



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬学）
報告番号	乙 第1850号
学位記番号	論 第 191 号
氏 名	家田 直弥
授与年月日	平成 26年 12月 24日
学位論文の題名	光制御可能なONOO ⁻ - およびNO発生剤の開発
論文審査担当者	主査： 樋口 恒彦 副査： 中川 秀彦, 中村 精一, 田中 正彦

名古屋市立大学学位論文

光制御可能な ONOO^- および NO 放出化合物の開発

名古屋市立大学大学院薬学研究科
薬化学分野（指導：中川秀彦教授）
家田 直弥

1. 本論文は、2014年10月、名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 中川 秀彦 教授
副査 樋口 恒彦 教授
 中村 精一 教授
 田中 正彦 准教授

2. 本論文は、学術雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

(i). Naoya Ieda, Hidehiko Nakagawa, Taeko Horinouchi, Tao Peng, Dan Yang, Hiroki Tsumoto, Takayoshi Suzuki, Kiyoshi Fukuhara, and Naoki Miyata

Peroxynitrite Generation from NO-releasing Nitrobenzene Derivative in Response to Photoirradiation

Chem. Commun. **2011**, 47, 6449–6451.

(ii). Naoya Ieda, Hidehiko Nakagawa, Tao Peng, Dan Yang, Takayoshi Suzuki, and Naoki Miyata

Photocontrollable Peroxynitrite Generator Based on *N*-Methyl-*N*-nitroso-aminophenol for Cellular Application

J. Am. Chem. Soc. **2012**, 134, 2563–2568.

(iii). Naoya Ieda, Yuji Hotta, Naoki Miyata, Kazunori Kimura, and Hidehiko Nakagawa

Photomanipulation of Vasodilation with a Blue-Light-Controllable Nitric Oxide Releaser

J. Am. Chem. Soc. **2014**, 136, 7085–7091.

3. 本論文の基礎となる研究は、中川秀彦 教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科で行われた。

目次

第1章 緒言	1
第2章 NO と ONOO ⁻	6
2-1 NO (nitric oxide) と ONOO ⁻ (peroxynitrite) の研究の発展	6
2-2 NO について	7
2-2-1 NO の物理学的・化学的性質	
2-2-2 生体内での NO の反応	
2-2-3 生体内での NO の発生	
2-2-4 NO の生理活性	
2-2-5 NO の毒性	
2-3 ONOO ⁻ について	12
2-3-1 生体内での ONOO ⁻ の形成について	
2-3-2 ONOO ⁻ の物理学的・化学的性質	
2-3-3 ONOO ⁻ の自発的な分解	
2-3-4 ONOO ⁻ 、ONOOH の反応	
2-3-5 ONOO ⁻ による生理機能障害	
2-3-6 ONOO ⁻ による細胞保護作用	
2-4 NO と ONOO ⁻ の研究のためのケミカルツール	20
2-4-1 NO の研究のためのケミカルツール	
2-4-1-1 NO ドナー	
2-4-1-2 NO のイメージングプローブ	
2-4-2 ONOO ⁻ の研究のためのケミカルツール	
2-4-2-1 ONOO ⁻ 消去剤	
2-4-2-2 ONOO ⁻ 検出蛍光プローブ	
2-4-2-3 ONOO ⁻ ドナー	
2-5 研究目的	27

第3章 光制御可能な ONOO⁻および NO ドナーの開発28

3-1 2,6-Dimethylnitrobenzene 構造を有する光制御型 ONOO⁻ドナーの開発28

- 3-1-1 分子設計
- 3-1-2 化合物 112–117 の合成
- 3-1-3 化合物 112–117 の吸光スペクトルの測定
- 3-1-4 ESR スピントラッピング法を用いた NO 放出の確認
- 3-1-5 化合物 112–117 の光分解率の測定
- 3-1-6 蛍光プローブを用いた ONOO⁻の検出
- 3-1-7 Stilbenequinone 誘導体 121 の合成
- 3-1-8 HPLC による光分解物 121 の検出
- 3-1-9 考察

3-2 *N*-Nitrosoaniline 構造を有する光制御型 ONOO⁻ドナーの開発39

- 3-2-1 分子設計
- 3-2-2 化合物 129–132 の合成
- 3-2-3 化合物 129–132 の吸光スペクトルの測定
- 3-2-4 ESR スピントラッピング法を用いた NO 放出の確認
- 3-2-5 蛍光プローブを用いた ONOO⁻の検出
- 3-2-6 O₂⁻の影響の検討
- 3-2-7 自発分解型 ONOO⁻ドナー SIN-1 との比較
- 3-2-8 チロシン誘導体のニトロ化反応の検討
- 3-2-9 **P-NAP** の反応量子収率の測定
- 3-2-10 DNA 切断能の検討
- 3-2-11 細胞内での ONOO⁻放出の制御
- 3-2-12 考察・結論

3-3 光誘起電子移動反応に基づく可視光制御型 NO ドナーの開発53

- 3-3-1 光誘起電子移動反応について
- 3-3-2 分子設計
- 3-3-3 **NOBL-1**、化合物 154 の合成
- 3-3-4 吸光スペクトルと蛍光スペクトルの測定
- 3-3-5 ESR スピントラッピング法を用いた NO 放出確認の検討
- 3-3-6 NO 放出量の定量
- 3-3-7 NO 放出の時間制御

- 3-3-8 細胞内での NO 放出の空間制御
- 3-3-9 NOBL-1 を用いた血管弛緩の制御
- 3-3-10 NOBL-1 の光分解物の確認
- 3-3-11 NOBL-1 の分解量子収率の測定
- 3-3-12 NOBL-1 の細胞内局在の確認
- 3-3-13 考察・結論

第4章 結語.....69

第5章 実験の部.....70

参考文献

謝辞

本文中以下の用語及び試薬は、下記のように略記した。

Ac	acetyl
Akt	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
Anal	combustion elemental analysis
aq	aqueous
ATP	adenosine 5'-triphosphate
BH ₄	tetrahydrobiopterin
Bn	benzyl
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
BODIPY	dipyrrromethene boron difluoride
br	broad (spectral)
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -butyl
°C	degrees Celsius
calcd	calculated
cat	catalytic
cm	centimeter
concd	concentrated
Cp	cyclopentadienyl
Cys	cysteine
δ	chemical shift in parts per million downfield from tetramethylsilane
d	doublet
dba	dibenzylideneacetone
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano- <i>p</i> -benzoquinone
DIPEA	diisopropylethylamine
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacetamide
DMAP	<i>N,N</i> -dimethyl-4-aminopyridine
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
D-PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DPPA	diphenylphosphoryl azide
DTC	dithiocarbamate
EDCI	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
EDG	electron donating group
EDRF	endothelium derived relaxing factor

EI	electron impact
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
equiv	equivalent
ESI	electrospray ionization
ESR	electron spin resonance
ESRI	electron spin resonance imaging
Et	ethyl
FA	formic acid
FAB	fast atom bombardment
FBS	fetal bovine serum
FeTMPyP	Fe(III) tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin pentachloride
FMNH ₂	flavin mononucleotide
g	gram(s)
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GHz	gigahertz
GTP	guanosine 5'-triphosphate
h	hour(s)
His	histidine
HOMO	highly occupied molecular orbital
HPLC	high performance liquid chromatography
iNOS	inducible nitric oxide synthase
<i>J</i>	coupling constant (in NMR spectrometry)
k	kilo
L	liter
L-NAME	L-nitroarginine methyl ester
μ	micro
M	molar (moles per liter)
m	multiplet (spectral); meter; milli
MHz	megahertz
<i>m/z</i>	mass-to-charge ratio
MAPK	mitogen-activated protein kinase
max	maximum
Me	methyl
Met	methionine
MGD	<i>N</i> -methyl-D-glucamine dithiocarbamate
MHz	megahertz
min	minute(s)
MMP	matrix metalloproteinase

MOM	methoxymethyl
mp	melting point
MRI	magnetic resonance imaging
MS	mass spectrometry
N	normality
NADH	dihyronicotine adenine dinucleotide
NADPH	dihyronicotine adenine dinucleotide phosphate
NANC	non-adrenergic, non-cholinergic
NF-kB	nuclear factor-kappa B
NMR	nuclear magnetic resonance
nNOS	neuronal nitric oxide synthase
NOC7	1-hydroxy-2-oxo-3-(<i>N</i> -methyl-3-aminopropyl)-3-methyl-1-triazene
NOS	nitric oxide synthase
Nu	nucleophile
ODQ	1 <i>H</i> -1,2,4-oxadiazolo[4,3- <i>a</i>]quinoxalin-1-one
PARP	poly ADP ribose polymerase
PeT	photoinduced electron transfer
Ph	phenyl
PKC	protein kinase C
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor γ
ppm	part(s) per million
<i>i</i> -Pr	isopropyl
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10
q	quartet
quant	quantitative
rt	room temperature
s	singlet
sat	saturated
sept	septet
SERCA	sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase
sGC	soluble guanylate cyclase
SOD	superoxide dismutase
SOMO	single-occupied molecular orbital
Src	proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
t	triplet
TBAI	tetrabutylammonium iodide
TBE	tris(hydroxymethyl)aminomethane-borate-ethylenediaminetetraacetate
TFA	trifluoroacetic acid

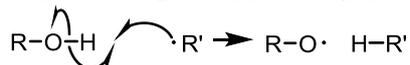
THF	tetrahydrofuran
Trp	tryptophan
Tyr	tyrosine
UV	ultraviolet
XO	xanthine oxidase

本論文におけるラジカル反応の表記について

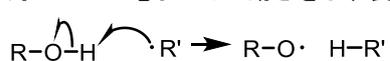
本論文ではラジカル反応を示す際、矢印が込み合い、見えにくくなることを避けるために、ウォーレン有機化学 下（第1版、東京化学同人）の1054ページを参考に、電子対のうち1電子のみの動きを示す表記法を採用した。

水素の引き抜き

電子対の二つの電子の動きを示す表記



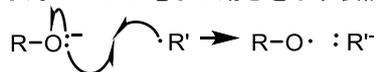
電子対の一つの電子のみの動きを示す表記



← 本論文で採用した表記

電子対からの一電子の引き抜き

電子対の二つの電子の動きを示す表記



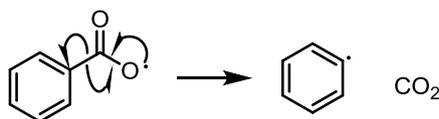
電子対の一つの電子のみの動きを示す表記



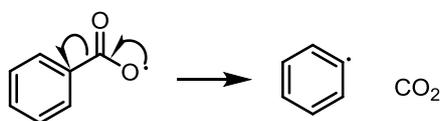
← 本論文で採用した表記

ラジカル脱離

電子対の二つの電子の動きを示す表記



電子対の一つの電子のみの動きを示す表記



← 本論文で採用した表記

ラジカル開裂

電子対の二つの電子の動きを示す表記



電子対の一つの電子のみの動きを示す表記



← 本文で採用した表記

第1章 緒言

一酸化窒素 (nitric oxide: NO) は、生体内でアルギニンから一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase: NOS) によって生合成され、血管拡張や神経伝達、免疫系制御など様々な生理機能に関与している。また、NO は酸化酵素系等から生じる O_2^- と反応し、ONOO⁻ (peroxynitrite) になる。ONOO⁻ は強力な酸化活性を有し、様々な成分をニトロ化することが知られている。いくつかの病態モデルや疾患サンプルからニトロ化された生体分子が検出されていることから、病態の進行に関与していると考えられているが、近年では生体の恒常性維持に必要なイベントに関与しているとの報告もあり、ONOO⁻ は単なる毒性因子ではなく、精密に制御されたシグナル伝達因子としての可能性も示唆されている。

NO や ONOO⁻ は反応性が高いために生体内半減期が数秒であり、非常に取り扱いが難しい活性種である。このため、その生物学的試験においては、これらを貯蔵・放出することのできる供与化合物 (ドナー) が汎用されてきた。ドナーの中でも、光制御型ドナーは光によって放出の時空間制御が可能であり、任意の時空間で放出制御を行うことができる。そこで私は、光制御型 NO もしくは ONOO⁻ ドナーはこれらの生理活性を精査するための研究試薬としてだけでなく、その活性を利用した新たな化学療法剤の候補化合物になりうるのではないかと考え、開発を行った。

生物試験などで ONOO⁻ を投与する方法としては、ONOO⁻ のアルカリ性水溶液を用いる方法や、自発分解型 ONOO⁻ ドナーである SIN-1 を用いる方法があるが、光制御型 ONOO⁻ ドナーはこれまで開発されていなかった。私は、光制御型 NO ドナーの構造である 2,6-dimethylnitrobenzene 構造に着目し、この構造を含み NO と同時に O_2^- も発生しうるような化合物 DiP-DNB を設計・合成した。この化合物が紫外光照射によって ONOO⁻ を放出することを ONOO⁻ の蛍光プローブである HKGreen-3 を用いて確認し、世界初の光制御 ONOO⁻ ドナーである DiP-DNB を開発することに成功した。また、DiP-DNB の反応機構を基に、N-nitrosoaminophenol 構造を有する、細胞系にも適用可能な光制御型 ONOO⁻ ドナーである P-NAP を開発することに成功した。

NO は血管内皮由来弛緩因子であることが報告されて以降、非常に多くの研究が行われてきた活性種であり、これまで光制御型 NO ドナーも多く開発されてきた。このように光で制御する生理活性分子を用いる場合、その制御光としては生体透過性が高く、毒性の低い可視-近赤外光を用いることが望まれる。可視-近赤外光で制御可能な NO ドナーはいくつか開発されているが、遷移金属錯体を含むものや、高価な光源であるパルスレーザーを用いなければならないなどの問題があった。そこで私は、色素の光誘起電子移動反応に着目し、単純な可視光源で制御可能な NO ドナーである NOBL-1 を設計・合成した。この化合物は 500 nm 付近の青色光照射によって NO の放出を制御可能であり、NOBL-1 を用いて青色光で NO の特徴的な反応の一つである血管弛緩作用を制御することに成功した。

これらの化合物は、ONOO⁻ や NO の生理活性を精査するためのツールとして有用であるだけでなく、その活性を応用した新たな光線力学療法剤としての可能性が期待される。

なお、本研究内容について以下の学術雑誌、学会にて発表し、特許出願を行った。

誌上发表

1. Naoya Ieda, Hidehiko Nakagawa, Taeko Horinouchi, Tao Peng, Dan Yang, Hiroki Tsumoto, Takayoshi Suzuki, Kiyoshi Fukuhara, and Naoki Miyata
Peroxynitrite Generation from NO-releasing Nitrobenzene Derivative in Response to Photoirradiation
Chem. Commun. **2011**, 47, 6449–6451.
2. Naoya Ieda, Hidehiko Nakagawa, Tao Peng, Dan Yang, Takayoshi Suzuki, and Naoki Miyata
Photocontrollable Peroxynitrite Generator Based on *N*-Methyl-*N*-nitrosoaminophenol for Cellular Application
J. Am. Chem. Soc. **2012**, 134, 2563–2568.
3. Naoya Ieda, Yuji Hotta, Naoki Miyata, Kazunori Kimura, and Hidehiko Nakagawa
Photomanipulation of Vasodilation with a Blue-Light-Controllable Nitric Oxide Releaser
J. Am. Chem. Soc. **2014**, 136, 7085–7091.

学会発表

1. 家田直弥、中川秀彦、鈴木孝禎、福原潔、宮田直樹
「光作動性 NO ドナーにおける水酸基の影響」
日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26–28 日、京都、27P-am245（ポスター発表）
2. 家田直弥、中川秀彦、津元裕樹、鈴木孝禎、福原潔、宮田直樹
「2,6-Dimethylnitrobenzene 型 NO ドナーによる ROS の発生」
日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2009、2009 年 11 月 23 日、四日市、C-19（口頭発表）
3. 家田直弥、中川秀彦、津元裕樹、鈴木孝禎、福原潔、宮田直樹
「光応答性 NO ドナーからのヒドロキシルラジカルの発生」
創薬懇話会 2009 in 岐阜、2009 年 12 月 10–11 日、岐阜、P44（ポスター発表）
4. 家田直弥、中川秀彦、津元裕樹、鈴木孝禎、福原潔、宮田直樹
「光作動性 NO ドナーによる ROS 発生の検討」
日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28–30 日、岡山、29P-pm302（ポスター発表）
5. Naoya Ieda, Hidehiko Nakagawa, Hiroki Tsumoto, Takayoshi Suzuki, Kiyoshi Fukuhara, Naoki Miyata
「A photo-controllable releaser of hydroxyl radical-like species」
The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of

Nitric Oxide (NO2010), 2010. 6. 14–18, Kyoto, P16 (ポスター発表)

6. 家田直弥、中川秀彦、堀之内妙子、鈴木孝禎、福原潔、宮田直樹
「光制御型 hROS 供与化合物の開発」
第 63 回日本酸化ストレス学会学術集会、2010 年 6 月 24–25 日 (横浜) O-29 (口頭発表)
7. Naoya Ieda, Hidehiko Nakagawa, Taeko Horinouchi, Takayoshi Suzuki, Kiyoshi Fukuhara, Naoki Miyata
「Generation of highly reactive oxygen species from nitrobenzene derivative by photoirradiation」
Pacifichem2010, 2010. 12. 15–20, Honolulu, 1647 (ポスター発表)
8. 家田直弥、中川秀彦、鈴木孝禎、宮田直樹
「新規光応答性 hROS 供与化合物の合成と評価」
日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 28–31 日、静岡、31P-0333 (ポスター発表)
9. 家田直弥、中川秀彦、Tao Peng、Dan Yang、鈴木孝禎、宮田直樹
「N-Nitroso-4-aminophenol 構造を有する光応答性パーオキシナイトライト供与化合物の創製」
第 64 回日本酸化ストレス学会学術集会、2011 年 7 月 2–3 日、留寿都、P19 (ポスター発表)
※優秀演題賞受賞
10. 家田直弥、中川秀彦、Tao Peng、Dan Yang、津元裕樹、鈴木孝禎、福原潔、宮田直樹
「Nitrobenzene 構造を有する光応答性 ONOO⁻ドナーの創製」
第 44 回酸化反応討論会、2011 年 11 月 4–5 日、大阪、P-09 (ポスター発表)
11. Naoya Ieda, Hidehiko Nakagawa, Tao Peng, Dan Yang, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata
「Synthesis and Evaluation of A Novel Photo-controllable Peroxynitrite Generator」
8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, 2011, 11. 29–12. 2, Tokyo, 2P-226
(ポスター発表)
12. 家田直弥、中川秀彦、Tao Peng、Dan Yang、鈴木孝禎、宮田直樹
「N-Nitrosoaminophenol 構造を有する光制御型 ONOO⁻ドナーの合成と評価」
日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 28–31 日、札幌、31E11-pm04S (口頭発表)
13. 家田直弥、中川秀彦、Tao Peng、Dan Yang、鈴木孝禎、宮田直樹
「生体応用を志向した光制御パーオキシナイトライト供与剤の開発と評価」

第 10 回次世代を担う有機化学シンポジウム、2012 年 5 月 11–12 日、大阪、2-10（口頭発表）

14. 家田直弥、中川秀彦、Tao Peng、Dan Yang、鈴木孝禎、宮田直樹
「細胞系で制御可能な光応答性 ONOO⁻ 供与剤の開発」
第 65 回日本酸化ストレス学会学術集会、2012 年 6 月 7–8 日、徳島、P56（ポスター発表）
15. Naoya Ieda, Hidehiko Nakagawa, Tao Peng, Dan yang, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata
「Development of photocontrollable peroxyinitrite generator based on *N*-methyl-*N*-nitrosoaminophenol」
SFRRI 2012: 16th Biennial Meeting, 2012. 9. 6–9, London, P1.32（ポスター発表）
16. 家田直弥、中川秀彦、Tao Peng、Dan Yang、鈴木孝禎、宮田直樹
「新規光応答型 ONOO⁻ ドナーの合成と細胞における放出制御」
第 45 回酸化反応討論会、2012 年 11 月 16–17 日、名古屋、P-04（ポスター発表）
17. 家田直弥、中川秀彦、Tao Peng、Dan Yang、鈴木孝禎、宮田直樹
「光制御可能なパーオキシナイトライト発生剤の開発」
第 29 回臨床フリーラジカル会議、2012 年 12 月 7–8 日、京都、若手 1（口頭発表）
18. 家田直弥、中川秀彦、Tao Peng、Dan Yang、宮田直樹
「細胞内で制御可能な光応答性 ONOO⁻ 発生剤の開発」
日本酸化ストレス学会東海支部 第 1 回学術集会、2013 年 2 月 9 日、名古屋、一般公演 2-08（口頭発表）
19. 家田直弥、中川秀彦、Tao Peng、Dan Yang、鈴木孝禎、宮田直樹
「光制御可能な ONOO⁻ 供与化合物の開発と DNA 切断能の確認」
日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 27–30 日、横浜、28amA-054（ポスター発表）
20. 家田直弥、中川秀彦、Tao Peng、Dan Yang、鈴木孝禎、宮田直樹
「光制御可能な ONOO⁻ 発生剤の開発とその機能評価」
第 66 回日本酸化ストレス学会学術集会、2013 年 6 月 13–14 日、名古屋、Y-4（口頭発表）
※学術奨励賞受賞
21. Naoya Ieda, Tao Peng, Dan Yang, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, Hidehiko Nakagawa
「Synthesis and evaluation of photo-controllable peroxyinitrite generators」
The 6th Joint Meeting of SFRRA+J, 2013. 9. 12–14, Sydney, S17（ポスター発表）

22. 家田直弥、鈴木孝禎、宮田直樹、中川秀彦
「可視光で制御可能な一酸化窒素発生剤の設計・合成と機能評価」
第 31 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2013 年 11 月 20–22 日、広島、2P-23
(ポスター発表)
23. Naoya Ieda, Naoki Miyata, Hidehiko Nakagawa
「Design and synthesis of a novel visible light controllable NO releaser applicable for living cells」
SFRR 2014, 2014. 3. 23–26, Kyoto, P200 (ポスター発表)
24. 家田直弥、堀田祐志、木村和哲、宮田直樹、中川秀彦
「N-Nitrosoaniline 構造を有する可視光制御可能な NO ドナーによる血管弛緩」
日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 27–30 日、熊本、28L-pm21 (口頭発表)

特許出願

1. 特願 2009-260470
中川秀彦、家田直弥、津元裕樹、鈴木孝禎、宮田直樹
「ニトロベンゼン誘導体、並びにそれを用いた高反応性 ROS 発生剤及び高反応性 ROS の発生方法」
出願日：2009 年 11 月 13 日
2. 特願 2011-040986
中川秀彦、家田直弥、鈴木孝禎、宮田直樹
「N-ニトロソアニリン誘導体、並びに、それを用いた高反応性 ROS 発生剤及び高反応性 ROS の発生方法」
出願日：2011 年 2 月 26 日
3. 特願 2013-234477
家田直弥、中川秀彦
「N-ニトロソアニリン誘導体、並びに、それを用いた NO 発生剤及び NO の発生方法」
出願日：2013 年 11 月 12 日

第2章 NO と ONOO⁻

2-1 NO (nitric oxide) と ONOO⁻ (peroxynitrite) について

一酸化窒素 (nitric oxide: NO, **1**) は窒素原子 (N) と酸素原子 (O) の一つずつからなるフリーラジカルであり、血管内皮由来弛緩因子 (endothelium derived relaxing factor: EDRF) であることが示されるまで、単なる環境汚染物質の一つと考えられていた (Fig. 2-1) ¹。しかし 1980 年代に NO はアルギニン (**2**) から NOS によって生合成され、可溶性グアニル酸シクラーゼ (soluble guanylate cyclase: sGC) を活性化させる EDRF の本態として働くことが報告されて ²以降、血管系のみならず、神経系 ³や免疫系 ⁴など生体内で広く作用するセカンドメッセンジャーとして、非常に多くの研究が行われてきた。そして 1992 年には、NO は *Science* 誌の molecule of the year⁵にも選ばれ、1998 年には NO のシグナル機能を解明したとして Murad、Furchgott、Ignarro がノーベル医学・生理学賞を受賞した。このように NO のようなガス状分子が体内で生合成され、重要なシグナル伝達分子として働いているという発見は驚きをもって迎えられ、その発見から 30 年近くたった現在でも多くの研究者によって研究が行われている。

そして、peroxynitrite (ONOO⁻, **3**) は、NO と superoxide (O₂⁻, **4**) が拡散律速 ($k = \sim 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) で反応して生じる ⁶、強力な酸化活性を有する活性窒素種 (reactive nitrogen species: RNS) の一種である。ONOO⁻は、100 年以上前からその存在は知られており、NO と同様に大気汚染の際に発生する窒素酸化物 (NO_x) の一つとみなされていた ¹。しかし、生体内で NO が生合成されていることが報告され、さらに 1990 年に生体内で O₂⁻との反応によって生じる可能性を示唆した報告 ⁷がされて以降、多くの研究者たちによってその興味深い反応性、生理活性について研究が行われてきた。

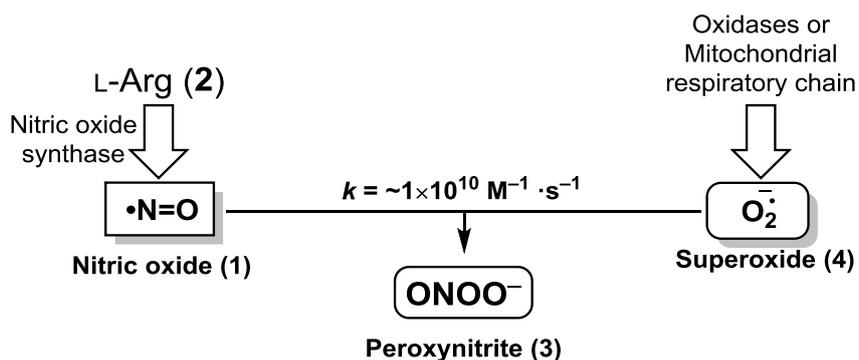


Fig. 2-1 生体内での主な NO と ONOO⁻の生成経路

NO と ONOO⁻はいずれも RNS であるが、それぞれの生体成分に対する反応性は全く異なるために、生体に与える影響も異なる。以下に NO と ONOO⁻の性質の概要を示す。

2-2 NOについて

2-2-1 NOの物理学的・化学的性質

NOの構造式は $\cdot\text{N}=\text{O}$ で表され、NとOの距離は 1.15 \AA である。沸点は $-164 \text{ }^\circ\text{C}$ であり、常温常圧では無色無臭の気体である。生体内における半減期は $1\text{--}5 \text{ s}$ であり、他のフリーラジカルと比べ、比較的長い半減期を持つ¹。極性が小さいために細胞膜を通過でき、その拡散係数はおよそ $1.0 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ほどと見積もられており⁸、ほぼ完全に分解されるまでに細胞1-2個分の距離を移動すると考えられている。また、NOはフリーラジカルであるため、他のフリーラジカルとラジカルカップリングを起こす。金属とも反応を起こしやすく、NOは π^* 軌道が金属原子からの逆供与を受けやすいため、遷移金属と反応して金属ニトロシル錯体 (metal-nitrosyl complex: $\text{M}-\text{NO}$) を形成する。

2-2-2 生体内でのNOの反応

①金属との反応

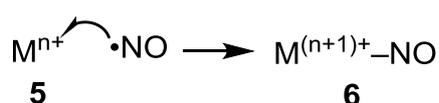


Fig. 2-2 NOと金属の反応

NOは金属イオン (M^{n+} , **5**) と反応して金属-ニトロシル錯体 ($\text{M}^{(n+1)+} - \text{NO}$, **6**) になる (Fig. 2-2)。NOのレセプターであるsGCはhemeを含むタンパク質であるが、このhemeがNOと反応して、hemeのニトロシル錯体になる ($k > 1.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ at $4 \text{ }^\circ\text{C}$)⁹。Hemeのニトロシル錯体が形成されると、hemeの軸配位子であるHis105の配位が外れ、酵素の構造が変化し、基質であるGTPの結合部位が広がるために活性が増大する¹⁰。

また、NOと反応する別の金属含有タンパク質として鉄硫黄タンパク質がある (Fig. 2-3)。大腸菌に存在するレドックス感受性転写促進因子であるSoxRは、そのレドックスセンサー部位として存在する2Fe-2Sクラスター**7**がNOによってニトロシル化されて**8**になり、活性化されることが報告されている¹¹。

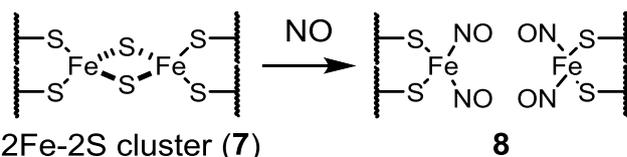


Fig. 2-3 2Fe-2SクラスターとNOの反応

また、NOと反応する別の金属含有タンパク質として鉄硫黄タンパク質がある (Fig. 2-3)。大腸菌に存在するレドックス感受性転写促進因子であるSoxRは、そのレドックスセンサー部位として存在する2Fe-2Sクラスター**7**がNOによってニトロシル化されて**8**になり、活性化されることが報告されている¹¹。

このようにNOと金属タンパク質が結合すると、タンパク質の機能・構造が変化し、生体機能に影響を与える。

このようにNOと金属タンパク質が結合すると、タンパク質の機能・構造が変化し、生体機能に影響を与える。

②O₂との反応

NOはフリーラジカルであるため、ビラジカルである $^3\text{O}_2$ と容易に反応して N_2O_4 (**9**) になり、これがホモリシスを起こして二酸化窒素 ($\cdot\text{NO}_2$, **10**) になる ($k = 3\text{--}12 \times 10^6 \text{ M}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) (Fig. 2-4)¹²。 $\cdot\text{NO}_2$ はさらにNOと反応して ^+NO 供与体である N_2O_3 (**11**) になり、生

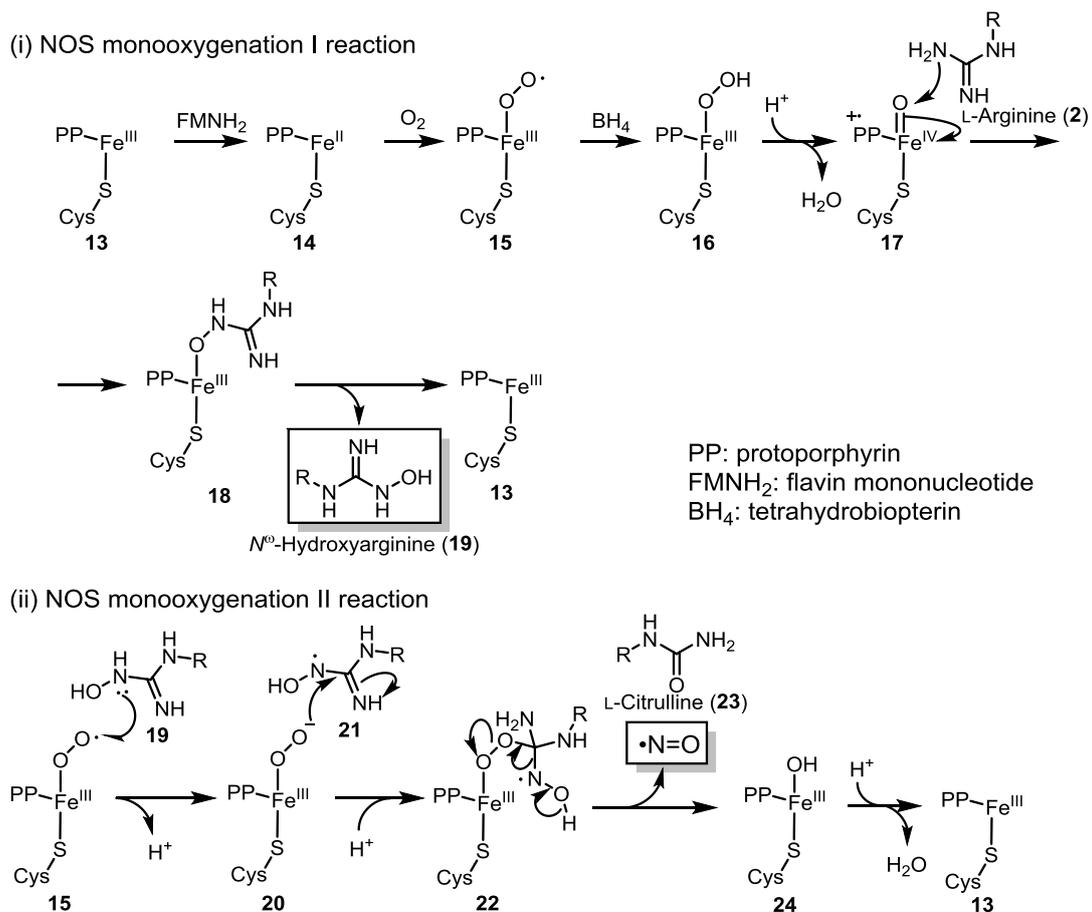


Fig. 2-5 NOS によるアルギニンからの NO 発生の予想される反応機構¹⁵

NOS の活性は様々な因子によって制御されている。eNOS と iNOS はカルモジュリン結合部位を有しており、カルモジュリンが結合すると、NADPH からフラビンドメインへの電子移動反応が加速されるために活性が上昇する。また、eNOS と iNOS の活性はリン酸化によっても上昇する^{16, 17}。iNOS にはカルモジュリンがすでに結合しており、その活性は主に遺伝子の発現レベルに依存すると考えられている¹⁸。

NOS の局在は、そのタンパク質の構造や翻訳後修飾などによって制御されている。eNOS は、N 末端のグリシンがミリスチル化、Cys15 と Cys26 のチオールがパルミトイル化を受けると血管内皮細胞のカベオラと呼ばれる細胞内小器官へ移動する¹⁹。血管内皮細胞で生合成された NO は血管平滑筋へ移動し、sGC を活性化させることにより血管弛緩を起こす。また、nNOS はシナプス後肥厚タンパク質の配列である PDZ ドメインを有しており、このためシナプスに集積する²⁰。iNOS は、マクロファージでは細胞質や小胞に存在しており、肝細胞ではペルオキシソームに局在することが確認されている^{21, 22}。

nNOS と eNOS は恒常的に発現しており、iNOS の発現はサイトカインなどの刺激によって誘導される。しかし、eNOS の発現レベルは運動によって平常時よりは上昇する、iNOS は神経、腎臓、肝臓、肺、結腸などで恒常的に発現しているとの報告もあり、一概に恒常型、誘導型という括りにとらわれない発現をしている場合もある²³。

また、NOS にはそれぞれのアイソフォームに細胞特異性があり、様々な細胞に存在している (Table 2-1)。

Table 2-1 NOS のそれぞれのアイソフォームが存在する細胞²³

nNOS		神経細胞、心筋細胞、腸管平滑筋、ケラチノサイト、緻密斑、好中球、骨格筋、尿細管上皮、血管平滑筋、肝細胞
iNOS	誘導型	マクロファージ、気道平滑筋、軟骨細胞、内皮細胞、肺繊維芽細胞、肥満細胞、好中球、骨格筋
	恒常型	気管内皮、結腸粘膜、皮質尿細管、神経、肝細胞、ケラチノサイト
eNOS		内皮細胞、気管支平滑筋、好酸球、鼻粘膜平滑筋、繊維芽細胞、腸管粘膜、肝細胞、リンパ球、好酸球

これらの NOS の働きにより、生体での NO の濃度は数 nM ほどに保たれている²⁴。

②S-ニトロソチオールからの発生

生体内の Cys は O₂ 存在下 NO によってニトロソ化されるが、生体内ではこの S-ニトロソチオールの S-N 結合がホモリシスを起こして NO を放出する²⁵。このため、S-ニトロソチオールは生体内で NO の貯蔵体として働いていると考えられている。

③NO₂⁻からの NO の発生

生体内の亜硝酸イオン (NO₂⁻) には、RNS が分解したもの、もしくは食物から摂取されたものが存在しているが、この NO₂⁻が NO の貯蔵体として存在しているとの報告がある (Fig. 2-6)²⁶。アルギニンを基質とした NOS による NO の生合成には O₂ が必要であるが、低酸素状態になると、O₂ の供給量が減少するため NO の生合成量が低下する。その際、NO 貯蔵体である NO₂⁻がヘムタンパク質であるグロビタンパク質によって還元され NO になる。グロビタンパク質 (25) に NO₂⁻が配位して 26 になり、26 の Fe^{II} から一電子移動が起きて 27 になる。27 から水酸化物イオンが脱離して 28 になり、これから NO が脱離して 29 になる。

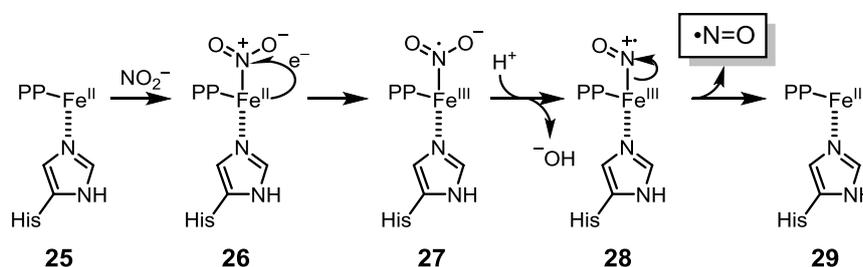


Fig. 2-6 Heme による NO₂⁻からの NO 発生の予想される反応機構

2-2-4 NO の生理活性

NO は非常に多くの生理作用が報告されているが、以下に主要なものを示す。

①血管拡張作用²⁷

血管内皮の eNOS から生じる NO は血管平滑筋の sGC を活性化させ、GTP から cGMP への変換を促進する。cGMP は平滑筋の Na⁺/Ca²⁺交換輸送体を活性化し、Ca²⁺の細胞外流出による過分極を促す。このため、血管平滑筋は弛緩し、血管が拡張する。

②血小板凝集阻害作用²⁸

血管内皮由来の NO によって sGC が活性化され、血小板の cGMP の産生が促進される。cGMP はプロテインキナーゼ G (PKG) を活性化し、トロンボキサン A₂ 受容体がリン酸化される。このため、トロンボキサン A₂ の結合が阻害され、血小板凝集が抑制される。

③中枢神経系におけるシグナル伝達²⁹

nNOS はシナプス後部に存在し、ここから発生した NO はシナプス前部の sGC を活性化して cGMP の産生が促進され、PKG が活性化される。これによりグルタミン酸の放出が促進され、グルタミン酸作動性神経が活性化される。

④末梢神経系における神経伝達物質³⁰

末梢神経系においては、アドレナリンやアセチルコリンが神経伝達物質として働くことが多いが、NO は末梢神経系において、非アドレナリン性-非コリン性 (non-adrenergic, non-cholinergic: NANC) 神経伝達物質として働くことが示されている。陰茎の末梢神経では、NO が nNOS から産生されて海綿体平滑筋の sGC を活性化し、血管を弛緩させる神経伝達物質として働く。

⑤マクロファージ、好中球などにおける異物分解

iNOS はマクロファージや好中球などにおいてサイトカイン刺激などによって発現し、NO を産生する。同時に NADPH oxidase の発現も増大するため O₂⁻の産生が増加し、NO と O₂⁻が反応して強力な酸化力を有する ONOO⁻が生じ、これによって異物が分解される³¹。また、NO は細菌などが有する鉄硫黄タンパク質の Fe-S クラスタを破壊することによっても、抗菌活性を示していると考えられている³²。

2-1-5 NO の毒性について

NO が sGC を活性化させるために必要な濃度は数 nM と低いが、μM オーダーまで濃度が上昇すると毒性を示すと考えられている。この場合、NO 自体が毒性を示すのではなく、NO が酸化されて生じる・NO₂ や、O₂⁻と反応して生じる ONOO⁻が毒性を示すと考えられている³³。

2-3 ONOO⁻について

2-3-1 生体内での ONOO⁻の形成について

前述したように、ONOO⁻は、NO と O₂⁻が拡散律速で反応して生じる⁶。NO と O₂⁻の反応以外の生成経路として、³NO⁻と³O₂の反応が示唆されている³⁴。これらも拡散律速 ($k = 4-9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) で反応して ONOO⁻を与えることが知られているが、NO⁻の共役酸である HNO の pKa がおよそ 11 と生理的条件下での pH よりも高いこと、より安定な電子スピンの¹HNO と、天然でより安定に存在している³O₂との反応性が低いことから、生体内でこの反応によって ONOO⁻が形成される可能性は低いと考えられる。

細胞内において NO よりも O₂⁻の半減期が短いことから (NO: 0.1–5 s, O₂⁻: 10⁻⁵ s)^{35,36}、ONOO⁻は主に O₂⁻が形成される場所 (NADPH oxidase がある細胞膜やミトコンドリアの呼吸鎖) で生じると考えられている。生体内で生じる ONOO⁻の発生速度は最大で 50–100 μM/min であると見積もられている³⁷が、その高い反応性のために、実際に維持されている濃度は数 nM であると考えられている³⁸。

また、ONOO⁻は半減期が 1 s 未満と短い、アニオントランスポーター band3 を介して膜透過する³⁹、またはリン脂質膜を速やかに透過する⁴⁰という報告もあり、実際には細胞内で生じた ONOO⁻は細胞二つ分の距離 (5–20 μm) は移動しうるのではないかと考えられている。

2-3-2 ONOO⁻の物理学的・化学的性質

ONOO⁻は直鎖状の分子であり、N–O の単結合のまわりに回転するため *cis* 体 (*cis*-ONOO⁻, **30**) と *trans* 体 (*trans*-ONOO⁻, **31**) が存在する (Fig. 2-7)。化学計算により、*cis* 体の方が *trans* 体より 3 kcal/mol 安定であると見積もられている。この *cis* 体の安定性は、ONOO⁻の HOMO における末端の酸素原子同士の軌道の相互作用の安定化効果によるものであると考えられている⁴¹。

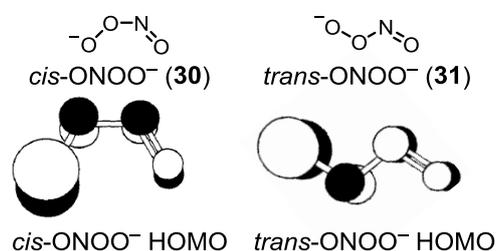


Fig. 2-7 ONOO⁻の *cis* 体と *trans* 体⁴¹

ONOO⁻はプロトン化されると ONOOH (peroxynitrous acid) となり反応性が大きく変化する。前述したように *cis*-ONOO⁻は安定化されているため、ONOOH の pKa は 6.8 と他の hydroperoxide と比べて低い値を示す。生体内の pH はおよそ 5.5–8 の間で変化するため、

ONOO⁻と ONOOH のいずれの反応も生体内で起こりうると考えられている。また、ONOOH にも *cis* 体 (*cis*-ONOOH, **32**)、*trans* 体 (*trans*-ONOOH, **33**) が存在するが、末端水素と末端酸素の水素結合により、*cis* 体の方が安定であると考えられている (Fig. 2-8) ⁴²。

