

# THE CHEMICAL TIMES

2026 No.1 (通巻279号)  
ISSN 0285-2446

02 新年を迎えて 代表取締役社長 野澤 学

特 集

クリックケミストリーの展開

## 03 DACN(ダックン)の開発と応用

九州大学 河崎 悠也  
熊本大学 井川 和宣  
九州大学 友岡 克彦

## 12 多機能分子創製のためのマルチクリック反応

東京科学大学 細谷 孝充

## 20 クリック反応を基盤とした小型蛍光分子 1,3a,6a-Triazapentaleneの開発と応用

大阪大学 難波 康祐

## 26 in situ クリックケミストリーを利用した 酵素阻害剤の探索

北里大学 廣瀬 友靖



KANTO CHEMICAL CO., INC.



# 新年を迎えて

代表取締役社長 野澤 学

あけましておめでとうございます。

「THE CHEMICAL TIMES」の読者の皆様におかれましては、つつがなく良い新年を迎えられたことと心よりお慶び申し上げます。

昨年は、米国政府による関税政策が国際経済に大きな波紋をもたらした1年でした。トランプ大統領による追加関税と、中国によるレアアース規制の問題では一時的に停戦となりましたが、米中間での貿易摩擦は世界市場に大きな影響を及ぼしています。一方、国内では10月に発足した高市政権による経済政策に期待が高まり、円安も追い風となって、日経平均株価は史上初の5万円台を突破するに至りました。日本初の女性指導者の誕生に国民は歓喜し、政治・経済への関心は高まっております。高市総理の「働いて働いて」の強い精神と、しなやかな心で内政や外交問題に力を発揮して欲しいと願っております。

ところで、2025年のノーベル生理学・医学賞は「制御性T細胞(Treg)の発見とその免疫制御機構の解明」により、大阪大学の坂口志文特別栄誉教授、米国研究機関のメアリー・ブランコウ氏、米国バイオ企業のフレッド・ラムズデル氏の3名が受賞しました。本研究は、自己免疫疾患やがん治療、臓器移植など、医療の根幹を揺るがす画期的な発見であり、生命科学と化学の融合がもたらす可能性を感じさせるものでした。また、ノーベル化学賞は「金属有機構造体(MOF)の開発」により、京都大学の北川進特別教授、豪州のリチャード・ロブソン教授、米国のオマー・ヤギー教授の3名が受賞しました。MOFは金属イオンと有機配位子が織りなす無数の多孔性結晶構造体で、ガスの分離・吸着・貯蔵、触媒反応、医薬品の担体など、多岐にわたる応用が期待され、まさに分子レベルで空間を設計できる技術は、持続可能な社会実現に向けた鍵となることでしょう。この二つの受賞は、毎日の研究に取り組む研究者や次の世代の若い方々に夢と希望を与える出来事であったと思います。受賞された皆様のご功績に敬意を申し上げますとともに、ますますのご活躍を祈念しております。

当社は1944年の創業以来、総合試薬メーカーとして、化学、医薬、電機、ライフサイエンス分野などの幅広い領域において、高品質の製品を供給しております。基礎研究に使用される試薬から、最先端の応用研究に必要な高純度試薬、機能性薬品、素材・材料などの開発に取り組んでまいりました。「すべては試薬から始まる」との信念のもと、科学の発展と人々の生活を支える企業として、これからも社会に貢献してまいりたいと考えております。

本誌は1950年の創刊以来、今号で279号となりました。本号では、『クリックケミストリー』をテーマに著名な先生方にご寄稿いただきました。

今後も本誌を通じて、読者の皆様に革新的な技術情報をお届けできるよう取り組んでまいります。

2026年「丙午年(ひのえうまどし)」が、闊達で常に前進する馬のごとく“躍動し幸多く舞う年”でありますようお祈りするとともに、今後のご支援、ご鞭撻のほど、よろしくお願い申し上げます。

# ダクン DACNの開発と応用

Development and Application of DACN

河崎 悠也

Yuuya Kawasaki

九州大学先端物質化学研究所 助教

Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyusyu University (Assistant Professor)

井川 和宣

Kazunobu Igawa

熊本大学大学院先端科学研究部 基礎科学部門化学分野 教授

Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University (Professor)

友岡 克彦

Katsuhiko Tomooka

九州大学先端物質化学研究所 教授

Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyusyu University (Professor)

