稚拙なセミナーにもかかわらず、理解して多くの質問を寄せていただきありがとうございます。
感想と質問内容をもとに、より皆さんが理解しやすいセミナーをできるように努力します。
お忙しい中お聞きいただきありがとうございました。

それでは、最初に全体的な質問への解答、そのあと各スライドでの質問への解答をいたします。

全体的な質問に関して

Q. 結局これらの研究の最終目標はどこで、これまでわかったことはなんだろう？
A. 最終目標は各反応で少しずつ違うと思いますが、目指しているものとしては以下のものがあげられます。
- ・イメージング
- ・ケミカルバイオロジー
- ・タンパク間相互作用の調査
- ・医薬品

各反応ごとに毒性や特性を考えて、それらのアウトプット先を見据えて研究が行われていると思います。
今回は早足での説明になってしまい、紹介した論文がそれぞれどこを目指しているか説明せずすみません。
どれに応用できそうか考えるのは簡単だと思うので、考えてみてはどうでしょうか。
それがこの論文が最終的に目指しているものです。

Q. 遺伝学的に、反応性のある官能基をいれたタンパク質を作って反応させてもあまり意味がないのでは?
A. 遺伝学的に発現させているのは、タンパクの表面の狙った場所に確実に官能基を導入する方法が
まだ確立されていないので、確実にそれができる方法として採択したのではないでしょうか。
実際今回紹介した論文中で (選択性は甘いものの) タンパクの表面をラベル化する研究も行っているように、
今後これら両方を組み合わせてnativeのタンパク質に対して修飾したり機能を調節する分野が
伸びてくるのではないかと思います。

Q. 金属触媒を用いて生体内にない官能基を導入するのは可能?
A. チロシンのラベル化、リシンのreductive alkylationはそれができる例だと思います。選択性は低いですが。
システインを足がかりに置換基をつけるのも可能で、
金属を使っていないので今回のメインではないですが、メタセシスの項で取り上げました。
全て精製したタンパクを用いていて、まだ細胞で行えるほど選択制が出せないのだと思います。

Q. 今回扱った中で、『一番体の中に近い』、言い換えると生体への応用が期待できるのはどれ?
A. フェロセンとタモキシフェンをくっつけたもの、RuでGSHを酸化するもの、
ガン細胞を殺す応用を目指しているものはかなり有望だと思います。
(毒性を出すように設計すればいいので、毒性を無くすようにするより楽なのではないか?)

それ以外のものに関して、Ruを使ったAlloc脱保護がかなりいい条件でできていると思います。
(論文で試している濃度では) 細胞毒性もなく、発展が期待できるのではないでしょうか。

Pd系のものはそれぞれまだいろいろと問題点があるように見えます。
その中ではPd-microsphereが一番期待できると思います。
まだ培養細胞レベルでの結果なので、これを*in vivo*で組織選択的に導入できたらかなり有望だと思います。

今回の分野に関して、どれも個体に関して行った実験はありませんでした。
そこまでの応用が見込めないからという単純な理由ではなく、
その原因に、合成化学者が個体を使った研究をやろうにも設備的にできないことが多い、経験もない、
費用的にも培養細胞よりはるかにかかる、など、結構複雑な事情がありそうです。

Q. 著者らがそれぞれその触媒をbiological conditionに適応できると考えた理由は?
A. 2つ後のスライドでも書きましたが、まず水や酸素共存下で反応がいくか、
条件を穏和にできるか、官能基許容性を担保できるか、
既存の反応のうちこれらを文献調査して、望みの高いものに関してモデル実験を行って
少しずつ改善していったのではないでしょうか。
おそらく今回取り上げた裏には、試してみたけど適応できなかった反応が多くありそうです。

Q. 水溶性の悪い錯体が多い印象だけど、どのぐらい溶けているのだろう?
A. 化合物によってまちまちなのですが、溶けにくいものはDMSO溶液を水で薄めて溶かしているものが多いようです。
反応中に析出したりしているかもしれませんが、わかりません。

Q. プロドラッグの活性化につかうためには錯体を望みの組織に局在させる必要があると思うけど、
これに向けた解決策は?

A. ^{18}Fの項で取り上げた腫瘍ターゲットペプチド (VTANST) やホルモンのような、
組織やレセプターを発現している細胞に局在する特性を持つ部分構造を触媒に持たせて、
それをもとに局在化させるアプローチがあると思います。
個体レベルで行った例がなかったため、局在化を検証している例はありませんでした。

Q. タンパク側の変換部位としてCys、Tyr,、Trp、*p*-I-Phe、Lys他
選択肢がいろいろ広がってきているが、これを増やすことの意義は?

A. 使える選択肢が多いにこしたことはないと思います。
触媒が近づける位置にCysやTyrがないたんぱく質があったり、
逆に修飾に使う残基が多すぎて選択性が出なかったり、
少ないと現状のアプローチでは修飾できない可能性がありますが、
多くなるとその可能性は低くなり、その都度最適なものを選べるようになるのではないでしょうか。

Q. 標的にしているたんぱく質はどのようにして決めている？

A. まず分子量の小さいもの、次にCysがないものが多く選ばれていると思います。
Cysがあるとまずい反応が多いようで、これを克服できるかが大きな課題の1つだと思いました。
まだ、何か意味があって修飾したわけではなく、狙いやすかったという理由が強いように感じます。

Q. 金属で生体修飾をするためにはfunctional group toleranceが最重要だと個人的に思うのだが、
どういう特性を持つ触媒 (金属) がそれを克服し、水中で使える？
soft-metal, 1e$^-$ redoxという特性は一つだと思いますが、他にも意見があれば教えてください。

A. おっしゃる通りです。そして調べた中で実用化に近いと感じるものはsoft-metal, 1e$^-$ redoxばかりでした。
Pdはいろいろと欠点が目立つのですが、他の金属と違う点は活性本体が0価であるということ?
酸化度が2,3ぐらいの金属の方が官能基許容性やその他で良い特性を示していそうなのは気のせいなのか?
Pdがうまくいかないのはこの分野ができたばかりで歴史が一番浅いという理由も大きいと思いますが、
もしかしたらある程度の酸化度の金属が良い傾向を示す可能性があるかもしれません。

Q. このchemistryの進歩状況として、官能基許容性、基質選択制、反応条件など改善の余地はまだあるか?
A. 後半の方でよく出てきたDavisさんが最近この分野でいろいろ試して論文を出しまくってます。
Q&Aにも書いてますが、まだ改善点は多く残されていて、
特に基質選択性が甘く、同じ官能基があるなかで目的のもののみ区別して変換することは
誰もできていないように思えます。(reductive alkylationとかが良い例です)

Q. 反応を行った後、細胞内でできた色素や修飾したタンパクは除去できる？
A. わかりません。
除去して一過性に作用させたいなら既存の化合物等でも可能だと思うので、
今回取り上げた『触媒を用いて何かを細胞内でつくる』ことに関しては、
それができたとしてもメリットをあまり感じません。
むしろ、除去できなくて、プロドラッグを局所的・選択的に活性化する、
細胞外にそれが出てこないので標的細胞への作用が最小に抑えられることに着目して
できた化合物や修飾タンパクが細胞外に出ない方が良い応用に結びつけられると思います。

Q. 遺伝子組み換えによる官能基導入は一般的?
A. 調べた中ではreviewもいくつかあり、一般的に行われていることだと思います。
より詳しくはこちらを参照してください。現在導入できる非天然アミノ酸の一覧がまとめられています。
Synthesis at the Interface of Chemistry and Biology
P. G. Schultz *et al. J. Am. Chem. Soc*. **2009**, *131*, 12497-12515

Q. タンパクの立体構造に金属は影響与えている?
A. おそらく影響しています。
PdとCuの比較で取り上げた際にCuの方がタンパクの変性が早いのはCuがキレートすることで構造が変わっている
ことが原因ではないかと考えています。
あまり金属をいれすぎると、どの金属でも毒性が出るのはタンパクにくっついちゃうからで、
そのキレート能の差なのかな?と個人的に考えていますが、金属毒性が出る理由は不明です。

Q. 副反応で生じる化合物の毒性などは調べていない?
A. それに関して調べている例はありませんでした。

Q. 生体に対して毒性のない金属はある?
A. おそらく全ての金属は程度の差はありますが毒性があります。
同じ金属でも酸化度、配位子の状態、で毒性が大きく変わるようで、
生体触媒に応用できる可能性が高いものがどれかはわからないと思います。

Q. Bioorthogonalな置換基を導入したタンパクを発現させた細胞内で反応させるというのは、
イメージングやシグナル経路の解明等が応用としての限界ではないか?
A. その通りだと思います。これが医薬に結びつく可能性は低いと思います。
余談ですが、カップリング反応自体は、低分子に用いることで細胞内でプロドラッグを活性化したり
いままで細胞に導入できなかった大きな分子を二つ以上に分けて導入し、
医薬分子を細胞内で構築するという新しい手法もとれるので、
これが発展することは医薬に結びつくのではないでしょうか。

Q. PETのために鈴木カップリングでプローブを合成する意義は? もっと簡単な方法ないの？
A. 現在PETで腫瘍を判定するのには^{18}F-DG (グルコースの2位の-OHが^{18}Fに変わった化合物) が広く用いられていて、
それに置き換わる方法となり得るかはわかりません。
ただJACSになるということはそれがとても実用的だからということなんでしょうか?よくわかりません。

Q. まとめると各グループの戦略が見えないんですが。
A. 私も戦略的にやっている印象がなく、とりあえずためしまくってうまくいったのをまた調整して、
その繰り返しのような感じがします。理論的ではないです。
おそらく今回ご紹介した分野に関してまだ一般的な方法とかは存在していないのが現状です。
あったらもっと発展してるはず。

官能基許容性に関してあまり調整している例を見つけれなかったのが申し訳ないです。
メタセシスなんかは元々有機溶媒中でリガンド変えまくって、官能基許容性高く反応性も担保した
今のHoveyda-grubbs 2ndができてきたので水中でそれをやる例があってもいい気はするのですが、
この分野ではLigandの検討をしている例は紹介した程度のものしかなく、
官能基許容性は適応させようとしたもともとの反応に大きく依存しているようです。

Metal complex catalysis in Biological conditions

Q&A

Literature Seminar
2013.12.2 (Mon.)
Takushi Araya

Q. 人によってbiological conditionが違うのはなぜ?
A. 使おうとしてる錯体が溶けなかったり、官能基許容性が低かったり、
各段階で克服する (その論文中で注目してほしい) 課題にあわせて
適切な条件を設定しているのじゃないかと思います。
最初から細胞中で反応をさせる人はいないはずで、
以下のように細胞・生体条件に段階的に近づけているので人によって条件が違います。
c.f) 有機溶媒→徐々に水の割合を増やす→pH 7.4
目的とする官能基のみ→他の官能基共存下
タンパクのみ→細胞表面→細胞中

Contents

1. Introduction

2. Redox catalyst

3. Pd catalyst

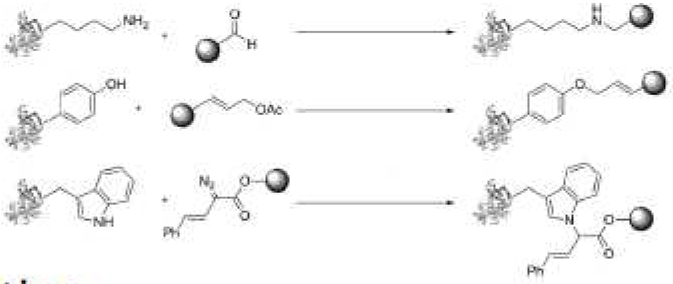
4. Others

5. Summary

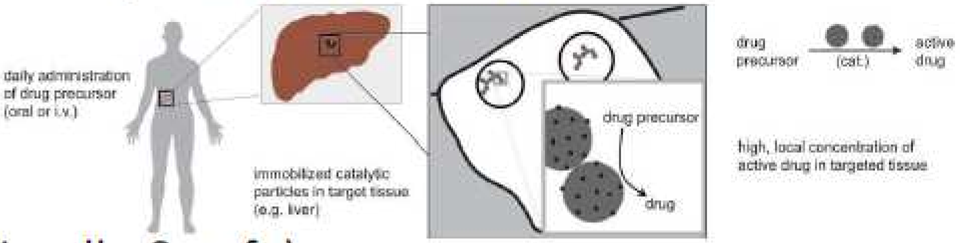
Biological condition
・buffer (pH7.4)
・protein (many functional groups)
・cell (surface or inside)

Good points

・Modification in Living cell



・Site specific prodrug activation



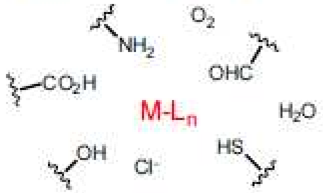
(・Eco-friendly & safe)

Low H_2O & O_2 tolerence
Temperature, *hv* sensitive

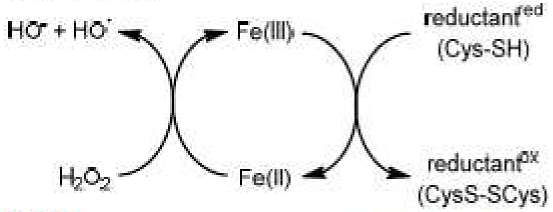
Just mixing

Problematic points

・Low functional group tolerance



・Toxicity *e.g.*) Fenton reaction



J. A. Imalay *et al.*, *J. Bacteriol.* **2003**, 185, 1942-1950

・Low water solubility

Pd(PPh3)4, Hoveyda-Grubbs 2nd cat. etc...

Ligand must be

・protect active site

Q. 毒性をクリアするために、一般的にどうしたらよい？
A. まだ一般的な方法が確立されるまでこの分野が成熟していないので、個人的な見解を述べさせてもらいます。
Pd microsphereのような不均一系にして絶対溶け出さないようにするアプローチが一番確実ではないでしょうか。
均一系の触媒でやろうとすると、望ましくない反応も起こしてしまい、完全に毒性を抑えるのは難しいと思います。
これを多少軽減するために、リガンドをつけて金属の活性部位の露出を減らし、
望まない反応を起こすのを防ぐことはできますが、その分反応性が低くなってしまうので
両方のバランスを取るのは簡単ではないと思います。

Contents

1. Introduction

2. Redox catalyst ・・・
   - R-SH oxication
   - Reduction by HCO_2^-
   - Reduction by NADH

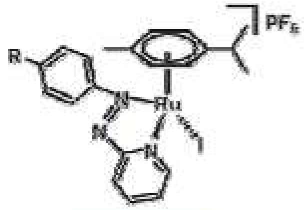
3. Pd catalyst

4. Others

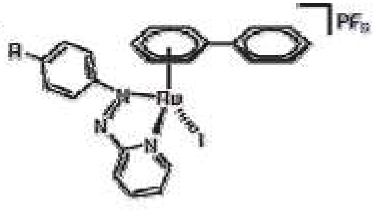
5. Summary

2-1. R-SH oxidation (1)-1

Cytotoxic [Ru] complex oxidize GSH to GSSG



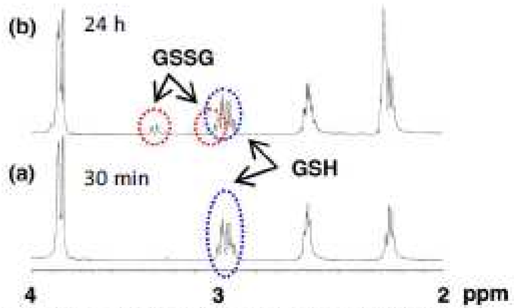
1: R = NMe_2
2: R = OH
3: R = H



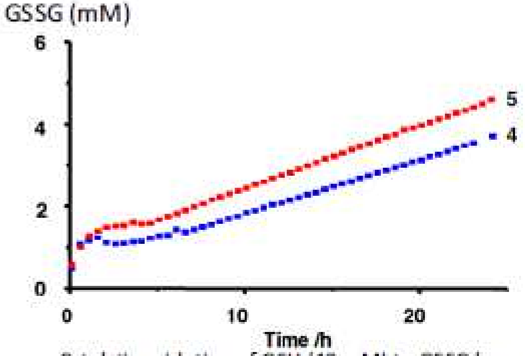
4: R = NMe_2
5: R = OH
6: R = H

Complex*	IC_{50}, μM A2780	IC_{50}, μM A549	E_{red}, V
1 (1-Cl)	4 (>100)	3 (>100)	−0.40, −1.00
4 (4-Cl)	3 (44)	2 (49)	−0.36
Azpy-NMe_2	>100	14	−1.28
2 (2-Cl)	4 (58)	4 (>100)	−0.33, −0.77
5 (5-Cl)	5 (18)	6 (56)	−0.26, −0.72
Azpy-OH	>100	>100	nd[†]
3 (3-Cl)	>100 (>100)	>100 (>100)	−0.22, −0.74
6 (6-Cl)	39 (>100)	51 (>100)	−0.18, −0.67
Azpy	>100	>100	−1.31 (vs SCE)[‡]

(A2780 ovarian and A549 lung cancer cell lines)



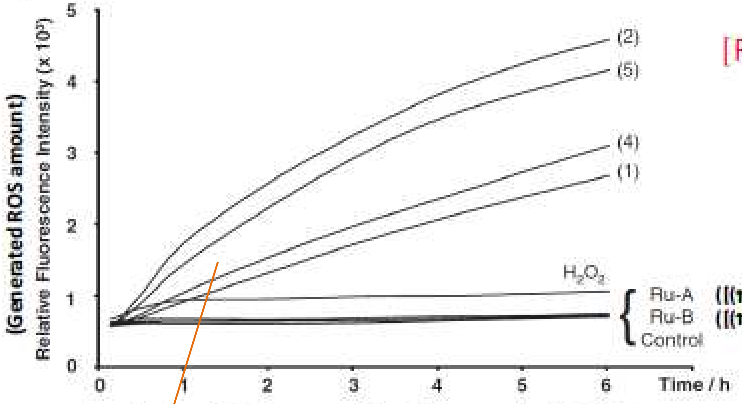
^1H NMR spectra of GSH after incubation (37°C) with **4** for (*a*) 30 min and (*b*) 24 h



Catalytic oxidation of GSH (10 mM) to GSSG by **4** (100 μM; blue) or **5** (100 μM; red) for 24 h, 37°C