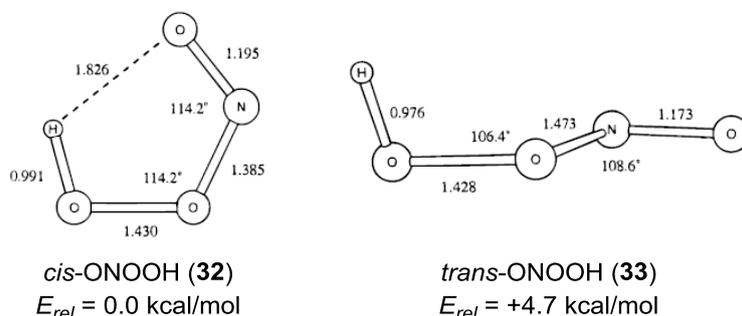


Fig. 2-8 ONOOH の *cis* 体と *trans* 体 ⁴²

ONOO⁻は pH>12 のアルカリ性水溶液中で安定であり、紫外可視吸収スペクトルで測定すると、302 nm に極大吸収を示す。ONOO⁻の 302 nm における吸収係数は $1670 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ であり、この値から ONOO⁻の濃度を算出することができる ⁴³。

また、ONOOH の酸化還元電位は $E_0' = 1.2 \text{ V}$ であり、 H_2O_2 ($E_0' = 0.94 \text{ V}$) と比べて強い酸化力を有する ⁴⁴。

2-3-3 ONOO⁻の自発的な分解

ONOO⁻は比較的安定であるが、ONOOH は容易に異性化反応を起こし、構造異性体である HNO_3 (nitric acid) になる (Fig. 2-9)。この異性化反応は、 $\cdot\text{NO}_2$ と $\cdot\text{OH}$ によって形成されるビラジカル中間体 **34**、**35** を経由して起こると考えられている ⁷。このラジカル中間体は、 $E_0' = 2.1 \text{ V}$ と、ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) ($E_0' = 2.3 \text{ V}$) に匹敵する強い酸化力を示す。pH 7.4、37 °C においてこの異性化反応の $k = 4.5 \text{ s}^{-1}$ であるため、ONOO⁻の生理的条件下での半減期は 1 s 未満である ⁴⁴。

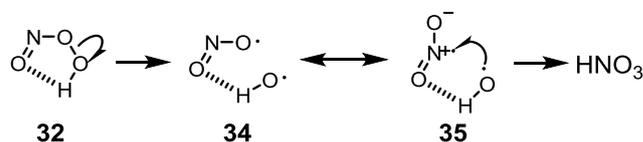


Fig. 2-9 ONOOH の異性化の想定される反応機構

2-3-4 ONOO⁻、ONOOH の反応

① 硫黄原子との反応

ONOOH は求電子性が高く、生体内のシステイン (Cys, **36**) やメチオニン (Met, **39**) など硫黄原子を有するアミノ酸残基と反応する。この反応によって Cys はスルフェン酸

(37) を経由してジスルフィド (38) に、Met (39) は 40 を経由してスルホキシド 41 になる (Fig. 2-10)。Cys における ONOOH のジスルフィド形成は、その酸化力の高さのため、同様の反応を起こす過酸化水素 (H₂O₂) よりも 10³ 倍速い^{45,46}。

また、ONOOH の異性化の過程で生じるビラジカル中間体 34、35 との反応により Cys からチールラジカルが生じる。これがラジカルカップリングを起こすことによってもジスルフィドを形成するが、34、35 の形成よりも ONOOH とチオールとの反応の方が速いため、チールラジカルの形成は不利であると考えられている。

生体においてチオールとジスルフィドの間の変換はタンパク質の機能制御に非常に重要であり、ONOO⁻はこの反応によって生理機能の制御を行っていると考えられている。

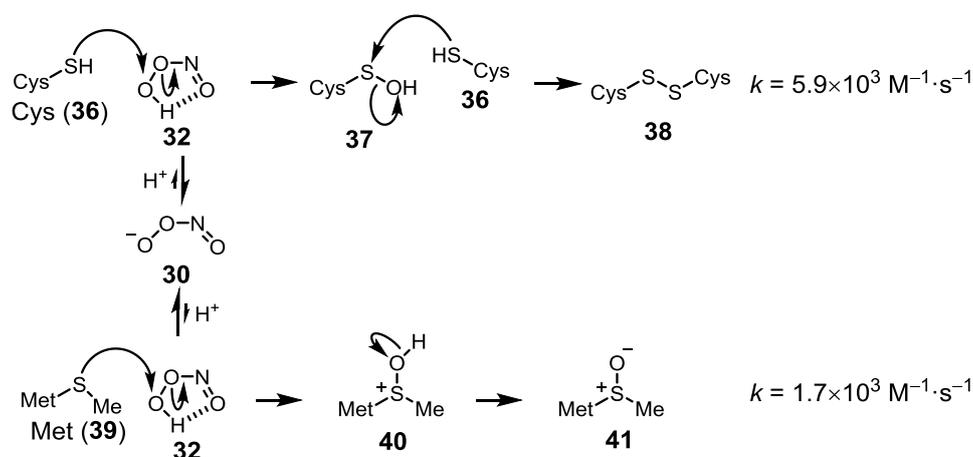


Fig. 2-10 Cys、Met と ONOO⁻との反応

②生体成分のニトロ化

ONOOH の異性化の過程で生じるラジカル中間体は、強力な一電子酸化剤である・OH とニトロ化剤である・NO₂ のペアであるため、Fig. 2-11 に示すようにチロシン (Tyr, 42) の水酸基のオルト位をニトロ化し、ニトロチロシン (nitro-Tyr, 44) にする⁴⁷。この過程ではフェノキシラジカル (Tyr-O[•], 43) が生じるが、ラジカルがフェノールのオルト位に転位し、これらがホモカップリングを起こすとジチロシン (di-Tyr, 45) になる⁴⁸。タンパク質中のチロシン残基がニトロ化されると、Tyr のリン酸化の抑制、タンパク質の三次構造の変化によって機能が変化する。Tyr 以外にも、トリプトファン (Trp)⁴⁹、不飽和脂肪酸⁵⁰、グアノシン三リン酸 (guanosine 5'-triphosphate: GTP)^{51,52} などがニトロ化されることが知られている。実際にこれらのニトロ化された成分が検出されており、生体内で何らかの機能を発揮していると考えられている。

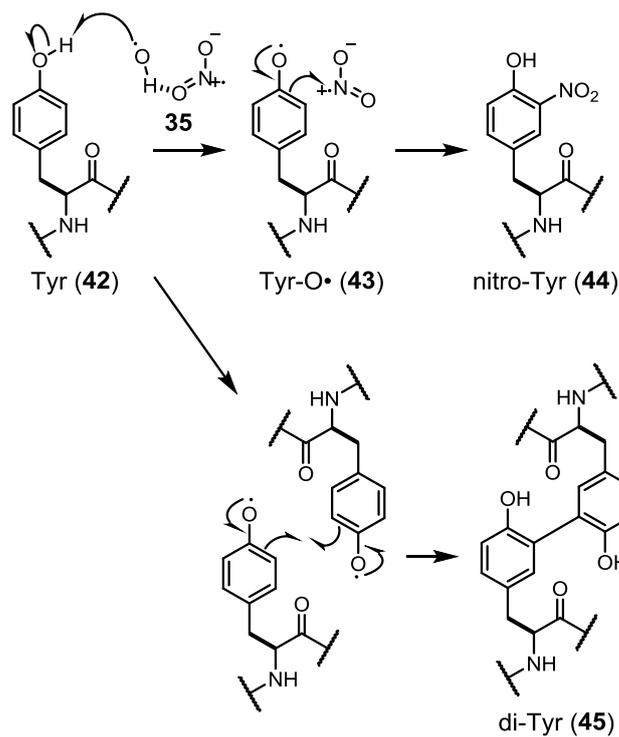


Fig. 2-11 ONOOH と Tyr (42) の反応

③金属含有タンパク質との反応

ONOO⁻は金属-ポルフィリンによって異性化が促進されることが知られている (Fig. 2-12)。まず、Fe^{III}-ポルフィリン 46 に ONOO⁻の酸素原子が配位して 47 になる。これがホモリシスを起こして•NO₂が脱離し、48 になる。48 が•NO₂の窒素原子と反応して 49 になり、これから硝酸イオンが脱離して触媒サイクルを繰り返す。ウマ心臓ミオグロビンにおいて、Fe^{III}-ポルフィリンの近辺に存在する Tyr がニトロ化されるが、これは ONOO⁻の異性化反応の途中で生じる•NO₂によるものであると考えられている。さらに、マンガン-スーパーオキシドジスムターゼ (Mn-SOD) においても、Mn 周辺のチロシン残基がニトロ化される⁵³。このため、M=O のようなオキソ錯体を形成できる金属を有しているタンパク質は、ONOO⁻によるニトロ化反応を受けやすいと考えられている。

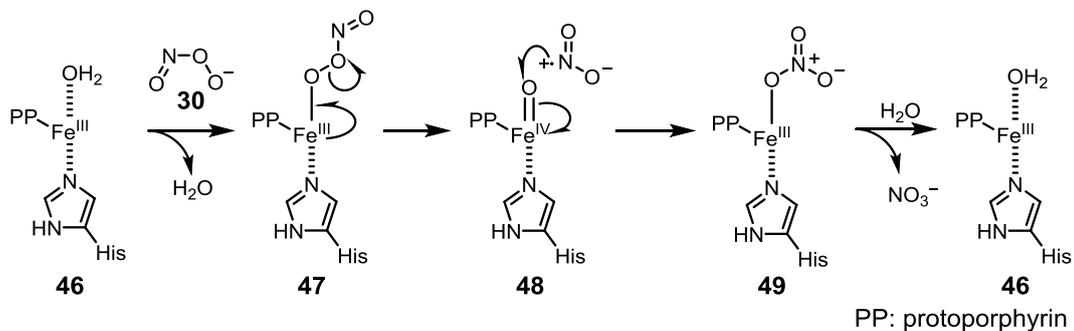


Fig. 2-12 Fe^{III}-ポルフィリンと ONOO⁻との反応

④求核剤としての反応

ONOO⁻は強い求核性を持つことが知られており、ナフトキノン (47) に求核付加反応を起こし、48 を経由してエポキシド 49 にする (Fig. 2-13) ⁵⁴。

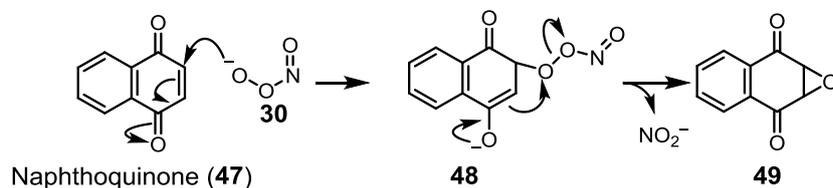


Fig. 2-13 ナフトキノン (47) と ONOO⁻の反応

また、ONOO⁻は CO₂ に求核攻撃して ONOOCO₂⁻ (50) になる (Fig. 2-14、 $k = 5.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)。ONOOCO₂⁻は、ONOOH と同様に O-O 結合がホモリシスを起こして・NO₂ と・CO₃⁻ (51) になる ⁵⁵。この反応は ONOOH のホモリシスよりもエネルギー的に有利であるため、CO₂ は ONOO⁻からの・NO₂の形成を促進し、ニトロ化反応の効率を上昇させる ⁴²。・NO₂ と・CO₃⁻は再び反応して硝酸炭酸無水物 (52) になり、硝酸イオンと二酸化炭素に分解する。

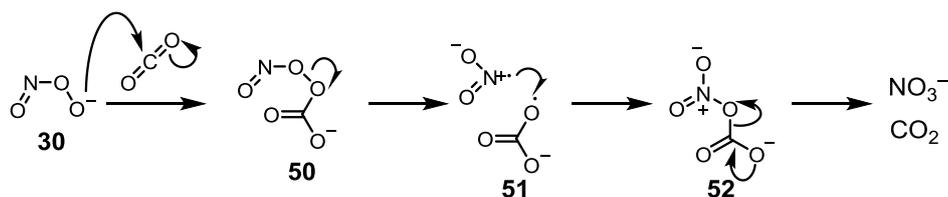


Fig. 2-14 CO₂ と ONOO⁻の反応

ONOO⁻のように強い求核性と強い酸化活性を有する活性種は、生体内に他に存在しない。後述するように、この反応性は ONOO⁻を検出するためのプローブ分子との反応にも用いられている。

2-3-5 ONOO⁻による生理機能障害

ONOO⁻はその高い反応性のために、多くの生体成分と無差別に反応してしまうため、様々なシグナルイベントを乱し、病態の進行に関与すると考えられている (Table 2-2)。以下に ONOO⁻の細胞機能の障害について主なものを示した。

Table 2-2 ONOO⁻による障害作用とその作用機序⁵⁶

Action	Target molecule	Mechanism	Consequence	Ref.
Antioxidant enzyme inhibition	• Cu, Zn and Mn SOD, glutathione reductase, glutaredoxin	• Oxidation, nitration	• Deleterious positive-feedback cycles of injury • Neuroinjury	57, 58
Antioxidant depletion	• Glutathione, cysteine	• Oxidation	• Deleterious positive-feedback cycles of injury • Neuroinjury	59–61
Cytosolic enzyme inhibition	• GAPDH, tyrosine hydroxylase, creatine kinase, tyrosine phosphatases, aconitine	• Oxidation of cysteine residues, nitration of tyrosine residues	• Cellular functional impairment • Inhibition of tyrosine hydroxylase, impaired dopamine production in dopaminergic neurons (in Parkinson's disease)	62–66
Protein aggregation	• α -Synuclein and microtubule associated tau protein	• Oxidation, nitration	• Lewy-body formation, neurodegeneration	67, 68
Activation of enzymes	• Matrix metalloproteinases (MMPs), cytochrome c, glutathione-S-transferase, protein kinase C- ϵ • Fibrinogen	• Direct nitration (MMP2), S-glutathiolation (MMP1, 8, 9) of pro-MMPs • Nitration of glutathione-S-transferase • Cytochrome c nitration • Nitrated fibrinogen affects its pro-coagulant activity	• Shift towards a pro-inflammatory phenotype • Apoptotic signaling	69–72
Impairment of enzyme cofactors	• Tetrahydrobiopterin, NADH	• Oxidation	• Impairment of BH ₄ -mediated enzymes • Inhibition of NADH-dependent enzymes • Imbalance in cellular pyrimidine nucleotide levels • Positive-feedback cycle of cytosolic oxidant generation	73, 74
Membrane channel inhibition	• Calcium pumps (including SERCA), Na ⁺ /K ⁺ ATP-ase, Na ⁺ channel, neuronal L-type calcium channels	• Cysteine oxidation, tyrosine nitration	• Impairment of cellular ionic balance, impaired cellular calcium handling	75–79

Table 2-2 (続き) ONOO⁻の障害活性とその作用機序⁵⁶

Action	Target molecule	Mechanism	Consequence	Ref.
Lipid peroxidation and nitration, Arachidonic acid oxidation	<ul style="list-style-type: none"> • Fatty acid • Low-density lipoprotein 	<ul style="list-style-type: none"> • Oxidation, nitration 	<ul style="list-style-type: none"> • Nitration of fatty acids may lead to secondary inhibition of protein function by thiol-based modification • Nitrated lipid can also have direct anti-inflammatory functions via PPARγ-dependent and independent pathways 	80–82
DNA injury	<ul style="list-style-type: none"> • DNA base 	<ul style="list-style-type: none"> • Probably due to secondary processes initiated by peroxynitrite: oxidation, nitration, deamination, adduct formation, activation of Ca²⁺-Mg²⁺-endonucleases 	<ul style="list-style-type: none"> • Genotoxic damage, induction of secondary DNA repair and suicidal pathways including activation of PARP • Cell death 	83–84
Mitochondria dysfunction	<ul style="list-style-type: none"> • Mitochondrial respiratory chain • Mitochondrial permeability transition pore 	<ul style="list-style-type: none"> • Inactivation of complex I, II and V • Thiol oxidation of the adenine nucleotide translocator and creatine kinase • Disruption of the iron-sulfur cluster • Aconitase nitration • Inactivation and nitration of 3-oxoacid CoA-transferase 	<ul style="list-style-type: none"> • Alterations in mitochondrial electron flow and Krebs cycle • Release of mitochondrial 'death factors', secondary generation of mitochondrial oxidants and free radicals 	85–87

このように ONOO⁻はその強い酸化活性による酸化反応、または不可逆反応であるニトロ化によって多くの機能障害を引き起こす。

2-3-6 ONOO⁻による細胞保護作用

ONOO⁻は細胞機能障害を引き起こす一方で、細胞保護作用を示すことも知られている。免疫系で産生されると、その強い酸化活性で異物分解を行う。また、循環器系、神経系、呼吸器系などでも低濃度においては細胞保護作用を示すことが報告されている (Fig. 2-15)。

①免疫系における異物の分解

免疫系のマクロファージや好中球では、サイトカイン刺激などによって iNOS や NADPH oxidase が誘導され、NO と O₂⁻の産生が亢進する。そして強い酸化力を持つ ONOO⁻の産生が促進され、異物分解を行う³¹。

②がん原遺伝子チロシンプロテインキナーゼ Src の活性化

Src は3つのドメイン (SH1-3 ドメイン) からなるチロシンキナーゼであり、細胞の接着、成長、移動、分化に関与している。キナーゼ触媒ドメインである SH1 は Tyr527 がリン酸化されると活性を失うが、ONOO⁻によるニトロ化を受けることによりリン酸化を受けなくなり、活性が持続する。チロシンのニトロ化反応は不可逆反応であるため、この活性化は持続する。これにより Src 下流の作用が活性化される⁸⁸。

③ホスファターゼの阻害によるシグナルの活性化

ONOO⁻はホスファターゼを阻害して、その下流の酵素のリン酸化状態を維持し、いくつかのシグナル経路を活性化する。活性化される経路としては、タンパク質キナーゼ C (PKC) /Akt 経路⁸⁹、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) シグナル⁹⁰、NF-κB 経路⁹¹ などがある。これらの経路が活性化されると、転写調節、細胞生存、分化誘導などが起こる。

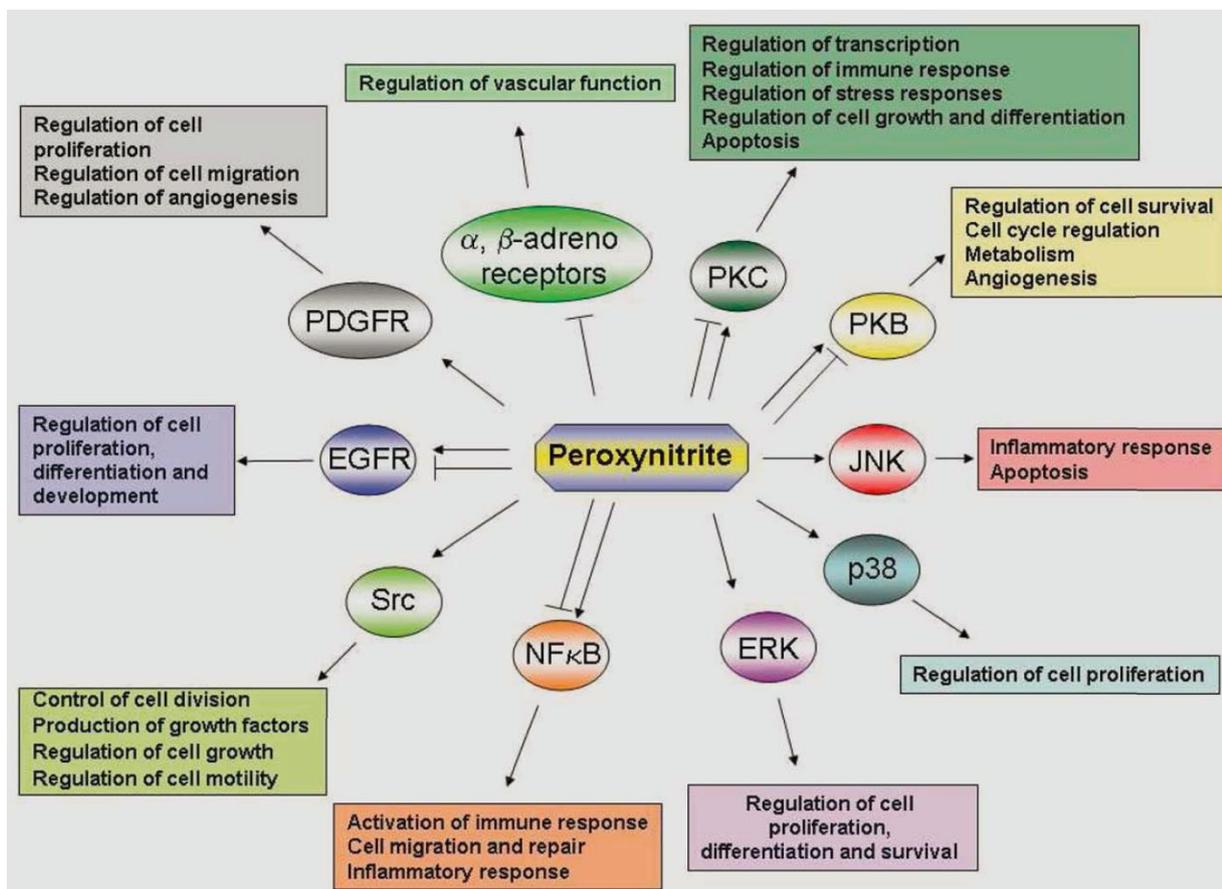


Fig. 2-15 ONOO⁻による細胞内シグナルの制御⁹²

2-4 NO と ONOO⁻の研究のためのケミカルツール

前述したように、生体内で NO と ONOO⁻は様々なシグナルイベントや病態の進行に関与することが知られている。そのため、NO と ONOO⁻のドナーや蛍光プローブは、生体内での RNS の働きを解明するための重要なツールになると考えられる。以下に、NO と ONOO⁻の研究のためのケミカルツールについて概説する。

2-4-1 NO の研究のためのケミカルツール

2-4-1-1 NO ドナー

NO は常温常圧で気体であり、その取扱いが非常に困難であるため、NO を貯蔵・放出できる NO ドナーが数多く開発されてきた。以下にその代表的なものを示す。

①硝酸エステル、亜硝酸エステル (Fig. 2-16) ^{93, 94}

ニトログリセリン **53** などの硝酸エステル (**54**、**55**) は古くから NO 発生剤として、狭心症の発作に対する治療薬として用いられてきた。生体内で硝酸エステルは 3 電子還元、亜硝酸エステル (**56**、**57**) は 1 電子還元を受け、NO と対応するアルコールを生じる。

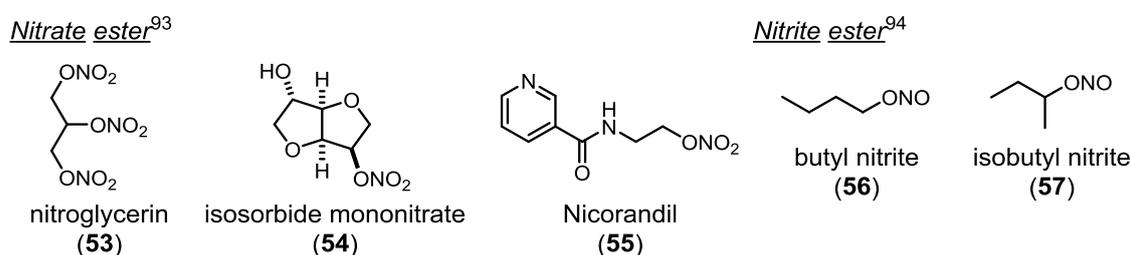


Fig. 2-16 硝酸エステル、亜硝酸エステル型の NO ドナー

②金属-ニトロシル錯体 (Fig. 2-17) ⁹⁵⁻⁹⁷

Fe、Ru など様々な遷移金属のニトロシル錯体 (**58-61**) が NO ドナーとして報告されている。Fe のニトロシル錯体であるニトロプルシド (sodium nitroprusside: SNP, **58**) は血管拡張薬として臨床応用されている。金属-ニトロシル錯体は生体内の還元反応や光照射によって NO を放出する。

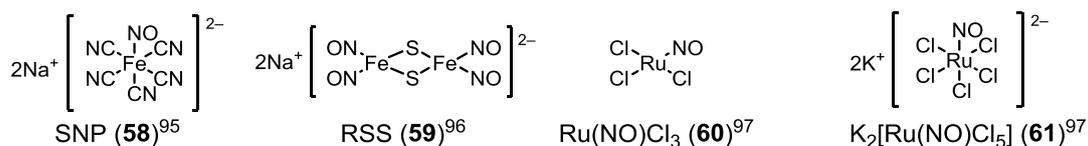


Fig. 2-17 金属-ニトロシル錯体構造を持つ NO ドナー

③S-ニトロソチオール化合物 (Fig. 2-18) ²⁵

S-ニトロソチオール類 (**62**、**63**) は熱、光、もしくは生体内の還元反応によって NO を放出する。また、RSNO の窒素原子が求核攻撃を受けやすいために、他の Cys のチオールによって求核攻撃を受け、ニトロソ基が転移する。

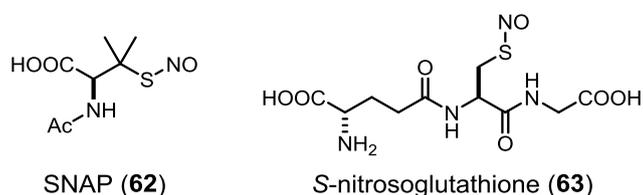


Fig. 2-18 S-ニトロソチオール構造を持つ NO ドナー

④ジアゼニウムジオラート系 NO ドナー (Fig. 2-19) ⁹⁸

ジアゼニウムジオラート系 NO ドナー (**64–67**) は自発的に分解して NO を放出する。アルカリ性水溶液中では安定だが、中性条件下で 2 当量の NO を放出する。生体内の還元や熱、光反応を必要とせず、自発的に効率よく NO を放出する。各誘導体によって半減期が異なり、それぞれの用途によって使い分ける。

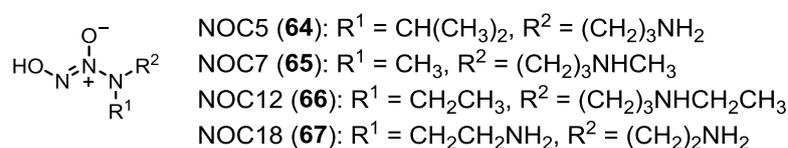


Fig. 2-19 ジアゼニウムジオラート系 NO ドナー

⑤オキシム系 NO ドナー (Fig. 2-20) ⁹⁹

オキシム系 NO ドナー (**68–71**) は中性条件下で酸化され、自発的に NO を放出する NO ドナーである。それぞれの誘導体によって半減期が異なる。比較的脂溶性が高く、実験動物における経口投与も可能である。

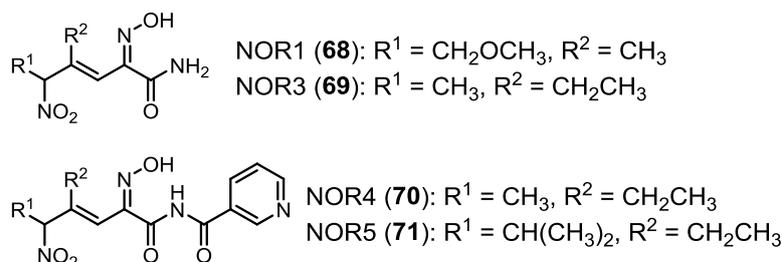


Fig. 2-20 オキシム系 NO ドナー

⑥光制御型 NO ドナー

前述した NO ドナーはいずれも自発的に、もしくは生体内での反応によって NO を放出する化合物であり、その放出制御が困難であった。NO は他のセカンドメッセンジャーと比べ半減期が短く不安定なため、発生する時間・位置が生理活性に影響を与えると考えられる。そこで放出制御因子として、時空間の制御が容易な「光」を用いた光制御型 NO ドナーが開発されてきた (Fig. 2-21)。

BNN3 (72) に紫外光を照射すると N-N 結合がホモリシスを起こし、2 当量の NO が放出される¹⁰⁰。2,6-Dimethylnitrobenzene 誘導体 (73) は光照射によりニトロ基が亜硝酸エステルへと転位し、NO を放出すると考えられている¹⁰¹⁻¹⁰⁶。紫外光によって NO を放出するが、二光子励起という励起方法を用いることにより近赤外光で NO を放出できる。実際に *in vivo* でのグリア細胞の遊走の制御など NO の作用を光制御することに成功している。ルテニウムのニトロシル錯体 (74) は、可視光の一光子励起で NO を放出できる光制御型 NO ドナーである¹⁰⁷。

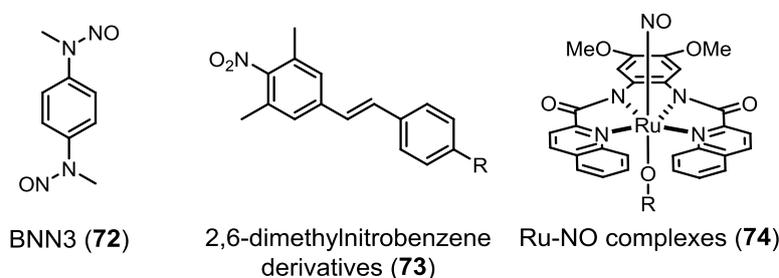


Fig. 2-21 光制御型 NO ドナー

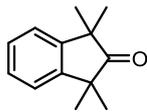
2-4-1-2 NO のイメージングプローブ

前述したように、NO は生体内における重要なシグナル伝達因子の一つであり、その動態を追跡することは、そのシグナル経路を解明するために有用である。NO は不安定なため直接検出することが難しく、その挙動を追跡するために NO をイメージングするためのツールが数多く開発されてきた。以下にその一部を示す。

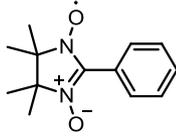
①NO の ESR スピンプローブ (Fig. 2-22)

ESR とは電子スピン共鳴 (electron spin resonance) のことである。磁場中におかれた試料中の不対電子は特定のマイクロ波を吸収する。このマイクロ波の吸収を測定する方法であり、不対電子の検出に用いられる。NMR と類似した原理であるため、MRI に対応する形でのイメージング (ESR imaging: ESRI) にも応用されている¹⁰⁸。ESR 測定に用いる目的で、NO の反応性を利用したプローブが開発されている。

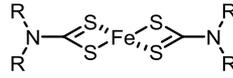
1,1,3,3-tetramethyl-2-indanone (75) は光キレトロピー反応によって *o*-quinodimethane 誘導体を形成し、これが NO とキレトロピー反応をすると不対電子を有する nitroxyl radical を形成する¹⁰⁹。PTIO (76) は NO を $\bullet\text{NO}_2$ にして、iminonitroxide になる。この iminonitroxide は PTIO とは異なる ESR スペクトルを有するため、これを利用して NO の検出を行う。ま



1,1,3,3-tetramethyl-2-indanone
(75)



PTIO (76)



Fe-DTC (77)

た、NO を効率よく・NO₂ に変換するため、NO 消去剤としても用いられる¹¹⁰。Fe-dithiocarbamate complex (Fe-DTC, 77)

Fig. 2-22 NO のスピンプローブ

は NO と反応して NO-Fe-dithiocarbamate complex (NO-Fe-DTC) を形成する。この錯体は ESR で特徴的なシグナルを示すため、これを利用して NO の検出を行う¹¹¹。

②NO の蛍光プローブ (Fig. 2-23)

培養細胞など生きた生体試料において簡便にイメージングを行える化合物として、蛍光プローブが数多く開発されている。中でも 2,3-diaminonaphthalene (78)¹¹² は、高感度に NO を検出できる。この構造を基に DAF-2 (79)¹¹³、DAR-4M (80)¹¹⁴ などの蛍光プローブが開発されている。これらの 1,2-diaminoarene 構造と NO の反応には、O₂ などの酸化剤が必要である。他に、金属錯体の構造を持つプローブも開発されている。[Ru(TPP)(CO)(Ds-Im)] (81) は、NO がリガンドである CO と置き換わるとイミダゾールの配位が外れ、蛍光分子である dansyl が遊離する¹¹⁵。CuFL (82) は、リガンドである窒素原子が NO によるニトロソ化を受け、Cu への配位が外れ、キサントン環が形成される¹¹⁶。

このように、多くの NO の蛍光プローブが開発されており、NO のライブイメージングを可能にしている。

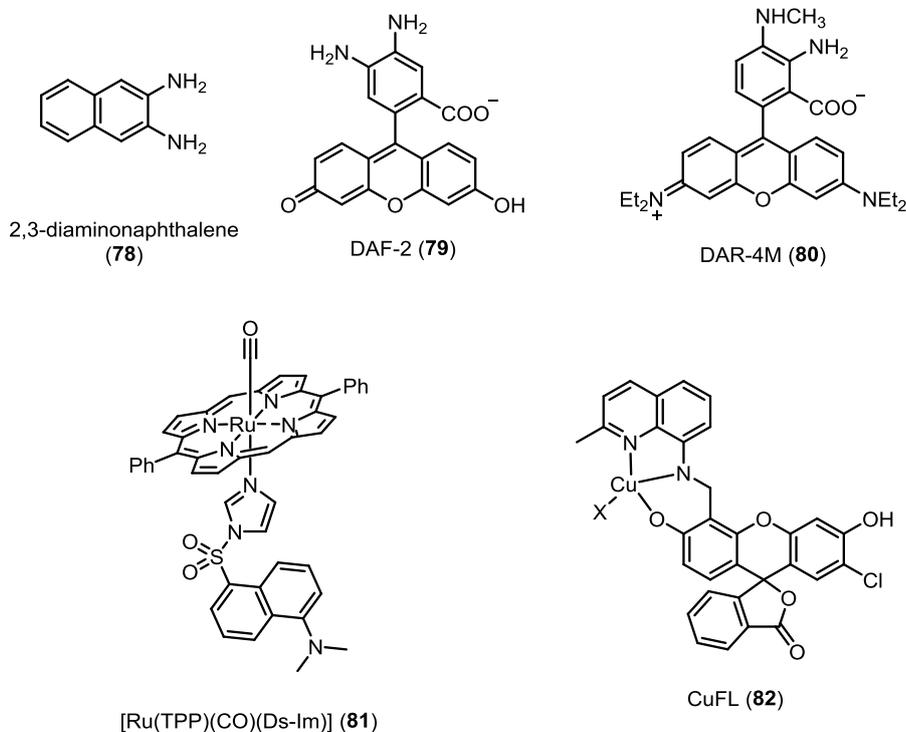


Fig. 2-23 NO の蛍光プローブの例

2-4-2 ONOO⁻の研究のためのケミカルツール

2-4-2-1 ONOO⁻消去剤

ONOO⁻の消去剤は ONOO⁻の毒性を減少させるため、細胞保護作用を示す (Fig. 2-24)。

前述したように、Fe^{III}-ポルフィリン錯体 **83–85** は ONOO⁻を NO₃⁻に変換する反応を触媒し、効率よく ONOO⁻を消去することが知られている⁵³。また、セレン含有小分子である ebselen (**86**) は、Se が ONOOH に求核攻撃を起こして NO₂⁻にし、セレノキシド (Se⁺-O⁻) になる。このセレノキシドは細胞内のグルタチオン (GSH) によって還元されて ebselen に戻る¹¹⁷。また、尿酸 (**87**) も効率よく ONOO⁻と反応するため、ONOO⁻の毒性を軽減させる内因性の抗酸化剤として報告されている¹¹⁸。

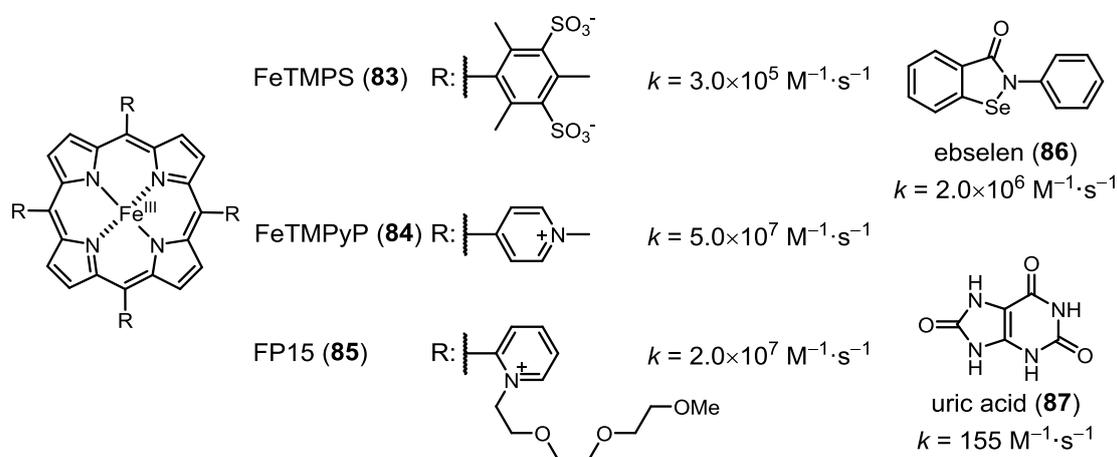


Fig. 2-24 ONOO⁻の消去剤とその反応速度

これらの ONOO⁻消去剤について、炎症反応¹¹⁹やモデルマウスにおける I 型糖尿病の症状改善¹²⁰、血管系障害の改善¹²¹など、様々な効果が確認されている。

2-4-2-2 ONOO⁻検出蛍光プローブ

ONOO⁻の検出はその関与する病態の進行状況の把握に有用であり、診断薬としての可能性も期待できるため、多くの ONOO⁻検出蛍光プローブが開発されている。

HKGreen シリーズは、ONOO⁻の強い求核性と酸化力を利用した蛍光プローブである (Fig. 2-25)。まず、ONOO⁻がトリフルオロメチルカルボニル基に求核攻撃をし、NO₂⁻の脱離とともにジオキシランを形成する。これに分子内の電子豊富なフェニル基が求核攻撃をし、キノイドになる。HKGreen-1 (**88**)¹²²、3 (**90**)¹²⁴ではこのキノイドが加水分解され、蛍光強度が増大する。また HKGreen-2 (**89**)¹²³では、キノイドの形成によってフェニル基の電子密度が低下し、蛍光強度が増大する。

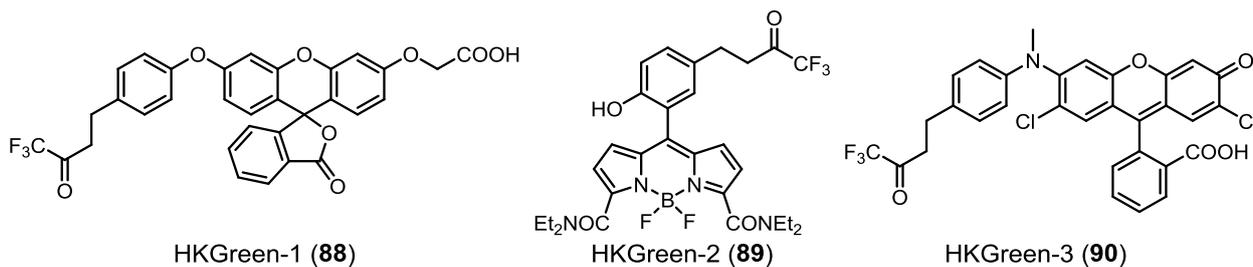


Fig. 2-25 ONOO⁻蛍光プローブの HKGreen シリーズ

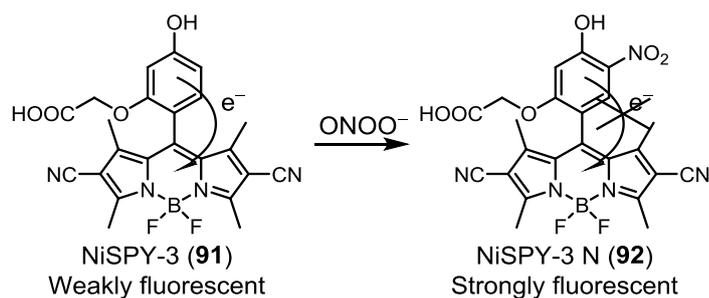


Fig. 2-26 ニトロ化ストレス特異的蛍光プローブ NiSPY-3

NiSPY-3 (**91**) は光誘起電子移動反応 (photoinduced electron transfer: PeT) を利用した、ニトロ化ストレス検出蛍光プローブであり、ONOO⁻などにニトロ化されて蛍光強度が増大する (Fig. 2-26)¹²⁵。ニトロ化が起こる前は、電子密度の高いフェノール部位から電子密度の低い蛍光団 BODIPY への PeT が起きているため、

蛍光強度が低い。フェノール部位がニトロ化された NiSPY-3 N (**92**) では電子移動反応が抑制され、蛍光強度が増大する。

このほかにも、様々な ONOO⁻検出蛍光プローブが開発されており、ONOO⁻のライブセルイメージングを可能にしている (Fig. 2-27, **93–97**)。

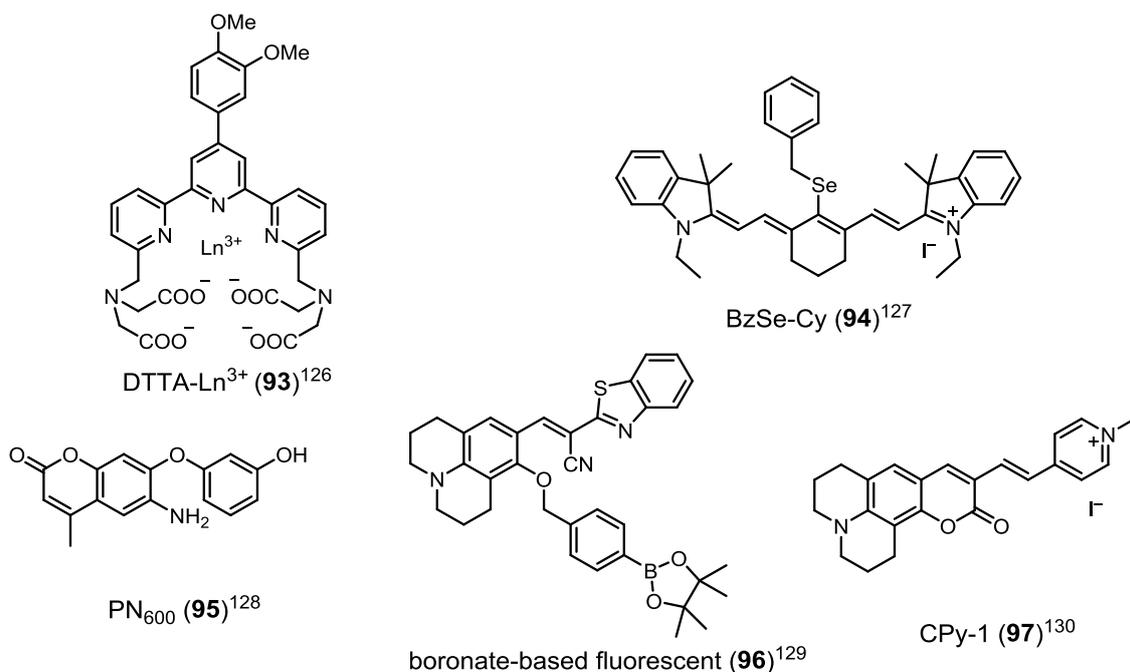


Fig. 2-27 様々な ONOO⁻検出蛍光プローブ

2-4-2-3 ONOO⁻ドナー

①ONOO⁻含有水溶液

ONOO⁻はアルカリ水溶液中 (pH>12) で安定であり、-78 °C で数か月にわたって保存することができる。また、その濃度は 302 nm の吸光度 ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) から算出することができる⁴³。ONOO⁻含有水溶液を作る方法としては、酸性水溶液中で HNO₂ と H₂O₂ を反応させる方法¹³¹ と、アルカリ性水溶液中で NaN₃ と O₃ を反応させる方法¹³² がある。