KEYWORD ▶

クリック反応

中員環アルキン

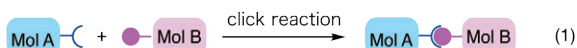
分子の複合化

受理日:2025年11月26日

## はじめに

01

現代の生物有機化学や機能性材料の研究において、クリック反応(click reaction)と総称される分子連結法が重要な役割を果たしている(式1)。



クリック反応とは2001年にSharplessらによって提唱された分子連結の概念であり、以下の条件を満たすものと定義されている<sup>1)</sup>。

- a) モジュールタイプで適用範囲が広い反応であること
- b) 立体特異的な反応であること
- c) 反応条件が単純であること(理想的には酸素と水に影響されない)
- d) 容易に入手できる出発物質と反応剤を用いること
- e) 無溶媒か水など無害な溶媒、または容易に除去できる溶媒を用いること
- f) 簡単に精製できること(必要に応じて結晶化や蒸留などの非クロマトグラフィー法で精製できることが望ましい)
- g) 生成物が生理学的条件下で安定であること

なお、クリック反応という名称は2つの分子が選択的に結合形成する様子を、あたかもシートベルトのバックルが「カチッと音を立てて(clicking)」噛み合う様子に擬えて名付けられたとされている。SciFinderで「click reaction」をキーワード検索すると、Sharplessらによるクリック反応の提案以降、2004年頃から関連する論文が増え続け、近年は2,000報/年を超えており、活発な研究領域であることが伺える(図1)。

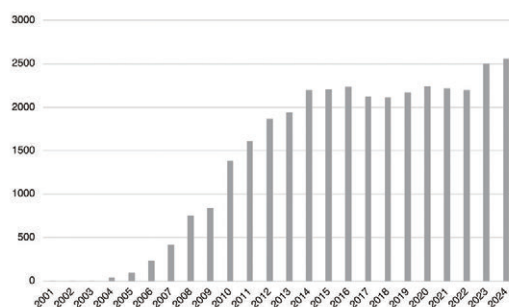


図1 クリック反応に関する論文数の推移

2003年、Bertozziらは生体条件と干渉しない反応のことをbioorthogonal reaction(生体直交型反応)と称した<sup>2)</sup>。それ以降、生体直交型クリック反応が注目されて多くの研究が成され、2022年には「クリック化学と生体直交化学の開発」に関する功績が讃えられて、Sharpless, Meldal, Bertozziの3氏にノーベル化学賞が授与された。



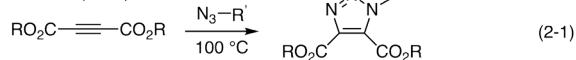
## Huisgen反応

02

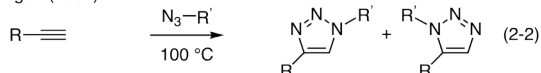
数あるクリック反応、生体直交型反応の中でも「アルキンとアジドの付加環化反応」、通称「Huisgen反応」は特に有名であり多用されている。ちなみにHuisgen反応と称されているので、Rolf Huisgenによって見出された反応と思われがちであるが最初の報告はMichael反応で著名なArthur Michaelによって1893年に成されている(式2-1)<sup>3)</sup>。その後、1960年代にHuisgenらによって詳細な検討が行われたためにHuisgen反応と称されるようになったと考えられる(式2-2)<sup>4)</sup>。本稿でもその慣例に従う。ただし、古典的なHuisgen反応は進行が遅く、実用的には加熱を必要とするためSharplessらが提唱したクリック反応とはかけ離れたものであった。これに対して、2002年にMeldalら、Sharplessらはそれぞれ独自に末端アルキンとアジドとのHuisgen反応が触媒量の銅塩の存在で劇的に加速され、室温下でも迅速に進行することを見出し、クリック反応としての有用性を明らかにした(式2-3)<sup>5)</sup>。この銅触媒を用いたHuisgen反応は、英語表記 Cu-catalyzed azide-alkyne cycloadditionの頭文字をとってCuAACと称されている。

### 古典的 Huisgen反応

Michael (1893)

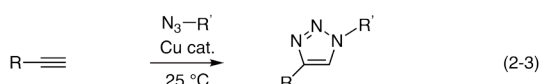


Huisgen (1961)

