イオンは dpa^{4-OMe} の 2つの窒素原子と μ -OPh- μ -1,1-OAc- μ -1,3-OAc 架橋の 3つの酸素原子によって配位された歪んだ四角錐構造を取ることが明らかになった。**11a** の τ 値は $\tau_{\text{Cu}(1)} = 0.580$, $\tau_{\text{Cu}(2)} = 0.390$ であるため、**10a** と **11a** の結晶構造は類似しているが、**11a** では **10a** の μ -1,1-OAc 架橋が μ -1,3-OAc 架橋に置き換わっている。この様に **11a** では補助配位子である AcO が電子供与性の高い μ -1,3-OAc 架橋構造をとっている。これはクロロ基の電子求引性により支持配位子 L1⁴⁻

^{Cl}のドナー性が低下したためと考えられる。実際に、それぞれの Cu–O_{AcO} 結合距離を比較したところ、**10a** の Cu(1)–O(4)と Cu(2)–O(4)の結合距離は、それぞれ 2.261(13), 2.089(14) Å であり、**11a** の Cu(1)–O(4)と Cu(2)–O(5)の結合距離 2.058(10), 2.0128(11) Å よりも長かった。これは **11a** では、AcO が電子供与性の高い μ -1,3-架橋の結合様式で銅により強く配位していることを示している。また、これらの値は、**10a** と **11a** における Cu(1)–O(2)と Cu(2)–O(3)の Cu–O_{AcO} 結合距離 1.940(9)–1.978(11) Å と比較して長い。第四章で示したように、**7a** では、Cu–O_{AcO} 結合距離が長い μ -1,1-OAc 架橋が水中で容易に μ -OH₂ 架橋に変化した。従って、**10a**, **11a** においても結合距離が長くなっている μ -1,1-OAc 及び μ -1,3-OAc 架橋(Cu(1)–O(4), Cu(2)–O(5))は外因性の架橋基と置換しやすいと考えられる。

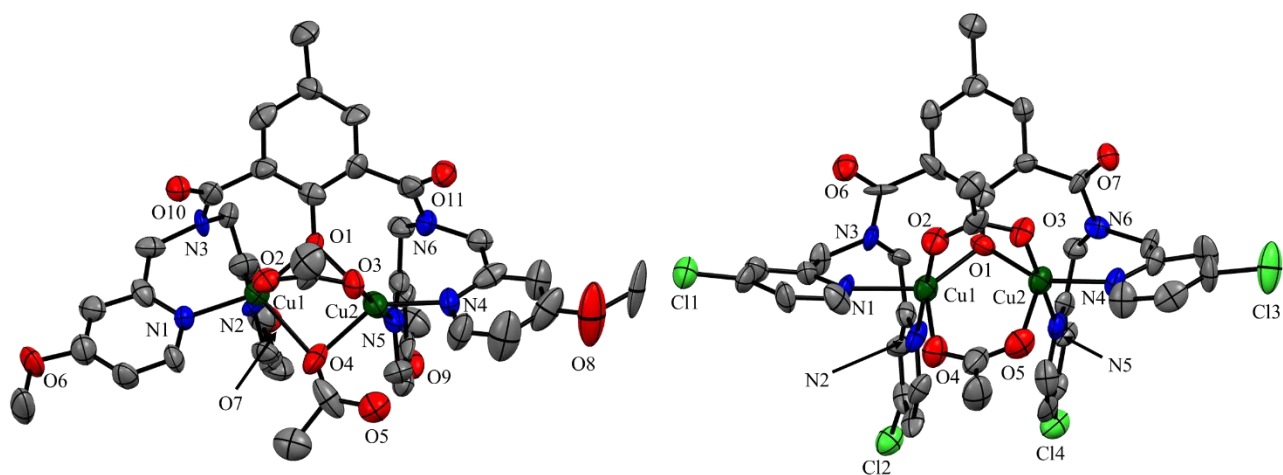


Figure 5-1. ORTEP diagrams of cationic part of **10a** (left) and **11a** (right), respectively. Hydrogen atoms are omitted for clarity.

Table 5-1. Crystallographic data for 10a and 11a

complex	10a	11a
Empirical formula	C ₄₇ H ₄₉ Cu ₂ F ₆ N ₆ O ₁₁ P	C ₃₉ H ₃₆ Cl ₅ Cu ₂ N ₆ O _{11.5}
Formula weight	1145.97	1077.07
Temperature (K)	103	103
Wavelength	CuK α (1.54187 Å)	CuK α (1.54187 Å)
Crystal system	Monoclinic	Triclinic
Crystal size (mm ³)	0.14 × 0.12 × 0.10	0.20 × 0.10 × 0.10
Space group	P2 ₁	P-1
a (Å)	12.0084(8)	11.7339(5)
b (Å)	16.7164(11)	18.6301(8)
c (Å)	12.5107(8)	21.0371(9)
α (deg)	90	97.014(7)
β (deg)	105.573(7)	96.503(7)
γ (deg)	90	91.138(6)
Volume (Å ³)	2419.2(3)	4532.4(3)
Z value	2	4
Density (calculated)	1.573 g/cm ³	1.578 g/cm ³
Absorption coefficient	2.186 mm ⁻¹	4.431 mm ⁻¹
F(000)	1176.0	2188.0
R1 ^a , wR2 ^b)	0.0872, 0.1917	0.0907, 0.1462
GOF index	0.989	0.864

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

Table 5-2. Selected bond distances (Å) and angles (deg) for 10a and 11a

10a	11a
Cu(1) ••• Cu(2) : 3.081(4)	Cu(1) ••• Cu(2) : 2.966(3)
Cu(1) – N(1) : 2.005(13)	Cu(1) – N(1) : 2.166(11)
Cu(1) – N(2) : 2.064(15)	Cu(1) – N(2) : 2.037(12)
Cu(2) – N(4) : 2.039(14)	Cu(2) – N(4) : 2.086(11)
Cu(2) – N(5) : 1.978(14)	Cu(2) – N(5) : 2.045(13)
Cu(1) – O(1) : 1.982(10)	Cu(1) – O(1) : 2.100(9)
Cu(1) – O(2) : 1.978(11)	Cu(1) – O(2) : 1.940(9)
Cu(1) – O(4) : 2.261(13)	Cu(1) – O(4) : 2.058(10)
Cu(2) – O(1) : 2.311(11)	Cu(2) – O(1) : 2.095(9)
Cu(2) – O(3) : 1.944(12)	Cu(2) – O(3) : 1.951(9)
Cu(2) – O(4) : 2.089(14)	Cu(2) – O(5) : 2.128(11)
Cu(1) – O(1) – Cu(2) : 91.4(4)	Cu(1) – O(1) – Cu(2) : 90.0(4)
Cu(1) – O(4) – Cu(2) : 90.1(5)	O(1) – Cu(1) – O(2) : 86.4(4)
O(1) – Cu(1) – O(2) : 88.4(5)	O(1) – Cu(1) – O(4) : 128.9(4)
O(1) – Cu(1) – O(4) : 89.8(5)	O(2) – Cu(1) – O(4) : 90.5(4)
O(2) – Cu(1) – O(4) : 88.0(5)	O(1) – Cu(1) – N(1) : 143.4(4)
O(1) – Cu(1) – N(1) : 158.1(5)	O(1) – Cu(1) – N(2) : 92.1(5)
O(1) – Cu(1) – N(2) : 87.9(5)	O(2) – Cu(1) – N(1) : 84.4(5)
O(2) – Cu(1) – N(1) : 89.2(5)	O(2) – Cu(1) – N(2) : 178.2(6)
O(2) – Cu(1) – N(2) : 175.8(5)	O(4) – Cu(1) – N(1) : 86.5(5)
O(4) – Cu(1) – N(1) : 111.9(5)	O(4) – Cu(1) – N(2) : 91.2(6)
O(4) – Cu(1) – N(2) : 90.1(5)	N(1) – Cu(1) – N(2) : 96.3(4)
N(1) – Cu(1) – N(2) : 95.0(5)	O(1) – Cu(2) – O(3) : 87.5(4)
O(1) – Cu(2) – O(3) : 83.3(5)	O(1) – Cu(2) – O(5) : 119.1(4)
O(1) – Cu(2) – O(4) : 85.8(4)	O(3) – Cu(2) – O(5) : 89.3(4)
O(3) – Cu(2) – O(4) : 91.3(5)	O(1) – Cu(2) – N(4) : 151.2(5)
O(1) – Cu(2) – N(4) : 135.7(5)	O(1) – Cu(2) – N(5) : 87.5(4)
O(1) – Cu(2) – N(5) : 91.3(5)	O(3) – Cu(2) – N(4) : 86.9(4)
O(3) – Cu(2) – N(4) : 86.9(6)	O(3) – Cu(2) – N(5) : 174.6(5)
O(3) – Cu(2) – N(5) : 174.5(6)	O(5) – Cu(2) – N(4) : 89.1(5)
O(4) – Cu(2) – N(4) : 137.7(6)	O(5) – Cu(2) – N(5) : 95.1(6)
O(4) – Cu(2) – N(5) : 89.1(5)	N(4) – Cu(2) – N(5) : 96.3(4)
N(4) – Cu(2) – N(5) : 96.5(6)	
$\tau\text{Cu}(1) = 0.295$, $\tau\text{Cu}(2) = 0.613$	$\tau\text{Cu}(1) = 0.580$, $\tau\text{Cu}(2) = 0.390$

10a と **11a** は水に難溶なため、細胞毒性の評価には **10b** 及び **11b** を用いた。水溶液中の **10b** と **11b** の構造は分光学的測定によって明らかにした。水中における **10b** (0.5 mM) の電子スペクトルは、312 ($\epsilon = 5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 432 nm ($\epsilon = 800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)に、それぞれ Cu(II)-OAc/-OPh の LMCT に帰属できる吸収バンド^[11]を示した(Figure 5-2)。これらは錯体濃度を 50 μM まで希釈すると 340 ($\epsilon = 5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 440 nm ($\epsilon = 500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)にシフトした(Figure 5-2(A), (B))。一方、MeCN 中で電子スペクトルを測定すると、317 ($\epsilon = 6000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 439 nm ($\epsilon = 800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)に吸収バンドが現れ、これらは希釈してもシフトしなかった(Figure 5-2(C), (D))。また、水中における **11b** (0.5 mM) の電子スペクトルは、335 nm ($\epsilon = 6000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)に吸収極大と 460 nm 付近に shoulder が現れ、Cu(II)-OAc/-OPh の LMCT に帰属できる吸収バンド^[11]を示した(Figure 5-3)。これらは錯体濃度を 50 μM まで希釈すると 339 nm ($\epsilon = 5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)に吸収極大と 460 nm 付近に shoulder が現れ、**10b** と比較してシフトが小さいことがわかった(Figure 5-3(A), (B))。一方、MeCN 中で電子スペクトルを測定すると、321 ($\epsilon = 5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 469 nm ($\epsilon = 500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)に吸収バンドが現れ、これらは希釈してもシフトしなかった(Figure 5-3(C), (D))。この **10b** の結果は、第四章で述べた **7b** と同様の傾向を示しており、架橋基が変化していることを示している。従って、**10a** の結晶構造で示された μ -1,1-OAc 架橋は、水中の **10b** では μ -OH₂ 架橋に置換しているが、水中の **11b** では μ -1,3-OAc 架橋は置換されないと考えられる。

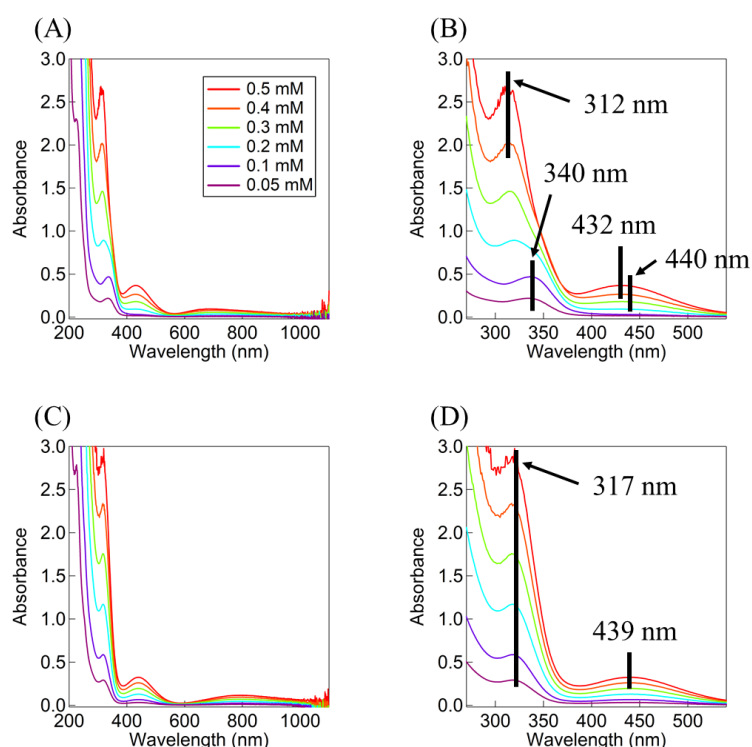


Figure 5-2. Electronic absorption spectra of **10b** in H₂O (A) and MeCN (C). (B) and (D) are enlarged views of the graph of (A) and (C), respectively.

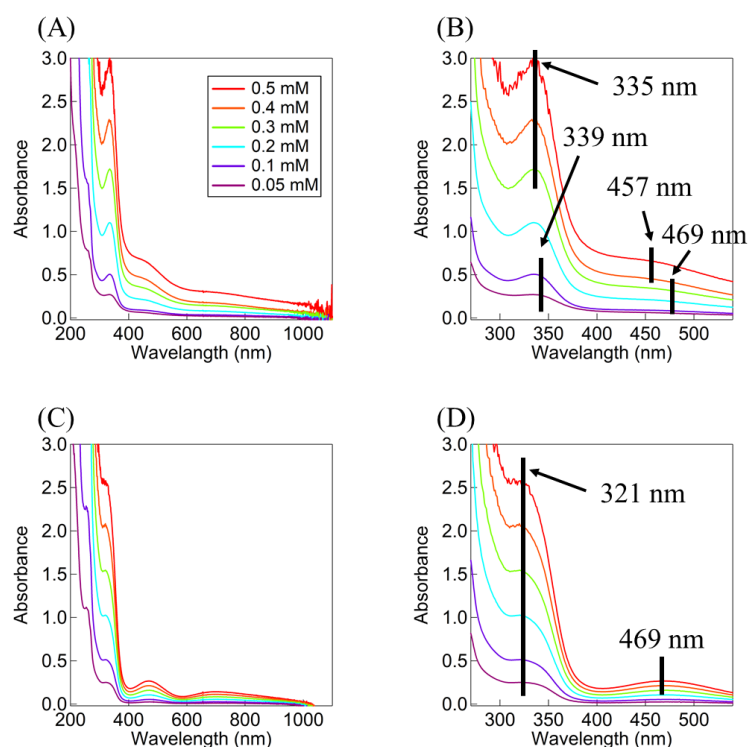


Figure 5-3. Electronic absorption spectra of **11b** in H₂O (A) and MeCN (C). (B) and (D) are enlarged views of the graph of (A) and (C), respectively.

10b の ESI MS スペクトルは、MeCN 中と水中では異なる質量ピークを与え、MeCN 中では $[L1^{4-OMe} + 2Cu(II) + 2OAc]^+$ に相当する質量ピークを m/z : 921.08 に与え、水中では、 $[L1^{4-OMe} + 2Cu + OAc + OH]^+$ に相当する質量ピークが 879.15 に現れた (Figure 5-4, 5-5). 一方、**11b** の ESI MS スペクトルは MeCN 中と水中で同じ質量ピークを与え、 $[L1^{4-Cl} + 2Cu(II) + 2OAc]^+$ に相当する質量ピークを m/z : 937.02 に与えた (Figure 5-6, 5-7). これらの事実は、**10b** 及び **11b** は水中においても二核銅(II)構造を維持していることを示しており、また **10b** は **7a** の結晶構造で示された様に μ -1,1-OAc と μ -OH₂ が互いに置換しやすいことを示唆している. 一方、**11b** の μ -1,3-OAc は μ -OH₂ と置換が起こりにくいことを示しており、これらは水中における電子スペクトルの変化が小さかったことと一致している. これは、錯体の水溶性とも関係していると考えられ、実際、**7b** や **10b** は水に対して高い溶解性を示すが、**11b** は水に対して低い溶解性を示す.

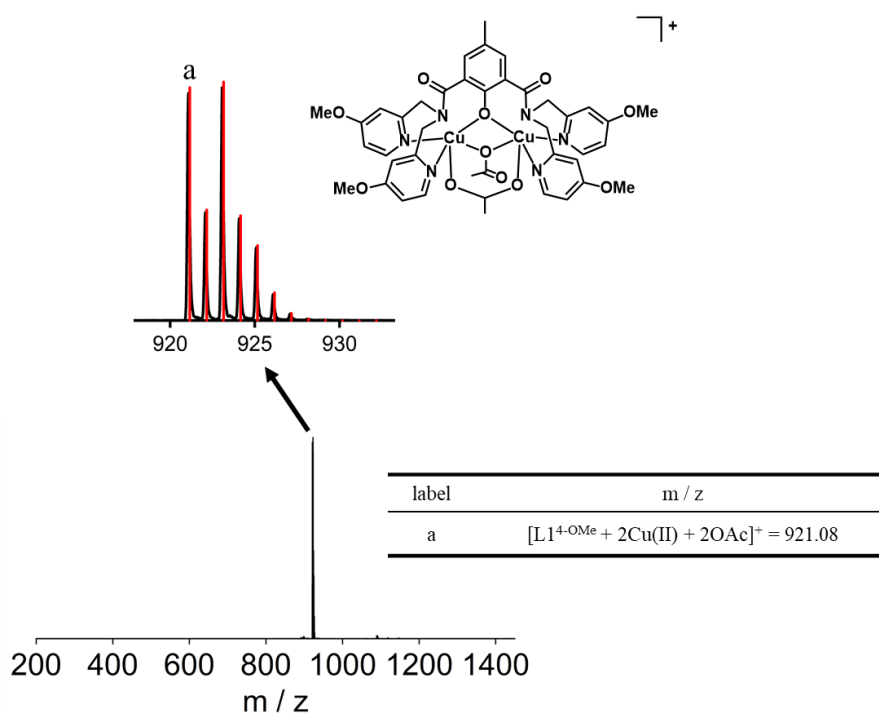


Figure 5-4. ESI MS spectrum of **10b** measured in MeCN at room temperature at orifice 1: 10 V, orifice 2: 10 V, ring lens voltage: 10 V.

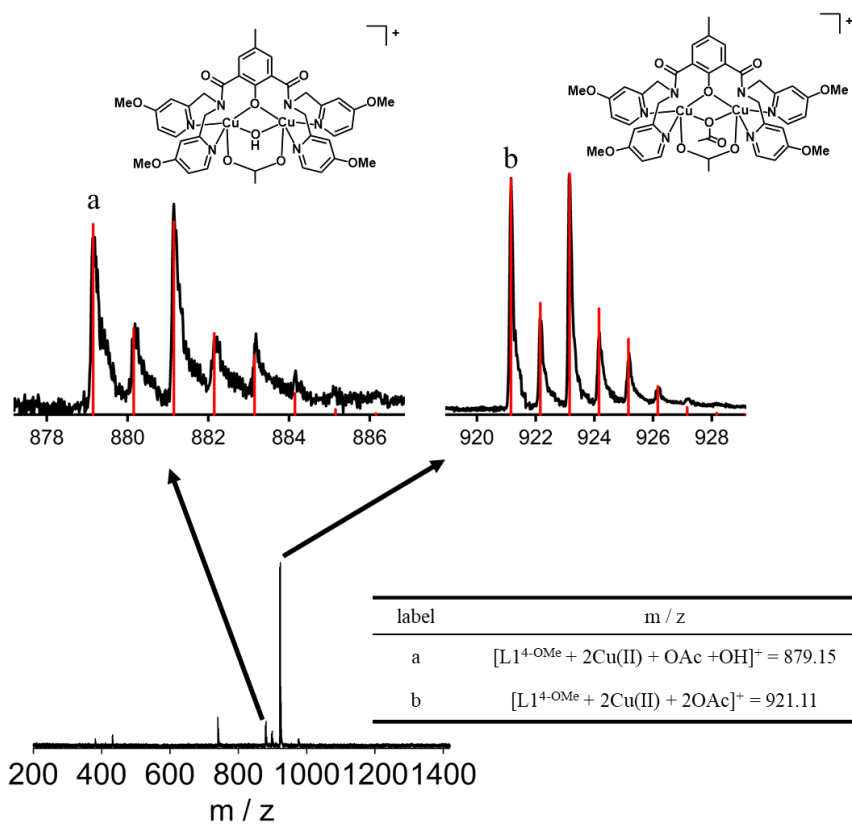


Figure 5-5. CSI MS spectrum of **10b** measured in H₂O at room temperature at orifice 1: 5 V, orifice 2: 5 V, ring lens voltage: 10 V.

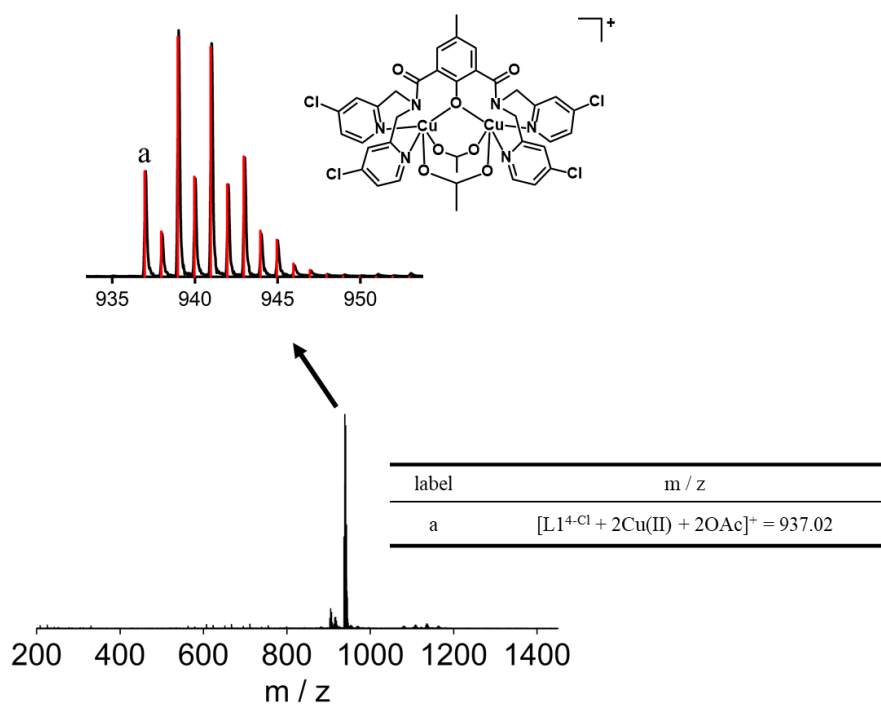


Figure 5-6. ESI MS spectrum of **11b** measured in MeCN at room temperature at orifice 1: 10 V, orifice 2: 10 V, ring lens voltage: 10 V.

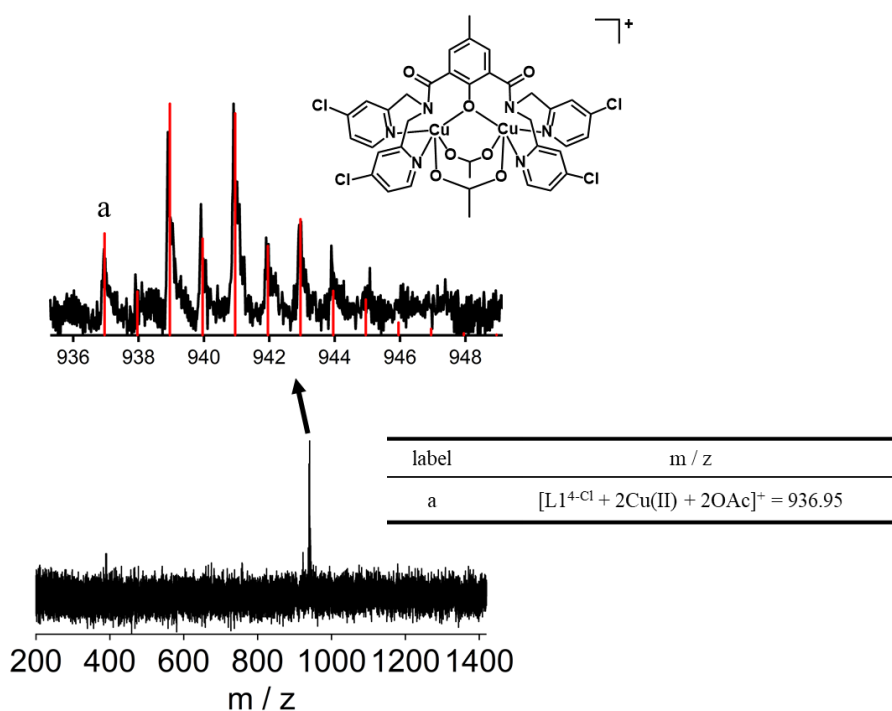


Figure 5-7. CSI MS spectrum of **11b** measured in H₂O at room temperature at orifice 1: 0 V, orifice 2: 5 V, ring lens voltage: 10 V.

5-3-3. MTT assay による細胞毒性の評価

HL1^{4-OMe}, HL1^{4-Cl}, **10b** 及び **11b** の抗がん活性を調べるため, HeLa 細胞に対する細胞毒性を MTT assay によって評価した^[12,13]. HL1^{4-OMe} と HL1^{4-Cl} は水に難溶であるため, IC₅₀ 値を算出することはできなかった. **10b** 及び **11b** の IC₅₀ 値は縦軸に細胞生存率, 横軸に log[X] (X = **10b** and **11b**) をプロットしたグラフから算出した. これらを, **7b** の IC₅₀ 値とともに Table 5-3, Figure 5-8 に示す. HeLa 細胞に対する **10b** 及び **11b** の IC₅₀ 値は, それぞれ 10.0, 14.2 μM であった. これらのプロットはいずれも急勾配であり, 第四章で述べた **7b** の性質と同様に, 細胞内において二核銅を維持していることが示唆された. また, IC₅₀ 値を **7b** の 72.8 μM と比較すると, **10b** 及び **11b** は HeLa 細胞に対してそれぞれ 7.3, 5.1 倍高い細胞毒性を示すことが明らかになった. これらの結果から, dpa への疎水性置換基の導入で錯体の疎水性が上がり, 細胞の取り込まれやすさが向上した結果として高い細胞毒性が発現したと考えられる.

10b と **11b** のがん細胞と正常細胞の選択性は, ヒト肺細胞及びヒト膵臓細胞のがん細胞と正常細胞を用いて評価した. ヒト肺がん細胞 A549, ヒト膵臓がん細胞 PK-59 に対する IC₅₀ 値は, **10b** では 20.0, 14.7 μM, **11b** では 21.3, 18.1 μM であった. ヒト肺正常細胞 WI-38, ヒト膵臓正常細胞 2C6 に対する IC₅₀ 値は, **10b** では 22.1, 23.7 μM, **11b** では 2.94, 9.5 μM であった. これらの値を **7b** と比較すると, **10b** 及び **11b** は肺と膵臓細胞に対して高い細胞毒性を示し, **10b** はヒト肺・膵臓細胞に対してそれぞれ 1.1, 1.6 倍細胞毒性が高いが, **11b** はヒト肺及び膵臓細胞に対して選択性を示さないことが見出された. これらの大きな細胞毒性の向上と選択性の発現は, 小胞体のストレス応答により細胞死が誘導されている可能性が考えられる. これは, dpa にクロロやメトキシなどの疎水性置換基を導入したことにより錯体の疎水性が向上して, これらの錯体が小胞体やゴルジ体に局在しやすくなり, ストレス応答でアポトーシスを引き起こしていることを示唆している.

Table 5-3. In vitro cytotoxicity for 7b, 10b, and 11b against HeLa, A549, WI-38, PK-59, and 2C6 cells by means of MTT assay (24 h)

Compound	IC ₅₀ (μM)				
	Cervical	Lung		Pancreas	
	HeLa	A549	WI-38	PK-59	2C6
7b	72.8 ± 2.1	92.7 ± 1.4	121 ± 11	66.5 ± 3.1	88.2 ± 8.9
10b	10.0 ± 2.8	20.0 ± 2.7	22.1 ± 1.2	14.7 ± 0.9	23.7 ± 1.7
11b	14.2 ± 2.3	21.3 ± 1.5	2.94 ± 0.3	18.1 ± 1.5	9.5 ± 0.6

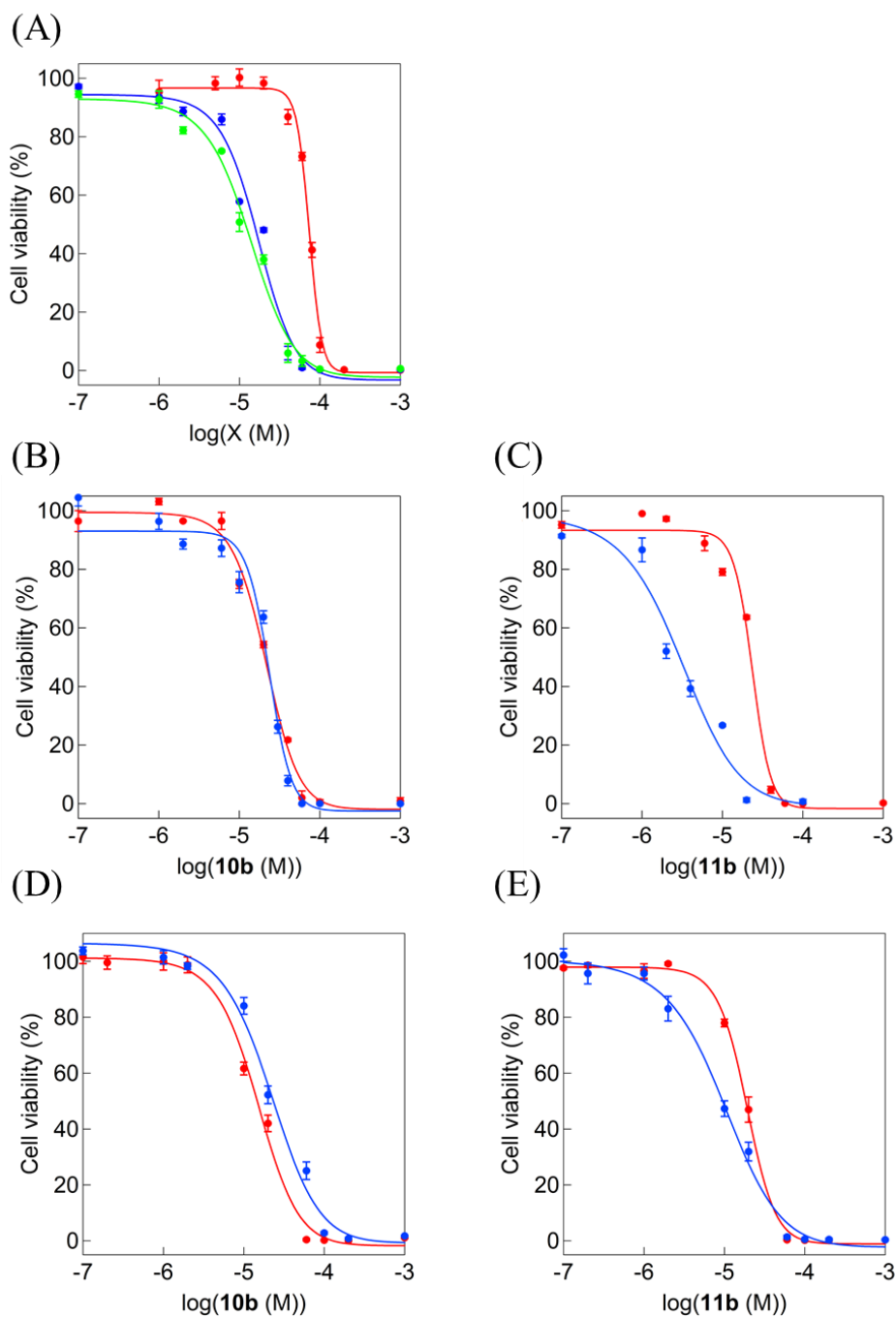
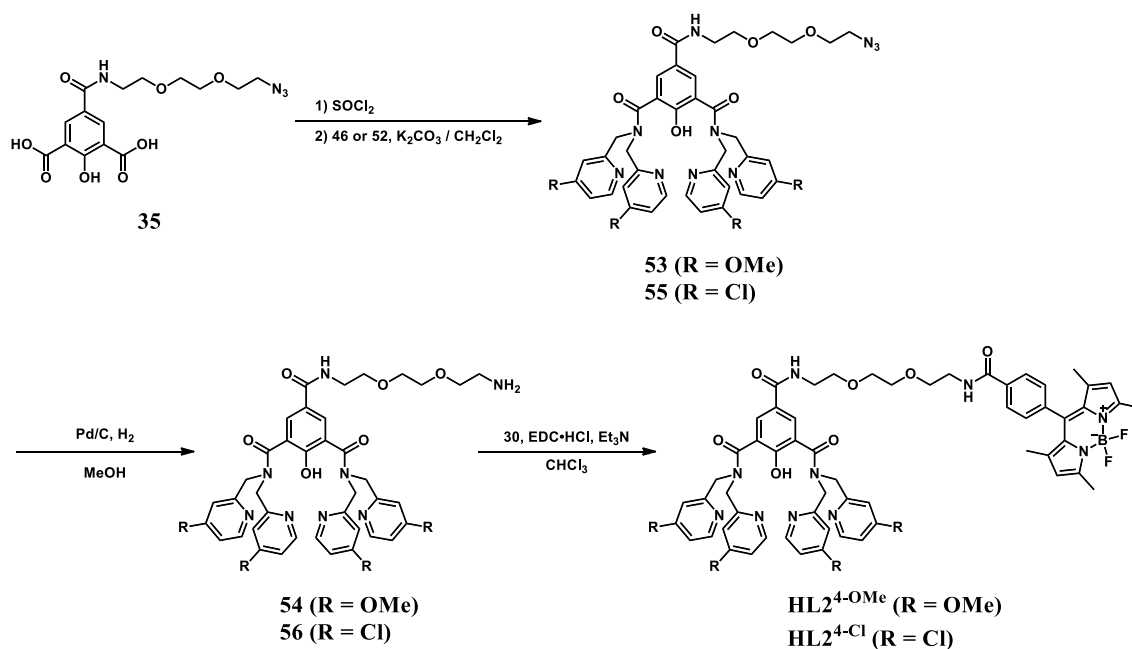


Figure 5-8. (A) Plots of cell viability vs log[X] (X = **7b** (red), **10b** (green), and **11b** (blue)) in the MTT assay of HeLa cells. (B), (C) Plots of cell viability vs log[**10b**] and log[**11b**] in the MTT assay of A549 (red) and WI-38 (blue) cells treated with **10b** and **11b**. (D), (E) Plots of cell viability vs log[**10b**] and log[**11b**] in the MTT assay of PK-59 (red) and 2C6 (blue) cells treated with **10b** and **11b**. All experiments were carried out at least three times.

5-3-4. 蛍光標識を有する金属錯体の合成及びそれらを用いた細胞内挙動の解明

10b 及び **11b** の細胞毒性発現機構を明らかにするためには、その細胞内挙動を可視化する必要がある。第四章では、Bodipy と HL1^{4H} を化学結合でつないだ配位子の二核銅(II)錯体を用いて細胞内挙動を明らかにした。そこで、本章でも同様に、Bodipy と HL1^{4OMe} 及び HL1^{4Cl} を化学結合でつないだ HL2^{4OMe} と HL2^{4Cl} 及びそれらの二核銅(II)錯体 [Cu₂(μ-OAc)₂(L2^{4OMe})](OAc) (**12**)と [Cu₂(μ-OAc)₂(L2^{4Cl})](OAc) (**13**)を合成した。HL2^{4OMe} 及び HL2^{4Cl} の合成経路を、Scheme 5-3 に示す。4,4-difluoro-8-(4-carboxyphenyl)-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (**30**)及び 4-(N-(8-azido-3,6-dioxaoctyl)carbamoyl)-2-hydroxyisophthalic acid (**35**)は第四章の合成項に従って合成した。**12** 及び **13** の構造は分光学的測定によって明らかにした。合成及び ¹H NMR スペクトルの詳細は本章第 5 節を参照に記載している。MeCN 中における **12** 及び **13** の ESI MS スペクトルでは、*m/z*: 1431.10 及び 1447.10 にピークを与え、それぞれ[L2^{4OMe} + 2Cu(II) + 2OAc]⁺と[L2^{4Cl} + 2Cu(II) + 2OAc]⁺の質量に相当した(Figure 5-9, 5-10)。この結果は、溶液中においても **12** 及び **13** が二核銅(II)構造を維持していることを示している。

Scheme 5-3. Synthesis of HL2^{4OMe} and HL2^{4Cl}



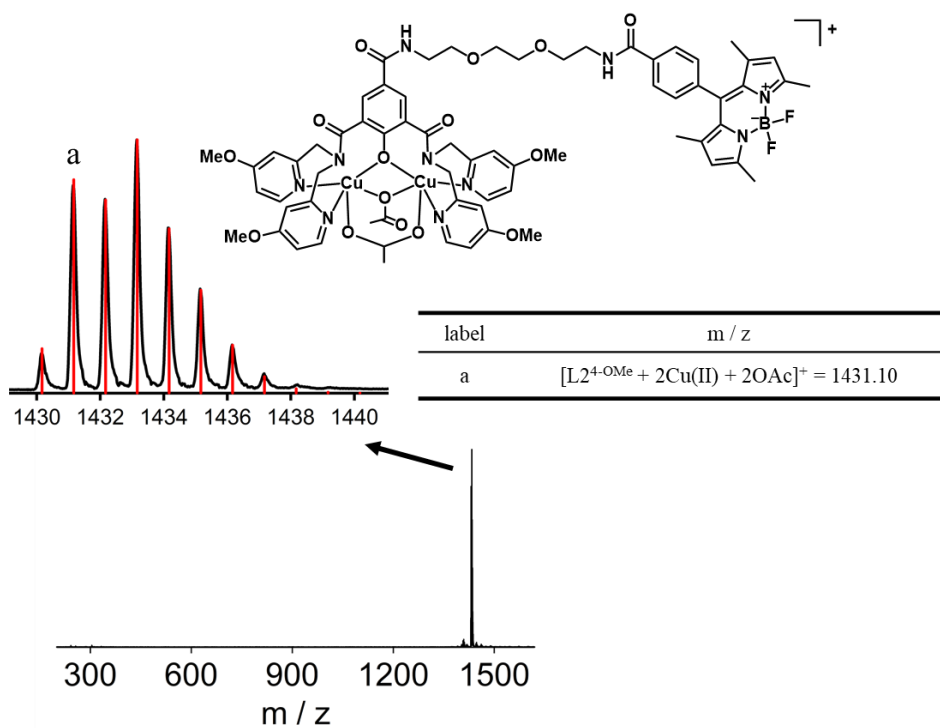


Figure 5-9. ESI MS spectrum of **12** measured in MeCN at room temperature at orifice 1: 10 V, orifice 2: 10 V, ring lens voltage: 10 V.