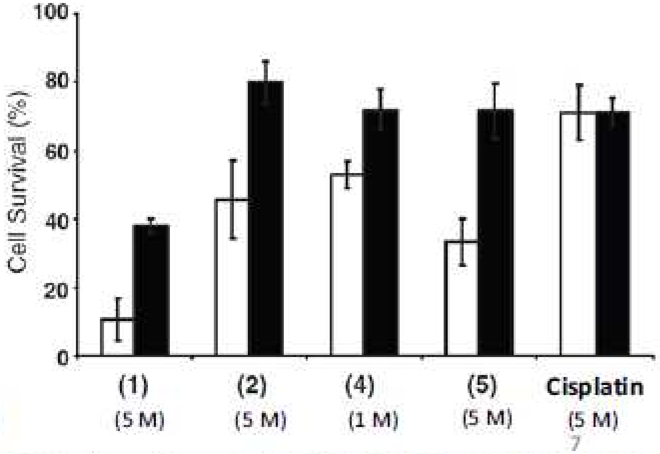
P. J. Sadler *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 11628-11633

2-1. R-SH oxidation (1)-2



Incubation of A549 cancer cells with Ru complex (25 μM)

[Ru] increases cell ROS level



Thiol cancels [Ru] cytotoxicity

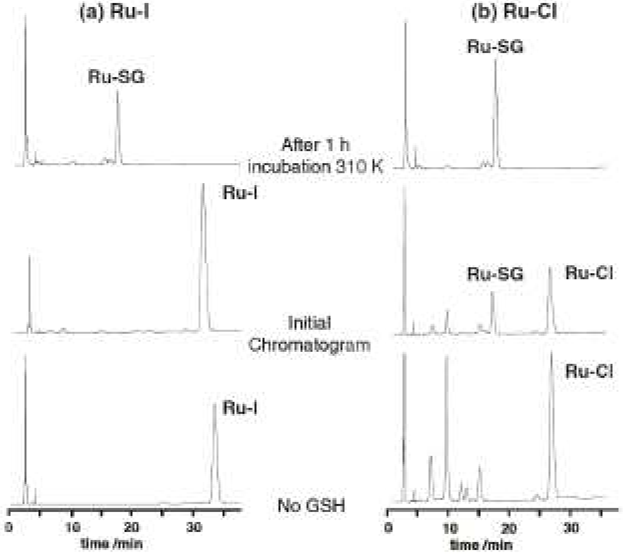
After 24 h exposure to ruthenium compounds,
Lighter : 96 h recovery for A549 lung cancer cells
Darker : same but pretreated to increase intracellular thiol level
(retreated 5 mM *N*-Ac-Cys for 2 h)

P. J. Sadler *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 11628-11633

Q. RuはH2O2を出すことで細胞毒性を示してる?
A.そのことに加え、細胞中のGSHを消費することでも細胞内の酸化度を上げています。前のスライド参照。

2-1. R-SH oxidation (1)-3

Ru-X is replaced to Ru-SG

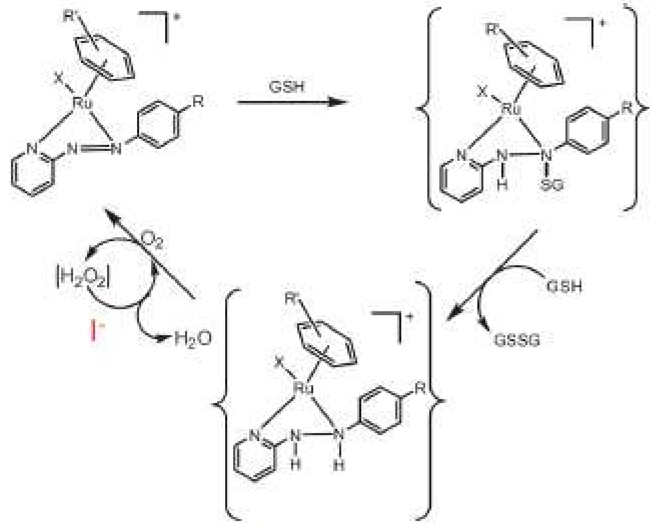


HPLC-analysis

Reaction of GSH (5 mM) with **4** (Ru-I) (*a*)
and corresponding chlorido complex (50 M) (Ru-Cl) (*b*)
(10 mM phosphate buffer (pH 7.9), 95% H_2O, 5% MeOH)

After 1 h incubation at 37°C, GS^- adduct is major peak
and peaks of starting material have disappeared.

Proposed catalytic cycle



*X is initially I^-, which is displaced GS^- during the early stage
**I^--Catalyzed Decomposition of H_2O_2
J. C. Hansen, *J. Chem. Educ.*, 1996, *73*, 728-732

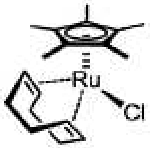
P. J. Sadler *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 11628-11633

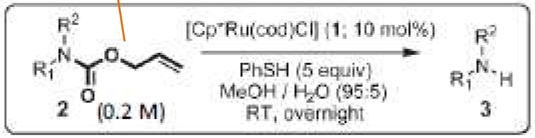
Q. 他にも生体内でAlloc脱保護する触媒はある？
A. 今回紹介したRu, Pd以外は見つけられませんでした。

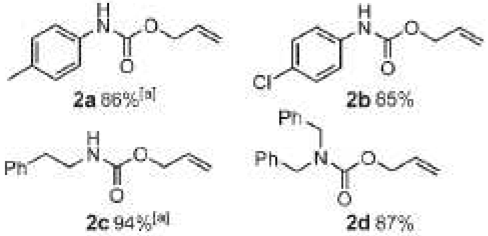
Q. Entry 5で、PhSH and PhCH2CH2SHってどういうこと？
A. それぞれの等量について記載がありません。
　たぶん還元力の強いPhSHが還元剤として優先的に使われ、
　P hCH2CH2SHは大部分が残っていると思います。

2-1. R-SH oxidation (2)-1

Allylcarbamate cleavage by Ru(cod) complex







yield determined by GC-MS

Table 1: Catalytic cleavage of allylcarbamate **2a** to *p*-methylaniline with [Cp*Ru(cod)Cl].[a]

Entry	Thiol	Solvent	Atm.	*T*	Yield
1	PhSH	$MeOH/H_2O$ (95:5)	air	RT	89 %
2	PhSH	MeOH	air	RT	93 %
3	PhSH	$MeOH/H_2O$ (95:5)	argon	RT	96 %
4	no thiols	$MeOH/H_2O$ (95:5)	air	RT	0%
5	PhSH and $PhCH_2CH_2SH$	$MeOH/H_2O$ (95:5)	air	RT	93 %
6	$PhCH_2CH_2SH$	$MeOH/H_2O$ (95:5)	air	RT	34 %
7	$PhCH_2CH_2SH$	$MeOH/H_2O$ (95:5)	air	37°C	67 %

*Presence of excess thiol, no negative influence observed
yield determined by GC-MS
Obtain as byproduct PhS-SPh

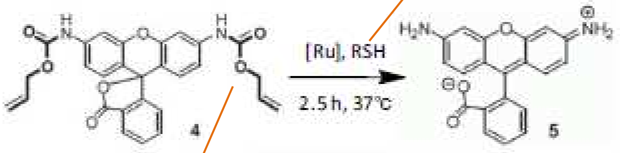
E. Meggers *et al. Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 5645-5648

Q. 他の論文ではascorbateとかを還元剤に使ってるものもあったが、それが還元しているということは？
A. それも考えられます。
今回実証したのはSHが還元剤として働きうるということだけで、それ以上はわかりません。
同じようにタンパク質の持つ-SHが酸化されている可能性もありますが、
通常GSHの濃度はタンパク質の-SHに比べて遙かに多く、
タンパクの方が立体的に混んでいて反応性が低いので起こりにくいはずです。

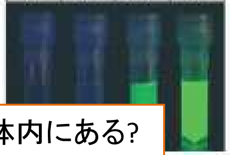
2-1. R-SH oxidation (2)-2

2. *Redox*

Reaction occurred in cell extract, HeLa cell and *E. coli*

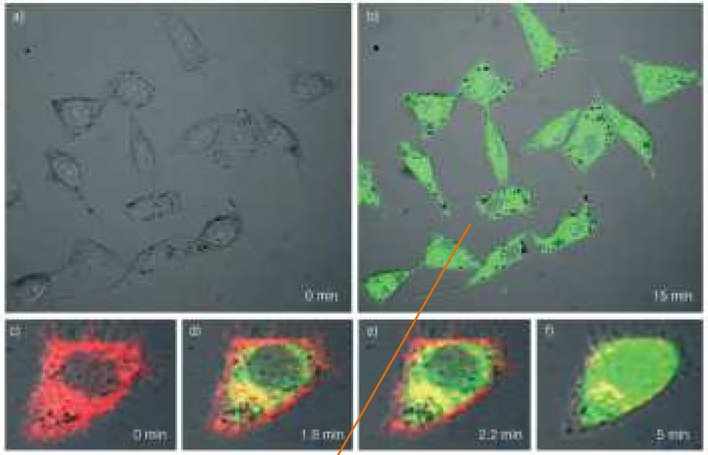


Entry	1	2	3	4
Carbamate **4**	+	+	+	+
Cell Extract + GSH	–	+	+	+
[Cp*Ru(cod)Cl]	–	–	+	+
PhSH	–	–	–	+
Yields of **5**	0%	0%	6%	80%



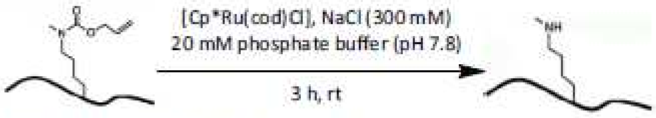
Q. Alloc (やそれに模した構造) って生体内にある?
A. おそらくありません。

Entry 2: 4 (0.5 mM) in DMSO/cell extract (1:1), and GSH (3.5 mM), pH 7.0
Entry 3: Same as entry 2, but with [Cp*Ru(cod)Cl] (100 ~~m~~µM)
Entry 4: Same as entry 2, but with [Cp*Ru(cod)Cl] (100 ~~m~~µM) and PhSH (3.5 mM)
*Yields determined by fluorescence intensity



Fluorescence imaging of HeLa cells
a) and b): preincubated with **4** (100 ~~m~~µM) for 30 min, washed with PBS buffer, then treated with [Cp*Ru(cod)Cl] (20 ~~m~~µM) and PhSH (500 ~~m~~µM)
a) right after this addition
b) after 15 min

c)–f): preincubated with **4** (100 ~~m~~µM) for 30 min and at same time with membrane carbocyanine dye DiIC18(5). After washing with PBS buffer, cells were treated with [Cp*Ru(cod)Cl] (40 ~~m~~µM) and PhSH (100 ~~m~~µM)
c) right after this addition
d)–f) after the indicated times.



Histone H2B-Lys27(*N*-alloc)Lys in *E. coli*
P. G. Schultz *et al*, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 5506-5508

No cytotoxicity observed (no figure)

E. Meggers *et al. Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 5645-5648

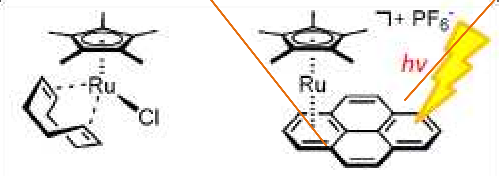
Q. 細胞は生きてる?
A. この実験で使った濃度では、細胞内に触媒をいれても細胞毒性は出なかったようです。

Q. Pyreneは発癌性だが細胞に影響ないの?
他の光増感剤が配位したRu錯体はある？
A. 細胞毒性に関しては記述がありません。
おそらく長期毒性を見ると発がん作用が見えてくる、
この部分の発がん性を無くすリガンドの選択が必要

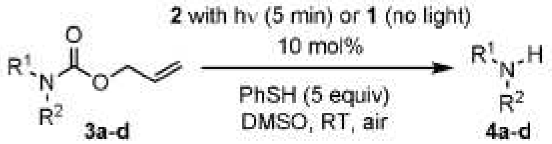
Q. 他の光増感剤が配位したRu錯体はある？
A. Photo cross linkingで使っていたRu(bipy)3があると思います。
他にはbiological conditionで反応してる例がありませんでした。

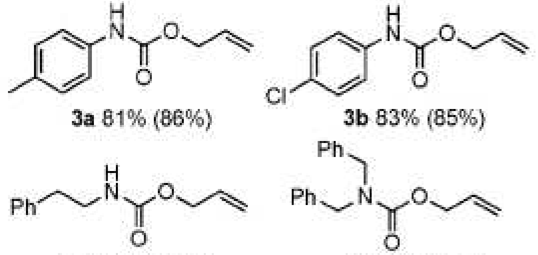
2-1. R-SH oxidation (3)-1

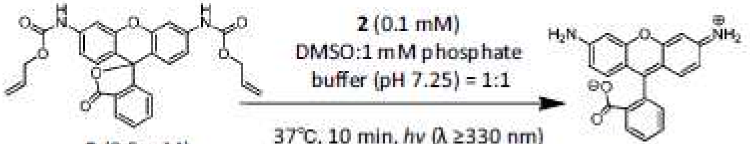
Photoactivatable catalyst



thermal catalyst (**1**) *previous work*
photoactivated catalyst (**2**) *this study*

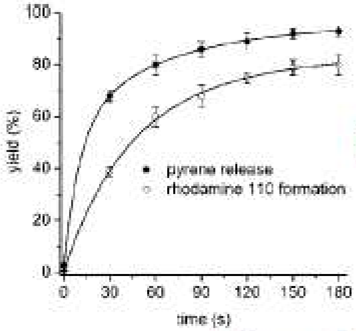






entry	amt of cat. (mol %)	thiol	yield (%)[b]
1	none	ME	0.5 ± 0.1
2	20	none	1.2 ± 0.3
3	20	ME	13 ± 2
4	20	Cys	14 ± 2
5	20	PhSH	93 ± 4
6	20	ME + PhSH	90 ± 3

β-mercaptoethanol (ME), PhSH, and cysteine (Cys) were all 5 mM
Yields determined by fluorescence intensity
(rhodamine 110: λex 488 nm, λem 520 nm)



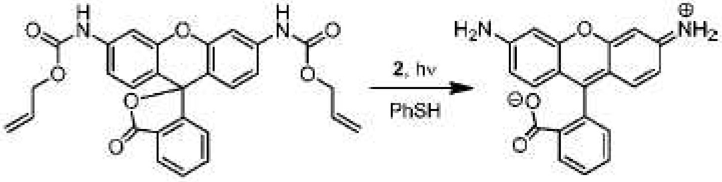
Reaction dynamics

2 (0.1 mM), **5** (0.5 mM), β-ME (5 mM), PhSH (5 mM), DMSO/H_2O (1/1), hv (λ ≥330 nm)
Yields determined by fluorescence intensity
(pyrene, λex 319 nm, λem 390 nm;
rhodamine 110, λex 488 nm, λem 520 nm)

E. Meggers *et al. Organometallics*, **2012**, *31*, 5968–5970

2-1. R-SH oxidation (3)-2

Inside HeLa cells



5 *(non-fluorescent)* **6** *(fluorescent)*

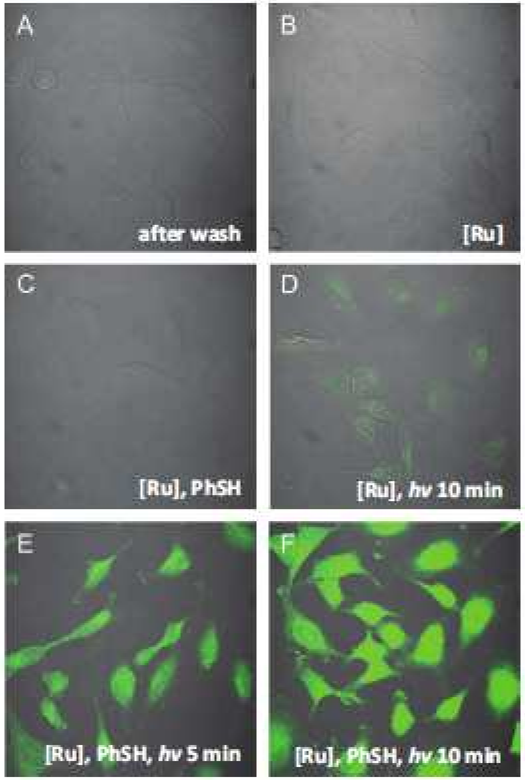
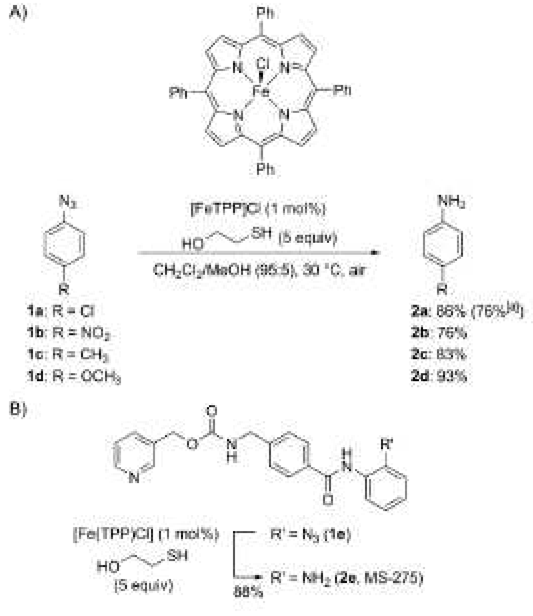


Figure 2. Confocal fluorescence imaging of [Cp*Ru(pyrene)]PF_6-induced uncaging of the bisallylcarbamate-protected rhodamine 110 (**5**) inside HeLa cells. HeLa cells were incubated with caged rhodamine **5** (100 μM) for 25 min and then washed with PBS buffer. (A) after the washing step; (B) after the addition of ruthenium complex **2** (20 μM) and a 10 min incubation time; (C) after the addition of ruthenium complex **2** (20 μM) and thiophenol (1 mM) and a 10 min incubation time without photolysis; (D) ruthenium complex **2** (20 μM) added and photolyzed for 10 min with $\lambda \geq 330$ nm; (E) ruthenium complex **2** (20 μM) and thiophenol (1 mM) added and photolyzed for 5 min with $\lambda \geq 330$ nm; (F) ruthenium complex **2** (20 μM) and thiophenol (1 mM) added and photolyzed for 10 min with $\lambda \geq 330$ nm.

E. Meggers *et al.* *Organometallics,* **2012**, *31*, 5968–5970

2-1. R-SH oxidation (4)

Ar-N₃ reduction by FeTPP and R-SH



Scheme 1. [Fe(TPP)]Cl-catalyzed reduction of aromatic azides to amines with thiols. A) Reduction of simple aromatic azides. B) [Fe(TPP)]Cl-catalyzed formation of the anticancer drug candidate MS-275. [a] Only 0.05 mol% [Fe(TPP)]Cl used in the reaction.