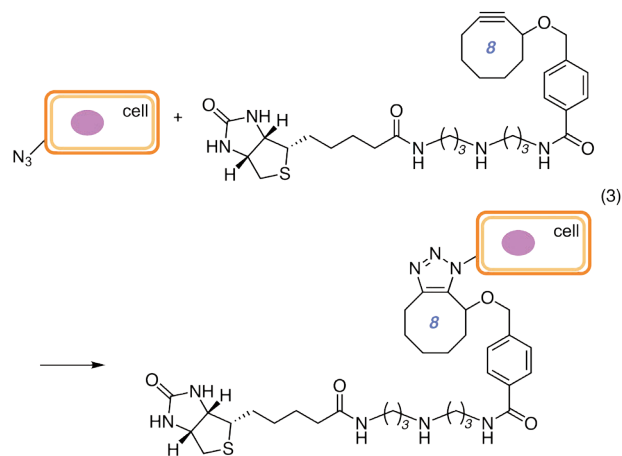


### CuAAC

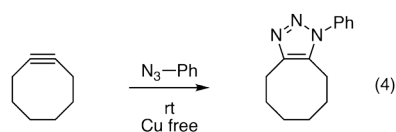
Meldal, Sharpless (2002)



CuAACは、水系中、夾雑系中であっても迅速かつ直交的に進行する優れた反応であるが、用いる銅塩が高い細胞毒性を有するために、生細胞を用いた研究などへの応用は困難であった。この問題を回避する方法の一つとして2004年にBertozziらは、「歪みを有する中員環アルキンとアジドとのHuisgen反応」が銅塩が無くとも室温下で迅速に進行することを利用した「歪み促進型アジド-アルキン付加環化反応 [strain-promoted azide-alkyne cycloaddition (略称 SPAAC)]」の利用に着目した(式3)。彼らはアジド化した糖タンパク質を細胞表面に発現させたヒトJurkat細胞に対して、シクロオクチン誘導体(OCT)を導入したビオチン分子を作用させることで細胞のビオチンタグ化に成功した<sup>6)</sup>。

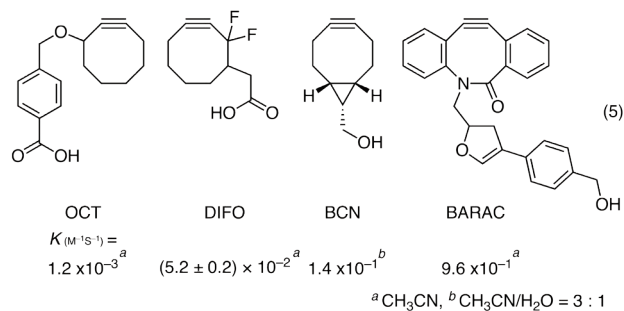


なお、シクロオクチンとアジドとの無触媒Huisgen反応は1961年にWittigらによって最初の報告が成されている(式4)<sup>7)</sup>。



Bertozziらの報告を契機として、SPAACを利用する生化学研究が大いに発展した。また、OCTのHuisgen反応性をより向上させるために、プロパルギル位にフッ素を導入したDIFO<sup>8a)</sup>やシクロプロパン環やベンゼン環を導入することで歪みを増大させたBCN<sup>8b)</sup>、BARAC<sup>8c)</sup>等が開発された(式5)。それらはベンジルアジドとの反応において、それぞれOCTのおおよそ40倍、120倍、800倍の反応速度を示す。

シクロオクチン誘導体とベンジルアジドとの反応速度



しかしながら、これらシクロオクチン誘導体はその高い反応性故に、自己多量化<sup>7)</sup>やアルキン部位へのチオール類の付加反応<sup>9)</sup>などを起こすために生体直交性に欠けるという本質的な問題も有していた(後述)。これに対して我々は、2015年、環内プロパルギル位に窒素官能基を有する9員環アルキン4,8-diazacyclononyne [略称 DACN (ダクン)] (1)とその一つの窒素原子を酸素原子に変えた4-aza-8-oxacyclononyne [略称 AOCN (アオクン)] (2)を開発した(図2, 3)<sup>10)</sup>。これらは、無触媒条件でアジドと迅速に反応するにも関わらず、熱的、化学的に安定であり、また高い生体直交性を有している。



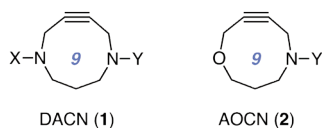


図2 DACNとAOCN

1893	A. Michael	アルキンとアジドの付加環化反応を報告
1961	Huisgen Wittig	1,3-双極子付加環化反応について詳細な研究 シクロオクテンとアジドが迅速に反応することを報告
2001	Sharpless	クリック反応の概念を提唱
2002	Meldal Sharpless	CuAACを報告
2004	Bertozzi	OCT誘導体を用いたSPAACによって 生細胞の標識化を達成
2015	our group	DACNを開発

