



Title	X線によるアゾ結合の還元的開裂を鍵反応とするケージド化合物の開発に向けた検討
Author(s)	小河原, 浩輝
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第16786号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16786
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99631
Type	doctoral thesis
File Information	Koki_Ogawara.pdf, 全文



博士学位論文

X線によるアゾ結合の還元的開裂を鍵反応とする
ケージド化合物の開発に向けた検討

小河原 浩輝

北海道大学大学院生命科学院
生命科学専攻 生命医薬科学コース
生体分析化学研究室

2026 年 3 月

(略語表) 本論文中で記載のない略語には以下を用いた。

AcOEt	ethyl acetate
aq.	aqueous solution
BNPC	bis(4-nitrophenyl) carbonate
¹³ C-NMR	carbon nuclear magnetic resonance
DCM	dichloromethane
DIPEA	<i>N, N</i> -diisopropylethylamine
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
ESI-MS	electrospray ionization-mass spectrometer
EtOH	ethanol
FBS	fetal bovine serum
GRRM17	global reaction route mapping 17
HCl	hydrogen chloride
HOMO	highest occupied molecular orbital
HPLC	high-performance liquid chromatography
HRMS	high-resolution mass spectrometer
¹ H-NMR	proton nuclear magnetic resonance
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometer
LUMO	lowest unoccupied molecular orbital
MeCN	acetonitrile
MeOH	methanol
NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidone
NOBF ₄	nitrosonium tetrafluoroborate

PB	phosphate buffer
PBS	phosphate-buffered saline
RP-HPLC	reverse phase high-performance liquid chromatography
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640 medium
RT	room temperature
sat.	saturated
SOMO	singly occupied molecular orbital
TBAF	tetrabutylammonium fluoride
TBSCl	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl chloride
TEA	triethylamine
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran

目次

序論	6
第一章: 水素結合によるアゾ結合の開裂効率の向上に向けた検討	12
化合物の設計と合成	13
Azo1-4 の還元電位の測定	14
硬 X 線照射後の Azo1-4 溶液の分解生成物の分析	15
分解した Azo1-4 と放出された 3-ABA の定量評価	18
硬 X 線照射後の副生成物の解析	18
第二章: π 共役系の拡張によるアゾ結合の還元効率の向上に関する検討とアゾ結合開裂メカニズムの解明	24
ローダミンを導入したアゾ化合物の設計と合成	24
硬 X 線照射後の生成物の解析	26
Azo-Rho1-3 の反応量と DR の生成量	28
LC-MS による硬 X 線照射後の生成物の解析	28
量子化学計算を用いたアゾ化合物と水和電子の反応評価	32
考察	35
第二章の小括	38
第三章: 硬 X 線によるアゾ結合の開裂を鍵反応とする薬剤の活性化に関する検討	39
第一節: 細胞内の硬 X 線照射によるアゾ結合の開裂	39
アゾ結合開裂の線量依存性に関する検討	39
細胞内のアゾ結合の開裂評価	41
第二節: アゾ結合の開裂を利用した薬剤の放出	43
1,4-脱離により薬剤を放出する化合物の合成	44
38 および AzoNMe-DOX (39) の合成	44
AzoOH-Dox (41) の合成	49
硬 X 線照射による AzoNMe-Dox および AzoOH-Dox の反応解析	50
電子供与性/吸引性の変化によって活性化する Azo-NM の合成	55
硬 X 線照射による Azo-NM の反応解析	56
硬 X 線照射による Azo-NM の放射線増感効果に関する検討	59
考察	60
第三章の小括	65
総括	66
参考文献	67
Chapter1: Materials and methods	72
Reagents and general information	72

Synthesis	74
Chapter2: Materials and methods	76
Reagents and general information	76
Synthesis	78
Chapter3: Materials and methods	81
Reagents and general information	81
Synthesis	83
Appendix	94

序論

ケージド化合物とは外部刺激によって保護基が脱離することにより薬剤や生理活性物質を放出する化合物である。その中でも光で活性化するケージド化合物は光照射の位置やタイミングを制御することで薬剤や生理活性物質の活性化を優れた時空間分解能で制御できるため基礎研究の分野において特に有用である¹⁻⁷。例えば光分解性保護基として BODIPY 骨格を有したケージドヒスタミン (**1**) は、可視光領域である 500 nm の照射光により光分解性保護基が脱離し、ヒスタミン (**2**) を放出する (Figure 1a)⁸。細胞内に放出されたヒスタミンは Ca^{2+} 濃度を増大させるため、ケージドヒスタミンを利用することで光照射による Ca^{2+} 濃度を時空間的に制御できる。また、ケージド化合物を動物へ応用し、光を照射した部位で薬剤や生理活性物質を局所的に活性化する試みも報告されている。例えば、マウス腫瘍モデルを用いた検討では、光照射をすることで抗がん剤を放出するケージド化合物を用いることで腫瘍成長が抑制されることが示されており⁹、さらに神経科学の分野では、神経伝達物質を放出するケージド化合物をマウス脳内で局所投与することで光によって神経応答を誘起できることが示されている¹⁰。

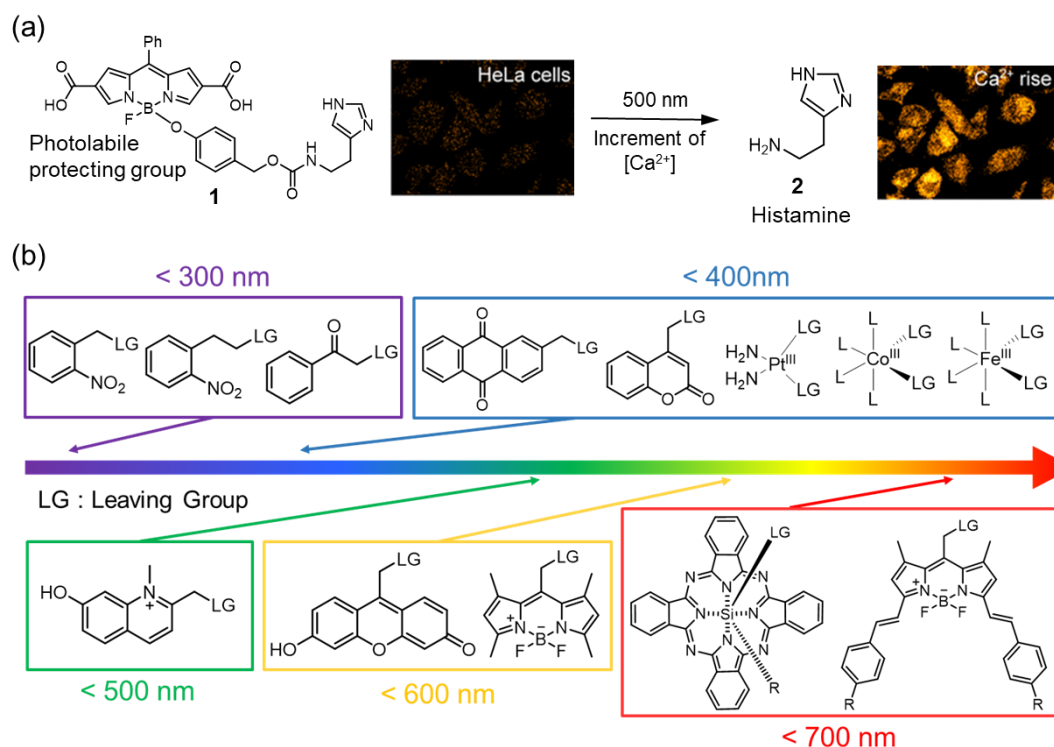


Figure 1 (a) 可視光領域の波長の光照射によってヒスタミンを放出するケージド化合物と、ヒスタミンの放出により Ca^{2+} 濃度が上昇した細胞のカルシウムイメージング画像。(N. Umeda *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, **2014**) (b) 紫外-近赤外光領域の光で活性化するケージド化合物。共役系を伸ばす、または金属との配位結合を利用することで長波長の光でのアンケージングが可能になる。

近年ではヒトへの応用を志向し、紫外光・可視光領域に加えて生体透過性に優れた近赤外領域の光によって活性化されるケージド化合物の開発が進められている (Figure 1b) ¹¹。しかしながら生体深部への適応を考えた場合、近赤外光を用いた場合であっても吸収や散乱の影響が無視できない。例えば 810 nm の近赤外光を出力 13.5 W で厚さ 2.5 cm のヒトの掌に照射した場合、入射光の強度は 0.6% にまで減衰し、上腕三頭筋に照射した場合、2.5 cm の透過により 0.3% にまで低下することが報告されている ¹²。従って、近赤外光は生体でわずか数センチメートルの伝播により著しく減衰するため、生体深部への適応は依然として透過性の課題がある。以上のことから、生体深部でケージド化合物を活性化させるためには、近赤外光よりもさらに透過性に優れた外部刺激の導入が必要であると考えられる。

上記の背景から、ケージド化合物の活性化に用いる外部刺激として硬 X 線に着目した。硬 X 線は X 線の中でも光子エネルギーがおよそ 10 keV 以上の極めて短波長の電磁波であり生体透過性が高い。有機分子が有する励起準位および結合エネルギーは主に数 eV であり、これは紫外-近赤外光の光子エネルギーと対応する。そのため従来のケージド化合物では用いる光の波長に合わせ、有機分子の基底状態と励起状態のエネルギー差および開裂させる結合のエネルギーを考慮した設計をすることで脱保護反応を起こすことができる。しかし、硬 X 線の光子エネルギーは 10 keV を超えるため、これらのエネルギースケールを大きく上回り、有機分子と相互作用しにくい。そのため、硬 X 線でケージド化合物を活性化させるためには従来のケージド化合物で用いられてきた分子設計は適応できず、硬 X 線の物理化学的性質に基づいた新たな活性化戦略を考案する必要がある。

硬 X 線が分子と相互作用する際には、紫外-近赤外光による電子励起と比較してその相互作用効率は低いものの、高い結合エネルギーを有する内殻電子の電離を伴う光電効果、ならびに弱く束縛された外殻電子との非弾性散乱であるコンプトン散乱を通じて相互作用し、高エネルギーの二次電子の生成を伴う励起状態または電離状態を形成する (Figure 2)。硬 X 線を生体に照射すると、生体内で最も豊富に存在する水分子がこれらの効果を受け、電離および励起される (物理過程)。続いて、硬 X 線の通過したスパー内 (局所領域) で生成したイオン種や励起種が高速で緩和・再編成されることで水和電子 (e^-_{aq})、ヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$)、水素ラジカル ($\cdot H$) などの一次活性種が生成される (物理化学過程)。これらの一次活性種はその後溶媒に均一に拡散し、化学反応を起こす (化学過程) ^{13,14}。一連の過程で生じた活性種の生成収率は G 値から換算できる。G 値は 100 eV あたりの X 線照射によって生成・反応した分子の個数として定義され (単位: 個/100 eV) ¹⁵、活性種の生成に関する G 値を参考するとヒドロキシルラ

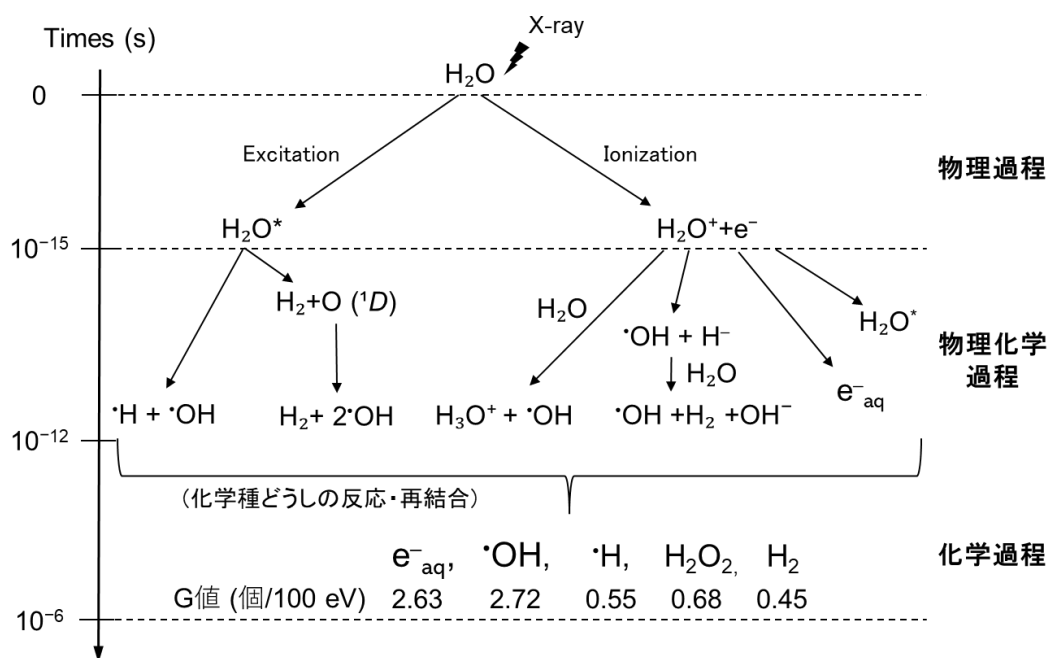


Figure 2 硬 X 線による水の放射線分解とそれにより生じた各化学種の 100 eV 当たりの生成量 (G 値)

ジカルや水和電子は他の活性種よりも 5 倍ほど高い G 値であり生成量が高いことが分かる (Figure 2)。中でもヒドロキシルラジカルは 2.8 V vs. SHE の酸化電位を^{16,17}、水和電子は -2.9 V vs. SHE の還元電位を持ち¹⁸、反応性が高いことが知られている。従って、これらの化学種を応用した高効率な脱保護反応を開発することができれば、硬 X 線により活性化されるケージド化合物の鍵反応となりうると考えられる。しかし、水和電子やヒドロキシルラジカルは通常、生体内においてアミノ酸¹⁹、タンパク質²⁰や核酸^{21,22}などの内在性分子と速やかに反応する。そのため、ヒドロキシルラジカルや水和電子によって引き起こされる反応をケージド化合物に応用するためには、細胞内分子との反応よりも高い効率であり、かつ副生成物を生じないような高い選択性を持つ反応を利用する必要がある。

同様の考えのもと、近年複数の硬 X 線により活性化するケージド化合物が報告されてきた。例えばヒドロキシルラジカルと反応し活性化するケージド化合物についてはアジド基からアミノ基への変換^{23,24}、芳香環へのアダクト²⁵を利用したものが報告されている。また、水和電子に関しては N-オキシド²⁶、第四級アンモニウムカチオン²⁷そしてピコリニウムカチオン²⁸の還元を利用したものが報告されているが、未だ硬 X 線ケージド化合物の報告は限られており分子設計の自由度や反応選択性が制限されている (Figure 3)。またこれらの反応は、詳細な反応メカニズムまで十分に検討されていないものが含まれており、活性種との反応性を高めるための理論的な分子設計の指針が

立てにくい。生体深部への適応を目指した硬 X 線で活性化するケージド化合物を開発するためにはヒドロキシルラジカルや水和電子と効率の良く選択性の高い反応を見出すだけでなく、その反応メカニズムについても解明する必要がある。

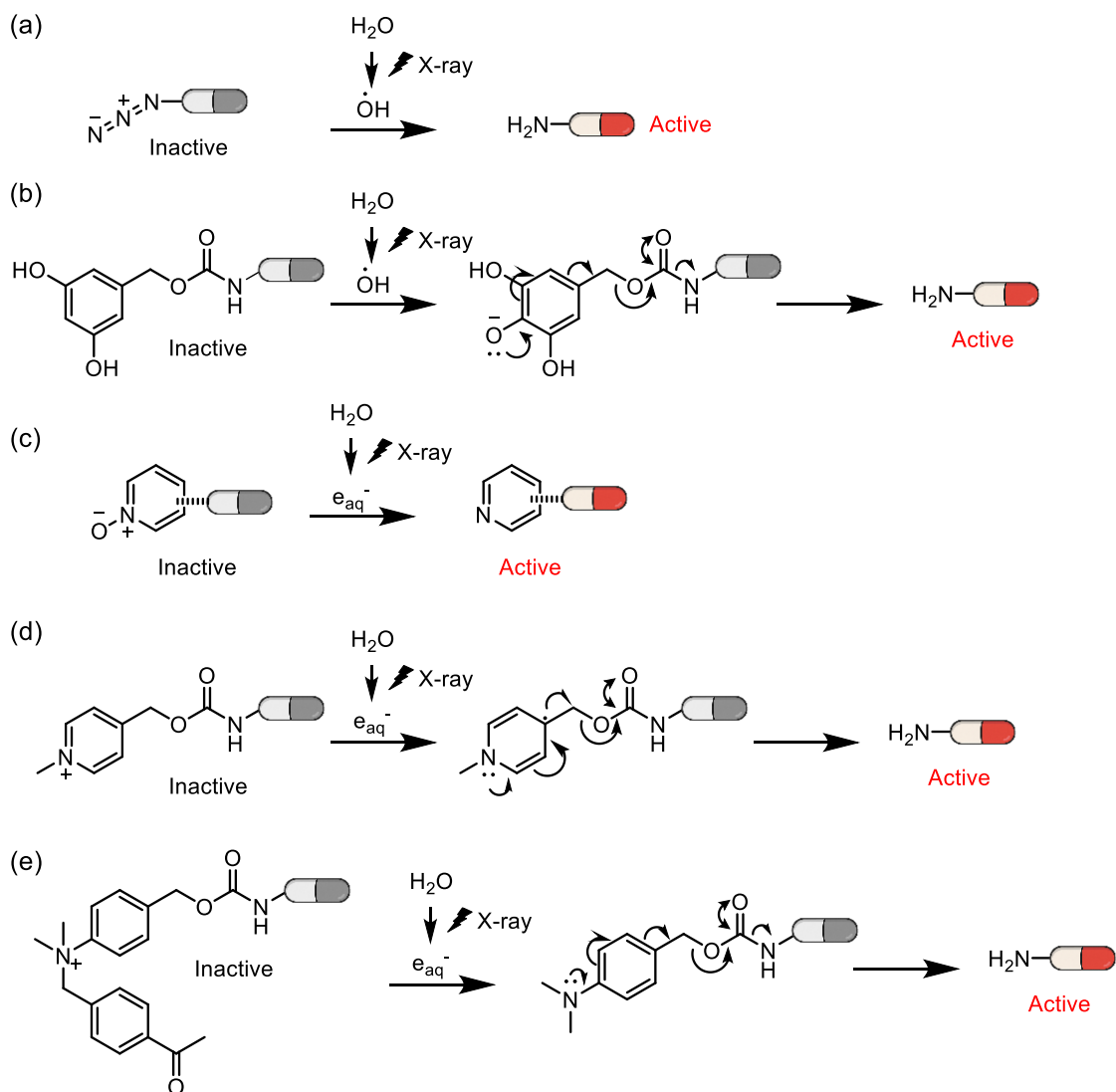
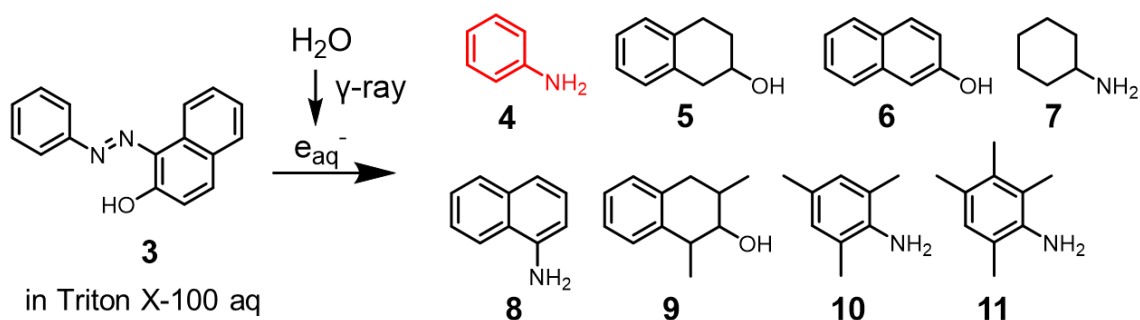


Figure 4 今までに報告されている X 線ケージド化合物。(a) ヒドロキシルラジカルによるアジド基からアミノ基への変換、(b) ヒドロキシ基を有する芳香環へのヒドロキシルラジカルのアダクト、(c) 水和電子による N-オキシドの還元、(d) ピコリニウムの還元、(e) 第四級アンモニウムの還元を鍵反応としている。

筆者はケージド化合物に用いる鍵反応としてヒドロキシルラジカルの反応ではなく水和電子の還元反応に着目した。がん細胞などの低酸素環境下にある細胞は還元的環境にあることが知られているが、このような還元的環境はがん細胞に限らず、慢性炎症病変²⁹⁻³¹、虚血性病変³²などの病変組織においても観察される。これらの環境下では、ヒドロキシルラジカルなどの強い酸化作用を有する化学種は内在性分子によって速やかにスカベンジされると考えられる。また、水和電子は主として還元反応を引き起こすが、ヒドロキシルラジカルは酸化反応だけではなく、水素引き抜き^{33,34}、ラジカル付加^{35,36}、置換反応³⁷など多様な反応様式をとることが報告されており、副生成物が生じやすい³⁸。例えば、グアニンとヒドロキシルラジカルとの反応では、プリン塩基への付加、酸化、水素引き抜きなどの経路を経て複数の生成物を与えることが報告されている³⁹。従って、生体内で硬 X 線によりケージド化合物を開発するためにはヒドロキシルラジカルではなく水和電子を用いた反応が望ましいと考えられる。

2015 年 Das らは、Triton X-100 を含む 1-phenylazo-2-naphthol (**3**) 水溶液に γ 線を照射することで aniline (**4**) が生じることを報告した⁴⁰。この時に生じたアニリンは、アゾ結合が水和電子によって還元的に開裂することで生成した可能性があり、アゾ結合の開裂を応用することでケージド化合物を開発することができると考えた。しかしながらこの報告では、1,2,3,4-tetrahydro-2-naphthol (**5**)、cyclohexylamine (**6**)、1-naphthylamine (**8**) など、アゾ結合の開裂以外の経路によって生じた副生成物も観測されている (Scheme 1)。さらに同報告における γ 線照射は 2000 Gy という高線量の条件で行われており、臨床で用いられる X 線または γ 線を用いた放射線治療の照射線量が一般的に 60 Gy 程度であることを考慮すると^{41,42}、アゾ結合の開裂をケージド化合物へ応用するためにはさらに反応効率を高める必要がある。さらに、アゾ結合の開裂機構について概略的な議論がされているが、その機構を裏付ける実験結果は提示されていない。



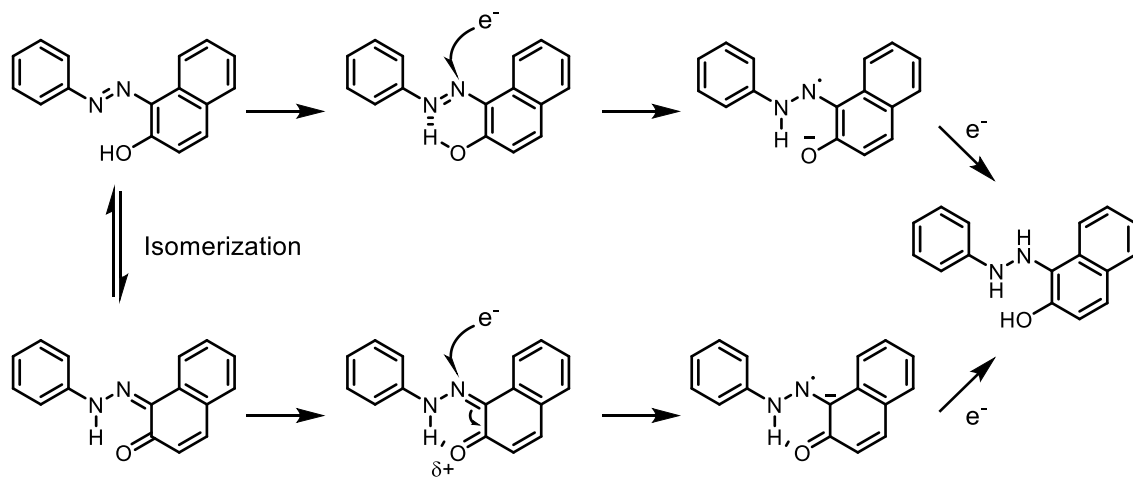
Scheme 1 1-Phenylazo-2-naphthol への硬 X 線照射により生じた 8 種の分解生成物。分解生成物の中にアゾ結合の開裂生成物のアニリンが生じることが報告されている。

以上より、アゾ結合の開裂反応をケージド化合物の鍵反応として応用するためには、(1) アゾ結合の開裂を高効率に誘起できる分子設計法の確立、(2) その開裂機構の解明、(3) 生体内のような夾雑系においても反応が進行するかの評価、の三点が必要だと考えられる。

そこで本研究では、水和電子とアゾ化合物の反応性を高めるためにアゾ結合の電子密度を低下させる分子設計法を考案し、実際にアゾ結合の開裂効率が高まるかどうか検討した。さらに硬X線によるアゾ結合の開裂が細胞中のような夾雑系でも起こせるかを明らかにし、明らかとなったアゾ結合の開裂メカニズムを応用することで硬X線照射によって薬剤放出が可能かどうか検討した。これらの検討から、アゾ結合の開裂反応を利用したケージド化合物が生体内条件に向けた検討が応用可能か評価した。

第一章: 水素結合によるアゾ結合の開裂効率の向上に向けた検討

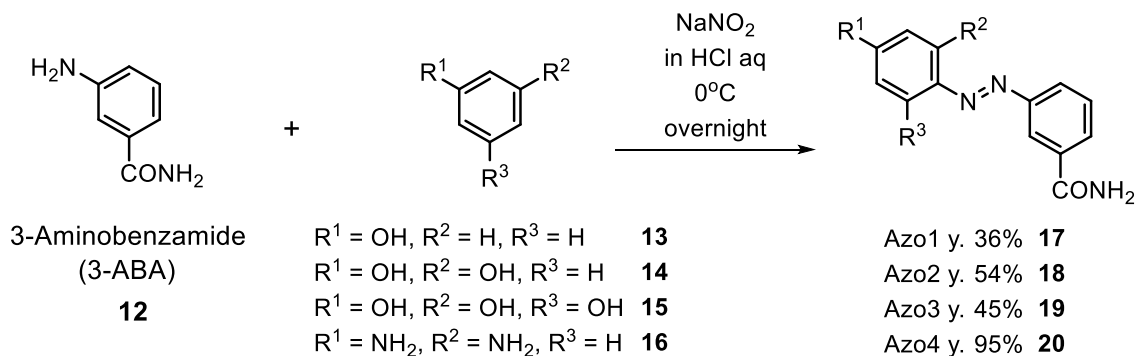
アゾ結合の開裂反応効率を上げる方法として Das らが提案した反応機構に着目した (Scheme 1.1) ⁴⁰。この機構では、アゾ結合近傍の水素結合ドナーがアゾ結合の窒素原子と水素結合を形成し、アゾ結合の電子密度を部分的に低下させる。その結果、部分的な正電荷が生じるため、静電的な相互作用により水和電子との反応が促進される機構が提示されている。そこで、アゾ結合の近傍に水素結合ドナーを複数個導入することによってアゾ結合の開裂効率を向上できると考え、水素結合ドナーとしてヒドロキシ基またはアミノ基を複数個導入した化合物を設計した。そして設計したアゾ化合物の還元電位と硬 X 線照射後のアゾ化合物の分解量およびアゾ結合の開裂量を評価し、このような水素結合が水和電子とアゾ結合との反応効率に与える影響を評価した。



Scheme 1.1 Das らの提案した 1-phenylazo-2-naphthol の分解機構

化合物の設計と合成

アゾ結合の開裂後に放出される薬剤として、DNA 修復酵素阻害剤である 3-aminobenzamide (3-ABA、**12**) を選択した^{43,44}。そして2つあるフェニル基のうち、カルバモイル基を有さないフェニル基に、水素結合ドナーとしてヒドロキシ基もしくはアミノ基を導入した Azo1-4 を設計した。これらの化合物は Scheme 1.2 に従い、3-ABA を酸性条件下で亜硝酸ナトリウムと反応させてジアゾニウム塩にしたのち、phenol (**13**)、resorcinol (**14**)、phloroglucinol (**15**) または 3-phenylenediamine (**16**) とそれぞれアゾカップリングさせて、Azo1-4 (**17-20**) を得た (Scheme 1.2)。合成した化合物の構造は、¹H-NMR、¹³C-NMR、HRMS および元素分析によって決定した。



Scheme 1.2 Azo1-4 の合成スキーム

Azo1-4 の還元電位の測定

サイクリックボルタンメトリー (Cyclic voltammetry; CV) によって Azo1-4 の還元電位を測定した。Azo1 および Azo3 は可逆的なボルタモグラム、Azo2 からは非可逆的なボルタモグラムが得られたことから Azo1-3 は測定条件において還元電位が存在することが認められた。それぞれのボルタモグラムを元に還元電位を評価したところ、Azo1 については -1.13 V 、Azo2 は -0.933 V 、Azo3 については -0.928 V であり、還元電位は高い順から $\text{Azo3} > \text{Azo2} > \text{Azo1}$ であることが示唆された (Figure 1.1a-c)。また Azo4 の還元電位は -2.5 V までの範囲内において測定できなかった (Figure 1.1d)。

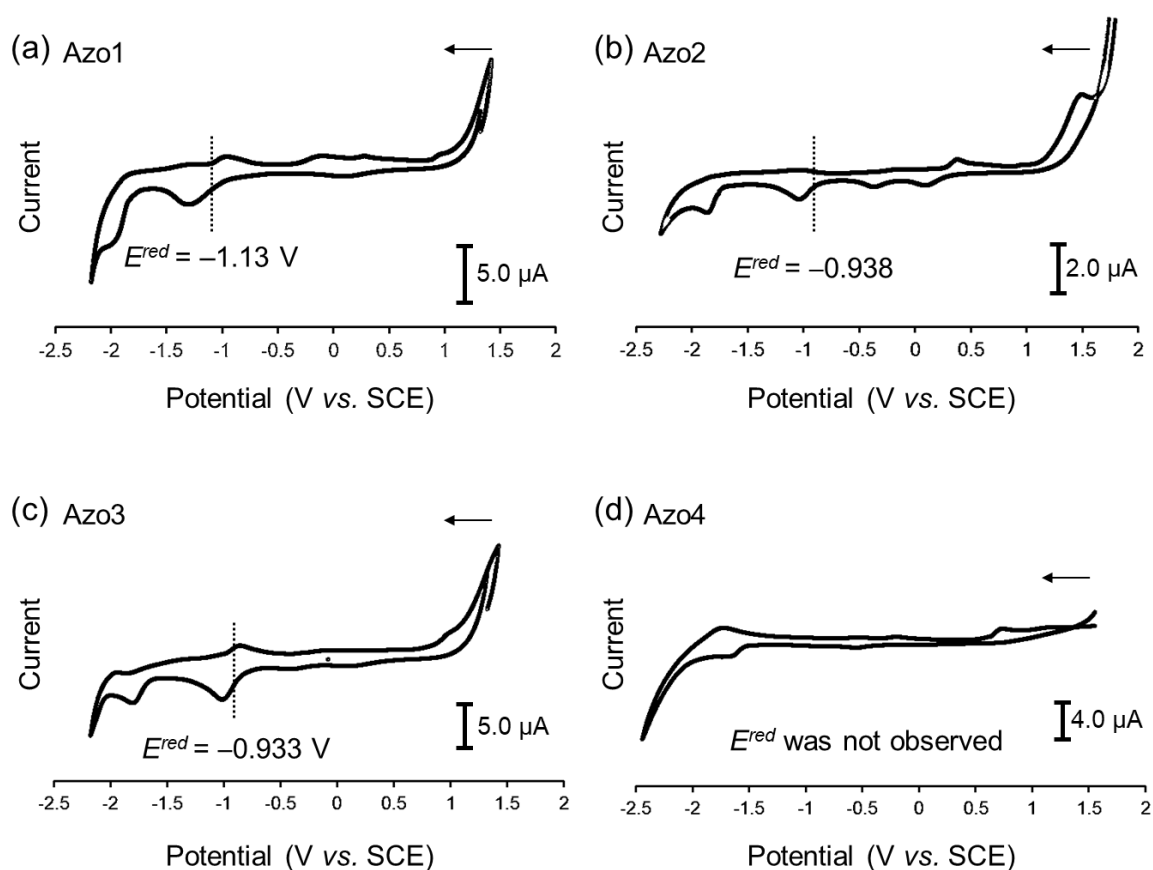
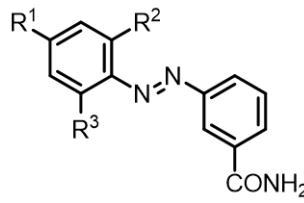


Figure 1.1 (a) Azo1、(b) Azo2、(c) Azo3、(d) Azo4 のボルタモグラム (溶媒は DMF、電解質は TBAP を用いた。矢印は電流を流した方向を表し、各パネル右下のバーおよび数値は電流の縮尺を示す。Azo1-3 の濃度は 2 mM 、Azo4 の濃度は 4 mM で測定した。Scan rate は 0.05 Vs^{-1} に設定した。)

また、量子化学計算によって Azo1-4 の LUMO/HOMO エネルギー準位を算出した。LUMO エネルギーは低い順から順に Azo3 < Azo2 < Azo1 < Azo4 であり、CV から測定された還元電位の順番と対応した結果となった。また HOMO エネルギーに関しては高い方から Azo4 > Azo3 = Azo2 > Azo1 の順であった (Table 1.1)。これらのことから、Azo4 と Azo3 は特に還元されやすいことが示唆された。



Azo1 (R¹ = OH, R² = H, R³ = H) **17**

Azo2 (R¹ = OH, R² = OH, R³ = H) **18**

Azo3 (R¹ = OH, R² = OH, R³ = OH) **19**

Azo4 (R¹ = NH₂, R² = NH₂, R³ = H) **20**

	Azo1	Azo2	Azo3	Azo4
LUMO (eV)	-0.66	-0.77	-0.80	-0.36
HOMO (eV)	-8.02	-7.92	-7.92	-7.23
HOMO-LUMO gap (eV)	7.36	7.15	7.12	6.87

Table 1.1 Azo1-4 の LUMO/HOMO エネルギー (汎関数は ωB97X-D、基底関数は cc-pVDZ を用いた。水の溶媒効果は水の誘導体モデル IEFPCM によって計算した。)

硬 X 線照射後の Azo1-4 溶液の分解生成物の分析

Azo1-4 を 25 μM となるように 40% MeOH を含む pH7.4 PB に溶解した。その後、アルゴンで脱気し、等量の水和電子を発生させるために 100 Gy の硬 X 線を照射した。MeOH はヒドロキシルラジカルのスカベンジャーとして働くため^{45,46}、この条件では主に水と電子との反応を評価できる。硬 X 線により発生した活性種の濃度 [RS] (reactive species; RS) は以下の式で計算した (eq.1)。

$$[RS] = (G_{RS} \times d_{\text{solvent}} \times D) / (100e \times N_A) \quad (\text{eq.1})$$

ここで G_{RS} は活性種の G 値 (100 eV 当たりの X 線で生成・反応した分子の個数; 個/100 eV)、 d_{solvent} は溶媒の密度 (g cm^{-3})、 e は電気素量 ($1.6 \times 10^{-19} \text{ C}$)、 D は吸収線量 ($\text{Gy} = \text{J kg}^{-1}$) そして N_A はアボガドロ定数 ($6.02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) である。X 線によって MeOH 中で発生する電子 (溶媒和電子) の G 値はパルス照射による実験から 1.1 と報告されており⁴⁷、水中で生じた電子 (水と電子) の G 値の 2.6 よりも低い値である。従って 40%MeOH を含んだ PB における水と電子の G 値は水の G 値よりも低いと考えられるため、この実験における水と電子の発生量は 100%水中の条件で生成される水と電子の量よりも少な

いか同程度であると考えられる。先の式 (eq.1) から 100 Gy の硬 X 線照射により水和電子が Azo1-4 とほぼ等量の最大 27 μM 発生すると算出できる。

硬 X 線照射後の溶液を LC-MS により解析した結果、Azo1-4 全てのピーク強度が減少し、特に Azo3 や Azo2 では Azo1 や Azo4 と比較して顕著に減少したことが認められた (Figure 1.2)。

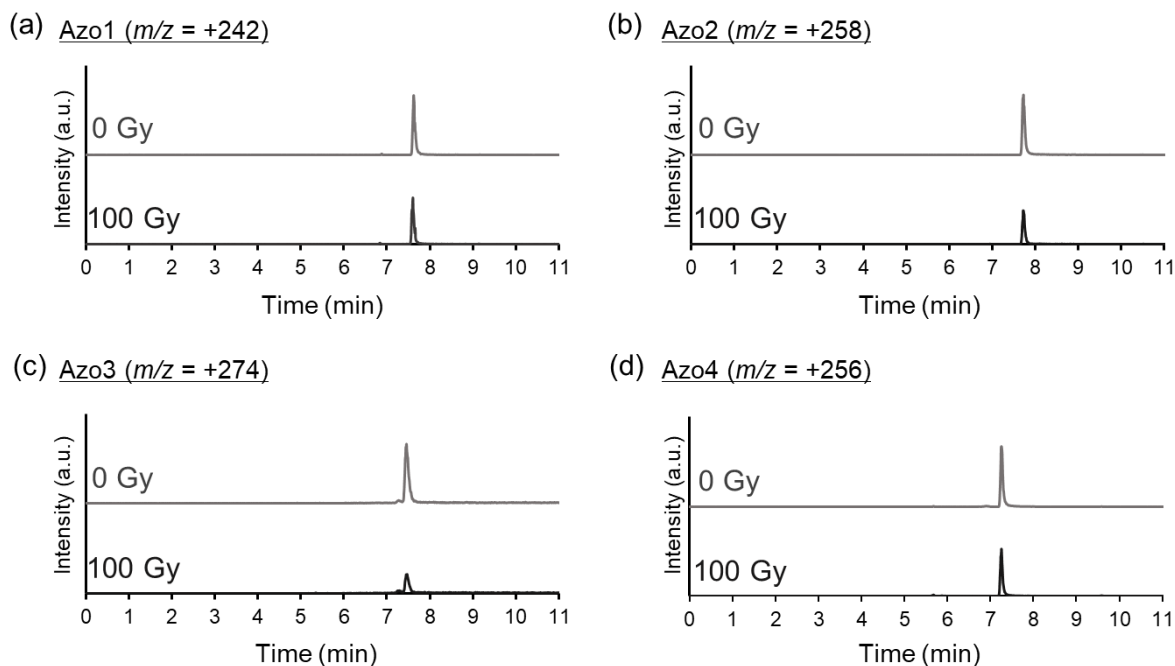
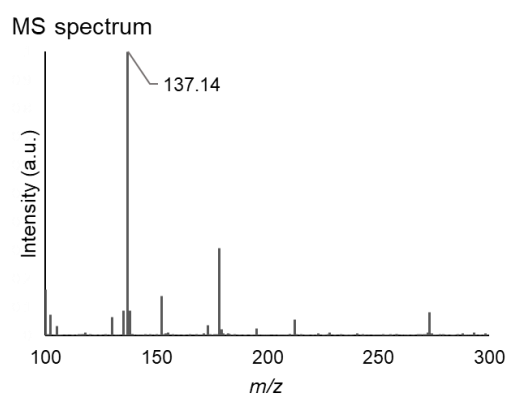
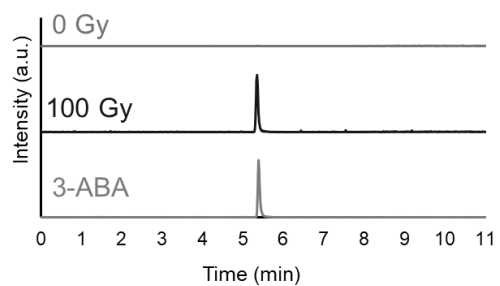