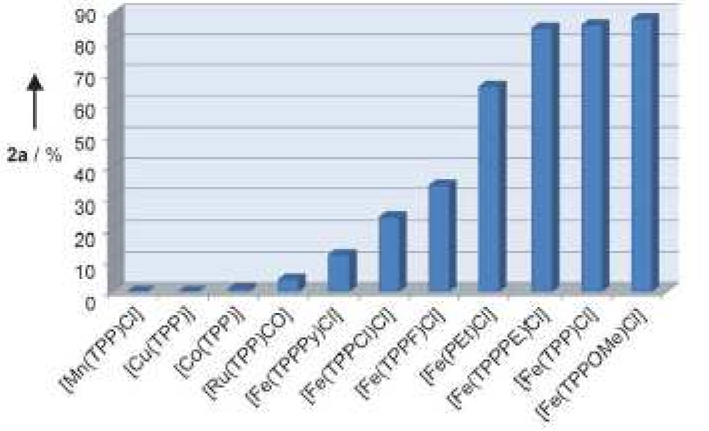


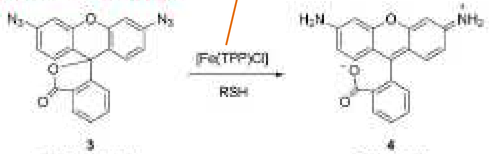
Figure 1. Comparison of different metalloporphyrins for the catalytic reduction of aromatic azides with thiols. Shown are isolated yields of **2a**. TPPPy: 5,10,15,20-tetra(*N*-methyl-4-pyridyl)porphine, TPPCl: 5,10,15,20-tetra(*o*-dichlorophenyl)-21*H*,23*H*-porphine, TPPE: 5,10,15,20-tetraphenyl-21*H*,23*H*-porphine modified with ethylene glycol chains, TPPF: 5,10,15,20-tetra(pentafluorophenyl)-21*H*,23*H*-porphine, PEt: 2,3,7,8,12,13,17,18-octaethyl-21*H*,23*H*-porphine, TPPOMe: 5,10,15,20-tetra(4-methoxyphenyl)-21*H*,23*H*-porphine. Reaction conditions: azide **1a** (1 M), β-mercaptoethanol (5 equiv), and metalloporphyrin (1 mol%) were reacted in CH_2Cl_2/MeOH (95:5) for 30 min at 30 °C. See the Supporting Information for more details.

E. Meggers *et al. ChemBioChem* **2012**, *13*, 1116-1120

Q. 今回触媒の水溶性は気にしていない?
A.この触媒は脂溶性が高そうで、モデル系ではDMSO:H_2O＝1:1の反応を行っています。
これを細胞に使うときには有機溶媒はほとんど使っていませんが、果たして溶けているのか?でも反応は成功しています。
ポルフィリン錯体がどれほど溶けやすいかわかりませんが、今後使うにあたって水溶性の向上が求められると思います。

2-1. R-SH oxidation (4)

Reductant scope



3 nonfluorescent → 4 fluorescent

Table 1. Influence of biorelevant reaction conditions on the catalytic reduction of rhodamine bisazide 3 by [Fe(TPP)Cl].[a]

	[Fe(TPP)Cl] [mol %]	Thiol	Ascorbate [mM]	Yield [%][b]
1	5	–	–	0.2 ± 0.1
2	5	Cys (5 mM)	–	13 ± 2
3	5	Cys (5 mM)	10	40 ± 3
4	5	Cys (15 mM)	10	77 ± 5
5	5	PhSH (5 mM)	10	85 ± 5[d]
6	5	Cys (5 mM)	10[c]	41 ± 2
7	–	Cys (5 mM)	10	2.3 ± 0.5

[a] Bisazide 3 (0.5 mM) was treated with the indicated amounts of [Fe(TPP)Cl] in DMSO/phosphate buffer (1:1, 20 mM, pH 7.25) at 37 °C for 1 h. [b] Standard deviations from three independent experiments. [c] Reaction performed in DMEM instead of phosphate buffer. [d] In the absence of [Fe(TPP)Cl] the yield is only 1%.

Ar-N_3 were reduced in cell

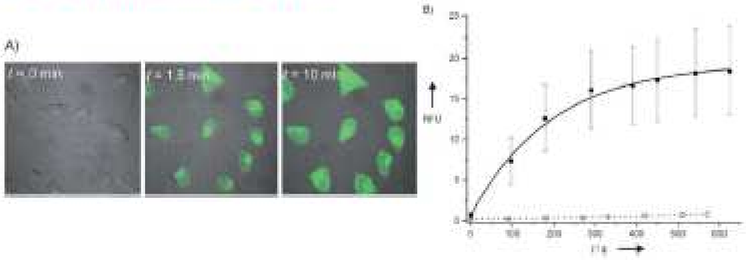


Figure 2. [Fe(TPP)Cl]-induced reduction of bisazide 3 to fluorescent rhodamine 110 inside HeLa cells. A) Superimposed phase contrast and confocal fluorescence images. HeLa cells were pre-incubated with bisazide 3 (100 μM) for 25 min, washed with PBS, and subsequently treated with [Fe(TPP)Cl] (10 μM). See the Supporting Information for more details. B) Quantified time-dependent increase of fluorescence emission within the cellular cytosol of HeLa cells upon [Fe(TPP)Cl] addition (●) and the corresponding time-dependent fluorescence in the absence of catalyst (○). The image analysis was performed on regions of interest (ROIs) for eight individual HeLa cells with the software ImageJ. The fluorescence evolution was analyzed for eight different HeLa cells. The data for the catalytic reaction were fitted to an exponential equation with the exponent being the rate constant [s^{-1}] of the intensity increase.

Fluorescence were observed *in vivo*, due to reductive metabolism of Ar-N_3

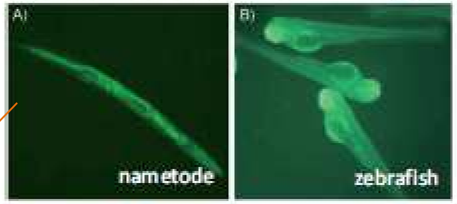


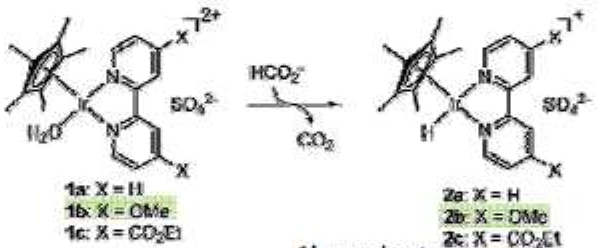
Figure 3. Activation of bisazide 3 in vivo. A) Adult *C. elegans* nematode incubated with bisazide 3 (25 μM) in M9 buffer with 1% DMSO for 20 min, before being pelleted, washed with M9 buffer (1 mL), concentrated to 100 μL by decanting, placed on a slide, and treated with one drop of 10% azide, followed by fluorescence imaging. B) 2.5-day-old transparent zebrafish embryos incubated with bisazide 3 (100 μM) for 30 min followed by fluorescence imaging.

E. Meggers *et al. ChemBioChem* **2012**, *13*, 1116-1120

Q. 生体内でArN3が代謝されるメカニズムは?
A.お伝えしたとおり、肝臓のミクロソーム中で代謝が起こります。どの酵素が代謝するかまではわかりませんでした。
電子不足なアジドが代謝されやすいようです。アルキルアジドは代謝される例は見つかりませんでした。
click chemistryでアルキルアジドしか使われているのを見たことがないのは、Ar-N3が代謝されてしまうからではないかと思います。
Appendixにもう少し詳しいことを載せています。

2-2. Reduction by HCO_2H (1)

Reductive alkylation by [Ir-H] and HCO_2^-



1b was best
(**1a** afford small amount of **2a**,
1c gave no product(data not shown))

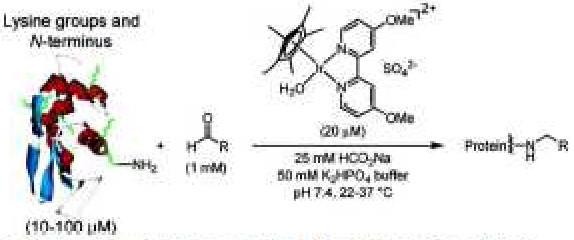


Table 1. Reductive Alkylation of Proteins Using **4a** and **1b**[a]

entry	protein	[1b] (μM)	*T* (°C)	Unmod (%)	+1 (%)	+2 (%)	+3 (%)	+4 (%)
1	3a (100 μM)	20	22	6	21	37	25	11
2	3a (100 μM)	10	37	20	33	29	16	2
3	3a (100 μM)	5	37	18	38	31	1	0
4	3a (100 μM)	2	37	84	16	0	0	0
5	3a (10 μM)	20	22	15	32	34	19	trace
6	3b (100 μM)	20	22	11	19	27	22	12[b]
7	3c (100 μM)	20	37	24	47	27	2	0
8	3d (100 μM)	20	37	85	15	0	0	0
9	3e (100 μM)	20	37	59	41	0	0	0
10	3f (100 μM)	20	37	70	30	trace	0	0

[a] Additional conditions: 1 mM **4a**, 25 mM HCO_2Na, 50 mM K_2HPO_4, pH 7.4, 18−22 h. Protein substrates: lysozyme (**3a**), cytochrome *c* (**3b**), α-chymotrypsinogen A (**3c**), h h myoglobin (**3d**), ribonuclease A (**3e**), and bacteriophage MS2 (**3f**). Product distributions were determined from ESI-MS analyses. [b] **3b** also gave small amounts of +5 (5%) and +6 (3%).

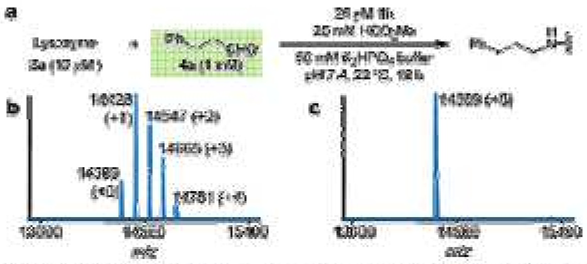


Figure 1. Modification of lysozyme using reductive alkylation. Under the reaction conditions summarized in (a), a distribution of alkylated products results (b). (c) Control experiments lacking catalyst yielded no reaction products. Spectra shown are reconstructed from charge ladders obtained using ESI-MS analysis.

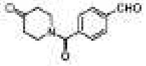
M. B. Francis *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13490-13491

Q. どこが修飾されたか、選択性は決めてる？
A.この報告に関してはどこが修飾されたかは示していません。
　他の、Tyrの辻-Trost反応等では酵素消化→LC-MS/MSで修飾部位を決定しているものもあります。

2-2. Reduction by HCO2H (1)

Aldehyde substrate scope

Table 2. Modification of Lysozyme (3a) By Reductive Alkylation[a]

Aldehyde/Ketone		Unmod (%)	+1 (%)	+2 (%)	+3 (%)	+4 (%)
4b	CH_3CH_2CHO	72	28	0	0	0
4c		41	43	16	0	0
4d		6	26	40	23	5
4e		60	34	6	0	0
4f		14	41	36	9	0
4g		100	0	0	0	0
4h		18	46	29	7	0
4i		33	52	15	0	0

[a] Conditions: 100 μM lysozyme, 1 mM **4b−i**, 20 μM **1b**, 25 mM sodium formate, 50 mM K_2HPO_4, pH 7.4, 22 °C, 22 h. Product distributions were determined using ESI-MS analysis.

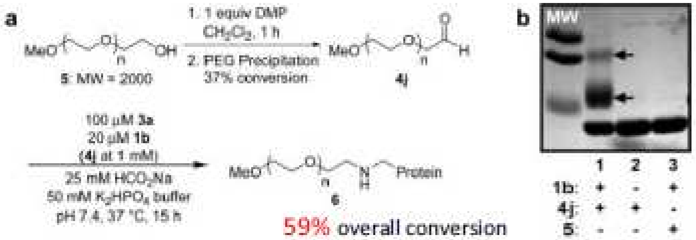
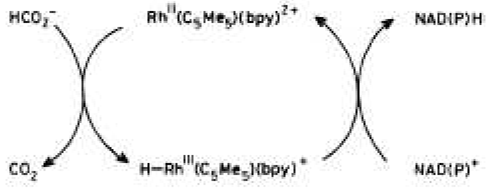


Figure 2. Conjugation of PEG to lysozyme using a simple two-step procedure. (a) Commercially available PEG alcohols can be oxidized to afford aldehydes before conjugation to proteins via reductive alkylation. (b) SDS−PAGE analysis of **6** shows the formation of singly and doubly alkylated conjugates. Control reactions run in the absence of catalyst (lane 2) or aldehyde (lane 3) afforded no conjugates. MW ladder: 25, 20, and 15 kD (from top). Lysozyme MW = 14.3 kD.

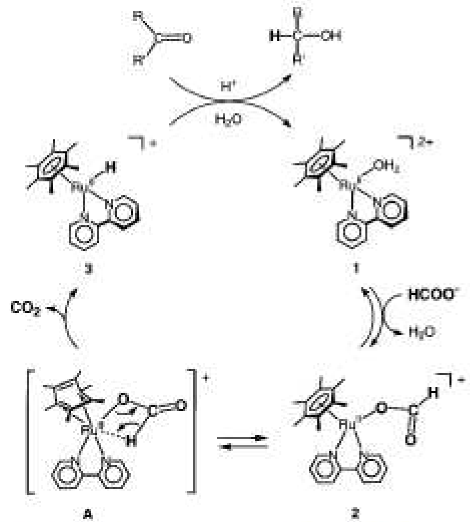
M. B. Francis *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13490-13491

2-2. Reduction by HCO2H (2)-0

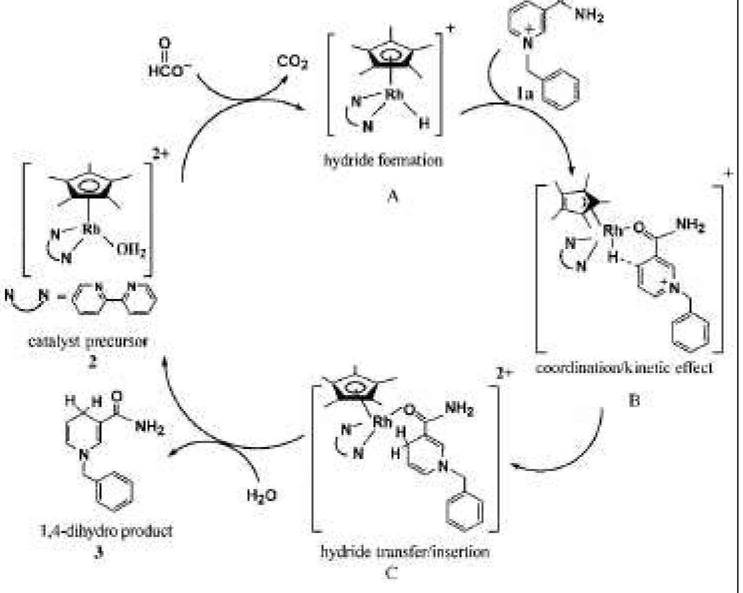
Precedents



E. Steckhan *et al. J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 1150-1151



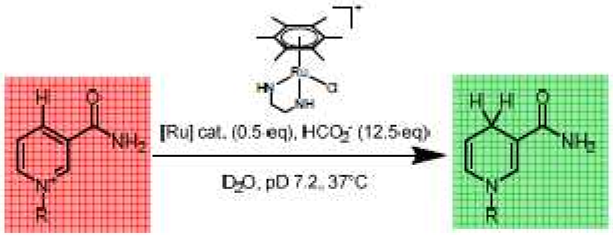
Y. Watanabe *et al. Organometallics*, **2002**, *21*, 2964-2969



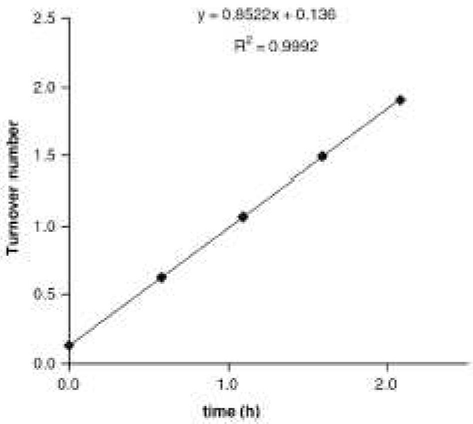
R. H. Fish *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, *38*, 1429-1432
R. H. Fish *et al. Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 6705-6716

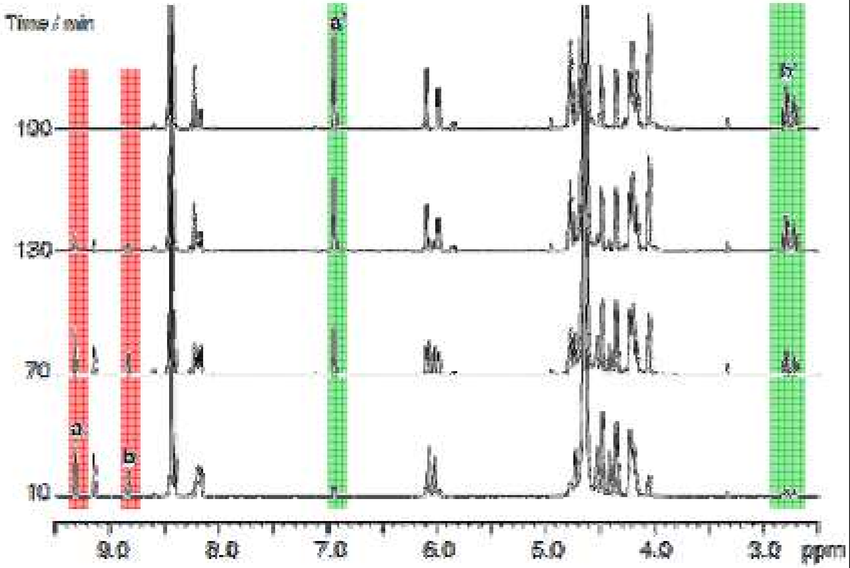
*Ir, Ru complex also reduce NAD^+ to NAD catalytically
P. Stepnicka *et al. Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 4736-4742