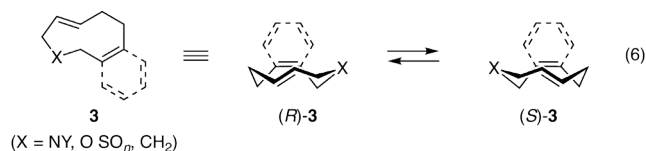
図3 Huisgen反応の発展

## DACN

03

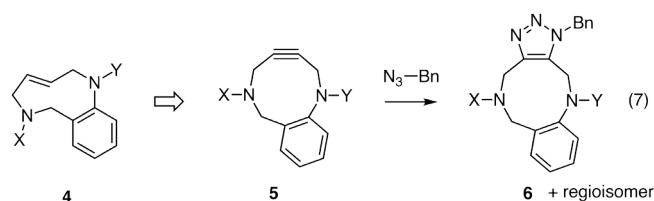
## 3-1. DACN開発の経緯

先に、我々の研究室では、ヘテロ中員環アルケン **3** が動的な面不斉を有していることを見出し、関連する化学について系統的な研究を行っていた(式6)<sup>11)</sup>。

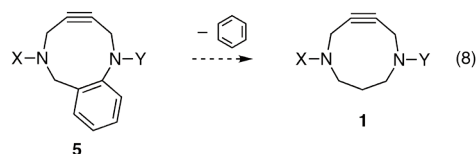


その過程で新たに、環内に二つの窒素原子を有するオルトシクロフェン **4** を設計し、その合成前駆体としてオルトシクロフィン **5** を設定した(式7)。

そのアルキン部位は大きく歪むであろうことから、かなり不安定かと危惧したが、合成、取り扱いともに特に問題は生じなかった。**5**を手にして改めてその構造を眺めるうちに「この分子は無触媒Huisgen反応に適しているのでは」と思い付いた。早速、室温下でベンジルアジドを作用させると反応が円滑に進行した。

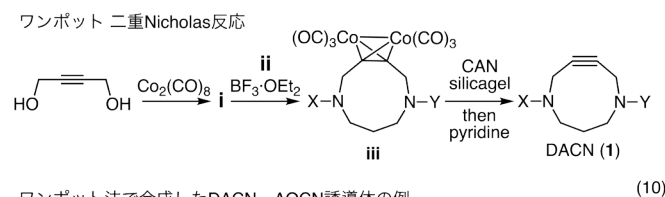
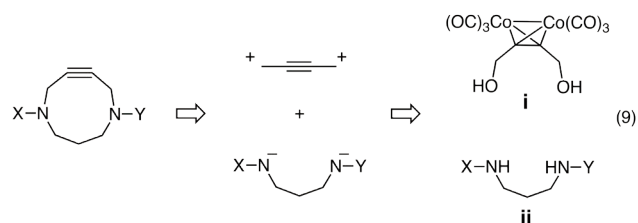


その後、水溶性を向上させるために、**5**のベンゼン環を取り除き、より単純化させることでDACN (**1**)に辿り着いた(式8)。

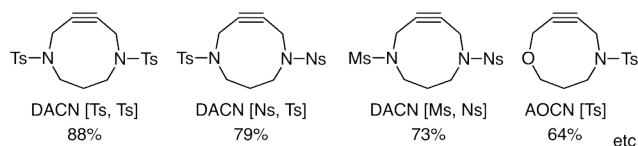


## 3-2. DACNの合成

4炭素のジカチオン種と1,3-プロパンジアミン誘導体間での2つのC-N結合の一挙形成による合成経路を立案した(式9、10)。



ワンボット法で合成したDACN, AOCN誘導体の例

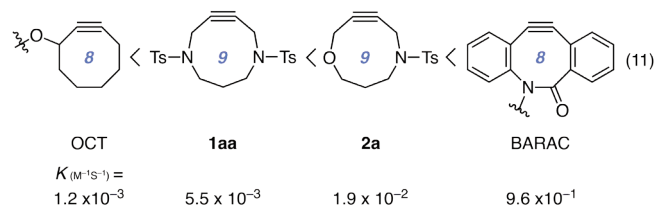


2-ブチン-1,4-ジオールに対してジコバルトオクタカルボニルを作用させてアルキンコバルト錯体 **i**<sup>12)</sup>を調製した後に、三フッ化ほう素・ジエチルエーテル錯体存在下に1,3-プロパンジアミン誘導体 **ii**を作用させると二重Nicholas反応が進行し、9員環アルキンコバルト錯体 **iii**を効率的に与えた。その後、硝酸二アンモニウムセリウム(IV) (CAN)を作用させてコバルト部位を除去することでDACN (**1**)を収率良く合成することに成功した。なお、本法はワンボットで実施でき、精製は再結晶のみで行えることから効率的である<sup>13)</sup>。また、ジアミン **ii**を変えることで様々なDACN誘導体を収率良く10グラム規模で合成することができる。なお、**ii**の代わりに3-アミノ-1-プロパノール誘導体を用いることでAOCN (**2**)も効率的に合成できる。