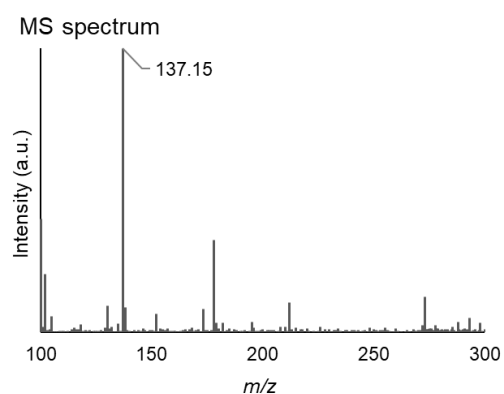
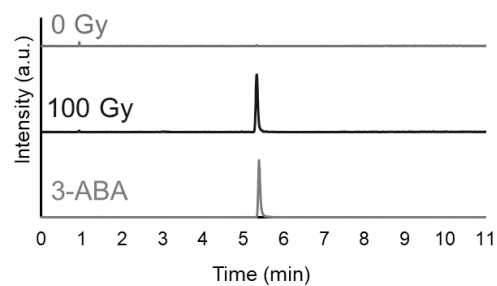
Figure 1.2 硬 X 線照射前後の親化合物に関する MS クロマトグラム (a) Azo1 は $m/z = +242$ 、(b) Azo2 は $m/z = +256$ 、(c) Azo3 は $m/z = +274$ 、(d) Azo4 は $m/z = +256$ の値を参照した。

続いて、3-ABA の質量電荷比である $m/z = +137$ のピークを参照した。硬 X 線照射前ではいずれの化合物溶液からも $m/z = +137$ のピークの検出は認められなかった。一方で、硬 X 線照射後では全てのアゾ化合物溶液から $m/z = +137$ のピークが検出された。(Figure 1.3)。また、これらのピークが出現した保持時間は、標品の 3-ABA の保持時間と一致した。このことから硬 X 線によって Azo1-4 が開裂し、3-ABA が生成したことが示された。

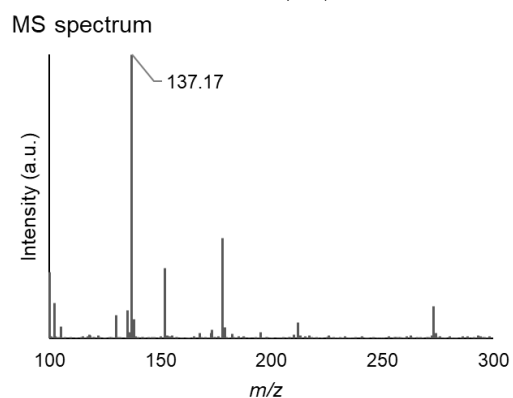
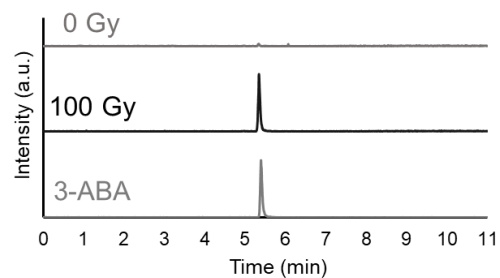
(a) 3-ABA released from Azo1



(b) 3-ABA released from Azo2



(c) 3-ABA released from Azo3



(d) 3-ABA released from Azo4

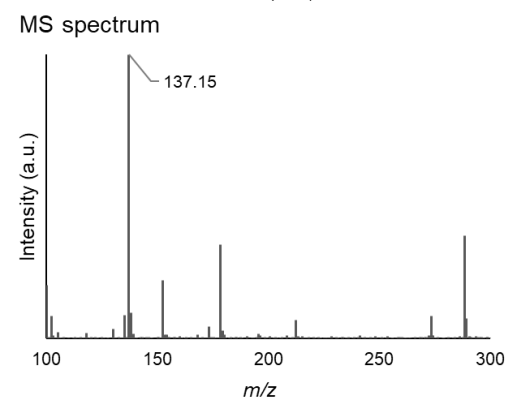
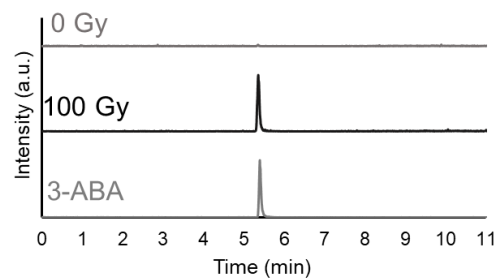


Figure 1.3 硬 X 線照射前後の (a) Azo1、(b) Azo2、(c) Azo3、(d) Azo4 溶液中の $m/z = +137$ のクロマトグラムおよび硬 X 線照射後に生成した 3-ABA の MS スペクトル。

分解した Azo1-4 と放出された 3-ABA の定量評価

LC-MS で得られたクロマトグラムの面積から反応した Azo1-4 および 3-ABA の生成量を定量した。Azo1-4 の反応量は Azo3 > Azo2 > Azo1 = Azo4 の順で多く、Azo1 が 5.9 μM 、Azo2 が 9.8 μM 、Azo3 が 16 μM 、Azo4 が 7.4 μM であり、ヒドロキシ基の数が多いほど反応量が増大することが示唆された。一方、硬 X 線照射後に生成した 3-ABA の量は Azo1-4 で有意差はなく、いずれの化合物についても 2.4-3.0 μM だった (Figure 1.4 b)。

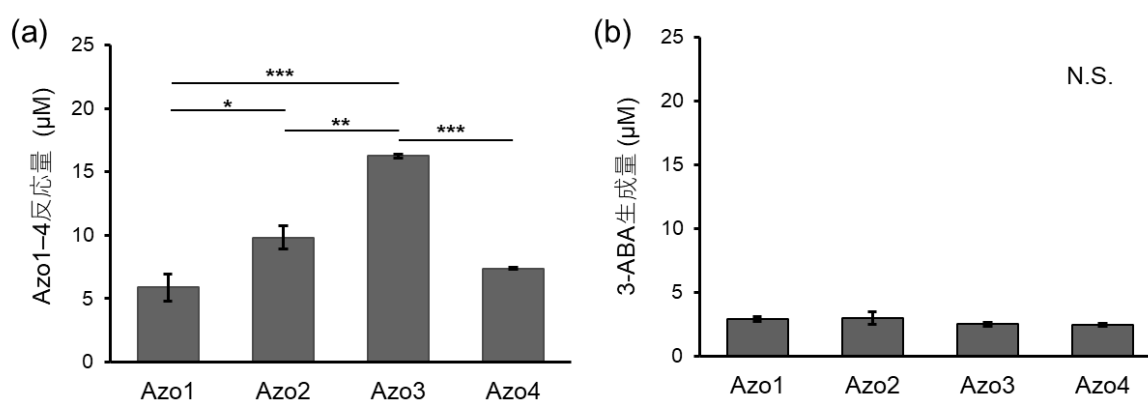


Figure 1.4 (a) Azo1-4 の反応量と(b) 3-ABA の生成量 (Error bars represent SEM: $n = 3$, Tukey test, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, and * $p < 0.05$)

硬 X 線照射後の副生成物の解析

定量結果から、アゾ化合物が反応した量に対し 3-ABA の生成量が少ない原因を明らかにするため副生成物について解析した。その結果、Azo1 溶液からは $m/z = +110$ (Figure 1.5a)、Azo2 溶液からは $m/z = -286$ (Figure 1.5b)、Azo4 溶液からは $m/z = +286$ (Figure 1.5c) の質量電荷比を持つ化合物が検出された $m/z = +110$ の生成物は *p*-aminophenol (**21**) であり、これはアゾ結合が四電子還元を受けて生成したと考えられる。 $m/z = -286$ および $m/z = +286$ の生成物は Azo2 または Azo4 にメトキシ基が付加した化合物 **22**、**23** であると考えられる (Figure 1.5d)。

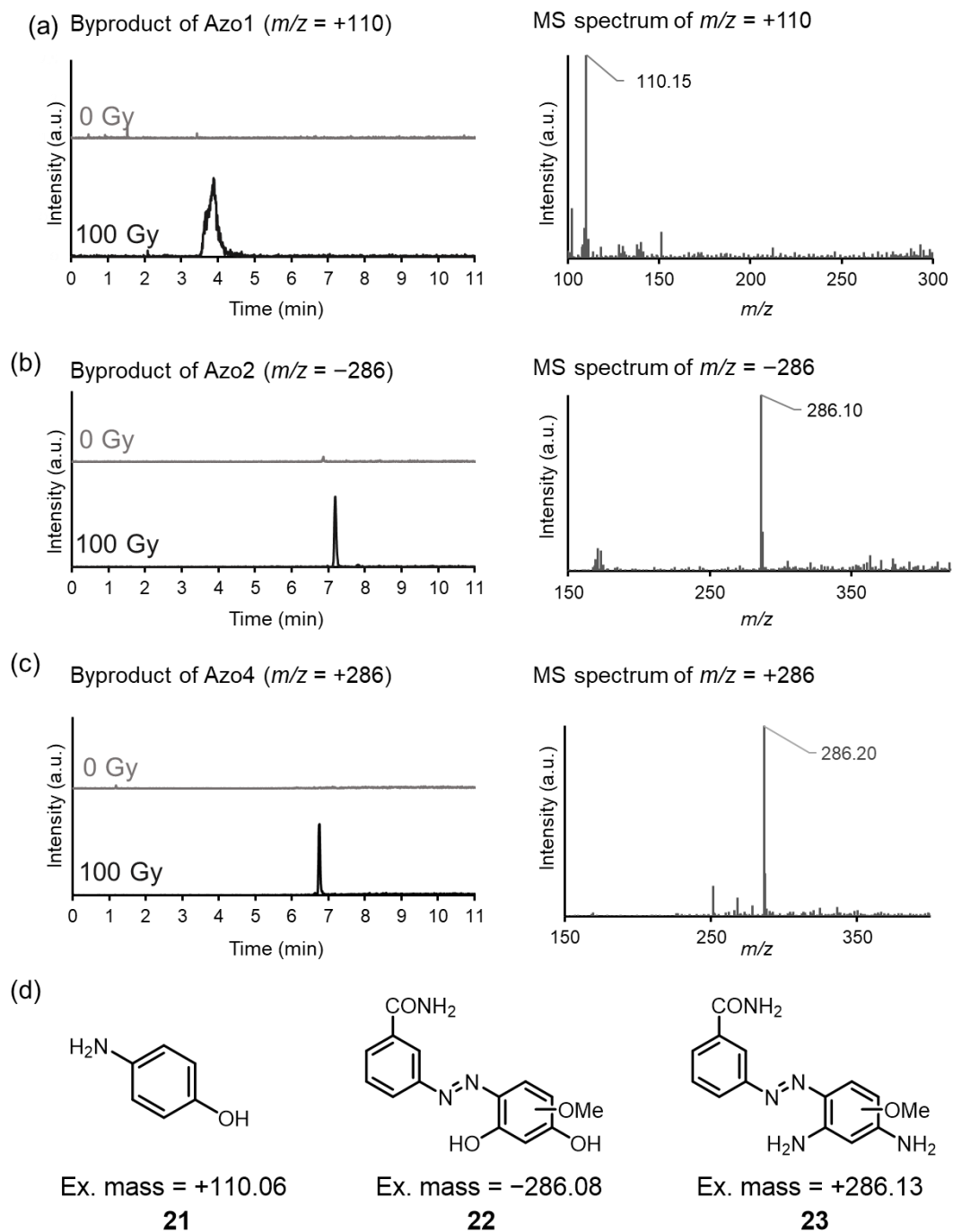


Figure 1.5 (a) Azo1、(b) Azo2、(c) Azo4 から検出された $m/z = +110$ 、 $m/z = -286$ 、 $m/z = +286$ の分解生成物のクロマトグラム (左) とその保持時間における MS スペクトル (右) (d) 検出された化合物 **21–23** の推定構造

考察

ヒドロキシ基やアミノ基などの水素結合ドナーを複数個アゾ化合物に導入することで水素結合が形成され、アゾ結合の電子密度が低下し、水和電子による還元が起こりやすくなると考え Azo1-4 を合成した。CV の結果から還元電位が測定できなかった Azo4 は最も還元されにくいと考えられ (Figure 1.1)、LUMO エネルギー準位からも Azo1-4 の還元のされやすさは $\text{Azo3} > \text{Azo2} > \text{Azo1} > \text{Azo4}$ の順であることが示唆された (Table 1.1)。この順番は分子内のヒドロキシ基の数に対応することから、設計指針の通りにヒドロキシ基がアゾ結合に対して水素結合ドナーとして働き、アゾ結合を還元されやすくすると考えられる。また、それぞれの溶液への硬 X 線照射後の定量結果から、反応量は $\text{Azo3} > \text{Azo2} > \text{Azo1} = \text{Azo4}$ であり、還元電位同様にヒドロキシ基の数が多いほど反応性が増大することが示唆された (Figure 1.4a)。一方で、生成した 3-ABA の量はいずれの化合物間も有意差はなく同程度の生成量だった (Figure 1.4b)。このことから、ヒドロキシ基の導入は還元電位を上昇させるが、硬 X 線によるアゾ結合の開裂効率を上げるほどの影響はなく、むしろ副反応を増大させると考えられる。アミノ基の水素結合ドナーとしての効果に関しては Azo4 の還元電位が測定範囲内に存在しなかったこと、および LUMO エネルギーが最も高いことを考慮すると、アミノ基はヒドロキシ基のように水素結合ドナーとしては寄与せず、アゾ結合の還元電位を低下させる効果は小さいと考えられる。Azo2 および Azo3 では、ヒドロキシ基水素とアゾ結合窒素の距離は 1.70 Å および 1.71 Å であり、同程度の距離である。しかし、Azo4 のアミノ基水素とアゾ結合窒素との距離は 1.92 Å であり、Azo2 および Azo3 と比較して約 0.2 Å 長い。一般に水素結合距離が短いほど相互作用は強いと考えられるため、ヒドロキシ基水素はアミノ基水素よりもアゾ結合窒素と水素結合を形成しやすいことを示唆している (Figure 1.6)。

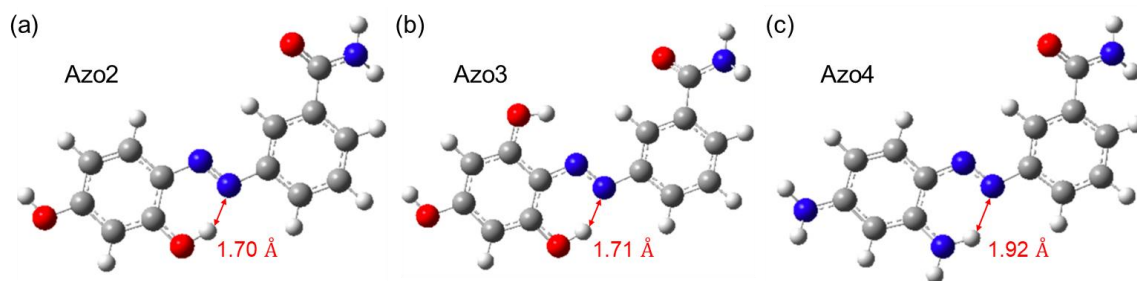
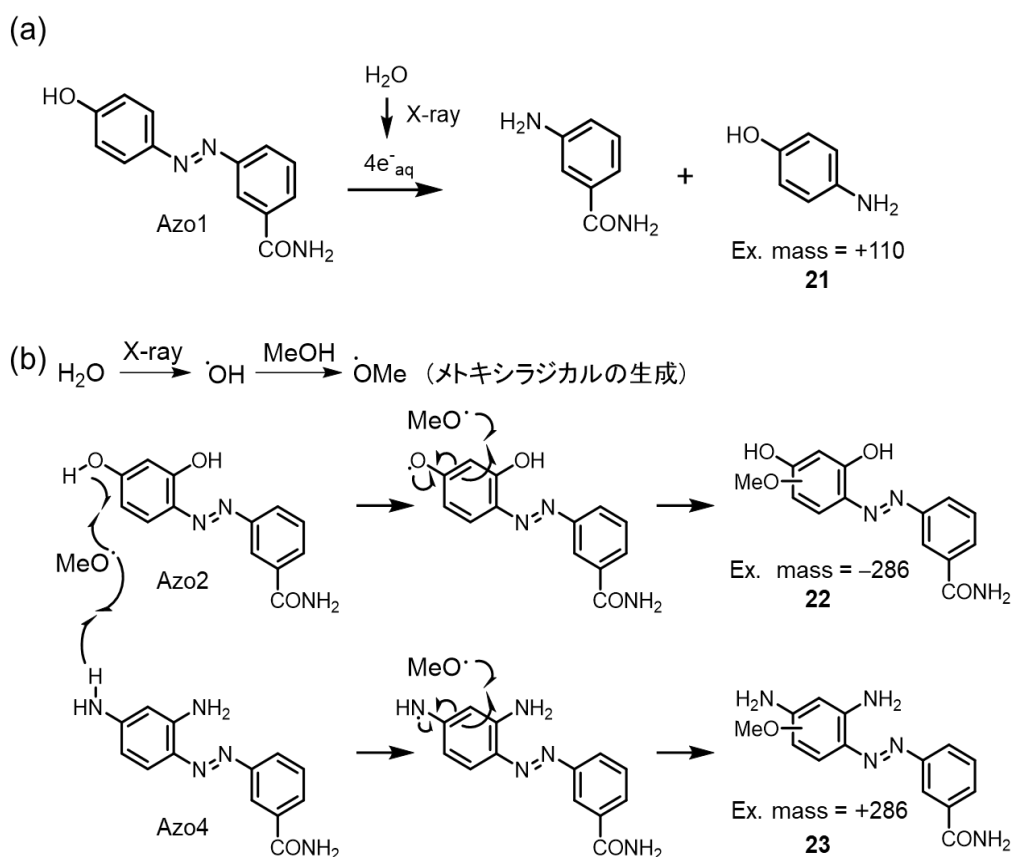


Figure 1.6 (a) Azo2、(b) Azo3 のヒドロキシ基水素、(c) Azo4 のアミノ基水素とアゾ結合窒素間の距離 (汎関数は ω B97X-D、基底関数は cc-pVDZ を用いた。水の溶媒効果は水の誘導体モデル IEFPCM によって計算した。)

硬 X 線照射後の Azo1 の溶液から $m/z = +110$ の四電子還元による開裂生成物の *p*-aminophenol (**21**) が検出されたが (Scheme 1.3a)、同様の開裂生成物は Azo2–4 溶液からは検出されなかった。また、Azo2 から検出された $m/z = -286$ の副生成物 **22** と Azo4 から検出された $m/z = +286$ の副生成物 **23** は、それぞれ Azo2 もしくは Azo4 にメトキシ基が付加した化合物であると考えられる。この実験条件では、硬 X 線によるメタノールの電離⁴⁸、またはメタノールがヒドロキシルラジカルをスカベンジした際にメトキシラジカルが生じる⁴⁶。そのため、**22** と **23** はどちらも Azo2 および Azo4 がメトキシラジカルからの攻撃を受けて生成したものと考えられる (Scheme 1.3b)。

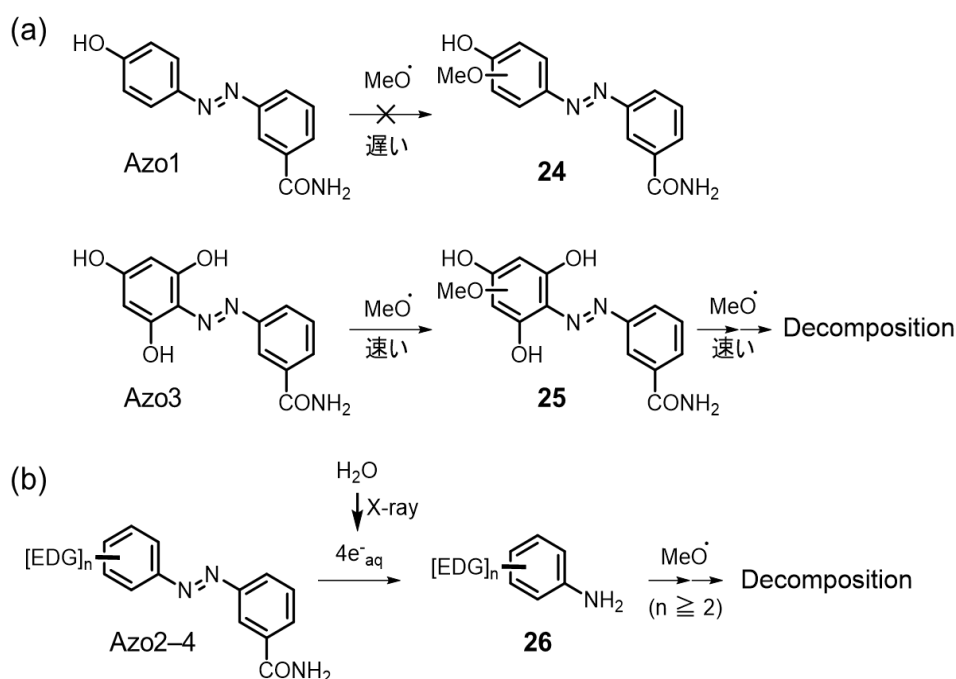


Scheme 1.3 (a) Azo1 の四電子還元による 4-aminophenol (**21**) の生成と (b) メトキシラジカルの Azo2, Azo4 への付加によるメトキシ基付加体 **22**、**23** の生成

また、Azo2 と同様にヒドロキシ基を持つ Azo1 のメトキシ基付加体 **24** および Azo3 のメトキシ基が付加体 **25** は検出されなかった (Scheme 1.4a)。硬 X 線による反応量が $\text{Azo3} > \text{Azo2} > \text{Azo1}$ であること、Azo1 は最も HOMO エネルギーが高く酸化されにくいと考えられるため、Azo1 はヒドロキシ基を 1 つしか持たず、ベンゼン環の電子密度が

Azo2-4と比較して低いためにメトキシラジカルとの反応が起こりにくく **24** を生成しなかったと考えられる (Scheme 1.4a 上段)。反対に Azo3 はヒドロキシ基を同一芳香環上に3つ有し、HOMO エネルギーも Azo2 と同程度であるため、少なくとも Azo2 と同等かそれ以上にメトキシラジカルと反応しうる。しかし実際には Azo3 のメトキシ基の付加体 **25** は検出されなかった。これは生成した **25** は元の Azo3 よりもさらに電子密度が高く、メトキシラジカルからの攻撃が加速し、分解したために検出されなかったと考えられる (Scheme 1.4a 下段)。

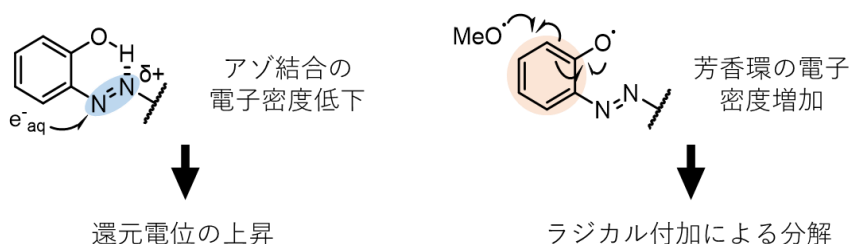
Azo1 溶液からは開裂生成物 **21** が検出された一方で、Azo2-4 溶液からは開裂生成物 **26** は検出されなかった。この理由についても Azo3 の分解と同様の理由により、開裂後に生じたアミノ基が芳香環の電子密度を上昇させ、メトキシラジカルからの攻撃が促進され分解したために検出されなかったと考えられる (Scheme 1.4b)。



Scheme 1.4 (a) Azo1 とメトキシラジカルとの反応および Azo3 のメトキシラジカル付加体 **25** の分解。(b) メトキシラジカルによる Azo2-4 の開裂生成物 **26** の分解

第一章の小括

第一章では、アゾ化合物に水素結合ドナーとして働く置換基を複数個導入し、水素結合によりアゾ結合の電子密度を低下させ、水和電子による還元効率を向上できると考えた。CV および量子化学計算の結果からアゾ化合物中のヒドロキシ基の数が多いほどアゾ化合物が還元されやすくなることが示唆された。一方で、硬 X 線照射による検討ではいずれのアゾ結合の開裂量は変化せず、分子内のヒドロキシ基が増加すると副反応による分解が促進したことが明らかとなった。また、副生成物の解析から Azo2 や Azo4 はメトキシラジカルの付加を受けた化合物が検出された。そのため、水素結合の形成によってアゾ結合の電子密度を低下させる設計は、アゾ結合の還元電位を低下させる点において有効であるが、芳香環の電子密度の増大に起因するメトキシラジカルの攻撃など副反応を起こしやすくと考えられる。従ってアゾ結合の電子密度だけでなく芳香環の電子密度も低下させる設計が必要である。



第二章: π 共役系の拡張によるアゾ結合の還元効率の向上に関する検討とアゾ結合開裂メカニズムの解明

前章から水素結合の形成によってアゾ結合の電子密度を低下させる分子設計はアゾ化合物の還元電位を上昇させることが示唆されたが、水素アクセプターとして働く置換基の電子供与性によって芳香環の電子密度の増加に起因する副反応が起こりやすくなることが示された。そのため、第二章では分子全体の電子密度を高めずにアゾ結合を選択的に還元されやすくなるような分子設計を考案し検討を行った。さらに薬剤放出のための設計指針を構築するため、実験結果と量子化学計算の結果から水和電子によるアゾ結合の開裂反応メカニズムを明らかにした。

ローダミンを導入したアゾ化合物の設計と合成

アゾ結合を還元させやすくする別の方法として、 π 共役系にアゾ結合を直接組み込み、アゾ結合の電子を非局在化させる設計を考案した (Figure 2.1a)。この設計では、水和電子が π 共役系の LUMO と相互作用し、アゾ結合の反結合性軌道の電子密度が高まることで選択的にアゾ結合が還元されると考えられる。さらに HOMO の電子が共役系全体に非局在化するため、Azo2-4 のようなメトキシルラジカルによる付加反応が起こりにくくなると期待される。上記の理由から、ローダミン骨格を導入したアゾ化合物を設計した (Figure 2.1b)。ローダミンは π 共役系が長いので、ローダミン骨格が導入されたアゾ化合物の LUMO エネルギーが効果的に低下し、水和電子による還元が起こりやすくなると考えられる。さらにローダミン骨格の持つ正電荷と水和電子の静電相互作用により反応速度の上昇が期待できる。

そこで、アゾ化合物 Azo-Rho1-3 (**27-28**) を設計した。ベンゼン環部の置換基の影響を評価するため、Azo-Rho2 のベンゼン環部のオルト位には電子供与性基としてヒドロキシ基、Azo-Rho3 には電子求引性置換基としてカルボキシ基を導入されている。設計した Azo-Rho1-3 のアゾ結合が開裂すると、*N,N*-diethylrhodamine (DR, **30**) が生成すると予想される。

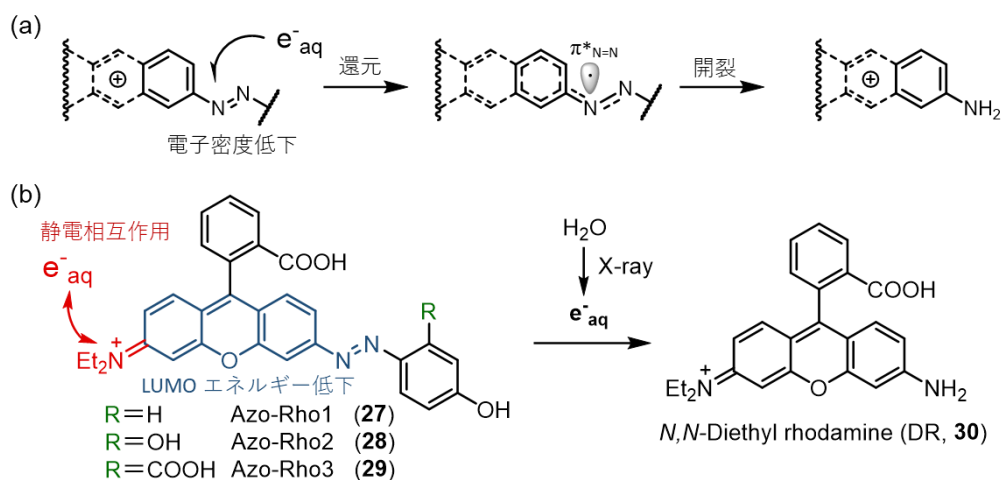
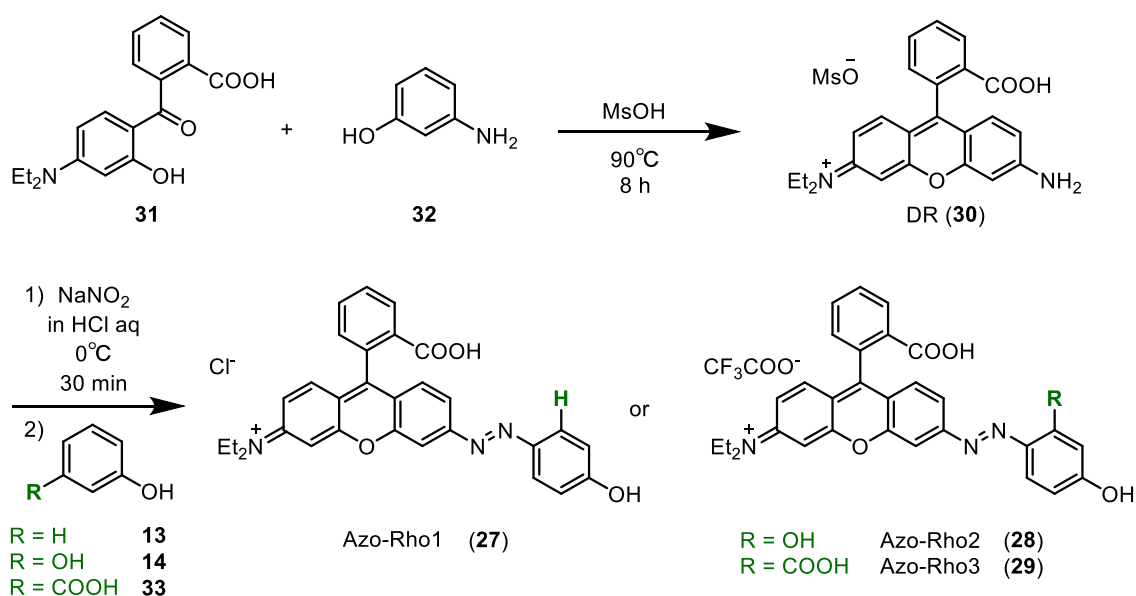


Figure 2.1 (a) π 共役系にアゾ結合を組み込むことによる水和電子の選択的なアゾ結合の還元。 (b) ローダミン骨格を導入したアゾ化合物 Azo-Rho1-3 の設計

Azo-Rho1-3 は Scheme 2.1 に従って合成した。2-(4-diethylamino-2-hydroxybenzoyl)-benzoic acid (31) と 3-aminophenol (32) を縮合させることで DR を合成後、DR をジアゾ化し phenol (13)、resorcinol (14)、*m*-benzoic acid (33) とアゾカップリングすることで得た。合成した化合物は $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、HRMS および元素分析によって同定した。



Scheme 2.1 Azo-Rho1-3 の合成スキーム

硬 X 線照射後の生成物の解析

合成した化合物は溶液中においてスピロ環化により正電荷を失い π 共役系の長さが変化する可能性がある (Figure 2.2a)。そこで吸光スペクトルから中性付近の pH において正電荷を持つ開環体が存在するか検討した。アゾベンゼン誘導体は 300–400 nm に吸光極大を持つことが知られており⁴⁹、共役系が短いスピロ閉環体の Azo-Rho1–3 はこの領域内に吸収極大を持つと予想され、一方で開環体はキサンテン構造を持つことから 500–600 nm の領域に吸収極大を持つと予想される (Figure 2.2a)。Azo-Rho1–3 溶液の pH を変えて吸収スペクトルを測定した。いずれのアゾ化合物の溶液も 500–600 nm の領域内において吸光極大を持つことが認められた。従って、中性付近においても Azo-Rho1–3 の溶液中には開環体が存在することが示唆された (Figure 2.2b–d)。

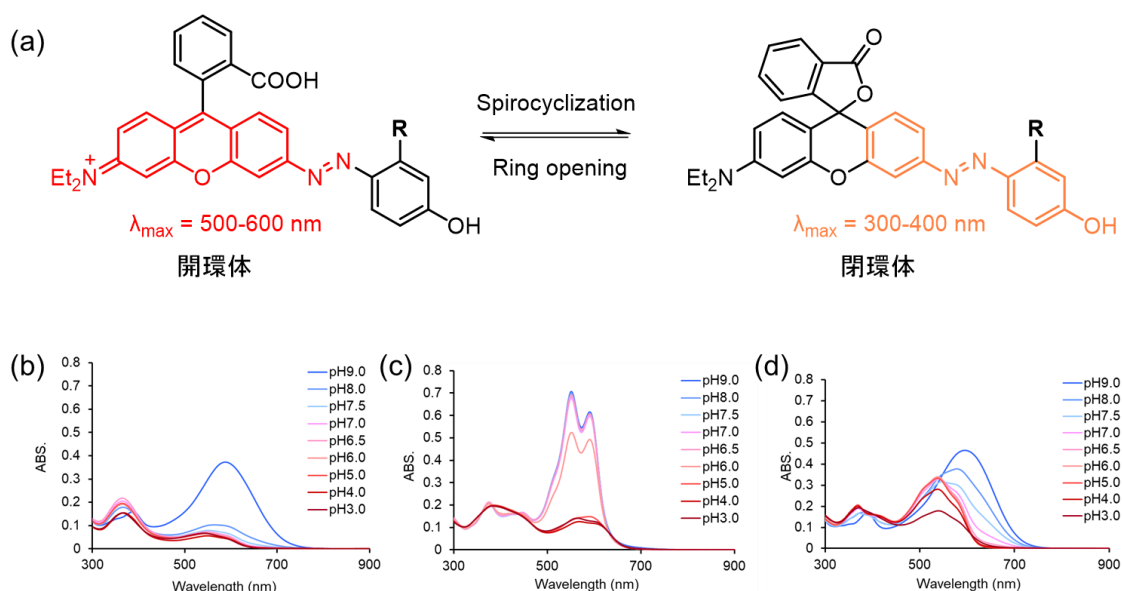


Figure 2.2 (a) Azo-Rho1–3 のスピロ環化の平衡によって生じた Azo-Rho1–3 の開環・閉環体の構造式および (b) Azo-Rho1、(c) Azo-Rho2、(d) Azo-Rho3 の pH プロファイル

Azo-Rho1–3 を 40% の MeOH を含む PB に 5 μ M となるように溶解した。その後、アルゴンで脱気し、硬 X 線を線量率 4.7 G min⁻¹ で 20 Gy 照射することで、アゾ化合物とほぼ等量の約 5.4 μ M の水和電子を発生させた。その後、硬 X 線照射後の溶液を HPLC によって分析した。硬 X 線照射後の溶液を確認したところ、全てのアゾ化合物溶液が DR 由来の赤色に変化したことが認められた (Figure 2.3a–c)。HPLC による分析の結果、硬 X 線照射によって Azo-Rho1–3 の原料のピークの面積が減少し、DR と同一の保持時間に新たなピークが生じたことが認められた (Figure 2.3d–f)。さらに

Azo-Rho1 および Azo-Rho3 では副生成物のピークが生じたことが認められた (Figure 2.3d、f)。

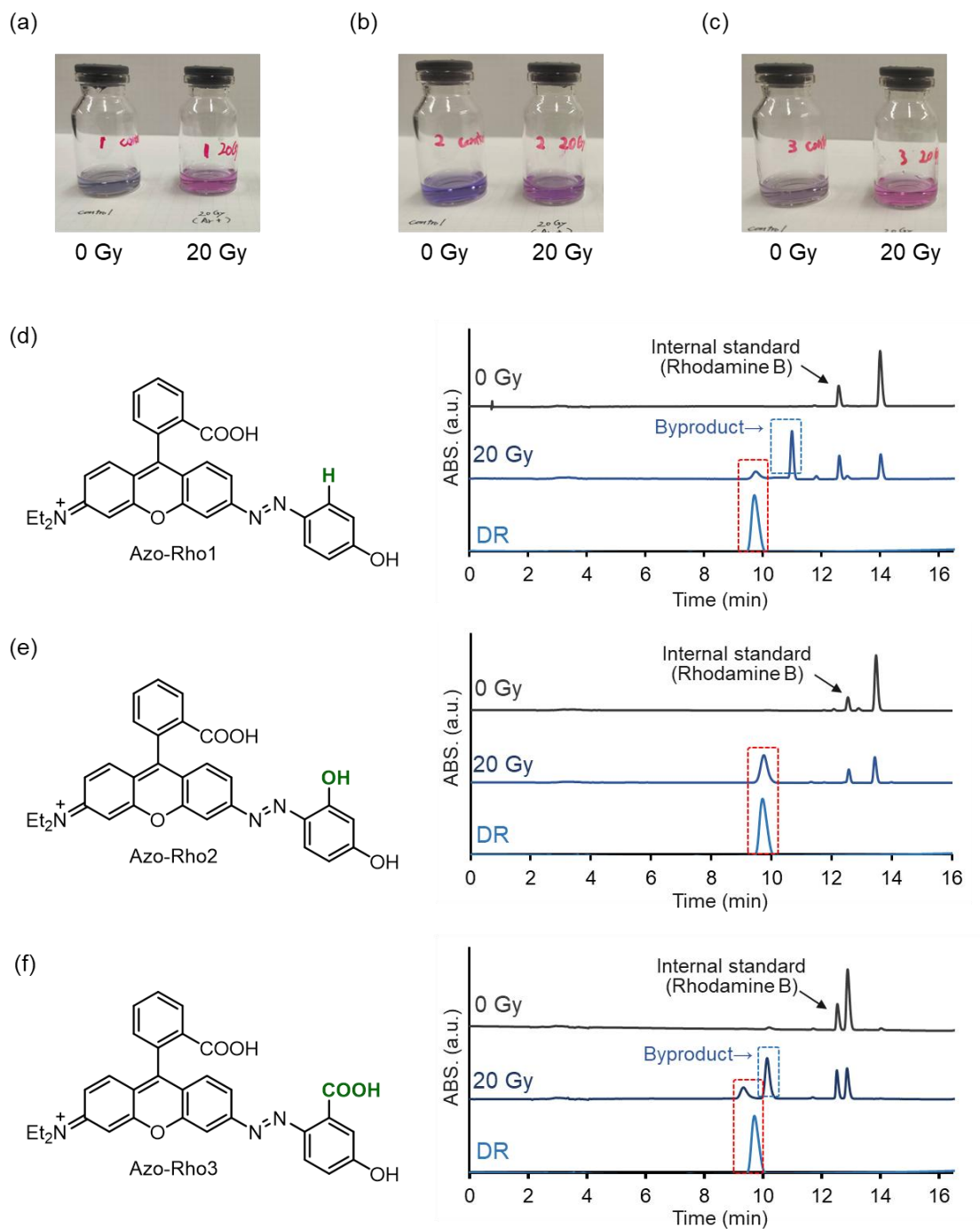


Figure 2.3 硬 X 線照射前後の (a) Azo-Rho1、(b) Azo-Rho2、(c) Azo-Rho3 溶液の写真。各写真の左側が硬 X 線照射前 (0 Gy)、右側が硬 X 線照射後 (20 Gy) のアゾ化合物溶液が入ったバイアルを示す。(d) Azo-Rho1、(e) Azo-Rho2、(f) Azo-Rho3 溶液の HPLC チャート。各パネルの上段が硬 X 線照射前 (0 Gy)、中段が照射後 (20 Gy)、下段が DR の HPLC チャートを示す。(検出波長: $\lambda = 538 \text{ nm}$ 、内部標準物質: Rhodamine B)