②NO と O₂⁻を別々に発生させる系 (Fig. 2-28)¹³³

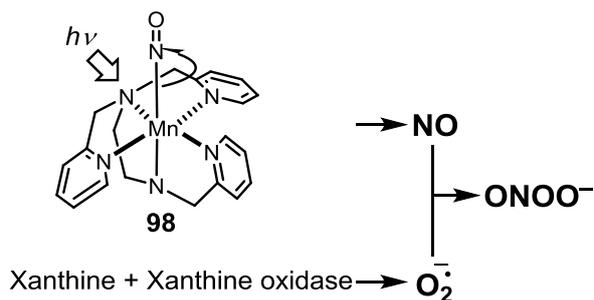


Fig. 2-28 Mascharak らの光応答性 ONOO⁻発生系¹³³

Mascharak らは、光応答性 NO ドナーである Mn-NO 錯体 **98** と、O₂⁻発生系としてキサンチンオキシダーゼ (XO) を利用した ONOO⁻発生系を開発した。これは、光で NO の放出制御を行うことにより、ONOO⁻の発生制御を行うものであるが、O₂⁻の発生量の制御を行うことができない。

③自発分解型 ONOO⁻ドナーSIN-1 (Fig. 2-29)¹³⁴

自発分解型の ONOO⁻ドナーSIN-1 (**99**) は生物試験などで最も頻用されている ONOO⁻ドナーである。生理的条件下で開環して **100** になり、これが系中の O₂を一電子還して O₂⁻にし、**101** になる。**101** は NO を放出して **102** になり、NO と O₂⁻が反応して ONOO⁻になる。

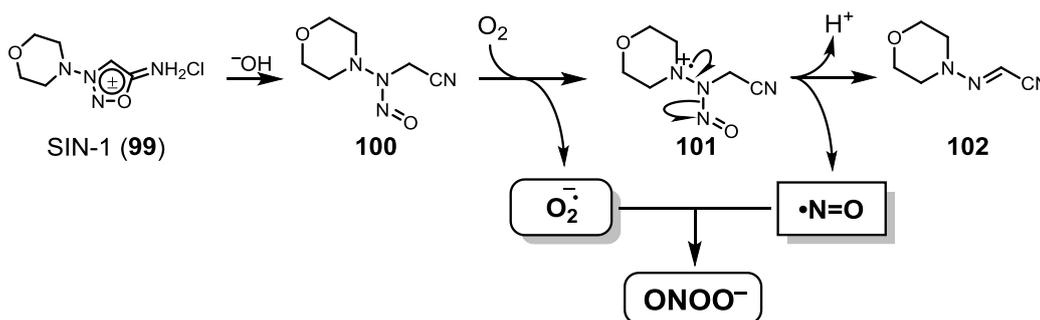


Fig. 2-29 自発分解型 ONOO⁻ドナーSIN-1 の ONOO⁻発生機構

2-5 研究目的

以上のように、NO と ONOO⁻は多彩な反応性を示し、また多くのシグナルイベントに関与すると考えられており、様々なケミカルツールが開発されている。

これまで多くの ONOO⁻消去剤や蛍光プローブが開発されているが、ドナーの開発は全くと言っていいほど進んでいない。これは ONOO⁻が多くの場合、生体イベントを乱す毒性因子として働くため、ドナーよりも分解触媒や検出プローブの有用性の方が高いと考えられているためである。しかし、ONOO⁻は低濃度において細胞保護に関わっているとの報告もあり、また、その高い反応性のために発生する時空間によって大きく生理活性が変化すると考えられる。そのため、ONOO⁻の作用をより詳細に解明するためには、その発生を時空間制御できるドナーが必要と言える。また、そのような化合物は、ONOO⁻の活性を利用した新たな化学療法剤になる可能性も期待できるものの、そのような化合物は開発されていない。

またNOに関しては、NOの関与するシグナルイベントの重要性のために、これまで多くの光制御型ドナーが開発されてきた。このような光制御ドナーを用いる際は、その制御に生体透過性が高く、毒性の低い可視-近赤外光を用いるのが理想的であるため、可視-近赤外光で制御可能なNOドナーもいくつか開発されている。しかし、毒性の懸念される遷移金属錯体含有しているもの¹⁰⁷、または非常に高価な光源である近赤外パルスレーザーを必要とする¹⁰³ものである点などが問題であった。そのため、金属非含有かつ単純な可視-近赤外光で制御可能なNOドナーが望まれている。

そこで私は、いまだ報告のない光制御型 ONOO⁻ドナーと、金属非含有かつ安価な可視光源で制御可能な可視光制御型 NOドナーが RNSの研究のための新たなケミカルツールとして、もしくは新たな化学療法剤として期待できると考え、これらの化合物の開発を行った。

第3章 光制御可能な ONOO⁻および NO ドナーの開発

3-1 2,6-Dimethylnitrobenzene 構造を有する光制御型 ONOO⁻ドナーの開発

3-1-1 分子設計

光で制御可能な ONOO⁻ドナーを開発するために、宮田らにより開発が行われてきた光制御型 NO ドナーである 2,6-dimethylnitrobenzene 誘導体に着目した (Fig. 3-1, 2)。

宮田らは、Fig. 3-1 に示す 6-nitrobenzo[*a*]pyrene (6-nitroBaP, **103**) が光照射によって NO を放出することを見出した¹⁰¹。これはニトロ基の両ペリ位にある水素原子の立体障害により、ニトロ基の共役平面と芳香環の共役平面がずれており、亜硝酸エステル (**104**) への異性化反応が起こりやすくなるためであると考えられた。**104** はホモリシスを起こして NO と oxyl radical (**105**) になると考えられている。

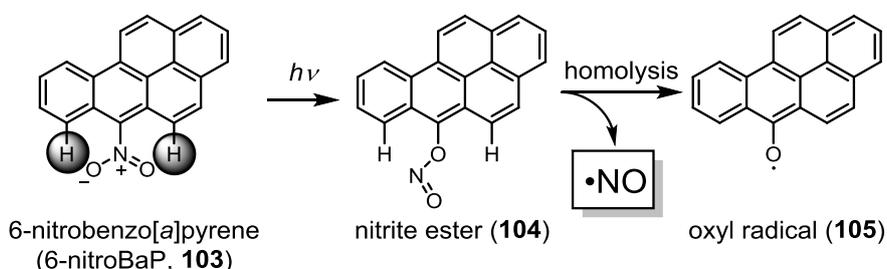


Fig. 3-1 予想される 6-nitroBaP からの NO 放出機構

そして Fig. 3-2 に示すように、6-nitroBaP におけるペリ位水素に代わる立体障害としてメチル基を有し、さらに構造を簡略化した 2,6-dimethylnitrobenzene 誘導体 (**106**) が、同様の NO 放出能を有することを見出した¹⁰²⁻¹⁰⁶。これらの化合物は、光照射によって亜硝酸エステル (**107**) を経由して NO を放出し、phenoxy radical (**108**) になると考えられている。

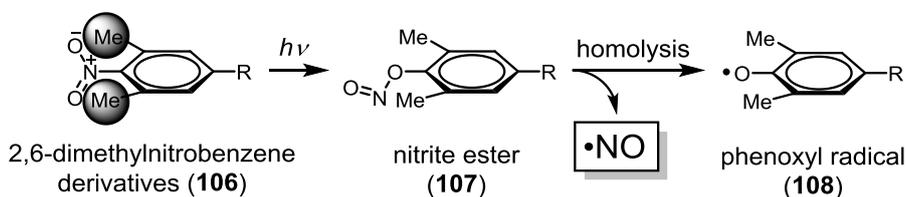


Fig. 3-2 予想される 2,6-dimethylnitrobenzene 誘導体からの NO 放出機構

この反応を応用して、以下に示す ONOO⁻発生反応を想定した (Fig. 3-3)。スチルベン骨格を持ち、図に示した位置に水酸基を有する 2,6-dimethylnitrobenzene 誘導体 (**109**) は、光照射によって NO を放出した後、semiquinone 型の間mediate (**110**) になると考えられる。Semiquinone は系中の O₂ を一電子還元して O₂⁻にする¹³⁵ため、この semiquinone 型の間mediate

も系中の O_2 を一電子還元して $O_2^{\cdot-}$ にし、stilbenequinone (**111**) になると考えた。そして NO と $O_2^{\cdot-}$ は拡散律速で反応して $ONOO^-$ を形成するため、このような構造の化合物が光制御可能な $ONOO^-$ ドナーになると考えた。

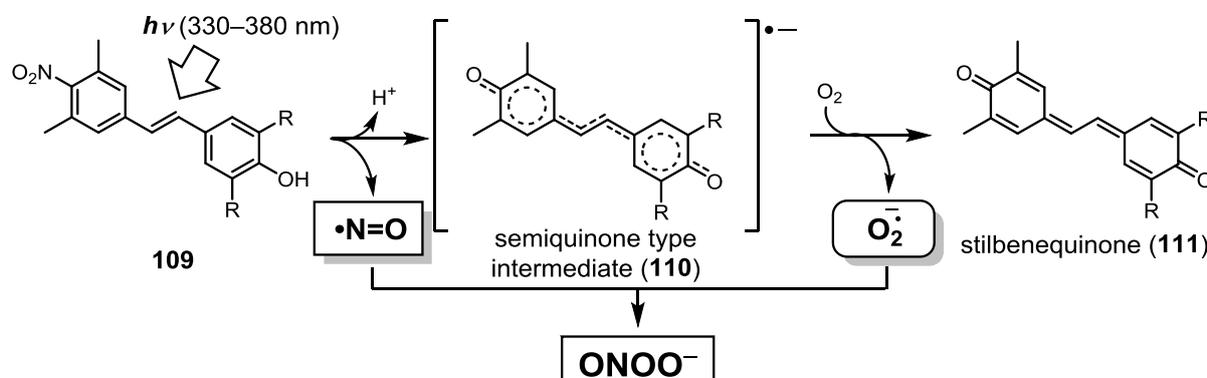


Fig. 3-3 想定される光制御型 $ONOO^-$ ドナーとその発生機構

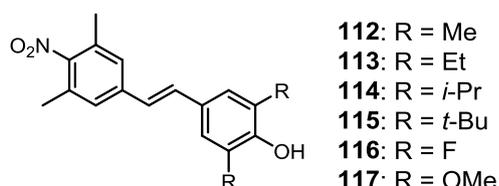


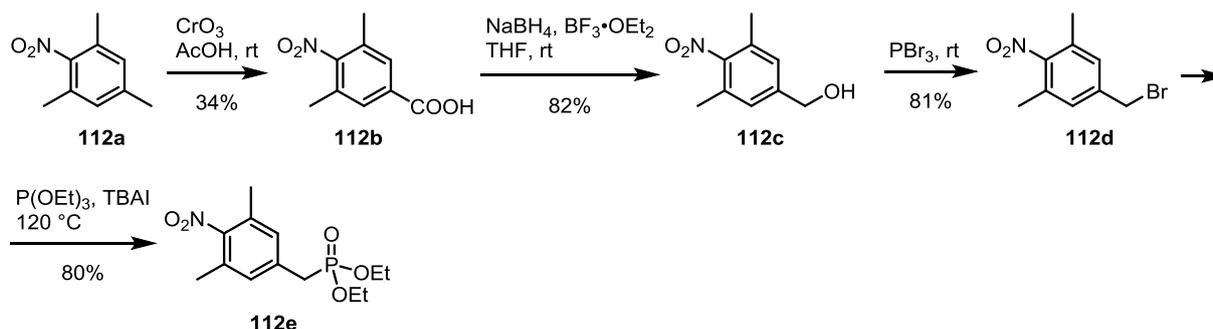
Fig. 3-4 設計した光制御型 $ONOO^-$ ドナー

そこで、Fig. 3-4 に示す化合物を設計した。 $ONOO^-$ はフェノール性水酸基のオルト位をニトロ化する性質があるため、この反応によって $ONOO^-$ が消費されることを防ぐために、水酸基のオルト位には置換基を導入する必要がある。そして、この置換基の影響を調べる目的で、様々な置換基を導入した化合物 **112–117** を設計した。

3-1-2 化合物 **112–117** の合成

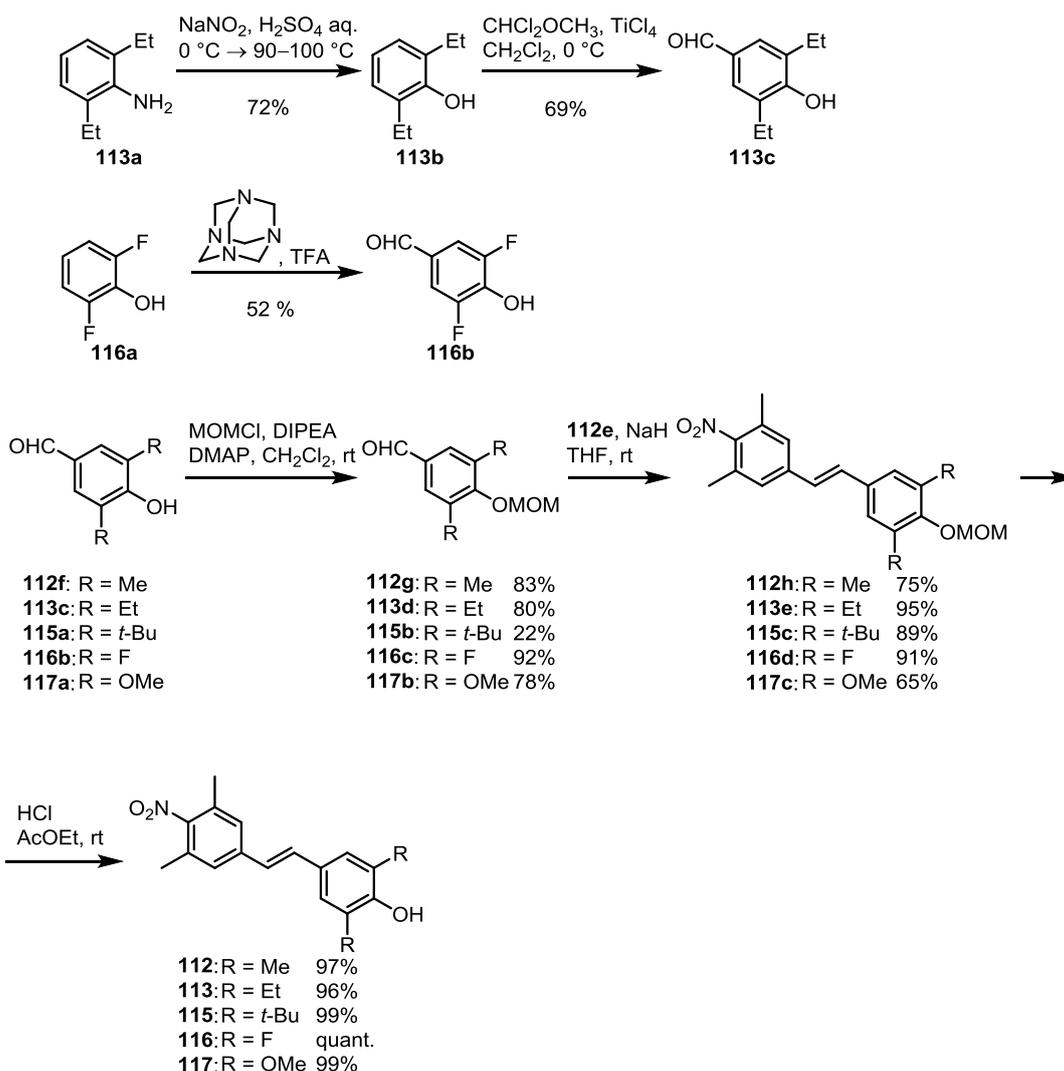
設計した化合物の合成を行った (Scheme 3-1、2、3)。化合物の合成は、過去の 2,6-dimethylnitrobenzene 誘導体の合成法を参照して行った^{102–106}。

まず、stilbene 構造を構築する Horner-Wadsworth-Emmons 反応のための共通反応剤であるリン酸エステル **112e** を合成した (Scheme 3-1)。2-Nitromesitylene (**112a**) の 5 位のメチル基を CrO_3 で酸化¹³⁶ して安息香酸誘導体 **112b** にし、これを $NaBH_4$ と $BF_3 \cdot OEt_2$ を用いた還元¹³⁷ で **112c** にした。**112c** の水酸基を PBr_3 でブロモ化して **112d** にし、これを Arbuzov 反応でリン酸エステル **112e** にした¹⁰²。



Scheme 3-1 共通中間体 **112e** の合成

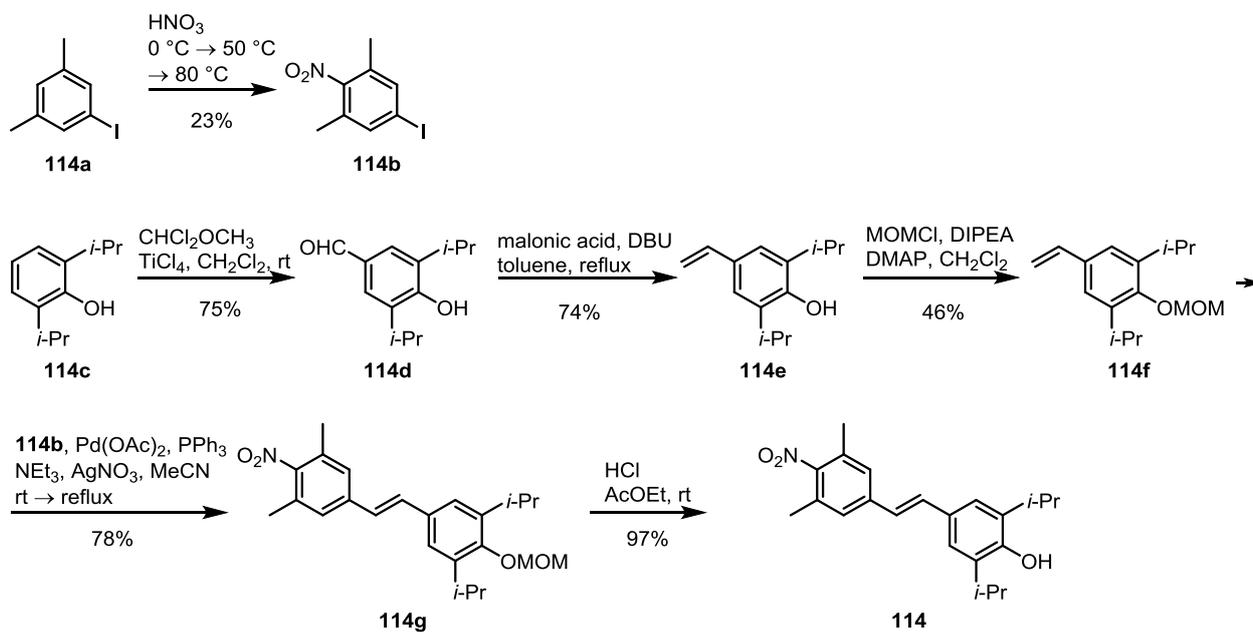
合成した **112e** を用いて **112**、**113**、**115–117** を合成した (Scheme 3-2)。2,6-Diethylaniline (**113a**) を Sandmeyer 反応でフェノール誘導体 **113b** にした。**113b** を、 $\text{CHCl}_2\text{OCH}_3$ を用いたホルミル化で **113c** にした。また、2,6-difluorophenol (**116a**) を Duff 反応¹³⁸ でホルミル化して **116b** にした。市販の、もしくは合成した 4-hydroxybenzaldehyde 誘導体の水酸基を MOM 基で保護し、**112e** と Horner-Wadsworth-Emmons 反応でカップリングさせ、4 N HCl-AcOEt で MOM 基を脱保護して **112**、**113**、**115–117** にした。



Scheme 3-2 **112**、**113**、**115–117** の合成

この骨格を構築する別の方法として、Heck 反応を用いる方法で **114** を合成した (Scheme 3-3)。ヨードベンゼン誘導体 **114a** をニトロ化して **114b** を得た。フェノール誘導体 **114c** をホルミル化して **114d** にし、**114d** に DBU 存在下、マロン酸との Knoevenagel 縮合、続く脱炭酸反応をワンポットで行い¹³⁹、スチレン誘導体 **114e** とした。**114e** の水酸基を MOM 基で保護し、得られた **114f** と **114b** の Heck 反応でスチルベン誘導体 **114g** を得た。得られた **114g** の MOM 基を 4 N HCl-AcOEt で脱保護して **114** にした。

以上のように、Heck 反応によっても目的の骨格を構築できることを示した。



Scheme 3-3 Heck 反応による **114** の合成

3-1-3 化合物 **112–117** の吸光スペクトルの測定

照射する光の波長を決定するため、合成した **112–117** の紫外可視吸収スペクトルを測定した (Fig. 3-5)。

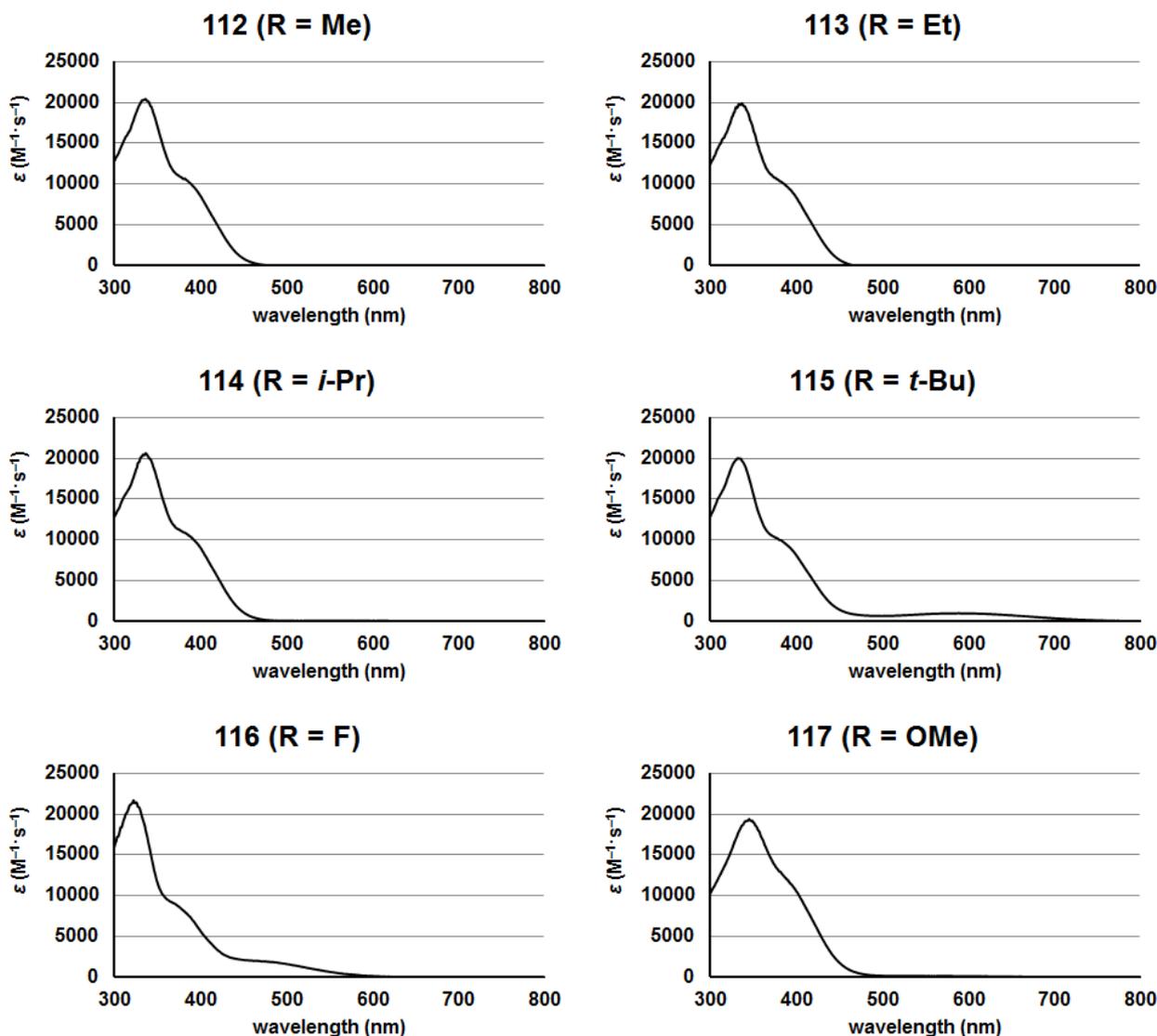
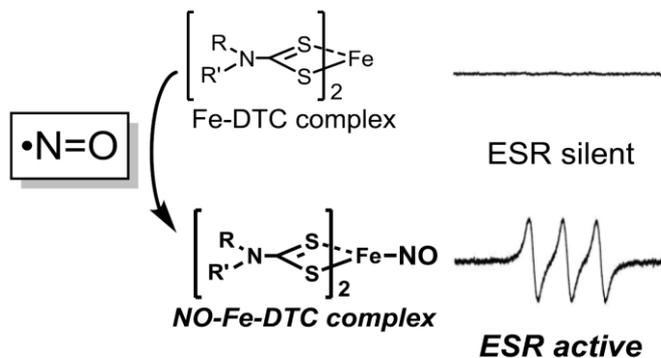


Fig. 3-5 合成した **112–117** の紫外可視吸収スペクトル;それぞれの化合物の DMSO 溶液の吸収スペクトルを測定した。

いずれの化合物もスチルベン骨格由来と考えられる 330 nm 付近の吸収極大を有していた。このため、**112–117** の光照射を必要とする実験では、光源の蛍光顕微鏡 Olympus BX-60 の高圧水銀ランプに 330–380 nm のバンドパスフィルターを装着して、光照射を行った。

3-1-4 ESR スピントラッピング法を用いた NO 放出の確認

まず、合成した化合物について ONOO⁻放出の第一段階である NO 放出が光照射によって起こるかを、Fe-DTC を用いた ESR スピントラッピング法で確認した (Fig. 3-6)¹¹¹。Fe-DTC は NO と反応すると NO-Fe-DTC になる。これを 1 GHz ESR で測定すると、330 mT 付近に特徴的な 3 本のシグナルを示す⁹²。



合成した化合物と Fe-DTC の混合溶液に光照射を行い、このシグナルが観測されるかを調べた (Fig. 3-7)。好氣的条件下で光照射を行うと、 O_2^- が生じ、NO を消費してしまうと考えられたので、キュベットを密閉してアルゴンで溶液をバブリングした後に、光照射を行った。

Fig. 3-6 NO と Fe-DTC の反応と ESR スペクトルの変化

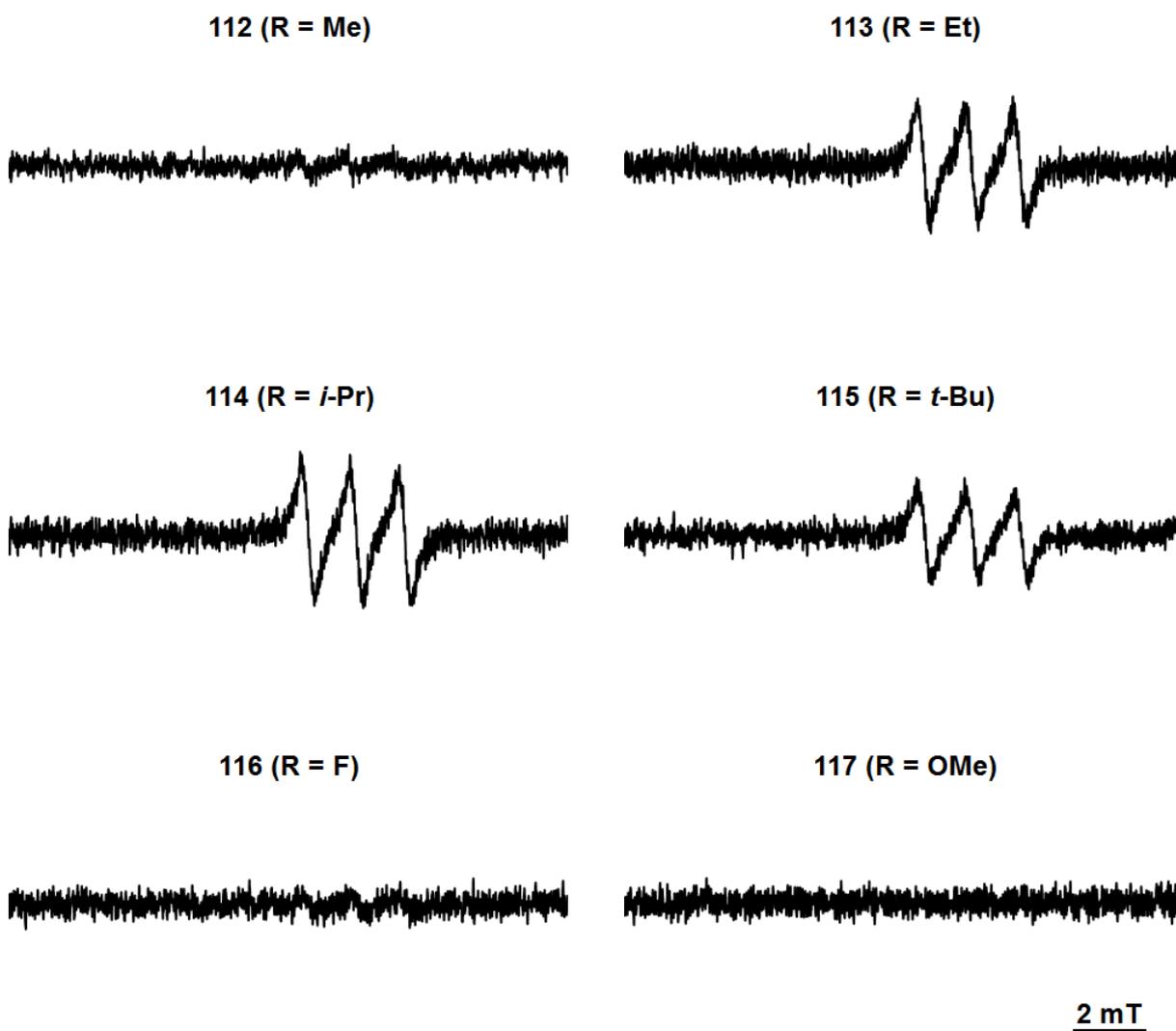


Fig. 3-7 112–117 と Fe-DTC の混合溶液への光照射後の ESR スペクトル；それぞれの化合物 (100 μM) と Fe-MGD (1.5 mM) のリン酸緩衝溶液 (10 mM, pH = 7.5) に 330–380 nm の光 (60 mW/cm^2) を 15 分間照射した。MGD: *N*-Methyl-D-glucamine dithiocarbamate

Fig. 3-7 に示すように、**113**、**114**、**115** で NO 由来のシグナルが観測された。この結果から、**113**、**114**、**115** が光照射によって、ONOO⁻ 放出の第一段階である NO 放出を起こす化合物であることが示唆された。

3-1-5 化合物 112–117 の光分解率の測定

次に、どの化合物が最も効率よく光分解するかを、HPLC を用いて調べた (Table 3-1)。それぞれの化合物の溶液に光照射を行い、光照射を行う前後の水溶液 (DMSO 1%) を HPLC で解析して、その分解率を算出した。

Table 3-1 化合物の光分解率

化合物(水酸基のオルト位の置換基)	分解率 (%)
112 (Me)	20
113 (Et)	40
114 (<i>i</i> -Pr)	98
115 (<i>t</i> -Bu)	98
116 (F)	42
117 (OMe)	14

Table 3-1 に示すように、**114** と **115** で多くの光分解が起こることが確認された。このことから、水酸基のオルト位に立体障害の大きい置換基の結合した化合物で多く光分解が起こるのではないかと考えた。そこで、**115** (**DiP-DNB**) を最も効率の良いドナーとし、以後の解析を行った。水酸基のオルト位の置換基の立体障害が大きいほど、分解効率が良い原因は以下のように考察した (Fig. 3-8、9、10)。

水酸基のオルト位の置換基の立体障害が大きいほど分解効率が良いということは、水酸基が周りの環境と何らかの相互作用をしており、それにより効率が低下していると考えられる。その原因として、水酸基と溶媒である水分子との水素結合ではないかと考察した。過去の報告から 2,6-dimethylnitrobenzene 誘導体のニトロ基とベンゼン環のねじれ角度はおよそ 45°と見積もられており¹⁰²、部分的に共役が起きていると考えられる。そして Fig. 3-8 のように、水分子の水素結合によって二重結合性が増大するのではないかと考えた。それにより、NO の放出に必要な亜硝酸エステルへの異性化反応が起こりにくくなっているのではないかと考えた。

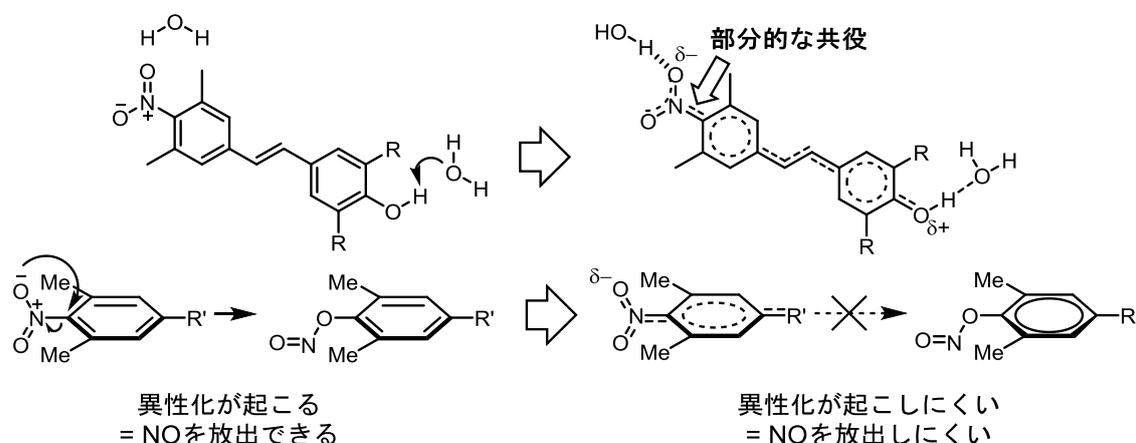


Fig. 3-8 予想される水素結合による化合物への影響

また、2,6-di-*tert*-butylphenol のように水酸基周辺に大きな立体障害を持つフェノール誘導体は、その立体障害のために O-H 結合が不安定化されており、一電子酸化され、プロトンを放出したフェノキシルラジカルが安定であることが知られている¹⁴⁰。Fig. 3-3 に示したように **DiP-DNB** は NO を生じた後、セミキノン型のラジカルになるが、この時、2,6-di-*tert*-butylphenol 構造がより安定なフェノキシルラジカルになる (Fig. 3-9, **118**)。この不安定な 2,6-di-*tert*-butylphenol 構造の分解を駆動力とすることも、分解率が大きい原因の一つであると考えられる。

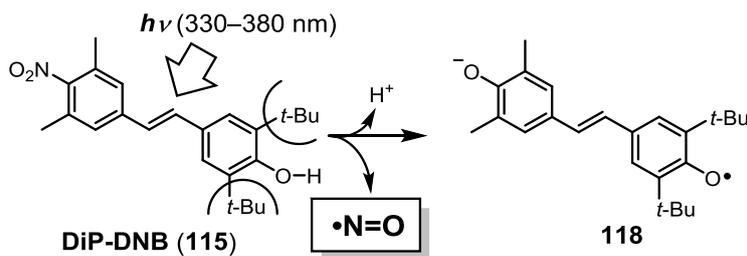


Fig. 3-9 **DiP-DNB** の分解による安定なラジカルの形成

また、**116** は中程度の分解率を示したにも関わらず、ESR で NO 由来のシグナルが観測されなかった。2-Halophenol (**119**) は光によって C-X 結合がホモリシスを起こして phenyl radical (**120**) になることが報告されており (Fig. 3-10)¹⁴¹、**116** は光によって NO 放出ではなく、この反応によって分解している可能性が考えられる。

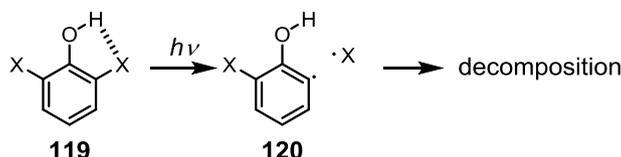


Fig. 3-10 2-Halophenol の光分解

3-1-6 蛍光プローブを用いた ONOO⁻の検出

次に、**DiP-DNB** から光照射によって ONOO⁻が発生するかを、ONOO⁻の特異的蛍光プローブである HKGreen-3¹²⁴ を用いて確認した。**DiP-DNB** と HKGreen-3 の混合溶液に光照射を行い、その蛍光強度を測定した。

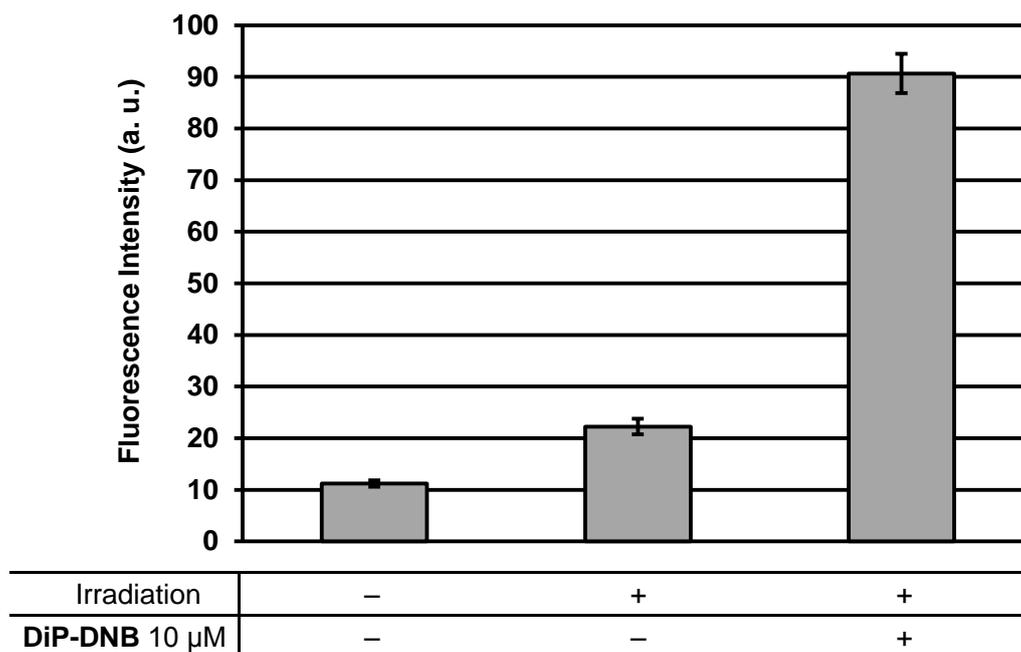


Fig. 3-11 HKGreen-3 による **DiP-DNB** からの ONOO⁻放出の確認；**DiP-DNB** (10 μM) と HKGreen-3 (10 μM) のリン酸緩衝溶液に 15 分間照射 (330–380 nm, 60 mW/cm²) を行った後、混合溶液の蛍光強度を測定した。励起光：520 nm、観察光：535 nm

Fig. 3-11 に示すように **DiP-DNB** と HKGreen-3 の溶液に光照射を行うと、コントロールと比較して蛍光強度が大きく増大した。このことから、**DiP-DNB** への光照射によって ONOO⁻が放出されることが示唆された。

3-1-7 Stilbenequinone 誘導体 **121** の合成

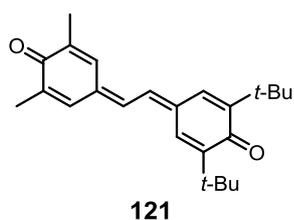
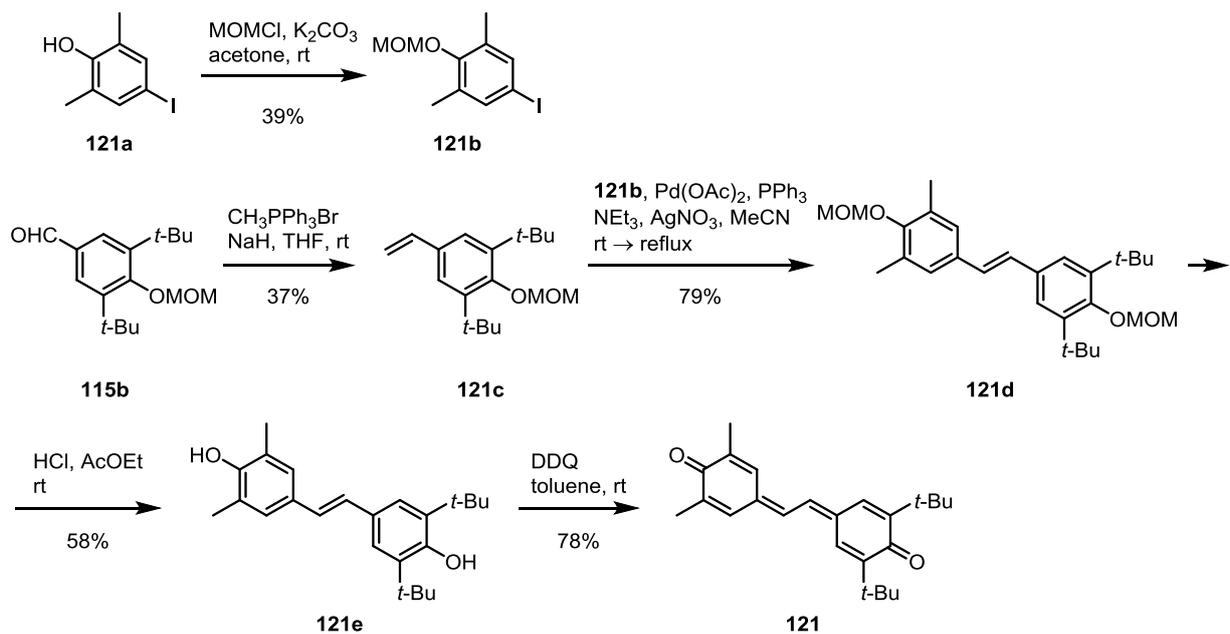


Fig. 3-12 **DiP-DNB** の予想される光分解物 **121**

もし **DiP-DNB** が予想通りの光分解をすれば、Fig. 3-12 に示す光分解物 **121** になるはずである。そこで、この **121** が生成しているかを調べた。

まず **121** の標品の合成を行った (Scheme 3-4)。4-ヨードフェノール誘導体 **121a** の水酸基を MOM 基で保護し、**121b** にした。**115b** に CH₃PPh₃Br を用いて Wittig 反応を行い、スチレン誘導体 **121c** にした。**121b** と **121c** を Heck 反応でカップリングさせて **121d** にし、MOM 基を 4 N HCl-AcOEt で脱保護して **121e** にした。**121e** を DDQ で酸化して **121** にした。