### 3-3. DACN, AOCNの反応性

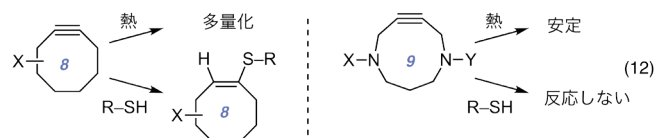
アセトニトリル中25 °C下におけるDACN [Ts, Ts] (**1aa**)とベンジルアジドとの反応速度定数は、 $5.5 \times 10^{-3}$ でありBARAC ( $9.6 \times 10^{-1}$ )には及ばないものの、OCT ( $1.2 \times 10^{-3}$ )の約4.6倍の反応性を有している(式11)。また、AOCN [Ts] (**2a**) ( $1.9 \times 10^{-2}$ )は**1aa**の3.5倍程度の反応性を示す。

中員環アルキンとベンジルアジドとの反応速度



### 3-4. DACNの安定性

前述の様にシクロオクチン誘導体が熱による多量化やアルキン部位に対するチオール類の付加反応を起こすのに対して、DACNは熱的、化学的に安定であり同様な条件に附しても有意な変化は観測されない(式12)。AOCNも同様に安定である。



DACNが一般には相反すると考えられる「安定性」と「反応性」を併せ持つ鍵は、環内プロパルギル位窒素の存在にある(図4)。すなわち、アルキンの折れ曲がりによって  $\sigma^*_{C-N}$  軌道とアルキンの  $\pi$  軌道の重なりが生じ、その軌道相互作用によって歪み構造が安定化される[図4 i)]。また、Huisgen反応の遷移状態では形成されつつある  $\pi^*$  軌道が  $\sigma^*_{C-N}$  軌道との軌道相互作用によって安定化されることから高い反応性が発現すると考えられる[図4 ii)]。

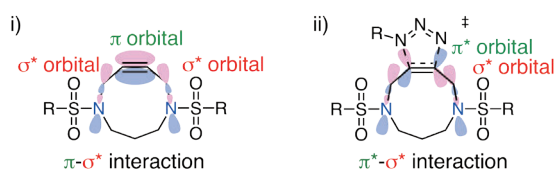
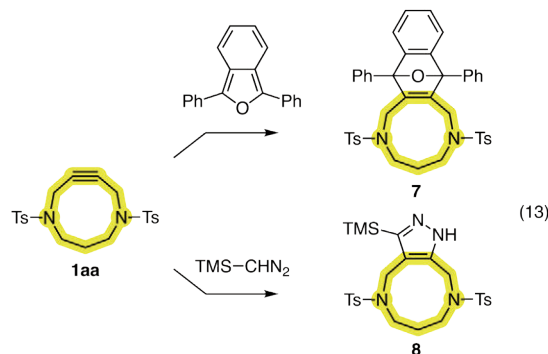


図4 DACNにおける軌道相互作用

### 3-5. DACN [Ts, Ts] (**1aa**)の応用例

[a] DACNはアジド以外の分子とも迅速に反応して付加環化生成物を与える(式13)。例えば、**1aa**に1,3-ジフェニルイソベンゾフランを作用させるとDiels-Alder反応生成物 **7**が、トリメチルシリルアゾメタンを作用させるとピラゾール **8**が得られる<sup>10)</sup>。



[b] 山田、田中らは4重ロタキサン結合により連結されたポルフィリン・フタロシアニン face-to-face型ヘテロ二量体 **9**を設計し、そのロタキサン部分を構築するために、**1aa**とアジドの無触媒Huisgen反応を利用した(図5)<sup>14a)</sup>。なお、銅触媒を用いたHuisgen反応を行うとポルフィリン・フタロシアニン部分に銅イオンが取り込まれてしまい、それを取り除くことや他の金属イオンへの交換が困難となる。**9**の鉄錯体は高いエタン酸化活性を示す。また、**9**の鉄錯体を含む超分子会合体はメタン酸化の強力な触媒となる<sup>14b)</sup>。

