



Title	生体内アミンに対するアクロレインの新規な反応性と酸化ストレス疾患診断への応用
Author(s)	高松, 正之
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/61504">https://doi.org/10.18910/61504</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

# 博士學位論文

生体内アミンに対するアクロレインの新規な反応性と  
酸化ストレス疾患診断への応用

平成29年 2月 1日

専攻名 化学専攻

氏名 高松 正之

大阪大学大学院理学研究科



略語表

略号	正式名称 (英名)	和名
Ac	Acetyl	アセチル
Allyl	2-propenyl	アリル
Bn	Benzyl	ベンジル
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl	<i>tert</i> -ブトキシカルボニル
Bu	Butyl	ブチル
Bz	Benzoyl	ベンゾイル
cat.	catalyst	触媒
CDP	Cytidine diphosphate	シチジン二リン酸
CL	cardiolipin	カルジオリピン
Cp	cyclopropane	シクロプロパン
DAG	diacylglycerol	ジアシルグリセロール
DCC	dicyclohexylcarbodiimide	ジシクロヘキシルカルボジイミド
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone	ジクロロジシアノベンゾキノン
DIPEA	Diisopropylethylamine	ジイソプロピルエチルアミン
DMAP	4-dimethylaminopyridine	4-ジメチルアミノピリジン
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide	<i>N,N</i> -ジメチルホルムアミド
DMSO	Dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DNA	Deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	(酵素結合免疫吸着法)
ESI	Electrospray ionization	電子スプレーイオン化法
Et	Ethyl	エチル
Et <sub>3</sub> N	Triethylamine	トリエチルアミン
FDP	3-formyl-3,4-dehydropiperidine	3-ホルミル-3,4-デヒドロピペリジン
Fmoc	9-fluorenylmethyloxycarbonyl	9-フルオレニルメチルオキシカルボニル
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol	ヘキサフルオロ-2-プロパノール
HPLC	high-performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
<i>i</i> Pr	isopropyl	イソプロピル

MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization	マトリックス支援レーザー脱離イオン化法
<i>m</i> CPBA	<i>meta</i> -chloroperbenzoic acid	4-クロロ安息香酸
Me	Methyl	メチル
MeOH	Methanol	メタノール
MP	Methylpyridinium salt	メチルピリジニウム塩
MS	Mass spectrometry	質量分析法
MS4A	Molecular sieves 4A	モレキュラーシーブス 4A
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
NMR	Nuclear magnetic resonance	核磁気共鳴
pH	potential Hydrogen	水素イオン指数
Ph	phenyl	フェニル
PC	Phosphatidyl choline	ホスファチジルコリン
PL	phospholipid	リン脂質
PMB	<i>p</i> -methoxybenzyl	パラメトキシベンジル
PPh	triphenylphosphine	トリフェニルホスフィン
r.t.	room temperature	室温
TBAF	tetrabutylammonium fluoride	フッ化テトラブチルアンモニウム
TBS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl	<i>tert</i> -ブチルジメチルシリル
TBDPS	<i>tert</i> -butyldiphenylsilyl	<i>tert</i> -ブチルジフェニルシリル
TFA	trifluoroacetic acid	トリフルオロ酢酸
THF	tetrahydrofuran	テトラヒドロフラン
TLC	thin layer chromatography	薄層クロマトグラフィー
TMS	Trimethylsilyl	トリメチルシリル
TOF	Time of flight	飛行時間型
pyr	pyridine	ピリジン
<i>p</i> -TsOH	<i>p</i> -toluenesulfonic acid	<i>p</i> -トルエンスルホン酸
WSCD	water solved carbodiimide	水溶性カルボジイミド

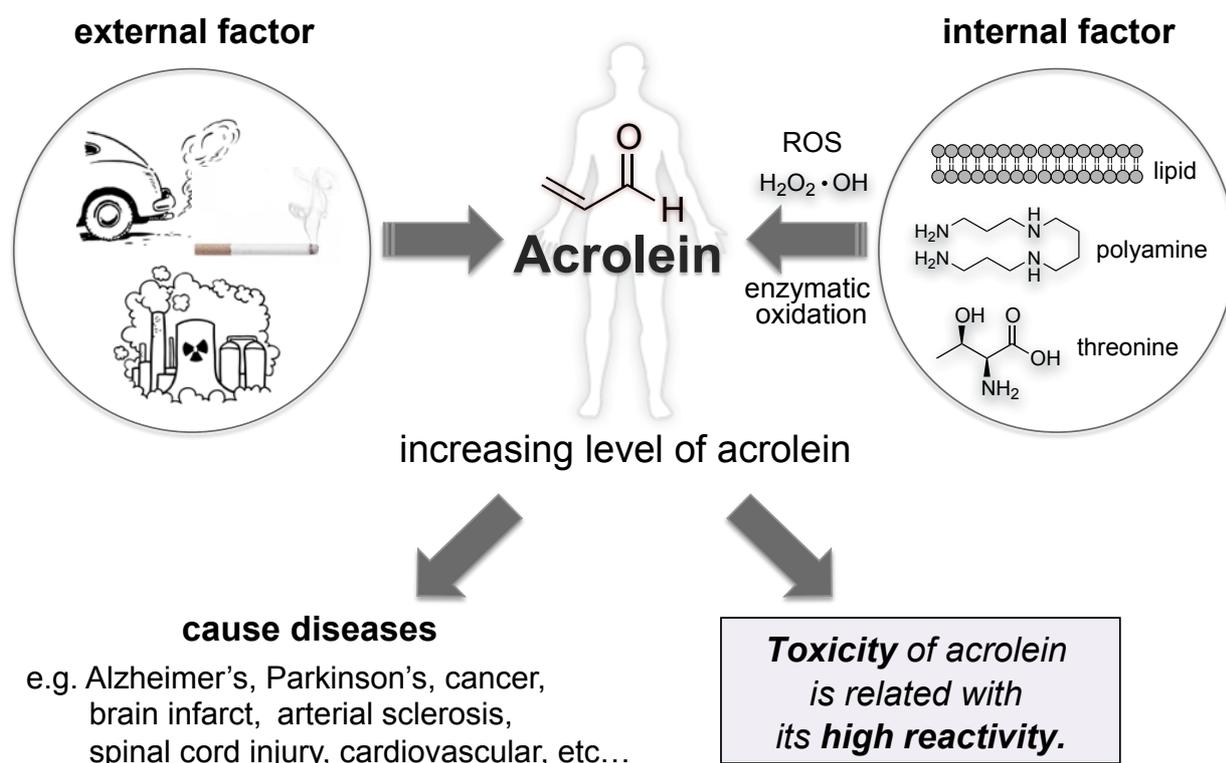


## 目次

第一章 序論：アクロレインと酸化ストレス疾患	6
第二章 アクロレインとアミンの反応	13
2-1 アクロレインと生体アミノアルコールの反応	
2-2 8員環からFDPへの変換	
2-3 小括	
第三章 酸化ストレスマーカーFDPを利用した有機還元反応	23
3-1 酸化的芳香族化と酸化還元反応	
3-2 FDPの還元反応	
3-3 ワンポット還元反応	
3-4 小括	
第四章 生体FDPの蛍光検出法開発	31
4-1 FDP検出法	
4-2 FDP検出プローブ	
4-3 生体サンプルのFDP検出試験	
4-4 小括	
総括	
付録	
謝辞	
実験項	
参考文献	

## 第一章 序論：アクロレインと酸化ストレス疾患

有機物（油脂、木炭、材木、樹脂製品等）の燃焼やタバコの煙等から発生する不飽和アルデヒドのアクロレインは、非常に高い毒性を有している（F i g. 1-1）<sup>1,2</sup>。アクロレインは、生体内に存在する脂質類、ポリアミン、アミノ酸等の生体分子からも産生する<sup>3-6</sup>。たとえば、活性酸素種等の発生した酸化ストレス条件下において、不飽和脂肪酸（リノール酸やリノレン酸等）を有する脂質に対して酸化および開裂反応が進行し、アクロレインを産生する。また、細胞内のモノアミン酸化酵素によってポリアミンの酸化が進行し、加水分解を経てアクロレインが発生する。そして、アクロレインの生体濃度が上昇すると、後述のような種々の生体システムの異常・疾患等を引き起こすと考えられている。その病理解明には、アクロレインと様々な酸化ストレス疾患との関係性を分子レベルで理解することが重要となる。



F i g. 1-1 アクロレインの発生とその毒性

アクロレインは、その小さな分子構造（C3ユニット）の中にアルデヒド基および共役アルケンといった複数の求電子官能基を有している。そのため、非常に高い化学反応性を示し、様々な生体基質と反応することが知られている<sup>7,8</sup>（F i g. 1-2）。たとえば、タンパク質を構成するアミノ酸の一つであるアルギニンと反応した際には、そのグアニジン基が反応し、6員環の付加体を生成する。同様に、アミノ酸のシステインとはチオール基を介して共役付加体を形成する。また、リジンとの反応では後述のFDPを与える。さらに、タンパク質以外でも、デオキシリボ核酸（DNA）に含まれる核酸塩基部位と反応した際には、アルギニンと同様の環状付加体を与える。これらのアルキル化反応の他にも、アクロレインを介した生体分子同士（タンパク質および核酸等）のクロスリンク（架橋化）を促進すること等が考えられる。

### Acrolein: Mechanism of toxicity

- Protein adduction

- DNA adduction

- Protein / DNA crosslinking

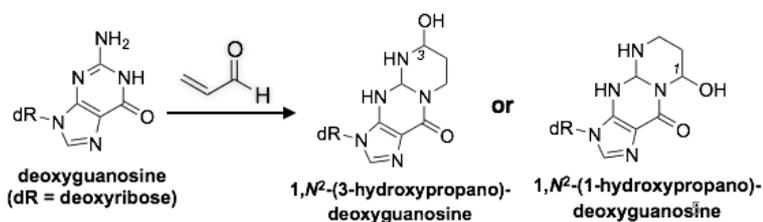
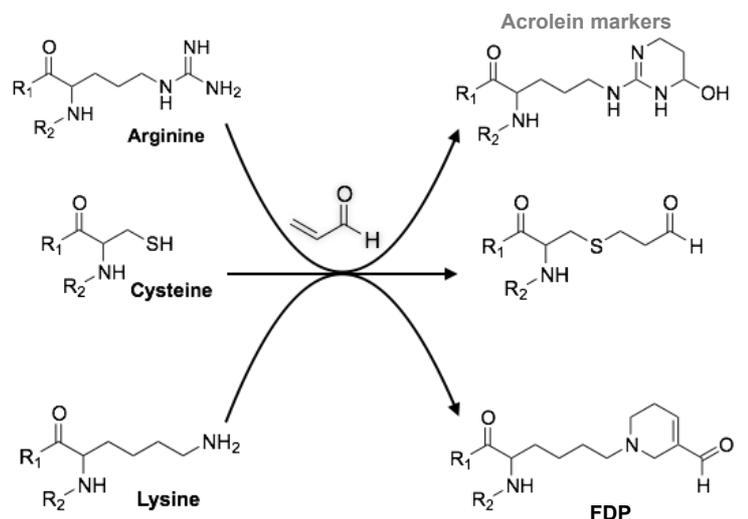
- Increasing oxidative stress level

- Inflammation and immune alteration

- Mitochondrial disruption

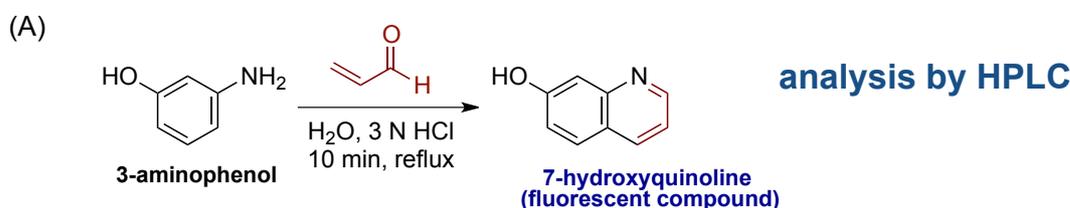
- Membrane damage

- Endoplasmic reticulum stress



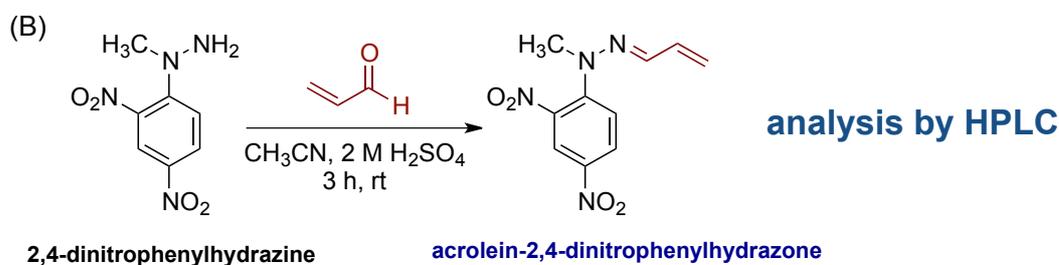
F i g. 1-2 アクロレインと生体分子の反応物

アクロレインは、前述の高い反応性をきっかけとして、生体分子の本来の機能を阻害し、種々の生体機能の異常を引き起こすと考えられている<sup>9-11</sup>。たとえば、アルツハイマー病、パーキンソン病、がん、脳梗塞・心筋梗塞、動脈硬化等の発症にアクロレインが関連していると示唆されている<sup>12-27</sup>。それゆえ、アクロレインの生体蓄積量は、酸化ストレス疾患の発症・進行度を理解し、治療へとつなげるための重要な指標になる<sup>28-32</sup>。これまで、生体組織上の酸化ストレスマーカーとしてアクロレインに着目した研究は、とりわけ検出法を中心として発展してきた。特に、アクロレインの生理学的な濃度を明らかにする研究に関して、いくつかのグループによって精力的に行われてきた<sup>33, 34</sup>。古くからアクロレインの検出は、求核付加による3-アミノフェノールから7-ヒドロキシキノリンへの変換反応が利用されてきた (F i g. 1-3 A)<sup>35, 36</sup>。また同様に、2, 4-ジニトロフェニルヒドラジンを用いた誘導化も用いられてきた<sup>37, 38</sup> (F i g. 1-3 B)。これらの手法はいずれも、反応させた後に高速液体クロマトグラフィー (H P L C) を用いて吸光測定もしくは蛍光測定を行い、アクロレイン量を算出する。しかし、高温で強酸を使用するといった厳しい反応条件であること、また、他のアルデヒド共存下でのアクロレインに対する選択性 (化学直交性) の低さ等が課題として挙げられる。



(1) Alarcon, R. A. *Anal. Chem.* **1968**, *40*, 1704.

(2) Kroemer, H. K.; et. al. *J. Chromatogram. B Biomed. Sci. Appl.* **1997**, *692*, 163.

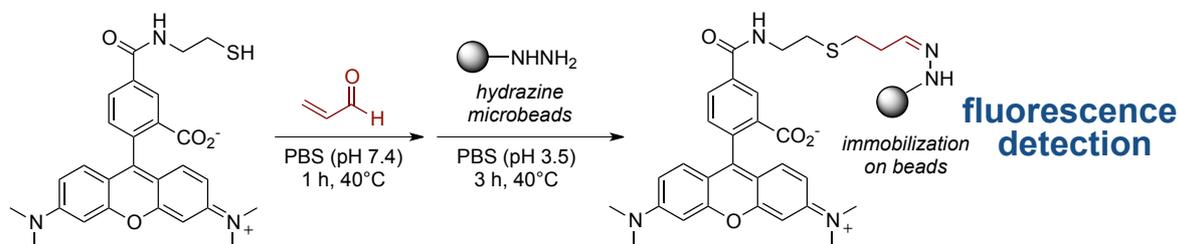


(1) Boor, P. J.; Ansari, G. A. S. *J. Chromatogr.* **1986**, *375*, 159.

(2) Büldt, A.; Karst, U. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3617.

F i g. 1-3 アクロレインの直接的な検出法 I

上記のような高速液体クロマトグラフィーを用いずに、高精度かつ高効率な測定方法として、固相担体を用いる手法も開発されてきた (F i g. 1-4)<sup>39</sup>。その中では、調製した蛍光基を有するチオール分子プローブ、ヒドラジン部位を有するマイクロビーズを順次反応させ、精製後に蛍光測定によってアクロレイン量を算出する。

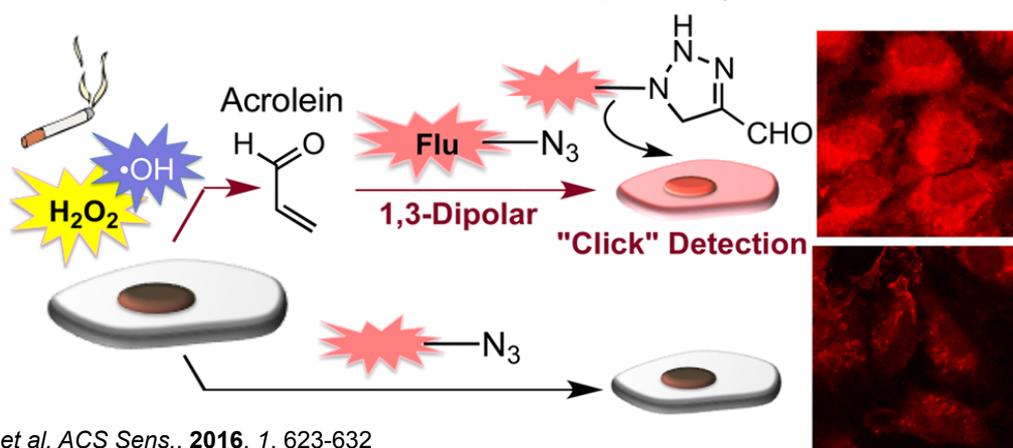


Togashi, M.; Urano, Y.; Nagano, T.; et.al. *Chem. Commun.* **2014**, 50, 14946.

F i g. 1-4 アクロレインの直接的な検出法 2

また、これまでに我々のグループでも、独自に見出したアクロレインとアジドのクリック反応を用いて、アクロレインの検出を行ってきた (F i g. 1-5)<sup>40</sup>。反応生成物であるクリック体の見かけ膜透過性の高さを利用し、酸化ストレス条件としてタバコ煙や過酸化水素等を用いて意図的に刺激を与えたがん細胞に対して、蛍光アジドプローブを作用させ、がん細胞上のアクロレインのイメージングに成功している。これにより、HPLCを必要とせず、生細胞のアクロレインレベルをそのまま評価できる手法を開発した。

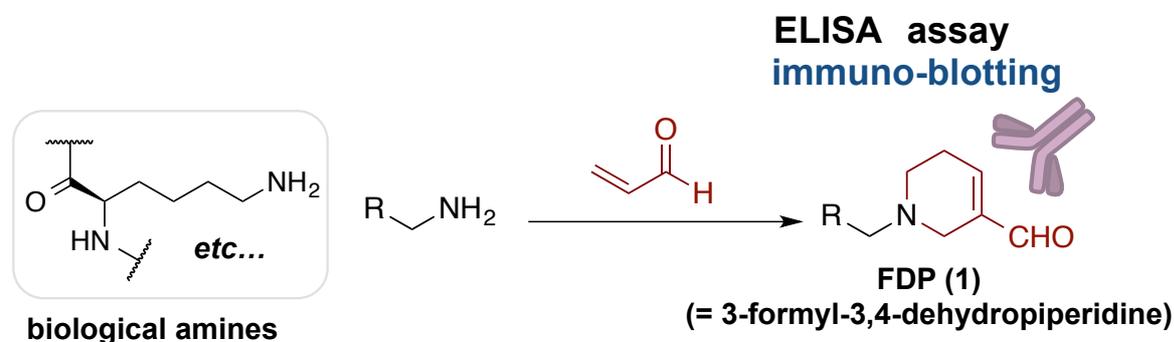
**Previous our work**



Pradipta, A. R. et al. *ACS Sens.*, **2016**, 1, 623-632

F i g. 1-5 アクロレインの直接的な検出法 3

一方、生体サンプル測定では、アクロレインと生体分子の付加化合物を評価する手法が用いられている。その代表例として、名古屋大学の内田浩二博士のグループが、アクロレインと生体に豊富に存在するアミン類(特にタンパク質リジン)の反応物について報告している。その中では、酸化ストレスマーカーとして3-ホルミル-3,4-デヒドロピペリジン(FDP) 1の生成が報告されている<sup>7</sup>(Fig. 1-6)。近年では、同グループが、タンパク質上のFDP構造を認識するモノクローナル抗体を作成し、タカラバイオ株式会社と共同してELISA-KITを市販化した<sup>41-44</sup>。バイオマーカーとしてのFDP検出はアクロレインの生体濃度を間接的に指し示す手法として非常に優れており、動脈硬化<sup>12-14</sup>、アルツハイマー病<sup>15,16</sup>、がん<sup>17-20</sup>、糖尿病<sup>21-24</sup>、自己免疫疾患<sup>25,26</sup>、高血圧<sup>27</sup>をはじめとする様々な疾患・病状<sup>45-48</sup>を査定するために使用されている。また、千葉大学の五十嵐一衛教授のグループは、産学医療ベンチャー「アミンファーマ」を設立し、このFDP抗体検出法と他のバイオマーカー評価法を組み合わせた「かくれ脳梗塞」診断法を実施している。このように、酸化ストレス疾患研究において、アクロレインおよびその酸化ストレスマーカーに注目が集まりつつある。



(1) Uchida, K.; et. al. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 16058.

(2) Uchida, K.; et. al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95, 4882.