Scheme 3-4 光分解物 **121** の合成

3-1-8 HPLC による光分解物 **121** の検出

DiP-DNB の光分解後に、予想される分解物である **121** が検出されるかを、HPLC で調べた。**DiP-DNB** の溶液に光照射を行った後、溶液を HPLC で解析した (Fig.3-13、14)。

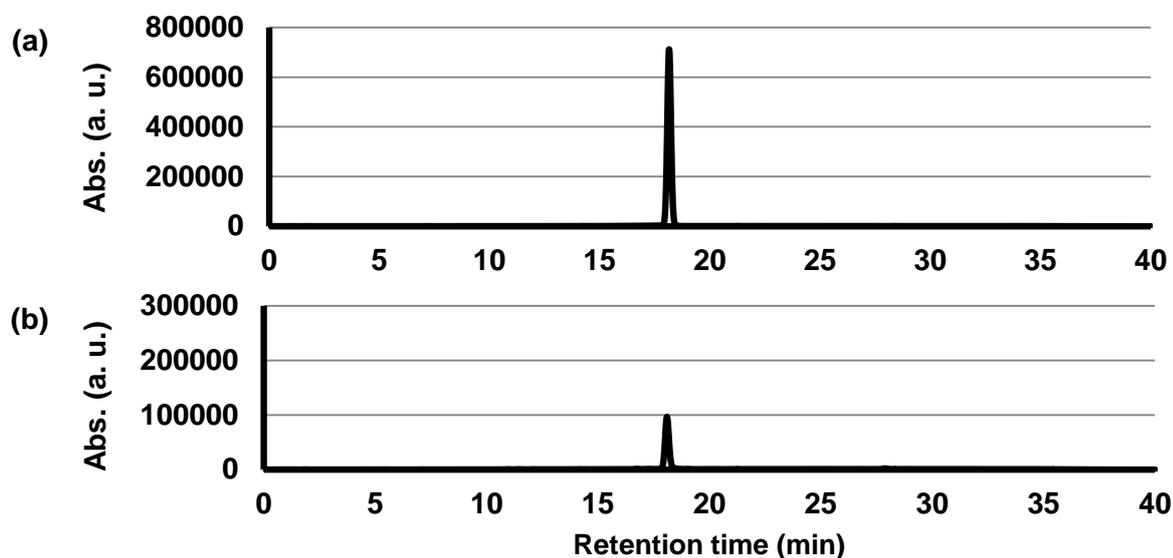


Fig. 3-13 HPLC による光分解物の解析: (a) **121** 100 μM の溶液のクロマトグラム; (b) **DiP-DNB** 100 μM に光照射を行った後のクロマトグラム。測定波長は 446 nm で測定した。

Fig. 3-13b に示すように、**DiP-DNB** の光照射後の溶液から標品の **121** のピーク (Fig. 3-13a) と同じ保持時間に検出された。吸収スペクトルも一致したことから (data not shown)、**DiP-DNB** が予想通りの光分解を起こしていることが示唆された。

さらに光照射後の分解物の解析を行ったところ、Fig. 3-14 に示すように、**112f**、**115a**、3,5-dimethyl-4-nitrobenzaldehyde (**122**) が検出された。この内、**112f** と **115a** は **121** に ONOO^- を反応させた後の溶液からも検出されたため、**DiP-DNB** から生じた ONOO^- が **121** と反応して生成したと考えられる。**122** は、**DiP-DNB** の stilbene 構造のオレフィンの部分が、溶存酸素による酸化開裂を起こして生成したものだと考えられる。また、検出された分解物の生成率の合計が 50% に満たないが、残りは生じる活性酸素等によって分解されたと考えられる。

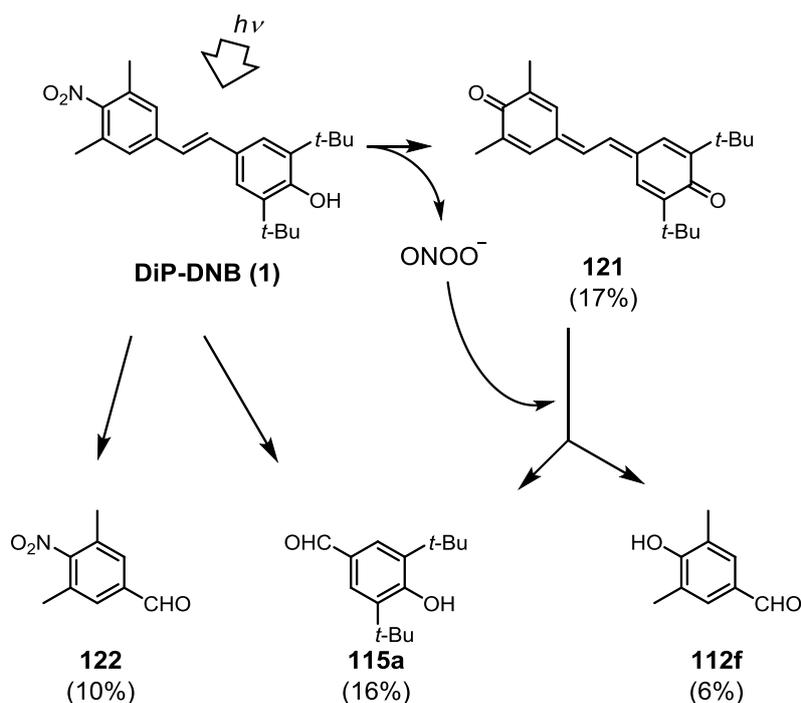


Fig. 3-14 **DiP-DNB** の光照射によって生じた分解物とその推測される反応経路。()内の数値は **DiP-DNB** からの生成率。

3-1-9 考察

以上のように、世界初の光制御型 ONOO^- ドナーである **DiP-DNB** を開発することに成功した。**DiP-DNB** が光照射によって NO を放出することを ESR スピントラッピング法で確認し、また、 ONOO^- を放出することを蛍光プローブ HKGreen-3 で確認した。さらに分解物の解析から、分子設計の際に想定した反応を起こしていることが示唆された。しかし、分解物の解析により **DiP-DNB** の光分解物が ONOO^- と反応することが示唆された。また、 ONOO^- の特徴的な反応であるチロシンのニトロ化は検出されなかった (data not shown)。そのため、生体系へ適用するには、より放出効率が高く、 ONOO^- と反応しないような構造を見出す必要性が示された。

3-2 N-Nitrosoaniline 構造を有する光制御型 ONOO⁻ドナーの開発

3-2-1 分子設計

より放出効率が高く、生体系にも適用可能な光制御 ONOO⁻ドナーを開発するために、高効率な光制御型 NO ドナーとして知られている BNNs (**123**) に着目した (Fig. 3-15)。BNNs は、紫外光照射によって N-N 結合がホモリシスを起こして最初の NO を放出し、不安定なラジカル中間体 **124** を経由して、次の NO を放出することが知られている¹⁰⁰。

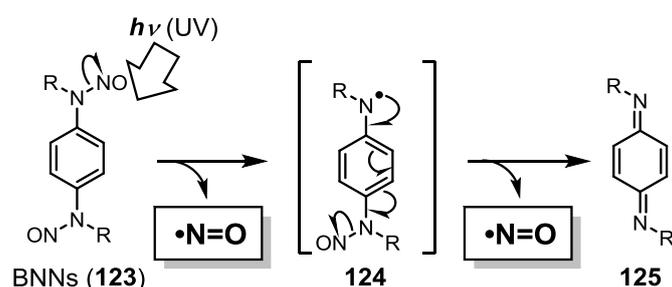


Fig. 3-15 光制御型 NO ドナー-BNNs の NO 放出機構

この BNNs に **DiP-DNB** の反応機構を適用し、水酸基を導入した化合物は以下のような反応を起こすと想定した (Fig. 3-16)。

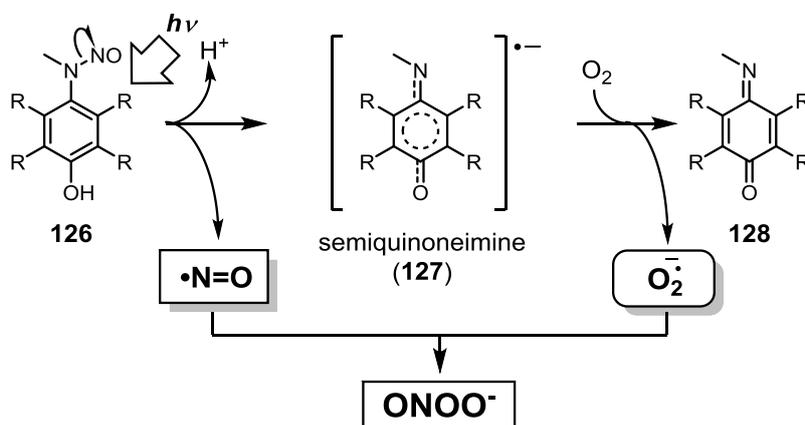


Fig. 3-16 新たな光制御型 ONOO⁻ドナーとその放出機構

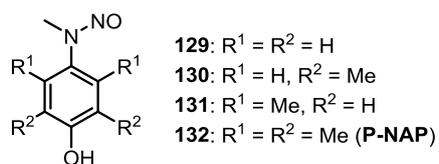


Fig. 3-17 設計した光制御型 ONOO⁻ドナー

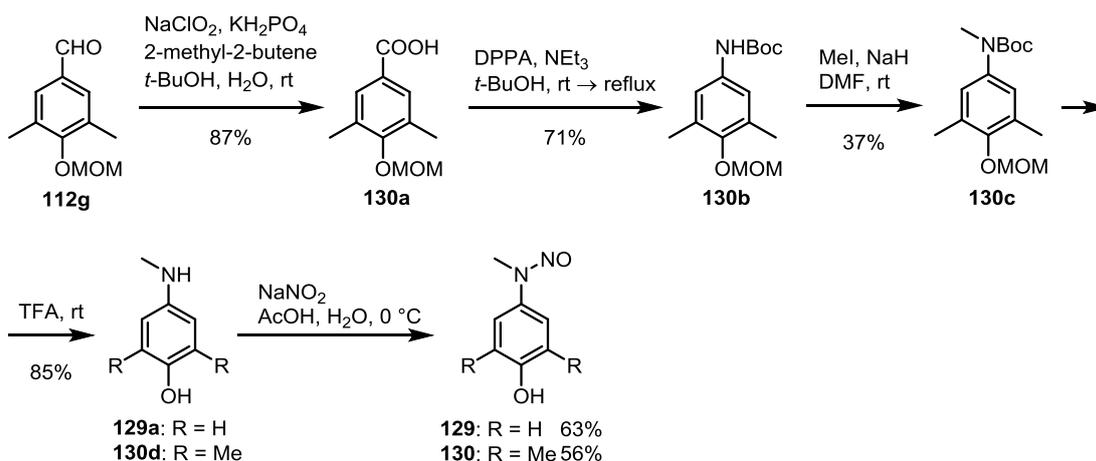
Fig. 3-16 に示す **126** に光照射を行うと、NO を放出して、semiquinoneimine **127** になると考えられる。これが系中の O₂ を一電子還元して O₂^{•-} にし、**128** になる。そして O₂^{•-} が先に生じた NO と反応して ONOO⁻ になると考えた。

このような反応を起こす化合物として、化合物 **129–132** を設計した (Fig.3-17)。DiP-DNB では、照射後の分解物であるキノン体が ONOO⁻と反応していることが示唆されたため、立体障害を増す目的で、ベンゼン環にはメチル基を導入した。このメチル基はベンゼン環の電子密度を上げ、semiquinoneimine **127** から O₂ への一電子移動を加速するためにも有用だと考えられる。**129–132** はそれぞれ、メチル基の置換位置、置換数を変えた化合物であり、メチル基の重要性を比較することができると考えた。

3-2-2 化合物 **129–132** の合成

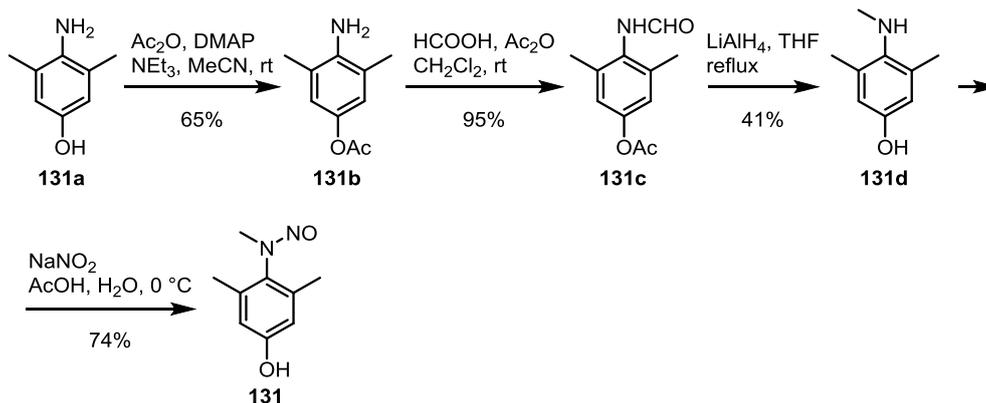
設計した化合物の合成を行った (Scheme 3-5、6、7)。

129、**130** を Scheme 3-5 に従って合成した。Benzaldehyde 誘導体 **112g** のホルミル基を亜塩素酸ナトリウムで酸化¹⁴²して **130a** にした。**130a** を Curtius 転位¹⁴³によって **130b** にし、*N*-メチル化を行い、**130c** にした。**130c** の Boc 基と MOM 基を TFA で脱保護して **130d** にし、これに *N*-ニトロソ化を行って **130** にした。また、**129** は市販の **129a** を *N*-ニトロソ化して得た。



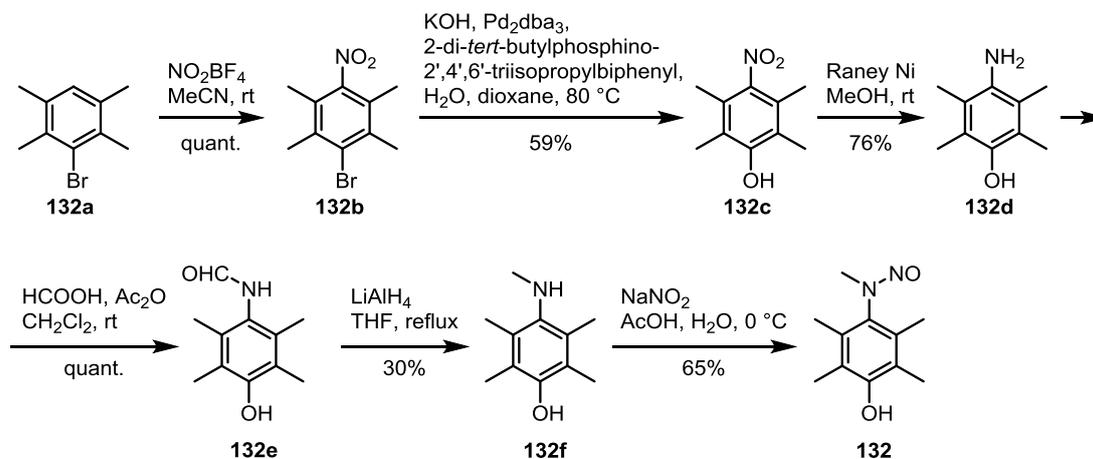
Scheme 3-5 **129**、**130** の合成

131 を Scheme 3-6 に従って合成した。4-Aminophenol 誘導体 **131a** の水酸基をアセチル化して **131b** にし、アミノ基をホルムアミド化して **131c** にした。**131c** を LiAlH₄ による還元で **131d** にし、**131d** の *N*-ニトロソ化を行って **131** にした。



Scheme 3-6 **131** の合成

132 は Scheme 3-7 に従って合成した。3-Bromo-4,5-dimethyl-*o*-xylene (**132a**) をニトロ化して **132b** にし、Pd₂dba₃ を用いた水酸基導入反応¹⁴⁴を行い、**132c** にした。**132c** のニトロ基を Raney Ni で還元して **132d** にし、Ac₂O と HCOOH から発生させた混合酸無水物でホルムアミド化して **132e** にした。**132e** を LiAlH₄ による還元で **132f** にし、**132f** の *N*-ニトロソ化を行って **132** にした。



Scheme 3-7 **132** の合成

3-2-3 化合物 **129–132** の吸光スペクトルの測定

照射光の波長を決定するために、**129–132** の吸光スペクトルを測定した (Fig. 3-18)。

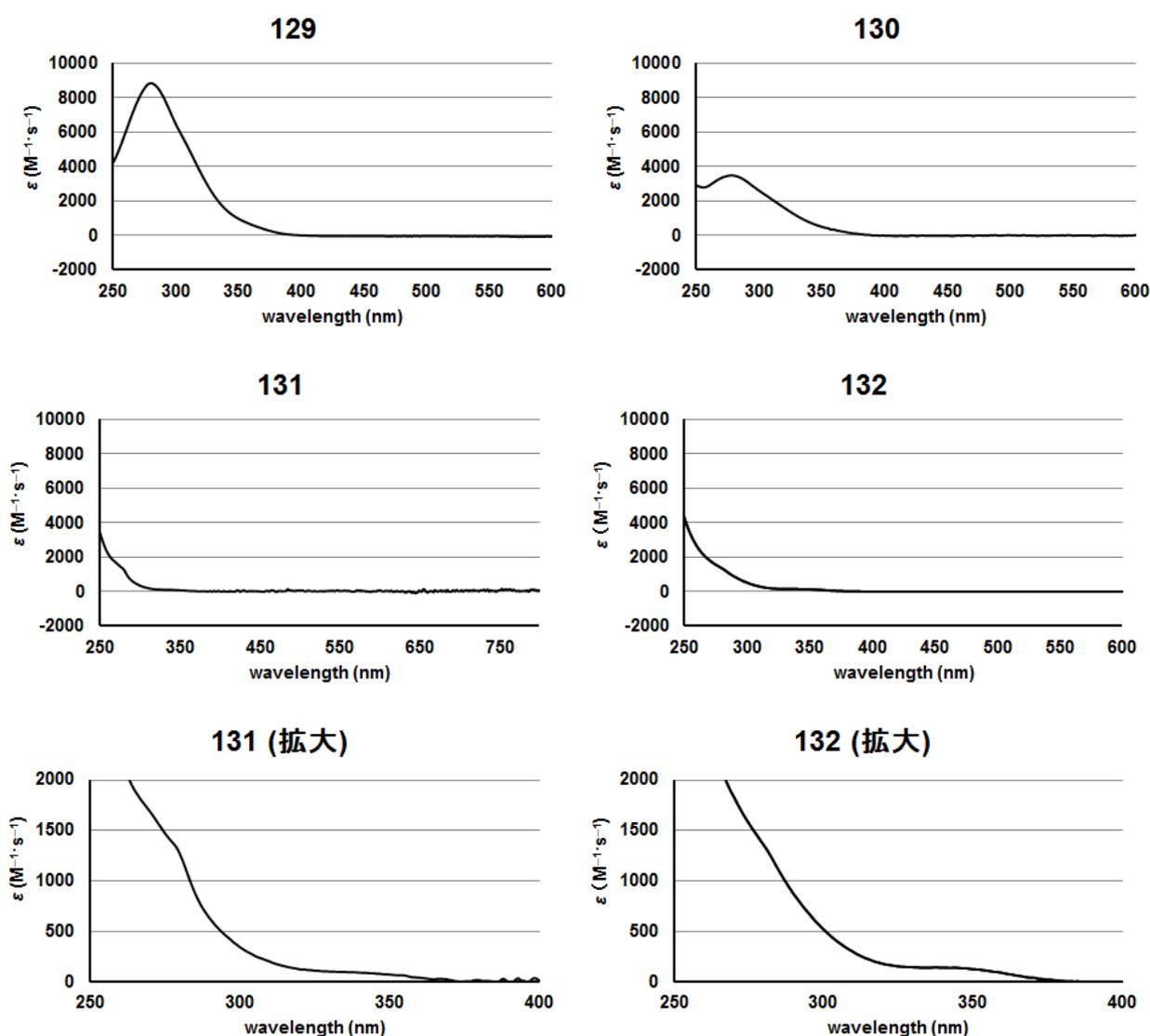


Fig. 3-18 **129–132** の吸光スペクトル：いずれも DMF 0.1% を含む水溶液として測定した。

Fig. 3-18 に示すように、いずれの化合物も 350 nm 付近まで弱いながらも吸収を有していたため、**DiP-DNB** の場合と同様、光源である蛍光顕微鏡 Olympus BX-60 の高圧水銀ランプに、330–380 nm のバンドパスフィルターを装着し、**129–132** への光照射を行うことにした。

3-2-4 ESR スピントラッピング法を用いた NO 放出の確認

合成した化合物が光照射によって ONOO⁻ 発生の第一段階である NO の放出を起こすかを、**DiP-DNB** の場合と同様、Fe-DTC による ESR スピントラッピング法で調べた¹¹¹。

129–132 のいずれかの化合物と Fe-DTC の混合溶液に、O₂⁻ の影響を防ぐ目的でキュベットを密閉してアルゴンでバブリングした後に、330–380 nm の光照射 (60 mW/cm²) を 15 分間行い、1 GHz ESR で 330 mT 付近の ESR スペクトルを測定した。

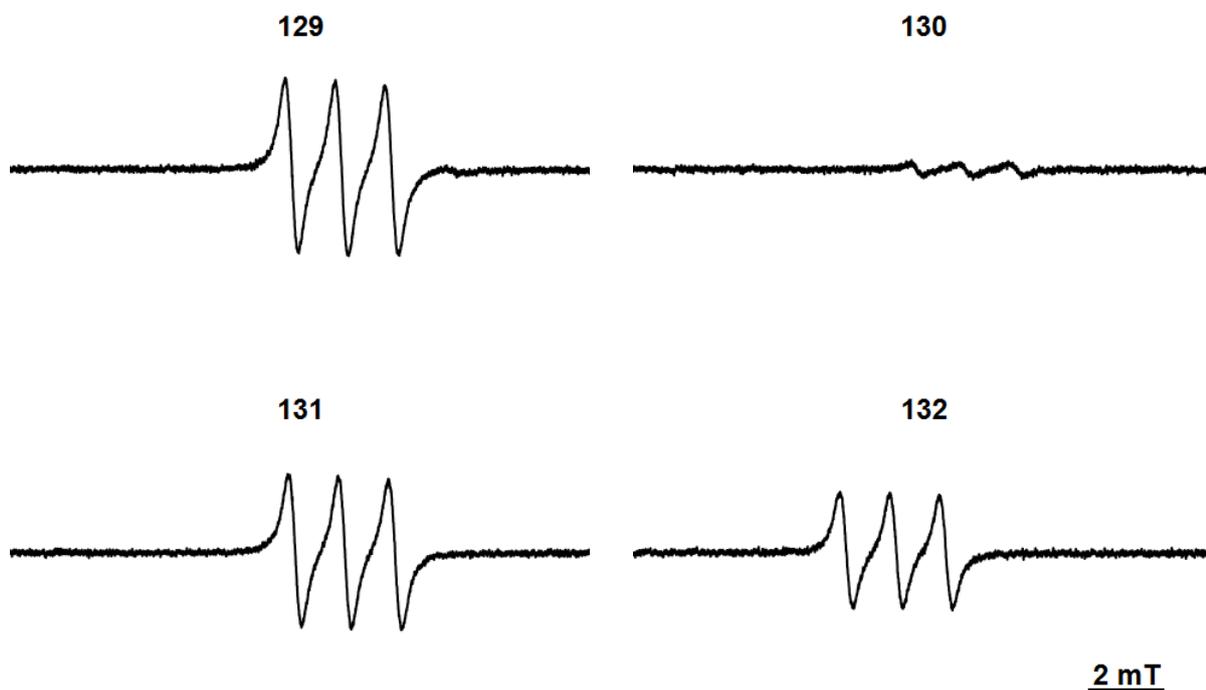


Fig. 3-19 **129–132** と Fe-DTC の混合溶液への光照射後の ESR スペクトル；それぞれの化合物（100 μM ）と Fe-MGD（1.5 mM）を含むリン酸緩衝溶液（10 mM、pH = 7.0）に 330–380 nm の光（60 mW/cm^2 ）を 15 分間照射した。MGD: *N*-Methyl-D-glucamine dithiocarbamate

Fig. 3-19 に示すように、強度に差はあるものの、いずれの化合物でも NO-Fe-DTC 由来のシグナルが観測され、330–380 nm の光照射によって ONOO⁻放出の第一段階である NO 放出が起こることが示唆された。**130** を用いた際のシグナルが特に小さかった。これは、*N*-nitroso-4-aminophenol の 3 位が特に反応性が高く、また、**129** と比べて **130** はメチル基が二つ置換しているために電子密度が高く、生じた NO とのラジカルカップリングによる C-N 結合形成など、意図する反応とは別の反応が 3 位で起きたためだと考えられる。

3-2-5 蛍光プローブを用いた ONOO⁻の検出

129–132 から ONOO⁻が放出されるかを、HKGreen-3 を用いて確認した（Fig. 3-20）。

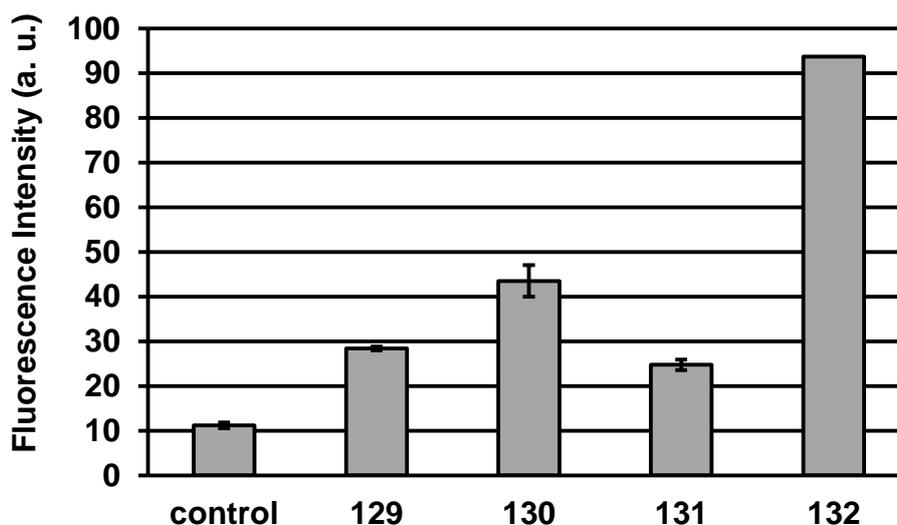


Fig. 3-20 HKGreen-3 を用いた ONOO⁻発生量の比較；それぞれの化合物 (10 μM) と HKGreen-3 (10 μM) のリン酸緩衝溶液に 15 分間光照射 (330–380 nm、60 mW/cm²) を行った後、溶液の蛍光強度を測定した。励起光：520 nm、観察光：535 nm

Fig. 3-20 に示すように、**132** が最も効率よく ONOO⁻を放出することが示唆された。この結果から、*N*-nitrosoaminophenol 構造を持つ光制御 ONOO⁻ドナーにおけるベンゼン環上のメチル基の重要性が示唆された。

132 が最も効率が良い ONOO⁻ドナーであると示唆されたため、以下の実験は **132 (P-NAP)** を用いて行った。

3-2-6 O₂⁻の影響の検討

NO を ESR スピントラッピング法で、また ONOO⁻を蛍光プローブ法で検出したので、次に O₂⁻の検出を試みた (Fig. 3-21)。しかし、DEPMPO (**133**)¹⁴⁵、BESSo (**134**)¹⁴⁶ MitoSOX Red (**135**)¹⁴⁷ のいずれの O₂⁻プローブを用いた場合でも、O₂⁻を検出することはできなかった (data not shown)。

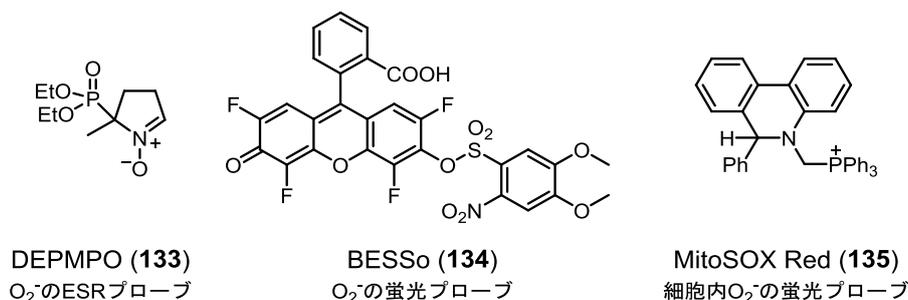


Fig. 3-21 検出に用いた O₂⁻のプローブ

これは、NO と O_2^- の反応速度が $6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ と非常に早いためだと考えられた。このため、NO が発生している状況下で O_2^- を検出することは困難と考えられる。そこで、 O_2^- の発生に影響を与えるような条件下で NO、ONOO⁻ の検出を行い、間接的に O_2^- の発生を証明することを考えた。

まず、NO の検出における O_2^- の影響を調べた (Fig. 3-22)。Fig. 3-19 の ESR スペクトルは、アルゴン雰囲気下で光照射を行って得られたものであるが、好氣的条件下で光照射を行えば、系中の O_2 から O_2^- が生じて NO と反応するため、NO は検出されなくなるはずである。また、好氣的条件下で光照射を行っても、SOD が添加されていれば O_2^- が消去されるため、NO が検出されるはずである。そこで、**P-NAP** と Fe-DTC の混合溶液に、好氣的条件下での光照射および好氣的条件下で SOD を添加しての光照射を行い、ESR 測定を行った。

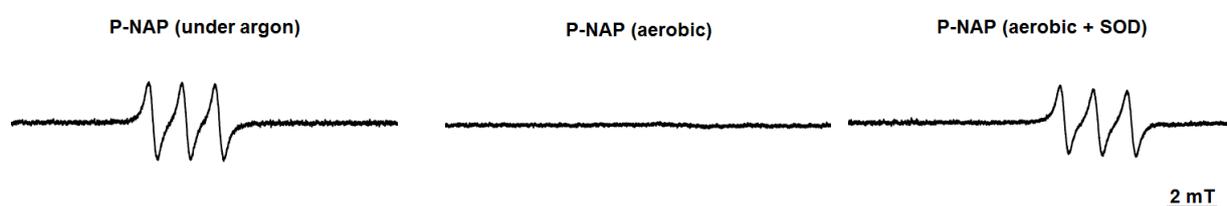


Fig. 3-22 **P-NAP** と Fe-DTC の混合溶液への光照射後の ESR スペクトル；それぞれの化合物 (100 μM) と Fe-MGD (1.5 mM) のリン酸緩衝溶液 (10 mM, pH = 7.0) に 330–380 nm の光 ($60 \text{ mW}/\text{cm}^2$) を 15 分間照射した；(左) アルゴン雰囲気下で光照射を行った；(中) 好氣的条件下で光照射を行った；(右) SOD 1 kU/mL を加え、好氣的条件下で光照射を行った。MGD: *N*-Methyl-D-glucamine dithiocarbamate

Fig. 3-22 に示すように、**P-NAP** に好氣的条件下で光照射を行うと NO-Fe-DTC のシグナルは観測されず、好氣的条件下で SOD を添加して光照射を行うと NO-Fe-DTC のシグナルは観測された。このことから、好氣的条件下で光照射を行うと O_2^- が発生し、NO の検出に影響を与えるということが示唆された。

次に HKGreen-3 を用いた ONOO⁻ の検出を、同様の条件下で行った (Fig. 3-23)。**P-NAP** にアルゴン雰囲気下で光照射を行えば O_2^- が形成されないため、ONOO⁻ は検出されない。また、好氣的条件下で SOD を添加して光照射を行えば、形成された O_2^- が不均化されるため、ONOO⁻ が検出されないと予測した。

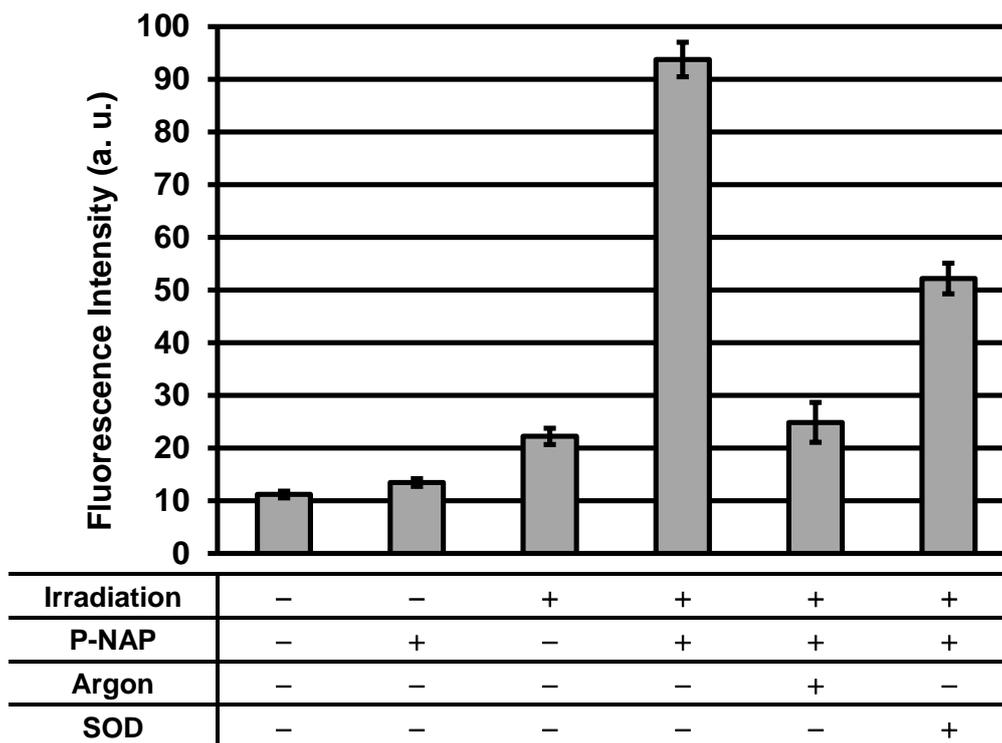


Fig. 3-23 HKGreen-3 を用いた ONOO⁻発生量の比較 ; **P-NAP** (10 μM) と HKGreen-3 (10 μM) のリン酸緩衝溶液に 15 分間照射 (330–380 nm、60 mW/cm²) を行った後の溶液の蛍光強度を測定した。SOD は 1 kU/mL 添加した。励起光 : 520 nm、観察光 : 535 nm

Fig. 3-23 に示すように、アルゴン雰囲気下で照射を行うと、蛍光強度の増大は抑制され、ONOO⁻は発生していないことが示唆された。また、好氣的条件下で SOD を添加して照射を行うと、SOD を加えなかった場合と比べ、蛍光強度の増大が抑制された。これらの結果から、**P-NAP** への照射によって系中の O₂ 依存的に O₂⁻を形成し、ONOO⁻を発生していることが示唆された。

以上の結果より、O₂⁻を直接検出することはできなかったが、その発生に影響を与える条件下での測定から、O₂⁻が発生していることが間接的に示唆された。

3-2-7 自発分解型 ONOO⁻ドナーSIN-1 との比較

最も ONOO⁻を放出していることが示唆された **P-NAP** と、自発分解型 ONOO⁻ドナーSIN-1 との ONOO⁻発生量の比較を行った (Fig. 3-24、25)。ONOO⁻の発生量の比較は、HKGreen-3 による蛍光強度の増大の度合いを比較することによって行った。

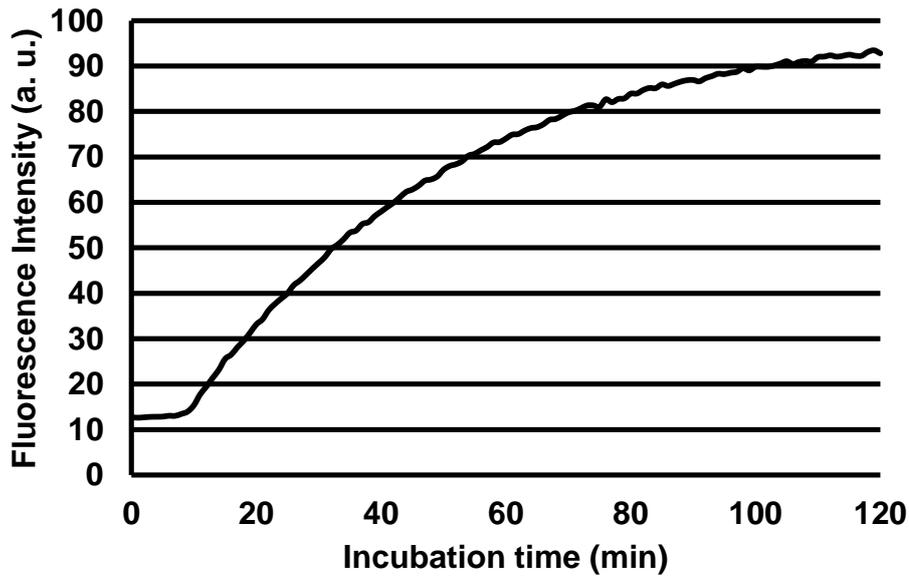


Fig. 3-24 HKGreen-3 を用いた SIN-1 からの ONOO⁻ 発生の確認; SIN-1 (10 μM) と HKGreen-3 (10 μM) のリン酸緩衝溶液の蛍光強度の変化を追跡した。励起光 : 520 nm、観察光 : 535 nm

Fig. 3-24 に示すように、SIN-1 と HKGreen-3 の混合溶液の蛍光強度は時間依存的に増大した。また、ONOO⁻ の標品を用いて作成した検量線との比較により、10 μM の SIN-1 から最大で 5.1 μM の ONOO⁻ を放出することが示唆された。

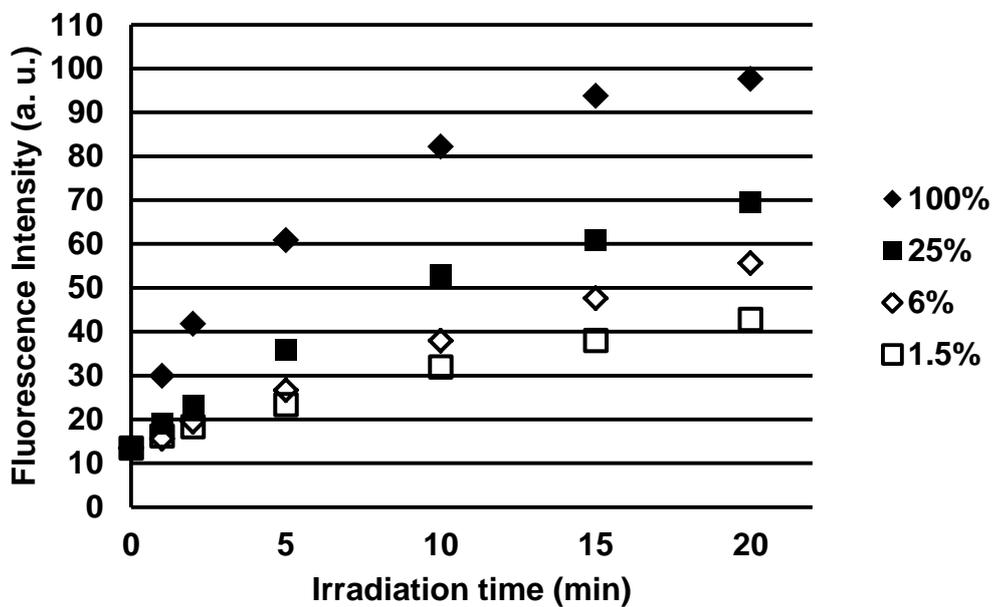


Fig. 3-25 HKGreen-3 を用いた P-NAP からの ONOO⁻ 発生の確認 ; P-NAP (10 μM) と HKGreen-3 (10 μM) のリン酸緩衝溶液に光照射を行った後、溶液の蛍光強度を測定した。凡例に示した%の値は 60 mW/cm² を 100% とした時の照射光強度。励起光 : 520 nm、観察光 : 535 nm

Fig. 3-25 に示すように、**P-NAP** と HKGreen-3 の混合溶液の蛍光強度は照射時間依存的に増大した。また、ONOO⁻の標品を用いて作成した検量線との比較により、10 μM の **P-NAP** から最大で 4.6 μM の ONOO⁻を放出することが示唆された。

以上のように ONOO⁻の放出量は、**SIN-1** の方がわずかに多いことが示唆された。しかし、**P-NAP** は **SIN-1** と異なり、照射光強度によって ONOO⁻の放出速度を制御可能であるだけでなく、発生させる ONOO⁻の量の時空間制御が可能である。この 2 点に関しては、**SIN-1** より優れていると言える。

3-2-8 チロシン誘導体のニトロ化反応の確認

ONOO⁻の特徴的な反応として、タンパク質中のチロシン残基のニトロ化反応が知られている。そこで、*N*-acetyltyrosine ethyl ester (Ac-Tyr-OEt) を用いてこのニトロ化反応が起こるかを調べた (Fig. 3-26)。

P-NAP と Ac-Tyr-OEt の混合溶液に光照射を行い、HPLC でニトロ化生成物 (Ac-nitroTyr-OEt) の検出を試みた。

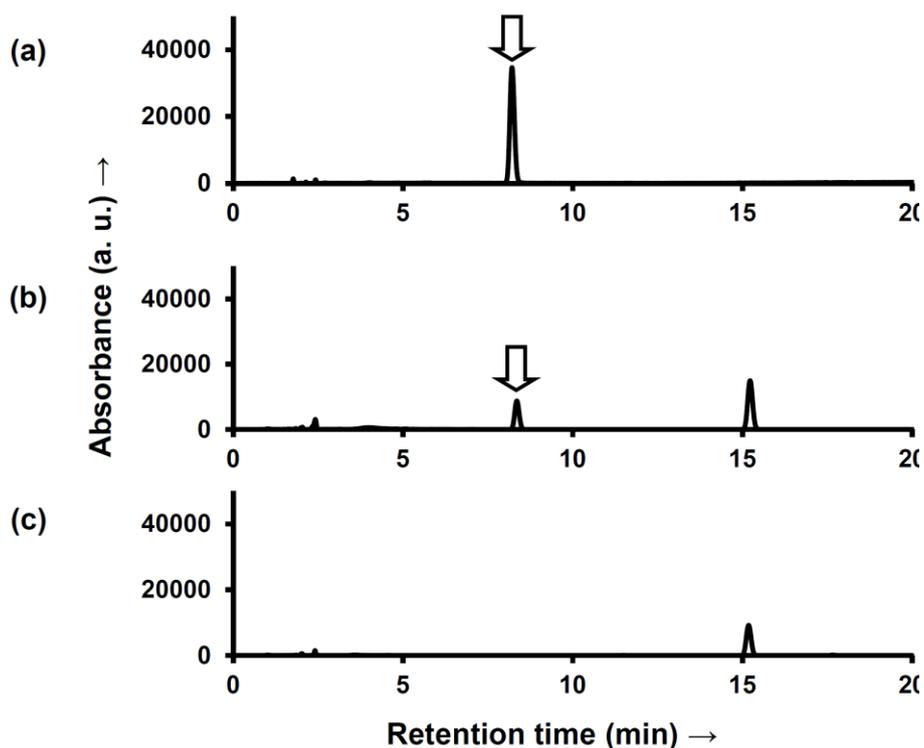


Fig. 3-26 HPLC によるニトロ化チロシンの検出 ; (a) Ac-nitroTyr-OEt 100 μM ; (b) **P-NAP** 1 mM と Ac-Tyr-OEt 1 mM を含むリン酸緩衝溶液に 15 分間光照射後 (330–380 nm、60 mW/cm²) ; (c) クロマトグラム (b) と同じ成分の溶液を密封し、アルゴンでバブリングした後に光照射後。

