

キサントレン色素を基盤とした新規機能性分子の開発

2023

三和 空知

目次

| | |
|-------------------------------|----|
| 第1章 序論 | |
| 第一節 機能性色素 | 1 |
| 第二節 本研究の概要 | 6 |
| 引用文献 | 8 |
| 第2章 P糖タンパク質の阻害剤開発に向けた構造活性相関研究 | |
| 第一節 研究背景 | 11 |
| 第二節 基質合成 | 14 |
| 第三節 ATPase 活性評価 | 15 |
| 第四節 薬剤耐性試験 | 19 |
| 第五節 トリプトファン消光実験 | 21 |
| 第六節 要約 | 23 |
| 引用文献 | 24 |
| 第3章 含ヘリセンフルオレセインの合成および光学特性評価 | |
| 第一節 研究背景 | 26 |
| 第二節 要約 | 31 |
| 引用文献 | 32 |
| 第4章 含ヘリセンアミノキサントンの合成及び光学特性の評価 | |
| 第一節 研究背景 | 36 |
| 第二節 要約 | 39 |
| 引用文献 | 40 |

| | |
|--------|----|
| 第五章 結論 | 41 |
| 實驗項 | 43 |
| 謝辭 | 63 |

略語表

| | |
|-----------------|--|
| ADP | adenosine diphosphate |
| AIBN | azobis(isobutyronitrile) |
| aq | aqueous |
| ATP | adenosine triphosphate |
| BODIPY | boron-dipyrrromethene |
| DBU | 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene |
| β -DDM | <i>N</i> -dodecyl- β -maltoside |
| DMSO | dimethyl sulfoxide |
| EDC·HCl | 3-ethylcarbodiimide hydrochloride |
| EL | electroluminescence |
| equiv | equivalent |
| DMAP | 4-dimethylaminopyridine |
| DMF | dimethylformamide |
| HEPES | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid |
| I | intensity |
| microED | micro electron diffraction |
| NBS | <i>N</i> -Bromosuccinimide |
| N.D. | not determined |
| NOE | nuclear Overhauser effect |
| pH | potential hydrogen |
| Pi | inorganic phosphate |
| SAR | structure activity relationship |
| SD | standard definition |
| TFA | trifluoroacetic acid |
| THF | tetrahydrofuran |
| TLC | thin-layer chromatography |
| Tris | tris(hydroxymethyl)aminomethane |
| UV | ultraviolet |
| Vis | visible |
| WT | wild type |
| YPD | yeast extract-peptone-dextrose |
| ε | molar extinction coefficient |
| Φ_F | quantum yield |
| λ_{em} | emission wavelength |
| λ_{abs} | absorption wavelength |
| τ_F | fluorescence lifetime |
| λ_{ex} | excitation wavelength |

また、蛍光イメージングに用いられる機能性色素も数多く報告されている。蛍光イメージングは、蛍光色素や蛍光タンパク質を使用し、生体内での生理活性物質の動態を観察するための手法である。この技術は、生命科学分野の発展に大きく貢献してきた。特に、2008年に Shimomura、Chalfie、Tsien が「緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein、GFP）の発見と開発」⁹でノーベル化学賞を受賞したことは、この分野の重要性を示している。また、生体内での応用を志向し、近赤外領域で吸収および発光を示す分子の開発が現在も精力的に進められている（Figure 1-2）¹⁰。

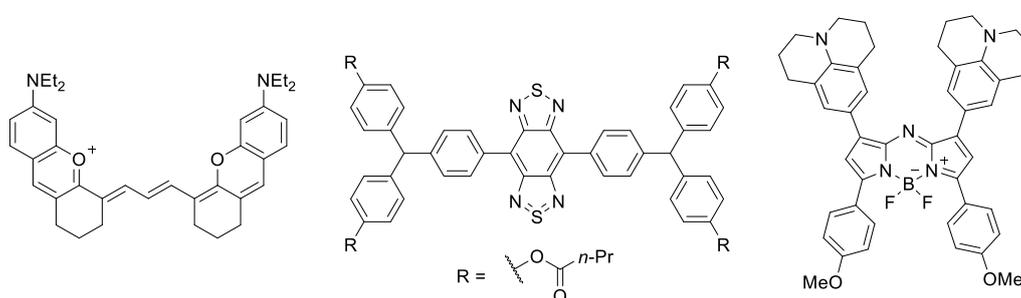


Figure 1-2 Near infrared II Dyes utilized in bioimaging.

一方、近年、数多くある汎用色素の中でキサンテン色素が機能性色素として注目されている。キサンテン色素は、ピラン環の両側にベンゼン環が縮環した三環性のキサンテン骨格を特徴とし^{11,12,13}、その基本構造に結合している置換基によって大きく3つに分類することができる。すなわち、(1) 2つの酸素官能基を有するフルオレセイン、(2) 2つの窒素官能基を有するローダミン、そして(3) 酸素官能基と窒素官能基を1つずつ有するロドール、の3つである（Figure 1-3-a）。キサンテン色素の発見は、1871年に von Bayer によって初めて報告されたフルオレセインにまで遡る¹⁴。その後、1887年に Ceresole によってローダミン B^{15,16}が見いだされ、研究が進められた結果、ローダミン類は発がん性¹⁷を有し、ミトコンドリアに集積することで細胞毒性が発現¹⁸することが in vivo での実験やマウスを用いた実験で報告された。一方、ローダミン類は P 糖タンパク質（P-gp, ABCB1）の輸送基質¹⁹であるため細胞集積が抑制され、先述した毒性は発現しにくい。このような毒性の低さに加え、高いモル吸光係数、高い蛍光量子収率、高い光安定性、および可視域での吸収や発光を示すとい

った特徴を有することから顔料や染料としてだけでなく、河川や海洋などの水流を追跡するための色素や生物学研究における蛍光マーカー^{20,21} など、多くの分野で広く使われてきた。例えば、Nagano らは Tokyo green にガラクトースを結合させたプローブがβ-ガラクトシダーゼの検出に利用できることを報告している²² (Figure 1-3-b)。また、マレイミドを有するローダミン誘導体は蛍光色素を容易に導入できる試薬として販売され、蛍光プローブとして汎用されている (Figure 1-3-c)。

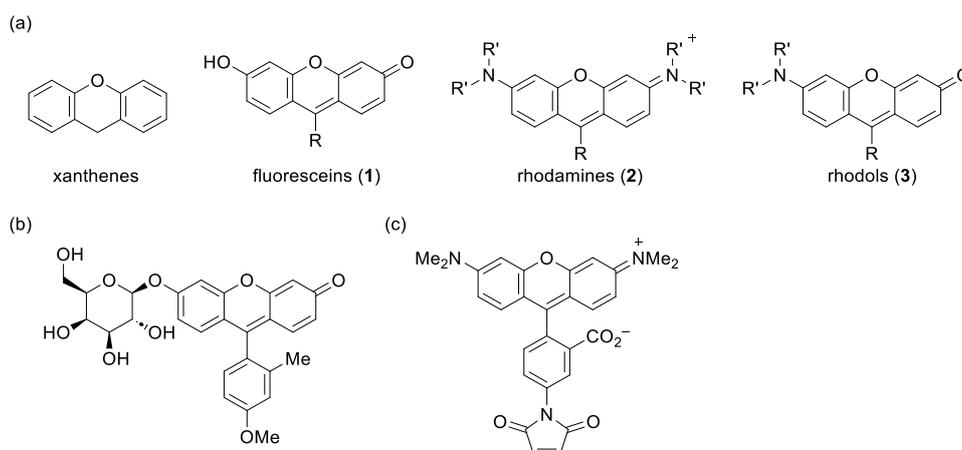


Figure 1-3 (a) General structure of xanthenes. (b),(c) Elected derivatives for bioimaging

こうした光学特性に加え、ヘテロスピロ環構造を有するキサンテン色素は環の開閉により発光のオン/オフを制御できることが知られている (Figure 1-4)¹³。すなわち、スピロ環を有する構造で存在しているときはキサンテン骨格のπ共役電子が両端の芳香環に局在しているため、吸収極大波長は短波長側に観測され、モル吸光係数も小さい。一方、開環状態に構造が変化するとπ電子は非局在化し、吸収極大波長が長波長化するとともに、モル吸光係数と蛍光量子収率も増大する。このような構造変化は、溶媒の極性のほか、pH 変化のような外部刺激によっても引き起こされる (Figure 1-4-a,b)。例えば、ヒドロキシ基を有するフルオレセインは、弱酸性条件下ではスピロラクトン体として存在し、蛍光を示さない。しかし、塩基の添加により水酸基が脱プロトン化されることでラクトン環が開環し、緑色蛍光を示すようになる (Figure 1-4-b)^{23,24}。また、1997年に Czarnik によってローダミン B 誘導体のスピロ環の開閉が Cu^{2+} の添加によって引き起こされることが報告されている (Figure 1-4-c)²⁵。これ

以降、キサテン色素は金属イオンのトレーサーとして利用可能であることが分かり、さらに注目されることとなった。例えば、Yoonらは、ヒドラジドを導入することで銅を選択的に検知できるプローブを報告している (Figure 1-4-d) ²⁶。このような液性の変化や金属の添加以外にも、機械的刺激 ²⁷ や熱 ²⁸、光 ²⁹ など様々な外部刺激に応答するクロミズム特性 ³⁰ を示す誘導体が報告され (Figure 1-4-d-f)、医学的診断に用いる蛍光プローブ ^{20,21} や化学センサー ¹³、光デバイス ³¹、感熱性の色素 ²⁸ としての利用も可能であり、幅広い分野、用途で利用されている。

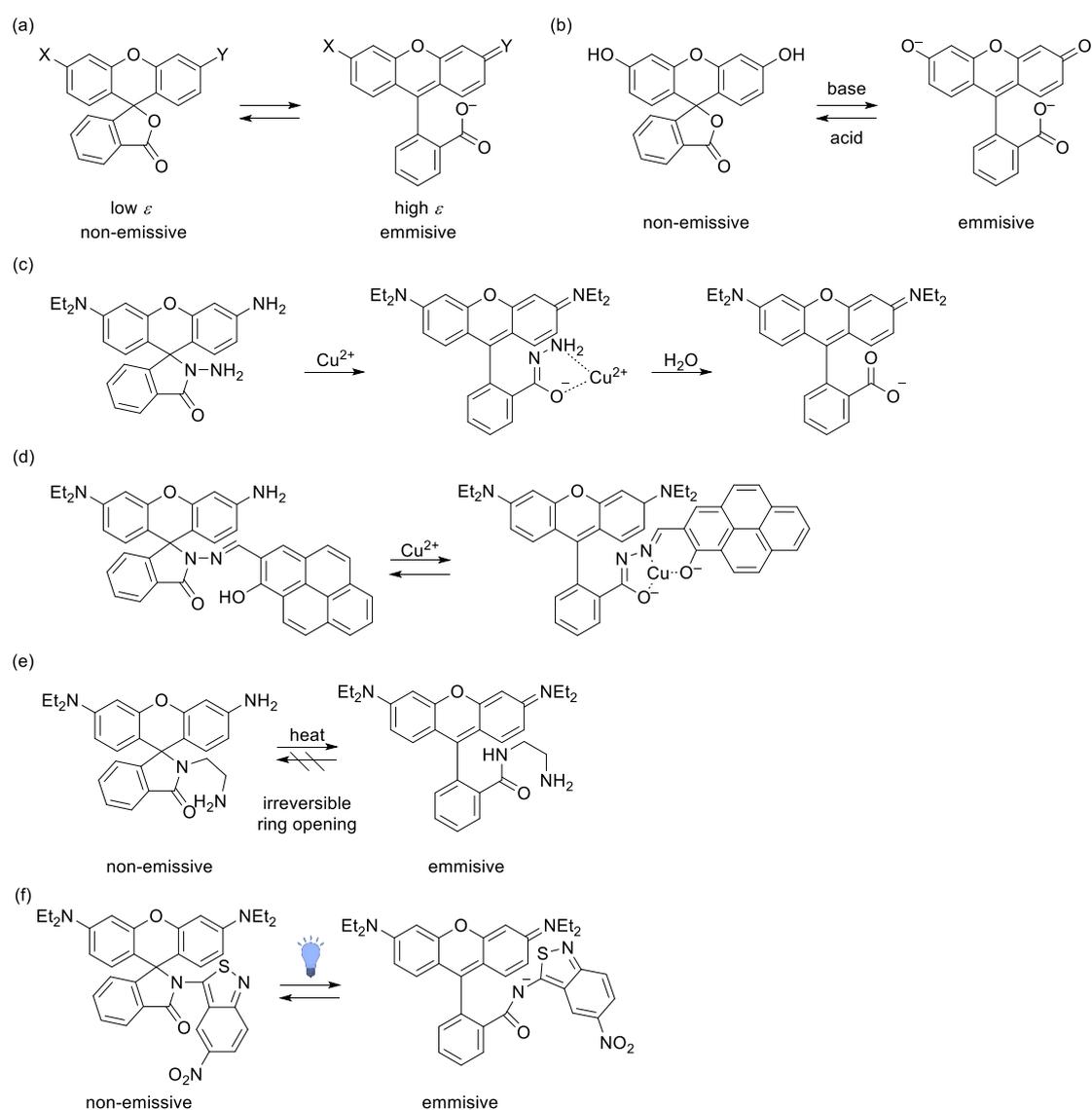


Figure 1-4 Chromism of xanthene derivatives. (a) Solvatochromism. (b) Halochromism. (c,d) Ionochromism. (e) Thermochromism. (f) Photochromism.

これまでにキサンテン骨格上の置換基や構成元素を改変した種々の誘導体が合成されている (Figure 1-5) ^{11,12}。こうした構造改変により、その吸収波長や蛍光波長、蛍光量子収率、水溶性などの物性のある程度は制御できることから、生体透過性の高い近赤外域での吸収、蛍光を示す化合物を活用した生体イメージングに関する研究が数多く進められている ^{20,21}。これらの研究は、主に3つの構造改変のアプローチに分類できる。すなわち (1) π 共役系の拡張、(2) 三環性骨格の中央の環に含まれるヘテロ原子の変更、(3) 電子供与性基の変更、の3つである。特に2つめは、中央の環のヘテロ原子以外を変えることなく近赤外領域での吸収、蛍光特性を示すようになるため、活発に研究が進められてきた。例えば、Naganoらはキサンテン環の酸素をケイ素に変更したシリルローダミン (Si-rhodamine) が 660 nm の蛍光極大波長を示すことが報告している (Figure 1-5、左下) ^{32,33}。他にも酸素原子をビスマス原子 ³⁴、炭素原子 ³⁵、リン原子 ³⁶、硫黄原子 ³⁷ などに置き換えた誘導体があり、フルオレセイン ³⁸ においても同様のアプローチでの赤色蛍光分子の開発が報告されている。これらの誘導体は、細胞へのダメージが比較的小さい波長域で取り扱うことが可能であることから、光線力学的療法など医学的な応用もなされてきた ^{39,40}。

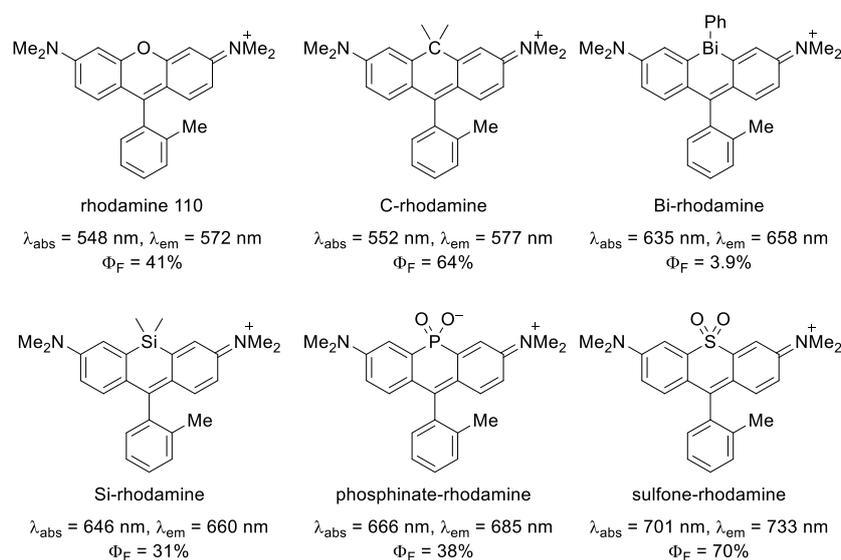


Figure 1-5 Optical properties of heteroxanthene

以上に述べた通り、機能性色素を開発は現代社会における科学技術の革新と緊密に関連している。特に、有機化学の進展によって可能となった従来の色素構造への機能性置換基や機

機能性ユニットの導入は、この分野における重要なアプローチである (Figure 1-6)。機能性色素の応用は多岐にわたることから、新たな機能を持つ機能性色素の開発は、科学技術の進歩に寄与するだけでなく、人々の生活の質の向上にも直接寄与すると考えられ、その重要性は今後も高まるものと期待される。

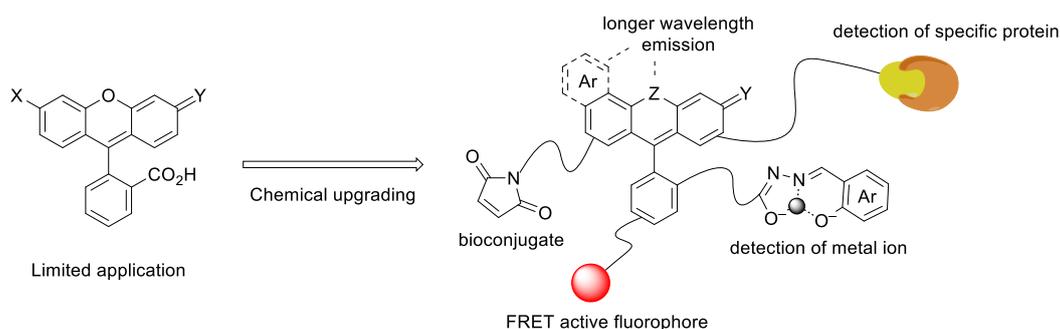


Figure 1-6 Schematic representation of the chemical upgrading of xanthene dyes.

第二節 本研究の概要

筆者は本博士研究において、有機化学を駆使した分子設計と化学合成によって2種類の異なる機能性キサンテン色素を開発し、それぞれ生理活性物質、及びキラル発光分子としての機能評価を行った。

第二章ではローダミンを用いた P 糖タンパク質 CmABCB1⁴¹ の阻害剤の開発に向けた構造活性相関研究について述べる (Figure 1-7)⁴²。P 糖タンパク質は腫瘍細胞の薬剤耐性獲得の原因の1つとされているトランスポーターである^{43,44}。しかし、その薬剤排出機構の詳細は解明されておらず、阻害剤の開発は難航している。このような背景を受け、トランスポーターの内腔に取り込まれながらも排出されない阻害剤の開発は、薬剤排出機構解明の一助となるのではないかと考え、研究に着手した。今回基質として選択したローダミン類は古くから P 糖タンパク質の輸送基質として利用されており、以前、Raubらにより P 糖タンパク質の阻害剤として利用可能であることが示唆されている⁴⁵。また、トランスポーターの内腔への取り込みを確認する手法も確立されている⁴⁶。このような特徴を持つローダミン誘導体の P 糖タンパク質 CmABCB1 に対する親和性および阻害活性を、ATPase 活性を基準に評価した。その結果、基準にしたローダミン 6G より 6 倍高い親和性と 120 倍高い阻害

活性を示す誘導体 Rh_Q-DMB の開発に至った。さらに、薬剤耐性試験やトリプトファン消光実験の結果、Rh_Q-DMB はトランスポーターに取り込まれるものの、排出されない阻害剤であることが分かった。一般にローダミン類はP-糖タンパク質の輸送基質であることが知られているが、その構造を変化させることで排出されにくい誘導体を見出すことができた。

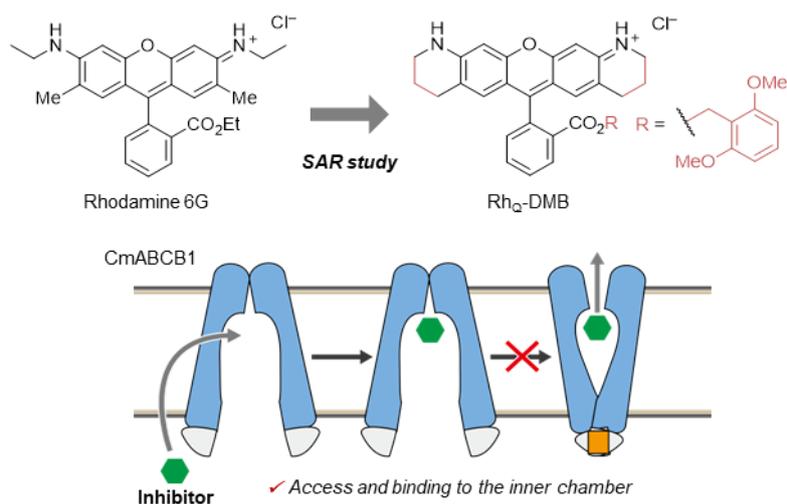


Figure 1-7 Outline of chapter 2.

第三章、第四章では、円偏光発光 (CPL) を示すキサンテン色素の開発について述べる (Figure 1-8)。まず、第三章ではヘリセンが組み込まれたフルオレセインの設計と合成に取り組んだ結果について述べている。すなわち、フェノールとベンゾフェノンとを酸性条件下加熱することで左右非対称なキサンテン色素が合成可能であることに着目し、光学的に純粋なヘリセノールとベンゾフェノンから対応する含ヘリセンフルオレセインを合成した。得られた含ヘリセンフルオレセインの光学特性を評価した結果、中性条件下では青色 CPL を、塩基を添加した際は赤色 CPL を示した。すなわち、今回開発した発光分子は、フルオレセインの塩基応答性とヘリセンの CPL 特性を併せ持つことが分かった。また、今回合成した分子は液性の変化により、波長だけでなく CPL の符号も変化することを見いだした。

第四章では、フルオレセインの水酸基がアミノ基に置換された含ヘリセンアミノキサンテンの合成と光学特性の評価について述べている。この発光分子はアミノキサンテンの酸

応答性とヘリセンのCPL特性を併せ持つことが分かった。さらに、中性条件下、紫外光を照射することで赤色CPLを示すことが判明し、光照射によって励起状態において閉環状態から開環状態へと構造変化していることが示唆された。このときの励起状態における挙動を、過渡吸収分光法を用いて考察した。

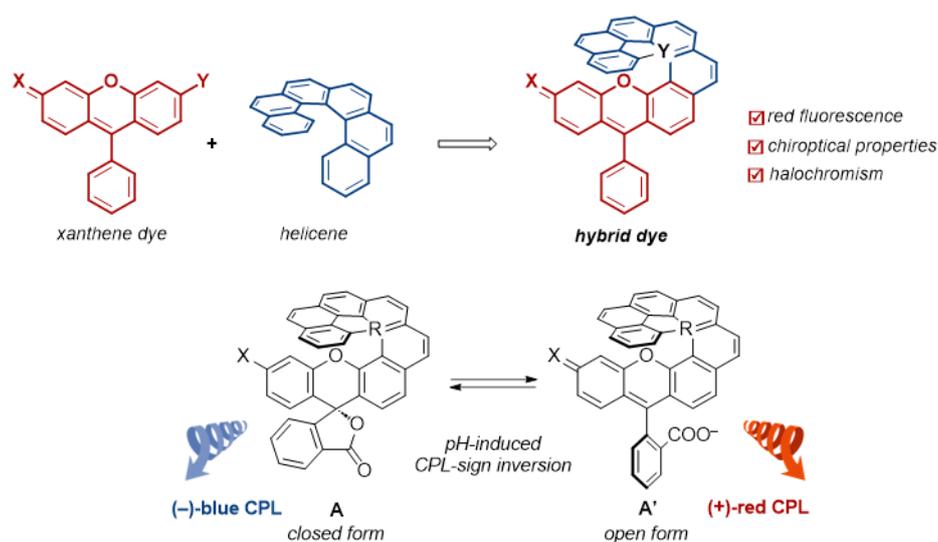


Figure 1-8 Outline of the thesis in chapter 3 and 4.

引用文献

1. Chisholm, Hugh, ed. (1911). "Perkin, Sir William Henry". *Encyclopædia Britannica*. Vol. 21 (11th ed.). Cambridge University Press. p. 173.
2. O'regan, B.; Grätzel, M. *Nature* **1991**, *353*, 737–740.
3. Hagfeldt, A.; Boschloo, G.; Sun, L.; Kloo, L.; Pettersson, H. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6595–6663.
4. Tang, C. W.; Van Slyke, S. A. *Appl. Phys. Lett.* **1987**, *51*, 913–915.
5. Sasabe, H.; Kido, J. *J. Mater. Chem. C* **2013**, *1*, 1699–1707.
6. Ueno, T.; Nagano, T. *Nat Methods*, **2011**, *8*, 642–645.
7. Eccleston, J. F.; Hutchinson, J. P.; Jameson, D. M. Fluorescence-Based Assays. In *Progress in Medicinal Chemistry*; King, F. D.; Lawton, G., Eds.; Elsevier, 2005; Vol. 43, pp 19– 48.
8. 中澄博行 (編) (2013) .機能性色素の科学 色素の基本から合成・反応、実際の応用まで 化学同人
9. Zimmer, M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2823–2832.
10. Su, Y.; Yu, B.; Wang, S.; Cong, H.; Shen, Y. *Biomaterials* **2021**, *271*, 120717.
11. Kamino, S.; Uchiyama, M. *Org. Biomol. Chem.*, **2023**, *21*, 2458–2471.
12. Wang, L.; Du, W.; Hu, Z.; Uvdal, K.; Li, L.; Huang, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 14026–14043.
13. Chen, X.; Pradhan, T.; Wang, F.; Kimand, J. S.; Yoon, J. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 1910–1956.