Fig. 1-6 アクロレイン-アミン付加体FDPに対する抗体検出

一方、我々のグループも、不飽和アルデヒドとアミン類の化学反応性に関して研究を進めてきた<sup>49-54</sup>。その中で、アクロレインがアミン類と速やかに反応し、新奇な形式的イミノ[4+4]環化を経て、8員環を与える反応を報告している<sup>55-58</sup>(Fig. 1-7)。本反応では、

アクロレインとアミノアルコール (例えば、アミノインダノール **2**) を反応させた場合には、共役イミンを経由し、その分子内の水酸基の活性化効果によって、窒素から共役イミン上のβ炭素への求核付加が促進され、2分子間反応が速やかに進行する。その後、アминаールを含む縮環構造を有した8員環化合物 **3** を与える。また同様に、求核性の高いベンジルアミン **4** を反応させた場合にも、同様に2分子の共役イミンが、水酸基の代わりに余剰のアミンに活性化されることで環化付加が進行する。その結果、架橋型の8員環化合物 **5** を与えることを既に見出している。

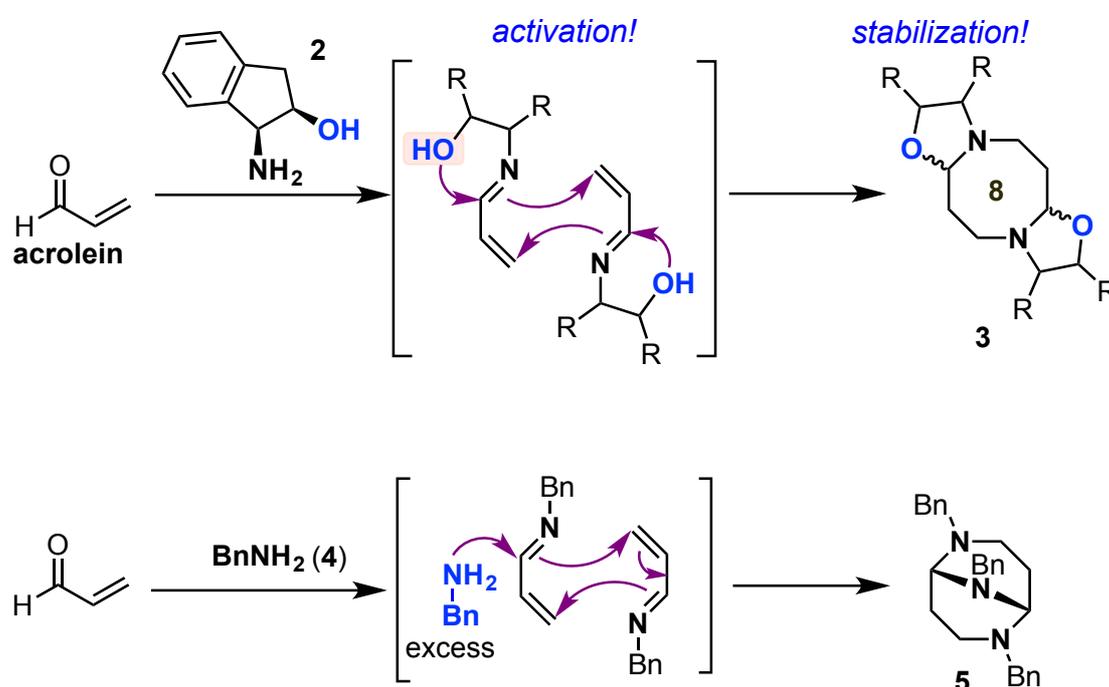


Fig. 1-7 形式的イミノ [4+4] 環化

このように、ほぼ同様の反応条件で、FDPと8員環という異なる生成物が報告されていることに大きな関心を抱いた。そして、フラスコ内で [4+4] 反応を進行させたアミノアルコールは、生体分子に普遍的に共通している。そこで、生体アミンも実際に生体内で [4+4] 反応を起こしているのではないかと想起した (Fig. 1-8)。そこで、生体内に数多く存在している反応基質のアミン類、その中でもアクロレインとの反応性が未だ調べられていない生体由来のアミノアルコールを用いて、化学的な検証実験を行うことを計画した。

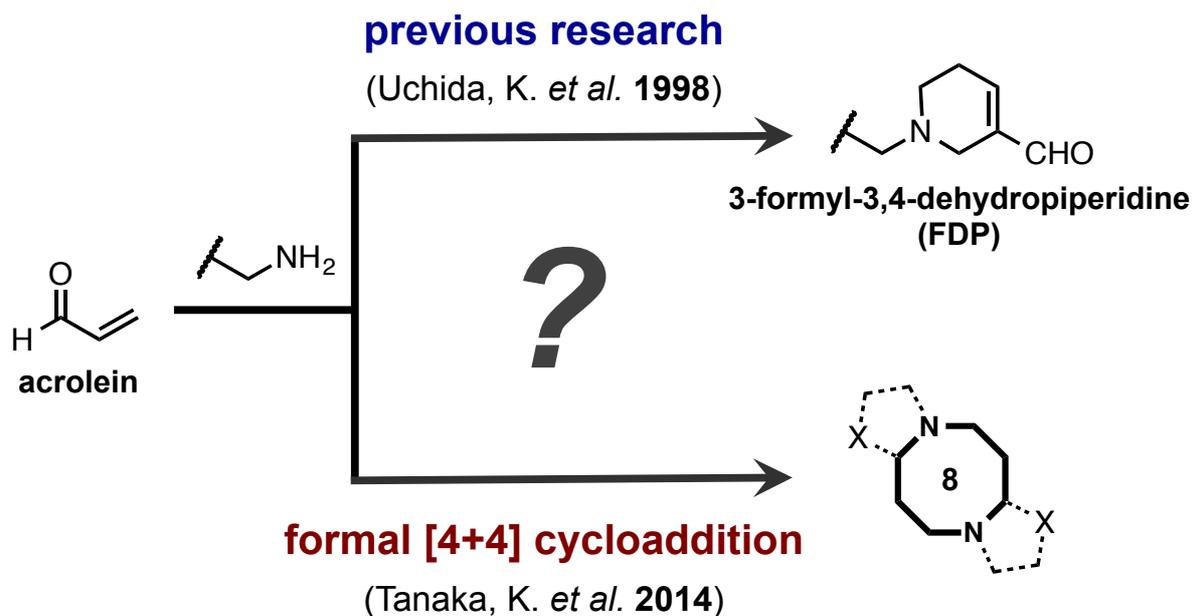


Fig. 1-8 アクロレインとアミンの反応生成物

本研究では、はじめにアクロレインと生体分子種、特にアミン類との反応を実験的に検証し、8員環化合物の生体内での存在可能性を実証した (Fig. 1-9 上)。さらに、8員環に関する研究を進める中で、アクロレイン付加体 FDP の生成機構を明らかにした。そして同時に、FDP の分子構造から化学反応性を予測し、FDP の新規な還元反応性を見出した (Fig. 1-9 中)。また、この還元反応を有機化学的に展開し、簡便なワンポット還元法の開発につなげた。さらに、生体に存在する FDP を還元剤として活用して、従来の抗体検出法に代わる、生体 FDP の蛍光検出法へと発展させた。これらの経緯・成果について詳細に報告する (Fig. 1-9 下)。

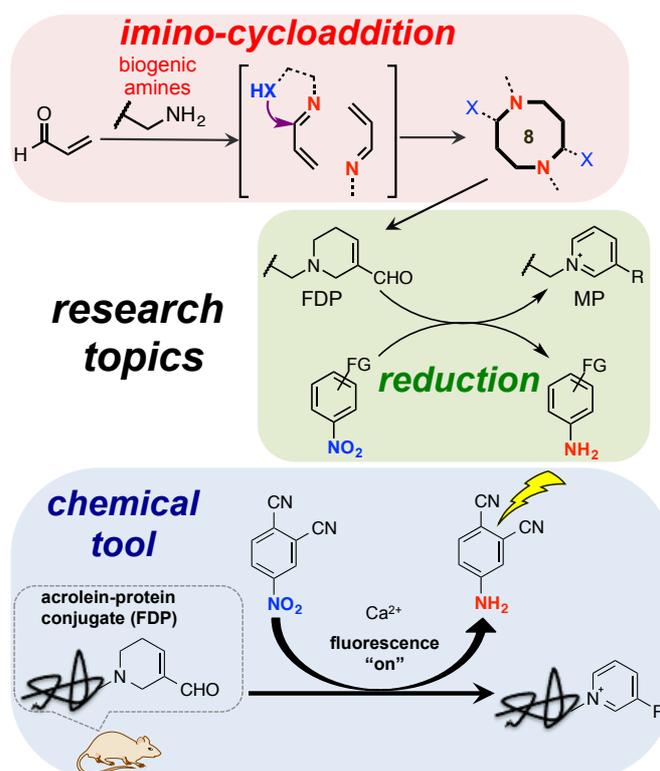
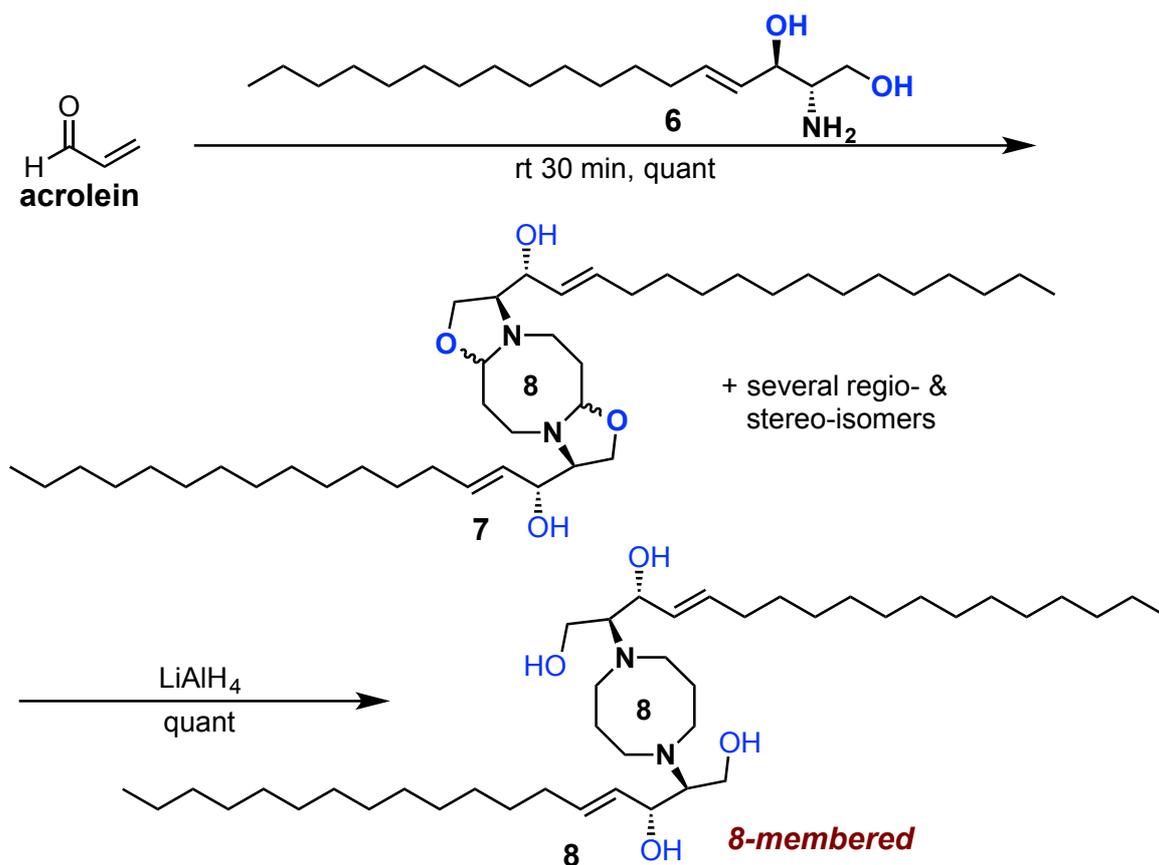


Fig. 1-9 本研究の概略図

## 第二章 アクロレインとアミンの反応

### 2-1 アクロレインと生体アミノアルコールの反応

序論で述べたように、我々のグループの研究で、生体分子によく似たアミンが [4 + 4] 反応を起こすことを明らかにした。もしアクロレインが生体内で発生した際に、近傍にアミンが存在していれば、アクロレインと生体アミンが [4 + 4] 反応を引き起こすのではないかと想起した。そこで、アクロレインと生体内に数多く存在しているアミノアルコールを用いて、化学的な検証実験を計画した。まず、生体アミンとして、長鎖アミノアルコールであるスフィンゴシンを用いて検証することとした (Fig. 2-1)。スフィンゴシンは、生体脂質として豊富に脂質膜に存在し、細胞内の脂質メディエーターとしてリン酸化酵素を介して細胞分裂や免疫系等の生体機能にも関与する分子である<sup>59</sup>。前述のように、アクロレインは活性酸素種等の酸化ストレスによって脂質膜から産生するため、脂質膜に存在するスフィンゴシンがアクロレインと生体内で反応する可能性が十分に想定される。そこで、実際にアクロレインとスフィンゴシン **6** との反応を行った。その結果、アクロレインのアルデヒドおよびアルケンの消失した <sup>1</sup>H-NMRを示し、我々がこれまで報告してきたイミノ [4 + 4] 反応によって、8員環化合物 **7** が定量的に得られた。また、構造異性体混合物 **7** に対して、LiAlH<sub>4</sub>による還元を行うことで単一構造 **8** へと導き、8員環生成物を確かめた。



F i g. 2-1 アクロレインとスフィンゴシンの反応

次に、神経伝達を司るアミン種の一つであるノルアドレナリン類を用いて同様に検証することとした (F i g. 2-2)。ノルアドレナリンは、主に中枢神経にある神経細胞から分泌され、細胞膜および細胞質に存在する脂質・ポリアミンに由来するアクロレインと反応する可能性が考えられる<sup>60</sup>。はじめに、ノルアドレナリン **9 a** を反応に用いた際には、ベンゼン環上の電子供与性の水酸基によりベンジル位の酸化が起りやすく、基質が分解してしまい、反応追跡が困難であった。そこで、ベンゼン環上をすべて水素により置換したモデル化合物 **9 b** により検証することとした。その結果、前述のスフィンゴシンと同様に、8員環生成物 **1 0** が定量的に得られることがわかり、収率63%で還元体 **1 1** へと導くことで構造を確かめた。これにより、生体内のアミノアルコールによってもFDPではなく8員環化合物が得られてくることが明らかになった。このことから、生体内でイミノ [4+4] 環化反応が進行することが強く示唆された。

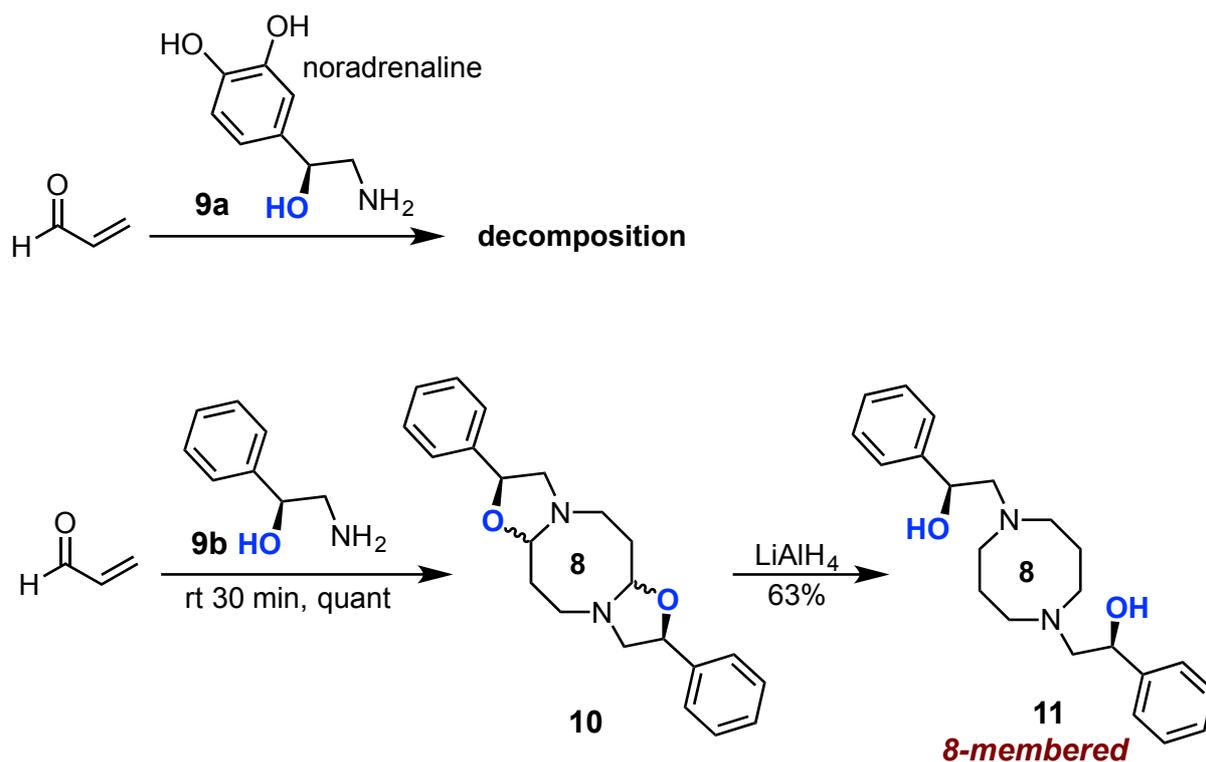


Fig. 2-2 アクロレインとノルアドレナリン誘導体の反応

では、いったいなぜ、「これまではFDPの生成が報告されていたにもかかわらず、フラスコ内による実験では8員環が観測される」のであろうか。これを強く疑問に思い、さらに追求することとした。

## 2-2 8員環からFDPへの変換

そこでさらに、生成した8員環化合物自体に関して精査したところ、興味深い知見を得ることができた (Fig. 2-3)。まず、アクロレインとベンジルアミンにより生成する8員環化合物5に着目して、詳細な機器分析を進めていった。ある日、実験台の上に放置してあった廃棄予定のサンプルを見つけ、興味本位で分析してみることにした。その結果、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) チャートが示すように (Fig. 2-3A)、上段左の架橋型の8員環化合物5のピーク ( $t = 12$  付近) が、下段右のように経時後に異なる位置のピーク ( $t = 36$  付近) に変化していることが判明した。これをHPLCによる分取、質量

分析 (MS) と核磁気共鳴 (NMR) のスペクトル測定を中心に構造解析を続けていった (Fig. 2-3 B)。数日間の解析の結果、FDPのイミン誘導体 **12a** の構造を推定できた。

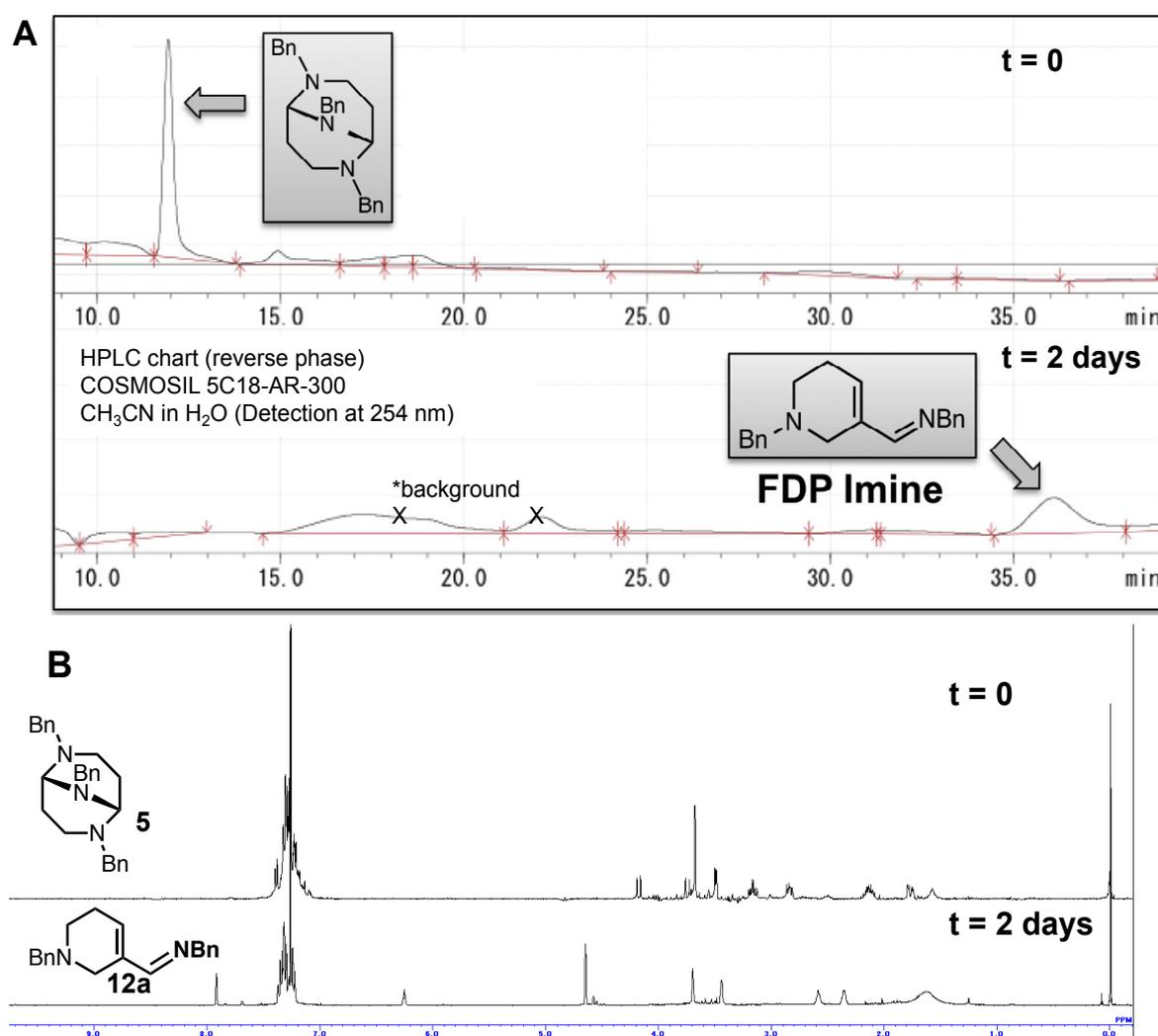
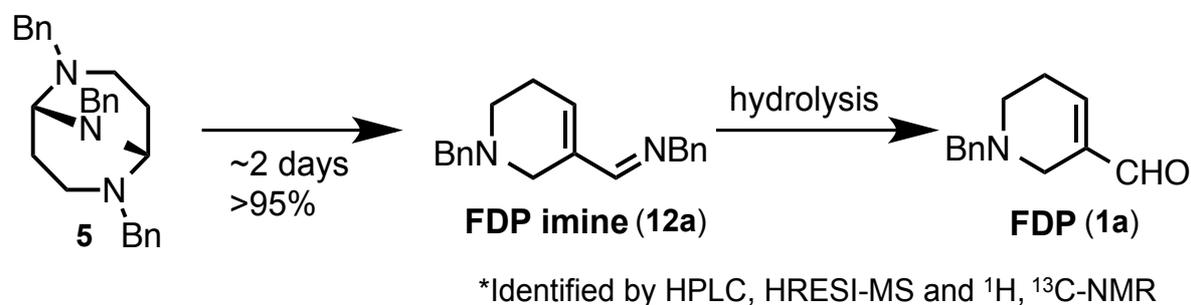


Fig. 2-3 8員環からFDP誘導体への変換、HPLCチャート (A)、 $^1\text{H}$ -NMRスペクトル (B)

前述の構造解析を確実なものとするため、別法により標品合成を行うこととした(Fig. 2-4)<sup>61</sup>。ベンジルアミンを出発原料として、炭酸カリウム存在下で2-(2-ブロモエチル)-1,3-ジオキソランを作用させ、アセタール保護体S1を定量的に得た。続いて、4N塩酸によってアセタールを除去し、ジアルデヒド体を経由後、分子内アルドール反応によってFDP1aを得た。その後、ベンジルアミンを作用させ、FDPのイミン誘導体12aを定量的に得ることができた。前述の分取品と合成標品の12aを種々のスペクトルにより比較することで、分子構造の一致を確かめた。

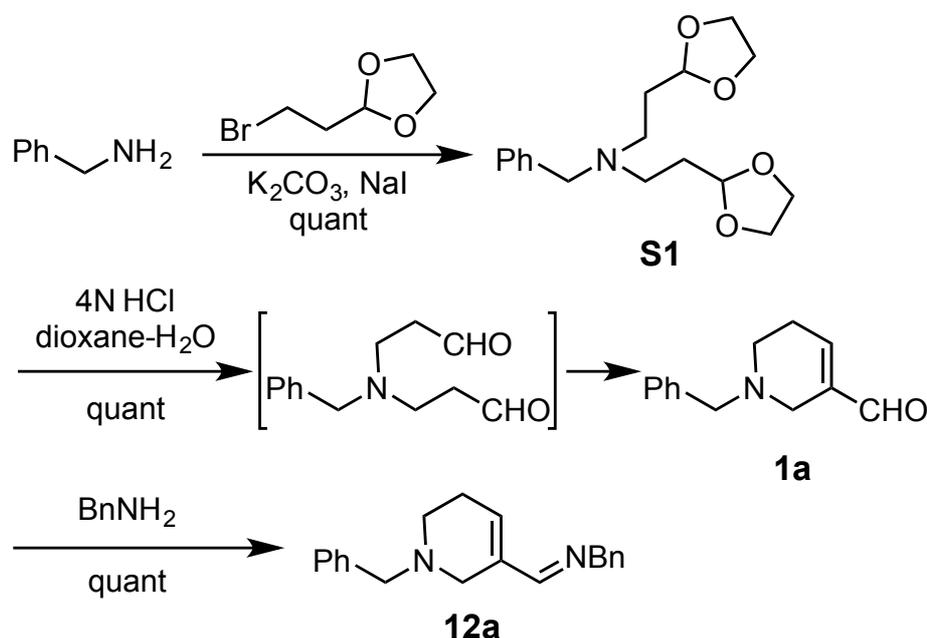


Fig. 2-4 FDPの標品合成

次に、ポリアミン由来の8員環13を調べることにした(Fig. 2-5)。その結果、8員環13において、<sup>1</sup>H-NMRスペクトルの経時変化が認められた。解析したところ、FDP構造に由来するHa(δ 9.4)およびHb(δ 7.2)のピークが経時(0-24h)と共に増加していることが判明し、24時間後に5%程度のFDP誘導体14への変換が観測された(Fig. 2-5左)。これにより、8員環化合物は、アミナル部位の安定度によって多少の差はあるものの、8員環から酸化ストレスマーカーとして知られているFDP構造へと次第に変換されていくことが明らかとなった。