Azo-Rho1-3 の反応量と DR の生成量

HPLC チャートのピーク面積から Azo-Rho1-3 の反応量と DR の生成量を定量した。Azo-Rho1-3 の反応量はそれぞれ 1.9 μM (Azo-Rho1)、2.8 μM (Azo-Rho2)、2.3 μM (Azo-Rho3) でいずれも同程度であり有意差はなかった。一方で DR の生成量はそれぞれ、0.66 μM (Azo-Rho1)、2.8 μM (Azo-Rho2)、0.45 μM (Azo-Rho3)であり、Azo-Rho2 が最も多かった (Figure 2.4)。

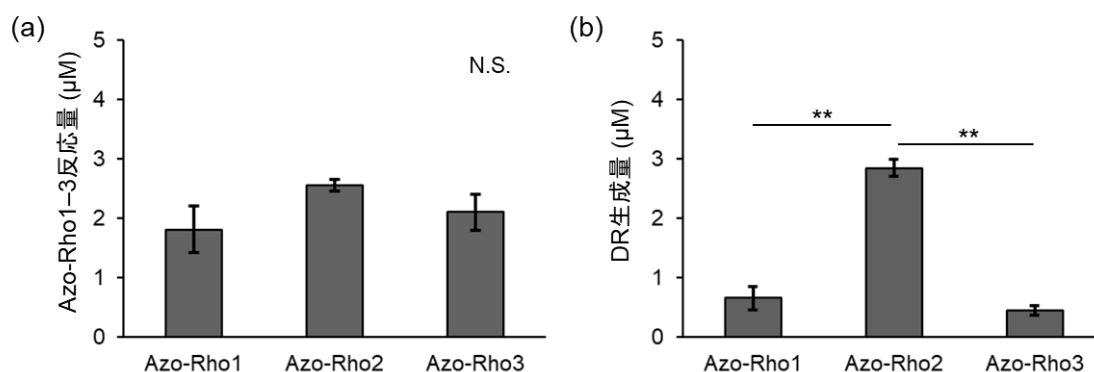


Figure 2.4 (a) 硬 X 線による Azo-Rho1-3 の反応量 (Error bars represent SEM: $n = 3-5$, Tukey-Kramer test) および (b) DR の生成量 (Error bars represent SEM: $n = 3-5$, Tukey test, $**p < 0.01$)

LC-MS による硬 X 線照射後の生成物の解析

LC-MS を用いて硬 X 線照射後に生じた生成物の質量電荷比を解析した。その結果、全てのアゾ化合物溶液から $m/z = +387$ の化合物が検出され、これは DR の質量電荷比と一致した (Figure 2.5a および b、Figure 2.6a および b、Figure 2.7a および b)。また硬 X 線照射後の Azo-Rho1 溶液からは副生成物として $m/z = +494$ (Figure 2.5a および c) の化合物が検出された。これは元の Azo-Rho1 の質量電荷比よりも +2 だけ大きい値であり、アゾ結合が二電子還元されて生じたヒドラジン体 (**34**) であると考えられる。さらに Azo-Rho3 溶液からは $m/z = +536$ の質量電荷比を持つ化合物が検出された。この化合物は Azo-Rho3 と同じ質量電荷比であるが異なる保持時間を有するため、Azo-Rho3 の *cis* 異性体 (*cis*Azo-Rho3, **35**) の可能性がある (Figure 2.7a および c)。そこで、Azo-Rho1 溶液と Azo-Rho3 溶液の副生成物が検出されたため、1 L の 1 mM Azo-Rho1 および 1 mM Azo-Rho3 溶液に硬 X 線を 100 Gy 照射し、カラムクロマトグラフィーによる副生物の単離を試みたが、単離後の化合物が不安定であり同定することはできなかった。

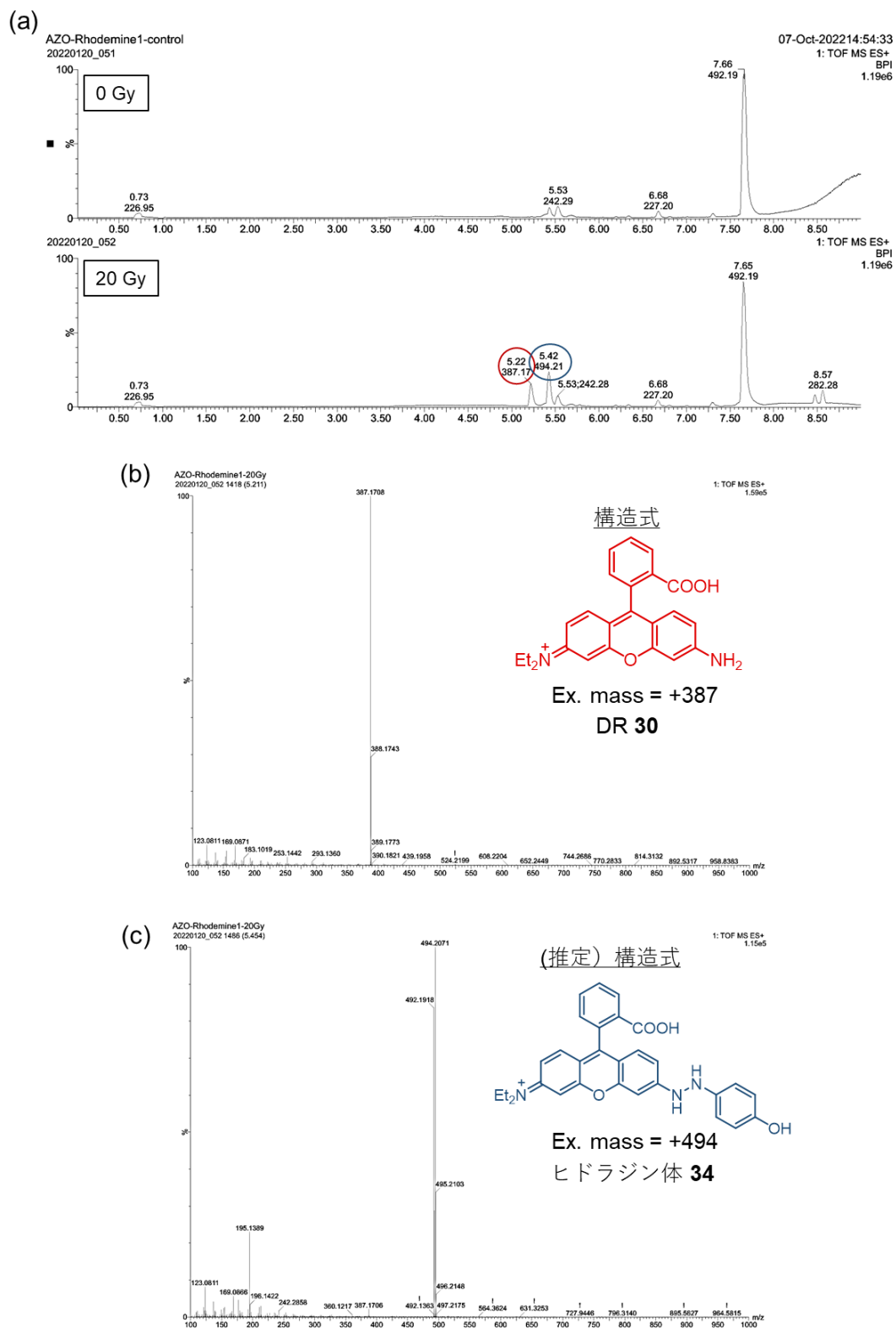


Figure 2.5 (a) 硬 X 線照射前後の Azo-Rho1 の LC-MS クロマトグラム (上段は 0 Gy、下段は 20 Gy を示し、赤の丸は DR のピーク、青の丸は副生成物 **34** のピークを表す。) (b) 硬 X 線照射後の DR の MS スペクトルおよび (c) ヒドラジン体 (**34**) の MS スペクトル

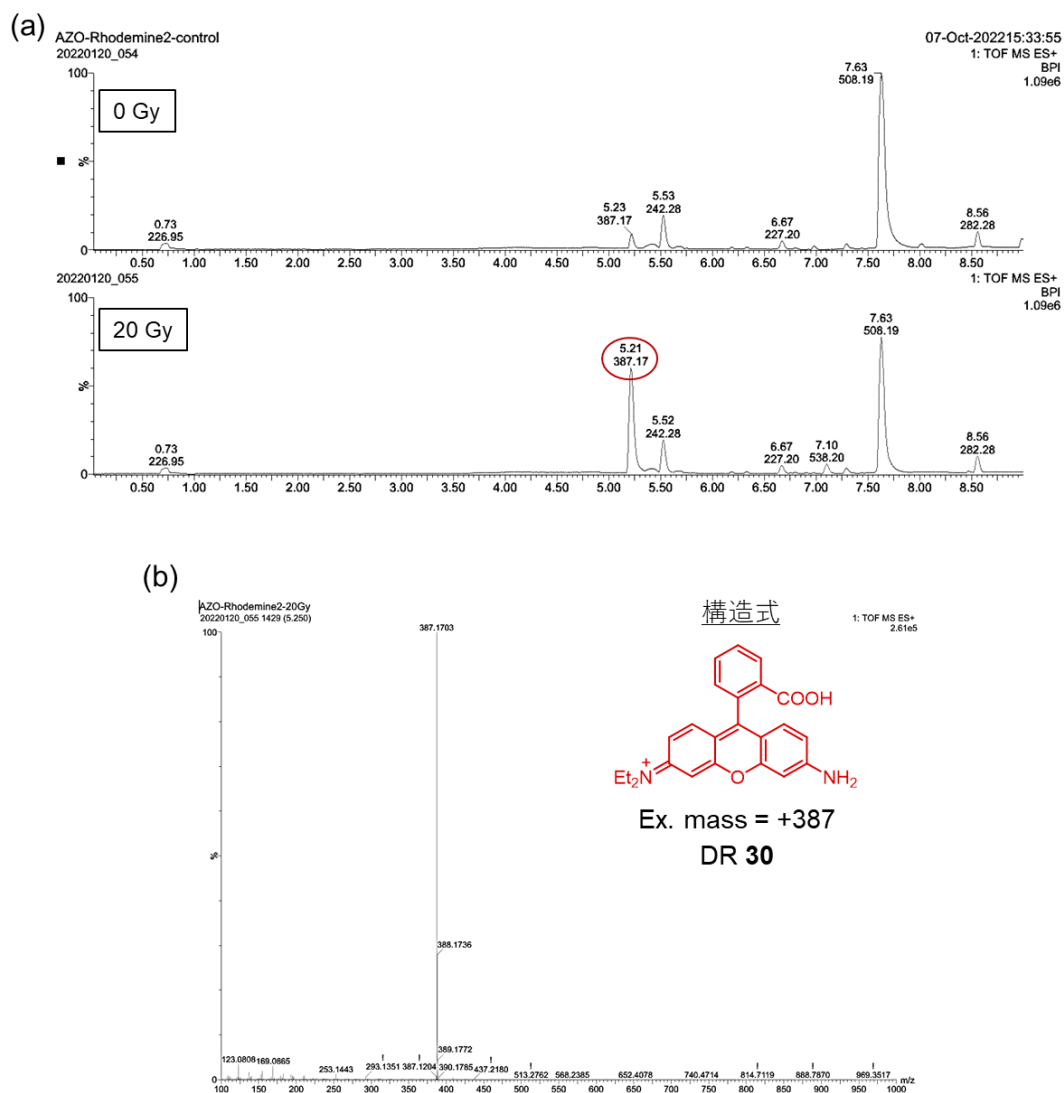


Figure 2.6 (a) 硬 X 線照射前後の Azo-Rho2 の LC-MS クロマトグラム (上段は 0 Gy、下段は 20 Gy、赤の丸は DR のピークを表す。) (b) 硬 X 線照射後の DR の MS スペクトル

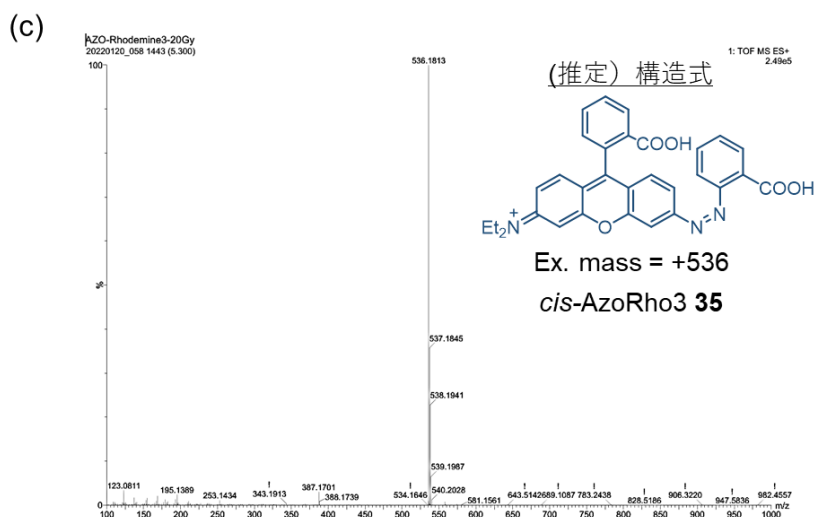
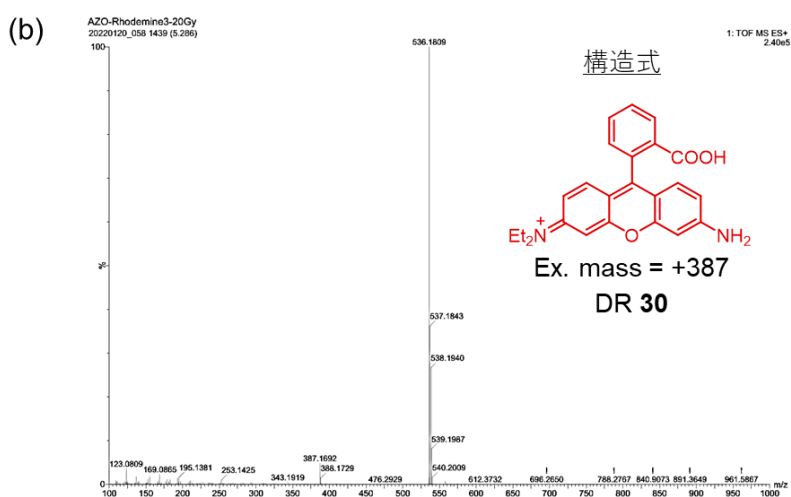
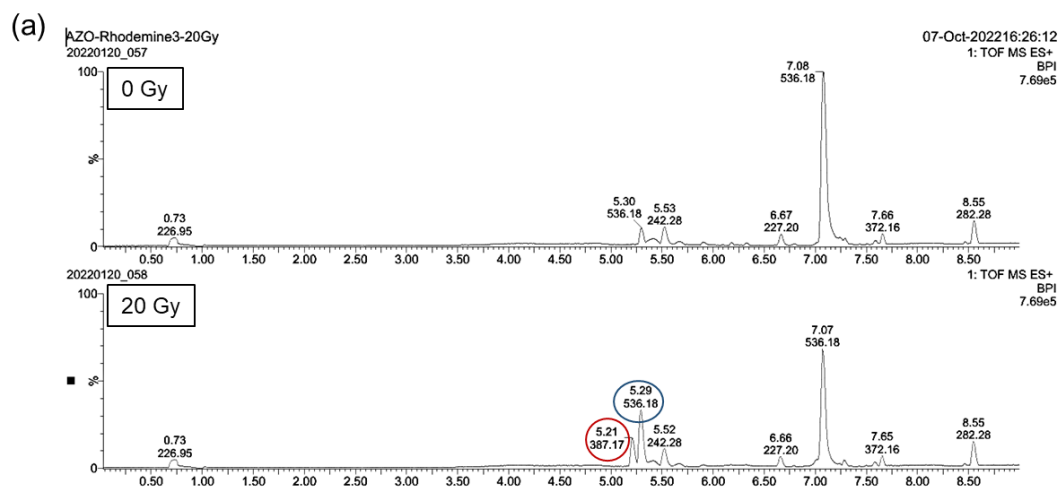


Figure 2.7 (a) 硬 X 線照射前後の Azo-Rho1 の LC-MS クロマトグラム (上段は 0 Gy、下段は 20 Gy、赤の丸は DR のピーク、青の丸は副生成物のピークを表す。)(b) 硬 X 線照射後の DR の MS スペクトルおよび (c) *cis*-AzoRh3 (35) の MS スペクトル

量子化学計算を用いたアゾ化合物と水和電子の反応評価

量子化学計算を用いて Azo-Rho1-3 と水和電子との反応の起こりやすさを評価した。量子化学計算では水和電子のエネルギーを記述するのが難しいため、水和電子の溶媒和による安定化エネルギーである vertical binding energy (VBE) とアゾ化合物の電子親和力 (electron affinity) を用いて反応性を評価した (Figure 2.8)。電子親和力には一電子還元状態の振動緩和を加味した断熱遷移に伴う電子親和力の adiabatic electron affinity (AEA) と振動緩和を考慮しない垂直遷移に伴う電子親和力の vertical electron affinity (VEA) の 2 つが存在する。水和電子の反応性に関して VBA が VEA に近い場合、解離性電子付着による還元反応が進行することが報告されている⁵⁰。そのため本検討では VEA を用いて水和電子との反応性を評価した (Figure 2.8)。

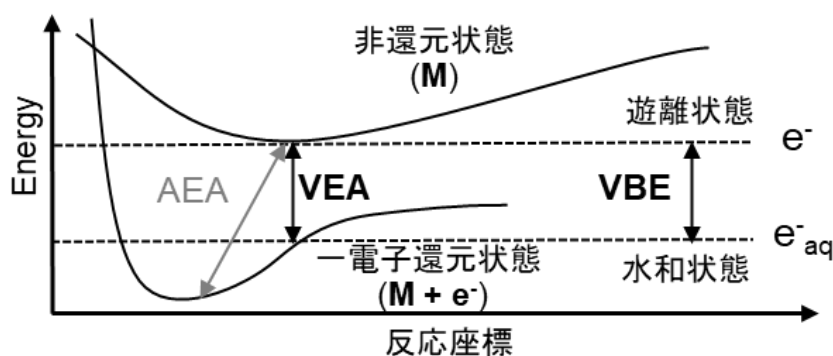
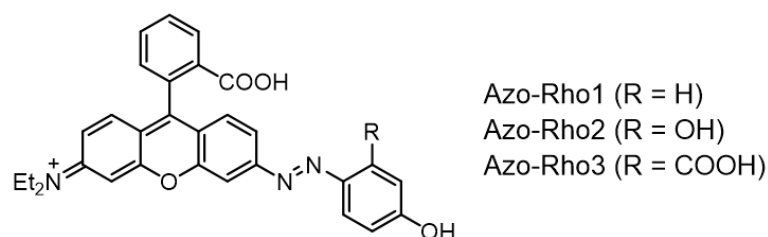


Figure 2.8 VBE、AEA、VEA の模式図

初めに Azo-Rho1-3 の最安定構造について GRRM17 プログラムを用いた sequential fragmentation - artificial force induced reaction (SF-AFIR) 法によって求めたところ⁵¹、Azo-Rho1-3 はいずれも *trans* 体が最安定構造であることが示された。そこで Azo-Rho1-3 の *trans* 体における非還元状態のエネルギーと等価な座標における一電子還元体のエネルギーを算出し、そのエネルギー差から VEA を求めた。その結果、Azo-Rho1-3 はいずれも 3.7 eV 付近に VEA を有していた (Table 2.1)。水和電子の VBE は 3.7 eV と報告されていることから⁵²、Azo-Rho1-3 はいずれも水和電子の解離性電子付着に基づく還元が起こりやすいと考えられる。続いて、別の還元されやすさの指標として LUMO エネルギーについて評価した結果、いずれの化合物も LUMO エネルギーは -2.0 eV 付近の値であることが認められた (Table 2.1)。また HOMO エネルギーはベンゼン環部に電求引性置換基が導入された Azo-Rho3 が最も低く、電子供与性置換基の導入された Azo-Rho2 が最も高い値だった。



	Azo-Rho1	Azo-Rho2	Azo-Rho3
VEA (eV)	3.70	3.68	3.77
LUMO (eV)	-2.00	-1.98	-2.11
HOMO (eV)	-7.96	-7.85	-8.13
HOMO-LUMO gap (eV)	5.96	5.87	6.02

Table 2.1 Azo-Rho1-3 の VEA, LUMO エネルギー、HOMO エネルギー、および HOMO-LUMO エネルギーギャップ (汎関数は ω B97X-D、基底関数は cc-pVDZ を用いた。溶媒効果は水の誘導体モデル IEFPCM によって計算した。)

水和電子が付着し、アゾ結合を還元しうるか検討するため Azo-Rho1 の LUMO および一電子還元状態の SOMO の電子軌道の分布を計算した。LUMO は電子が入りうる部位を示し、SOMO は還元後に電子が存在しうる部位を示すため、LUMO/SOMO の電子軌道が重なる場所で水和電子による還元が起こると考えられる。Azo-Rho1 の安定構造について探索したところ、最安定構造の *trans* 体の他にエネルギーが +0.18 kJ mol⁻¹ 高い *trans'* 体、+58.13 kJ mol⁻¹ 高い *cis* 体、+59.84 kJ mol⁻¹ 高い *cis'* 体の 4 つの安定構造が存在することが示された (Figure 2.9)。そこで、これら全ての一電子還元状態の SOMO と非還元状態の LUMO を比較した。その結果、いずれの安定構造についても SOMO および LUMO はローダミン部分からアゾ結合周辺にかけて分布していることが認められた。さらに HOMO はいずれの構造においても主にベンゼン環部に分布しているが、部分的にローダミン部分にも分布していることが認められた。

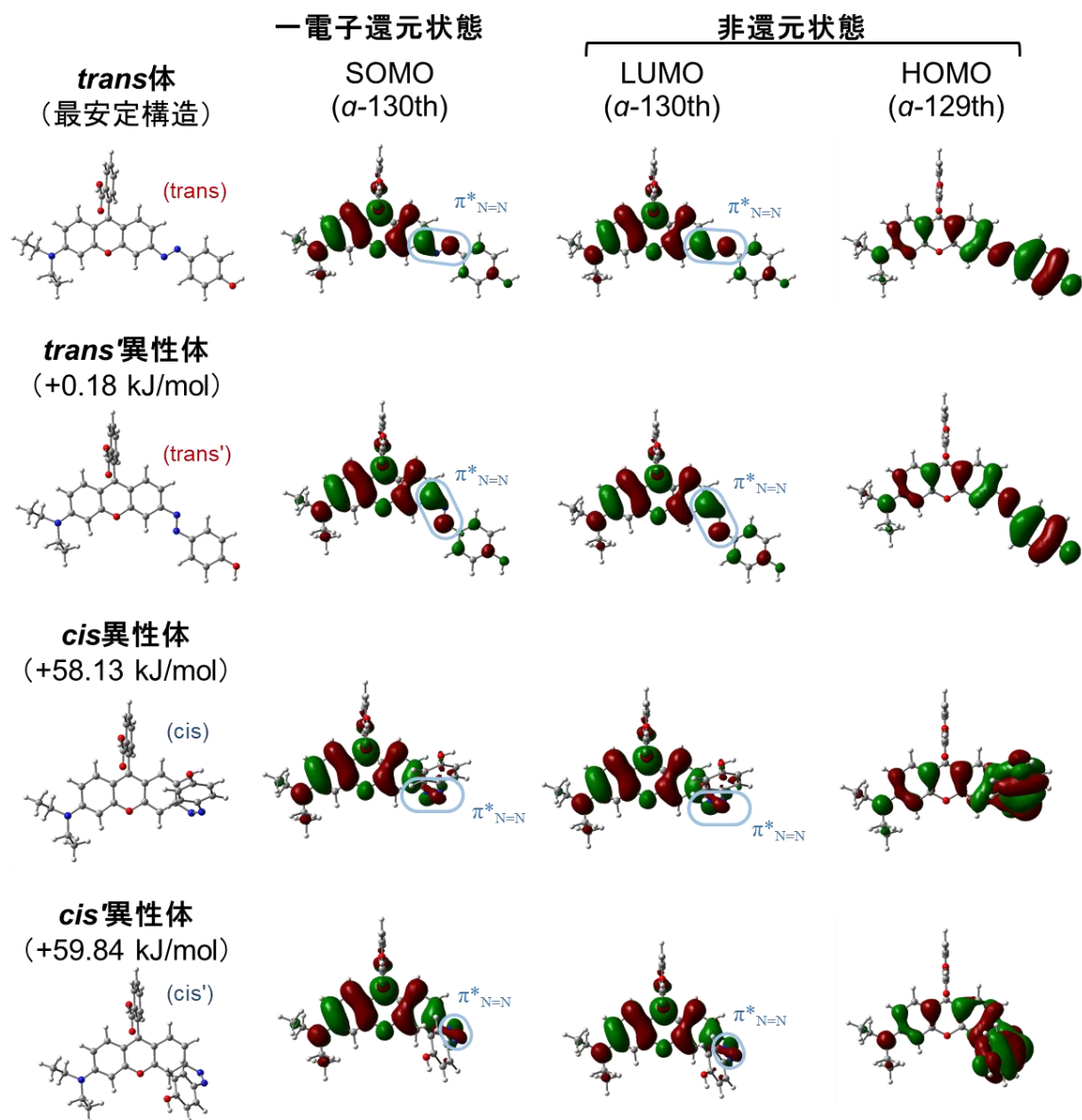


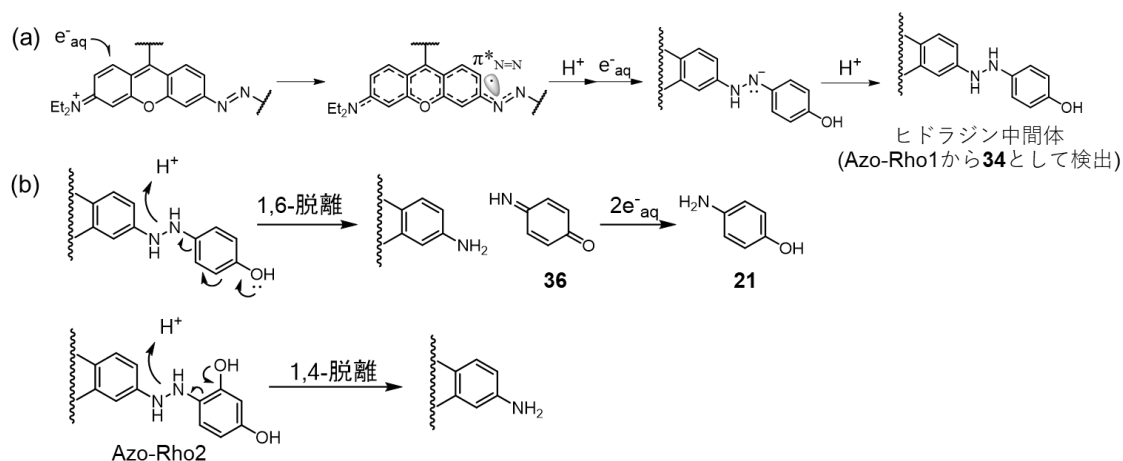
Figure 2.9 Azo-Rho1 の最安定構造を含む四つの安定構造の SOMO、LUMO および HOMO の分布。SOMO の計算では非還元状態の座標に従い計算した。(汎関数は ω B97X-D、基底関数は cc-pVDZ を用いた。溶媒効果は水の誘導体モデル IEFPCM によって計算した。)

考察

第二章では電子密度の増加に起因する副反応を抑え、水和電子によるアゾ結合の還元の選択的を向上させるために、アゾ結合を直接 π 共役系に組み込んだ設計を考案した。そのような構造としてローダミン骨格に着目し、ローダミン構造を有するアゾ化合物 Azo-Rho1-3 を設計・合成した。これらの化合物はアゾ結合が、共役系の長いカチオン性の芳香環に直結しているため、アゾ結合の電子が効果的に非局在化すると考えられる。さらにローダミン骨格中の正電荷は水和電子と静電相互作用を働かせ、反応効率を高めることができると考えられる。Azo-Rho1-3 が水和電子による還元を受け、共役系の反結合性軌道に付着した場合、アゾ結合の反結合性軌道の電子密度が増大するため選択的にアゾ結合が還元されると考えられる。また官能基の影響を評価するために Azo-Rho1 はベンゼン環部のオルト位に水素、Azo-Rho2 はヒドロキシ基、Azo-Rho3 はカルボキシ基が導入されている。

硬X線照射後の Azo-Rho1-3 溶液から DR が検出されたことから、Azo-Rho1-3 は全て水和電子によってアゾ結合が開裂することが示唆された。この時の DR の生成量は Azo-Rho2 が最も多かった。一方で、反応量についてはいずれの化合物も同程度であった (Figure 2.4)。さらに量子化学計算の結果から、VEA と LUMO エネルギーの値は Azo-Rho1-3 の間で大きな差はなく同程度の反応性であることが示された (Table 2.1)。以上の結果から、アゾ結合の開裂は以下の機構で進行すると考えられる。

一段階目では硬X線照射により生成した水和電子によってアゾ結合が二電子還元を受けることによってヒドラジン中間体を生成する (Scheme 2.3a)。このヒドラジン中間体は、Azo-Rho1 の溶液から $m/z = +424$ の副生成物として検出された。また、Azo-Rho1 の SOMO と LUMO の比較から、水和電子の付着はローダミン部分からアゾ結合の周辺にかけて起こることが示唆された (Figure 2.10)。従って Azo-Rho1-3 はこの部分において同一の構造を有するため、還元効率についても同程度であると考えられる。二段階目ではベンゼン環部のヒドロキシ基から電子供与を受けることで 1,6-脱離が起こり、ヒドラゾ基が開裂する (Scheme 2.3b)。ここで DR を最も多く生成した Azo-Rho2 はベンゼン環部にヒドロキシ基を 2 つ有するためにこの過程が早く、かつオルト位のヒドロキシ基からの電子供与によって 1,4-脱離も起こるために DR の生成量が Azo-Rho1 および Azo-Rho3 よりも高かったと考えられる。また、この時に生じたもう一つの開裂生成物であるキノンイミン (**36**) は、水和電子からさらに二電子還元を受け *p*-aminophenol 誘導体 (**21**) になると考えられる。



Scheme 2.3 アゾ結合開裂の推定メカニズム (a) 水和電子による二電子還元と (b) 1,6-脱離 (上段) または 1,4-脱離反応 (下段) によるキノンイミン体 (**36**) の生成

さらに硬 X 線照射後の Azo-Rho3 溶液から、元の Azo-Rho3 と同じ質量電荷比である $m/z = +536$ の化合物が検出された。これは、Azo-Rho3 の *cis* 異性体 (*cis*-Azo-Rho3) であると考えられる。これまでにアゾ結合が一電子還元^{53,54}または、X線によって生成したヒドロキシルラジカルからの酸化⁵⁵を受けるとアゾ結合の二重結合性が失われ、自由回転が起こり、異性化することが報告されている。そのため、Azo-Rho3 は水和電子による一電子還元またはメトキシラジカルからの一電子酸化を受け、同様の過程が起き *cis* 体に異性化した可能性がある。その場合、アゾ結合の開裂量が Azo-Rho3 と同程度であった Azo-Rho1 においても、同様に *cis* 異性体が検出される可能性が有るが、実際には検出できなかった。Azo-Rho3 はオルト位に水素結合ドナーとして寄与し得るカルボキシ基を有しているため、アゾ基窒素原子と六員環を介し、水素結合を形成しうる。従って、この水素結合により *cis*-Azo-Rho3 は熱力学的に安定化され、*cis-trans* 異性化に必要な活性化エネルギーが増大した結果、*cis* 体が検出可能な寿命を有したと考えられる。(Figure 2.10)。

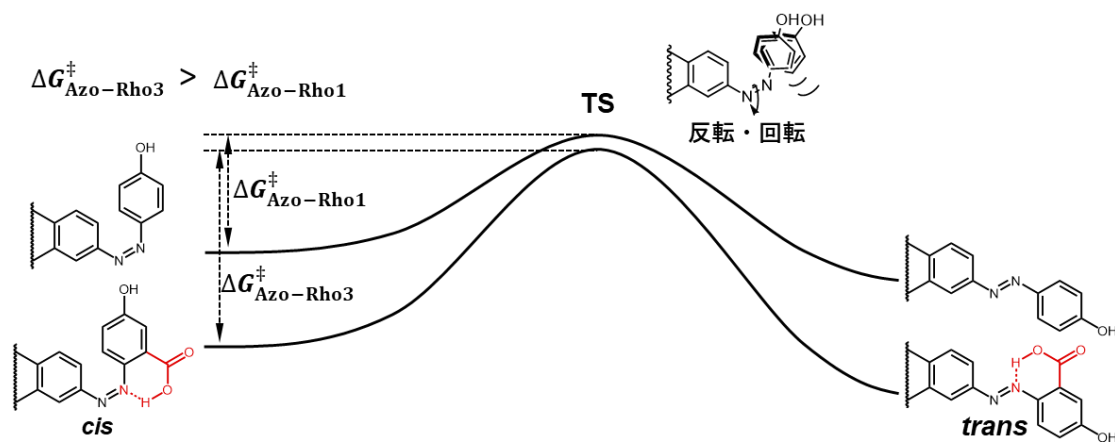
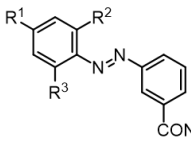


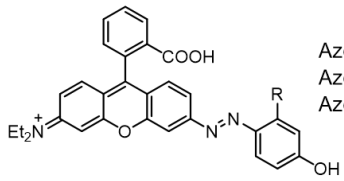
Figure 2.10 Azo-Rho1、Azo-Rho3 の *cis* から *trans* への異性化と水素結合の寄与に関する考察

20 Gy の硬 X 線照射で生成される水和電子の濃度 (5.4 μM) と上記の二電子還元機構を考慮すると、最大で 2.7 μM の DR が生成し得る。これを収率 100% とすると、Azo-Rho2 から生成された DR の収率はほぼ 100% であり、既存の硬 X 線により活性されるケージド化合物と比較しても劣らない反応効率であると考えられる。対照的に、Azo-Rho1 および Azo-Rho3 の収率はそれぞれ 24 %、17 % であった。より高効率なアゾ結合の開裂を実現するためには、二段階目の脱離過程を考慮し適切な電子供与性置換基を組み込むことが有効であると示唆された。

硬 X 線による反応は、1 Gy あたりの分解量や生成量によって反応効率が比較できる。そこで、前章の Azo1-3 と Azo-Rho1-3 の反応効率とアゾ結合の開裂効率について、1 Gy あたりの反応量およびアゾ結合の開裂生成物 (Azo1-3 では 3-ABA、Azo-Rho1-3 では DR) の生成量から比較した (Table 2.2)。ヒドロキシ基をベンゼン環部に 1 つ持つ Azo1 と Azo-Rho1 を比較すると Azo-Rho1 の反応効率は 90 nM Gy⁻¹ であり Azo1 の 59 nM Gy⁻¹ よりも高く、同様にヒドロキシ基を 2 つ持つ Azo2 と Azo-Rho2 を比較すると Azo-Rho2 の反応効率は 130 nM Gy⁻¹ であり Azo2 の 98 nM Gy⁻¹ よりも高い。従って、ローダミン骨格の導入は硬 X 線照射による反応性を高めることが示唆された。また、LUMO エネルギーの比較からも Azo1-3 は -0.80 eV から -0.66 eV の範囲内であり、Azo-Rho1-3 では -1.98 から -2.11 eV の範囲内であり LUMO エネルギーが低いことから、アゾ結合の還元効率は Azo-Rho1-3 の方が高いことが計算結果からも示唆された。一方で、開裂生成物の生成量は Azo1-3、Azo-Rho1 および Azo-Rho3 の間で大きな差は無かったが Azo-Rho2 はこれらの約 5 倍の生成量であった。これらの比較はローダミンとヒドロキシ基の導入の両方がアゾ結合の開裂効率を高める上で重要であることを示唆している。ただし、これらの反応量や生成量については Azo1-3 の硬 X 線照射が Azo-Rho1-3 よりも高濃度の条件で行われているため Azo-Rho1-3 の反応を過小評価している可能性がある。



Azo1 (R¹ = OH, R² = H, R³ = H)
Azo2 (R¹ = OH, R² = OH, R³ = H)
Azo3 (R¹ = OH, R² = OH, R³ = OH)



Azo-Rho1 (R = H)
Azo-Rho2 (R = OH)
Azo-Rho3 (R = COOH)

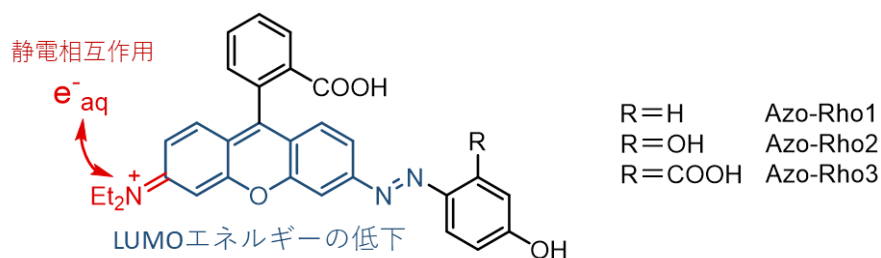
	Azo1	Azo2	Azo3		Azo-Rho1	Azo-Rho2	Azo-Rho3
反応量 (nM/Gy)	59	98	160	反応量 (nM/Gy)	90	130	105
3-ABA生成量 (nM/Gy)	29	30	25	DR生成量 (nM/Gy)	33	140	23

Table 2.2 Azo1-3 と Azo-Rho1-3 の 1 Gy あたりの反応量と開裂生成物の生成量

前章の Azo2 および Azo4 ではメトキシラジカルの付加体が検出されたが、Azo-Rho1-3 ではいずれのアゾ化合物からも付加体は検出されなかった。HOMO エネルギーを比較すると、Azo-Rho1 は Azo1 よりも HOMO エネルギーが高く、Azo-Rho2 は Azo2 よりも HOMO エネルギーが高い。従って、ローダミン骨格の導入は HOMO エネルギーを高めメトキシラジカルからの酸化的な攻撃が起こりやすくなる可能性がある。しかし、LC-MS による解析の結果、Azo-Rho1-3 溶液からメトキシラジカルの付加体は検出されなかった。また、Azo-Rho2 の反応量が DR 生成量と同程度であることを考慮するとメトキシラジカルやヒドロキシルラジカルによる副反応よりもアゾ結合の開裂が優先的に起こったと考えられる。この理由について、Azo-Rho1 の HOMO の電子は主にベンゼン環部に存在するが、部分的にローダミン骨格にも存在していることが認められる (Figure 2.9)。そのため、HOMO エネルギーが上昇する一方で、ベンゼン環部位の電子がローダミン骨格にも非局在化し、ヒドロキシルラジカルやメトキシラジカルからの反応が低減されたと考えられる。従ってローダミンの骨格の導入はアゾ化合物を還元させやすくするだけでなく、ラジカルの酸化付加等の副反応を低減させる可能性がある。