2-2. Reduction by HCO_2H (2)-1



[Ru] complex reduces NAD^+

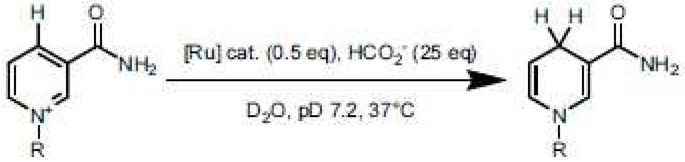


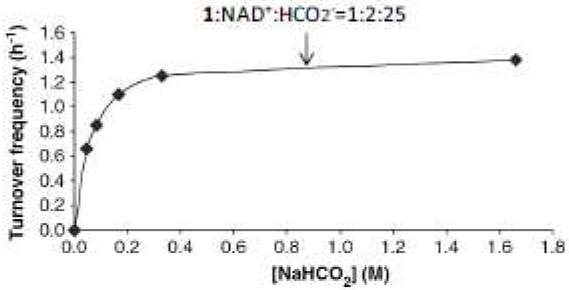


P. J. Sadler *et al. J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 483-488

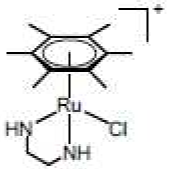
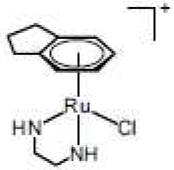
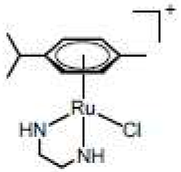
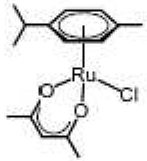
2-2. Reduction by HCO2H (2)-2

Ligand effects





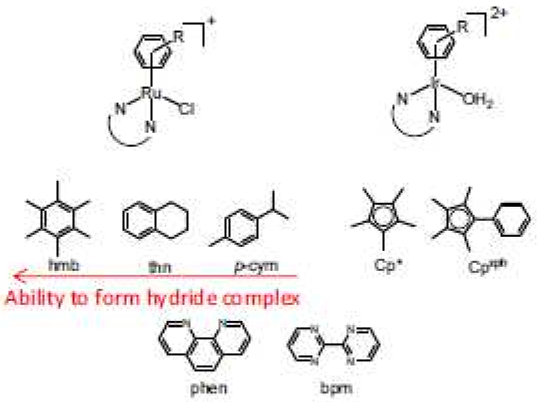
A549 (lung cancer cells) were tolerant to 2.5 mM HCO2⁻
(highest concentration in this test, data not shown)

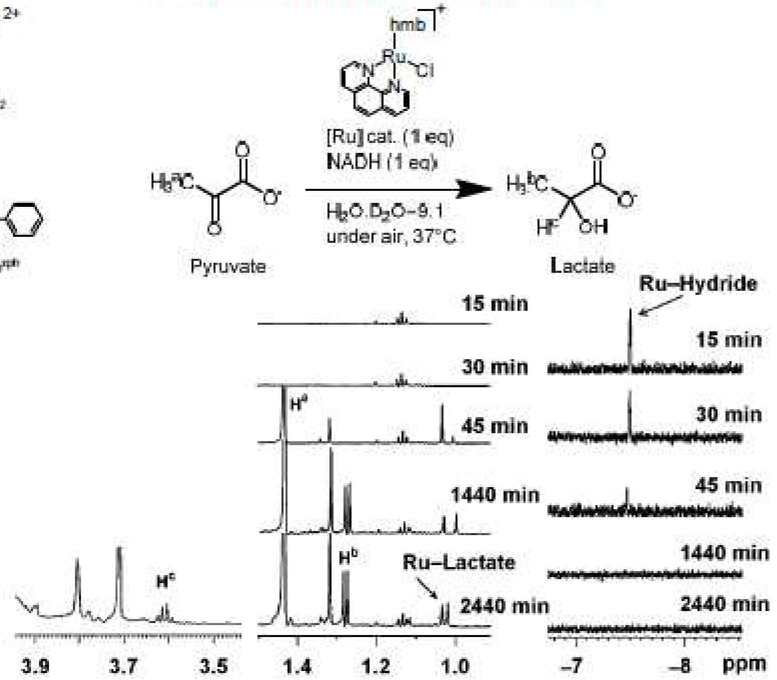
	Turnover frequency (h^{-1})
	0.85
	0.16
	0.18
	0.05

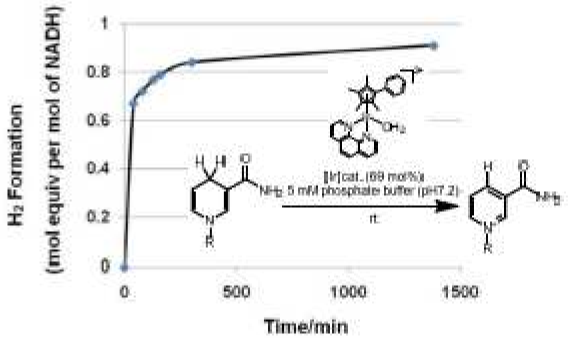
P. J. Sadler *et al. J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 483-488

2-3. Reduction by NADH (1)-1

[Ru-H] (also [Ir-H]) reduces pyruvate







P. J. Sadler *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3897 –3900

Q. これらの錯体のRing slippageはmildな条件で起こるの?
A. ここで引用した左下の論文では、錯体をベンゼン溶液中rt, 1 atm, D2雰囲気下で
錯体上の水素と加えた重水素の交換が起こっています。
それをふまえると、今回も起こっていてもおかしくはないはずです。

2-3. Reduction by NADH (1)-2

2. Redox

Proposed mechanism of hydride migration

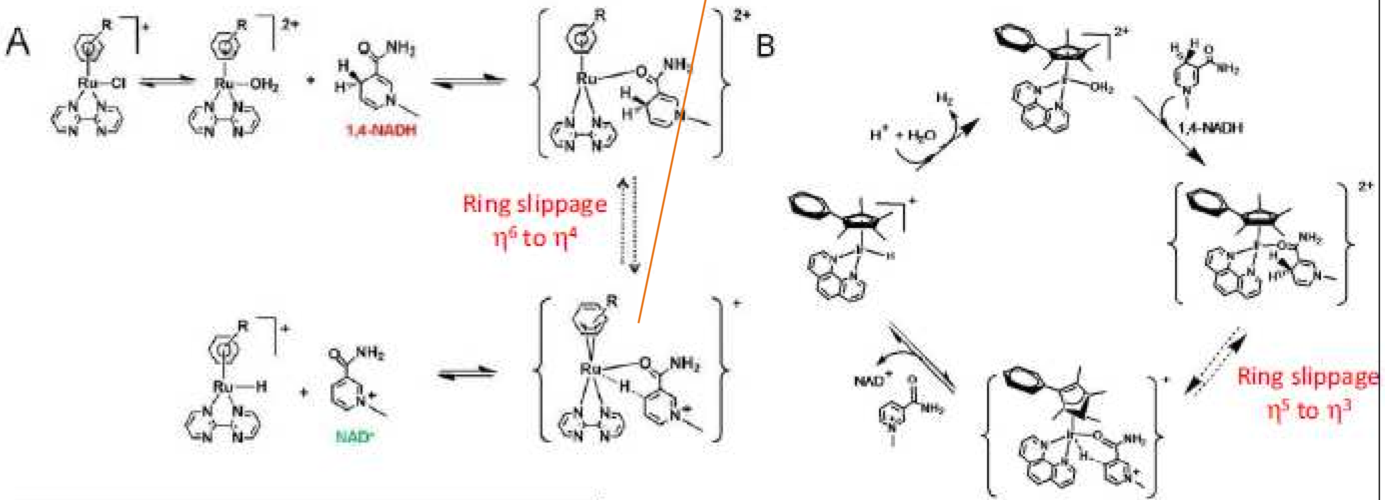
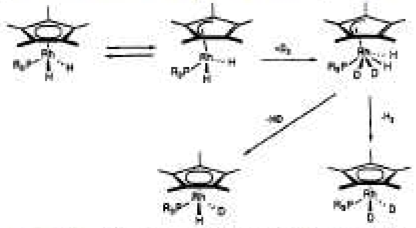


Figure S8. Proposed mechanism for transfer of hydride from 1,4-NADH to (*A*) Ru[II] complexes **1**, **2**, and **4**, and (*B*) Ir[III] complex (**7**).

Ring Slip Reaction of Cp*Rh complex



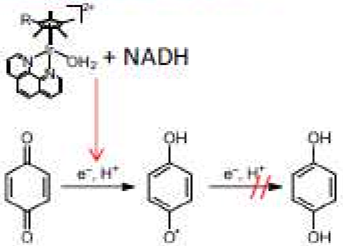
A. D. Selmeczy *et al. Organometallics* **1991**, *10*, 1577-1586.

P. J. Sadler *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3897 –3900

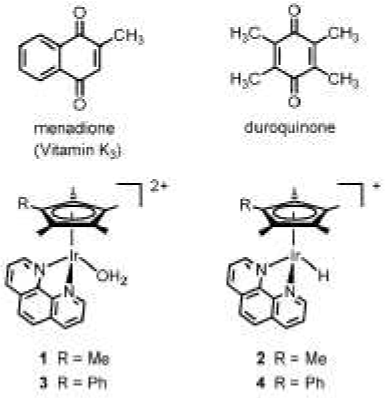
Q. ここのピークがブロード化するのはラジカルになっているからなのか、常磁性の金属種が発生するからなのか。どっち？
A. おそらくラジカルが原因です。
(0価、2価のIr, Ruの磁性はわからないのですが) 金属は触媒量なので、
quinoneが配位していてもそのピークの変化はここまで大きくは出ないはずです。

2-3. Reduction by NADH (2)-1

[Ir-H] reduces quinones to...?



Scheme 1. One- and two-electron reduction of a quinone (e.g. benzoquinone) leading to semiquinone and hydroquinone, respectively.



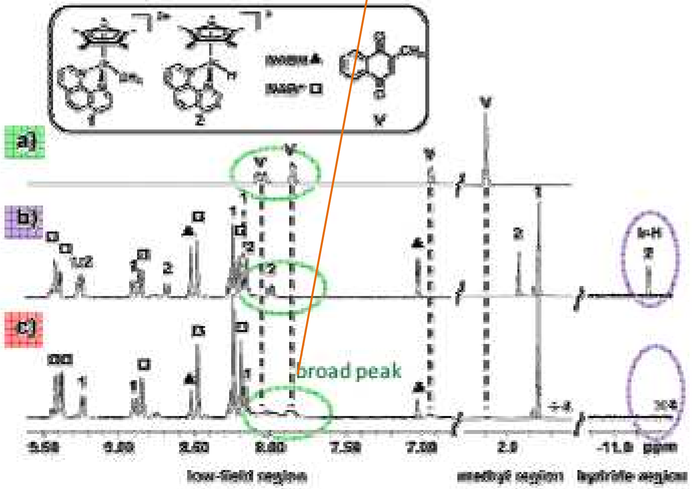


Figure 1. ^{1}H NMR spectra showing the formation of complex 2 [(η^5-C_5Me_5)Ir(phen)(H)]$^+$ and its reaction with menadione in [D_4]MeOD/H_2O (1:9) at 298 K. a) Menadione alone. b) Formation of hydride complex 2 from reaction of [(η^5-C_5Me_5)Ir(phen)(H_2O)]$^{2+}$ (1; 1 mM) with NADH (2 mM). c) Disappearance of signals of hydride 2 and broadening of signals of menadione 10 min after addition of menadione (1 mM) to mixture in (b).

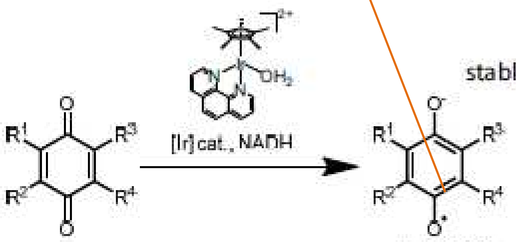
P. J. Sadler *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4194-4197

Q. なぜここで止まる?
半分がhydroquinoneになってそれが残りのquinoneと反応しているという可能性は?
A. その可能性もありますが、それでは次のスライドで示した2電子還元の反応メカニズムをたどることになると思います。
エネルギー的に高い経路をたどることになりますし、semiquinoneよりエネルギーの高いhydroquinoneを出す(それでないと均一化しないと思うので)、彼らが提唱している1電子還元のものと比べて2つ不利になる部分があるので、可能性が薄いと思います。

2-3. Reduction by NADH (2)-2

2. Redox

[Ir-H] reduces quinones to semiquinone radical



yield 93%
(menadione)

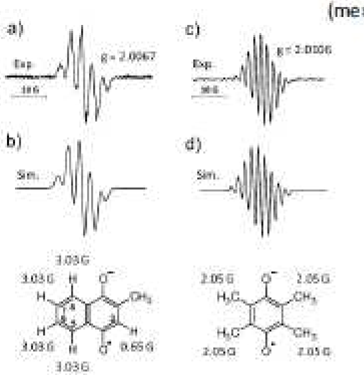


Figure 2. X-band EPR spectra at around 290 K. a) Menadione radical anion ($M^{\cdot-}$) generated by the reduction of menadione (1 mM) by NADH (0.5 mM) catalyzed by complex 1 or 3 (160 μM) in phosphate buffer (pH 7.2, 9 h). b) Simulated $M^{\cdot-}$ EPR spectrum with hyperfine coupling constants. c) Durosemiquinone radical anion ($D^{\cdot-}$) generated by reduction of duroquinone (2 mM) by NADH (1 mM) catalyzed by complex 1 or 3 (330 μM) in phosphate buffer (pH 7.2, 10 h). d) Simulated $D^{\cdot-}$ EPR spectrum with hyperfine coupling constants.

1 NADH reduces 2 quinone

menadione (VK3)

Entry	Molar ratio 1: NADH: VK_3
1	1: 3: 25
2	1: 6: 25
3	1: 30: 80
4	1: 60: 120

duroquinone

Entry	Molar ratio 1: NADH: Duro
5	1: 30: 80
6	1: 15: 40

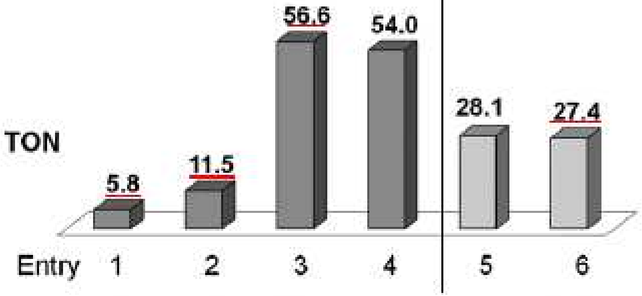


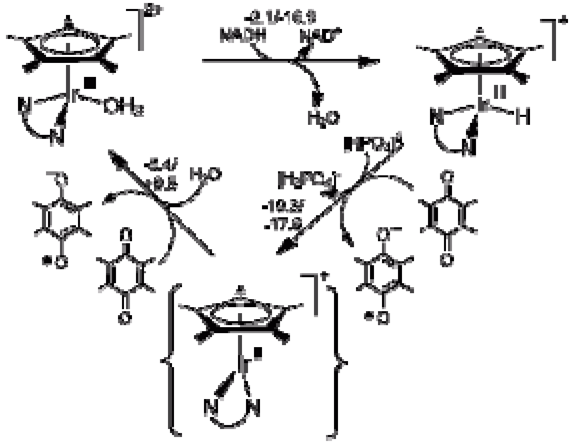
Figure 3. Reduction of menadione (VK_3, entries 1–4) and duroquinone (Duro, entries 5 and 6) by NADH catalyzed by complex 1 (80 μM).

P. J. Sadler *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4194-4197

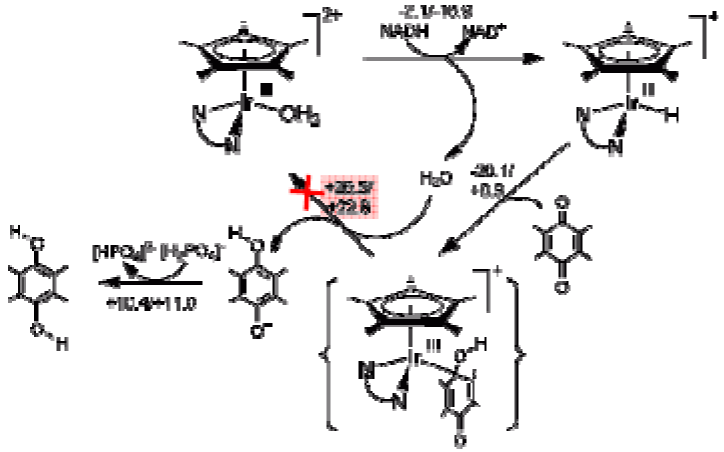
2-3. Reduction by NADH (2)-3

Proposed raction mechanism

a) One electron transfer × 2 (proposed)



b) Two electron transfer



XX/YY is each potential-energy/free-energy difference (kcal• mol^{-1}) by DFT calculation

P. J. Sadler *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4194-4197

Contents

1. Introduction

2. Redox catalyst

3. Pd catalyst ・・・ Mizorogi-Heck, Sonogashira, Suzuki-Miyaura, Tsuji-Trost

4. Others

5. Summary

3-0. History

3. Pd

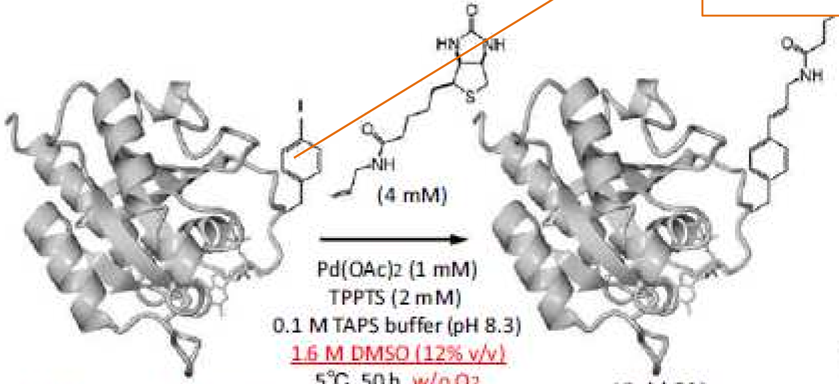
	2005	2006	2009	2011	2012	2013
Mizorogi-Heck	Yokoyama *et al.* protein buffer (pH 8.3) Yield: 2%					
Sonogashira		Yokoyama *et al.* protein buffer (pH 8.3) Yield: 25%		Lin *et al.* protein buffer (pH 8.0), inside *E.coli* Yield: ~90%		Chen *et al.* protein buffer (pH 7.6) Yield: ~95%
Suzuki			Davis *et al.* protein buffer (pH 8.0) Yield: >95%	Bradley *et al.* Small molecule Inside HeLa cell Yield: ---	Davis *et al.* protein on *E.coli* surface Yield: ---	Davis *et al.* peptide buffer (pH 8.0) Yield: <48%
Tsuji-Trost		Francis *et al.* protein Buffer (pH 8.5) Yield: 50-65%				