14. von Bayer, A. *Chem. Ber.* **1871**, *5*, 255.
15. M. Ceresole, German patent 44002, **1887**, November 13
16. M. Ceresole, German patent 44002, **1888**, January 31.
17. Umeda, M. *Gann* **1956**, *47*, 51–78.
18. Modica-Napolitano, J. S.; Aprille, J. R. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 4361–4365.
19. Shapiro, A. B.; Ling, V. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *254*, 189–193.
20. Lee, M. H.; Han, J. H.; Lee, J. H.; Park, N.; Kumar, R.; Kang, C.; Kim, J. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6206–6209.
21. Moon, H.; Park, J.; Tae, J. *Chem. Rec.* **2016**, *16*, 124–140.
22. Urano, Y.; Kamiya, M.; Kanda, K.; Ueno, T.; Hirose, K.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4888–4894.
23. Carvell, M.; Robb, I. D.; Small, P. W. *Polymer* **1998**, *39*, 393–398.
24. Jang, Y. H.; Hwang, S.; Chung, D. S. *Chem. Lett.* **2001**, *30*, 1316–1317.
25. Dujols, V.; Ford, F.; Czarnik, A. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7386–7387.
26. Zhou, Y.; Wang, F.; Kim, Y.; Kim, S.-J.; Yoon, J. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4442–4445.
27. Chen, Z.; Ye, F.; Shao, T.; Wu, Y.; Chen, M.; Zhang, Y.; Zhao, X.; Zou, B.; Ma, Y. *Macromolecules* **2022**, *55*, 2310–2319.
28. Babazadeh-Mamaqani, M.; Mohammadi-Jorjafki, M.; Alipour-Fakhri, S.; Mardani, H.; Roghani-Mamaqani H. *Macromolecules* **2023**, *56*, 5843–5853.
29. Battula, H.; Nath, M.; Mishra, S.; Jayanty, S. *RSC Adv.* **2023**, *13*, 5134–5148.
30. Bar, N.; Chowdhury, P. *ACS Appl. Electron. Mater.* **2022**, *4*, 3749–3771.
31. Amat-Guerri, F.; Costela, A.; Figuera, J. M.; Florido, F.; Sastre, R. *Chem. Phys. Lett.* **1993**, *209*, 352–356.
32. Koide, Y.; Urano, Y.; Hanaoka, K.; Terai, T.; Nagano, T. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 600–608.
33. Fu, M.; Xiao, Y.; Qian, X.; Zhao, D.; Xu, Y. *Chem. Commun.* **2008**, *15*, 1780–1782.
34. Grimm, J. B.; Sung, A. J.; Legant, W. R.; Hulamm, P.; Matlosz, S. M.; Betzig, E.; Lavis, L. D. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1303–1310.
35. Jia, S.; Ramos-Torres, K. M.; Kolemen, S.; Ackerman, C. M.; Chang, C. J. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 1844–1852.
36. Zhou, X.; Lai, R.; Beck, J. R.; Li, H.; Stains, C. I. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 12290–12293.
37. Liu, J.; Sun, Y.; Zhang, H.; Shi, H.; Shi, Y.; Guo, W. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 22953–22962.
38. Fukazawa, A.; Suda, S.; Taki, M.; Yamaguchi, E.; Grzybowski, M.; Sato, Y.; Higashiyama, T.; Yamaguchi, S. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 1120–1123.
39. Li, M.; Long, S.; Kang, Y.; Guo, L.; Wang, J.; Fan, J.; Du, J.; Peng, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 15820–15826.
40. Xiong, T.; Li, M.; Chen, Y.; Du, J.; Fan, J.; Peng, X. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 2515–2520.
41. Kodan, A.; Yamaguchi, T.; Nakatsu, T.; Sakiyama, K.; Hipolito, C. J.; Fuhioaka, A.; Hirokane, R.; Ikeguchi, K.; Watanabe, B.; Hiratake, J.; Kimura, Y.; Suga, H.; Ueda, K.; Kato, H. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 4049–4054.
42. Miwa, S.; Takikawa, H.; Takeuchi, R.; Mizunuma, R.; Matsuoka, K.; Ogawa, H.; Kato, H.; Takasu, K. *ACS Med. Chem. Lett.* Accepted Article. DOI: 10.1021/acsmchemlett.3c00526
43. Gottesman, M. M.; Fojo, T.; Bates, S. E. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 48–58.
44. Eckford, P. D. W.; Sharom, F. J. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2989–3011.
45. Gannon, M. K.; Holt, J. J.; Bennett, S. M.; Wetzel, B. R.; Loo, T. W.; Bartlett, M. C.; Clarke, D. M.; Sawada, G. A.; Higgins, J. W.; Tomblin, G.; Raub, T. J.; Detty, M. R. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3328–3341.

46. Inoue, Y.; Yamaguchi, T.; Otsuka, T.; Utsunomiya, Y.; Pan, D.; Ogawa, H.; Kato, H. *Protein Sci.* **2022**, *31*, e4331.

第二章 P糖タンパク質の阻害剤開発に向けた構造活性相関研究

第一節 研究背景

多剤耐性 (Multidrug resistance, MDR) は、様々な構造や作用機序を持つ医薬品に対する効果が低下する現象であり、がん治療における大きな課題である^{1,2}。これまでの研究により、がん細胞の MDR 獲得において、ATP 結合カセットトランスポーター (ATP-binding cassette transporter, ABC transporter) の過剰発現が重要な要因の一つであることが明らかとなっている³⁻⁵。ヒトでは、ABC トランスポータースーパーファミリーが少なくとも 48 種類存在し、その中でも主に 3 種 (ABCB1、ABCC1、ABCG2) が MDR に関与していると報告されている⁶。特に、P 糖たんぱく質 (P-gp、MDR1、ABCB1) は、MDR に関与することが最初に報告されたトランスポーターである^{7,8}。ABCB1 は、様々な構造を有する化合物を排出し、その中には有毒な生体異物や内因性の代謝物だけではなく、パクリタキセルやドキソルビシンといった化学療法で用いられる抗がん剤も含まれている (Figure 2-1)^{9,10}。その結果、抗がん剤の細胞集積が抑制され、薬効が十分に得られなくなることが問題となっている^{11,12}。

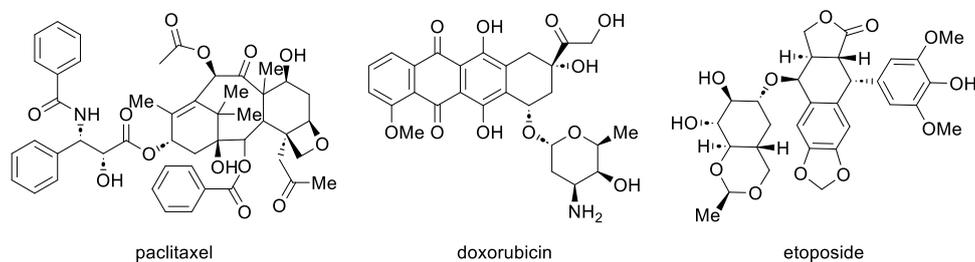


Figure 2-1 Elected reported ABCB1 substrates.

ABCB1 は長年にわたり、MDR を克服するための有効な創薬ターゲットとみなされ、これまで数多くの ABCB1 阻害剤の開発が進められてきた (Figure 2-2)。実際、ABCB1 阻害剤を抗がん剤と同時に服用する戦略は、MDR を回避し、抗がん剤を細胞集積させることができると考えられ、*in vitro* や *in vivo* での実験では有望な結果が得られている¹³。例えばカルシウムチャネルの阻害剤であるベラパミルはドキソルビシンを含む多数の抗がん剤の細胞集積を引き起こすことが報告されている。しかしながら、ABCB1 の阻害剤開発に関する数十年にわたる研究にもかかわらず、臨床研究で満足できる結果はほとんど得られていない¹⁴⁻¹⁷。こ

のように阻害剤開発が難航している主な要因の一つは、ABCB1による基質輸送のメカニズムの詳細が未解明であることが挙げられる。具体的には、基質結合部位に加え、ABCB1が基質を取り込んだ時、輸送途中、そして排出した直後の全体構造については、未解明な点が多い。これまでに、構造生物学的アプローチによる ABCB1 の基質輸送機構の解明が試みられ、原核生物および真核生物において野生型もしくは変異体の ABCB1 の全体構造が解明されている²⁹⁻³⁴。また、例は限られているものの、ヒト ABCB1 が基質を取り込んだ際の構造もクライオ電子顕微鏡法によって明らかにされている^{17,23-25}。しかしながら、これらの構造が基質輸送過程のものであるのかは明らかとなっていない。これは、ATP加水分解能を失わせる変異が導入されたトランスポーターや抗体を結合させることで基質輸送能が低下した状態のトランスポーターと基質との複合体として報告されているためである。さらに、これらの文献で用いられた基質は ABCB1 を阻害することは報告されているが、ABCB1により輸送されるかは解明されていない。そのため、得られた構造が基質輸送のどの過程に該当するのかが判明していなかった。

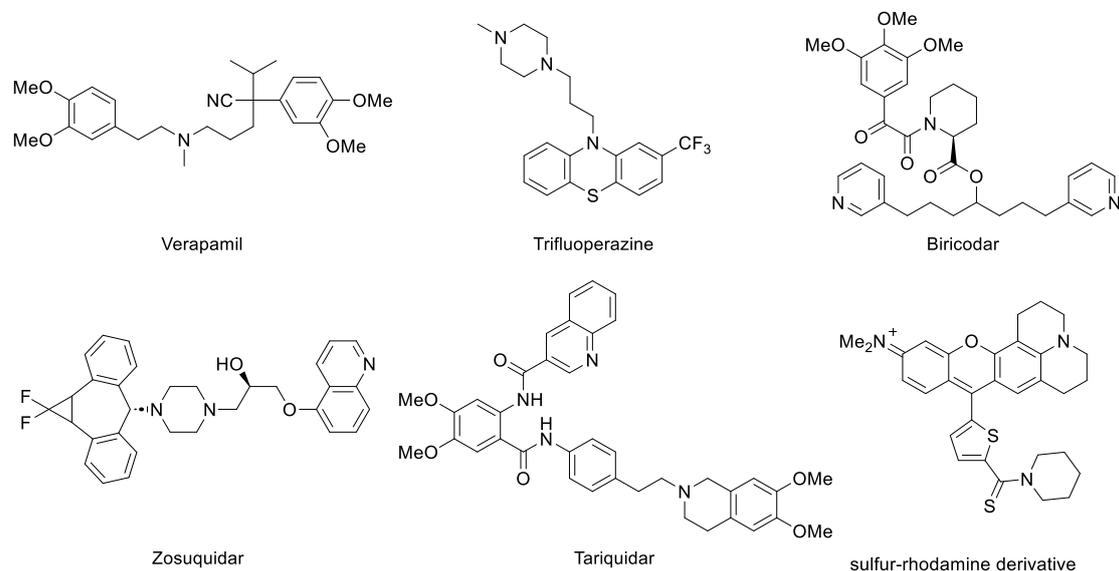


Figure 2-2 Elected reported ABCB1 inhibitors.

ABCB1の基質輸送サイクルは Figure 2-3-a に示すように一般的に考えられている。すなわち、まずトランスポーターは内向き型 (inward-facing) の立体構造をとり、基質が結合する

内腔 (cavity) を細胞内側に露出している。この構造において、基質は膜貫通ドメインへの結合を介して内腔に入る。その後、ATP がヌクレオチド結合ドメインに結合するとともに、基質が結合する内腔が圧縮され、外向き型 (outward-facing) への構造変換が起こることで基質が細胞外へと輸送される。現状では、内向き型および外向き型の構造は散発的に報告されており、同一分子でそれぞれの構造が決定されているものは限られている。したがって、基質輸送機構についての知見を深めるためにはそれぞれの状態の構造を野生型もしくは同一の変異体において議論することが重要である。一方、共同研究者である本学構造生物薬学分野の加藤らは、単細胞紅藻シズン (*Cyanidioschyzon marolae*) 由来の ABCB1 である CmABCB1 が、ヒトの ABCB1 と同様の構造および基質特異性を示し、高い熱安定性を示すことを報告している (Figure 2-3-b) ^{19,21}。さらに、彼らはその内向き型および外向き型の構造を同一分子にて X 線結晶構造解析により詳細に決定している ^{19,21}。しかし、基質を取り込んだ状態で

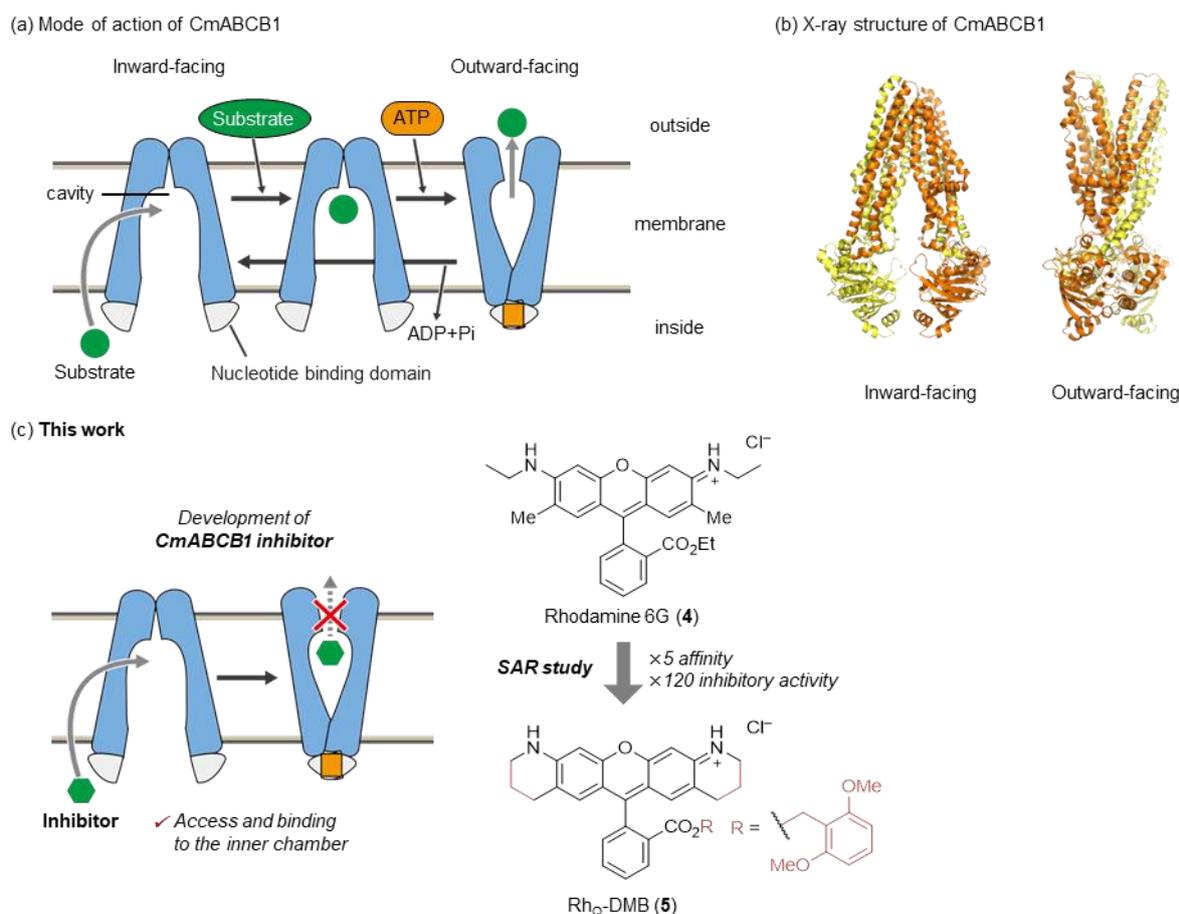


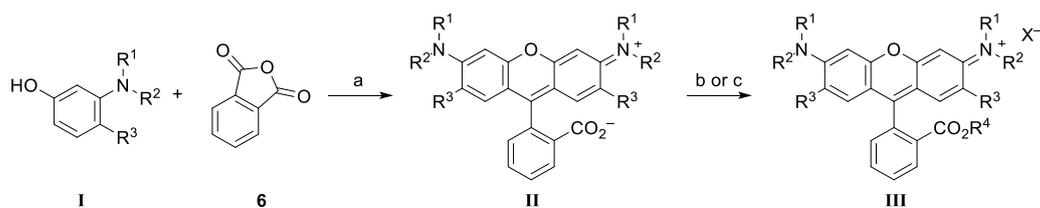
Figure 2-3 (a) Mode of action of ABCB1; (b) X-ray structure of CmABCB1; (c) Development of a CmABCB1 inhibitor.

の構造はこれまで決定されていない。ABCB1 が基質を取り込んだ複合体の構造を解明することは、トランスポーターの分子動力学を深く理解するうえで重要である。

このような背景のもと、筆者は、構造生物学的アプローチによる CmABCB1 の基質輸送メカニズムの解明を念頭に、CmABCB1 阻害剤の開発に着手した。具体的には、CmABCB1 と基質の複合体構造を解明するために、トランスポーター内に取り込まれながらも、排出されない基質の開発を試みることにした (Figure 2-3-c)。そこで筆者は、多数存在する ABCB1 の輸送基質の中から、ローダミン 6G (4) を構造活性相関研究の出発点として選択した。ローダミン 6G (4) はヒト ABCB1 および CmABCB1 の輸送基質であることで知られており¹⁹、ABCB1 変異体の輸送能や別途開発した阻害剤の阻害活性を評価する際にも用いられてきた。また、加藤らは、トリプトファンの蛍光消光実験によって 4 が CmABCB1 変異体の内腔に入ることも確認している²⁶。さらに、キサントゲン色素を基盤とした阻害剤開発の先駆的な例として、Raub と Detty らはスルファローダミン誘導体 (Figure 2-2 右下) がマウス及びヒト ABCB1 に対する効果的な阻害剤であることを報告している¹⁴。以上を踏まえ、本研究では、ローダミン誘導体が CmABCB1 を阻害する可能性について検討すべく、多様なローダミン誘導体を有機化学的手法により合成し、これらの誘導体による CmABCB1 に対する活性を評価した。

第二節 基質合成

既知のローダミン誘導体の合成法²⁷を参考に、種々のローダミン誘導体を合成した (Scheme 2-1)。すなわち、アミノフェノール I と無水フタル酸 (6) とを *o*-ジクロロベンゼン中、175 °C で加熱することでカルボン酸 II を得た。その後、得られたカルボン酸 II を種々のアルコールと縮合することで、合計 19 種のローダミン誘導体 III を合成した。得られた生成物はいずれも高極性化合物であったが、クロロホルムとメタノールの混合溶媒を展開溶媒とする順相クロマトグラフィーによって精製可能であった。このとき、充填剤であるシリカゲルに含まれる無機塩を除くために、クロマトグラフィーの前にメタノールによる脱塩操作を行った。



Scheme 2-1 Synthesis of rhodamine derivatives.

Reagents and conditions: (a) *o*-dichlorobenzene, 175 °C; (b) alcohol (R⁴OH), EDC·HCl, DMAP, CH₂Cl₂, rt; (c) alkyl iodide (R⁴I), Cs₂CO₃, DMF, rt.

第三節 ATPase 活性評価

本節では、合成したローダミン誘導体の構造活性相関研究について述べる。ABC トランスポーターは、細胞外への基質排出過程において、ATP を ADP とリン酸に加水分解することが知られている²⁸。この特性はヒト P-gp に限られたものではなく、CmABC B1 にも明確に観測される。特に注目すべきは、ミセル中に導入した CmABC B1 が顕著な熱安定性を有している点である。すなわち、この高い熱安定性が CmABC B1 の定量的かつ速度論的な解析を可能にする重要な要因であり、先行研究では実際に、高純度の CmABC B1 を用いてその機能的特性を詳細に解析している¹⁹。

CmABC B1 は基質非存在時に低い定常 ATPase 活性を示し、基質が存在する場合は高い ATPase 活性を示すことが報告されている (Figure 2-4-a)³¹。この ATPase 活性の亢進は、ヒト P-gp にも報告されている現象である^{29,30}。基質濃度の上昇に伴って ATPase 活性は増加するが、最大値に達した後は基質濃度が高くなるにつれて減少し、特徴的なベル型の曲線を描く (Figure 2-4-b)。この現象は、ミカエリスメンテンの式を適切に修正することにより解析可能である³¹⁻³⁴。高濃度における ATPase 活性の低下は基質阻害と解釈され、トランスポーターや酵素の一般的な特性として広く認識されている。

筆者は合成したローダミン誘導体の CmABC B1 に対する親和性と阻害活性を評価した。これらのパラメータは、以下の式 1 に基づいて算出される。

$$v = [e] \left[k_{basal} + \frac{(k_{sub} - k_{basal})[s]}{K_m + [s]} \left(1 - \frac{[s]}{K_i + [s]} \right) \right] \quad \text{[式 1]}$$

ここで、 v は ATP 加水分解初速度、 $[e]$ は CmABC1 の濃度、 $[s]$ は基質濃度、 k_{basal} は基質非存在時の ATPase 活性の速度定数、 k_{sub} は基質依存性 ATPase 活性の速度定数、 K_m は 5 mM の ATP 存在下での輸送基質のミカエリス定数、 K_i は輸送基質による阻害定数である。 K_m が低い基質はトランスポーターの内腔に入りやすく、その構造変換を引き起こしやすいと考えられる。一方で、 K_i が低い基質は基質輸送を効率的に阻害し、排出が困難であるとみなすことができる。したがって、本研究の目的に適合する基質は K_m と K_i の両方が低い基質であると考え、4 に比べ K_m 、 K_i の低い誘導体の探索を行うこととした。

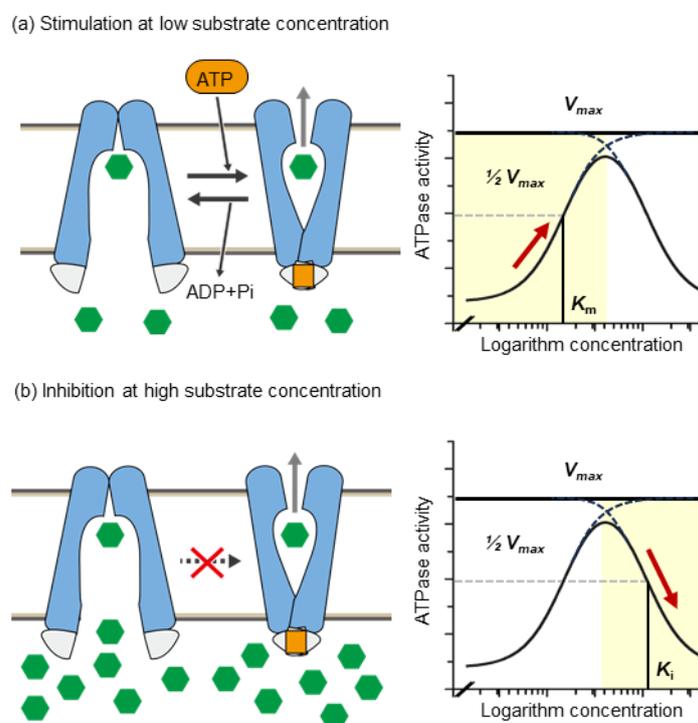


Figure 2-4 (a) The behavior of CmABC1 at low substrate concentration showing substrate-stimulated ATPase activity. (b) The behavior of CmABC1 at high substrate concentration showing substrate inhibition.

Table 2-1 に主にキサンテン骨格上の置換基や縮環様式の異なる誘導体の親和性及び阻害活性の結果を示す。まず、ローダミン 6G (4) は中程度の親和性 ($K_m = 2.9 \mu\text{M}$) と阻害活性 ($K_i = 640 \mu\text{M}$) を示し、対応するブチルエステル 7 は阻害活性が向上した。そこで、その後の検討はブチルエステル体を用いることにした。*N*-ブチル誘導体 8 は阻害活性が向上したものの ($K_i = 160 \mu\text{M}$)、親和性の向上は見られなかった ($K_m = 3.2 \mu\text{M}$)。ピロリジノ基を導入し

た誘導体 **9** は、親和性 ($K_m = 1.1 \mu\text{M}$) と阻害活性 ($K_i = 110 \mu\text{M}$) の両方が向上した。一方、ピペリジン環が縮環した5環性ローダミン誘導体である Q-ローダミン誘導体 **10** は、親和性を維持しつつ ($K_m = 1.7 \mu\text{M}$)、阻害活性の向上が見られた ($K_i = 14 \mu\text{M}$)。しかし、6員環をさらに追加した多環性ローダミン誘導体 **11** は、中程度の阻害活性 ($K_i = 43 \mu\text{M}$) を示すにとどまった。

キサントレン部位の最適構造 (Q-ローダミン) を見出したことに基づき、エステル部位の構造最適化を行うこととした (Table 2-2)。CmABCB1 の内腔の上部に位置する基質結合部位は、疎水性が高く、芳香族性の残基が多く存在していることが知られている¹⁹。このことから、筆者はエステル部位に芳香環を導入することで親和性及び阻害活性を向上させることができると推測した。実際に、ABCB1 への親和性が芳香環の導入により向上することが過去の関連研究で報告されている³⁵⁻³⁷。そこで、まずはベンジル基 (**12**) とナフチル基 (**13**) を導入

Table 2-1 Effect of the xanthene moiety on affinity and inhibitory activity toward CmABCB1.^a

| Compd | Structure | K_m (μM) | K_i (μM) | Compd | Structure | K_m (μM) | K_i (μM) |
|-------|-----------|-------------------------|-------------------------|-------|-----------|-------------------------|-------------------------|
| 4 | | 2.9 ± 0.14 | 690 ± 40 | 9 | | 1.1 ± 0.095 | 110 ± 20 |
| 7 | | 4.6 ± 0.18 | 560 ± 180 | 10 | | 1.7 ± 0.29 | 14 ± 1.0 |
| 8 | | 3.2 ± 1.1 | 160 ± 95 | 11 | | 1.5 ± 0.25 | 43 ± 13 |

^a K_m and K_i values were obtained from three independent repeats except **9**. Data of **9** were obtained from four independent repeats.

したところ、親和性及び阻害活性の向上が確認された。しかし、1 炭素多いフェネチル基を有する誘導体 **14** は親和性が低下した ($K_m = 1.4 \mu\text{M}$)。そこで、芳香環上の置換基の改変が比較的容易なベンジル基を採用し、検討を継続した。まず、メタ位に置換基を導入した場合、電子供与基、求引基にかかわらず、親和性が向上した。すなわち、メチル (**15**)、ジメチルアミノ (**16**)、メトキシ (**17**)、トリフルオロメチル (**18**)、ニトロ (**19**) 基をベンジル基に導入した際に親和性が向上した。一方、阻害活性に関しては、電子求引性基を有する誘導体 **18** および **19** において中程度の低下が見られた (**18**: $K_i = 18 \mu\text{M}$, **19**: $K_i = 12 \mu\text{M}$)。

続いて、置換基の位置と数の影響を評価するために (**5**, **20-24**)、化合物の入手性を考慮し

Table 2-2 Effects of the ester moiety on affinity and inhibitory activity toward CmABC1.^a

| Compound | R ⁴ | K _m (μM) | K _i (μM) | Compound | R ⁴ | K _m (μM) | K _i (μM) |
|-----------|----------------|---------------------|---------------------|------------------------------------|----------------|---------------------|---------------------|
| 10 | | 1.7 ± 0.3 | 14 ± 1 | 19 | | 0.55 ± 0.03 | 12 ± 2 |
| 12 | | 0.81 ± 0.12 | 8.9 ± 0.7 | 20 | | 3.9 ± 2.0 | 1.2 ± 0.5 |
| 13 | | 0.77 ± 0.23 | 9.6 ± 2.0 | 21 | | 2.3 ± 1.0 | 6.3 ± 1.8 |
| 14 | | 1.4 ± 0.3 | 8.1 ± 1.6 | 22 | | 0.50 ± 0.10 | 8.2 ± 0.8 |
| 15 | | 0.56 ± 0.10 | 8.4 ± 1.3 | 23 | | 0.73 ± 0.16 | 9.1 ± 2.0 |
| 16 | | 0.52 ± 0.09 | 10 ± 3 | 24 | | 0.31 ± 0.11 | 31 ± 5 |
| 17 | | 0.58 ± 0.10 | 8.2 ± 1.7 | 5 (Rh _Q -DMB) | | 0.55 ± 0.13 | 5.8 ± 1.3 |
| 18 | | 0.44 ± 0.11 | 18 ± 4 | | | | |

^aK_m and K_i values were obtained from three independent repeats.

てメトキシ基とトリフルオロメチル基に注目した。トリフルオロメチル基をオルト位に1つ、またはメタ位に2つ導入した誘導体 **20** および **21** は、親和性が顕著に低下した。このとき、誘導体 **20** のデータは、今回用いた算出方法では K_m 値が K_i 値より大きくなるという一見、不自然な結果を示した。これは、低濃度域での非線形曲線において ATPase 活性が飽和するはるか前に基質による阻害が生じている可能性を示唆している。一方、メトキシ基はその数と位置に関わらず、親和性が向上する効果を示した。すなわち、*o*-メトキシ基 (**22**)、*p*-メトキシ基 (**23**)、*m,m'*-ジメトキシ基 (**24**)、*o,o'*-ジメトキシ基 (**5**) を持つ誘導体はいずれも低い K_m 値を示した。その中でも、*o,o'*-ジメトキシベンジル誘導体 **5** (Rh_Q-DMB) は親和性、阻害活性ともに優れており、親化合物であるローダミン 6G (**4**) と比較し K_m 値 (0.55 μ M) が6倍、 K_i 値 (5.8 μ M) が120倍向上することが分かった (Figure 2-5)。

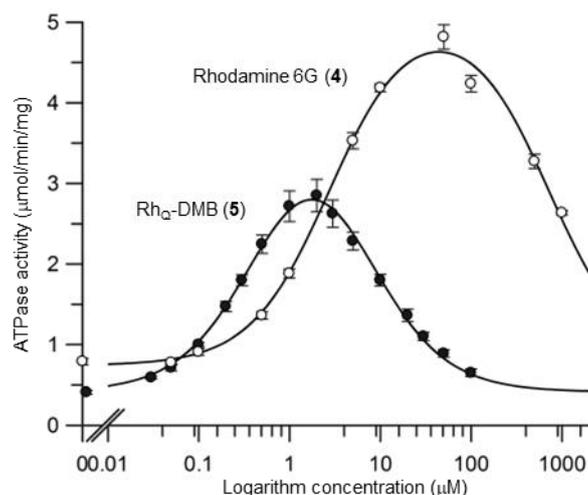


Figure 2-5 Substrate-concentration dependence of CmABCB1 ATPase activity. The ATPase activity was measured as a function of rhodamine 6G (**4**) or RhQ-DMB (**5**) concentration with 5 mM ATP at 37 °C in a buffer solution of 50 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 37 °C), 150 mM NaCl, and 0.05% (w/v) β -DDM for 30 min. Data are means \pm SD ($n = 3$). The solid line is a fit of the equation 1.