Fig. 3-26b に示すように、Ac-Tyr-OEt のニトロ化体が検出され、**P-NAP** から生じた ONOO⁻によって Ac-Tyr-OEt のニトロ化が起きたことが示唆された。また、アルゴン雰囲気下で同

様の光照射を行うと、Ac-nitroTyr-OEt は検出されなかった (Fig. 3-26c)。このことから、系中の O_2 依存的に ONOO⁻ が発生し、ニトロ化が起きたことが示唆された。

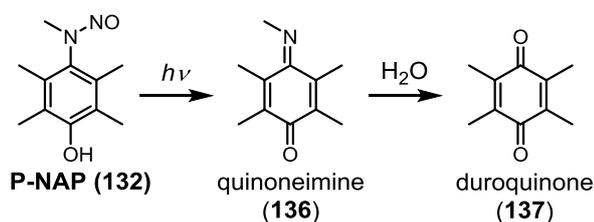


Fig. 3-27 検出された分解物と予想される生成経路

また、保持時間 15 分付近に新たなピークが検出されたが、これは標品との比較により、2,3,5,6-tetramethylbenzoquinone (duroquinone, **137**) のピークであることが確認された (Fig. 3-27)。これ以外に目立ったピークは確認できなかったため、**137** が **P-NAP** の主な光分解物と考えられた。**137** は、**P-NAP** の光分解によって生じた quinoneimine (**136**) が加水分解されて生じたものであると考えられた。Benzoquinone 誘導体は生体内で酸化還元酵素からの電子の漏れ出しを促進して O_2^- を産生する、もしくは生体内の求核剤の攻撃を受けやすいために毒性を示すことが知られている。しかし、duroquinone は 4 つのメチル基が置換しているために電子密度が高く、電子受容能が低い。さらにメチル基の立体障害のために求核攻撃を受けづらい構造である。これらの理由から、duroquinone は benzoquinone の中でも毒性の低いものであると報告されており¹⁴⁸、**P-NAP** の光分解物として生じて、生体に与える影響は低いと考えられる。

3-2-9 P-NAP の反応量子収率の測定

P-NAP の反応量子収率 Φ の測定を行った (Table 3-2、3、4)。反応量子収率とは、ある分子が光子を吸収して励起された際、目的の反応を起こす確率であり、光反応の起こりやすさの指標として用いられる。測定する基質の光分解反応を測定する場合は、溶液の吸光度が大きく変化しない数%程度分解する時点での総光子数、総分解量を測定するのが一般的である。**P-NAP** の光分解物である duroquinone (**137**) の生成量を HPLC で測定し、その生成量子収率 Φ_{DQ} を測定した。

まず、**P-NAP** の溶液に蛍光分光光度計の光源を用いて 334 nm の光照射を行い、分解物である **137** が **P-NAP** の総量に対して 5% ほど生成する時間を検討したところ、15 分間とわかった。その条件で光照射を行い、**137** の生成量を測定した (Table 3-2)。

Table 3-2 生成した **137** の定量

	137 Peak area (A. U.)	137 (μ M)	137 (μ mol)
平均	125969.7	6.180597	0.002472
標準偏差	8849.023	0.510796	0.000204

P-NAP 100 μ M (400 μ L) を光分解させた。測定は 3 回行った。ピーク面積は次式に従って濃度に換算した : $y = 17324x + 18897$ (y: peak area, x: concentration of DQ)

次に、**P-NAP** の溶液が吸収した光の光子数を求めた。まず照射した光子数を $K_3Fe(C_2O_4)_3$ によるアクチノメーター¹⁴⁹ を用いて求め、**P-NAP** の吸光度から溶液が吸収した光子数 N_{hv} を求めた (Table 3-3)。

Table 3-3 照射した光子数 N_{hv}

	N_{hv} (μmol)
平均	0.174663
標準偏差	0.01338

実験は3回行った。

Table 3-3 に照射した光子数を示した。**P-NAP** の 334 nm における吸光度 (ϵ) は $144 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ であることから、Table 3-3 の値より溶液が吸収した光子数 N_{abs} は $2.87 \times 10^{-3} \mu\text{mol}$ となる。この値と、Table 3-2 の値より、**P-NAP** の 334 nm の量子収率 Φ_{DQ} は 0.86 ± 0.07 と算出された (Table 3-4)。

Table 3-4 **P-NAP** の量子収率 Φ_{DQ}

	DQ (μmol)	Produced 13 (μmol) N_{abs} (μmol)
平均	0.002472	0.86081
標準偏差	0.000204	0.07114

3-2-10 DNA 切断能の確認

ONOO⁻は強力な酸化活性を有し、DNA 鎖を切断することが知られている⁸³。**P-NAP** を用いて DNA 鎖切断が確認できるかを調べた (Fig. 3-28)。

P-NAP と pBR322 プラスミド DNA の混合溶液に光照射を行い、電気泳動で切断された DNA の観察を行った。

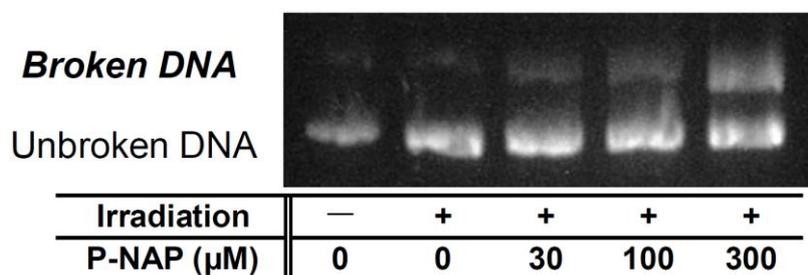


Fig. 3-28 **P-NAP** による DNA 鎖切断能の確認 ; **P-NAP** と pBR322 プラスミド DNA (0.04 mg/mL) のリン酸緩衝溶液に光照射を行い、電気泳動後、臭化エチジウムで染色して蛍光観察を行った。

Fig. 3-28 に示すように、**P-NAP** への光照射によって DNA 鎖切断が起こることが示された。また、この DNA 切断能は **P-NAP** の用量依存的に増大した。このことから、**P-NAP** から生じる ONOO⁻は DNA などの生体成分とも反応しうることが示唆された。

3-2-11 細胞内での ONOO⁻放出の制御

培養細胞内で **P-NAP** の ONOO⁻放出を制御できるかを、HKGreen-3 のアセチル化体である HKGreen-3A を用いて調べた (Fig. 3-29)。

ヒト結腸癌細胞株 HCT116 に HKGreen-3A と **P-NAP** を投与し、光照射後、共焦点蛍光顕微鏡で細胞内の蛍光観察を行った。

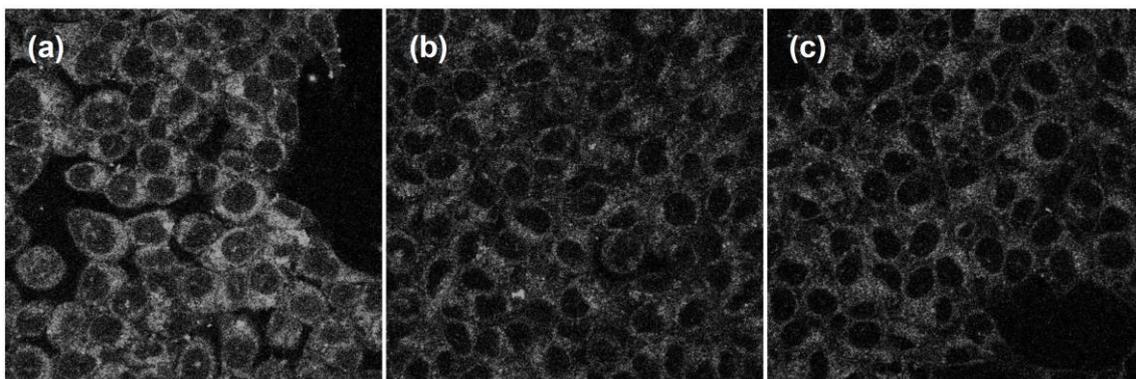


Fig. 3-29 **P-NAP** を用いた細胞内での ONOO^- 放出制御の確認；(a) **P-NAP** 10 μM 、HKGreen-3A 10 μM を HCT116 に投与し、15 分間光照射を行った；(b) **P-NAP** 10 μM 、HKGreen-3A 10 μM を HCT116 に投与し、15 分間暗所で放置した；(c) HKGreen-3A 10 μM を HCT116 に投与し、15 分間光照射を行った。

Fig. 3-29 に示すように、**P-NAP** を投与して光照射を行った細胞 (Fig. 3-29a) では蛍光増大が観察され、光照射を行わなかった場合 (Fig. 3-29b)、もしくは **P-NAP** 非共存化で光照射を行った場合 (Fig. 3-29c) には蛍光増大が観察されなかった。このことから、**P-NAP** は細胞内でも光照射依存的に ONOO^- の発生をコントロールできる化合物であることが示唆された。

3-2-12 考察・結論

以上のように、**DiP-DNB** の反応機構を基にした新たな光制御型 ONOO^- ドナー **P-NAP** を開発した。

P-NAP は 330–380 nm の光照射によって NO 、 ONOO^- を放出することを ESR スピントラッピング法、蛍光プローブ法を用いて確認した。 O_2^- 生成を直接検出することはできなかったが、 O_2^- の発生に影響を与えるような条件下での ESR 測定、蛍光測定から、 O_2^- が発生していることが間接的に示唆された。また、**P-NAP** は ONOO^- に特徴的な反応の一つであるチロシン誘導体のニトロ化反応を引き起こした。これは **DiP-DNB** では起こすことのできなかった反応であり、骨格変換の重要性が示唆された。さらに **P-NAP** は DNA 鎖の切断、細胞内での ONOO^- 放出も可能であった。

129–131 は HKGreen-3 の蛍光増大は **P-NAP** と比べて小さく、 ONOO^- 放出能は低いと考えられ、いずれの化合物もチロシン誘導体のニトロ化反応を起こさなかった (data not shown) ことから、このタイプの光制御型 ONOO^- ドナーにおけるベンゼン環上のメチル基の重要性が示唆された。このメチル基は、電子密度の上昇による O_2^- 形成の加速¹³⁵、 ONOO^- の分解物であるキノンへの求核付加反応⁵⁴を防ぐ効果を持つものと推測される。

P-NAP の 334 nm の量子収率は 0.86 であり、この波長で効率よく光分解を起こすことが示された。334 nm は **P-NAP** のモル吸光係数が非常に小さい波長であるが、わずかにこの領域に吸収極大を有する。ベンゼン環の $\pi \rightarrow \pi^*$ の電子遷移の波長よりも長波長側に表れる弱い吸収は、 $n \rightarrow \pi^*$ の電子遷移に特徴的な吸収であることが知られている。このことから、334

nm の光は N-NO の $n \rightarrow \pi^*$ の電子遷移を直接光励起しており、このために高い量子収率を示したと考えられる。

3-3 光誘起電子移動反応に基づく可視光制御型 NO ドナーの開発

3-3-1 光誘起電子移動反応について

可視光制御型 NO ドナーの開発について説明する前に、光誘起電子移動反応 (photoinduced electron transfer: PeT) について概説する (Fig. 3-30)。

PeT とは、ある色素が光励起された際、その低エネルギー半占有分子軌道 (lower singly occupied molecular orbital: lower SOMO) に近傍の電子密度の高い置換基から一電子移動が起こる反応のことである。この反応は光エネルギーを電子移動反応の駆動力に転換でき、光合成中心においても利用されている¹⁵⁰。また、これによって生じる電荷分離状態 (charge separated state) を利用すれば電流を生み出せるため、太陽電池にも応用されている (光起電力効果)¹⁵¹。

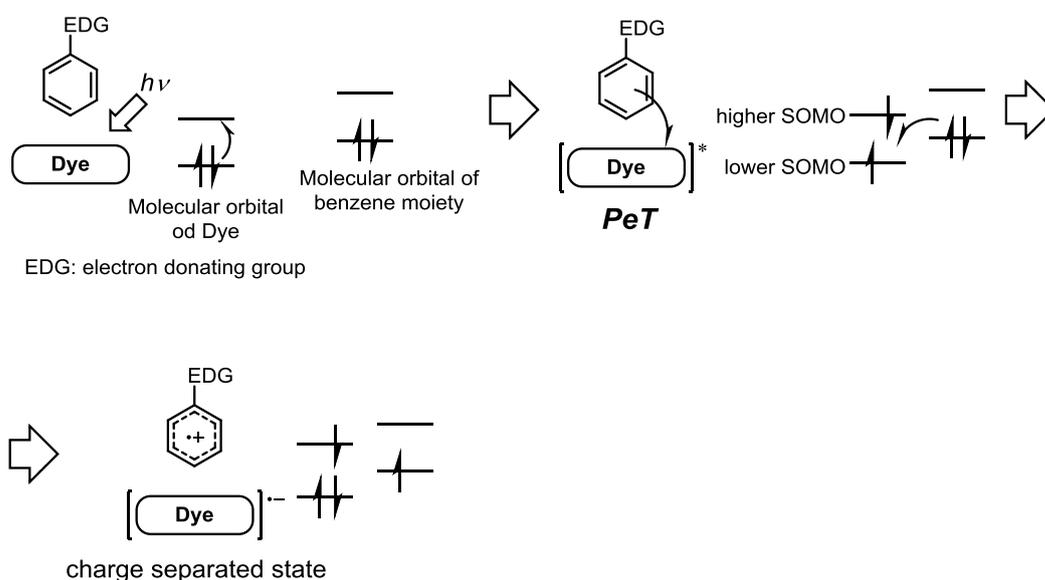
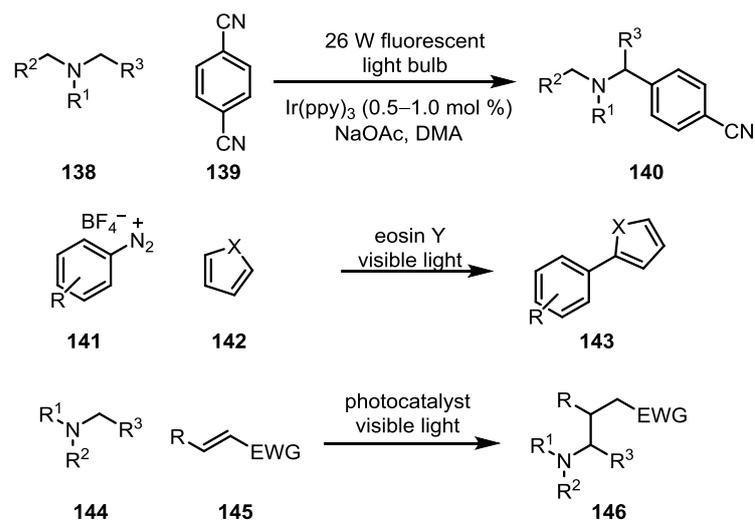


Fig. 3-30 PeT の想定される反応機構

PeT により形成される電荷分離状態を利用した合成反応も開発されている (Scheme 3-8)。以下に示した反応は色素が一電子酸化還元触媒となり、C-C 結合の形成を行う反応である。光励起された $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ は **138** から **139** への一電子移動を触媒し、形成したラジカルペアがカップリングを起こして **140** になる¹⁵²。光励起された eosin Y は **141** を一電子酸化してフェニルラジカルを生じ、これと **142** がカップリングして **143** になる¹⁵³。**144** は光触媒によって一電子酸化され、これがオレフィン (**145**) とカップリングして **146** になる¹⁵⁴。



Scheme 3-8 PeT を利用した C-C 結合形成反応の例

また蛍光分子において PeT が起こると、蛍光放出の過程とは別の緩和過程を経由するため、蛍光が減弱することが知られている (Fig. 3-31)。このことを利用した蛍光プローブが数多く開発されている。Fig. 3-31 にはその一例を示した。

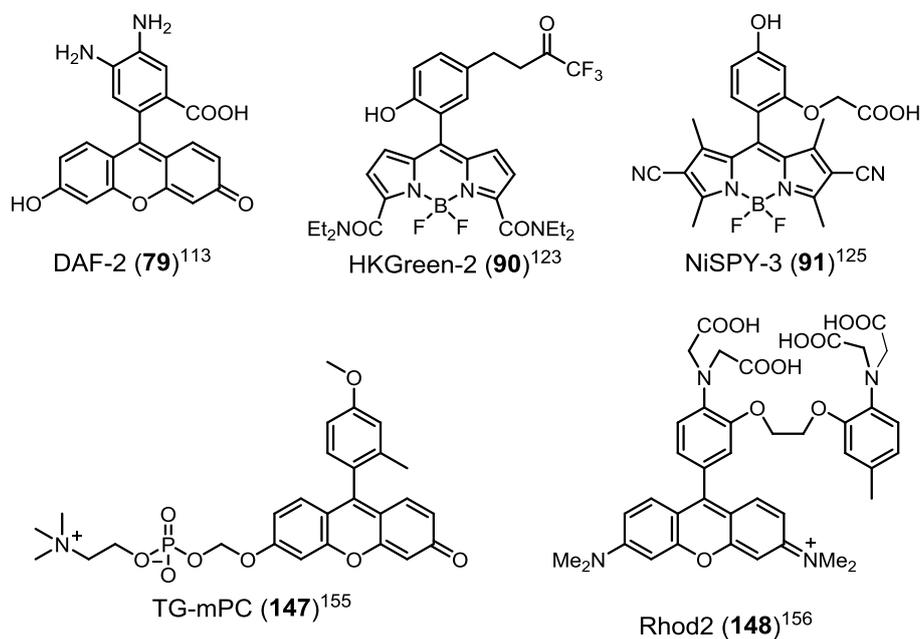


Fig. 3-31 PeT を利用した蛍光プローブの例

このように PeT は、光によって分子の一電子酸化還元を制御することができることから、様々な分野で応用されている。

3-3-2 分子設計

可視光で制御可能な NO ドナーを開発するために、紫外光制御型 NO ドナーとして知られている BNNs (**123**) に着目した。BNNs の 1 分子目の NO は光エネルギーによって **123** の N-N 結合がホモリシスを起こして放出されるが、2 分子目の NO 放出は光エネルギーによってではなく、不安定なラジカル中間体 **124** が熱力学的に安定なキノン体 **125** になる際のエネルギー差を駆動力として起きていると考えられている¹⁰⁰。そこで、ラジカル中間体 **124** と同様の酸化状態を可視光によって作り出すことができれば、BNNs の 2 分子目の NO 放出と同様の機構で、N-N 結合がホモリシスを起こして NO を放出すると考えた。

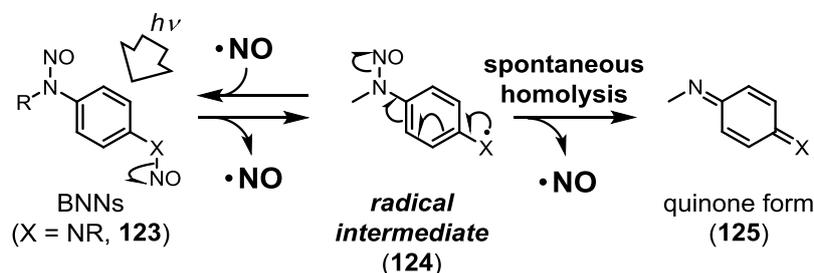


Fig. 3-32 想定される BNNs の NO 放出機構

そのような酸化状態を作り出すための反応として、分子内 PeT に着目した。前述したように、PeT とはある吸光団の近傍に電子密度の高い置換基が存在する場合、吸光団を光励起すると電子密度の高い置換基から、励起された吸光団に一電子移動が起こる反応のことである。

分子内 PeT を応用した光制御型 NO ドナーの反応として、以下に示す反応を想定した (Fig. 3-33)。N-Nitrosoaminophenol 構造を組み込んだ色素 **149** の色素部分を光励起すると、色素部分が励起状態 **150** になり電子密度の高い N-nitrosoaminophenol 部から色素部分へ一電子移動反応が起こると考えられる。この結果生じたラジカル **151** は、ラジカル中間体 **124** と同様の電子状態であり、安定なキノン体 **152** の形成を駆動力として NO を放出すると考えられる。結果として、このような構造の分子は色素の励起波長で制御可能な NO ドナーになると考えた。

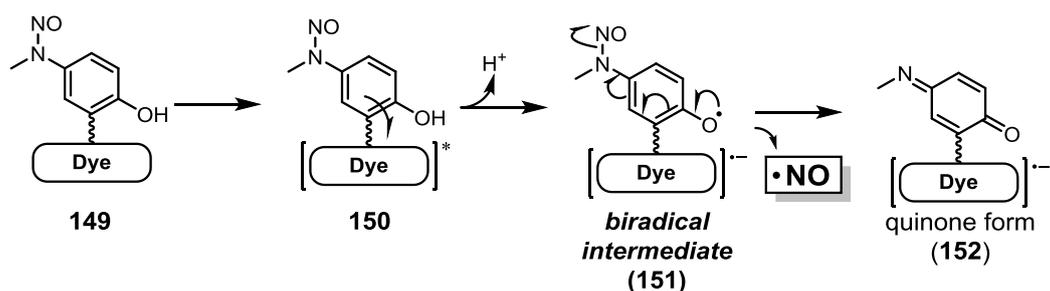


Fig. 3-33 PeT をトリガーとした新たな光制御 NO ドナーの、想定される反応機構

この考え方にに基づき、新たな可視光制御型 NO ドナーとして、Fig. 3-34 に示す **NOBL-1 (153)** を設計した。NO 放出部位として *N*-nitrosoaminophenol 構造を用い、色素部位として青色光領域に強い吸収を有する蛍光分子である BODIPY を用いた。BODIPY には、ラジカルアニオン中間体を安定化させるためにシアノ基を導入した。また、BODIPY は水溶性が低い蛍光分子であるため、水溶性を上昇させる目的で NO 放出部位にカルボキシ基を導入した。

比較化合物として、NO 放出部位を持たない化合物 **154** を設計した。

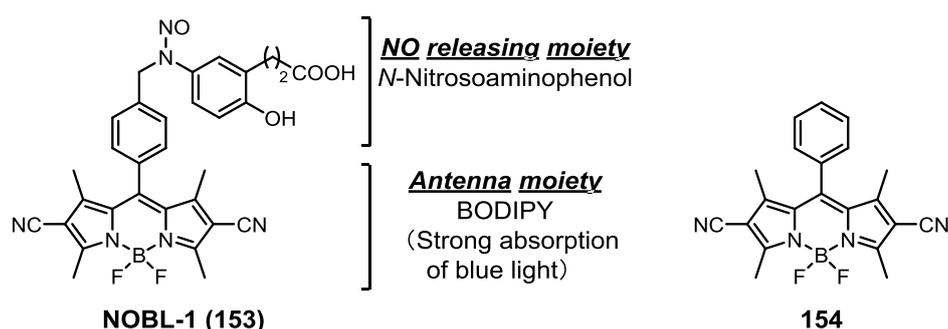
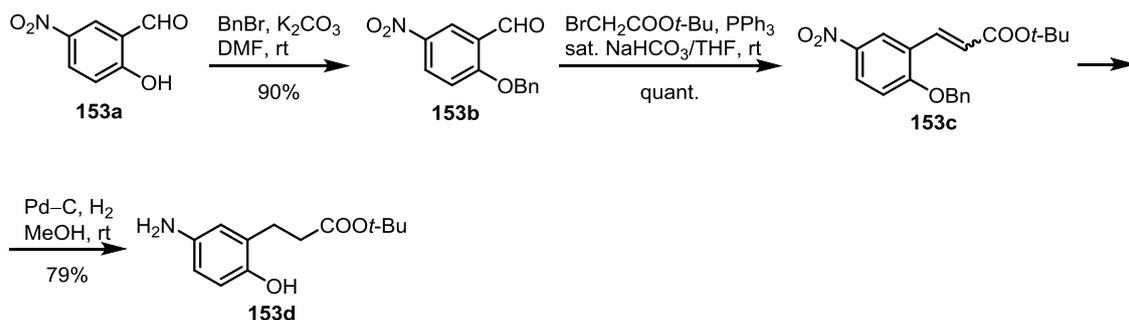


Fig. 3-34 設計した可視光制御 NO ドナー **NOBL-1** と比較化合物 **154**

3-3-3 NOBL-1、化合物 154 の合成

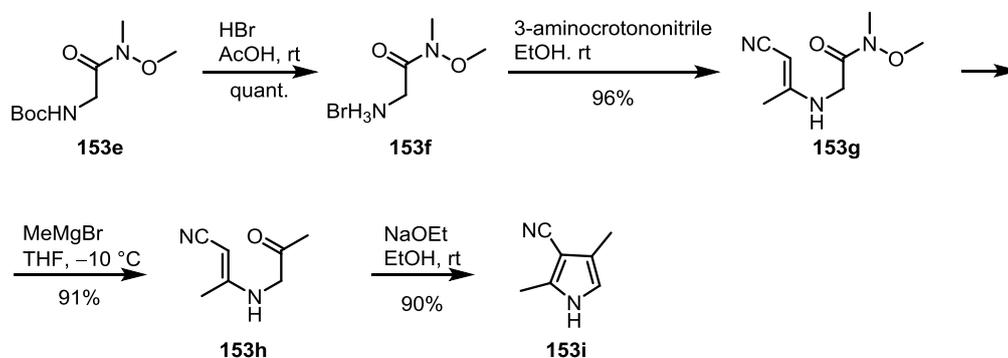
NOBL-1 の合成を行った (Scheme 3-9、10、11)。

まず Scheme 3-9 に従い、アミノフェノール誘導体 **153d** を合成した。ヒドロキシベンズアルデヒド誘導体 **153a** の水酸基をベンジル基で保護して **153b** にし、Wittig 反応でケイ皮酸誘導体 **153c** にした¹⁵⁷。**153c** を接触還元でオレフィンとニトロ基の還元、ベンジル基の脱保護を行い、**153d** にした。



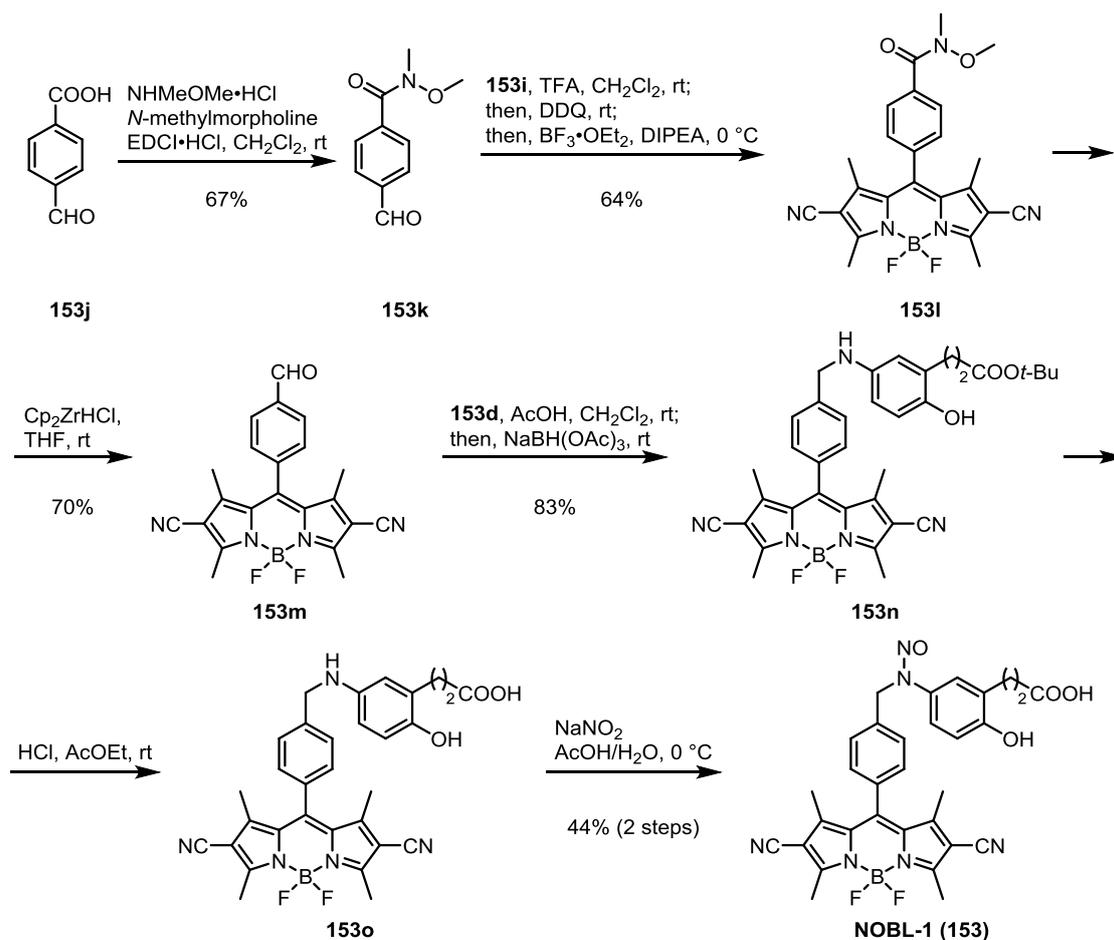
Scheme 3-9 アミノフェノール誘導体 **153d** の合成

次に Scheme 3-10 に従い、シアノピロール誘導体 **153i** を合成した¹²⁵。グリシン誘導体 **153e** の Boc 基を酸で脱保護して **153f** にし、**153f** と 3-aminocrotononitrile と反応させて **153g** にした。**153g** を MeMgBr と反応させて **153h** にし、**153h** を NaOEt で環化させて **153i** にした。



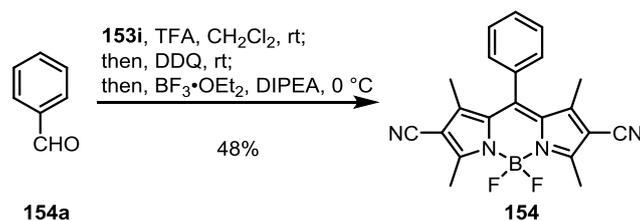
Scheme 3-10 シアノピロール誘導体 **153i** の合成

さらに Scheme 3-11 に従い、**NOBL-1** を合成した。Terephthalaldehydic acid (**153j**) と *N,N'*-dimethylhydroxylamine を縮合させて **153k** にした。**153k** と酸性条件下での **153i** との縮合、DDQ による酸化、BF₂ の挿入反応をワンポットで行い、**153l** を得た。**153l** のアミドを Schwartz 試薬で還元¹⁵⁸してアルデヒド **153m** にし、**153m** と **153d** で還元的アミノ化を行い、**153n** を得た。**153n** の *t*-Bu エステルを酸で脱保護して **153o** にし、**153o** を *N*-ニトロソ化して **NOBL-1** にした。



Scheme 3-11 **NOBL-1** の合成

また、比較化合物である **154** を合成した (Scheme 3-12)。Benzaldehyde (**154a**) と **153i** の酸性条件下での縮合、DDQ による酸化、BF₂ の挿入をワンポットで行い、**154** を得た。



Scheme 3-12 **154** の合成

3-3-4 吸光スペクトルと蛍光スペクトルの測定

NOBL-1、**154** の吸光スペクトルと蛍光スペクトルの測定を行った (Fig. 3-35)。**154** は水溶性が低かったため、DMSO 中でスペクトルの測定を行った。

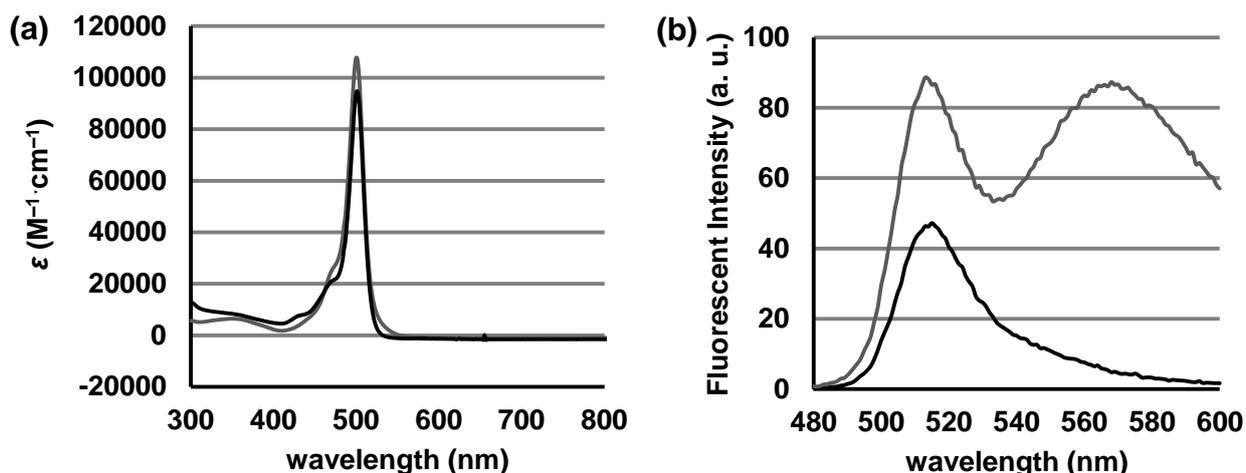


Fig. 3-35 吸収スペクトルと蛍光スペクトルの比較（黒線：NOBL-1、灰色線：154）；(a) 吸収スペクトル；(b) 蛍光スペクトル（励起光 500 nm）

Fig. 3-35a に示すように、NOBL-1 と 154 のいずれからも BODIPY 構造由来と考えられる 500 nm 付近の強い吸収が観測された。また、NOBL-1 の 500 nm 付近の強い吸収は水溶液においても観測された。このことから、NOBL-1 の NO 放出のための光源として、Xe ランプ光源に 470–500 nm のバンドパスフィルターを装着したものをを用いることとした。

吸収スペクトルでは、NOBL-1 と 154 はほぼ同じスペクトルを示したが、蛍光スペクトルでは、NOBL-1 の蛍光発光は 154 と比べ減弱していることが示された (Fig. 3-35b)。蛍光団において PeT が起こると、蛍光を生じる過程とは別の過程での無輻射失活が起こることから、蛍光が減弱することが知られている¹⁵⁹。このことから、NOBL-1 において分子内 PeT が起きていることが示唆された。また、154 の DMSO 溶液は 580 nm 付近にも蛍光極大が観測されたが、これは 154 のエキシマー由来の蛍光であると考えられる。

3-3-5 ESR スピントラッピング法を用いた NO 放出の確認

NOBL-1 が可視光によって NO を放出することを、Fe-DTC を用いた ESR スピントラッピング法で確認した (Fig. 3-36)¹¹¹。

NOBL-1 と Fe-DTC の溶液に 470–500 nm の光照射を行い、1 GHz ESR で 330 mT 付近のスペクトルを測定した。また、NOBL-1 の NO 放出部位の構造のみを有する *N*-methyl-*N*-nitroso-4-aminophenol (Fig. 3-37, 129) についても同様に 470–500 nm で NO を放出するかを調べた。

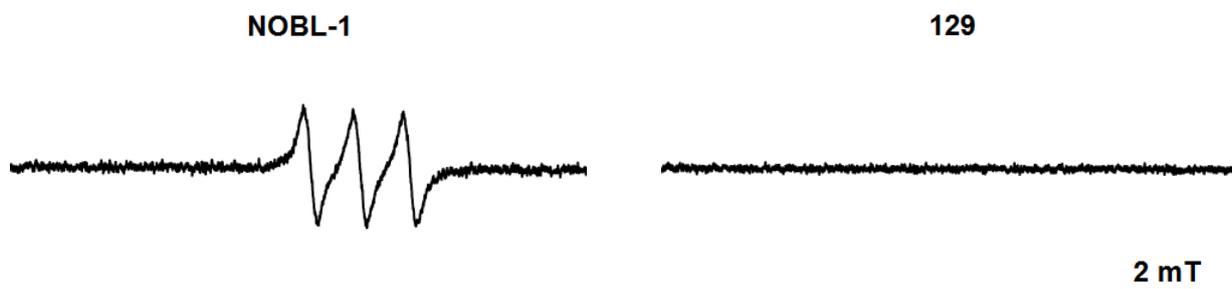


Fig. 3-36 化合物と Fe-DTC の溶液への光照射後の ESR スペクトル；それぞれの化合物（100 μM ）と Fe-MGD（1.5 mM）のリン酸緩衝溶液（10 mM、pH = 7.0、DMF 1%）に 470–500 nm の光（200 mW/cm^2 ）を 15 分間照射した；（左）**NOBL-1** 100 μM の溶液に光照射後のスペクトル；（右）**129** 100 μM の溶液に光照射後のスペクトル：MGD: *N*-Methyl-D-glucamine dithiocarbamate

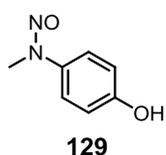


Fig. 3-37 **129** の構造

Fig. 3-36 に示すように、**NOBL-1** の溶液に光照射を行ったところ、NO-Fe-DTC 由来のシグナルが観測され、**NOBL-1** が 470–500 nm の光照射によって NO を放出することが示唆された。一方、**NOBL-1** の NO 放出部位に相当する構造を有する **129** の溶液に 470–500 nm の光照射を行ったが、NO-Fe-DTC 由来のシグナルは観測されなかった。このことから、**NOBL-1** の光吸収部位である BODIPY 構造の重要性が示唆された。

3-3-6 NO 放出量の定量

NOBL-1 が NO を放出することが示唆されたため、その放出量を測定した (Fig. 3-38, Table 3-5)。

自発分解型 NO ドナーである NOC7 は効率よく 2 当量の NO を放出することが知られている⁹⁸。そこで NO の蛍光プローブである DAR-4M¹¹⁴ と、自発分解型の NO ドナーである NOC7 を用いて検量線を作成した (Fig. 3-38)。そして、**NOBL-1** が 100% 分解される条件下で **NOBL-1** と DAR-4M の混合溶液に光照射を行い、その蛍光強度を測定し、検量線と比較することによって NO 放出量の測定を行った (Table 3-5)。

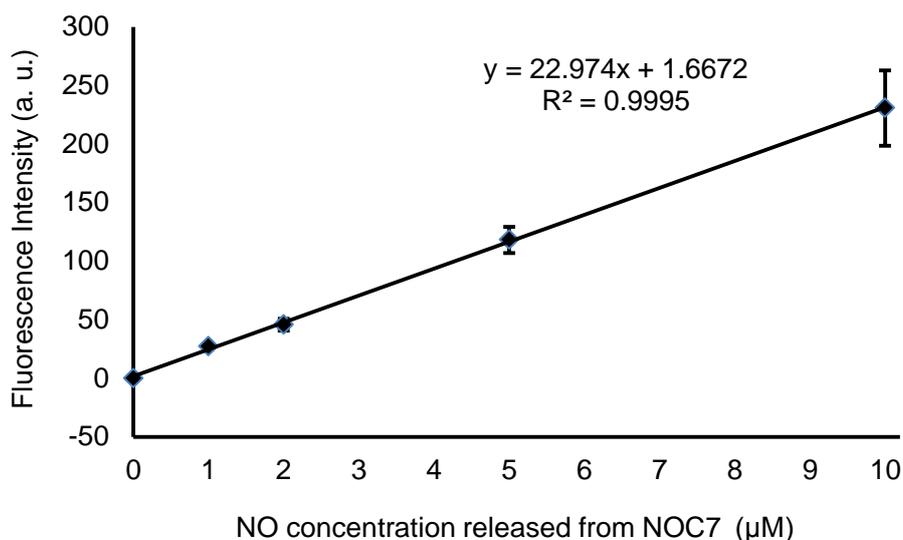


Fig. 3-38 NOC7 と DAR-4M による検量線；励起光 560 nm、観察光 575 nm

Table 3-5 **NOBL-1** から生じる NO の定量

NOBL-1 の濃度	平均	標準偏差
0 μM	5.329	0.729
10 μM	181.998	25.862
(10 μM の値)-(0 μM の平均値)	176.669	25.862
NO 濃度に換算 (μM)	7.62	1.13

Fig. 3-38 と Table 3-5 の結果より、10 μM の **NOBL-1** から最大で 7.6 μM の NO を放出することが分かった。

3-3-7 NO 放出の時間制御

NOBL-1 により NO の放出が時間制御可能かを、DAR-4M を用いて調べた (Fig. 3-24)。

DAR-4M と **NOBL-1** の混合溶液に断続的に 470–500 nm の光照射を行いながら、DAR-4M の蛍光測定を行った。

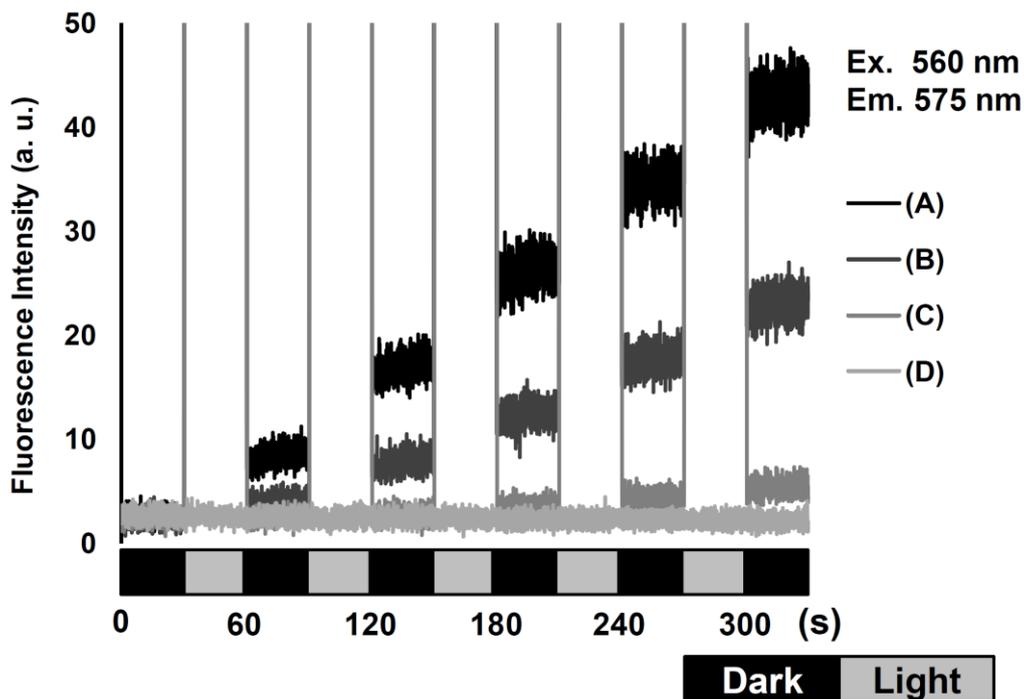


Fig. 3-24 DAR-4M の蛍光強度の時間変化：DAR-4M と **NOBL-1** の溶液に 470–500 nm の光照射を断続的に行った (Dark : 470–500 nm 光照射なし、Light : 470–500 nm 光照射あり)；光照射強度は (A) を 100%として、(B) 50%、(C) 20%、(D) 0%