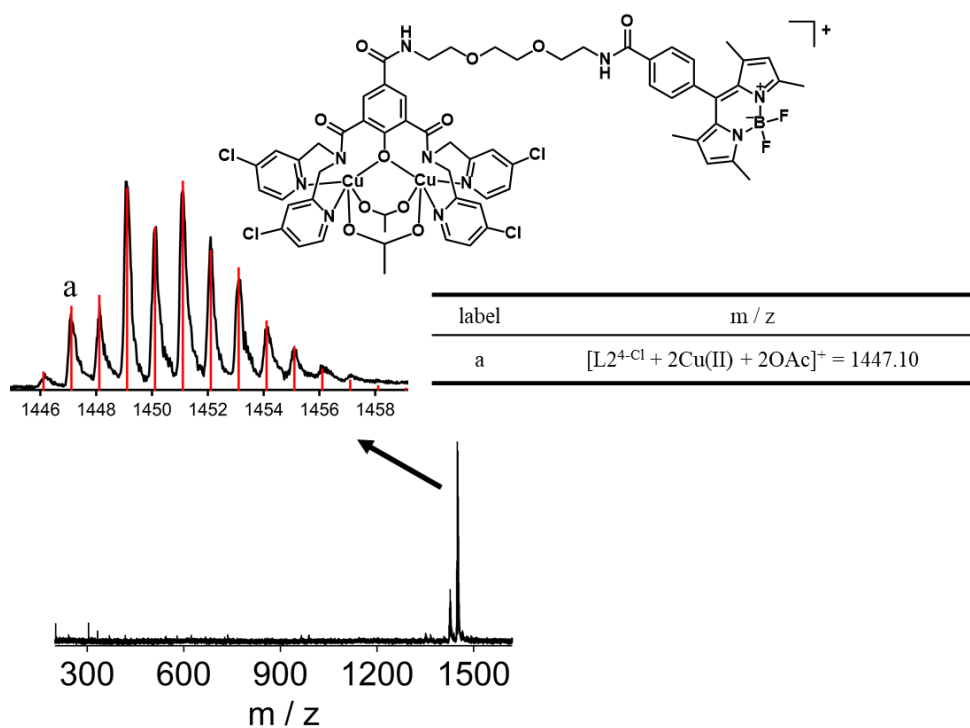


Figure 5-10. ESI MS spectrum of **13** measured in MeCN at room temperature at orifice 1: 10 V, orifice 2: 10 V, ring lens voltage: 10 V.

細胞内イメージング実験には HeLa 細胞を用い、**12** 及び **13** を培地に蒔いた後、24 時間インキュベートした。**12** 及び **13** の細胞内取り込み及び細胞内分布は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。核及びミトコンドリア染色に Hoechst 33342 (8.1 μM), Mito Tracker Deep Red (50 nM)を用いて細胞を処理した結果、**12** 及び **13** (10 μM)の細胞内取り込みが観測された(Figure 5-11)。青色と赤色は、それぞれ核とミトコンドリアを染色した色である。緑色蛍光は、**12** 及び **13** が細胞内に存在することを示している。これらの画像を合わせた画像(Figure 5-11, Merge)では、これらの色が合わさってできる水色や黄色の蛍光は確認できなかった。これは、**12** 及び **13** は核またはミトコンドリアに局在化していないことを示している。

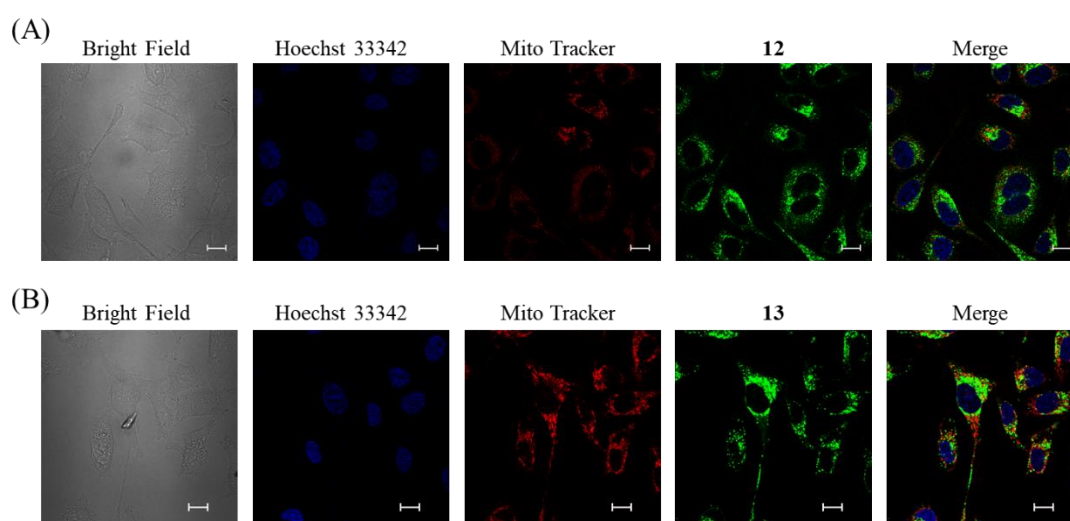


Figure 5-11. Confocal luminescence microscopy images of HeLa cells with treatments of 10 μM of **12** (A) and **13** (B) for 24 h, stained with Hoechst 33342 (blue) and Mito Tracker (red) as well as merged images. Scale bars represent 20 μm .

そこで、小胞体及びゴルジ体染色にそれぞれ ER-TrackerTM Red (1 μM), BodipyTM TR Ceramide (10 μM)を用いて細胞を処理した。**12** 及び **13** を用いた結果をそれぞれ Figure 5-12, 5-13 に示す。Figure 5-12(A), 5-13(A)に示している赤色及び緑色は、それぞれ小胞体の染色及び錯体 **12,13** の蛍光を示している。Figure 5-12(B), 5-13(B)に示している赤色及び緑色は、それぞれゴルジ体の染色及び錯体の蛍光を示している。これらの画像を重ね合わせると(Figure 5-12, 5-13, Merge), これらの色が合わさってできる黄色が確認された。これは、**12** 及び **13** は小胞体及びゴルジ体に局在化していることを示している。この結果から、**12** 及び **13** は小胞体とゴルジ体のストレス応答を発現させて細胞死を誘導していると考えられる。がん細胞は正常細胞と比較して代謝が速く、タンパク合成が盛んに行われているため、小胞体にストレス応答を起こしやすい状態にある。従って、**12, 13** は小胞体にストレス応答を起こさせて高い細胞毒性を発現するとともに、がん細胞選択的に働いていると考えられる。

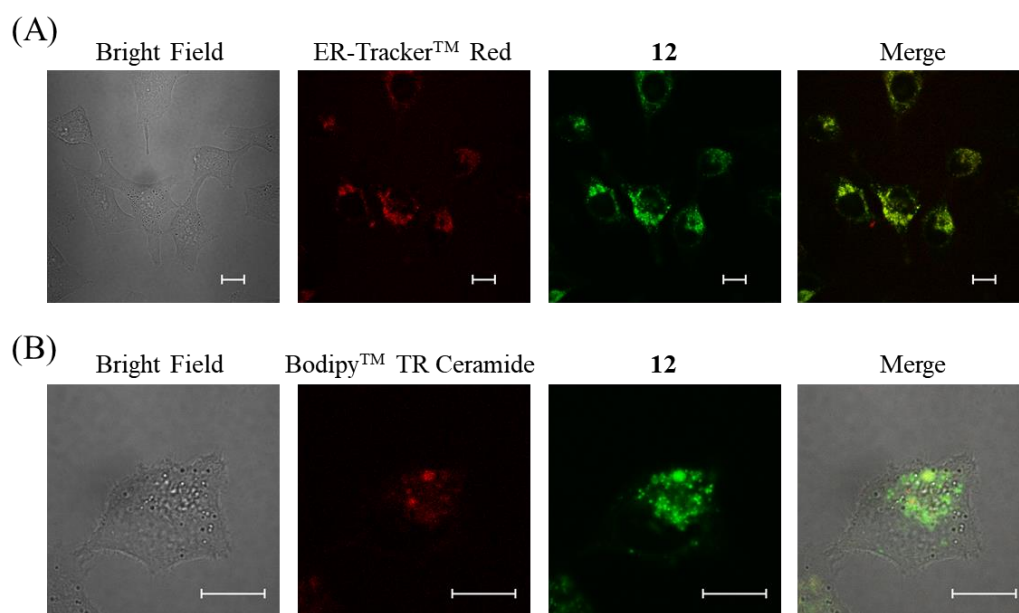


Figure 5-12. Confocal luminescence microscopy images of HeLa cells with treatments of 10 μM of **12** for 24 h, stained with (A) ER-Tracker™ Red (red) and (B) Bodipy™ TR Ceramide (red) as well as merged images. Scale bars represent 20 μm .

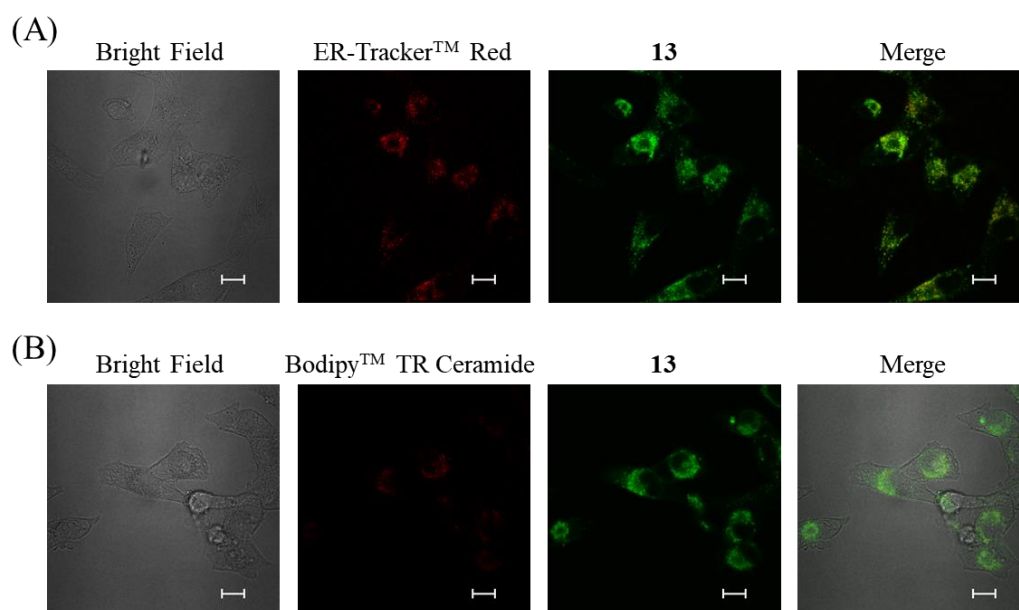


Figure 5-13. Confocal luminescence microscopy images of HeLa cells with treatments of 10 μM of **13** for 24 h, stained with (A) ER-Tracker™ Red (red) and (B) Bodipy™ TR Ceramide (red) as well as merged images. Scale bars represent 20 μm .

5-3-5. Comet assay による核内 DNA 損傷の検出

上述した結果から、**10b** 及び **11b** は核またはミトコンドリア内の DNA 及び RNA の切断を通して細胞毒性を発現しているのではないと考えられる。これを裏付けるため、核内 DNA の損傷を定量することができる comet assay を **10b** 及び **11b** を用いて行った (Figure 5-14)。その結果、comet tail を確認することはできなかった。従って、**10b** 及び **11b** は核の DNA を切断していないことが示された。この結果は、上述した細胞内分布の結果と一致している。

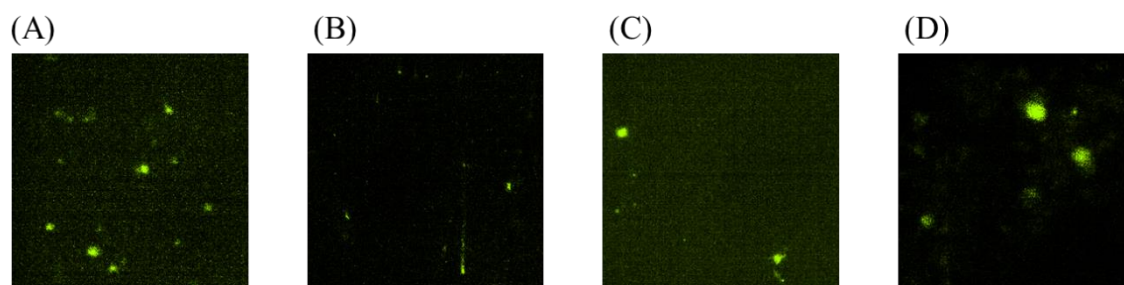


Figure 5-14. Comet assay of SYBR[®] Gold-stained HeLa cells. (A) HeLa cells (untreated), (B) HeLa cells treated with H₂O₂ (100 μM) at 20 min incubation at 4°C, and HeLa cells treated with IC₁₀ concentration of **10b** (C, 1 μM) and **11b** (D, 3 μM) at 24 h incubation.

5-4. 結論

本研究では、新規 *p*-cresol-2,6-bis(dpa^{4-X}) amide-tether 配位子 HL1^{4-X} [X = OMe and Cl] 及びその二核銅(II)錯体[Cu₂(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L1^{4-OMe})]X [X = PF₆ (**10a**) and OAc (**11b**)], [Cu₂(μ-1,3-OAc)₂(L1^{4-Cl})]X [X = ClO₄ (**11a**) and OAc (**11b**)]を合成し、これらの構造を明らかにした。**10b**, **11b** の HeLa 細胞に対する細胞毒性を MTT assay で評価した結果、どちらも **7b** と比較して高い細胞毒性を示すことが見出された。また、ヒト肺及び膵臓細胞で細胞選択性を評価した結果、**10b** はどちらの細胞に対しても、**11b** はヒト肺細胞に対して選択性を有することが明らかになった。これらの細胞毒性発現機構を明らかにするため、蛍光団として Bodipy を末端に導入した配位子 HL2^{4-X} [X = OMe and Cl] 及びその二核銅錯体[Cu₂(μ-OAc)₂(L2^{4-X})](OAc) [X = OMe (**12**) and Cl (**13**)]を合成し、これらの錯体を用いて細胞内可視化実験を行った。その結果、**12**, **13** のどちらも核やミトコンドリアに局在するのではなく、ゴルジ体や小胞体に局在化していることが明らかになった。この結果より、**10b**, **11b** はゴルジ体や小胞体に局在化し、ストレス応答を引き起こすことにより、細胞毒性を発現していると考えられる。

5-5. 実験方法

5-5-1. 試薬及び測定装置

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。4-methylphenol-2,6-dicarboxylic acid (**24**)は参考文献^[9]に従って合成し、4,4-difluoro-8-(4-carboxyphenyl)-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (**30**)及び 4-(*N*-(8-azido-3,6-dioxaoctyl)carbamoyl)-2-hydroxyisophthalic acid (**35**)は第四章の合成項に従って合成した。

元素分析(C, H, N)は、Perkin-Elmer 社製 Elemental Analyzer 2400 II を用いて測定した。¹H 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*₄ (TSP)を用いて測定した。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-T100CSRX the AccuTOF CS を用いて、MeOH, MeCN または H₂O を溶媒として測定した。pH 測定は、HORIBA 製 LAQUA electrode を用い、標準緩衝溶液を用いて構成した後に測定を行った。UV-vis スペクトルは、Agilent 社製 8453 紫外可視分光光度計を用いて測定した。IR スペクトルは、Shimadzu Single Reflection HATR IR Affinity-1 MIRacle 10 を用いて測定した。単結晶 X 線構造解析は、リガク社製 R-AXIS RAPID II/RAPID AUTO X 線単結晶 X 線構造解析装置で解析データを測定し、Olex 2 ソフトウェアを用いて解析を行った。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。

5-5-2. 配位子及び二核銅(II)錯体合成

Methyl 4-chloropicolinate (38)の合成^[7,8]

Picolinic acid (48.2 g, 0.391 mol)を SOCl_2 (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_2 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 Na_2CO_3 水溶液を塩基性になるまで加えた後、 CHCl_3 (3×200 mL)で分液した。有機層に Na_2SO_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, CDCl_3): δ/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, CH_3)。

4-Chloro-2-hydroxymethylpyridine (39)の合成^[7]

38 (20.0 g, 0.117 mol)を MeOH-THF (120/70 mL)に溶解させ、氷浴に浸し、 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、 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、 H_2O (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 Na_2SO_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, CDCl_3): δ/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, CH_2), 3.40 (brs, 1H, OH)。

2-Hydroxymethyl-4-methoxypyridine (40)の合成^[7,8]

39 (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。 $^1\text{H NMR}$ 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、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%)。 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ/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_2), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 3.78 (t, $J = 4.6$ Hz, 1H, OH)。

2-Folmyl-4-methoxypyridine (41)の合成^[7]

100 mL ナスフラスコに MnO₂ (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 **40** (2.14 g, 15.4 mmol) を加え、CHCl₃ (25 mL) に溶解させた後、80°C で 24 時間加熱還流した。¹H 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。MnO₂ 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%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ/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, OCH₃)。

2-Chloromethyl-4-methoxypyridine (42)の合成^[7]

40 (2.19 g, 15.7 mmol) を CH₂Cl₂ (12 mL) に溶解させ、SOCl₂ (10 mL) を加えた後、50°C で 4 時間加熱還流した。SOCl₂ を留去すると黄色の固体が得られた。これを飽和 NaHCO₃ 水溶液(50 mL)に溶解させ、CHCl₃ (3 × 150 mL) で分液した。有機層に Na₂SO₄ 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、真空乾燥すると橙色の油状物質が得られた(2.43 g, Yield: 98%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ/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, CH₂), 3.88 (s, 3H, OCH₃)。

2-Azidomethyl-4-methoxypyridine (43)の合成^[7]

42 (2.43 g, 15.4 mmol), NaN₃ (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 NaHCO₃ 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 NaCl 水溶液(2 × 300 mL)で分液した。有機層に Na₂SO₄ 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%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ/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, CH₂), 3.88 (s, 3H, OCH₃)。

2-Aminomethyl-4-methoxypyridine (44)の合成^[7]

43 (2.37 g, 14.4 mmol) を THF (18 mL) に溶解させ、氷浴に浸した後、PPh₃ (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、H₂O (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 CHCl₃ (50 mL) に溶解させ、1 M HCl (3 × 50 mL) で分液した。水層を取り出した後、4 M NaOH 水溶液で pH を 11 にした。これを CHCl₃ (3 × 200 mL) で分液した。有機層に Na₂SO₄ 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%)。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ/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, CH_2), 3.86 (s, 3H, OCH_3).

1-*tert*-Butoxycarbonyl-bis(2-(4-methoxypyridyl)methyl)amine (45)の合成^[7]

41 (1.72 g, 12.5 mmol), **44** (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。 ^1H NMR スペクトルでイミンの形成及び **44** が残っていないことを確認した後、 NaBH_4 (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。 ^1H 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_2CO_3 水溶液を用いて塩基性にした。 CH_2Cl_2 (3×200 mL)で分液し、有機層に Na_2SO_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。

この油状物質を CH_2Cl_2 (24 mL)に溶解させ、氷浴に浸した後、 Et_3N (3.26 mL, 23.4 mmol)を加えた。ここに、 CH_2Cl_2 (40 mL)に溶解させた Boc_2O (5.09 g, 23.3 mmol)を N_2 雰囲気下で加え、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_2Cl_2 (36 mL)を加え、飽和 NaHCO_3 水溶液(3×30 mL)で分液した。有機層に Na_2SO_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。これを最少量の CHCl_3 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%)。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 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_2), 4.55 (s, 2H, CH_2), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 1.44 (s, 9H, CH_3).

Di((2-(4-methoxypyridyl)methyl)amine) (46)の合成^[7]

45 (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 K_2CO_3 水溶液(20 mL)に溶解させ、 CH_2Cl_2 (3×60 mL)で分液した。有機層に Na_2SO_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%)。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ/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, CH_2), 3.84 (s, 6H, OCH_3).

HL1^{4-OMe} の合成^[9]

24 (25.5 mg, 0.130 mmol) を SOCl₂ (1.5 mL) に溶解させ、60°C で 4 時間攪拌した。SOCl₂ 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。**46** (84.2 mg, 0.325 mmol), K₂CO₃ (158 mg, 1.14 mmol) を CH₂Cl₂ (2 mL) に溶解させた。この溶液に、先程の油状物質を CH₂Cl₂ (2 mL) に溶解させた溶液を N₂ 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 CHCl₃ に溶解させ、アルミナカラムクロマトグラフィー (gradient CHCl₃/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%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ/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, CH₂), 4.59 (s, 4H, CH₂), 3.88 (s, 6H, OCH₃), 3.81 (s, 6H, OCH₃), 2.22 (s, 3H, CH₃). ESI MS (MeOH *m/z*, positive mode). Calcd for [HL1^{4-OMe} + H]⁺: 679.29. Found: 679.29.

4-Chloro-2-formylpyridine (**47**) の合成^[7]

100 mL ナスフラスコに MnO₂ (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 **39** (8.00 g, 55.7 mmol) を加え、CHCl₃ (96 mL) に溶解させた後、80°C で 36 時間加熱還流した。¹H 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。MnO₂ 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%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ/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).

4-Chloro-2-chloromethylpyridine (**48**) の合成^[7]

39 (8.00 g, 55.7 mmol) を CH₂Cl₂ (40 mL) に溶解させ、SOCl₂ (30 mL) を加えた後、50°C で 3 時間加熱還流した。SOCl₂ を留去すると黄色の固体が得られた。これを飽和 NaHCO₃ 水溶液 (100 mL) に溶解させ、CHCl₃ (3 × 100 mL) で分液した。有機層に Na₂SO₄ 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、真空乾燥すると黄色の油状物質が得られた (9.17 g, Yield: 98%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ/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, CH₂).

2-Azidomethyl-4-chloropyridine (49)の合成^[7]

48 (8.93 g, 55.1 mmol), NaN₃ (10.1 g, 155 mmol)を DMF (180 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 NaHCO₃ 水溶液 (100 mL)を加え、EtOAc-hexane (1/1, 3 × 300 mL)で分液した。有機層を取り出した後、飽和 NaCl 水溶液 (2 × 300 mL)で分液した。有機層に Na₂SO₄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 (8.70 g, Yield: 94%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ/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, CH₂)。

2-Aminomethyl-4-chloropyridine (50)の合成^[7]

49 (8.54 g, 50.7 mmol)を THF (73 mL)に溶解させ、氷浴に浸した後、PPh₃ (20.0 g, 76.3 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、H₂O (4 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 CHCl₃ (100 mL)に溶解させ、1 M HCl (3 × 100 mL)で分液した。水層を取り出した後、2 M NaOH 水溶液で pH を 11 にした。これを CHCl₃ (3 × 100 mL)で分液した。有機層に Na₂SO₄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 (6.50 g, Yield: 90%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ/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, CH₂)。

1-tert-Butoxycarbonyl-bis((2-(4-chloropyridyl)methyl)amine) (51)の合成^[7]

47 (6.55 g, 46.5 mmol), 50 (6.28 g, 44.2 mmol)を MeOH (50 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。¹H NMR スペクトルでイミンの形成及び 50 が残っていないことを確認した後、NaBH₄ (4.18 g, 110 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。¹H 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 K₂CO₃ 水溶液を用いて塩基性にした。CH₂Cl₂ (3 × 300 mL)で分液し、有機層に Na₂SO₄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 CH₂Cl₂ (90 mL)に溶解させ、氷浴に浸した後、Et₃N (10.5 mL, 75.1 mmol)を加えた。ここに、CH₂Cl₂ (90 mL)に溶解させた Boc₂O (16.4 g, 75.1 mmol)を N₂ 雰囲気下で加え、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 CH₂Cl₂ (100 mL)を加え、飽和 NaHCO₃ 水溶液 (3 × 60 mL)で分液した。有機層に Na₂SO₄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 CHCl₃に溶解させ、シリカゲルカラムクロマト

グラフィー(CHCl₃/MeOH 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油状物質が得られた(9.76 g, Yield: 60%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 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, CH₂), 4.57 (s, 2H, CH₂), 1.44 (s, 9H CH₃).

Di((2-(4-chloropyridyl)methyl)amine) (52)の合成^[7]

51 (6.38 g, 16.5 mmol)を EtOH (90 mL), 12 M HCl (30 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 K₂CO₃ 水溶液(30 mL)に溶解させ、CH₂Cl₂ (3 × 90 mL)で分液した。有機層に Na₂SO₄ 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、真空乾燥すると黄色の油状物質が得られた(3.91 g, Yield: 88%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ/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, CH₂).

HL1^{4-Cl}の合成^[9]

24 (43.9 mg, 0.224 mmol)を SOCl₂ (3 mL)に溶解させ、60°C で 4 時間攪拌した。SOCl₂ 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。**52** (150 mg, 0.560 mmol), K₂CO₃ (255 mg, 1.85 mmol)を CH₂Cl₂ (5 mL)に溶解させた。この溶液に、先程の油状物質を CH₂Cl₂ (5 mL)に溶解させた溶液を N₂ 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 CHCl₃ に溶解させ、アルミナカラムクロマトグラフィー(CHCl₃/MeOH 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(102 mg, Yield: 65%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ/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, CH₂), 4.60 (s, 4H, CH₂), 2.09 (s, 3H, CH₃). ESI MS (MeOH *m/z*, positive mode). Calcd for [HL1^{4-Cl} + H]⁺: 695.09. Found: 695.09.

N-(8-Azido-3,6-dioxaoctyl)-2,6-di(*N,N*-bis(2-(4-methoxypyridyl)methyl)carbamoyl)-1-hydroxy-4-benzamide (53)の合成

35 (159 mg, 0.416 mmol)を CH₂Cl₂ (4 mL)に溶解させ、SOCl₂ (75 μL)を加えて 60°C で 1 時間攪拌した。SOCl₂ を留去した後、真空乾燥すると黄色の固体が得られた。この固体は精製を行わずに次の反応に用いた。**46** (216 mg, 0.833 mmol), K₂CO₃ (403 mg, 2.92 mmol)を CH₂Cl₂ (5 mL)に溶解させた。この溶液に、先程の固体を CH₂Cl₂ (5 mL)に溶解させた

溶液を N₂ 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。反応溶液をセライト濾過した後、濾液をロータリーエバポレーターで濃縮、真空乾燥すると深緑色の固体が得られた。これを最少量の CHCl₃ に溶解させ、アルミナカラムクロマトグラフィー(CHCl₃/MeOH 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、真空乾燥すると緑色の固体が得られた(199 mg, Yield: 55%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃); δ /ppm: 8.37 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, Py), 8.32 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, Py), 7.93 (s, 2H, Ph), 7.02–7.11 (m, 2H, Py), 6.81–6.86 (m, 1H, NH), 6.73–6.78 (m, 2H, Py), 6.63–6.72 (m, 4H, Py), 4.91 (s, 4H, CH₂), 4.56 (s, 4H, CH₂), 3.89 (s, 6H, OCH₃), 3.82 (s, 6H, OCH₃), 3.47–3.70 (m, 10H, CH₂), 3.39 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, CH₂)。ESI MS (MeOH *m/z*, positive mode). Calcd for [53 + H]⁺: 865.36. Found: 865.20.

***N*-(8-Amino-3,6-dioxaoctyl)-2,6-di(*N,N*-bis(2-(4-methoxypyridyl)methyl)carbamoyl)-1-hydroxy-4-benzamide (54)の合成**

53 (199 mg, 0.230 mmol), 10% Pd/C (54.0 mg)を MeOH (10 mL)に溶解させ、脱気窒素置換した後、室温で5時間攪拌した。反応容器をセライト濾過した後、濾液をロータリーエバポレーターで濃縮すると黄色の油状物質が得られた(180 mg, Yield: 94%)。ESI MS (MeOH *m/z*, positive mode). Calcd for [54 + H]⁺: 839.37. Found: 839.15.

HL2^{4-OMe}の合成

CHCl₃ (5 mL)に溶解させた 54 (180 mg, 0.215 mmol)溶液に、CHCl₃ (10 mL)に溶解させた 30 (113 mg, 0.307 mmol), EDC•HCl (61.7 mg, 0.307 mmol)の溶液を加えた。この反応溶液に Et₃N (120 μ L, 0.860 mmol)を加え、脱気窒素置換した後、室温の暗所で一晩攪拌した。反応溶液をロータリーエバポレーターで濃縮すると赤褐色の固体が得られた。これを CHCl₃ (70 mL)に溶解させ、飽和 NaHCO₃ (3 \times 10 mL)で分液した。有機層に Na₂SO₄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すると赤色の固体が得られた。これを最少量の CHCl₃ に溶解させ、アルミナカラムクロマトグラフィー(CHCl₃/MeOH 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すると赤色の固体が得られた。これを、GL Science 社製 InertSustain C18 逆相カラム(ϕ 20 mm \times 250 mm, H₂O/MeCN)を用いて HPLCを行い、目的物が含まれているフラクションを集め、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固体が得られた(26.2 mg, Yield: 10%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃); δ /ppm: 8.36 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, Py), 8.30 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, Py), 7.98 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ph), 7.91 (s, 2H, Ph), 7.88–7.90 (m, 1H, NH), 7.19 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ph), 7.05–7.09 (m, 2H, Py), 6.98–7.03 (m, 1H, NH), 6.69–6.73 (m, 2H, Py), 6.65–6.68 (m, 2H, Py), 6.61–6.64 (m, 2H, Py), 5.93 (s, 2H, CH), 4.90 (s, 4H, CH₂), 4.55 (s, 4H, CH₂), 3.82 (s, 6H, OCH₃), 3.79 (s, 6H, OCH₃), 3.62–3.70 (m, 8H, CH₂), 3.45–3.61 (m, 4H, CH₂), 2.55 (s, 6H, CH₃), 1.26 (s, 6H, CH₃)。

ESI MS (MeCN m/z , positive mode). Calcd for $[\text{HL2}^{4\text{-OMe}} + \text{Na}]^+$: 1211.49. Found: 1211.42.

***N*-(8-Azido-3,6-dioxaoctyl)-2,6-di(*N,N*-bis(2-(4-chloropyridyl)methyl)carbamoyl)-1-hydroxy-4-benzamide (55)の合成**

35 (500 mg, 1.31 mmol)を CH_2Cl_2 (7 mL)に溶解させ、 SOCl_2 (240 μL)を加えて 60°C で 1 時間攪拌した。 SOCl_2 を留去した後、真空乾燥すると白色の固体が得られた。この固体は精製を行わずに次の反応に用いた。**52** (720 mg, 2.68 mmol), K_2CO_3 (1.46 g, 10.6 mmol)を CH_2Cl_2 (20 mL)に溶解させた。この溶液に、先程の固体を CH_2Cl_2 (10 mL)に溶解させた溶液を 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。反応溶液をセライト濾過した後、濾液をロータリーエバポレーターで濃縮、真空乾燥すると深緑色の固体が得られた。これを最少量の CHCl_3 に溶解させ、アルミナカラムクロマトグラフィー($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 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、真空乾燥すると緑色の固体が得られた(0.490 g, Yield: 42%)。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3); δ/ppm : 12.1 (s, 1H, OH), 8.39–8.52 (m, 4H, Py), 7.95 (s, 2H, Ph), 7.48–7.60 (m, 2H, Py), 7.10–7.31 (m, 7H, Py, NH), 6.69–6.79 (m, 1H, NH), 4.92 (s, 4H, CH_2), 4.62 (s, 4H, CH_2), 3.60–3.70 (m, 10H, CH_2), 3.39 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H, CH_2). ESI MS (MeOH m/z , positive mode). Calcd for $[\mathbf{55} + \text{Na}]^+$: 903.15. Found: 903.19.

***N*-(8-Amino-3,6-dioxaoctyl)-2,6-di(*N,N*-bis(2-(4-chloropyridyl)methyl)carbamoyl)-1-hydroxy-4-benzamide (56)の合成**

55 (44.5 mg, 0.0504 mmol), 10% Pd/C (0.200 mg)を MeOH (2 mL)に溶解させ、脱気窒素置換した後、室温で 5 時間攪拌した。反応容器をセライト濾過した後、濾液をロータリーエバポレーターで濃縮すると黄色の油状物質が得られた(25.7 mg, Yield: 60%)。ESI MS (MeOH m/z , positive mode). Calcd for $[\mathbf{56} + \text{H}]^+$: 855.17. Found: 855.19.

HL2^{4-Cl}の合成

CHCl_3 (1.5 mL)に溶解させた **56** (25.7 mg, 0.0300 mmol)溶液に、 CHCl_3 (2.5 mL)に溶解させた **30** (52.4 mg, 0.142 mmol), EDC \cdot HCl (30.0 mg, 0.156 mmol)の溶液を加えた。この反応溶液に Et_3N (120 μL , 0.860 mmol)を加え、脱気窒素置換した後、室温の暗所で一晩攪拌した。反応溶液をロータリーエバポレーターで濃縮すると赤褐色の固体が得られた。これを最少量の CHCl_3 に溶解させ、アルミナカラムクロマトグラフィー($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10/1)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すると赤褐色の固体が得られた。これを、GL Science 社製 InertSustain C18 逆相カラム($\phi 20$ mm \times 250 mm, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$)を用いて HPLC を行い、目的物が含まれているフラクションを集め、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固体が得られた(11.1 mg, Yield: 31%)。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3); δ/ppm : 12.2 (s,

1H, OH), 8.40–8.48 (m, 4H, Py), 7.95–7.99 (m, 2H, Ph), 7.94 (s, 2H, Ph), 7.49–7.52 (m, 2H, Py), 7.34–7.41 (m, 1H, NH), 7.15–7.30 (m, 4H, Ph, Py), 6.76–6.80 (m, 1H, NH), 5.96 (s, 2H, CH), 4.91 (s, 4H, CH₂), 4.61 (s, 4H, CH₂), 3.57–3.75 (m, 12H, CH₂), 2.55 (s, 6H, CH₃), 1.29 (s, 6H, CH₃). ¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆); δ /ppm: 8.40–8.60 (m, 4H, Py), 8.05–8.15 (m, 3H, Ph, NH), 7.97 (s, 2H, Ph), 7.65–7.80 (m, 3H, Ph, NH), 7.29–7.50 (m, 8H, Py), 6.10 (s, 2H, CH), 4.96 (s, 4H, CH₂), 4.76 (s, 4H, CH₂), 3.47–3.69 (m, 12H, CH₂), 2.50 (s, 6H, CH₃), 1.35 (s, 6H, CH₃). ESI MS (MeCN *m/z*, positive mode). Calcd for [HL2^{4-Cl} + Na]⁺: 1227.30. Found: 1227.29.

二核銅(II)錯体 10b の合成

MeCN (3 mL)に Cu(OAc)₂ (27.5 mg, 0.151 mmol)を溶解させた溶液に, MeCN (2 mL)に HL1^{4-OMe} (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 Et₂O 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 [Cu₂(μ -1,1-OAc)(μ -1,3-OAc)(L1^{4-OMe})](OAc)•4H₂O: C, 49.00; H, 5.16; N, 7.97. Found: C, 49.03; H, 4.77; N, 7.80. ESI MS (H₂O *m/z*, positive mode). Calcd for [10b - OAc]⁺: 921.16. Found: 921.10. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ /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 10a の合成

MeCN (1 mL)に溶解させた 10b (8.7 mg, 7.94 μ mol)の溶液に, 1 M NH₄PF₆ MeCN 溶液 (8.9 μ L, 8.9 μ mol)を加え, 室温で 10 分間攪拌した. この溶液に benzene を少量加え, Et₂O 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 11b の合成

MeCN (2 mL)に Cu(OAc)₂ (72.0 mg, 0.396 mmol)を溶解させた溶液に, MeCN (2 mL)に HL1^{4-Cl} (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 Et₂O 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 [Cu₂(μ -1,3-OAc)₂(L1^{4-Cl})](OAc)•2.5H₂O: C, 44.84; H, 3.76; N, 8.04. Found: C, 44.49; H, 3.33; N, 7.82. ESI MS (H₂O *m/z*, positive mode). Calcd for [11b - OAc]⁺: 936.96. Found: 936.95. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ /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 11a の合成

MeCN (0.2 mL)に溶解させた **11b** (7.8 mg, 7.29 μmol)の溶液に, 1 M NaClO₄•H₂O MeCN 溶液(7.8 μL , 7.8 μmol)を加え, 室温で 10 分間攪拌した. この溶液を Et₂O 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 12 の合成

MeCN (1 mL)に Cu(OAc)₂ (5.5 mg, 30.4 μmol)を溶解させた溶液に, MeCN (1 mL)に HL²⁺^{OMe} (18.1 mg, 15.2 μmol)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 0.2 mL にした. この溶液に Et₂O を加えると固体が析出したので, これを濾過し, 真空乾燥すると茶色の固体が得られた(19.6 mg, Yield: 79%). Anal. calcd for [Cu₂(μ -OAc)₂(L²⁺^{OMe})](OAc)•7.5H₂O: C, 50.92; H, 5.57; N, 8.61. Found: C, 50.65; H, 5.09; N, 8.40. ESI MS (MeCN *m/z*, positive mode). Calcd for [**12** - OAc]⁺: 1431.38. Found: 1431.10. IR (KBr): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3686–3447, 3001–2789, 2374, 2349, 2313, 1613, 1547, 1508, 1456, 1435, 1417, 1306, 1196, 1157, 1121, 1086, 1040, 982, 908, 853, 839, 773, 735, 679, 646, 637, 604. UV-vis spectra (MeCN at room temperature, 25 μM): 228 nm (ϵ = 73000 M⁻¹ cm⁻¹), 278 nm (ϵ = 19000 M⁻¹ cm⁻¹), 310 nm (ϵ = 11000 M⁻¹ cm⁻¹), 388 nm (ϵ = 3000 M⁻¹ cm⁻¹), and 499 nm (ϵ = 60000 M⁻¹ cm⁻¹).

二核銅(II)錯体 13 の合成

MeCN (1 mL)に Cu(OAc)₂ (3.4 mg, 18.4 μmol)を溶解させた溶液に, MeCN (1 mL)に HL²⁺^{Cl} (11.1 mg, 9.20 μmol)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 0.2 mL にした. この溶液に Et₂O を加えると固体が析出したので, これを濾過し, 真空乾燥すると茶色の固体が得られた(10.6 mg, Yield: 70%). Anal. calcd for [Cu₂(μ -OAc)₂(L²⁺^{Cl})](OAc)•5H₂O: C, 48.79; H, 4.60; N, 8.75. Found: C, 48.81; H, 4.36; N, 8.88. ESI MS (MeCN *m/z*, positive mode). Calcd for [**13** - OAc]⁺: 1447.19. Found: 1447.10. IR (KBr): $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ = 3690–3161, 3138–3009, 2982–2830, 1640, 1597, 1547, 1508, 1464, 1443, 1410, 1306, 1258, 1194, 1157, 1113, 1086, 1047, 1024, 982, 872, 829, 758, 737, 718, 706, 677, 638, 617. UV-vis spectra (MeCN at room temperature, 25 μM): 228 nm (ϵ = 62000 M⁻¹ cm⁻¹), 281 nm (ϵ = 21000 M⁻¹ cm⁻¹), 308 nm (ϵ = 13000 M⁻¹ cm⁻¹), 388 nm (ϵ = 3400 M⁻¹ cm⁻¹), and 499 nm (ϵ = 69000 M⁻¹ cm⁻¹).