第四節 薬剤耐性試験

前節の結果から、Rh_Q-DMB (**5**) が CmABCB1 の ATPase 活性に対する高い阻害活性を示すことが示唆された。しかし、今回行ったミセル中での ATPase 活性測定は基質と CmABCB1

との相互作用を間接的に評価しているに過ぎない。したがって、**5** が実際に阻害剤として機能し、CmABC1の輸送能が抑制されているかどうか、別途確認する必要があった。

そこで、Rh_Q-DMB (**5**) の作用機序に関する知見を得るために、薬剤感受性酵母として知られている *Saccharomyces cerevisiae* AD1-8u⁻を用いた薬剤耐性試験を実施した (Figure 2-6)。*S. cerevisiae* AD1-8u⁻は、MDR に関与する主要な ABC トランスポーターを欠損させた株であり、これに所望のトランスポーターを発現させることで、その機能を評価できる³⁸。ローダミン類は酵母の増殖を抑制することが知られており、CmABC1 非発現株では、低濃度でもローダミン類が細胞内に蓄積し、増殖が抑制される。これに対し、CmABC1 発現株ではローダミン類が排出されるため、より高濃度のローダミン類に対しても抵抗性を示すことが知られている¹⁹。

実際にローダミン 6G (**4**) を用いて薬剤耐性試験を実施してみると、CmABC1 発現株では 30 μM まで細胞増殖を抑制しなかったが (Figure 2-6-a, WT)、CmABC1 非発現株では 1 μM でも増殖が抑制された (Figure 2-6-a, Mock)。これは、ローダミン 6G (**4**) が CmABC1 によって積極的に排出されることを示唆している。

これらの結果を踏まえ、Rh_Q-DMB (**5**) を用いた薬剤耐性試験を実施した (Figure 2-6-b)。もし Rh_Q-DMB (**5**) が CmABC1 の阻害剤として機能する場合、トランスポーターの有無に関わらず細胞増殖を抑制することが予想される。実際に検討したところ、CmABC1 発現株も非発現株も、約 1 μM 以上の濃度で同様の増殖阻害を示すことが分かった。このことから、Rh_Q-DMB (**5**) は CmABC1 によって排出されにくいことが示唆され、先述した高い ATPase

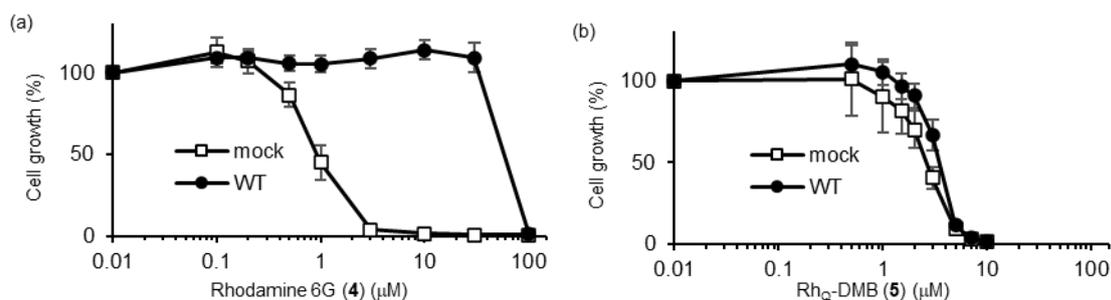


Figure 2-6 Drug susceptibility assay in *S. cerevisiae* AD1-8u⁻ cells in YPD medium for 30 °C for 15–17 h. AD1-8u⁻ cells expressing WT CmABC1 (●) were grown in various concentrations of drugs. For each drug assayed, mock-transfected AD1-8u⁻ cells (□) were also grown. Data are means ± SD (n = 3).

阻害活性と整合する結果となった。

第五節 トリプトファン消光実験

前節の結果から、Rh_Q-DMB (5) が CmABC1 を効果的に阻害することが確認された。しかし、ATPase 活性の亢進は基質が内腔に入る可能性を示唆するものの、内腔での相互作用による阻害を確定させるものではない。例えば、以前、共同研究者の加藤らが報告した環状ペプチド型の阻害剤のように¹⁹、細胞外ドメインと相互作用することによって ATPase 活性に影響を与える可能性も考えられる。これに関連し、共同研究者の小田島はマレイミド基を有する Q-ローダミン誘導体が CmABC1 の内腔に取り込まれることを報告している (Figure 2-7)³⁹。この報告では、CmABC1 の内腔に変異導入されたシステイン残基とマレイミドとの間で共有結合を形成させることで基質を内腔で捕捉している。このように、Rh_Q-DMB と類似した構造を有する誘導体が内腔に取り込まれることが確認されている。しかしながら、この手法はマレイミドのようにシステインと共有結合を形成しうる部位を導入する必要があり、Rh_Q-DMB (5) が内腔に取り込まれるかの確認には別の手法が必要であった。

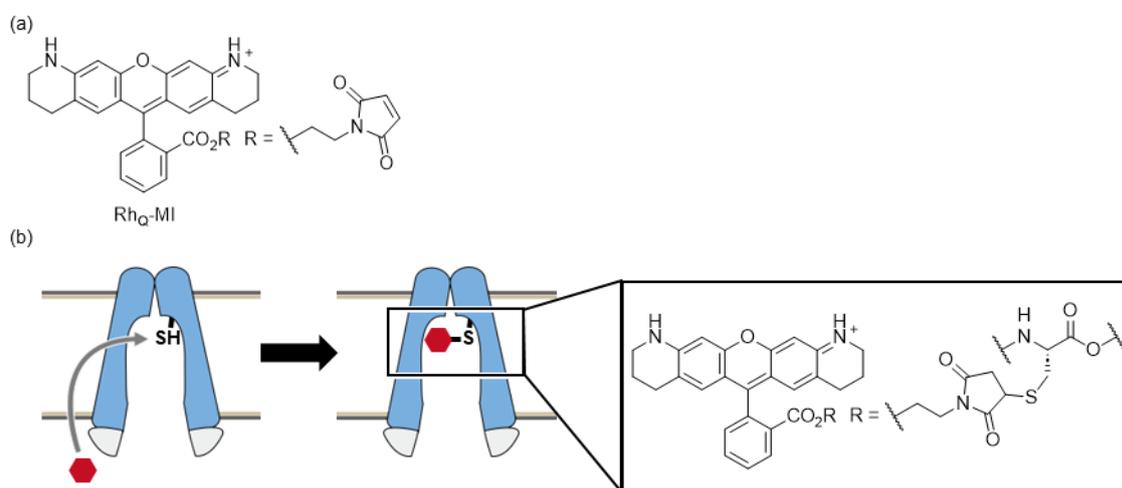


Figure 2-7 (a) Structure of the rhodamine derivative with maleimide. (b) Schematic representation of the Rh_Q-MI trapping by cystein residue.

そこで、今回、加藤らにより最近報告されたトリプトファン蛍光消光実験を利用する手法

を採用した (Figure 2-8) ^{26,40,41}。この方法では、CmABCB1 の内腔への基質の取り込みを観察するために 4WY/M391W 変異体を用いている。この変異体は、4つの内在性トリプトファン残基をチロシン残基に変換し、想定される基質結合部位の最上部にある 391 残基目のメチオニン残基をトリプトファン残基へと変換した変異体である (Figure 2-8-a,b)。この 4WY/M391W 変異体の内腔に位置するトリプトファン残基と基質とが近接することで消光が起こることから、トリプトファン残基由来の蛍光強度をプロットすることで、内腔への基質の取り込みを確認できる (Figure 2-8-c,d)。一方で、導入した5つの変異は基質輸送に大きな影響を及ぼさず、野生型 (WT) とほぼ同じ構造及び活性を持つことが確認されている。また、4WY/M391W 変異体は、2つの内在性トリプトファン残基 (W400、W513) が残存している。これら2つのトリプトファン残基のみを有する 4WY 変異体は野生型の CmABCB1 (WT) と比較し、ローダミン 6G (4) による蛍光の消光が起こりにくいことが確認されている。この結果は、W400 と W513 は基質と相互作用することが少ないことを示唆している。そのため、4WY/M391W 変異体の内腔に基質が取り込まれた際、内腔の W391 由来の蛍光だけが消光され、W400 と W513 に由来する蛍光は維持されるため、蛍光消光率 30%程度でプラトーに達する。このことから、4WY/M391W 変異体の基質濃度依存的な蛍光消光は、内腔

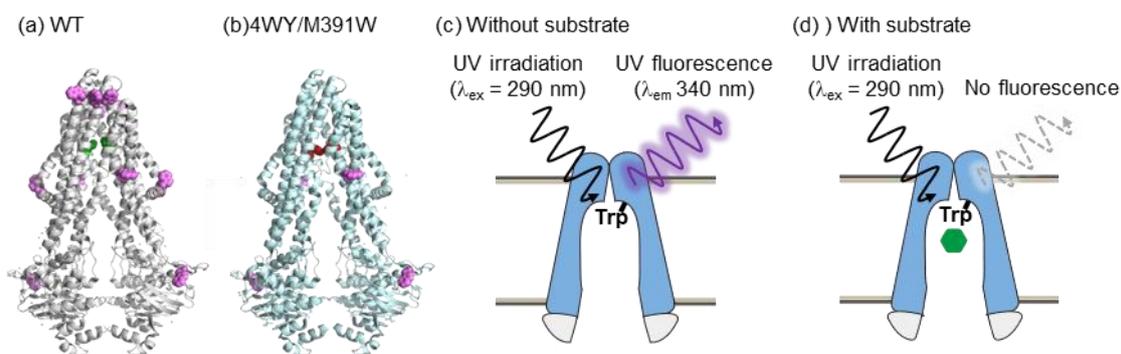


Figure 2-8 Tryptophan quenching analysis. (a) Overall structure of CmABCB1 in the inward-facing state (PDBID: 3WME). The locations of the intrinsic tryptophan residues are shown as magenta spheres and methionine 391 is shown as green spheres. (b) Overall structure of CmABCB1 4WY/M391W mutant in the inward-facing state (PDBID: 7VR5). The locations of the intrinsic tryptophan residues are shown as magenta spheres extrinsic residues are shown as red spheres. (c) Phenomenone observed by irradiation of UV light ($\lambda = 290$ nm) if the substrate does not enter the inner chamber of CmABCB1 4WY/M391W mutant. (d) Phenomenone observed by irradiation of UV light ($\lambda = 290$ nm) if the substrate enters the inner chamber of CmABCB1 4WY/M391W mutant.

に入った基質と内腔の W391 との相互作用により起こったものと判断できる²⁶。

筆者はこの変異体を用い、Rh_Q-DMB (5) と混合した際のトリプトファン残基の蛍光を測定した。その結果、4WY/M391W 変異体のトリプトファン蛍光は Rh_Q-DMB (5) に対して濃度依存的に消光することが分かった (Figure 2-9-a)。Figure 2-9-b は、5 の濃度に応じた 340 nm におけるトリプトファン残基由来の蛍光消光率を示している。その蛍光消光率は 30%程度でプラトーに達し、ローダミン 6G やニカルジピン、およびテトラフェニルホスホニウムといった CmABCB1 に取り込まれることが確認されている基質と同様の結果となった²⁶。

以上の結果から、Rh_Q-DMB は CmABCB1 の内腔に入り、内腔の W391 と相互作用していることが強く示唆された。

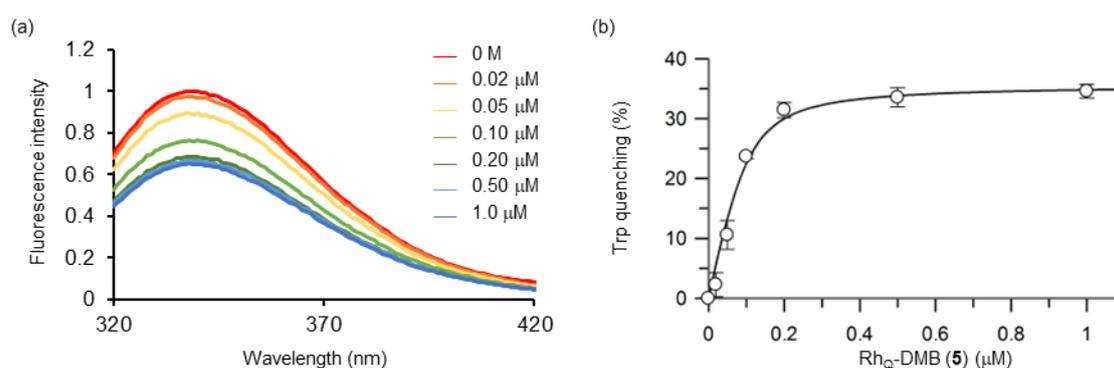


Figure 2-9 Fluorescence emission spectra for the purified CmABCB1 mutant (4WY/M391W) (13 μg/mL) in a buffer solution of 20 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25 °C), 150 mM NaCl, and 0.05% (w/v) β-DDM containing Rh_Q-DMB (5) (0–1.0 μM). Fluorescence emission was recorded at 25 °C following excitation at 290 nm. (b) Quenching of the extrinsic tryptophan fluorescence of P-gp by sequential addition of Rh_Q-DMB (5). Rh_Q-DMB (5) was added at increasing concentrations to a 13 μg/mL solution of purified mutant CmABCB1 (4WY/M391W) in buffer at 25 °C. Fluorescence emission at 340 nm was recorded at 25 °C following excitation at 290 nm.

第六節 要約

本研究では種々のローダミン誘導体を合成し、CmABCB1 と混和させた際の ATPase 活性を測定することで CmABCB1 に対する親和性及び阻害活性を評価した。構造活性相関研究の結果、*o,o'*-ジメトキシベンジル基を有する Q-ローダミン誘導体 Rh_Q-DMB (5) が最も良い親和性および阻害活性を示すこと ($K_m = 0.55 \mu\text{M}$, $K_i = 5.8 \mu\text{M}$) が示唆された。CmABCB1 を発現

させた酵母菌を用いた薬剤耐性試験の結果、RhQ-DMB (5) は CmABC1 によってほとんど排出されないことが示唆された。トリプトファン消光実験では RhQ-DMB (5) の濃度に依存したトリプトファン蛍光の消光が見られ、5 が CmABC1 の内腔に取り込まれていることが示唆された。これらの結果は、RhQ-DMB (5) が CmABC1 の内腔に取り込まれるものの、排出されないという望ましい特徴を有していることを示唆している。現在、基質を取り込んだ際の CmABC1 の構造を X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡法を用いた構造生物学的手法により解明することで、CmABC1 の輸送機構に関する重要な知見を得る試みがなされている。当研究により CmABC1 ないしは ABC1 の輸送機構が解明されることで、ABC1 により排出されにくい薬剤の開発や Structure-driven な ABC1 の阻害剤開発が可能になると期待される。

引用文献

1. Gottesman, M. M. *Annu. Rev. Med.* **2002**, *53*, 615–627.
2. Holohan, C.; Van Schaeybroeck, S.; Longley, D. B.; Johnston, P. G. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 714–726.
3. Shaffer, B. C.; Gillet, J.-P.; Patel, C.; Baer, M. R.; Bates, S. E.; Gottesman, M. M. *Drug Resist. Updates* **2012**, *15*, 62–69.
4. Shao, S.; Huang, X.; Wang, Y.; He, S.; Xu, X.; Zhu, X.; Yang, X.; Ding, Z.; Yao, L.; Huang, Y.; Wang, C. *Int. J. Hematol.* **2014**, *99*, 57–68.
5. O'Donovan, T. R.; O'Sullivan, G. C.; McKenna, S. L. *Autophagy* **2011**, *7*, 509–524.
6. Dean, M.; Rzhetsky, A.; Allikmets, R. T. *Genome Res* **2001**, *11*, 1156–1166.
7. Gottesman, M. M.; Fojo, T.; Bates, S. E. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 48–58.
8. Eckford, P. D. W.; Sharom, F. J. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2989–3011.
9. Aller, S. G.; Yu, J.; Ward, A.; Weng, Y.; Chittaboina, S.; Zhuo, R.; Harrell, P. M.; Trinh, Y. T.; Zhang, Q.; Urbatsch, I. L.; Chang, G. *Science* **2009**, *323*, 1718–1722.
10. Yang, X.; Liu, K. *Curr. Drug Metab.* **2016**, *17*, 806–826.
11. Eadie, L. N.; Hughes, T. P.; White, D. L. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2014**, *95*, 294–306.
12. Cui, H.; Zhang, A. J.; Chen, M.; Liu, J. J. *Curr. Drug Targets* **2015**, *16*, 1356–1371.
13. Binkhathlan, Z.; Lavasanifar, A. *Curr. Cancer Drug Targets* **2013**, *13*, 326–346.
14. Gannon, M. K.; Holt, J. J.; Bennett, S. M.; Wetzel, B. R.; Loo, T. W.; Bartlett, M. C.; Clarke, D. M.; Sawada, G. A.; Higgins, J. W.; Tomblin, G.; Raub, T. J.; Detty, M. R. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3328–3341.
15. Dong, J.; Qin, Zuodong.; Zhang, W.-D.; Cheng, G.; Yehuda, A. G.; Ashby, C. R.; Chen, Z.-S.; Cheng, X.-D.; Qin, J.-J. *Drug Resist. Updat.* **2020**, *49*, 100681.
16. Zhang, H.; Xu, H.; Ashby, C. R.; Assaraf, Y. G.; Chen, Z.-S.; Liu, H.-M. *Med. Res. Rev.* **2021**, *41*, 525–555.

17. Uргаonkar, S.; Nosol, K.; Said, A. M.; Nasief, N. N.; Bu, Y.; Locher, K. P.; Lau, J. Y. N.; Smolinski, M. P. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 191–216.
18. Jin, M. S.; Oldham, M. L.; Zhang, Q.; Chen, J. *Nature* **2012**, *490*, 566–569.
19. Kodan, A.; Yamaguchi, T.; Nakatsu, T.; Sakiyama, K.; Hipolito, C. J.; Fuhioaka, A.; Hirokane, R.; Ikeguchi, K.; Watanabe, B.; Hiratake, J.; Kimura, Y.; Suga, H.; Ueda, K.; Kato, H. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 4049–4054.
20. Esser, L.; Zhou, F.; Pluchino, K. M.; Shiloach, J.; Ma, J.; Tang, W.-k.; Gutierrez, C.; Zhang, A.; Shukla, S.; Madigan, J. P.; Zhou, T.; Kwong, P. D.; Ambudkar, S. A.; Gottesman, M. M.; Xia, D. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 446–461.
21. Kodan, A.; Yamaguchi, T.; Nakatsu, T.; Matsuoka, K.; Kimura, Y.; Ueda, K.; Kato, H. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 88.
22. Kim, Y.; Chen, J. *Science* **2018**, *359*, 915–919.
23. Alam, A.; Kowal, J.; Broude, E.; Roninson, I.; Locher, K. P. *Science* **2019**, *363*, 753–756.
24. Nosol, K.; Romane, K.; Irobalieva, R. N.; Alam, A.; Kowal, J.; Fujita, N.; Locher, K. P. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **2020**, *117*, 26245–26253.
25. Barbieri, A.; Thonghin, N.; Shafi, T.; Prince, S. M.; Col-lins, R. F.; Ford, R. C. *Membranes* **2021**, *11*, 923.
26. Inoue, Y.; Yamaguchi, T.; Otsuka, T.; Utsunomiya, Y.; Pan, D.; Ogawa, H.; Kato, H. *Protein Sci.* **2022**, *31*, e4331.
27. Natarajan, A.; Boden, E. P.; Burns, A.; McCloskey, P. J.; Rishel, M. J. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 4222–4226.
28. Ambudkar, S.V.; Cardarelli, C. O.; Pashinsky, I.; Stein, W. D. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 21160–21166.
29. Horio, M.; Gottesman, M. M.; Pastan, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 3580–3584.
30. Kamimoto, Y.; Gatmaitan, Z.; Hsu, J.; Arias, I. M. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 11693–11698.
31. Litman, T.; Zeuthen, T.; Skovsgaard, T.; Stein, W. D. *Biochim. Biophys. Acta.* **1997**, *1361*, 159–168.
32. Al-Shawi, M. K.; Polar, M. K.; Omote, H.; Figler, R. A. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 52629–52640.
33. Aanismaa, P.; Seelig, A. *Biochemistry* **2007**, *46*, 3394–3404.
34. Gatlik-Landwojtowicz, E.; Aanismaa, P.; Seelig, A. *Biochemistry* **2006**, *45*, 3020–3032.
35. Pearce, H. L.; Safa, A. R.; Bach, N. J.; Winter, M. A.; Cirtain, M. C.; Beck, W.T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 5128–5132.
36. Suzuki, T.; Fukazawa, N.; San-nohe, K.; Sato, W.; Yano, O.; Tsuruo, T. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2047–2052.
37. Isca, V. M. S.; Ferreira, R. J.; Garcia, C.; Monteiro, C. M.; Dinic, J.; Holmstedt, S.; André, V.; Pesic, M.; dos Santos, D. J. V. A.; Candeias, N. R.; Afonso, C. A. M.; Rijo, P. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11*, 839–845.
38. Nakamura, K.; Niimi, M.; Niimi, K.; Holmes, A. R.; Yates, J. E.; Decottignies, A.; Monk, B. C.; Goffeau, A.; Cannon, R. D. *Antimicrob Agents Chemother.* **2001**, *45*, 3366–3374.
39. 小田島圭、令和2年度京都大学薬学研究科修士論文.
40. Liu, R.; Siemiarczuk, A.; Sharom, F. J. *Biochemistry* **2000**, *39*, 14927–14938.
41. Vaiana, A. C.; Neuweiler, H.; Schulz, A.; Wolfrum, J.; Sauer, M.; Smith, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14564–14572.

第三章 含ヘリセンキサンテン色素の合成と評価

第一節 研究背景

光学活性な発光分子の中には、円二色性 (Circular Dichroism, CD) や円偏光発光 (Circularly Polarized Luminescence, CPL) などのキラル光学特性を示すものがあることが知られている¹。円偏光発光とは右回りと左回りに円を描くように振動しながら伝搬するキラルな光を発する現象のことである (Figure 3-1-a)^{2,3}。CPL は通常の発光 (Photoluminescence, PL) と比較すると夾雑物の影響を受けにくく、夾雑系での高感度な分光分析が可能になると期待されている (Figure 3-1-b)⁴。

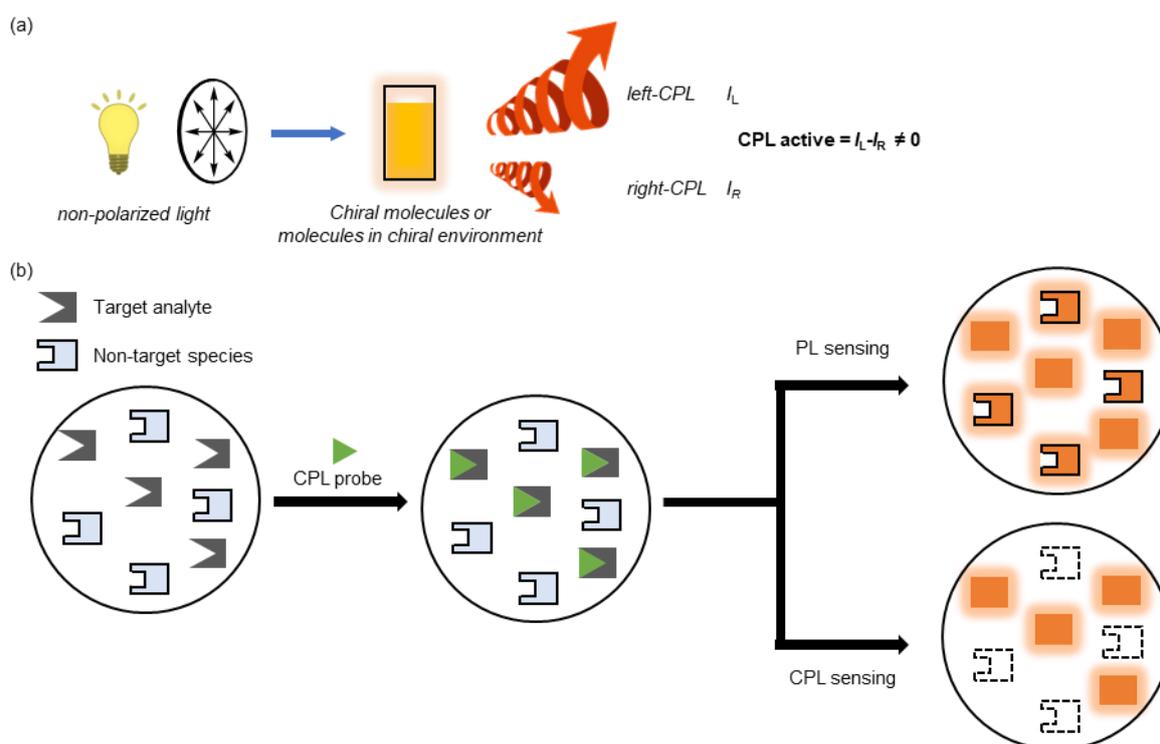


Figure 3-1 (a) Circularly polarized luminescence obtained from chiral substances. (b) Schematic of the sensing method using the CPL probe to detect the target analyte.