Fig. 3-24 に示すように、**NOBL-1** と DAR-4M の混合溶液に断続的に 470–500 nm の光照射を行ったところ、光照射時間依存的に蛍光強度が増大した。また、この蛍光強度増大は照射する 470–500 nm の光強度に依存して増減した。この結果から、照射光の照射時間、光強度によって **NOBL-1** からの NO 放出量を制御可能なことが示唆された。

3-3-8 細胞内での NO 放出の空間制御

NOBL-1 を用いて、細胞内で NO の放出が空間制御可能かを調べた (Fig. 3-25)。

ヒト胎児腎由来細胞 HEK293 に DAR-4M のアセトキシメチルエステル体である DAR-4M AM¹⁴ と **NOBL-1** を投与し、共焦点蛍光顕微鏡のアルゴンレーザー (488 nm) で、Fig. 3-25a のサークルの内側に部分的に光照射を行い、蛍光観察を行った。Fig. 3-25b、d はそれぞれ、光照射前後の明視野の画像である。

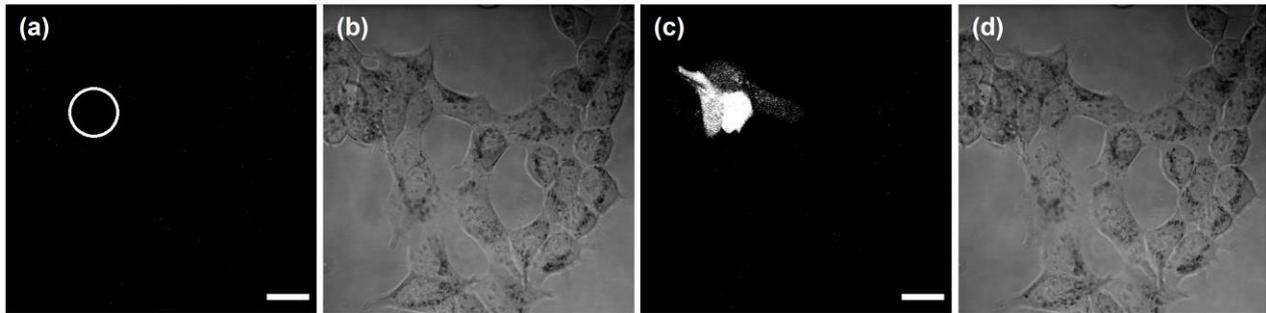


Fig. 3-25 DAR-4M AM を用いた HEK293 細胞内での **NOBL-1** による NO 放出制御の検討：(a) 照射前の蛍光画像；(b) 照射前の明視野画像；(c) (a) のサークル内にアルゴンレーザー（488 nm）で照射後の蛍光画像；(d) (a) のサークル内に照射後の明視野画像。Scale bar = 20 μ m

Fig. 3-25c に示すように、レーザー照射を行った周辺のみで NO の放出を示す蛍光強度の増大が観察された。**NOBL-1** を加えなかった細胞では、このような蛍光は観測されなかったことから、**NOBL-1** から放出された NO によって蛍光強度の増大が起きたと考えられる。

このことから、**NOBL-1** を用いて NO の放出を培養細胞系内で空間制御可能なことが示された。

3-3-9 **NOBL-1** を用いた血管弛緩の制御

NO は血管平滑筋の soluble guanylate cyclase (sGC) を活性化させることにより cGMP の産生を促進し、血管平滑筋を弛緩させることが知られている³⁵。この血管平滑筋弛緩作用を、**NOBL-1** を用いて制御可能かを調べた (Fig. 3-26)。

ラットの大動脈切片をマグヌス管内に設置し、内因性の NO 合成を抑制するために NOS の阻害剤である L-NAME (L-nitroarginine methyl ester)¹⁶⁰ を投与した。ノルアドレナリンで血管を収縮させ、**NOBL-1** を投与した後に断続的に照射を行った。

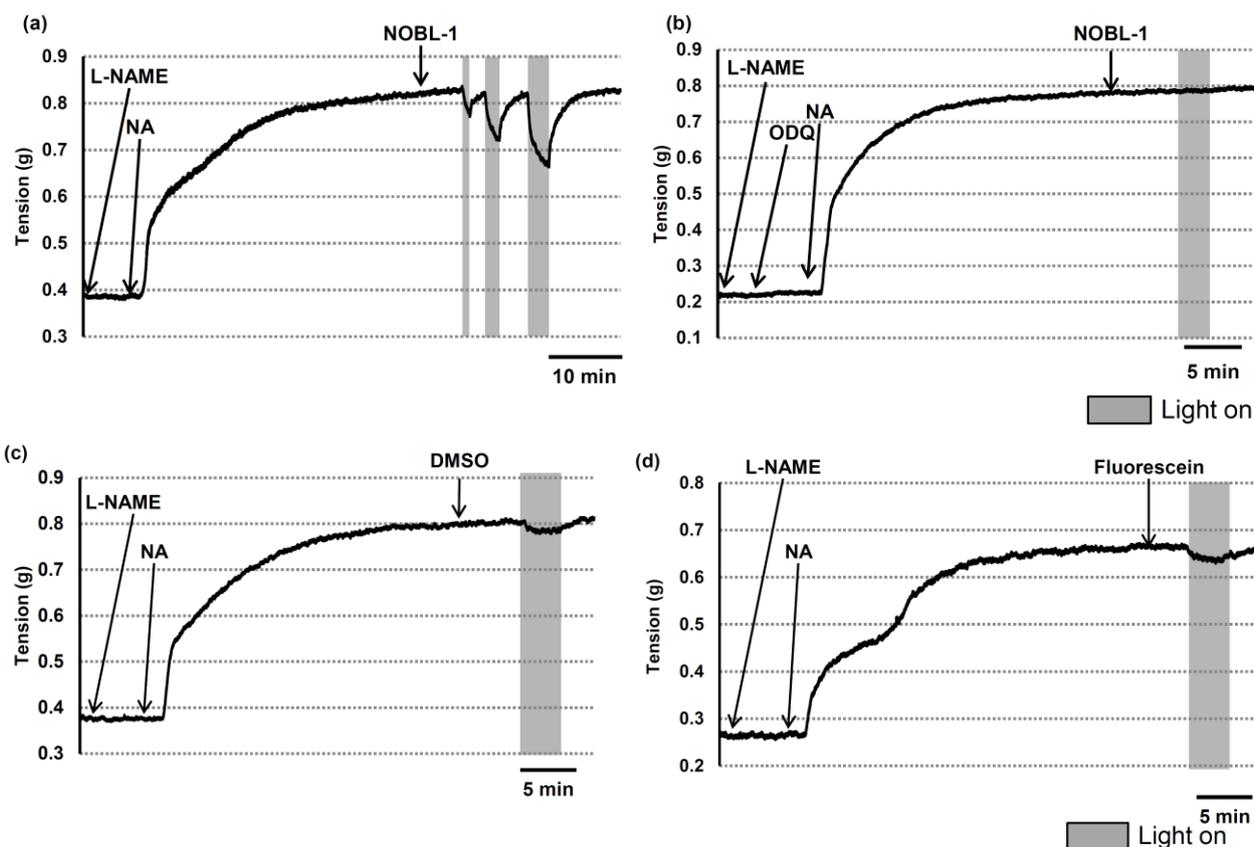


Fig. 3-26 マグナス試験による **NOBL-1** を用いた血管弛緩制御の検討；(a) L-NAME 10 μ M、ノルアドレナリン (NA) 10 μ M を加え、**NOBL-1** 10 μ M を加えた後に 470–500 nm の光照射 (15 mW/cm²) を行った；(b) L-NAME 10 μ M、ODQ 10 μ M、ノルアドレナリン (NA) 10 μ M を加え、**NOBL-1** 10 μ M を加えた後に 470–500 nm の光照射 (15 mW/cm²) を行った；(c) L-NAME 10 μ M、ノルアドレナリン (NA) 10 μ M を加え、DMSO 10 μ L を加えた後に 470–500 nm の光照射 (15 mW/cm²) を行った；(d) L-NAME 10 μ M、ノルアドレナリン (NA) 10 μ M を加え、fluorescein 10 μ M を加えた後に 470–500 nm の光照射 (15 mW/cm²) を行った。

Fig. 3-26a に示すように、光照射依存的に血管の張力が減少し、血管弛緩が起こることが示された。また、この反応が sGC を経由していることを確認するために、sGC の阻害剤である 1*H*-1,2,4-oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one (ODQ)¹⁶¹ を投与してから光照射を行ったところ、この血管弛緩作用はほぼ完全に抑制された (Fig. 3-26b)。また比較試験として、DMSO を投与し光照射を行ったが、**NOBL-1** を投与した際のような血管弛緩は確認されなかった (Fig. 3-26c)。さらに、この作用が **NOBL-1** の光吸収部位である dicyanoBODIPY の光増感作用によるものでないことを確認するために、dicyanoBODIPY よりも強い光増感作用を示すことが報告¹⁶² されている fluorescein を加えてから光照射を行ったが、血管弛緩はほとんど確認されなかった (Fig. 3-26d)。

以上の結果から、この血管弛緩は **NOBL-1** から生じた NO によって sGC が活性化され、起きたものであることが示唆された。

3-3-10 NOBL-1 の光分解物の確認

NOBL-1 の光分解物の検出を行った (Fig. 3-27)。

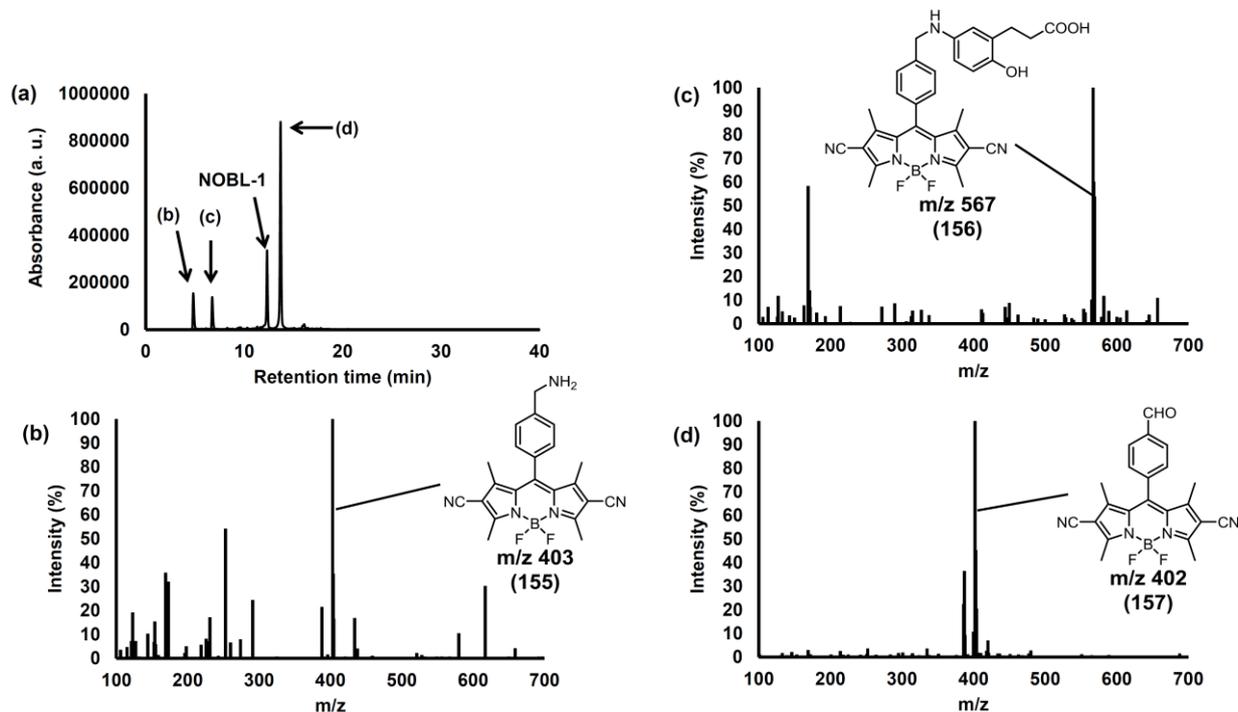


Fig. 3-27 LC-MS による NOBL-1 の光分解物の検出 ; (a) NOBL-1 100 μ M の溶液に 470–500 nm の光照射 (200 mW/cm²) を 15 分間行った後のクロマトグラム (λ : 496 nm) ; (b)–(d) (a)のそれぞれのピークのマススペクトル

NOBL-1 の光照射後の水溶液を LC-MS で解析したところ、主な分解物に由来する 3 つのピークが観測された。それらのマススペクトルを解析したところ、m/z 567、403、402 のピークが検出された。それぞれの分子量と予想される反応機構から、Fig. 3-27 に示す構造の化合物 155、156、157 であると推測された。これらの分解物は、Fig. 3-28 に示したようにセミキノニンイミンの不均化反応を経て生じていると考えられる。

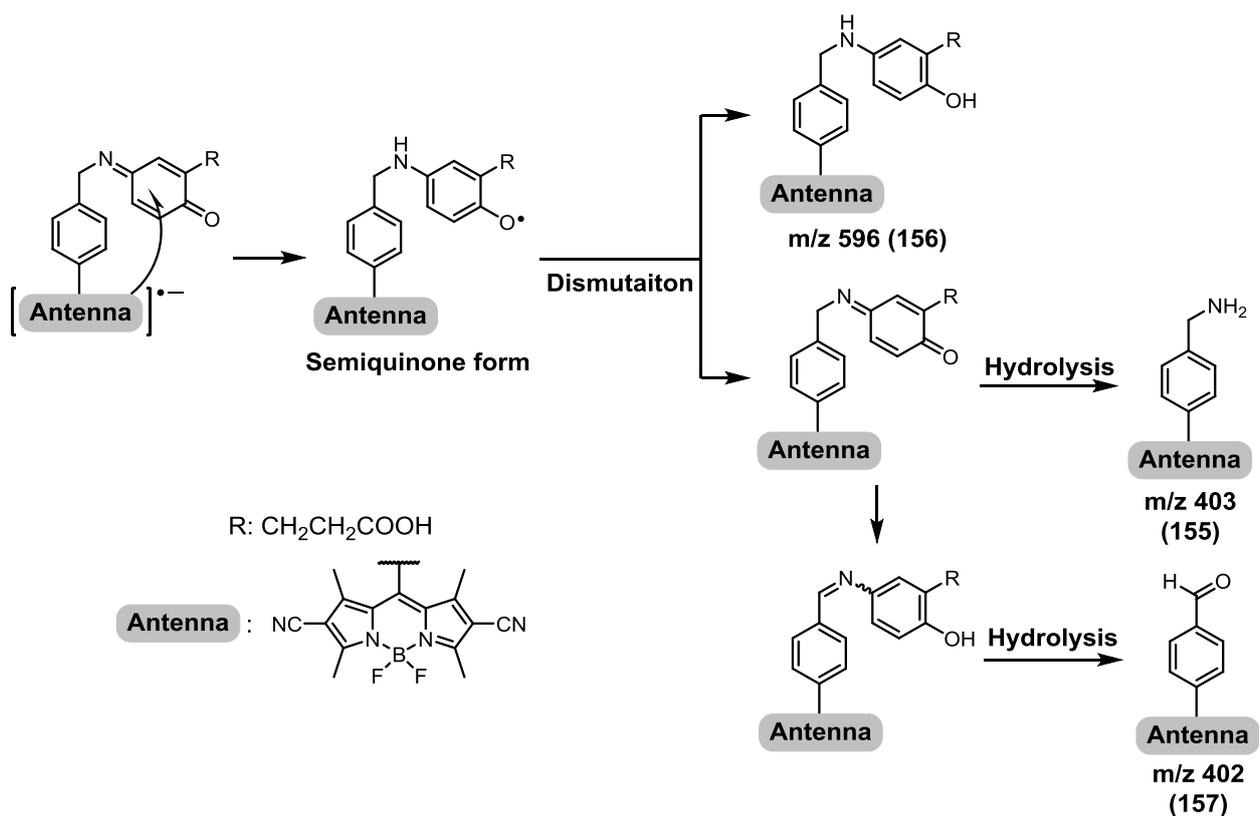


Fig. 3-28 予想される NO 放出後の **NOBL-1** の分解機構

3-3-11 **NOBL-1** の分解量子収率の測定

光反応の起こりやすさの指標である、分解量子収率 Φ_{dec} の測定を行った (Table 3-6、7)。

まず、蛍光分光光度計 RF5300 の光源を用いて、**NOBL-1** が 10% 程度分解する条件を調べた。488 nm の光を 1 分間照射すると 10% 程度分解したため、この条件下で光照射を行い、ピーク面積の減少率から分解したモル数を算出した。

Table 3-6 **NOBL-1** 10 μM の光照射後の分解量

HPLC (ピーク面積)	照射前 (10 μM)	照射後	分解量 (μmol)
平均	412999	369183	1.07E-04
標準偏差	430971	382855	7.42E-05

NOBL-1 (10 μM 、100 μL) の分解量を HPLC で算出した。3 回ずつ測定を行い、平均値と標準偏差を算出した。分解量は照射前の溶液の量 (10 μM 、200 μL) と HPLC のピーク面積減少率から算出した。

また、この溶液に照射された光子数を同条件下で $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3]$ を用いることにより算出した¹⁴⁹。また **NOBL-1** の 488 nm の吸収係数から **NOBL-1** が吸収した光子数を求め、**NOBL-1** の分解量子収率 Φ_{dec} を算出した。

Table 3-7 **NOBL-1** の分解量子収率 Φ_{dec} の算出

	NOBL-1 に吸収された光子数 (μmol)	分解量 (μmol)	量子収率 Φ
平均	0.044631	8.49E-05	1.91E-03
標準偏差	0.004442	1.91E-05	4.30E-04

Table 3-7 に示したように、**NOBL-1** の 488 nm の光照射に対する分解量子収率 Φ_{dec} は 1.91×10^{-3} であると算出された。

3-3-12 **NOBL-1** の細胞内局在の確認

NOBL-1 が細胞に取り込まれているかを、共焦点蛍光顕微鏡で確認した (Fig. 3-29)。

HEK293 細胞に核染色試薬の SYTO 61 Red Fluorescent Nucleic Acid Stain (SYTO 61) と **NOBL-1** を投与し、インキュベーション後の細胞の蛍光観察を行った。

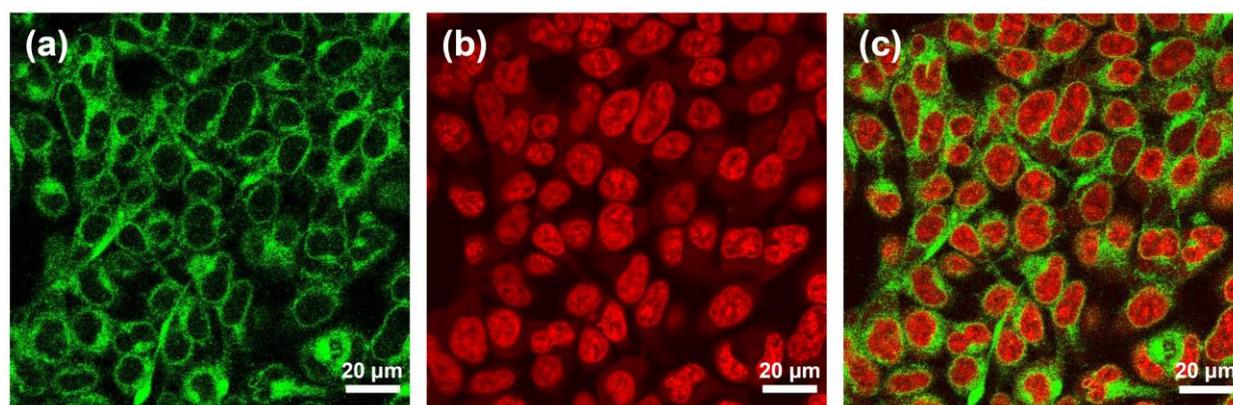


Fig. 3-29 **NOBL-1** の細胞内局在の確認；HEK293 細胞に SYTO 61 ($5 \mu\text{M}$) と **NOBL-1** ($10 \mu\text{M}$) を投与し、インキュベーション、洗浄後 (D-PBS $2 \text{ mL} \times 3$) の細胞を共焦点蛍光顕微鏡で観察した；(a) 488 nm で励起し、緑色蛍光を観察した；(b) 633 nm で励起し、赤色蛍光を観察した；(c) (a) と (b) を重ね合わせた。

Fig. 3-29a に示すように **NOBL-1** 由来と考えられる緑色蛍光が細胞内で観察された。核を染色した画像 (Fig. 3-29b) と重ね合わせた画像 (Fig. 3-29c) から、**NOBL-1** は核の外側に存在しており、細胞質に存在していることが示唆された。

3-3-13 考察

以上のように、青色光で制御可能な新たな NO ドナーである **NOBL-1** を開発することに成功した。**NOBL-1** が青色光照射によって NO を放出することは、ESR スピントラッピング法と蛍光法により確認された。**NOBL-1** を用いて、NO 放出の微細な時空間制御が可能であり、培養細胞においても、数十 μm の範囲の NO 放出を制御することが可能であった。また、

NOBL-1 を用いて、*ex vivo* において **NO** の主な生理機能の一つである血管弛緩作用を高い時間分解能をもって光制御することが可能であった。

NOBL-1 の **NO** 放出 のために光を吸収するアンテナ部位である **BODIPY** 構造が重要であることは、**Fe-DTC** を用いた **ESR** 測定において、**NO** 放出部位のみの構造を有する **129** に青色光照射を行っても **NO** が放出されないことから確認された。**BODIPY** 構造が必要であることから、想定した通りの電子移動反応が関与する可能性が考えられた。なお、電子移動反応の反応速度について解析したマークス理論¹⁶³により、このような反応には、電子受容体・供与体の電子密度、それぞれの部位の距離、溶媒分子の配向など様々な要因が重要と考えられており、今後、様々な構造の誘導体を合成し、その光化学反応性を精査し、より詳細なメカニズム解析を行う必要がある。

血管弛緩を行った試験において、**NOBL-1** を投与していない場合においても、若干の弛緩が観測された。これは、生体内の **RSNO** が光によって分解を起こし、**NO** を放出したためだと考えられる。**ODQ** を投与した場合にはこのわずかな弛緩も完全に抑制されていることから、**RSNO** に由来する内因性の **NO** が **sGC** に作用していると考えられ、実際に生体内の **RSNO** を **NO** 放出源として利用した、光による血管弛緩実験も報告されている¹⁶⁴。しかし、このような生体内の光制御型 **NO** 源としての **RSNO** は様々な要因 (**NOS** の減少、**NOS** の補因子の減少、**O₂** の減少など) によって増減する¹⁶⁵。これに対し、光制御型 **NO** ドナーは任意の量を、任意の時空間に放出させることができるため、内因性の **NO** 源を利用する方法よりも、信頼性の高い方法と言える。

NOBL-1 の 488 nm における Φ_{dec} は 1.91×10^{-3} と非常に低い値を示した。しかし、488 nm における **NOBL-1** の吸光係数は 20000 を超える値であり、この吸収効率の高さ故に、*ex vivo* にも適用可能な **NO** ドナーとして働いたと考えられる。

第4章 結語

以上より、私は紫外光で制御可能な ONOO⁻ドナー**DiP-DNB** と **P-NAP**、可視光で制御可能な NO ドナー**NOBL-1** を開発した。

光制御可能な ONOO⁻ドナーはこれまで報告のなかった化合物であり、ONOO⁻の研究を発展させるための重要なツールになると期待する。また可視光制御型 NO ドナー**NOBL-1** は、培養細胞系内や生体組織で NO 放出の時空間制御を行うことができたことから、**NOBL-1** は NO の作用を調べるためのツールとしてだけでなく、その関与するシグナルイベントを応用した新たな化学療法剤の候補としても用いられることを期待する。

第5章 実験の部

General Method

Melting point was determined using a Büchi 545 melting point apparatus or Yanaco micro melting point apparatus. Proton nuclear magnetic resonance spectra (^1H NMR) and carbon nuclear magnetic resonance spectra (^{13}C NMR) were recorded on a JEOL JNM-A500 spectrometer in the indicated solvent. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million relative to the internal standard, tetramethylsilane. Elemental analysis was performed with Yanaco CHN CORDER NT-5 analyzer, and all values were within $\pm 0.4\%$ of the calculated values. The MS spectra (EI-MS or FAB-MS) were recorded on a JEOL JMS-SX102A mass spectrometer. UV-visible-light absorption spectra were recorded on an Agilent 8453 spectrometer. All reagents and solvents were purchased from Aldrich, Tokyo Chemical Industry, Wako Pure Chemical Industries, Nacalai Tesque, Kanto Chemical, Kishida Chemical, Junsei Chemical, Dojindo, and used without purification. Flash column chromatography was performed using silica gel 60 (the particle size was 0.046–0.063 mm supplied by Merck in chapter 3-1, and 0.032–0.075 mm supplied by Taiko Shojiin chapter in chapter 3-2, and 3-3). UV irradiation was performed using the light source of an Olympus BX-60 fluorescence microscope with a WU filter (330–380 nm band-pass filter). Blue light irradiation was performed using the light source of an MAX-302 (Asahi Spectra, Tokyo) with a 470–500 nm band-pass filter. Before the irradiation under an argon atmosphere, the 3 mL sealed cuvette containing sample solution was bubbled with argon (200 mL). ESR spectra were recorded on a JES-RE2X spectrometer (JEOL Co. Ltd., Tokyo, Japan). All DMEM for cell treatments was mixed with 5% FBS and supplemented with streptomycin and penicillin.

Experimental Section

Preparation of 3,5-dimethyl-4-nitrobenzoate (**112b**)¹³⁶

To a slurry of CrO_3 (20.0 g, 200 mmol, 3.2 equiv.) in AcOH (220 mL) was added 2-nitromesitylene (**112a**) (10.2 g, 61.8 mmol) dissolved in AcOH (30 mL). The mixture was stirred at room temperature for 12.5 h. The mixture was poured into ice-water on ice-water bath to precipitate a colorless solid, which was collected by filtration and dissolved in CHCl_3 . The solution was extracted with 2 N NaOH, and the aqueous layer was acidified with concd. HCl, and extracted with CHCl_3 . The CHCl_3 layer was washed with brine and dried over Na_2SO_4 . Filtration, evaporation *in vacuo* gave 4.03 g (34%) of **112b** as a colorless solid: ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ ; ppm) 7.90 (2H, s), 2.38 (6H, s).

Preparation of (3,5-dimethyl-4-nitrophenyl)methanol (**112c**)¹³⁷

To a slurry of NaBH_4 (2.36 g, 62.3 mmol, 3.0 equiv.) in THF (40 mL) was added **112b** (4.03 g, 20.7 mmol) dissolved in THF (30 mL) followed by $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (2.26 g, 15.9 mmol, 0.77 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 8 h. The mixture was poured into water and extracted

with CHCl₃. The CHCl₃ layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration and evaporation *in vacuo* gave 3.08 g (82%) of **112c** as a yellow solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.12 (2H, s), 4.69 (2H, s), 2.32 (6H, s).

Preparation of 5-(bromomethyl)-2-nitroxylenes (**112d**)¹⁰²

A mixture of PBr₃ (14.4 g, 53.2 mmol, 3.1 equiv.) and **112c** (3.08 g, 17.0 mmol) was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was poured into water and extracted with CHCl₃. The CHCl₃ layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the residue by silica gel flash column chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 6/1) gave 3.29 g (81%) of **112d** as a yellow solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.15 (2H, s), 4.41 (2H, s), 2.31 (6H, s).

Preparation of diethyl (3,5-dimethyl-4-nitrobenzyl)phosphonate (**112e**)¹⁰²

Tetrabutylammonium iodide (413 mg, 1.19 mmol, 0.080 equiv.) and triethylphosphite (2.98 g, 17.9 mmol, 1.3 equiv.) were added to **112d** (3.29 g, 13.7 mmol). The mixture was stirred at 120 °C for 4.5 h, then cooled to room temperature and purified by silica gel flash column chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 1/9) to give 3.34 g (80%) of **112e** as yellow oil: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.06 (2H, d, *J* = 2.3 Hz), 4.06 (4H, m), 3.09 (2H, d, *J*_{PH} = 21.9 Hz), 2.30 (6H, s), 1.28 (6H, t, *J* = 7.3 Hz).

Preparation of 4-(methoxymethoxy)-3,5-dimethylbenzaldehyde (**112g**)¹⁶⁵

To the solution of **112f** (5.00 g, 33.3 mmol) in CH₂Cl₂ (250 mL) was added DMAP (88 mg, 0.720 mmol, 0.02 equiv.), DIPEA (7.5 mL, 42.0 mmol, 1.3 equiv.) and MOMCl (3.5 mL, 36.9 mmol, 1.1 equiv.). After stirring at room temperature for 3 h, the solution was washed with 0.1 N HCl and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 4/1) gave 5.37 g (83%) of **112g** as colorless oil: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 9.89 (1H, s), 7.57 (2H, s), 5.03 (2H, s), 3.62 (3H, s), 2.36 (6H, s).

Preparation of 5-*{(E)-2-[3,5-dimethyl-4-(methoxymethoxy)phenyl]vinyl}*-2-nitro-*m*-xylene (**112h**)

To a slurry of NaH (60% in oil; 335 mg, 8.38 mmol, 1.0 equiv.) in THF (5 mL) was added a solution of **112e** (2.47 g, 8.20 mmol) in THF (5 mL). The mixture was stirred at room temperature for 3 h, and then a solution of **112g** (1.70 g, 8.75 mmol, 1.1 equiv.) in THF (5 mL) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h, then poured into water and extracted with CHCl₃. The CHCl₃ layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the residue by silica gel flash column chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 20/1) gave 2.11 g (75%) of **112h** as a yellow solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.22 (2H, s), 7.19 (2H, s), 7.03 (1H, d, *J* = 16.3 Hz), 6.91 (1H, d, *J* = 16.3 Hz), 4.98 (2H, s), 3.62 (3H, s), 2.34 (6H, s), 2.32 (6H, s).

Preparation of 2,6-dimethyl-4-[(E)-2-(3,5-dimethyl-4-nitrophenyl)vinyl]phenol (**112**)

To a solution of **112h** (2.04 g, 5.96 mmol) in AcOEt and CHCl₃ (15 mL and 5 mL) was added 4 N HCl-AcOEt (20 mL). The mixture was stirred at room temperature for an hour, then poured into water and extracted with AcOEt. The AcOEt layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration and evaporation *in vacuo* gave 1.72 g (97%) of **112** as a yellow solid, which was recrystallized from AcOEt to give 464 mg (27%) of **112** as yellow crystals: mp 230.2–234.2 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.20, (2H, s), 7.16 (2H, s), 7.02 (1H, d, *J* = 16.1 Hz), 6.86 (1H, d, *J* = 16.1 Hz), 4.71 (1H), 2.34 (6H, s), 2.28 (6H, s); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz, δ; ppm) 152.7, 150.3, 139.7, 131.1, 130.3, 128.9, 127.3, 126.4, 124.1, 123.4, 17.9, 16.0; Anal. Calcd for C₁₈H₁₉NO₃; C:72.71, H:6.44, N:4.71. Found; C:72.71, H:6.55, N:4.78; MS (EI) *m/z* 297 (M⁺).

Preparation of 2,6-diethylphenol (**113b**)¹⁶⁷

2,6-Diethylaniline (**113a**) (3.00 g, 20.0 mmol) was dissolved in water (60 mL) and concd. H₂SO₄ (40 mL) in a 1 L flask with a stirring bar on an ice-water bath. NaNO₂ (1.54 g, 22.3 mmol, 1.1 equiv.) was dissolved in water (40 mL), and the solution was added slowly to the reaction mixture. The solution turned light orange, and bubbles of N₂ were observed. The solution was added to 50% sulfuric acid (50 mL), and the mixture was heated to 90–100 °C for 15 min. After cooling, the reaction mixture was extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/toluene = 4/1 → 3/1) gave 2.18 g (72%) of **113b** as a colorless solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.00 (2H, d, *J* = 7.6 Hz), 6.84 (1H, t, *J* = 7.6 Hz), 4.65 (1H, s), 2.63 (4H, q, *J* = 7.6 Hz), 1.25 (6H, t, *J* = 7.6 Hz).

Preparation of 3,5-diethyl-4-hydroxybenzaldehyde (**113c**)¹⁶⁸

To a solution of **113b** (2.18 g, 14.5 mmol) was added TiCl₄ (6.06 g, 31.9 mmol, 2.2 equiv.) followed by CHCl₂OCH₃ (1.84 g, 16.0 mmol, 1.1 equiv.) on an ice-water bath. The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h, then poured into water on an ice-water bath and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 6/1) gave 1.78 g (69%) of **113c** as a yellow solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 9.85 (1H, s), 7.57 (2H, s), 5.29 (1H, s), 2.69 (4H, q, *J* = 7.6 Hz), 1.29 (6H, t, *J* = 7.6 Hz).

Preparation of 3,5-diethyl-4-(methoxymethoxy)benzaldehyde (**113d**)

To a mixture of **113c** (254 mg, 1.43 mmol), DMAP (5 mg, 0.0041 mmol, 0.03 equiv.), DIPEA (304 mg, 2.35 mmol, 1.7 equiv.) in CH₂Cl₂ (10 mL) maintained at 0 °C (ice-water bath) was added MOMCl (137 mg, 1.71 mmol, 1.2 equiv.). After complete addition, the reaction mixture was allowed to warm to room temperature and then stirred for 2 h, followed by treatment with 0.1 N HCl. The

organic layer was separated, washed with brine, and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 4/1) gave 253 mg (80%) of **113d** as yellow oil: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 9.93 (1H, s), 7.62 (2H, s), 5.00 (2H, s), 3.63 (3H, s), 2.75 (4H, q, *J* = 7.6 Hz), 1.27 (6H, t, *J* = 7.6 Hz).

Preparation of 5-*[(E)-2-[3,5-diethyl-4-(methoxymethoxy)phenyl]vinyl]-2-nitro-*m*-xylene (113e)*

To a solution of **112e** (517 mg, 1.72 mmol, 1.5 equiv.) in THF (8 mL) was added NaH (60% in oil; 110 mg, 2.75 mmol, 2.4 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 15 min, then **113d** (253 mg, 1.14 mmol) in THF (5 mL) was added and stirring was continued at room temperature for 2.5 h. The reaction mixture was poured into water and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 6/1) gave 401 mg (95%) of **113e** as a yellow solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.24 (2H, s), 7.23 (2H, s), 7.09 (1H, d, *J* = 16.3 Hz), 6.93 (1H, d, *J* = 16.3 Hz), 4.97 (2H, s), 3.62 (3H, s), 2.71 (4H, q, *J* = 7.6 Hz), 2.35 (6H, s), 1.27 (6H, t, *J* = 7.6 Hz).

Preparation of 2,6-diethyl-4-*[(E)-2-(3,5-dimethyl-4-nitrophenyl)vinyl]phenol (113)*

To a solution of **113e** (401 mg, 1.09 mmol) in AcOEt was added 4 N HCl-AcOEt (5 mL). The mixture was stirred at room temperature for an hour, then poured into water and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration and evaporation *in vacuo* gave 338 mg (96%) of **113** as a yellow solid, which was recrystallized from *n*-hexane/toluene/AcOEt 221 mg (65%) to afford a yellow solid: mp 158.5–162.8 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.22 (2H, s), 7.18 (2H, s), 7.07 (1H, d, *J* = 16.3 Hz), 6.88 (1H, d, *J* = 16.3 Hz), 4.84 (1H, s), 2.66 (4H, q, *J* = 7.6 Hz), 2.34 (6H, s), 1.29 (6H, t, *J* = 7.6 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz, δ; ppm) 151.8, 150.3, 139.7, 131.4, 130.3, 129.6, 129.1, 126.4, 125.4, 124.1, 23.1, 17.9, 13.9; Anal. Calcd. for C₂₀H₂₃NO₃: C, 73.82; H, 7.12; N, 4.30. Found: C, 73.79; H, 7.24; N, 4.40.

Preparation of 5-iodo-2-nitro-*m*-xylene (**114b**)¹⁶⁹

To concd. HNO₃ aq. (7 mL) was added 5-iodo-*m*-xylene (**114a**) (2.00 g, 8.62 mmol) at 0 °C. The mixture was heated to 50 °C for 9 h and 80 °C for 12 h, then poured onto ice, neutralized with sat. NaHCO₃ and extracted with Et₂O. The Et₂O layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/toluene = 20/1) gave 542 mg (23%) of **114b** as a yellow solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.51 (2H, s), 2.27 (6H, s).

Preparation of 4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzaldehyde (**114d**)¹⁷⁰

To a solution of 2,6-diisopropylphenol (**114c**) (150 mg, 0.840 mmol) in CH₂Cl₂ was added TiCl₄ (351 mg, 1.85 mmol, 2.2 equiv.) followed by CHCl₂OCH₃ (106 mg, 0.924 mmol, 1.1 equiv.). The

reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h, then poured into water and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 6/1) gave 112 mg (75%) of **114d** as a yellow solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 9.87 (1H, s), 7.63 (2H, s), 5.39 (1H, s), 3.17 (2H, sept, *J* = 7.0 Hz) 1.31 (12H, d, *J* = 7.0 Hz).

Preparation of 2,6-diisopropyl-4-vinylphenol (**114e**)¹⁷¹

To a solution of 3,5-diisopropyl-4-hydroxybenzaldehyde (**114d**) (403 mg, 1.96 mmol) and malonic acid (1.19 g, 11.4 mmol, 5.8 equiv.) in toluene (10 mL) was added DBU (298 mg, 1.96 mmol, 1.0 equiv.). The reaction mixture was stirred at reflux temperature (120 °C) for 16 h. After cooling, the reaction mixture was added to AcOEt, and washed with an aqueous solution of sat. NaHCO₃. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 20/1) gave 296 mg (74%) of **114e** as colorless oil: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.12 (2H, s), 6.66 (1H, dd, *J* = 11.0 Hz, 17.6 Hz), 5.61 (1H, d, *J* = 17.6 Hz), 5.11 (1H, d, *J* = 11.0 Hz), 4.81 (1H, s), 3.14 (2H, sept, *J* = 6.9 Hz), 1.28 (12H, d, *J* = 6.9 Hz).

Preparation of 3,5-diisopropyl-4-(methoxymethoxy)-styrene (**114f**)

A magnetically stirred mixture of **114e** (296 mg, 1.45 mmol), DMAP (4 mg, 0.0327 mmol, 0.02 equiv.), and DIPEA (300 mg, 2.32 mmol, 1.6 equiv.) in CH₂Cl₂ (5 mL) maintained at 0 °C (ice-water bath) under an argon atmosphere was treated dropwise with MOMCl (280 mg, 3.48 mmol, 2.4 equiv.). After complete addition, the reaction mixture was allowed to warm to room temperature and then stirred for 4 h. The reaction mixture was added to CHCl₃ and extracted with 0.1 N HCl. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration and evaporation *in vacuo* gave 165 mg (46%) of **114f** as colorless oil: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.15 (2H, s), 6.69 (1H, dd, *J* = 10.6 Hz, 17.7 Hz), 5.67 (1H, d, *J* = 17.7 Hz), 5.19 (1H, d, 10.6 Hz), 4.92 (2H, s), 3.62 (3H, s), 3.33 (2H, sept, *J* = 7.0 Hz), 1.24 (12H, d, *J* = 7.0 Hz).

Preparation of 5-*{(E)-2-[3,5-diisopropyl-4-(methoxymethoxy)phenyl]vinyl}*-2-nitro-*m*-xylene (**114g**)

To a solution of **114f** (162 mg, 0.650 mmol) in MeCN (6 mL) was added a solution of **114b** (200 mg, 0.721 mmol, 1.1 equiv.) in MeCN (4 mL), Pd(OAc)₂ (15 mg, 0.0668 mmol, 0.1 equiv.), PPh₃ (34 mg, 0.131 mmol, 0.2 equiv.), NEt₃ (66 mg, 0.651 mmol, 1.0 equiv.), and AgNO₃ (122 mg, 0.715 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 1.5 h, heated at 100 °C for 3 h, then filtered and poured into water. After extraction with CHCl₃, the organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo*, and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/toluene = 1/1) gave 202 mg (78%) of **114g** as a yellow amorphous solid: ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz, δ; ppm) 7.54 (2H, s), 7.40 (2H, s), 7.37 (1H, d, *J* = 16.6 Hz),

7.21 (1H, d, $J = 16.6$ Hz), 4.91 (2H, s), 3.52 (3H, s), 3.29 (2H, sept, $J = 7.2$ Hz), 2.29 (6H, s), 1.21 (12H, d, $J = 7.2$ Hz).

Preparation of 4-[(*E*)-2-(3,5-dimethyl-4-nitrophenyl)vinyl]-2,6-diisopropylphenol (**114**)

To a solution of **114g** (189 mg, 0.476 mmol) in AcOEt (3 mL) was added 4 N HCl-AcOEt (3 mL). The mixture was stirred at room temperature for 1.5 h, then poured into water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration and evaporation *in vacuo* gave 162 mg (97%) of **114** as a yellow solid, which was recrystallized from *n*-hexane/toluene to yield 113 mg (70%) of **114** as yellow crystals: mp 160.2–163.0 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.24 (2H, s), 7.23 (2H, s), 7.11 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 6.88 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 4.91 (1H, s), 3.17 (2H, sept, $J = 6.8$ Hz), 2.35 (6H, s), 1.31 (12H, d, $J = 6.8$ Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz, δ; ppm) 150.6, 150.3, 139.8, 134.1, 131.8, 130.3, 129.1, 126.4, 123.9, 122.3, 27.3, 22.7, 17.9; Anal. Calcd. for C₂₀H₂₃NO₃: C, 74.76; H, 7.70; N, 3.96. Found: C, 74.44; H, 7.70; N, 4.05; MS (EI) m/z 353 (M⁺).

Preparation of 3,5-di-*tert*-butyl-4-(methoxymethoxy)benzaldehyde (**115b**)

To a solution of 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzaldehyde (**115a**) (6.03 g, 25.7 mmol) and DMAP (32 mg, 0.258 mmol, 0.01 equiv.) in CH₂Cl₂ (150 mL) was added DIPEA (5.66 g, 43.8 mmol, 1.7 equiv.), and then to this mixture was added MOMCl (2.46 g, 30.6 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 19 h, and then treated with 0.1 N HCl. The organic layer was separated and the aqueous solution was extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 20/1) gave 1.55 g (22%) of **115b** as a colorless solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 9.92 (1H, s), 7.81 (2H, s), 4.94 (2H, s), 3.66 (3H, s), 1.48 (18H, s).