5-5-3. MTT assay による細胞毒性の評価

96 well プレートに blank として培地のみを 1 列と, 培地に 10 × 10⁴ cells/mL になるように懸濁させた細胞(HeLa (ヒト子宮頸がん), A549 (ヒト肺がん), WI-38 (ヒト肺正常), PK-59 (ヒト膵臓がん), 2C6 (ヒト膵臓正常)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, インキュベーター(37°C, 5% CO₂)でインキュベーション

ンした。24 時間後、PBS(-)で洗浄した。その後、サンプル列にはそれぞれの濃度に調製した錯体のサンプル(10–1000 μM)を、blank と control 列には培地のみを 1 well につき 100 μL ずつ加え、インキュベーターでインキュベーションした。24 時間後、PBS(-)で洗浄し、5 mg/mL に調製した MTT reagent 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ターで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。その後、570 nm の波長を用いて吸光度測定器で吸光度を測定し、細胞毒性を評価した。

5-5-4. 細胞内イメージング実験

観察用ディッシュ($\phi 14$ mm)に 6×10^4 cells/mL に調製した HeLa 細胞の懸濁液を 600 μL 加え、37°C、5% CO_2 条件下で 24 時間インキュベーションした。培養した HeLa 細胞から培地を除去し、PBS(-)で 2 回洗浄し、錯体 **12** 及び **13** (10–100 μM)の D10 培地溶液 (600 μL)を加え、37°C、5% CO_2 条件下で 1, 12, 24 時間インキュベーションした。培地を除去し、PBS(-)で 2 回洗浄し、核、ミトコンドリア、小胞体及びゴルジ体染色として Hoechst 33342 (600 μL , 8.1 μM), Mito TrackerTM Deep Red FM (Thermo Fisher) (600 μL , 50 nM), ER-TrackerTM Red (600 μL , 1 μM)及び BodipyTM TR Ceramide (600 μL , 10 μM)を培地に加えた。核、ミトコンドリア及び小胞体染色については、37°C、5% CO_2 条件下でそれぞれ 10, 20 及び 30 分間インキュベーションし、培地を PBS(-)で 2 回洗浄した後、共焦点レーザー顕微鏡で細胞を観察した。ゴルジ体染色については、4°C、5% CO_2 条件下で 30 分間インキュベーションし、培地を PBS(-)で 2 回洗浄した後、再度培地を加えて 37°C、5% CO_2 条件下で 30 分間インキュベーションし、培地を PBS(-)で 2 回洗浄した後、共焦点レーザー顕微鏡で細胞を観察した。

5-5-5. フローサイトメトリー

観察用ディッシュ($\phi 60$ mm)に 1×10^5 cells/mL に調製した HeLa 細胞の懸濁液を 4 mL 加え、37°C、5% CO_2 条件下で 24 時間インキュベーションした。培養した HeLa 細胞から培地を除去し、PBS(-)で 2 回洗浄し、最終濃度が 100 μM になるように錯体溶液を 4 mL 加え、37°C、5% CO_2 条件下で 1, 12 時間インキュベーションした。培地を PBS(-)で 2 回洗浄し、トリプシン(0.25%)で細胞をはがした。この溶液を遠心分離機にかけ、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、懸濁させ、再度遠心分離機にかけた。溶液をアスピレーターで吸引した後、1 \times BB (1 mL)を細胞に加えて 1 \times BB 溶液を加えて 1×10^6 cells/mL (100 μL)を調製した。Annexin V-FITC 溶液(5 μL)を溶液に加え、室温で 10 分間攪拌した後、遠心分離機にかけ、溶液をアスピレーターで吸引した。細胞に 1 \times BB 溶液(500 μL)を加えて懸濁させ、遠心分離機にかけ、アスピレータ

一で溶液を吸引した。1 × BB 溶液(200 μL)を細胞に加えて懸濁させ、PI (5 μL)を加えてさらに懸濁させた。この細胞溶液(10,000 cells)を、channel BL1 (Filter 530/30, Filter Range 515/545)及び channel BL2 (Filter 574/26, Filter Range 561/587)を用いて、Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer によって観察した。

5-5-6. Comet assay による核内 DNA 損傷の検出

Comet assay は、Trevigen 社製 CometAssay[®] Electrophoresis System II を用いて測定を行った。lysis solution は、使用 20 分前に 4°C で保存した。LMAgarose は使用前に沸騰した水で完全に溶解させた後、20 分間 37°C で維持した。1 × 10⁵ cells/mL の溶液を溶解させた LMAgarose と 1:10 (v/v)の比率で混合させ、直ちにピペッティングによって攪拌した後、サンプルガラスに広げた。これらのスライドを 1 時間、4°C の暗所で保存すると、0.5 mm 程度の輪が CometSlide[™] に観察された。これらのスライドを 4°C の lysis solution に 30 分間浸し、溶液を除き、pH > 13 のアルカリ溶液に 20 分間、室温の暗所で保存した。約 850 mL のアルカリ電気泳動溶液を CometAssay[®] ES unit に加え、スライドを静置した。この後、30 分間 21 V で電気泳動を行った。電気泳動溶液を除き、5 分間蒸留水に浸す作業を 2 回繰り返した後、5 分間 70%エタノール溶液に浸した。スライドを 37°C で 10–15 分間乾燥させた後、TE buffer に溶解させた SYBR[®] Gold 溶液(100 μL)を加え、暗所で 30 分間染色させた。SYBR 溶液を除き、蒸留水で簡単に洗浄した後、37°C で乾燥させた。最後に、これらのスライドを蛍光顕微鏡で観察した。

5-6. 参考文献

- [1] (a) Caporale, C.; Massi, M. Cyclometalated iridium(III) complexes for life science. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *363*, 71–91. (b) King, A. P.; Wilson, J. J. Endoplasmic reticulum stress: an arising target for metal-based anticancer agents. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, in press.
- [2] Schwarz, D. S.; Blower, M. D. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 79–94.
- [3] (a) Xu, C.; Bailly-Maitre, B.; Reed, J. C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *Clin. Invest.* **2005**, *115*, 2656–2664. (b) Schönthal, A. H. Endoplasmic Reticulum Stress: Its Role in Disease and Novel Prospects for Therapy. *Scientifica* **2012**, *2012*, 1–26.
- [4] (a) Wilson, C.; Venditti, R.; Rega, L. R.; Colanzi, A.; D'Angelo, G.; De Matteis, M. A. The Golgi apparatus: an organelle with multiple complex functions. *Biochem. J.* **2011**, *433*, 1–9. (b) Rabouille, C.; Haase, G. Editorial: Golgi Pathology in Neurodegenerative Diseases. *Front. Neurosci.* **2016**, *9*, 489–491.
- [5] Fan, J.; Hu, Z.; Zeng, L.; Lu, W.; Tang, X.; Zhang, J.; Li, T. Golgi apparatus and neurodegenerative diseases. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2008**, *26*, 523–534.
- [6] Kaur, P.; Singh, K. Recent advances in the application of BODIPY in bioimaging and chemosensing. *J. Mater. Chem. C.* **2019**, *7*, 11361–11405.
- [7] Fuchida, H.; Tabata, S.; Shindo, N.; Takashima, I.; Leng, Q.; Hatsuyama, Y.; Hamachi, I.; Ojida, A. Design of Coordination Interaction of Zn(II) Complex with Oligo-Aspartate Peptide to Afford a High-Affinity Tag-Probe Pair. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2015**, *88*, 784–791.
- [8] Comba, P.; Morgen, M.; Wadepohl, H. Tuning of the Properties of Transition-Metal Bispidine Complexes by Variation of the Basicity of the Aromatic Donor Groups. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 6481–6501.
- [9] Kadoya, Y.; Fukui, K.; Hata, M.; Miyano, R.; Hitomi, Y.; Yanagisawa, S.; Kubo, M.; Kodera, M. Oxidative DNA Cleavage, Formation of μ -1,1-Hydroperoxo Species, and Cytotoxicity of Di-copper(II) Complex Supported by a *p*-Cresol-Derived Amide-Tether Ligand. *Inorg. Chem.* **2019**, *58*, 14294–14298.
- [10] Addison, A. W.; Rao, T. N.; Reedijk, J.; Rijn, J. V.; Verschoor, G. C. Synthesis, structure, and spectroscopic properties of copper(II) compounds containing nitrogen-sulphur donor ligands; the crystal and molecular structure of aqua[1,7-bis(*N*-methylbenzimidazol-2'-yl)-2,6-dithiaheptane]copper(II) perchlorate. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1984**, *7*, 1349–1356.
- [11] (a) Kurbah, S. D.; Kumar, A.; Syiemlieh, I.; Dey, A. K.; Lal, R. A. Synthesis, characterization, structure and properties of heterobimetallic complexes [CuNi(μ -OAc)(μ -OH)(μ -OH₂)(bpy)₂](BF₄)₂ and [CuNi(bz)₃(bpy)₂]ClO₄ from 2,2' bipyridine. *J. Mol. Struct.* **2018**, *1154*, 535–542. (b) Zhang, Y.; Liu, L.-Z.; Peng, Y.-D.; Li, N.; Dong, W.-K. Structurally characterized trinuclear nickel(II) and copper(II) Salamo-type complexes: syntheses, Hirshfeld analyses and

fluorescent properties. *Transit. Met. Chem.* **2019**, *44*, 627–639.

[12] HeLa is a human cell line derived from cervical cancer cells taken from Henrietta Lacks, a patient who died of cancer.

[13] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.

第六章： *p*-cresol-2,6-bis(dpa^{4-X}) amide-tether 配位子の二核銅(II)錯体による DNA 酸化切断

6-1. 要約

第四章及び第五章では、ペンダント基として di(2-pyridylmethyl)amine (dpa) とその誘導体を amide-tether で導入した配位子 HL1^{4-X} [X = H, OMe, and Cl] とその二核銅(II)錯体 [Cu₂(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L1^{4-H})](OAc) (**7b**), [Cu₂(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L1^{4-OMe})](OAc) (**10b**), [Cu₂(μ-1,3-OAc)₂(L1^{4-Cl})](OAc) (**11b**) を合成し、これらの錯体の構造及び特徴を詳細に明らかにした。特に、側鎖ピリジル基に置換基を導入した **10b** や **11b** は、**7b** と比較して高い細胞毒性を発現することを見出した。また、これらの錯体はいずれも、がん細胞選択的であることも明らかになった。

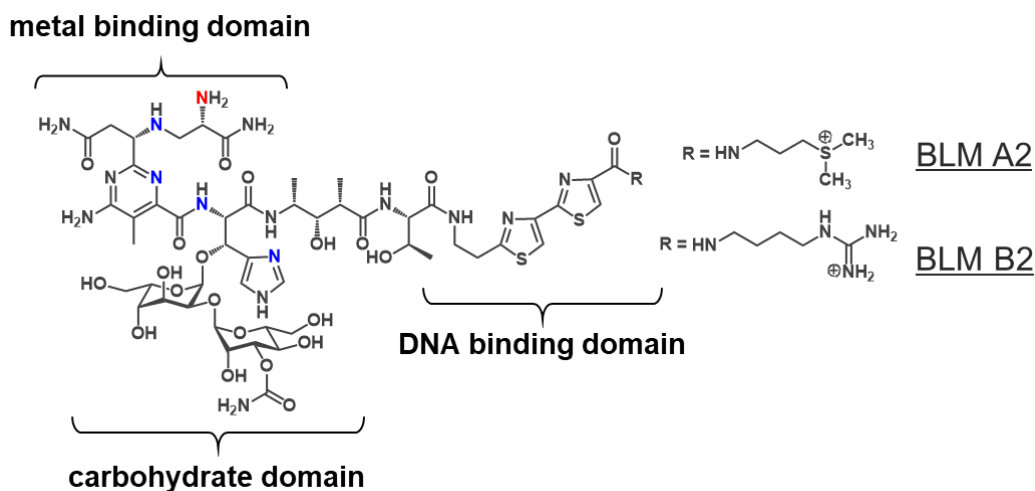
本章では、錯体 **7b**, **10b**, **11b** を用いてスーパーコイルドプラスミド DNA の酸化的切断を行った結果を記述する。過酸化水素を酸化剤とする DNA 切断が **7b** により加速されることは第四章で記述した。本章では、電子供与基としてメトキシ基、電子求引基としてクロロ基をそれぞれ持つ錯体 **10b**, **11b** を用いて同様な反応を行った。その結果、**11b** が最も高い活性を示した。酸素分子の還元的活性化による DNA 酸化切断を行うために、還元剤としてアスコルビン酸ナトリウム(AscNa)を用いて空気下で DNA 切断を行ったところ、過酸化水素を酸化剤とする反応よりもはるかに高い DNA 切断活性を示した。錯体 **7b**, **10b**, **11b** は、AscNa (150 μM) 存在下、空気下の反応で、反応開始後 1 分で DNA Form III をそれぞれ 30, 57, 21% 生成し、電子供与基を持つ **10b** が最も高い活性を示した。錯体 **7b**, **10b**, **11b** の DNA 切断活性は、関連する methylene-tether 配位子 Hbpmp (2,6-bis[di(2-pyridylmethylaminomethyl)-*p*-cresol]) の二核銅(II)錯体 [Cu₂(μ-OH)(bpmp)]²⁺ (**8**) よりもはるかに高かった。さらに、これまでに高い DNA 切断活性を示すと報告されている N4Py 配位子 (*N,N*-bis(2-pyridylmethyl)-*N*-bis(2-pyridyl)methylamine) の単核鉄(II)錯体 [Fe(N4Py)(MeCN)]²⁺ (**14**) と比較してもはるかに高活性であった。

6-2. 緒言

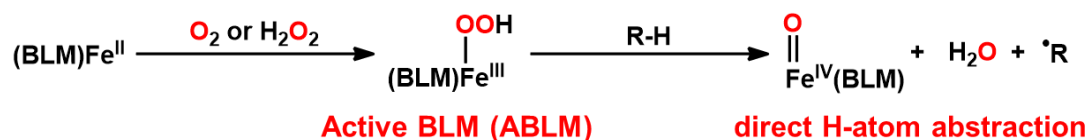
がん細胞は、正常細胞と比較して過酸化水素を含む活性酸素種(reactive oxygen species (ROS))の濃度が高いことが知られている^[1]。そこで、がん細胞内では恒常性を維持するために抗酸化物質(還元剤)の濃度もまた、正常細胞内と比較して高いことが知られている。近年のがん治療に対するアプローチの中で、がん細胞内の ROS 濃度を高めたり、また還元剤濃度を高めたりすることによってがん細胞内の恒常性を壊し、細胞分裂を停止させ、がん細胞を細胞死に導くという研究が盛んに行われている^[2]。

抗がん剤として使用されているブレオマイシン(Chart 6-1)^[3]は、投与後に体内で鉄イオンと結合して鉄(II)錯体を形成する。この鉄錯体が酸素または過酸化水素と反応して活性化ブレオマイシン(Fe(III)-OOH)を生成し、DNA の二本鎖を切断してがん細胞をアポトーシスに導くことが明らかにされている(Scheme 6-1)^[4]。ブレオマイシンは様々ながん細胞に対して効果を発揮するが、がん細胞と正常細胞の選択性を持たないため、長期使用によって肺毒性を示すことが問題点となっている^[5]。

Chart 6-1. Chemical structure of bleomycin (likely metal ligating atoms indicated in blue (equatorial) and red (axial))



Scheme 6-1. Proposal reaction pathway for ABLM



Roelfes らは, N4Py (*N,N*-bis(2-pyridylmethyl)-*N*-bis(2-pyridyl)methylamine)配位子の単核鉄(II)錯体[Fe(N4Py)(MeCN)]²⁺ (**14**)が還元剤として dithiothreitol (DTT)の存在下, DNA 切断活性を大きく加速することを報告した^[6]. この反応では, **14** は酸素と反応し, ヒドロペルオキシド鉄(III)錯体 Fe(III)-OOH を形成する. その後, O-O 結合がホモリテックに開裂してオキシド鉄(IV)錯体 Fe(IV)=O とヒドロキシラジカル・OH を生成し, ・OH が直接の活性種となって DNA を切断すると考えられる. この反応はブレオマイシンの DNA 切断機構と類似している. しかしながら, 錯体 **14** は, DNA 切断を起こすためには大量の還元剤(1 mM の DTT)を必要とし, この条件下の 1 時間の反応で DNA の Form III を 6%程度しか生成しないと報告されている^[6b].

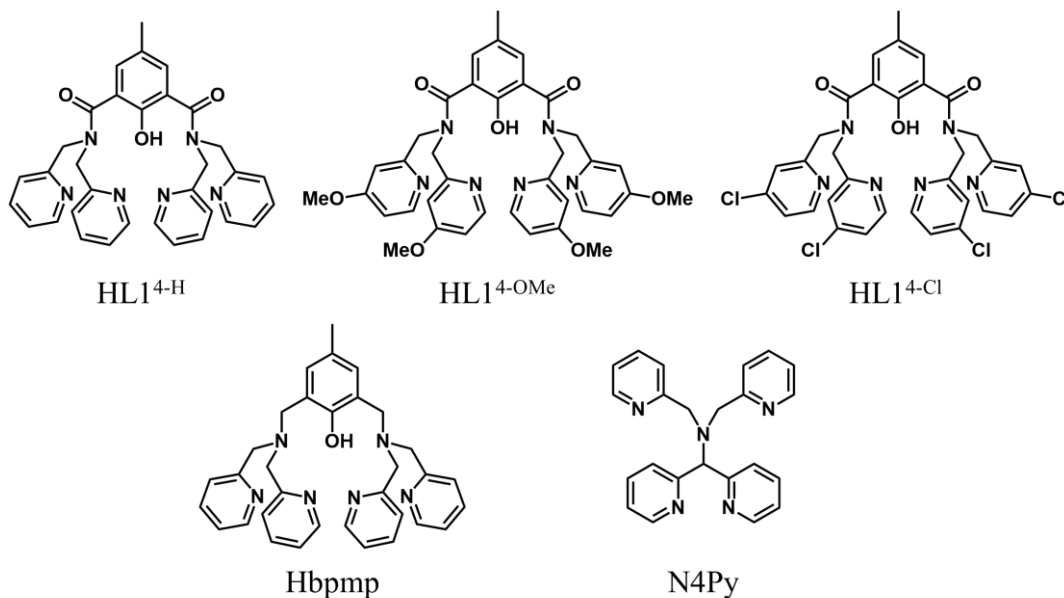
第四章及び第五章では, ペンダント基として di(2-pyridylmethyl)amine (dpa)とその誘導体を amide-tether で導入した配位子 HL1^{4-X} [X = H, OMe, and Cl]とその二核銅(II)錯体 [Cu₂(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L1^{4-H})](OAc) (**7b**), [Cu₂(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L1^{4-OMe})](OAc) (**10b**), [Cu₂(μ-1,3-OAc)₂(L1^{4-Cl})](OAc) (**11b**)が, がん細胞に対して高い細胞毒性を示すことを見出した. この中で, **7b** はミトコンドリアや核小体内の DNA または RNA を切断して細胞毒性を発現したが, **10b** や **11b** は小胞体ストレスを引き起こすことで細胞毒性を発現することが示された. この結果は, **10b** や **11b** の細胞毒性に DNA 切断は関与しないことを示すが, DNA をターゲットとする抗がん剤は効率よくがん細胞を死滅させることが知られている. そこで, もし **10b** や **11b** が高い DNA 切断活性を示すのであれば, これらの錯体に DNA 標的部位を導入すれば DNA 切断により抗がん活性を示す錯体の開発が可能になる. 本章では, そのような研究基盤を提供することを目的として, **7b**, **10b**, **11b** を用いた過酸化水素及び還元剤存在下での酸化的 DNA 切断活性を評価した.

最初に, 過酸化水素を酸化剤として用いて **7b**, **10b**, **11b** の DNA 切断活性を評価した. その結果, **10b** と **11b** は **7b** と同様に, 中性付近の pH で過酸化水素を活性化してスーパーコイルドプラスミド DNA の酸化切断を大きく加速することが明らかになった. pH 6.0, 37°C, 錯体 30 μM, 過酸化水素 50 μM の条件下では, **7b** は 120 分の反応で DNA Form III を 35%生成した(第四章). 錯体 **10b**, **11b** による酸化的 DNA 切断実験を同様の条件で行ったところ, **10b** では 29%, **11b** では 73%の Form III が生成し, 電子求引基を持つ **11b** が最も高い活性を示した. これらの活性の違いは, **7b**, **10b**, **11b** が過酸化水素との反応で生成する活性種の反応性に起因すると考えられる.

次に, 還元剤としてアスコルビン酸ナトリウム(AscNa)を用いた空気下における **7b**, **10b**, **11b** の DNA 切断を行った. その結果, **7b**, **10b**, **11b** は, 反応開始 1 分後にはそれぞれ 30, 57, 21%の DNA Form III を生成し, AscNa を用いた反応は過酸化水素を酸化剤とする反応よりもはるかに高い DNA 切断活性を示すことを見出した. 一方, 関連する methylene-tether 配位子 Hbpmp (2,6-bis[di(2-pyridylmethylaminomethyl)-*p*-cresol])の二核銅(II)錯体[Cu₂(μ-OH)(bpmp)]²⁺ (**8**)を用いて同条件で測定を行った結果, 60 分後の反応でも DNA Form III の生成割合は 0%であった. また, ブレオマイシンの反応性を模倣した

N4Py 配位子の単核鉄(II)錯体 $[\text{Fe}(\text{N4Py})(\text{MeCN})]^{2+}$ (**14**)の DNA 切断活性を同様の条件で測定した結果、反応開始後 60 分が経過しても DNA Form III の生成割合は 6%程度であった。これらの事実から、還元剤存在下の反応では、amide-tether でペンダント基を導入した二核銅錯体である **7b**, **10b**, **11b** が特異的に高い DNA 切断活性を示すことが明らかになった。さらに各種分光学的測定の結果より、**7b**, **10b** は、少量の還元剤で速やかに Cu(I)に還元されることがわかった。従って、これらの二核銅錯体は、二核銅(I)錯体の生成を経て空気中の酸素分子を還元的に活性化して高い DNA 切断活性を示す酸化活性種を生じると考えられる。本章で使用した配位子 HL1^{4-X} [X = H, OMe, and Cl], Hbpmp, N4Py の構造を Chart 6-2 に示す。

Chart 6-2. Chemical structures of HL1^{4-X} [X = H, OMe, and Cl], Hbpmp, and N4Py



6-3. 結果と考察

6-3-1. 過酸化水素存在下における DNA 切断活性の評価

錯体 **10b**, **11b** の DNA 酸化切断では、スーパーコイルドプラスミド pUC19 DNA (Form I) を基質として用いた。DNA の酸化切断で生じる Form II, III の生成量はアガロースゲル電気泳動法によって分析・定量した。ここで示す Form I, II, III は、それぞれスーパーコイルド状、1 本鎖切断の環状、2 本鎖切断の直線状 DNA である^[7]。

pH 6.0, 37°C における **10b**, **11b** (0–30 μM) を用いた過酸化水素 (0–50 μM) による DNA 切断の結果を Figure 6-1, 6-2, 6-3, 6-4 に示す。また、これらの実験におけるゲル写真とその詳細なデータを Figure S6-1, S6-2, S6-3, S6-4 及び Table S6-1, S6-2, S6-3, S6-4 に示す。少量の過酸化水素を加えることにより、**10b**, **11b** は、**7b** と同様に、Form II, III への切断を大きく加速した。一方、過酸化水素非存在下では DNA は全く切断されなかった。

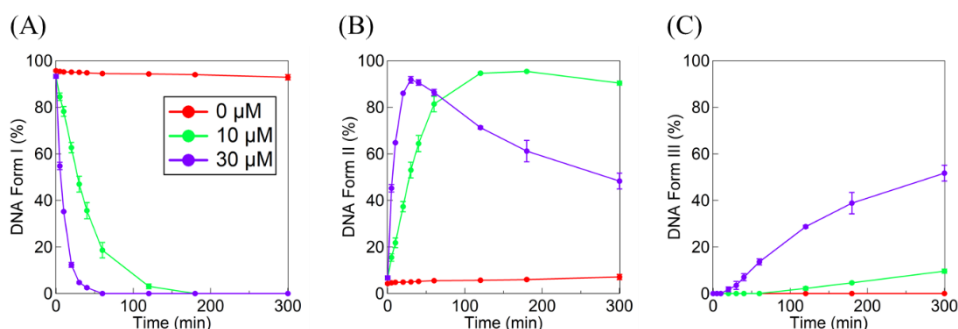


Figure 6-1. Complex concentration-dependent profile for DNA cleavage promoted by **10b**. Time courses for the decrease of % of Form I (A), increase of % of Form II (B), and Form III (C) at pH 6.0. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [pUC19 DNA] = 50 μM bp, [complex] = 0–30 μM , [H_2O_2] = 50 μM , [$\text{Cu}(\text{OAc})_2$] = 70 μM at 37°C for 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min. Experiments were carried out at least three times.

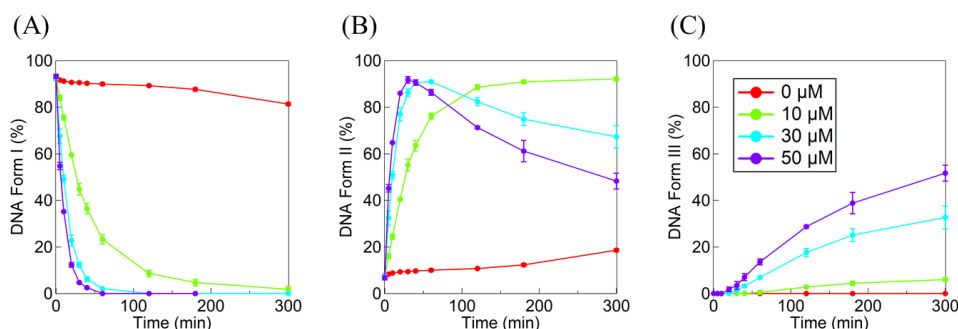


Figure 6-2. H_2O_2 concentration-dependent profile for DNA cleavage promoted by **10b**. Time courses for the decrease of % of Form I (A), increase of % of Form II (B), and Form III (C) at pH 6.0. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [pUC19 DNA] = 50 μM bp, [complex] = 30 μM , [H_2O_2] = 0–50 μM , [$\text{Cu}(\text{OAc})_2$] = 70 μM at 37°C for 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min. Experiments were carried out at least three times.

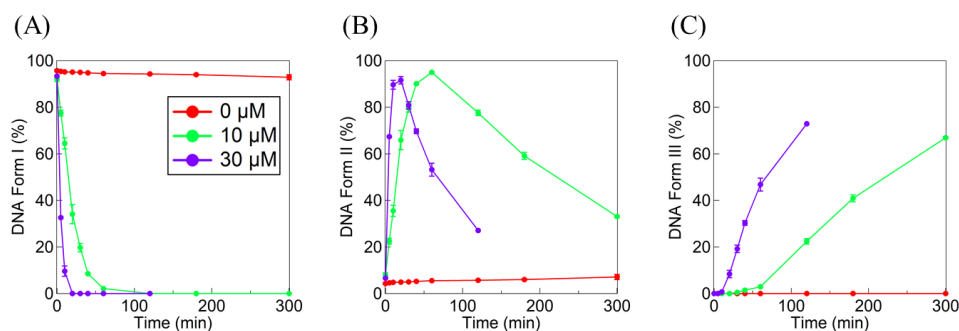


Figure 6-3. Complex concentration-dependent profile for DNA cleavage promoted by **11b**. Time courses for the decrease of % of Form I (A), increase of % of Form II (B), and Form III (C) at pH 6.0. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [pUC19 DNA] = 50 μ M bp, [complex] = 0–30 μ M, [H₂O₂] = 50 μ M, [Cu(OAc)₂] = 70 μ M at 37°C for 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min. Experiments were carried out at least three times.

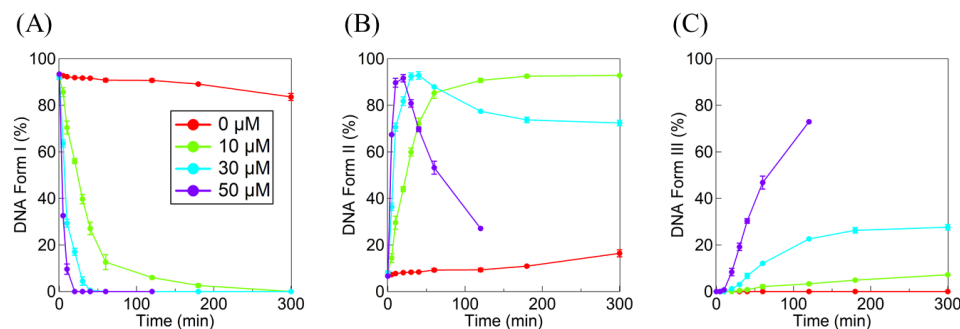


Figure 6-4. H₂O₂ concentration-dependent profile for DNA cleavage promoted by **11b**. Time courses for the decrease of % of Form I (A), increase of % of Form II (B), and Form III (C) at pH 6.0. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [pUC19 DNA] = 50 μ M bp, [complex] = 30 μ M, [H₂O₂] = 0–50 μ M, [Cu(OAc)₂] = 70 μ M at 37°C for 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min. Experiments were carried out at least three times.

錯体 **10b**, **11b** による DNA 切断の反応速度は、錯体と過酸化水素の濃度が増加するにつれて大きくなった。Form I の減少速度は、擬一次反応に従った。この擬一次反応速度定数は **10b** の濃度と過酸化水素の濃度に比例して増加し、それぞれに対して 1 次の依存性を示した(Figure 6-5, 6-6)。一方、**11b** の擬一次反応速度定数は **10b** と同様に **11b** と過酸化水素の濃度に比例して増加したが、**11b** の濃度と過酸化水素の濃度のどちらに対してもわずかに 2 次の依存性を示した(Figure 6-7, 6-8)。これらは、**10b** は過酸化水素と反応して二核銅パーオキシ錯体を生成することを示している。また、**11b** は過酸化水素と反応して主に二核銅パーオキシ錯体を生成するが、**7b** と同様に、活性の高い四核銅パーオキシ錯体が少量だけ生成することを示唆している。

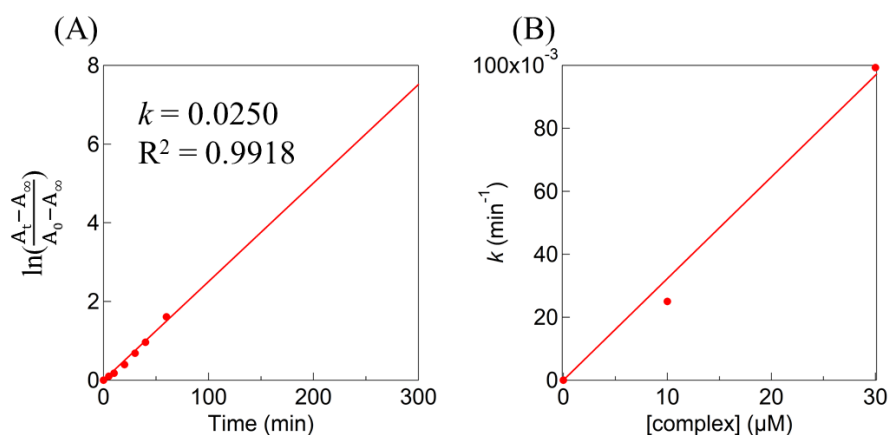


Figure 6-5. (A) A pseudo-first-order plot for the decrease of % of Form I in the reaction with **10b** (10 μM) in the presence of H_2O_2 (50 μM). (B) A plot of the pseudo-first-order constant vs concentration of **10b** (0–30 μM).

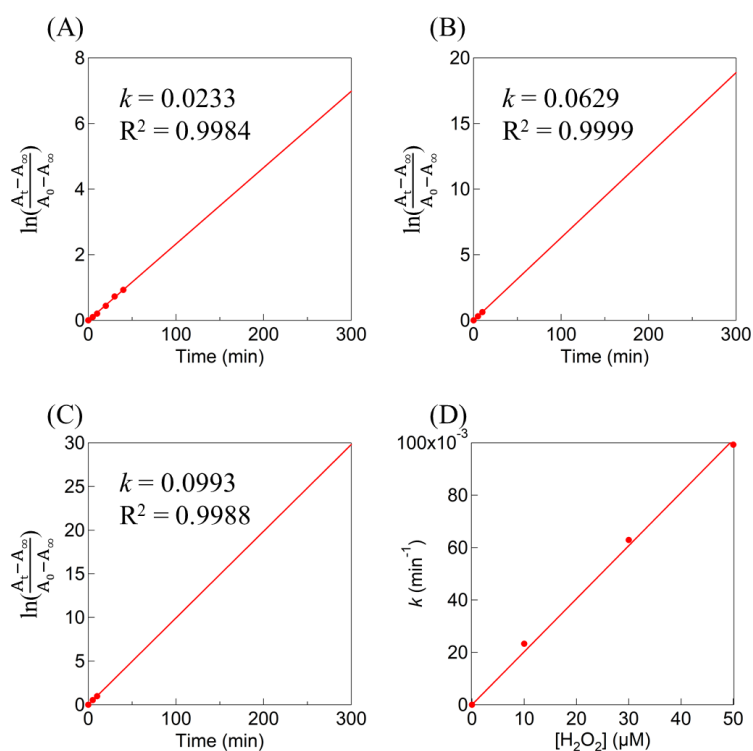


Figure 6-6. Pseudo-first-order plots for the decrease of % of Form I in the reaction with **10b** ((A) 10 μM , (B) 30 μM , and (C) 50 μM). (D) A plot of the pseudo-first-order constant vs concentration of H_2O_2 (0–50 μM).

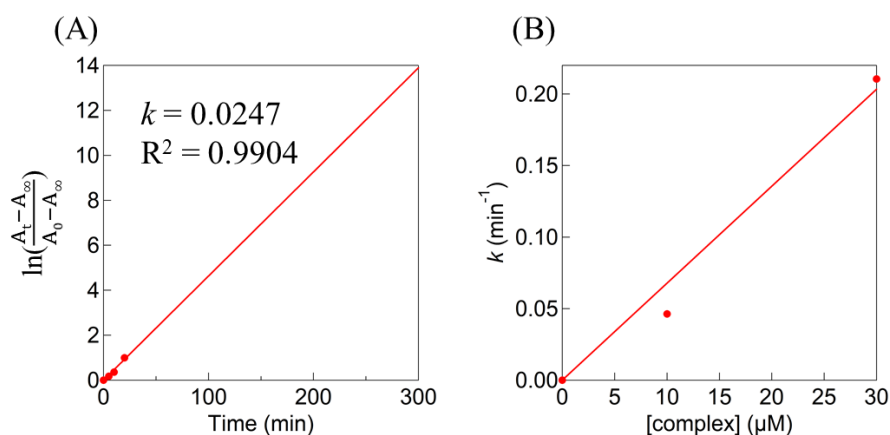


Figure 6-7. (A) A pseudo-first-order plot for the decrease of % of Form I in the reaction with **11b** (10 μM) in the presence of H_2O_2 (50 μM). (B) A plot of the pseudo-first-order constant vs concentration of **11b** (0–30 μM).

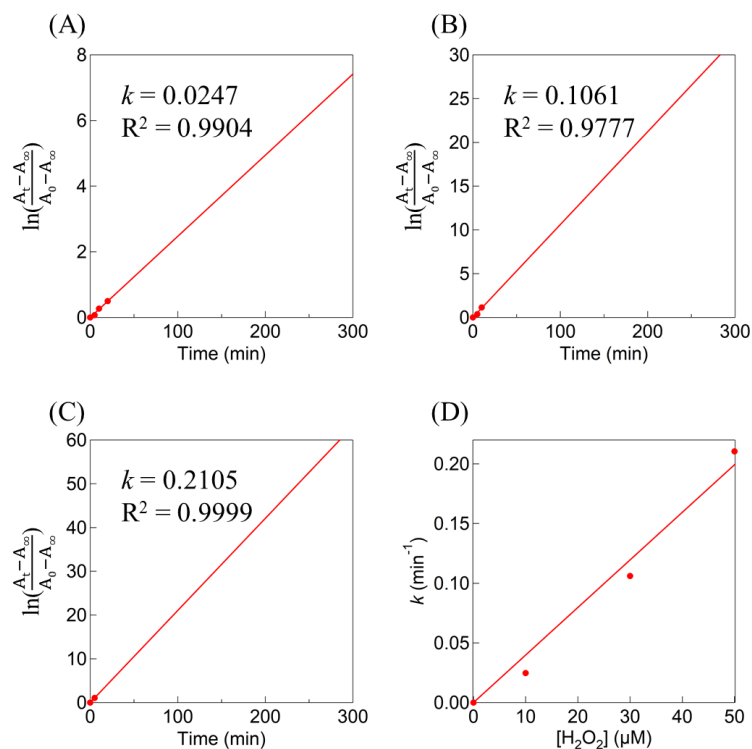


Figure 6-8. Pseudo-first-order plots for the decrease of % of Form I in the reaction with **11b** ((A) 10 μM , (B) 30 μM , and (C) 50 μM). (D) A plot of the pseudo-first-order constant vs concentration of H_2O_2 (0–50 μM).

pH 6.0, 37°C における **7b**, **10b**, **11b** (30 μ M) を用いた過酸化水素(50 μ M) による DNA 酸化切断結果の比較を Figure 6-9 に示す. **7b** (green), **10b** (light blue), **11b** (purple) は, 120 分後にそれぞれ 35%, 29%, 73% の Form III を生成した. これらの活性の違いは酸化活性種の反応性の違いによると考えられる. **10b** の OMe 基は電子供与性であり, 銅イオンのルイス酸性を低下させる. このために, **10b** から生じる酸化活性種の求電子性が弱められ, DNA 酸化切断活性が低下したと推測される. 一方, 電子求引基の Cl 基を持つ **11b** は, 酸化活性種の求電子性が強められ, DNA 酸化切断活性が向上したと推測される.

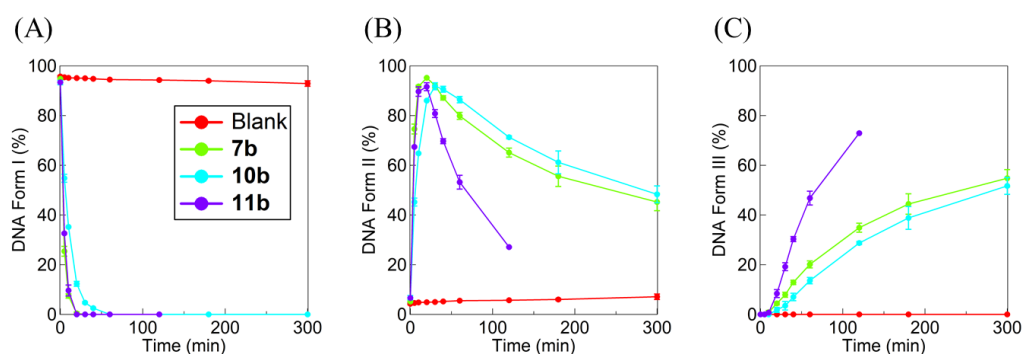


Figure 6-9. Time courses for decrease of percent of Form I (A), increase of percent of Form II (B) and Form III (C) upon reaction of pUC19 DNA (50 μ M bp) with **7b** (green), **10b** (light blue), **11b** (purple) (30 μ M), and no complex (red) in the presence of H₂O₂ (50 μ M), NaCl (10 mM), and Cu(OAc)₂ (70 μ M) at pH 6.0 (MES, 10 mM) at 37°C. The reactions were analyzed at 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min.

pH 6.0, 7.4 における, **10b**, **11b** (30 μ M) を用いた過酸化水素(50 μ M) による DNA 酸化切断結果の比較を Figure 6-10, 6-11 に示す. また, ゲル写真と詳細なデータを Figure S6-5 と Table S6-5 に示す. 錯体 **10b**, **11b** による Form III の生成の初期速度は pH 7.4 で加速された. これらの結果は, 第四章で示した **7b** の結果と一致しており, **10b**, **11b** と過酸化水素が反応して生成する活性種は, 高 pH 領域で脱プロトン化されて生成が加速されることを示唆している. しかし, pH 7.4 では **10b**, **11b** いずれの場合も反応開始から 30 分程度で, Form III の生成が飽和しており, 錯体の分解が起こっている可能性が考えられる. これについては反応途中の錯体の構造変化を調べる必要がある.