CPL 特性を示す分子はこれまでに多数報告されており、3D ディスプレイ⁵やデータ記憶媒体材料⁶、光電素子⁷、バイオイメージング⁸など様々な分野で近年盛んに研究されている。有機発光分子は比較的安価であることに加え、構造改変によって蛍光波長や蛍光量子収率を含む各種光学特性を調節できることが魅力である。代表的な有機 CPL 分子は、ヘリセン類や

ビナフチル類などのキラル π 共役系分子である^{9,10}。しかし、これらの蛍光量子収率は一般的に低く、また長波長での蛍光を示す分子は稀である。これらの課題を克服するため、様々な取り組みが行われてきた。例えば、複素環^{11,12}や電子供与基、電子求引基の導入¹³や金属元素の取り込み¹⁴により光学特性を改善できことが報告されている (Figure 3-2-a)。その中でも、CPL 特性を示す π 共役系分子と既知の蛍光分子とを融合させるアプローチは特筆すべきである (Figure 3-2-b)¹⁵。このような複合型発光分子は、両者の特徴を併せ持つことが期待され、実際に高い蛍光量子収率や長波長での蛍光を示すCPL分子が数多く報告されている。例えば、Emaらは緑色色素として汎用されるBODIPYとヘリセンとを組み合わせることで橙色CPL ($\lambda_{em} = 594 \text{ nm}$, $\Phi_F = 21\%$) を示すことを報告している¹⁶。本アプローチでは他にもフラビン¹⁷、フェノキサジン¹⁸、ベンズイミダゾール¹⁹にヘリセン骨格を導入した分子やBODIPY²⁰やペリレン²¹などに軸不斉を導入したCPL分子が報告されている。

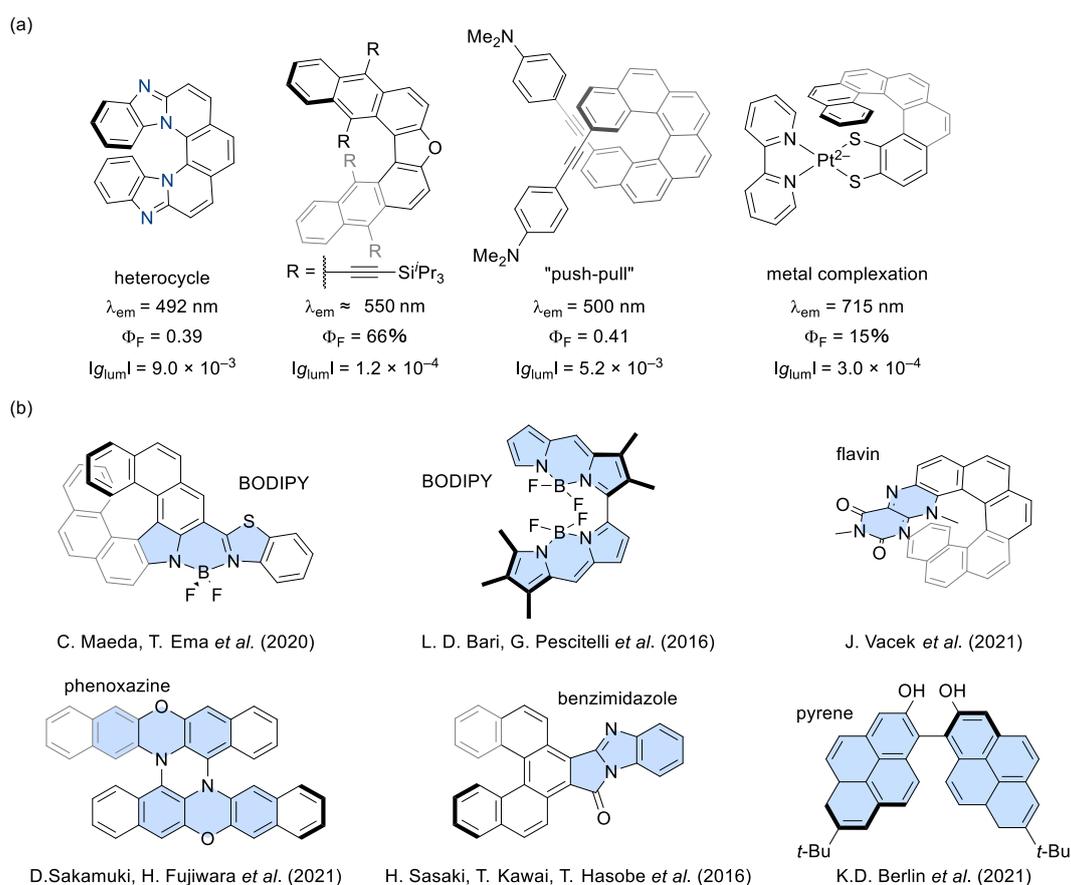


Figure 3-2 (a) Elected helicene derivatives showing improved optical properties. (b) Elected hybrid CPL molecules fused with helicene or by introducing axial chirality.

このような光学特性の改良を目指した CPL 分子に加え、外部刺激に応答して光学特性が可逆的に変化する CPL 分子の開発が近年注目されている。このような現象はクロミズムと呼ばれ、こうした性質をもつ分子はクロミック分子と称される。光学特性を変化させる外部刺激には様々なものが存在し、クロミズム特性はそれぞれの刺激に応じて分類される。特に注目されているクロミック分子には、熱（サーモクロミズム）、光（フォトクロミズム）、pH 変化（ハロクロミズム）、溶媒変化（ソルバトクロミズム）、機械的刺激（メカノクロミズム）に応答するものが挙げられる²²。代表的なクロミック分子には、スピロピラン、ジアリールエテン、ピリジニウム *N*-フェノキシドベタイン、フェノールフタレインなどがある（Figure 3-3）²²。例えば、スピロピランやジアリールエテンはフォトクロミズム特性を示し、光照射による構造変化に応じて光学特性が変化する^{23,24}。これらの分子はフォトスイッチ²⁵やサングラスなどへの応用が行われている。ピリジニウム *N*-フェノキシドベタインは、2つの共鳴構造を反映した異なる光学特性が溶媒の極性によって変化するソルバトクロミズムを示し²⁶、溶媒極性パラメータの指標として活用されている²⁷。フェノールフタレインは pH 変化に応じて光学特性が変化するハロクロミズムを示し²⁸、pH 指示薬として利用されている。これらのクロミック分子は該当する刺激を検知するトレーサー²⁹としてだけでなく、スマートデバイス³⁰やセンサー²⁹、インクジェット色素³¹など様々な分野への応用できるため、盛んに研究が進められている。

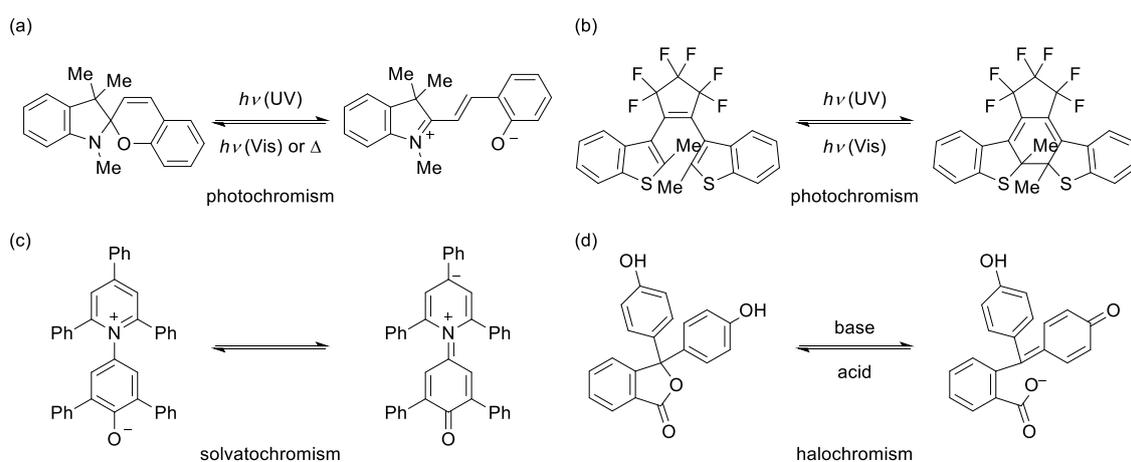


Figure 3-3 Elected molecules showing chromisms.

CPL 特性を有するクロミック分子は、データ記憶媒体材料³²、分子応答性プローブ³³などへの応用が期待されている。これまでに、光³⁴⁻³⁷や pH^{11,19,38-49}、金属イオン^{43,47,50-57}、溶媒^{45,58-75}、レドックス刺激^{76,77}などの外部刺激に応答するものが報告されている。外部刺激による CPL 特性の変化は、大まかに 4 つに分類される (Figure 3-4-a-d)。すなわち、(1) CPL の ON/OFF が切り替わる、(2) 波長は大きく変化せず符号が反転する、(3) 符号は変わらず波長が変化する、(4) 波長と CPL の符号の両方が変化する、の 4 つである。これらの中で、単一の有機小分子において符号の反転を伴うものの報告がいくつか報告されている^{36,45,48,54,60,61,63,66,67,69,72,75}。例えば、Crassous らが開発したピリジン環を有するヘリセンは酸の添加により CPL の波長が変化することを報告している (Figure 3-4-e)³⁸。また、Ema らが開発したビナフチル構造とビピリジル構造とが融合した CPL 分子は、中性条件下では CPL を示し、酸の添加により消光することを報告している (Figure 3-4-f)⁴⁰。

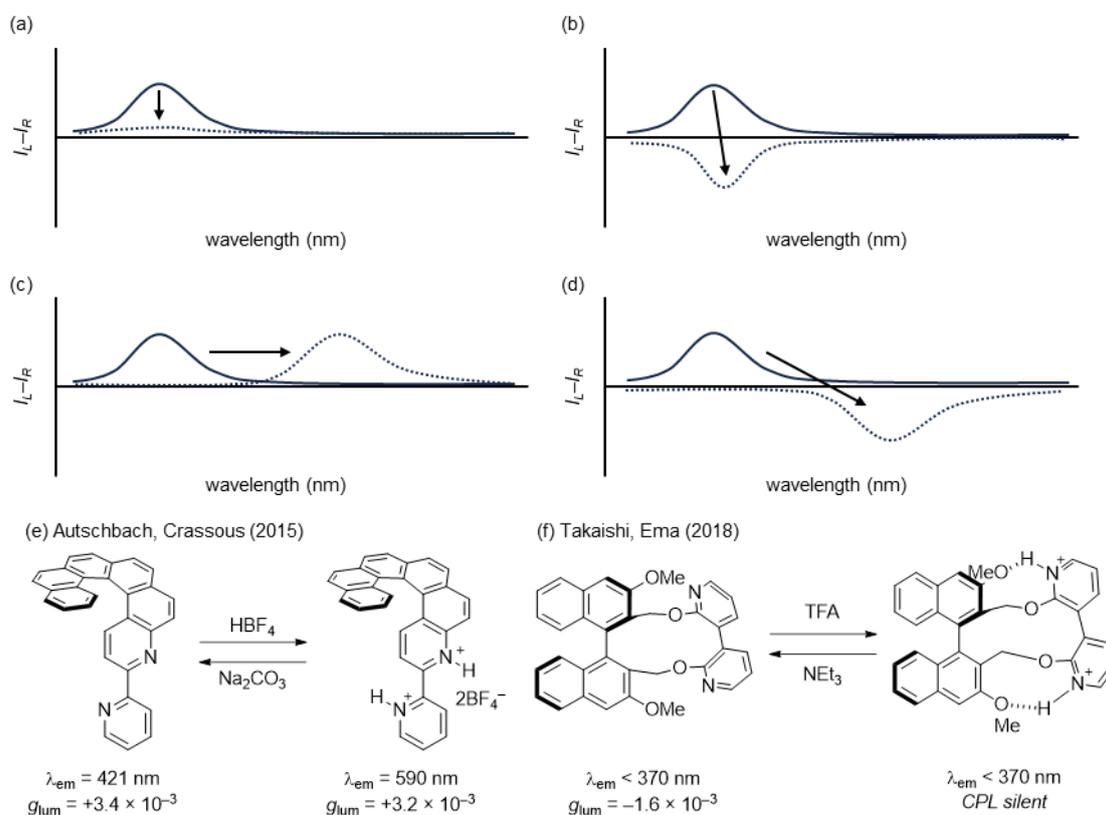


Figure 3-4 (a)–(d) Schematic representation of the change in CPL properties. $I_L - I_R$ represents the difference between intensities of left and right CPL. (e),(f) Selected CPL switches respond to addition of acid/base.

このような背景のもと、筆者は、外部刺激に応答する新しい CPL 分子の開発を目指し、キサントン色素に注目した。序論でも述べたように、キサントン色素はその光学特性のスイッチングが可能な蛍光色素の代表例であり、100 年以上にわたって研究されてきた。これらの色素は、CPL への応用検討も数多く検討されている^{49,79-89}。しかし、これまでの多くの研究は、ポリマーなどによって構築したキラル環境にキサントン色素を導入するものに限られていた (Figure 3-5-a)⁷⁹⁻⁸⁴。一方、光学活性なキサントン誘導体の報告例もあるものの^{49,85-89}、キラル光学特性を示すものは限られている。特に、CPL を発現するキサントン誘導体に関する報告は、Liu らによる最近の報告のみである (Figure 3-5-b)⁴⁹。彼らは軸不斉ビナリール骨格を介して2つのキサントン色素を結合し、酸や塩基の添加によって赤色 CPL ($\lambda_{em} = 610 \text{ nm}$, $\Phi_F = 26\%$) の ON/OFF を制御できることを示した。このように、キサントン色素を基盤とした CPL 分子の開発には、発光部位もしくはその近傍にキラル環境を構築する必要があると考えられる。実際、Fan らは発光部位から離れた位置に軸不斉ビナフトール部位を導入したローダミン誘導体を合成し、その光学特性と調べたところ、キサントン由来の吸収域で CD 特性の発現は観測されなかったことを報告している (Figure 3-5-c)⁸⁸。

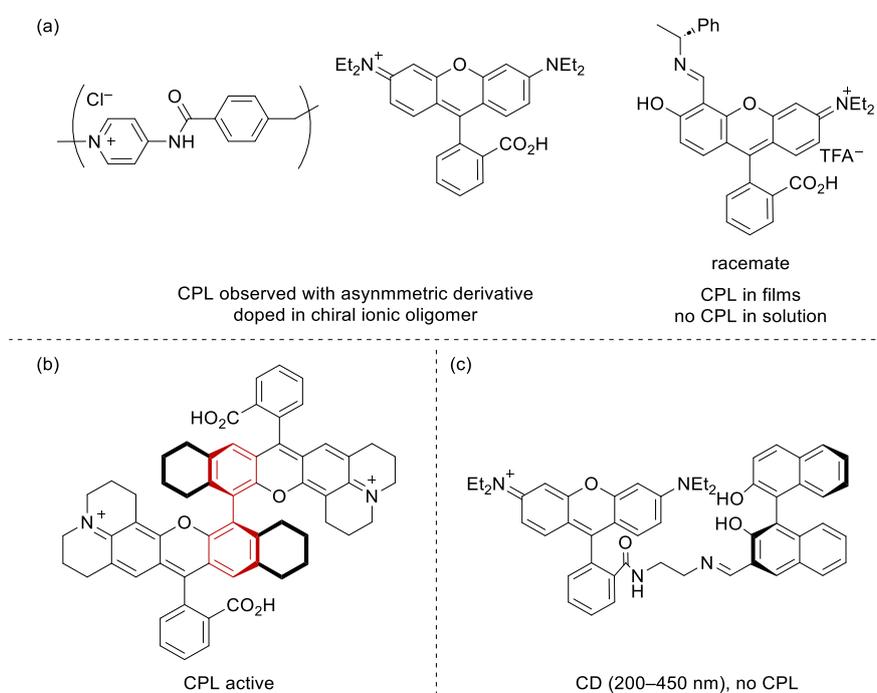
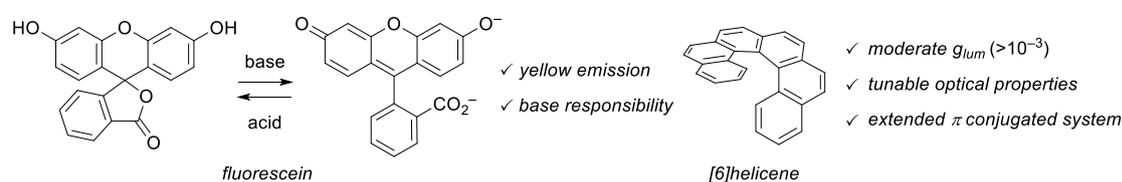


Figure 3-5 Representative chiroptical properties of xanthene derivatives.

以上を踏まえ、筆者はクロミズム特性を有する新しい CPL 分子として、キサントン色素の一種であるフルオレセインとヘリセンを組み合わせた新奇 CPL 分子 **A** を設計した (Figure 3-6)。フルオレセインは高い蛍光量子収率と pH 応答性を示す広く知られた発光分子であり、中性や酸性条件下では蛍光を示さないものの、塩基性条件下では強い黄色蛍光を発する (Figure 3-6-a)。一方、ヘリセンは有機小分子としては高い異方性因子 g_{lum} を有し、置換基の導入により光学特性が容易に変更できることが知られている。また、 π 共役系を拡張しつつ、CPL 特性を効率よく発現させることができるため、既知の発光分子を CPL 分子に変更する際に特に汎用されている骨格である。そこで筆者は、フルオレセインとヘリセンとを組み合わせることで、以下の 3 つの特徴を併せもつ新しい CPL 分子の開発を目指すこととした (Figure 3-6-b)。

- (1) らせん不斉を有するヘリセンに由来する CPL 特性
- (2) キサントン色素に由来する酸塩基応答性のスイッチング能
- (3) π 共役系の拡張に由来する長波長域での発光

(a) Optical properties of helicene and fluorescein



(b) This work: helicene-fused fluorescein

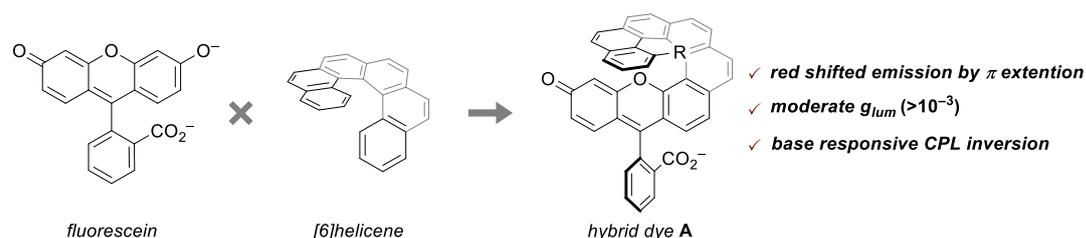


Figure 3-6 The schematic illustrations for helicene-fused fluorescein in this study.

第二節 要約

本研究では塩基応答性を示すフルオレセインにヘリセンを組み込んだ新規 CPL 分子を開発し、その光学特性を評価した。中性条件下、および塩基性条件下、各種スペクトルを測定し

た結果、含ヘリセンフルオレセイン **40** は塩基応答性を示し、塩基の添加により CPL の波長や強度、および符号が変化することが見いだされた。また、ヘリセンの置換基を変換することで水系溶媒を含む様々な溶媒中で発光する CPL 分子が見いだされた。これらの結果はクロミズム特性を示す CPL 分子を設計する際にキサンテン色素に CPL 活性なヘリセンを導入するアプローチが有効であることを示唆していると考えている。本研究で用いたアプローチはフェノール性ヒドロキシ基を有する他の π 共役英分子に適用可能であると考えられることから、さらなる構造展開が期待される。

引用文献

1. Mun, J.; Kim, M.; Yang, Y.; Badloe, T.; Ni, J.; Chen, Y.; Qiu, C.-W.; Rho, J. *Light: Sci. Appl.* **2020**, *9*, 139.
2. Richardson, F. S.; Riehl, J. P. *Chem Rev.* **1977**, *77*, 773–792.
3. Riehl, J. P.; Richardson, F. S.; *Chem Rev.* **1986**, *86*, 1–16.
4. Imai, Y.; Nakano, Y.; Kawai, T.; Yuasa, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 8973–8978.
5. Zhang, D.-W.; Li, M.; Chen, C.-F. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 1331.
6. Chen, Y.; Gao, J.; Yang, X. *Adv. Opt. Mater.* **2019**, *7*, 1801467.
7. Han, J.; Guo, S.; Lu, H.; Liu, S.; Zhao Q.; Huang, W. *Adv. Opt. Mater.* **2018**, *6*, 1800538.
8. Heffern, M. C.; Matosziuk, L. M.; Meade, T. J. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4496–4539.
9. Chen, N.; Yan, B. *Molecules* **2018**, *23*, 3376.
10. T. Mori (Eds.) (2020). *Circularly Polarized Luminescence of Isolated Small Organic Molecules*. Springer Nature Singapore.
11. Otani, T.; Tsuyuki, A.; Iwachi, T.; Someya, S.; Tatenno, K.; Kawai, H.; Saito, T.; Kanyiva, K. S.; Shibata, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 3906–3910.
12. Matsuno, T.; Koyama, Y.; Hiroto, S.; Kumar, J.; Kawai, T.; Shinokubo, H. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 4607–4610.
13. Dhbaibi, K.; Abella, L.; Meunier-Della-Gatta, S.; Roisnel, T.; Vanthuyne, N.; Jamoussi, B.; Pieters, G.; Racine, B.; Quesnel, E.; Autschbach, J.; Crassous, J.; Favereau, L. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 5522–5533.
14. Biet, T.; Cauchy, T.; Sun, Q.; Ding, J.; Hauser, A.; Oulevey, P.; Burgi, T.; Jacquemin, D.; Vanthuyne, N.; Crassous, J.; Avarvari, N. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 9210–9213.
15. Chen, Y. *Mater. Today Chem.* **2022**, *23*, 100651.
16. Maeda, C.; Nagahata, K.; Shirakawa, T.; Ema, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 7813–7817.
17. Jakubec, M.; Novák D.; Zatloukalová, M.; Císařová, I.; Cibulka, R.; Favereau, L.; Crassous, J.; Cytryniak, A.; Bilewicz, R.; Hrbáč, J.; Storch, J.; Žádný, J.; Vacek, J. *ChemPlusChem* **2021**, *86*, 982–990.
18. Sakamaki, D.; Tanaka, S.; Tanaka, K.; Takino, M.; Gon, M.; Tanaka, K.; Hirose, T.; Hirobe, D.; Yamamoto, H. M.; Fujiwara, H. *J. Phys. Chem. Lett.* **2021**, *12*, 9283–9292.

19. Sakai, H.; Kubota, T.; Yuasa, J.; Araki, Y.; Sakanoue, T.; Takenobu, T.; Wada, T.; Kawai, T.; Hasobe, T. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 6738–6743.
20. Zinna, F.; Bruhn, T.; Guido, C. A.; Ahrens, J.; Bröring, M.; Di Bari, L.; Pescitelli, G. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 16089–16098.
21. Hassan, K.; Yamashita, K.; Hirabayashi, K.; Shimizu, T.; Nakabayashi, K.; Imai, Y.; Matsumoto, T.; Yamano, A.; Sugiura, K.I. *Chem. Lett.* **2015**, *44*, 1607–1609.
22. Michal, V.; Prince, P. A. *Chromic Materials: Fundamentals, Measurements and Applications*; Apple Academic Press: 2018.
23. Klajn, R. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 148–184.
24. Irie, M.; Fukaminato, T.; Matsuda, K.; Kobatake, S. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 12174–12277.
25. Wu, Y.; Zhu, Y.; Yao, C.; Zhan, J.; Wu, P.; Han, Z.; Zuo, J.; Feng, H.; Qian, Z. *J. Mater. Chem. C* **2023**, *11*, 15393–15411.
26. Machado, V. G.; Stock, R. I.; Reichardt, C. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 10429–10475.
27. Reichardt, C. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319–2358.
28. Tamura, Z.; Abe, S.; Ito, K.; Maeda, M. *Anal. Sci.* **1996**, *12*, 927–930.
29. Seok, H.; Son, S. Cho, J.; Choi, S.; Park, K.; Kim, C.; Jeon, N.; Kim, T.; Kim, H.-U. *Sensors* **2022**, *22*, 4288.
30. Zhong, Y.; Chai, Z.; Liang, Z.; Sun, P.; Xie, W.; Zhao, C.; Mai, W. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 34085–34092.
31. Ju, L.; Gao, W. Zhang, J.; Qin, T.; Du, Z.; Sheng, L.; Zhang, S. X.-A. *J. Mater. Chem. C* **2020**, *8*, 2806–2811.
32. Li, H.; Li, H.; Wang, W.; Tao, Y.; Wang, S.; Yang, Q.; Jiang, Y.; Zheng, C.; Huang, W.; Chen, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 4756–4762.
33. Jhun, B. H.; Park, S. Y.; You, Y. *Dyes Pigm.* **2023**, *208*, 110786.
34. Hashimoto, Y.; Nakashima, T.; Shimizu, D.; Kawai, T. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 5171–5174.
35. Ai, Y.; Fei, Y.; Shu, Z.; Zhu, Y.; Liu, J.; Li, Y. *Chem. Eng. J.* **2022**, *450*, 138390.
36. Xue, C.; Xu, L.; Wang, H.-X.; Li, T.; Liu, M. *ChemPhotoChem* **2022**, *6*, e202100255.
37. Matsuo, Y.; Maeda, C.; Tsutsui, Y.; Tanaka, T.; Seki, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202314968.
38. Saleh, N.; Moore, II, B.; Srebro, M.; Vanthuyne, N.; Toupet, L.; Williams, J. A. G.; Roussel, C.; Deol, K. K.; Muller, G.; Autschbach, J.; Crassous, J. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 1673–1681.
39. Pascal, S.; Besnard, C.; Zinna, F.; Di Bari, L.; Le Guennic, B.; Jacquemin, D.; Lacour, J. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 4590–4594.
40. Takaishi, K.; Yasui, M.; Ema, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 5334–5338.
41. David, A. H. G.; Casares, R.; Cuerva, J. M.; Campaña, A. G.; Blanco, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 18064–18074.
42. Isla, H.; Saleh, N.; Ou-Yang, J.-K.; Dhbaibi, K.; Jean, M.; Dziurka, M.; Favereau, L.; Vanthuyne, N.; Toupet, L.; Jamoussi, B.; Srebro-Hooper, M.; Crassous, J. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 5383–5393.
43. Tong, S.; Li, J. T.; Liang, D. D.; Zhang, Y. E.; Feng, Q. Y.; Zhang, X.; Zhu, J.; Wang, M. X. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 14432–14436.
44. Zhang, M.-Y.; Liang, X.; Ni, D.-N.; Liu, D.-H.; Peng, Q.; Zhao, C.-H. *Org. Lett.* **2021**, *23*, 2–7.
45. Yen-Pon, E.; Buttard, F.; Frédéric, L.; Thuéry, P.; Taran, F.; Pieters, G.; Champagne, P. A.; Audisio, D. *JACS Au*, **2021**, *1*, 807–818.