Q. この構造は生体中に存在するものなの？
A. ありません。組み替えによって発現しています。
ざっくりと述べると以下のように作っています。

目的のタンパクのcDNAを取得
→変えたい部位に、そのタンパクが使っていない終止コドンを導入
→それに対応するtRNAと入れたいアミノ酸のペアを選択
→その遺伝子も合わせてプラスミド入れ、大腸菌等に導入
→発現、精製、目的のタンパクを得る

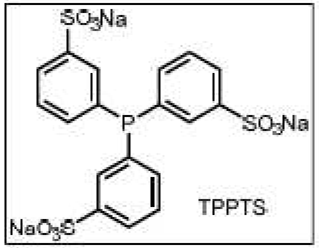
より詳しくはこちらのページを参照してください
http://protein.gsc.riken.jp/sakamoto/abstract.html

3-1. Mizorogi-Heck reaction



(*p*-I-Phe)32-Ras-His (13 μM)

Yield 2%
(28% : dehalogenated,
70% : starting material)
by protease→LC-MS/MS



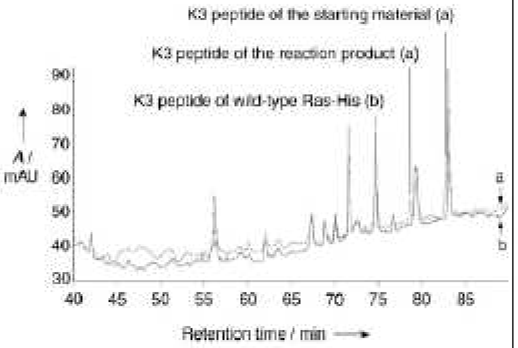


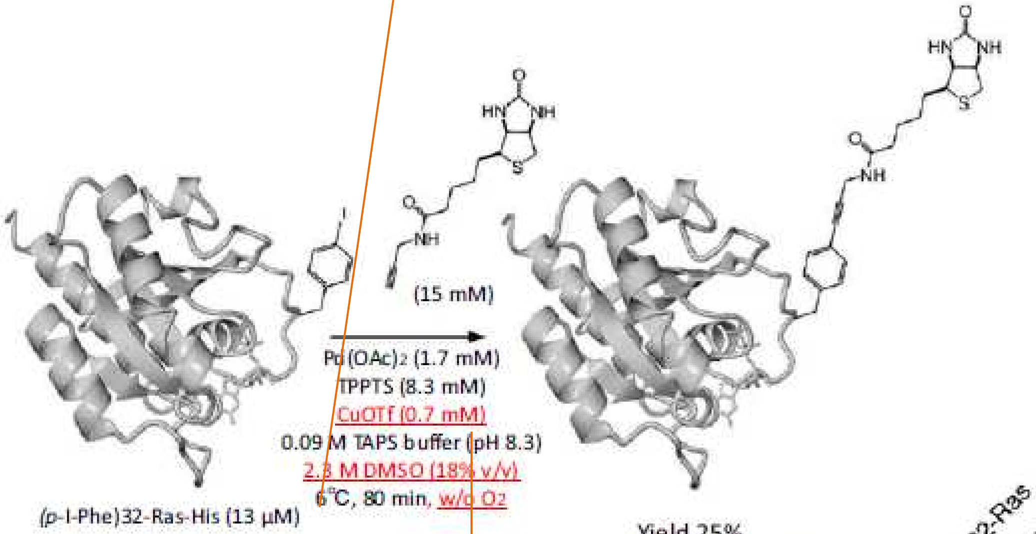
Figure 2. The HPLC chromatogram for Lys-C peptides of a) the crude reaction product and b) those of intact wild-type Ras-His, with ultraviolet (UV) detection at 215 nm. The K3 peptide (17–42) of the biotinylated product (bF32-Ras-His) and that of the dehalogenated product (F32-Ras-His) were eluted as an overlapped peak at 77.9 min.

S. Yokoyama *et al.* *ChemBioChem* **2006**, *7*, 134-139

Q. 6℃って中途半端だけどなぜ?
この前の論文では同じ著者が5℃で反応させてますよね。
A. これが5→6℃になっている理由はわかりません。
論文中では使っているタンパクの変成を防ぐために低温にしていると述べていました。
低温室でずっと反応をかけていて、そのときの空調の設定が核温度だったのかもしれないです。

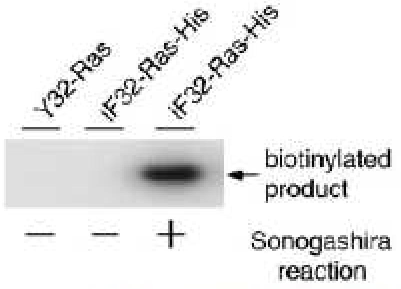
3-2. Sonogashira coupling (1)

3. Pd



Yield 25%
(13%:dehalogenated)

by SDS-PAGE,
protease→LC-MS/MS analysis



Detected by Streptoavidin-HRP

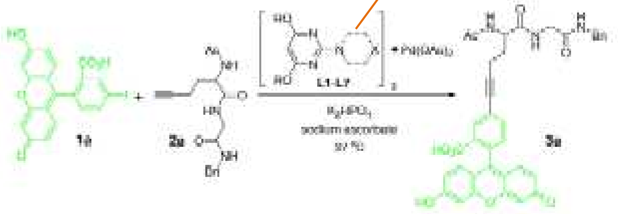
S. Yokoyama *et al. ChemBioChem* **2007**, *8*, 232-238

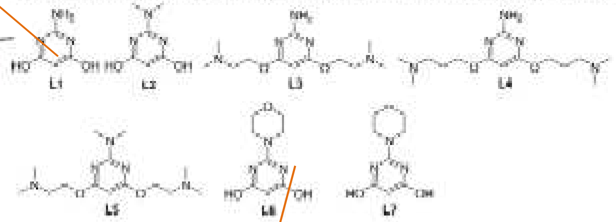
Q. 生体内で使えるCuを使った触媒反応は、sonogashiraとhuisgen 環化以外はある?
A. 私が調べた限りではその二つだけでした。

Q. P→Nに大幅に変えてるのはなぜ?
A. P系のリガンドはもしかしたら毒性が強かったり酸化に弱いのではないか？
　細胞まで考えると、一般的にNの方が良い物性を示すので採用したのかもしれません。
　著者らの記述はありません。

Q. これらのLigandはどう配位してる?
A. 論文では記載がなく、調べてもわかりませんでした。
　すみません　。

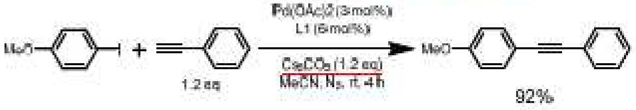
3-2. Sonogashira coupling (2)-1





Good Suzuki-coupling Ligand in water*

And Good Cu-free Sonogashira coupling Ligand
in organic solvent**



Entry	1a : 2a	Pd • ligand	Ligand	Time	Yield (%) [b]
1	1.05:1.00	20%	L1	30 min	NR
2	1.05:1.00	20%	L2	30 min	59
3	1.05:1.00	20%	L3	30 min	<5
4	1.05:1.00	20%	L4	30 min	<5
5	1.05:1.00	20%	L5	30 min	29
6	1.05:1.00	20%	L6	30 min	<5
7	1.05:1.00	20%	L7	30 min	13
8	1.00:2.40	30%	L2	40 min	91

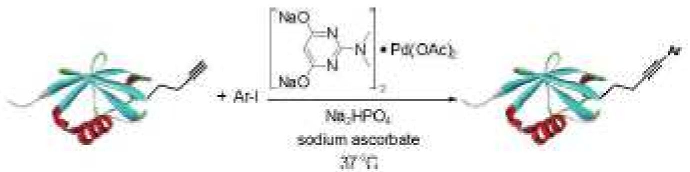
[b]HPLC yield

*Described more detail in "3-3. Suzuki coupling (1)"
B. G. Davis *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16346-16347
Y. –X. Xie *et al. Eur. J. Org. Chem.* **2005, 4256–4259

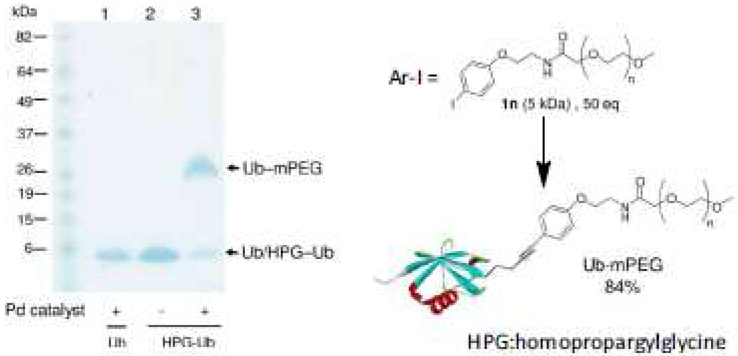
Q. Lin *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15316-15319

Q. なぜこれらのLigandがいい結果を示すの?
A. 論文では良い結果を示したとの記述のみで、詳しい考察はありません。
　これも含め、今回Pdの項で取り上げたLigandはとりあえず置換基を変えてみた感じしか見受けられませんでした。

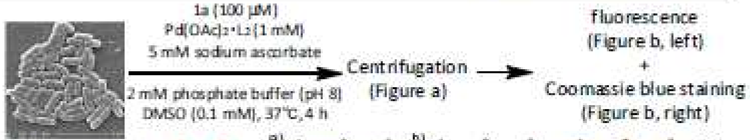
3-2. Sonogashira coupling (2)-2



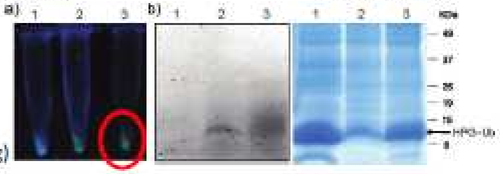
*Mixture of Ar-I, Pd complex, and sodium ascorbate was stirred at 37°C for 60 min to activate



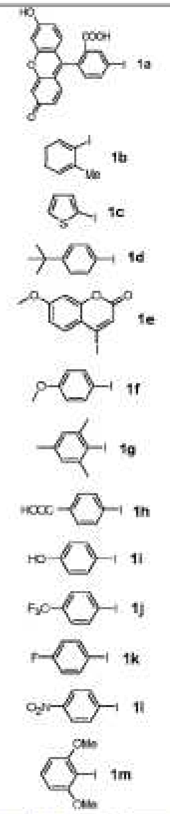
HPG:homopropargylglycine



HPG-Ub overexpressing *E. coli*



1 : control (w/o Pd complex)
2 : add **1a** and Pd
3 : add preactivated 1a and Pd (stirred at 37℃, 1 h before adding)



Entry	Ar-I	Time	Yield (%)[b]
1	**1a**	30 min	93
2	**1b**	30 min	83
3	**1c**	30 min	55
4	**1d**	30 min	86
5	**1e**	240 min	73[c]
6	**1f**	30 min	83
7	**1g**	180 min	73
8	**1h**	30 min	82
9	**1i**	30 min	85
10	**1j**	30 min	78
11	**1k**	30 min	79
12	**1l**	180 min	66
13	**1m**	180 min	60

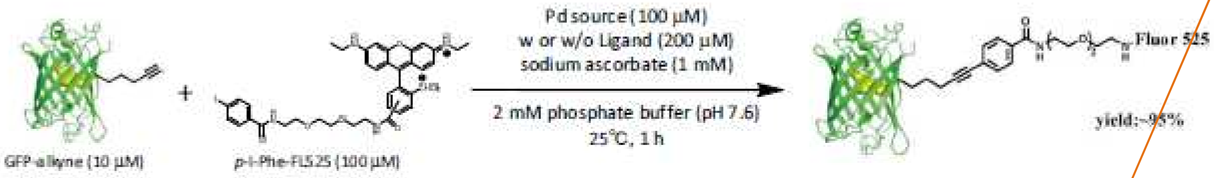
[b]LC-MS yield

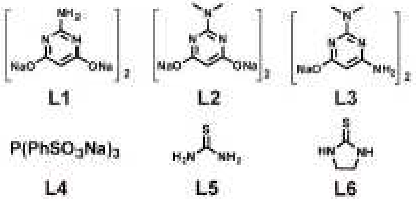
Q. Lin *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15316-15319

Q. なぜ$Pd(NO_3)_2$が一番いい結果を与えた?
A. 著者らは理由までは言及していません。
これは私なりの考えなのですが、
水溶性の高いものがいい収率を出しているので、
($Pd(NO_3)_2$、Na_2PdCl_4は水溶性だが$Pd(OAc)_2$、$PdCl_2$は水に溶けない)
溶けていないものは還元されても粒子径が大きく、
しかもPd^0が表面にしかできない、
均一に溶けているものはPd^0の微粒子がたくさんできる、
できる活性本体は一緒のPd^0だが、比表面積の差によって
反応性が大きく違うのではないかと思います。

3-2. Sonogashira coupling (3)-1

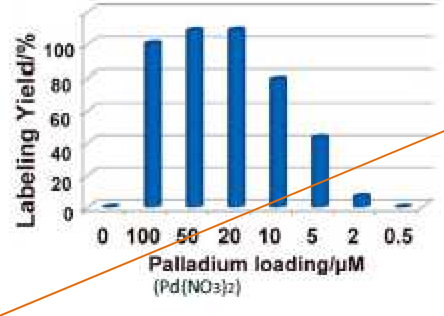
Ligand-free, $Pd(NO_3)_2$ shows best conversion





Entry	Ligand	Pd source	Yield(%)[b]
1	L1[a]	$Pd(OAc)_2$	< 5
2	L2[a]	$Pd(OAc)_2$	53
3	L3[a]	$Pd(OAc)_2$	< 5
4	—	$Pd(OAc)_2$	11
5	—	**Na_2PdCl_4**	**90**
6	—	$PdCl_2$	25
7	—	**$Pd(NO_3)_2$**	**95**
8	L4	Na_2PdCl_4	82
9	L4	$Pd(OAc)_2$	64
10	—	$Pd_2(dba)_3$	57
11	L5	$Pd(OAc)_2$	< 5
12	L6	$Pd(OAc)_2$	< 5

[b]calculated from sample florescence on SDS-PAGE



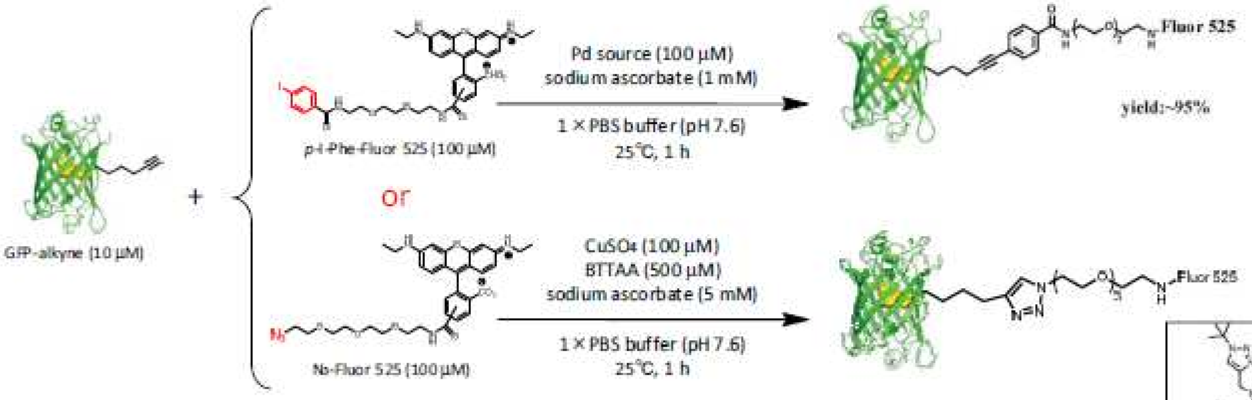
31

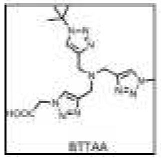
P. R. Chen *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7330–7338

Q. Ligand無しの場合、どのようにPd(0)が出る?
A. はっきりとはわかりませんが、
おそらく水中で還元剤からの1電子還元が二回起こって
Pd(0)の微粒子 (クラスター) の懸濁液になるのではないでしょうか。

Q. これらのPd sourceは普通使うものなの?
A. すみません、わかりません。
水溶性のあるPd源として、配位子交換を水中で行いたい場合は
利用価値があるとは思います。

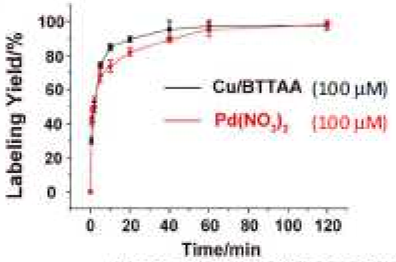
3-2. Sonogashira coupling (3)-2





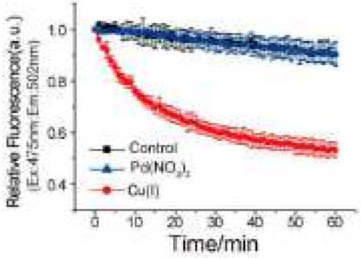
Pd vs Cu

Reaction dynamics



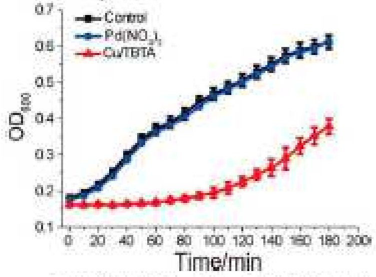
*Same reaction condition as above

Protein deactivation



*GFP (10 μM) + Pd(NO3)2 (100 μM) or Cu(I) (100 μM)

Acute toxicity

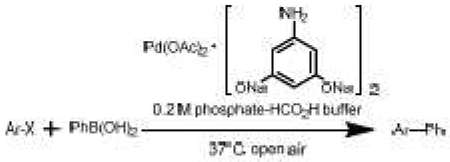


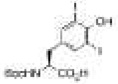
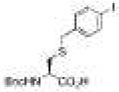
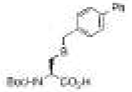
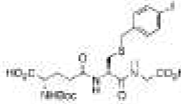
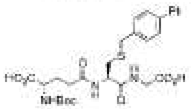
*Pd(NO3)2 (200 μM) or Cu(I) (200 μM) incubate 25℃, 1 h

P. R. Chen *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7330–7338

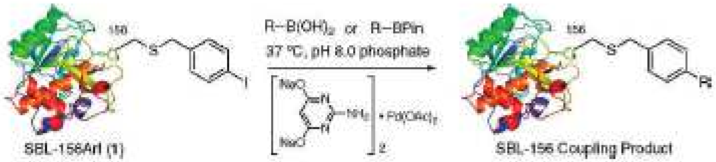
3-3. Suzuki coupling (1)

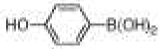
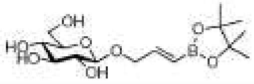
3. Pd



Entry	ArX	Pd Loading	Conditions	Coupling Product	Yield (%)
1		1%	37 °C, 4 h		95
2		1%	37 °C, 4 h		98
3		1%	37 °C, 4 h		0
4		1%	37 °C, 4 h		94
5		2%	37 °C, 4 h		95
6		1%–10%	37 °C, 6 h		0
7		4%	37 °C, 6 h		92

?