第二章の小括

第二章では、アゾ結合を直接 π 共役系に組み込み、アゾ結合の電子密度を低下させる目的でローダミン骨格を導入したアゾ化合物を合成した。明らかとなったアゾ結合の開裂メカニズムから、ローダミン骨格の導入は水和電子による還元過程の効率を高めることが示され、さらにヒドロキシ基などの電子供与性置換基は N-N 結合の開裂を促進することが示唆された。また、ローダミン部分に HOMO の電子が局在することで酸化等の副反応が抑制される可能性が示された。上記の結果より、アゾ結合の開裂効率を向上させるためにローダミン骨格導入し、水和電子との反応性を高める戦略は有効であると考えられる。



第三章: 硬 X 線によるアゾ結合の開裂を鍵反応とする 薬剤の活性化に関する検討

第二章の結果から、ローダミン骨格を導入することによって水和電子とアゾ結合の化合物の反応性を高めることが示唆された。さらに明らかとなった開裂メカニズムを応用することによって、薬剤の活性化が可能になると考えられる。そのため、本章ではアゾ結合の開裂が細胞内で起こることを示し、さらに硬 X 線により薬剤の放出が可能かどうかを検討した。

第一節: 細胞内の硬 X 線照射によるアゾ結合の開裂

アゾ結合開裂の線量依存性に関する検討

第一章および第二章では、新たに設計・合成したアゾ化合物の分解を HPLC や LC-MS などの分析機器によって解析したが、細胞内で起こるアゾ結合の開裂をこれらの分析機器で直接評価することは難しい。そこで Azo-Rho1-3 の光学特性に着目した。アゾ結合の振動・回転はピコ秒スケールで起こることが報告されている^{49,56,57}。蛍光はナノ秒スケールで起こるため⁵⁸、アゾ結合が蛍光性分子の共役系に組み込まれると蛍光よりも振動や回転などの緩和過程が先行し、その化合物は蛍光性を失う^{59,60}。従って、硬 X 線照射後の Azo-Rho1-3 を取り込んだ細胞内の蛍光を測定することで間接的にアゾ結合の開裂が起こったかを評価することができると考えられる (Figure 3.1a)。

Azo-Rho1-3 を 40% のメタノールを含むリン酸緩衝液に 5 μM となるように溶解した。その後、アルゴンで脱気し硬 X 線を線量率 4.7 Gy min^{-1} で 20 Gy 照射することで、水和

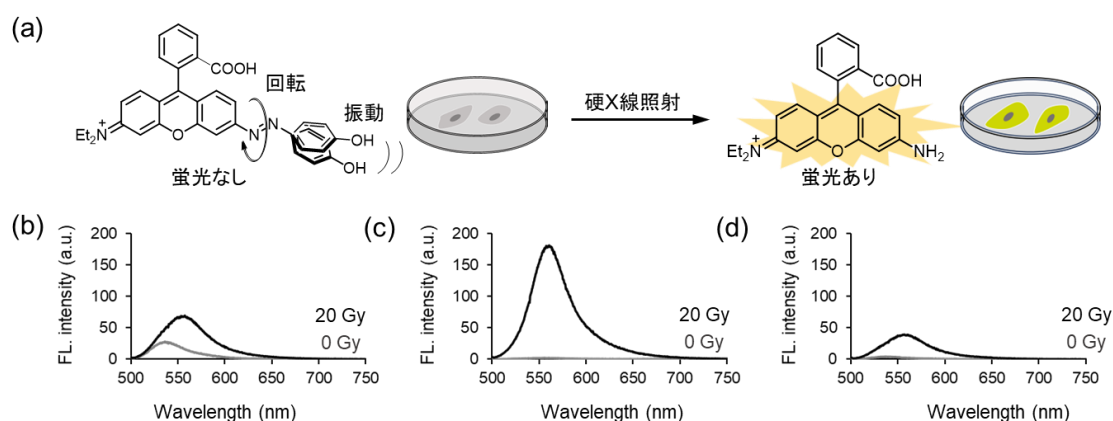


Figure 3.1 (a) アゾ結合の光学特性を利用した細胞内におけるアゾ結合の開裂評価方法 (b) Azo-Rho1、(c) Azo-Rho2、(d) Azo-Rho3 の硬 X 線照射前後の蛍光スペクトル (線量率: 4.7 Gy/min、照射線量: 20 Gy、励起波長: 488 nm)

電子をアゾ化合物とほぼ等量の約 5.4 μM 発生させた。硬 X 線照射前後の蛍光を比較した結果、Azo-Rho2 が最も蛍光強度が増加した。続いて、最も蛍光強度が増加した Azo-Rho2 を用いて、線量依存的に蛍光強度が増加するか評価した。Azo-Rho2 を 40% のメタノールを含む 1 mM のリン酸緩衝液に 5 μM となるように溶解し、アルゴンで脱気後、硬 X 線を 4–40 Gy 照射した。HPLC による分析の結果、いずれの線量においても DR と同じ保持時間に新たな化合物のピークが新たに生じていることが認められた (Figure 3.2a)。そこでピーク面積から DR の生成量を定量した結果、DR が線量依存的に生成したことが認められた (Figure 3.2b)。同様に DR の蛍光についても評価した。各バイアルに紫外光を照射したところ、溶液が黄色の蛍光を発することが視覚的に確認された (Figure 3.2c)。蛍光スペクトルを測定した結果、蛍光強度は硬 X 線照射線量の増加に伴って段階的に増大することが示された (Figure 3.2d)。このことから、DR の蛍光を用いてアゾ結合の開裂を評価できることが示唆された。

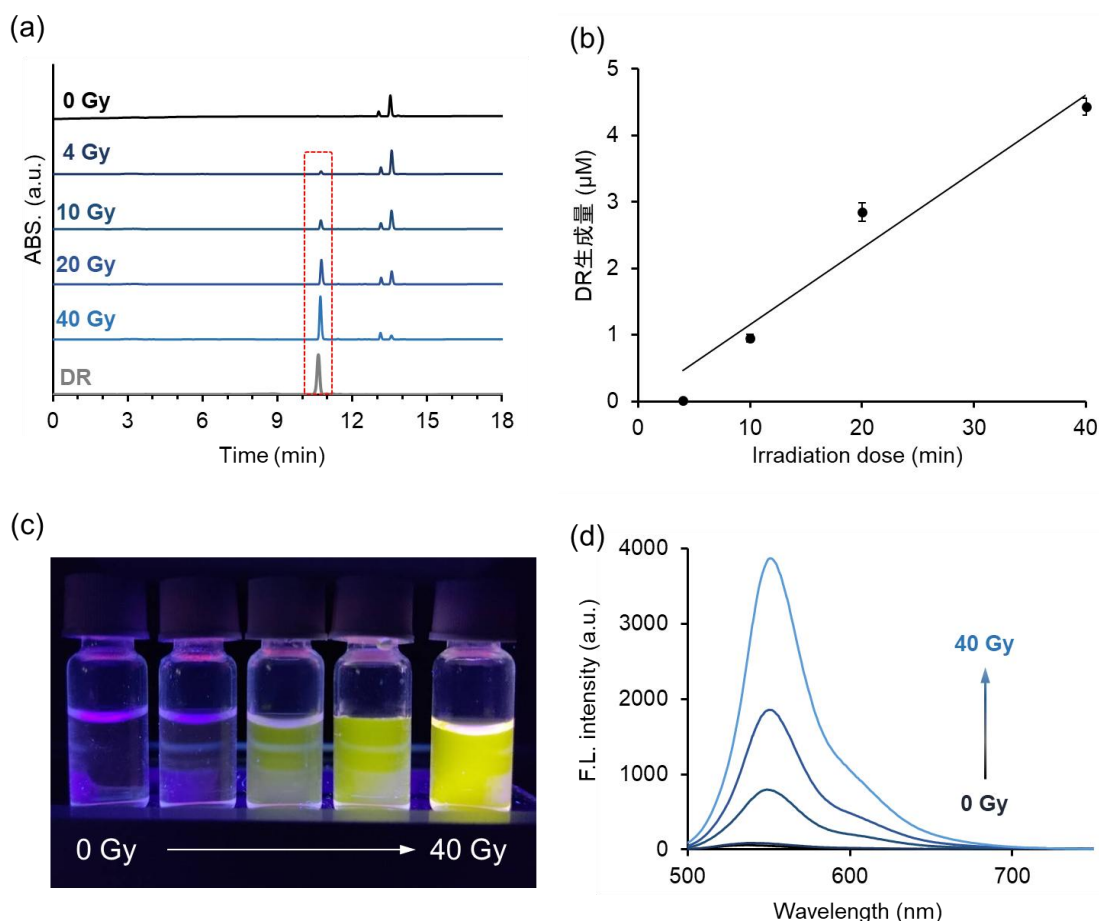


Figure 3.2 (a) 各線量における硬 X 線照射後の Azo-Rho2 溶液の HPLC クロマトグラム。(検出波長: 538 nm) (b) DR の生成量のプロット。(c) 紫外光で励起した各線量における Azo-Rho2 溶液の写真。(左から 0、4、10、20 Gy) (d) 各線量における Azo-Rho2 の蛍光スペクトル。(励起波長: 488 nm)

細胞内のアゾ結合の開裂評価

硬 X 線照射により Azo-Rho2 から生成する DR は蛍光により評価可能であることから、この特性を利用し硬 X 線照射で細胞内におけるアゾ結合の開裂を評価した。放射線影響の評価系として広く用いられている MOLT-4 細胞をモデル細胞株として選択した⁶¹。MOLT-4 細胞を含む培地に Azo-Rho2 を 5 μ M となるように溶解し、80 分インキュベートした。その後、培地を Azo-Rho2 を含まない PBS に置換して細胞外の Azo-Rho2 を除いた。PBS に置換された細胞懸濁液を 1 mL ずつ (細胞数 1.0×10^5) バイアルに分注し、N₂ ガスを 10 分間吹き付け脱気し、硬 X 線を 2.5–100 Gy 照射した。その後、硬 X 線照射直後の細胞生存率をトリパンブルー染色で評価し、細胞内の DR 由来の蛍光をフローサイトメトリーで測定した。細胞内のレダクターゼなどの影響を低減させるため PBS に置換後の一連の操作は全て氷冷条件下で行った。

トリパンブルー染色の結果、照射前の細胞生存率は 76% 以上であり、硬 X 線照射直後においても、いずれの線量条件においても 70% 以上の生存率が維持されていた。したがって、本実験で用いた線量範囲においては、硬 X 線照射による細胞死の影響は極めて小さいことが確認された (Figure 3.3)。一方、細胞内 DR の蛍光強度は、すべての照射線量条件において非照射群と比較して増大した (Figure 3.4a)。さらに、0–25 Gy の範囲では蛍光強度は線量依存的に増加したが (Figure 3.4b) 25 Gy を超える高線量領域では、蛍光強度は逆に線量依存的に減少した (Figure 3.4c)。以上より、細胞内においても硬 X 線照射によってアゾ結合を開裂できることが示された。

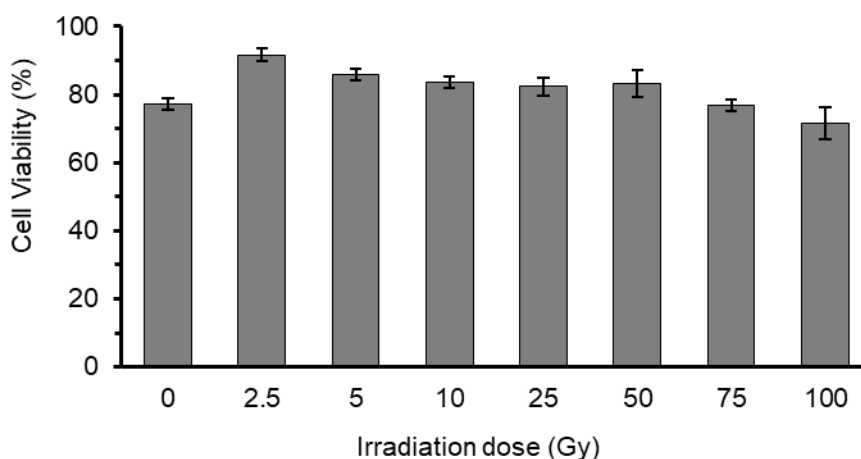


Figure 3.3 トリパンブルー染色試験から求められた各照射線量における細胞生存率。 (Error bars represent SEM: n = 3)

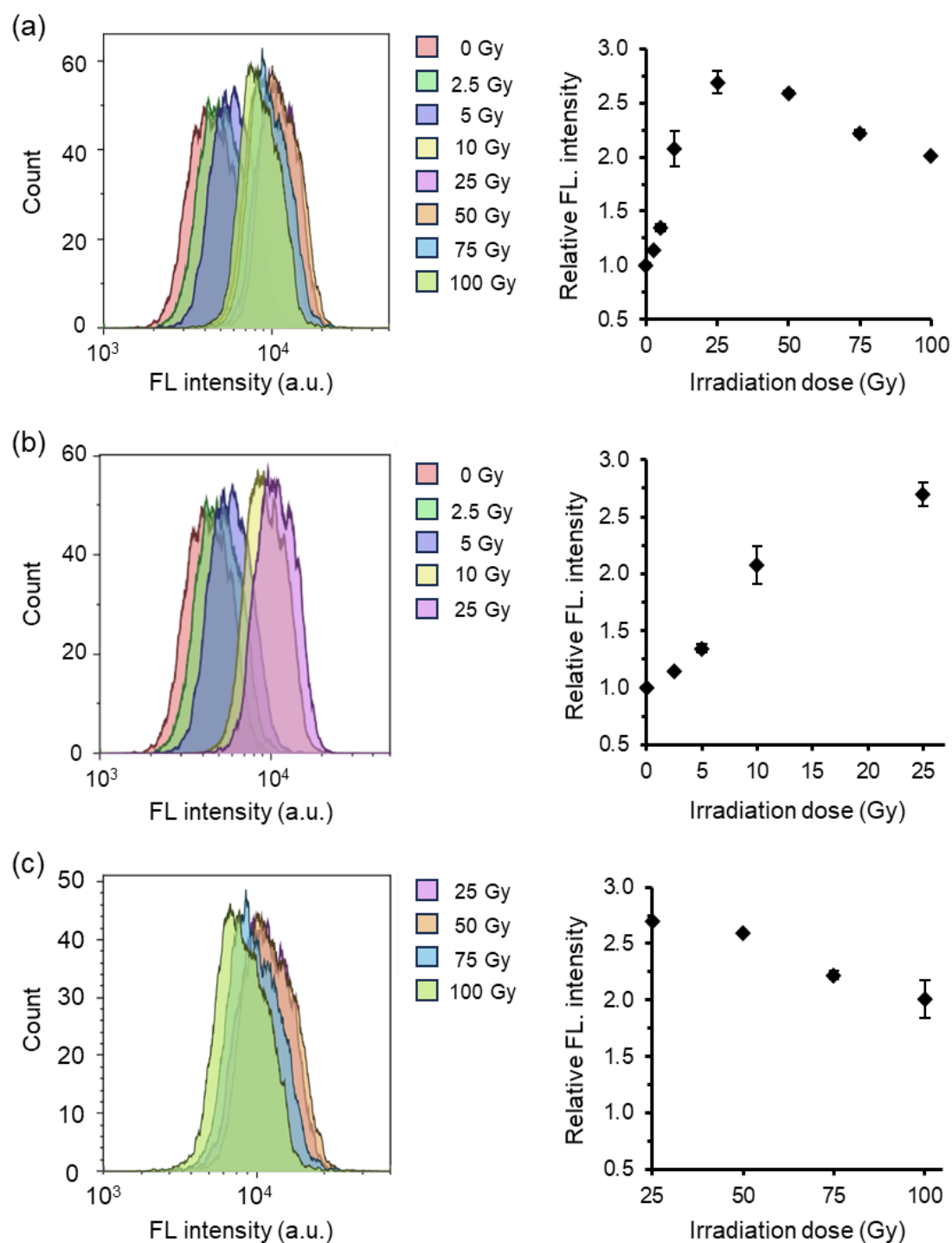
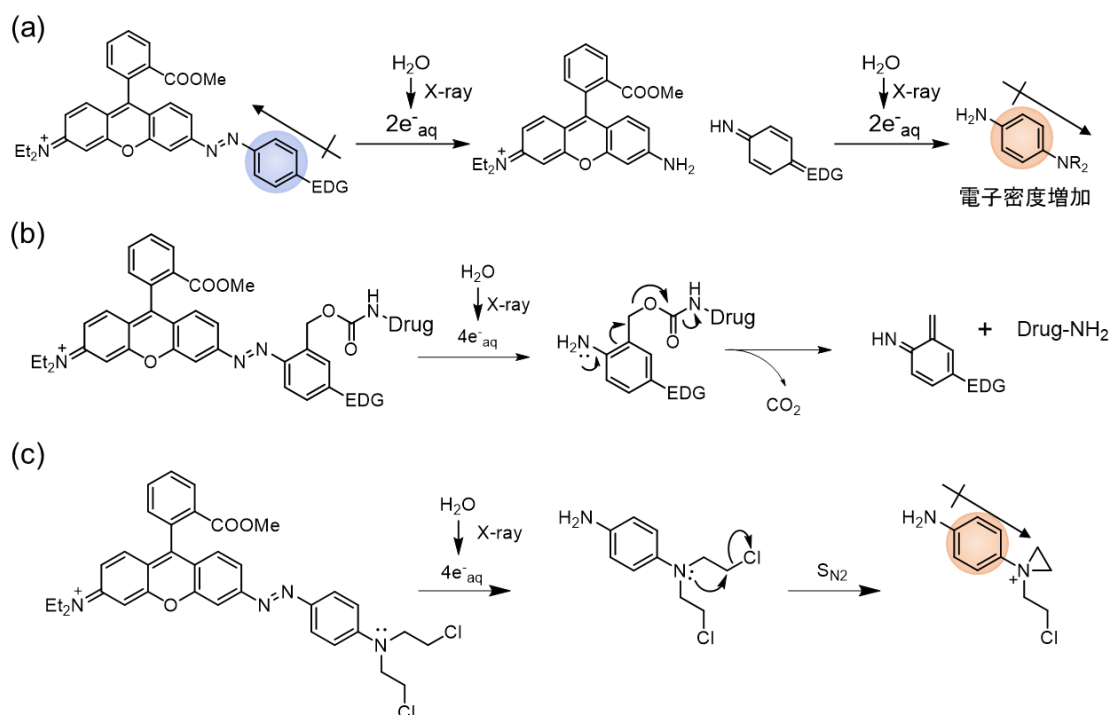


Figure 3.4 (a) 硬X線照射後のフローサイトメーターから得られた細胞の蛍光強度に関するヒストグラム (左) および 0 Gy の細胞内の DR 蛍光強度を 1 とした時の各線量における相対蛍光強度。(b) 線量依存的な蛍光強度の増加が見られた 0–25 Gy の線量域におけるヒストグラムおよび相対蛍光強度。(c) 線量依存的な蛍光強度の減少が見られた 25–100 Gy の線量域におけるヒストグラムおよび相対蛍光強度。(Error bars represent SEM: $n = 3$)

第二節: アゾ結合の開裂を利用した薬剤の放出

アゾ結合が硬 X 線照射によって二電子還元を受けると 1,6-脱離を経てアゾ結合が開裂する。これによってキノンイミン体が生じ、さらにこれが二電子還元されることによってアニリン誘導体を生成する (Scheme 3.1a)。この節ではアゾ結合の開裂メカニズムを応用し、薬剤を放出するような化合物を設計する。

薬剤の放出法は以下の二つの設計に従った。一つ目の設計は 1,4-脱離を利用した薬剤放出である。この設計ではアゾ結合の開裂後のアミノ基の共鳴効果によって二酸化炭素の生成を伴いながら薬剤が脱離する (Scheme 3.1, b)。この時の二酸化炭素の生成は反応全体をエントロピー的に有利にし、反応速度を高めることが期待できる。二つ目の設計は電子密度変化を利用した **nitrogen mastered** の活性化である。この設計では、水和電子による還元前はアゾ結合の電子吸引力によりクロロエチル基の結合した窒素原子の lone pair が安定化され求核性が抑えられているが、還元後ではアミノ基が電子供与性置換基として働き、クロロエチル基の結合した窒素原子の lone pair が不安定化し、分子内 S_N2 反応を起こすことで細胞障害性を持つアジリジニウムカチオンを生じる (Scheme 3.1c)。この説ではこれら 2 つの設計指針に基づき分子を合成した。



Scheme 3.1 (a) アゾ結合の開裂スキームと四電子還元によるアニリン誘導体の生成 (b) アゾ結合開裂後のアミノ基の共鳴効果を利用した 1,4-脱離による薬剤放出機構 (c) アゾ基/アミノ基の電子求引性/供与性を利用した **nitrogen mastered** の活性化機構

1,4-脱離により薬剤を放出する化合物の合成

初めに 1,4-脱離によって薬剤を放出する化合物の合成を検討した。放出する薬剤としては doxorubicin (37) を選択した。ベンゼン環部には 1,6-脱離を促進するため強い電子供与性置換基であるジメチルアミノ基またはヒドロキシ基を 2 つ導入することとし、アゾ化合物 38、AzoNMe-Dox (39)、40、AzoOH-Dox (41) の合成を試みた (Figure 3.5)。

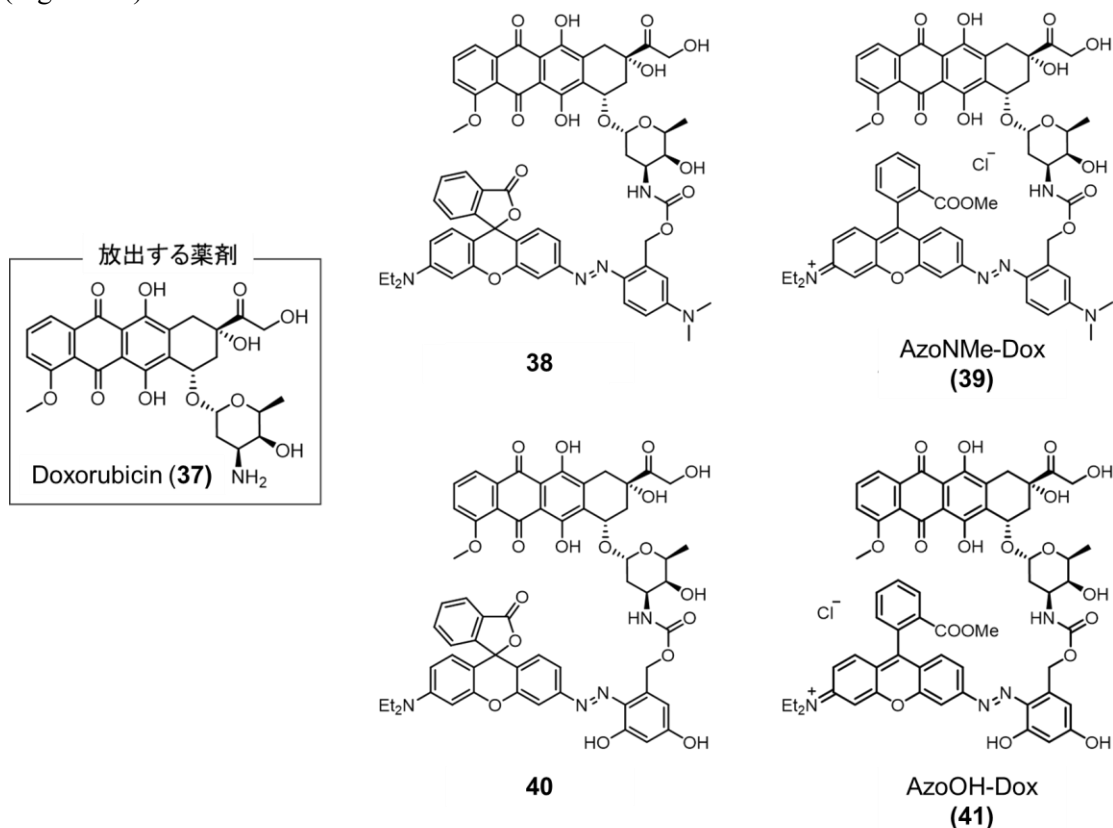
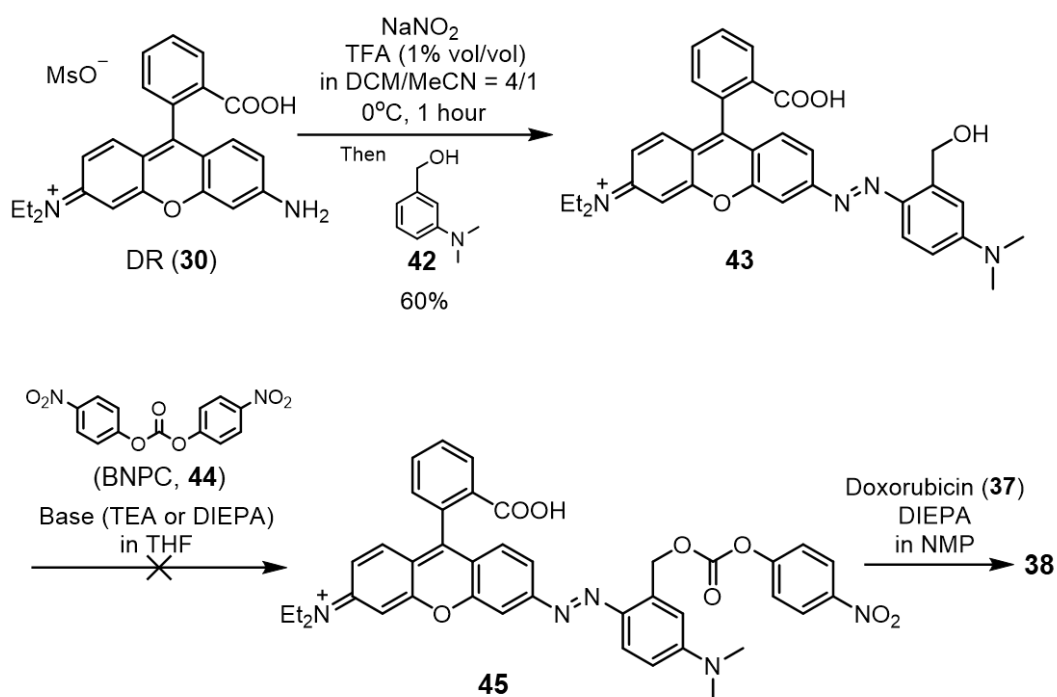


Figure 3.5 硬 X 線照射により doxorubicin (37) を放出すると予想される化合物 38–41

38 および AzoNMe-DOX (39) の合成

初めに、ジメチルアミノ基を導入した 38 の合成ではアゾカップリング後に doxorubicin (37) を縮合させる合成経路を採用した (Scheme 3.2)。

一段階目のアゾカップリングは収率 60% で進行し、アゾ化合物 43 の合成に成功した。しかしながら、二段階目の反応において 43 と縮合剤 Bis (4-nitrophenyl) chloroformate (BNPC, 44) を反応させたが、期待されたアゾ化合物 45 は合成できず、異なる化合物の生成が認められた。



Scheme 3.2 DR のアゾカップリング後に縮合剤を反応させる合成経路

カラムクロマトグラフィーによって精製した副生成物の構造を $^1\text{H-NMR}$ で同定し、縮合反応前の NMR チャートと比較した結果、縮合反応後の NMR チャートでは 4.9 ppm 付近のベンジル位の水素の 2H 分が消失し (Figure 3.3a)、8.2 ppm の低磁場領域における singlet のプロトンが 1H 分増加したことが認められた (Figure 3.3b)。このことからカルボネート体の **45** が分解しアルデヒドとなった **46** が生成したと考えられた。従って、アゾカップリング後に縮合剤を反応させる合成経路では目的物を合成できないことが示唆された。

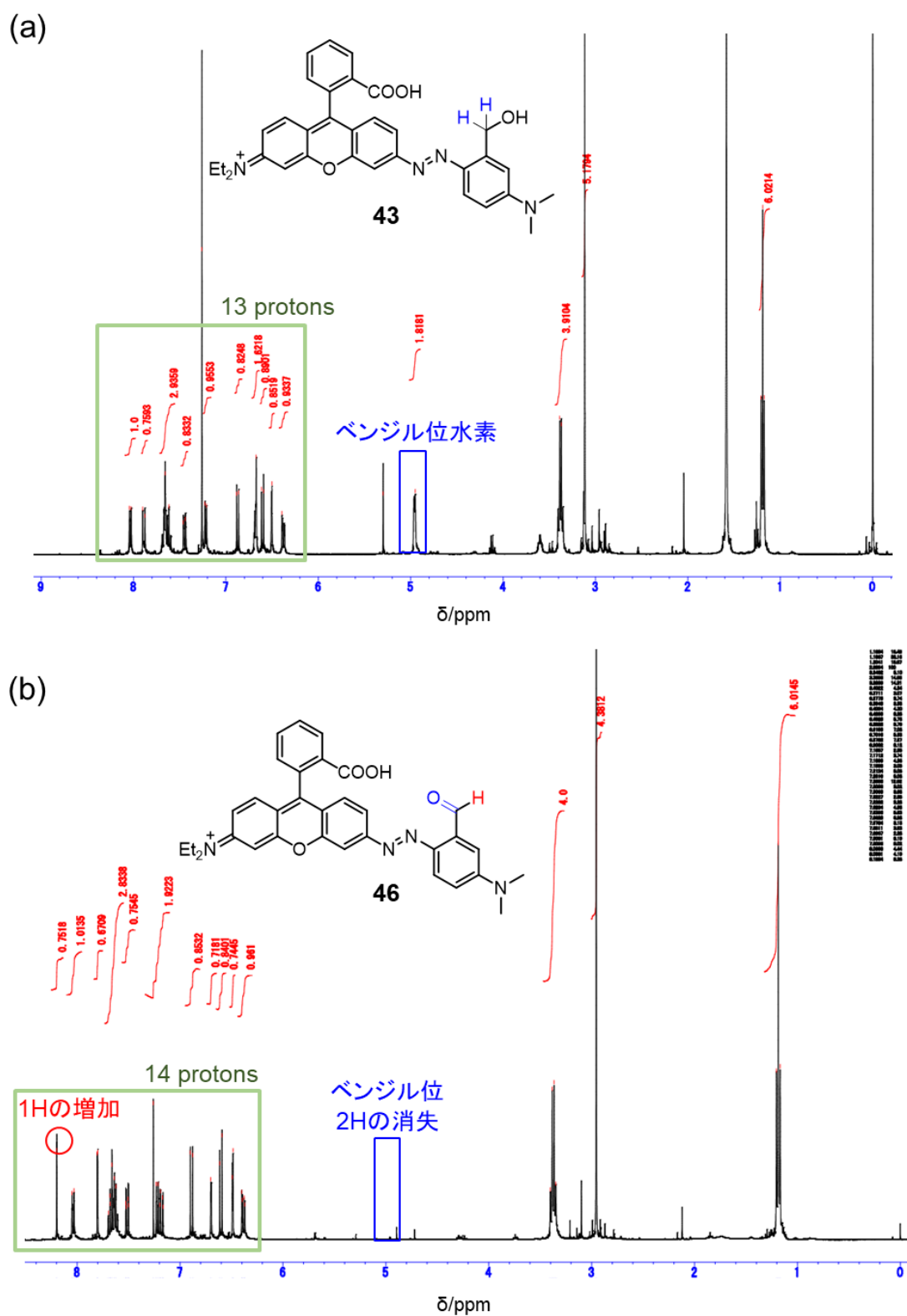
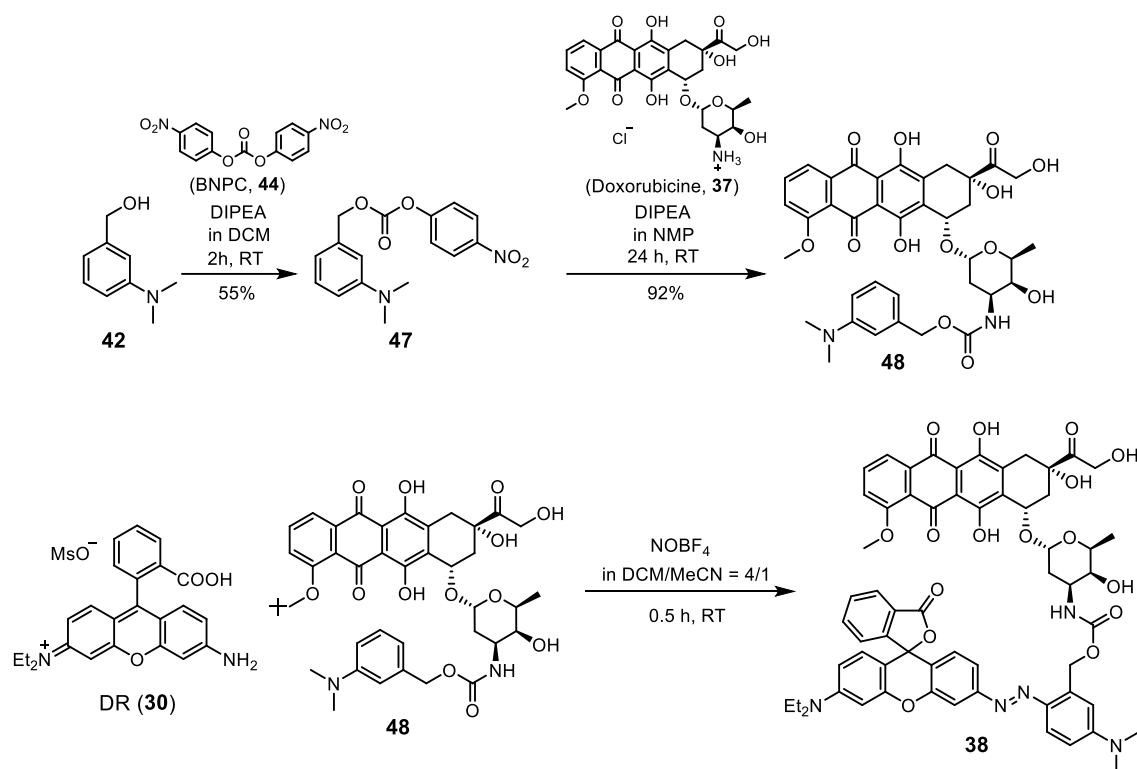


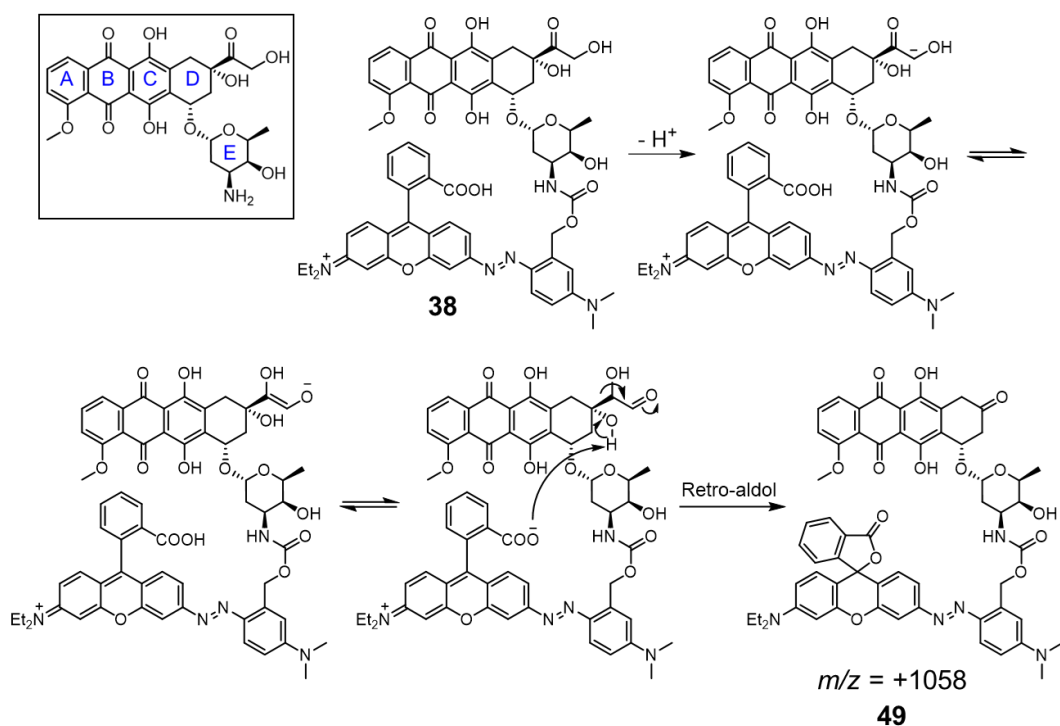
Figure 3.3 (a) BNCP (44) 反応前の 43 の NMR チャートおよび (b) 縮合剤反応後の 46 の NMR チャート。

そこで、doxorubicin の縮合をアゾカップリングの前に行う合成経路に変更した。3-Dimethylaminobenzyl alcohol (**42**) を BNPC (**44**) を縮合剤として doxorubicin と反応させたところ 92%の収率で **48** が得られた (Scheme 3.3)。



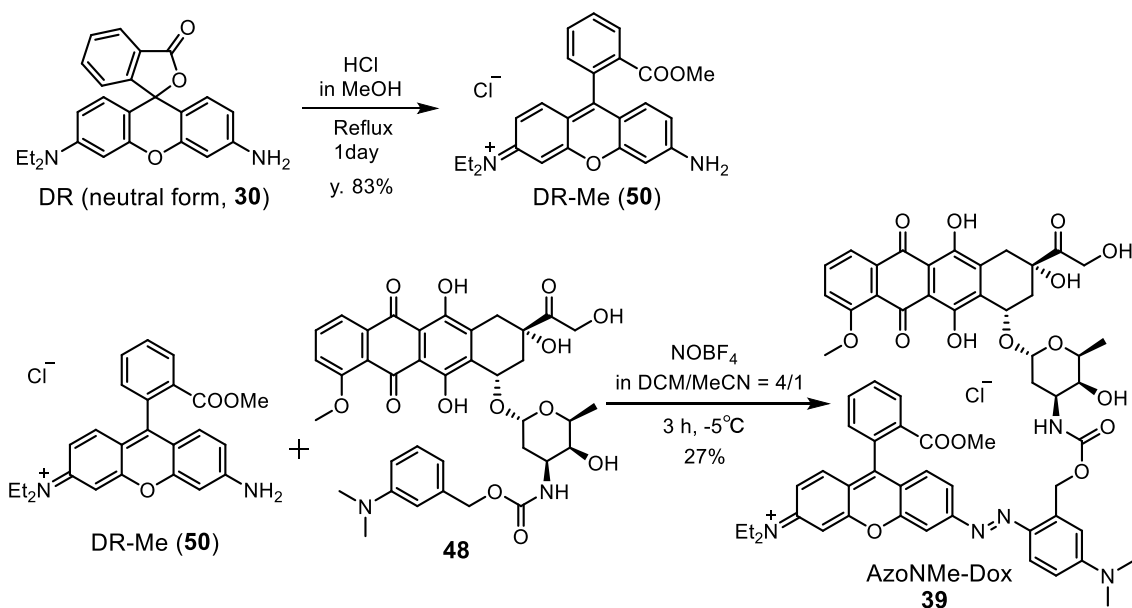
Scheme 3.3 アゾカップリング前に縮合剤を反応させる合成経路

続いて、**48** に対し DR をアゾカップリングさせたところ、**38** の生成が ESI-MS による分析から認められた。そこで RP-HPLC によって **38** の単離を試みたが、**38** は非常に不安定であり $m/z = +1058$ の化合物に徐々に分解することが認められた。この分解が起こった理由として、D 環と立体的に近い位置にある **38** のカルボキシ基が D 環ヒドロキシ基の水素を引き抜き、retro-aldol 反応が起こり **49** を生成したためであると考察した (Scheme 3.4)。