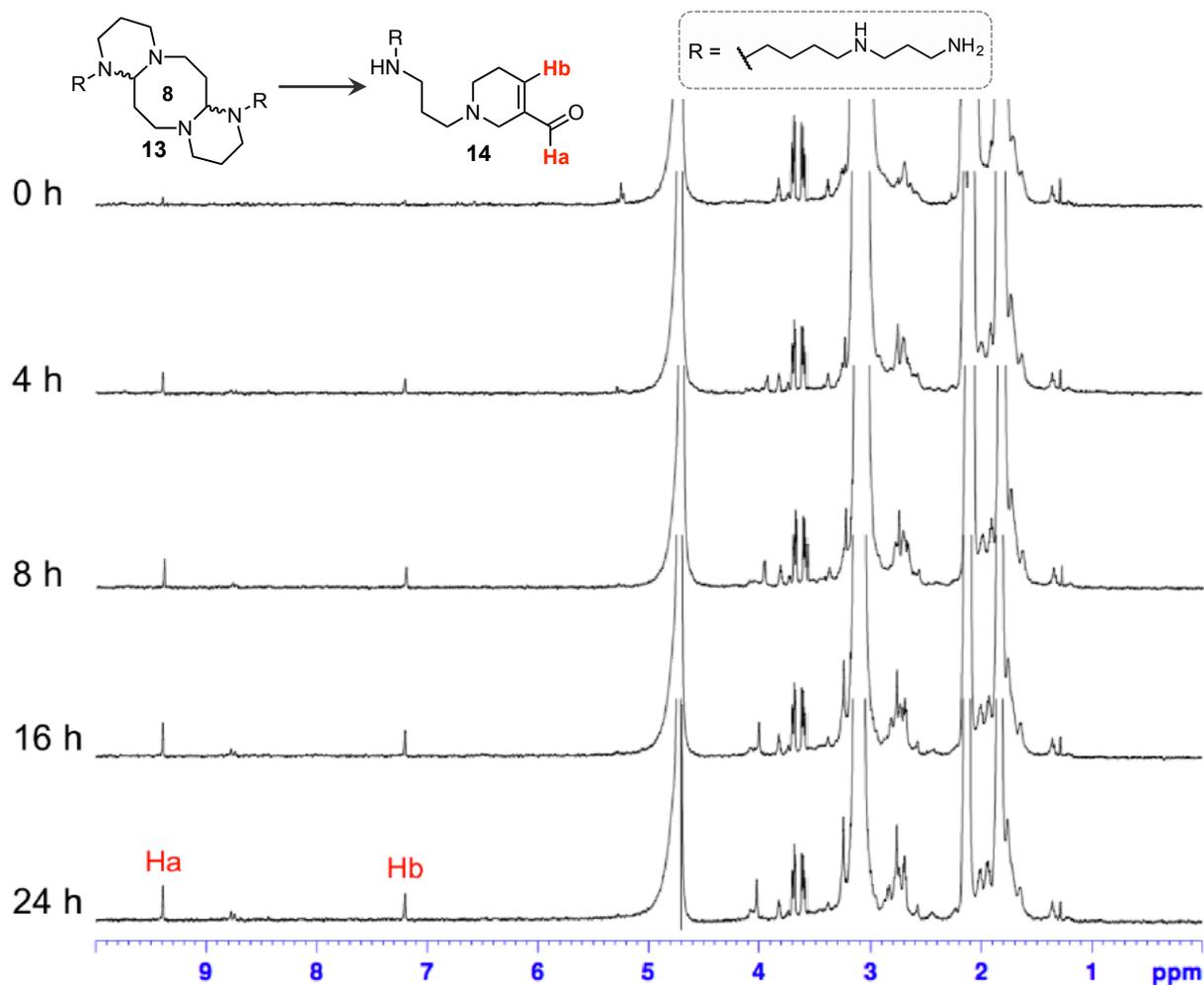


Fig. 2-5 ポリアミン由来の8員環化合物の<sup>1</sup>H-NMR経時スペクトル

この変換反応のきっかけは、8員環内のアミナルの開裂であると想定した。架橋型の8員環構造**5**では、アミナルが架橋構造の橋頭位に位置しており、分子ひずみが大きいためか、ほぼ定量的にFDPへと変換されている (Fig. 2-6 A)。一方、ポリアミン由来の8員環では分子ひずみが小さいため、それほど変換反応が進行しなかったと考えられる (Fig. 2-6 B)。

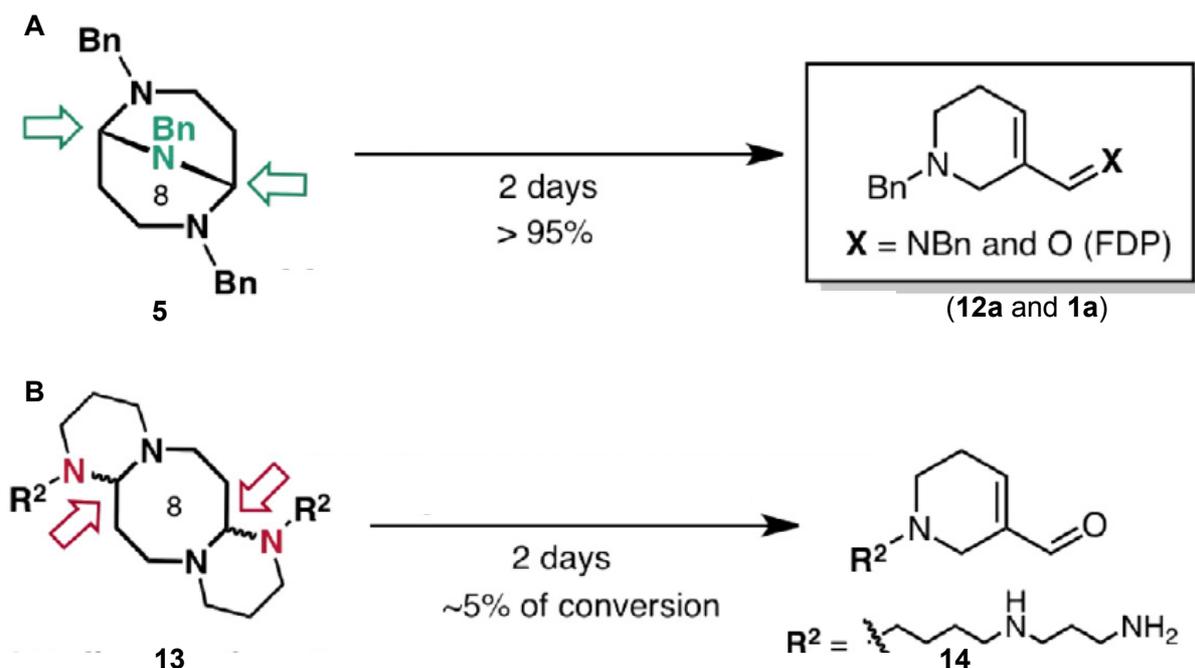


Fig. 2-6 種々の8員環からFDPへの変換

見出された変換について、予想される分子変換の機構を以下に示す (Fig. 2-7)。架橋構造の8員環**5**を例とした場合には、まずアミナル部位に対して、窒素からの電子の押し出し、架橋部位の開裂によって**T 1**が生成する。さらに、互変異性化が起こって**T 2**へと変換され、そして窒素からの電子の押し出しによって8員環が開裂し、**T 3**となる。続いて、**T 3**における $\alpha$ 位炭素からの求核付加、6員環への巻き直しの後に**T 4**へと変換され、異性化、加水分解を経て、FDP**1 a**が生成する機構が想定された。

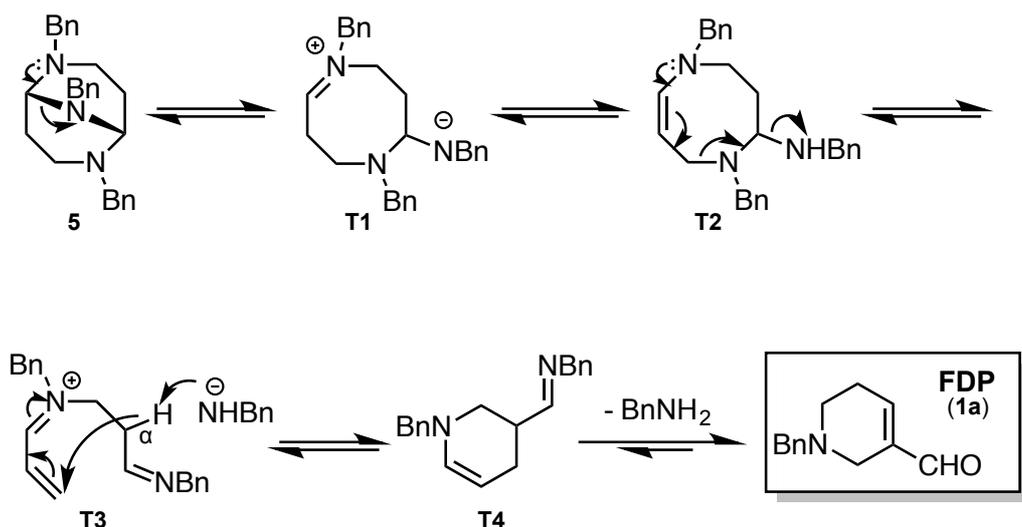
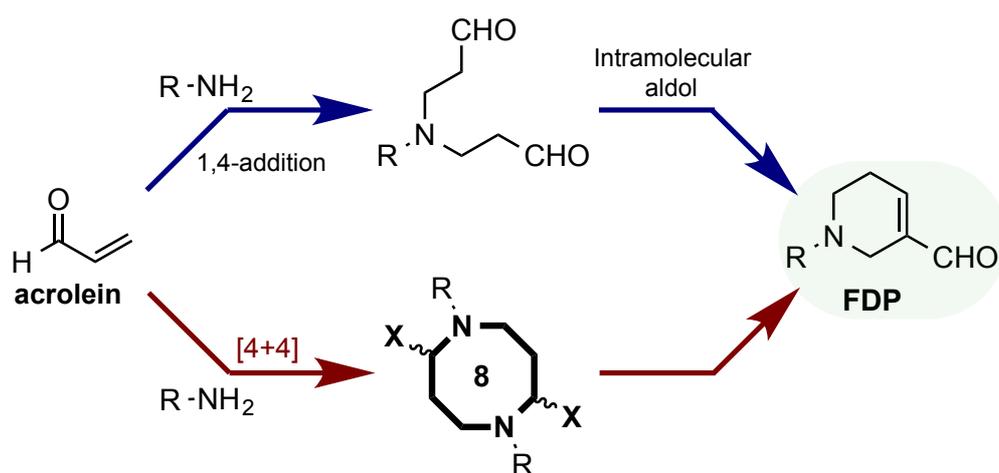


Fig. 2-7 想定される8員環からFDPへの分子変換機構

得られた結果から、次の作業仮説が想定された (Fig. 2-8)。FDPの生成には、これまでに、route Aのように、アミンとアクロレインの2段階のマイケル付加の後、ジアルデヒド体の分子内アルドール縮合による生成経路が報告されてきた<sup>7</sup>。しかし、それだけでなく、route Bのように、アクロレインとアミンからイミノ [4+4] 環化反応による8員環を中間体として経由し、FDPへと変換される生成経路の存在も強く示唆された

<sup>62</sup>。

**route A** (Uchida, K. *et al.* 1998)

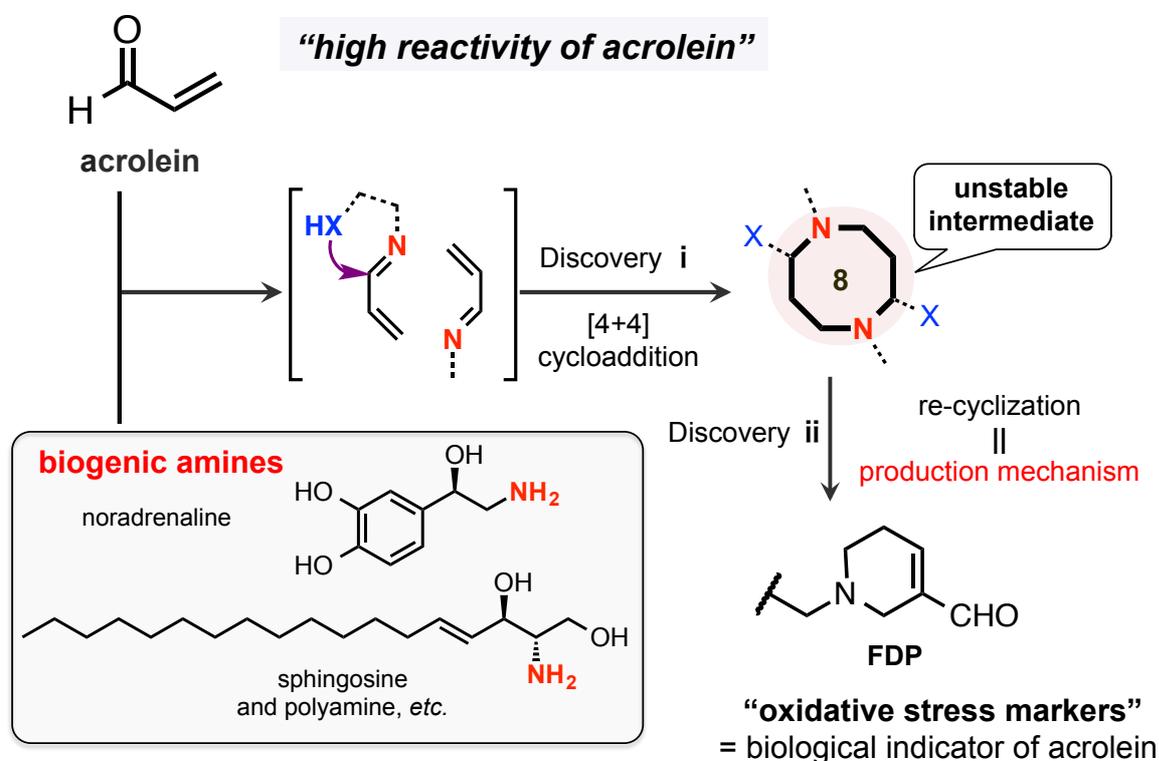


**route B** (Tanaka, K. *et al.* 2014)

Fig. 2-8 FDPの生体内生成機構

## 2-3 小括

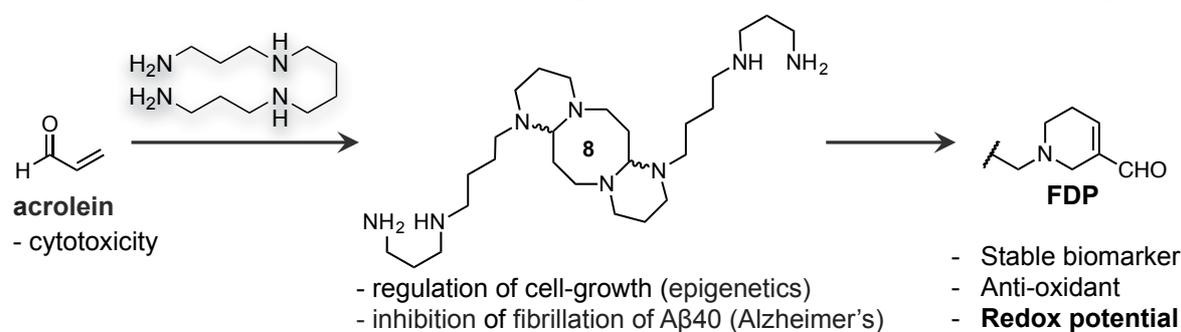
アクロレインがスフィンゴシン等の生体内アミンと速やかに反応し、新奇な形式的 [4 + 4] 反応を経て、1, 5-ジアザシクロオクタンを与えることを明らかにした (F i g. 2-9)。これにより、生体内での [4 + 4] 反応の可能性を見出した。さらに、これらの8員環化合物は、酸化ストレスマーカーとして以前から知られている3-ホルミル-3, 4-デヒドロピペリジン (F D P) へと次第に変換されていくことを明らかにした。実際に生体内でも起こりうる、アクロレインと様々なアミノ基から得られる8員環中間体が、開裂・再環化して安定なF D Pへと変換される、新規な生体内生成機構を想定した。先行研究のような生物学的手法では、安定なF D Pだけが単離報告されており、不安定で検出されにくい中間体である8員環がこれまで見過ごされてきたと考えられる。一方、本研究では、さらに有機化学的手法を用いて生体条件を再現し、フラスコ内の反応物を詳細に観察できたため、F D P 生成機構の解明につながったと考えられる。



F i g. 2-9 アクロレインとアミンの反応のまとめ

最近、FDPの抗酸化活性も報告されており、今回見出したアクロレインからのFDPへの変換経路に関して、アクロレイン、8員環、FDPのそれぞれの物性・生物活性に対する我々のグループの研究結果から以下の生体防御機構への関与が予想される。

酸化ストレスによって、毒性の高いアクロレインが生成する。このままでは、酸化ストレス疾患の発症につながっていく。その際に、アクロレインが一部の生体アミンと反応することで、アクロレインの毒性を中和（無害化）する（Fig. 2-10）。また、生体内で産生した8員環化合物の有する生物活性が徐々に明らかになっている。たとえば、我々のグループは共同研究の中で、ポリアミンによる8員環化合物が、核内のヒストン修飾酵素に作用してその細胞の増殖を制御するといった効果やアルツハイマー病の原因となるアミロイドペプチドの凝集に対する阻害効果等を有していることが既に判明してきている。これらは過剰のアクロレイン産生による生体へのダメージを経減する効果（緩衝作用）を発現していることが期待される。そして、活性な8員環がしばらく働いた後に、抗酸化作用を有するFDPへと安定化される（Fig. 2-10右）。このように、アクロレイン発生時に、分子変換を伴ってそれぞれのステージで異なる役割を果たしながら生体制御システムを形作っていることが想定される。そこからさらに研究を進めていったところ、FDPには還元反応性が備



わっていることも判明したので、詳細を次章に記述する。

Fig. 2-10 アクロレイン-アミン付加体の生物学的機能

### 第三章 酸化ストレスマーカー FDP を利用した有機還元反応

#### 3-1 酸化的芳香族化と酸化還元反応

これまでに生体内の酸化ストレス代謝物、特にアミン・アクロレイン付加生成物がいくつか報告されている<sup>41, 43, 63</sup>。その中には、デヒドロピペリジン構造を持つ FDP に加え、これがさらに酸化されたピリジニウム塩構造 (MP) も単離されている (Fig. 3-1)。本章では、この2つの分子種の酸化還元構造に着目した。

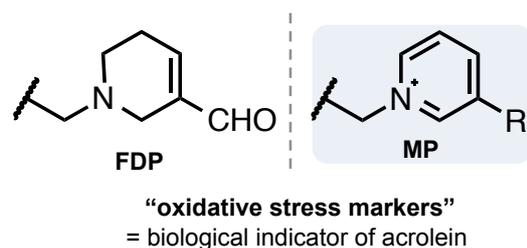


Fig. 3-1 FDP とピリジニウム塩 (MP) 構造

さて、FDP と分子構造のよく似たジヒドロピリジン環を有するニコチンアデニンヌクレオチド (NADH) は、天然の酸化還元剤として働くことが知られている<sup>64</sup>。生体内の還元酵素は NADH を補酵素として用い、電子授受を通じて様々な生体物質の還元反応を行い、生体内の酸化レベルの調節作用を担う役割を果たしている (Fig. 3-2)。以上のことから、FDP も還元反応を起こしうるのではないかと想起した。

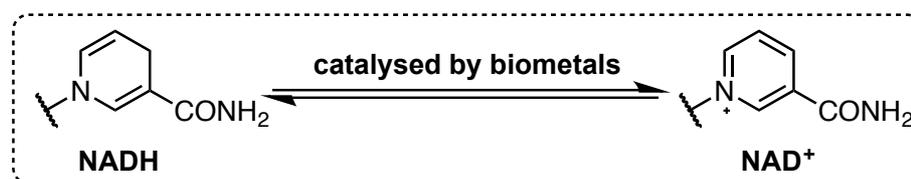
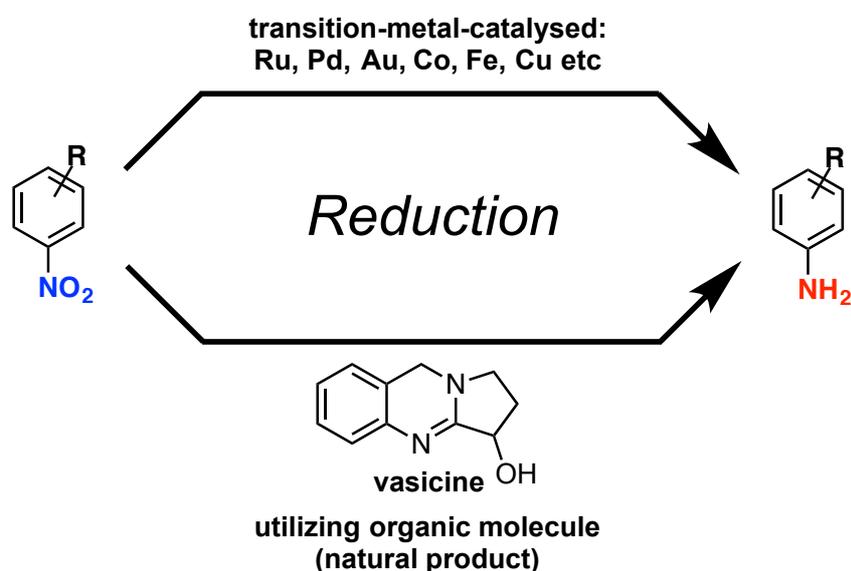


Fig. 3-2 NADH の酸化還元反応

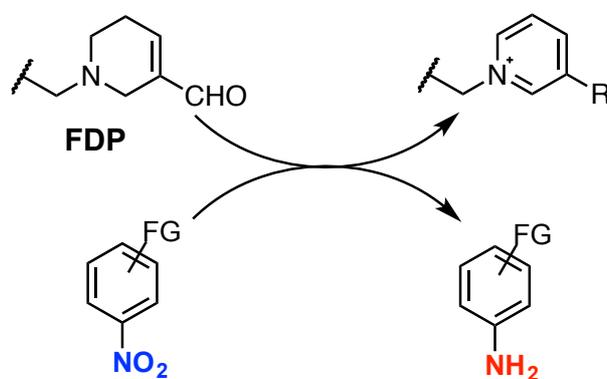
通常、一般的な還元反応は、遷移金属の単体もしくは金属塩と水素ガスを組み合わせる方法が用いられる (Fig. 3-3)。しかし、グリーンケミストリーの観点から、これまでに