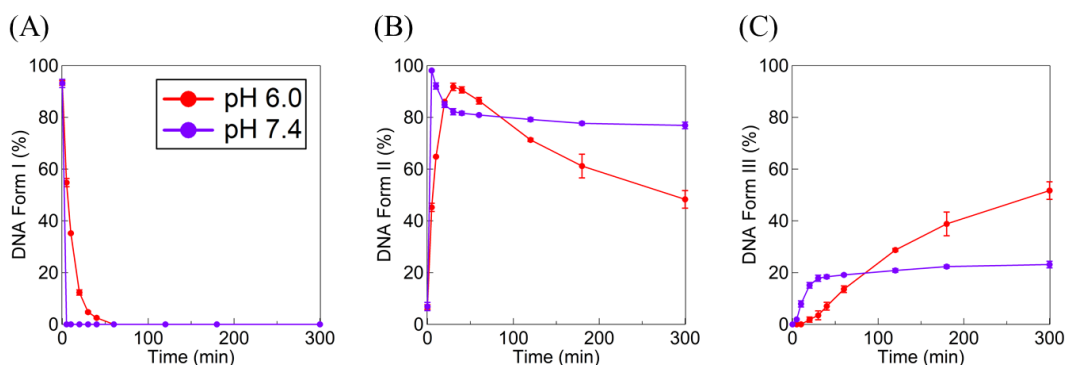


Figure 6-10. pH-dependent profile for DNA cleavage promoted by **10b**. Time courses for the decrease of % of Form I (A), increase of % of Form II (B), and Form III (C) at pH 6.0 and 7.4. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES) and 7.4 (MOPS)), [pUC19 DNA] = 50 μ M bp, [complex] = 30 μ M, [H₂O₂] = 50 μ M, [Cu(OAc)₂] = 70 μ M at 37°C for 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min. Experiments were carried out at least three times.

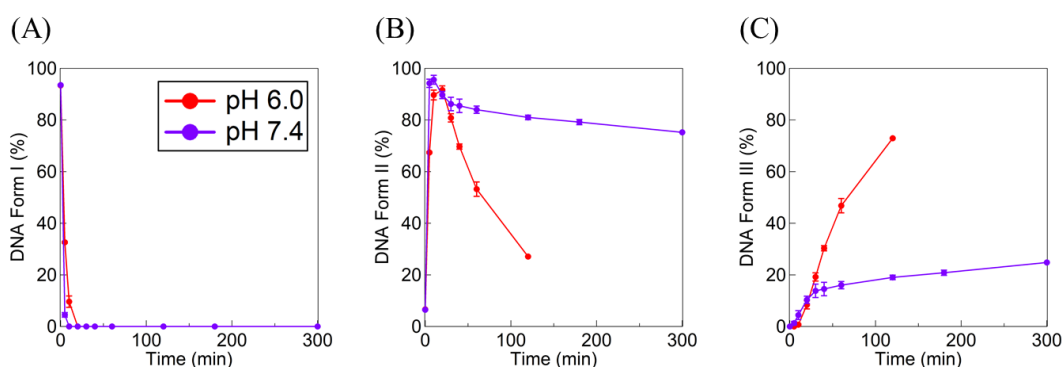


Figure 6-11. pH-dependent profile for DNA cleavage promoted by **11b**. Time courses for the decrease of % of Form I (A), increase of % of Form II (B), and Form III (C) at pH 6.0 and 7.4. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES) and 7.4 (MOPS)), [pUC19 DNA] = 50 μ M bp, [complex] = 30 μ M, [H₂O₂] = 50 μ M, [Cu(OAc)₂] = 70 μ M at 37°C for 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min. Experiments were carried out at least three times.

6-3-2. 過酸化水素存在下における DNA 切断阻害実験

ヨウ化カリウム KI^[8,9]またはジメチルスルホキシド DMSO^[8,10]の存在下で, **10b**, **11b** による DNA の酸化的切断を調べた(Figure 6-12, 6-13). KI は過酸化水素の還元剤として知られており, DMSO はヒドロキシラジカルのトラップ剤である. この実験のゲル写真と詳細なデータを Figure S6-6, S6-7 及び Table S6-6, S6-7 に示す. DMSO (1.0, 5.0, 10 mM) 存在下の反応では, Form I の減衰と Form III の増加に対して阻害効果は認められなかった. 従って, **10b**, **11b** の DNA 酸化切断にヒドロキシラジカルは関与していないといえる. 一方, 大過剰の KI (5.0 and 10 mM)存在下では, Form I の減衰は阻害されなかったが, Form III の生成は阻害された. これは, KI が比較的ゆっくりと過酸化水素を還元するため, 初期の速い反応である Form I の減衰は阻害されず, その後起こる遅い反応である Form III の生成が阻害されたと考えられる. これらの結果は, ヒドロキシラジカルと過酸化水素は酸化的 DNA 切断の直接的な酸化活性種ではなく, 二核銅パーオキシ錯体の様な錯体由来の酸化活性種が生成していることを示唆しており, **7b** と同様の機構で反応が進行していると推定される.

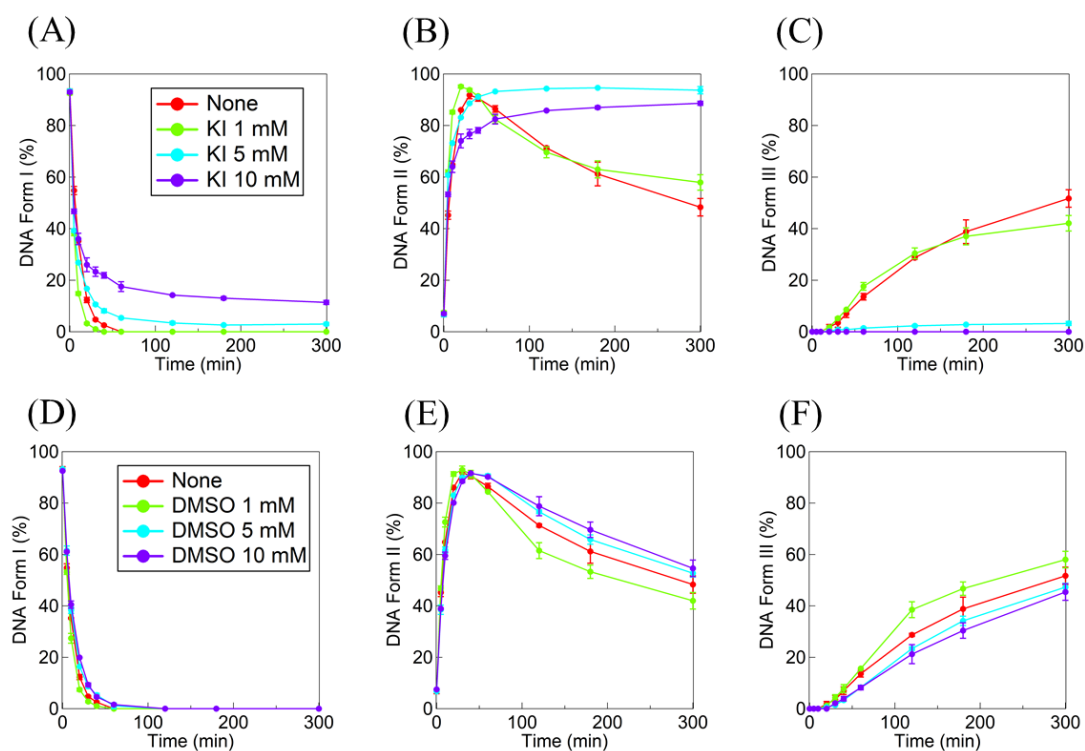


Figure 6-12. Time courses for the decrease of % of Form I (A), (D), increase of % of Form II (B), (E), and Form III (C), (F) in the reaction of **10b** with KI (upper) and DMSO (bottom), respectively. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [pUC19 DNA] = 50 μ M bp, [**10b**] = 30 μ M, [H₂O₂] = 50 μ M, [Cu(OAc)₂] = 70 μ M, [KI] = [DMSO] = 0–10 mM at 37°C for 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min. Experiments were carried out at least three times.

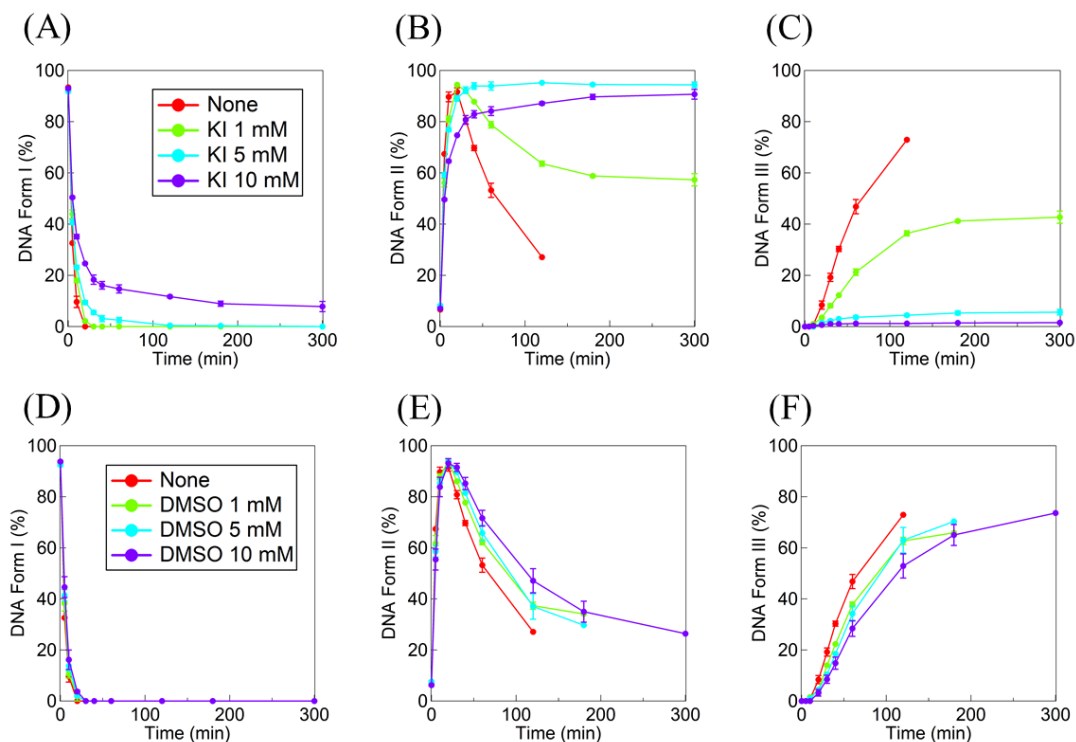


Figure 6-13. Time courses for the decrease of % of Form I (A), (D), increase of % of Form II (B), (E), and Form III (C), (F) in the reaction of **11b** with KI (upper) and DMSO (bottom), respectively. Experimental conditions: $[\text{NaCl}] = 10 \text{ mM}$, $[\text{buffer}] = 10 \text{ mM}$ (pH 6.0 (MES)), $[\text{pUC19 DNA}] = 50 \text{ }\mu\text{M}$ bp, $[\mathbf{11b}] = 30 \text{ }\mu\text{M}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 50 \text{ }\mu\text{M}$, $[\text{Cu}(\text{OAc})_2] = 70 \text{ }\mu\text{M}$, $[\text{KI}] = [\text{DMSO}] = 0\text{--}10 \text{ mM}$ at 37°C for 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min. Experiments were carried out at least three times.

6-3-3. 分光学的測定による活性種の検出

活性種の検出を目的として、**10b**, **11b** と過酸化水素の反応を電子スペクトル及び CSI MS スペクトルで追跡した。しかしながら、生成する活性種の反応性が高く、直接的に分光学的証拠を得ることはできなかった。第四章で示した様に、**7b** は過酸化水素を活性化して MeCN を酸化する能力がある。錯体 **7b** の反応と同条件で CSI MS スペクトルを測定して同様の結果が得られれば、生成する活性種は同一のものである可能性が高い。そこで、MeCN 中、 -40°C で、**10b**, **11b** と過酸化水素の反応を CSI MS スペクトルで追跡した。その結果、MeCN がギ酸に変換されて銅に配位した $[\text{L1}^{4\text{-OMe}} + 2\text{Cu(II)} + \text{OAc} + \text{HCO}_2]^+$ と $[\text{L1}^{4\text{-Cl}} + 2\text{Cu(II)} + \text{OAc} + \text{HCO}_2]^+$ に相当する質量ピークがそれぞれ m/z : 907.01 と 922.87 に観測された(Figure 6-14, 6-16)。また、 ^{18}O ラベルした過酸化水素($\text{H}_2^{18}\text{O}_2$)を用いて観測された質量ピークは、それぞれ 909.05 ($[\text{L1}^{4\text{-OMe}} + 2\text{Cu(II)} + \text{HC}^{16}\text{O}^{18}\text{O}]^+$)と 924.86 ($[\text{L1}^{4\text{-Cl}} + 2\text{Cu(II)} + \text{HC}^{16}\text{O}^{18}\text{O}]^+$)に 2 マスシフトした(Figure 6-15, 6-17)ことからギ酸の1つの酸素原子は $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ 由来であると言える。この反応では、MeCN は錯体と過酸化水素から生じる酸化活性種によって一原子酸素化されてシアノヒドリン(HOCH_2CN)に変換された後、HCN がとれて HCHO が生成し、これが空気酸化されてギ酸が生成したと考えられる。これは、第四章で述べた様に、錯体と過酸化水素の反応で μ -1,1- O_2H 錯体が生じていることを示唆している。DNA 酸化切断の速度論解析、阻害実験、CSIMS による反応追跡などの実験事実から、**10b**, **11b** は過酸化水素と反応して μ -1,1- O_2H 錯体を生成し、これが直接の酸化活性種として DNA を切断すると推定される。

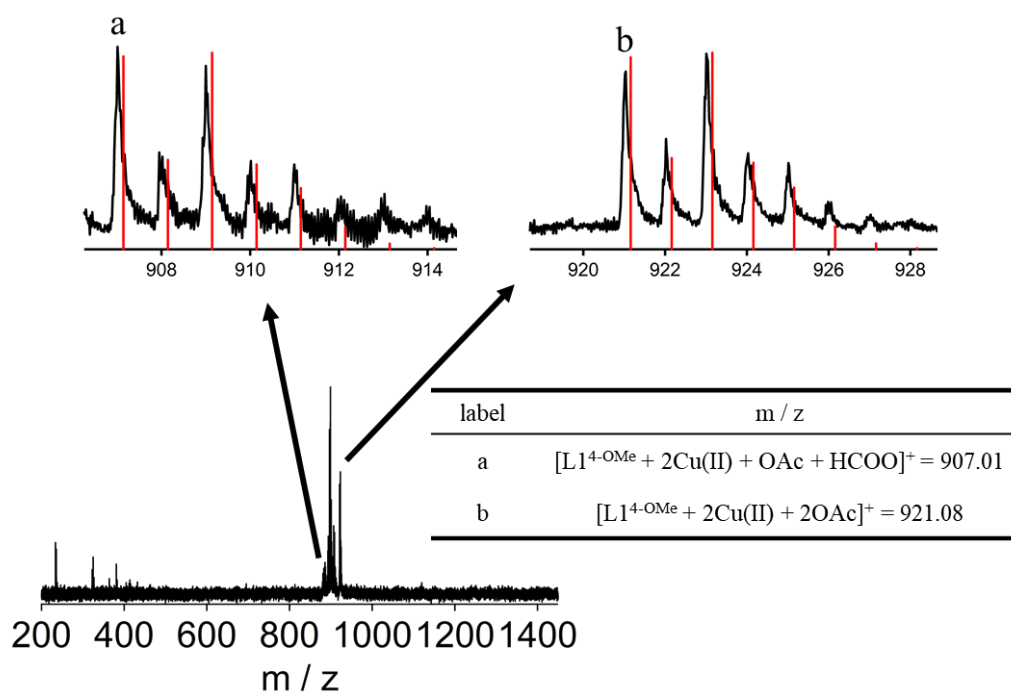


Figure 6-14. CSI MS spectrum of complex **10b** (0.5 mM) reaction with H_2O_2 (100 eq) measured in MeCN at -40°C at orifice 1: 0 V, orifice 2: 5 V, ring lens voltage: 10 V.

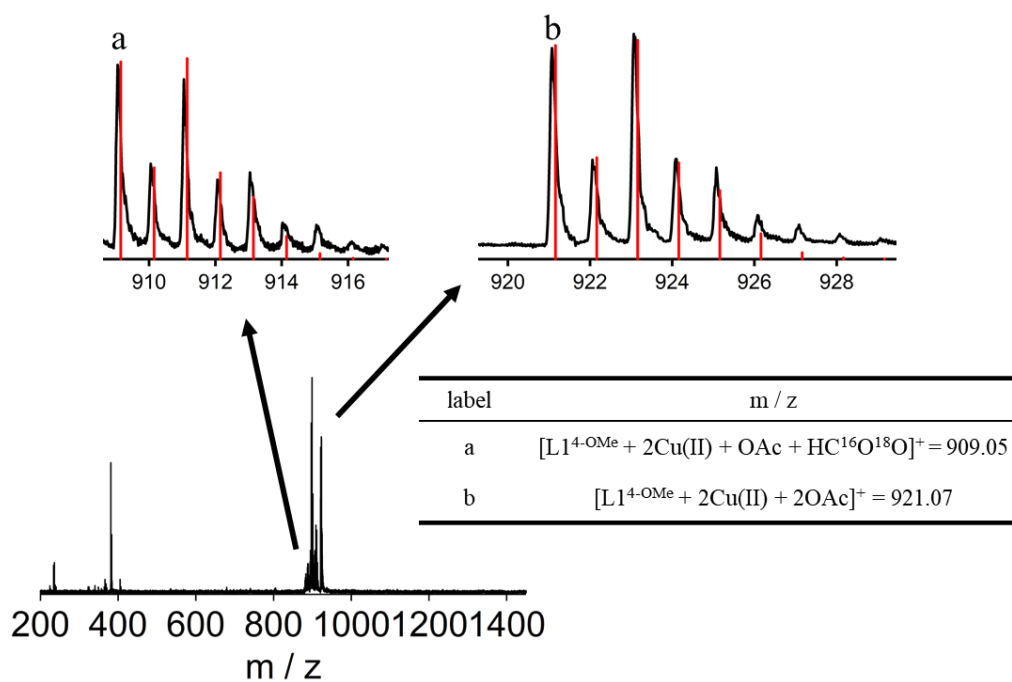


Figure 6-15. CSI MS spectrum of complex **10b** (0.5 mM) reaction with $H_2^{18}O_2$ (100 eq) measured in MeCN at $-40^\circ C$ at orifice 1: 0 V, orifice 2: 5 V, ring lens voltage: 10 V.

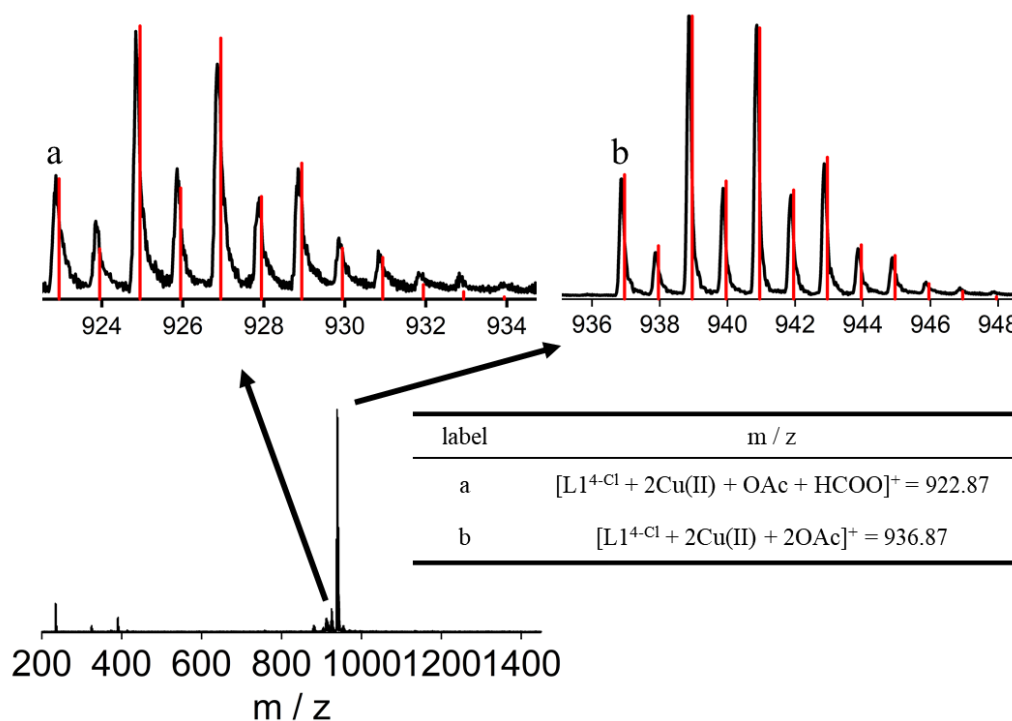


Figure 6-16. CSI MS spectrum of complex **11b** (0.5 mM) reaction with H_2O_2 (100 eq) measured in MeCN at $-40^\circ C$ at orifice 1: 0 V, orifice 2: 5 V, ring lens voltage: 10 V.

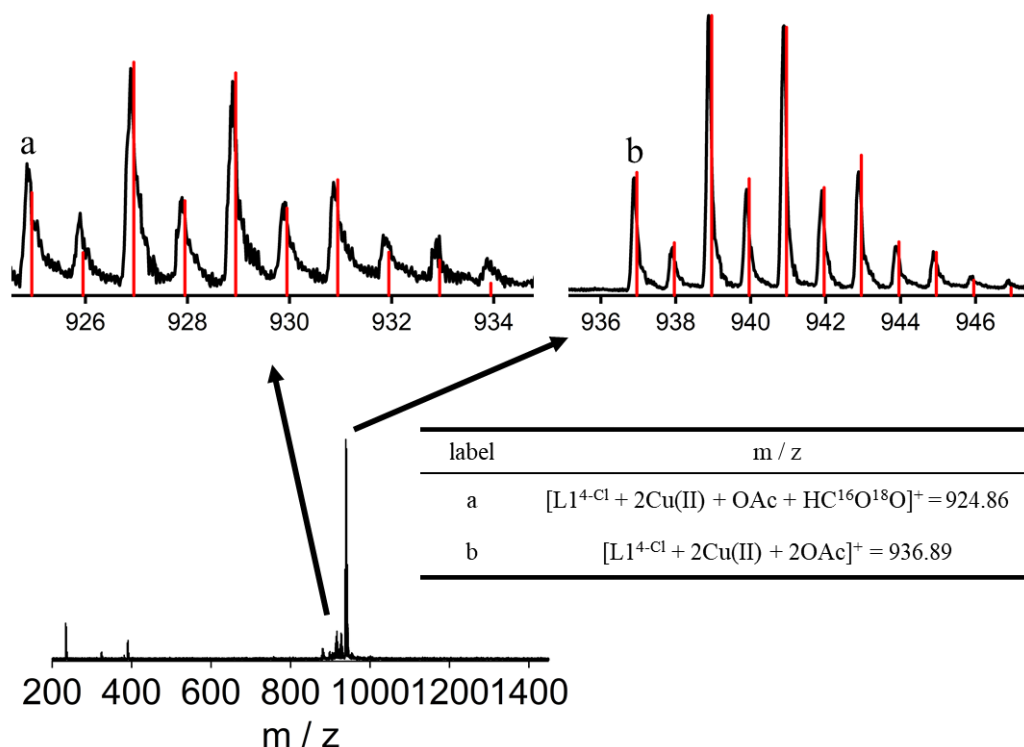


Figure 6-17. CSI MS spectrum of complex **11b** (0.5 mM) reaction with $H_2^{18}O_2$ (100 eq) measured in MeCN at $-40^\circ C$ at orifice 1: 0 V, orifice 2: 5 V, ring lens voltage: 10 V.

6-3-4. AscNa 存在下における DNA 切断活性の評価

スーパーコイルドプラスミド pUC19 DNA (Form I)を基質として用いて **7b**, **10b**, **11b** による DNA 切断を還元剤存在下で行った。この時、還元剤にはアスコルビン酸ナトリウム(AscNa)を用いた。この反応で生成する Form II, III はアガロースゲル電気泳動法によって分析・定量した。

pH 6.0, $37^\circ C$ における **7b**, **10b**, **11b** (0–30 μM)と AscNa (0–150 μM)の反応による DNA 切断の結果を Figure 6-18, 6-19 に示す。また、これらの実験におけるゲル写真とその詳細なデータを Figure S6-8, S6-9, S6-10 及び Table S6-8, S6-9, S6-10, S6-11, S6-12, S6-13 に示す。錯体 **7b**, **10b**, **11b** は、AscNa を加えなければ DNA を全く切断しなかったが、少量の AscNa を添加すると DNA 切断を大きく加速した。

Figure 6-19 の実験条件では、全ての錯体において測定開始 1 分後には、完全に DNA Form I が消失しており、擬一次解析することができなかった。そこで、DNA Form I の減少率の擬一次速度解析をするために錯体と還元剤の濃度を下げて、**7b**, **10b**, **11b** (5 μM) / AscNa (0, 10, 30, 50, 100, 150 μM)の条件で pH 6.0, $37^\circ C$ における DNA 切断を行った。これらの DNA 切断のゲル写真とその詳細なデータを Figure S6-11, S6-12, Table S6-14 に示す。また、これらのデータを擬一次解析した結果を Figure 6-20, 6-21, 6-22, 6-23, 6-24, 6-25 に示す。ここで得られた擬一次速度定数(k_{obs})は、**7b**, **10b**, **11b** の全てで、AscNa 濃

度の増加に対して飽和型曲線を与えた(Figure 6-21, 6-23, 6-25). 錯体 **7b**, **10b** 及び **11b** から得られた擬一次速度定数(k_{obs})は, 錯体濃度に対して 2 次の依存性を示した(Figure 6-20, 6-22, 6-24). また, 100 または 150 μM の濃度の AscNa との反応で, **7b**, **10b**, **11b** は定量的に二核銅(I)錯体に還元された. これらの結果から, **7b**, **10b** 及び **11b** は二核銅パーオキシ錯体よりも高活性な四核銅パーオキシ錯体を生成する可能性が示唆された.

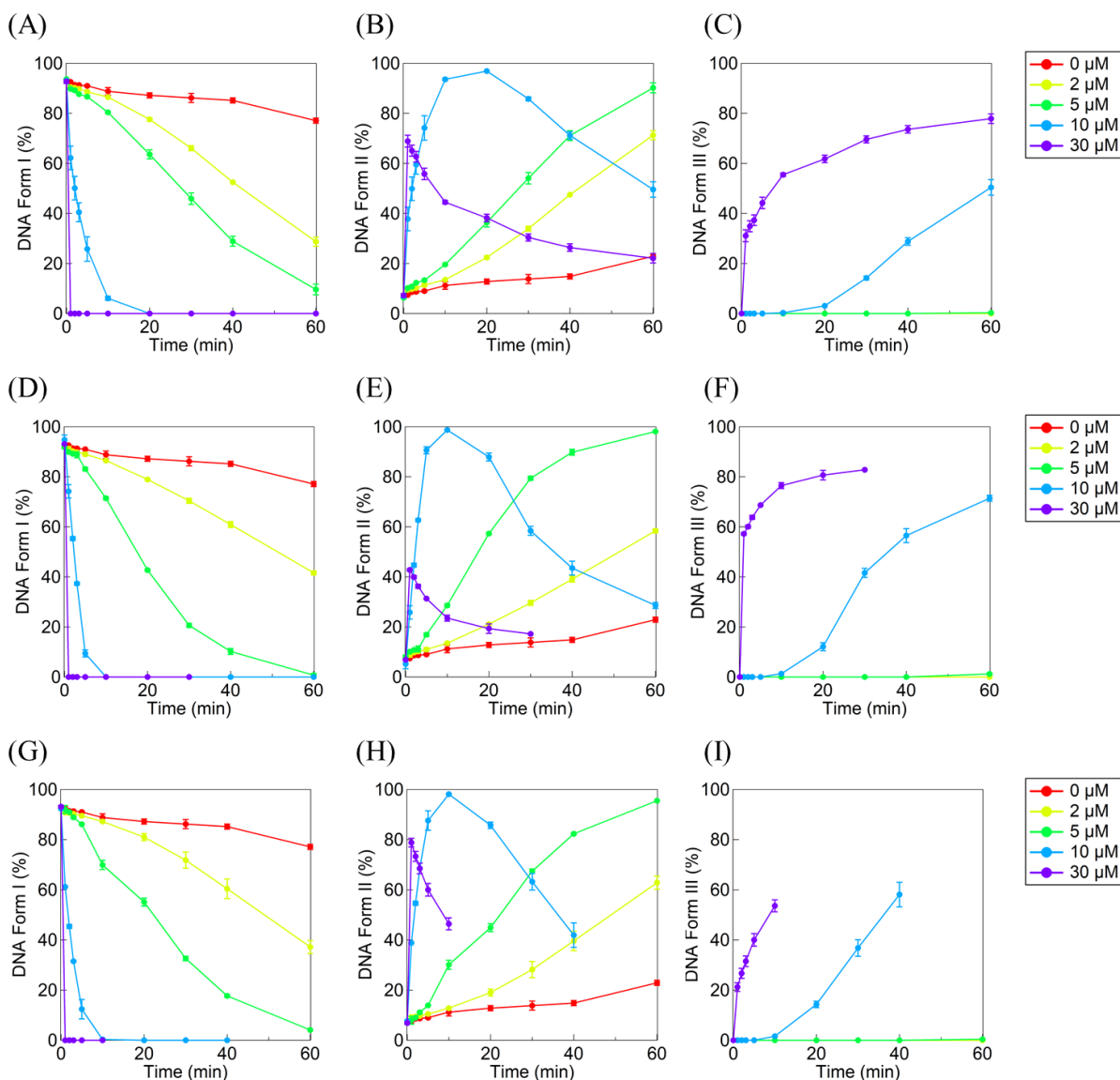


Figure 6-18. Complex concentration-dependent profile for DNA cleavage promoted by **7b** (A)–(C), **10b** (D)–(F), and **11b** (G)–(I). Time courses for the decrease of % of Form I ((A), (D), and (G)), increase of Form II ((B), (E), and (H)), and Form III ((C), (F), and (I)) at pH 6.0. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [pUC19 DNA] = 50 μ M bp, [complex] = 0–30 μ M, [AscNa] = 150 μ M, [Cu(OAc)₂] = 70 μ M at 37°C for 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min. Experiments were carried out at least three times.

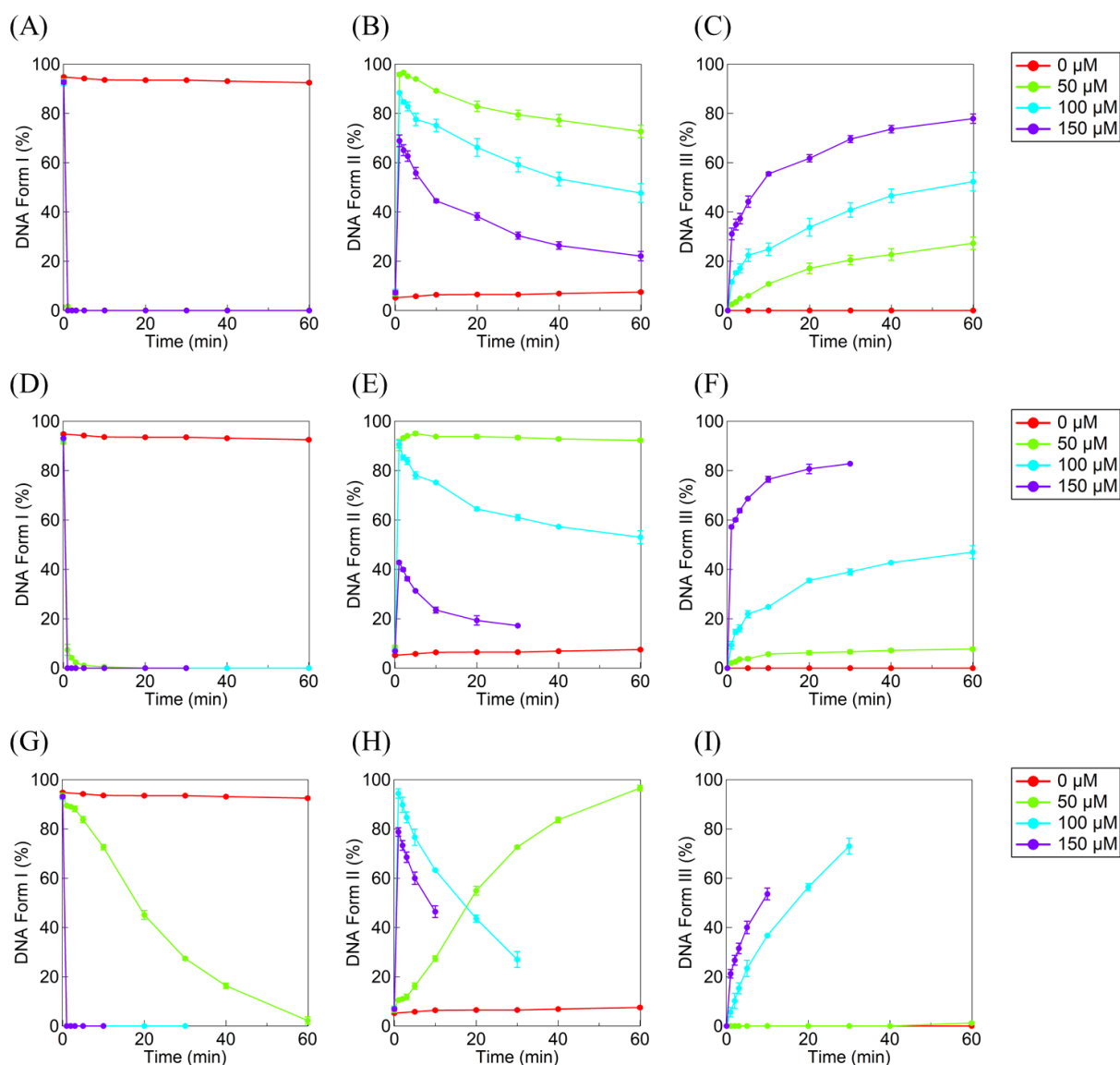


Figure 6-19. AscNa concentration-dependent profile for DNA cleavage promoted by **7b** (A)–(C), **10b** (D)–(F), and **11b** (G)–(I). Time courses for the decrease of % of Form I ((A), (D), and (G)), increase of % of Form II ((B), (E), and (H)), and Form III ((C), (F), and (I)) at pH 6.0. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [pUC19 DNA] = 50 μM bp, [complex] = 30 μM, [AscNa] = 0–150 μM, [Cu(OAc)₂] = 70 μM at 37°C for 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min. Experiments were carried out at least three times.

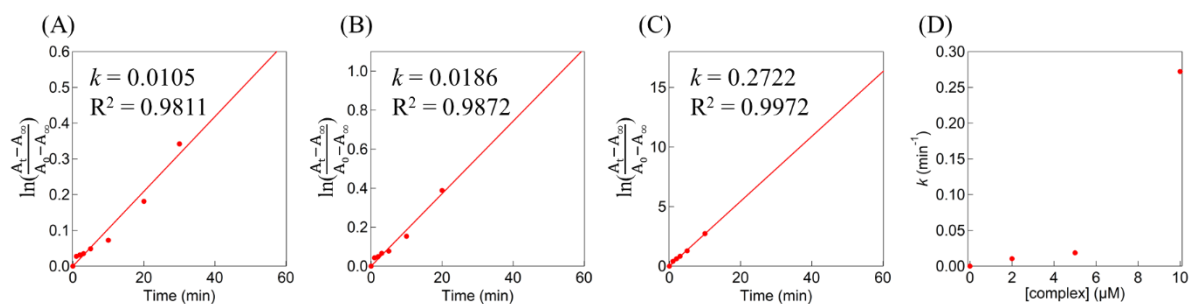


Figure 6-20. Pseudo-first-order plots for the decrease of % of Form I in the reaction with **7b** ((A) 2, (B) 5, and (C) 10 μM) in the presence of AscNa (150 μM). (D) A plot of the pseudo-first-order constant vs concentration of **7b** (0–10 μM).

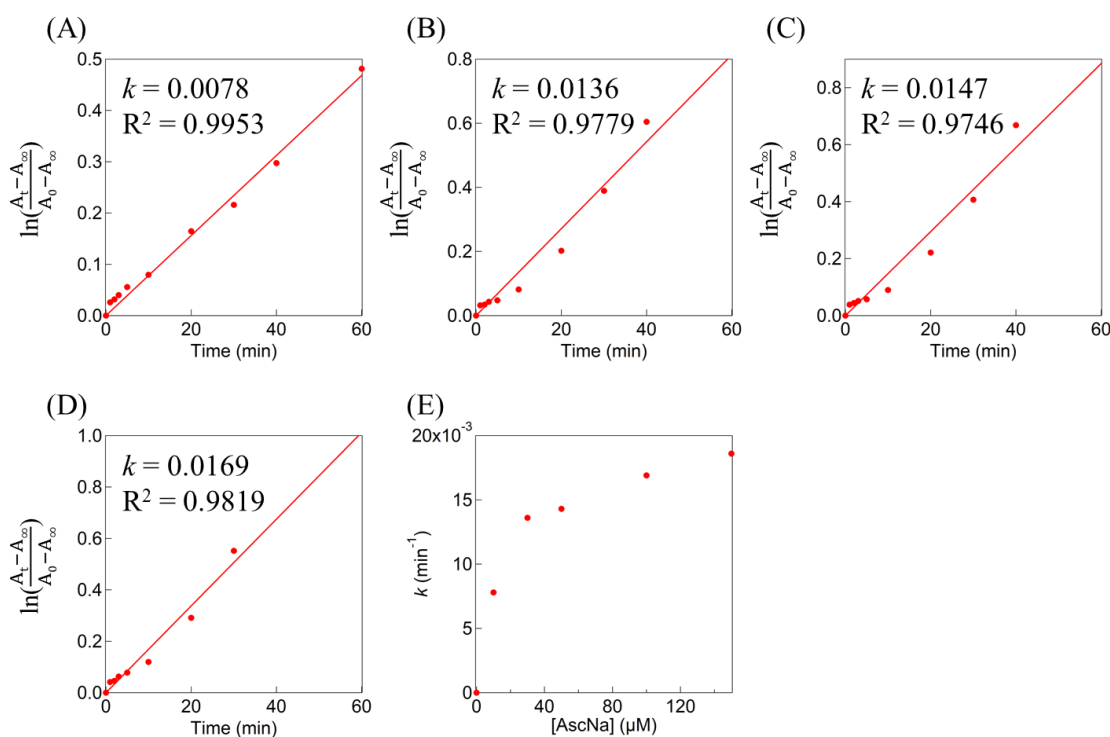


Figure 6-21. Pseudo-first-order plots for the decrease of % of Form I in the reaction with **7b** (5 μM) in the presence of AscNa ((A) 10, (B) 30, (C) 50, and (D) 100 μM). (E) A plot of the pseudo-first-order constant vs concentration of AscNa (0–150 μM).

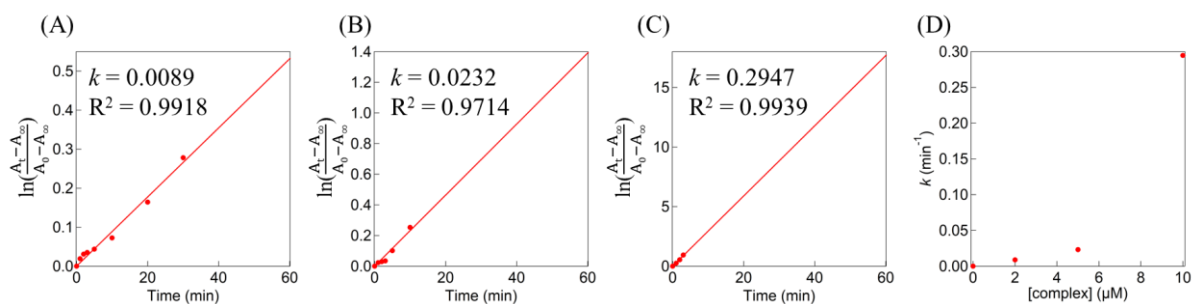


Figure 6-22. Pseudo-first-order plots for the decrease of % of Form I in the reaction with **10b** ((A) 2, (B) 5, and (C) 10 μM) in the presence of AscNa (150 μM). (D) A plot of the pseudo-first-order constant vs concentration of **10b** (0–10 μM).