Scheme 3.4 レトロアルドール反応による **37** からの **49** への分解スキーム

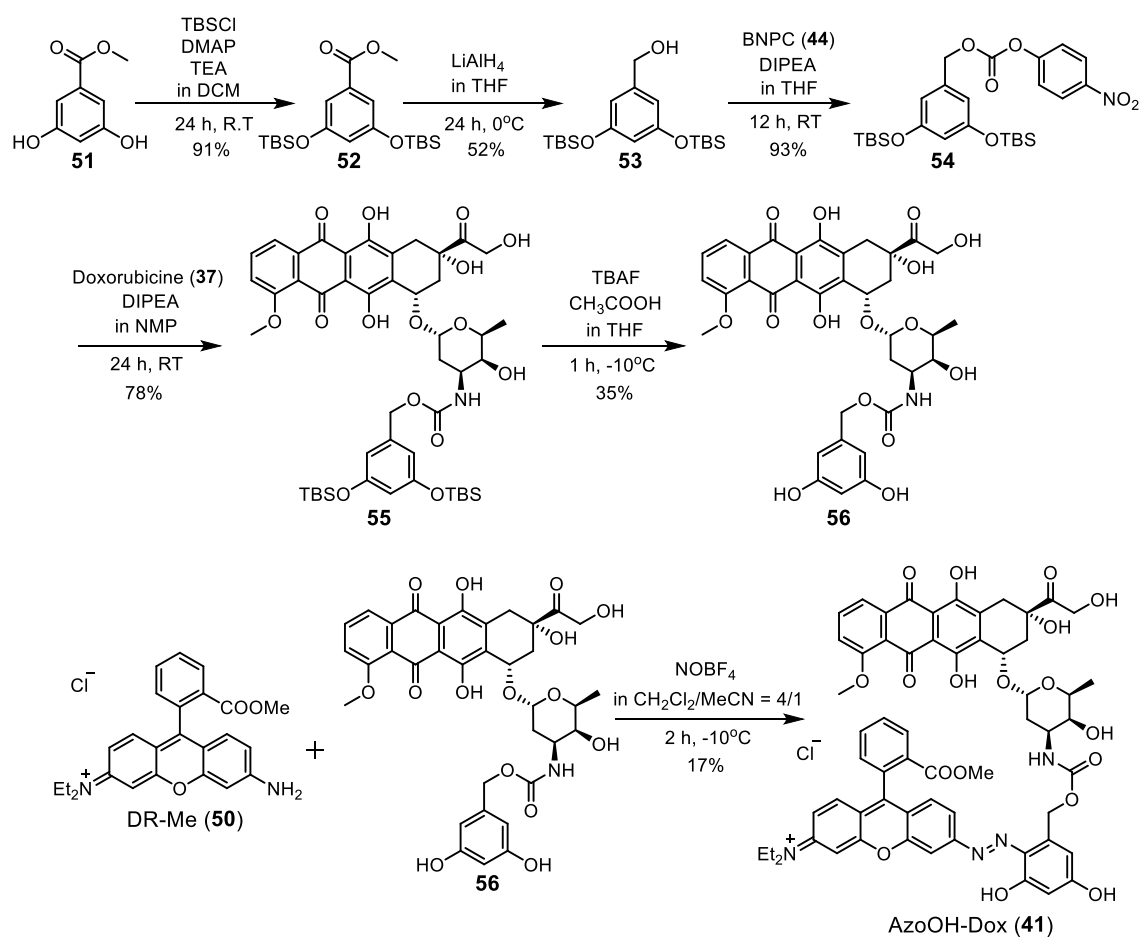
カルボン酸由来の retro-aldol 反応を避けるため、先に DR のメチルエステル化体 DR-Me (DR-Methyl ester, **50**) を合成した。その後 DR-Me と **48** のアゾカップリングにより AzoNMe-Dox (**39**) を合成した (Scheme 3.5)。合成した化合物は HRMS と EA により同定した。



Scheme 3.5 AzoNMe-Dox (**39**) の合成スキーム

AzoOH-Dox (41) の合成

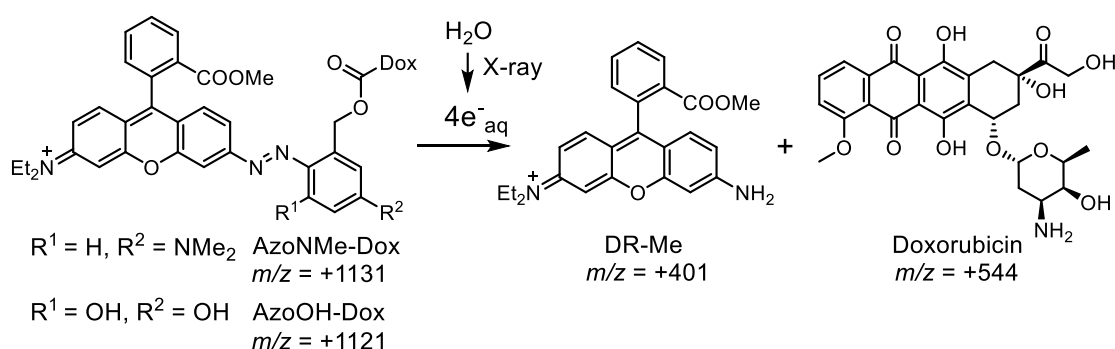
AzoNMe-Dox (39) の合成検討から、40 の合成においても retro-aldol 反応に由来する副反応が生じることが懸念されたため、AzoOH-Dox (41) の合成を検討した。AzoOH-Dox の合成においても副反応を避けるため、doxorubicin (37) と BNPC (44) を用いた縮合反応をアゾカップリングの前に行った。3,5-dihydroxy benzoic acid (51) の水酸基をシリル保護し (52)、LiAlH₄によってカルボキシ基をアルコールに還元した (53)。53 を BNPC (44) と反応させ 54 を合成し、続いて doxorubicin と縮合させ 55 を合成した。55 のシリル基を脱保護し (56)、DR-Me (50) と 56 をアゾカップリングさせることで AzoOH-Dox (41) を合成した (Scheme 3.6)。合成した化合物は HRMS と EA より同定した。



Scheme 3.6 AzoOH-Dox (41) の合成スキーム。

硬 X 線照射による AzoNMe-Dox および AzoOH-Dox の反応解析

AzoNMe-Dox、AzoOH-Dox を 50% のメタノールを含むリン酸緩衝液に 10 μM となるように溶解させた。その後、アルゴンで脱気し、硬 X 線を線量率 2.63 Gy min^{-1} で 20–100 Gy 照射することで、水和電子をアゾ化合物と 0.5–1.5 等量の約 5.4–16.2 μM 発生させた。その後、硬 X 線照射後の溶液を LC-MS によって分析した。AzoNMe-Dox および AzoOH-Dox が硬 X 線照射によって四電子還元を受けると DR-Me と doxorubicin が生成すると考えられる。



Scheme 3.7 硬 X 線照射による AzoNMe-Dox/AzoOH-Dox からの doxorubicin の生成

初めに硬 X 線照射による AzoNMe-Dox の反応について分析した。AzoNMe-Dox の質量電荷比である $m/z = +1131$ のクロマトグラムから、硬 X 線照射により AzoNMe-Dox が線量依存的に反応することが認められた。ピーク面積の減少量から AzoNMe-Dox の反応量を定量した。その結果、AzoNMe-Dox は 0.41–3.9 μM の範囲内で反応したことが示された (Figure 3.5a)。

同様に、DR-Me の質量電荷比である $m/z = +401$ のクロマトグラムから、DR-Me が線量依存的に生成することが認められた。DR-Me のピーク面積から生成量を定量した結果、DR-Me は硬 X 線照射によって 0.82–1.8 μM 生成することが示された (Figure 3.5 b)。

Doxorubicin の質量電荷比である $m/z = +544$ のクロマトグラムから、AzoNMe-Dox の不安定性に起因し、0 Gy においても doxorubicin のピークが検出された。そこで 0 Gy のピーク面積を差し引き、各線量における doxorubicin の生成量を定量した。その結果、40 Gy の照射線量において 0.23 μM の doxorubicin が生成されたが、0 Gy および 60 Gy では doxorubicin がほとんど生成しないことが示された (Figure 3.5c)。AzoNMe-Dox は硬 X 線照射によって線量依存的に反応することで 1,6-脱離を起こし DR-Me を生成する一方で doxorubicin の生成は少量だった。

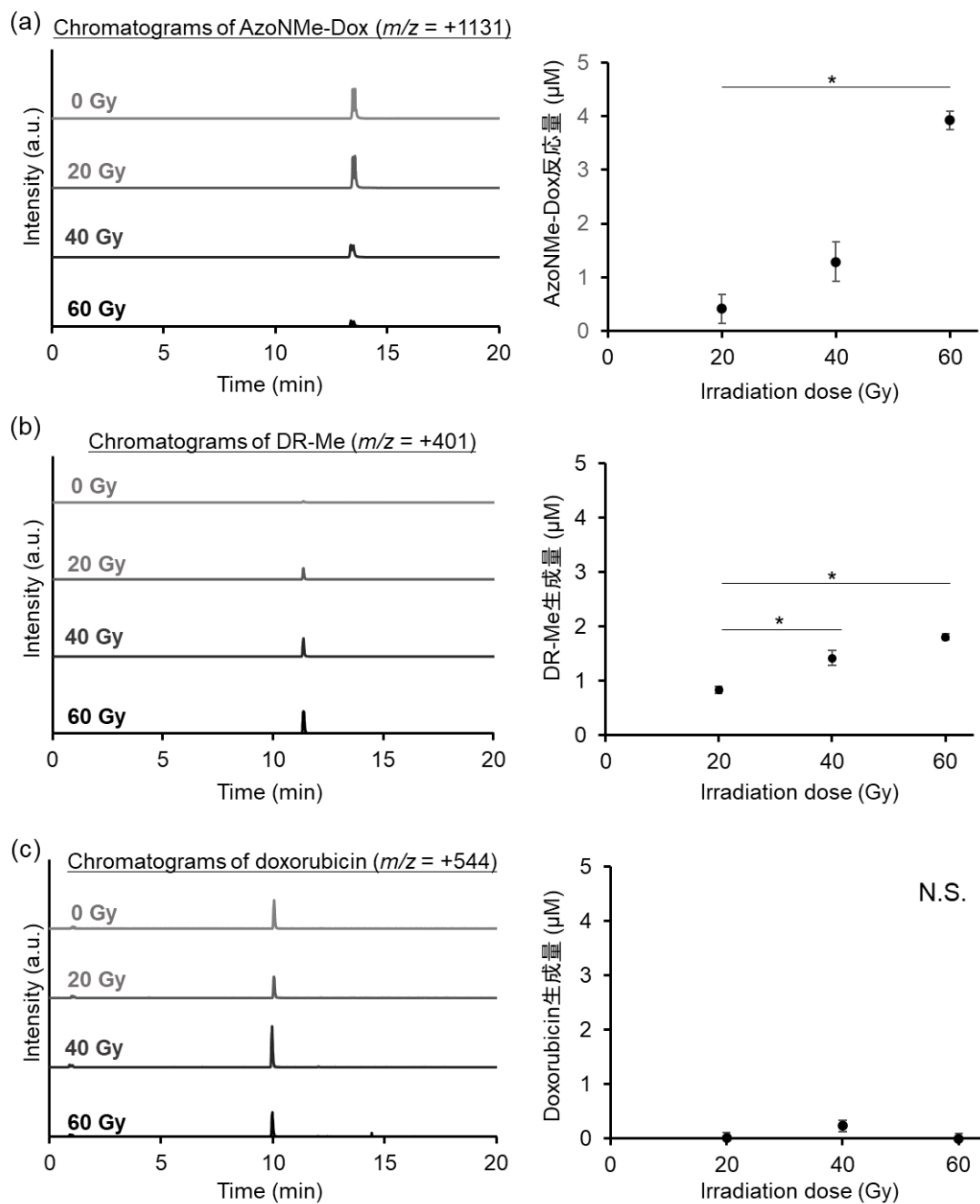


Figure 3.5 (a) AzoNMe-Dox の質量電荷比である $m/z = +1131$ のクロマトグラムおよびピーク面積から算出された反応量 (b) DR-Me の質量電荷比 $m/z = +401$ または (c) doxorubicin の質量電荷比 $m/z = +544$ のクロマトグラムおよびピーク面積から算出された生成量 (Error bars represent SEM, $n = 3$, Student's t-test, $*p < 0.05$)

AzoNMe-Dox からの doxorubicin の生成量が少量であった理由を解明するため、硬 X 線照射後の AzoOH-Dox の副生成物について解析した。その結果、 $m/z = +736$ と $m/z = +735$ の副生成物 **57** および **58** が生成していることが示唆された (Figure 3.6a)。これらは 1,6-脱離によって生じたキノンイミン体に由来する構造であると考えられる。 $m/z = +736$ の副生成物 **57** は 20 Gy の線量では生成が認められず、40 Gy および 60 Gy の線量においてのみ生成が認められた (Figure 3.6b)。 $m/z = +735$ の副生成物 **58** はいずれの線量においても生成が認められたが、そのイオン強度は 20 Gy と 40 Gy では同程度であり、60 Gy では低下することが示された (Figure 3.6c)。

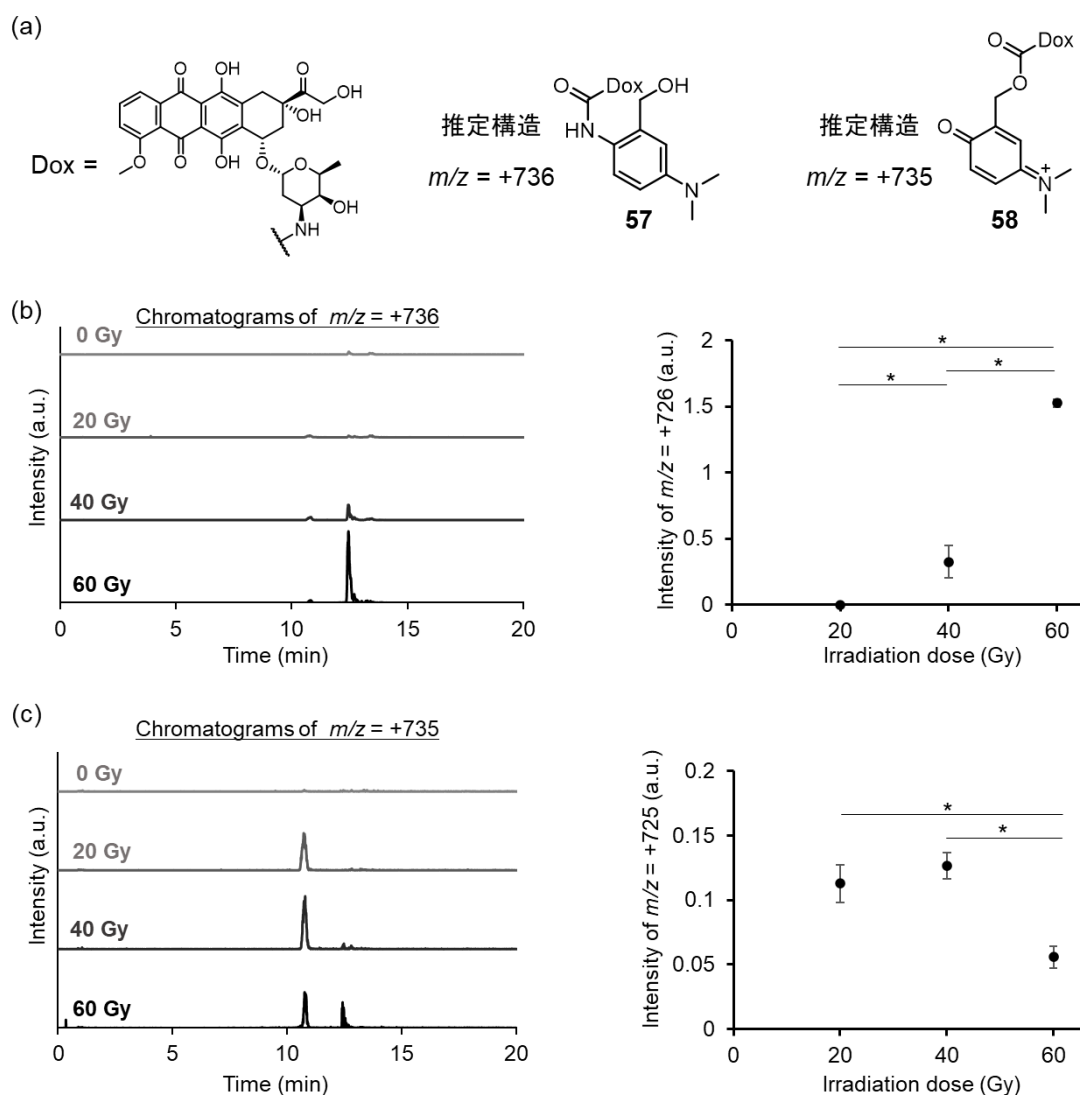


Figure 3.6 (a) 質量電荷比 $m/z = +736$ および $+735$ の副生成物 **57**、**58** の推定構造。(b) DR-Me の質量電荷比 $m/z = +736$ または (c) $m/z = +735$ のクロマトグラムおよび各線量におけるピーク強度。(Error bars represent SEM, $n = 3$, Student's t -test, $*p < 0.05$)

続いて硬 X 線照射後の AzoOH-Dox 溶液について解析した。AzoOH-Dox の質量電荷比である $m/z = +1121$ のクロマトグラムから、硬 X 線照射により AzoOH-Dox が線量依存的に反応したことが認められ、その反応量は 2.7–4.5 μM だった (Figure 3.7a)。

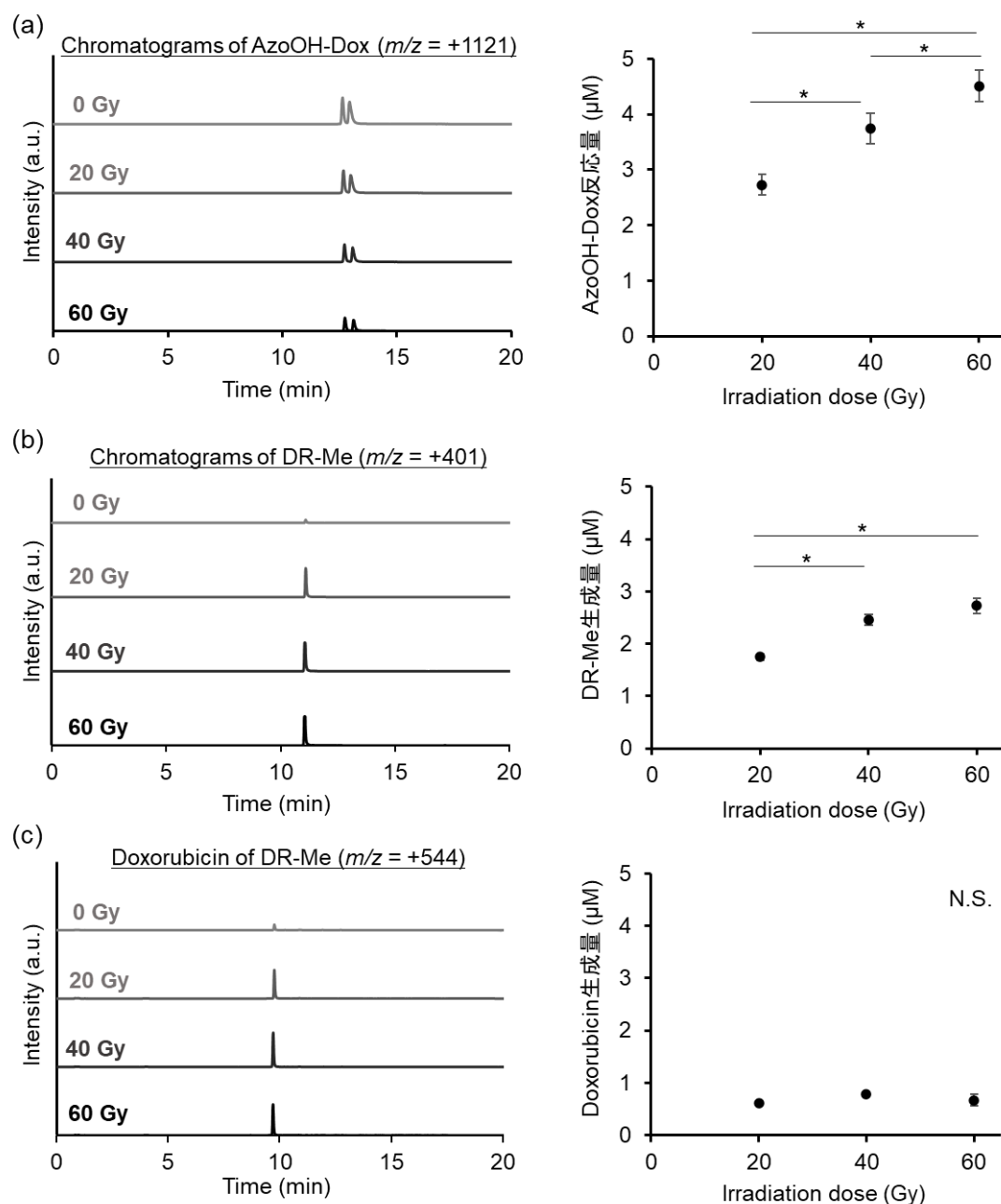


Figure 3.7 (a) AzoOH-Dox の質量電荷比 $m/z = +1131$ のクロマトグラムおよびピーク面積から算出された反応量 (b) DR-Me の質量電荷比 $m/z = +401$ または (c) doxorubicin の質量電荷比 $m/z = +544$ のクロマトグラムおよびピーク面積から算出された生成量 (Error bars represent SEM, $n = 3$, Student's t-test, $*p < 0.05$)

続いて DR-Me のクロマトグラムをもとに DR-Me の生成量を定量した。その結果、DR-Me が線量依存的に反応し、0.82–1.8 μM 生成することが示された (Figure 3.7b)。また doxorubicin の生成量はいずれの線量においても同程度であり 0.61–0.78 μM 生成されていることが示された (Figure 3.7c)。Doxorubicin の生成量が一定であったことから、AzoOH-Dox の副生成物について解析した。硬 X 線照射後の溶液から $m/z = +566$ と $m/z = +415$ の副生成物 **59**、**60** が認められた (Figure 3.8a)。 $m/z = +566$ の副生成物のピーク強度は 20–60Gy の間で有意差はなくいずれの線量においても同程度であった (Figure 3.8, b)。一方で $m/z = +415$ の副生成物のイオン強度は線量依存的に増加していることが示された (Figure 3.8c)。従って、生成した doxorubicin は硬 X 線照射によってさらに分解し **60** を生成することが示された。この生成物は doxorubicin のアミノ糖が脱離して生じたと考えられる。

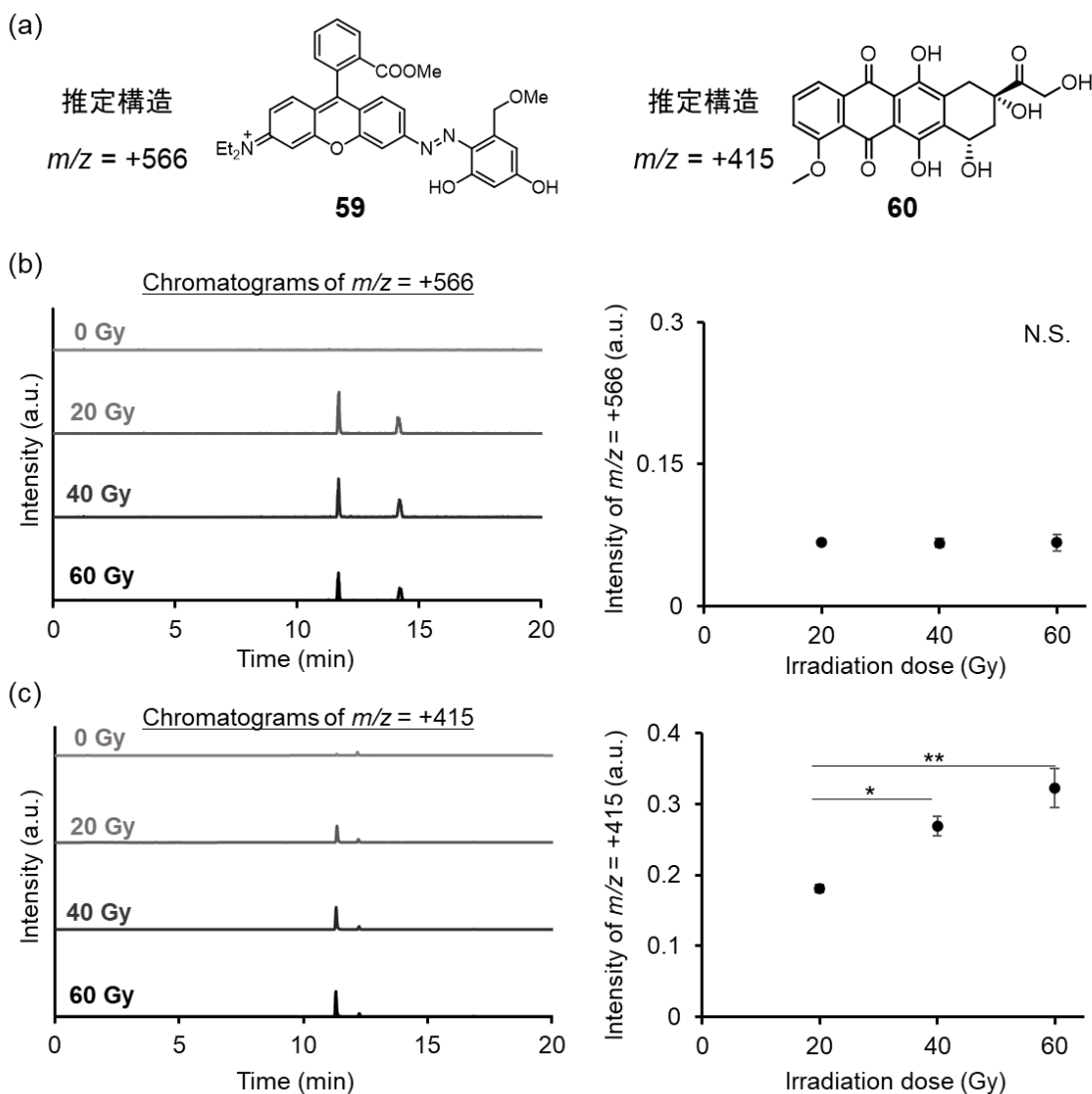
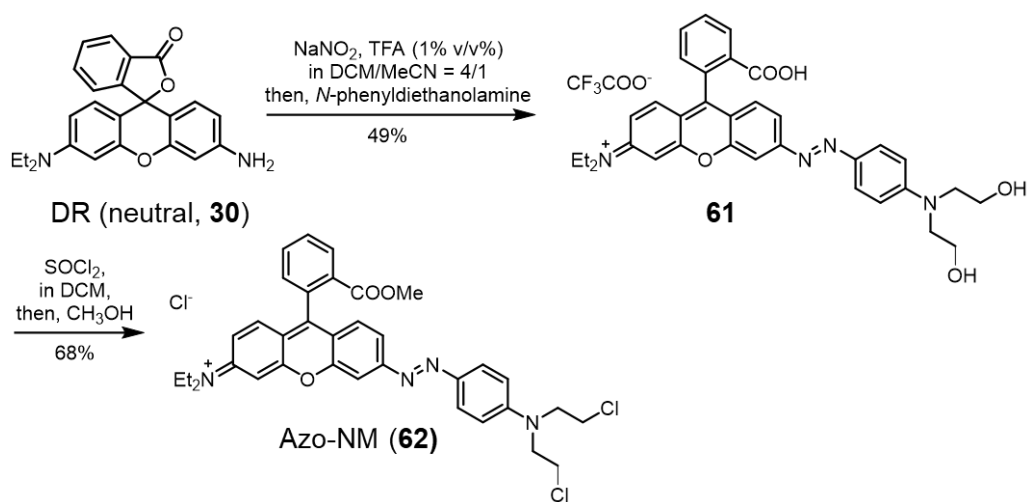


Figure 3.8 (a) 質量電荷比 $m/z = +566$ および $+415$ の副生成物 **60**、**61** の推定構造 (b) 質量電荷比 $m/z = +566$ または (c) $m/z = +415$ のクロマトグラムおよび各線量におけるピーク強度 (Error bars represent SEM, $n = 3$, Student's t-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

電子供与性/吸引性の変化によって活性化する Azo-NM の合成

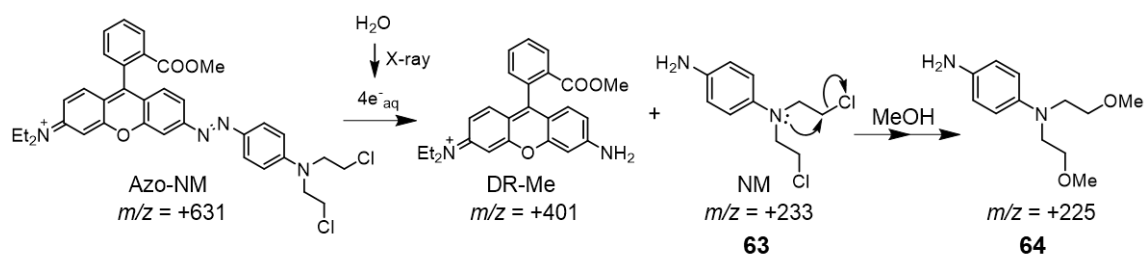
電子供与性/吸引性置換基の変化によって nitrogen mastered として機能する化合物の合成は既報の合成法に基づき合成した⁶²。まず、DR を *N*-phenyldiethanolamine とアゾカップリングさせ **61** を合成した。**61** に塩化チオニルとメタノールを反応させることで Azo-NM (**62**) を合成した (Scheme 3.7)。合成した化合物は ¹H-NMR、¹³C-NMR、HRMS および EA によって同定した。



Scheme 3.7 Azo-NM (**62**) の合成スキーム

硬 X 線照射による Azo-NM の反応解析

Azo-NM を 50% のメタノールを含むリン酸緩衝液に 10 μM となるように溶解し、アルゴンによる脱気後、硬 X 線を 20–100 Gy 照射し水和電子を 0.5–1.5 等量 (5.4–16.2 μM) 発生させた。その後、硬 X 線照射後の溶液を LC-MS によって分析した。Azo-NM が四電子還元を受けると DR-Me と nitrogen mastered (NM, **63**) が生成すると考えられる (Scheme 3.8)。



Scheme 3.8 硬 X 線照射による Azo-NM の想定反応

Azo-NM の定量結果から、Azo-NM は線量依存的に反応し 0.68–3.2 μM 反応することが示された (Figure 3.7a)。一方で DR-Me の生成量は 40 Gy で頭打ちとなり 0.89–1.45 μM の生成量だった (Figure 3.8b)。また、NM の質量電荷比である $m/z = +233$ の MS クロマトグラムを参照したが、いずれの線量においても $m/z = +233$ のピークは検出できなかった。そこで NM が溶液中でアジリジニウムカチオンを形成し分解したと考え、NM のクロロ基が溶媒の MeOH で置換された化合物 **64** の $m/z = +225$ の検出を試みたところ、 $m/z = +225$ の化合物のピーク強度は線量依存的に増加したことが認められた (Figure 3.7c)。以上より、Azo-NM が四電子還元を受け NM を生成した一方で、NM が溶液中でアジリジニウムカチオンを形成し **64** を生じることが示された。

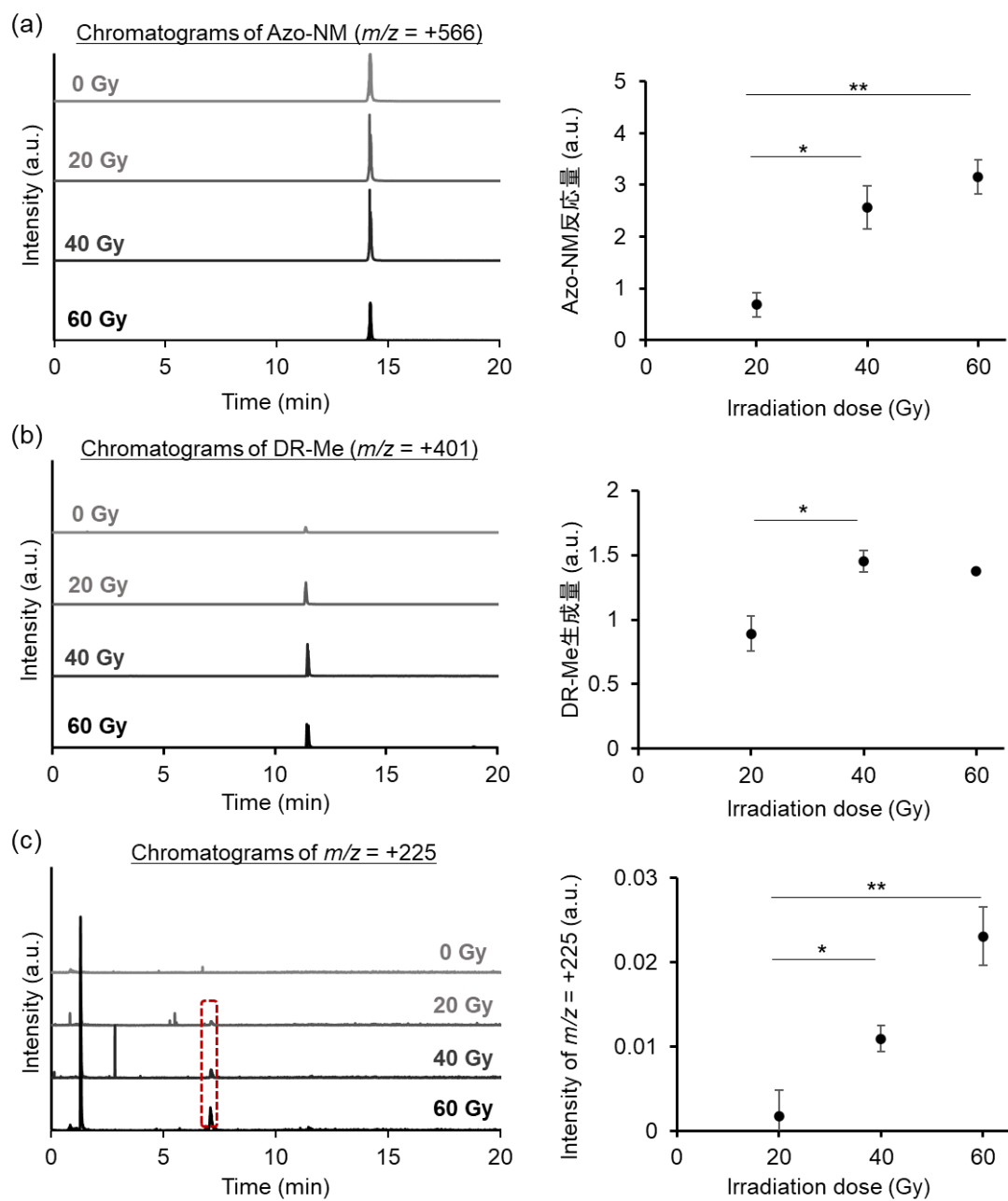


Figure 3.9 (a) Azo-NM の質量電荷比 $m/z = +631$ のクロマトグラムおよびピーク面積から算出された反応量 (b) DR-Me の質量電荷比 $m/z = +401$ または (c) NM 分解生成物 **65** の質量電荷比 $m/z = +225$ のクロマトグラムおよびピーク強度のプロット (Error bars represent SEM, $n = 3$, Student's t-test, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$)

DR-Me の生成量が頭打ちとなった理由を明らかにするため、硬 X 線照射後の Azo-NM の副生成物について分析した。その結果、 $m/z = +625$ と $m/z = +611$ の副生成物 **65**、**66** が検出された (Figure 3.8a)。これらの副生成物は Azo-NM のクロロ基がメトキシ基またはヒドロキシ基に置換された構造であると考えられる。また、これらの副生成物のイオン強度はいずれも 40 Gy で頭打ちとなった (Figure 3.8b, c)。

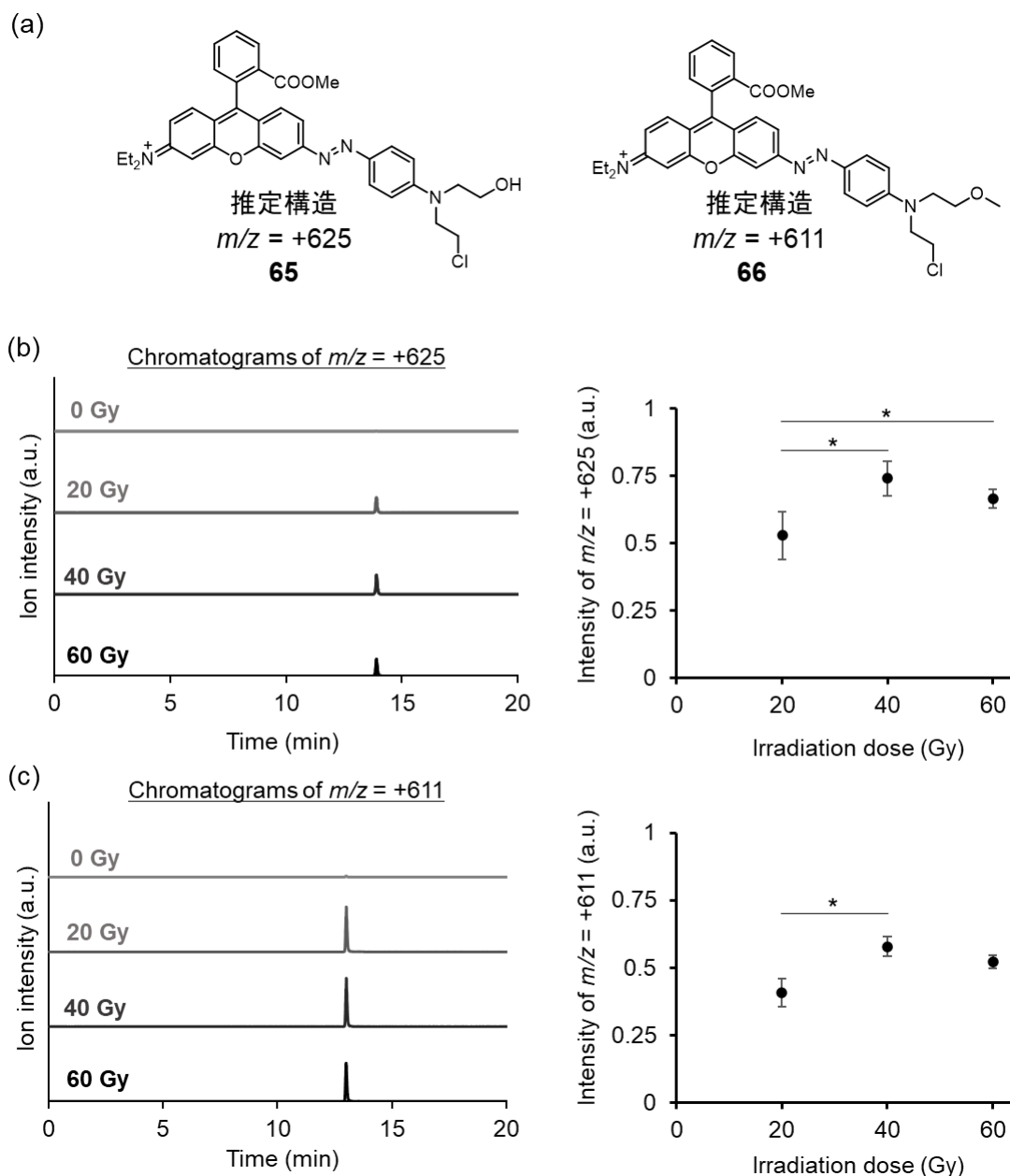


Figure 3.20 Azo-NM 溶液から検出された (a) 質量電荷比 $m/z = +625$ および $m/z = +611$ の副生成物 **65**、**66** の推定構造。(b) 質量電荷比 $m/z = +566$ または (c) $m/z = +415$ のクロマトグラムおよび各線量におけるピーク強度 (Error bars represent SEM, $n = 3$, Student's t-test, $*p < 0.05$)