人体に有害な重金属触媒等で行われてきた反応を有機分子によって再現することが望まれている。たとえば、金属触媒を用いることなく有機化合物によって還元する例として、天然物 *vasicine* が挙げられる。*vasicine* は酸化的芳香族化を伴って、ニトロベンゼン類をアミノベンゼンへと還元することが報告されている<sup>65</sup>。



F i g. 3-3 ニトロ基の還元反応

そこで、FDPも同様に有機還元剤として働く可能性を想起した (F i g. 3-4)。すなわち、FDPがピリジニウム塩構造へと変換される際に、ニトロ基のような還元対象基質を作用させることで、反応が進行すると想定した。そこで、実際にFDPにおいても還元反応を試みることにした。



F i g. 3-4 FDPの酸化還元反応

### 3-2 FDPの還元反応

はじめに、調製容易なN-BnFDP **1a**<sup>61</sup>を還元剤として種々の基質を用いた検討を開始した。しかし、カルボニル基 (**15a**、**15b**) やカルボニル基で活性化された不飽和結合 (**15c**) への還元反応は全く進行しなかった (Fig. 3-5 A)。一方で、スルホニルを含む芳香族ニトロ化合物 **15d**<sup>66</sup> に対して作用させたところ、アニリン誘導体 **16d** が生成することを見出した (Fig. 3-5 B)。この反応は60℃では全く進行せず、80℃でも痕跡量しか生成物が得られないが、100℃まで昇温した際に45%で目的のアニリン体 **16d** が得られることが明らかとなった (entry 1-3)。さらに反応性を調べるため、いくつかの市販されているニトロ化合物を用いて検討を始めた。**15d** と同じように、電子求引基であるエステルを有する基質においても反応が35%で進行した (entry 4)。また、4-ニトロアセトフェノン **15f** や4-ニトロベンゾニトリル **15g** でも還元反応がそれぞれ50%、73%で進行した (entry 5-6)。一方で、電子求引基をもたない単純なニトロベンゼン **15h** やニトロトルエン **15i** のような基質では反応が進行しなかった (entry 7-8)。

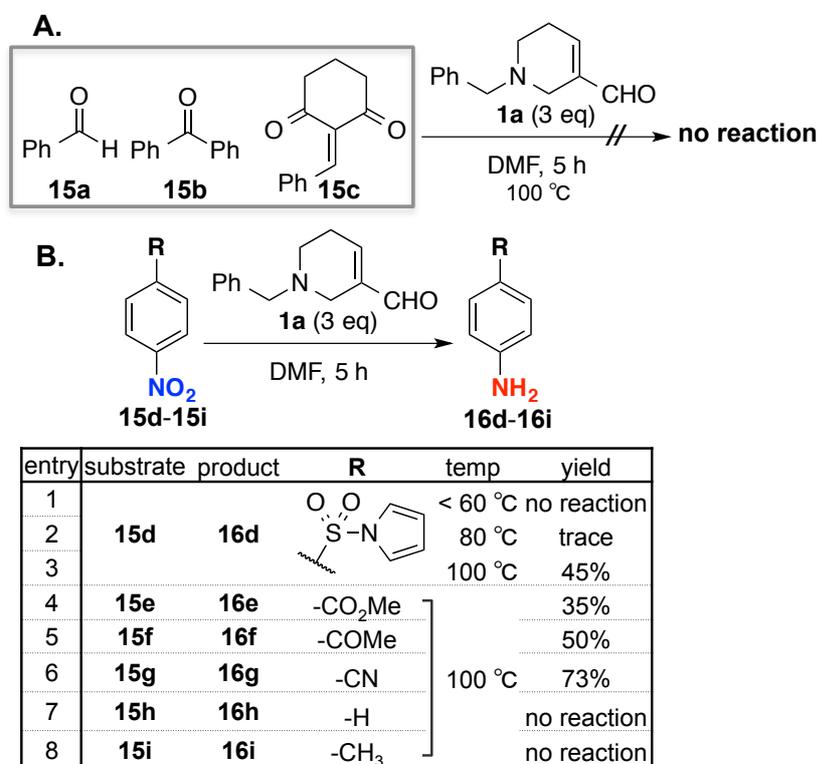
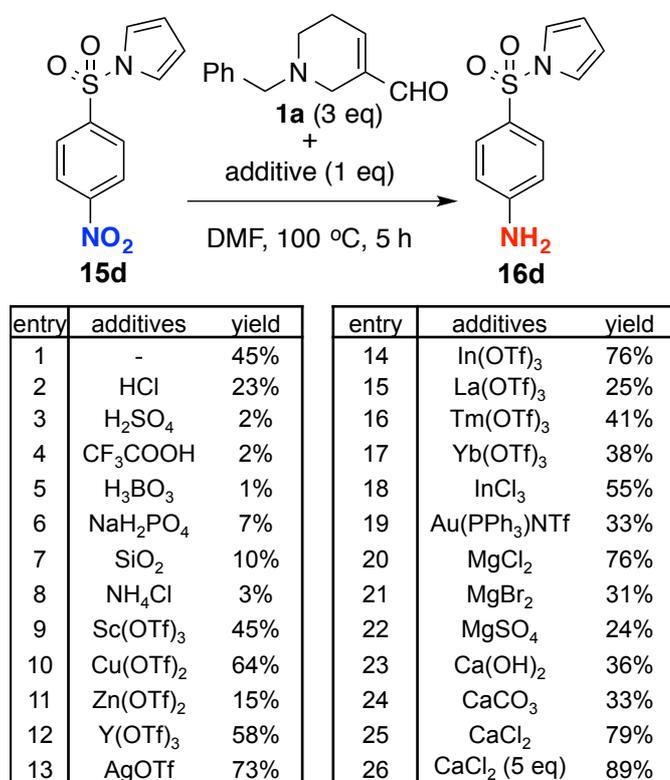


Fig. 3-5 FDPによる還元反応の初期検討

さらに収率を向上させるために、ブレンステッド酸やルイス酸の触媒効果を想定した。前述の生体内の還元試薬であるNADHの還元機構をもとに、**15d**をモデル基質として検討を開始した (F i g. 3-6)。残念ながら、塩酸、硫酸、トリフルオロ酢酸、ボロン酸等のブレンステッド酸では、元の条件より収率が低下した (e n t r y 2-8)。次に、一般的にルイス酸として機能する金属塩 (スカンジウム、亜鉛、イットリビウム、銀、ランタン、ツリウム等) を検討した (e n t r y 9-19)。幸運にも、銅 (64%) やインジウム (76%) のトリフレート塩等による収率の向上が見出された。さらに、NADH還元と同じように、マグネシウムやカルシウムといったアルカリ土類金属種が有効に働くと考えて検討を続けた (e n t r y 20-25) その結果、予想通りに収率が向上し、塩化カルシウムの添加が最も効率良く、79%で還元反応が進行した (e n t r y 25)。最終的に、5当量の塩化カルシウムを系内に添加することで、還元反応が収率89%で最も効率的に進行することを見出した (e n t r y 26)。これらはニトロ基やカルボニル基、窒素等にルイス酸が作用して反応性が向上したと想定される。この際に、薄層クロマトグラフィー (TLC) によって反応を経時追跡したところ、5時間で反応が完結していることがわかった。



F i g. 3-6 FDP還元反応の添加剤検討

また、FDPの分子構造と還元能力の関係を明らかにするため、FDPの誘導体による還元を検討した (Fig. 3-7)。まず、調製したN-Bn FDP 1a に対してベンジルアミンを作用させ、イミン誘導体 12a へと変換した。次に、FDP 1a に対して、シアン化カリウム存在下で二酸化マンガンを用いた酸化反応によりエステル誘導体 12b を合成した<sup>67</sup>。

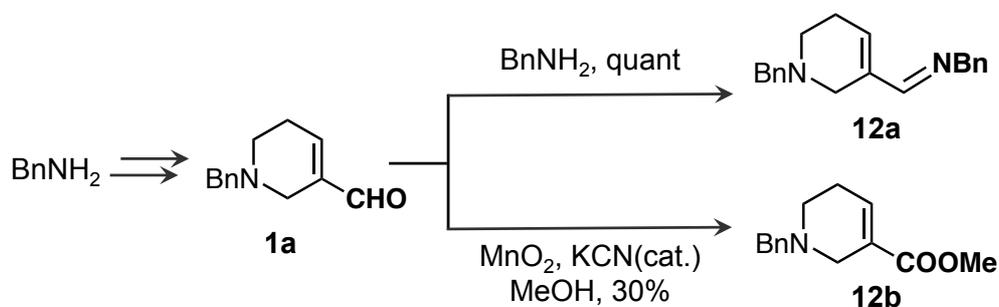


Fig. 3-7 FDP 誘導体の合成

これらのFDP誘導体を用いて、先の検討で最も良い結果を与えた塩化カルシウム存在下でモデル基質 15d に対する還元反応を行った (Fig. 3-8)。その結果、FDPのアルデヒド構造が最も収率が高く (89%)、イミン構造 (40%)、エステル構造 (痕跡量) の順に反応性が低下することがわかった (entry 1-3)。理由は今のところ不明であるが、本反応形式において、FDP内のアルデヒド基が重要であることが判明した。

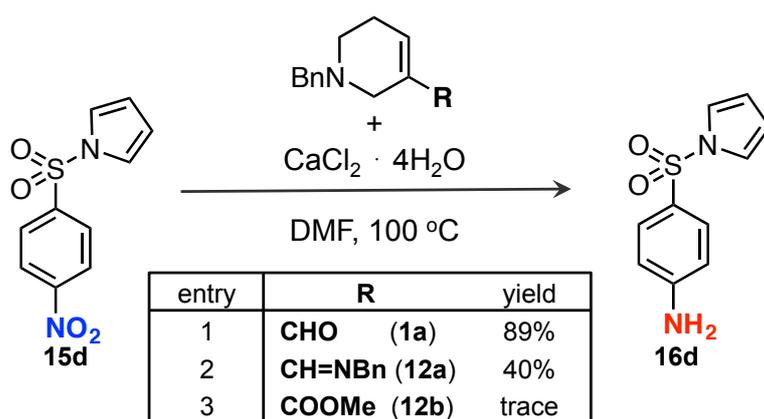
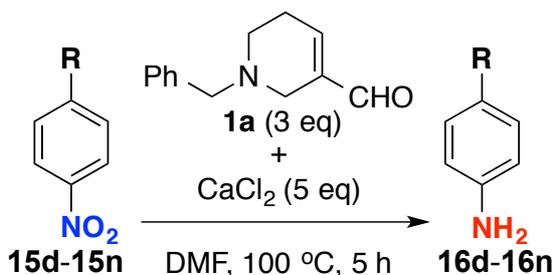


Fig. 3-8 FDPの構造と還元反応性

次に、最適化した条件（塩化カルシウム5当量、100℃、5時間）により、還元反応の基質適用限界を調べることにした。Fig. 3-7に示すように、電子求引基を有する基質群15d-15gを用いた際に、添加剤を用いなかった検討（Fig. 3-5B）に比べて、添加剤の効果による収率の向上が確認された（Fig. 3-9、entry 1-4）。すなわち、検討で用いた15d（89%）と同様に、エステル（15e、69%）、ケトン（15f、88%）、ニトリル（15g、82%）を有した基質で還元反応が効率的に進行した。さらに、以前は還元が進行しなかった単純なニトロベンゼン15hにおいても還元反応が18%で進行することを確認した（entry 5）。一方で、電子供与基を有するニトロトルエン15iを用いた際には反応が進行しなかった（entry 6）。また、天然物合成の中間体に用いられるスルホニルインドール骨格を持つ15jでは80%で還元が進行した（entry 7）。同様に、4-ニトロ安息香酸15kや4-ニトロベンズアルデヒド15lも、それぞれ61%、40%で還元反応が進行した（entry 8-9）。



同じく、4-フルオロニトロベンゼン15mでは、芳香族求核置換反応を引き起こすことなく、73%で還元が進行した（entry 10）。4-クロロニトロベンゼン15nにおいては収率が低いものの、副生成物を伴わずに還元が進行した（entry 11）。\*置換基効果に関する詳細は、付録Iを参照

entry	substrate	product	R	yield
1	15d	16d		89%
2	15e	16e	-CO <sub>2</sub> Me	69%
3	15f	16f	-COMe	88%
4	15g	16g	-CN	82%
5	15h	16h	-H	18%
6	15i	16i	-CH <sub>3</sub>	no reaction
7	15j	16j		80%
8	15k	16k	-CO <sub>2</sub> H	61%
9	15l	16l	-CHO	40%
10	15m	16m	-F	73%
11	15n	16n	-Cl	21%

Fig. 3-9 種々のニトロベンゼンに対する還元反応

一方、一部の非常に電子不足な芳香族基質においては、イプソ位での求核置換反応の進行が確認されている (Fig. 3-10)。これまでに述べたように、2置換芳香族基質である4-フルオロニトロベンゼン **15m** では、ニトロ基の還元反応が進行する。一方で、1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン **17a** では、フッ素のイプソ位において水素との置換反応が進行した。同様に、2, 3-ジシアノ-1-ニトロベンゼン **17b** においてもイプソ位での求核置換反応が進行することが明らかとなった。

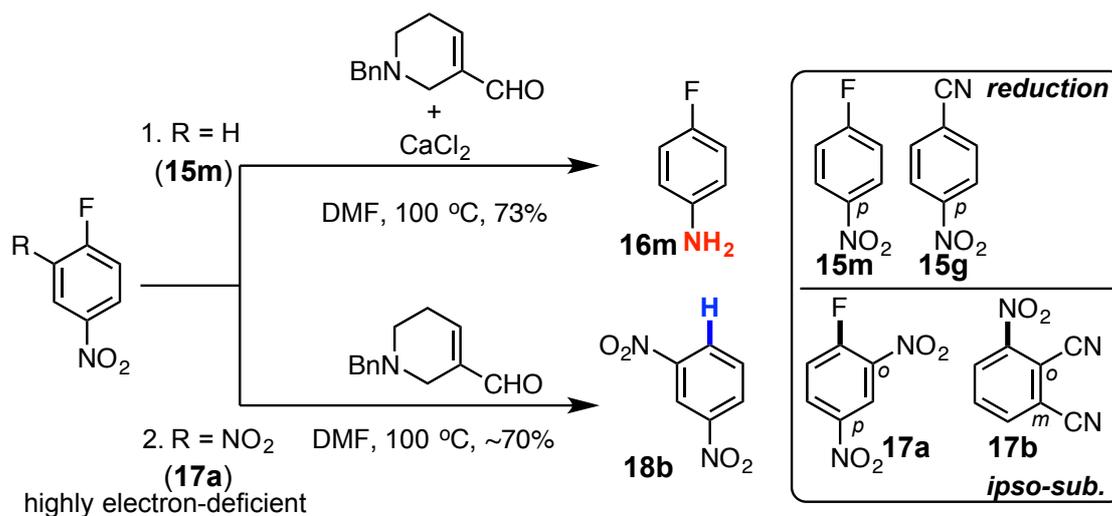


Fig. 3-10 ニトロ基の還元反応と芳香族求核置換反応

### 3-3 ワンポット還元反応

さて、第二章で見出した現象から、アミンとアクロレインとを室温で混ぜ合わせるだけで、共役イミンの形式的 [4 + 4] 反応、続く自己変換反応を経て効率良く得られることが明らかとなっている。そこで、本手法を簡便なワンポット還元法への展開を試みた。すなわち、1つのフラスコ内でアミン、アクロレイン、ニトロアール、そして塩化カルシウムを順に作用させることで、簡便なニトロ基の還元を行うこととした (Fig. 3-11)。実際にフラスコ内に順次試薬を投入して加熱し、反応を行った。まずベンジルアミンを用いた際には、61%でこれまでと同様に芳香族ニトロ基 **15d** の還元が進行した (entry 1)。次に、安価で、沸点が低いため減圧留去の容易なプロピルアミンをアミン源として還元反応を行ったところ、86%で還元反応が進行した (entry 2)。さらに、1グラムスケールにおいても84%で目的のアニリン体を得ることに成功した (entry 3)。さらに大きなスケール

ルでも可能であると考えられる。このように、大量スケールで可能な、重金属触媒を用いない簡便な有機還元法を開発した。

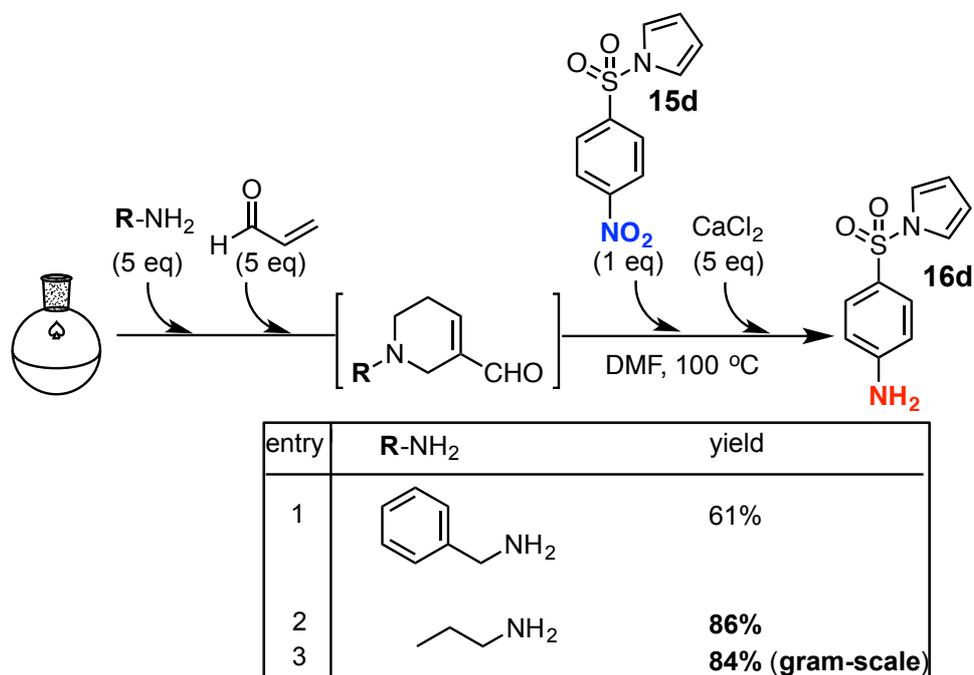


Fig. 3-11 ニトロ基のワンポット還元反応

### 3-4 小括

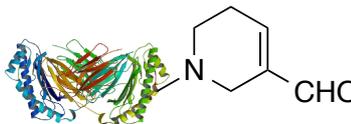
酸化ストレス産物の構造的特徴を基にして、FDPが還元能力を示し、様々な芳香族ニトロ基を選択的に還元することを新たに見出した。さらに第二章での変換反応を基に、フラスコ内でアミンとアクロレインから自発的に発生するFDPを活用して、単離精製等の余分な操作を伴わずに、還元反応を行うことができた。そして、従来の重金属触媒を使用しない、有機反応剤による、ニトロ基の簡便なワンポット還元法を確立した。

## 第四章 生体FDPの蛍光検出法開発

### 4-1 FDP検出法

序論で述べたように、アクロレインの生体内での蓄積量は、酸化ストレス疾患の発症・進行度を理解し、治療へとつなげるための重要な指標になる<sup>28-32</sup>。そのため、生体サンプル測定ではアクロレイン付加体を評価する手法が活用される。近年では、名古屋大学の内田浩二博士のグループが、タンパク質上のFDP構造を認識するモノクローナル抗体を作成し、ELISA-KITとして市販化した<sup>41-44</sup> (Fig. 4-1 上段)。バイオマーカーとしてのFDP検出はアクロレインの生体濃度を間接的に指し示す手法として優れており、種々の疾患を査定するために使用されている。その例として、産学医療ベンチャー「アミンファーマ」では、このFDP抗体検出法と他のバイオマーカー評価法を組み合わせた「かくれ脳梗塞」診断法として用いている。

この手法は、非常に優れているものの、高価な抗体キットやELISAの手法を経る煩雑な作業が必要となる。そのため、より安価で簡便な代替法が開発できれば、広く一般への普及が期待できる。そのためには、FDPの検出法において、抗体に匹敵する特異的な分子認識が鍵となる。そこで、「FDPによる特異的な反応」によって代用した化学プローブ検出法を想起した (Fig. 4-1 下段)。すなわち、生体のFDPを認識する抗体の量の調べる代わりに、FDPの引き起こす特異的な反応を定量することを考えた。

**detection target:**   
**FDP**

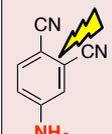
	cost	procedure	specificity
 <b>antibody</b>	high	tedious	recognition of FDP
 <b>chemical probe</b>	<b>low</b>	<b>easy</b>	<b>reduction by FDP</b>

Fig. 4-1 FDPに対する検出法

そこで、第三章で検討したニトロ基選択的な還元反応を利用して、生体のFDPによって非蛍光ニトロ化合物から蛍光のアミン化合物へと変換（蛍光スイッチング）できれば、FDPの検出が実現できると着想した（Fig. 4-2）。すなわち、疾患組織で産生された生体FDPがニトロ基質を選択的に蛍光性アニリン分子へと還元する。その後、蛍光測定により定量検出を行う。これにより、アクロレインのバイオマーカーであるFDPを従来の抗体を使用せずに、化学的に検出する簡便な手法へと展開することを計画した。