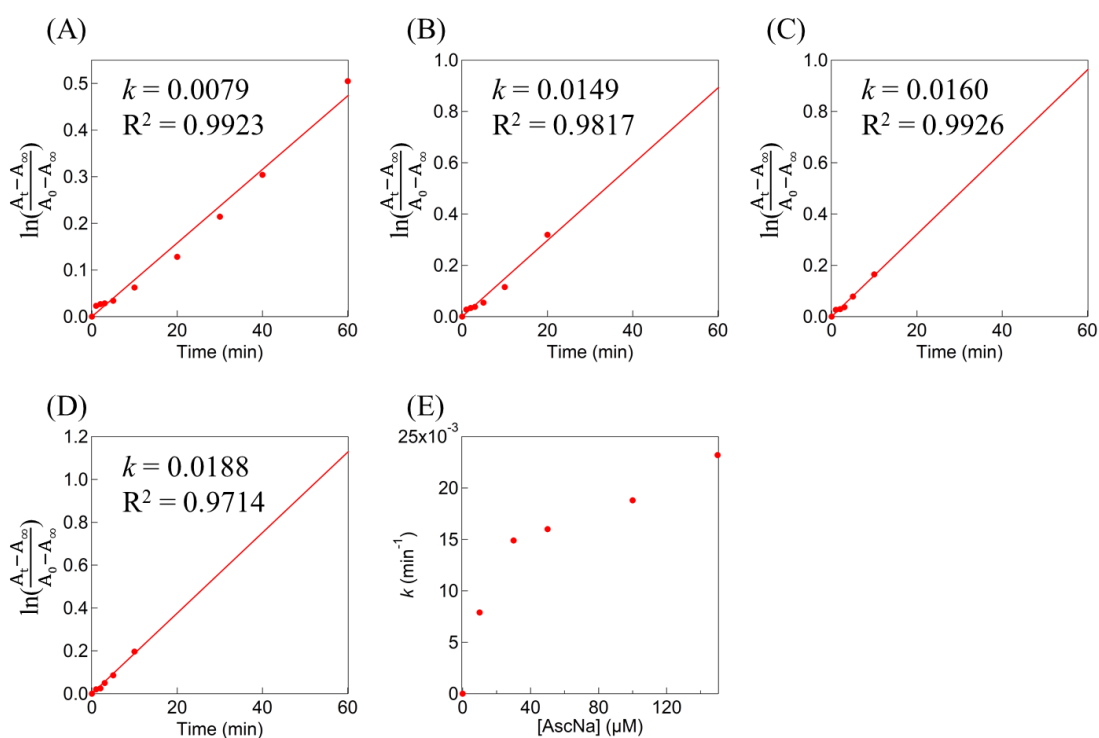


Figure 6-23. Pseudo-first-order plots for the decrease of % of Form I in the reaction with **10b** (5 μM) in the presence of AscNa ((A) 10, (B) 30, (C) 50, (D) 100 μM). (E) A plot of the pseudo-first-order constant vs concentration of AscNa (0–150 μM).

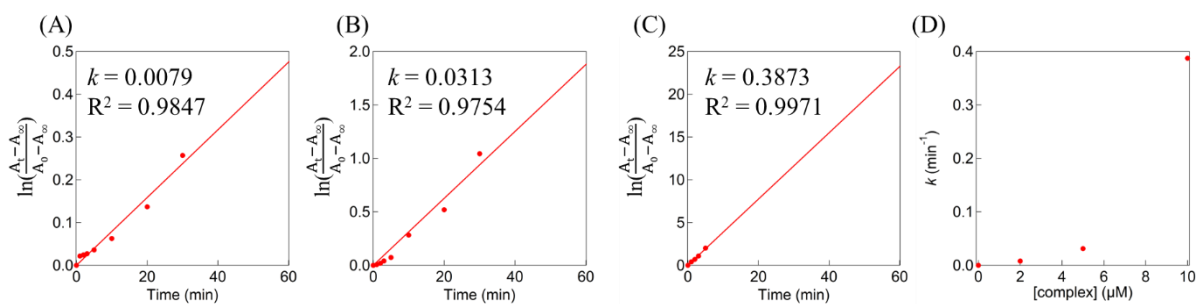


Figure 6-24. Pseudo-first-order plots for the decrease of % of Form I in the reaction with **11b** ((A) 2, (B) 5, and (C) 10 μM) in the presence of AscNa (150 μM). (D) A plot of the pseudo-first-order constant vs concentration of **11b** (0–10 μM).

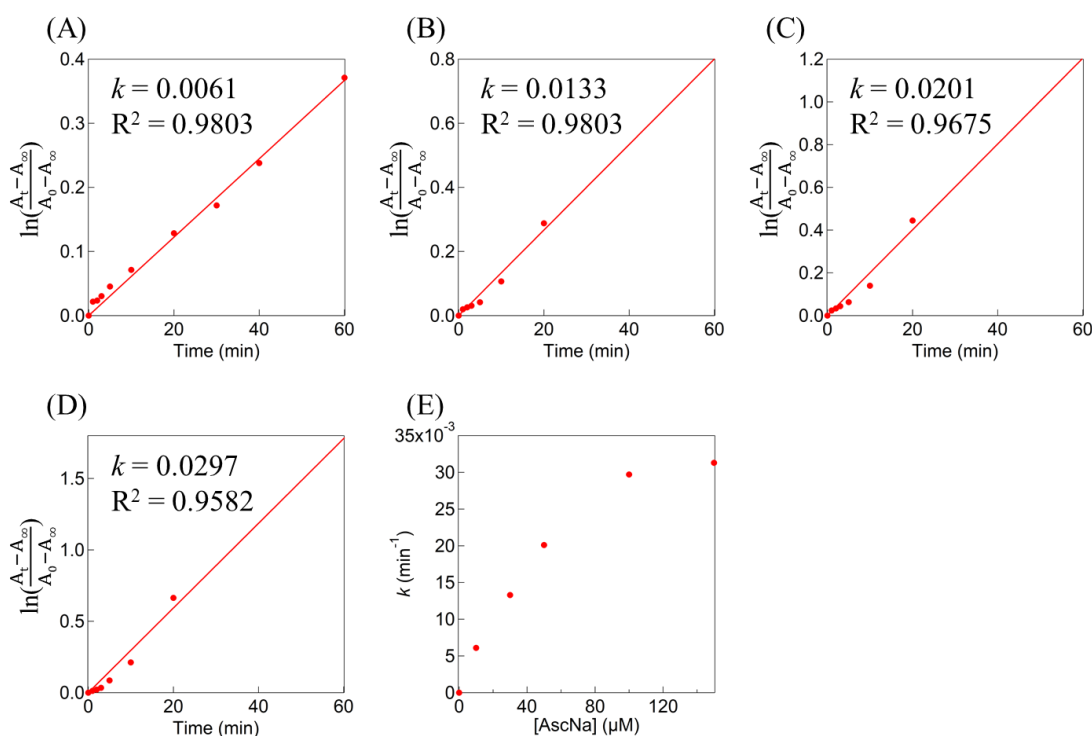


Figure 6-25. Pseudo-first-order plots for the decrease of % of Form I in the reaction with **11b** (5 μM) in the presence of AscNa ((A) 10, (B) 30, (C) 50, (D) 100 μM). (E) A plot of the pseudo-first-order constant vs concentration of AscNa (0–150 μM).

pH 6.0, 37°C で行われた, AscNa (150 μ M)存在下における **7b**, **10b**, **11b** (30 μ M)による DNA 切断結果の比較を Figure 6-26 に示す. **7b** (green), **10b** (light blue), **11b** (purple)は, 反応開始 1 分後にそれぞれ 30, 57, 21%の Form III を生成した. 錯体 **7b**, **10b**, **11b** の反応性の違いは, AscNa と反応して生成する二核銅(I)錯体の反応性に起因すると考えられる. 錯体 **10b** では, 電子供与基の OMe 基により銅イオンのルイス酸性が低下し, **11b** では, 電子求引基の Cl 基によりルイス酸性が上昇している. そのため, **10b** から生じる二核銅(I)錯体は, **11b** から生じる錯体よりも酸素分子と反応しやすいと考えられる. 従って, **7b**, **10b**, **11b** の中では, 酸素活性化能は **10b** が最も高く, その結果, 最も高い DNA 切断活性を示したと考えられる.

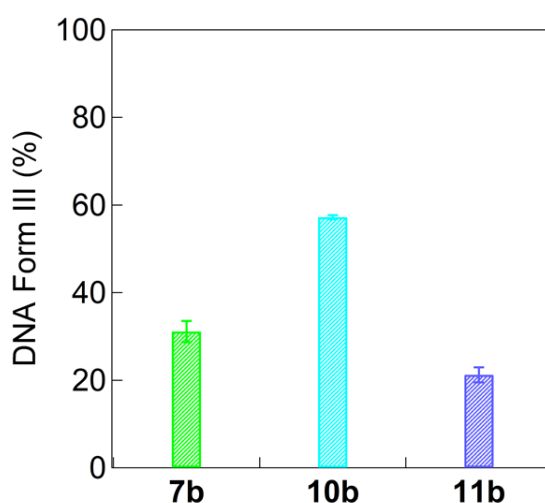


Figure 6-26. DNA cleavage profile promoted by **7b** (green), **10b** (light blue), and **11b** (purple) after 1 min reaction.

pH 6.0, 7.4 で行われた, AscNa (150 μ M)存在下での **7b**, **10b**, **11b** (30 μ M)による DNA 切断の結果の比較を Figure 6-27 に示す. また, これらの DNA 切断のゲル写真とその詳細なデータを Figure S6-13, S6-14, Table S6-15 に示す. 錯体 **7b**, **10b**, **11b** の反応開始 1 分後の DNA Form III の生成割合は pH 7.4 では減少し, それぞれ 9, 17, 21%の Form III が生成した. これは, pH 7.4 において AscNa との反応で生成する二核銅(I)錯体が酸素分子と反応して生じる中間体の形成速度または安定性が異なることを示唆している.

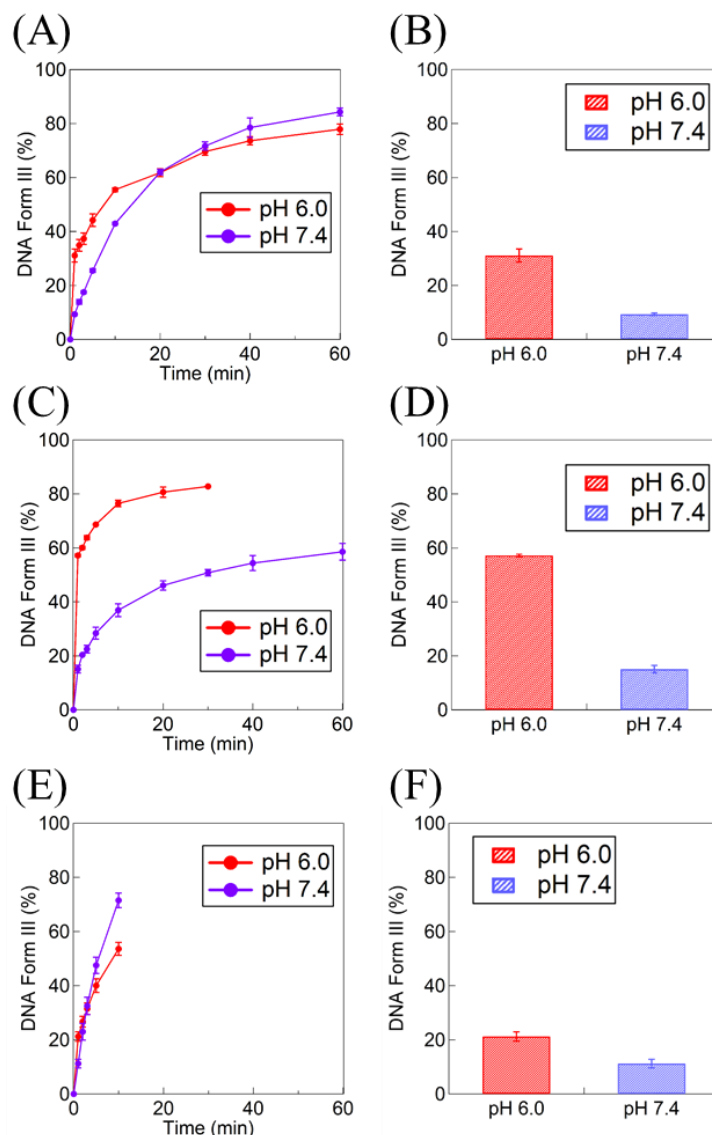


Figure 6-27. pH-dependent profile for DNA cleavage promoted by **7b**, **10b**, and **11b**, respectively. Time courses for the Form III (A), (C), and (E) at pH 6.0 (red line) and 7.4 (purple line). (B), (D), and (F) are the plot of DNA Form III after 1 min reaction. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES) and 7.4 (MOPS)), [pUC19 DNA] = 50 μ M bp, [complex] = 30 μ M, [AscNa] = 150 μ M, [Cu(OAc)₂] = 70 μ M at 37°C for 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min. Experiments were carried out at least three times.

DNA 切断活性の比較を行うため、**7b** に対応する methylene-tether 配位子 Hbpmp の二核銅(II)錯体[Cu₂(μ -OH)(bpmp)](ClO₄)₂ (**8**)を用いて比較実験を行った。pH 6.0, 37°C で行われた、AscNa (150 μ M)存在下での **7b**, **8** (30 μ M)による DNA 切断の結果の比較を Figure 6-28 に示す。また、これらの実験におけるゲル写真とその詳細なデータを Figure S6-15(A), S6-16(A)及び Table S6-16 に示す。上述したように、**7b** は AscNa 存在下において

反応開始 1 分後に DNA Form III を 31% 生成したが、**8** を用いた反応では、反応開始 60 分後でさえも DNA Form III は観測されなかった。これらの結果から、amide-tether でペンドラント基を導入した錯体 **7b**, **10b**, **11b** は、酸化還元電位が高くなり AscNa で容易に還元されて二核銅(I)錯体が生成するために酸素活性化が進行するが、methylene-tether でペンドラント基を導入した錯体 **8** は AscNa では還元されず酸素活性化が進行しないことが示唆された。

ブレオマイシンの活性中心の反応性を模倣した五座配位子である N4Py の単核鉄(II)錯体 $[\text{Fe}(\text{N4Py})(\text{MeCN})](\text{ClO}_4)_2$ (**14**) を合成し、AscNa 存在下での DNA 切断を **7b** と比較した。その結果を Figure 6-28 に、また、これらの実験におけるゲル写真とその詳細なデータを Figure S6-15(B), S6-16(B) 及び Table S6-16 に示す。錯体 **7b** は測定開始 1 分後に DNA Form III の生成割合がそれぞれ 31% であったのに対し、同様の反応条件では、**14** は Form I から Form II の切断は加速するが、反応開始 1 分後では Form III は 0.3% 程度しか生成しないことが明らかになった。また、反応開始 60 分後でさえも、Form III の生成は 6% 程度であった。この比較から、**7b** は、還元的な酸素活性化による反応では、従来の高活性な錯体に比べても高速・高効率で DNA を切断することが示された。

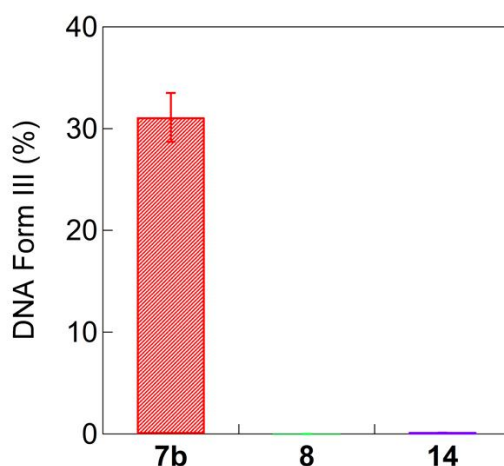


Figure 6-28. DNA cleavage profile of **7b** (red), **8** (green), and **14** (purple) after 1 min reaction.

6-3-5. DMSO 存在下における DNA 切断阻害実験

錯体 **7b**, **10b**, **11b** の DNA 切断実験を、ヒドロキシラジカルの阻害剤^[8,10]である DMSO 存在下で行った(Figure 6-29)。これらの反応のゲル写真と詳細なデータを Figure S6-17, S6-18 及び Table S6-16 に示す。Figure 6-29 に示す様に DMSO (1.0, 5.0, 10 mM) 存在下の反応では、Form III 生成が阻害された。これらの反応の 1 分後における Form III 生成に対する DMSO による阻害割合は、**7b**, **10b**, **11b** に対してそれぞれで 55, 63, 44% であった。この阻害割合は、DNA 切断活性が最も高い **10b** が最も高かった。錯体 **10b** から生じる二核銅(I)錯体は、電子供与性の OMe 基を持つため、酸素との反応性が最も高く、酸素分子との反応過程でヒドロキシラジカルを生成しやすいのかもしれない。また興味

深いことに、DMSO によって実際に阻害される絶対量は、時間経過であまり変化せず一定であり、DMSO の濃度にも殆ど依存しなかった。これらの傾向は、**7b**, **10b**, **11b** で共通であり、反応の時間経過や DMSO の濃度に依存せずに一定の割合で Form III の生成が阻害された。この結果より、**7b**, **10b**, **11b** の DNA 切断の反応初期において一定の割合でヒドロキシラジカルが生成し、これが DNA 切断を行うが、その後の反応では錯体由来の四核銅パーオキシ錯体または二核銅パーオキシ錯体などが活性種として DNA 切断を行っている可能性が考えられる。

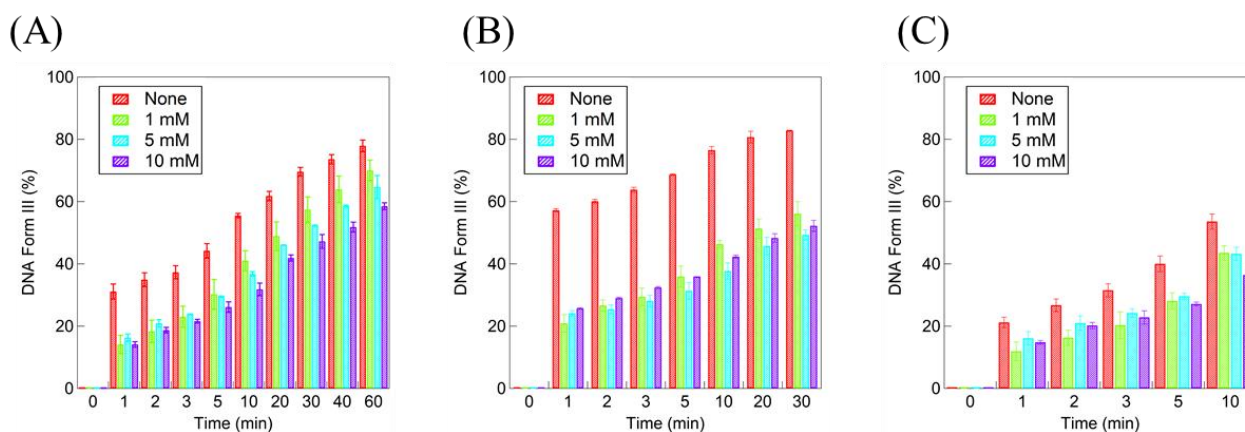


Figure 6-29. Time courses for the formation of Form III in the reactions of **7b** (A), **10b** (B), and **11b** (C) in the presence of DMSO (0, 1, 5, and 10 mM). Reaction conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [pUC19 DNA] = 50 μ M bp, [complex] = 30 μ M, [AscNa] = 150 μ M, [Cu(OAc)₂] = 70 μ M, [DMSO] = 0, 1, 5, and 10 mM at 37°C for 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min. Experiments were carried out at least three times.

6-3-6. 還元剤存在下における **7b**, **10b**, **11b** の挙動

水中、室温で **7b**, **10b**, **11b** と AscNa との反応を分光学的に追跡した。水中における **7b** (0.1 mM) の電子スペクトルは、458 ($\epsilon = 200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 740 nm ($\epsilon = 100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) に、それぞれ Cu(II)-OAc の LMCT, d-d 遷移に帰属できる吸収バンドを示した(Figure 6-30(A)). ここに、AscNa (20 eq) を加えると、これらの吸収バンドは直ちに消失した(Figure 6-30(A)). また、**10b** (0.1 mM) の電子スペクトルは、447 ($\epsilon = 300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 750 nm ($\epsilon = 100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) に、それぞれ Cu(II)-OAc の LMCT, d-d 遷移に帰属できる吸収バンドを示し、AscNa (20 eq) を加えると **7b** と同様に吸収バンドが直ちに消失した(Figure 6-30(B)). これらのスペクトルは、Karlin らが報告している *p*-cresol-2,6-bis(dpa)型配位子の二核銅(I)錯体のスペクトルと類似している^[11]. 従って、**7b**, **10b** は AscNa と反応して二核銅(I)錯体を生成するといえる。一方、**11b** (0.1 mM) は AscNa (20 eq) との反応で吸収バンドが増大した(Figure 6-30(C)). **11b** の水溶液に AscNa を加えた後の溶液は懸濁しており、これによって吸収

バンドが増大したものと考えられる。

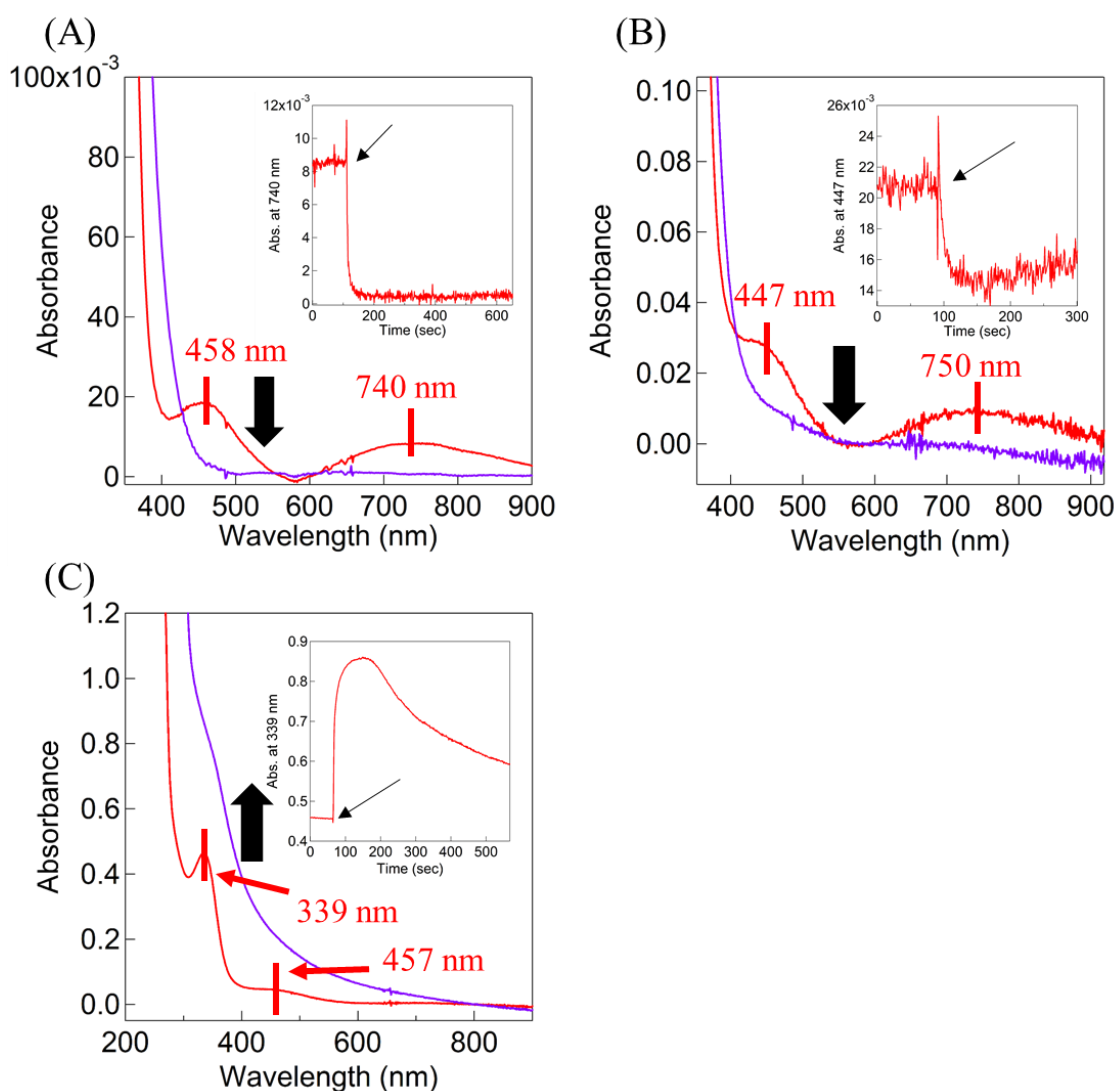


Figure 6-30. Electronic absorption spectra of **7b**, **10b**, **11b** (0.10 mM, red) (A)–(C) and after AscNa (20 eq) was added to the complex solution (purple) in H₂O at room temperature (insets: time courses for spectrum changes at 740 (A), 447 (B), and 339 nm (C), respectively).

AscNa との反応性を比較するため、水中における **8** (0.1 mM) の電子スペクトルを測定した。その結果、**8** は AscNa を加えても吸収バンドは減衰せず、ほとんど変化しなかった (Figure 6-31)。この結果から、amide-tether 錯体である **7b** は、methylene-tether 錯体と比較して特異的に還元されやすくなっていると考えられる。

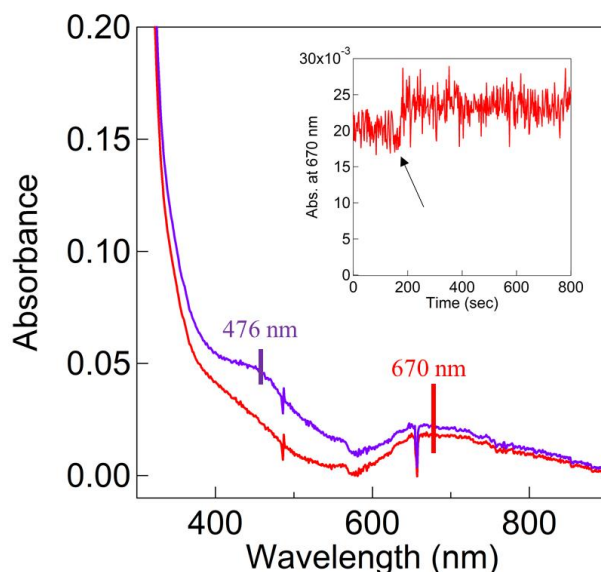


Figure 6-31. Electronic absorption spectra of **8** (0.10 mM, red) (A)–(C) and after AscNa (20 eq) was added to the complex solution (purple) in H₂O at room temperature (insets: time courses for spectrum changes at 670 nm).

6-3-7. 二核銅(II)錯体 **7b**, **8**, **10b** 及び **11b** の Cyclic voltammetry (CV)

HL1^{4-x}配位子[X=H, OMe, Cl]及びHbpmp配位子が及ぼす電子的な効果を調べるため、MeCN中で**7b**, **8**, **10b**及び**11b**の電気化学測定で、酸化還元電位を測定した。Figure 6-32にこれらのcyclic voltammogram (CV)を示す。**7b**のCVではCu^{II}Cu^{II}/Cu^ICu^Iに帰属される還元波が-0.706 Vに観測された。dpaをペンダント基としてもつ methylene-tether 錯体**8**では、Cu^{II}Cu^{II}/Cu^ICu^Iに帰属される還元波が-1.03 Vに観測され、約320 mV負側にシフトした。このことから、**7b**は**8**よりも還元されやすく、AscNaとの反応のUV-visスペクトル追跡の結果と一致している。

電子供与基をもつ**10b**のCu^{II}Cu^{II}/Cu^ICu^Iに帰属される還元波は-0.838 Vに観測され、電子求引基をもつ**11b**のCu^{II}Cu^{II}/Cu^ICu^Iに帰属される還元波は-0.607 Vに観測された。これらの値とAscNaの酸化電位を比べると**7b**, **10b**, **11b**は過剰量のAscNaで十分に還元されることがわかる。また、還元電位は**10b**が**7b**より負側に、**11b**が**7b**より正側に現れており、**7b**と比較して、**10b**は還元されにくく、**11b**は還元されやすいことがわかる。この結果は、AscNa存在下におけるDNA切断の結果に対して述べた考察を支持している。すなわち、AscNaにより還元された時に生じる還元体**7b^{red}**, **10b^{red}**, **11b^{red}**の還元力は、**10b^{red}** > **7b^{red}** > **11b^{red}**の順で高いと考えられ、還元力が最も高い**10b^{red}**は酸素分子に電子を与えて活性化する能力が高いためDNA酸化切断速度が大きくなったといえる。従って、これらの錯体の還元的酸素活性化によるDNA酸化切断の律速段階は還元体と酸素分子の反応の可能性が考えられる。

Figure 6-33に、縦軸に還元電位(Cu^{II}Cu^{II}/Cu^ICu^I) (V, vs Fc/Fc*), 横軸に**7b**, **10b**及び**11b**

に導入した置換基のハメット定数 $\sigma^{[12]}$ をプロットした図を示す。この図で、**7b**, **10b**, **11b** の還元電位とハメット定数は良い直線相関を示したことから、配位子の電子効果で酸素活性化を制御できると考えられる。

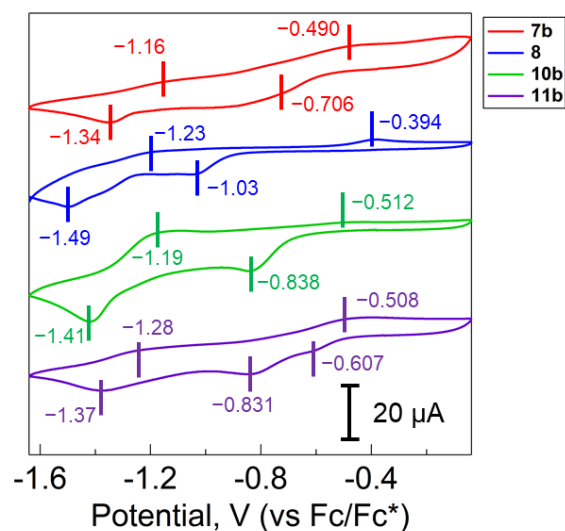


Figure 6-32. Cyclic voltammograms of **7b** (red), **8** (blue), **10b** (green), and **11b** (purple), respectively. Experimental conditions: [complex] = 0.5 mM, glassy carbon working electrode, Pt wire counter electrode, Ag/AgNO₃ reference electrode, Scan rate: 50 mV s⁻¹, Sensitivity: 10 μA/V, TBAP (0.1 M) as a supporting electrode.

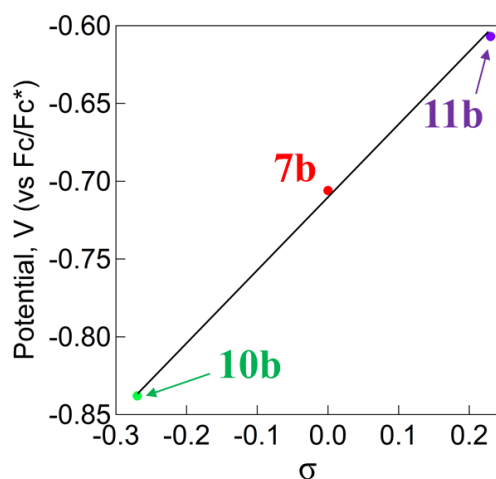


Figure 6-33. Plots of potential (V) (Cu^{II}Cu^{II}/Cu^{II}Cu^I) of **7b** (red), **10b** (green), and **11b** (purple) vs Hammett constants σ .

6-3-8. 水溶液中における AscNa 存在下での質量測定

UV-vis スペクトル追跡の結果を裏付けるために、**7b**, **10b** と AscNa の水中、室温における反応を CSI MS スペクトルで追跡した(Figure 6-34, 35). その結果、AscNa を加えると **7b** は、 $[L1^{4-H} + 2Cu(I)]^+$, $[L1^{4-H} + Cu(II) + Cu(I) + OAc]^+$ に相当する質量ピークをそれぞれ m/z : 693, 742 に与えた(Figure 6-34). また、**10b** は、 $[L1^{4-OMe} + 2Cu(I)]^+$ に相当する質量ピークを m/z : 801 に与えた(Figure 6-35). これらの結果から、**7b**, **10b** は、AscNa と反応して二核銅(I)錯体を生成することが裏付けられた. 一方、**11b** は AscNa を加えると沈殿が析出したため、CSI MS を測定することはできなかった.

以上の結果より、amide-tether 錯体は、二核銅(I)錯体を生成しやすく、methylene-tether 錯体やブレオマイシンの反応性を模倣した単核鉄(II)錯体と比較しても高活性であることが明らかになった. これら二核銅(I)錯体は酸素分子との反応で二核銅(II)ヒドロペルオキシ種を生成し、反応初期にはヒドロキシルラジカルの生成を伴って DNA 切断に関与していると考えられる.

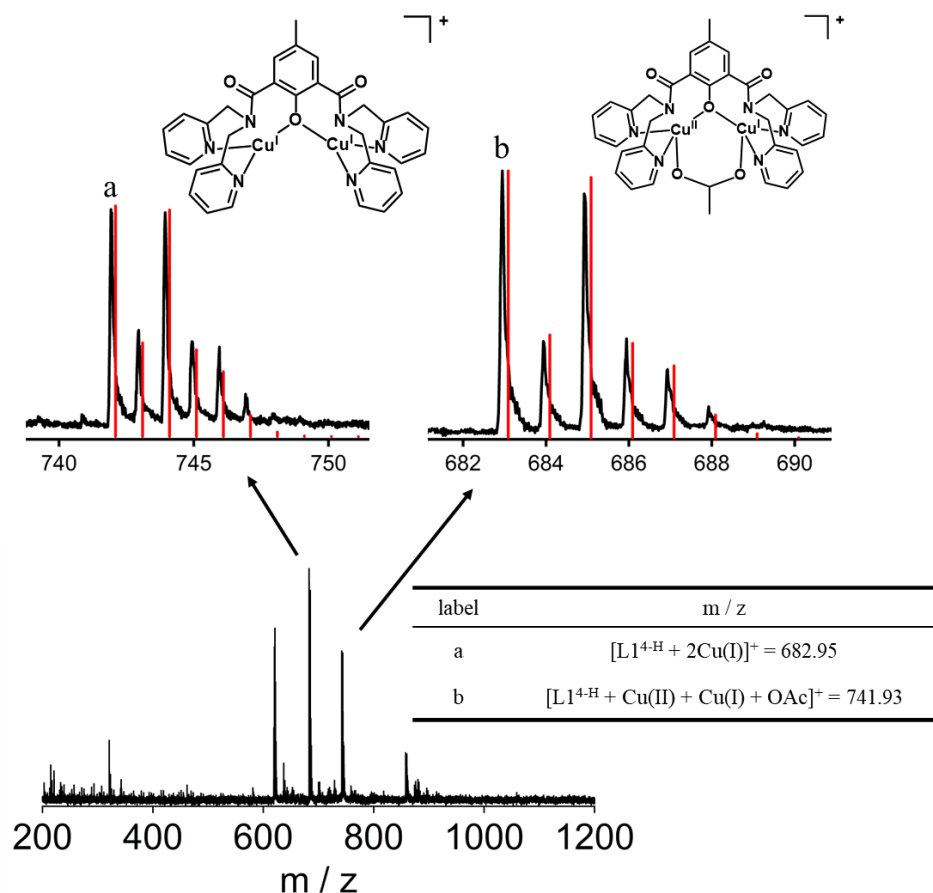


Figure 6-34. CSI MS spectrum of complex **7b** (0.5 mM) reaction with AscNa (20 eq) measured in H₂O at room temperature at orifice 1: 0 V, orifice 2: 5 V, ring lens voltage: 10 V.

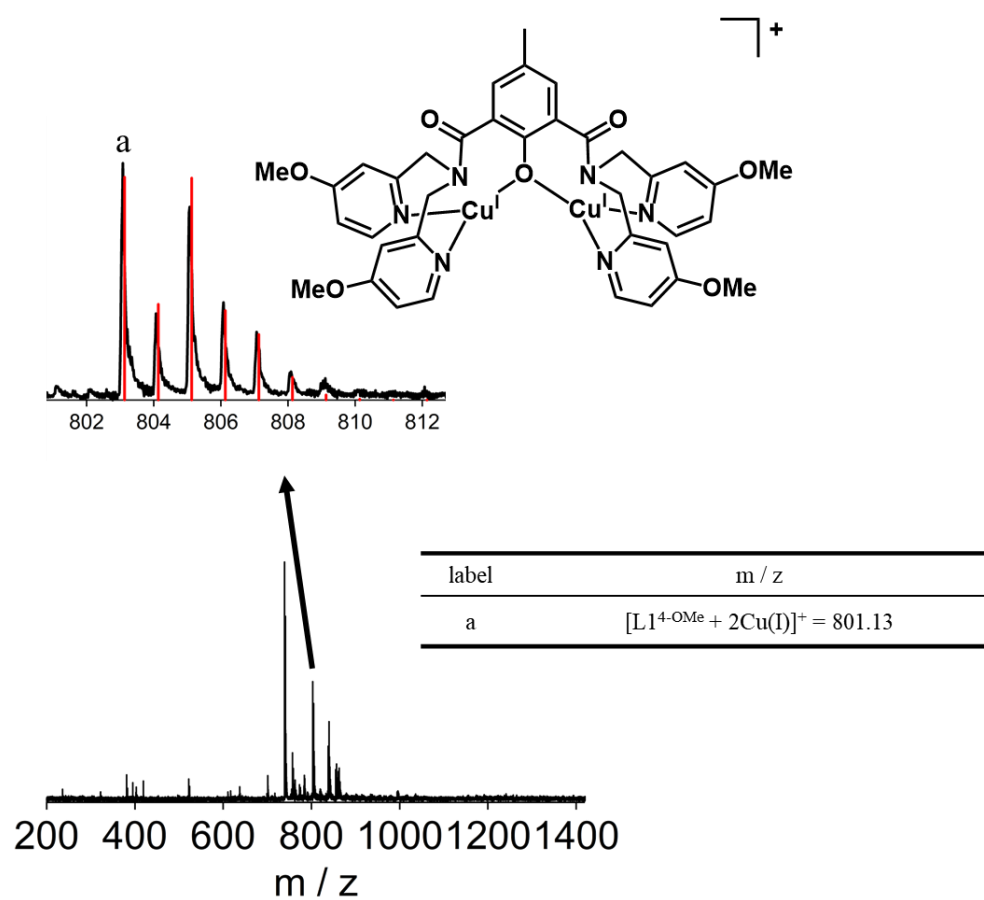


Figure 6-35. CSI MS spectrum of complex **10b** (0.5 mM) reaction with AscNa (20 eq) measured in H_2O at room temperature at orifice 1: 0 V, orifice 2: 5 V, ring lens voltage: 10 V.