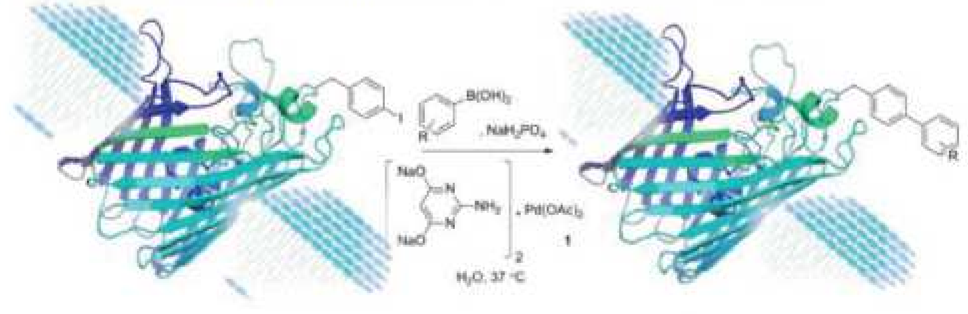


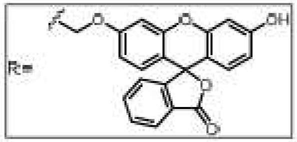
Entry	R-B(OH)2 / R-BPin	Time	Conversion
1		30 min	> 95%
2		30 min	> 95%
3		30 min	> 95%
4		30 min	> 95%
5		30 min	> 95%
6		30 min	> 95%
7		30 min	> 95%
8		30 min	> 95%
9		60 min	> 95%

B. G. Davis *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16346-16347

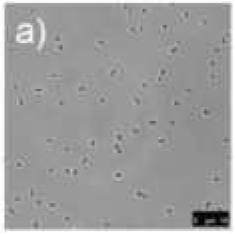
3-3. Suzuki coupling (2)

Cell-surface labeling (*E. coli*)

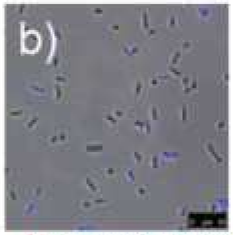




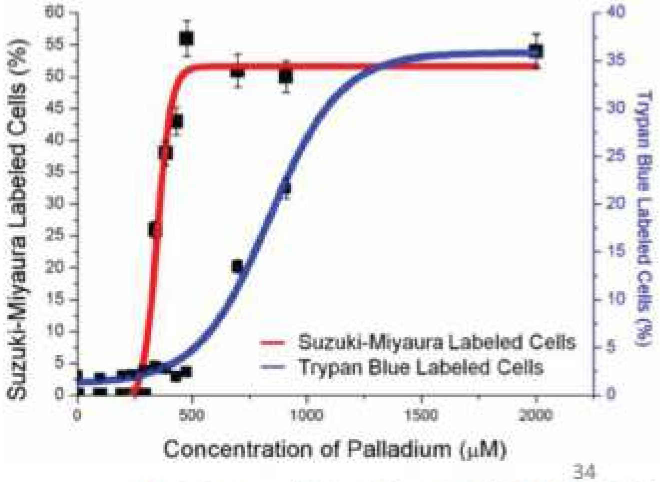
control



p-I-Phe mutant

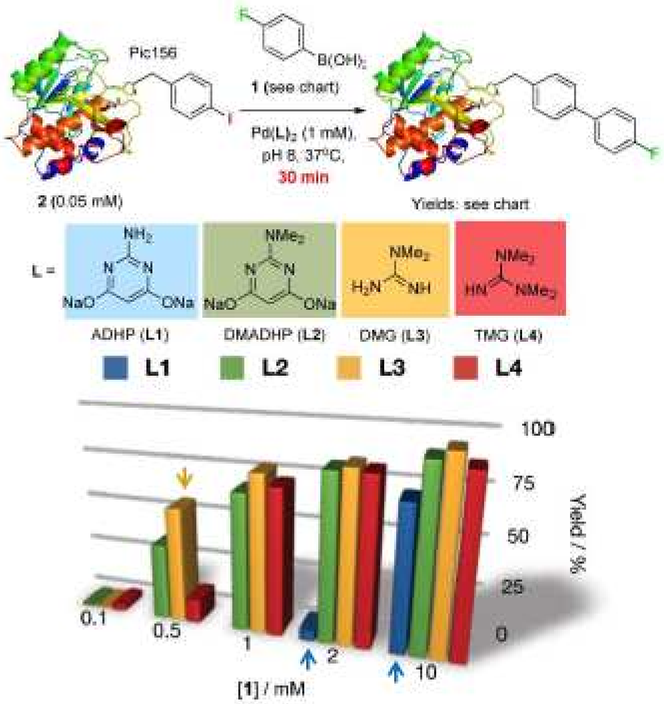


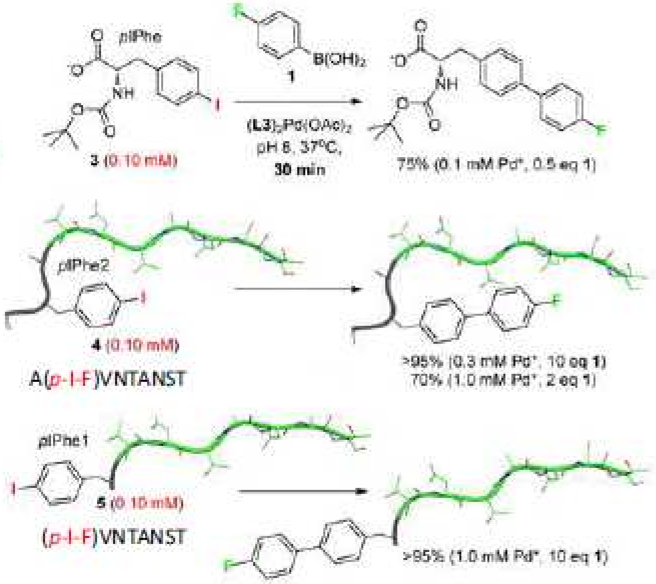
Fluorescence observed



B. G. Davis *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 800-803

3-3. Suzuki coupling (3)-1





VNTANST sequence :

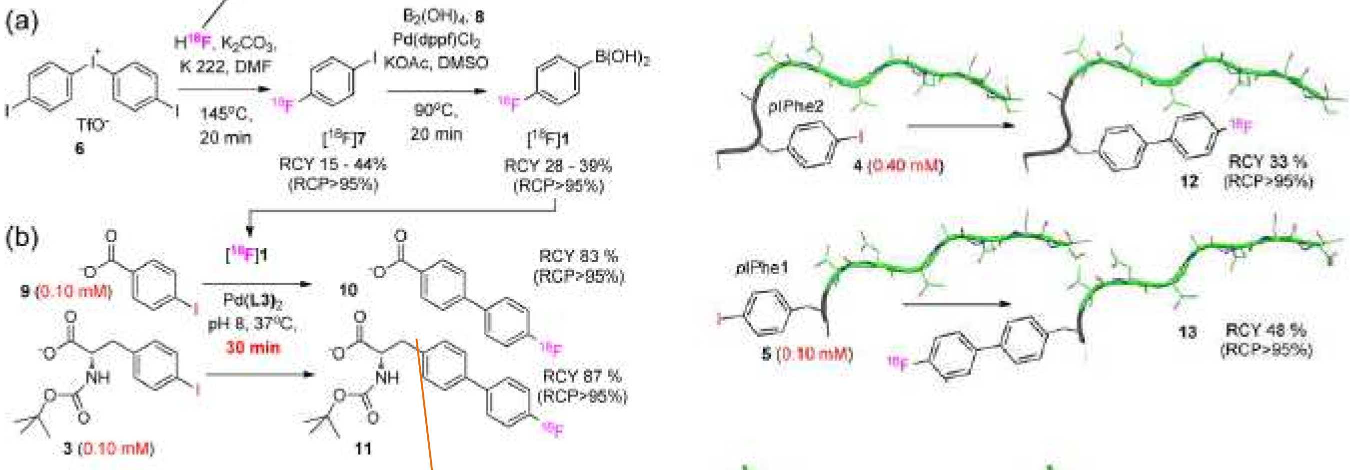
Comprehensive carcinoma homing peptide

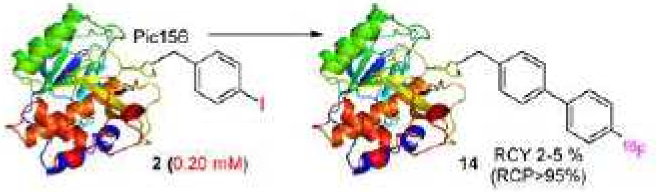
B. G. Davis *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 13612-13615

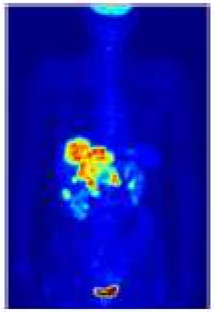
3-3. Suzuki coupling (3)-2

^{18}F・・・PET tracer, $t_{1/2}$=109 min

<1 h total reaction time is desired for PET







^{18}F-DG whole body PET imaging

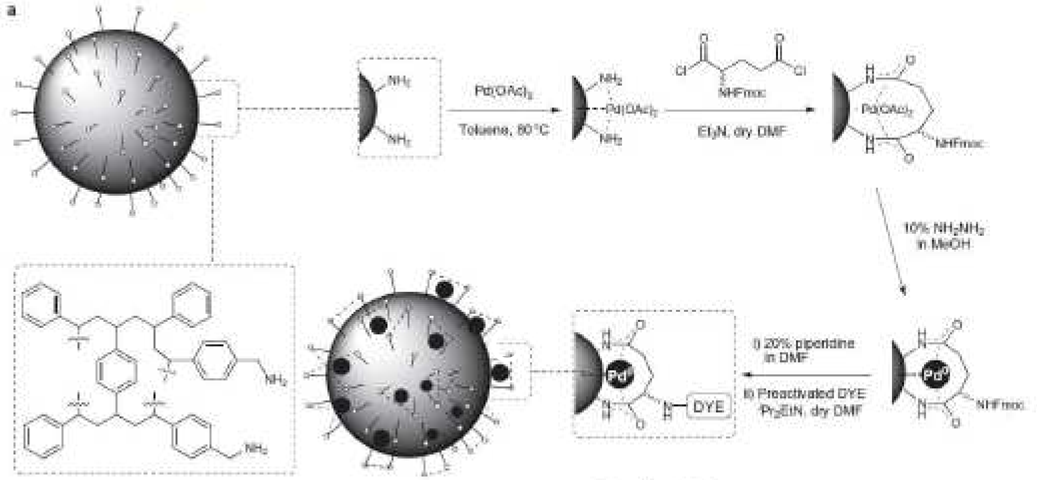
Source:wik

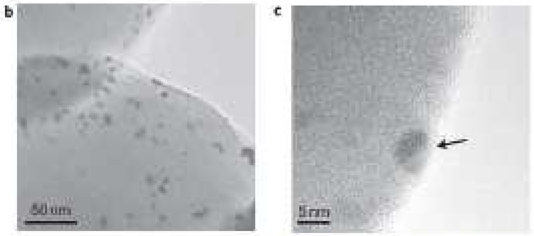
Q. これらはcrudeのまま次の反応に進んでる？

A. 各工程の後、HPLCで分取・精製しています。
^{18}F以外にも、PETで使う核種は半減期が短いことと、
実験者が被爆する危険があるので反応は全て機械で自動化されています。
上手く説明している例を見つけられなかったのですが、こんな感じの機械で作ってます。
http://www.jfe-steel.co.jp/archives/nkk_giho/177/pdf/177_21.pdf

3-3. Suzuki coupling (4)-1

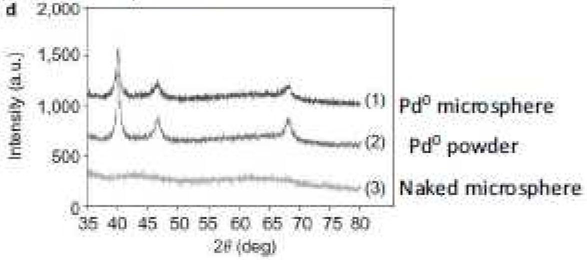
Pd^0 microsphere synthesis





TEM of Pd^0 nanoparticle

Powder XRD patterns



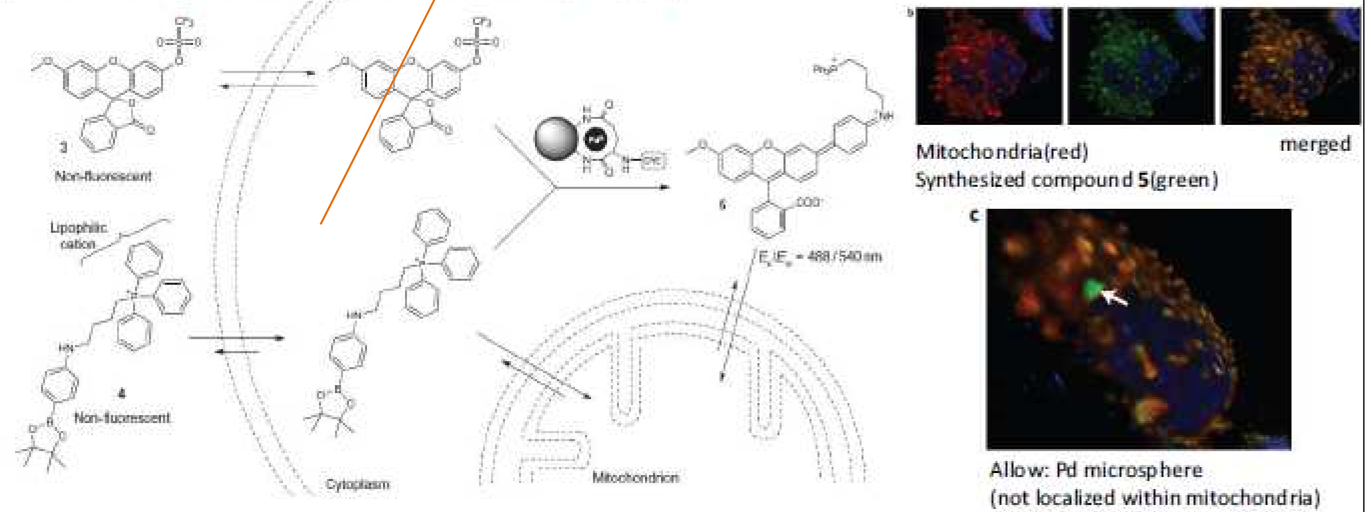
M. Bradley *et al. Nat. Chem.* **2011**, 3, 241-243

Q. なぜこれは細胞毒性示さない?
A. Pdの露出が少ないので望ましくない反応が抑えられているからだと思います。
例えば、タンパク質にキレートすること由来の毒性とかはPdの周りがかさ高すぎて起こらないはずです。

3-3. Suzuki coupling (4)-2

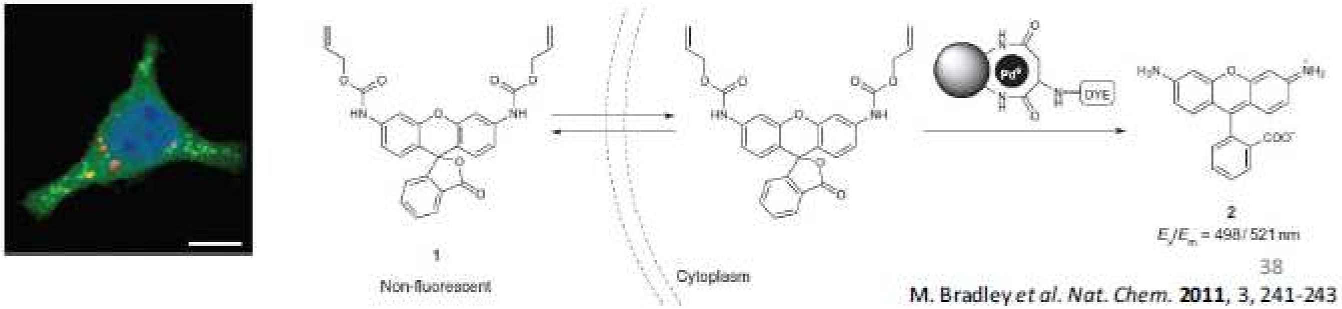
3. Pd

Pd microspheres are taken into cells (24 h, 75%~)



Mitochondria(red)
Synthesized compound 5(green)
merged

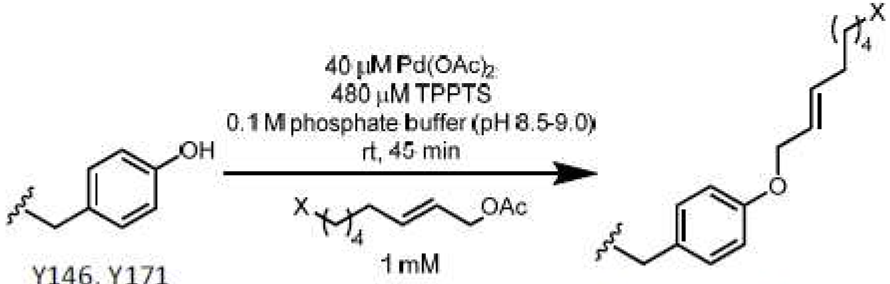
Allow: Pd microsphere
(not localized within mitochondria)



M. Bradley *et al.* *Nat. Chem.* **2011**, 3, 241-243

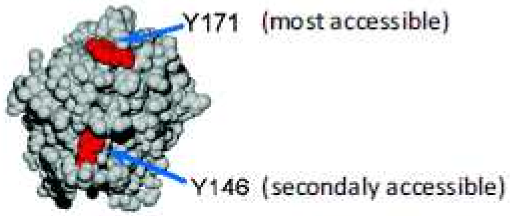
3-4. Tsuji-Trost Reaction

Also see Mr Suzuki's Literature Seminar (2013)