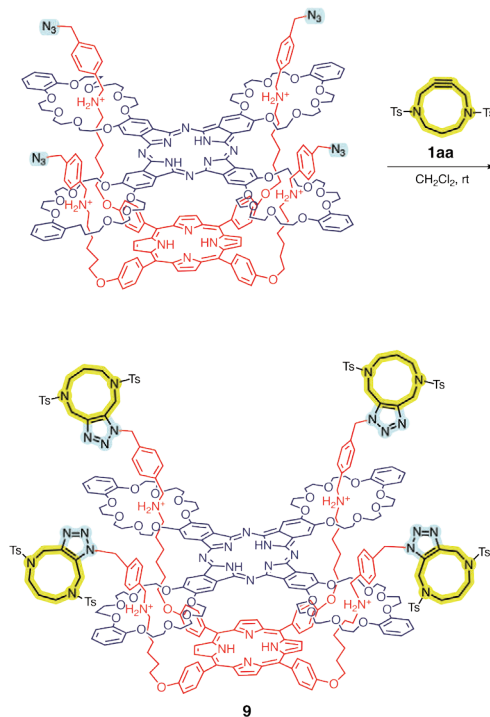


図5 ポルフィリン・フタロシアニン face-to-face型ヘテロ二量体 **9**の合成

### 3-6. 多様なDACN誘導体

[a] 水溶性DACNの開発研究の初期においては、合成とTLCでのUV検出の容易さからDACN [Ts] (**1a**)を多用していた。しかしながら、生体や生細胞などへの応用を考えると、Ts基の高高さや疎水性が問題となることが懸念された。そこでより親水性の高いDACNとしてDACN [Ms] (**1b**)を設計、合成した<sup>15)</sup>。その誘導体DACN-HCl [Ms] (**1ba**), DACN-GA [Ms] (**1bb**)の25 °Cにおける水への溶解度は、それぞれ57.4 wt%, 0.16 wt %であり、DACN-HCl [Ts] (**1aa**), DACN-GA [Ts] (**1ab**) (**1aa**: 19.3 wt%, **1ab**: N.D.)と比べて格段に高い(表1)。

表1 DACN [Ts]とDACN [Ms]の水溶性 (wt%)

Y = H·HCl	<b>1aa</b> : 19.3	<b>1ba</b> : 57.4
Y = COC <sub>3</sub> H <sub>6</sub> CO <sub>2</sub> H	<b>1ab</b> : N.D.	<b>1bb</b> : 0.16

[b] 多分子連結型DACN: DACNはその窒素原子上に様々な側鎖を導入することができる(図6)。側鎖に分子連結機能を導入すれば、多分子連結素子となる。我々は、その様な機能を有する多分子連結型DACN (DACN derived multi-molecule connector: DACN-MMC)として、DACN-HCl [Ms] (**1ba**)、DACN-NHS [Ms] (**1bc**)、DACN-Mal [Ms] (**1bd**)を開発した。**1ba**はカルボン酸との縮合によって、**1bc**はアミンとのアミド化によって、**1bd**はチオールとのthia-Michael反応によって Mol Aと連結できる。さらに、アジドを導入したMol BとのHuisgen反応を行うとMol AとMol Bの複合化が達成される。

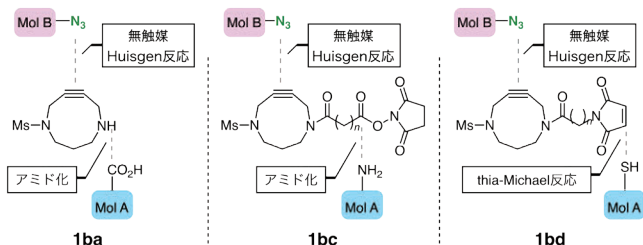


図6 DACN-MMC **1ba**, **1bc**, **1bd**

また、クリック反応性ペプチドの創出を目指して、DACN-(Fmoc-Asp) [Ms] (**1be**)、DACN-SPA [Fmoc] (**1c**)を開発した(図7)。これらはペプチド固相合成法に用いることができる。