6-4. 結論

本研究では、*p*-cresol-2,6-bis(dpa) amide-tether 配位子 HL1^{4-X} (X = H, OMe, and Cl) とその二核銅(II)錯体 [Cu₂(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L1^{4-H})](OAc) (**7b**), [Cu₂(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L1^{4-OMe})](OAc) (**10b**), [Cu₂(μ-1,3-OAc)₂(L1^{4-Cl})](OAc) (**11b**) を用いて、過酸化水素を酸化剤として用いた過酸化水素活性化による、及び、還元剤としてアスコルビン酸ナトリウム(AscNa)を用いた酸素活性化による DNA 切断活性を詳細に検討した。第四章で **7b** の過酸化水素による DNA 切断活性の結果を示したが、**7b** と同様に **10b**, **11b** は過酸化水素による DNA 切断で高い活性を示すことが明らかになった。その活性は、電子求引基を持つ **11b** が最も高く、電子供与基を持つ **10b** が最も低かった。これは、過酸化水素との反応で生じる酸化活性種の反応性の違いによると考えられる。

また、**7b**, **10b**, **11b** の AscNa 添加による酸素分子の還元的活性化における DNA 切断活性は、過酸化水素を酸化剤とする反応よりもはるかに高い活性を示すことが見出された。その活性は、過酸化水素を用いた反応とは逆に、電子供与基を持つ **10b** が最も高く、電子求引基を持つ **11b** が最も低かった。これは、生成する二核銅(I)錯体の酸素分子との反応性の違いによると考えられる。さらに、これらの錯体の DNA 酸化切断活性は、関連する methylene-tether 錯体 **8** やブレオマイシンの反応性を模倣した単核鉄(II)錯体 **14** の反応と比べて非常に高かった。本研究では、ペンダント基に置換基を導入することで DNA 切断活性を調節することができるという知見が得られた。この知見は、DNA をターゲットにした新規抗がん剤の開発に対する研究基盤を提供する可能性がある。

6-5. 実験方法

6-5-1. 過酸化水素存在下における DNA 切断実験

各錯体の 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), 7.4 (MOPS), 10 mM), pUC19 DNA (50 μ M bp), Cu(OAc)₂ (70 μ M), complex (0–30 μ M), H₂O₂ (0–50 μ 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, 5, 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 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 の染色補正要因 1.06 を用い、ImageJ ソフトウェアによって解析を行った。

6-5-2. AscNa 存在下における DNA 切断実験

各錯体の 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), 7.4 (MOPS), 10 mM), pUC19 DNA (50 μ M bp), Cu(OAc)₂ (70 μ M), complex (0–30 μ M), AscNa (0–150 μ 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。この後の手順は DNA 切断実験に記載したものと同様である。

6-5-3. 過酸化水素存在下における 10b 及び 11b の DNA 切断阻害実験

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 μ M bp), 10b or 11b (30 μ M), H₂O₂ (50 μ M), Cu(OAc)₂ (70 μ M), inhibitor (1, 5, and 10 mM) に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, 5, 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。この後の手順は DNA 切断実験に記載したものと同様である。

6-5-4. 過酸化水素との反応によって生成する反応中間体の CSI MS スペクトル測定

10b, 11b の MeCN 溶液(0.5 mM)を 20 mL ニロナスフラスコに入れ、 $-40 \pm 0.2^\circ\text{C}$ に保った。H₂O₂ の MeCN 溶液(錯体に対して 100 eq)を加え、スペクトルを測定した。

6-5-5. AscNa 存在下における 7b, 10b 及び 11b の DNA 切断阻害実験

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 μ M bp), 7b, 10b or 11b (30 μ M), AscNa (150 μ M), Cu(OAc)₂ (70 μ M), DMSO (1, 5, and 10 mM)に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. この後の手順は DNA 切断実験に記載したものと同様である.

6-5-6. 二核銅(I)錯体の UV-vis スペクトル測定

7b, 10b 及び 11b の Milli-Q 水溶液(0.1 mM)を 2 面セルに入れ, 室温に保った. AscNa の Milli-Q 水溶液(錯体に対して 20 eq)を加え, UV-vis スペクトルを追跡した.

6-5-7. 7b, 10b, 11b の cyclic voltammetry (CV)測定

MeCN 溶液(10 mL)に 7b, 10b 及び 11b が 0.5 mM, TBAP が 0.1 M となるように加えた溶液を調製した. この溶液に非水系参照電極(Ag/AgNO₃), 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 μ A/V, 掃引速度は 50 mV s⁻¹で行った. 得られた Ag/AgNO₃ 基準のデータから, 1.0 mM フェロセン(Fc)の MeCN 中における酸化還元電位を差し引くことで, Fc/Fc* 基準の酸化還元電位を算出した.

6-5-8. 二核銅(I)錯体の CSI MS スペクトル測定

7b 及び 10b の Milli-Q 水溶液(0.5 mM)を 20 mL ニロナスフラスコに入れ, 室温に保った. AscNa の Milli-Q 水溶液(錯体に対して 20eq)を加え, 室温で CSI MS スペクトルを測定した.

6-6. 参考文献

- [1] Aykin-Burns, N.; Ahmad, I. M.; Zhu, Y.; Oberley, L. W.; Spitz, D. R. Increased levels of superoxide and H₂O₂ mediate the differential susceptibility of cancer versus normal cells to glucose deprivation. *Biochem. J.* **2009**, *418*, 29–37.
- [2] (a) Sullivan, L. B.; Chandel, N. S. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab.* **2014**, *2*:17. (b) Gorrini, C.; Harris, I.; Mak, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 931–947.
- [3] Umezawa, H.; Maeda, K.; Takeuchi, T.; Okami, Y. New antibiotics, bleomycin A and B. *J. Antibiot.* **1966**, *19*, 200–209.
- [4] (a) Decker, A.; Chow, M. S.; Kemsley, J. N.; Lehnert, N.; Solomon, E. I. Direct Hydrogen-Atom Abstraction by Activated Bleomycin: An Experimental and Computational Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4719–4733. (b) Liu, L. V.; Bel III, C. B.; Wong, S. D.; Wilson, S. A.; Kwak, Y.; Chow, M. S.; Zhao, J.; Hodgson, K. O.; Hedman, B.; Solomon, E. I. Definition of the intermediates and mechanism of the anticancer drug bleomycin using nuclear resonance vibrational spectroscopy and related methods. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 22419–22424.
- [5] (a) Chen, J.; Stubbe, J. Bleomycin: towards better therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 102–112. (b) Galm, U.; Hager, M. H.; Lanen, S. G. V.; Ju, J.; Thorson, J. S.; Shen, B. Antitumor Antibiotics: Bleomycin, Eneidyne, and Mitomycin. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 739–758. (c) Hecht, S. M. Bleomycin: New Perspectives on the Mechanism of Action. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 158–168. (d) Einhorn, L. H. Curing metastatic testicular cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *99*, 4592–4595. (e) Sleijfer, S. Bleomycin-Induced Pneumonitis. *Chest* **2001**, *120*, 617–624. (f) Huang, S.-X.; Feng, Z.; Wang, L.; Galm, U.; Wendt-Pienkowski, E.; Yang, D.; Tao, M.; Coughlin, J. M.; Duan, Y.; Shen, B. A Designer Bleomycin with Significantly Improved DNA Cleavage Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13501–13509.
- [6] (a) Lubben, M.; Meetsma, A.; Wilkinson, E. C.; Feringa, B.; Que, L. Nonheme Iron Centers in Oxygen Activation: Characterization of an Iron(III) Hydroperoxide Intermediate. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1512–1514. (b) van der Berg, T. A.; Feringa, B. L.; Roelfes, G. Double strand DNA cleavage with a binuclear iron complex. *Chem. Commun.* **2007**, 180–182. (c) Li, Q.; van der Berg, T. A.; Feringa, B. L.; Roelfes, G. Mononuclear Fe(II)-N₄Py complexes in oxidative DNA cleavage: structure, activity and mechanism. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 8012–8021.
- [7] Tjioe, L.; Joshi, T.; Forsyth, C. M.; Moubaraki, B.; Murray, K. S.; Brugger, J.; Graham, B.; Spiccia, L. Phosphodiester Cleavage Properties of Copper(II) Complexes of 1,4,7-Triazacyclononane Ligands Bearing Single Alkyl Guanidine Pendants. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 939–953.
- [8] Dong, X.; Wang, X.; Lin, M.; Sun, H.; Yang, X.; Guo, Z. Promotive Effect of the Platinum Moiety on the DNA Cleavage Activity of Copper-Based Artificial Nucleases. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 2541–2549.

- [9] Aruoma, O. I.; Halliwell, B.; Dizdaroglu, M. Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical-generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 13024–13028.
- [10] Wang, J.-T.; Xia, Q.; Zheng, X.-H.; Chen, H.-Y.; Chao, H.; Mao, Z.-W.; Ji, L.-N. An effective approach to artificial nucleases using copper(II) complexes bearing nucleobases. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 2128–2136.
- [11] Li, L.; Sarjeant, A. A. N.; Vance, M. A.; Zakharov, L. N.; Rheingold, A. L.; Solomon, E. I.; Karlin, K. D. Exogenous Nitrile Substrate Hydroxylation by a New Dicopper-Hydroperoxide Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15360–15361.
- [12] Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R. W. A survey of Hammett substituent constants and resonance and field parameters. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 165–195.

6-7. Supporting Information

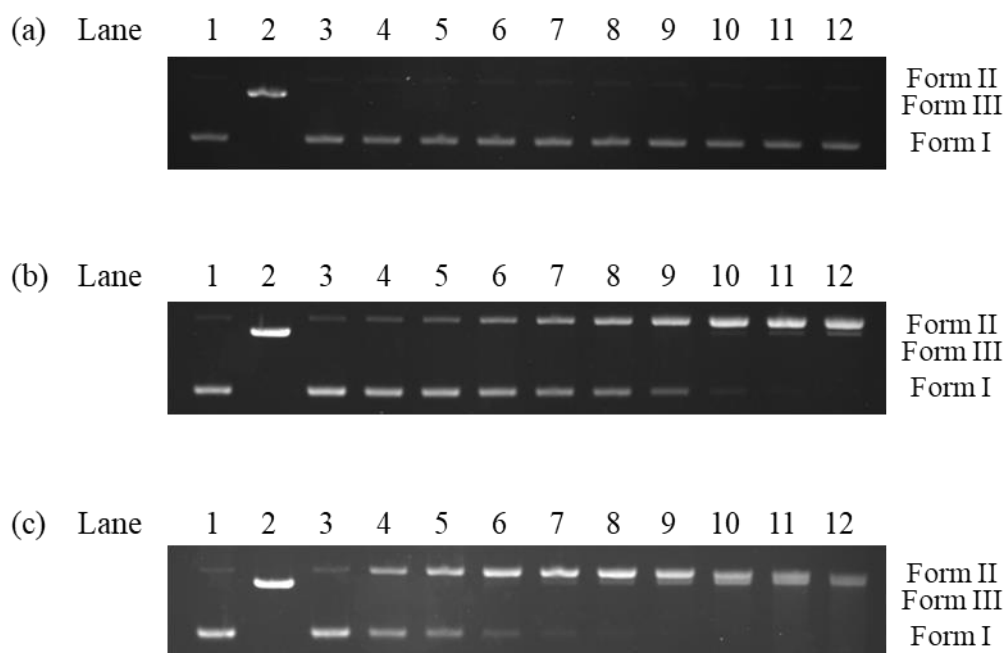


Figure S6-1. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of **10b** and H_2O_2 (50 μ M) at pH 6.0. (a)–(c) corresponded to complex concentration of 0, 10, and 30 μ M, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min, respectively.

Table S6-1. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 10b at pH 6.0

Complex (μM)	H_2O_2 (μM)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
0	50	0	95.7 ± 0.4	4.3 ± 0.4	-
		5	95.4 ± 0.3	4.6 ± 0.3	-
		10	95.2 ± 0.1	4.8 ± 0.1	-
		20	95.1 ± 0.1	4.9 ± 0.1	-
		30	95.0 ± 0.1	5.0 ± 0.1	-
		40	94.8 ± 0.2	5.2 ± 0.2	-
		60	94.5 ± 0.1	5.5 ± 0.1	-
		120	94.3 ± 0.2	5.7 ± 0.2	-
		180	94.0 ± 0.4	6.0 ± 0.4	-
300	92.9 ± 1.1	7.1 ± 1.1	-		
10	50	0	93.3 ± 0.5	6.7 ± 0.5	-
		5	84.5 ± 1.6	15.5 ± 1.6	-
		10	78.2 ± 2.1	21.8 ± 2.1	-
		20	62.7 ± 2.2	37.3 ± 2.2	-
		30	47.0 ± 3.4	53.0 ± 3.4	-
		40	35.6 ± 3.5	64.4 ± 3.5	-
		60	18.6 ± 3.3	81.4 ± 3.3	-
		120	3.1 ± 1.0	94.6 ± 0.4	2.2 ± 0.7
		180	0.0 ± 0.0	95.4 ± 0.4	4.6 ± 0.4
300	0.0 ± 0.0	90.4 ± 0.9	9.6 ± 0.9		
30	50	0	93.3 ± 0.9	6.7 ± 0.9	-
		5	54.8 ± 1.6	45.2 ± 1.6	-
		10	35.2 ± 0.2	64.8 ± 0.2	-
		20	12.3 ± 1.0	86.0 ± 0.0	1.8 ± 1.0
		30	4.7 ± 0.4	91.8 ± 1.4	3.5 ± 1.7
		40	2.5 ± 0.3	90.6 ± 1.2	7.0 ± 1.5
		60	0.0 ± 0.0	86.4 ± 1.3	13.6 ± 1.3
		120	0.0 ± 0.0	71.3 ± 0.6	28.7 ± 0.6
		180	0.0 ± 0.0	61.2 ± 4.6	38.8 ± 4.6
300	0.0 ± 0.0	48.3 ± 3.4	51.7 ± 3.4		

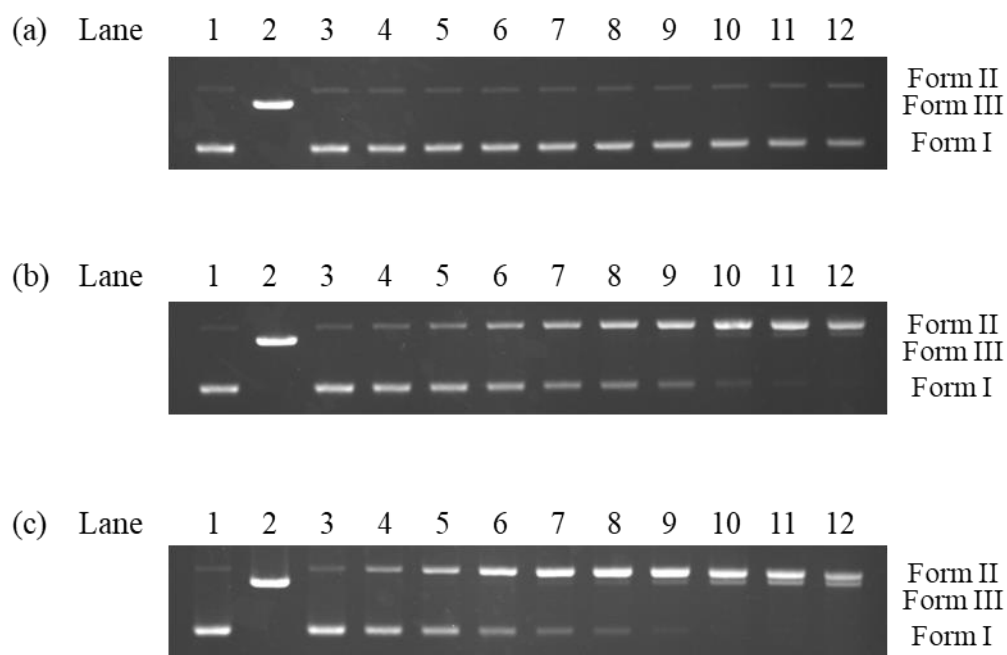


Figure S6-2. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of **10b** (30 μ M) and H₂O₂ at pH 6.0. (a)–(c) corresponded to H₂O₂ concentration of 0, 10, and 30 μ M, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min, respectively.

Table S6-2. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 10b at pH 6.0

Complex (μM)	H_2O_2 (μM)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
30	0	0	92.2 ± 0.4	7.8 ± 0.4	-
		5	91.7 ± 0.3	8.3 ± 0.3	-
		10	91.2 ± 0.1	8.8 ± 0.1	-
		20	90.7 ± 0.3	9.3 ± 0.3	-
		30	90.6 ± 0.3	9.4 ± 0.3	-
		40	90.3 ± 0.4	9.7 ± 0.4	-
		60	90.0 ± 0.6	10.0 ± 0.6	-
		120	89.3 ± 0.4	10.7 ± 0.4	-
		180	87.7 ± 0.6	12.3 ± 0.6	-
		300	81.4 ± 0.6	18.6 ± 0.6	-
30	10	0	92.6 ± 0.2	7.4 ± 0.2	-
		5	84.0 ± 1.1	16.0 ± 1.1	-
		10	75.6 ± 1.1	24.4 ± 1.1	-
		20	59.5 ± 0.4	40.5 ± 0.4	-
		30	44.8 ± 2.5	55.2 ± 2.5	-
		40	36.5 ± 2.3	63.5 ± 2.3	-
		60	23.3 ± 2.0	76.2 ± 1.3	0.5 ± 0.7
		120	8.6 ± 1.4	88.6 ± 1.1	2.8 ± 0.4
		180	4.7 ± 1.4	90.9 ± 0.7	4.4 ± 0.9
		300	1.8 ± 1.3	92.2 ± 0.8	6.0 ± 0.8
30	30	0	92.4 ± 0.6	7.6 ± 0.6	-
		5	67.6 ± 3.1	32.4 ± 3.1	-
		10	49.2 ± 1.6	50.8 ± 1.6	-
		20	22.7 ± 2.4	77.0 ± 2.9	0.3 ± 0.5
		30	12.3 ± 1.1	86.3 ± 1.6	1.4 ± 1.0
		40	6.2 ± 1.0	90.6 ± 1.0	3.2 ± 0.6
		60	2.1 ± 0.1	91.0 ± 0.4	6.9 ± 0.5
		120	0.0 ± 0.0	82.4 ± 1.7	17.6 ± 1.7
		180	0.0 ± 0.0	74.9 ± 2.8	25.1 ± 2.8
		300	0.0 ± 0.0	67.3 ± 4.8	32.7 ± 4.8

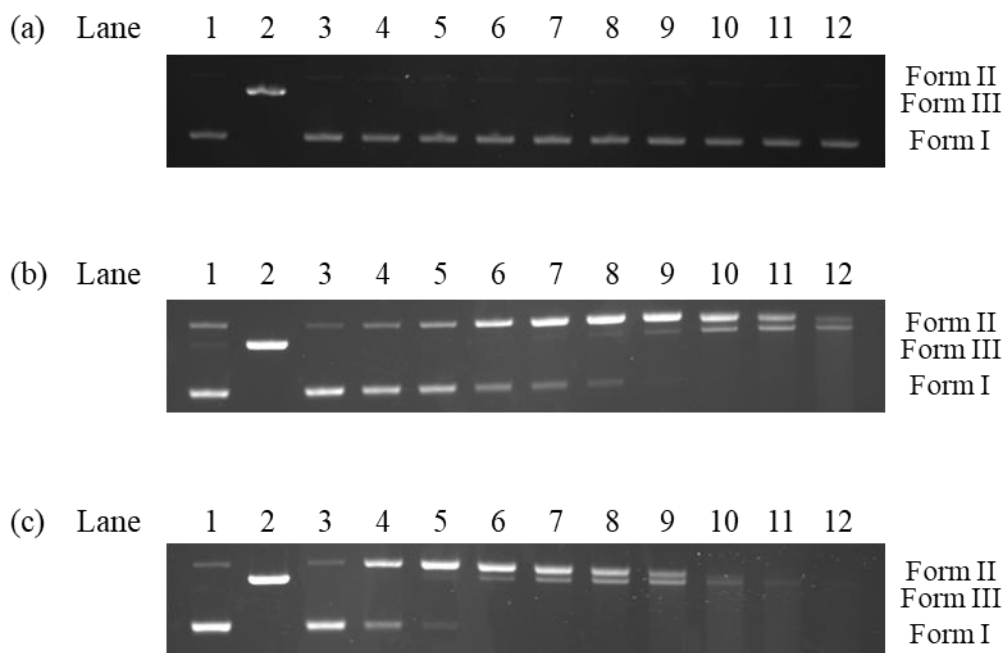


Figure S6-3. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of **11b** and H_2O_2 (50 μ M) at pH 6.0. (a)–(c) corresponded to complex concentration of 0, 10, and 30 μ M, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min, respectively.

Table S6-3. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 11b at pH 6.0

Complex (μM)	H_2O_2 (μM)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
0	50	0	95.7 \pm 0.4	4.3 \pm 0.4	-
		5	95.4 \pm 0.3	4.6 \pm 0.3	-
		10	95.2 \pm 0.1	4.8 \pm 0.1	-
		20	95.1 \pm 0.1	4.9 \pm 0.1	-
		30	95.0 \pm 0.1	5.0 \pm 0.1	-
		40	94.8 \pm 0.2	5.2 \pm 0.2	-
		60	94.5 \pm 0.1	5.5 \pm 0.1	-
		120	94.3 \pm 0.2	5.7 \pm 0.2	-
		180	94.0 \pm 0.4	6.0 \pm 0.4	-
		300	92.9 \pm 1.1	7.1 \pm 1.1	-
10	50	0	92.1 \pm 1.0	7.9 \pm 1.0	-
		5	77.5 \pm 1.3	22.5 \pm 1.3	-
		10	64.5 \pm 2.4	35.5 \pm 2.4	-
		20	34.1 \pm 4.1	65.9 \pm 4.1	-
		30	19.7 \pm 1.8	79.7 \pm 1.8	0.5 \pm 0.0
		40	8.5 \pm 0.4	90.1 \pm 0.2	1.4 \pm 0.5
		60	2.1 \pm 0.1	95.0 \pm 0.3	2.9 \pm 0.4
		120	0.0 \pm 0.0	77.6 \pm 1.2	22.4 \pm 1.2
		180	0.0 \pm 0.0	59.1 \pm 1.5	40.9 \pm 1.5
		300	0.0 \pm 0.0	33.1 \pm 0.5	66.9 \pm 0.5
30	50	0	93.4 \pm 0.1	6.6 \pm 0.1	-
		5	32.6 \pm 0.3	67.4 \pm 0.3	-
		10	9.6 \pm 2.2	89.7 \pm 1.9	0.7 \pm 0.3
		20	0.0 \pm 0.0	91.6 \pm 1.6	8.4 \pm 1.6
		30	0.0 \pm 0.0	80.8 \pm 1.6	19.2 \pm 1.6
		40	0.0 \pm 0.0	69.7 \pm 1.0	30.3 \pm 1.0
		60	0.0 \pm 0.0	53.2 \pm 2.8	46.8 \pm 2.8
		120	0.0 \pm 0.0	27.1 \pm 0.0	72.9 \pm 0.0
		180	n.d.*	n.d.*	n.d.*
		300	n.d.*	n.d.*	n.d.*

*n. d. means cannot determine.

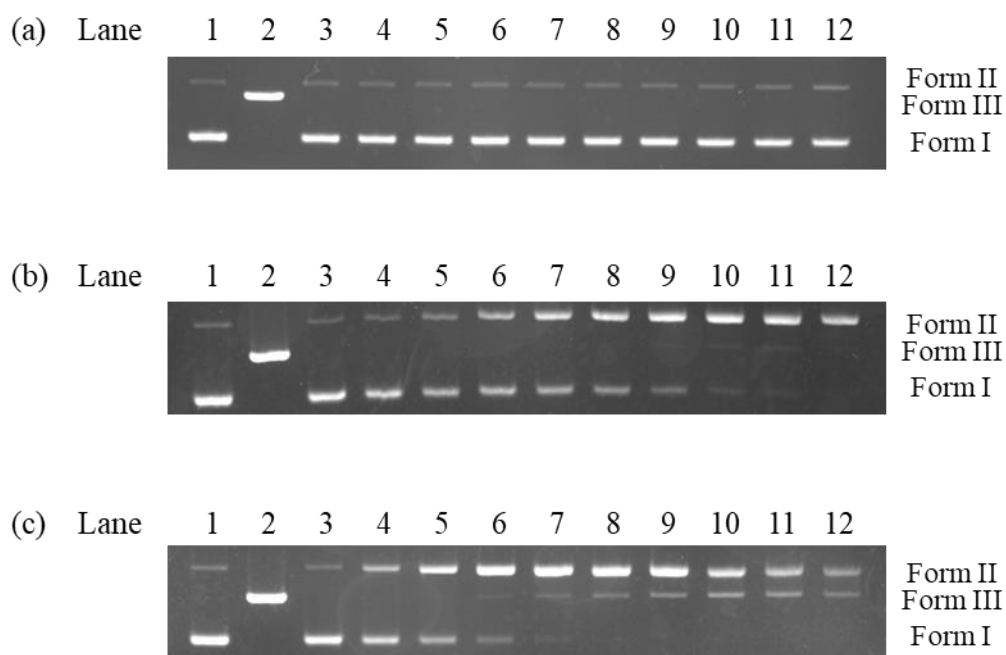


Figure S6-4. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of **11b** (30 μ M) and H₂O₂ at pH 6.0. (a)–(d) corresponded to H₂O₂ concentration of 0, 10, 30, and 50 μ M, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min, respectively.

Table S6-4. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 11b at pH 6.0

Complex (μM)	H_2O_2 (μM)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
30	0	0	93.3 \pm 0.3	6.7 \pm 0.3	-
		5	92.7 \pm 0.1	7.3 \pm 0.1	-
		10	92.3 \pm 0.3	7.7 \pm 0.3	-
		20	91.9 \pm 0.2	8.1 \pm 0.2	-
		30	91.7 \pm 0.4	8.3 \pm 0.4	-
		40	91.6 \pm 0.3	8.4 \pm 0.3	-
		60	90.8 \pm 0.7	9.2 \pm 0.7	-
		120	90.7 \pm 0.7	9.3 \pm 0.7	-
		180	89.1 \pm 0.3	10.9 \pm 0.3	-
		300	83.6 \pm 1.5	16.4 \pm 1.5	-
30	10	0	92.0 \pm 0.1	8.0 \pm 0.1	-
		5	85.6 \pm 1.9	14.4 \pm 1.9	-
		10	70.4 \pm 2.8	29.6 \pm 2.8	-
		20	56.0 \pm 1.1	44.0 \pm 1.1	-
		30	39.7 \pm 2.0	59.9 \pm 1.7	0.4 \pm 0.4
		40	27.1 \pm 2.7	72.1 \pm 2.4	0.8 \pm 0.2
		60	12.6 \pm 3.2	85.3 \pm 2.4	2.1 \pm 0.8
		120	6.0 \pm 0.5	90.7 \pm 0.9	3.3 \pm 0.4
		180	2.6 \pm 0.7	92.5 \pm 0.6	4.9 \pm 0.1
		300	0.0 \pm 0.0	92.8 \pm 0.3	7.2 \pm 0.3
30	30	0	92.1 \pm 1.0	7.9 \pm 1.0	-
		5	63.6 \pm 1.6	36.4 \pm 1.6	-
		10	29.4 \pm 1.7	70.6 \pm 1.7	-
		20	17.1 \pm 1.5	81.8 \pm 1.8	1.2 \pm 0.3
		30	4.5 \pm 1.8	92.4 \pm 1.5	3.0 \pm 0.4
		40	0.5 \pm 0.5	92.8 \pm 1.6	6.7 \pm 1.1
		60	0.0 \pm 0.0	87.9 \pm 0.3	12.1 \pm 0.3
		120	0.0 \pm 0.0	77.4 \pm 0.2	22.6 \pm 0.2
		180	0.0 \pm 0.0	73.7 \pm 1.2	26.3 \pm 1.2
		300	0.0 \pm 0.0	72.4 \pm 1.2	27.6 \pm 1.2

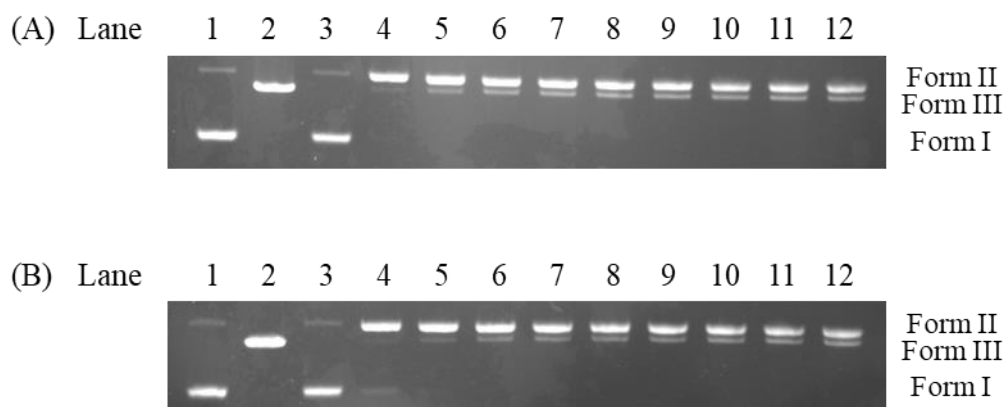


Figure S6-5. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of (A) **10b** and (B) **11b** (30 μ M) and H_2O_2 (50 μ M) at pH 7.4, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min, respectively.

Table S6-5. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 2b and 3b (30 μ M) in the presence of H_2O_2 (50 μ M) at pH 7.4

Complex	10b			11b		
Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
0	93.1 \pm 1.6	6.9 \pm 1.6	-	93.5 \pm 0.2	6.5 \pm 0.2	-
5	0.0 \pm 0.0	98.1 \pm 0.3	1.9 \pm 0.3	4.5 \pm 0.9	94.2 \pm 1.6	1.3 \pm 0.7
10	0.0 \pm 0.0	92.1 \pm 1.2	7.9 \pm 1.2	0.0 \pm 0.0	95.6 \pm 1.7	4.4 \pm 1.7
20	0.0 \pm 0.0	84.9 \pm 1.1	15.1 \pm 1.1	0.0 \pm 0.0	89.7 \pm 1.4	10.3 \pm 1.4
30	0.0 \pm 0.0	82.2 \pm 1.2	17.8 \pm 1.2	0.0 \pm 0.0	86.2 \pm 2.6	13.8 \pm 2.6
40	0.0 \pm 0.0	81.6 \pm 0.7	18.4 \pm 0.7	0.0 \pm 0.0	85.5 \pm 2.6	14.5 \pm 2.6
60	0.0 \pm 0.0	80.9 \pm 0.4	19.1 \pm 0.4	0.0 \pm 0.0	84.0 \pm 1.4	16.0 \pm 1.4
120	0.0 \pm 0.0	79.2 \pm 0.7	20.8 \pm 0.7	0.0 \pm 0.0	81.0 \pm 0.9	19.0 \pm 0.9
180	0.0 \pm 0.0	77.7 \pm 0.6	22.3 \pm 0.6	0.0 \pm 0.0	79.2 \pm 1.0	20.8 \pm 1.0
300	0.0 \pm 0.0	76.9 \pm 1.3	23.1 \pm 1.3	0.0 \pm 0.0	75.2 \pm 0.1	24.8 \pm 0.1

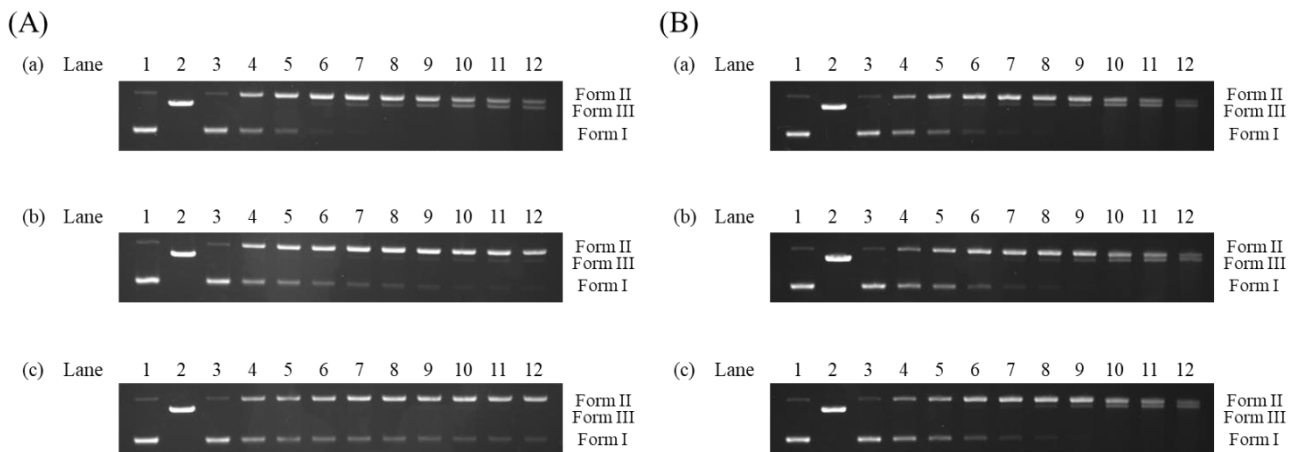


Figure S6-6. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of **10b** (30 μ M) and H₂O₂ (50 μ M) at pH 6.0. (a)–(c) corresponded to (A) KI and (B) DMSO concentrations of 1, 5, and 10 mM, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lane 3–12: corresponding to the time of 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min, respectively.

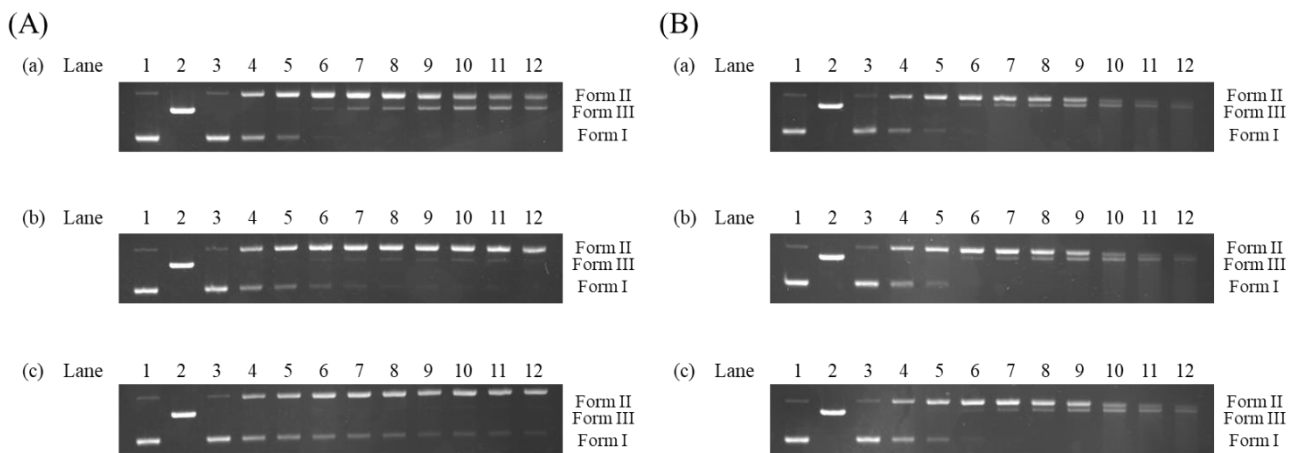


Figure S6-7. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of **11b** (30 μ M) and H₂O₂ (50 μ M) at pH 6.0. (a)–(c) corresponded to (A) KI and (B) DMSO concentrations of 1, 5, and 10 mM, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lane 3–12: corresponding to the time of 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min, respectively.

Table S6-6. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 10b (30 μ M) in the presence of H₂O₂ (50 μ M) and inhibitors at pH 6.0

Inhibitor		KI			DMSO		
Conc. (mM)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
1	0	92.5 \pm 0.6	7.5 \pm 0.6	-	92.7 \pm 0.4	7.3 \pm 0.4	-
	5	38.1 \pm 0.9	61.9 \pm 0.9	-	53.1 \pm 0.9	46.9 \pm 0.9	-
	10	14.8 \pm 0.7	85.2 \pm 0.7	-	27.4 \pm 1.9	72.6 \pm 1.9	-
	20	3.2 \pm 0.4	95.1 \pm 0.6	1.7 \pm 0.1	7.4 \pm 0.6	91.3 \pm 0.9	1.2 \pm 0.3
	30	1.0 \pm 0.0	93.8 \pm 0.6	5.2 \pm 0.5	2.8 \pm 0.4	92.9 \pm 1.5	4.3 \pm 1.2
	40	0.0 \pm 0.0	91.4 \pm 0.0	8.6 \pm 0.0	1.0 \pm 0.1	91.2 \pm 1.5	7.8 \pm 1.6
	60	0.0 \pm 0.0	82.4 \pm 1.5	17.6 \pm 1.5	0.0 \pm 0.0	84.4 \pm 0.0	15.6 \pm 0.0
	120	0.0 \pm 0.0	69.6 \pm 2.1	30.4 \pm 2.1	0.0 \pm 0.0	61.5 \pm 3.1	38.5 \pm 3.1
	180	0.0 \pm 0.0	63.0 \pm 3.3	37.0 \pm 3.3	0.0 \pm 0.0	53.3 \pm 2.6	46.7 \pm 2.6
	300	0.0 \pm 0.0	57.9 \pm 3.0	42.1 \pm 3.0	0.0 \pm 0.0	42.0 \pm 3.2	58.0 \pm 3.2
5	0	93.4 \pm 0.7	6.6 \pm 0.7	-	93.3 \pm 0.1	6.7 \pm 0.1	-
	5	39.2 \pm 0.6	60.8 \pm 0.6	-	61.5 \pm 1.8	38.5 \pm 1.8	-
	10	26.8 \pm 0.1	73.2 \pm 0.1	-	38.3 \pm 1.2	61.7 \pm 1.2	-
	20	16.7 \pm 0.0	83.1 \pm 0.2	0.2 \pm 0.2	16.4 \pm 0.0	83.0 \pm 0.3	0.6 \pm 0.3
	30	10.6 \pm 0.5	88.6 \pm 0.3	0.8 \pm 0.2	8.7 \pm 0.9	89.9 \pm 0.6	1.4 \pm 0.4
	40	8.1 \pm 0.8	91.1 \pm 0.5	0.8 \pm 0.2	5.3 \pm 0.7	91.5 \pm 0.3	3.3 \pm 0.4
	60	5.4 \pm 0.4	93.2 \pm 0.0	1.4 \pm 0.4	1.1 \pm 1.1	90.6 \pm 0.7	8.3 \pm 0.4
	120	3.4 \pm 0.6	94.3 \pm 0.2	2.3 \pm 0.4	0.0 \pm 0.0	76.6 \pm 0.7	23.4 \pm 0.7
	180	2.6 \pm 0.3	94.6 \pm 0.1	2.8 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	65.8 \pm 1.8	34.2 \pm 1.8
	300	3.0 \pm 0.6	93.7 \pm 1.4	3.2 \pm 0.8	0.0 \pm 0.0	52.7 \pm 1.5	47.3 \pm 1.5
10	0	93.0 \pm 0.6	7.0 \pm 0.6	-	92.5 \pm 0.2	7.5 \pm 0.2	-
	5	46.7 \pm 0.9	53.3 \pm 0.9	-	61.1 \pm 0.3	38.9 \pm 0.3	-
	10	36.0 \pm 2.2	64.0 \pm 2.2	-	40.5 \pm 1.4	59.5 \pm 1.4	-
	20	26.0 \pm 2.7	74.0 \pm 2.7	-	19.9 \pm 0.0	80.1 \pm 0.0	-
	30	23.3 \pm 1.8	76.7 \pm 1.8	-	9.3 \pm 0.7	88.5 \pm 0.6	2.1 \pm 0.0
	40	21.9 \pm 1.1	78.1 \pm 1.1	-	4.6 \pm 0.5	91.6 \pm 0.3	3.9 \pm 0.9
	60	17.5 \pm 1.9	82.5 \pm 1.9	-	1.6 \pm 0.5	90.2 \pm 0.4	8.2 \pm 0.9
	120	14.2 \pm 0.2	85.8 \pm 0.2	-	0.0 \pm 0.0	78.8 \pm 3.7	21.2 \pm 3.7
	180	13.0 \pm 0.6	87.0 \pm 0.6	-	0.0 \pm 0.0	69.6 \pm 3.0	30.4 \pm 3.0
	300	11.4 \pm 0.8	88.6 \pm 0.8	-	0.0 \pm 0.0	54.6 \pm 3.2	45.4 \pm 3.2

Table S6-7. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 11b (30 μ M) in the presence of H₂O₂ (50 μ M) and inhibitors at pH 6.0

Inhibitor		KI			DMSO		
Conc. (mM)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
1	0	91.9 \pm 0.4	8.1 \pm 0.4	-	93.5 \pm 0.3	6.5 \pm 0.3	-
	5	43.9 \pm 1.6	56.1 \pm 1.6	-	38.3 \pm 3.1	61.7 \pm 3.1	-
	10	18.0 \pm 0.9	81.0 \pm 1.2	1.0 \pm 0.4	10.6 \pm 1.6	87.8 \pm 1.2	1.5 \pm 0.4
	20	2.1 \pm 0.4	94.4 \pm 0.1	3.5 \pm 0.2	1.8 \pm 1.8	94.0 \pm 0.9	4.3 \pm 0.8
	30	0.0 \pm 0.0	91.9 \pm 0.8	8.1 \pm 0.8	0.0 \pm 0.0	86.0 \pm 0.4	14.0 \pm 0.4
	40	0.0 \pm 0.0	87.8 \pm 0.1	12.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	77.7 \pm 0.1	22.3 \pm 0.1
	60	0.0 \pm 0.0	78.8 \pm 1.3	21.2 \pm 1.3	0.0 \pm 0.0	62.2 \pm 1.0	37.8 \pm 1.0
	120	0.0 \pm 0.0	63.6 \pm 1.0	36.4 \pm 1.0	0.0 \pm 0.0	37.3 \pm 1.4	62.7 \pm 1.4
	180	0.0 \pm 0.0	58.8 \pm 0.5	41.2 \pm 0.5	0.0 \pm 0.0	34.1 \pm 0.0	65.9 \pm 0.0
	300	0.0 \pm 0.0	57.3 \pm 2.4	42.7 \pm 2.4	n.d.*	n.d.*	n.d.*
5	0	91.8 \pm 0.3	8.2 \pm 0.3	-	92.4 \pm 0.4	7.6 \pm 0.4	-
	5	40.8 \pm 1.0	59.2 \pm 1.0	-	41.4 \pm 2.2	58.6 \pm 2.2	-
	10	23.1 \pm 0.8	76.9 \pm 0.8	-	13.7 \pm 2.0	85.3 \pm 1.6	1.0 \pm 0.4
	20	9.4 \pm 0.8	89.1 \pm 1.1	1.5 \pm 0.3	2.0 \pm 0.4	93.7 \pm 0.3	4.4 \pm 0.1
	30	5.5 \pm 0.8	92.3 \pm 1.3	2.2 \pm 0.5	0.0 \pm 0.0	89.6 \pm 0.2	10.4 \pm 0.2
	40	3.1 \pm 1.2	93.9 \pm 1.3	3.0 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	81.5 \pm 0.4	18.5 \pm 0.4
	60	2.5 \pm 1.0	93.9 \pm 1.6	3.6 \pm 0.6	0.0 \pm 0.0	65.8 \pm 3.0	34.2 \pm 3.0
	120	0.4 \pm 0.4	95.2 \pm 0.1	4.4 \pm 0.5	0.0 \pm 0.0	37.0 \pm 5.0	63.0 \pm 5.0
	180	0.3 \pm 0.3	94.5 \pm 0.5	5.3 \pm 0.8	0.0 \pm 0.0	29.7 \pm 0.0	70.3 \pm 0.0
	300	0.0 \pm 0.0	94.4 \pm 1.1	5.6 \pm 1.1	n.d.*	n.d.*	n.d.*
10	0	93.0 \pm 0.5	7.0 \pm 0.5	-	93.8 \pm 0.3	6.2 \pm 0.3	-
	5	50.4 \pm 0.4	49.6 \pm 0.4	-	44.6 \pm 4.1	55.4 \pm 4.1	-
	10	35.1 \pm 0.9	64.6 \pm 0.5	0.3 \pm 0.3	16.2 \pm 3.8	83.8 \pm 0.0	-
	20	24.6 \pm 0.3	74.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.2	3.7 \pm 0.5	93.1 \pm 3.8	3.2 \pm 1.3
	30	18.3 \pm 1.8	80.7 \pm 1.7	1.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	91.5 \pm 1.8	8.5 \pm 1.6
	40	16.1 \pm 1.5	82.9 \pm 1.4	1.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	85.2 \pm 2.4	14.8 \pm 2.4
	60	14.7 \pm 1.6	84.1 \pm 1.7	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	71.6 \pm 3.1	28.4 \pm 3.1
	120	11.7 \pm 0.5	87.1 \pm 0.6	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	47.1 \pm 4.7	52.9 \pm 4.7
	180	8.9 \pm 1.0	89.7 \pm 1.0	1.4 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	35.0 \pm 4.1	65.0 \pm 4.1
	300	7.8 \pm 2.0	90.7 \pm 1.9	1.5 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	26.4 \pm 0.0	73.6 \pm 0.0

*n. d. means cannot determine.