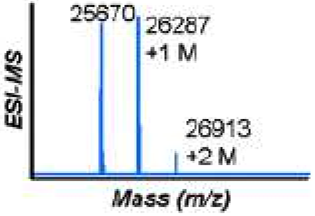


Y146, Y171
in chymotrypsinogen A

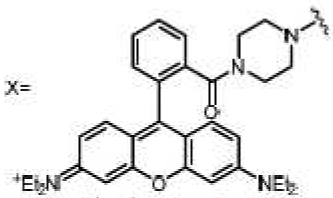
50-65% (by HPLC)
Mainly **Y171**-alkylated product



Chymotrypsinogen A



X=



Rhodamine Dye

Lys-NH_2, Cys-SH and other residue were intact

M. B. Francis *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1080-1081

Contents

1. Introduction

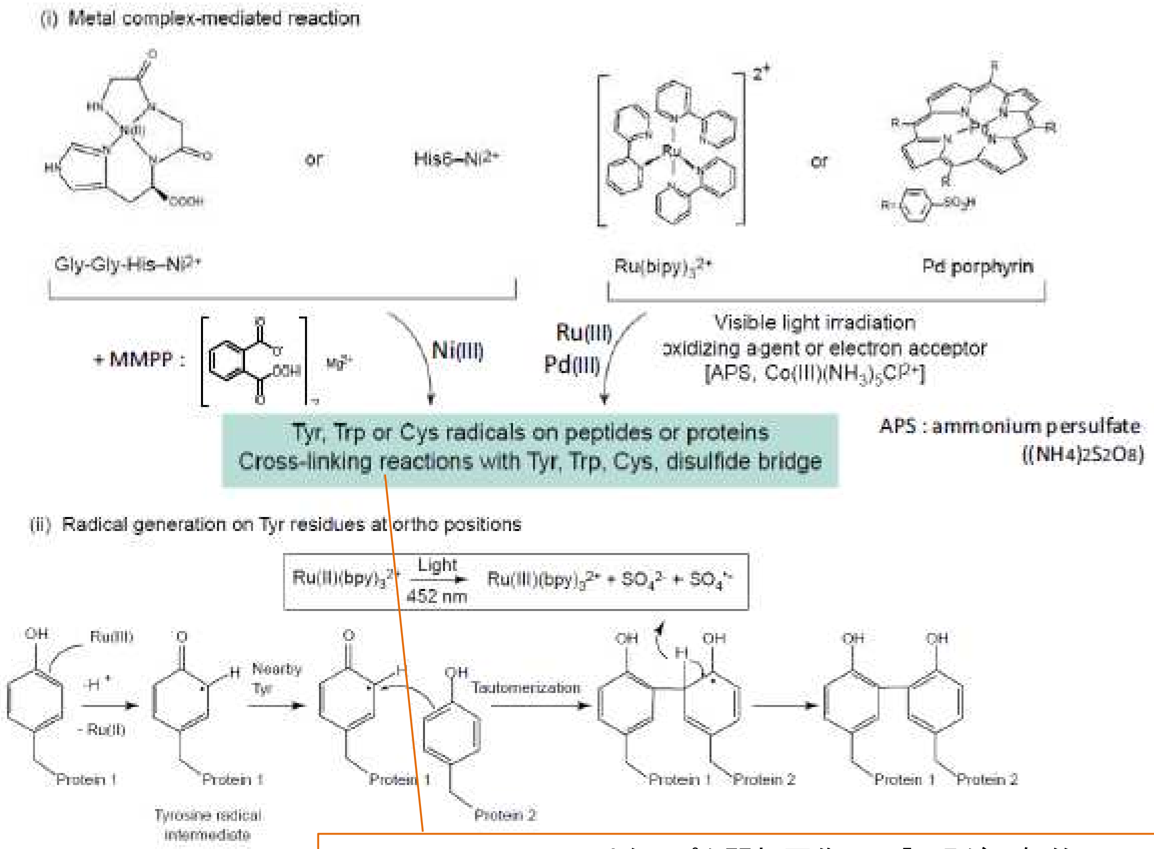
2. Redox catalyst

3. Pd catalyst

4. Others ・・・
    - Photo Cross Linking
    - OH・ generator
    - Metathesis
    - Rh-carbenoid

5. Summary

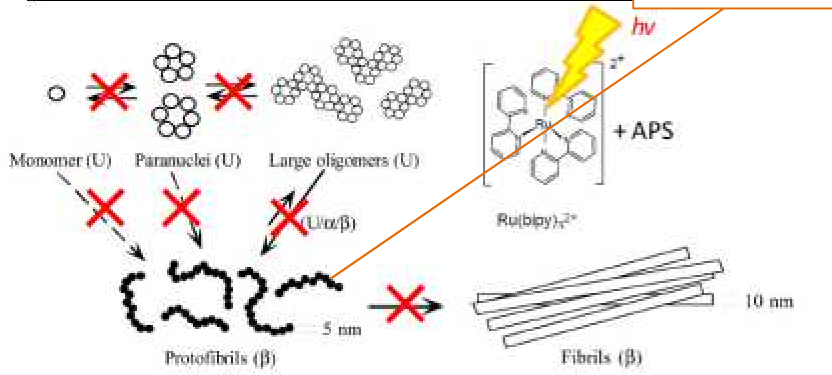
4-1. Photo Cross Linking-1

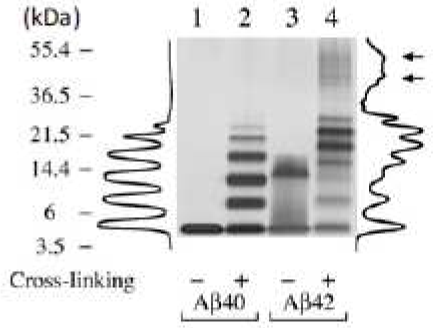


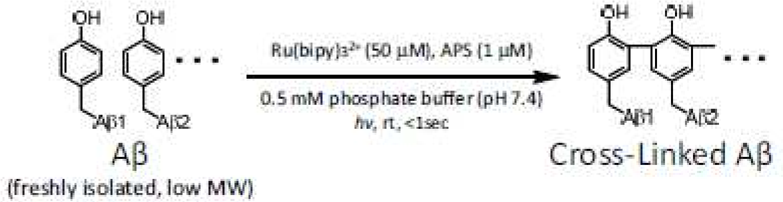
Q. Photo cross linkingはタンパク間相互作用の証明が一般的?
何かを取ってくるということに関して使っている例はある?
A.それが一般的に使われている例です。
ものとりの例は今回調査していませんが、あっても不思議ではないと思います。
例えば、相互作用している相手タンパクがわからない状態で
その相手を見つけてくるために使うとかもそれの一例になりますかね？

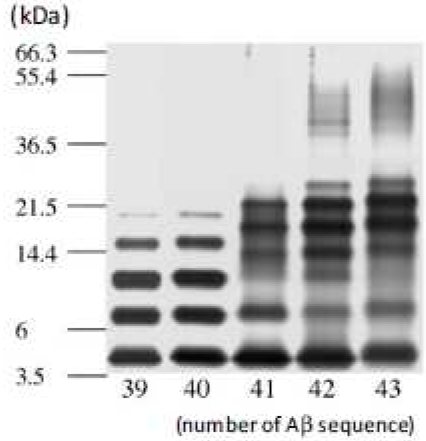
Q. Photo Cross Linked-Abは元々の構造を保っているのか？
もし保っていれないのであればこれを取得する意味は?
A. 保っているかどうかわかりません。
Abがいろいろな構造の平衡状態にあり、溶液中では
それらの混合物が存在することを明らかにしている論文なので、
これを取得する意味はそこを明らかにしたということでしょうか。
確かに、元の構造を保っていない(Ab本来の性質が失われている) ものを
取得してもその利用はあまりないのではないかと思います。

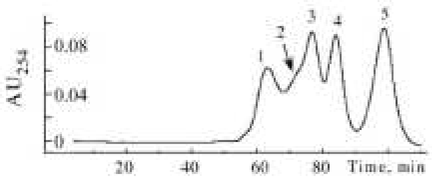
4-1. Photo Cross Linking-2

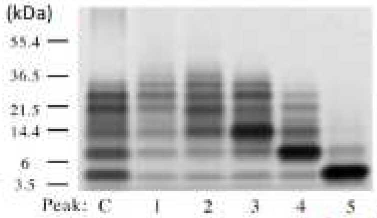








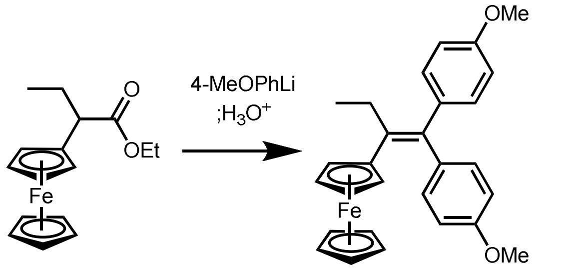




D. B. Teplow *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 330-335

4-2. OH˙ generator

Q. Tamoxifenはかなり混んでる4置換olefinだがどうやって合成してる?
A.



Tamoxifenを調べるのが骨だったので、
類縁体の骨格を作ってるとこだけ引用しました。詳しくはスライド中のref参照

Ferrocene
antitumor compound

R=H (Tamoxifen)
=OH (active metabolite)
estrogen receptor antagonist
(anti-breast cancer)

(Z)-Fc TAM-OH

(E)-Fc TAM-OH

compound	binding affinity (%)	IC50 (μM)
oestradiol	100	-
(Z) TAM-OH	107	6.4
(Z)-Fc TAM-OH	40	3.4
(E)-Fc TAM-OH	12	4.9

G. Jaouen *et al. Chem. Commun.* **1996**, 955-956

More active derivatives are reported

Q. (*Z*)-Fc TAM-OHのTamoxifen骨格としての活性はどう変化している?
A. Tamoxifenと同じタイプの抗がん作用の程度は標的とのbinding affinityで考えれると思います。
やはりベンゼン環をフェロセンに変換したことで、その部分の収まりが悪くなって
結合能＝Tamoxifenと同じ作用機序での抗がん作用は落ちています。
それを補ってフェロセンの活性酸素産生作用が効いているので、IC$_{50}$はtamoxifenより低くなっています。

...nd DNA damage
...n. Acta. **2000**, 42-48
... damage is not associated
...them.
... 1974, **249**, 2447-2452

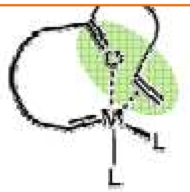
Q. ガン細胞への選択性は出せている?
A. わかりません。正常細胞を用いた実験は行っていません。
フェロセンは非特異的に作用すると思うので、その選択性が出せているかどうかを調べるために、
Tamoxifenがターゲットとしている受容体を持たない細胞に対しての毒性も見るべきだと思います。

Q. 触媒はいつも通りの形だがこれをbuffer中に溶かす工夫はしてる?
A. 触媒はこの論文中では全く変えていません。
　Bufferの有機溶媒の割合をかなり増やすことで無理矢理溶かしている感があります。
　これがbufferと言えるかはあやしいです。

4-3. Olefin metathesis (1)-1

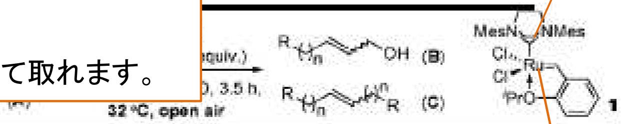
4. Others

Q.NとOを比べるとN<Oだがこれの理由は?
A. 論文中でもNよりOがいいねと触れてはいましたが理由は述べていません。
　Bn_2N-とBnO-の比較になるので、Nの方が立体的に混んでて反応性が低いとも見て取れます。



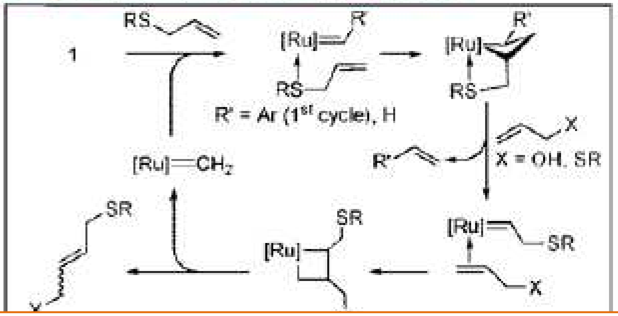
Ester chelates to [Ru] center
(M=Ru)

A. Fürstner *et al. J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9130-9136



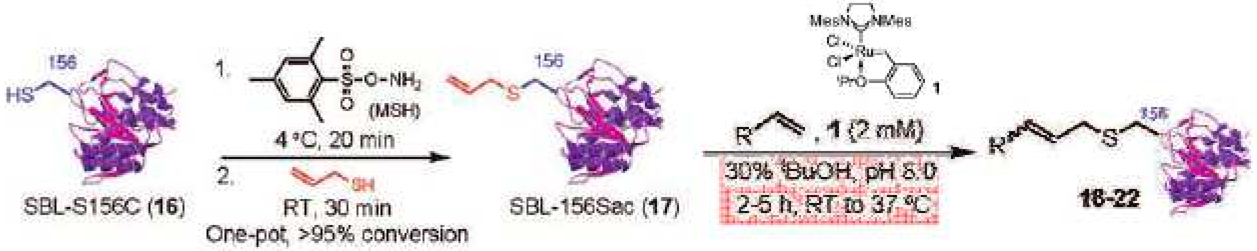
Entry	Alkene A		Cross-Metathesis B (%)[c]	Self-Metathesis C (%)[c]
1[a,b]	AcHN, $CONH_2$	3	0	0
2[a]	BocHN, CO_2Me	4	56 (74 brsm)	0
3[a]	BocHN, CO_2Me	5	67 (99 brsm)	0
4[a]	AcHN, $CONH_2$; n = 1 (6)	6	68[d]	0
5[a,b]	n = 2 (7)	7	0	0
6[a]	n = 3 (8)	8	0	0
7	BnS; n = 0 (9)	9	0	0
8	n = 1 (10)	10	52[d]	15
9	n = 2 (11)	11	19	0
10	n = 3 (12)	12	8	0

Chalcogen assisted Cross-Metathesis



Q. そもそもこの触媒が水に対して安定で有効であることは知られていたはずで、触媒にオリジナリティを感じない。
　O<S<Seという反応性の差を見つけたのが新しいのか?それともこれも知られていて、これを生体内に適応しただけという論文?
A. ご指摘の通り、触媒はHoveyda Grubbs 2nd という既知のメタセシス触媒で、最も官能基許容性・安定性の高いものです。新規性はありません。
　この論文で筆者らがアピールしている点として以下の2つがあります。
　　1) Oがダイレクティングしているのは既知だがそれを他の16族原子まで拡張してS, Seがよりよい活性化能を示すことを明らかにしたこと
　　2) その反応性の差を利用して用いて、タンパク質という配位する部位がたくさんある基質に対してもクロスメタセシスを収率良く行えたこと
　クロスメタセシス自体かなり難しいようで、これが上手くできるよ、と若干メタセシスの研究に重きを置いてアピールしている感があります。
　JACSになった理由はこれら2つを総合して幅広い分野での応用が期待できると考えられたから?
　生体条件中といっても有機溶媒リッチですし、この点はあまり評価されているわけではない気がします。

4-3. Olefin metathesis (1)-2



Entry	Alkene (mM)	Additives (mM)	Temp.	Prod.	Conversion (%)[a]
1	2 (100)	None	RT	-	0
2	2 (100)	$MgCl_2$ (100)	RT	18	>90
3	2 (100)	NaCl (100)	RT	-	0
4[b]	23 (30)	$MgCl_2$ (80)	37 °C	19	50
5[b]	24 (130)	$MgCl_2$ (130)	37 °C	20	60
6[c]	25 (75)	$MgCl_2$ (160)	37 °C	21	55
7[c]	26 (66)	$MgCl_2$ (130)	37 °C	22	60

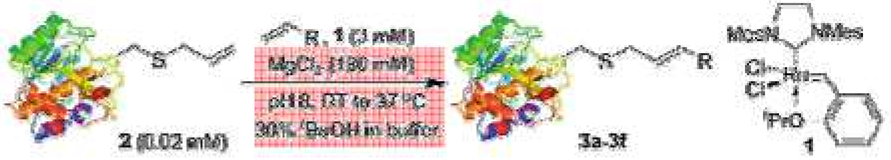
→ Minor MS signal of **1**+**17** ···strong chelation?
by LC-MS

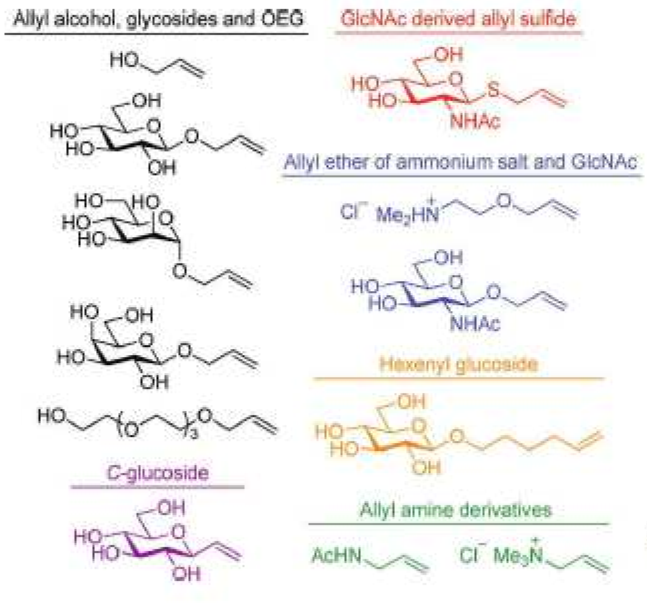
$MgCl_2$ disrupts nonproductive chelation of Ru + protein

(SBL-S156XXX have no Cys-SH)