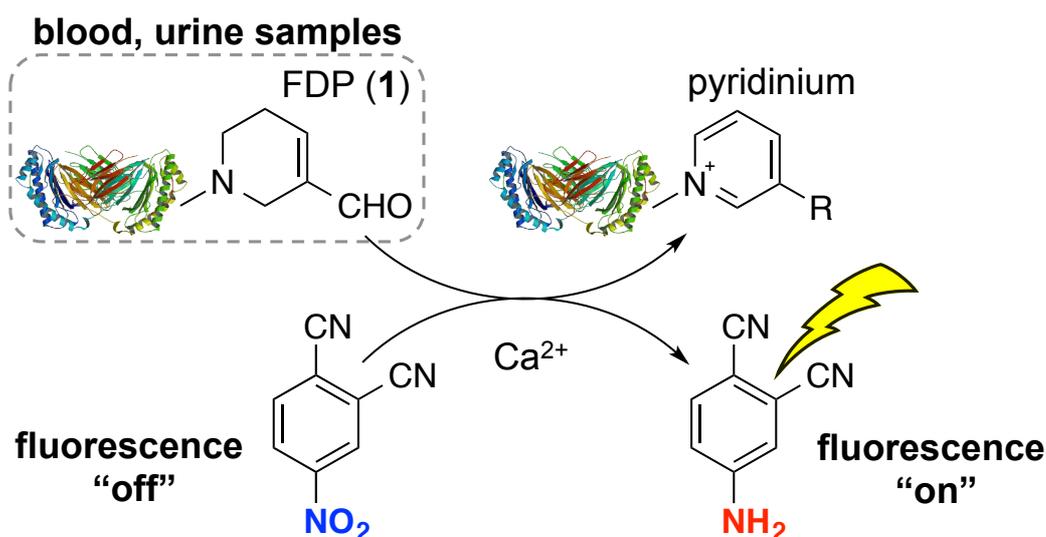
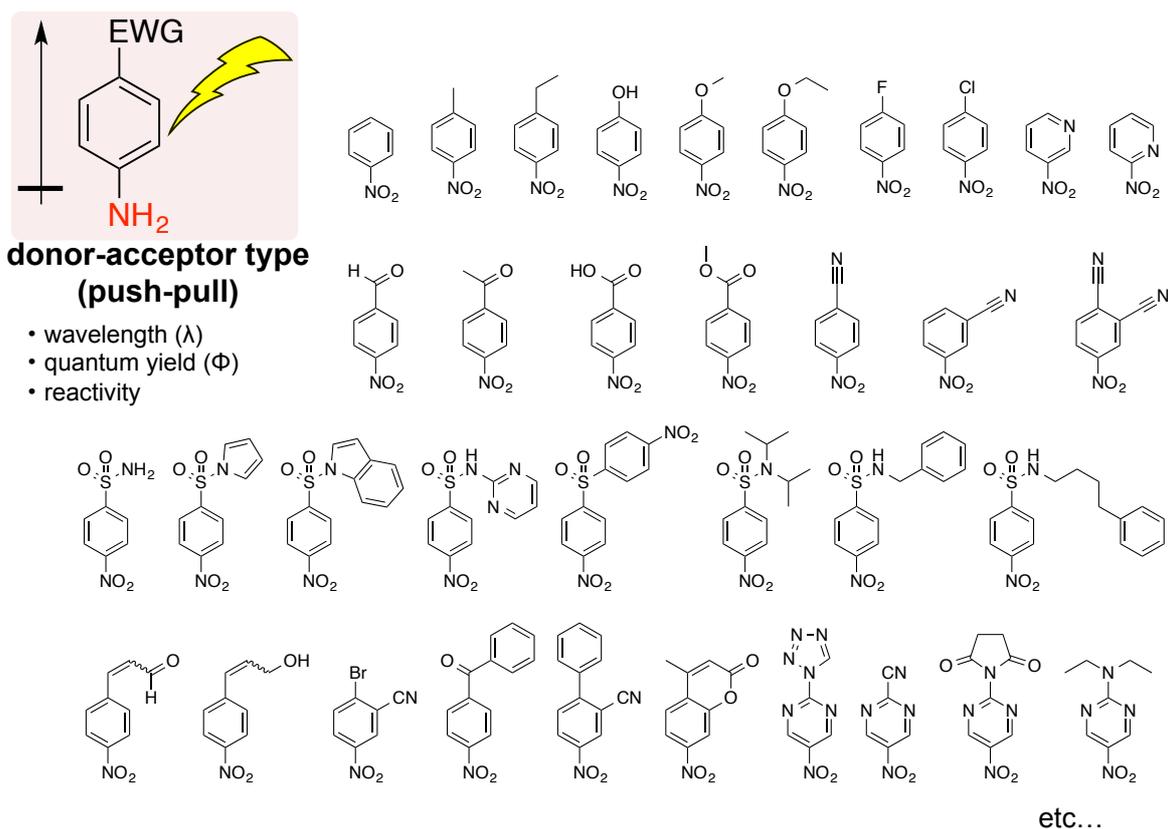


Fig. 4-2 FDPの還元反応による検出システム

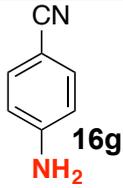
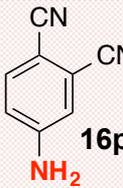
#### 4-2 FDP検出プローブ

本反応の検出形式では、後述のように蛍光強度が生成物のアニリンの量に比例するため、一定の割合で反応に関与するFDPの量を見積もることができる。従って、蛍光波長域や量子効率の観点からプローブ分子（ニトロアレーン）を適切に選択することで、様々な生体混合物中（夾雑系）でもFDPレベルを測定することができると想定した。そこで、種々のニトロアレーンをプローブ候補としてスクリーニングを始めた。（Fig. 4-3）。



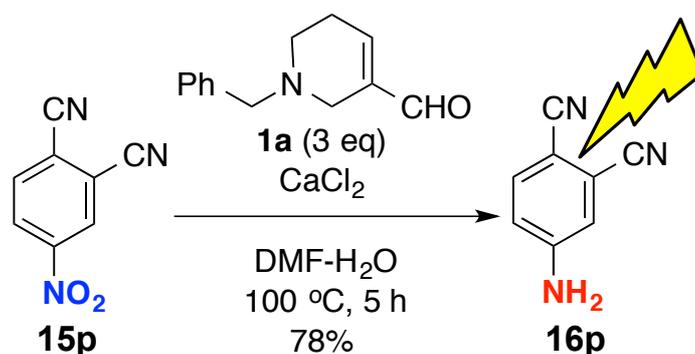
F i g . 4-3 プロブ分子候補（一部は文献から）

必要となるプロブ分子には、還元反応性はもとより、反応前後での励起-蛍光波長域 ( $\lambda_{ex}-\lambda_{em}$ ) の大きな変化（ストークスシフト）や量子効率 ( $\Phi$ ) の高さも重要な要素となる。検討を進めていくうちに、芳香環上に電子供与基と電子求引基の両方を有する *push-pull* 型の蛍光基の分子構造に焦点を当てた。中でもニトリル基とアミノ基の組み合わせに着目した<sup>68</sup>。16g や 16o を含む数十種の候補化合物をスクリーニングした結果、ジシアノアミノベンゼン 16p を見出すことができた (F i g . 4-4)。

formula	 <b>16g</b> <b>NH<sub>2</sub></b>	 <b>16o</b> <b>NH<sub>2</sub></b>	 <b>16p</b> <b>NH<sub>2</sub></b>
$\lambda_{ex}$	283 nm	307 nm	340 nm
$\lambda_{em}$	344 nm	392 nm	404 nm
$\Phi$	0.041	0.002	0.570
Reduction yield	82%	22%	78%

F i g. 4-4 検出プローブの励起/蛍光波長 ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ )、量子効率 ( $\Phi$ ) の文献値および反応性

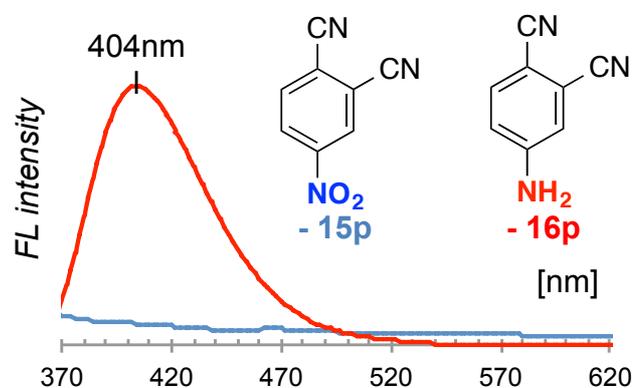
そこで、還元反応を引き金とした「蛍光オン」のFDP検出システムを実現するため、**15p**をプローブとして実験系を確立していくこととした。まず、モデル反応を行うこととした。ジシアノニトロベンゼン**15p**を、塩化カルシウム存在下、3当量のFDP**1a**と反応させたところ、還元反応は78%で進行した(F i g. 4-5)。



F i g. 4-5 検出プローブとモデル反応

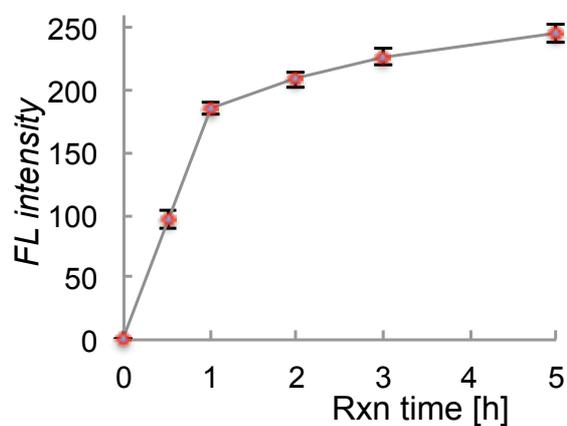
次にプローブ分子**15p**と得られてくるアニリン体**16p**に対して蛍光スペクトル測定を行った(F i g. 4-6)。その結果、**15p**では蛍光が観測されなかったのに対して、ア

ニリン体 **16p** は励起/蛍光波長[340/404 nm]に極大を持つスペクトルを示すことを確かめた。



F i g. 4-6 検出プローブとアニリン体の蛍光スペクトル (励起波長: 340 nm)

さらにモデル反応における、経時蛍光変化を測定し、反応時間を調べた。その結果、蛍光量の経時測定から、これまでの反応検討と同じように、5時間で還元反応が完結していることが明らかとなった (F i g. 4-7)。



F i g. 4-7 蛍光測定によるモデル反応の経時追跡 (励起/蛍光波長: 340/404 nm)

また、生体サンプル中での生体直交性を保証するため、様々な生体の酸化還元剤で確かめ

ていくこととした。まずFDPに対して、酸化還元剤として過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) やマグネシウム、カルシウム、鉄、銅等の生体金属塩を作用させた。この条件では、FDPは酸化されることなく回収することができた (Fig. 4-8)。

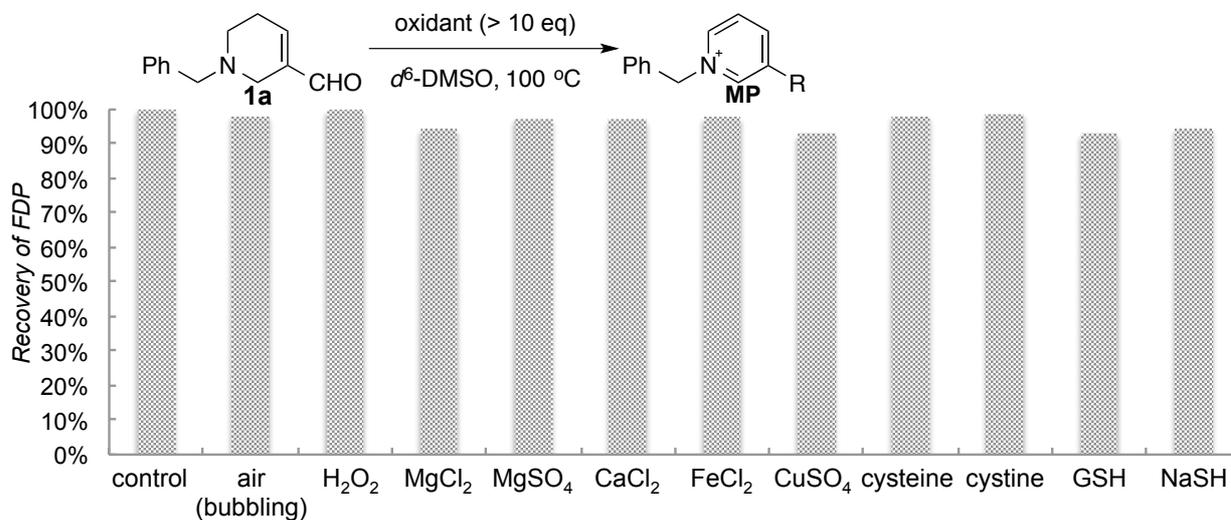


Fig. 4-8 生体酸化還元条件におけるFDPの安定性

同様にプローブ15pに対して、酸化還元剤としてシステイン、シスチン、グルタチオン (GSH) や硫化水素ナトリウム (NaSH) を反応させた。その結果、生理学的濃度<sup>69</sup> (1 μM 程度) では還元反応の進行による蛍光の増大は確認されなかった (Fig. 4-9)。この結果から、生体サンプルの条件下でも本システムが機能することを確認することができた。

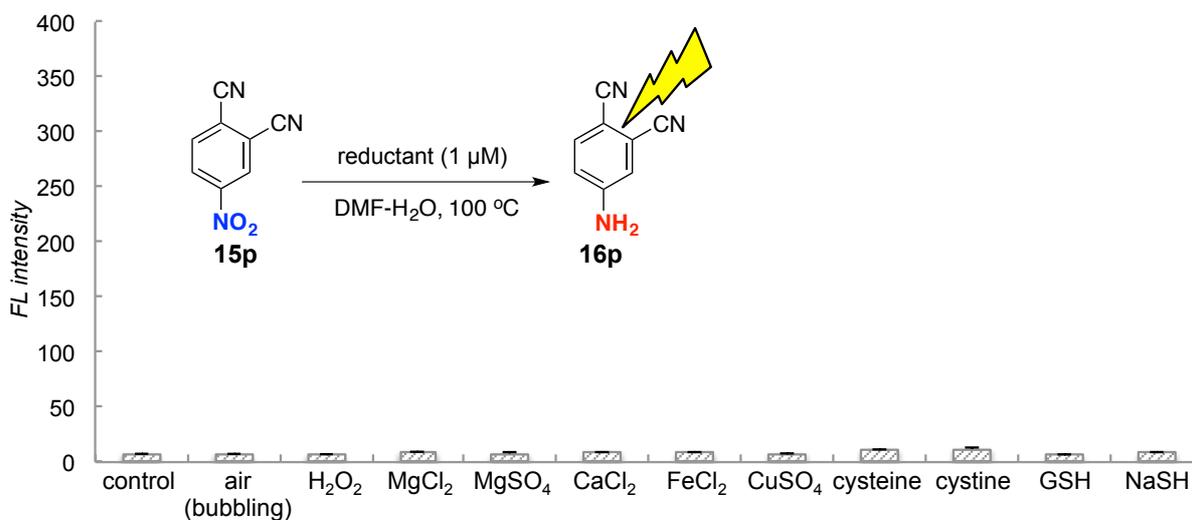


Fig. 4-9 生体酸化還元条件における検出プローブの安定性

さらに、標品として *N*-lys FDP 1b を用いたモデル反応を行った (Fig. 4-10 A)。その蛍光量を測定した結果、良い線形を示し、検量線を作成できた (Fig. 4-10 B)。また、その検量線を基に誤差範囲を考慮して最小検出限界を算出した (Fig. 4-10 C)。従来の抗体 ELISA 法の検出限界 (3.13 nmol/mL) に対して、本法では 0.84 nmol/mL まで検出可能であることが明らかとなった。\* 蛍光定量性に関する詳細は、付録 II を参照

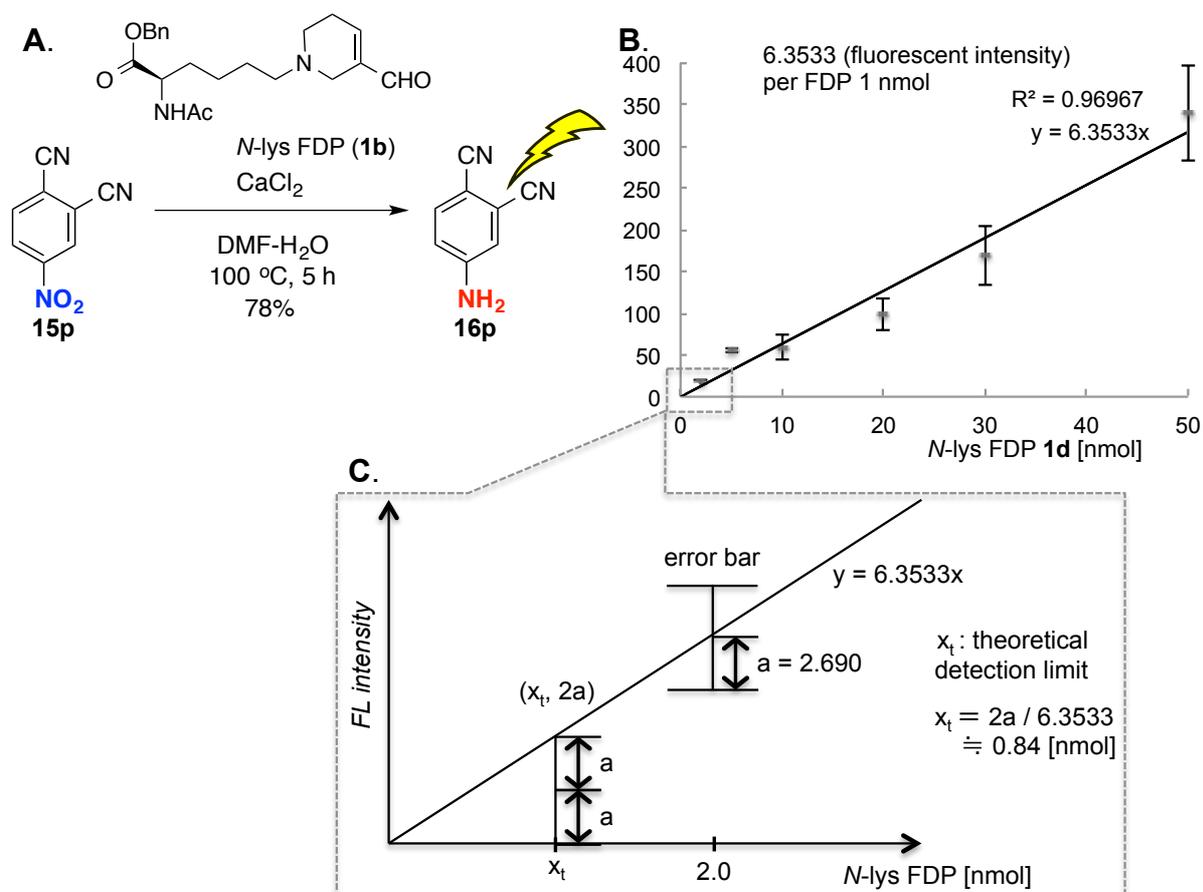


Fig. 4-10 モデル反応における検量線

### 4-3 生体サンプルのFDP検出試験

上述のように確立した条件を用いて、プローブ **15 p** や塩化カルシウム等の試薬類をキット化し、簡便な検出プロトコルを作成した (Fig. 4-11)。i) まず、サンプルとキット溶液を混合して100 °Cで5時間加熱後、ii) 蛍光マイクロプレートリーダーによる測定を行う手法を確立した。

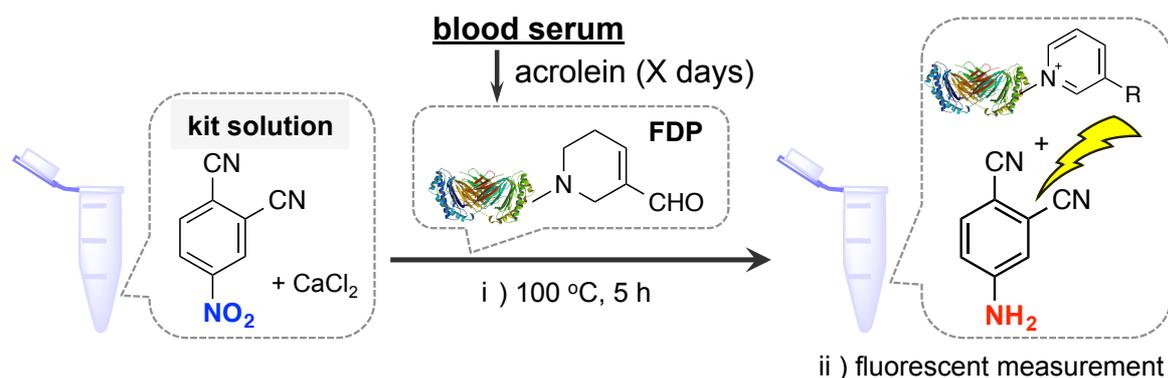


Fig. 4-11 生体FDPの検出プロトコル

本手法によって生体検出が可能であることを確かめるために、生体サンプルとして入手容易な市販品のラット血清を用いた検出試験を行った (Fig. 4-12)。ラット血清存在下にアクロレインを加えてそれぞれ0、1、20、60日間保温したサンプルを調製後に、前述の操作で検出試験をそれぞれ行った。標品FDPの蛍光量から求めた検量線から、アクロレインで処理しなかったサンプルでは $4.9 \pm 0.2 \text{ nmol/ml}$ 、1日間処理したサンプルでは $7.7 \pm 2.6 \text{ nmol/ml}$ のFDPを定量検出できた。また同様に、20日間処理したサンプルでは $12.7 \pm 0.7 \text{ nmol/ml}$ 、60日間処理したサンプルでは $18.7 \pm 1.4 \text{ nmol/ml}$ のFDPが観測された。ここから、アクロレイン処理時間に比例して、蛍光強度の増大、すなわちFDPの生成量の増加が明らかとなった。これは血清内のタンパク質上に、ゆっくりとアクロレイン由来のFDPが生成してきたことを示している。また本手法による結果は、従来法であるELISAによる測定結果とも良い一致を示した (Fig. 4-12)。

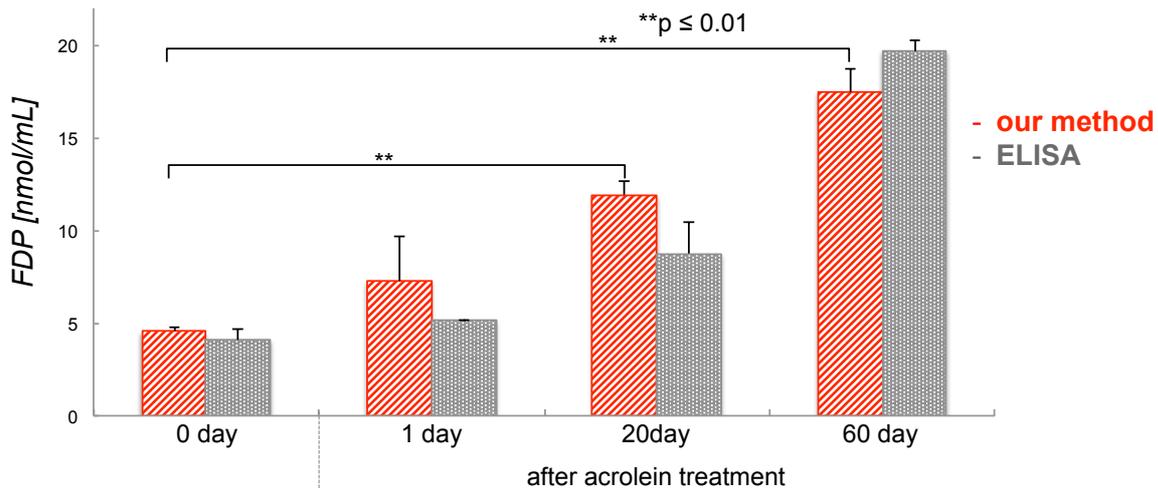


Fig. 4-12 ラット血清中のFDP測定

次に、生体サンプルとしてマウス尿サンプル（6週令）を用いた検出試験を行った。マウス尿は理化学研究所システム糖鎖生物学研究チームの谷口直之博士、北爪しのぶ博士のグループからの提供サンプルを使用した。マウス尿を20倍希釈した生体サンプルを調製後に、検出試験を行ったところ、先程と同様に $5.2 \pm 0.8 \text{ nmol/mL}$ のFDPを定量検出できた（Fig. 4-13A）。またこちらの実験においても、従来法であるELISAによる結果とも良い一致を示した。

さらに本手法の簡便性を実証するため、様々な週令の10匹のマウスから採取した尿を用いた、一斉検出試験を行った（Fig. 4-13B）。再現性のためにサンプル毎に3回ずつ行うこととし、計30ロットの試験を行った。全測定試験は6時間以内で完結し、尿中のFDP含有量が判明した。4週令から50週令へとマウスの週令の増加に比例して、FDP量が増加する傾向が確認された。本研究で見出したFDPの還元反応を基に、従来法と比較して安価で簡便な酸化ストレスマーカー検出診断法を開発した。