46. Wang, Y.; Gong, J.; Wang, X. Li, W.-J.; Wang, X.-Q.; He, X. Wang, W.; Yang, H.-B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202210542.
47. Ikeshita, M.; He, H.; Kitahara, M.; Imai, Y.; Tsuno, T. *RSC Adv.* **2022**, *12*, 34790–34796.
48. Liu, W.; Qin, T.; Xie, W.; Zhou, J.; Ye, Z.; Yang, X. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202303430.
49. Qu, L.; Zhou, X.; Song, J.; Zhang, B.; Yang, Q.; Zhou, X.; Liu, J.; Xiang, H. *Adv. Optical Mater.* **2023**, 2300779.
50. Morcillo, S. P.; Miguel, D.; Álvarez de Cienfuegos, L.; Justicia, J.; Abbate, S.; Castiglioni, E.; Bour, C.; Ribagorda, M.; Cárdenas, D. J.; Paredes, J. M.; Crovetto, L.; Choquesillo-Lazarte, D.; Mota, A. J.; Carreño, M. C.; Longhi, G.; Cuerva, J. M. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 5663–5670.
51. Isla, H.; Srbo-Hooper, M.; Jean, M.; Vanthuynne, N.; Roisnel, T.; Lunkley, J. L.; Muller, G.; Willians, J. A. G.; Autschbach, J.; Crassous, J. *Chem. Commun.* **2016**, *35*, 5932–5935.
52. Gon, M.; Morisaki, Y.; Chujo, Y. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 8304–8307.
53. Resa, S.; Miguel, D.; Guisán-Ceinós, S.; Mazzeo, G.; Choquesillo-Lazarte, D.; Abbate, S.; Crovetto, L.; Cárdenas, D. J.; Carreño, M. C.; Ribagorda, M.; Longhi, G.; Mota, A. J.; Álvarez de Cienfuegos, L.; Cuerva, J. M. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 2653–2662.
54. Reiné, P.; Justicia, J.; Morcillo, S. P.; Abbate, S.; Vaz, B.; Ribagorda, M.; Orte, Á.; Álvarez de Cienfuegos, L.; Longhi, G.; Campaña, A. G.; Miguel, D.; Cuerva, J. M. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 4455–4463.
55. Reiné, P.; Ortuño, A. M.; Resa, S.; Álvarez de Cienfuegos, L.; Blanco, V.; Ruedas-Rama, M. J.; Mazzeo, G.; Abbate, S.; Lucotti, A.; Tommasini, M.; Guisán-Ceinós, S.; Ribagorda, M.; Campaña, A. G.; Mota, A.; Longhi, G.; Miguel, D.; Cuerva, J. M. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 13985–13988.
56. Homberg, A.; Brun, E.; Zinna, F.; Pascal, S.; Górecki, M.; Monnier, L.; Besnard, C.; Pescitelli, G.; Di Bari, L.; Lacour, J. *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 7043–7052.
57. Reiné, P.; Ortuño, A. M.; Resa, S.; Álvarez de Cienfuegos, L.; Ribagorda, M.; Mota, A. J.; Abbate, S.; Longhi, G.; Miguel, D.; Cuerva, J. M. *ChemPhotoChem* **2022**, *6*, e202100160.
58. Van Delden, R. A.; Huck, N. P. M.; Piet, J. J.; Warman, J. M.; Meskers, S.C. J.; Dekkers, H. P. J. M.; Feringa, B. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15659–15665.
59. Sheng, Y.; Shen, D.; Zhang, W.; Zhu, C.; Cheng, Y. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 13196–13200.
60. Okazaki, M.; Mizusawa, T.; Nakabayashi, K.; Yamashita, M.; Tajima, N.; Harada, T.; Fujiki, M.; Imai, Y. *J. Photochem. Photobiol. A* **2016**, *331*, 115–119.
61. Mizusawa, T.; Sato, T.; Kitayama, Y.; Tajima, N.; Fujiki, M.; Imai, Y. *Chemistry Select* **2016**, *1*, 3398–3404.
62. Sheng, Y.; Ma, J.; Liu, S.; Wang, Y.; Zhu, C.; Cheng, Y. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 9519–9522.
63. Mimura, Y.; Kitamura, S.; Shizuma, M.; Kitamatsu, M.; Fujiki, M.; Imai, Y. *ChemistrySelect*, **2017**, *2*, 7759–7764.
64. Takase, K.; Noguchi, K.; Nakano, K. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 15057–15065.
65. Nakanishi, S.; Hara, N.; Kuroda, N.; Tajima, N.; Fujiki, M.; Imai, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 1093–1100.
66. Sun, Z.-B.; Liu, J.-K.; Yuan, D.-F.; Zhao, Z.-H.; Zhu, X.-Z.; Liu, D.-H.; Peng, Q.; Zhao, C.-H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 4840–4846.
67. Zhao, Z.-H.; Liang, X.; He, M.-X.; Zhang, M.-Y.; Zhao, C.-H. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 9569–9573.
68. Takaishi, K.; Iwachido, K.; Ema, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 1774–1779.
69. Dhbaibi, K.; Favereau, L.; Srebro-Hooper, M.; Quinton, C.; Vanthuynne, N.; Arrico, L.; Roisnel, T.; Jamoussi, B.; Poriel,

- C.; Cabanetos, C.; Autschbach, J.; Crassous, J. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 567–576.
70. Kubo, M.; Takase, K.; Noguchi, K.; Nakano, K. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 2866–2876.
71. Sumsalee, P.; Abella, L.; Roisnel, T.; Lebrequier, S.; Pieters, G.; Autschbach, J.; Crassous, J.; Favereau, L. *J. Mater. Chem. C*, **2021**, *9*, 11905–11914.
72. Sumsalee, P.; Abella, L.; Kasemthaveechok, S.; Vanthuyne, N.; Cordier, M.; Pieters, G.; Autschbach, J.; Crassous, J.; Favereau, L. *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 16505–16511.
73. Zhang, K.; Zhao, J.; Zhang, N.; Chen, J.-F.; Wang, N.; Yin, X.; Zheng, X.; Chen, P. *J. Mater. Chem. C*, **2022**, *10*, 1816–1824.
74. Chen, J.-F.; Gao, Q.-X.; Liu, L.; Chen, P.; Wei, T.-B. *Chem. Sci.* **2023**, *14*, 987–993.
75. Sumsalee, P.; Morgante, P.; Pieters, G.; Crassous, J.; Autschbach, J.; Favereau, L. *J. Mater. Chem. C*, **2023**, *11*, 8514–8523.
76. Anger, E.; Srebro, M.; Vanthuyne, N.; Toupet, L.; Rigaut, S.; Roussel, C.; Autschbach, J.; Crassous, J.; Réau, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15628–15631.
77. Srebro, M.; Anger, E.; Moore, B. II.; Vanthuyne, N.; Roussel, C.; Réau, R.; Autschbach, J.; Crassous, J. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 17100–17115.
78. Goto, T.; Okazaki, Y.; Ueki, M.; Kuwahara, Y.; Takafuji, M.; Oda, R.; Ihara, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 2989–2993.
79. Ma, S.; Jiang, J.; Liu, Z.; Jiang, Y.; Wu, Z.; Liu, M. *Nanoscale* **2020**, *12*, 7895–7901.
80. Du, S.; Zhu, X.; Zhang, L.; Liu, M. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 15501–15508.
81. Zhang, C.; Yan, Z.-P.; Dong, X.-Y.; Han, Z.; Li, S.; Fu, T.; Zhu, Y.-Y.; Zheng, Y.-X.; Niu, Y.-Y.; Zang, S.-Q. *Adv. Mater.* **2020**, *32*, 2002914.
82. Huang, J.-C.; Ye, G.-M.; Yu, M.; Huang, R.; Zhao, Z.; Qin, A.; Wu, S.-T.; Xie, Z. *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 6760–6766.
83. Chen, H.; Gu, Z.-G.; Zhang, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 7245–7252.
84. Yang, G.; Yao, Z.; Yang, X.; Xie, Y.; Duan, P.; Zhang, Y.-M.; Zhang, S. X.-A. *Adv. Sci.* **2022**, *9*, 2202636.
85. Chen, X.; Jou, M. J.; Lee, H.; Kou, S.; Lim, J.; Nam, S.-W.; Park, S.; Kim, K.-M.; Yoon, J. *Sens. Actuators, B* **2009**, *137*, 597–602.
86. Dong, M.; Ma, T.-H.; Zhang, A.-J.; Dong, Y.-M.; Wang, Y.-W.; Peng, Y. *Dyes Pigm.* **2010**, *87*, 164–172.
87. Lv, H.-S.; Huang, S.-Y.; Zhao, B.-X.; Miao, J.-Y.; *Anal. Chim. Acta* **2013**, *788*, 177–182.
88. Fan, C.; Huang, X.; Han, L.; Lu, Z.; Wang, Z.; Yi, Y. *Sens. Actuators, B* **2016**, *224*, 592–599.
89. Zhao, F.; Tian, J.; Wu, X. D.; Li, S.; Chen, Y.; Yu, S.; Yu, X.; Pu, L. *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 7342–7348.

第四章 含ヘリセンアミノキサントンの合成及び光学特性の評価

第一節 研究背景

ローダミン類はキサントン色素の一種であり、電子供与性基として窒素官能基が結合していることからアミノキサントンとも呼ばれている (Figure 4-1)。1905年に Dziewonski らによって初めて合成されて以来¹、その高い褪色耐性や高い蛍光量子収率、低い毒性などの優れた特徴を有することから、古くから染料や顔料として利用されてきた。フルオレセインが無保護のヒドロキシ基を蛍光発現に必要とするのに対し、ローダミン類は窒素原子上に置換基を有していても可視域の蛍光を示すことが知られている²。さらに、フルオレセインよりも長波長での蛍光を示し、窒素原子上の置換基を変更することで蛍光波長や蛍光量子収率などの光学特性を調整することが可能である²。例えば、窒素置換基上にエチル基を4つ有するローダミン B、2つ有するローダミン 19、そして無置換のローダミン 110 を比較すると、蛍光極大波長はローダミン B が最も長く ($\lambda_{em} = 568 \text{ nm}$)、ローダミン 110 が最も短い ($\lambda_{em} = 524 \text{ nm}$)^{3,4}。一方、蛍光量子収率はローダミン 110 ($\Phi_F = 92\%$) とローダミン 19 が高く ($\Phi_F = 95\%$)、ローダミン B は中程度の値 ($\Phi_F = 65\%$) を示す^{3,4}。このように、窒素原子上の置換基の数を増やすことで蛍光波長が長波長シフトする一方、蛍光量子収率は低下することが知られている。また、両側にピペリジン環が縮環した Q-ローダミンは、比較的長い蛍光極大波長を示しながらも蛍光量子収率を維持している (Figure 4-1-c)⁵。この量子収率の改善は、アルキル基の熱運動による無輻射失活が環状構造にすることにより抑制されたことによるものと考えられている。窒素原子上に2つ置換基を有するローダミン 101 は環化により無輻射失活を抑制することで、長波長での蛍光を示しつつ、高い蛍光量子収率を示す (Figure 4-1-c)^{3,4}。このようにアミノキサントン類は窒素原子上の置換基を変更することで光学特性を容易に変更することができる。

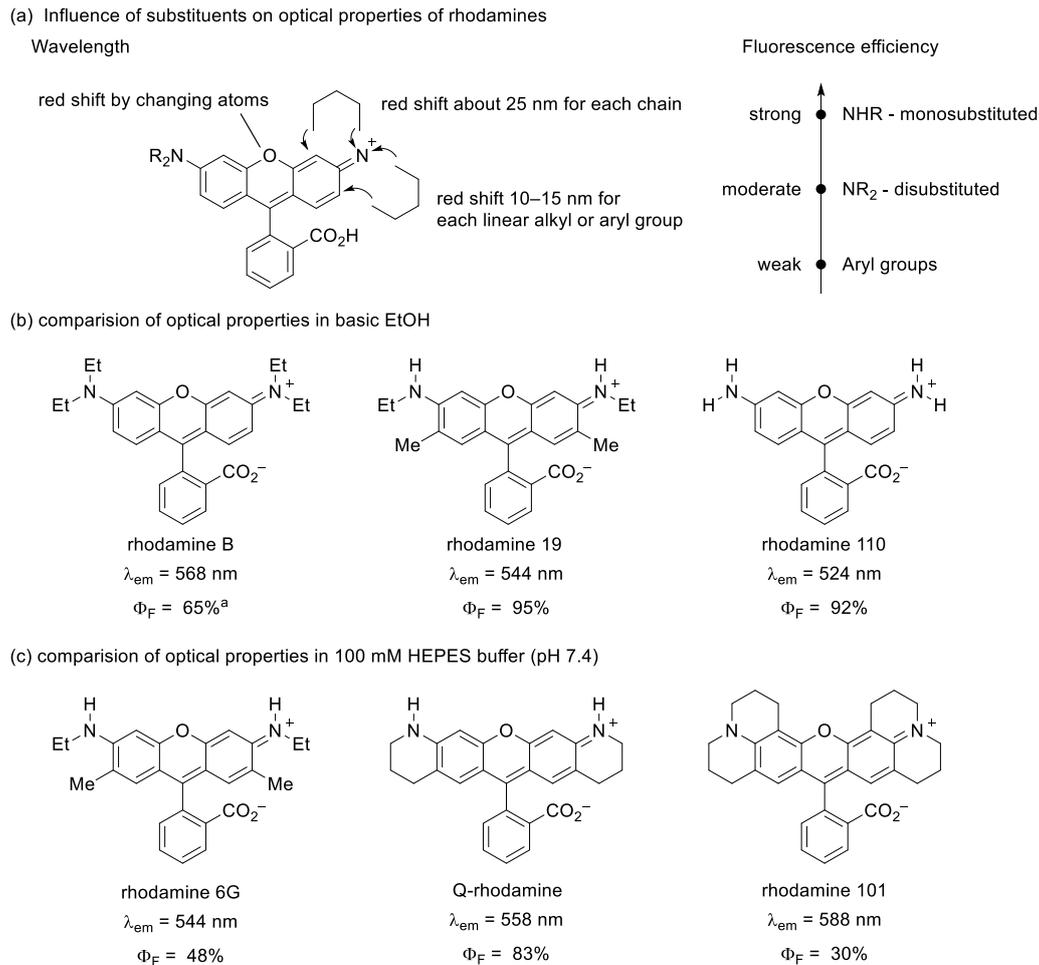


Figure 4-1 Influence of substituents on optical properties of rhodamines.

また、アミノキサンテンはフルオレseinとは異なる外部刺激応答性を示すことが知られている (Figure 4-2) ⁶。先述した通り、フルオレseinは極性溶媒中や塩基の添加によって開環状態になることが知られているが、一般的にローダミン類や一部のロドール類は酸を添加すると開環する (Figure 4-2-a,b)。さらに、一部の誘導体は紫外線照射や温度変化、機械的刺激などの外部刺激にも応答し、その光学特性が変化することが知られている (Figure 4-2-c,d) ⁶。

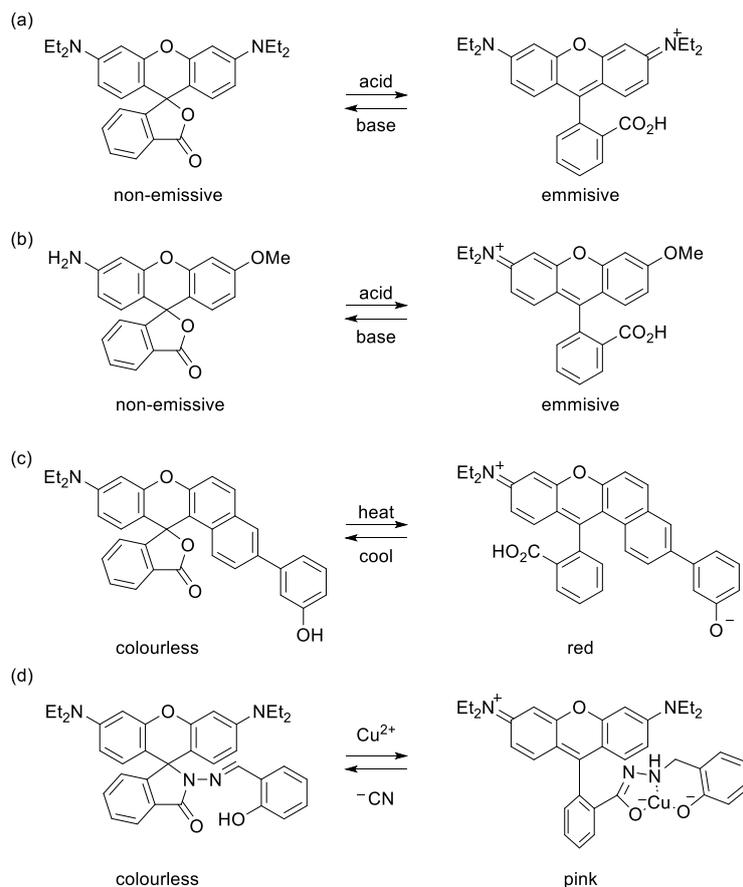
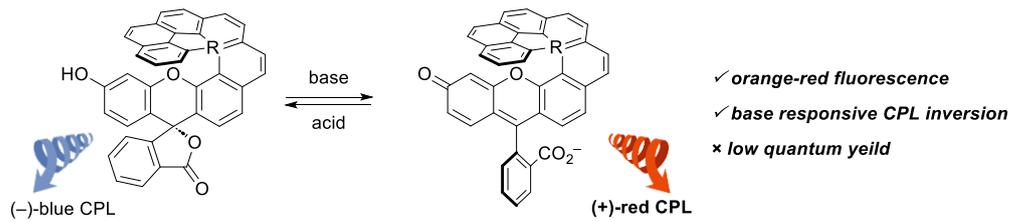


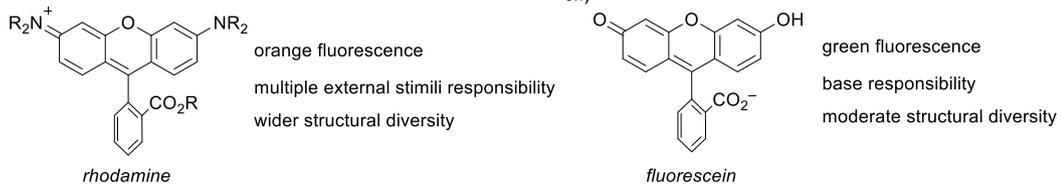
Figure 4-2 Chromic properties of aminoxanthene derivatives.

第三章に記述したように、筆者は赤色 CPL を示す含ヘリセンフルオレセインを開発し、キサントレン色素にヘリセン骨格を組み込むアプローチが赤色 CPL 分子の開発に有効であることを見いだした (Figure 4-3-a)。そこで、光学特性や外部刺激に対する応答性の変化を期待し、アミノキサントレンとヘリセンとを組み合わせさせた色素 **B** の開発に着手した (Figure 4-3-c)。先述した通り、アミノキサントレンは構造改変による光学特性の調整が可能であることから、近赤外域の CPL や高い蛍光量子収率、様々な外部刺激に対する応答性など、ユニークな特徴を有する新奇 CPL 分子の開発につながるものと期待した。

(a) Helicene-fused fluorescein (chapter 3)



(b) Characteristics of xanthene derivatives



(c) This work: helicene-fused aminoxanthene

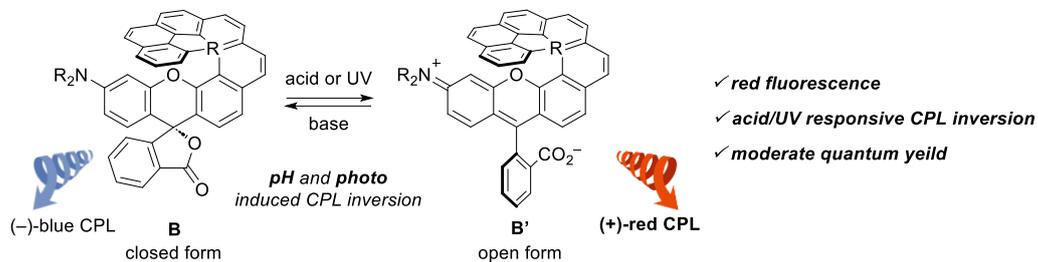


Figure 4-3 The schematic illustrations for helicene-fused aminoxanthene in this study.

第二節 要約

本研究では酸応答性を示すアミノキサテンにヘリセンを組み込んだ CPL 分子を開発し、その光学特性を評価した。各種スペクトルを測定した結果、含ヘリセンアミノキサテン **51** は酸応答性だけでなく、光応答性も示し、酸の添加や光照射により CPL の波長や強度、および符号が変化することが見いだされた。また、第三章にて報告した含ヘリセンフルオレセインよりも長波長での CPL や改善された蛍光量子収率を示し、窒素官能基の導入により光学特性を種々変更することができた。アミノキサテン色素は窒素上の置換基やキサテン環の酸素原子を変更することで光学特性を変更することが可能である。さらに、酸応答性や光応答性以外の外部刺激に応答する誘導体も報告されている。今後、様々な外部刺激に応答する CPL 分子や近赤外領域での CPL を示す分子の開発が期待される。

引用文献

1. Noelting, E.; Dziejowski, K. Zur Kenntniss der Rhodamine Ber, 38 (1905), pp. 3516-3527(Badische Anilin- und Soda-Fabrik, DE54684, 1890.)
2. Wang, L.; Du, W.; Hu, Z.; Uvdal, K.; Li, L.; Huang, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 14026–14043.
3. Kubin, R. F.; Fletcher, A. N. *J. Lumin.* **1982**, *27*, 455–462.
4. Sasaki, H.; Hanaoka, K.; Urano, Y.; Terai, T.; Nagano, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1072–1078.
5. Grimm, J. B.; Klein, T.; Kopek, B. G.; Shtengel, G.; Hess, H. F.; Sauer, M.; Lavis, L. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1723–1727.
6. Bar, N.; Chowdhury, P. *ACS Appl. Electron. Mater.* **2022**, *4*, 3749–3771.

第五章 結論

筆者はキサントレン色素があまり利用されていない、2つの領域での利用を志向し、新たな機能を有するキサントレン色素の設計、合成及び評価を行った。すなわち、生理活性物質としての利用及びキラルな機能性分子としての利用を志向し、研究に着手した。

第二章ではローダミン類がP糖タンパク質の輸送基質であることに着目し、トランスポーターの内腔に取り込まれながらも排出されない阻害剤の開発に取り組んだ。一般的なローダミン誘導体であるローダミン 6G を親化合物として選択し、創造活性相関研究を行った結果、5つ環が連続して出環した骨格を有し、エステル部位に*o,o*-ジメトキシベンジル基を有する誘導体 Rh_Q-DMB がローダミン 6G より 6 倍高い親和性と 120 倍高い阻害活性を示すことを見出した。さらに、薬剤耐性試験やトリプトファン消光実験の結果、Rh_Q-DMB はトランスポーターに取り込まれるものの、排出されにくく、所望の特性を有する化合物であることが分かった。

第三章、第四章では、円偏光発光を示すキサントレン色素の開発について述べた。まず、第三章ではヘリセンが組み込まれたフルオレセインの合成と光学特性について述べた。フェノールとベンゾフェノンとを酸性条件下加熱することで左右非対称なキサントレン色素を合成する既知の合成法を参考に、光学的に純粋なヒドロキシヘリンとベンゾフェノンから対応する含ヘリセンフルオレセインを合成した。得られた含ヘリセンフルオレセインは中性条件下では青色 CPL を、塩基を添加した際は赤色 CPL を示した。すなわち、今回開発した発光分子は、フルオレセインの塩基応答性とヘリセンの CPL 特性を併せ持つことが分かった。また、今回合成した分子は液性の変化により、波長だけでなく CPL の符号も変化することを見いだした。

第四章では、含ヘリセンアミノキサントレンの合成と光学特性について述べた。この発光分子はアミノキサントレンの酸応答性とヘリセンの CPL 特性を併せ持つことが分かった。さらに、中性条件下、紫外光を照射することで赤色 CPL を示すことが判明し、光照射によって励起状態において閉環状態から開環状態へと構造変化していることが示唆された。

第三章、四章に述べた含ヘリセンキサントレン色素は波長だけでなく、CPL の符号のスイッチングも可能であることを見だし、キサントレン色素に CPL 特性を示すキラル部位を導入す

るアプローチの有効性を指摘した点は今後同様の特性を有する化合物を合成する際に応用できる知見である。フェノール性ヒドロキシ基を有している他の π 共役系分子も同様の方法にて導入できることが想定され、多様な性質を有する CPL 分子を合成可能であることが想定される。また、キサントンの酸素原子を他の原子に変えることでより長波長での蛍光を示すことが知られており、本分子を同様のアプローチにて構造展開することで、近赤外領域での CPL を示す分子の開発が期待される。

実験項

1. General experimental procedures

All solvents and materials were obtained from commercial suppliers and used without further purification unless otherwise noted. Column chromatography was performed on Wakogel® 60N or on DPS DUALPORE™ SIL Flash. The silica gel was pre-washed with MeOH prior to column chromatography using a mixture of CHCl₃ and MeOH as eluent. Preparative thin-layer chromatography (PTLC) was performed using plates prepared from Wakogel® B5-F or Merck Silica Gel 60 PF₂₅₄. Reactions and chromatography fractions were analyzed employing pre-coated silica gel plate (Merck Silica Gel 60 F254) with visualization by ultraviolet (UV) irradiation at 254 nm and/or indicated stains. Attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-IR) spectra were recorded on a Shimadzu IRAffinity-1 with an ATR attachment (MIRacle 10), and the wave numbers of maximum absorption peaks are reported in cm⁻¹. Melting points (mp) were recorded on a Stanford Research System OptiMelt capillary melting point apparatus and are uncorrected. The ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on JEOL ECA-500 (¹H, 500 MHz; ¹³C, 125 MHz) or JEOL ECZ-600 (¹H, 600 MHz; ¹³C, 150 MHz). Chemical shifts are presented in ppm relative to tetramethylsilane (¹H, 0.00) or solvents as follows: CDCl₃ (¹³C, 77.16); methanol-*d*₄ (¹³C, 49.00); acetone-*d*₆ (¹³C, 29.84). Abbreviations are as follows: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; t, triplet; ddd, double double doublet; m, multiplet; br, broad. High-resolution mass spectra were recorded on Shimadzu LCMS-IT-TOF (ESI) or a ThermoFisher Q-Exactive Orbitrap spectrometer with an electrospray ionization (ESI) mass spectrometer using methanol as a mobile phase. High performance liquid chromatography (HPLC) analyses were performed on a SHIMADZU analytical system equipped with a LC-20AT pump and a SPD-M20A PDA detector using DAICEL CHIRALPAK OD-H column (250 × 4.6 mm). Analytical RP-HPLC was carried out on a SHIMADZU analytical system equipped with a LC-20AT pump, an SPD-M20A PDA detector and a CBM-20A communication bus using GL Sciences InertSustain AQ-C18 3 μm column (150 × 4.6 mm). The purity of the representative compounds (**1**, **2**, **7**, and **9**) was determined by LC-MS using a 1:1 mixed solution of (A) H₂O + 0.1% H₃PO₄ and (B) acetonitrile at a flow rate of 1 mL/min. The purity of the final compounds used in the chapter 2 was determined by using the area percentage method on the UV trace recorded at a wavelength of 320 nm and found to be >95%. X-Ray single crystal diffraction analyses were performed on a Rigaku XtaLAB P200 apparatus. Optical rotations were determined with a JASCO P-2200KDT polarimeter and are the average of five measurements and reported as follows: $[\alpha]_D^{25}$ concentration (c = g / 100 mL, solvent). No unexpected or unusually high safety hazards were encountered.

Experiments on Chapter 2

1. Biological assays.

All biological assays, including the mutant construction, protein expression, purification, ATP measurement, drug-susceptibility assay and fluorescence measurement were totally performed according to the previously published protocols reported by Kato and coworkers.^{1,2}

Mutant construction

The CmABCB1 mutants were constructed using PCR site-directed mutagenesis. 4WY/M391W were constructed using the QuikChange Multi system (Agilent, Santa Clara, CA) with the corresponding primers listed in Table S1 and pPICZA plasmid harboring the CmABCB1 gene with a C-terminal His₆ affinity tag.²

Table S1 Oligonucleotides used in this study.

| Mutation | Primer Sequence (from 5' to 3') |
|-------------|--|
| W114Y | CTTCGCGCTTGCCTATAGCTCGTCTGCAAC |
| W161Y | GATCGAAGGGCGAAACATATAAGTATTCCGTTGGATTTCG |
| W363Y/W364Y | CTATGCGCTTGCCTGTATTATGGCGGGCAACTGATC |
| M391W | CCATACTCGGCTTCTGGGAGTTCGGTTCAG |

Protein Expression

The WT and mutant CmABCB1 proteins were expressed in *Pichia pastoris* SMD1163 cells. Single colonies were seeded into 10 mL yeast extract-peptone-dextrose (YPD) medium (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) *D*-glucose) and incubated overnight at 30 °C with shaking at 220 rpm (BioShaker BR-23FP, TAITEC, Koshigaya, Japan). The precultured cells were seeded into 200 mL YPD medium to an OD₆₀₀ of 0.5 and incubated at 30 °C until the OD₆₀₀ reached 4. The cells were then diluted in YPMY medium (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 1.34% (w/v) YNB without amino acids, 0.5% (w/v) sorbitol, 4 × 10⁻⁵% (w/v) biotin, and 0.5% (v/v) methanol) to an OD₆₀₀ of 0.1 and were grown at 25 °C with shaking at 220 rpm using an Innova 4330 incubator shaker (New Brunswick Scientific). Methanol (0.5% volume) was added 24 h after the start of culture. Cells were harvested using centrifugation (3,000 × g for 15 min) after 42–45 h, and the cell pellets were stored at –80 °C.

The stored cells were thawed and suspended in a disruption buffer containing 20 mM Tris–HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 1 tablet cOplete, EDTA-free (Roche CUSTOMBIOTECH) per 500 mL of buffer. Cells were then disrupted using an EmulsiFlex-C3 (Avestin, Ottawa, ON, Canada) at 170–200 MPa. The homogenate was centrifuged at 3,000 × g for 15 min to remove undisrupted cells and the nuclear fraction, and the crude membranes obtained were collected using ultracentrifugation at 100,000 × g for 45 min. The membranes were mechanically homogenized in binding buffer (20 mM Tris–HCl (pH 7.5), 300 mM NaCl, and 20 mM imidazole) and solubilized with 3% (w/v) polyoxyethylene (9) dodecyl ether (C₁₂E₉) (Wako) for 3 h. The total protein concentration at solubilization was 10 mg/mL. After removal of the insoluble fraction by ultracentrifugation at 100,000 × g for 80 min, immobilized metal ion affinity chromatography resin (Bio-Rad, Hercules, CA) pre-equilibrated with wash buffer (binding buffer containing 0.05% (w/v) *n*-dodecyl-β-D-maltopyranoside (β-DDM) (Anatrace, Maumee, OH)) was incubated with the supernatant for 3 h. The resin was washed with wash buffer, and protein was eluted with elution buffer (binding buffer containing 300 mM imidazole) to extract CmABCB1. After removal of the N-terminal 92 residues using trypsin, CmABCB1 was isolated using SEC (Superdex200 column (GE Healthcare)) pre-equilibrated with SEC buffer (20 mM Tris–HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 0.05% (w/v) β-DDM (Anatrace)). Because the N-terminal 92 residues have three intrinsic Trp residues (Trp68, Trp69, and Trp72), purified CmABCB1 WT has six Trp residues per dimer.