B. G. Davis *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9642-9643

4-3. Olefin metathesis (2)-1





Entry	Alkene (mM)	Conditions	Prod.	Conv. (%)[a]
1	**4** (180)	RT, 2 h	**3a**	>95
2	**5** (180)	RT, 2 h	**3a**	28
		then 37 °C, 30 mins	**3a**	>95
3	**6** (92)	37 °C, 1 h	**3b**	30
4	**7** (89)	37 °C, 1 h	**3c**	30
5	**8** (92)	37 °C, 1 h	**3d**	30
6[b]	**9** (92)	37 °C, 30 mins	**3e**	65
7	**10** (92)	RT, 1 h	**3f**	>95
8	**11** (92)	37 °C, 1 h	-	0
9	**12a** (85)	37 °C, 2 h	-	0
10	**13a** (85)	37 °C, 1 h	-	0
11	**13b** (85)	37 °C, 1 h	-	0
12	**14** (85)	37 °C, 1 h	-	0
13	**15** (180)	37 °C, 1 h	-	0
14	**16** (170)	37 °C, 1 h	-	0

Less reactive partner
→cross-metathesis
(entry 1~7)

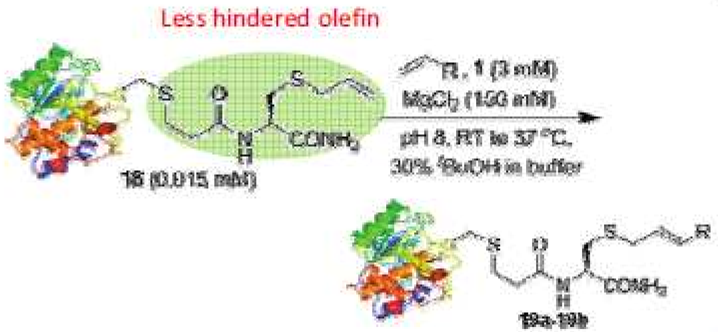
More reactive partner
→self-metathesis
(entry 10)

(Only self-metathesis)

Much less reactive partner
→no reaction
(entry 8,9,11~14)

B. G. Davis *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16805-16811

4-3. Olefin metathesis (2)-2

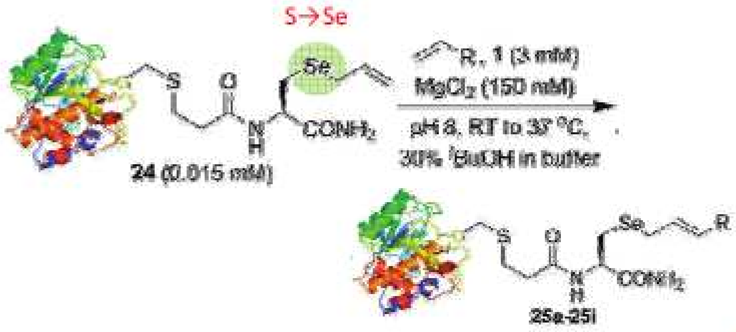


Entry	Alkene (mM)	Conditions	Prod.	Conv. (%)[a]	Conv. (hindered)
1	**4** (76)	RT, 30 mins	**19a**	>95	>95 (RT, 2 h)
2	**6** (77)	37 °C, 1 h	**19b**	>95	30
3	**7** (72)	37 °C, 1 h	**19c**	>95	30
4	**8** (77)	37 °C, 1 h	**19d**	>95	30
5	**9** (77)	RT, 2 h	**19e**	>95	65
6	**10** (80)	RT, 30 mins	**19f**	>95	>95
7	**11** (77)	37 °C, 30 mins	**19g**	29	0
8	**12a** (72)	37 °C, 2 h	**19h**	53	0
9	**13a** (77)	37 °C, 1 h	-	0 (Only self-metathesis)	0
10	**14** (72)	37 °C, 1 h	-	0	0
11	**15** (77)	37 °C, 30 mins	-	0	0
12	**16** (74)	37 °C, 1 h	-	0	0

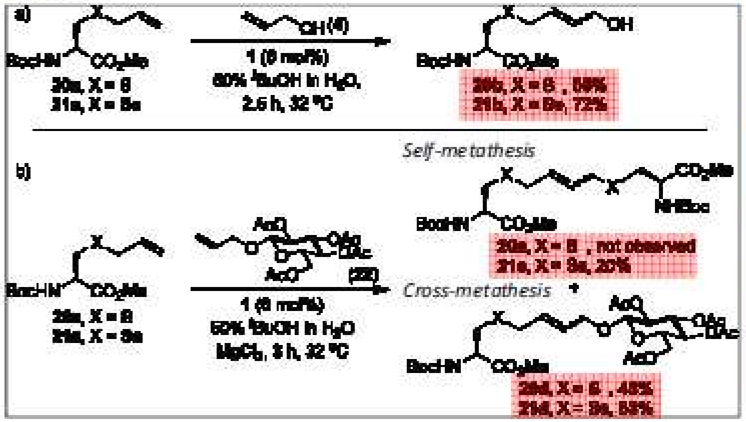
B. G. Davis *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16805-16811

4-3. Olefin metathesis (2)-3

4. Others



S vs Se



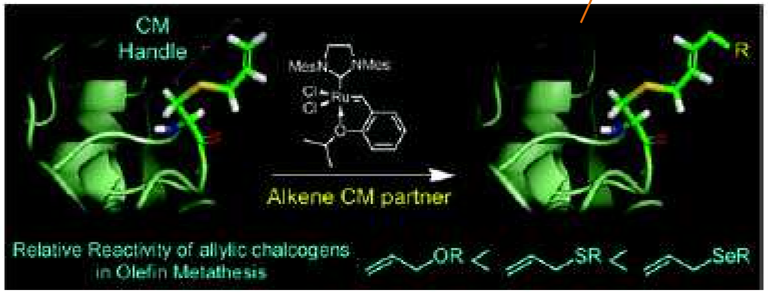
Entry	Alkene (mM)	Conditions	Prod.	Conv. (%)[a]	Conv. (S)
1	**4** (76)	RT, 15 mins	**25a**	>95	>95 (RT, 30 min)
2	**6** (77)	37 °C, 1 h	**25b**	>95	>95
3	**7** (74)	37 °C, 1 h	**25c**	>95	>95
4	**8** (77)	37 °C, 1 h	**25d**	>95	>95
5	**9** (77)	RT, 1 h	**25e**	>95	>95
6	**10** (85)	RT, 30 mins	**25f**	>95	>95
7	**11** (76)	37 °C, 30 mins	**25g**	>95	29
8	**12a** (73)	37 °C, 1 h	**25h**	>95	53
9	**13a** (77)	RT, 1 h	-	0 (Only self-metathesis)	0
10	**14** (82)	37 °C, 1 h	-	0	0
11	**15** (77)	37 °C, 30 mins	**25i**	90	0
12	**16** (74)	37 °C, 1 h	-	0	0

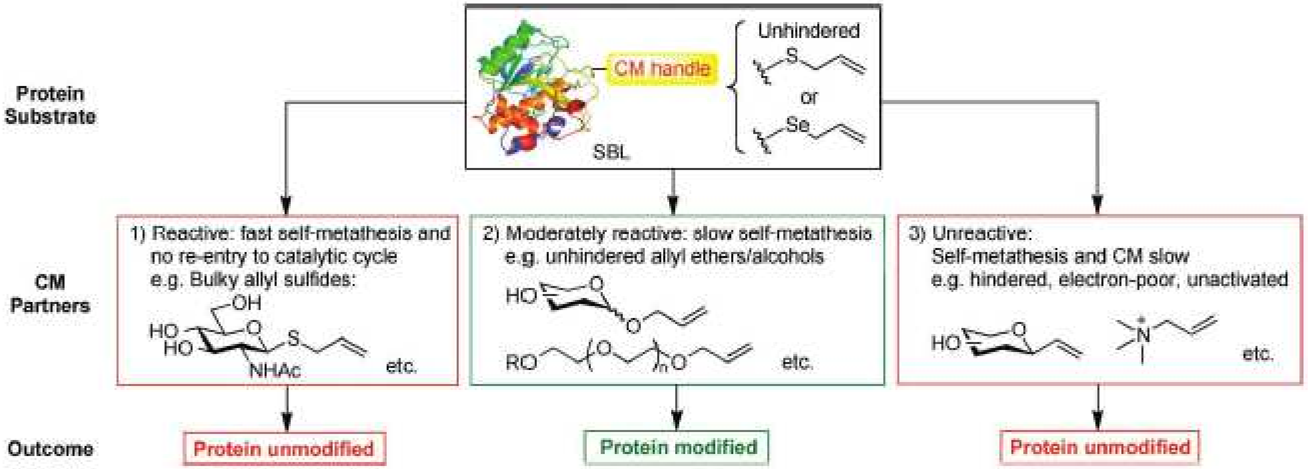
B. G. Davis *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16805-16811

Q. 片方が確実に過剰量必要なこの反応を生体に適応するメリットはあるの?
A. 確かにこれは他のカップリング方法と比べて、
カップリング相手も同じ官能基を持っているので、
選択性を出すためには片方が必ず過剰量になる。意味がない可能性があります。

4-3. Olefin metathesis (2)-4

4. Others



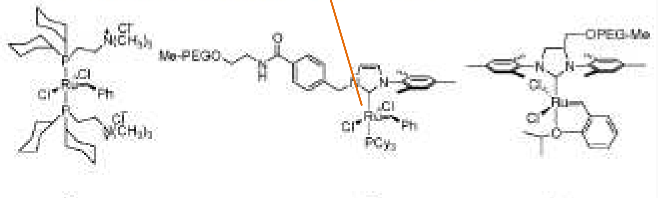


B. G. Davis *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16805-16811

Q. PEG付きのこれらはねっとりしてそうだが取り扱いが面倒じゃない?
A. 論文中で言及されてません。　確かにその問題がある可能性が高いと思います。

4-3. Olefin metathesis (3)

Water soluble Metathesis catalysts



2　3　4

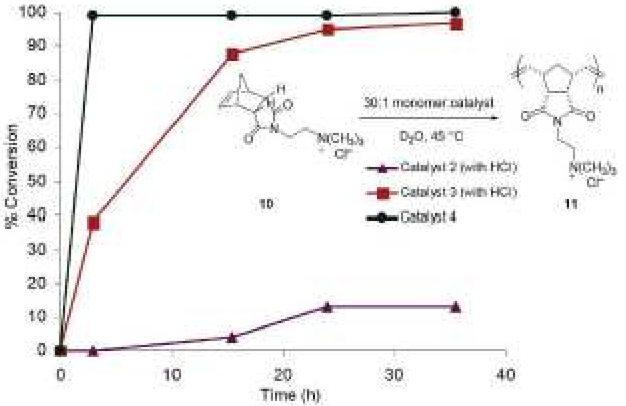


Figure 1. A comparison of the ability of water-soluble catalysts to polymerize *endo*-monomer **10** (data for catalyst **2** and **3** are obtained from ref 4).

Table 1. Ring-Closing Metathesis Reactions in Aqueous Media[a]

Entry	Substrate	Time	Product	Conversion
1	12	12 h	13	>95%
2	14	24 h	15	>95%
3	16	36 h	17 (+ 18)	67% (+28%)
4	19	24 h	20	42%
5	21	24 h	22	<5%

[a] Reactions were carried out at room temperature with 5 mol % of catalyst **4** and an initial substrate concentration of 0.2 M in D_2O or H_2O. Conversions were determined by ^1H NMR spectroscopy.

Table 2. Cross-Metathesis Reactions in Aqueous Media[a]

Substrate	Time	Product	Conversion
23	12 h	HO–CH2CH=CHCH2–OH	>95%[b]
24	12 h	25	94%[c]

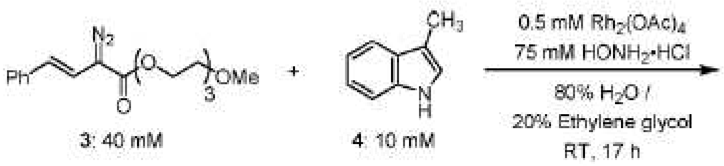
[a] Reactions were carried out at 45 °C with 5 mol % of catalyst **4** and an initial substrate concentration of 0.2 M in D_2O or H_2O. Conversions were determined by ^1H NMR spectroscopy. [b] $E/Z \sim 15:1$. [c] 6% of **24** remains due to thermodynamic equilibrium.

PEG : Poly Ethylene Glycol, MW≒2000

R. H. Grubbs *et al., J. Am. Chem. Soc.* ~~2010, 132, 16805-16811~~ 2006, *128*, 3508-3509

4-4. Rh carbenoid

Also see Mr Suzuki's Literature Seminar (2013)



51% (**5**:**6** = 1:1.4)

R = $(CH_2CH_2O)_3CH_3$

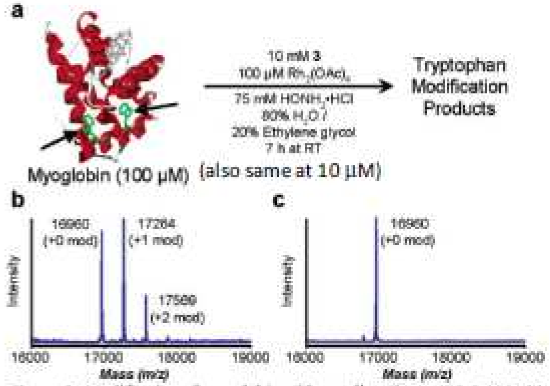
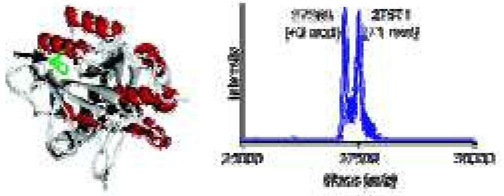


Figure 1. Modification of myoglobin with metallocarbenes. (a) A 100 μM solution of horse heart myoglobin was exposed to **3** and $Rh_2(OAc)_4$ for 7 h. The two tryptophan residues are shown in green. (b) Following removal of the small molecules via gel filtration, the sample was analyzed by ESI-MS. Both singly and doubly modified protein products were identified in the mass reconstruction. (c) In the absence of $Rh_2(OAc)_4$, no products were obtained under otherwise identical conditions. (d) After digestion with trypsin, MS/MS analysis of the doubly modified peptide fragment confirmed modification of only the tryptophan residues. All assigned species agree to within 0.1% of the expected mass values.



Subtilisin Carlsberg (100 μM)

Figure 2. Modification of subtilisin Carlsberg with rhodium carbenoids. Conditions: 100 μM protein, 10 mM **3**, 100 μM $Rh_2(OAc)_4$ and 75 mM $HONH_2$·HCl (pH 1.5) in 80% water/20% ethylene glycol, rt, 7 h. Following removal of the small molecules via gel filtration, the sample was analyzed using MALDI-TOF MS. Only the singly modified protein was observed, as would be expected by the single tryptophan residue (shown in green). In the absence of $Rh_2(OAc)_4$, no reaction occurred under otherwise identical conditions.

These have no Cys・・・Selective?

M. B. Francis *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10256-10257

Contents

1. Introduction

2. Redox catalyst

3. Pd catalyst

4. Others

5. Summary

5. Summary

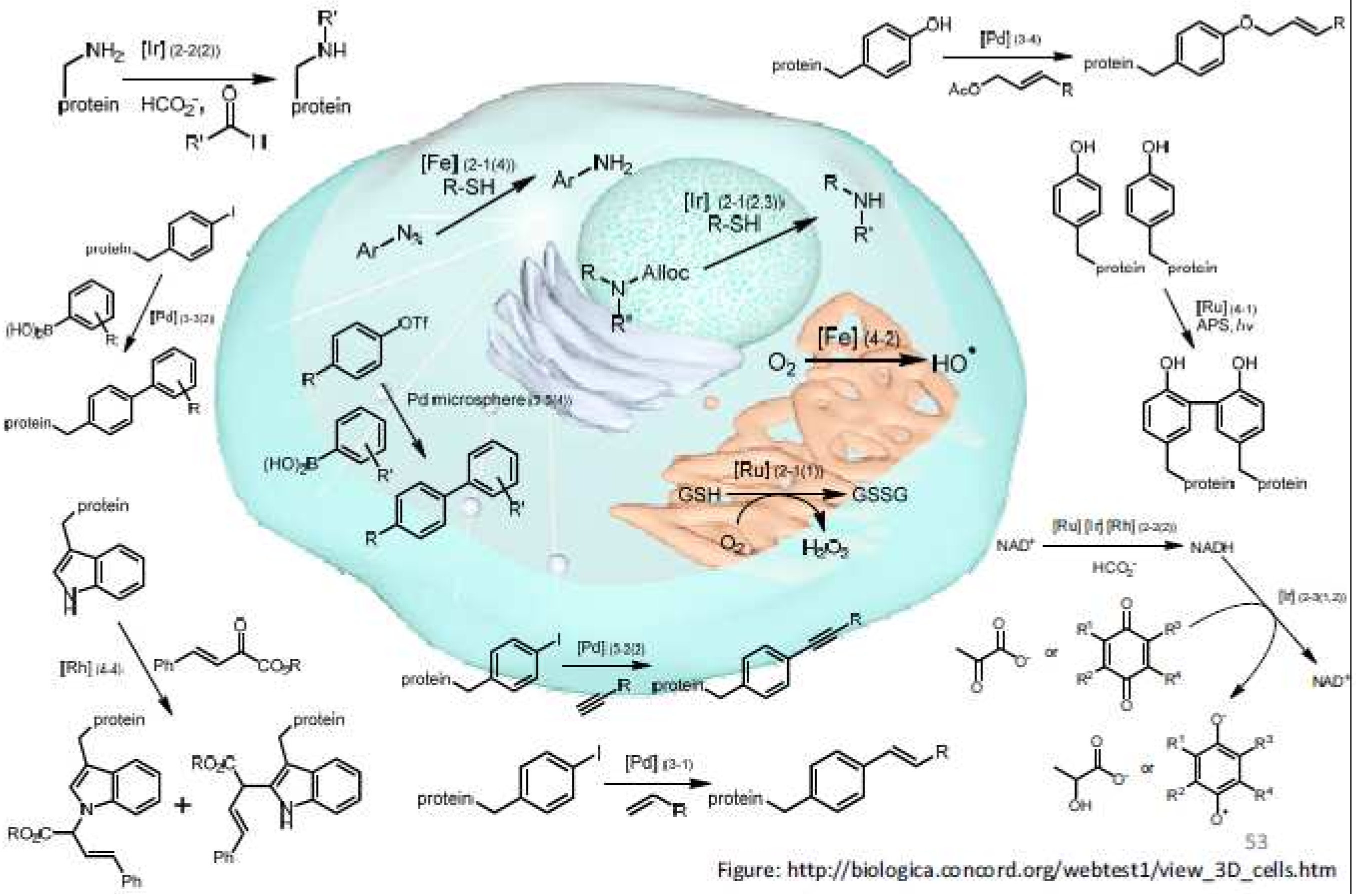


Figure: http://biologica.concord.org/webtest1/view_3D_cells.htm