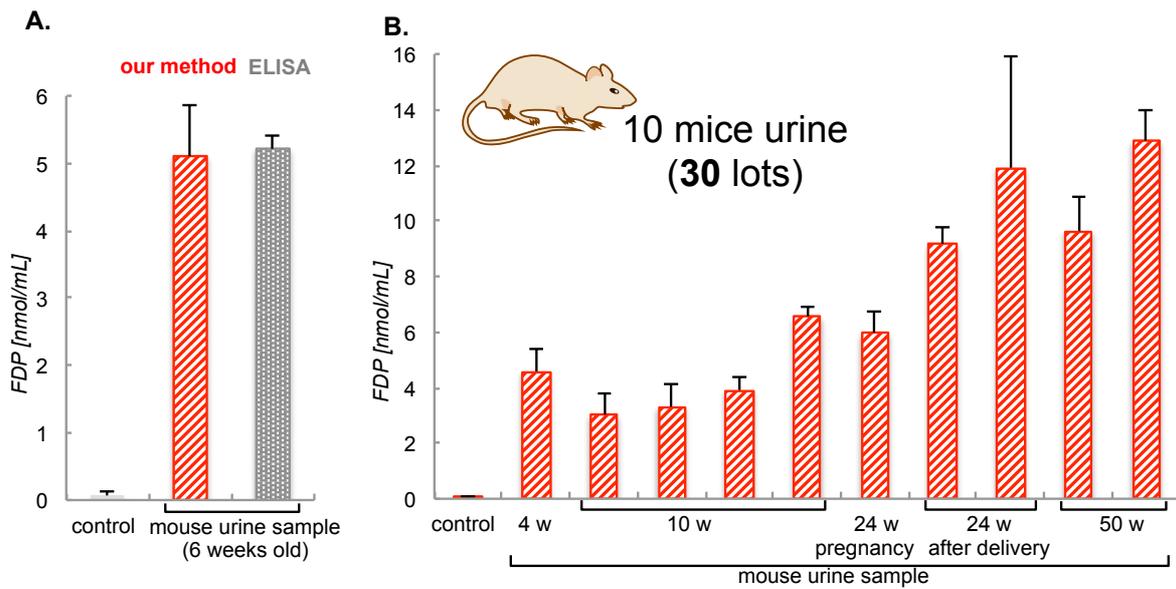


Fig. 4-12 マウス尿中のFDP測定

#### 4-4 小括

独自に見出したFDPの還元反応を、生体のFDPレベル検出するための「蛍光スイッチングシステム」へと応用した。条件検討を進めていき、確立した検出系を用いて、実際にモデル動物の尿や血清を生体サンプルとして評価し、検出精度を従来法と比較した。その結果、従来法と比較して安価で簡便な酸化ストレスマーカー検出法を開発できた<sup>70</sup>。現在、医療クリニックと連携し、本法の臨床応用を検討している。

## 総括

本研究では、非常に毒性の高いアクロレインの優れた反応性に着目した。特に、アクロレインと生体分子との反応物が報告例と異なることに興味をもち、検証実験を進めていった。そして、アクロレインによるイミノ [4 + 4] 環化反応が生体内でも進行しうることを実証した。また、[4 + 4] 反応によって生じる 8 員環化合物が、次第に既知の酸化ストレスマーカー F D P へと変換されていくことを突きとめた。そこから、8 員環化合物群が F D P の生成中間体であるという新たな知見を得られた。これらの有機化学的手法による検証を以って、酸化ストレスマーカー F D P の見過ごされてきた生体内生成機構を明らかにした。

また、生体内の酸化ストレス産物である F D P の構造的特徴から F D P の還元反応性を予測し、検証実験を進め、ニトロ基への選択的な還元反応性をはじめて明らかにした。本還元反応において、塩化カルシウムのルイス酸としての効果を見出すことができた。さらに第二章での変換反応を基に、フラスコ内でアミンとアクロレインから自発的に発生する F D P を活用して、単離精製の余分な操作を伴わずに、還元反応を行うことができた。これにより、重金属触媒を必要としない、ニトロ基の効率的なワンポット還元法の開発に成功した。

さらに本還元反応を、生体の F D P レベル検出するための「蛍光スイッチングシステム」へと応用した。確立した検出系を用いて、実際にモデル動物の尿等を生体サンプルとして用いて本手法を実証し、検出精度を従来法と比較した。その結果、安価で簡便な酸化ストレスマーカー検出法を開発することができた。将来的に本手法を活用することで、アクロレインを発症因子とする様々な病気の予前診断の普及への貢献が期待される。

近年における、生物有機科学分野の著しい発展は、クリックケミストリーのような化学的な手法を武器として生物現象に立ち向かう姿勢によって支えられている。しかしながら、そのように武器として通用する化学ツールは未だ限られている。したがって、次世代の生物有機分野の発展には、更なる化学的手法の開発が必要になる。そのためには、有機反応の基礎研究に立ち戻り、地道に反応の条件検討から始めなければならない。そうして、築かれた地盤から生体条件で活躍する強力な手法が生まれてくるのではないだろうか。本研究では、生体内での酸化ストレスに関わるアクロレインとその反応物を例に、バイオマーカー生成機構

の謎や生物学的手法における課題の解決に向けて、有機化学反応の力を磨いて挑戦した。本研究で達成した成果が、これからの生物有機科学の発展に繋がることを期待する。

付録 I 還元反応と置換基効果

第三章での還元反応の検討結果を基に、ニトロベンゼン類の置換基効果および電気化学的性質について考察した (Fig. S1)。

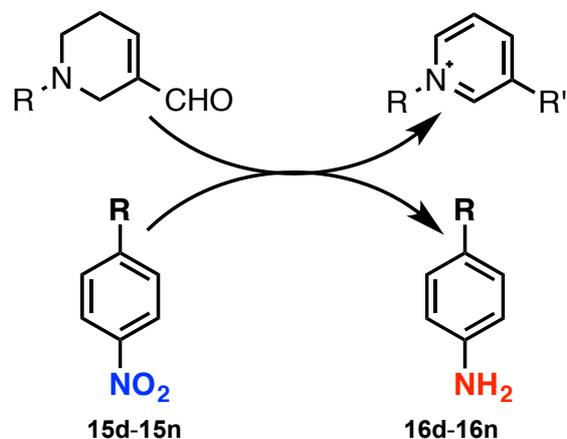


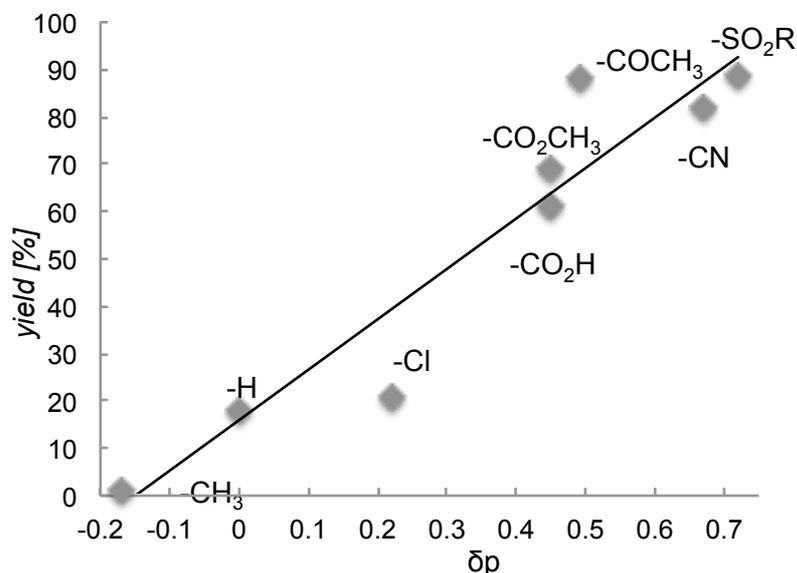
Fig. S1 FDPとニトロベンゼンの反応式

それぞれの基質において置換基効果を表すHammett定数を文献から調べた (Fig. S2)。一般に、Hammett定数が大きいほど置換基による電子求引性が大きい。

R	Hammett constant ( $\delta\rho$ ) <sup>1</sup>	redox potential (V) <sup>2</sup>	yield
-SO <sub>2</sub> R	0.72	-	89%
-COCH <sub>3</sub>	0.49	-0.360	88%
-CO <sub>2</sub> H	0.45	-0.396	61%
-Cl	0.22	-0.450	21%
-H	0	-0.485	18%
-CH <sub>3</sub>	-0.17	-0.500	0%
*cf) Ph-CHO	-	-1.67	0%

Fig. S2 ニトロベンゼン上の各置換基のHammett定数および酸化還元電位との比較

さらに還元反応の収率とH a m m e t 定数を軸に二次元プロットを行ったところ、その比例関係から置換基効果が支持された ( F i g . S 3 )。



F i g . S 3 FDPとニトロベンゼンの反応におけるH a m m e t プロット

また、電気化学的に重要な酸化還元電位と反応の関連を考えた。一般に、酸化還元反応が進行する場合、酸化剤（たとえばニトロベンゼン）と還元剤（FDP）の酸化還元電位  $E$  にはある程度以上の電位差  $\Delta E$  が必要であり、次式の関係が成り立つ。

$$\Delta E = E_{\text{oxidant}} - E_{\text{reductant}} > 0$$

$$\therefore E_{\text{reductant}} < E_{\text{oxidant}}$$

FDP **1 a** の難溶性であり、またその分子内アルデヒド基に対して分子内酸化還元反応を競合して引き起こすため、FDP自身の酸化還元電位の直接的な測定は困難であった。そこで、還元相手であるニトロベンゼン類の文献値から概算することとした ( F i g . S 4 )。ニトロベンゼン誘導体では、有する置換基の電子求引性が大きくなるほど、芳香環上の電子密度が下がり、酸化還元電位  $E$  も大きくなる (= 電子を受け入れやすい)。文献値より見積もったところ、 $E = -0.4$  付近の基質で本反応が起こりにくくなったことが明らかとなっている。すなわち、 $E_{\text{FDP}} < -0.4$  であることが間接的に見積られた。

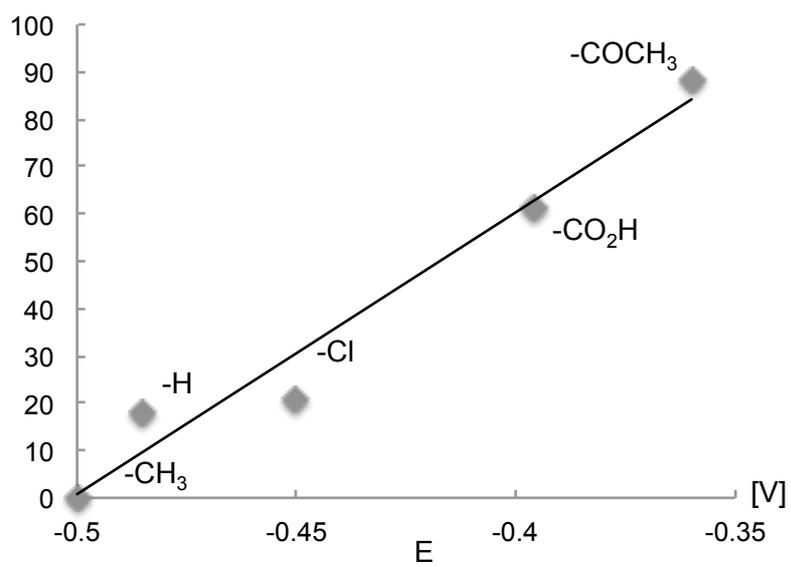


Fig. S4 FDPとニトロベンゼンの反応における酸化還元電位プロット

## 付録 II 蛍光定量性

第四章での本システムの定量性を確認するため、理論式とアニリン体 **16p** の濃度確認を行った (Fig. T1A)。蛍光測定の定量性に関しては、Lambert-Beerの法則をもとに蛍光強度  $F$  は (1A) の式で表されることが知られている。

$$F = \Phi P_0 (1 - 10^{-abc}) \quad \dots (1A)$$

蛍光分子が高濃度の場合では、蛍光分子の自己吸収や凝集・エキシマー形成等の要因で蛍光消光 (いわゆる濃度消光) が起こる。一方で、低濃度の場合 ( $c < 10^{-5}$  [M]) には、近似的に濃度の1次比例が成立する。(1A式に  $10^{-abc} \cong 1 - 2.303abc$  を代入して整理)

$$F \cong (2.303\Phi P_0 abc) * c \quad \dots (1B)$$

となり、蛍光強度  $F$  は濃度  $c$  に対する1次比例式で導かれる。

「前述の理論式は本法における濃度域において成立するか」を、実験的に確かめることとした (Fig. T1B)。数種の濃度 (特に本法で用いる nM 付近) におけるアニリン体 **16p** の標品溶液を調製した。これらの標品溶液を用いて、蛍光測定 (励起/蛍光波長 = 340/404 nm) を行った。その結果、両対数グラフ上のプロットから濃度と強度の関係が線形を示した。また、傾きから次数が 1.03 であることがわかり、1次比例であることが強く示唆された。これにより、本法における、濃度に対する蛍光定量性を実証できた。

### A. Theoretical formula

一般的に蛍光強度は次式で表される.

$$F = \Phi P_0(1-10^{-abc}) \quad \dots (1A)$$

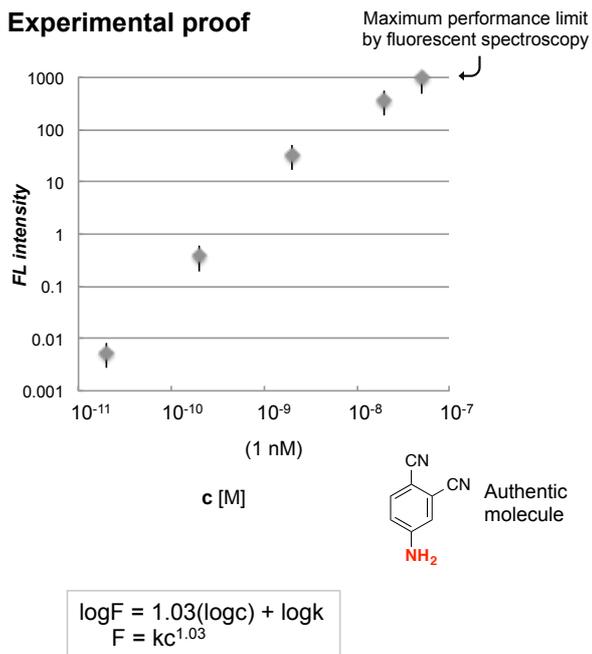
濃度  $c$  が十分に小さい場合 ( $c < 10^{-5}$  [M]),  
 近似的に濃度の 1 次比例が成立する.  
 ( $10^{-abc} \doteq 1 - 2.303abc$  を代入して整理)

$$F \doteq (2.303\Phi P_0 ab) * c \quad \dots (1B)$$

code	name	unit
F	fluorescence intensity	-
$P_0$	incident light intensity	-
$\Phi$	quantum yield	-
a	molar absorptivity	$\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{L}$
b	light path	cm
c	concentration	$\text{molL}^{-1}$

Fig. T1 蛍光比例式と濃度域

### B. Experimental proof



## 謝辞

本研究を進めるにあたり、始終様々な面で適切なご指導、助言を頂いた深瀬浩一教授に心より御礼申し上げます。また、本研究の遂行に際して、実験に関する助言、ご協力をして頂いた田中克典准主任研究員に深く感謝いたします。そして、実験において様々な助言を頂いた、藤本ゆかり准教授（現慶應大学教授）、樺山一哉准教授、下山敦史助教、真鍋良幸助教に深く感謝いたします。E L I S A試験および生体サンプル測定試験にご助力いただいた理化学研究所の谷口直之博士、北爪しのぶ博士に御礼申し上げます。細胞実験にご協力いただいた理化学研究所の吉田稔博士、伊藤昭博博士ならびマックスプランク研究所のH. W a l d m a n n博士に御礼申し上げます。さらに、配属当時から面倒をみていただいたA. P r a d i p t a博士に厚く御礼申し上げます。また研究生活を共に過ごし、切磋琢磨した同期の相羽俊彦君をはじめ、大阪大学大学院理学研究科化学専攻 天然物有機化学研究室、理化学研究所生体機能合成化学研究室内の皆様方に御礼申し上げます。

また研究生活を経済面から支えていただいた大阪大学未来基金グローバル化推進事業、理化学研究所大学院生リサーチアソシエイト、サントリー生命科学財団S U M B O R S C H L A R S H I Pに感謝いたします。

最後に、学生生活を様々な面で支え、温かく見守ってくれた家族に感謝いたします。

2017年2月

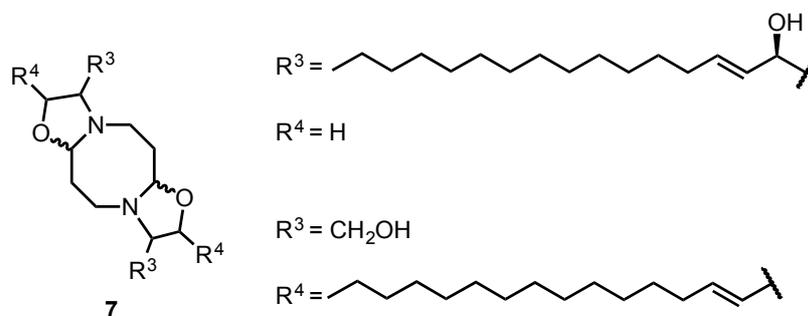
高松 正之

## 実験項

### General information

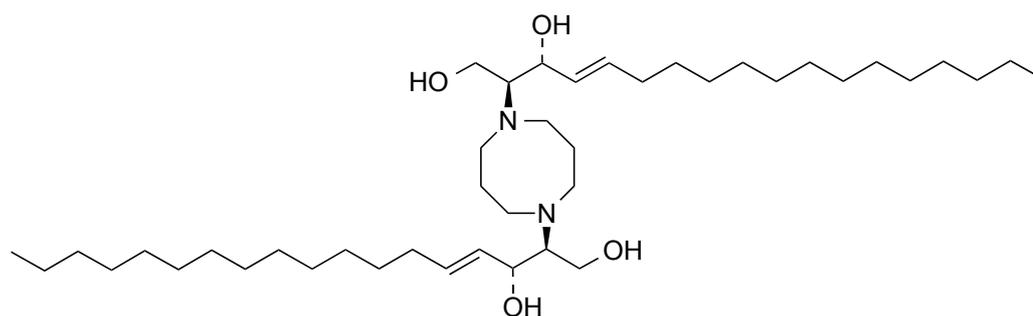
All solvents were of reagent grade. All commercially purchased chemicals were used as received.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were obtained from a JEOL RESONANCE AL400 NMR and a JEOL RESONANCE AL300 NMR spectrometer. Signals were internally referenced to solvent residues. High-resolution mass spectral analyses were carried out using micrOTOF-Q III-HCTM (BRUKER). All fluorescent measurement was carried out using JASCO FP6500 spectrofluorometer with 96-well flat-bottomed plates from Corning Inc. Each value of amount is calculated from intensity of authentic standards. All procedures involving experiment animals was approved by the Ethics Committee of Osaka University and RIKEN. The experiments were performed in accordance with the institutional and national guidelines.

### Reaction with acrolein

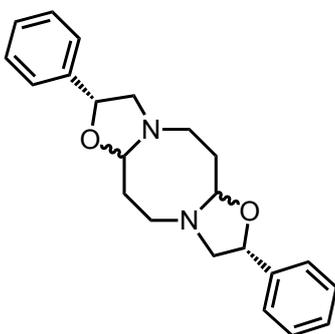


To a solution of sphingosine (4.5 mg, 15  $\mu\text{mol}$ ) in either  $\text{CHCl}_3$  or a PBS buffer solution (1.0 mL) was slowly added acrolein (90 %, 1.0  $\mu\text{L}$ , 15  $\mu\text{mol}$ ) at room temperature. After stirring for 30 min at this temperature, the mixture was concentrated *in vacuo* to give a presumable mixture of **7** as colorless oil. Direct NMR analysis without any purification procedure confirmed the production of **7** in nearly quantitatively yield (colorless oil, quant); IR (neat,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3393(br), 1716, 1465, 1365, 970;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.75 (dt, 2H,  $J = 10.8, 7.5$  Hz), 5.36 (dd, 2H,  $J = 10.8, 6.3$  Hz), 4.58-4.44 (m, 2H), 4.39-4.20 (m, 2H), 3.99-3.71 (m, 4H), 3.58-3.45 (m, 4H), 2.90 (br, 2H), 2.03 (br, 4H), 1.66 (br, 4H), 1.30 (br, 44H), 0.88 (t, 6H,  $J = 6.2$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  133.3, 128.3, 70.9, 70.2, 68.3, 67.6, 65.2, 32.5, 32.1, 29.8, 29.2, 22.8, 14.3; HRESI-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{42}\text{H}_{78}\text{N}_2\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  675.6034, found 675.6049.

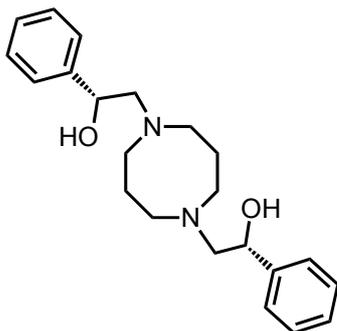
### Reduction of 1,5-diazacyclooctane derivatives



To a solution of a mixture of **7** obtained above (10 mg, 15  $\mu\text{mol}$ ) in anhydrous tetrahydrofuran (0.3 mL) was added  $\text{LiAlH}_4$  (5.6 mg, 150  $\mu\text{mol}$ ) at 0  $^\circ\text{C}$  under  $\text{N}_2$  atmosphere. After the resulting solution was stirred for 90 min at room temperature, the mixture was quenched with  $\text{H}_2\text{O}$  and filtered with a celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo* to give crude products, which were purified by column chromatography on silica gel ( $\text{CHCl}_3$ ) to give diol **8** as a white solid (white solid, quant); IR (neat,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3411(br), 1704, 1361, 1223;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.76 (dt, 2H,  $J = 7.0, 6.0$  Hz), 5.32-5.27 (m, 2H), 4.49-4.19 (m, 2H), 3.95-3.37 (m, 4H), 2.87-2.77 (m, 10H), 2.01 (br, 4H), 1.68 (br, 4H), 1.28 (br, 44H), 0.88 (t, 6H,  $J = 6.0$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  32.5, 32.1, 29.8, 29.6, 29.5, 29.3(br), 22.8, 14.3; HRESI-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{42}\text{H}_{82}\text{N}_2\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  679.6347, found 679.6317.