Preparation of 5-[(*E*)-2-[3,5-di-*tert*-butyl-4-(methoxymethoxy)phenyl]vinyl]-1,3-dimethyl-2-nitrobenzene (**115c**)

To a suspension of NaH (60% in oil; 302 mg, 7.54 mmol, 2.7 equiv.) in THF (15 mL) was added **112e** (1.01 g, 3.37 mmol, 1.2 equiv.) on an ice-water bath. The mixture was stirred at room temperature for 25 min. Then, to this mixture was added a solution of **115b** (780 mg, 2.80 mmol) in THF (10 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h, poured into water on ice-water bath, and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration and evaporation *in vacuo* and purification by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 20/1) gave 1.06 g (89%) of **115c** as a yellow solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.42 (2H, s), 7.25 (2H, s), 7.10 (1H, d, $J = 16.3$ Hz), 6.90 (1H, d, $J = 16.3$ Hz), 4.92 (2H, s), 3.66 (3H, s), 2.35 (6H, s), 1.48 (18H, s).

Preparation of 3,5-di-*tert*-butyl-4-[(*E*)-2-(3,5-dimethyl-4-nitrophenyl)vinyl]phenol (**115**)

To a solution of **115c** (1.06 g, 2.50 mmol) in AcOEt (5 mL) was added 4 N HCl-AcOEt (10 mL). The mixture was stirred at room temperature for 2.5 h. The mixture was poured into sat. NaHCO₃ and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration and evaporation *in vacuo* gave 944 mg (99%) of **115** as a yellow amorphous solid, which was recrystallized from *n*-hexane to yield 676 mg (72%) of **115** as yellow crystals: mp 168.7–169.5 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.35 (2H, s), 7.23 (2H, s), 7.10 (1H, d, *J* = 16.3 Hz), 6.85 (1H, d, *J* = 16.3 Hz), 5.35 (1H, s), 2.34 (6H, s), 1.48 (18H, s); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz, δ; ppm) 154.4, 150.2, 139.8, 136.3, 132.1, 130.3, 127.9, 126.4, 123.8, 123.7, 34.4, 30.3, 17.9; Anal. Calcd for C₂₄H₃₁NO₃; C:75.56, H:8.19, N:3.67. Found; C:75.38, H:8.24, N:3.59; MS (EI): *m/z* 381 (M⁺).

Preparation of 3,5-difluoro-4-hydroxybenzaldehyde (**116b**)¹⁷²

A stirred solution of 2,6-difluorophenol (**116a**) (2.11 g, 16.2 mmol) and hexamethylenetetramine (2.35 g, 16.7 mmol, 1.0 equiv.) in TFA (30 mL) was heated at reflux temperature under an argon atmosphere for 24 h, then cooled to room temperature. The solvent was evaporated *in vacuo* and the crude residue was suspended in CHCl₃. The suspension was washed with an aqueous solution of sat. NaHCO₃ and the separated aqueous layer acidified with concd. HCl. The aqueous layer was extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated *in vacuo* to afford 1.33 g (52%) of **5b** as a colorless solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 9.82 (1H, t, *J*_{FH} = 1.8 Hz), 7.49 (2H, d, *J*_{FH} = 6.4 Hz).

Preparation of 3,5-difluoro-4-(methoxymethoxy)benzaldehyde (**116c**)

A stirred mixture of **116b** (300 mg, 1.90 mmol), DMAP (8 mg, 0.0655 mmol, 0.03 equiv.), and DIPEA (392 mg, 3.04 mmol, 1.6 equiv.) in CH₂Cl₂ (15 mL) maintained at 0 °C (ice-water bath) under an argon atmosphere was treated dropwise with MOMCl (183 mg, 2.28 mmol, 1.2 equiv.). After complete addition, the reaction mixture was allowed to warm to room temperature and then stirred for 1.5 h. The reaction mixture was added to CHCl₃ and washed with 0.1 N HCl. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration and evaporation *in vacuo* gave 351 mg (92%) of **116c** as yellow oil: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 9.86 (1H, t, *J*_{FH} = 1.8 Hz), 7.47 (2H, d, *J*_{FH} = 8.2 Hz), 5.29 (2H, s), 3.60 (3H, s).

Preparation of 5-*{(E)-2-[3,5-difluoro-4-(methoxymethoxy)]vinyl}*-2-nitro-*m*-xylene (**116d**)

To a solution of **112e** (471 mg, 1.56 mmol) in THF (3 mL) was added NaH (60% in oil; 95 mg, 2.36 mmol, 1.6 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 10 min, then **116c** (303 mg, 1.50 mmol) in THF (2 mL) was added, and stirring was continued at room temperature for 2 h. The mixture was poured into water and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 4/1) gave 476 mg (91%) of **116d** as a yellow solid: ¹H

NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ ; ppm) 7.23 (2H, s), 7.06 (2H, d, $J_{\text{FH}} = 8.8$ Hz), 6.97 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 6.91 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 5.18 (2H, s), 3.61 (3H, s), 2.35 (6H, s).

Preparation of 2,6-difluoro-4-[(*E*)-2-(3,5-dimethyl-4-nitrophenyl)vinyl]phenol (**116**)

To a solution of **116d** (476 mg, 1.36 mmol) in AcOEt (5 mL) was added TFA (5 mL). The reaction was stirred at room temperature for an hour, and then poured into water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration and evaporation *in vacuo* gave 497 mg (quant.) of **116** as a yellow solid, which was recrystallized from *n*-hexane/AcOEt to afford 173 mg (35%) of **116** as yellow crystals: mp 214.7–218.3 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ ; ppm) 7.21 (2H, s), 7.07 (2H, d, $J_{\text{FH}} = 8.8$ Hz), 6.95 (1H, d, $J = 16.4$ Hz), 6.87 (1H, d, $J = 16.4$ Hz), 5.81 (1H, s), 2.35 (6H, s); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz, δ ; ppm) 152.8, 150.9, 132.7, 130.4, 129.1, 128.9, 127.2, 126.8, 109.9, 109.7, 17.7; Anal. Calcd for C₁₆H₁₃F₂NO₃·1/2H₂O ; C:61.15, H:4.49, N:4.46. Found ; C:61.12, H:4.43, N:4.30; MS (EI) *m/z* 305 (M⁺).

Preparation of 3,5-dimethoxy-4-(methoxymethoxy)benzaldehyde (**117b**)¹⁷³

A stirred mixture of 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzaldehyde (**117a**) (512 mg, 2.81 mmol), DMAP (4 mg, 0.0327 mmol, 0.01 equiv.), and DIPEA (586 mg, 4.53 mmol, 1.6 equiv.) in CH₂Cl₂ (10 mL) maintained at 0 °C (ice-water bath) under an argon atmosphere was treated dropwise with MOMCl (271 mg, 3.37 mmol, 1.2 equiv.). After complete addition, the reaction mixture was allowed to warm to room temperature and then stirred for 1.5 h, and then added 0.1 N HCl (15 mL). The organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 3/2) gave 497 mg (78%) of **117b** as a colorless solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ ; ppm) 9.88 (1H, s), 7.14 (2H, s), 5.23 (2H, s), 3.93 (6H, s), 3.60 (3H, s).

Preparation of 5-[(*E*)-2-[3,5-dimethoxy-4-(methoxymethoxy)phenyl]vinyl]-2-nitro-*m*-xylene (**117c**)

To a solution of **112e** (629 mg, 2.09 mmol) in THF (5 mL) was added NaH (60% in oil; 117 mg, 2.93 mmol, 1.4 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 15 min, then a solution of **117b** (495 mg, 2.19 mmol) in THF (5 mL) was added, and stirring was continued at room temperature for 5 h. The mixture was poured into water and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 5/1) gave 342 mg (65%) of **117c** as a yellow solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ ; ppm) 7.25 (2H, s), 7.07 (1H, d, $J = 16.3$ Hz), 6.92 (1H, d, $J = 16.3$ Hz), 6.75 (2H, s), 5.15 (2H, s), 3.91 (6H, s), 2.35 (6H, s).

Preparation of 4-[(*E*)-2-(3,5-dimethyl-4-nitrophenyl)vinyl]-3,5-dimethoxyphenol (**117**)

To a solution of **117c** (520 mg, 1.39 mmol) in AcOEt (15 mL) was added 4 N HCl-AcOEt (5 mL). The mixture was stirred at room temperature for 2 h, then poured into water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration and evaporation *in vacuo* gave 456 mg (99%) of **117** as a yellow solid, which was recrystallized from *n*-hexane/AcOEt to yield 359 mg (79%) of **117** as a yellow solid: mp 217.2–219.2 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.23 (2H, s), 7.06 (1H, d, *J* = 16.4 Hz), 6.88 (1H, d, *J* = 16.4 Hz), 6.76 (2H, s), 5.61 (1H, s), 3.95 (6H, s), 2.35 (6H, s); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz, δ; ppm) 150.5, 147.3, 139.3, 135.5, 131.4, 130.3, 128.2, 126.5, 124.8, 103.7, 56.4, 16.8; Anal. Calcd for C₁₈H₁₉NO₅; C:65.54, H:5.81, N:4.25. Found; C:65.46, H:5.90, N:4.26; MS (EI): *m/z* 329 (M⁺).

Preparation of 5-iodo-2-(methoxymethoxy)xylene (**121b**)

To a solution of 2,6-dimethyl-4-iodophenol (**121a**) (1.66 g, 6.70 mmol) in acetone (15 mL) was added K₂CO₃ (1.87 g, 13.5 mmol, 2.0 equiv.). This mixture was stirred at room temperature for 15 min. To this solution, MOMCl (1.08 g, 12.7 mmol, 1.9 equiv.) was added slowly. After complete addition, the mixture was warmed to reflux for 5.5 h. Again, the reaction mixture was cooled to room temperature. After removal of excess K₂CO₃ by filtration on a Kiriya funnel, the solution was poured into water and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 20/1) gave 771 mg (39%) of **121b** as a colorless oil: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.35 (2H, s), 4.93 (2H, s), 3.59 (3H, s), 2.24 (6H, s).

Preparation of 3,5-di-*tert*-butyl-4-(methoxymethoxy)styrene (**121c**)

To a suspension of CH₃PPh₃Br (1.79 g, 5.01 mmol, 1.0 equiv.) in dry THF (10 mL) was added a suspension of NaH (60% in oil; 262 mg, 6.55 mmol, 1.3 equiv.) in dry THF (10 mL) and **121b** (1.39 g, 5.00 mmol) in dry THF (10 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h, then poured into water and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 40/1) gave 506 mg (37%) of **121c** as yellow oil: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.31 (2H, s), 6.67 (1H, dd, *J* = 10.9 Hz, 17.7 Hz), 5.63 (1H, dd, *J* = 0.7 Hz, 17.7 Hz), 5.17 (1H, dd, *J* = 0.7 Hz, 10.9 Hz), 4.89 (2H, s), 3.64 (3H, s), 1.45 (18H, s).

Preparation of 5-*{(E)-2-[3,5-di-*tert*-butyl-4-(methoxymethoxy)phenyl]vinyl}*-2-(methoxymethoxy)xylene (**121d**)

To acetonitrile (15 mL) were added **121b** (506 mg, 1.83 mmol), **121c** (590 mg, 2.02 mmol, 1.1 equiv.), Pd(OAc)₂ (44 mg, 0.196 mmol, 0.1 equiv.), PPh₃ (103 mg, 0.393 mmol, 0.2 equiv.), NEt₃ (185 mg, 1.83 mmol, 1.0 equiv.), and AgNO₃ (355 mg, 2.09 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 1.5 h, heated at 100 °C for 3 h, then filtered. The filtrate was poured into water and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried over

Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/toluene = 6/1) gave 636 mg (79%) of **121d** as brown oil: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.39 (2H, s), 7.18 (2H, s), 6.97 (1H, d, *J* = 16.1 Hz), 6.88 (1H, d, *J* = 16.1 Hz), 4.97 (2H, s), 4.91 (2H, s), 3.65 (3H, s), 3.62 (3H, s), 2.31 (6H, s), 1.47 (18H, s).

Preparation of 4-[(*E*)-2-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)vinyl]-3,5-dimethylphenol (**121e**)

To a solution of **121d** (636 mg, 1.44 mmol) in AcOEt (5 mL) was added 4 N HCl-AcOEt (5 mL). The mixture was stirred at room temperature for an hour, then poured into water and extracted. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 6/1) gave 295 mg (58%) of **121e** as a brown solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.31 (2H, s), 7.15 (2H, s), 6.92 (1H, d, *J* = 16.1 Hz), 6.83 (1H, d, *J* = 16.1 Hz), 5.23 (1H, s), 4.60 (1H, s), 2.27 (6H, s), 1.47 (18H, s).

Preparation of 4-[2-(3,5-di-*tert*-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dien-1-ylidene)ethylidene]-2,6-dimethylcyclohexa-2,5-dien-1-one (**121**)¹⁷⁴

To a solution of **121e** (295 mg, 0.837 mmol) in toluene (10 mL) was added DDQ (199 mg, 0.877 mmol, 1.0 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. The solvent was removed by evaporation *in vacuo*. The residue was purified by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 6/1) to afford 229 mg (78%) of **121** as a red solid, which was recrystallized from *n*-hexane/AcOEt to afford 168 mg (73%) of **121** as a violet solid: mp 196.0–197.0 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz, δ; ppm) 7.98 (1H, s), 7.89 (1H, d, *J* = 13.4 Hz), 7.80 (1H, d, *J* = 13.4 Hz), 7.70 (1H, s), 7.43 (1H, s), 7.29 (1H, s), 2.02 (3H, s), 1.98 (3H, s), 1.31 (9H, s), 1.28 (9H, s); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz, δ; ppm), 182.2, 158.3, 150.3, 150.0, 138.2, 137.7, 137.6, 136.7, 134.1, 133.3, 133.3, 128.2, 124.4, 99.0, 94.7, 84.8, 63.0, 35.8, 35.4, 29.6, 29.6, 17.0, 16.4; Anal. Calcd for C₂₄H₃₀O₂; C:82.24, H:8.53. Found; C:82.04, H:8.53; MS (EI) *m/z* 350 (M⁺).

Preparation of 4-(*N*-methyl-*N*-nitrosoamino)phenol (**129**)¹⁷⁵

129a (482 mg, 3.91 mmol) was dissolved in 6 mL of acetic acid on ice-water bath. Then, a solution of NaNO₂ (280 mg, 4.06 mmol, 1.0 equiv.) in water (30 mL) was added to the solution. The reaction mixture was stirred on ice-water bath for 1.5 h and neutralized by sat. NaHCO₃. The resulting solution was extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo*, and purification by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 2/1) gave 335 mg (56%) of **129** as brown solid. The solid was recrystallized from *n*-hexane, AcOEt, and MeOH to afford 210 mg (63%) of **129** as dark brown solid: mp 140.3–141.5 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz, δ; ppm) 9.78 (1H, s), 7.41 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.89 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 3.37 (3H, s); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz, δ; ppm) 156.9, 133.9, 121.6, 115.7, 32.4;

Anal. Calcd for C₇H₈N₂O₂ ; C:55.26, H:5.30, N:18.41. Found ; C:55.07, H:5.36, N:18.15; MS (FAB) : m/z 154 [(M+2)⁺].

Preparation of 4-(methoxymethoxy)-3,5-dimethylbenzoate (**130a**)

To the solution of **112g** (5.37 g, 27.6 mmol) and 2-methyl-2-butene (9 mL, 84.7 mmol, 3.1 equiv.) in *t*-BuOH (25 mL) was added the solution of NaClO₂ (5.08 g, 56.1 mmol, 2.0 equiv.) and KH₂PO₄ (36.1 g, 278 mmol, 10 equiv.) in water (250 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. The mixture was extracted with CHCl₃. The organic layer was extracted with 2 N NaOH. The aqueous layer was acidified with concd. HCl. This mixture was extracted with CHCl₃. This CHCl₃ layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* gave 5.04 g (87%) of **130a** as a colorless solid: ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz, δ; ppm) 7.63 (2H, s), 5.00 (2H, s), 3.51 (3H, s), 2.27 (6H, s).

Preparation of *N*-*tert*-butoxycarbonyl-4-(methoxymethoxy)-3,5-dimethylaniline (**130b**)

To a solution of **10a** (5.04 g, 24.0 mmol) in *t*-BuOH (150 mL) was added NEt₃ (4 mL, 28.7 mmol, 1.2 equiv.). After stirring at room temperature for 30 min, to this mixture was added DPPA (7.5 mL, 34.8 mmol, 1.5 equiv.) and stirred at reflux temperature for 2.5 h. After cooling, the reaction mixture was added AcOEt and washed with sat. NaHCO₃ and brine, and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification by silica gel flash chromatography gave 4.81 g (71%) of **130b** as a colorless solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.02 (2H, s), 6.36 (1H, s), 4.91 (2H, s), 3.59 (3H, s), 2.26 (6H, s) 1.50 (9H, s).

Preparation of *N*-*tert*-butoxycarbonyl-*N*-methyl-4-(methoxymethoxy)-3,5-dimethylaniline (**130c**)

To a slurry of NaH (60 % oil; 3.98 g, 99.4 mmol, 5.8 equiv.) in dry DMF (120 mL) was added **130b** (4.81 g, 17.1 mmol). After stirring under an N₂ atmosphere on ice-water bath for an hour, this mixture was added MeI (6 mL, 96.3 mmol, 5.6 equiv.). This reaction mixture was stirred at room temperature under an N₂ atmosphere for an hour. The reaction mixture was quenched with water and extracted with CHCl₃. After evaporation *in vacuo*, the residue was added AcOEt and washed with water. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 10/1) gave 1.85 g (37%) of **130c** as clear oil: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 6.88 (2H, s), 4.94 (2H, s), 3.61 (3H, s), 3.20 (3H, s), 2.27 (6H, s), 1.45 (9H, s).

Preparation of 4-(methylamino)-2,6-dimethylphenol (**130d**)

A solution of **130c** (1.85 g, 6.27 mmol) in TFA (10 mL) was stirred at room temperature for 15 min. The solvent was evaporated *in vacuo* and the residue was added to sat. NaHCO₃, and this mixture was extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄.

Filtration, evaporation *in vacuo* and purification by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 2/1) gave 809 mg (85%) of **130d** as a pale orange color solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 6.31 (2H, s), 4.07 (1H, s), 2.78 (3H, s), 2.21 (6H, s).

Synthesis of 2,6-dimethyl-4-(*N*-methyl-*N*-nitrosoamino)phenol (**130**)

To a solution of **130d** (600 mg, 3.97 mmol) in AcOH (20 mL) was added a solution of NaNO₂ (304 mg, 4.41 mmol, 1.1 equiv.) in water (60 mL) on ice-water bath. The reaction mixture was stirred on ice-water bath for 10 min. The reaction mixture was poured sat. NaHCO₃ and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 4/1) gave 457 mg (64%) of **130** as a pale orange color solid. This solid was recrystallized from *n*-hexane/AcOEt to obtain 287 mg (63%) of **130** as pale orange color crystal: mp 108.8–111.5 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.14 (2H, s), 4.75 (1H, s), 3.43 (3H, s), 2.31 (6H, s); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz, δ; ppm) 151.9, 134.8, 124.3, 120.3, 32.6, 16.1; Anal.Calcd for C₇H₈N₂O₂; C:59.99, H:6.71, N:15.55. Found; C:59.79, H:6.67, N:15.33; MS (FAB): m/z 181 [(M+1)⁺].

Preparation of 4-acetoxy-2,6-dimethylaniline (**131b**)¹⁷⁶

To a solution of 4-amino-3,5-xyleneol (**131a**) (4.00 g, 29.1 mmol) in MeCN (250 mL) was added NEt₃ (5 mL, 35.9 mmol, 1.3 equiv.), DMAP (41 mg, 0.221 mmol, 0.03 equiv.) followed by Ac₂O (1 mL, 10.6 mmol, 1.5 equiv.). After stirring at room temperature for an hour, the reaction mixture was evaporated *in vacuo*, and the residue was dissolved in AcOEt. The solution was washed with water, brine, and dried over Na₂SO₄. After filtration, the solution was passed through silica gel. The filtrate was evaporated *in vacuo* to obtain 3.39 g (65%) of **131b** as a brown solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 6.67 (2H, s), 3.51 (2H, brs), 2.25 (3H, s), 2.16 (6H, s).

Preparation of *N*-(4-acetoxy-2,6-dimethylphenyl)formamide (**131c**)

The mixture of HCOOH (3 mL) and Ac₂O (3.5 mL) was stirred at 0 °C for an hour. This mixture was added to a solution of **131b** (3.39 g, 18.9 mmol) in CH₂Cl₂ (50 mL). After stirring at room temperature for 40 min, the mixture was washed with sat. NaHCO₃, brine, and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporatin *in vacuo* gave 3.71 g (95%) of **131c** as a pale orange color solid: ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz, δ; ppm) 9.46 (1H, brs), 8.25 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 6.85 (2H, s), 2.25 (3H, s), 2.14 (6H, s).

Preparation of 3,5-dimethyl-4-(methylamino)phenol (**131d**)¹⁷⁷

To a slurry of LiAlH₄ (2.04 g, 84.8 mmol, 4.7 equiv.) in dry THF (20 mL) was added a solution of **131c** (3.71 g, 17.9 mmol) in dry THF (70 mL) on ice-water bath under an N₂ atmosphere. The reaction mixture was stirred at reflux temperature under an N₂ atmosphere for 4 h. After cooling, the reaction mixture was poured into water (2 mL), 2 N NaOH (4 mL), water (6 mL), sequentially and

slowly. After stirring for 30 min, the precipitate was filtered by Celite. After evaporation of the filtrate, the residue purified by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 2/1) gave 1.11 g (41%) of **131d** as a pale orange color solid: ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz, δ; ppm) 8.65 (1H, s), 6.34 (2H, s), 2.48 (3H, s), 2.12 (6H, s), 1.99 (1H, s).

Preparation of 3,5-dimethyl-4-(*N*-methyl-*N*-nitrosoamino)phenol (**131**)

To a solution of **131d** (1.11 g, 7.32 mmol) in AcOH (20 mL) was added a solution of NaNO₂ (653 mg, 9.46 mmol, 1.3 equiv.) in water (60 mL) on ice-water bath. After stirring for 15 min on ice-water bath, the reaction mixture was alkalinized with 2 N NaOH and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 3/1 → 1/1) gave 981 mg (74%) of **131** as pale orange color solid. The solid was recrystallized from *n*-hexane and AcOEt to obtain 650 mg (66%) of **131** as pale orange color crystal: mp 118.1–123.4 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) (6:5 mixture of two rotamers) (*major*) 6.58 (2H, s), 4.84 (1H, s), 3.98 (3H, s), 1.96 (6H, s), (*minor*) 6.65 (2H, s), 4.89 (1H, s), 3.32 (3H, s), 2.10 (6H, s); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz, δ; ppm) (*major*) 156.1, 137.2, 133.7, 115.2, 35.2, 17.9, (*minor*) 156.3, 136.0, 115.3, 102.3, 40.0, 17.6; Anal. Calcd for C₇H₈N₂O₂; C:59.99, H:6.71, N:15.55. Found; C:59.86, H:6.57, N:15.38; MS (FAB): *m/z* 181 [(M+1)⁺].

Preparation of 3-bromo-4,5-dimethyl-6-nitro-*o*-xylene (**132b**)¹⁷⁸

To a solution of 2,3,5,6-tetramethylbromobenzene (**132a**) (1.81 g, 8.50 mmol) in MeCN (30 mL) was added NO₂BF₄ (1.49 g, 11.2 mmol, 1.3 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 10 min. The reaction mixture was quenched with water and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration and evaporation of the filtrate *in vacuo* gave 2.28 g (quant.) of **132b** as a colorless solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz; δ, ppm) 2.44 (6H, s), 2.21 (6H, s).

Preparation of 2,3,5,6-tetramethyl-4-nitrophenol (**132c**)¹⁷⁹

To a solution of **132b** (2.28 g, 8.85 mmol) in 1,4-dioxane (20 mL) were added Pd₂dba₃ (84 mg, 0.0917 mmol, 0.01 equiv.) and 2-di-*tert*-butylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphenyl (75 mg, 0.177 mmol, 0.02 equiv.), followed by 1 N KOH (20 mL). The reaction mixture was stirred at 90 °C under an N₂ atmosphere for 24 h. After cooling, the reaction mixture was acidified with 2 N HCl and filtered. The filtrate was extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation of the filtrate *in vacuo*, and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 9/1) gave 1.01 g (59%) of **132c** as a yellow solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz; δ, ppm) 4.95 (1H, s), 2.18 (6H, s), 2.15 (6H, s).

Preparation of 4-amino-2,3,5,6-tetramethylphenol (**132d**)¹⁸⁰

To a solution of **132c** (1.01 g, 5.19 mmol) in MeOH (15 mL) was added a catalytic amount of Raney Ni. The reaction mixture was stirred at room temperature under an H₂ atmosphere for 14 h and then filtered through Celite. The filtrate was evaporated *in vacuo* to afford 650 mg (76%) of **132d** as a brown solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz; δ, ppm) 4.15 (1H, s), 3.35 (2H, s), 2.20 (6H, s), 2.17 (6H, s).

Preparation of *N*-(4-hydroxy-2,3,5,6-tetramethylphenyl)formamide (**132e**)¹⁸¹

A mixture of Ac₂O (446 μL, 4.72 mmol, 1.2 equiv) and HCOOH (594 μL, 15.7 mmol, 1.2 equiv) was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was added to a slurry of **132d** (650 mg, 3.93 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 10 min, MeOH was added, and the mixture was evaporated *in vacuo* to afford 770 mg (quant.) of **132e** as a colorless solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz; δ, ppm) 9.21 (1H, s), 8.20 (1H, d, *J* = 1.2 Hz), 7.97 (1H, s), 2.08 (6H, s), 1.99 (6H, s).

Preparation of 2,3,5,6-tetramethyl-4-(methylamino)phenol (**132f**)

To a slurry of LiAlH₄ (940 mg, 25.0 mmol, 6.3 equiv) in dry THF (20 mL) was added a slurry of **132e** (770 mg, 3.99 mmol) on an ice-water bath. The reaction mixture was stirred at reflux for an hour and then allowed to cool, and water (1 mL), 2 N NaOH (2 mL), and water (3 mL) were added successively. The mixture was stirred for 20 min and then filtered through Celite. The filtrate was evaporated *in vacuo*. Purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 4/1) gave 215 mg (30%) of **132f** as a pale orange solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz; δ, ppm) 4.40 (1H, br), 2.63 (3H, s), 2.24 (6H, s), 2.18 (6H, s), 1.60 (1H, br).

Preparation of 2,3,5,6-tetramethyl-4-(*N*-methyl-*N*-nitrosoamino)phenol (**132**)

A solution of **132f** (195 mg, 1.09 mmol) in AcOH (5 mL) was added to a solution of NaNO₂ (75 mg, 1.09 mmol, 1.0 equiv) in water (6 mL) on an ice-water bath. The reaction mixture was stirred on the ice-water bath for 10 min and then quenched with sat. NaHCO₃ and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation of the filtrate *in vacuo*, and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 4/1) gave 147 mg (65%) of **132** as a colorless solid. This product was recrystallized from AcOEt/MeOH to afford 116 mg of **132** as colorless needles: mp 162.4–163.9 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz; δ, ppm; 3:2 mixture of two rotamers) (*major*) 4.77 (1H, s), 3.96 (3H, s), 2.16 (6H, s), 1.90 (6H, s), (*minor*) 4.84 (1H, s), 3.31 (3H, s), 2.22 (6H, s), 2.01 (6H, s); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz; δ, ppm) 152.5, 152.5, 133.9, 132.4, 130.8, 130.7, 120.5, 120.3, 77.5, 40.4, 35.5, 14.9, 14.7, 12.3; MS (FAB) *m/z* 209 [(*M*+1)⁺]. Anal. Calcd for C₁₁H₁₆N₂O₂: C, 63.44; H, 7.74; N, 13.45. Found: C, 63.18; H, 7.58; N, 13.29.

Preparation of 2-benzyloxy-5-nitrobenzaldehyde (**153b**)¹⁸²

To a solution of 2-hydroxy-5-nitrobenzaldehyde (**153a**) (1.00 g, 5.99 mmol) and K₂CO₃ (997 mg, 7.21 mmol, 1.2 equiv.) in DMF (30 mL) was added BnBr (860 μL, 7.19 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was stirred for 2 h at room temperature, and further BnBr (215 μL, 1.80 mmol, 0.3 equiv.) was added to it. Stirring was continued at room temperature for a further 1.5 h and the mixture was diluted with AcOEt and washed with water. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 3/1 → 2/1) gave 1.39 g (90%) of **153b** as a colorless solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 10.52 (1H, s), 8.73 (1H, d, *J* = 2.8 Hz), 8.41 (1H, dd, *J* = 2.8 Hz, 9.2 Hz), 7.45–7.38 (5H, m), 7.18 (1H, d, *J* = 9.2 Hz), 5.33 (2H, s).

Preparation of *t*-butyl 3-(2-benzyloxy-5-nitrophenyl)prop-2-enoate (**153c**)

To a slurry of **153b** (1.39 g, 5.39 mmol) and *tert*-butyl bromoacetate (1.42 mL, 9.74 mmol, 1.8 equiv.) in sat. NaHCO₃ (30 mL) and THF (10 mL) was added PPh₃ (2.13 g, 8.13 mmol, 1.5 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 1.5 h, then diluted with water and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 8/1) gave 2.17 g (quant.) of **153c** as colorless oil: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm, 10:7 mixture of two isomers) (*trans*) 8.44 (1H, d, *J* = 2.8 Hz), 8.18 (1H, dd, *J* = 2.8 Hz, 9.1 Hz), 7.94 (1H, d, *J* = 16.2 Hz), 7.42–7.37 (5H, m), 7.02 (1H, d, *J* = 9.1 Hz), 6.55 (1H, d, *J* = 16.2 Hz), 5.27 (2H, s), 1.53 (9H, s), (*cis*) 8.39 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 8.18 (1H, dd, *J* = 2.7 Hz, 9.2 Hz), 7.42–7.37 (5H, m), 7.03 (1H, d, *J* = 12.4 Hz), 6.99 (1H, d, *J* = 9.2 Hz), 6.03 (1H, d, *J* = 12.4 Hz), 5.21 (2H, s), 1.40 (9H, s).

Preparation of *t*-butyl 3-(5-ami-hydroxyphenyl)propionate (**153d**)¹⁸³

A slurry of **153c** (164 mg, 0.462 mmol) and 5% Pd-C (97 mg) in MeOH (5 mL) was stirred at room temperature under H₂ for 18 h. The reaction mixture was filtered on Celite and the filtrate was evaporated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 1/1) to obtain 86 mg (79%) of **153d** as a pale yellow solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 6.95 (1H, s), 6.72 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.49 (1H, dd, *J* = 2.8 Hz, 8.4 Hz), 6.45 (1H, d, *J* = 2.8 Hz), 3.36 (2H, s), 2.77 (2H, t, *J* = 6.3 Hz), 2.60 (2H, t, *J* = 6.3 Hz), 1.41 (9H, s).

Preparation of 2-amino-*N*-methoxy-*N*-methylacetamide hydrobromide (**153f**)¹²⁵

A mixture of *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)glycine *N*¹-methoxy-*N*¹-methylamide (**153e**) (4.94 g, 22.6 mmol) in 25% HBr in AcOH (19.2 mL) was stirred at room temperature for 30 min. To the mixture was added Et₂O (50 mL) to precipitate a colorless solid. This was collected by filtration to obtain 4.47 g (quant.) of **153f** as a colorless solid: ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz, δ; ppm) 8.04 (3H, s), 3.90 (2H, s), 3.72 (3H, s), 3.17 (3H, s).

Preparation of 2-[(*E*)-2-cyano-1-methylethenyl]amino}-*N*-methoxy-*N*-methylacetamide (**153g**)

125

A mixture of **153f** (4.41 g, 22.2 mmol) and 3-aminocrotononitrile (3.83 g, 44.8 mmol, 2.0 equiv.) in EtOH (250 mL) was stirred at room temperature for 24 h. The reaction mixture was evaporated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 1/2) to obtain 3.89 g (96%) of **153g** as a colorless solid: ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz, δ; ppm) 6.89 (1H, s), 3.89 (2H, s), 3.78 (1H, s), 3.70 (3H, s), 3.12 (3H, s), 2.03 (3H, s).

Preparation of (*E*)-3-(2-oxopropylamino)but-2-enenitrile (**153h**)¹²⁵

To a solution of **153g** (3.89 g, 21.2 mmol) in dry THF (150 mL) was added 3.0 M MeMgBr in Et₂O (7.5 mL, 1.1 equiv.) at -10 °C under an N₂ atmosphere. The mixture was stirred for 50 min, and 3.0 M MeMgBr in Et₂O (15 mL, 2.1 equiv.) was added to it. Stirring was continued at -10 °C under an N₂ atmosphere for a further 2 h. The reaction mixture was quenched with water (200 mL) and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration and evaporation *in vacuo* gave 2.67 g (91%) of **153h** as a pale yellow solid: ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz, δ; ppm) 7.00 (1H, s), 3.90 (2H, d, *J* = 5.5 Hz), 3.74 (1H, s), 2.10 (3H, s), 2.02 (3H, s).

Preparation of 3-cyano-2,4-dimethylpyrrole (**153i**)¹²⁵

To a slurry of **153h** (2.67 g, 19.3 mmol) in EtOH (75 mL) was added NaOEt (273 mg, 4.01 mmol, 0.2 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min. After evaporation *in vacuo* of the reaction mixture, the residue was taken up in water (100 mL) and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the filtrate by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 3/1) gave 2.09 g (90%) of **153i** as a colorless solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.94 (1H, brs), 6.37 (1H, s), 2.38 (3H, s), 2.14 (3H, s).

Preparation of *N*-methoxy-*N*-methyl-4-formylbenzamide (**153k**)¹⁸⁴

To a slurry of terephthalaldehydic acid (**153j**) (5.00 g, 33.3 mmol) in CH₂Cl₂ (200 mL) was added *N*-methylmorpholine (3.66 mL, 33.3 mmol, 1.0 equiv), followed by EDC·HCl (7.68 g, 40.1 mmol, 1.2 equiv) and NHMeOMe·HCl (3.60 g, 36.9 mmol, 1.1 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 4.5 h, and then evaporated *in vacuo*. The residue was taken up in Et₂O and the mixture was washed with water and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄. Filtration and evaporation *in vacuo* gave 4.31 g (67%) of **153k** as a yellow oil: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 10.07 (1H, s), 7.93 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.81 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 3.54 (3H, s), 3.39 (3H, s).

Preparation

of

4-(2,6-dicyano-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen-8-yl)-*N*-methoxy-*N*-methylbenzamide (153l**)**

To a solution of **153k** (1.26 g, 6.51 mmol) and **153i** (1.55 g, 12.9 mmol, 2.0 equiv.) in CH₂Cl₂ (50 mL) was added TFA (0.2 mL). The mixture was stirred at room temperature for 19 h, and then DDQ (2.21 g, 9.71 mmol, 1.5 equiv.) was added to it. Stirring was continued for a further 20 min, then BF₃·OEt₂ (8.5 mL, 32.4 mmol, 5.0 equiv.) was added, followed by DIPEA (6.0 mL, 34.4 mmol, 5.3 equiv.) on an ice-water bath. Stirring was continued for a further 10 min on the ice-water bath, then the reaction mixture was quenched with water and filtered. The organic layer was separated, and the water layer was extracted with CHCl₃. The combined organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 1/1 → 1/2) gave 1.92 g (64%) of **153i** as a dark red solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.88 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.35 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 4.28 (4H, q, *J* = 7.1 Hz), 3.51 (3H, s), 3.42 (3H, s), 2.84 (6H, s), 1.68 (6H, s), 1.33 (6H, t, *J* = 7.1 Hz).

Preparation **of**
8-(4-formylphenyl)-2,6-dicyano-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (153m)

To a solution of **153i** (206 mg, 0.447 mmol) in dry THF (10 mL) was added Cp₂ZrHCl (142 mg, 0.551 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was stirred for 5 min, and then quenched with water. The mixture was extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 2/1) gave 126 mg (70%) of **153m** as a red solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 10.37 (1H, s), 8.31 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.74 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 4.51 (4H, q, *J* = 7.1 Hz), 3.07 (6H, s), 1.87 (6H, s), 1.55 (6H, t, *J* = 7.1 Hz).

Preparation **of**
3-[N-[4-(2,6-dicyano-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)-phenylmethyl]-5-amino-2-hydroxyphenyl]propionate (153n)

A solution of **153d** (130 mg, 0.549 mmol, 1.0 equiv.), **153m** (221 mg, 0.550 mmol), and AcOH (0.5 mL) in CH₂Cl₂ (5 mL) was stirred at room temperature for 2 h, then NaBH(OAc)₃ (353 mg, 1.67 mmol, 3.0 equiv.) was added to it and stirring was continued for 10 min. The reaction mixture was quenched with water and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 2/1 → 3/2) gave 283 mg (83%) of **153n** as a dark green solid: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.61 (2H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.22 (2H, d, *J* = 8.1 Hz), 6.96 (1H, brs), 6.75 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.43 (1H, dd, *J* = 2.9 Hz, 8.6 Hz), 6.38 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 4.43 (2H, s), 2.76 (2H, t, *J* = 6.2 Hz), 2.72 (6H, s), 2.58 (2H, t, *J* = 6.2 Hz), 1.59 (6H, s), 1.42 (9H, s).

Preparation

of

3-{*N*-[4-(2,6-dicyano-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen-8-yl)-phenylmethyl]-*N*-nitroso-5-amino-2-hydroxyphenyl}propionate (**153**)

A solution of **153n** (273 mg, 0.438 mmol) in 4 N HCl AcOEt (7 mL) and AcOEt (3 mL) was stirred at room temperature for 19.5 h. The reaction mixture was neutralized with 2 N NaOH and sat. NaHCO₃, and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the residue by silica gel flash chromatography (CHCl₃/MeOH = 100/1 → 30/1 → 10/1) gave 247 mg (crude) of **153o** as a dark green solid. A solution of **153o** (crude 247 mg) in AcOH (6 mL) was added to a solution of NaNO₂ (34 mg, 0.493 mmol) in water (6 mL) on an ice-water bath. Stirring was continued for 10 min, then the mixture was diluted with AcOEt and washed with 10% citric acid. The organic layer was evaporated *in vacuo*. The residue was taken up in sat. NaHCO₃ and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 2/1 → AcOEt only → AcOEt/MeOH = 100/1 → AcOEt/MeOH = 20/1) gave 113 mg (44%) of **153** as a red solid. This was recrystallized from *n*-hexane and CHCl₃ to obtain 75 mg (66%) of green crystals: mp 195.3–198.3 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz, δ; ppm) 12.08 (1H, brs), 9.82 (1H, s), 7.36 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.32 (2H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.29 (1H, d, *J* = 2.6 Hz), 7.15 (1H, dd, *J* = 2.6 Hz, 8.4 Hz), 6.82 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 5.38 (2H, s), 2.75 (2H, t, *J* = 7.8 Hz), 2.63 (6H, s), 2.48 (2H, t, *J* = 7.8 Hz), 1.39 (6H, s); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz, δ; ppm) 173.7, 158.8, 154.9, 149.1, 147.1, 137.1, 132.0, 130.7, 130.7, 129.2, 127.7, 127.5, 123.3, 120.9, 114.9, 113.3, 105.4, 46.8, 33.1, 25.2, 13.5, 13.3; Anal.Calcd for C₃₁H₂₇BF₂N₆O₄·4/3H₂O ; C:60.01, H:4.82, N:13.55. Found ; C:60.29, H:4.79, N:13.28; MS (FAB): *m/z* 597 [(*M*+1)⁺].

Preparation

of

8-phenyl-2,6-dicyano-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacene (**154**)¹⁸⁵

To a solution of benzaldehyde (**154a**) (100 μL, 0.981 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) was added **153i** (118 mg, 0.982 mmol, 2.0 equiv.), followed by TFA (3 drops). The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h, and DDQ (223 mg, 0.982 mmol, 2.0 equiv.) was added to it. Stirring was continued at room temperature for 20 min, and then DIPEA (854 μL, 4.90 mmol, 10 equiv.) was added, followed by BF₃·OEt₂ (1.31 mL, 4.91 mmol, 10 equiv.). Stirring was continued at room temperature for 10 min, and the reaction mixture was quenched with water. The mixture was extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Filtration, evaporation *in vacuo* and purification of the residue by silica gel flash chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 8/1) gave 87 mg (48%) of **154** as a dark green solid. This solid was washed with AcOEt to obtain 58 mg of **154** as a brick-colored solid: mp 279.6–282.5 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ; ppm) 7.62–7.61 (3H, m), 7.27 (2H, m), 2.73 (6H, s), 1.58 (6H, s); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz, δ; ppm) 159.7, 149.5, 147.1, 132.6, 131.5, 130.6, 130.1, 127.0, 113.5, 106.5, 13.8; Anal.Calcd

for C₂₁H₁₇BF₂N₄ ; C:67.40, H:4.58, N:14.97. Found ; C:67.24, H:4.75, N:14.75; MS (EI): m/z 374 [M⁺].

ESR analysis of 2,6-dimethylnitrobenzene derivatives by using iron dithiocarbamate complex

A solution (total volume 200 μ L) of FeSO₄·6H₂O (1.5 mM), *N*-methyl-D-glucamine dithiocarbamate (6 mM) and one of 2,6-dimethylnitrobenzene derivatives (100 μ M) in phosphate buffer (DMF 1%) was photoirradiated (330–380 nm, 60 mW/cm²) at room temperature for 15 min as a sample for ESR studies. When appropriate, SOD (1 kunit/mL) was added to a sample solution or irradiation was conducted under an argon atmosphere. The measurement conditions were follows; microwave power, 10 mW; frequency, 9.4200 GHz; field, 330 mT; sweep width, 7.5 mT; sweep time, 4 min; modulation width, 0.125 mT; time constant; 0.10 s.

Detemination of decomposition ratio of 2,6-dimethylnitrobenzene derivatives

A solution (total volume, 200 μ L) of one of 2,6-dimethylnitrobenzene derivatives (100 μ M, DMSO 1%) was photoirradiated (330–380 nm, 60 mW/cm²) at room temperature for 15 min for HPLC analysis. An aliquot of each solution (20 μ L) was loaded onto a Senshu Pak C18 column (5 mm; 150 \times 4.6 mm) fitted on a Shimadzu HPLC system, and the eluates were monitored with a photodiode array detector. Gradient condition; **112**: 0 min (A 50 % + B 50%) \rightarrow 30 min (A 0 % + B 100 %) \rightarrow 40 min (A 0 % + B 100 %) \rightarrow 50 min (A : 50 % + B 50 %), **113**: 0 min (A 40 % + B 60%) \rightarrow 30 min (A 0 % + B 100 %) \rightarrow 40 min (A 0 % + B 100 %) \rightarrow 50 min (A : 40 % + B 60 %), **114**: 0 min (A 30 % + B 70%) \rightarrow 30 min (A 0 % + B 100 %) \rightarrow 40 min (A 0 % + B 100 %) \rightarrow 50 min (A : 30 % + B 70 %), **115**: 0 min (A 30 % + B 70%) \rightarrow 30 min (A 0 % + B 100 %) \rightarrow 40 min (A 0 % + B 100 %) \rightarrow 50 min (A : 30 % + B 70 %) **116**: 0 min (A 50 % + B 50%) \rightarrow 30 min (A 0 % + B 100 %) \rightarrow 40 min (A 0 % + B 100 %) \rightarrow 50 min (A : 50 % + B 50 %), **117**: 0 min (A 50 % + B 50%) \rightarrow 30 min (A 0 % + B 100 %) \rightarrow 40 min (A 0 % + B 100 %) \rightarrow 50 min (A : 50 % + B 50 %). (A = milli-Q water, B = MeOH)

Detection of ONOO⁻ release from DiP-DNB (115) by a ONOO⁻ fluorescence probe HKGreen-3

The fluorescence spectra were recorded with a Hitachi F4500. Samples containing 10 μ M DiP-DNB and 10 μ M HKGreen-3 in potassium phosphate buffer (100 mM, pH 7.4, DMF 1.1%) were irradiated for 15 min under aerobic or anaerobic condition. The fluorescence intensity was determined at 515 nm with excitation at 490 nm. The slit width was set to 2.5 nm for both excitation and emission. The photomultiplier voltage was 950 V.