硬 X 線照射による Azo-NM の放射線増感効果に関する検討

前項から Azo-NM へ硬 X 線を照射するとアゾ結合が四電子還元を受け NM を放出することが示された。また、NM の分解生成物のピーク強度から NM の生成は線量依存的に起こることが示唆された。そこで Azo-NM を取り込ませた細胞に硬 X 線を照射することで、生成された NM が細胞障害性を有するか検討した。

細胞内はグルタチオン、システイン、アスコルビン酸が高濃度で含まれるため、Azo-NM の生体内還元剤に対する安定性を評価した。Azo-NM を 10 μ M 溶解したリン酸緩衝液にグルタチオン、システイン、アスコルビン酸を加えた。その後、室温で 24 時間攪拌し HPLC によって残存率を定量した。その結果、いずれの条件でも Azo-NM は 76% 以上残存していることが認められた (Figure 3.11)。

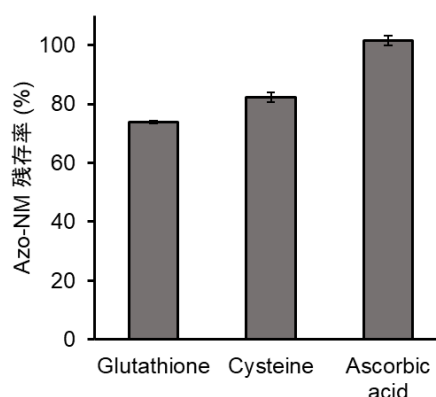


Figure 3.11 Glutathione, cysteine, ascorbic acid (1 mM) 存在下における 24 時間後の Azo-NM の残存率 (Error bars represent SEM, n=3)

Azo-NM の還元剤に対する安定性が示されたため、Azo-NM の放射線増感効果を評価した。Hela 細胞と A549 細胞を 5 cm $\times$ 5 cm のディッシュに播種し、5 時間後に細胞がディッシュに接着したことを確認後、250 nM の Azo-NM が溶解した培地に交換し 1 時間インキュベートした。その後、硬 X 線を 2.5 Gy 照射し、コロニーアッセイによって細胞生存率を算出した。

コロニーアッセイの結果から Hela 細胞の硬 X 線照射+薬剤併用群の細胞生存率は最も低いことが示された。しかし、硬 X 線単独照射群の細胞生存率と有意差が付かなかったため、Azo-NM は Hela 細胞に対する放射線増感効果が低いことが示唆された。一方、A549 細胞では硬 X 線照射+薬剤併用群の細胞生存率が他の群よりも有意に低いことが示されたことから (Figure 3.12)、Azo-NM は A549 細胞に対して放射線増感効果を持つことが示唆された。

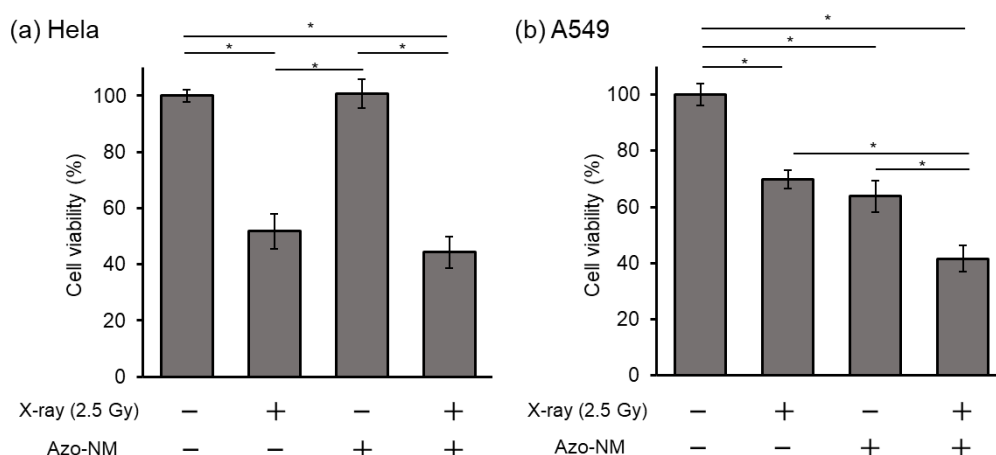


Figure 3.12 (a) HeLa 細胞および (b) A549 細胞の硬 X 線照射群、薬剤添加群、硬 X 線照射 + 薬剤併用群との細胞生存率

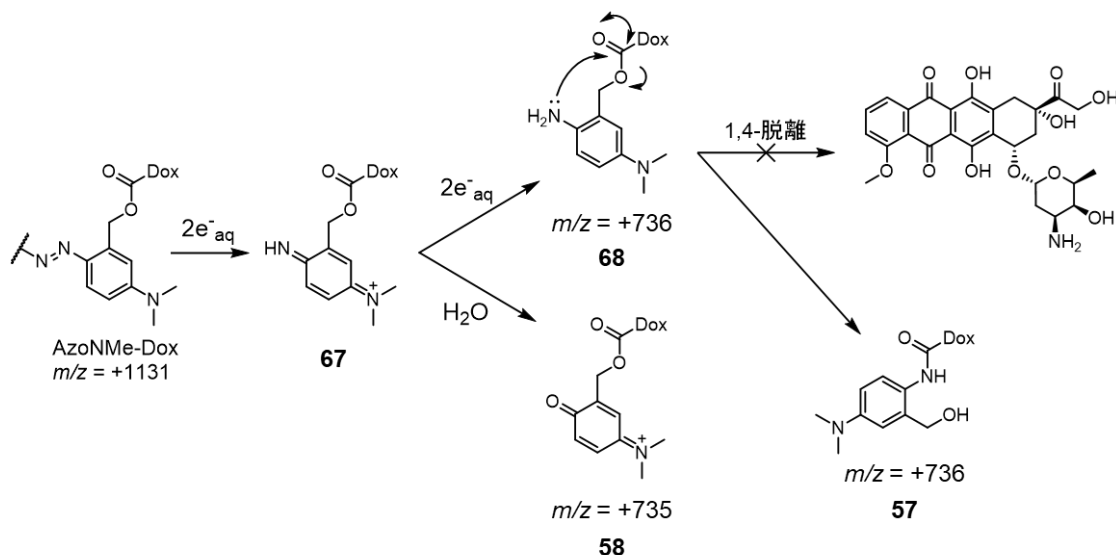
考察

本章では、硬 X 線の照射によるアゾ結合の開裂が細胞内で起こるか検討し、アゾ結合の開裂メカニズムに基づき薬剤を放出するような化合物を設計・合成し、硬 X 線によってそれらの化合物が機能するか評価した。

Azo-Rho2 を MOLT-4 細胞に取り込ませた後に硬 X 線を照射すると、細胞内の DR の蛍光が増加した。細胞内にはアミノ酸やタンパク質など、水和電子のスカベンジャーとなり得る夾雑物が多数存在する。例えば、ヒト血清アルブミンはジスルフィド結合の還元によって水和電子を捕捉する⁶³。そのような環境下においても DR の蛍光増加が認められたことから、細胞内のように夾雑物が存在するような環境においても硬 X 線照射によってアゾ結合の開裂が誘発されることが示された。また、細胞内の DR の蛍光強度は 25 Gy を最大値としてそれ以上の線量では徐々に低下した (Figure 3.4)。トリパンプルー染色の結果から、硬 X 線照射後の細胞生存率は照射前と同程度であったことを考慮すると (Figure 3.3)、この実験条件において硬 X 線照射によって誘導される細胞膜損傷や細胞死の影響は小さいと考えられる。従って、DR の蛍光強度の減少は細胞膜の損傷により DR が細胞外へ流出したのではなく、細胞内に存在する Azo-Rho2 が反応し終わった結果、DR が硬 X 線照射によって発生した活性種と反応し分解されたためであると考えられる。

硬 X 線照射による 1,4-脱離反応を利用した薬剤が可能か証明するため、doxorubicin を導入した AzoNMe-Dox と AzoOH-Dox を合成した。AzoNMe-Dox に硬 X 線照射を照射することによって、40 Gy の線量では doxorubicin が少量放出されることが示唆されたが、他の線量ではほとんど生成は認められなかった (Figure 3.5)。 $m/z = +736$ と $m/z = +735$ の副生成物 **57** および **58** が生成したことから AzoNMe-Dox の硬 X 線照射後の反応は次の用に進行すると考えられる (Figure 3.6)。

初めに、AzoNMe-Dox が二電子還元を受けて 1,6-脱離を起こし開裂する。ここで生じたキノンジイミン体 **67** は水和電子が比較的少ない低線量域において加水分解を起こし、 $m/z=+735$ の **58** を生じる。40 Gy 以降の線量ではキノンジイミン体の二電子還元が起こり $m/z=+736$ の **68** が生成する (Scheme 3.9)。この還元が起こるにも関わらず doxorubicin の生成量が少なかった理由については、ジメチルアミノ基の影響によってアミノ基の求核性が高くなった結果、カルバメートへ求核攻撃を起こし、安定なウレア体 **57** を生成したためであると考えられる。副生成物のイオン強度に関して、**67** の加水分解生成物である **58** のイオン強度 ($m/z = +735$) は 40 Gy で頭打ちとなり、**67** の二電子還元体に由来する **68** のイオン強度 ($m/z = +736$) は線量依存的に増加した。これは **68** の二電子還元効率が低く加水分解と競合したためであると考えられる。従って、薬剤放出の効率性を高めるためには適切な電子求引性置換基を導入することでキノンジイミン体の二電子還元効率を高め、アミノ基の求核性を低減させるような分子設計が必要であると考えられる。

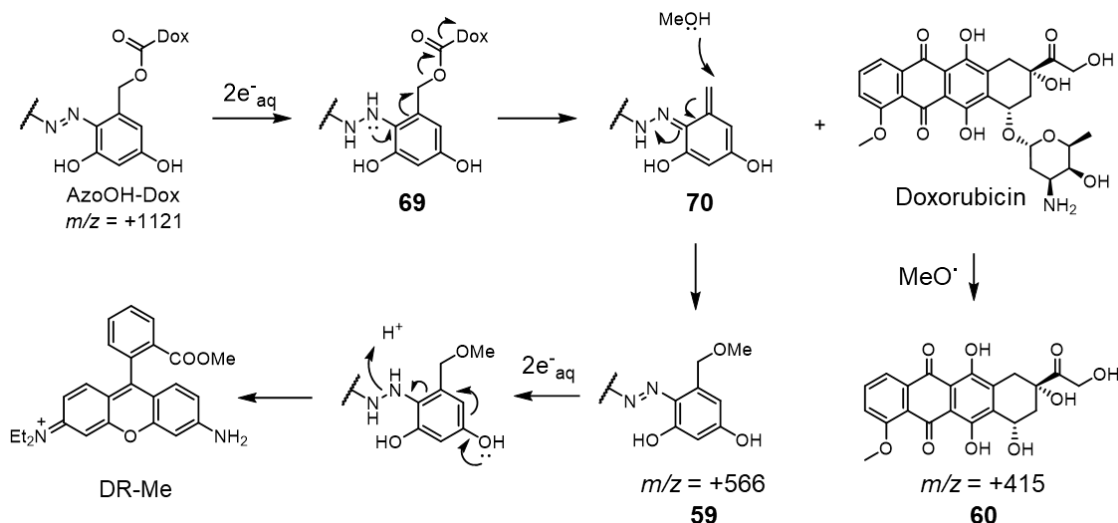


Scheme 3.9 AzoNMe-Dox の反応スキーム

AzoOH-Dox への硬 X 線照射の結果では、いずれの線量においても doxorubicin が生成されたが、生成量は同程度だった (Figure 3.7)。副生成物を解析したところ $m/z = +566$ と $m/z = +415$ の副生成物 **59**、**60** が生成していたことが認められた (Figure 3.8)。**60**、**61** の副生成物の推定構造から、AzoOH-Dox からの doxorubicin の放出は AzoNMe-Dox からの放出とは異なる次の機構で進行すると考えられる。

初めに AzoOH-Dox が水和電子によってアゾ基が還元され、ヒドラジン中間体 **69** を生じる。この時、ヒドラゾ基からカルバメートへ電子が流れ込むことで 1,4-脱離が起こり doxorubicin を生成する。Doxorubicin はドキソルビシノンとアミノ糖が脱水縮合した構造を有する。スクロースやオリゴ糖に X 線や γ 線を照射するとアノマー位近傍の水素がラジカル的に引き抜かれ、ヘミアセタール結合が開裂することが報

告されている^{64,65}。従って $m/z = +415$ の **61** はアミノ糖のアノマー位近傍の水素がメトキシラジカルなどによって引き抜かれたために生成したと考えられる。また、 $m/z = +566$ の **59** は 1,4-脱離後の **70** が反応系中の MeOH からマイケル付加を受け生成したと考えられる (Scheme 3.9)。以上の結果より、AzoOH-Dox は二電子還元を受け doxorubicin を放出するが、放出された doxorubicin は硬 X 線照射で分解しやすく、今後は硬 X 線に対する安定性を考慮し薬剤を導入する必要がある。



Scheme 3.9 AzoOH-Dox の反応スキーム

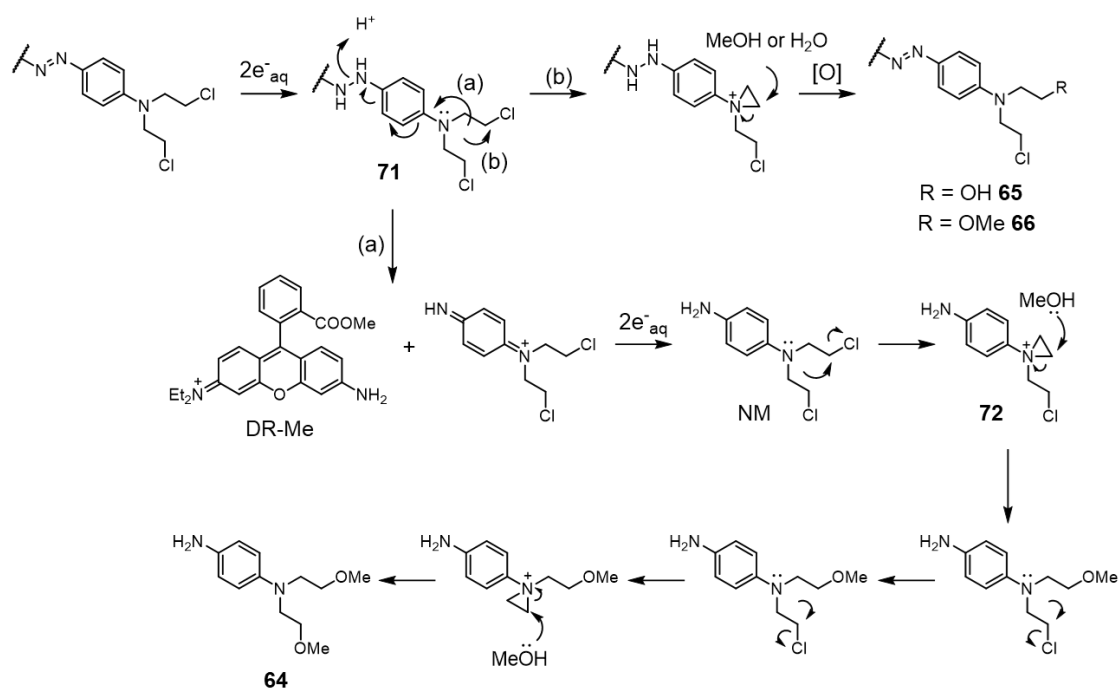
AzoNMe-Dox および AzoOH-Dox は、ベンゼン環部に異なる電子供与性置換基が導入されたアゾ化合物である。アゾ基が二電子還元を受けてヒドラゾ基へと変換された後、AzoNMe-Dox では 1,6-脱離反応が進行し、ヒドラゾ基側へ電子が流れ込むことで結合開裂が起こる。一方、AzoOH-Dox では、ヒドラゾ基の電子供与性によって、カルバメート部位へ電子が流れ込むことで 1,4-脱離が進行し、薬剤が放出される。この反応経路の差異は、ジメチルアミノ基がヒドロキシ基よりも強い電子供与性を示すことに起因すると考えられる。すなわち、AzoNMe-Dox ではジメチルアミノ基からヒドラゾ基への電子供与が優勢となり、結果として 1,6-脱離が促進される。一方、AzoOH-Dox ではヒドラゾ基からカルバメート部位への電子移動が優先し、1,4-脱離による薬剤放出が進行する。

この反応機構に基づくと、AzoNMe-Dox では薬剤放出に至るまでに合計四電子の還元が必要であるが、AzoOH-Dox では二電子還元のみで薬剤放出が可能である。この差異は、ベンゼン環部の置換基の電子供与性の違いに起因し、電子供与性の強い置換基を有する場合には 1,6-脱離が優先するのに対し、電子供与性の低い、あるいは

は電子求引性置換基を導入した場合には 1,4-脱離反応が進行しやすくなると考えられる。従って、ベンゼン環部に電子供与性の低い官能基、もしくは電子求引性置換基を導入することで 1,4-脱離反応を選択的に促進する分子設計を行えば、低線量条件下においても効率的な薬剤放出が達成できる可能性がある。

Azo-NM への硬 X 線照射の結果では、NM の分解生成物が検出されたことから NM が放出されたことが認められた (Figure 3.9)。しかし、アゾ結合の開裂生成物である DR-Me の生成量は 40 Gy と 60 Gy でほとんど変わらず、高線量域では 1,6-脱離の進行が起きにくくなる可能性が示唆された。Azo-NM の副生成物として、Azo-NM のクロロ基がメトキシ基またはヒドロキシ基に置換された **65** および **66** が認められたことから (Figure 3.20)、硬 X 線照射による Azo-NM の反応は以下のように進行すると考えられる。

初めに Azo-NM が二電子還元を受けヒドラジン中間体 **71** を生じる。次に経路 (a) ではクロロエチル基が付いたアミノ基からの電子供与により 1,6-脱離が起こり、アゾ結合が開裂することで DR-Me と NM を生成する。NM のアミノ基は強い電子供与性置換基として働き、クロロエチル基が結合した窒素の lone pair が不安定化し S_N2 反応が促進され、アジリジニウムカチオン (**72**) を生成する。このアジリジニウムカチオンは溶媒分子からの求核攻撃を受け開環するが、もう一度同様の過程が起こることで $m/z = +225$ の **64** が生成したと考えられる。一方で経路 (b) ではヒドラゾ基が電子供与性置換基として働き、クロロエチル基が結合した窒素の lone pair が同様に不安定化し、1,6-脱離の代わりに S_N2 反応を起こす。この時生じたアジリジニウムカチオンに対し溶媒中のメタノールまたは水が付加し、空気酸化を受けることで $m/z = +625$ または $m/z = +611$ の副生成物 **65** と **66** が生成したと考えられる。従って、Azo-NM へ硬 X 線を照射するとアゾ結合の開裂と S_N2 反応によるアジリジニウムカチオンの形成が競合し、DR-Me の生成が阻害されたと考えられる。



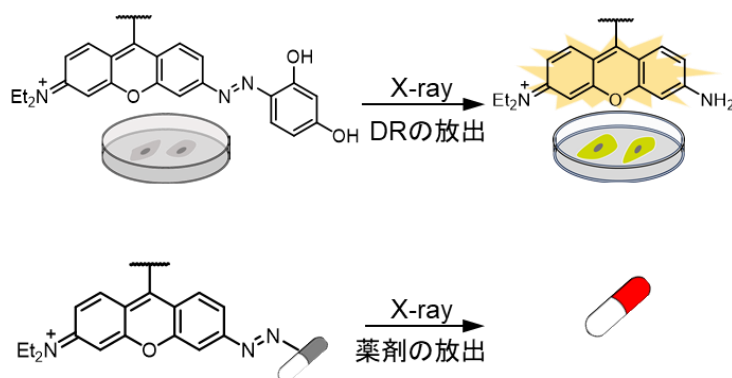
Scheme 3.10 Azo-NM の反応スキーム

Azo-NM を用いた細胞実験において、HeLa 細胞では放射線増感効果は認められなかった一方、A549 細胞では増感効果が確認された。この違いは、HeLa 細胞の細胞死の起こりやすさと、A549 細胞における内在性酵素の働きの違いに起因すると考えられる。HeLa 細胞は HPV18 由来の L1、E6、E7 の遺伝子を部分的に保持していることが知られている。このうち E6 は p53 をユビキチン化し、p53 のプロテアソーム分解を促進する働きを有する^{66,67}。そのため、HeLa 細胞は野生型 p53 遺伝子を発現しているにもかかわらず、p53 の機能が十分に発揮されない。さらに nitrogen mustard による細胞死には p53 依存的なアポトーシス経路が関与することが報告されている^{68,69}。そのため、この p53 の機能低下が HeLa と A549 の細胞障害性の違いに寄与した可能性がある。また、A549 細胞では薬剤単独投与群においても細胞生存率が約 60% まで低下しており、Azo-NM 自体に細胞毒性があることが示唆された。この理由として A549 細胞はアゾレダクターゼの一つである NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) を高発現していることが報告されていることから⁷⁰⁻⁷³、NQO1 の影響により Azo-NM のアゾ結合が細胞内で開裂し、NM が生成されたと考えられる。A549 細胞における薬剤投与+硬 X 線照射群で観察された放射線増感効果は、硬 X 線照射により生成した NM に加えて、NQO1 によって細胞内で生成された NM の作用も寄与している可能性がある。そのため今後は、硬 X 線照射によって新たに生成される NM が細胞死に与える影響を、内因性酵素による開裂反応と区別して詳細に評価する必要がある。

第三章の小括

第三章では、硬 X 線照射によるアゾ結合の開裂が、細胞内のような夾雑系においても起こり得るかを検討するとともに、このアゾ結合の開裂メカニズムを応用することで、硬 X 線による薬剤の活性化が可能であるかを評価した。

Azo-Rho2 を取り込ませた細胞に硬 X 線を照射したところ、細胞内における DR の蛍光強度が増加することが確認された。この結果から、細胞内環境においても硬 X 線照射によってアゾ結合の開裂を制御できることが示された。また、doxorubicin を放出する薬剤として設計した AzoNMe-Dox および AzoOH-Dox に硬 X 線を照射した結果、いずれの化合物からも doxorubicin が生成されることが示唆された。しかし、AzoNMe-Dox ではアゾ結合開裂後に生成するアミノ基がカルバメート部位に求核攻撃する副反応が進行し、doxorubicin の生成量は微量にとどまった。このことから、今後は開裂後に生成するアミノ基の求核性を低減させる分子設計を導入する必要があると考えられる。一方、AzoOH-Dox では二電子還元によって doxorubicin が生成するものの、doxorubicin のアミノ糖部が脱離することが認められた。この結果は、薬剤放出後の doxorubicin が硬 X 線照射条件下で分解を受けうることを示しており、放射線に対する薬剤自体の安定性についても考慮する必要があることを示唆している。さらに、Azo-NM に硬 X 線を照射した結果、アゾ結合が開裂することで NM が生成されることが示唆された。加えて、細胞実験の結果から、Azo-NM は A549 細胞に対して放射線増感効果を示すことが明らかとなった。以上の結果より、薬剤放出効率のさらなる向上や放射線安定性の改善といった課題は残されているものの、生体内環境においてもアゾ結合の開裂を利用することで、硬 X 線照射による薬剤の活性化を制御できる可能性が示された。



総括

本論文では、硬 X 線によって活性化されるケージド化合物の開発を目的とした。そのために、アゾ結合の開裂反応に着目し、アゾ結合を還元させやすくする分子設計によって、開裂効率を高めることが可能か評価した。さらに、生体応用を見据えて、硬 X 線照射により細胞内のような夾雑系においてもアゾ結合の開裂反応が進行するかを検討し、この反応を利用することで薬剤放出が可能であるか検証した。

1. 第一章の結果から、水素結合によってアゾ結合の電子密度を低下させるという分子設計はアゾ結合の還元電位を上昇させる一方で、アゾ結合の開裂効率には影響せず、芳香環の電子密度の増加に起因するメトキシラジカル付加などの副反応を増加させることを明らかにした⁷⁴。
2. 第二章の結果から、ローダミン骨格を導入することでアゾ結合の電子密度を低下させるという分子設計は、水和電子によるアゾ結合の還元効率を高めることを明らかにした。さらにアゾ結合の開裂メカニズムが (1) 二電子還元によるヒドラジン中間体の形成と (2) 電子供与性置換基からの 1,6-脱離の二段階で進行することを明らかにした。また、HOMO の軌道分布からローダミン骨格の導入は、ベンゼン環の電子密度を低下させることでメトキシラジカル付加を起りにくくする可能性を明らかにした⁷⁵。
3. 第三章の結果から細胞内においてもアゾ結合の開裂を硬 X 線照射によって起こせることを示した。また AzoNMe-Dox、AzoOH-Dox そして Azo-NM に硬 X 線を照射することでアゾ結合の開裂を起こし、doxorubicin や NM などの薬剤を放出できることを示した。また、Azo-NM は A549 細胞に対し、放射線増感効果を持つことを明らかにした。

以上の結果より、硬 X 線によるアゾ結合の開裂は生体深部の治療に向けたケージド化合物の活性化の鍵反応となると考えられ、生体深部において薬剤の活性化を制御することで副作用を低減させる新たな治療法への応用可能性を提示するものである。今後はアゾ化合物の生体安定性を向上させ、動物実験などにより硬 X 線照射後に放出された薬剤の治療効果を評価することで臨床応用へ向けたアゾ結合の開裂を利用したケージド化合物を開発する。

参考文献

- 1 R. S. Foote, P. Cornwell, K. R. Isham, H. Gigerich, K.-P. Stengele, W. Pfleiderer and R. A. Sachleben, *Tetrahedron*, 1997, **53**, 4247–4264.
- 2 J. A. Peterson, C. Wijesooriya, E. J. Gehrmann, K. M. Mahoney, P. P. Goswami, T. R. Albright, A. Syed, A. S. Dutton, E. A. Smith and A. H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, **140**, 7343–7346.
- 3 S. Aoki, N. Matsuo, K. Hanaya, Y. Yamada and Y. Kageyama, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **17**, 3405–3413.
- 4 C. H. Park and R. S. Givens, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 2453–2463.
- 5 F. Bley, K. Schaper and H. Gö, *Photochem. Photobiol.*, 2008, **84**, 162–171.
- 6 P. K. Singh, P. Majumdar and S. P. Singh, *Coord. Chem. Rev.*, 2021, **449**, 214193.
- 7 S. B. Cambridge, D. Geissler, F. Calegari, K. Anastassiadis, M. T. Hasan, A. F. Stewart, W. B. Huttner, V. Hagen and T. Bonhoeffer, *Nat. Methods*, 2009, **6**, 527–531.
- 8 N. Umeda, H. Takahashi, M. Kamiya, T. Ueno, T. Komatsu, T. Terai, K. Hanaoka, T. Nagano and Y. Urano, *ACS Chem. Biol.*, 2014, **9**, 2242–2246.
- 9 V. H. S. Van Rixel, V. Ramu, A. B. Auyeung, N. Beztsinna, D. Y. Leger, L. N. Lameijer, S. T. Hilt, S. E. Le Dévédec, T. Yildiz, T. Betancourt, M. B. Gildner, T. W. Hudnall, V. Sol, B. Liagre, A. Kornienko and S. Bonnet, *J. Am. Chem. Soc.*, 2019, **141**, 18444–18454.
- 10 S. P. McClain, X. Ma, D. A. Johnson, C. A. Johnson, A. E. Layden, J. C. Yung, S. T. Lubejko, G. Livrizzi, X. J. He, J. Zhou, J. Chang-Weinberg, E. Ventriglia, A. Rizzo, M. Levinstein, J. L. Gomez, J. Bonaventura, M. Michaelides and M. R. Banghart, *Neuron*, 2023, **111**, 3926–3940.
- 11 M. Russo, H. Janeková, D. Meier, M. Generali and P. Štacko, *J. Am. Chem. Soc.*, 2024, **146**, 8417–8424.
- 12 T. A. Henderson, *Front. Neurol.*, 2024, **15**, 1398894.
- 13 B. C. Garrett, D. A. Dixon, D. M. Camaioni, D. M. Chipman, M. A. Johnson, C. D. Jonah, G. A. Kimmel, J. H. Miller, T. N. Rescigno, P. J. Rossky, S. S. Xantheas, S. D. Colson, A. H. Laufer, D. Ray, P. F. Barbara, D. M. Bartels, K. H. Becker, K. H. Bowen, S. E. Bradforth, I. Carmichael, J. V. Coe, L. R. Corrales, J. P. Cowin, M. Dupuis, K. B. Eienthal, J. A. Franz, M. S. Gutowski, K. D. Jordan, B. D. Kay, J. A. LaVerne, S. V. Lymar, T. E. Madey, C. W. McCurdy, D. Meisel, S. Mukamel, A. R. Nilsson, T. M. Orlando, N. G. Petrik, S. M. Pimblott, J. R. Rustad, G. K. Schenter, S. J. Singer, A. Tokmakoff, L. S. Wang, C. Wittig and T. S. Zwier, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 355–389.
- 14 S. Le Caër, *Water (Switzerland)*, 2011, **3**, 235–253.

- 15 J. P. Jay-Gerin, *Encyclopedia*, 2025, **5**, 38.
- 16 X. Wang and L. Zhang, *RSC Adv.*, 2018, **8**, 40632–40638.
- 17 J. Teng, Y. Zhang, P. Li and G. Liu, *Elsevier B.V., Sustain. Horiz.*, 2025, **16**, 100156.
- 18 G. V. Buxton, C. L. Greenstock, W. P. Helman and A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 1988, **17**, 513–886.
- 19 R. Braams, *Radiat. Res.*, 1966, **27**, 319–329.
- 20 R. Braams, *Radiat. Res.*, 1967, **31**, 8–26.
- 21 H. Schüssler, S. Navaratnam and L. Distel, *Radiat. Phys. Chem.*, 2005, **73**, 163–168.
- 22 J. Ma, F. Wang, S. A. Denisov, A. Adhikary and M. Mostafavi, *Sci. Adv.*, 2017, **3**, e1701669.
- 23 K. Tanabe, J. Ishizaki, Y. Ando, T. Ito and S. I. Nishimoto, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**, 1682–1685.
- 24 J. Geng, Y. Zhang, Q. Gao, K. Neumann, H. Dong, H. Porter, M. Potter, H. Ren, D. Argyle and M. Bradley, *Nat. Chem.*, 2021, **13**, 805–810.
- 25 Q. Fu, H. Li, D. Duan, C. Wang, S. Shen, H. Ma and Z. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2020, **59**, 21546–21552.
- 26 Z. Ding, Z. Guo, Y. Zheng, Z. Wang, Q. Fu and Z. Liu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2022, **144**, 9458–9464.
- 27 Z. Guo, H. Hong, Y. Zheng, Z. Wang, Z. Ding, Q. Fu and Z. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2022, **61**, e202205014.
- 28 Q. Fu, Z. Gu, S. Shen, Y. Bai, X. Wang, M. Xu, P. Sun, J. Chen, D. Li and Z. Liu, *Nat. Chem.*, 2024, **16**, 1–9.
- 29 F. Bellanti, A. R. D. Coda, M. I. Trecca, A. Lo Buglio, G. Serviddio and G. Vendemiale, *Antioxidants*, 2025, **14**, 656.
- 30 J. Lyu, D. E. Narum, S. L. Baldwin, S. E. Larsen, X. Bai, D. E. Griffith, V. Dartois, T. Naidoo, A. J. C. Steyn, R. N. Coler and E. D. Chan, *Front. Immunol.*, 2024, **15**, 1427559.
- 31 W. Xiao and J. Loscalzo, *Antioxid. Redox Signal.*, 2020, **32**, 1330–1347.
- 32 M. J. C. de Kok, A. F. M. Schaapherder, J. R. Bloeme - ter Horst, M. L. Lo Faro, D. K. de Vries, R. J. Ploeg, J. A. Bakker and J. H. N. Lindeman, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, 2025, **1866**, 149539.
- 33 J. Y. Wang, Z. R. Liu, M. Ren, X. Kong, K. Liu, B. Deng and W. Lin, *Sens. Actuators B Chem.*, 2016, **236**, 60–66.
- 34 L. Yuan, W. Lin and J. Song, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 7930–7932.
- 35 H. Li, W. Shi, X. Li, Y. Hu, Y. Fang and H. Ma, *J. Am. Chem. Soc.*, 2019, **141**, 18301–18307.

- 36 H. Li, X. Li, W. Shi, Y. Xu and H. Ma, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2018, **57**, 12830–12834.
- 37 K. Setsukinai, Y. Urano, K. Kakinuma, H. J. Majima and T. Nagano, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 3170–3175.
- 38 J. T. Hou, M. Zhang, Y. Liu, X. Ma, R. Duan, X. Cao, F. Yuan, Y. X. Liao, S. Wang and W. Xiu Ren, *Coord. Chem. Rev.*, 2020, **421**, 213457.
- 39 B. Halliwell, A. Adhikary, M. Dingfelder and M. Dizdaroglu, *Chem. Soc. Rev.*, 2021, **50**, 8355–8360.
- 40 L. Das, S. Chatterjee, D. B. Naik and S. Adhikari, *J. Hazard. Mater.*, 2015, **298**, 19–27.
- 41 V. Gondi, *Chin. Clin. Oncol.*, 2021, **10**, 39.
- 42 L. Kepka and J. Socha, *Transl. Lung Cancer Res.*, 2021, **10**, 1969–1982.
- 43 T. El-Hamoly, E. S. El-Denshary, S. M. Saad and M. A. El-Ghazaly, *Wound Repair Regen.*, 2015, **23**, 672–684.
- 44 X. Meng, W. Song, B. Deng, Z. Xing and W. Zhang, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2015, **8**, 12207–12215.
- 45 L. Ding, Y. Hou, H. Liu, J. Peng, Z. Cao, Y. Zhang, B. Wang, X. Cao, Y. Chang, T. Wang and G. Liu, *ACS ES and T Water*, 2023, **3**, 3534–3543.
- 46 L. G. Devi, S. G. Kumar, K. S. A. Raju and K. E. Rajashekhar, *Chem. Pap.*, 2010, **64**, 378–385.
- 47 T. S. Singh, B. S. M. Rao, H. Mohan and J. P. Mittal, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, 2002, **153**, 163–171.
- 48 J. Lind, A. Jowko and T. E. Eriksen, *Radial Phys. Chem*, 1979, **13**, 159–163.
- 49 H. M. D. Bandara and S. C. Burdette, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 1809–1825.
- 50 D. Luckhaus, Y. Yamamoto, T. Suzuki and R. Signorell, *Sci. Adv.*, 2017, **3**, e1603224-6
- 51 S. Maeda, K. Ohno and K. Morokuma, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 3683–3701.
- 52 D. Luckhaus, Y. Yamamoto, T. Suzuki and R. Signorell, *Sci. Adv.*, 2017, **3**, 1–6.
- 53 A. Goulet-Hanssens, M. Utecht, D. Mutruc, E. Titov, J. Schwarz, L. Grubert, D. Bléger, P. Saalfrank and S. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 335–341.
- 54 D. Schatz and H. A. Wegner, *J. Org. Chem.*, 2025, **90**, 5336–5342.
- 55 A. Guesdon-Vennerie, P. Couvreur, F. Ali, F. Pouzoulet, C. Roulin, I. Martínez-Rovira, G. Bernadat, F. X. Legrand, C. Bourgaux, C. L. Mazars, S. Marco, S. Trépout, S. Mura, S. Mériaux and G. Bort, *Nat. Commun.*, 2022, **13**, 41021.
- 56 I. K. Lednev, T.-Q. Ye, R. E. Hester and J. N. Moore, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 13338–13341.
- 57 T. Fujino, S. Y. Arzhantsev and T. Tahara, *J. Phys. Chem. A*, 2001, **105**, 8123–8129.

- 58 N. Boens, W. Qin, N. Basarić, J. Hofkens, M. Ameloot, J. Pouget, J. P. Lefèvre, B. Valeur, E. Gratton, M. VandeVen, N. D. Silva, Y. Engelborghs, K. Willaert, A. Sillen, G. Rumbles, D. Phillips, A. J. W. G. Visser, A. Van Hoek, J. R. Lakowicz, H. Malak, I. Gryczynski, A. G. Szabo, D. T. Krajcarski, N. Tamai and A. Miura, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 2137–2149.
- 59 A. Sussardi, R. J. Marshall, S. A. Moggach, A. C. Jones and R. S. Forgan, *Chem. Eur. J.*, 2021, **27**, 14871–14875.
- 60 A. Chevalier, C. Massif, P. Y. Renard and A. Romieu, *Chem. Eur. J.*, 2013, **19**, 1686–1699.
- 61 O. Inanami, K. Sugihara, T. Okui, M. Hayashi, M. Tsujitani and M. Kuwabara, *Int. J. Radiat. Biol.*, 2002, **78**, 267–274.
- 62 P. Verwilt, J. Han, J. Lee, S. Mun, H. G. Kang and J. S. Kim, *Biomaterials*, 2017, **115**, 104–114.
- 63 A. Konarska, K. Radomska and M. Wolszczak, *Radiat. Phys. Chem.*, 2018, **152**, 23–35.
- 64 B. Ershov, A. Kiimentov, *Russ. Chem. Rev.*, 1984, **53**, 2056–2077.
- 65 G. Phillios, G. Moody, *J. Chem. Soc.*, 1960, 762–768.
- 66 E. C. Goodwin and D. Dimaio, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, **97**, 12513–12518.
- 67 S. M. Horner, R. A. DeFilippis, L. Manuelidis and D. DiMaio, *J. Virol.*, 2004, **78**, 4063–4073.
- 68 R. Ranaldi, S. Palma, C. Tanzarella, A. Lascialfari, S. Cinelli and F. Pacchierotti, *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, 2007, **615**, 57–65.
- 69 J. Muret, M. Yacoub, P. Terrier, F. Drusch, A. Laplanche, C. Gaudin, C. Richon, C. Le Péchoux, A. Le Cesne, F. J. Lejeune, T. Tursz, P. Fouret, S. Bonvalot and S. Chouaib, *Ann. Oncol.*, 2008, **19**, 793–800.
- 70 K. Li, S. Zhou, Y. Chen, P. Xu and B. Song, *Sens. Actuators B Chem.*, 2022, **363**, 131860.
- 71 P. Rodrigo-Martínez, M. Barros, M. C. Terencio, E. Garrido, P. Arroyo, J. A. Sáez, M. Parra and P. Gaviña, *Drug Deliv. Transl. Res.*, 2025.
- 72 E. Janczy-Cempa, O. Mazuryk, A. Kania and M. Brindell, *Cancers (Basel)*, 2022, **14**, 2686.
- 73 X. Li, Z. Liu, A. Zhang, C. Han, A. Shen, L. Jiang, D. A. Boothman, J. Qiao, Y. Wang, X. Huang and Y. X. Fu, *Nat. Commun.*, 2019, **10**, 3251.
- 74 K. Ogawara, N. Ieda, H. Takakura, K. Nakajima, A. Mukaimine, M. Harada, K. Hashimoto, O. Inanami and M. Ogawa, *Org. Biomol. Chem.*, 2025, **23**, 3595–3600.
- 75 K. Ogawara, O. Inanami, H. Takakura, K. Saita, K. Nakajima, S. Kumar, N. Ieda, M. Kobayashi, T. Taketsugu and M. Ogawa, *Adv. Sci.*, 2024, **11**, 2306586.