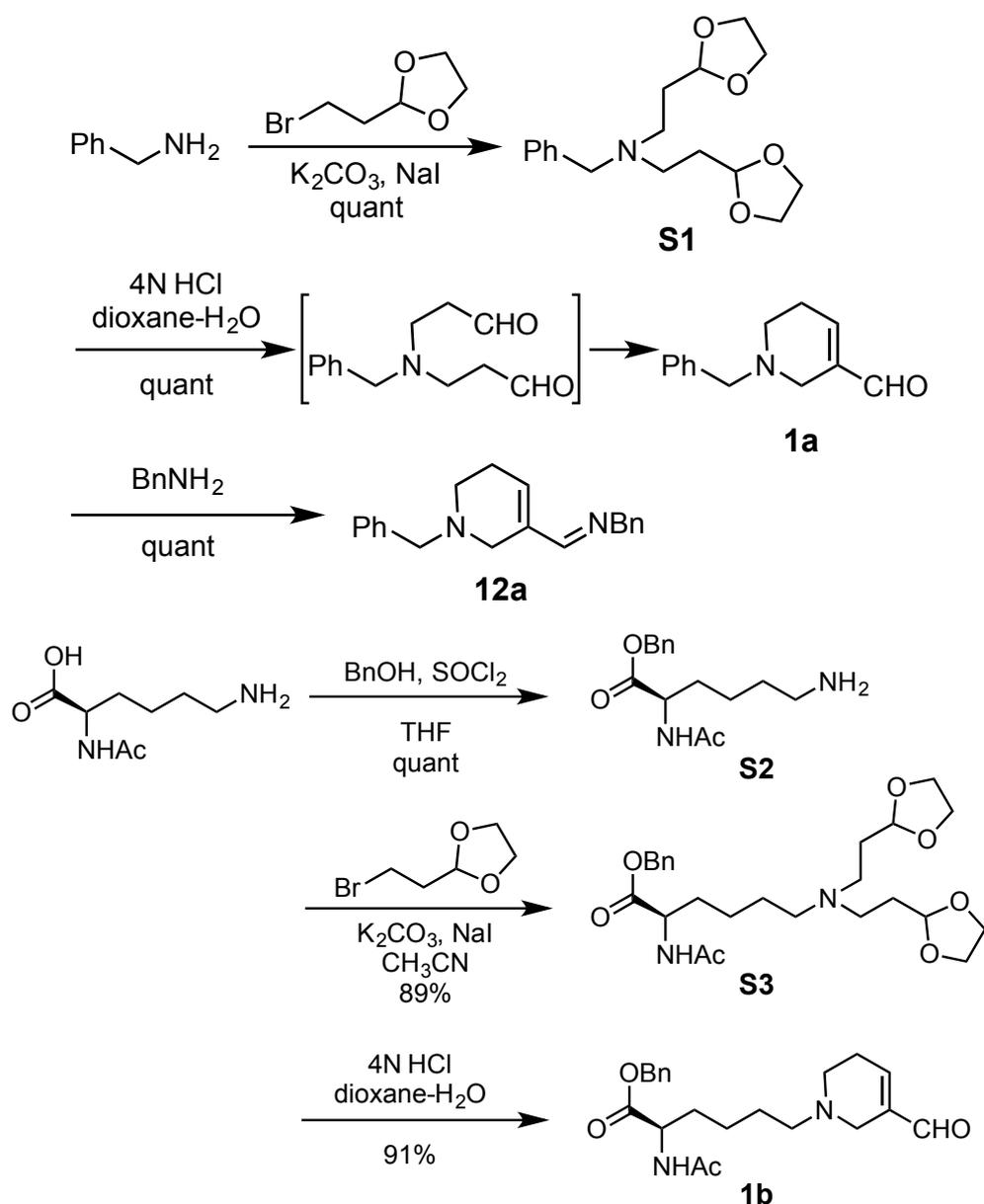


**10**: The compound **10** was prepared similarly to compound **7**. (colorless oil, quant); IR (neat,  $\text{cm}^{-1}$ ) 1709, 1494, 1361, 1222, 1089, 1026;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.38-7.28 (m, 10H, Ph), 5.03-4.62 (m, 4H), 3.57-3.55 (m, 4H), 3.20-2.81 (m, 4H), 2.18-2.11 (m, 4H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  142.2, 128.5, 127.7, 126.0, 73.8, 69.2, 66.2, 50.5, 27.0; HRESI-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  351.2067, found 351.2080.



**11**: The compound **11** was prepared similarly to compound **8**. (colorless oil, 63%); IR (neat,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3331(br), 1651, 1406, 1110, 1015;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.40-7.33 (m, 10H, Ph), 4.71 (td, 2H,  $J = 10.2, 3.0$  Hz), 2.93-2.77 (m, 8H), 2.59-2.47 (m, 4H), 1.86-1.81 (m, 4H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  142.4(br), 128.4, 127.7, 126.1, 69.9(br), 66.1(br), 52.1(br), 29.8(br); HRESI-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  355.2380, found 355.2390.

Preparation of FDPs (1a, 1b)<sup>a</sup>



a) L. Fuentes, U. Osorio, L. Quintero, H. Höpfl, N. Vázquez-Cabrera and F. Sartillo-Piscil, Direct chemical method for preparing 2,3-epoxyamides using sodium chlorite. *J Org Chem* **2012**, *77*, 5515.

**S1**: To a stirred suspension of  $K_2CO_3$  (6.44 g, 46.7 mmol) in 3 mL of acetonitrile at room temperature was added benzylamine (2.08 mL, 18.0 mmol) and sodium iodide (2.7 g, 18.0 mmol). The reaction mixture was stirred for 5 min before 2-bromomethyl-1,3-dioxolane (5.46 mL, 46.7 mmol) dissolved in 3 mL of acetonitrile was added. The reaction mixture was refluxed until the starting materials were completely consumed. Then, the mixture was filtered off, and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by short column chromatography on silica gel to give **S1** as pale yellow oil. (5.70 g, quant);  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.31–7.21 (m, 5H, Ph), 4.87 (t, 2H,  $J = 4.7$  Hz), 3.92–3.78 (m, 8H), 3.58 (s, 2H), 2.59 (t, 4H,  $J = 7.9$  Hz), 1.86–1.81 (m, 4H);  $^{13}C$  NMR (100

MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 139.2, 128.7(2C), 128.6(2C), 128.0, 103.3(2C), 64.6(4C), 50.2, 49.3(2C), 31.2(2C).

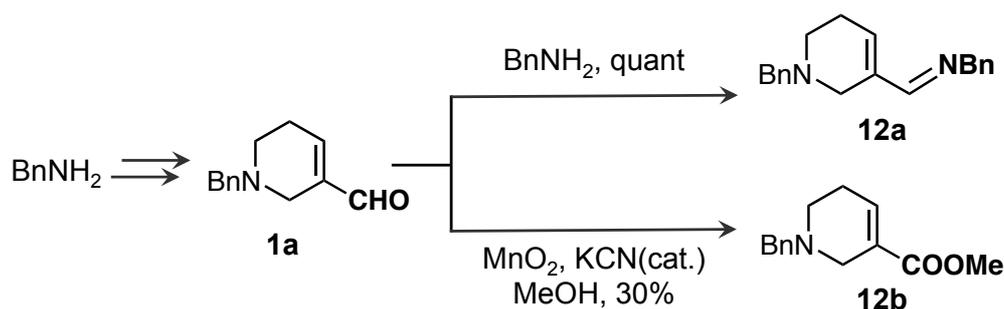
**N**-benzyl 3-formyl-3,4-dehydropiperidine (**1a**): To a flask containing a solution of **S1** (5.1 g, 23.3 mmol) in 1,4-dioxane (3 mL) was added 6 mL of HCl (4 M solution in water) at room temperature. The resulting mixture was stirred under reflux until the total consumption of starting materials. The reaction was quenched with the addition of NaOH until reaching a pH = 8. The biphasic mixture was extracted with EtOAc and dried with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was evaporated under reduced pressure. The desired product was obtained in quantitative yield as brown syrup. (4.68 g, quant); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.40 (s, 1H), 7.39-7.33 (m, 5H, Ph), 6.83 (td, 1H, *J* = 3.6, 1.8 Hz), 3.65 (s, 2H), 3.19 (d, 2H, *J* = 1.8 Hz), 2.60 (t, 2H, *J* = 5.7 Hz), 2.46 (dtd, 2H, *J* = 8.4, 5.7, 3.6 Hz); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 192.2, 148.5, 137.5, 129.0, 128.2, 127.1, 62.4, 49.3, 48.7, 27.2; HRESI-MS *m/z* calcd. for C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>NO [M+H]<sup>+</sup> 202.1226, found 202.1223.

**S2**: To a flask containing a solution of *N*-acetyl lysine (300 mg, 1.6 mmol) in acetonitrile (1 mL) was added benzyl alcohol (1 mL) and thionyl chloride (130 μL, 1.8 mmol) at room temperature. The resulting mixture was stirred at 60 °C until the total consumption of starting materials. The reaction was quenched with the addition of ethanol and ether. The solvent was evaporated under reduced pressure. The desired product was obtained in quantitative yield as brown syrup. (4.68 g, quant); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.36–7.31 (m, 5H, Ph), 5.16 (dd, 2H, *J* = 19, 12 Hz), 4.44–4.40 (m, 1H), 2.87 (t, 2H, *J* = 8.0 Hz), 1.99 (s, 3H), 1.85-1.74 (m, 2H), 1.66-1.64 (m, 2H), 1.43-1.41 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 173.6, 173.2, 137.2, 129.4, 129.3, 128.2, 67.9, 53.7, 40.4, 31.8, 28.0, 23.8, 22.3; HRESI-MS *m/z* calcd for C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 279.1703, found 279.1701.

**S3**: The compound **S3** was prepared similarly to compound **S1**. (78.9 mg, 89%); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.38–7.36 (m, 5H, Ph), 5.17 (dd, 2H, *J* = 17, 12 Hz), 5.04 (t, 2H, *J* = 3.6 Hz), 4.54–4.52 (m, 1H), 4.04–4.02 (m, 4H), 3.86–3.84 (m, 4H), 3.65–3.55 (m, 2H), 3.43–3.40 (m, 4H), 2.18–2.15 (m, 4H), 2.01 (s, 3H), 1.92-1.90 (m, 2H), 1.86-1.84 (m, 2H), 1.57-1.55 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.9, 171.0, 135.5, 128.5, 128.2, 128.1, 100.5, 66.8, 65.2, 64.7, 59.6, 54.1, 52.0, 30.6, 25.8, 23.1, 19.1; HRESI-MS *m/z* calcd for C<sub>25</sub>H<sub>39</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> 479.2752, found 479.2754.

FDP-Lys (AcNH-lys(FDP)-OBn, **1b**): The compound **1b** was prepared similarly to compound **1a**. (34.9 mg, 91%); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.36 (s, 1H), 7.33–7.30 (m, 5H, Ph), 6.81 (brs, 1H), 5.12 (dd, 2H, *J* = 16, 12 Hz), 4.49–4.39 (m, 1H), 3.64–3.58 (m, 2H), 2.56 (brs, 2H), 2.45–2.43 (m, 2H), 1.99 (s, 3H), 1.81-1.78 (m, 2H), 1.71-1.68 (m, 2H), 1.57-1.54 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 192.1, 173.1, 170.3, 148.2, 141.2, 128.7, 128.5, 127.4, 127.0, 65.0, 63.9, 54.0, 52.4, 43.6, 42.2, 32.0, 23.1, 12.2; HRESI-MS *m/z* calcd for C<sub>20</sub>H<sub>41</sub>N<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 373.3061, found 373.3058.

### Preparation of FDP derivativess (12a, 12b)<sup>b</sup>

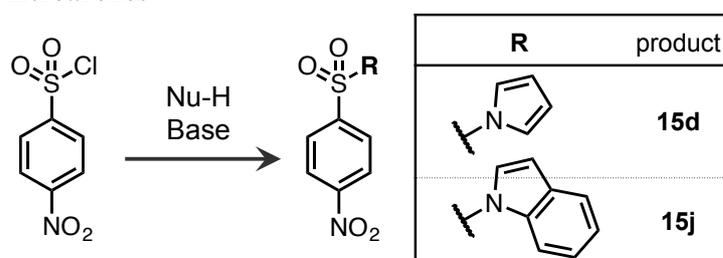


b) Foot, J.; Kanno, H.; Giblin, G.; Taylor, R., Esters and amides from activated alcohols using manganese(IV) dioxide: Tandem oxidation processes. *Synthesis-Stuttgart* **2003**, (7), 1055-1064.

Imine derivative of FDP (**12a**): To a solution of *N*-Bn FDP **1a** (50 mg, 0.25 mmol) in chloroform (0.1 mL) was added benzylamine (27  $\mu\text{L}$ , 0.25 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature until the total consumption of starting materials. The solvent was evaporated under reduced pressure. The desired product **12a** was obtained as brown syrup. (77 mg, quant);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.91 (s, 1H), 7.36–7.30 (m, 10H, Ph), 6.24 (td, 1H,  $J = 2.0, 1.8$  Hz), 4.65 (s, 2H), 3.65 (s, 2H), 3.41 (d, 2H,  $J = 1.8$  Hz), 2.54 (t, 2H,  $J = 3.3$  Hz), 2.33 (br, 2H); HRESI-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  291.1856, found 291.1865.

Ester derivative of FDP (**12b**): To a solution of *N*-Bn FDP **1a** (100 mg, 0.5 mmol) and potassium cyanide (50 mg, 0.77 mmol) in dry MeOH (0.1 mL) was added manganese dioxide (500 mg, 5.7 mmol). After the resulting mixture was stirred at room temperature for 12 h, it was filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by short column chromatography on silica gel to give **12b** as colorless oil. (34 mg, 30%);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.36–7.30 (m, 5H, Ph), 7.03–7.00 (m, 1H, Ph), 3.72 (s, 3H), 3.65 (s, 2H), 3.23 (dd, 2H,  $J = 4.8, 1.2$  Hz), 2.53 (t, 3H,  $J = 6.0$  Hz), 2.36–2.30 (m, 1H, Ph);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.4, 138.1, 138.0, 129.1, 129.0(2C), 128.3(2C), 127.1, 62.4, 51.6, 51.5, 48.3, 26.5; HRESI-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  232.1332, found 232.1332

### Preparation of nitroarenes<sup>c</sup>

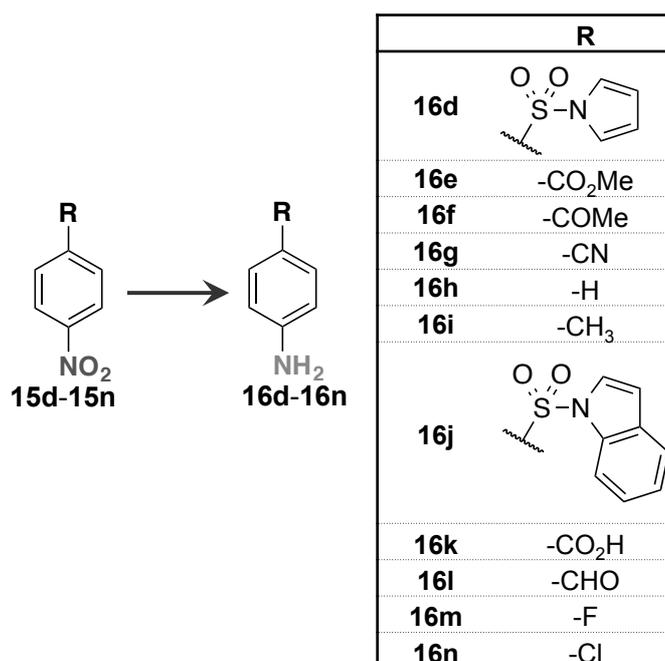


c) Janosik, T.; Shirani, H.; Wahlstrom, N.; Malky, I.; Stensland, B.; Bergman, J., Efficient sulfonation of 1-phenylsulfonyl-1H-pyrroles and 1-phenylsulfonyl-1H-indoles using chlorosulfonic acid in acetonitrile. *Tetrahedron* **2006**, 62 (8), 1699-1707.

1-((4-nitrophenyl)sulfonyl)-1*H*-pyrrole (**15d**): To a stirred suspension of pyrrol (67.0 mg, 1.0 mmol) and sodium hydride (60 mg, 1.5 mmol) in 3 mL of tetrahydrofuran at 0°C was added 4-nosylchloride (310 mg, 1.4 mmol). After the resulting mixture was stirred at room temperature for 8 h, the mixture was quenched with H<sub>2</sub>O, extracted with EtOAc and dried with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by short column chromatography on silica gel to give **15d** as brown crystal. (255 mg, quant); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, *d*<sup>6</sup>-DMSO) δ 8.42 (dd, 2H, *J* = 6.7, 2.0 Hz), 8.23 (dd, 2H, *J* = 6.7, 2.0 Hz), 7.42 (apparent t, 2H, *J* = 2.3 Hz), 6.42 (apparent t, 2H, *J* = 2.3 Hz); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, *d*<sup>6</sup>-DMSO) δ 150.71, 143.0, 128.5(2C), 125.1(2C), 121.4(2C), 114.8(2C)

1-((4-nitrophenyl)sulfonyl)-1*H*-indole (**15j**): The compound **15j** was prepared similarly to compound **15d**. (280.4 mg, 93%); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.24 (dd, 2H, *J* = 9.1, 2.4 Hz), 8.02 (dd, 2H, *J* = 9.1, 2.4 Hz), 7.97 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 7.53-7.51 (m, 2H), 7.33 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 8.3, 1.2 Hz), 7.25 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 8.3, 1.2 Hz), 6.70 (d, 1H, *J* = 3.6 Hz); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 150.5, 143.3, 134.7, 130.9, 129.1, 128.0(2C), 126.0, 125.2, 124.5(2C), 124.1, 121.8, 113.4, 110.

#### A general procedure for the reduction of nitroarenes with FDP



To a solution of nitroarene **15d** (25.0 mg, 0.10 mmol) and CaCl<sub>2</sub> (55.0 mg, 0.50 mmol) in DMF (0.2 mL) was added N-benzyl 3-formyl-3,4-dehydropiperidine (N-Bn FDP, 60.0 mg, 0.30 mmol) at 100 °C. After stirring for several hours at this temperature, the mixture was concentrated *in vacuo* to give a crude mixture as sticky gum. The crude residue was monitored in NMR or purified by either preparative TLC or silica gel flash column chromatography with the hexane-EtOAc solvent mixture as the eluting system to give the desired aniline product **16d** (19.6 mg, 89% yield)

1-((4-aminophenyl)sulfonyl)-1*H*-pyrrole (**16d**, 89%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.63 (dd, 2H, *J* = 6.7, 2.0 Hz), 7.13 (apparent t, 2H, *J* = 2.3 Hz), 6.63 (dd, 2H, *J* = 6.8, 2.0 Hz), 6.26 (apparent t, 2H, *J* =

2.3 Hz), 4.21 (brs, NH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 151.6, 129.2(2C), 126.8, 120.6(2C), 114.1(2C), 113.1(2C); HRESI-MS *m/z* calcd for C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 223.0536, found 223.0534.

Methyl 4-aminobenzoate (**16e**, 69%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.85 (dd, 2H, *J* = 8.7, 2.8 Hz), 6.64 (dd, 2H, *J* = 8.7, 2.8 Hz), 4.10 (brs, NH<sub>2</sub>), 3.87 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 167.2, 150.8, 131.2(2C), 119.7, 113.9(2C), 51.6; HRESI-MS *m/z* calcd for C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>1</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 152.0706, found 152.0709.

4-aminoacetophenone (**16f**, 88%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.79 (dd, 2H, *J* = 8.6, 1.4 Hz), 6.63 (dd, 2H, *J* = 8.7, 1.4 Hz), 4.23 (brs, NH<sub>2</sub>), 2.49 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 196.7, 151.3, 130.9(2C), 127.7, 119.7, 113.7(2C), 26.1; HRESI-MS *m/z* calcd for C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>N<sub>1</sub>O<sub>1</sub> [M+H]<sup>+</sup> 136.0762, found 136.0757.

4-aminobenzonitrile (**16g**, 82%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.41 (dd, 2H, *J* = 8.6, 1.2 Hz), 6.64 (dd, 2H, *J* = 8.6, 1.2 Hz), 4.17 (brs, NH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 150.5, 133.9(2C), 120.2, 114.6(2C), 100.4; HRESI-MS *m/z* calcd for C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 119.0604, found. 119.0605

aniline (**16h**, 18%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.13 (ddd, 2H, *J* = 7.5, 7.5, 1.2 Hz), 6.74 (tt, 1H, *J* = 7.5, 1.2 Hz), 6.65 (dd, 2H, *J* = 7.5, 1.2 Hz), 3.51(brs, NH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 146.3, 129.2(2C), 118.4, 115.0(2C)

1-((4-aminophenyl)sulfonyl)-1*H*-indole (**16j**, 80%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.97 (dd, 1H, *J* = 8.3, 1.2 Hz), 7.66 (dd, 2H, *J* = 9.1, 2.4 Hz), 7.55(d, 1H, *J* = 3.6 Hz), 7.52 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 7.29 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 8.3, 1.2 Hz), 7.20 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 8.3, 1.2 Hz), 6.62 (d, 1H, *J* = 3.6 Hz), 6.55 (dd, 2H, *J* = 9.1, 2.4 Hz), 4.11(brs, NH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 153.5, 151.3, 134.8, 130.7, 129.1 (2C), 126.3 (2C), 124.2, 122.9, 121.2, 113.9, 113.5, 108.4; HRESI-MS *m/z* calcd for C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 273.0692, found 273.0691.

4-aminobenzoic acid (**16k**, 61%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, *d*<sup>6</sup>-DMSO) δ 7.62 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 6.54 (dd, 2H, *J* = 8.4 Hz), 5.89 (brs, NH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, *d*<sup>6</sup>-DMSO) δ 167.6, 153.2, 131.3(2C), 116.9, 112.6(2C); HRESI-MS *m/z* calcd for C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>1</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 138.0550, found 138.0539.

4-aminobenzaldehyde (**16l**, 40%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, *d*<sup>6</sup>-DMSO) δ 9.56 (s, 1H), 7.54 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 6.62 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 4.14; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, *d*<sup>6</sup>-DMSO) δ 189.7, 155.3(2C), 132.2, 124.8, 113.1(2C); HRESI-MS *m/z* calcd for C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>N<sub>1</sub>O<sub>1</sub> [M+H]<sup>+</sup> 122.0600, found 122.0610

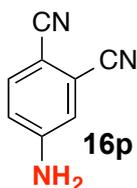
4-fluoroaniline (**16m**, 73%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.84-6.78 (m, 2H), 6.56-6.51 (m, 2H), 3.51(brs, NH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.1(d, *J* = 235 Hz, C-F), 142.4, 115.8(2C), 115.3(2C); HRESI-MS *m/z* calcd for C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>F<sub>1</sub>N<sub>1</sub> [M+H]<sup>+</sup> 112.0557, found 112.0558.

4-chloroaniline (**16n**, 21%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.09 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 6.58 (d, 2H, *J* =

8.6 Hz), 3.45(brs, NH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 145.4, 129.2(2C), 123.2, 116.3(2C); HRESI-MS *m/z* calcd for C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>N<sub>1</sub>C<sub>1</sub> [M+H]<sup>+</sup> 128.0262, found 128.0263.



3-aminobenzonitrile (**16o**, 22%): <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.16 (dd, 1H, *J* = 7.2, 7.2 Hz), 6.94 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz), 6.83-6.77 (m, 2H), 3.82 (brs, NH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 147.0, 130.2(2C), 122.1, 119.3, 117.6, 113.1; HRESI-MS *m/z* calcd for C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 119.0604, found. 119.0612. Fluorescent excitation/emission: 307/392 nm, quantum yield Φ = 0.002 in DMF.



4-aminophthalonitrile (**16p**, 78%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, *d*<sup>6</sup>-DMSO) δ 7.64 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 7.03 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 6.68 (dd, 1H, *J* = 8.7, 2.4 Hz), 6.72 (brs, NH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO) δ 153.2, 135.1, 117.6, 117.3, 117.1, 116.5, 115.6, 97.9; HRESI-MS *m/z* calcd for C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 166.0400, found 166.0380. Fluorescent excitation/emission: 304/404 nm, quantum yield Φ = 0.570 in DMF.