ATPase measurements.

ATPase Measurements.

ATPase activity was measured in 50 mM Tris–HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.05% (w/v) β-DDM, and 10 mM MgCl₂, with 5 mM ATP and/or compounds, at 37 °C. The amount of inorganic phosphate released from ATP was measured using a colorimetric method.³ The initial hydrolysis rate was calculated by plotting the amount of inorganic phosphate as a function of reaction time.

Determination of Kinetic Parameters for the ATPase Reaction.

The kinetic parameters were determined using the following equations with a slight modification from the previous study (Eqs. 1)^{1,2,4,5}

$$v = [e] \left[k_{basal} + \frac{(k_{sub} - k_{basal})[s]}{K_m + [s]} \left(1 - \frac{[s]}{K_i + [s]} \right) \right] \text{ [Eqs. 1]}$$

where v is the initial ATP hydrolysis rate, $[e]$ is the CmABC1 concentration, $[s]$ is the substrate concentration, k_{basal} is the catalytic rate constant of basal ATPase activity in the absence of drug, k_{sub} is the catalytic rate constant of drug-dependent ATPase activity, K_m is the Michaelis constant for transport substrates with 5 mM ATP, K_i is the inhibition constant for substrate inhibition by transport substrates. Fitting was carried out using GRAFIT (Erithacus Software).

Drug susceptibility assay in *S. cerevisiae* AD1-8u⁻ cells.

S. cerevisiae AD1-8u⁻ expressing WT or mock-transfected AD1-8u⁻ were precultured in YPD medium at 30 °C for 16 h, inoculated in YPD medium to an OD₆₀₀ of 0.5, and then cultured at 30 °C to an OD₆₀₀ of 3–5. These cultures were then diluted in YPD medium to an OD₆₀₀ of 0.2, and 25 μL of each cell suspension was inoculated into 75 μL YPD medium containing a drug at the indicated concentration in a 96-well round-bottom microplate (STEM). After culture at 30 °C for 15–17 h, OD₆₀₀ values of the cell suspensions were measured. For each mutant, the assay was performed using three clones, and the averages and SDs of the measured values were calculated. The expression levels of mutant proteins were evaluated by Western blot analysis to detect the FLAG tag fused to the C terminus of CmABC1. Total cellular protein (20 μg) from AD1-8u⁻ cells was separated on an SDS polyacrylamide gel and electroblotted on to a nitro cellulose membrane. Proteins were detected by Western blot analysis using mouse monoclonal anti-FLAG antibody (diluted 1:4,000) or mouse monoclonal anti-GAPDH antibody (diluted 1:4,000). Expression levels of the mutants were approximately equal to that of WT.

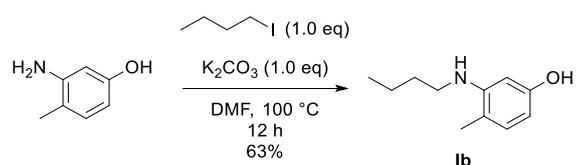
Fluorescence measurement.

All fluorescence measurements were performed in a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 0.05% (w/v) *N*-dodecyl-β-maltoside (β-DDM, Anatrace) using a FluoroMax-4 (Horiba, Kyoto, Japan) at 25 °C. Trp fluorescence emission was recorded between 320 and 470 nm (band-pass: 5 nm) after excitation at 290 nm (band-pass: 5 nm) using 0.1 μM CmABC1. Quenching experiments were performed by measuring Trp fluorescence in the presence of various concentrations of the substrate in the presence of 0–1 μM CmABC1.

2. Synthetic methods and characterization

Synthesis of aminophenol **Ia–e**

Synthesis of 3-butylamino-4-methylphenol (**Ib**)

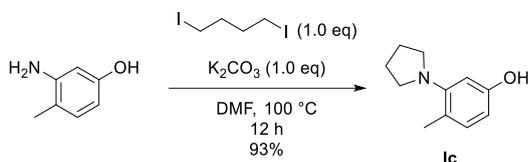


To a suspension of 3-amino-4-methylphenol (1.00 g, 8.12 mmol) in DMF (5.0 mL) were added K₂CO₃ (1.10 g, 7.96 mmol) and 1-iodobutane (1.49 g, 0.93 mL, 8.10 mmol). After stirring for 12 h at 100 °C, the reaction was quenched by adding water and the mixture was extracted with EtOAc (x3). The combined organic layers were washed with brine, dried (Na₂SO₄), and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography (silica gel, hexane/EtOAc = 10/1 to 5/1) to afford **Ib** (0.921 g, 63%) as yellow oil, contaminated with a trace amount of impurity (assessed by ¹H NMR). This material was employed in the next experiment without further purification.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 0.97 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 1.41–1.48 (m, 2H), 1.62–1.67 (m, 2H), 2.05 (s, 3H), 3.11 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz), 3.47 (brs, 1H, NH), 4.49 (brs, 1H, OH), 6.09 (dd, 1H, *J* = 7.7, 2.3 Hz), 6.13 (d, 1H, *J* = 2.9 Hz), 6.87 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 13.9, 16.6, 20.3, 31.4, 43.9, 98.6, 103.9, 114.3, 130.6, 147.2, 155.2; IR (ATR) 3360, 2959,

1616, 1519, 1470, 1215 cm^{-1} ; **HRMS** (ESI) calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) m/z 180.1383, found m/z 180.1388.

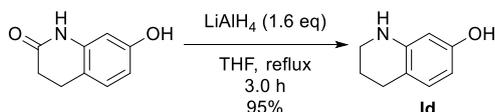
Synthesis of 4-methyl-3-(1-pyrrolidinyl)phenol (**1c**)



To a suspension of 3-amino-4-methylphenol (2.00 g, 16.2 mmol) and K_2CO_3 (2.20 g, 15.9 mmol) in DMF (10 mL) was added 1,4-diodobutane (5.03 g, 2.13 mL, 16.2 mmol). After stirring for 12 h at 100 $^\circ\text{C}$, the reaction was quenched by adding water and the mixture was extracted with EtOAc (x3). The combined organic layers were washed with brine, dried (Na_2SO_4), and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography (silica gel, hexane/EtOAc = 10/1 to 5/1) to afford **1c** (2.70 g, 93%) as brown oil.

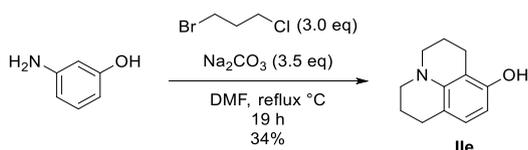
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ 1.91–1.93 (m, 4H), 2.25 (s, 3H), 3.17–3.20 (m, 4H), 4.53 (brs, 1H, OH) 6.28 (dd, 1H, $J = 8.0$, 2.9 Hz), 6.37 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 6.93 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ 20.1, 24.9, 51.1, 103.5, 106.9, 120.4, 132.6, 150.5, 154.5; **IR** (ATR) 3348, 2967, 2249, 1605, 1504, 906 cm^{-1} ; **HRMS** (ESI) calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{NO}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) m/z 178.1226, found m/z 178.1221.

Synthesis of 7-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (**1d**)



In a flame-dried 3-necked flask with a reflux condenser were placed LiAlH_4 (3.60 g, 95.0 mmol) and anhydrous THF (50 mL), to which was dropwise added 7-hydroxy-3,4-dihydroquinolin-2(1H)-one (9.80 g, 60.0 mmol) in THF (200 mL) over 30 min, which was refluxed for 3 h. After cooling to room temperature, the reaction was quenched by adding saturated aqueous NH_4Cl , and the mixture was filtrated through Celite[®] pad (washed with EtOAc). The filtrate was concentrated in vacuo and the mixture was extracted with EtOAc (x3). The combined organic layers were washed with brine, dried (Na_2SO_4), and concentrated in vacuo. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, hexane/EtOAc = 1/1) to afford **1d** (8.53 g, 95%) as a yellow solid. Spectral data matched those reported in the literature.⁶

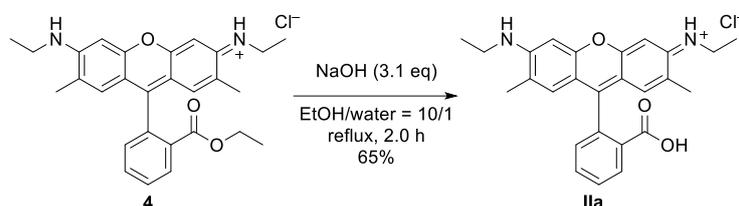
Synthesis of 8-hydroxyjulolidine (**1e**)



To a suspension of 3-aminophenol (0.960 g, 8.80 mmol) and Na_2CO_3 (3.26 g, 31.0 mmol) in DMF (10 mL) was added 1-bromo-3-chloropropane (4.16 g, 2.60 mL, 26.0 mmol), which was refluxed for 19 h. After cooling to room temperature, the mixture was filtrated and extracted by CH_2Cl_2 (x3). The combined organic layers were washed with brine, dried (Na_2SO_4), and concentrated in vacuo. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, hexane/EtOAc = 5/1) to afford **1e**

(0.559 g, 34%) as colorless solid. The spectral data matched those reported in the literature.⁷

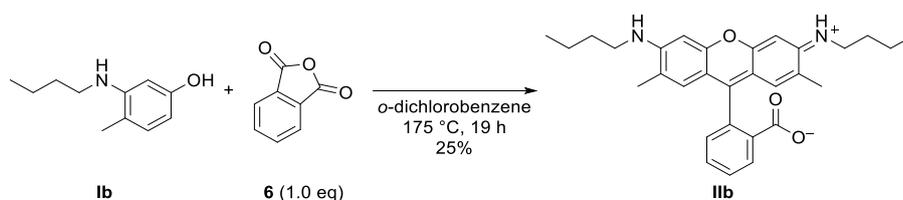
Synthesis of carboxylic acid **IIa**



To a solution of rhodamine 6G (**1**) (2.20 g, 4.50 mmol) in ethanol (64 mL) was added NaOH (0.41 g, 10.3 mmol) in water (6.0 mL), which was refluxed for 2.0 h. After cooling to room temperature, the mixture was neutralized by adding 2.0 M aqueous HCl to afford red precipitate. The precipitate was collected by filtration and dried to afford **23a** (1.31 g, 65%) as a pink solid. The spectral data matched those reported in the literature.⁸

Synthesis of carboxylate **IIb–e**

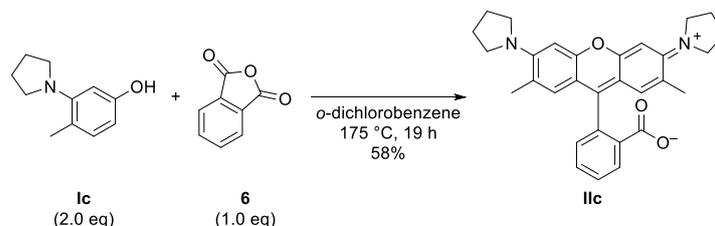
Synthesis of carboxylate **IIb**



To a solution of **Ib** (500 mg, 2.8 mmol) in *o*-dichlorobenzene (2.0 mL) was added phthalic anhydride (207 mg, 1.40 mmol). After stirring for 19 h at 175 °C, the reaction was cooled to room temperature. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, CHCl₃/MeOH = 20/1 to 5/1) to afford **IIb** (158 mg, 25%) as a pink solid.

mp 232 °C (decomp.); **¹H NMR** (methanol-*d*₄, 500 MHz) δ 1.01 (t, 6H, *J* = 7.4 Hz), 1.44–1.52 (m, 4H), 1.69–1.75 (m, 4H), 2.12 (s, 6H), 3.46 (t, 4H, *J* = 7.3 Hz), 6.85 (s, 2H), 7.04 (s, 2H), 7.20 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz), 7.60 (dd, 1H, *J* = 7.2 Hz), 7.65 (dd, 1H, *J* = 7.2 Hz), 8.08 (d₅, 1H, *J* = 7.2 Hz); **¹³C NMR** (methanol-*d*₄, 150 MHz) δ 14.0, 17.3, 21.1, 31.5, 44.3, 95.0, 115.5, 126.5, 130.96, 131.00, 131.2, 131.47, 131.53, 134.4, 158.1, 159.6, 163.6, 174.4, several peaks overlapped; **IR** (ATR) 3321, 2943, 2832, 1450, 1115, 1022 cm⁻¹; **HRMS** (ESI) calcd for C₃₀H₃₄N₂O₃ ([M+H]⁺) *m/z* 471.2642, found *m/z* 471.2642.

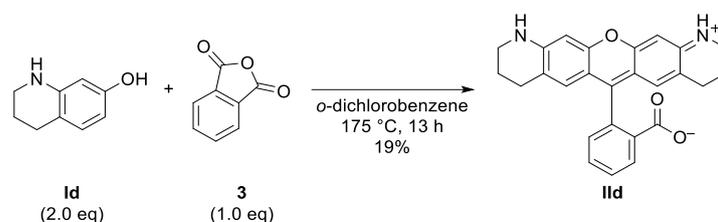
Synthesis of carboxylate **IIc**



To a solution of **Ic** (1.00 g, 5.65 mmol) in *o*-dichlorobenzene (4.0 mL) was added phthalic anhydride (460 mg, 3.11 mmol) at room temperature. After stirring for 19 h at 175 °C, the reaction was cooled to room temperature. The mixture was purified by flash column chromatography (silica gel, CHCl₃/MeOH = 10/1 to 5/1) to afford **IIc** (817 mg, 58%) as a purple solid.

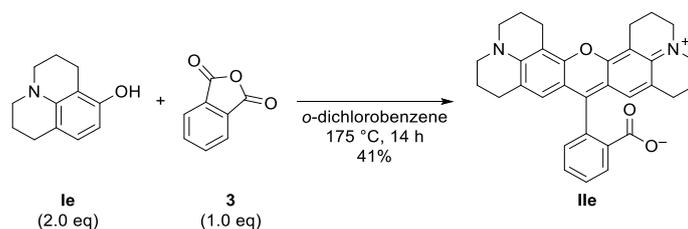
mp 250 °C (decomp.); **¹H NMR** (methanol-*d*₄, 500 MHz) δ 1.91–1.96 (m, 8H), 2.14 (s, 6H), 3.26–3.30 (m, 8H), 6.40 (s, 2H), 6.62 (s, 2H), 7.17 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.60 (dd, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.64 (dd, 1H, *J* = 7.5 Hz), 8.02 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz); **¹³C NMR** (methanol-*d*₄, 150 MHz) δ 20.6, 25.1, 51.0, 102.4, 109.4, 123.6, 124.7, 125.5, 128.0, 129.7, 131.0, 134.5, 151.4, 152.2, 153.3, 170.6, several peaks overlapped; **IR** (ATR) 3318, 3298, 2943, 2832, 1450, 1115, 1022 cm⁻¹; **HRMS** (ESI) calcd for C₃₀H₃₁N₂O₃ ([M+H]⁺) *m/z* 467.2333, found *m/z* 467.2329.

Synthesis of carboxylate **II**d



To a suspension of **Id** (500 mg, 3.45 mmol) in *o*-dichlorobenzene (2.0 mL) was added phthalic anhydride (273 mg, 1.84 mmol). After stirring for 13 h at 175 °C, the reaction was cooled to room temperature. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, CHCl₃/MeOH = 10/1 to 5/1) to afford **II d** (137 mg, 19%) as pink solid. The spectral data matched those reported in the literature.⁹

Synthesis of carboxylate **II**e

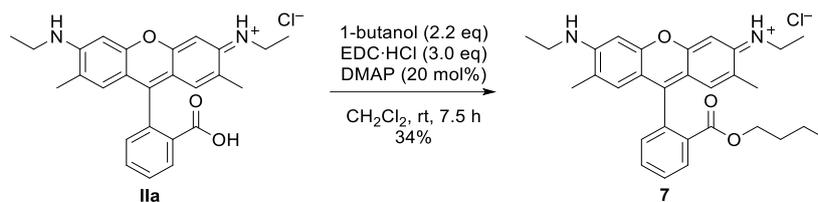


To a suspension of **II e** (100 mg, 0.529 mmol) in *o*-dichlorobenzene (1.0 mL) was added phthalic anhydride (37.0 mg, 0.252 mmol). After stirring for 14 h at 175 °C, the reaction was cooled to room temperature. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, CHCl₃/MeOH = 7/1) to afford **II e** (49.1 mg, 41%) as a purple solid.

mp 150 °C (decomp.); **¹H NMR** (methanol-*d*₄, 500 MHz) δ 1.91–1.95 (m, 4H), 2.06–2.10 (m, 4H), 2.63–2.74 (m, 4H), 3.04–3.07 (m, 4H), 3.46–3.48 (m, 4H), 3.51–3.53 (m, 4H), 6.80 (s, 2H), 7.18 (dd, 1H, *J* = 7.5, 1.1 Hz), 7.57 (ddd, 1H, *J* = 7.5, 7.5, 1.7 Hz), 7.61 (ddd, 1H, *J* = 7.5, 7.5, 1.1 Hz), 8.04 (dd, 1H, *J* = 7.5, 1.7 Hz); **¹³C NMR** (CDCl₃, 125 MHz) δ 20.80, 20.83, 21.7, 28.4, 51.3, 51.7, 106.5, 114.8, 125.1, 128.5, 130.8, 130.9, 131.2, 131.4, 134.5, 152.8, 154.3, 161.2, several peaks overlapped; **IR** (ATR) 3416, 2940, 1595, 1493, 1362, 1296, 1196, 1101 cm⁻¹; **HRMS** (ESI) calcd for C₃₂H₃₁N₂O₃⁺ ([M+H]⁺) *m/z* 491.2329, found *m/z* 491.2333.

Synthesis of ester **5–24**

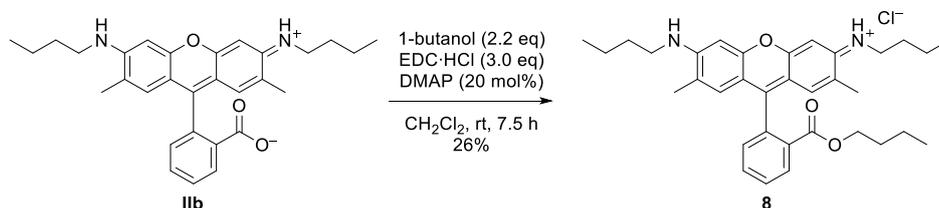
Synthesis of rhodamine 19 butyl ester (**7**)



To a suspension of carboxylic acid **IIa** (210 mg, 0.505 mmol) in CH₂Cl₂ (6.0 mL) were added DMAP (12.2 mg, 0.0999 mmol), 1-butanol (0.10 mL), and EDC·HCl (300 mg, 1.50 mmol). After stirring for 7.5 h at room temperature, the reaction was quenched by adding water and the mixture was extracted with CHCl₃ (x3). The combined organic layers were washed with 10% aqueous HCl and brine, dried (Na₂SO₄), and concentrated in vacuo. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, CHCl₃/MeOH = 10/1 to 5/1) to afford ester **7** (80.1 mg, 34%) as a pink solid.

mp 136 °C (decomp.); **¹H NMR** (CDCl₃, 500 MHz) δ 0.78 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 1.06–1.13 (m, 2H), 1.31–1.36 (m, 2H), 1.42 (t, 6H, *J* = 7.5 Hz), 2.30 (s, 6H), 3.52–3.63 (m, 4H), 3.99 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz), 6.64 (s, 2H), 6.74 (s, 2H), 7.28 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.41 (brs, 2H, NH), 7.75 (ddd, 1H, *J* = 7.4, 7.4, 1.2 Hz), 7.79 (ddd, 1H, *J* = 7.4, 7.4, 1.2 Hz), 8.30 (dd, 1H, *J* = 7.4, 1.2 Hz); **¹³C NMR** (CDCl₃, 150 MHz) δ 13.3, 13.6, 18.4, 18.8, 30.1, 38.4, 65.6, 93.9, 113.7, 126.7, 128.8, 130.5, 130.6, 130.8, 131.8, 133.2, 134.5, 156.6, 157.1, 157.7, 166.0; **IR** (ATR) 3210, 2974, 2253, 1717, 1605, 1524, 1501, 1304, 907, 729 cm⁻¹; **HRMS** (ESI) calcd for C₃₀H₃₅N₂O₃ ([M+H]⁺) *m/z* 471.2648, found *m/z* 471.2652.

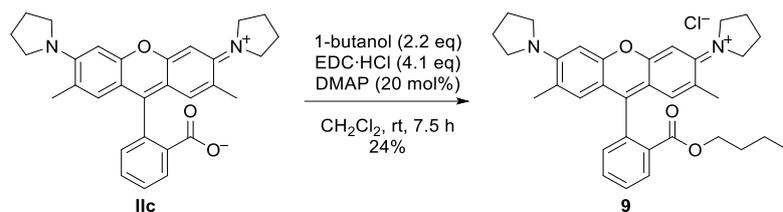
Synthesis of N-butyl-rhodamine butyl ester (**8**)



To a suspension of carboxylate **IIb** (230 mg, 0.506 mmol) in CH₂Cl₂ (6.0 mL) were added DMAP (12.3 mg, 0.101 mmol), 1-butanol (0.10 mL), and EDC·HCl (300 mg, 1.50 mmol). After stirring for 7.5 h at room temperature, the reaction was quenched by adding water and the mixture was extracted with CHCl₃ (x3). The combined organic layers were washed with aqueous 10% HCl and brine, dried (Na₂SO₄), and concentrated in vacuo. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, CHCl₃/MeOH = 10/1 to 5/1) to afford ester **8** (72.2 mg, 26%) as a pink solid.

mp 224 °C (decomp.); **¹H NMR** (CDCl₃, 500 MHz) δ 0.78 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz), 0.99 (t, 6H, *J* = 7.5 Hz), 1.05–1.13 (m, 2H), 1.30–1.36 (m, 2H), 1.44–1.52 (m, 4H), 1.74–1.80 (m, 4H), 2.30 (s, 6H), 3.45–3.56 (m, 4H), 3.99 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz), 6.62 (s, 2H), 6.72 (s, 2H), 7.29 (dd, 1H, *J* = 7.6, 1.2 Hz), 7.53 (brs, 2H, NH), 7.74 (ddd, 1H, *J* = 7.6, 7.6, 1.2 Hz), 7.79 (ddd, 1H, *J* = 7.6, 7.6, 1.2 Hz), 8.31 (dd, 1H, *J* = 7.6, 1.2 Hz); **¹³C NMR** (CDCl₃, 150 MHz) δ 13.4, 13.6, 18.4, 18.8, 20.1, 30.1, 30.4, 43.6, 65.6, 94.1, 113.8, 126.6, 128.9, 130.5, 130.6, 130.8, 131.8, 133.2, 134.5, 156.6, 157.0, 157.6, 166.0; **IR** (ATR) 3202, 2959, 2361, 1609, 1501, 1300, 1215, 1076, 748 cm⁻¹; **HRMS** (ESI) calcd for C₃₄H₄₃N₂O₃ ([M+H]⁺) *m/z* 527.3268, found *m/z* 527.3272.

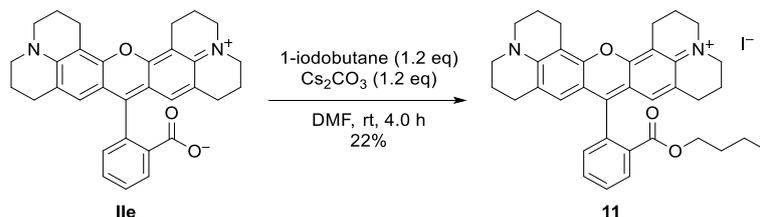
Synthesis of pyrrolidine-rhodamine butyl ester (**9**)



To a solution of carboxylate **IIc** (120 mg, 0.266 mmol) in CH₂Cl₂ (3.0 mL) were added DMAP (6.0 mg, 0.0491 mmol), 1-butanol (0.10 mL) and EDC·HCl (141 mg, 0.746 mmol). After stirring for 7.5 h at room temperature, the reaction was quenched by adding water and the mixture was extracted with CHCl₃ (x3). The combined organic layers were washed with aqueous 10% HCl and brine, dried (Na₂SO₄), and concentrated in vacuo. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, CHCl₃/MeOH = 10/1 to 5/1) to afford ester **9** (30.1 mg, 24%) as a purple solid.

mp 42.9 °C (decomp.); **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 0.80 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz), 1.10–1.17 (m, 2H), 1.35–1.40 (m, 2H), 2.07–2.16 (m, 8H), 2.46 (s, 6H), 3.75–3.85 (m, 8H), 4.00 (t, 3H, *J* = 6.6 Hz), 6.76 (s, 2H), 6.82 (s, 2H), 7.33 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.77 (dd, 1H, *J* = 7.5, 7.5 Hz), 7.85 (dd, 1H, *J* = 7.5, 7.5 Hz), 8.30 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz); **¹³C NMR** (150 MHz, CDCl₃) δ 13.4, 18.8, 23.0, 25.6, 30.2, 52.5, 65.6, 99.6, 114.8, 126.6, 130.6, 130.7, 131.8, 132.4, 133.5, 133.9, 156.8, 157.5, 157.6, 165.9; **IR** (neat) 3020, 1597, 1215, 745 cm⁻¹; **HRMS** (ESI) calcd for C₃₄H₄₀N₂O₃ ([M+H]⁺) *m/z* 523.2961, found *m/z* 523.2956.

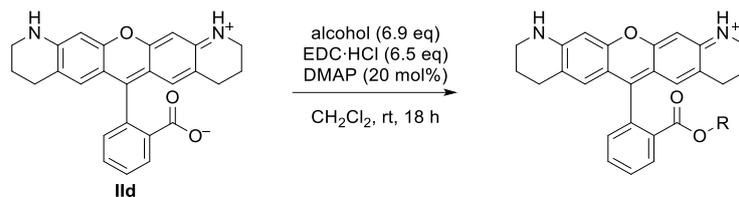
Synthesis of X-rhodamine butyl ester (**11**)



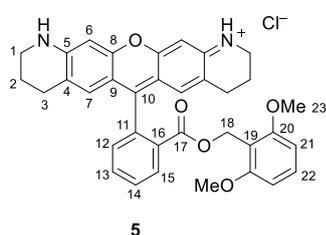
To a solution of carboxylate **IIe** (49.1 mg, 0.0997 mmol) in DMF (0.91 mL) were added 1-iodobutane (18.4 mg, 11 mL, 0.120 mmol) and Cs₂CO₃ (39.1 mg, 0.120 mmol). After stirring for 4.0 h at room temperature, the reaction was quenched by adding water and the mixture was extracted by CHCl₃ (x3). The combined organic layers were washed with brine, dried (Na₂SO₄), and concentrated in vacuo. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, CHCl₃/MeOH = 20/1 to 10/1) to afford ester **11** (15.1 mg, 22%) as purple amorphous solid.

mp 44.0 °C (decomp.); **¹H NMR** (CDCl₃, 600 MHz) δ 0.82 (t, 3H, *J* = 7.6 Hz), 1.12–1.19 (m, 2H), 1.38–1.43 (m, 2H), 1.94–2.03 (m, 4H), 2.07–2.19 (m, 4H), 2.63–2.72 (m, 4H), 3.00–3.10 (m, 4H), 3.49–3.68 (m, 8H), 4.03 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz), 6.54 (s, 2H), 7.28 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.73 (dd, 1H, *J* = 7.6, 7.6 Hz), 7.80 (dd, 1H, *J* = 7.6, 7.6 Hz), 8.28 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz); **¹³C NMR** (CDCl₃, 150 MHz) δ 13.5, 18.9, 19.5, 19.7, 20.4, 27.5, 30.3, 50.5, 50.9, 65.5, 105.7, 113.3, 124.1, 126.3, 130.4, 130.7, 131.0, 131.5, 133.5, 134.8, 151.7, 152.7, 156.4, 165.1; **IR** (neat) 3209, 2931, 2198, 1716, 1651, 1608, 1500, 1408, 1288, 1223, 1173, 1076, 729 cm⁻¹; **HRMS** (ESI) calcd for C₃₆H₃₉N₂O₃ ([M+H]⁺) *m/z* 547.2955, found *m/z* 547.2952.