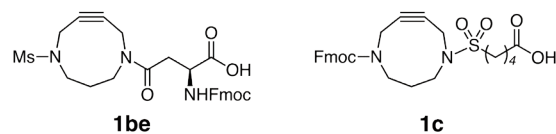


図7 DACN-MMC **1be**, **1c**

なお、AOCNもその窒素上に分子連結機能を導入することができ、種々のAOCN-MMCの開発にも成功している。

### 3-7. DACN-MMCを用いた生体分子複合化

[a] タンパク質間相互作用の制御に関与する14-3-3タンパク質の機能異常は、がんや神経変性など多様な疾患に関与していることが示唆されており、14-3-3タンパク質とリン酸化された天然変性タンパク質との相互作用を阻害することは新たな治療戦略として注目されている。この問題に対して大神田らは、14-3-3タンパク質の機能制御を目的としてfusicoccinとplasma membrane ATPase 2のリン酸化ペプチド(QSYpTV)との複合化を検討した(図8)<sup>16)</sup>。実際に、保護基を導入したQSYpTV **10**とDACN-HCl [Ms] (**1ba**)を縮合後、保護基を除去して得られたペプチド **11**に対してアジドを導入したfusicoccin **12**を作用させると迅速にHuisgen反応が進行して**13**を得ることに成功した。なお、ヒト結腸癌HCT116細胞に、**13**を作用させても活性を示さないのに対して、**11**と**12**を別々に作用させた場合は細胞毒性を示した。これらの結果は、**11**と**12**が細胞内に取り込まれた後に、細胞内で**13**を生成して、14-3-3タンパク質を制御したことを示唆している。

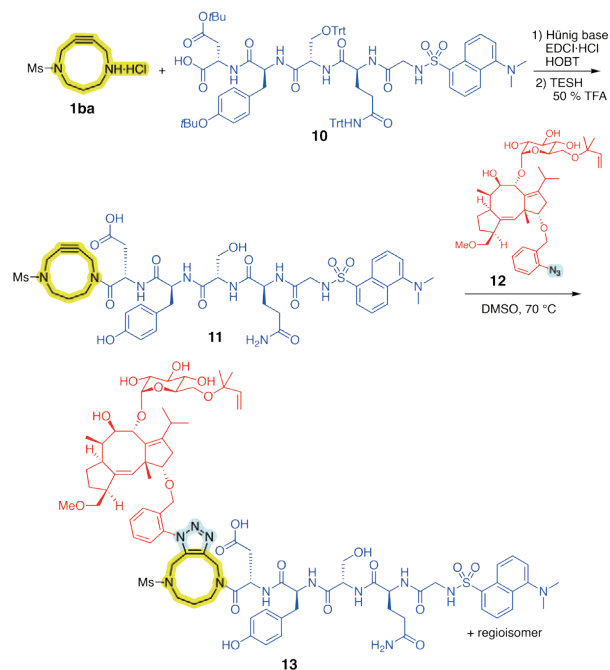


図8 fusicoccinとペプチドの複合化



**[b]** 生体分子のビオチンタグ標識化法の開発を目指して、ペプチドとビオチンの複合化を検討した(図9)<sup>17)</sup>。ヒキガエル属(*physalaemus*)のカエルから単離されたペプチドである *physalaemin* (**14**)に対してDACN-NHS [Ms] (**1bc**)を作用させると、そのリシン残基でのアミド化が進行してDACN-*physalaemin*複合体 **15**が得られた。さらに**15**にビオチンを有するアジド **16**を作用させることで *physalaemin*-ビオチン複合体 **17**の合成に成功した。