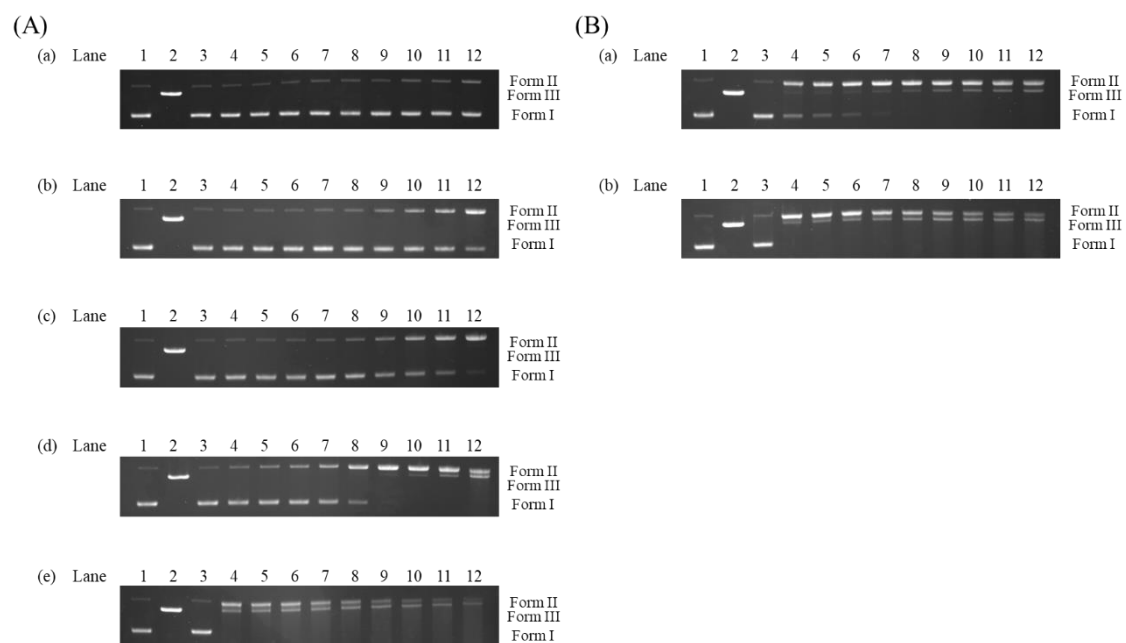


Figure S6-8. (A) Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of **7b** and AscNa (150 μ M) at pH 6.0. (a)–(e) corresponded to complex concentration of 0, 2, 5, 10, and 30 μ M, respectively. (B) Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of **7b** (30 μ M) at pH 6.0. (a) and (b) corresponded to AscNa concentration of 50 and 100 μ 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.

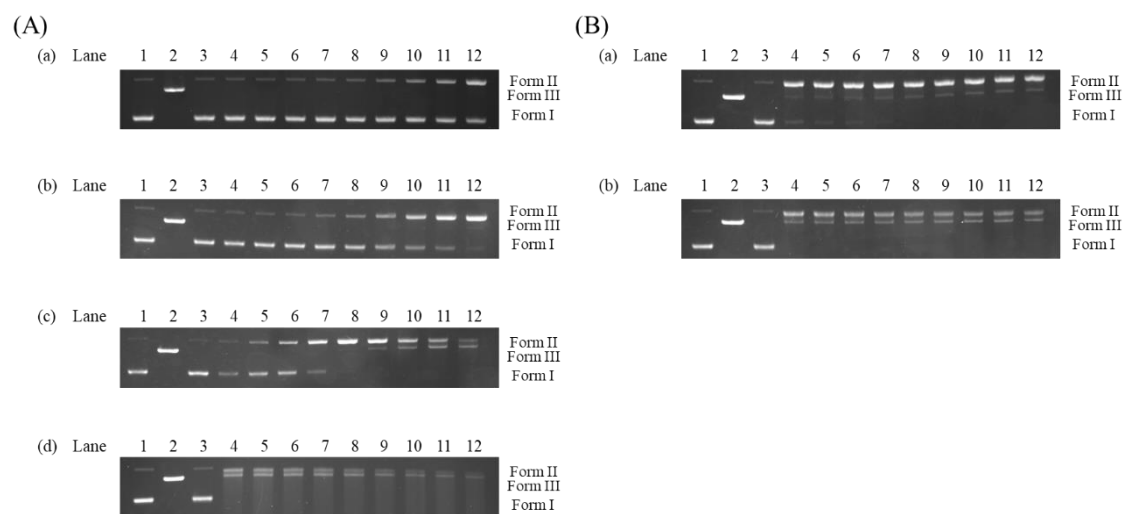


Figure S6-9. (A) Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of **10b** and AscNa (150 μ M) at pH 6.0. (a)–(d) corresponded to complex concentration of 2, 5, 10, and 30 μ M, respectively. (B) Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of **10b** (30 μ M) at pH 6.0. (a) and (b) corresponded to AscNa concentration of 50 and 100 μ 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.

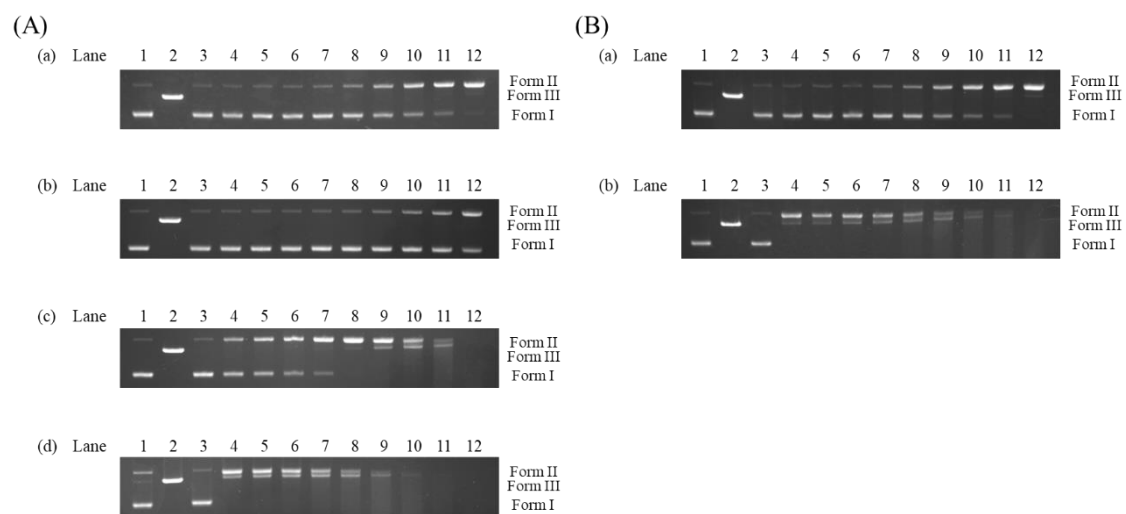


Figure S6-10. (A) Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of **11b** and AscNa (150 μ M) at pH 6.0. (a)–(d) corresponded to complex concentration of 2, 5, 10, and 30 μ M, respectively. (B) Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of **11b** (30 μ M) at pH 6.0. (a) and (b) corresponded to AscNa concentration of 50 and 100 μ 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 S6-8. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 7b at pH 6.0

Complex (μM)	AscNa (μM)	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	93.0 \pm 0.3	7.0 \pm 0.3	-
		1	90.5 \pm 0.5	9.5 \pm 0.5	-
		2	90.2 \pm 0.4	9.8 \pm 0.4	-
		3	89.8 \pm 0.1	10.2 \pm 0.1	-
		5	88.6 \pm 0.6	11.4 \pm 0.6	-
		10	86.5 \pm 0.2	13.5 \pm 0.2	-
		20	77.6 \pm 0.6	22.4 \pm 0.6	-
		30	66.1 \pm 1.0	33.9 \pm 1.0	-
		40	52.5 \pm 0.1	47.5 \pm 0.1	-
		60	28.7 \pm 1.8	71.3 \pm 1.8	-
5	150	0	93.7 \pm 0.2	6.3 \pm 0.2	-
		1	89.8 \pm 0.1	10.2 \pm 0.1	-
		2	89.2 \pm 0.5	10.8 \pm 0.5	-
		3	87.7 \pm 0.0	12.3 \pm 0.0	-
		5	86.7 \pm 0.4	13.3 \pm 0.4	-
		10	80.4 \pm 0.4	19.6 \pm 0.4	-
		20	63.6 \pm 1.8	36.4 \pm 1.8	-
		30	45.9 \pm 2.3	54.1 \pm 2.3	-
		40	28.9 \pm 2.0	71.1 \pm 2.0	-
		60	9.6 \pm 2.1	90.2 \pm 2.0	0.3 \pm 0.1

10	150	0	93.1 ± 0.2	6.9 ± 0.3	-
		1	62.2 ± 4.7	37.8 ± 4.7	-
		2	50.1 ± 4.7	49.9 ± 4.7	-
		3	40.5 ± 3.8	59.5 ± 3.8	-
		5	25.8 ± 4.9	74.2 ± 4.9	-
		10	6.1 ± 0.8	93.6 ± 0.5	0.3 ± 0.3
		20	0.0 ± 0.0	96.9 ± 0.1	3.1 ± 0.1
		30	0.0 ± 0.0	85.8 ± 0.8	14.2 ± 0.8
		40	0.0 ± 0.0	71.2 ± 1.5	28.8 ± 1.5
		60	0.0 ± 0.0	49.6 ± 3.1	50.4 ± 3.1
30	150	0	92.7 ± 0.7	7.3 ± 0.7	-
		1	0.0 ± 0.0	68.9 ± 2.4	31.1 ± 2.4
		2	0.0 ± 0.0	65.1 ± 2.2	34.9 ± 2.2
		3	0.0 ± 0.0	62.7 ± 2.1	37.3 ± 2.1
		5	0.0 ± 0.0	55.8 ± 2.3	44.2 ± 2.3
		10	0.0 ± 0.0	44.5 ± 0.7	55.5 ± 0.7
		20	0.0 ± 0.0	38.2 ± 1.5	61.8 ± 1.5
		30	0.0 ± 0.0	30.4 ± 1.4	69.6 ± 1.4
		40	0.0 ± 0.0	26.4 ± 1.5	73.6 ± 1.5
		60	0.0 ± 0.0	22.1 ± 1.9	77.9 ± 1.9

Table S6-9. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 7b at pH 6.0

Complex (μM)	AscNa (μM)	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

Table S6-10. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 10b at pH 6.0

Complex (μM)	AscNa (μM)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
2	150	0	93.0 \pm 0.0	7.0 \pm 0.0	-
		1	91.2 \pm 0.9	8.8 \pm 0.9	-
		2	90.2 \pm 0.5	9.8 \pm 0.5	-
		3	89.8 \pm 0.2	10.2 \pm 0.2	-
		5	89.0 \pm 0.7	11.0 \pm 0.7	-
		10	86.5 \pm 0.4	13.5 \pm 0.4	-
		20	78.9 \pm 0.4	21.1 \pm 0.4	-
		30	70.4 \pm 1.0	29.6 \pm 1.0	-
		40	60.9 \pm 1.2	39.1 \pm 1.2	-
		60	41.6 \pm 0.8	58.4 \pm 0.8	-
5	150	0	91.9 \pm 0.6	8.1 \pm 0.6	-
		1	89.9 \pm 0.5	10.1 \pm 0.5	-
		2	89.2 \pm 0.1	10.8 \pm 0.1	-
		3	88.8 \pm 1.2	11.2 \pm 1.2	-
		5	83.1 \pm 0.7	16.9 \pm 0.7	-
		10	71.4 \pm 0.6	28.6 \pm 0.6	-
		20	42.7 \pm 0.5	57.3 \pm 0.5	-
		30	20.6 \pm 0.8	79.4 \pm 0.8	-
		40	10.2 \pm 1.2	89.8 \pm 1.2	-
		60	0.7 \pm 0.7	98.1 \pm 0.2	1.2 \pm 0.4
10	150	0	94.8 \pm 1.9	5.2 \pm 1.9	-
		1	74.2 \pm 2.7	25.8 \pm 2.7	-
		2	55.3 \pm 0.8	44.7 \pm 0.8	-
		3	37.3 \pm 0.6	62.7 \pm 0.6	-
		5	9.4 \pm 1.4	90.6 \pm 1.4	-
		10	0.0 \pm 0.0	98.7 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1
		20	0.0 \pm 0.0	87.9 \pm 1.6	12.1 \pm 1.6
		30	0.0 \pm 0.0	58.4 \pm 1.8	41.6 \pm 1.8
		40	0.0 \pm 0.0	43.5 \pm 2.8	56.5 \pm 2.8
		60	0.0 \pm 0.0	28.6 \pm 1.2	71.4 \pm 1.2

		0	93.1 ± 0.3	6.9 ± 0.3	-
		1	0.0 ± 0.0	42.8 ± 0.5	57.2 ± 0.5
		2	0.0 ± 0.0	39.9 ± 0.6	60.1 ± 0.6
		3	0.0 ± 0.0	36.2 ± 0.8	63.8 ± 0.8
30	150	5	0.0 ± 0.0	31.3 ± 0.2	68.7 ± 0.2
		10	0.0 ± 0.0	23.5 ± 1.2	76.5 ± 1.2
		20	0.0 ± 0.0	19.3 ± 1.9	80.7 ± 1.9
		30	0.0 ± 0.0	17.2 ± 0.1	82.8 ± 0.1
		40	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		60	n. d.*	n. d.*	n. d.*

*n. d. means cannot determine.

Table S6-11. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 10b at pH 6.0

Complex (μM)	AscNa (μM)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
30	50	0	91.4 \pm 0.6	8.6 \pm 0.6	-
		1	7.4 \pm 2.2	90.4 \pm 2.3	2.1 \pm 0.1
		2	4.2 \pm 0.7	93.2 \pm 0.5	2.6 \pm 0.2
		3	2.3 \pm 0.5	94.1 \pm 0.2	3.6 \pm 0.3
		5	1.1 \pm 0.0	95.0 \pm 0.7	3.8 \pm 0.7
		10	0.5 \pm 0.5	93.8 \pm 0.1	5.7 \pm 0.4
		20	0.0 \pm 0.0	93.8 \pm 0.8	6.2 \pm 0.8
		30	0.0 \pm 0.0	93.4 \pm 0.7	6.6 \pm 0.7
		40	0.0 \pm 0.0	92.8 \pm 0.6	7.2 \pm 0.6
		60	0.0 \pm 0.0	92.3 \pm 0.6	7.7 \pm 0.6
30	100	0	92.7 \pm 0.1	7.3 \pm 0.1	-
		1	0.0 \pm 0.0	90.7 \pm 1.5	9.3 \pm 1.5
		2	0.0 \pm 0.0	85.3 \pm 1.0	14.7 \pm 1.0
		3	0.0 \pm 0.0	83.9 \pm 1.4	16.1 \pm 1.4
		5	0.0 \pm 0.0	78.1 \pm 1.4	21.9 \pm 1.4
		10	0.0 \pm 0.0	75.2 \pm 0.2	24.8 \pm 0.2
		20	0.0 \pm 0.0	64.5 \pm 0.7	35.5 \pm 0.7
		30	0.0 \pm 0.0	61.0 \pm 1.2	39.0 \pm 1.2
		40	0.0 \pm 0.0	57.3 \pm 0.2	42.7 \pm 0.2
		60	0.0 \pm 0.0	53.0 \pm 2.6	47.0 \pm 2.6

Table S6-12. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 11b at pH 6.0

Complex (μM)	AscNa (μM)	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.*

		0	93.1 ± 0.5	6.9 ± 0.5	-
		1	0.0 ± 0.0	78.8 ± 1.7	21.2 ± 1.7
		2	0.0 ± 0.0	73.3 ± 2.0	26.7 ± 2.0
		3	0.0 ± 0.0	68.5 ± 2.1	31.5 ± 2.1
30	150	5	0.0 ± 0.0	60.0 ± 2.5	40.0 ± 2.5
		10	0.0 ± 0.0	46.4 ± 2.4	53.6 ± 2.4
		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.

Table S6-13. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 11b at pH 6.0

Complex (μM)	AscNa (μM)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
30	50	0	93.2 \pm 1.3	6.8 \pm 1.3	-
		1	89.5 \pm 0.1	10.5 \pm 0.1	-
		2	89.0 \pm 0.5	11.0 \pm 0.5	-
		3	88.2 \pm 1.1	11.8 \pm 1.1	-
		5	83.8 \pm 1.3	16.2 \pm 1.3	-
		10	72.6 \pm 1.1	27.4 \pm 1.1	-
		20	45.1 \pm 1.8	54.9 \pm 1.8	-
		30	27.4 \pm 0.6	72.6 \pm 0.6	-
		40	16.3 \pm 1.1	83.7 \pm 1.1	-
		60	2.2 \pm 1.5	96.6 \pm 1.1	1.2 \pm 0.3
30	100	0	92.8 \pm 0.6	7.2 \pm 0.6	-
		1	0.0 \pm 0.0	94.4 \pm 1.9	5.6 \pm 1.9
		2	0.0 \pm 0.0	89.8 \pm 3.1	10.2 \pm 3.1
		3	0.0 \pm 0.0	84.7 \pm 2.2	15.3 \pm 2.2
		5	0.0 \pm 0.0	76.6 \pm 3.3	23.4 \pm 3.3
		10	0.0 \pm 0.0	63.3 \pm 0.4	36.7 \pm 0.4
		20	0.0 \pm 0.0	43.6 \pm 1.4	56.4 \pm 1.4
		30	0.0 \pm 0.0	27.0 \pm 3.2	73.0 \pm 3.2
		40	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		60	n. d.*	n. d.*	n. d.*

*n. d. means cannot determine.

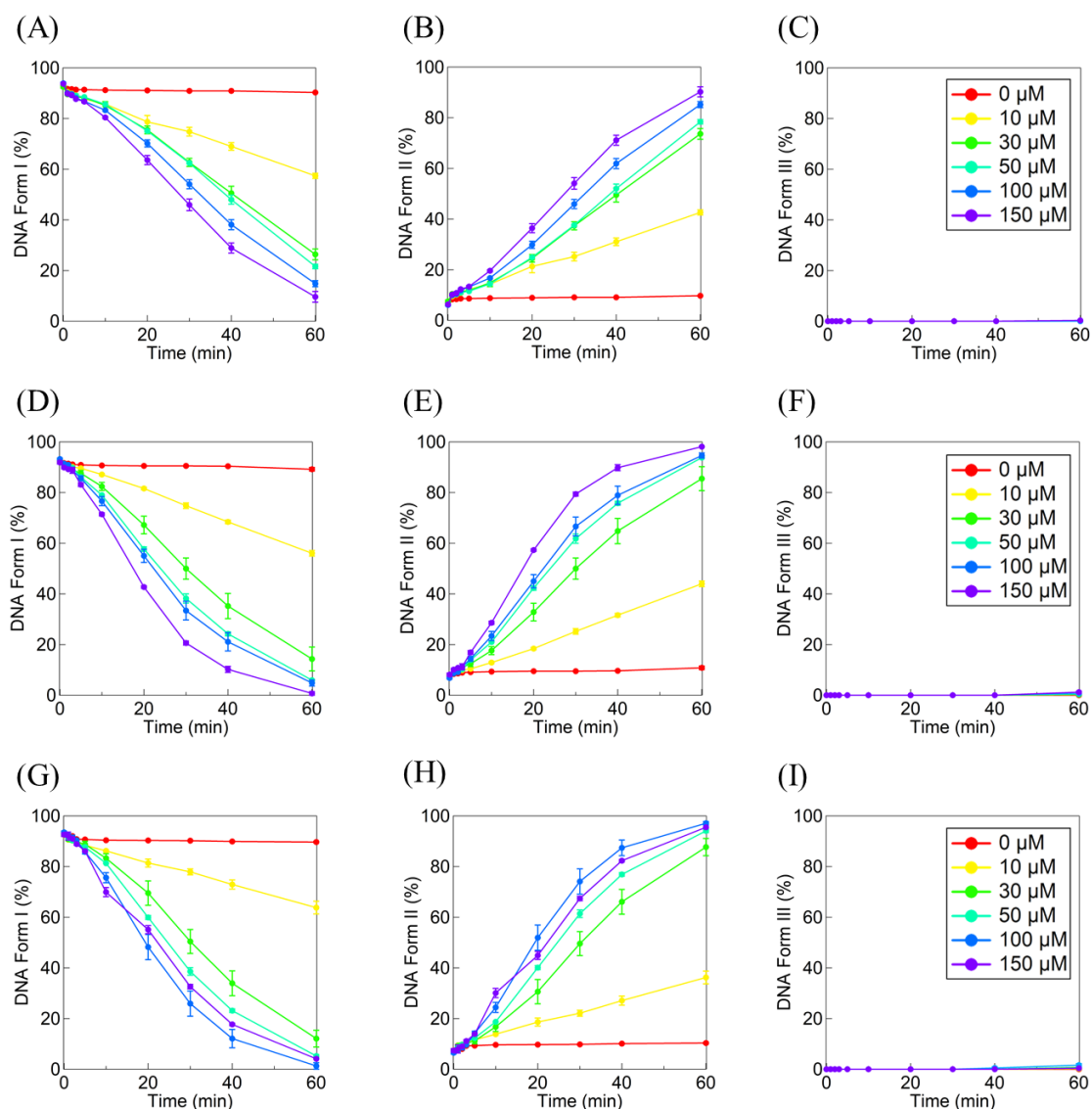


Figure S6-11. AscNa concentration-dependent profile for DNA cleavage promoted by **7b** (A)–(C), **10b** (D)–(F), and **11b** (G)–(I). Time courses for the decrease of % of Form I ((A), (D), and (G)), increase of Form II ((B), (E), and (H)), and Form III ((C), (F), and (I)) at pH 6.0. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [pUC19 DNA] = 50 μ M bp, [complex] = 5 μ M, [AscNa] = 0–150 μ M, [Cu(OAc)₂] = 70 μ M at 37°C for 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min. Experiments were carried out at least three times.

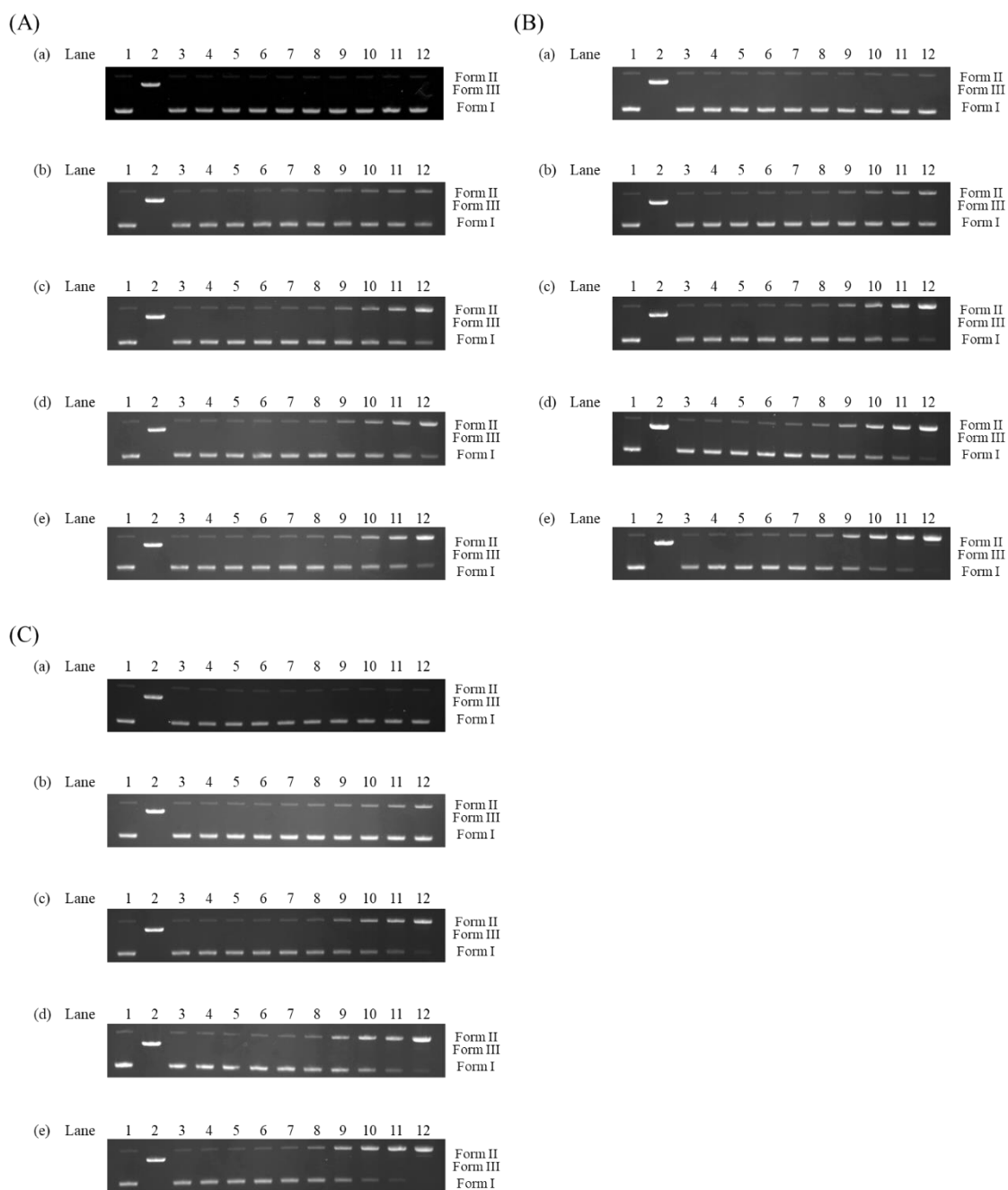


Figure S6-12. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of (A) **7b**, (B) **10b**, and (C) **11b** (5 μ M) and AscNa at pH 6.0. (a)–(d) corresponded to AscNa concentration of 0, 10, 30, 50, 100, and 150 μ M, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively.

Table S6-14. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 7b, 10b, and 11b (5 μ M) in the presence of AscNa at pH 6.0

Complex		7b			10b			11b		
AscNa (μ M)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
0	0	92.8 \pm 0.0	7.2 \pm 0.0	-	92.2 \pm 0.4	7.8 \pm 0.4	-	93.3 \pm 0.0	6.7 \pm 0.0	-
	1	91.7 \pm 0.3	8.3 \pm 0.3	-	91.6 \pm 0.2	8.4 \pm 0.2	-	92.4 \pm 0.2	7.6 \pm 0.2	-
	2	91.6 \pm 0.4	8.4 \pm 0.4	-	91.4 \pm 0.2	8.6 \pm 0.2	-	92.0 \pm 0.4	8.0 \pm 0.4	-
	3	91.4 \pm 0.2	8.6 \pm 0.2	-	91.1 \pm 0.0	8.9 \pm 0.0	-	90.8 \pm 0.2	9.2 \pm 0.2	-
	5	91.4 \pm 0.2	8.6 \pm 0.2	-	90.9 \pm 0.1	9.1 \pm 0.1	-	90.7 \pm 0.2	9.3 \pm 0.2	-
	10	91.2 \pm 0.0	8.8 \pm 0.0	-	90.7 \pm 0.0	9.3 \pm 0.0	-	90.4 \pm 0.1	9.6 \pm 0.1	-
	20	91.1 \pm 0.0	8.9 \pm 0.0	-	90.5 \pm 0.0	9.5 \pm 0.0	-	90.3 \pm 0.1	9.7 \pm 0.1	-
	30	90.9 \pm 0.1	9.1 \pm 0.1	-	90.5 \pm 0.0	9.5 \pm 0.0	-	90.2 \pm 0.0	9.8 \pm 0.0	-
	40	90.9 \pm 0.1	9.1 \pm 0.1	-	90.4 \pm 0.1	9.6 \pm 0.1	-	89.9 \pm 0.2	10.1 \pm 0.2	-
	60	90.3 \pm 0.1	9.7 \pm 0.1	-	89.2 \pm 0.7	10.8 \pm 0.7	-	89.7 \pm 0.3	10.3 \pm 0.3	-
10	0	92.8 \pm 0.4	7.2 \pm 0.4	-	92.7 \pm 0.3	7.3 \pm 0.3	-	92.5 \pm 0.1	7.5 \pm 0.1	-
	1	90.5 \pm 0.0	9.5 \pm 0.0	-	90.6 \pm 0.0	9.4 \pm 0.0	-	90.6 \pm 0.3	9.4 \pm 0.3	-
	2	89.9 \pm 0.2	10.1 \pm 0.2	-	90.3 \pm 0.1	9.7 \pm 0.1	-	90.4 \pm 0.4	9.6 \pm 0.4	-
	3	89.2 \pm 0.5	10.8 \pm 0.5	-	90.1 \pm 0.3	9.9 \pm 0.3	-	89.8 \pm 0.2	10.2 \pm 0.2	-
	5	87.8 \pm 0.6	12.2 \pm 0.6	-	89.6 \pm 0.2	10.4 \pm 0.2	-	88.4 \pm 0.6	11.6 \pm 0.6	-
	10	85.7 \pm 0.4	14.3 \pm 0.4	-	87.1 \pm 0.4	12.9 \pm 0.4	-	86.2 \pm 0.4	13.8 \pm 0.4	-
	20	78.7 \pm 2.5	21.3 \pm 2.5	-	81.6 \pm 0.5	18.4 \pm 0.5	-	81.4 \pm 1.6	18.6 \pm 1.6	-
	30	74.8 \pm 1.7	25.2 \pm 1.7	-	74.8 \pm 1.1	25.2 \pm 1.1	-	77.9 \pm 1.2	22.1 \pm 1.2	-
	40	69.0 \pm 1.5	31.0 \pm 1.5	-	68.4 \pm 0.7	31.6 \pm 0.7	-	72.9 \pm 1.8	27.1 \pm 1.8	-
	60	57.4 \pm 1.0	42.6 \pm 1.0	-	56.0 \pm 1.1	44.0 \pm 1.1	-	63.8 \pm 2.5	36.2 \pm 2.5	-
30	0	92.5 \pm 0.5	7.5 \pm 0.5	-	92.5 \pm 0.3	7.5 \pm 0.3	-	92.6 \pm 0.2	7.4 \pm 0.2	-
	1	89.6 \pm 0.2	10.4 \pm 0.2	-	90.0 \pm 0.0	10.0 \pm 0.0	-	90.8 \pm 0.5	9.2 \pm 0.5	-
	2	89.4 \pm 0.3	10.6 \pm 0.3	-	89.4 \pm 0.2	10.6 \pm 0.2	-	90.3 \pm 0.6	9.7 \pm 0.6	-
	3	88.6 \pm 0.7	11.4 \pm 0.7	-	89.0 \pm 0.2	11.0 \pm 0.2	-	89.8 \pm 0.3	10.2 \pm 0.3	-
	5	88.2 \pm 0.5	11.8 \pm 0.5	-	87.6 \pm 1.1	12.4 \pm 1.1	-	88.8 \pm 1.2	11.2 \pm 1.2	-
	10	85.2 \pm 1.5	14.8 \pm 1.5	-	82.4 \pm 1.6	17.6 \pm 1.6	-	83.3 \pm 1.8	16.7 \pm 1.8	-
	20	75.5 \pm 1.5	24.5 \pm 1.5	-	67.2 \pm 3.5	32.8 \pm 3.4	-	69.5 \pm 4.8	30.6 \pm 4.8	-
	30	62.7 \pm 1.6	37.3 \pm 1.6	-	50.0 \pm 4.2	50.0 \pm 4.2	-	50.4 \pm 4.7	49.6 \pm 4.7	-
	40	50.5 \pm 2.8	49.5 \pm 2.8	-	35.2 \pm 5.0	64.8 \pm 5.0	-	33.9 \pm 4.9	66.1 \pm 4.9	-
	60	26.4 \pm 2.1	73.6 \pm 2.1	-	14.3 \pm 4.7	85.5 \pm 4.7	0.2 \pm 0.0	12.1 \pm 3.3	87.7 \pm 3.4	0.2 \pm 0.0

50	0	93.7 ± 0.2	6.3 ± 0.2	-	93.1 ± 0.5	6.9 ± 0.5	-	93.4 ± 0.1	6.6 ± 0.1	-
	1	90.1 ± 0.3	9.9 ± 0.3	-	90.7 ± 0.4	9.3 ± 0.4	-	91.2 ± 0.1	8.8 ± 0.1	-
	2	89.6 ± 0.2	10.4 ± 0.2	-	90.5 ± 0.6	9.5 ± 0.6	-	90.4 ± 0.4	9.6 ± 0.4	-
	3	89.0 ± 0.6	11.0 ± 0.6	-	89.8 ± 0.0	10.2 ± 0.0	-	89.4 ± 1.0	10.6 ± 1.0	-
	5	88.5 ± 0.1	11.5 ± 0.1	-	86.1 ± 0.0	13.9 ± 0.0	-	87.7 ± 0.2	12.3 ± 0.2	-
	10	85.6 ± 0.3	14.4 ± 0.3	-	79.0 ± 0.0	21.0 ± 0.0	-	81.3 ± 0.1	18.7 ± 0.1	-
	20	75.1 ± 0.4	24.9 ± 0.4	-	57.7 ± 0.9	42.3 ± 0.9	-	59.9 ± 0.8	40.1 ± 0.8	-
	30	62.4 ± 0.3	37.6 ± 0.3	-	38.2 ± 1.8	61.8 ± 1.8	-	38.6 ± 1.5	61.4 ± 1.5	-
	40	48.0 ± 1.8	52.0 ± 1.8	-	24.2 ± 0.8	75.8 ± 0.8	-	23.1 ± 0.7	76.9 ± 0.7	-
60	21.6 ± 0.9	78.4 ± 0.9	-	5.9 ± 0.3	93.8 ± 0.3	0.3 ± 0.0	5.2 ± 0.6	94.1 ± 0.7	0.7 ± 0.0	
100	0	93.9 ± 0.4	6.1 ± 0.4	-	93.2 ± 0.4	6.8 ± 0.4	-	93.5 ± 0.5	6.5 ± 0.5	-
	1	90.1 ± 0.1	9.9 ± 0.1	-	91.4 ± 0.1	8.6 ± 0.1	-	92.3 ± 0.7	7.7 ± 0.7	-
	2	89.7 ± 0.1	10.3 ± 0.1	-	90.9 ± 0.3	9.1 ± 0.3	-	91.5 ± 0.9	8.5 ± 0.9	-
	3	88.2 ± 0.1	11.8 ± 0.1	-	88.7 ± 1.1	11.3 ± 1.1	-	90.4 ± 0.1	9.6 ± 0.1	-
	5	86.8 ± 0.2	13.2 ± 0.2	-	85.6 ± 1.0	14.4 ± 1.0	-	85.8 ± 0.8	14.2 ± 0.8	-
	10	83.3 ± 0.3	16.7 ± 0.3	-	76.6 ± 1.8	23.4 ± 1.8	-	75.6 ± 2.0	24.4 ± 2.0	-
	20	70.2 ± 1.4	29.8 ± 1.4	-	55.0 ± 2.6	45.0 ± 2.6	-	48.2 ± 5.0	51.9 ± 5.0	-
	30	54.1 ± 1.8	45.9 ± 1.8	-	33.4 ± 3.7	66.6 ± 3.7	-	25.9 ± 5.0	74.1 ± 5.0	-
	40	38.1 ± 2.0	61.9 ± 2.0	-	21.1 ± 3.6	78.9 ± 3.6	-	12.1 ± 3.6	87.4 ± 3.1	0.5 ± 0.5
60	14.8 ± 1.2	85.2 ± 1.2	-	4.8 ± 1.2	94.6 ± 1.0	0.6 ± 0.2	1.3 ± 1.3	97.1 ± 0.7	1.6 ± 0.6	