## Fluorescent measurement

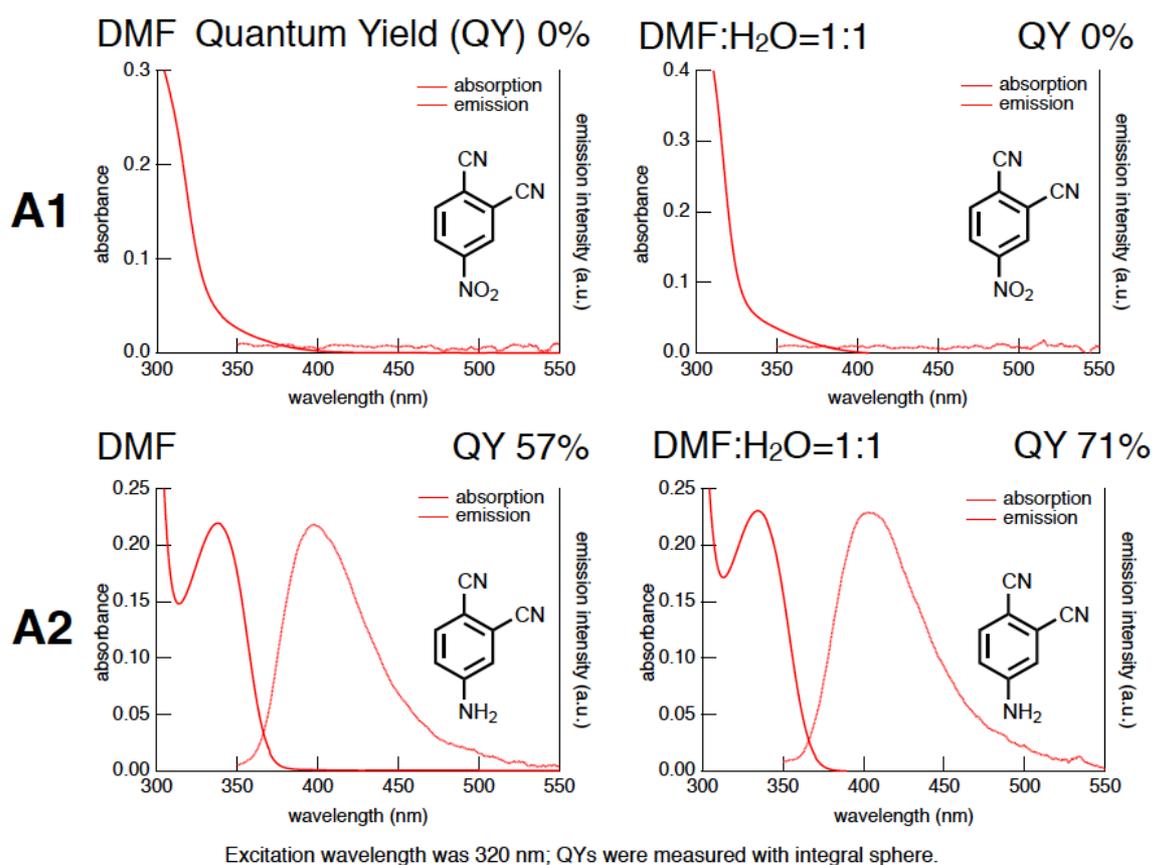


Figure S1. Absorption and fluorescence spectra of probe and corresponding product

## Sample Preparation and Detection Procedure

Normal rat serum (100  $\mu$ L) purchased from Wako Pure Chemical Industry Ltd. was treated with acrolein 100  $\mu$ L (>100-fold equivalent to serum proteins) for a specific number of days (0, 1, 20, or 60 d). After which, the sample was diluted to 1 mL with distilled water. Fresh urine samples (100  $\mu$ L) were supplied from C57BL/6 mouse of RIKEN bio-resource center and diluted 20-fold with distilled water. To a solution of nitroarene probe **15p** (1.7 mg, 10.0  $\mu$ mol) and CaCl<sub>2</sub> (5.5 mg, 50.0  $\mu$ mol) in DMF-H<sub>2</sub>O (50  $\mu$ L) was added a given urine sample. After stirring for 5 h at 100  $^{\circ}$ C, the crude reaction mixture was filtered, and the resulting filtrate was measured by spectrofluorometer at 340 nm/404 nm.

## ELISA Assay

The measurement was conducted with the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit system (TAKARA, Acrolein-Lysine adduct competitive ELISA kit) and followed by attached instructions. The absorbance at 450 nm was measured using micro plate reader (ImmunoMini NJ1000). Data represent averages of more than twice assay with standard deviations from individual experiments.

## 参考文献

1. Alarcon, R. A., Acrolein. IV. Evidence for the formation of the cytotoxic aldehyde acrolein from enzymatically oxidized spermine or spermidine. *Arch Biochem Biophys* 1970, 137 (2), 365-72.
2. Kehrer, J. P.; Biswal, S. S., The molecular effects of acrolein. *Toxicol Sci* 2000, 57 (1), 6-15.
3. Kimes, B. W.; Morris, D. R., Preparation and stability of oxidized polyamines. *Biochim Biophys Acta* 1971, 228 (1), 223-34.
4. Houen, G.; Bock, K.; Jensen, A. L., HPLC and NMR investigation of the serum amine oxidase catalyzed oxidation of polyamines. *Acta Chem Scand* 1994, 48 (1), 52-60.
5. Hensley, K.; Robinson, K. A.; Gabbita, S. P.; Salsman, S.; Floyd, R. A., Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 2000, 28 (10), 1456-62.
6. Stevens, J. F.; Maier, C. S., Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol Nutr Food Res* 2008, 52 (1), 7-25.
7. Uchida, K.; Kanematsu, M.; Morimitsu, Y.; Osawa, T.; Noguchi, N.; Niki, E., Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins. *J Biol Chem* 1998, 273 (26), 16058-66.
8. West, J. D.; Marnett, L. J., Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death. *Chem Res Toxicol* 2006, 19 (2), 173-94.
9. Sharmin, S.; Sakata, K.; Kashiwagi, K.; Ueda, S.; Iwasaki, S.; Shirahata, A.; Igarashi, K., Polyamine cytotoxicity in the presence of bovine serum amine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 282 (1), 228-35.
10. Yoshida, M.; Tomitori, H.; Machi, Y.; Hagihara, M.; Higashi, K.; Goda, H.; Ohya, T.; Niitsu, M.; Kashiwagi, K.; Igarashi, K., Acrolein toxicity: Comparison with reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun* 2009, 378 (2), 313-8.
11. Alarcon, R. A.; Meienhofer, J., Formation of the cytotoxic aldehyde acrolein during in vitro degradation of cyclophosphamide. *Nat New Biol* 1971, 233 (42), 250-2.
12. Shao, B.; Fu, X.; McDonald, T. O.; Green, P. S.; Uchida, K.; O'Brien, K. D.; Oram, J. F.; Heinecke, J. W., Acrolein impairs ATP binding cassette transporter A1-dependent cholesterol export from cells through site-specific modification of apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* 2005, 280 (43), 36386-96.
13. Vindis, C.; Escargueil-Blanc, I.; Elbaz, M.; Marcheix, B.; Grazide, M. H.; Uchida, K.; Salvayre, R.; Nègre-Salvayre, A., Desensitization of platelet-derived growth factor receptor-beta by oxidized lipids in vascular cells and atherosclerotic lesions: prevention by aldehyde scavengers. *Circ Res* 2006, 98 (6), 785-92.

14. Vindis, C.; Escargueil-Blanc, I.; Uchida, K.; Elbaz, M.; Salvayre, R.; Negre-Salvayre, A., Lipid oxidation products and oxidized low-density lipoproteins impair platelet-derived growth factor receptor activity in smooth muscle cells: implication in atherosclerosis. *Redox Rep* 2007, *12* (1), 96-100.
15. Calingasan, N. Y.; Uchida, K.; Gibson, G. E., Protein-bound acrolein: a novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1999, *72* (2), 751-6.
16. Hamann, K.; Durkes, A.; Ouyang, H.; Uchida, K.; Pond, A.; Shi, R., Critical role of acrolein in secondary injury following ex vivo spinal cord trauma. *J Neurochem* 2008, *107* (3), 712-21.
17. Satoh, K.; Yamada, S.; Koike, Y.; Igarashi, Y.; Toyokuni, S.; Kumano, T.; Takahata, T.; Hayakari, M.; Tsuchida, S.; Uchida, K., A 1-hour enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of acrolein- and hydroxynonenal-modified proteins by epitope-bound casein matrix method. *Anal Biochem* 1999, *270* (2), 323-8.
18. Kawai, Y.; Furuhata, A.; Toyokuni, S.; Aratani, Y.; Uchida, K., Formation of acrolein-derived 2'-deoxyadenosine adduct in an iron-induced carcinogenesis model. *J Biol Chem* 2003, *278* (50), 50346-54.
19. Akatsuka, S.; Aung, T. T.; Dutta, K. K.; Jiang, L.; Lee, W. H.; Liu, Y. T.; Onuki, J.; Shirase, T.; Yamasaki, K.; Ochi, H.; Naito, Y.; Yoshikawa, T.; Kasai, H.; Tominaga, Y.; Sakumi, K.; Nakabeppu, Y.; Kawai, Y.; Uchida, K.; Yamasaki, A.; Tsuruyama, T.; Yamada, Y.; Toyokuni, S., Contrasting genome-wide distribution of 8-hydroxyguanine and acrolein-modified adenine during oxidative stress-induced renal carcinogenesis. *Am J Pathol* 2006, *169* (4), 1328-42.
20. Zarkovic, K.; Uchida, K.; Kolenc, D.; Hlupic, L.; Zarkovic, N., Tissue distribution of lipid peroxidation product acrolein in human colon carcinogenesis. *Free Radic Res* 2006, *40* (6), 543-52.
21. Schaefer, S.; Kajimura, M.; Tsuyama, S.; Uchida, K.; Sato, E.; Inoue, M.; Suematsu, M.; Watanabe, K., Aberrant utilization of nitric oxide and regulation of soluble guanylate cyclase in rat diabetic retinopathy. *Antioxid Redox Signal* 2003, *5* (4), 457-65.
22. Iuchi, Y.; Kaneko, T.; Matsuki, S.; Ishii, T.; Ikeda, Y.; Uchida, K.; Fujii, J., Carbonyl stress and detoxification ability in the male genital tract and testis of rats. *Histochem Cell Biol* 2004, *121* (2), 123-30.
23. Cameron-Schaefer, S.; Kondo, K.; Ishige, A.; Tsuyama, S.; Uchida, K.; Hanawa, T.; Suematsu, M.; Watanabe, K., Maintaining the redox-balance intact: gosha-jinki-gan but not insulin activates retinal soluble guanylate cyclase in diabetic rats. *Ophthalmic Res* 2006, *38* (2), 95-104.
24. Yong, P. H.; Zong, H.; Medina, R. J.; Limb, G. A.; Uchida, K.; Stitt, A. W.; Curtis, T. M., Evidence supporting a role for N-(3-formyl-3,4-dehydropiperidino)lysine accumulation in Müller glia dysfunction and death in diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2010, *16*, 2524-38.
25. Iuchi, Y.; Okada, F.; Takamiya, R.; Kibe, N.; Tsunoda, S.; Nakajima, O.; Toyoda, K.; Nagae, R.; Suematsu, M.; Soga, T.; Uchida, K.; Fujii, J., Rescue of anaemia and autoimmune responses in SOD1-deficient mice by transgenic expression of human SOD1 in erythrocytes. *Biochem J* 2009, *422* (2), 313-20.

26. Iuchi, Y.; Kibe, N.; Tsunoda, S.; Suzuki, S.; Mikami, T.; Okada, F.; Uchida, K.; Fujii, J., Implication of oxidative stress as a cause of autoimmune hemolytic anemia in NZB mice. *Free Radic Biol Med* 2010, *48* (7), 935-44.
27. Tomitori, H.; Usui, T.; Saeki, N.; Ueda, S.; Kase, H.; Nishimura, K.; Kashiwagi, K.; Igarashi, K., Polyamine oxidase and acrolein as novel biochemical markers for diagnosis of cerebral stroke. *Stroke* 2005, *36* (12), 2609-13.
28. Shi, R.; Rickett, T.; Sun, W., Acrolein-mediated injury in nervous system trauma and diseases. *Mol Nutr Food Res* 2011, *55* (9), 1320-31.
29. Esterbauer, H.; Schaur, R. J.; Zollner, H., Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991, *11* (1), 81-128.
30. Huang, Y. J.; Jin, M. H.; Pi, R. B.; Zhang, J. J.; Ouyang, Y.; Chao, X. J.; Chen, M. H.; Liu, P. Q.; Yu, J. C.; Ramassamy, C.; Dou, J.; Chen, X. H.; Jiang, Y. M.; Qin, J., Acrolein induces Alzheimer's disease-like pathologies in vitro and in vivo. *Toxicol Lett* 2013, *217* (3), 184-91.
31. Leung, G.; Sun, W.; Zheng, L.; Brookes, S.; Tully, M.; Shi, R., Anti-acrolein treatment improves behavioral outcome and alleviates myelin damage in experimental autoimmune encephalomyelitis mouse. *Neuroscience* 2011, *173*, 150-5.
32. Pocernich, C. B.; Cardin, A. L.; Racine, C. L.; Lauderback, C. M.; Butterfield, D. A., Glutathione elevation and its protective role in acrolein-induced protein damage in synaptosomal membranes: relevance to brain lipid peroxidation in neurodegenerative disease. *Neurochem Int* 2001, *39* (2), 141-9.
33. Powick, W., A new test for acrolein and its bearing on rancidity in fats. *Industrial and Engineering Chemistry* 1923, *15*, 66-66.
34. Pradipta, A. R. S., ElenaTakamatsu, Masayuki; Kurbangalieva, A.; Tanaka, K., Progress in the Development of Reaction-Based Sensors for Detection of Acrolein in Biological Samples. *BioNanoScience* 2016, *6* (4), 473.
35. Alarcon, R. A., Fluorometric determination of acrolein and related compounds with m-aminophenol. *Anal Chem* 1968, *40* (11), 1704-8.
36. Bohnenstengel, F.; Eichelbaum, M.; Golbs, E.; Kroemer, H. K., High-performance liquid chromatographic determination of acrolein as a marker for cyclophosphamide bioactivation in human liver microsomes. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997, *692* (1), 163-8.
37. Boor, P. J.; Ansari, G. A., High-performance liquid chromatographic method for quantitation of acrolein in biological samples. *J Chromatogr* 1986, *375* (1), 159-64.
38. Büldt, A.; Karst, U., 1-Methyl-1-(2,4-dinitrophenyl)hydrazine as a New Reagent for the HPLC

Determination of Aldehydes. *Anal Chem* 1997, 69 (17), 3617-22.

39. Togashi, M.; Terai, T.; Kojima, H.; Hanaoka, K.; Igarashi, K.; Hirata, Y.; Urano, Y.; Nagano, T., Practical fluorescence detection of acrolein in human plasma via a two-step tethering approach. *Chem Commun (Camb)* 2014, 50 (95), 14946-8.

40. Rachmat, P. A.; Misako, T.; Ikuhiko, N.; Elena, S.; Almira, K.; Shinobu, K.; Naoyuki, T.; Katsunori, T., Uncatalyzed Click Reaction between Phenyl Azides and Acrolein: 4-Formyl-1,2,3-Triazolines as "Clicked" Markers for Visualizations of Extracellular Acrolein Released from Oxidatively Stressed Cells. *ACS Sensors* 2016, 1 (5), 623-632.

41. Uchida, K.; Kanematsu, M.; Sakai, K.; Matsuda, T.; Hattori, N.; Mizuno, Y.; Suzuki, D.; Miyata, T.; Noguchi, N.; Niki, E.; Osawa, T., Protein-bound acrolein: potential markers for oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95 (9), 4882-7.

42. Zhang, X.; Lai, Y.; McCance, D. R.; Uchida, K.; McDonald, D. M.; Gardiner, T. A.; Stitt, A. W.; Curtis, T. M., Evaluation of N (epsilon)-(3-formyl-3,4-dehydropiperidino)lysine as a novel biomarker for the severity of diabetic retinopathy. *Diabetologia* 2008, 51 (9), 1723-30.

43. Maeshima, T.; Honda, K.; Chikazawa, M.; Shibata, T.; Kawai, Y.; Akagawa, M.; Uchida, K., Quantitative analysis of acrolein-specific adducts generated during lipid peroxidation-modification of proteins in vitro: identification of N(epsilon)-(3-propanal)histidine as the major adduct. *Chem Res Toxicol* 2012, 25 (7), 1384-92.

44. Tran, T. N.; Kosaraju, M. G.; Tamamizu-Kato, S.; Akintunde, O.; Zheng, Y.; Bielicki, J. K.; Pinkerton, K.; Uchida, K.; Lee, Y. Y.; Narayanaswami, V., Acrolein modification impairs key functional features of rat apolipoprotein E: identification of modified sites by mass spectrometry. *Biochemistry* 2014, 53 (2), 361-75.

45. Tanaka, N.; Tajima, S.; Ishibashi, A.; Uchida, K.; Shigematsu, T., Immunohistochemical detection of lipid peroxidation products, protein-bound acrolein and 4-hydroxynonenal protein adducts, in actinic elastosis of photodamaged skin. *Arch Dermatol Res* 2001, 293 (7), 363-7.

46. Shibata, N.; Hirano, A.; Hedley-Whyte, E. T.; Dal Canto, M. C.; Nagai, R.; Uchida, K.; Horiuchi, S.; Kawaguchi, M.; Yamamoto, T.; Kobayashi, M., Selective formation of certain advanced glycation end products in spinal cord astrocytes of humans and mice with superoxide dismutase-1 mutation. *Acta Neuropathol* 2002, 104 (2), 171-8.

47. Kudo, A.; Kashiwagi, S.; Kajimura, M.; Yoshimura, Y.; Uchida, K.; Arai, S.; Suematsu, M., Kupffer cells alter organic anion transport through multidrug resistance protein 2 in the post-cold ischemic rat liver. *Hepatology* 2004, 39 (4), 1099-109.

48. Luo, J.; Uchida, K.; Shi, R., Accumulation of acrolein-protein adducts after traumatic spinal cord injury. *Neurochem Res* 2005, 30 (3), 291-5.

49. Tanaka, K.; Katsumura, S., Highly stereoselective asymmetric 6pi-azaelectrocyclization utilizing the novel 7-alkyl substituted cis-1-amino-2-indanols: formal synthesis of 20-epiuleine. *J Am Chem Soc* 2002, *124* (33), 9660-1.
50. Tanaka, K.; Masuyama, T.; Hasegawa, K.; Tahara, T.; Mizuma, H.; Wada, Y.; Watanabe, Y.; Fukase, K., A submicrogram-scale protocol for biomolecule-based PET imaging by rapid 6 pi-azaelectrocyclization: Visualization of sialic acid dependent circulatory residence of glycoproteins. *Angewandte Chemie-International Edition* 2008, *47* (1), 102-105.
51. Tanaka, K.; Fukase, K.; Katsumura, S., Exploring a Unique Reactivity of 6 pi-Azaelectrocyclization to Enzyme Inhibition, Natural Products Synthesis, and Molecular Imaging: An Approach to Chemical Biology by Synthetic Chemists. *Synlett* 2011, (15), 2115-2139.
52. Tanaka, K.; Siwu, E.; Hirotsuki, S.; Iwata, T.; Matsumoto, R.; Kitagawa, Y.; Pradipta, A.; Okumura, M.; Fukase, K., Efficient synthesis of 2,6,9-triazabicyclo[3.3.1]nonanes through amine-mediated formal [4+4] reaction of unsaturated imines. *Tetrahedron Letters* 2012, *53* (44), 5899-5902.
53. Tanaka, K.; Kitadani, M.; Tsutsui, A.; Pradipta, A. R.; Imamaki, R.; Kitazume, S.; Taniguchi, N.; Fukase, K., A cascading reaction sequence involving ligand-directed azaelectrocyclization and autooxidation-induced fluorescence recovery enables visualization of target proteins on the surfaces of live cells. *Org Biomol Chem* 2014, *12* (9), 1412-8.
54. Pradipta, A.; Tanaka, K., Unexplored Reactivity of N-Alkyl Unsaturated Imines: A Simple Procedure for Producing Optically Active 1,3-Diamines via a Stereocontrolled Formal [4+2] and [4+2+2] Iminocycloaddition. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 2016, *89* (3), 337-345.
55. Pradipta, A.; Tanaka, K., SYNTHESIS OF 3,7,9-AND 2,6,9-TRIAZABICYCLO[3.3.1]NONANE DERIVATIVES. *Heterocycles* 2013, *87* (10), 2001-2014.
56. Tanaka, K.; Matsumoto, R.; Pradipta, A.; Kitagawa, Y.; Okumura, M.; Manabe, Y.; Fukase, K., Facile Preparation of 1,5-Diazacyclooctanes from Unsaturated Imines: Effects of the Hydroxyl Groups on [4+4] Dimerization. *Synlett* 2014, *25* (7), 1026-1030.
57. Pradipta, A.; Tsutsui, A.; Ogura, A.; Hanashima, S.; Yamaguchi, Y.; Kurbangalieva, A.; Tanaka, K., Microfluidic Mixing of Polyamine with Acrolein Enables the Detection of the [4+4] Polymerization of Intermediary Unsaturated Imines: The Properties of a Cytotoxic 1,5-Diazacyclooctane Hydrogel. *Synlett* 2014, *25* (17), 2442-2446.
58. Tsutsui, A.; Pradipta, A.; Saigitbatalova, E.; Kurbangalieva, A.; Tanaka, K., Exclusive formation of imino[4+4]cycloaddition products with biologically relevant amines: plausible candidates for acrolein biomarkers and biofunctional modulators. *Medchemcomm* 2015, *6* (3), 431-436.
59. Okada, T.; Nakamura, S., [Role of S1P acting both inside and outside the cells]. *Seikagaku* 2012, *84*

(2), 92-101.

60. Tsunoda, M., [Role of catecholamine metabolism in blood pressure regulation using chemiluminescence reaction detection]. *Yakugaku Zasshi* 2008, *128* (11), 1589-94.
61. Fuentes, L.; Osorio, U.; Quintero, L.; Höpfl, H.; Vázquez-Cabrera, N.; Sartillo-Piscil, F., Direct chemical method for preparing 2,3-epoxyamides using sodium chlorite. *J Org Chem* 2012, *77* (13), 5515-24.
62. Takamatsu, M.; Fukase, K.; Kurbangalieva, A.; Tanaka, K., Imino [4+4] cycloaddition products as exclusive and biologically relevant acrolein-amine conjugates are intermediates of 3-formyl-3,4-dehydropiperidine (FDP), an acrolein biomarker. *Bioorg Med Chem* 2014, *22* (22), 6380-6.
63. Furuhashi, A.; Ishii, T.; Kumazawa, S.; Yamada, T.; Nakayama, T.; Uchida, K., N(epsilon)-(3-methylpyridinium)lysine, a major antigenic adduct generated in acrolein-modified protein. *J Biol Chem* 2003, *278* (49), 48658-65.
64. Aizpurua, J. M.; Palomo, C.; Fratila, R. M.; Ferrón, P.; Benito, A.; Gómez-Bengoia, E.; Miranda, J. I.; Santos, J. I., Mechanistic insights on the magnesium(II) ion-activated reduction of methyl benzoylformate with chelated NADH peptide beta-lactam models. *J Org Chem* 2009, *74* (17), 6691-702.
65. Sharma, S.; Kumar, M.; Kumar, V.; Kumar, N., Metal-free transfer hydrogenation of nitroarenes in water with vasicine: revelation of organocatalytic facet of an abundant alkaloid. *J Org Chem* 2014, *79* (19), 9433-9.
66. Janosik, T.; Shirani, H.; Wahlstrom, N.; Malky, I.; Stensland, B.; Bergman, J., Efficient sulfonation of 1-phenylsulfonyl-1H-pyrroles and 1-phenylsulfonyl-1H-indoles using chlorosulfonic acid in acetonitrile. *Tetrahedron* 2006, *62* (8), 1699-1707.
67. Foot, J.; Kanno, H.; Giblin, G.; Taylor, R., Esters and amides from activated alcohols using manganese(IV) dioxide: Tandem oxidation processes. *Synthesis-Stuttgart* 2003, (7), 1055-1064.
68. Oshima, J.; Shiobara, S.; Naoumi, H.; Kaneko, S.; Yoshihara, T.; Mishra, A. K.; Tobita, S., Extreme fluorescence sensitivity of some aniline derivatives to aqueous and nonaqueous environments: mechanistic study and its implication as a fluorescent probe. *J Phys Chem A* 2006, *110* (14), 4629-37.
69. Wang, R., Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 2002, *16* (13), 1792-8.
70. Takamatsu, M.; Fukase, K.; Oka, R.; Kitazume, S.; Taniguchi, N.; Tanaka, K., A Reduction-Based Sensor for Acrolein Conjugates with the Inexpensive Nitrobenzene as an Alternative to Monoclonal Antibody. *Scientific Reports* 2016, *6*.