HPLC analysis to determine the photodecomposition of DiP-DNB (115)

A solution (total volume, 200 μ L) of DiP-DNB (100 μ M, DMSO 1%) was photoirradiated (330–380 nm, 60 mW/cm²) at room temperature for 15 min for HPLC analysis. An aliquot of each solution (20 μ L) was loaded onto a Senshu Pak C18 column (5 mm; 150 \times 4.6 mm) fitted on a Shimadzu HPLC

system, and the eluates were monitored with a photodiode array detector. Gradient condition; 0 min, (A 30% + B 70%) → 20 min, (A 0% + B 100%) → 30min, (A 0% + B 100%) → 40 min, (A 30% + B 70%) (A: MilliQ water + 0.1% TFA, B: acetonitrile + 0.1% TFA). Chromatograms were recorded at 446 nm.

ESR analysis of *N*-nitrosoaminophenol derivatives by using iron dithiocarbamate complex

A solution (total volume 200 μ L) of $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1.5 mM), *N*-methylglucamine dithiocarbamate (6 mM), and one of *N*-nitrosoaminophenol derivatives (100 μ M) in phosphate buffer (pH 7.0, DMF 1%) was photoirradiated (without attenuation) at room temperature for 15 min as a sample for ESR studies. When appropriate, SOD (1 kunit/mL) was added to a sample solution or irradiation was conducted under an argon atmosphere. ESR spectra were recorded on a JES-RE2X spectrometer (JEOL Co. Ltd., Tokyo, Japan). The measurement conditions were follows: microwave power, 10 mW; frequency, 9.4200 GHz; field, 330 mT; sweep width, 7.5 mT; sweep time, 4 min; modulation width, 0.125 mT; time constant, 0.10 s.

Detection of ONOO^- release from *N*-nitrosoaminophenol derivatives or SIN-1 by a ONOO^- fluorescence probe HKGreen-3

A sample solution (total volume 1 mL) containing one of *N*-nitrosoaminophenol derivatives (10 μ M) or SIN-1 (10 μ M) and HKGreen-3 (10 μ M) in phosphate buffer (pH 7.4, DMF 0.2%) were irradiated or incubated in the dark. The fluorescence intensity was determined with an RF5300-PC (Shimadzu) at 535 nm, with excitation at 520 nm. The slit width was set to 3 nm for both excitation and emission.

HPLC analysis for detection of Ac-nitroTyr-OEt and duroquinone

A sample solution (total volume 200 μ L) of **P-NAP** (1 mM) and *N*-acetyl-L-tyrosine ethyl ester (1 mM) in phosphate buffer (pH 7.0, DMF 2%) were irradiated. An aliquot of each solution (20 μ L) was loaded onto a Senshu Pak C18 column (5 mm; 150 \times 4.6 mm) fitted on a Shimadzu HPLC system, and the eluates were monitored with a photodiode array detector. Gradient conditions were as follows: 0 min, (A 70% + B 30%) → 20 min, (A 20% + B 80%) → 30 min, (A 20% + B 80%) → 35 min, (A 70% + B 30%) → 40 min, (A 70% + B 30%) (A: MilliQ water + 0.1% TFA, B: acetonitrile + 0.1% TFA).

Determination of duroquinone formation quantum yield of P-NAP (132) (Φ_{DQ})

Determination of the quantity of photodecomposition: A solution of **P-NAP** (100 μ M) in milliQ water (400 μ L, DMF 1%) placed in a quartz cell (0.5 cm optical path length) was irradiated with 334 nm for 15 min. Photoirradiation was performed by using the light source of RF5300 (slit width 1.5 nm). The irradiated solution was loaded onto a Senshu Pak C18 column (5 mm; 150 \times 4.6 mm) fitted on a Shimadzu HPLC system and the eluates were monitored with a photodiode array detector. The

peak area of around 15 min was determined. Milli-Q water containing 0.1% TFA (A) and MeCN containing 0.1% TFA (B) were used as developing solvents. Gradient conditions were as follows: 0 min, A 70% and B 30% → 20 min, A 20% and B 80% → 30 min, A 20% and B 80% → 35 min, A 70% and B 30% → 40 min, A 70% and B 30%.

Determination of the quantity of the irradiated photons: A solution of potassium ferrioxalate (12 mM) in 0.05 M H₂SO₄ (400 μL) placed in a quartz cell (0.5 cm optical path length) was irradiated with 334 nm for 15 min. Irradiation was performed by using the light source of RF5300 (slit width 1.5 nm). To the irradiated solution was added 0.1% buffered phenanthroline (500 μL). An absorption spectrum was recorded on UV–Visible spectrophotometer. (0.1% buffered phenanthroline: a solution of AcONa 2.25 g and phenanthroline 10 mg in 0.5 M H₂SO₄ 10 mL)

Assay for DNA strand breaks

Sample solutions (total volume 20 μL) of phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.04 mg/mL of pBR 322 DNA, 0.3% DMF, and 0, 30, 100, or 300 μM **P-NAP** were photoirradiated with UV-A (without attenuation) or incubated at room temperature in the dark for 15 min. The reaction mixtures were treated with 5 μL of loading buffer (100 mM TBE buffer, pH 8.3, containing 30% glycerol, 0.1% bromophenol blue). Horizontal gel electrophoresis was carried out in 89 mM TBE buffer (pH 8.3) for 60 min at 100 V. The gel was stained with ethidium bromide (1 mg/mL) for 30 min, destained in TBE buffer for 30 min, and photographed with UV transillumination.

Detection of ONOO⁻ generated from **P-NAP (132)** in HCT116 cells

HCT116 human colon cancer cells were treated in the same manner as in the confocal microscopy experiments. Briefly, the cells were plated on 3 cm glassbottomed dishes at 1.0×10^5 cells/dish with 2 mL of McCoy's 5A culture medium supplemented with FBS containing streptomycin and penicillin, and then incubated at 37 °C in a humidified 5% (v/v) CO₂ incubator for 2 days. The cells were treated with 10 μM HKGreen-3A and incubated at 37 °C in a humidified 5% (v/v) CO₂ incubator for a further 2 h. The cells were treated with 10 μM **P-NAP** for 15 min and subjected to photoirradiation for 15 min with the light intensity attenuated to 25%. The dishes were subsequently washed with DMEM three times, and the culture medium was replaced with 2 mL of DMEM. After washing, the cells were subjected to confocal fluorescence microscopy (LSM 510, Carl Zeiss Japan Co. Ltd., Tokyo, Japan).

ESR analysis of **NOBL-1 (153)** using iron dithiocarbamate complex

A solution (total volume 200 μL) of FeSO₄·6H₂O (1.5 mM), *N*-methylglucamine dithiocarbamate (6 mM) and **NOBL-1** (100 μM) in phosphate buffer (pH 7.0, DMF 1%) was photoirradiated (470–500 nm, 200 mW/cm²) with MAX-302 at room temperature for 15 min as a sample for ESR studies. The measurement conditions were follows: microwave power, 10 mW; frequency, 9.4200 GHz; field, 330 mT; sweep width, 7.5 mT; sweep time, 4 min; modulation width, 0.125 mT; time constant; 0.10 s.

Fluorescence measurement of DAR-4M

A sample solution (total volume 2 mL) containing **NOBL-1** (10 μ M) and DAR-4M (10 μ M) in phosphate buffer (pH 7.4, containing DMSO 0.3%) were irradiated or incubated in the dark. The fluorescence intensity was determined with an RF5300-PC (Shimadzu) at 575 nm, with excitation at 560 nm. The slit width was set to 1.5 nm for both excitation and emission.

Detection of NO in HEK293 cells

HEK293 cells were plated on 3.5 cm glass dishes at 2.0×10^5 cells/dish with 2 mL of DMEM. The cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% (v/v) CO₂ in air for 2 days. The medium was replaced with 2 mL of fresh DMEM. The cells were incubated with 10 μ M **NOBL-1** (DMSO 0.1%) or DMSO for an hour under the above conditions. Then, the medium was replaced with 2 mL of fresh DMEM, and the cells were washed with 2 mL of DMEM twice and treated with 5 μ M DAR-4M AM (DMSO 0.1%) for 30 min under the above conditions. The medium was replaced with 2 mL of Dulbecco's PBS containing Mg²⁺ and Ca²⁺ (D-PBS). The cells were washed with 2 mL of D-PBS and irradiated with a MAX-302 (470–500 nm, 25 mW/cm²) for 5 min. After irradiation, the cells were examined under a differential interference contrast microscope (Olympus, IX71).

Spatial control of NO release in HEK293 cells

HEK293 cells were plated on 3.5 cm glass dishes at 2.0×10^5 cells/dish with 2 mL of DMEM. The cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% (v/v) CO₂ in air for 2 days. The medium was replaced with 2 mL of fresh DMEM. The cells were treated with 10 μ M **NOBL-1** (DMSO 0.1%) or DMSO (2 μ L) for an hour under the above conditions. Then, the medium was replaced with 2 mL of fresh DMEM, and the cells were washed with 2 mL of DMEM twice and treated with 5 μ M DAR-4M AM (DMSO 0.1%) for 30 min under the above conditions. The medium was replaced with 2 mL of Dulbecco's PBS containing Mg²⁺ and Ca²⁺ (D-PBS). The cells were washed with 2 mL of D-PBS, and subjected to confocal fluorescence microscopy (LSM 510, Carl Zeiss Japan Co. Ltd., Tokyo, Japan). A region of interest of a dish was selected and bleached with an argon laser (488 nm, output 70%, number of scans 1000, light intensity attenuated to 30%).

Modulation of vasodilation by NOBL-1 (153) under blue-light irradiation

A rat aortic strip was placed in a Magnus tube filled with Krebs buffer (10 mL) at 37 °C. The tension was recorded on a LabChart 7 (ADInstruments). The strip was treated with L-NAME (10 μ M) or ODQ (10 μ M) before addition of noradrenaline (10 μ M). After equilibration, **NOBL-1** (1 μ M or 10 μ M) or DMSO (10 μ L) or fluorescein (1 μ M) was added, and the tube was irradiated with a MAX-302 (14.5 mW/cm²) or a 1 mW green laser pointer.

Quantitative determination of NO

Standard curve for quantitative measurement of NO generated from NOBL-1 (153): Solutions (total volume 1 mL) of NOC7 (0, 0.5, 1, 2.5, or 5 μM) and DAR-4M (10 μM) in phosphate buffer (10 mM, pH 7.4, containing DMSO 0.3%) was incubated in the dark at room temperature for 2 hr for the standard curve. The fluorescence intensity was determined with RF-5300PC (Shimadzu) at 575 nm, with excitation at 560 nm. The slit width was set to 1.5 nm for both excitation and emission, and the sensitivity was high.

Quantitative measurement of NO generated from NOBL-1 (153): A solution (total volume 1 mL) of **NOBL-1** (0 or 10 μM) and DAR-4M (10 μM) in phosphate buffer (10 mM, pH 7.4, containing DMSO 0.3%) was photoirradiated with MAX-302 (Asahi spectra) for 15 min. After photoirradiation (150 mW/cm^2), the fluorescent intensity was measured as well as the standard curve.

Determination of photodecomposition product

A sample solution of **NOBL-1** (100 μM) in water (DMSO 1%) was irradiated with a MAX-302 (200 mW/cm^2 , 470–500 nm). An aliquot of the solution (4 μL) was loaded onto an Imtakt US-C18 column (5 mm; 150 \times 2 mm) fitted on a Waters ACQUITY/Quattro Premier XE system. MilliQ containing 0.1% formic acid (A) and MeCN containing 0.1% formic acid (B) were used as developing solvents. Gradient conditions were as follows: 0 min, A 70% and B 30% \rightarrow 20 min, A 20% and B 80% \rightarrow 30 min, A 20% and B 80% \rightarrow 35 min, A 70% and B 30% \rightarrow 40 min, A 70% and B 30%; ion mode, positive; cone voltage, 10 V.

Determination of photodecomposition quantum yield (Φ_{dec})

Determination of the quantity of photodecomposition: A solution of **NOBL-1** (10 μM) in phosphate buffer (10 mM, pH 7.0, DMF 1%) placed in a quartz cell (0.4 cm optical path length) was irradiated with 488 nm for 1 min. Photoirradiation was performed by using the light source of RF5300. The irradiated solution was loaded onto a Senshu Pak C18 column (5 mm; 150 \times 4.6 mm) fitted on a Shimadzu HPLC system and the eluates were monitored with a photodiode array detector. The peak area of around 15 min was determined. Milli-Q water containing 0.1% FA (A) and MeCN containing 0.1% FA (B) were used as developing solvents. Gradient conditions were as follows: 0 min, A 70% and B 30% \rightarrow 20 min, A 20% and B 80% \rightarrow 30 min, A 20% and B 80% \rightarrow 35 min, A 70% and B 30% \rightarrow 40 min, A 70% and B 30%.

Determination of the quantity of the irradiated photons: A solution of potassium ferrioxalate (12 mM) in 0.05 M H_2SO_4 (100 μL) placed in a quartz cell (0.4 cm optical path length) was irradiated with 488 nm for 1 min. Photoirradiation was performed by using the light source of RF5300. To the irradiated solution was added 0.1% buffered phenanthroline (400 μL). An absorbance spectrum was determined by UV–Visible spectrophotometer.

参考文献

1. Pacher, P.; Beckman, J. S.; and Liaudet, L. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 315–424.
2. Moncada, S.; Herman, A. G.; and Vanhoutte, P. M. *Trends Pharmacol. Sci.* **1987**, *8*, 365–368.
3. Schuman, E. M.; and Madison, D. V. *Science* **1991**, *254*, 1503–1506.
4. Bingisser, R. M.; Tilbrook, P. A.; Holt, P. G.; and Kees, U. R. *J. Immunol.* **1998**, *160*, 5729–5734.
5. Koshland Jr., D. E. *Science* **1992**, *258*, 1861.
6. Huie, R. E.; and Padmaja, S. *Free Rad. Res. Commun.* **1993**, *18*, 195–199.
7. Beckman, J. S.; Beckman, T. W.; Chen, J.; Marshall, P. A.; and Freeman, B. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 1620–1624.
8. Vanderkooi, J. M.; Wright, W. W.; and Erecinska, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1207*, 249–254.
9. Ballou, D. P.; Zhao, Y.; Brandish, P. E.; and Marletta, M. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 12097–12101.
10. Zhao, Y.; Brandish, P. E.; Ballou, D. P.; and Marletta, M. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 14753–14758.
11. Ding, H.; and Demple, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 5146–5150.
12. Nagano, T.; and Yoshimura, T. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1235–1269.
13. Numajiri, N.; Takasawa, K.; Nishiya, T.; Tanaka, H.; Ohno, K.; Hayakawa, W.; Asada, M.; Matsuda, H.; Azumi, K.; Kamata, H.; Nakamura, T.; Hara, H.; Minami, M.; Lipton, S. A.; and Uehara, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 10349–10354.
14. Koppenol, W. H.; Moreno, J. J.; Pryor, W. A.; Ischiropoulos, H.; and Beckman, J. S. *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 834–842.
15. Stuehr, D. J.; Santolini, J.; Wang, Z. Q.; Wei, C. C.; and Adak, S. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 36167–36170.
16. Bredt, D. S.; and Snyder, S. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 682–685.
17. Gachhui, R.; Abu-Soud, H. M.; Ghoshà, D. K.; Presta, A.; Blazing, M. A.; Mayer, B.; George, S. E.; and Stuehr, D. J. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 5451–5454.
18. Cho, H. J.; Xie, Q. W.; Calaycay, J.; Mumford, R. A.; Swiderek, K. M.; Lee, T. D.; and Nathan, C. *J. Exp. Med.* **1992**, *176*, 599–604.
19. Liu, J.; Hughes, T. E.; and Sessa, W. C. *J. Cell Biol.* **1997**, *137*, 1525–1535.
20. Brenman, J. E.; Chao, D. S.; Gee, S. H.; McGee, A. W.; Craven, S. E.; Santillano, D. R.; Wu, Z.; Huang, F.; Xia, H.; Peters, M. F.; Froehner, S. C.; and Bredt, D. S. *Cell* **1996**, *84*, 757–767.
21. Webb, J. L.; Harvey, M. W.; Holden, D. W.; and Evans, T. J. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 6391–6400.
22. Stolz, D. B.; Zamora, R.; Vodovotz, Y.; Loughran, P. A.; Billiar, T. R.; Kim, Y. M.; Simmons, R. L.; and Watkins, S. C. *Hepatology* **2002**, *36*, 81–93.

23. Villanueva, C.; and Giulivi, C. *Free. Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 307–316.
24. Stamler, J. S.; Jaraki, O.; Osborne, J.; Simon, D. I.; Keaney, J.; Vita, J.; Singel, D.; Valeri, C. R.; and Loscalzo, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 7674–7677.
25. Mathews, W. R.; and Kerr, S. W. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, *267*, 1529–1537.
26. Webb, A.; Bond, R.; McLean, P.; Uppal, R.; Benjamin, N.; and Ahluwalia, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 13683–13688.
27. Furukawa, K.; Ohshima, N.; Tawada-Iwata, Y.; and Shigekawa, M. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 12337–12341.
28. Wang, G. R.; Zhu, Y.; Halushka, P. V.; Lincoln, T. M.; and Mendelsohn, M. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 4888–4893.
29. Reyes-Harde, M.; Empson, R.; Potter, B. V. L.; Galione, A.; and Stanton, P. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 4061–4066.
30. Burnett, A. L.; Lowenstein, C. J.; Bredt, D. S.; Chang, T. S.; and Snyder, S. H. *Science* **1992**, *257*, 401–403.
31. Xia, Y.; and Zweier, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 6954–6958.
32. Tinberg, C. E.; Tonzetich, Z. J.; Wang, H.; Do, L. H.; Yoda, Y.; Cramer, S. P.; and Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18168–18176.
33. Beckman, J. S.; and Koppenol, W. H. *Am. J. Physiol.* **1996**, *271*, 1424–1437.
34. Kirsch, M.; and de Groot, H. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 13379–13388.
35. Moncada, S.; Palmer, R. M.; and Higgs, E. A. *Pharmacol. Rev.* **1991**, *43*, 109–142.
36. Winkler, B. S.; Boulton, M. E.; Gottsch, J. D.; and Sternberg, P. *Molecular Vision*, **1999**, *5*, 32.
37. Alvarez, M. N.; Piacenza, L.; Irigoín, F.; Peluffo, G.; and Radi, R. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *432*, 222–232.
38. Nalwaya, N.; and Deen, W. M. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 486–493.
39. Denicola, A.; Souza, J. M.; and Radi, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 3566–3571.
40. Marla, S. S.; Lee, J.; and Groves, J. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 14243–14248.
41. Tsai, J. H. M.; Harrison, J. G.; Martin, J. C.; Hamilton, T. P.; van der Woerd, M.; Jablonsky, M. J.; and Beckman, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4115–4116.
42. Houk, K. N.; Condroski, K. R.; and Pryor, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13002–13006.
43. Hughes, M. N.; and Nicklin, H. G. *J. Chem. Soc.* **1970**, 925–928.
44. Naskalski, J. W.; and Bartosz, G. *Adv. Clin. Chem.* **2000**, *35*, 161–253.
45. Radi, R.; Beckman, J. S.; Bush, K. M.; and Freeman, B. A.; *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 4244–4250.
46. Perrin, D.; and Koppenol, W. H. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *377*, 266–272.
47. Ischiropoulos, H.; Zhu, L.; Chen, J.; Tsai, M.; Martin, J. C.; Smith, C. D.; and Beckman, J. S. *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *298*, 431–437.
48. Pfeiffer, S.; Schmidt, K.; and Mayer, B. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 6346–6352.

49. Yamakura, F.; Matsumoto, T.; Ikeda, K.; Taka, H.; Fujimura, T.; Murayama, K.; Watanabe, E.; Tamaki, M.; Imai, T.; and Takamori, K. *J. Biochem.* **2005**, *138*, 57–69.
50. Baker, L. M. S.; Baker, P. R. S.; Golin-Bisello, F.; Schopfer, F. J.; Fink, M.; Woodcock, S. R.; Branchaud, B. P.; Radi, R.; and Freeman, B. A. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 31085–31093.
51. Sawa, T.; Zaki, M. H.; Okamoto, T.; Akuta, T.; Tokutomi, Y.; Kim-Mitsuyama, S.; Ihara, H.; Kobayashi, A.; Yamamoto, M.; Fujii, S.; Arimoto, H.; and Akaike, T. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 727–735.
52. Nishida, M.; Sawa, T.; Kitajima, N.; Ono, K.; Inoue, H.; Ihara, H.; Motohashi, H.; Yamamoto, M.; Suematsu, M.; Kurose, H.; van der Vliet, A.; Freeman, B. A.; Shibata, T.; Uchida, K.; Kumagai, Y.; and Akaike, T. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 714–724.
53. Su, J.; and Groves, J. T. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 6317–6329.
54. Nonoyama, N.; Hisatome, K.; Shoda, C.; and Suzuki, H. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6939–6940.
55. Squadrito, G. L.; and Pryor, W. A. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *25*, 392–403.
56. Szabó, C.; Ischiropoulos, H.; and Radi, R. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 662–680.
57. MacMillan-Crow, L. A.; Crow, J. P.; and Thompson, J. A. *Biochemistry* **1998**, *37*, 1613–1622.
58. Aykac-Toker, G.; Bulgurcuoglu, S.; and Kocak-Toker, N. *Hum. Exp. Toxicol.* **2001**, *20*, 373–376.
59. Hogg, N.; Darley-Usmar, V. M.; Wilson, M. T.; and Moncada, S. *FEBS Lett.* **1993**, *326*, 199–203.
60. van der Vliet, A.; Smith, D.; O'Neill, C. A.; Kaur, H.; Darley-Usmar, V.; Cross, C. E.; and Halliwell, B. *Biochem. J.* **1994**, *303*, 295–301.
61. Vatassery, G. T.; Lai, J. C.K.; DeMaster, E. G.; Smith, W. E.; and Quach, H. T. *J. Neurosci. Res.* **2004**, *75*, 845–853.
62. Hausladen, A.; and Fridovich, I. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 29405–29408.
63. Crow, J. P.; Beckman, J. S.; and McCord, J. M. *Biochemistry* **1995**, *34*, 3544–3552.
64. Mohra, S.; Stamler, J. S.; and Brüne, B. *FEBS Lett.* **1994**, *348*, 223–227.
65. Konorev, E. A.; Hogg, N.; and Kalyanaraman, B. *FEBS Lett.* **1998**, *427*, 171–174.
66. Blanchard-Fillion, B.; Souza, J. M.; Friel, T.; Jiang, G. C.; Vrana, K.; Sharov, V.; Barrón, L.; Schöneich, C.; Quijano, C.; Alvarez, B.; Radi, R.; Przedborski, S.; Fernando, G. S.; Horwitz, J.; and Ischiropoulos, H. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 46017–46023.
67. Giasson, B. I.; Duda, J. E.; Murray, I. V.; Chen, Q.; Souza, J. M.; Hurtig, H. I.; Ischiropoulos, H.; Trojanowski, J. Q.; and Lee, V. M. *Science* **2000**, *290*, 985–989.
68. Reynolds, M. R.; Lukas, T. J.; Berry, R. W.; and Binder, L. I. *Biochemistry* **2006**, *45*, 4314–4326.
69. Okamoto, T.; Akaike, T.; Sawa, T.; Miyamoto, Y.; van der Vliet, A.; and Maeda, H. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 29596–29602.
70. Ji, Y.; Neverova, I.; van Eyk, J. E.; and Bennett, B. M. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 1986–1991.

71. Xie, Z.; Dong, Y.; Zhang, M.; Cui, M. Z.; Cohen, R. A.; Riek, U.; Neumann, D.; Schlattner, U.; and Zou, M. H. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 6366–6375.
72. Jang, B.; and Han, S. *Biochimie* **2006**, *88*, 53–58.
73. Milstien, S.; and Katusicb, Z. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *263*, 681–684.
74. Kirsch, M.; and de Groot, H. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 24664–24670.
75. Bauer, M. L.; Beckman, J. S.; Bridges, R. J.; Fuller, C. M.; and Matalon, S. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1104*, 87–94.
76. Klebl, B. M.; Ayoub, A. T.; and Pette, D. *FEBS Lett.* **1998**, *422*, 381–384.
77. Grover, A. K.; Kwan, C. Y.; and Samson, S. E. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2003**, *285*, 1537–1543.
78. Chakraborti, S.; Mandal, A.; Das, S.; and Chakraborti, T. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1671*, 70–78.
79. Gutiérrez-Martín, Y.; Martín-Romero, F. J.; Henao, F.; and Gutiérrez-Merino, C. *J. Neurochem.* **2005**, *92*, 973–989.
80. Bagnasco, P.; MacMillan-Crow, L. A.; Greendorfer, J. S.; Young, C. J.; Andrews, L.; and Thompson, J. A. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *419*, 178–189.
81. Freels, J. L.; Nelson, D. K.; Hoyt, J. C.; Habib, M.; Numanami, H.; Lantz, R. C.; and Robbins, R. A. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 4569–4571.
82. Landino, L. M.; Crews, B. C.; Timmons, M. D.; Morrow, J. D.; and Marnett, L. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 15069–15074.
83. Salgo, M. G.; Bermudez, E.; Squadrito, G. L.; and Pryor, W. A. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *322*, 500–505.
84. Niles, J. C.; Wishnok, J. S.; and Tannenbaum, S. R. *Nitric Oxide* **2006**, *14*, 109–121.
85. Brown, G. C.; and Borutaite, V. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1658*, 44–49.
86. Radi, R.; Cassina, A.; Hodara, R.; Quijano, C.; and Castro, L. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33*, 1451–1464.
87. Marcondes, S.; Turko, I. V.; and Murad, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 7146–7151.
88. Minetti, M.; Mallozzi, C.; and Di Stasi, A. M. M. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33*, 744–754.
89. Delgado-Esteban, M.; Martin-Zanca, D.; Andres-Martin, L.; Almeida, A.; and Bolaños, J. P. *J. Neurochem.* **2007**, *102*, 194–205.
90. Bapat, S.; Verkleij, A.; and Post, J. A. *FEBS Lett.* **2001**, *499*, 21–26.
91. Bar-Shai, M.; and Reznick, A. Z. *Antioxid. Redox Signal.* **2006**, *8*, 639–652.
92. Ascenzi, P.; di Masi, A.; Sciorati, C.; and Clementi, E. *Biofactors* **2010**, *36*, 264–273.
93. Torfgård, K. E.; and Ahlner, J. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **1994**, *8*, 701–717.
94. Cederqvist, B.; Persson, M. G.; and Gustafsson, L. E. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 1047–1053.
95. Marks, G. S.; McLaughlin, B. E.; Jimmo, S. L.; Poklewska-Koziell, M.; Brien, J. F.; and Nakatsu, K. *Drug Metab. Dispos.* **1995**, *23*, 1248–1252.

96. Bourassa, J.; DeGraff, W.; Kudo, S.; Wink, D. A.; Mitchell, J. B.; and Ford, P. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2853–2860.
97. Carter, T. D.; Bettache, N.; and Ogden, D. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *122*, 971–973.
98. Hrabie, J. A.; Klose, J. R.; Wink, D. A.; and Keefer, L. K. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1472–1476.
99. Kita, Y.; Ozaki, R.; Sakai, S.; Sugimoto, T.; Hirasawa, Y.; Ohtsuka, M.; Senoh, H.; Yoshida, K.; and Maeda, K. *Br. J. Pharmacol.* **1994**, *113*, 1137–1140.
100. Namiki, S.; Arai, T.; and Fujimori, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3840–3841.
101. Fukuhara, K.; Kurihara, M.; and Miyata, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8662–8666.
102. Suzuki, T.; Nagae, O.; Kato, Y.; Nakagawa, H.; Fukuhara, K.; and Miyata, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11720–11726.
103. Hishikawa, K.; Nakagawa, H.; Furuta, T.; Fukuhara, K.; Tsumoto, H.; Suzuki, T.; and Miyata, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7488–7489.
104. Horinouchi, T.; Nakagawa, H.; Suzuki, T.; Fukuhara, K.; and Miyata, N. *Chem.–Eur. J.* **2011**, *17*, 4809–4813.
105. Horinouchi, T.; Nakagawa, H.; Suzuki, T.; Fukuhara, K.; and Miyata, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2000–2002.
106. Nakagawa, H.; Hishikawa, K.; Eto, K.; Ieda, N.; Namikawa, T.; Kamada, K.; Suzuki, T.; Miyata, N.; and Nabekura, J. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2493–2500.
107. Fry, N. L.; and Mascharak, P. K. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 289–298.
108. Ishida, S.; Matsumoto, S.; Yokoyama, H.; Mori, N.; Kumashiro, H.; Tsuchihashi, N.; Ogata, T.; Yamada, M.; Ono, M.; Kitajima, T.; Kamada, H.; and Yoshida, E. *Magn. Reson. Imaging* **1992**, *10*, 109–114.
109. Korth, H. G.; Ingold, K. U.; Sustmann, R.; de Groot, H.; and Sies, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 891–893.
110. Akaike, T.; Yoshida, M.; Miyamoto, Y.; Sato, K.; Kohno, M.; Sasamoto, K.; Miyazaki, K.; Ueda, S.; and Maeda, H. *Biochemistry* **1993**, *32*, 827–832.
111. Yoshimura, T.; and Kotake, Y. *Antioxid. Redox Signal.* **2004**, *6*, 639–647.
112. Misko, T. P.; Schilling, R. J.; Salvemini, D.; Moore, W. M.; and Currie, M. G. *Anal. Biochem.* **1993**, *214*, 11–16.
113. Kojima, H.; Nakatsubo, N.; Kikuchi, K.; Kawahara, S.; Kirino, Y.; Nagoshi, H.; Hirata, Y.; and Nagano, T. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2446–2453.
114. Kojima, H.; Hirotsu, M.; Nakatsubo, N.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Higuchi, T.; Hirata, Y.; and Nagano, T. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1967–1973.
115. Lim, M. H.; and Lippard, S. J. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 6366–6370.
116. Lim, M. H.; Xu, D.; and Lippard, S. J. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 375–380.
117. Masumoto, H.; and Sies, H. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 262–267.
118. Squadrito, G. L.; Cueto, R.; Splenser, A. E.; Valavanidis, A.; Zhang, H.; Uppu, R. M.; and Pryor, W. A. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *376*, 333–337.

119. Szabó, C.; Mabley, J. G.; Moeller, S. M.; Shimanovich, R.; Pacher, P.; Virag, L.; Soriano, F. G.; van Duzer, J. H.; Williams, W.; Salzman, A. L.; and Groves, J. T. *Mol. Med.* **2002**, *8*, 571–580.
120. Olcott, A. P.; Tocco, G.; Tian, J.; Zekzer, D.; Fukuto, J.; Ignarro, L.; and Kaufman, D. L. *Diabetes* **2004**, *53*, 2574–2580.
121. Sugawara, R.; Hikichi, T.; Kitaya, N.; Mori, F.; Nagaoka, T.; Yoshida, A.; and Szabo, C. *Curr. Eye Res.* **2004**, *29*, 11–16.
122. Yang, D.; Wang, H. L.; Sun, Z. N.; Chung, N. W.; and Shen, J. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6004–6005.
123. Sun, Z. N.; Wang, H. L.; Liu, F. Q.; Chen, Y.; Tam, P. K. H.; and Yang, D. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1887–1890.
124. Peng, T.; and Yang, D. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4932–4935.
125. Ueno, T.; Urano, Y.; Kojima, H.; and Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10640–10641.
126. Song, C.; Ye, Z.; Wang, G.; Yuan, J.; and Guan, Y. *Chem. –Eur. J.* **2010**, *16*, 6464–6472.
127. Xu, K.; Chen, H.; Tian, J.; Ding, B.; Xie, Y.; Qiang, M.; and Tang, B. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9468–9470.
128. Zhang, Q.; Zhu, Z.; Zheng, Y.; Cheng, J.; Zhang, N.; Long, Y. T.; Zheng, J.; Qian, X.; and Yang, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18479–18482.
129. Hou, J. T.; Yang, J.; Li, K.; Liao, Y. X.; Yu, K. K.; Xie, Y. M.; and Yu, X. Q. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 9947–9950.
130. Kim, J.; Park, J.; Lee, H.; Choi, Y.; and Kim, Y. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 9353–9356.
131. Robinson, K. M.; and Beckman, J. S. *Methods Enzymol.* **2005**, *396*, 207–214.
132. Uppu, R. M.; Squadrito, G. L.; Cueto, R.; and Pryor, W. A. *Methods Enzymol.* **1996**, *269*, 311–321.
133. de Boer-Maggard, T. R.; Resendez, A.; and Mascharak, P. K. *ChemBioChem* **2013**, *14*, 2106–2109.
134. Hogg, N.; Darley-Usmar, V. M.; Wilson, M. T.; and Moncada, S. *Biochem. J.* **1992**, *281*, 419–424.
135. Song, Y.; and Buettner, G. R. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 919–962.
136. Powell, G.; and Johnson, F. R. *Organic Syntheses*; Wiley: New York, **1955**; Collect. Vol. 3, p 449.
137. Goldstein, S. L.; and McNelis, E. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 1613–1620.
138. Duff, J. C.; and Bills, E. J. *J. Chem. Sci.* **1932**, 1987–1988.
139. Simpson, C. J.; M. J. Fitzhenry; and Stamford, N. P. *J. Tetrahedron Lett.* **2004**, *46*, 6893–6896.
140. Ingold, K. U. *Can. J. Chem.* **1962**, *40*, 111–121.
141. Nanbu, S.; Sekine, M.; and Nakata, M. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 9911–9918.
142. Kraus, G. A.; and Taschner, M. J. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1175–1176.
143. Ninomiya, K.; Shioiri, T.; and Yamada, S. *Tetrahedron* **1974**, *30*, 2151–2157.

144. Anderson, K. W.; Ikawa, T.; Tunbel, R. E.; and Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10694–10695.
145. Stolzea, K.; Udilovaa, N.; and Nohl, H. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *29*, 1005–1014.
146. Maeda, H.; Yamamoto, K.; Kohno, I.; Hafsi, L.; Itoh, N.; Nakagawa, S.; Kanagawa, N.; Suzuki, K.; and Uno, T. *Chem. –Eur. J.* **2007**, *13*, 1946–1954.
147. Mukhopadhyay, P.; Rajesh, M.; Kashiwaya, Y.; Haskó, G.; and Pacher, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *358*, 203–208.
148. Siraki, A. G.; Chan, T. S.; and O'Brien, P. J. *Toxicol. Sci.* **2004**, *81*, 148–159.
149. Murov, S. L. *Handbook of Photochemistry*; Marcel Dekker, Inc.:New York, 1973; pp 119–123.
150. Wasielewski, M. R. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 435–461.
151. Yu, G.; Gao, J.; Hummelen, J. C.; Wudl, F.; and Heeger, A. J. *Science* **1995**, *270*, 1789–1791.
152. McNally, A.; Prier, C. K.; and MacMillan, D. W. C. *Science* **2011**, *334*, 1114–1117.
153. Hari, D. P.; Schroll, P.; and König, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2958–2961.
154. Miyake, Y.; Nakajima, K.; and Nishibayashi, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 3338–3341.
155. Kawaguchi, M.; Okabe, T.; Okudaira, S.; Hanaoka, K.; Fujikawa, Y.; Terai, T.; Komatsu, T.; Kojima, H.; Aoki, J.; and Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12021–12030.
156. Burnier, M.; Centeno, G.; Burki, E.; and Brunner, H. R. *Am. J. Physiol.* **1994**, *266*, C1118–1127.
157. El-Batta, A.; Jiang, C.; Zhao, W.; Anness, R.; Cooksy, A. L.; and Bergdahl, M. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5244–5259.
158. Spletstoser, J. T.; White, J. M.; Tunoori, A. R.; and Georg, G. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3408–3419.
159. Miura, T.; Urano, Y.; Tanaka, K.; Nagano, T.; Ohkubo, K.; and Fukuzumi, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8666–8671.
160. Gray, G. A.; Schott, C.; Julou-Schaeffer, G.; Fleming, I.; Parratt, J. R.; and Stoclet, J. C. *Br. J. Pharmacol.* **1991**, *103*, 1218–1224.
161. Garthwaite, J.; Southam, E.; Boulton, C. L.; Nielsen, E. B.; Schmidt, K.; and Mayer, B. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *48*, 184–188.
162. Komatsu, T.; Oshiki, D.; Takeda, A.; Miyamura, M.; Ueno, T.; Terai, T.; Hanaoka, K.; Urano, Y.; Mineno, T.; and Nagano, T. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10055–10057.
163. Marcus, R. A. *J. Chem. Phys.* **1956**, *24*, 966–978.
164. Sexton, D. J.; Muruganandam, A.; McKenney, D. J.; and Mutus, B. *Photochem. Photobiol.* **1994**, *59*, 463–467.
165. Foster, M. W.; McMahon, T. J.; and Stamler, J. S. *Trends Mol. Med.* **2003**, *9*, 160–168.
166. Mai, A.; Cheng, D.; Bedford, M. T.; Valente, S.; Nebbioso, A.; Perrone, A.; Brosch, G.; Sbardella, G.; De Bellis, F.; Miceli, M.; and Altucci, L. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2279–2290.
167. Breslow, R.; Groves, K.; and Mayer, M. U. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3622–3635.

168. Bolli, M.; Bur, D.; Clozel, M.; Fischli, W.; Lehmann, D.; Mathys, B.; Mueller, C.; Nayler, O.; Scherz, M.; and Weller, T. PCT Int. Appl., 2006010544, 02 Feb 2006.
169. Sapountzis, I.; Dube, H.; Lewis, R.; Gommermann, N.; and Knochel, P. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2445-2454.
170. Roth, B.; Baccanari, D. P.; Sigel, C. W.; Hubbell, J. P.; Eaddy, J.; Kao, J. C.; Grace, M. E.; and Rauckman, B. S. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 122–129.
171. Kanagawa, S.; and Kagaya, K. Jpn. Kokai Tokkyo Koho (1976), JP 51060290 A 19760526.
172. Lawrence, N. J.; Hepworth, L. A.; Rennison, D.; McGown, A. T.; and Hadfield, J. A. *J. Fluor. Chem.* **2003**, *123*, 101–108.
173. Banwell, M. G.; Chand, S.; and Savage, G. P. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 1645–1654.
174. Kikuchi, N.; and Maruyama, A. Jpn. Kokai Tokkyo Koho (1997), JP 09281729 A 19971031.
175. Guo, Z.; Ramirez, J.; Li, J.; and Wang, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3726–3734.
176. Thomas, J.; and Meffin, P. *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 1046–1049.
177. Sundaram, K. M. S. *J. Environ. Sci. Health. A* **1997**, *B32*, 147–175.
178. Smith, L. I.; and Horner, J. W., Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62*, 1349–1354.
179. Illuminati, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 4951–4952.
180. Smith, L. I.; and Irwin, W. B.; and Guss, C. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 1036–1043.
181. Shulgin, A. T.; and Kerlinger, H. O. *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 2037–2039.
182. Beers, S. A.; Malloy, E. A.; Wu, W.; Wachter, M. P.; Gunnia, U.; Cavender, D.; Harris, C.; Davis, J.; Brosius, R.; Pellegrino-Gensey, J. L.; and Siekierka, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *5*, 2203–2211.
183. Konno, M.; Nakae, T.; and Hamanaka, N. Eur. Pat. Appl. (1991), EP 405116 A2 19910102.
184. Akama, T.; Kanda, Y.; Asai, A.; Yamashita, Y.; Kitamura, Y.; Murakata, C.; Komatsu, K.; Kishikawa, K.; Kobayashi, Y.; and Sasho, S. PCT Int. Appl. (2001), WO 2001030771 A1 20010503.
185. Forrest, S. R.; Thompson, M. E.; Chen, J. J.; Sommer, J. R.; Djurovich, P. I.; and Allen, K. R. PCT Int. Appl. (2014), WO 2014025435 A2 20140213.

謝辞

本研究に際し、統括的な御指導、御助言を賜りました本学創薬基盤科学研究所 宮田直樹 特任教授に感謝いたします。

本研究を行うにあたり、実験の細部に亘り直接的な御指導、御鞭撻を賜りました本学大学院薬学研究科 中川秀彦教授に感謝いたします。

本研究を行うにあたり、血管拡張試験の実験系を提供して頂き、また多大なる御指導、御助言を賜りました本学大学院薬学研究科 木村和哲教授、堀田祐志助教に感謝いたします。

本論文を執筆するにあたり、細部にわたる御指導、御討論をしていただいた、本学大学院薬学研究科 樋口恒彦教授、中村精一教授、田中正彦准教授に感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、多くの有益なる御助言をいただきました京都府立医科大学大学院医学研究科 鈴木孝禎教授に感謝いたします。

本研究を行うにあたり、有益な御助言をいただきました昭和大学薬学部 福原潔教授に感謝いたします。

本研究に関して、特に分析操作について御指導賜りました東京都健康長寿医療センター研究所 津元裕樹特認助教に感謝いたします。

ONOO⁻ドナーを開発するにあたり、蛍光プローブを提供して頂いた Prof. Dan Yang (Hong Kong University)、Dr. Tao Peng (The Rockefeller University) に感謝いたします。

目的化合物の合成法、アッセイ方法等について直接的な御指導、御鞭撻を頂き、また、様々な議論を交わしていただいた菱川和宏博士、菱川麻美子博士に感謝いたします。

ONOO⁻ドナーを開発するにあたり、分解物の標品を合成して下さいました篠原妙子博士に感謝いたします。

化合物の合成を行う際、元素分析、質量分析、核磁気共鳴測定を行って下さいました本学総合危機分析施設の皆様に感謝いたします。

有機化学の実験を始めるにあたり、基礎的な知識や技術について御指導、御鞭撻を頂きました名城大学大学院総合学術研究科 森裕二教授、名城大学薬学部分子設計化学研究室の皆様に感謝いたします。

最後に、研究活動を行っていく中でいろいろと相談に乗っていただいた先輩方、研究室生活を非常に有意義なものにしてくれた後輩の皆様、そして共に切磋琢磨し、いつまでも高い目標でいてくれる同期の皆様に厚く感謝申し上げます。

本当にありがとうございました。

本研究は、平成 23 年度笹川科学研究助成、科学研究費補助金（特別研究員奨励費、若手研究 B）を受けて遂行されました。

平成 26 年 12 月

家田 直弥