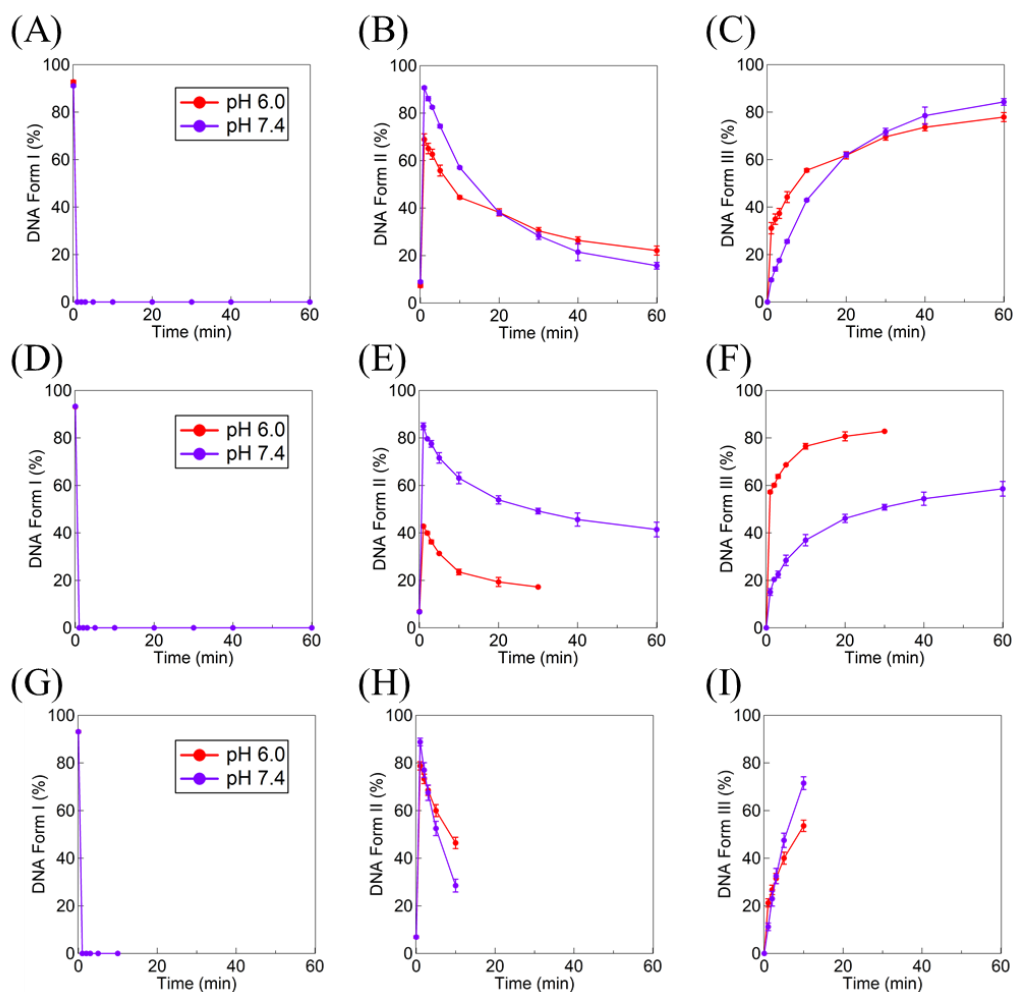


Figure S6-13. pH-dependent profile for DNA cleavage promoted by **7b** (A)–(C), **10b** (D)–(F), and **11b** (G)–(I). Time courses for the decrease of % of Form I ((A), (D), and (G)), increase of Form II ((B), (E), and (H)), and Form III ((C), (F), and (I)) at pH 6.0 (red) and 7.4 (purple). Experimental conditions: $[\text{NaCl}] = 10 \text{ mM}$, $[\text{buffer}] = 10 \text{ mM}$ (pH 6.0 (MES), 7.4 (MOPS)), $[\text{pUC19 DNA}] = 50 \text{ }\mu\text{M bp}$, $[\text{complex}] = 30 \text{ }\mu\text{M}$, $[\text{AscNa}] = 150 \text{ }\mu\text{M}$, $[\text{Cu}(\text{OAc})_2] = 70 \text{ }\mu\text{M}$ at 37°C for 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min. Experiments were carried out at least three

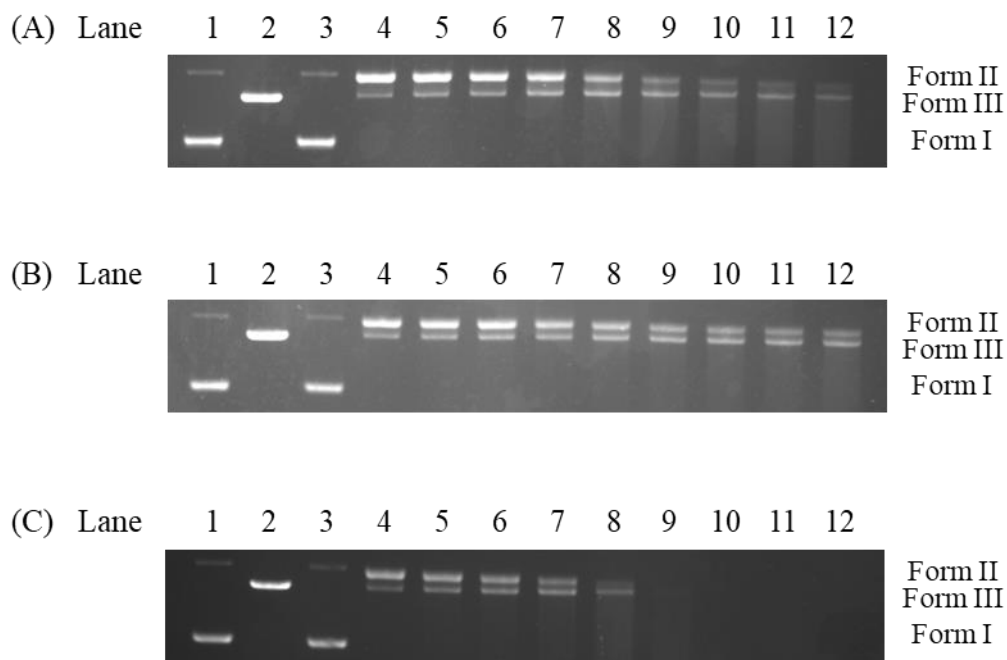


Figure S6-14. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of (A) **7b**, (B) **10b**, and (C) **11b** (5 μ M) and AscNa at pH 7.4. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively.

Table S6-15. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 7b, 10b, and 11b (30 μ M) at pH 7.4

Complex	AscNa (μ M)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
7b	150	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
10b	150	0	93.3 \pm 0.3	6.7 \pm 0.3	-
		1	0.0 \pm 0.0	84.9 \pm 1.4	15.1 \pm 1.4
		2	0.0 \pm 0.0	79.6 \pm 0.2	20.4 \pm 0.2
		3	0.0 \pm 0.0	77.5 \pm 1.4	22.5 \pm 1.4
		5	0.0 \pm 0.0	71.6 \pm 2.2	28.4 \pm 2.2
		10	0.0 \pm 0.0	63.1 \pm 2.4	36.9 \pm 2.4
		20	0.0 \pm 0.0	53.9 \pm 1.7	46.1 \pm 1.7
		30	0.0 \pm 0.0	49.2 \pm 1.2	50.8 \pm 1.2
		40	0.0 \pm 0.0	45.6 \pm 2.8	54.4 \pm 2.8
		60	0.0 \pm 0.0	41.4 \pm 3.1	58.6 \pm 3.1
11b	150	0	93.1 \pm 0.2	6.9 \pm 0.2	-
		1	0.0 \pm 0.0	88.8 \pm 1.6	11.2 \pm 1.6
		2	0.0 \pm 0.0	77.0 \pm 3.1	23.0 \pm 3.1
		3	0.0 \pm 0.0	67.5 \pm 3.2	32.5 \pm 3.2
		5	0.0 \pm 0.0	52.5 \pm 3.0	47.5 \pm 3.0
		10	0.0 \pm 0.0	28.5 \pm 2.7	71.5 \pm 2.7
		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.

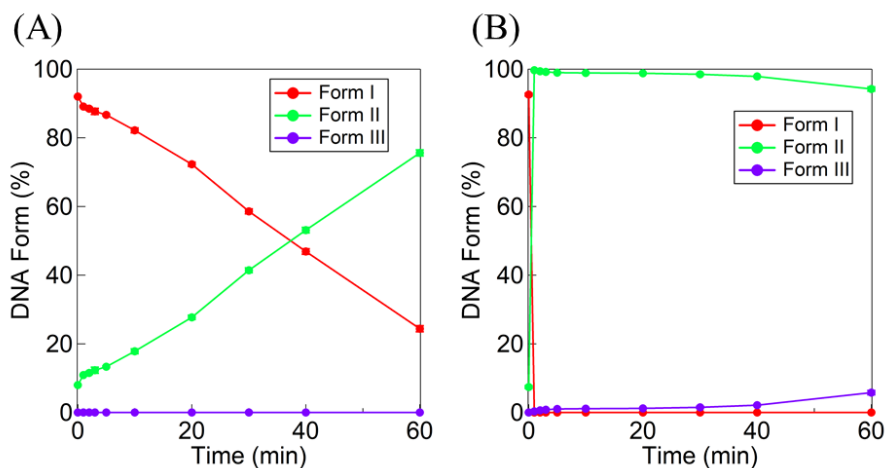


Figure S6-15. DNA cleavage profile promoted by (A) **8** and (B) **14**, respectively. Time courses for the decrease of % of Form I (red), increase of % of Form II (green), and Form III (purple) at pH 6.0. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [pUC19 DNA] = 50 μ M bp, [complex] = 30 μ M, [AscNa] = 150 μ M, [Cu(OAc)₂] = 70 μ M at 37°C for 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min. Experiments were carried out at least three times.

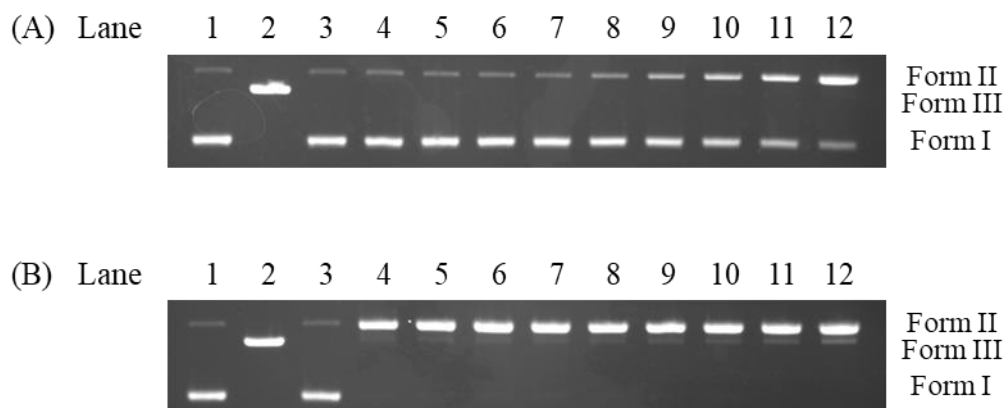


Figure S6-16. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of (A) **8** and (B) **14** (30 μ M) and AscNa (150 μ M) at pH 6.0, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively.

Table S6-16. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 8 and 14 (30 μ M) in the presence of H₂O₂ (50 μ M) at pH 6.0

Complex	8			14		
Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
0	92.0 \pm 0.1	8.0 \pm 0.1	-	92.6 \pm 0.4	7.4 \pm 0.4	-
1	89.1 \pm 0.1	10.9 \pm 0.1	-	0.0 \pm 0.0	99.7 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0
2	88.5 \pm 0.4	11.5 \pm 0.4	-	0.0 \pm 0.0	99.4 \pm 0.0	0.6 \pm 0.0
3	87.7 \pm 0.9	12.3 \pm 0.9	-	0.0 \pm 0.0	99.2 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1
5	86.7 \pm 0.2	13.3 \pm 0.2	-	0.0 \pm 0.0	99.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0
10	82.2 \pm 0.7	17.8 \pm 0.7	-	0.0 \pm 0.0	98.9 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1
20	72.3 \pm 0.6	27.7 \pm 0.6	-	0.0 \pm 0.0	98.8 \pm 0.0	1.2 \pm 0.0
30	58.6 \pm 0.7	41.4 \pm 0.7	-	0.0 \pm 0.0	98.5 \pm 0.3	1.5 \pm 0.3
40	46.9 \pm 0.8	53.1 \pm 0.8	-	0.0 \pm 0.0	97.9 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1
60	24.4 \pm 0.9	75.6 \pm 0.9	-	0.0 \pm 0.0	94.2 \pm 0.6	5.8 \pm 0.6

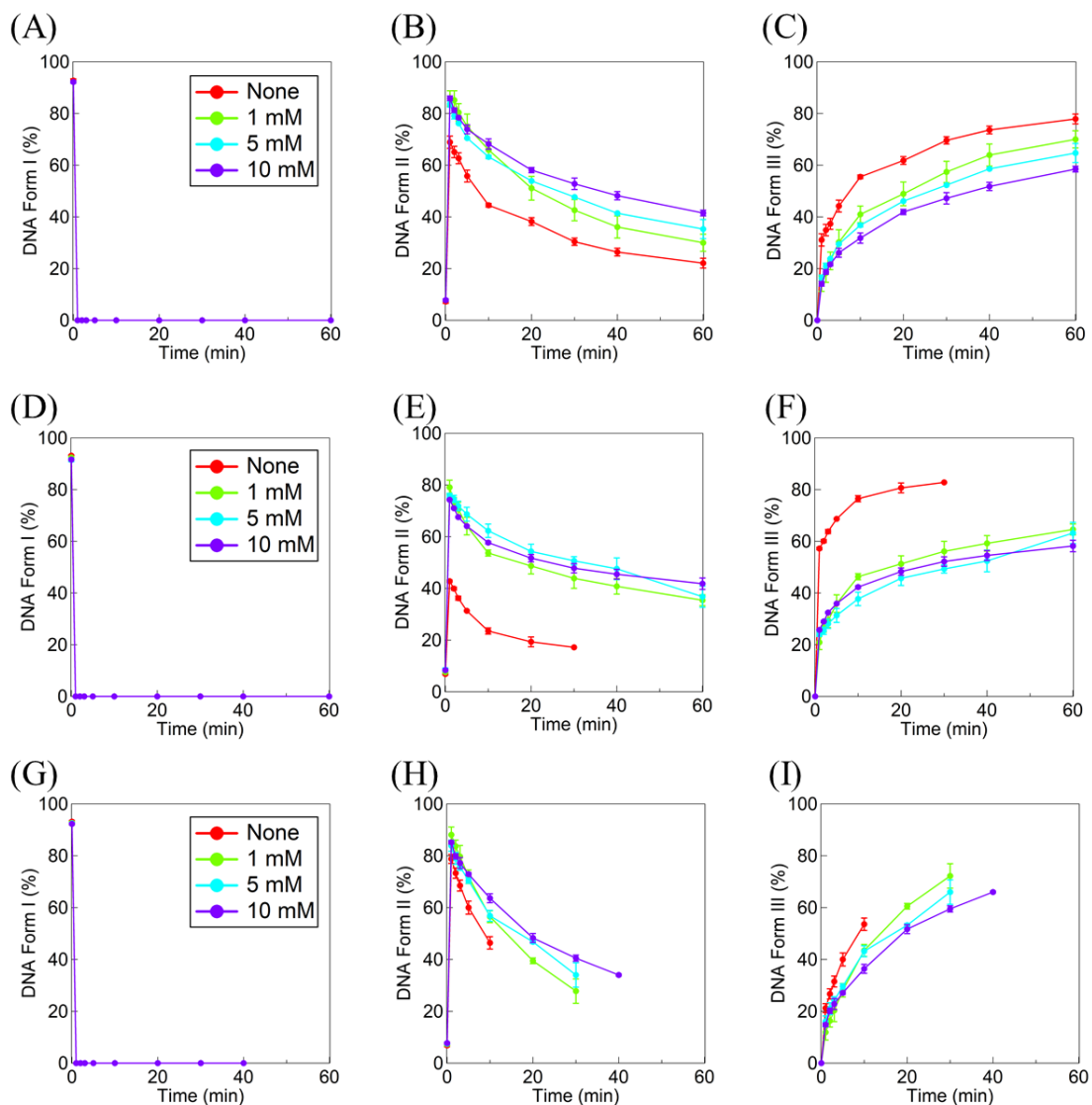


Figure S6-17. DNA cleavage profile promoted by **7b** (A)–(C), **10b** (D)–(F), and **11b** (G)–(I), respectively. Time courses for the decrease of % of Form I ((A), (D), and (G)), increase of % of Form II ((B), (E), and (H)), and Form III ((C), (F), and (I)) in the presence of DMSO, respectively. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [pUC19 DNA] = 50 μ M bp, [complex] = 30 μ M, [AscNa] = 150 μ M, [Cu(OAc)₂] = 70 μ M, and [DMSO] = 0, 1, 5, and 10 mM at 37°C for 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min. Experiments were carried out at least three times.

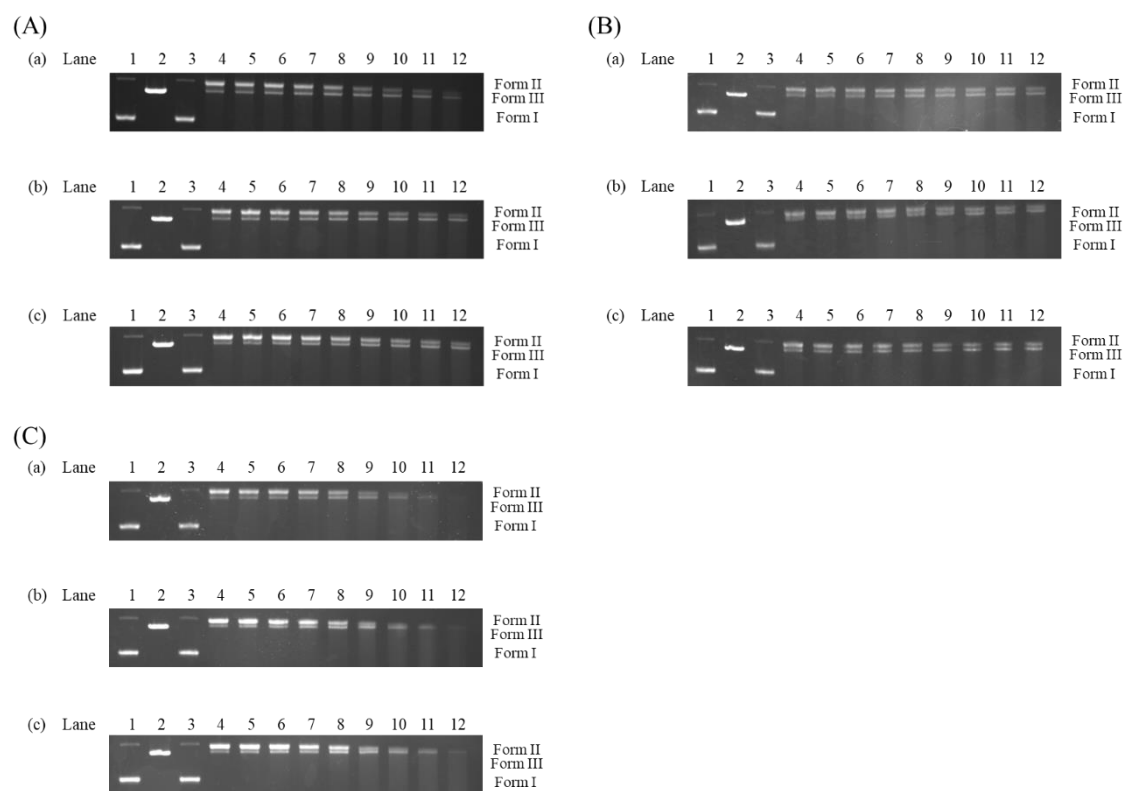


Figure S6-18. Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50 μ M bp) in the presence of (A) **7b** and (B) **10b**, and (C) **11b** (30 μ M), AscNa (150 μ M), and DMSO at pH 6.0, respectively. (a)–(c) corresponded to DMSO concentration of 1, 5, and 10 mM, respectively. Lane 1: DNA control; lane 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 S6-16. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 7b, 10b, and 11b (5 μ M) in the presence of AscNa (150 μ M) and DMSO at pH 6.0

Complex		7b			10b			11b		
DMSO (mM)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
1	0	92.2 \pm 0.5	7.8 \pm 0.5	-	92.4 \pm 0.3	7.6 \pm 0.3	-	92.6 \pm 0.7	7.4 \pm 0.7	-
	1	0.0 \pm 0.0	85.9 \pm 2.9	14.1 \pm 2.9	0.0 \pm 0.0	79.1 \pm 2.8	20.9 \pm 2.8	0.0 \pm 0.0	88.1 \pm 3.0	11.9 \pm 3.0
	2	0.0 \pm 0.0	85.2 \pm 3.6	18.3 \pm 3.6	0.0 \pm 0.0	73.4 \pm 1.8	26.6 \pm 1.8	0.0 \pm 0.0	83.7 \pm 2.4	16.3 \pm 2.4
	3	0.0 \pm 0.0	80.4 \pm 3.4	23.0 \pm 3.4	0.0 \pm 0.0	70.6 \pm 2.8	29.4 \pm 2.8	0.0 \pm 0.0	79.7 \pm 4.3	20.3 \pm 4.3
	5	0.0 \pm 0.0	75.0 \pm 4.8	30.2 \pm 4.8	0.0 \pm 0.0	64.1 \pm 3.4	35.9 \pm 3.4	0.0 \pm 0.0	71.9 \pm 2.6	28.1 \pm 2.6
	10	0.0 \pm 0.0	65.9 \pm 3.2	41.0 \pm 3.2	0.0 \pm 0.0	53.7 \pm 1.2	46.3 \pm 1.2	0.0 \pm 0.0	56.5 \pm 2.3	43.5 \pm 2.3
	20	0.0 \pm 0.0	51.1 \pm 4.6	48.9 \pm 4.6	0.0 \pm 0.0	48.7 \pm 3.1	51.3 \pm 3.1	0.0 \pm 0.0	39.5 \pm 1.1	60.5 \pm 1.1
	30	0.0 \pm 0.0	42.6 \pm 4.1	57.4 \pm 4.1	0.0 \pm 0.0	43.9 \pm 3.9	56.1 \pm 3.9	0.0 \pm 0.0	27.8 \pm 4.7	72.2 \pm 4.7
	40	0.0 \pm 0.0	36.1 \pm 3.3	63.9 \pm 3.3	0.0 \pm 0.0	40.8 \pm 3.0	59.2 \pm 3.0	n. d.*	n. d.*	n. d.*
	60	0.0 \pm 0.0	30.0 \pm 3.3	70.0 \pm 3.3	0.0 \pm 0.0	35.4 \pm 2.1	64.6 \pm 2.1	n. d.*	n. d.*	n. d.*
5	0	92.2 \pm 0.2	7.8 \pm 0.2	-	91.5 \pm 0.7	8.5 \pm 0.7	-	92.5 \pm 0.2	7.5 \pm 0.2	-
	1	0.0 \pm 0.0	83.7 \pm 1.2	16.3 \pm 1.2	0.0 \pm 0.0	75.9 \pm 0.9	24.1 \pm 0.9	0.0 \pm 0.0	83.9 \pm 2.1	16.1 \pm 2.1
	2	0.0 \pm 0.0	79.1 \pm 1.2	20.9 \pm 1.2	0.0 \pm 0.0	74.6 \pm 1.4	25.4 \pm 1.4	0.0 \pm 0.0	79.0 \pm 2.3	21.0 \pm 2.3
	3	0.0 \pm 0.0	76.2 \pm 0.1	23.8 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	71.9 \pm 1.8	28.1 \pm 1.8	0.0 \pm 0.0	75.8 \pm 1.4	24.2 \pm 1.4
	5	0.0 \pm 0.0	70.5 \pm 0.2	29.5 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	68.7 \pm 2.7	31.3 \pm 2.7	0.0 \pm 0.0	70.4 \pm 1.0	29.6 \pm 1.0
	10	0.0 \pm 0.0	63.2 \pm 0.7	36.8 \pm 0.7	0.0 \pm 0.0	62.3 \pm 2.6	37.7 \pm 2.6	0.0 \pm 0.0	56.8 \pm 2.1	43.2 \pm 2.1
	20	0.0 \pm 0.0	53.9 \pm 0.0	46.1 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	54.3 \pm 2.8	45.7 \pm 2.8	0.0 \pm 0.0	46.8 \pm 0.6	53.2 \pm 0.6
	30	0.0 \pm 0.0	47.7 \pm 0.2	52.3 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	50.7 \pm 1.6	49.3 \pm 1.6	0.0 \pm 0.0	34.0 \pm 4.7	66.0 \pm 4.7
	40	0.0 \pm 0.0	41.4 \pm 0.3	58.6 \pm 0.3	0.0 \pm 0.0	47.6 \pm 4.2	52.4 \pm 4.2	n. d.*	n. d.*	n. d.*
	60	0.0 \pm 0.0	35.3 \pm 3.7	64.7 \pm 3.7	0.0 \pm 0.0	36.8 \pm 4.1	63.2 \pm 4.1	n. d.*	n. d.*	n. d.*
10	0	92.2 \pm 0.5	7.8 \pm 0.5	-	91.6 \pm 0.2	8.4 \pm 0.2	-	92.3 \pm 0.3	7.7 \pm 0.3	-
	1	0.0 \pm 0.0	85.9 \pm 0.9	14.1 \pm 0.9	0.0 \pm 0.0	74.3 \pm 0.2	25.7 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	85.2 \pm 0.6	14.8 \pm 0.6
	2	0.0 \pm 0.0	81.3 \pm 0.9	18.7 \pm 0.9	0.0 \pm 0.0	71.0 \pm 0.3	29.0 \pm 0.3	0.0 \pm 0.0	79.8 \pm 1.0	20.2 \pm 1.0
	3	0.0 \pm 0.0	78.4 \pm 0.6	21.6 \pm 0.6	0.0 \pm 0.0	67.6 \pm 0.3	32.4 \pm 0.3	0.0 \pm 0.0	77.2 \pm 2.1	22.8 \pm 2.1
	5	0.0 \pm 0.0	73.9 \pm 1.7	26.1 \pm 1.7	0.0 \pm 0.0	64.1 \pm 0.0	35.9 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	72.9 \pm 0.6	27.1 \pm 0.6
	10	0.0 \pm 0.0	68.2 \pm 2.0	31.8 \pm 2.0	0.0 \pm 0.0	57.7 \pm 0.5	42.3 \pm 0.5	0.0 \pm 0.0	63.6 \pm 1.7	36.4 \pm 1.7
	20	0.0 \pm 0.0	58.1 \pm 1.0	41.9 \pm 1.0	0.0 \pm 0.0	51.7 \pm 1.4	48.3 \pm 1.4	0.0 \pm 0.0	48.3 \pm 1.7	51.7 \pm 1.7
	30	0.0 \pm 0.0	52.8 \pm 2.2	47.2 \pm 2.2	0.0 \pm 0.0	47.8 \pm 1.8	52.2 \pm 1.8	0.0 \pm 0.0	40.5 \pm 1.2	59.5 \pm 1.2
	40	0.0 \pm 0.0	48.2 \pm 1.6	51.8 \pm 1.6	0.0 \pm 0.0	45.5 \pm 1.9	54.5 \pm 1.9	0.0 \pm 0.0	34.0 \pm 0.4	66.0 \pm 0.4
	60	0.0 \pm 0.0	41.5 \pm 1.1	58.5 \pm 1.1	0.0 \pm 0.0	41.8 \pm 2.2	58.2 \pm 2.2	n. d.*	n. d.*	n. d.*

*n. d. means cannot determine.

第七章：総括

本論文では、副作用の少ない抗がん剤の開発を目的とし、正常細胞と異なるがん細胞の特異な生存環境で細胞毒性を示す二核銅(II)錯体の開発を目指した。特に、新規二核銅(II)錯体の構造と抗がん活性の相関性の探求は、がん細胞選択的に抗がん活性を示す抗がん剤の設計・開発を行う上で非常に重要である。以下に、各章で得られた知見をまとめるとともに、今後の展望について述べ、本論文の総括とする。

第二章では、*p*-cresol の 2,6 位に methylene-tether で環状アミンを導入した 3 つの配位子 Hbcmp, HMe₄bcmp, Hbcc 及びその二核銅(II)錯体 **1a**, **1b**, **2**, **3** を合成し、これらの錯体の DNA の加水分解的切断活性の pH 依存性を詳細に調べた。最初に、これらの構造を様々な分光学的測定及び単結晶 X 線構造解析によって明らかにした。また、**1a** が、がん細胞の特異環境の 1 つである弱酸性 pH 領域において高い加水分解活性を示すことを見出した。**1a** を用いて、オリゴ DNA との結合定数を ITC 測定によって測定した結果、DNA への結合はエントロピー及びエンタルピー的に有利であり、また **1a** の DNA 結合能は pH 5–6 においてプロトン化が起こることによってわずかに向上することが明らかになった。**1a** の加水分解的 DNA 切断活性を測定したところ、pH 5–6 の弱酸性 pH 領域においてスーパーコイルドプラスミド pUC19 DNA (Form I) を DNA Form II に切断する反応を加速することが見出された。DNA 切断活性についての **1a** と **2**, **3** の比較により μ -OH 架橋を持つ **1a** の活性が高いこと及び配位子の NH 基をメチル化した **2** が不活性であることから、 μ -OH 架橋が求核剤として DNA 切断を加速し、NH 基がこの反応に必要な不可欠であることが明らかになった。これらの実験事実から、**1a** の加水分解的 DNA 切断機構を推定した。本研究は、合成された金属錯体による加水分解的 DNA 切断が pH 依存的に加速された初めての例である。

第三章では、*p*-cresol の 2,6 位に amide-tether で環状アミンを導入した新規配位子 Hbcamide 及びその二核銅(II)錯体 [Cu₂(μ -OH)(bcamide)](ClO₄)₂ (**4**) を合成し、**4** を用いた過酸化水素存在下による酸化的 DNA 切断活性を詳細に調べた。最初に、単結晶 X 線構造解析を行い、アミド窒素が銅(II)に配位しておらず、このために二核銅が μ -OH で架橋されていることを明らかにした。**4** を用いた過酸化水素存在下による酸化的 DNA 切断活性を評価したところ、pH 6.0–8.2 の条件下でスーパーコイルドプラスミド pUC19 DNA (Form I) の酸化的切断を促進し、nicked DNA (Form II), linear DNA (Form III) に変換することを見出した。この DNA 切断活性は、対応する methylene-tether 錯体 **3** と比較して、高い活性を示した。**4** と過酸化水素との反応を様々な分光学的測定によって追跡したところ、**4** は過酸化水素と反応して μ -1,1-hydroperoxo species (**5**) を生成し、これが酸化的 DNA 切断の直接的な活性種であることを見出した。がん細胞の HeLa 細胞に対する細胞毒性

を MTT assay によって評価した結果, **4** は **3** と比較して約 1.6 倍高い細胞毒性を示すことが明らかになった. これらのことから, ペンダント基を amide-tether で導入した配位子の二核銅錯体が抗がん剤の開発に新たな知見を与える可能性が示された.

第四章では, *p*-cresol の 2,6 位に amide-tether で di(2-pyridylmethyl)amine (dpa) 三座配位子を持つ新規配位子 HL1^{4-H} 及びその二核銅(II)錯体 [Cu₂(μ-OH₂)(μ-1,3-OAc)(L1^{4-H})](ClO₄)₂ (**6**), [Cu₂(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L1^{4-H})]X [X = ClO₄ (**7a**) and OAc (**7b**)] を合成した. これらの錯体を用いた過酸化水素による酸化的 DNA 切断活性を詳細に調べた. 最初に, 様々な分光学的測定及び単結晶 X 線構造解析によって錯体の構造を決定した. **7b** の過酸化水素存在下における酸化的 DNA 切断活性を評価した結果, 中性付近の pH で過酸化水素を活性化してスーパーコイルドプラスミド pUC19 DNA の酸化切断を大きく加速した. またこの錯体は, がん細胞に対して高い細胞毒性を示すことを見出した. これらの活性は, ペンダント基に環状アミンを持つ **4** や methylene-tether で dpa を導入した配位子 Hbpmp の二核銅(II)錯体 **8** と比較して高活性であった. また, **7b** の細胞毒性は配位子 HL1^{4-H} の細胞毒性よりも高いため, **7b** の構造が細胞内で保持されていることが示唆された. **7b** の作用機構を調べるため, HL1^{4-H} に化学結合で Bodipy を導入した配位子 HL2^{4-H} を合成した. その二核銅錯体 [Cu₂(μ-OAc)₂(L2^{4-H})](OAc) (**9**) を合成し, その細胞内挙動を共焦点顕微鏡で観察して細胞内挙動を可視化した. その結果, **9** は核小体やミトコンドリアに局在することが明らかになった. さらに **7b** は, comet assay の結果より核 DNA を切断していないことが確認され, フローサイトメトリーの結果からは HeLa 細胞をアポトーシスで細胞死に誘導することが明らかになった. 以上の結果より, **7b** は細胞内で核小体やミトコンドリアに局在し, それぞれの RNA や DNA を切断してアポトーシスを誘導したと考えられる. さらに, **7b** はがん細胞選択的に細胞死を導くことを見出された. 本章の研究では, *p*-cresol の 2,6 位のペンダント基を変化させることで過酸化水素活性化能力を調節でき, 高い細胞毒性を発現できることを明らかにした.

第五章では, HL1^{4-H} の側鎖ピリジル基の 4 位に電子供与基として OMe 基を, 電子求引基として Cl 基を導入した新規二核化配位子 HL1^{4-X} [X = OMe and Cl] とその二核銅(II)錯体 [Cu₂(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L1^{4-OMe})]X [X = PF₆ (**10a**) and OAc (**10b**)] 及び [Cu₂(μ-1,3-OAc)₂(L1^{4-Cl})]X [X = ClO₄ (**11a**) and OAc (**11b**)] を合成し, その細胞毒性を詳細に調べた. 最初に, 様々な分光学的測定及び単結晶 X 線構造解析から錯体の構造を決定した. **10b** と **11b** の HeLa 細胞に対する細胞毒性を MTT assay によって評価したところ, **7b** と比較してそれぞれ約 7 倍と 5 倍高い細胞毒性を示した. また, ヒトの肺及び脾臓の細胞を用いた細胞毒性では, 電子供与性である MeO 基を持つ **10b** は, 比較的高いがん細胞選択的細胞毒性を示すことを見出された. これらの錯体の細胞内挙動を可視化するため, HL1^{4-OMe} と HL1^{4-Cl} を Bodipy で修飾した配位子を合成し, その二核銅錯体 **12** と **13** を得

た. 共焦点顕微鏡を用いてこれらの錯体の細胞内挙動を観察した. その結果, **12** や **13** は **9** とは異なり, 核やミトコンドリアではなくゴルジ体や小胞体に局在することが明らかになった. Comet assay を行った結果, **10b** と **11b** は核 DNA を切断していないことが確認された. 以上の結果より, **10b** と **11b** はゴルジ体や小胞体のストレス応答を引き起こすことにより細胞死を誘導したと考えられる. 本章の研究では, HL1^{4H} のペンダントピリジル基に置換基を導入して細胞内動態を変化させることができるという知見を得た.

第六章では, 第五章の研究で合成した二核銅(II)錯体 **7b**, **10b**, **11b** を用いて, 過酸化水素による, 及び, 還元剤としてアスコルビン酸ナトリウム(AscNa)を加えた空気下における DNA 切断活性を詳細に調べた. 過酸化水素による DNA 切断は, 電子求引基を持つ **11b** が最も高い活性を示し, 電子供与基を持つ **10b** では活性は低下した. これは, 錯体と過酸化水素の反応で生じる酸化活性種の反応性が置換基の電子効果により変化したためと考えられる. また, AscNa を添加した空気下における DNA 切断では, 過酸化水素を酸化剤とする反応よりもはるかに高い活性を示すことが見出され, 電子供与基を持つ **10b** が最も高い活性を示し, 電子求引基を持つ **11b** の活性が低下することが明らかになった. さらに, **10b**, **11b** は関連する methylene-tether 錯体 **8** やこれまでに高活性であると報告されていた N4Py 配位子の単核鉄(II)錯体[Fe(N4Py)(MeCN)](ClO₄)₂ (**14**)と比較してもはるかに高い活性を示すことが見出された.

以上, 本論文では, がん細胞選択的に抗がん活性を示す抗がん剤の開発を目指し, *p*-cresol から誘導される様々な二核銅(II)錯体が有する DNA 切断活性及び細胞毒性について詳細に検討した. 本論文では, *p*-cresol の 2,6 位に様々なペンダント基を methylene-tether または amide-tether で導入することで DNA 切断活性や細胞毒性の調節を可能にする知見を得た. この知見は, がん細胞の特異環境をターゲットにした新規抗がん剤の開発に対して大変意義深いものであり, 重要な指針になるであろう.

謝辞

本研究の遂行及び本論文の執筆するにあたり、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 教授ならびに東 信行 教授に心より感謝申し上げます。

共鳴ラマンスペクトル測定に際しましては、快く引き受けてくださいました兵庫県立大学 久保 稔 教授、柳澤 幸子 准教授に心より感謝申し上げます。等温滴定型熱量測定に際しましては、快く引き受けてください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。単結晶 X 線構造解析において有益な御助言を賜りました株式会社リガク 佐藤 寛泰 氏に厚く御礼申し上げます。本研究を進めるにあたり、学会等で有益な御助言を賜りました同志社女子大学 薬学部 根木 滋 准教授に厚く御礼申し上げます。

学部、修士の時分に対し、研究指針を指導していただいた 麻生 健太 氏、福井 克樹 氏をはじめとする諸先輩方に心より感謝申し上げます。学部から博士前期課程を通じて切磋琢磨し合った同輩であり分子生命化学研究室卒業生 鉢形 真也 氏、岸本 竜弥 氏、小池 巧真 氏、黒木 康平 氏、坂井 僚介 氏、佐野 綾菜 氏、Zaoputra Antonius Andre 氏に深く感謝申し上げます。また、博士後期課程の3年間という時間を共有し、支えてくれた物理化学研究室 藤井 香里 氏、機能有機化学研究室 毛 斉悦 氏に心より厚く感謝申し上げます。同じ DNA 班の後輩として最後までついてきてくれた分子生命化学研究室卒業生 齋藤 樹 氏、廣畑 敦洋 氏、宮野 梨沙 氏、前川 雄哉 氏に心より感謝申し上げます。また、博士後期課程の時分に対し、様々な錯体の合成及び単結晶の精製、さらには細胞実験の立ち上げに尽力してくれた 畑 真知 氏、困難な新規錯体合成から細胞内可視化実験に尽力してくれた 田中 芳樹 氏、新規錯体合成に取り組むとともに DNA 班全体の電気化学測定を行ってくれた 高松 泰司 氏、天然物を導入した新規錯体合成から DNA 切断、細胞実験を通して様々な知見を与えてくれた 長尾 美佳 氏に心より厚く御礼申し上げます。高度な要求に対しても諦めることなく真剣に取り組んでくれたことを誇りに思います。

最後になりましたが、常に第一の理解者であり、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
角谷 優樹