Chapter1: Materials and methods

Reagents and general information

Azo1–4 were synthesized via azo coupling of 3-ABA with phenol, resorcinol, phloroglucinol, and *m*-phenylenediamine. All reagents used in the syntheses were purchased from FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Tokyo, Japan) or Kanto Chemical Co., Inc. (Tokyo, Japan) and were used as received without further purification.

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on JNM-ECX400P and JNM-ECS400 spectrometers (JEOL, Tokyo, Japan), operating at 400 MHz for ^1H NMR and 100 MHz for ^{13}C NMR. Chemical shifts were referenced to residual solvent signals or trimethyl silane and are reported in parts per million (ppm).

LC–MS system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a reverse-phase Inertsil ODS-3 column (2.1 mm $\times$ 50 mm; GL Sciences Inc., Tokyo, Japan). Eluent A consisted of 0.1 M HCOONH_4 aq., and eluent B consisted of MeCN containing 1% water. The flow rate was set to 0.10 mL min^{-1} , and the gradient of eluent B was programmed as follows: 1% (0 min) $\rightarrow$ 1% (3 min) $\rightarrow$ 80% (9 min) $\rightarrow$ 80% (11 min).

Hard X-ray irradiation was performed using a medical linear accelerator (CLINAC; Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, USA). EA were conducted using a CHN analyzer (CE440; Exeter Analytical Inc., MA, USA), and HRMS measurements were obtained using an Exactive Plus instrument (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA). EA and HRMS measurements were carried out at the Global Facility Center, Hokkaido University. ^1H NMR spectra were acquired on either a JNM-ECX400P or JNM-ECS400 spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan) operating at 400 MHz. Chemical shifts were referenced to TMS or residual solvent signals and are reported in parts per million (ppm).

Hard X-ray irradiation to Azo1–4

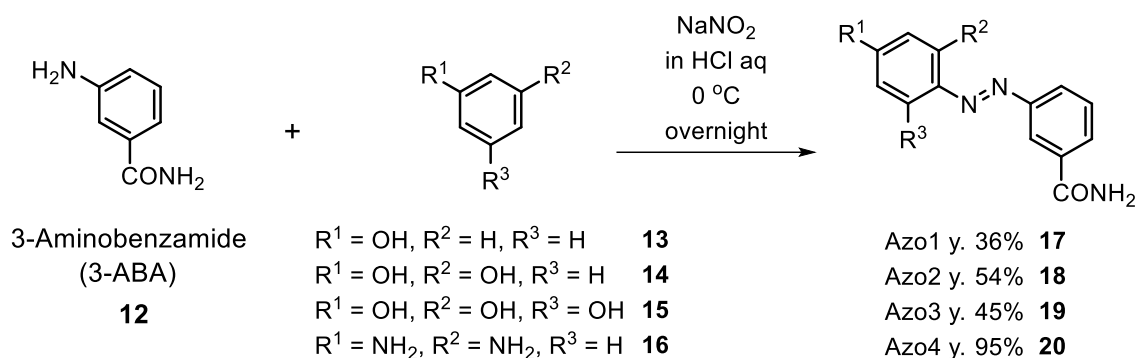
X-ray irradiation was conducted using 40% MeOH because of the low solubility of Azo1–4. Because MeOH can work as a hydroxyl radical scavenger, the reaction caused by hydrated electrons should be evaluated under these conditions. Each solution of Azo1–4 (25 μM) was prepared *via* dissolution in a mixture of 1 mM phosphate buffer (pH 7.4) and (PB/MeOH = 3/2, 2 mL). After the solution was deaerated with argon gas through the spectrum cap of the sealed vial for 10 min, it was irradiated with X-rays (100 Gy) using a CLINAC (dose rate: 4.7 Gy min^{-1} , tube voltage: 6 MeV). Each irradiated solution was mixed with 1 mM PB (pH = 7.4) containing 10 μM fluorescein of the same volume and analyzed by LC-MS.

Cyclic voltammetry

Cyclic voltammetry (CV) was conducted to measure the redox potentials using tetrabutylammonium perchlorate (TBAP) as the supporting electrolyte. Azo1–3 (2 mM) or Azo4 (4 mM) was dissolved in DMF, which contains 0.1 M TBAP, and bubbled with argon gas. The working electrode, which had a Pt disc with a surface area of 0.020 cm², the counter electrode made of a Pt wire, and the Ag/AgCl reference electrode were soaked in DMF. Voltage was applied at a scan rate of 0.05 V s⁻¹. All the reduction potentials are shown vs. a SCE and by standardizing with ferrocene at +0.403 V.

Quantum chemical calculations

Density functional theory (DFT) calculations were carried out with a Gaussian16 program, using the long-range corrected ω B97XD functional (including Grimme's dispersion correction) and cc-pVDZ basis set. The solvent effect of water was considered by using the integral equation formalism variant of the polarizable continuum model (IEFPCM). For each Azo1–4 derivative, equilibrium structures were systematically searched by the single-component artificial force induced reaction (SC-AFIR) method implemented in GRRM17 software, and then the lowest energy structure was employed for HOMO and LUMO energy.



Synthesis

Preparation of Azo1 (**17**)

To a solution of 3-ABA (**12**, 350 mg, 2.57 mmol) in a mixture of 1 M HCl aq. (10 mL) and water (30 mL), a solution of NaNO₂ (228 mg, 3.30 mmol) in water (1 mL) was gradually added at 0 °C. After stirring for 20 min at 0 °C, a solution of phenol (**13**, 331 mg, 3.52 mmol) in EtOH (2 mL) was added to the reaction mixture. After stirring overnight while gradually reaching room temperature, the precipitate was collected by filtration and recrystallized with water and a small amount of EtOH to obtain Azo1 (**17**, 200 mg, 0.829 mmol) as a yellow solid in 36% yield; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.15 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.45 (dd, *J* = 7.8 Hz, 7.8 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 167.82, 161.76, 152.57, 145.71, 136.08, 129.85, 129.72, 125.54, 125.06, 121.80, 116.54; HRMS (ESI) C₁₃H₁₁N₃O₂: [M – H][–] calcd = 240.0779, found = 240.0785; anal. calcd for C₁₃H₁₁N₃O₂·1/10H₂O: C, 64.36; H, 4.57; N, 16.94, found C, 64.24; H, 4.64; N, 17.29.

Preparation of Azo2 (**18**)

To a solution of 3-ABA (**12**, 497 mg, 3.65 mmol) in a mixture of water (4 mL), 1 M HCl aq. (12 mL), and EtOH (4 mL), a solution of NaNO₂ (280 mg, 4.06 mmol) in water (4 mL) gradually added at 0 °C. After stirring at 0 °C for 20 min, a solution of resorcinol (**14**, 444 mg, 4.03 mmol) in EtOH (4 mL) was added to the reaction mixture. After stirring overnight while gradually reaching room temperature, the precipitate was collected by filtration and recrystallized with water and a small amount of ethanol to obtain Azo2 (**18**, 504 mg, 1.96 mmol) as a yellow solid in 54% yield.; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.31 (s, 1H), 7.99–7.92 (m, 2H), 7.72 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.62 (dd, *J* = 7.8 Hz, 7.8 Hz, 1H), 6.54 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 6.32 (s, 1H); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 167.76, 163.87, 157.25, 151.29, 136.08, 132.89,

129.92, 129.67, 129.33, 124.69, 121.32, 109.78, 103.52; HRMS (ESI) $C_{13}H_{11}N_3O_3$: $[M - H]^-$ calcd = 256.0728, found = 256.0729; anal. calcd for $C_{13}H_{11}N_3O_3 \cdot 1/4H_2O$: C, 58.54; H, 4.09; N, 15.85, found C, 58.62; H, 4.26; N, 15.78.

Preparation for Azo3 (19)

To a solution of 3-ABA (**13**, 2.01 g, 14.7 mmol) in a mixture of water (16 mL), 1 M HCl aq. (48 mL), and EtOH (10 mL), a solution of $NaNO_2$ (1.08 g, 15.7 mmol) in water (16 mL) was gradually added at 0 °C. After stirring at 0 °C for 20 min, a solution of phloroglucinol (**15**, 2.08 g, 16.5 mmol) in EtOH (16 mL) was added to the reaction mixture. After stirring overnight while gradually allowing it to reach room temperature, the precipitation was collected by filtration. The precipitates were recrystallized with water and a small amount of ethanol to obtain Azo3 (**S8**, 1.80 g, 6.59 mmol) as a yellow solid in 46% yield; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.42 (s, 1H), 8.06 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.64 (dd, $J = 7.7$ Hz, 7.7 Hz, 1H), 5.95 (s, 2H); ^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ 167.78, 166.38, 159.29, 150.25, 136.00, 129.90, 128.62, 124.28, 123.47, 120.70, 95.57; HRMS (ESI) $C_{13}H_{11}N_3O_4$: $[M - H]^-$ calcd = 272.0677, found = 272.0676; anal. calcd for $C_{13}H_{11}N_3O_4 \cdot 1/4H_2O$: C, 55.96; H, 3.84; N, 15.35, found C, 56.22; H, 4.17; N, 15.13.

Preparation for Azo4

To a solution of 3-ABA (**13**, 497 mg, 3.65 mmol) in a mixture of water (4 mL), 1 M HCl aq. (2 mL), and EtOH (4 mL), a solution of $NaNO_2$ (279 mg, 4.04 mmol) in water (4 mL) was added at 0 °C. After stirring at 0 °C, a solution of *m*-phenylenediamine (**16**, 448 mg, 4.14 mmol) in EtOH (6 mL) was added to the reaction mixture. After stirring overnight while gradually reaching room temperature, the precipitation was collected by filtration and recrystallized with water and a small amount of EtOH to obtain Azo4 (**20**, 882 mg, 3.18 mmol) as a yellow solid in 95% yield; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.21 (s, 1H), 7.87 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H), 7.54–7.49 (m, 2H), 6.13 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 5.98 (s, 1H); ^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ 168.30, 154.14, 153.65, 135.68, 129.89, 129.42, 126.80, 124.01, 120.36, 106.44, 96.93; HRMS (ESI) $C_{13}H_{13}N_3O$: $[M + H]^+$ calcd = 256.1154, found = 256.1191, $[M + Na]^+$ calcd = 278.1012, found = 278.1009; anal. calcd for $C_{13}H_{13}N_3O \cdot 2/3H_2O$: C, 58.55; H, 5.12; N, 26.24, found C, 58.42; H, 5.42; N, 26.20.

Chapter2: Materials and methods

Reagents and general information

Azo-Rho1–3 were synthesized via azo coupling of DR. HPLC analyses were performed using an HPLC system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a reverse-phase Inertsil ODS-3 column (4.6 mm × 250 mm; GL Sciences Inc., Tokyo, Japan). Eluent A consisted of an aqueous solution containing 0.1% TFA aq, and eluent B consisted of MeCN containing 1% water. The flow rate was set to 1.0 mL min⁻¹. LC-MS analyses were conducted using an LC–MS system (Waters Xevo G2-XS QToF; Waters Corporation, MA, USA) equipped with a reverse-phase ACQUITY UPLC® BEH C18 column (2.1 mm × 50 mm; Waters Corporation). Eluent A was 1% HCOONH₄ aq., and eluent B was MeCN containing 1% water. X-ray irradiation was performed using CLINAC (Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, USA) or an X-Rad iR-225 system (Precision X-Ray, North Branford, CT, USA). Emission spectra of the compounds were recorded using a spectrofluorometer FP-8550 (JASCO, Tokyo, Japan). ¹H NMR spectra were acquired on either a JNM-ECX400P or JNM-ECS400 spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan) operating at 400 MHz. Chemical shifts were referenced to TMS or residual solvent signals and are reported in parts per million (ppm).

Hard X-ray irradiation to Azo-Rho1–3

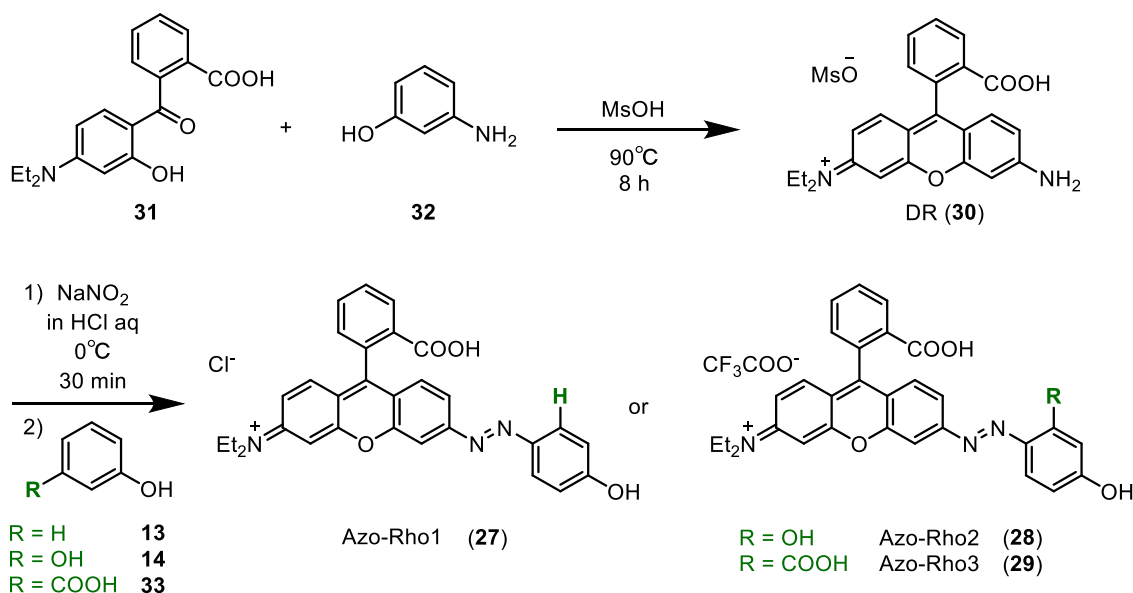
Each Azo-Rho1–3 was dissolved at a concentration of 5 μM in 1 mM PB (pH 7.4) containing 40% MeOH to improve solubility, and the solutions were prepared in sealed vials. Prior to irradiation, each solution was purged with argon gas through a septum cap to remove dissolved oxygen. The deoxygenated samples were then irradiated with X-rays at a total dose of 20 Gy using CLINAC (dose rate: 4.7 Gy min⁻¹, tube voltage: 6 MeV). After irradiation, each sample was mixed with an equal volume of phosphate buffer (pH 7.4) containing 1% DMF and 1 μM rhodamine B as an internal standard. The resulting solutions were analyzed by HPLC and LC–MS. HPLC analysis was performed using a gradient elution of solvent B from 40% (0 min) → 40% (4 min) and → 100% (13 min), with an injection volume of 150 μL and detection at 538 or 558 nm. LC–MS analysis was conducted using a gradient of solvent B from 20% (0 min) → 20% (2 min) and → 100% (5.5 min), with an injection volume of 5 μL.

Quantum chemical calculations

Density functional theory (DFT) calculations were carried out with a Gaussian16 program, using the long-range corrected ωB97XD functional (including Grimme's dispersion

correction) and cc-pVDZ basis set. The solvent effect of water was considered by using the integral equation formalism variant of the polarizable continuum model (IEFPCM). For each Azo-Rho derivative, equilibrium structures were systematically searched by the single-component artificial force induced reaction (SC-AFIR) method implemented in GRRM17 software, and then the lowest energy structure was employed for the vertical electron affinity (VEA) calculation. The VEA is calculated as the energy gap between non-reduced (NR) and one-electron-reduced (OER) states at equilibrium.

Synthesis



Preparation for *N,N*-diethyl rhodamine methane sulfonic acid (DR, **30**)

2-(4-Diethylamino-2-hydroxybenzoyl) benzoic acid (**31**, 2.19 g, 7.00 mmol), 3-aminophenol (**32**, 763 mg, 7.00 mmol) were added to methanesulfonic acid (10 mL) in a round bottle flask and reacted at 90 °C for 7 h. The reaction solution was then dissolved in water and salted out using potassium chloride. The salted product was recrystallized using 100 mL of toluene to obtain red crystals of the target compound (**30**, 982 mg, 2.03 mmol) in 29% yield. No further purification was performed.

Preparation for Azo-Rho1 (**27**)

DR methane sulfonic acid (**27**, 100 mg, 0.207 mmol) was dissolved in water (8 mL), MeCN (8 mL), and 1 M HCl aq. (4 mL) in the round bottle flask. After cooling, sodium nitrite (28.6 mg, 0.414 mmol) was added, and the reaction mixture was stirred at 0 °C for 15 min. Then, phenol (**13**, 39 mg, 0.415 mmol) was dissolved in MeOH (2 mL), and this MeOH solution was added dropwise to the previous mixture and allowed to react over 15 min. Next, 0.1 M aq. ammonia was added until pH 6–7 was reached. After removal of all the volatiles under reduced pressure, the residue was purified by column chromatography using silica gel (MeOH: DCM = 1:50) to afford the target compound (**27**, 90.3 mg, 0.178 mmol) in 86% yield; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.06 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 7.73–7.61 (m, 3H), 7.47 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.22 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.92 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 6.86 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.62 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.39 (d, J = 9.2, 1H), 3.70 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 1.18 (t, J = 7.2 Hz, 6H);

^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 170.4, 159.6, 154.4, 153.6, 153.5, 152.8, 150.3, 147.4, 135.5, 130.1, 129.3, 129.1, 125.8, 125.5, 124.6, 121.2, 118.1, 116.4, 111.3, 109.8, 105.1, 98.1, 84.8, 45.0, 13.0; HRMS (ESI) $\text{C}_{30}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4$: $[\text{M}]^+$ calcd. for 492.1918, found, 492.1916 (-0.2 mmu); Anal. Calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_5\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$: C; 65.99%, H; 5.17%, N; 7.70%, found C; 66.08%, H; 4.91%, N; 7.45%.

Preparation for Azo-Rho2 (**28**)

DR methane sulfonic acid (**30**, 100 mg, 0.207 mmol) was dissolved in water (16 mL), acetonitrile (16 mL), and 1 M HCl aq. (3 mL) in a round bottle flask, and the solution was cooled to 0 °C. Subsequently, sodium nitrite (28.6 mg, 0.414 mmol) was added, and the mixture was allowed to react at 0 °C for 15 min. Then, resorcinol (**S3**, 45.6 mg, 0.415 mmol) was dissolved in MeOH (2 mL), and this MeOH solution was added dropwise to previously prepared solution, and the mixture was allowed to react for 15 min. Next, 0.1 M NH_3 aq. was added until pH 6–7. After removal of all the volatiles under reduced pressure, the residue was purified by column chromatography using silica gel (MeOH/DCM = 1:50). Further purifications were carried out by RP- HPLC using 0.1% TFA aq. and MeCN as mobile phase (MeCN conc. : 30% (0 min) $\rightarrow$ 30% (2 min) $\rightarrow$ 50% (4 min) $\rightarrow$ 55% (13 min) $\rightarrow$ 60% (15 min)), evaporated and target compound were obtained in 71% yield (**28**, 72.7 mg, 0.147 mmol); ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.40 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.96–7.85 (m, $J = 12.0$ Hz, 3H), 7.74 (d, $J = 9.2$, 1H), 7.60 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.20 (dd, $J = 9.2$ Hz, 9.2 Hz, 2H), 7.03 (s, 1H), 6.55 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 6.23 (s, 1H), 3.76 (q, $J = 7.2$ Hz), 1.37 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H); ^{13}C -NMR Spectra (101 MHz, CDCl_3): δ 168.2, 167.7, 162.0, 160.3, 156.0, 155.8, 136.0, 135.2, 134.4, 133.5, 132.3, 131.9, 131.8, 131.3, 131.0, 122.8, 119.7, 118.9, 113.1, 109.8, 98.0, 47.9, 13.0; HRMS (ESI) $\text{C}_{30}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_5$: $[\text{M}]^+$ calcd for 508.1867, found, 508.1868 ($+0.1$ mmu); Anal. Calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_7\text{F}_3 \cdot 1/2\text{CF}_3\text{COOH}$: C, 58.41%; H, 3.94%; N, 6.19%, found C, 58.79%; H, 3.98%; N, 6.25%.

Preparation for Azo-Rho3 (**29**)

DR methane sulfonic acid (**30**, 100 mg, 0.207 mmol) was dissolved in water (8 mL), acetonitrile (8 mL), and 1 M HCl aq. (3 mL) in the round bottle flask. After cooling, sodium nitrite (22 mg, 0.319 mmol) was added, and the mixture was allowed to react at 0 °C for 15 min. Then, *m*-hydroxyl benzoic acid (**33**, 36 mg, 0.295 mmol) was dissolved in MeCN (2 mL), and this acetonitrile solution was gradually added to the previous solution, and the stirring continued for 15 min. Next, 0.1 M NH_3 aq. was added until pH 6–7. After removal of all the volatiles under reduced pressure, the residue was purified by silica gel column chromatography (MeOH/DCM

= 1:9 → 1:1). Further purifications were carried out by RP-HPLC using 0.1% TFA aq. and MeCN as mobile phase (MeCN conc.: 42% (0 min) → 42% (7 min) → 85% (18 min)), evaporated and target compound **29** was obtained in 31% yield (50.5 mg, 0.0787 mmol); ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.27 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.83-7.71 (m, 4H), 7.39 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 8.8, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.91 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 3.70 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H), 1.26 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H); ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 146.1, 144.5, 137.2, 136.1, 135.5, 133.6, 125.1, 118.7, 117.4, 116.1, 115.1, 114.6, 114.3, 113.8, 108.7, 106.4, 106.2, 105.4, 104.2, 103.8, 103.0, 99.3, 83.3, 47.9, 20.0; HRMS (ESI) C₃₁H₂₆N₃O₆: [M]⁺ calcd. 536.1816, found, 536.1828 (+1.2 mmu); Anal. Calcd. for C₃₃H₂₆N₃O₈F₃ • 1/2H₂O: C, 60.18%; H, 4.13%; N, 6.38%, found, C, 60.29%; H, 4.03%; N, 6.05%.

Chapter3: Materials and methods

Reagents and general information

HPLC analyses were performed using an HPLC system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a reverse-phase Inertsil ODS-3 column (4.6 mm × 250 mm; GL Sciences Inc., Tokyo, Japan). Eluent A consisted of an aqueous solution containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), and eluent B consisted of acetonitrile containing 1% water. The flow rate was set to 1.0 mL min⁻¹. LC-MS analysis were performed using LC-MS system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a reverse-phase Inertsil ODS-3 column (2.1 mm × 50 mm; GL Sciences Inc., Tokyo, Japan). Eluent A consisted of 0.1 M HCOONH₄ aq., and eluent B consisted of MeCN containing 1% water. The flow rate was set to 0.10 mL min⁻¹, and the gradient of eluent B was programmed as follows: 1% (0 min) → 1% (3 min) → 80% (9 min) → 80% (11 min). X-ray irradiation was performed using X-Rad iR-225 system (Precision X-Ray, North Branford, CT, USA). Emission spectra of the compounds were recorded using a spectrofluorometer FP-8550 (JASCO, Tokyo, Japan). ¹H NMR spectra were acquired on either a JNM-ECX400P or JNM-ECS400 spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan) operating at 400 MHz. Chemical shifts were referenced to TMS or residual solvent signals and are reported in parts per million (ppm).

Dose dependency of DR release from Azo-Rho2

A 5 μM solution of Azo-Rho2 was prepared in 1 mM PB (pH 7.4) containing 40% MeOH in a sealed vial. The solution was purged with argon gas through a septum cap to remove dissolved oxygen and subsequently irradiated with X-rays at doses of 4, 10, 20, and 40 Gy using CLINAC (dose rate: 4.7 Gy min⁻¹, tube voltage: 6 MeV). After irradiation, fluorescence emission spectra of the solutions were recorded with an excitation wavelength of 480 nm to evaluate the dose-dependent release of DR.

Investigation of intracellular azo bond cleavage induced by X-ray irradiation

The human leukemia cell line MOLT-4 was obtained from the RIKEN Cell Bank (Tsukuba, Japan). MOLT-4 cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS and 1% penicillin–streptomycin and maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cells were subcultured when the cell density reached 1.0 × 10⁴ cells mL⁻¹. For X-ray irradiation experiments, 3.0 × 10⁷ MOLT-4 cells were suspended in 30 mL of RPMI-1640 medium containing 10% FBS (final cell concentration: 1.0 × 10⁶ cells mL⁻¹). To prepare the Azo-Rho2-containing cell suspension, 150 μL of a 1 mM Azo-Rho2 solution in MeOH was first

mixed with 600 μL of RPMI-1640 medium containing MOLT-4 cells. The resulting 750 μL suspension was then stepwise diluted with 29.25 mL of RPMI-1640 medium. This stepwise dilution procedure was employed to prevent precipitation of Azo-Rho2 in the culture medium. After incubation with Azo-Rho2 for 80 min, the cells were collected by centrifugation at 400 g for 5 min, and the supernatant was removed. The cells were subsequently resuspended in 30 mL of PBS, yielding a final cell concentration of 1.0×10^6 cells mL^{-1} . The cell suspensions were transferred to sealed vials and purged with nitrogen gas for 10 min to remove dissolved oxygen, followed by X-ray irradiation at doses of 0, 2.5, 5, 10, and 25 Gy at a dose rate of 4.37 Gy min^{-1} . Low-energy X-rays were removed using a 0.3 mm copper plate as a filter. After irradiation, each sample was transferred to a measurement tube and analyzed using a CytoFLEX flow cytometer.

Hard X-ray irradiation to Azo-Rho1–3

Hard X-ray irradiation of Azo-Rho1–3 was carried out following the protocol described in Chapter 2. The solutions obtained before and after hard X-ray irradiation were placed in a cuvette with an optical path length of 1.3 mm $\times$ 1.3 mm and excited at a wavelength of 488 nm.

Hard X-ray irradiation to AzoNMe-Dox/AzoOH-Dox/Azo-NM

Each AzoNMe-Dox, AzoOH-Dox and Azo-NM were dissolved at a concentration of 10 μM in 1 mM PB (pH 7.4) containing 50% methanol to improve solubility, and the solutions were prepared in sealed vials. Prior to irradiation, each solution was purged with argon gas through a septum cap to remove dissolved oxygen. The deoxygenated samples were then irradiated with X-rays at a total dose of 20–60 Gy using X-rad iR225 (dose rate: 2.63 Gy min^{-1} , tube voltage: 200 keV, beam filter: 0.1 mm Cu plate and a 1 mm Al plate). After irradiation, each sample was mixed with an equal volume of PB (pH 7.4) containing 0.5% DMF and 0.5 μM rhodamine B as an internal standard. The resulting solutions were analyzed by LC–MS using a gradient of solvent B from 20% (0 min) $\rightarrow$ 20% (2 min) $\rightarrow$ 100% (5.5 min), with an injection volume of 60 μL .

Stability test of Azo-NM

Azo-NM was first dissolved in DMSO to prepare a 5 mM stock solution. The stock solution was then diluted with phosphate buffer containing 50% MeOH to obtain a final Azo-NM concentration of 10 μM . Subsequently, glutathione, ascorbic acid, or cysteine was added to the solution to a final concentration of 1 mM, and the mixture was stirred at room temperature for 24

h. After incubation, the samples were analyzed by HPLC, and the remaining fraction of Azo-NM was quantified based on the peak area of Azo-NM.

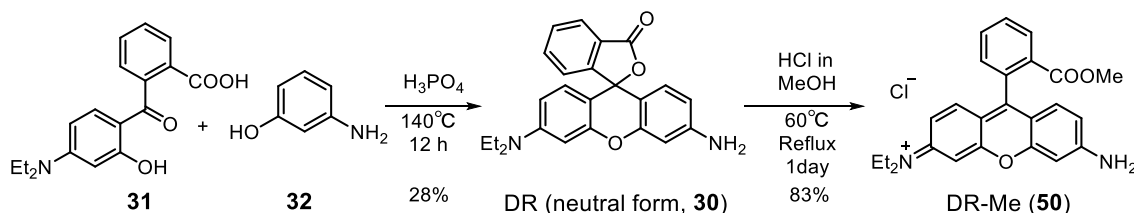
Cell Study

The human cervical cancer cell line HeLa and the human lung cancer cell line A549 were obtained from the RIKEN Cell Bank (Tsukuba, Japan). HeLa cells were cultured in DMEM high glucose medium, whereas A549 cells were cultured in RPMI-1640 medium. Both media were supplemented with 10%FBS and 1% penicillin–streptomycin. Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and subcultured when the cell density reached 1.0×10^4 cells mL⁻¹. HeLa and A549 cells were seeded in 5 cm × 5 cm culture dishes at a density of approximately 100 or 200 cells per dish in 5 mL of the appropriate culture medium and incubated under standard culture conditions. After 5 h, cell adhesion to the culture dish was confirmed, and the culture medium was replaced with DMEM (for HeLa cells) or RPMI-1640 (for A549 cells) containing Azo-NM at a final concentration of 250 μM. The cells were further incubated for 1 h. Subsequently, the cells were irradiated with hard X-rays at a dose of 2.5 Gy using an X-Rad system (dose rate: 1.37 Gy min⁻¹, tube voltage: 200 kV). After irradiation, the cells were incubated for an additional 14 days, after which colonies were fixed and counted to determine cell survival using a clonogenic assay.

Synthesis

Preparation for Azo-Rho1–3

Azo-Rho1–3 used in this chapter were synthesized according to chapter2.



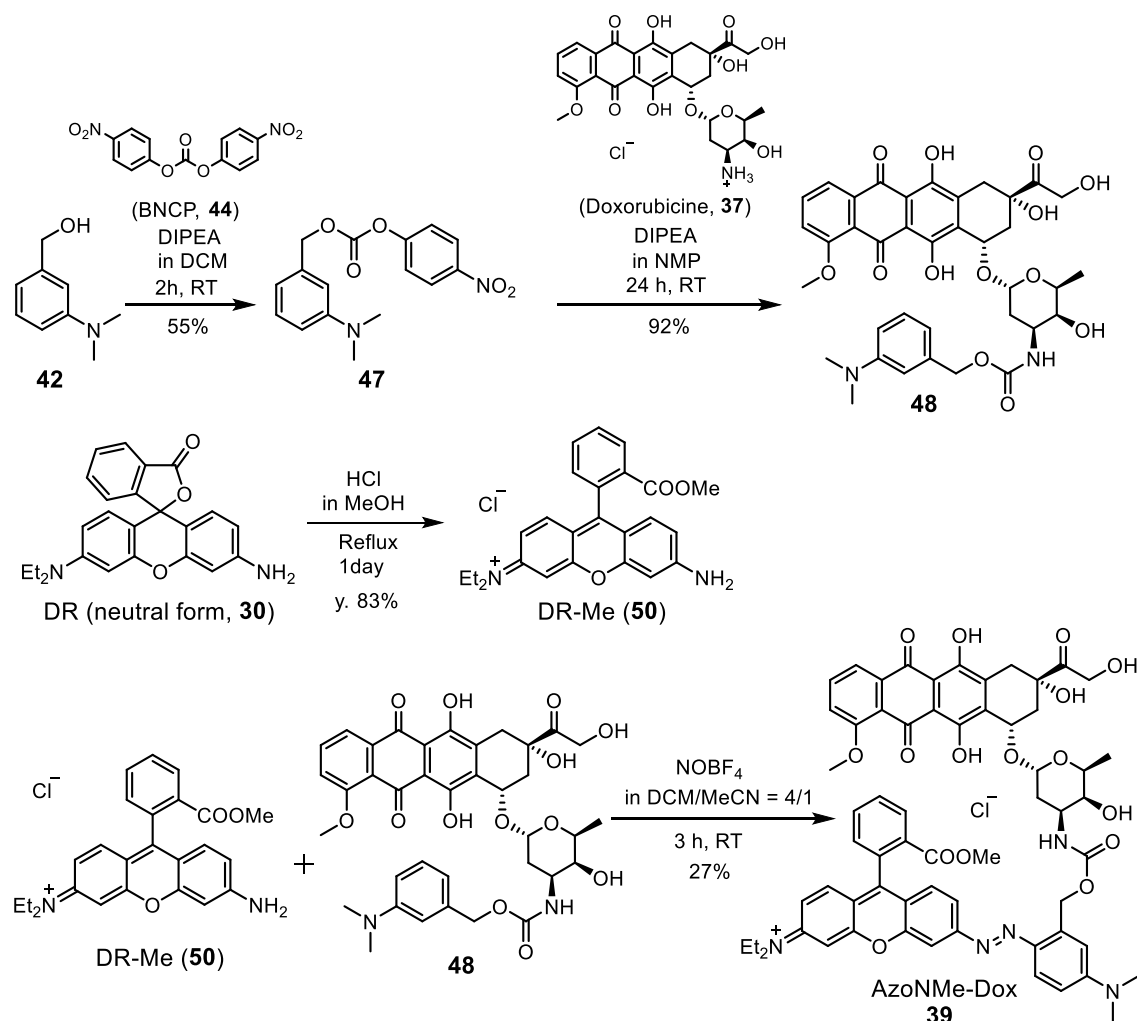
Preparation for DR (neutral form, **30**)

2-[4-(Diethylamino)-2-hydroxybenzoyl] benzoic acid (**31**, 3.14 g, 10.0 mmol) and m-aminophenol (2.12 g, 20.0 mmol) were dissolved in phosphoric acid (H₃PO₄, 40 mL), and the resulting mixture was stirred at 140 °C for 12 h. After completion of the reaction, the mixture was poured into 3 M aqueous NaOH and extracted with DCM (400 mL × 3). The combined organic layers were

concentrated under reduced pressure, and the crude product was purified by silica gel column chromatography (AcOEt/MeOH = 100:0 → 50:50). The target compound, DR (neutral form, **30**), was obtained as a pink solid in 28% yield (MW = 387.4 g mol⁻¹, 1.10 g, 2.84 mmol); ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.8000(d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.67-7.59 (m, 2H), 7.28 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.25 (dd, *J* = 7.3, 1.4 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.00 (dd, *J* = 9.4, 2.5 Hz, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.74-6.80 (m, 2H), 3.65 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H), 1.29 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H); ε₅₂₃ = 88000 M⁻¹ cm⁻¹ in MeOH.

Preparation for DR-Methyl ester (DR-Me, **50**)

DR (**30**, 1.0 g, 2.5 mmol) was dissolved in anhydrous MeOH (50 mL) containing 1 M HCl, and the resulting solution was refluxed at 70 °C for 24 h. After completion of the reaction, the solvent was removed under reduced pressure, and the crude product was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH = 100:0 to 50:50) to afford DR-Me (**50**) as a red solid in 82.5% yield (**S19**, MW = 436.9 g mol⁻¹, 931 mg, 2.1 mmol); ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.33 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 7.88 (dd, *J* = 7.4, 6.7 Hz, 1H), 7.82 (dd, *J* = 7.4, 7.4 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 7.06-7.00 (m, 3H), 6.85 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.80 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 3.69 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H), 3.64 (s, 3H), 3.34-3.38 (2H), 1.32 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H); HRMS (ESI) C₂₅H₂₅N₂O₃: [M]⁺ calcd. 401.1854, found, 401.1860 (+0.6 mmu).



Preparation for **47**

3-(Dimethylamino) benzyl alcohol (**42**, 5.0 mmol, 1.51 g) was dissolved in anhydrous DCM (10 mL) at room temperature. BNCP (**44**, 7.5 mmol, 3.42 g) and DIPEA (7.5 mmol, 0.97 g, 1.30 mL) were added to the solution, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction was quenched and the solvent was washed with sat. NH₄Cl aq. (200 mL × 2), sat. NaHCO₃ aq., and brine (200 mL). The organic layer was collected, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by medium-pressure liquid chromatography (MPLC) using hexane/AcOEt as the mobile phase (AcOEt content: 7%) to afford the desired product **S21** as a white solid (1.74 g, 55% yield); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.26 (dd, *J* = 9.9, 2.7 Hz, 2H), 7.37 (dd, *J* = 9.9, 2.7 Hz, 2H), 7.26 (dd, *J* = 7.9, 7.9 Hz 1H), 6.78-6.72 (m, 3H), 5.25 (s, 2H), 2.97 (s, 6H); HRMS (ESI) C₃₁H₂₆N₃O₆: [M]⁺ calcd. 536.1816, found, 536.1828 (+1.2 mmu).

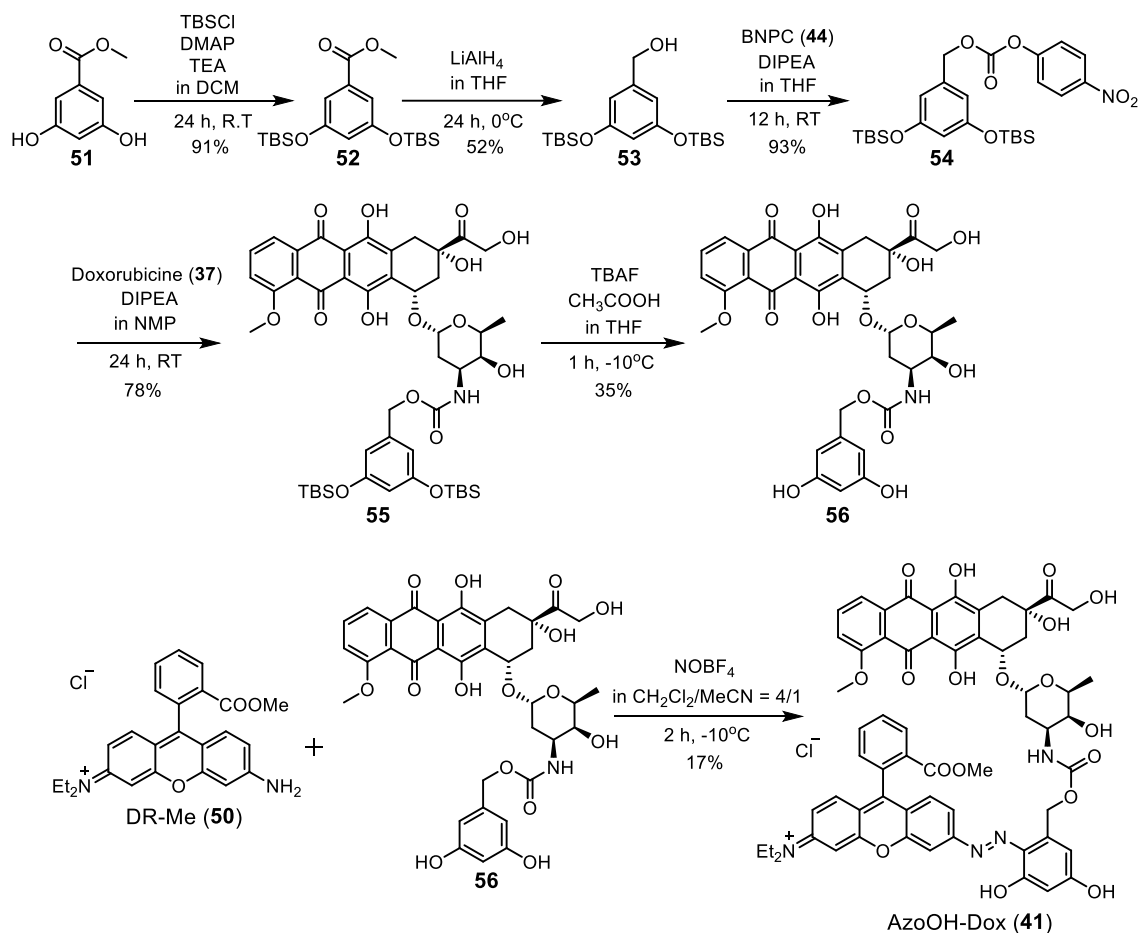
Preparation for **48**

47 (406 mg, 0.468 mmol) and doxorubicin hydrochloride (**37**, 290 mg, 0.341 mmol) were dissolved in NMP (20 mL) at room temperature. DIPEA (110 mg, 0.86 mmol, 150 μ L) was then slowly added to the reaction mixture, which was stirred at room temperature for 24 h. The reaction mixture was diluted with AcOEt/hexane (3:1, 300 mL) and washed with sat. NH_4Cl aq. (300 mL $\times$ 2) and brine (300 mL). The organic phase was separated, dried over with anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure. The resulting red oil was redissolved in cosolvent of AcOEt (50 mL) and MeOH (5 mL), after which hexane (150 mL) was added to induce precipitation. The precipitation was collected by filtration and dried under reduced pressure to afford the target compound as a red solid in 92% yields (464 mg, 0.275 mmol). The desired product was used for next reaction without further purification; ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.00 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.83 (t, J = 8.1, 8.1 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.15 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.69-6.65 (m, 3H), 5.45 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 5.21 (s, 1H), 4.97 (d, J = 4.5 Hz, 2H), 4.22 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 4.07 (s, 3H), 3.89 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 3.61 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.17 (d, J = 18.4 Hz, 1H), 3.02 (d, J = 18.4 Hz, 1H), 2.90 (s, 6H), 2.70 (s, 1H), 2.38 (d, J = 14.4 Hz, 1H), 2.20-2.16 (m, 1H), 1.91 (td, J = 12.9, 3.9 Hz, 1H), 1.80 (dd, J = 12.9, 4.8 Hz, 1H), 1.28 (d, J = 6.3 Hz, 3H); HRMS (ESI) $\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{13}$: $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd. 743.2423, found, 743.2409 (-1.4 mmu).