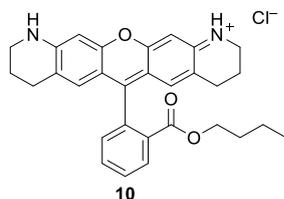
General procedure for the syntheses of esters **2**, **7**, **9**–**21**.



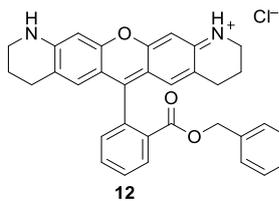
To the suspension of carboxylate **IIId** in CH_2Cl_2 were added DMAP (20 mol%), EDC·HCl (6.5 eq) and the corresponding alcohol (6.9 eq). After stirring for 18 h, the reaction was stopped by adding water and the mixture was extracted with CHCl_3 (x3). The combined organic layers were washed with aqueous 10% HCl and brine, dried (Na_2SO_4), and concentrated in vacuo. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 10/1$ to $5/1$) to afford the title compound as a red amorphous solid.



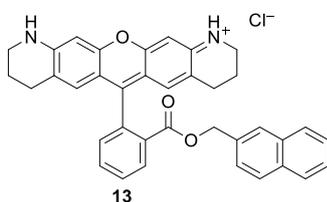
Rh_Q-DMB (**5**) **Yield** 70%; **mp** 208–211 °C; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl_3) δ 1.83–1.92 (m, 4H, H2), 2.56–2.60 (m, 4H, H3), 3.56 (m, 10H, H1,23), 5.00 (s, 2H, H18), 6.46 (s, 2H, H7), 6.50 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, H21), 6.95 (s, 2H, H6), 7.13–7.15 (m, 1H, H12), 7.38 (t, 1H, $J = 8.3$ Hz, H22), 7.66–7.68 (m, 2H, H13,14), 8.33–8.35 (m, 1H, H15), 9.13 (brs, 2H, NH); **¹³C NMR** (150 MHz, CDCl_3) δ 20.3 (C2), 26.9 (C3), 41.5 (C3), 55.6 (C23), 56.9 (C18), 98.1 (C6), 104.0 (C21), 109.6 (C19), 113.7 (C9), 123.0 (C4), 128.7 (C7), 129.9 (C12), 130.3 (C13), 131.1 (C10 or C11), 131.5 (C22), 132.0 (C15), 132.6 (C16), 134.7 (C14), 155.5 (C5 or C8 or C10 or C11), 155.8 (C5 or C8 or C10 or C11), 156.2 (C5 or C8 or C10 or C11), 159.3 (C20), 166.6 (C18); **IR** (ATR) 3210, 1713, 1609, 1504, 1412, 1304, 1177, 1123, 729; **HRMS** (ESI) calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_5^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) m/z 561.2384, found m/z 561.2408.



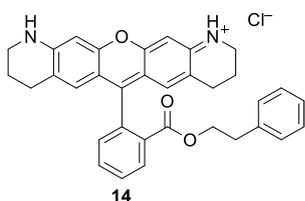
Rh_Q-butyl ester (**10**) **Yield** 48%; **mp** 114 °C (decomp.); **¹H NMR** (CDCl_3 , 500 MHz) δ 0.75 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz), 0.97–1.02 (m, 2H), 1.18–1.24 (m, 2H), 1.83–1.91 (m, 4H), 2.61–2.64 (m, 4H), 3.51–3.57 (m, 4H), 3.94 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz), 6.55 (s, 2H), 7.15 (s, 2H), 7.26 (dd, 1H, $J = 7.6, 0.85$ Hz), 7.69 (ddd, 1H, $J = 7.6, 7.6, 0.85$) 7.73 (ddd, 1H, $J = 7.6, 7.6, 0.85$ Hz), 8.26 (dd, 1H, $J = 7.6, 0.85$ Hz), 9.16 (brs, 2H, NH); **¹³C NMR** (CDCl_3 , 150 MHz) δ 13.4, 18.7, 20.2, 26.9, 30.0, 41.5, 65.6, 98.4, 113.5, 123.6, 128.5, 130.1, 130.9, 131.2, 131.7, 132.9, 134.7, 155.6, 155.9, 156.6, 166.5; **IR** (ATR) 3017, 2974, 2232, 1215, 1049, 745 cm^{-1} ; **HRMS** (ESI) calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) m/z 467.2329, found m/z 467.2338.



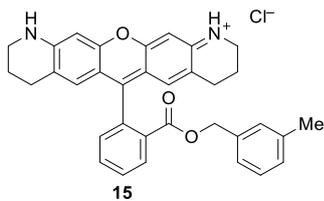
RhQ-benzyl ester (**12**) **Yield** 95%; **mp** 131 °C (decomp.); **¹H NMR** (CDCl₃, 500 MHz) δ 1.83–1.88 (m, 4H), 2.55–2.57 (m, 4H), 3.57–3.65 (m, 4H), 4.90 (s, 2H), 6.47 (s, 2H), 6.87 (d, 2H, *J* = 6.9 Hz), 7.07 (s, 2H), 7.20–7.26 (m, 3H), 7.34 (dd, 1H, *J* = 6.9, 6.9 Hz), 7.66–7.73 (m, 2H), 8.28 (dd, 1H, *J* = 7.5, 1.7 Hz), 9.36 (brs, 2H, NH); **¹³C NMR** (CDCl₃, 150 MHz) δ 20.2, 26.9, 41.5, 67.7, 98.5, 113.5, 123.5, 128.4, 128.8, 129.2, 129.3, 130.1, 130.8, 130.9, 131.8, 133.0, 134.5, 134.8, 155.2, 155.8, 156.4, 166.2; **IR** (neat) 3209, 2931, 2198, 1716, 1651, 1608, 1500, 1408, 1288, 1223, 1173, 1076, 729 cm⁻¹; **HRMS** (ESI) calcd for C₃₃H₂₉N₂O₃ ([M+H]⁺) *m/z* 501.2173, found *m/z* 501.2178.



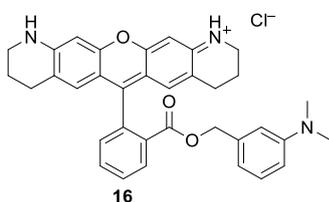
RhQ-naphthyl ester (**13**) **Yield** 61%; **mp** 141 °C (decomp.); **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 1.70–1.79 (m, 4H), 2.39–2.53 (m, 4H), 3.40–3.55 (m, 4H), 5.06 (s, 2H), 6.42 (s, 2H), 6.90–6.92 (m, 3H), 7.16–7.18 (m, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.56–7.61 (m, 2H), 7.67–7.77 (m, 4H), 7.97 (m, 1H), 8.28–8.30 (m, 1H), 9.07 (brs, 2H, NH); **¹³C NMR** (150 MHz, CDCl₃) δ 20.0, 26.8, 41.4, 67.8, 98.3, 113.4, 123.4, 126.3, 127.0, 127.3, 128.2, 128.40, 128.44, 128.8, 129.3, 130.0, 130.8, 130.9, 131.7, 131.8, 132.9, 133.4, 133.7, 134.7, 154.9, 155.6, 156.2, 166.3; **IR** (neat) 3208, 2930, 1717, 1607, 1503, 1410, 1302, 1225, 1145, 991, 729 cm⁻¹; **HRMS** (ESI) calcd for C₃₇H₃₁N₂O₃ ([M+H]⁺) *m/z* 551.2329, found *m/z* 551.2332.



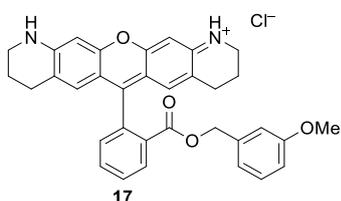
RhQ-phenethyl ester (**14**) **Yield** 70%; **mp** 137 °C (decomp.); **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 1.83–1.93 (m, 4H), 2.57–2.62 (m, 6H), 3.50–3.60 (m, 4H), 4.19 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 6.53 (s, 2H), 7.00 (dd, 1H, *J* = 7.7, 1.5 Hz), 7.12 (s, 2H), 7.18–7.25 (n, 4), 7.67 (ddd, 1H, *J* = 7.7, 7.7, 1.5 Hz), 7.73 (ddd, 1H, *J* = 7.7, 7.7, 1.5 Hz), 8.21 (dd, 1H, *J* = 7.7, 1.5 Hz), 9.03 (brs, 2H, NH); **¹³C NMR** (150 MHz, CDCl₃) δ 20.2, 27.0, 34.2, 41.5, 65.8, 98.4, 113.4, 123.6, 127.0, 128.4, 128.9, 129.0, 130.1, 130.9, 131.0, 131.6, 133.0, 135.0, 137.6, 155.5, 155.8, 156.6, 166.2; **IR** (ATR) 2924, 1717, 1647, 1612, 1539, 1288, 1076, 910, 737 cm⁻¹; **HRMS** (ESI) calcd for C₃₄H₃₁N₂O₃ ([M+H]⁺) *m/z* 515.2329, found *m/z* 515.2334.



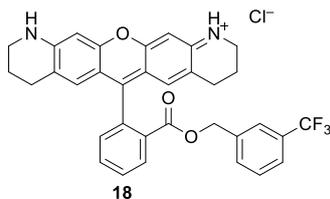
RhQ-methylbenzyl ester (**15**) **Yield** 75%; **mp** 126 °C (decomp.); **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 1.83–1.92 (m, 4H), 2.34 (s, 3H), 2.57–2.59 (m, 4H), 3.53–3.58 (m, 4H), 4.86 (s, 2H), 6.47 (s, 2H), 6.66 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 6.72 (s, 1H), 7.08 (s, 2H), 7.13 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz), 7.18–7.22 (m, 2H), 7.67–7.73 (m, 2H), 8.27–8.29 (m, 1H), 9.27 (brs, 2H, NH); **¹³C NMR** (150 MHz, CDCl₃) δ 20.2, 21.3, 26.9, 41.5, 67.8, 98.3, 113.4, 123.4, 125.9, 128.3, 129.1, 129.7, 130.0, 130.2, 130.8, 130.9, 131.7, 133.0, 134.3, 134.8, 138.9, 155.2, 155.7, 156.3, 166.2; **IR** (ATR) 3206, 1717, 1651, 1612, 1504, 1412, 1304, 1223, 1173, 991, 910, 733 cm⁻¹; **HRMS** (ESI) calcd for C₃₄H₃₁N₂O₃⁺ ([M+H]⁺) *m/z* 515.2329, found *m/z* 515.2333.



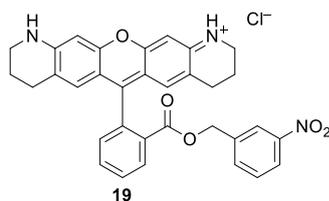
RhQ-dimethylaminobenzyl ester (**16**) **Yield** 26%; **mp** 149 °C (decomp.); **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 1.84–1.91 (m, 4H), 2.56–2.59 (m, 4H), 2.97 (s, 6H), 3.52–3.58 (m, 4H), 4.86 (s, 2H), 6.18 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 6.21–6.23 (m, 1H), 6.47 (s, 2H), 6.72 (dd, 1H, *J* = 8.3, 2.6 Hz), 7.02 (s, 2H), 7.10 (dd, 1H, *J* = 7.8, 7.8 Hz), 7.20 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.8 Hz), 7.66–7.72 (m, 2H), 8.28 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.8 Hz), 9.16 (brs, 2H, NH); **¹³C NMR** (150 MHz, CDCl₃) δ 20.2, 26.9, 40.4, 41.5, 68.5, 98.4, 112.6, 113.1, 113.4, 116.6, 128.3, 129.9, 130.0, 130.7, 131.0, 131.7, 132.8, 134.9, 135.0, 151.1, 155.2, 155.7, 156.3, 166.2; **IR** (ATR) 2986, 1612, 1504, 1412, 1303, 1227, 1173 cm⁻¹; **HRMS** (ESI) calcd for C₃₅H₃₄N₃O₃⁺ ([M+H]⁺) *m/z* 544.2595, found *m/z* 544.2612.



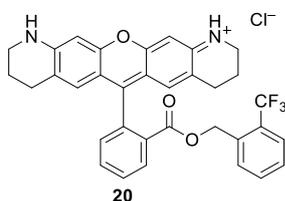
RhQ-m-methoxybenzyl ester (**17**) **Yield** 73%; **mp** 133 °C (decomp.); **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 1.84–1.91 (m, 4H), 2.57–2.60 (m, 4H), 3.53–3.57 (m, 4H), 3.85 (s, 3H), 4.86 (s, 3H), 6.41–6.43 (m, 2H), 6.47 (s, 2H), 6.93 (dd, 1H, *J* = 7.2, 1.7 Hz), 7.04 (s, 2H), 7.17–7.22 (m, 2H), 7.67–7.73 (m, 2H), 8.29 (dd, 1H, *J* = 7.2, 1.7 Hz), 9.20 (brs, 2H, NH); **¹³C NMR** (150 MHz, CDCl₃) δ 20.5, 27.2, 41.7, 55.6, 67.6, 98.2, 113.1, 113.6, 114.9, 120.6, 123.2, 128.0, 129.7, 130.1, 130.4, 130.5, 131.4, 132.7, 134.5, 135.3, 154.6, 155.3, 155.8, 159.7, 165.6; **IR** (ATR) 3206, 1721, 1609, 1504, 1412, 1304, 1173, 910, 732 cm⁻¹; **HRMS** (ESI) calcd for C₃₄H₃₁N₂O₄⁺ ([M+H]⁺) *m/z* 531.2278, found *m/z* 531.2279.



RhQ-*m*-trifluoromethylbenzyl ester (**18**) **Yield** 80%; **mp** 139 °C (decomp.); **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 1.82–1.91 (m, 4H), 2.56–2.58 (m, 4H), 3.52–3.57 (m, 4H), 4.95 (s, 2H), 6.48 (s, 2H), 6.99 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.09 (s, 2H), 7.25 (dd, 1H, *J* = 7.5, 1.0 Hz), 7.29–7.31 (m, 1H), 7.45 (dd, 1H, *J* = 7.5, 7.5 Hz), 7.61 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.70 (ddd, 1H, *J* = 7.5, 7.5, 1.0 Hz), 7.74 (ddd, 1H, *J* = 7.5, 7.5, 1.0 Hz), 8.27 (dd, 1H, *J* = 7.5, 1.0 Hz), 9.14 (brs, 2H, NH); **¹³C NMR** (150 MHz, CDCl₃) δ 20.1, 26.9, 41.4, 66.6, 98.3, 113.3, 123.6, 124.2 (q, *J*_{CF} = 273.1 Hz), 125.6 (q, *J*_{CF} = 2.9 Hz), 126.1 (q, *J*_{CF} = 2.9 Hz), 128.2, 130.15, 130.18, 130.9, 131.1 (q, *J*_{CF} = 33.2 Hz), 131.8, 132.2, 133.2, 134.9, 135.6, 155.0, 155.8, 156.3, 166.0; **IR** (ATR) 3213, 2935, 1720, 1612, 1504, 1412, 1303, 1173, 910, 733 cm⁻¹; **HRMS** (ESI) calcd for C₃₄H₂₈F₃N₂O₃⁺ ([M+H]⁺) *m/z* 569.2047, found *m/z* 569.2060.

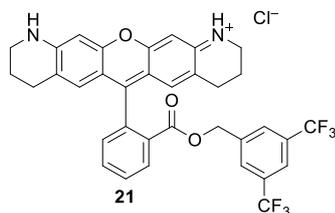


RhQ-nitrobenzyl ester (**19**) **Yield** 61%; **mp** 127 °C (decomp.); **¹H NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ 1.81–1.91 (m, 4H), 2.58–2.59 (m, 4H), 3.53–3.57 (m, 4H), 4.97 (s, 2H), 6.48 (s, 2H), 7.06 (s, 2H), 7.15 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.25 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.55 (dd, 1H, *J* = 8.3, 8.3 Hz), 7.71–7.77 (m, 2H), 7.80–7.83 (m, 1H), 8.22 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 8.30 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 9.25 (brs, 2H, NH); **¹³C NMR** (150 MHz, CDCl₃) δ 20.1, 26.9, 41.5, 66.1, 98.3, 113.3, 123.6, 123.7, 124.3, 130.2, 130.3, 130.8, 130.9, 131.9, 133.4, 134.7, 134.8, 136.3, 148.6, 154.8, 155.8, 156.1, 166.0; **IR** (ATR) 3217, 2924, 1721, 1609, 1501, 1408, 1303, 1173, 729 cm⁻¹; **HRMS** (ESI) calcd for C₃₃H₂₈N₃O₅⁺ ([M+H]⁺) *m/z* 546.2023, found *m/z* 546.2026.

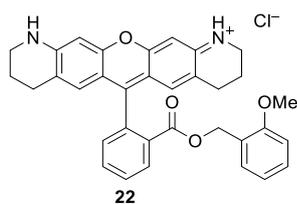


RhQ-*o*-trifluoromethylbenzyl ester (**20**) **Yield** 57%; **mp** 126 °C (decomp.); **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 1.83–1.93 (m, 4H), 2.57–2.61 (m, 4H), 3.53–3.58 (m, 4H), 5.05 (s, 2H), 6.46 (s, 2H), 6.84 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 6.97 (s, 2H), 7.19 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.5 Hz), 7.54 (ddd, 1H, *J* = 8.0, 8.0, 1.5 Hz), 7.60–7.65 (m, 2H), 7.69–7.74 (m, 2H), 8.34 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.5 Hz), 9.14 (brs, 2H, NH); **¹³C NMR** (150 MHz, CDCl₃) δ 20.1, 26.9, 41.5, 64.1, 98.2, 113.3, 123.5, 124.2 (q, *J*_{CF} = 274.5 Hz), 126.7 (q, *J*_{CF} = 4.3 Hz), 128.4, 128.8 (q, *J*_{CF} = 30.3 Hz), 130.1, 130.2, 130.7, 131.5, 132.0, 132.1, 133.1, 133.2, 134.9, 155.1, 155.7, 156.0, 165.7; **IR** (ATR) 3201, 2924, 1717, 1609, 1504, 1304, 1173, 729 cm⁻¹; **HRMS** (ESI) calcd for C₃₄H₂₈F₃N₂O₃⁺ ([M+H]⁺) *m/z*

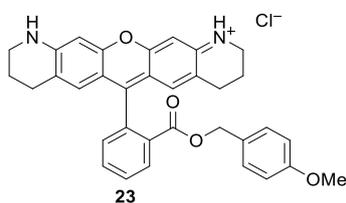
569.2047, found m/z 569.2048.



RhQ-*m,m'*-bistrifluoromethylbenzyl ester (**21**) **Yield** 73%; **mp** 210 °C (decomp.); **¹H NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ 1.82–1.92 (m, 4H), 2.59–2.61 (m, 4H), 3.50–3.60 (m, 4H), 5.07 (s, 2H), 6.51 (s, 2H), 7.12 (s, 2H), 7.31 (dd, 1H, $J = 8.0, 1.5$ Hz), 7.56 (s, 2H), 7.72 (ddd, 1H, $J = 8.0, 8.0, 1.5$ Hz), 7.78 (ddd, 1H, $J = 8.0, 8.0, 1.5$ Hz), 7.85 (s, 1H), 8.27 (dd, 1H, $J = 8.0, 1.5$ Hz), 8.30 (dd, $J = 7.5, 1.5$ Hz), 9.26 (brs, 2H, NH); **¹³C NMR** (150 MHz, CDCl₃) δ 20.0, 26.9, 41.4, 65.4, 98.2, 113.2, 123.0, 123.4 (q, $J_{CF} = 273.1$ Hz), 123.7, 128.1, 128.6, 129.8, 130.3, 131.1, 131.6, 132.4 (q, $J_{CF} = 34.7$ Hz), 133.6, 135.4, 137.8, 154.9, 155.9, 156.4, 165.5; **IR** (ATR) 2940, 1728, 1612, 1504, 1304, 1281, 1134, 733 cm⁻¹; **HRMS** (ESI) calcd for C₃₅H₂₇F₆N₂O₃⁺ ([M+H]⁺) m/z 637.1920, found m/z 637.1924.

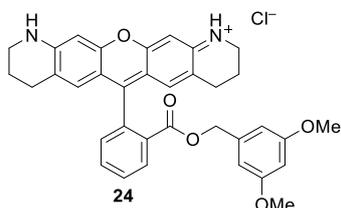


RhQ-*o*-methoxybenzyl ester (**22**) **Yield** 70%; **mp** 112 °C (decomp.); **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 1.81–1.90 (m, 4H), 2.54–2.57 (m, 4H), 3.52–3.56 (m, 4H), 3.64 (s, 3H), 4.95 (s, 2H), 6.45 (s, 2H), 6.78–6.84 (m, 3H), 7.05 (s, 2H), 7.17–7.19 (m, 1H), 7.33–7.37 (m, 1H), 7.66–7.70 (m, 2H), 8.28–8.30 (m, 1H), 9.22 (brs, 2H, NH); **¹³C NMR** (150 MHz, CDCl₃) δ 20.5, 27.2, 41.7, 55.5, 62.8, 98.1, 111.2, 113.2, 120.3, 122.2, 123.0, 128.2, 129.7, 130.4, 130.5, 130.7, 130.8, 131.5, 132.5, 134.3, 154.8, 155.2, 155.8, 157.6, 166.0; **IR** (ATR) 3213, 2936, 1717, 1609, 1505, 1410, 1302, 1225, 1175, 991, 729 cm⁻¹; **HRMS** (ESI) calcd for C₃₄H₃₁N₂O₄⁺ ([M+H]⁺) m/z 531.2278, found m/z 531.2283.



RhQ-*p*-methoxybenzyl ester (**23**) **Yield** 75%; **mp** 131 °C (decomp.); **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 1.81–1.91 (m, 4H), 2.52–2.58 (m, 4H), 3.51–3.58 (m, 4H), 3.90 (s, 3H), 4.86 (s, 2H), 6.46 (s, 2H), 6.74 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 6.83 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.09 (s, 2H), 7.20 (dd, 1H, $J = 7.2$ Hz, 1.8 Hz), 7.66–7.72 (m, 2H), 8.26 (dd, 1H, $J = 7.4$ Hz, 1.8 Hz), 9.06 (brs, 2H, NH); **¹³C NMR** (150 MHz, CDCl₃) δ 20.4, 27.2, 41.7, 55.8, 67.4, 98.2, 113.2, 114.1, 123.2, 126.4, 128.1, 129.7, 130.4, 130.5, 130.6, 131.3, 132.6, 134.4, 155.8, 155.3, 155.9, 159.9, 165.7; **IR** (ATR) 3201, 2931, 1651, 1612, 1504, 1411, 1315, 1258, 1223, 1177,

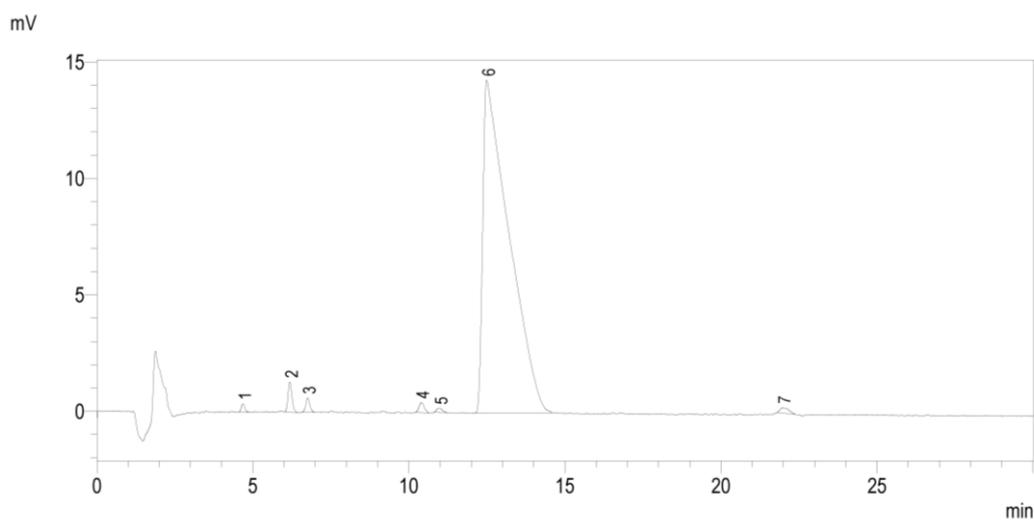
1069, 910, 841, 737 cm^{-1} ; **HRMS** (ESI) calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_4^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) m/z 531.2278, found m/z 531.2278.



RhQ-*m,m'*-dimethoxybenzyl ester (**24**) **Yield** 64%; **mp** 136 °C (decomp.); **^1H NMR** (600 MHz, CDCl_3) δ 1.82–1.94 (m, 4H), 2.55–2.63 (m, 4H), 3.52–3.57 (m, 4H), 3.85 (s, 6H), 4.82 (s, 2H), 6.02 (d, 2H, $J = 2.0$ Hz), 6.47 (s, 2H), 6.49–6.50 (m, 1H), 7.03 (s, 2H), 7.22 (dd, 1H, $J = 8.0, 1.7$ Hz), 7.68–7.73 (m, 2H), 8.29 (dd, 1H, $J = 8.0$ Hz, 1.7Hz), 9.24 (brs, 2H, NH); **^{13}C NMR** (150 MHz, CDCl_3) δ 20.1, 26.9, 41.5, 55.6, 67.7, 98.4, 100.0, 107.1, 113.4, 123.5, 128.3, 130.0, 130.8, 131.7, 133.0, 134.9, 136.2, 155.0, 155.7, 156.3, 161.6, 166.1; **IR** (ATR) 3208, 2932, 1717, 1609, 1505, 1302, 1225, 1175, 1069, 837, 729 cm^{-1} ; **HRMS** (ESI) calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_5^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) m/z 561.2384, found m/z 561.2391.

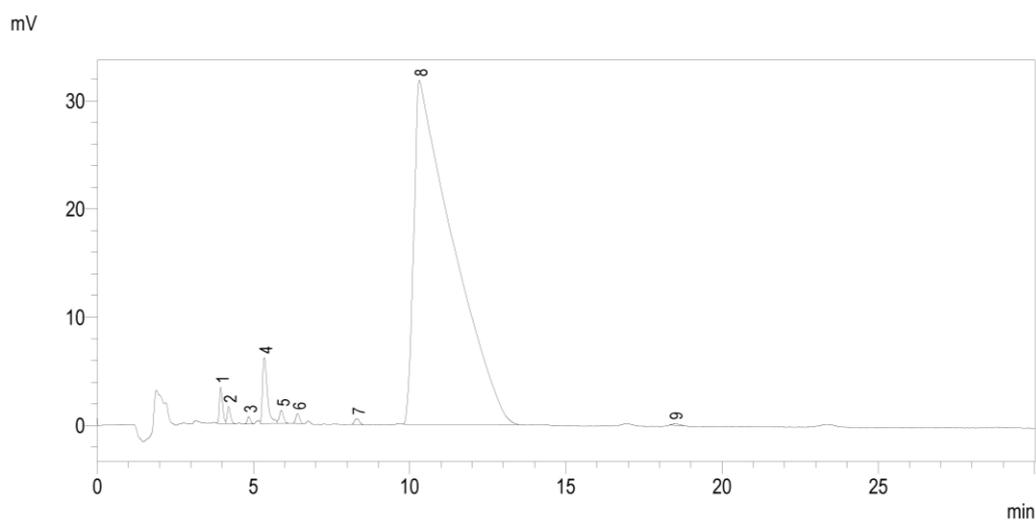
3. HPLC chromatogram of representative compounds

HPLC chromatogram of **4**



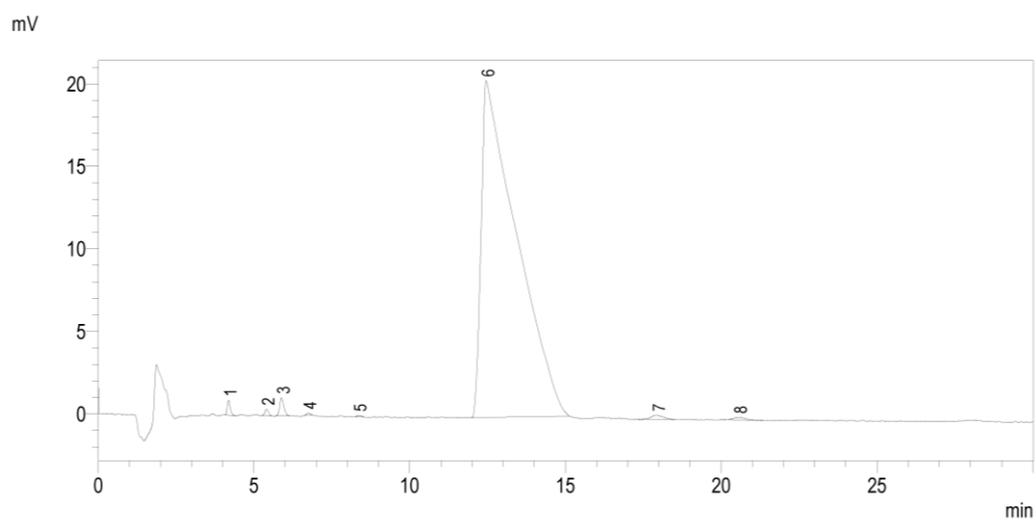
| Peak | Retention time (min) | Area (mAu*s) | % Area |
|-------|----------------------|--------------|--------|
| 1 | 4.69 | 2640 | 0.307 |
| 2 | 6.18 | 11490 | 1.34 |
| 3 | 6.76 | 5498 | 0.640 |
| 4 | 10.4 | 5033 | 0.586 |
| 5 | 11.0 | 2278 | 0.265 |
| 6 | 12.5 | 827374 | 96.3 |
| 7 | 22.0 | 4710 | 0.548 |
| total | | 859024 | 100 |

HPLC chromatogram of 5



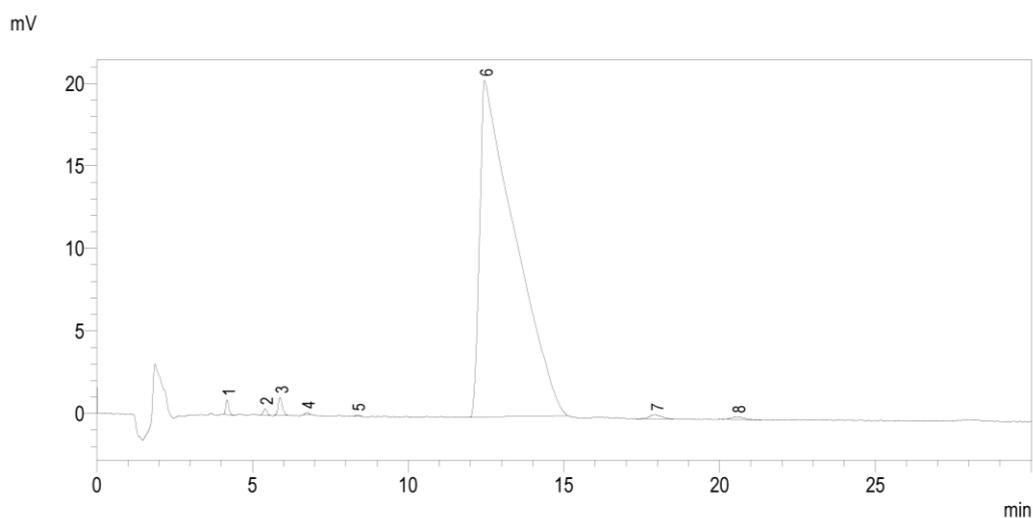
| Peak | Retention time (min) | Area (mAu*s) | % Area |
|-------|----------------------|--------------|--------|
| 1 | 3.96 | 22764 | 0.786 |
| 2 | 4.21 | 11654 | 0.403 |
| 3 | 4.85 | 4404 | 0.152 |
| 4 | 5.35 | 63817 | 2.20 |
| 5 | 5.90 | 10776 | 0.372 |
| 6 | 6.41 | 7628 | 0.263 |
| 7 | 8.31 | 5841 | 0.202 |
| 8 | 10.3 | 2765781 | 95.5 |
| 9 | 18.5 | 2566 | 0.089 |
| total | | 2895231 | 100 |

HPLC chromatogram of 10



| Peak | Retention time (min) | Area (mAu*s) | % Area |
|-------|----------------------|--------------|--------|
| 1 | 4.19 | 6123 | 0.374 |
| 2 | 5.41 | 3074 | 0.188 |
| 3 | 5.89 | 10199 | 0.623 |
| 4 | 6.75 | 1091 | 0.067 |
| 5 | 8.35 | 960 | 0.059 |
| 6 | 12.5 | 1603537 | 97.8 |
| 7 | 17.9 | 7293 | 0.446 |
| 8 | 20.6 | 4432 | 0.271 |
| total | | 1636710 | 100 |

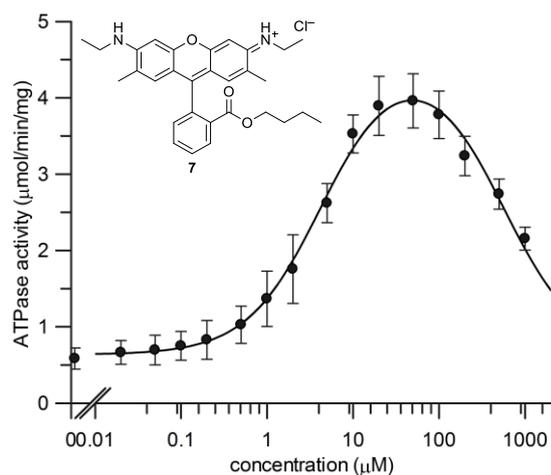
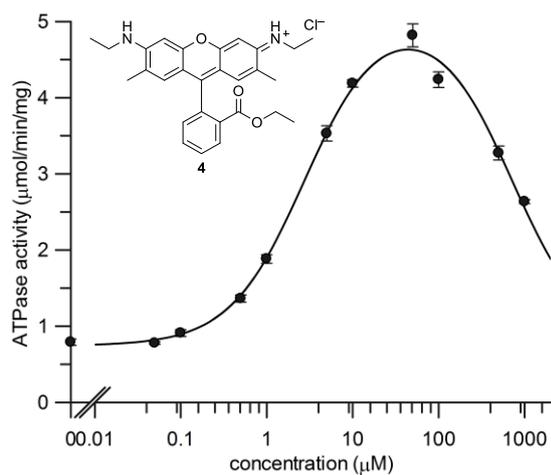
HPLC chromatogram of 12

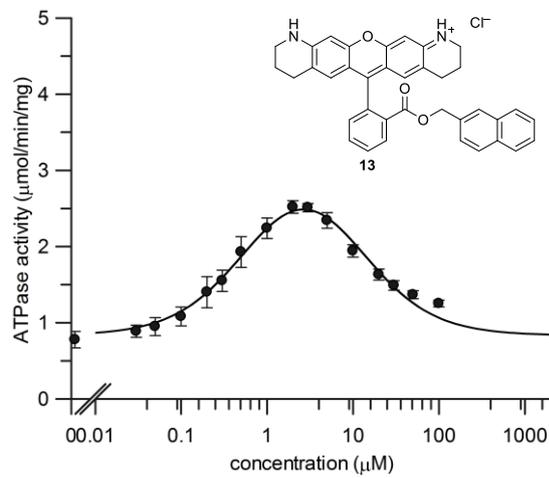
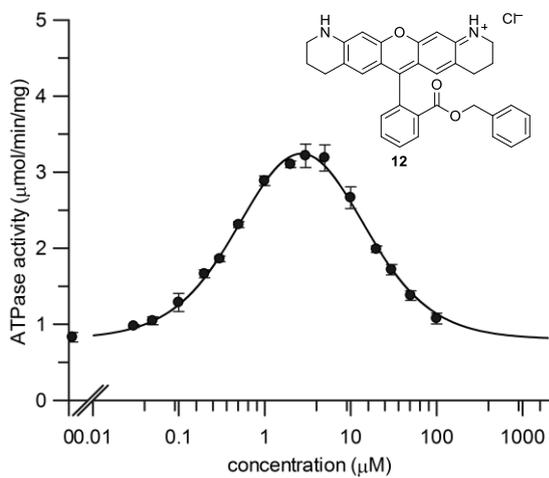
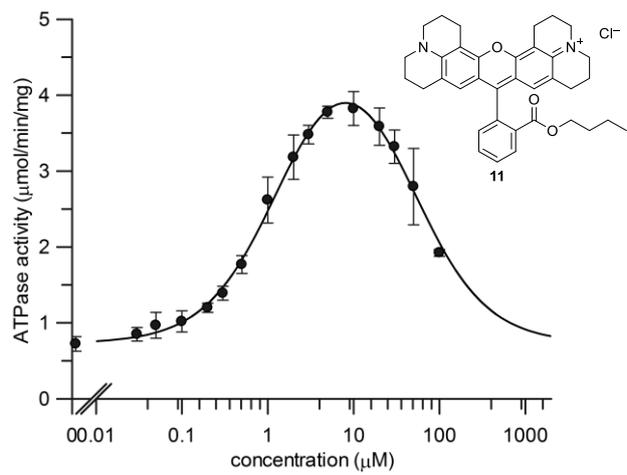
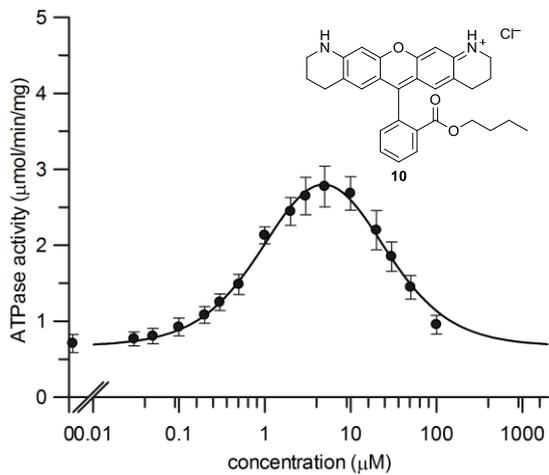
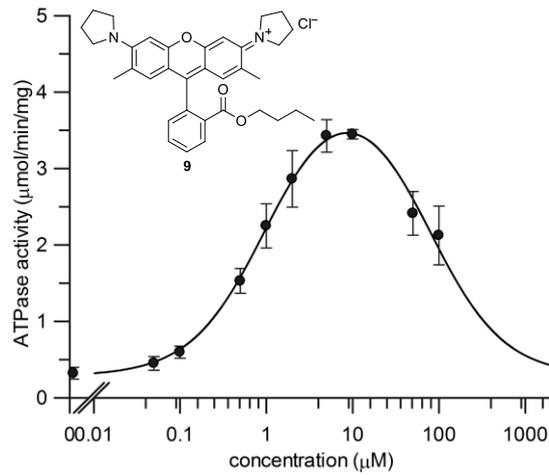
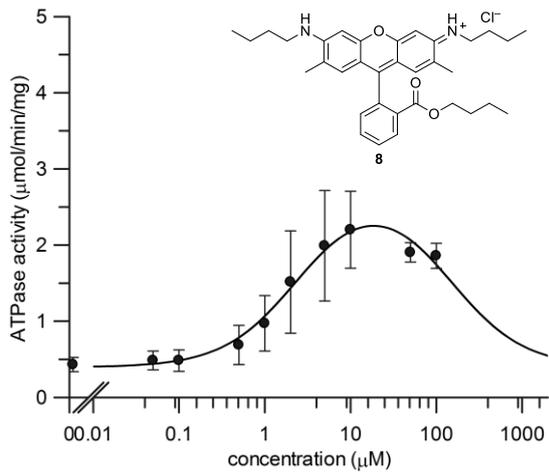


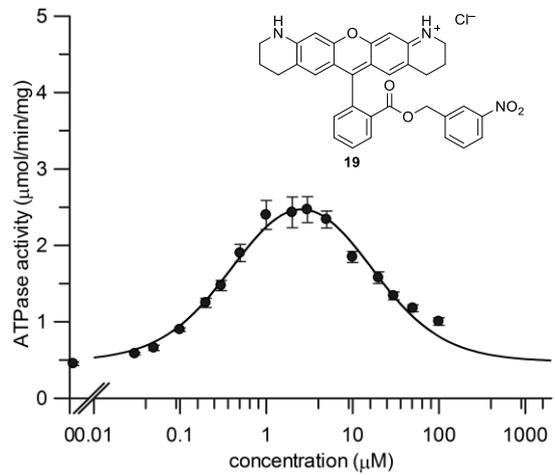
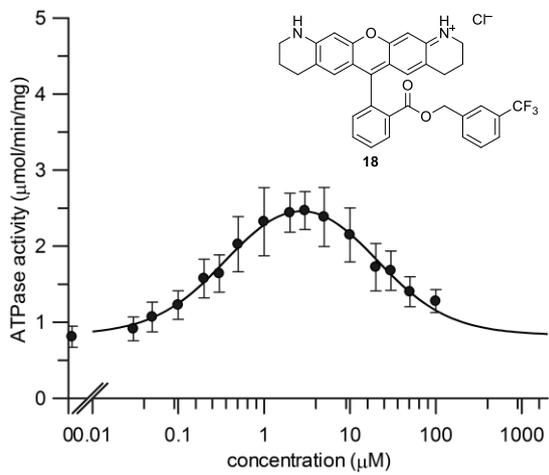
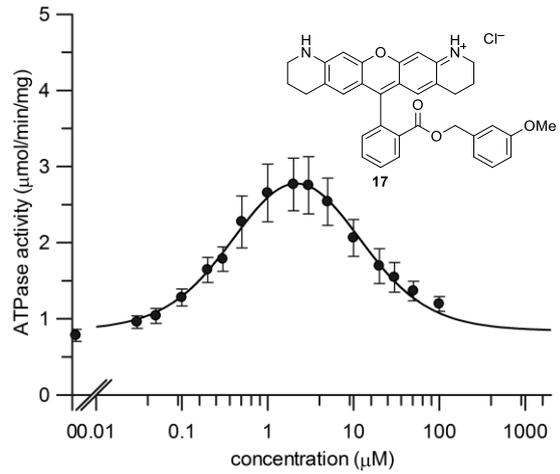
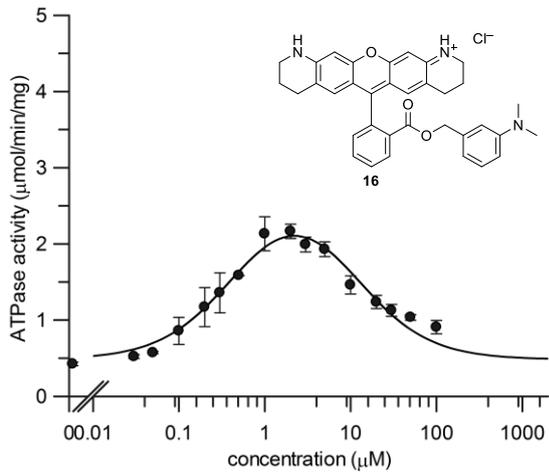
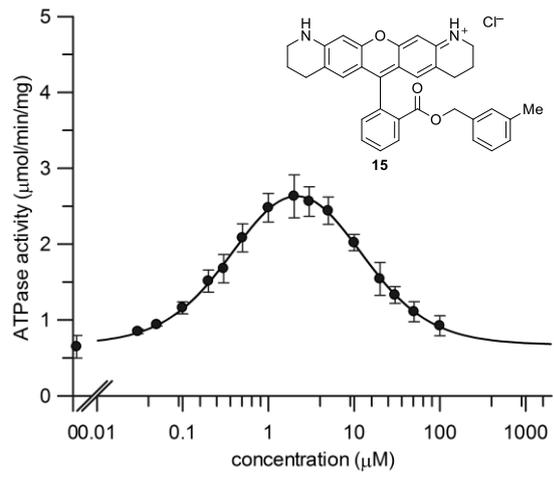
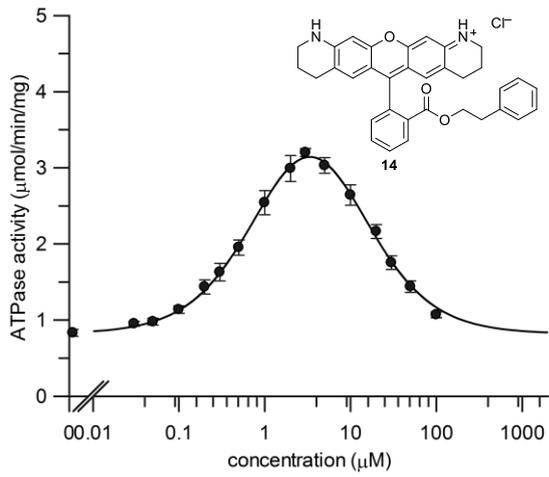
| Peak | Retention time (min) | Area (mAu*s) | % Area |
|-------|----------------------|--------------|--------|
| 1 | 3.93 | 13460 | 0.672 |
| 2 | 4.17 | 4083 | 0.204 |
| 3 | 5.05 | 4297 | 0.215 |
| 4 | 5.61 | 19048 | 0.951 |
| 5 | 6.22 | 2707 | 0.135 |
| 6 | 6.66 | 2823 | 0.141 |
| 7 | 11.6 | 1952674 | 97.5 |
| 8 | 17.2 | 3499 | 0.175 |
| total | | 859024 | 100 |

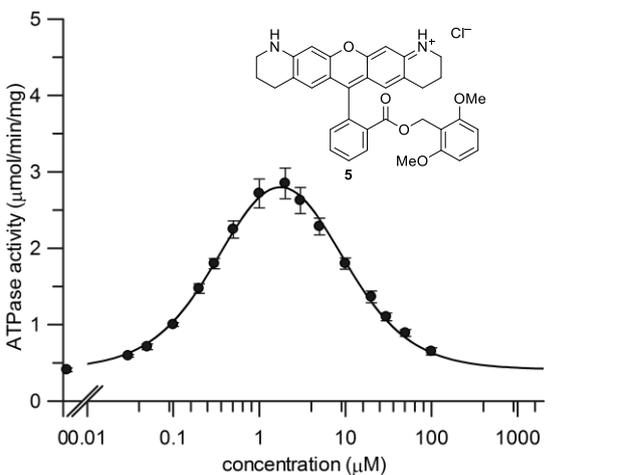
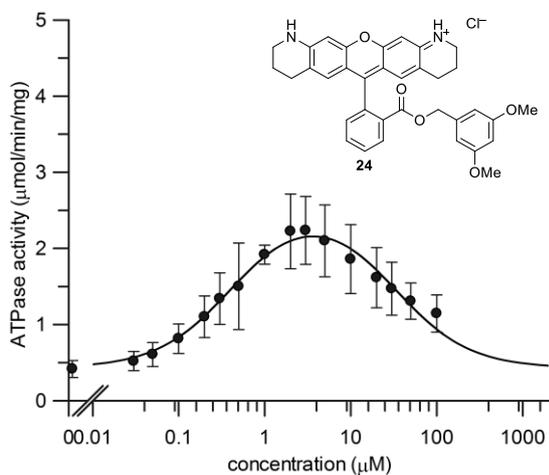
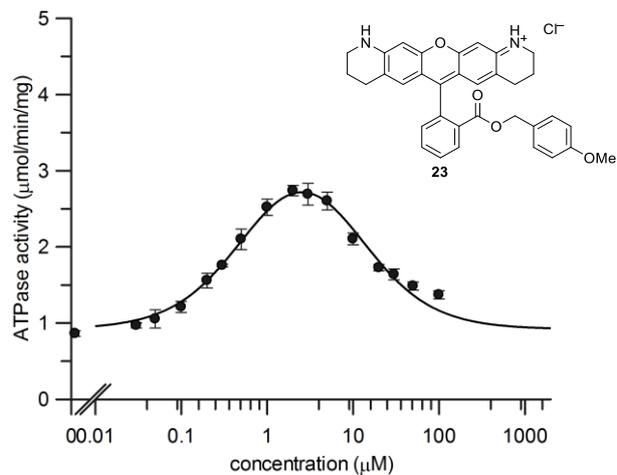
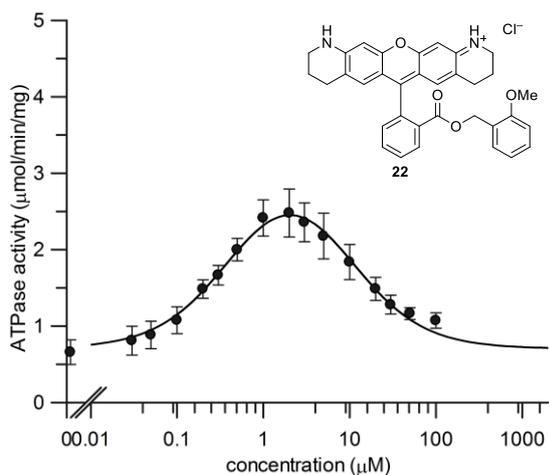
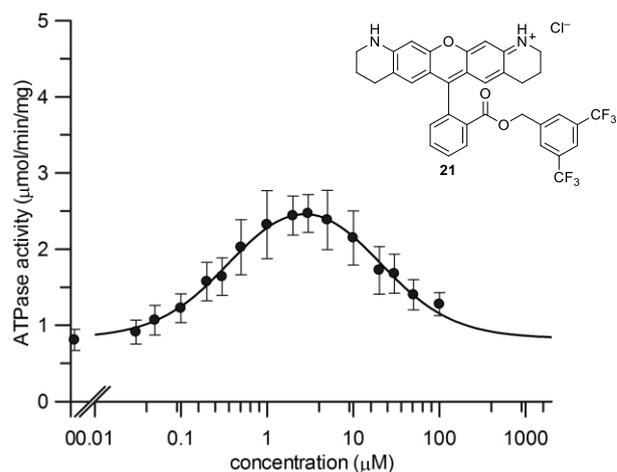
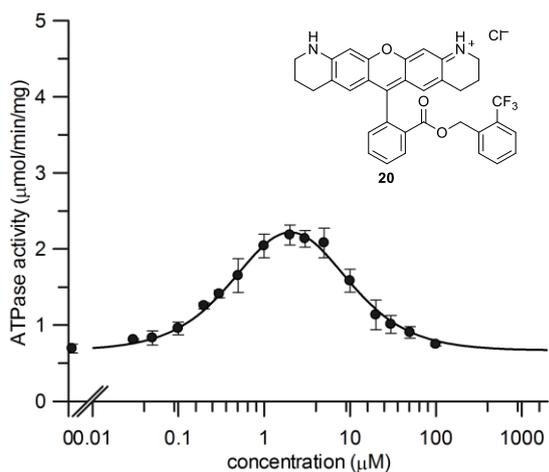
4. ATPase assay results

The graph of the ATPase assay of the given substrate is depicted at the top. Data were obtained from three independent repeats with 16 different substrate concentration except 4, 8, 9. Data of 4 was obtained from three independent repeats with 11 different substrate concentration, 8 was obtained from three independent repeats with 10 different substrate concentration and 9 was obtained from four independent repeats with 10 different substrate concentration.









Reference

1. Inoue, Y.; Yamaguchi, T.; Otsuka, T.; Utsunomiya, Y.; Pan, D.; Ogawa, H.; Kato, H. *Protein Sci.* **2022**, *31*, e4331.
2. Kodan, A.; Yamaguchi, T.; Nakatsu, T.; Sakiyama, K.; Hipolito, C. J.; Fuhioka, A.; Hirokane, R.; Ikeguchi, K.; Watanabe, B.; Hiratake, J.; Kimura, Y.; Suga, H.; Ueda, K.; Kato, H. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 4049–4054.
3. Chifflet, S.; Torriglia, A.; Chiesa, R.; Tolosa, S. *Anal. Biochem.* 1988, *168*, 1–4.
4. Al-Shawi, M. K.; Polar, M. K.; Omote, H.; Figler, R. A. *J. Biol. Chem.* 2003, *278*, 52629–52640.
5. Sato, T.; Kodan, A.; Kimura, Y.; Ueda, K.; Nakatsu, T.; Kato, H. *FEBS J.* 2009, *276*, 3504–3516.
6. Pauff, S. M.; Miller, S. C. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 6196–6199.

7. Zhang, R.; Peterson, J. P.; Fischer, L. J.; Ellern, A.; Winter, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 14308–14313.
8. Chen, X.; Nam, S.-W.; Jou, M. J.; Kim, Y.; Kim, S.-J.; Park, S.; Yoon, J. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5235–5238.
9. Boyarskiy, V. P.; Belov, V. N.; Medda, R.; Hein, B.; Bossi, M.; Hell, S. W. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1784–1792.

謝辞

本研究は京都大学大学院薬学研究科薬品合成化学分野において、高須清誠教授の御指導の下で行われたものであり、ここに心より厚く御礼申し上げます。

学部生時代に研究室に配属されて以降、7年間にわたり直接ご指導を賜りました瀧川紘先生（京都大学大学院薬学研究科・准教授）に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり折に触れて有意義なご助言、ご協力を賜りました、山岡庸介先生（現兵庫医科大学大学院薬学研究科・講師）、黒田悠介先生（京都大学大学院薬学研究科・特任助教）、高山亜紀先生（京都大学大学院薬学研究科・助教）に深く感謝申し上げます。

第二章の研究の遂行にあたり、加藤博章先生には有意義なご助言、ご協力を賜りました。また、本学位論文の査読をしていただきました。ここに心より感謝申し上げます。また、研究を遂行するにあたって、実験手技の直接のご指導、及びタンパク質等のご提供をいただきました、山口知宏博士、松岡敬太博士、井上善貴氏、水沼諒修士に深く感謝申し上げます。

第三章、四章での研究の遂行にあたって蛍光スペクトル測定にご協力いただいた樗一典先生（京都府立大学大学院生命環境科学研究科・教授）に感謝申し上げます。その際、ご指導いただいた野田駿介修士、藤尾晋哉修士、長屋勇輝修士、酒井美里氏、宮崎貴俊氏に感謝申し上げます。

第三章、四章での研究の遂行にあたって DFT 計算を行っていただきました長田裕也先生（北海道大学化学反応創成研究拠点・特任准教授）、microED での構造決定を行っていただきました朝倉克夫様（日本電子株式会社）、過渡吸収スペクトルの測定にご協力いただいた藤塚守先生（大阪大学産業科学研究所・教授）、小阪田泰子先生（大阪大学産業科学研究所・准教授）、中川達夫博士（株式会社ユニソク）、鈴木利明博士（株式会社ユニソク）、川端利幸様（株式会社ユニソク）、CPL スペクトル測定にご協力いただいた灰野岳晴先生（広

島大学大学院先進理工系科学研究科・教授)、関谷亮先生(広島大学大学院先進理工系科学研究科・准教授)、中西康夫様(ジャスコエンジニアリング株式会社)に深く感謝申し上げます。

本学位論文の査読をしていただきました、大野浩章先生に深く感謝申し上げます。

水谷大地氏と河本真輝氏には第三章及び第四章で研究の遂行に際して多大なご協力をいただきました。ここに厚く御礼申し上げます。

本研究成果の一部は国立研究開発法人科学技術振興機構の京都大学大学院教育支援機構プログラム(SPRING)の援助のもと達成されたものです。また、藤多仁生奨学金の援助もいただきました。故藤多仁生先生及びご遺族、ご関係者の方々に深く感謝申し上げます。

2024年 三和空知