Preparation for AzoNMe-Dox (**39**)

DR-Me (**50**, 52.4 mg, 0.12 mmol) was dissolved in a mixed solvent of dichloromethane and acetonitrile (4:1, v/v; 10 mL). The solution was cooled to -5 $^\circ\text{C}$, and nitrosonium tetrafluoroborate (NOBF_4 , 14.0 mg, 0.12 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at -10 $^\circ\text{C}$ for 1 h to effect diazotization. Subsequently, **48** (72.0 mg, 0.10 mmol) was added, and the mixture was stirred for an additional 10 min. Water (2 mL) and sat. NaHCO_3 aq. (2 mL) were then added, and stirred for a further 10 min. The reaction mixture was poured into DCM (150 mL) and washed successively with sat. NaHCO_3 aq. (150 mL) and brine (150 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure. The resulting blue solid was washed with anhydrous THF, and after complete removal of THF, the solid was further washed with water. Purification by silica gel column chromatography (DCM/MeOH = 100:0 $\rightarrow$ 92:8) followed by a second silica gel column chromatography under modified conditions (DCM/MeOH = 100:0 $\rightarrow$ 88:12) afforded the target compound as a blue solid in 27% yield (MW = 1249.7 g mol^{-1} , 330 mg, 0.026 mmol); ^1H -NMR (500 MHz, $\text{MeOD}/\text{CDCl}_3$ = 2/1) δ 8.43 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 8.10 (s, 2H), 7.96-7.86 (m, 5H), 7.53-7.53 (m, 2H), 7.42 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.35 (d,

$J = 8.9$ Hz, 2H), 7.20 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.76 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 5.70 (s, 2H), 5.54 (s, 1H), 5.33 (s, 1H), 4.80 (s, 2H), 4.22 (d, $J = 14.4$ Hz, 1H), 4.12 (s, 2H), 4.02-3.96 (m, 1H), 3.90-3.81 (m, 4H), 3.73-3.68 (m, 4H), 3.27 (s, 6H), 3.14-3.02 (m, 2H), 2.41 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 2.22 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 1.98-1.86 (m, 2H), 1.50-1.43 (m, 6H), 1.33-1.32 (m, 4H); HRMS (ESI) $C_{62}H_{62}N_5O_{16}$: $[M]^+$ calcd. 1132.4200, found, 1132.4186 (-1.4 mmu); Anal. Calcd. for $C_{62}H_{62}ClN_5O_{16} \cdot 7/2H_2O$: C, 59.59%; H, 5.73%; N, 5.60%, found, C, 59.64%; H, 5.59%; N, 5.59%.



Preparation for **52**

Methyl 3,5-dihydroxybenzoate (**51**, 19.0 g, 0.113 mol) and TBSCl (36.0 g, 0.238 mol) were dissolved in DCM (250 mL) in a 500 mL one-necked round-bottom flask equipped with a magnetic stir bar. After the mixture became homogeneous, TEA (32 g, 0.32 mol) and 4-dimethylaminopyridine (DMAP, 5.2 g, 42.6 mmol) were added, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. The reaction mixture was diluted with DCM and washed with water (200 mL $\times$ 2) and brine (200 mL). The organic phase was then washed sequentially with sat. NaHCO₃ aq. (200 mL) and brine. The organic layer was separated, dried over with anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure to afford a crude residue. The crude product was purified by silica gel column chromatography using hexane as the eluent to afford **52** as a colorless viscous liquid in 91% yield (41.0 g, 0.103 mol); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.11 (d, J = 2.3 Hz, 2H), 6.51 (t, J = 2.3 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 0.97 (s, 18H), 0.20 (s, 12H); HRMS (ESI) C₂₀H₃₆O₄Si₂: [M + Na]⁺ calcd. for 419.2045, found, 419.2044 (−0.1 mmu).

Preparation for **53**

Anhydrous THF (100 mL) was placed in a 500 mL one-necked round-bottom flask equipped with a magnetic stir bar and cooled to 0 °C using an ice bath. Lithium aluminum hydride (LiAlH₄, 1.40 g, 36.9 mmol) was added very slowly in portions of approximately 100 mg to minimize vigorous reaction or ignition. After completion of the addition, **52** (15.0 g, 37.8 mmol) was added, and the reaction mixture was stirred at 0 °C for 24 h. Upon completion of the reaction, the mixture was carefully quenched at 0 °C by the dropwise addition of 1 M HCl aq. (10 mL), followed cautiously by water (10 mL) and an excess amount of AcOEt. The resulting suspension was stirred for approximately 30 min until a white-to-beige precipitate formed. The organic layer was separated and concentrated under reduced pressure. The resulting viscous residue was purified by silica gel column chromatography using hexane as the eluent to afford the target compound **53** as a colorless viscous liquid in 52% yield (7.22 g, 19.6 mmol); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.09 (s, 2H), 6.49 (s, 1H), 3.85 (s, 2H), 0.952 (s, 18H), 0.175 (s, 12H), HRMS (ESI) C₁₉H₃₆O₃Si₂: [M + Na]⁺ calcd. for 396.2096, found, 391.2095 (−0.1 mmu).

Preparation for **54**

BNPC (**44**, 12.0 mmol, 3.68 g) and **53** (10.9 mmol, 4.02 g) were dissolved in THF (40 mL). DIPEA (2.23 g, 17.3 mmol 3.0 mL) was added, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. The reaction mixture was poured into a hexane/AcOEt (1:1, v/v) solution and washed with sat. NaHCO₃ aq. (200 mL × 3) followed by brine (200 mL). The organic layer was dried over with anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography using hexane/ethyl acetate (99:1, v/v) as the eluent to afford the target compound **54** as a white solid in 93% yield (4.97 g, 9.3 mmol); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.53 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 6.34 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 5.16 (s, 2H), 0.97 (s, 18H), 0.20 (s, 12H); HRMS (ESI) C₂₆H₃₉NO₇Si₂: [M + Na]⁺ calcd. 556.2158, found, 556.2149 (−0.9 mmu).

Preparation for **55**

55 (831 mg, 1.30 mmol) and doxorubicin hydrochloride (**37**, 754 mg, 1.30 mmol) were dissolved in NMP (10 mL). The solution was cooled to 0 °C in an ice bath, after which DIPEA (203 mg, 1.57 mmol, 273 μL) was added. The reaction mixture was stirred at 0 °C to room temperature for 24 h. After completion of the reaction, the mixture was washed with sat. NaHCO₃ aq. (500 mL × 2), water (500 mL × 2), and brine (500 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. TLC analysis indicated the

presence of unreacted starting materials. Therefore, the concentrated NMP residue was redissolved in AcOEt (500 mL) and washed successively with sat. NH₄Cl aq. (500 mL × 2), sat. NaHCO₃ aq. (500 mL), and brine (500 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in AcOEt (50 mL), and hexane was added to induce precipitation. The red precipitate was collected by filtration and dried under reduced pressure to afford the target compound **55** as a red solid in 78% yield (1.06 g, 1.13 mmol); HRMS (ESI) C₄₇H₆₃NO₁₅Si₂: [M + Na]⁺ calcd. 960.3629, found, 960.3622 (−0.7 mmu).

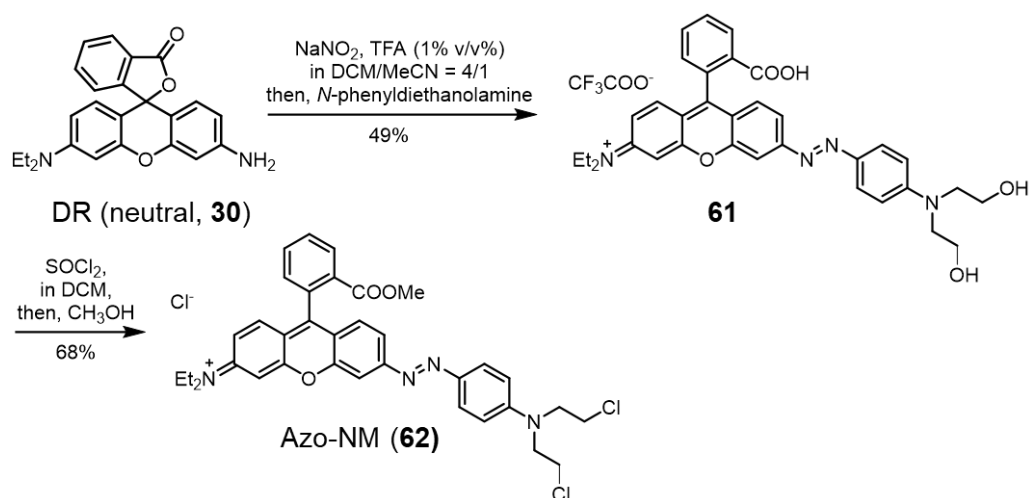
Preparation for **56** (Deprotection of **55**)

55 (695 mg, 0.74 mmol) was dissolved in anhydrous THF (50 mL). A solution of 1.0 M TBAF in THF (1.75 mL) and acetic acid (84 mg, 1.4 mmol, 80 μL) were added, and the reaction mixture was stirred at −10 °C for 1 h. The reaction mixture was poured into AcOEt (500 mL) and washed successively with sat. NaHCO₃ aq. (500 mL), sat. NH₄Cl aq. (500 mL × 2), and brine (500 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography using DCM/MeOH as the eluent (DCM/MeOH = 100:0 → 70:30) to afford the target compound **56** in 87% yield (MW = 709.7 g mol^{−1}, 456 mg, 0.64 mmol); ¹H-NMR (500 MHz, MeOD) δ 7.71-7.68 (m, 2H), 7.39 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.23 (s, 2H), 6.14 (s, 1H), 5.38 (s, 1H), 5.02 (s, 1H), 4.76 (s, 1H), 4.27 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.12 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.66 (s, 1H), 3.02 (d, *J* = 18.2 Hz, 1H), 2.84 (d, *J* = 18.2 Hz, 1H), 2.36 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H), 2.14-2.10 (m, 1H), 2.03 (s, 1H), 2.00-1.91 (m, 1H), 1.81 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H), 1.30-1.25 (m, 5H); HRMS (ESI) C₂₅H₃₅NO₁₅: [M + Na]⁺ calcd. 732.1899, found, 732.1892 (−0.7 mmu).

Preparation for **41**

DR-Me (60.7 mg, 0.14 mmol) was dissolved in a mixed solvent of dichloromethane and acetonitrile (DCM/MeCN = 4:1, 10 mL), and the solution was cooled to −10 °C. NOBF₄ (16 mg, 0.12 mmol) was added, and the reaction mixture was stirred at −10 °C for 1 h to effect diazotization. Separately, **56** (73.6 mg, 0.104 mmol) was dissolved in a mixed solvent of MeOH, DCM, and MeCN (MeOH/DCM/MeCN = 1 mL/8 mL/2 mL). This solution was added portionwise to the diazonium solution. After confirming that the reaction mixture became homogeneous DIPEA (26.7 g, 0.207 mmol, 36 μL) was added dropwise, and the mixture was stirred for an additional 1 hour at −10 °C. The reaction mixture was poured into DCM (500 mL)

and washed successively with sat. NaHCO_3 (500 mL), water (500 mL $\times$ 2), and brine (500 mL). The organic layer was collected, dried over with anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure. Any precipitates formed during the workup were also collected by filtration and combined with the organic residue obtained after concentration. The crude product was purified by MPLC using DCM/MeOH as the eluent (solvent A: DCM; solvent B: MeOH; B conc.: 0–14%). The blue fractions were collected and further purified by a second silica gel column chromatography with same condition to afford the target compound **41** as a blue solid (30.6 mg, 0.025 mmol) in 18% yield; ^1H -NMR (500 MHz, $\text{MeOD}/\text{CDCl}_3 = 2/1$) δ 8.29–8.26 (m, 1H), 7.95–7.76 (m, 4H), 7.55–7.37 (m, 3H), 7.12–6.76 (m, 5H), 6.17 (d, $J = 26.0$ Hz, 1H), 5.51 (s, 1H), 5.35–5.20 (m, 3H), 5.05 (s, 1H), 4.76 (s, 2H), 4.03–3.92 (m, 3H), 3.67–3.60 (m, 8H), 3.20–3.12 (m, 1H), 2.96 (t, $J = 15.9$ Hz, 1H), 2.36 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 2.15 (d, $J = 22.1$ Hz, 1H), 2.00 (s, 1H), 1.82 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 1.31–1.24 (m, 13H); HRMS (ESI) $\text{C}_{60}\text{H}_{57}\text{N}_4\text{O}_{18}$: $[\text{M}]^+$ calcd. 1121.3693, found, 1121.3698 (+0.5 mmu); Anal. Calcd. for $\text{C}_{60}\text{H}_{57}\text{ClN}_4\text{O}_{18} \cdot 7/2\text{H}_2\text{O}$: C, 59.04%; H, 5.29%; N, 4.59%, found, C, 59.04%; H, 5.66%; N, 4.46%.



Preparation for **61**

DR (neutral form, **30**, 1.06 mmol, 400 mg) was dissolved in a mixed solvent of DCM and MeCN (DCM/MeCN = 4:1, v/v; 40 mL), an TFA (400 μL , 1% v/v) was added. NaNO_2 (106 mg, 1.54 mmol) was then added, and the reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 min to effect diazotization. Subsequently, *N*-phenyldiethanolamine (1.27 mmol, 230 mg) was added, and the reaction mixture was stirred at 0 °C for 24 h. After completion of the reaction, the solvent was removed under reduced pressure, and the crude product was purified by silica gel column chromatography using (DCM/MeOH = 98/2 $\rightarrow$ 92/8) to afford the target compound **61** as a yellow solid in 45% yield (MW = 692.7 g mol⁻¹, 324 mg, 0.46 mmol); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.02 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 9.5 Hz, 2H), 7.71 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.66-7.61 (m, 2H), 7.49-7.46 (m, 1H), 7.16-7.22 (1H), 6.86 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.77 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 6.60 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.49 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.37 (dd, J = 9.1, 2.7 Hz, 1H), 3.95 (q, J = 5.0 Hz, 4H), 3.73 (t, J = 5.0 Hz, 4H), 3.37 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 1.18 (t, J = 7.1 Hz, 6H); HRMS (ESI) $\text{C}_{34}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_5$: $[\text{M}]^+$ calcd. 579.2602, found, 579.2589 (−1.3 mmu).

Preparation for Azo-NM (**62**)

61 (95.0 mg, 0.137 mmol) was dissolved in DCM (30 mL), and thionyl chloride (SOCl_2 , 150 μL) was added. The reaction mixture was refluxed at 45 °C for 1.5 h. MeOH (20 mL) was then added to quench excess thionyl chloride, and the mixture was further refluxed for an additional 1 h. After completion of the reaction, the solvent was removed under reduced pressure, and the crude product was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH = 100/0 $\rightarrow$ 50/50) to afford the target compound Azo-NM (**62**) as a blue solid in 68% yield (65.3 mg, 0.098 mmol); ¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.37 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.93-7.83

(m, 5H), 7.52 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.26 (s, 2H), 7.14 (s, 1H), 6.91 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 3.92-3.89 (m, 4H), 3.82-3.74 (m, 8H), 3.63 (s, 3H), 1.40 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.29 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H); HRMS (ESI) $C_{35}H_{35}Cl_2N_4O_3$: $[M]^+$ calcd. 629.2081, found, 629.2073 (-0.8 mmu); Anal. Calcd. for $C_{35}H_{35}Cl_3N_4O_3 \cdot 5/2H_2O$: C, 59.12%; H, 5.67%; N, 7.88%, found, C, 58.93%; H, 5.84%; N, 7.75%.

Appendix

Table S1 Cartesian coordinates (in Å) of the lowest energy (most stable) structure of Azo1 in the NR state. The potential energy of the NR state (charge = 0, spin multiplicity = 0) is −816.4907694 Hartree. Computational level was ωB97XD/cc-pVDZ | IEFPCM (solvent = water).

Atom	x	y	z
N	-3.70185	-0.92515	0.051102
C	0.223668	0.585841	-0.15956
C	-0.02317	-0.77831	-0.02454
C	-2.40191	-0.3484	-0.03028
C	-1.3337	-1.24652	0.037444
C	-0.84493	1.491504	-0.23261
C	-2.15381	1.021333	-0.15402
N	-4.63593	-0.11098	-0.10124
H	-1.54989	-2.31077	0.143255
H	-2.98493	1.723821	-0.1894
C	-5.93535	-0.66207	-0.01251
C	-6.99114	0.233828	-0.20074
C	-6.21641	-2.01361	0.247417
C	-8.31109	-0.19755	-0.13457
C	-7.52724	-2.45133	0.315831
C	-8.58416	-1.54511	0.125304
H	-9.1305	0.508575	-0.28445
H	-7.76184	-3.49729	0.517861
H	1.256109	0.938127	-0.179
H	0.810382	-1.47851	0.040176
C	-0.65471	2.980982	-0.3562
O	-1.55251	3.76243	-0.06221
N	0.561365	3.401635	-0.78472
H	0.669299	4.392135	-0.96683
H	1.19425	2.777449	-1.2662
O	-9.83876	-2.03609	0.205982
H	-10.4754	-1.3232	0.064143
H	-6.75926	1.281071	-0.40146
H	-5.38968	-2.7083	0.394629

Table S2 Cartesian coordinates (in Å) of the lowest energy (most stable) structure of Azo2 in the NR state. The potential energy of the NR state (charge = 0, spin multiplicity = 0) is −891.7110271 Hartree. Computational level was ωB97XD/cc-pVDZ | IEFPCM (solvent = water).

Atom	x	y	z
N	-3.68144	-0.93736	0.0469
C	0.232581	0.59204	-0.15545
C	-0.00419	-0.77366	-0.01625
C	-2.3844	-0.36359	-0.03017
C	-1.30992	-1.25434	0.042667
C	-0.84349	1.487412	-0.23536
C	-2.14915	1.007527	-0.15845
N	-4.6382	-0.13016	-0.08515
H	-1.51032	-2.3217	0.149714
H	-2.98463	1.704437	-0.19886
C	-5.91612	-0.67307	-0.00394
C	-6.98198	0.231674	-0.1565
C	-6.20837	-2.05031	0.218798
C	-8.29758	-0.17882	-0.09534
C	-7.53956	-2.46564	0.281471
C	-8.57336	-1.54313	0.126949
H	-9.11368	0.535176	-0.21663
H	-7.76588	-3.51812	0.45252
H	1.262068	0.952679	-0.17327
H	0.834586	-1.46706	0.053312
C	-0.66716	2.978339	-0.36458
O	-1.57346	3.751778	-0.07567
N	0.545518	3.40881	-0.79208
H	0.644669	4.39963	-0.97741
H	1.185963	2.78878	-1.26887
O	-9.83224	-2.01568	0.19982
H	-10.4581	-1.28884	0.082177
O	-5.24534	-2.95986	0.370909
H	-4.38703	-2.46369	0.291858
H	-6.7318	1.280011	-0.32644

Table S3 Cartesian coordinates (in Å) of the lowest energy (most stable) structure of Azo3 in the NR state. The potential energy of the NR state (charge = 0, spin multiplicity = 0) is −966.9260566 Hartree. Computational level was ωB97XD/cc-pVDZ | IEFPCM (solvent = water).

Atom	x	y	z
N	-3.66631	-0.96891	0.003426
C	0.232488	0.584285	-0.28098
C	0.006458	-0.75911	0.010915
C	-2.37831	-0.3855	-0.10167
C	-1.29482	-1.24532	0.103717
C	-0.85121	1.449637	-0.48472
C	-2.15307	0.958717	-0.40939
N	-4.63682	-0.16512	-0.04994
H	-1.48666	-2.29474	0.33341
H	-2.98831	1.631827	-0.59583
C	-5.90307	-0.69625	0.033102
C	-6.95467	0.25888	-0.02325
C	-6.22519	-2.07963	0.164118
C	-8.28086	-0.13916	0.043827
C	-7.55684	-2.47471	0.230827
C	-8.5671	-1.50754	0.169816
H	-9.07485	0.606855	0.000152
H	-7.81038	-3.52931	0.330013
O	-6.65965	1.559708	-0.14218
H	-5.68734	1.619892	-0.16973
H	1.258773	0.941644	-0.37658
H	0.850692	-1.43302	0.160451
C	-0.68739	2.907588	-0.82803
O	-1.59688	3.542928	-1.34989
N	0.518337	3.461675	-0.54906
H	0.609376	4.461544	-0.68288
H	1.158311	3.027848	0.102316
O	-9.83278	-1.95698	0.239248
H	-10.4465	-1.2124	0.184812
O	-5.26335	-2.99962	0.222484
H	-4.40121	-2.50848	0.161392

Table S4 Cartesian coordinates (in Å) of the lowest energy (most stable) structure of Azo4 in the NR state. The potential energy of the NR state (charge = 0, spin multiplicity = 0) is −851.9877013 hartree. Computational level was ωB97XD/cc-pVDZ | IEFPCM (solvent = water).

Atom	x	y	z
N	-3.58283	-1.02221	0.123933
C	0.268348	0.673596	-0.16567
C	0.086794	-0.69687	0.007117
C	-2.31522	-0.38969	0.016161
C	-1.19779	-1.22821	0.0934
C	-0.84658	1.519575	-0.2508
C	-2.13043	0.987234	-0.14565
N	-4.56394	-0.23576	-0.01303
H	-1.35229	-2.3006	0.226479
H	-2.99451	1.6477	-0.19181
C	-5.83989	-0.75054	0.082418
C	-6.8745	0.199801	-0.08578
C	-6.20356	-2.11786	0.332042
C	-8.20459	-0.13078	-0.02241
C	-7.57205	-2.44517	0.397702
C	-8.5699	-1.48429	0.223555
H	-8.97864	0.6259	-0.15848
H	-7.85383	-3.48339	0.589574
H	1.281773	1.075777	-0.20475
H	0.953677	-1.35494	0.081203
C	-0.73164	3.011877	-0.41884
O	-1.66142	3.759992	-0.13623
N	0.458024	3.478313	-0.87574
H	0.514197	4.466481	-1.09066
H	1.112397	2.870248	-1.34905
H	-6.56702	1.230893	-0.27082
N	-9.89575	-1.83842	0.234923
H	-10.134	-2.71629	0.680321
H	-10.5637	-1.09981	0.418498
N	-5.2602	-3.06846	0.503916
H	-4.28702	-2.78199	0.448473
H	-5.52763	-4.02604	0.679273

Table S5. Cartesian coordinates (in Å) of the lowest energy (most stable) structure of Azo-Rho1 in the NR state. The potential energy of the NR state (charge = +1, spin multiplicity = 1 [singlet]) is -44175.9193366963 hartree, and that of the OER state (charge = 0, spin multiplicity = 2 [doublet]) is -44179.6221391412 hartree. Computational level was ω B97XD/cc-pVDZ | IEFPCM (solvent = water).

Atom	x	y	z
O	-0.33056500	1.28443600	-0.06788900
O	-2.51066000	-4.04318900	2.69122300
O	-1.65312200	-2.04574700	2.15681100
N	-4.50872400	3.48131600	0.03240200
N	4.08483200	-0.63948200	-0.15197500
C	-1.53370600	-1.22463600	-0.37428200
C	-2.30598000	-0.08067600	-0.29694100
C	-0.10706200	-1.10178200	-0.32559700
C	-1.67105000	1.19238900	-0.12715700
C	0.45075900	0.18190900	-0.16854400
C	-3.79360200	2.35436700	-0.07614200
C	2.66636200	-0.71350800	-0.20433800
C	-2.15662200	-2.55574400	-0.62321000
C	-2.37497400	2.36757000	-0.02163000
C	1.82365800	0.38892400	-0.10725700
C	-3.73970700	-0.07476600	-0.34793500
C	0.77410000	-2.20094000	-0.42359500
C	-4.45125300	1.07457700	-0.24636400
C	2.13651800	-2.00970000	-0.36174800
C	-3.87402000	4.77727600	0.29011800
C	-5.96995600	3.50877900	-0.09714200
N	4.52718700	0.52680500	-0.05470700
C	-2.45567900	-3.46392900	0.40679000
C	-2.43688400	-2.89917300	-1.94744300
C	-3.43233400	5.47859800	-0.98906500
C	-6.68117300	3.25888100	1.22693400
C	-3.03177900	-4.69888000	0.09291600
C	-3.00851100	-4.13397000	-2.24887400
C	-3.30639400	-5.03501500	-1.22894500
C	-2.15998100	-3.09466900	1.82018700
H	-1.80649500	3.28703700	0.08567400
H	2.22662200	1.39251800	0.01469600
H	-4.26207100	-1.02425500	-0.46380400
H	0.36347000	-3.20271500	-0.54832300
H	-5.53622400	1.01949100	-0.27505500
H	2.82831000	-2.84860600	-0.43370200
H	-4.61033000	5.38976900	0.82778300
H	-3.03282800	4.63684400	0.98160600
H	-6.23082200	4.50058800	-0.49045300
H	-6.28443500	2.79022800	-0.86438600
H	-2.20358700	-2.19366400	-2.74611700
H	-2.68232100	4.88503200	-1.53209400
H	-4.28851600	5.64714100	-1.65881900
H	-2.98974900	6.45435100	-0.74356100

Table S5 continued			
H	-6.45092500	2.25830300	1.62185300
H	-6.38089800	4.00241700	1.97998000
H	-7.76862500	3.33298900	1.08443100
H	-3.26404500	-5.39567600	0.89702500
H	-3.22160000	-4.38878900	-3.28774000
H	-3.75491900	-6.00110700	-1.46219400
H	-2.28179500	-3.72010000	3.57784100
C	5.92812600	0.63824000	0.00494300
C	6.81988300	-0.44907000	-0.03199900
C	6.43186100	1.93956200	0.10828500
C	8.18257300	-0.23024800	0.03353000
C	7.80008000	2.16759500	0.17444300
C	8.68223600	1.08061200	0.13736200
H	6.42211500	-1.46040800	-0.11253100
H	5.72788600	2.77268000	0.13583000
H	8.88912500	-1.06060100	0.00648300
H	8.18704000	3.18541800	0.25491800
O	10.01979600	1.22267700	0.19742900
H	10.24602300	2.15979100	0.26622000

Table S6 Cartesian coordinates (in Å) of the lowest energy (most stable) structure of Azo-Rho2 in the NR state. The potential energy of the NR state (charge = +1, spin multiplicity = 1 [singlet]) is -46222.621147698 hartree, and that of the OER state (charge = 0, spin multiplicity = 2 [doublet]) is -46226.296237795 hartree. Computational level was ω B97XD/cc-pVDZ | IEFPCM (solvent = water).

Atom	x	y	z
O	0.96292700	-1.61943000	-0.02415200
O	2.01216300	4.06982100	2.69297700
O	1.56099700	1.93821400	2.17958700
N	5.53292700	-2.81092700	-0.00546600
N	-3.68969300	-0.96290900	0.02406300
C	1.55700900	1.09584400	-0.34802700
C	2.57213100	0.15742900	-0.28465500
C	0.19929600	0.65172200	-0.27006400
C	2.24719300	-1.22544800	-0.10665900
C	-0.04646300	-0.72230200	-0.10435600
C	4.57801600	-1.87567700	-0.09672600
C	-2.41604900	-0.35399800	-0.08705000
C	1.85683000	2.53181200	-0.61322300
C	3.20104600	-2.21071300	-0.01745700
C	-1.34031600	-1.22948000	-0.01189600
C	3.96774400	0.47746600	-0.36082300
C	-0.91645200	1.52074000	-0.34213700
C	4.92392900	-0.48026900	-0.27354300
C	-2.19817000	1.03440400	-0.25215400
C	5.21406000	-4.21761100	0.25446200
C	6.95946400	-2.50399500	-0.15684200
N	-4.65296700	-0.17061300	-0.11789800
C	1.98643300	3.48760300	0.40871000
C	2.00531000	2.92289000	-1.94559600
C	4.91939000	-4.99753900	-1.02152000
C	7.61336000	-2.09375200	1.15683900
C	2.26473200	4.81778300	0.07876000
C	2.27913500	4.25198300	-2.26298600
C	2.40911400	5.20064600	-1.25098600
C	1.82880400	3.06812800	1.83021900
H	2.85723900	-3.23488200	0.09661900
H	-1.50579200	-2.29813700	0.11851200
H	4.25889300	1.52057100	-0.48351500
H	-0.74538300	2.58989200	-0.46861400
H	5.96740700	-0.17995300	-0.32056800
H	-3.05144500	1.70708200	-0.30314200
H	6.08030500	-4.64837200	0.77444100
H	4.37632700	-4.27429400	0.96193100
H	7.43484000	-3.41102500	-0.55428800
H	7.09021200	-1.73460700	-0.92816900
H	1.90467800	2.17970900	-2.73786300
H	4.04311200	-4.58992000	-1.54661800
H	5.77829800	-4.96313700	-1.70793500
H	4.71675300	-6.04956500	-0.77558900

Table S6 continued			
H	7.16385100	-1.17237500	1.55584900
H	7.50346000	-2.88476100	1.91341500
H	8.68639500	-1.91505500	0.99866700
H	2.36761700	5.55228300	0.87621200
H	2.39213200	4.54326000	-3.30794500
H	2.62470400	6.24087900	-1.49664200
H	1.88946200	3.70826300	3.58579000
C	-5.92669200	-0.71223900	-0.00704500
C	-6.97748200	0.21837200	-0.18473600
C	-6.23516300	-2.06090000	0.26146500
C	-8.30620200	-0.19773400	-0.09317000
C	-7.54368200	-2.47653600	0.35299100
C	-8.58481300	-1.53704800	0.17515700
H	-5.41276300	-2.76340600	0.39556000
H	-9.10581700	0.53148400	-0.23247800
H	-7.80073500	-3.51489400	0.56102900
O	-9.84010000	-2.00546000	0.27901100
H	-10.47220900	-1.28632500	0.14532200
O	-6.71779300	1.50640500	-0.44243500
H	-5.74803300	1.59254200	-0.46649600

Table S7 Cartesian coordinates (in Å) of the lowest energy (most stable) structure of Azo-Rho3 in the NR state. The potential energy of the NR state (charge = +1, spin multiplicity = 1 [singlet]) is −49306.3085245246 hartree, and that of the OER state (charge = 0, spin multiplicity = 2 [doublet]) is −49310.0753422999 hartree. Computational level was ωB97XD/cc-pVDZ | IEFPCM (solvent = water).

Atom	x	y	z
O	1.367682000	-1.674115000	-0.074695000
O	1.792818000	4.172191000	2.453511000
O	1.597056000	1.987550000	2.006743000
N	5.968493000	-2.677746000	0.251838000
N	-3.300184000	-1.193793000	-0.386726000
C	1.879867000	1.051118000	-0.467732000
C	2.920704000	0.158585000	-0.303383000
C	0.533771000	0.552244000	-0.461414000
C	2.638402000	-1.231708000	-0.093614000
C	0.332889000	-0.822927000	-0.258820000
C	4.987418000	-1.785206000	0.077590000
C	-2.039100000	-0.548679000	-0.411193000
C	2.138208000	2.488122000	-0.766242000
C	3.620816000	-2.172562000	0.090225000
C	-0.942753000	-1.382994000	-0.245275000
C	4.306779000	0.532679000	-0.301347000
C	-0.602323000	1.369605000	-0.660364000
C	5.290626000	-0.381965000	-0.123857000
C	-1.869784000	0.835321000	-0.635320000
C	5.689248000	-4.087363000	0.543473000
C	7.389561000	-2.322572000	0.161077000
N	-4.255805000	-0.445893000	-0.097469000
C	2.092990000	3.492175000	0.216281000
C	2.419630000	2.831624000	-2.090239000
C	5.491052000	-4.919131000	-0.718204000
C	7.963872000	-1.858440000	1.493655000
C	2.330655000	4.822068000	-0.144081000
C	2.652101000	4.161022000	-2.438481000
C	2.607215000	5.157355000	-1.465889000
C	1.803559000	3.121877000	1.630638000
H	3.311025000	-3.205520000	0.221104000
H	-1.073904000	-2.453932000	-0.096722000
H	4.564283000	1.582591000	-0.439209000
H	-0.463365000	2.434958000	-0.843284000
H	6.322793000	-0.041776000	-0.114689000
H	-2.737124000	1.468755000	-0.813440000
H	6.543293000	-4.465774000	1.121010000
H	4.818847000	-4.153344000	1.209173000
H	7.914262000	-3.221353000	-0.190053000
H	7.529278000	-1.567721000	-0.622677000
H	2.453968000	2.051518000	-2.852004000
H	4.628972000	-4.563467000	-1.301291000
H	6.382975000	-4.875056000	-1.360460000
H	5.314606000	-5.969212000	-0.445522000

Table S7 continued			
H	7.463877000	-0.944897000	1.847810000
H	7.845824000	-2.634985000	2.263785000
H	9.036327000	-1.645170000	1.381416000
H	2.298683000	5.593885000	0.623585000
H	2.870095000	4.414757000	-3.476577000
H	2.790104000	6.197860000	-1.735697000
H	1.597091000	3.839269000	3.344475000
C	-5.540828000	-1.024835000	-0.099328000
C	-6.628560000	-0.201467000	0.271814000
C	-5.770715000	-2.359273000	-0.461304000
C	-7.911502000	-0.734914000	0.267961000
C	-7.050803000	-2.882017000	-0.459004000
C	-8.133912000	-2.067472000	-0.093694000
H	-4.921054000	-2.978008000	-0.746921000
H	-8.752817000	-0.104179000	0.551346000
H	-7.218294000	-3.923097000	-0.742063000
O	-9.403257000	-2.506225000	-0.072226000
H	-9.438147000	-3.434030000	-0.341374000
C	-6.523344000	1.253576000	0.687167000
O	-7.511506000	1.903718000	0.947044000
O	-5.315363000	1.796607000	0.769082000
H	-4.643001000	1.119079000	0.502536000

謝辞

本研究を遂行するにあたり、大学三年次より 6 年半という長い間、手厚いご指導ならびにご鞭撻を賜りました、北海道大学薬学研究院生体分析化学研究室 小川美香子教授に、心より深く御礼申し上げます。小川先生には、博士課程進学に対し迷っていた私の背中を強く押して頂きました。博士課程において経験した学会発表や論文執筆をはじめとする研究活動を通じて得られた知識や経験は、当初の想定をはるかに超えるものであり、背中を押され進学を決意して本当に良かったと心から感じております。また、研究テーマも非常に斬新かつ挑戦的であり、取り組む上でもとてもやり甲斐のある充実したテーマであったと思います。

また、博士課程において手厚いご指導や実験方法の相談など研究全般を支えて下さりました家田直弥准教授に心より深く感謝申し上げます。家田先生には論文の作法はもちろん、科学的な洞察力など言語化が難しい資質に通ずるものなど多くのものを学び、自分の知識レベルの向上に一層磨きがかかったと考えています。さらに、博士課程において遭遇した説明の難しい事象に対して、非常に鋭い示唆を賜り、実験結果の解釈および考察をより一段深く行う姿勢を涵養させて頂きました。

また、学士課程から修士課程まで、手厚いご指導ならびにディスカッション等を通じて研究活動を支えていただきました関西医科大学附属光免疫医学研究所統括部門 高倉栄男准教授に、心より感謝申し上げます。高倉先生には、研究室に入りたて研究経験の乏しかった私に対し、初歩的な実験技術をご指導頂くとともに、研究を進める上での道筋を示して頂きました。この場を借りて深く感謝申し上げます。

さらに、日頃の研究活動において、セミナー等の機会を通じて常に的確かつ建設的なご助言を賜り、研究の遂行を多方面から支えてくださいました中島孝平博士、向峯あかり特任助教、原田芽生助教、土屋光輝博士、後藤悠人助教、関西医科大学附属光免疫医学研究所基盤開発部門 鈴木基史講師に心より感謝申し上げます。

また、自身の不甲斐なさにより諸々の事務手続き等において多大なるご配慮をお掛けしたにも関わらず、極めて迅速かつ丁寧で機転のある対応により手厚いご支援を賜りました秘書の渡邊佳代様ならびに北海道大学の教務・会計・庶務担当の皆様、この場を借りて深く感謝申し上げます。

そして、本研究の遂行にあたり、細胞実験に関する実験手法・実験計画ならびに放射線生物学に必要な基礎知識等について実践を踏まえてご指導頂きました北海道大学獣医学研究院放射線学教室 安井博宣教授、房知輝講師、稲波修名誉教授に深く感謝申し上げます。さらに、論文執筆に際し、量子化学の立場から反応メカニズムについて強力な理論的裏付けを頂きました北海道大学総合科学院反応解析学講座 武次徹也教授、小林正人准教授、横浜市立大学生命ナノシステム科学研究科 斉田謙一郎特任准教授、Dr. Hari Singh Gour University 物理学科 Sonu Kumar 助教に深く感謝申し上げます。

さらに本論文の執筆にあたり、博士論文の審査を通じて、論文の完成度を一層高め、今後の研究を進める上での多くの有益なご指摘を賜りました北海道大学薬学研究院有機合成医薬部門 市川聡教授および勝山彬講師に心より感謝申し上げます。

修士課程まで互いに協力し合い、精神的に支えていただいた吉岡彪雅学士、大村和也学士、また博士課程において折に触れて気に掛けていただいた横内勇太修士、山下柁修士、榎本将聖修士、森田洋哉修士、佐々木駿学士、北川朋彦修士、吉野元貴修士、竹中翔修士に感謝申し上げます。

博士課程での研究を遂行するにあたり、実験等で協力しあうことで切磋琢磨致しました橋本和明学士、山田夏音学士に感謝申し上げます。そして、日頃の生活を送るにあたり、快適な研究環境を提供し、支えていただきました北海道大学生体分析化学研究室の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、博士課程に至るまで支えて頂きました家族親戚一同に感謝申し上げます。また、帰省のたびに自分の面倒を見て頂きました愛猫のぱすとめるに深く感謝申し上げます。

2026 年 3 月

小河原浩輝