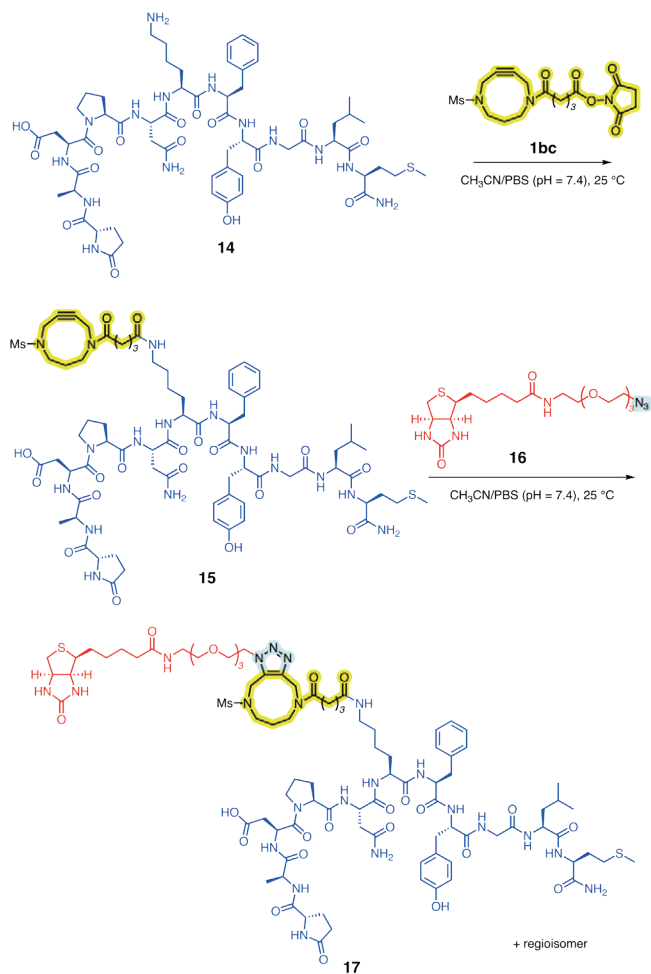


図9 *physalaemin*とビオチンの複合化

**[c]** 生体分子の蛍光標識化法の開発を目指して、ペプチドと蛍光色素の複合化を検討した(図10)<sup>17)</sup>。ペプチド固相合成によって調製したヘキサペプチド **18**に対してDACN-Mal [Ms] (**1bd**)を作用させるとシステイン残基でのthia-Michael反応が迅速に進行して対応するDACN-ペプチド複合体 **19**を与える。これに対して、蛍光色素基であるDANSYL基を有するアジド **20**を作用させることでペプチド-蛍光色素複合体 **21**の合成に成功した。

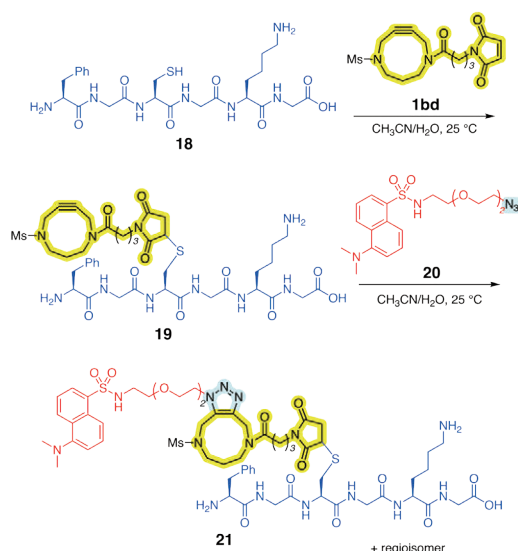
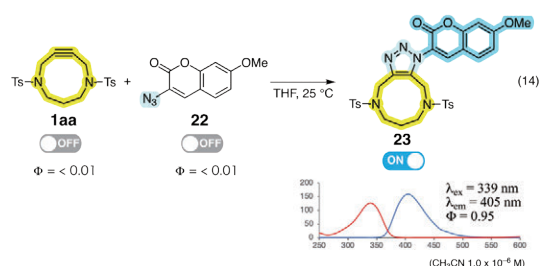


図10 ペプチドと蛍光色素分子の複合化

**[d]** 蛍光標識法では蛍光性反応剤が残存すると、バックグラウンドノイズを与え問題となる。この問題を回避する方法として、蛍光を示さない二つの分子がクリック反応によって連結すると蛍光性の分子となる「スイッチ型蛍光標識クリック反応 (switchable fluorescent click reaction: 略称 SFCR)」が考えられる。DACNを用いたSFCRの開発を目指して、DACNと3-アジドクマリンの反応を検討した結果、THF中、25 °Cにおいて、共に蛍光を示さないDACN [Ts, Ts] (**1aa**)と3-アジド-7-メトキシクマリン (**22**)を混合するとHuisgen反応が円滑に進行してトリアゾール **23**を得ることに成功した(式14)<sup>18)</sup>。



期待した様に**23**は蛍光を発した[最大励起波長 ( $\lambda_{ex}$ ): 339 nm、最大蛍光波長 ( $\lambda_{em}$ ): 405 nm]。その蛍光量子収率 ( $\Phi$  0.95)はSPAACで多用されているBARAC由来のクマリン誘導体のそれ ( $\Phi$ =0.34)よりも顕著に高い。同様にしてDACN-*physalaemin*複合体 **15**に対して9位ヒドロキシ基にビオチンを導入した3-アジドクマリン **24**を作用させるとHuisgen反応が進行して対応するビオチン-*physalaemin*複合体 **25**を得ることに成功した(図11)。UV測定(220 nm)では**15**, **24**に由来する

ピークが徐々に減少し、フィサラミン-ビオチン複合体 **25** に由来するピークが増加した(図12)。また、蛍光測定 ( $\lambda_{\text{ex}} = 339 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 405 \text{ nm}$ ) では**15**, **24**に由来するピークは認められず、両者を混合するとHuisgen反応生成物 **25** に由来するピークが生じて徐々に増加した。本法はバックグラウンド蛍光が無い生体分子の蛍光標識化法として有効である<sup>18)</sup>。

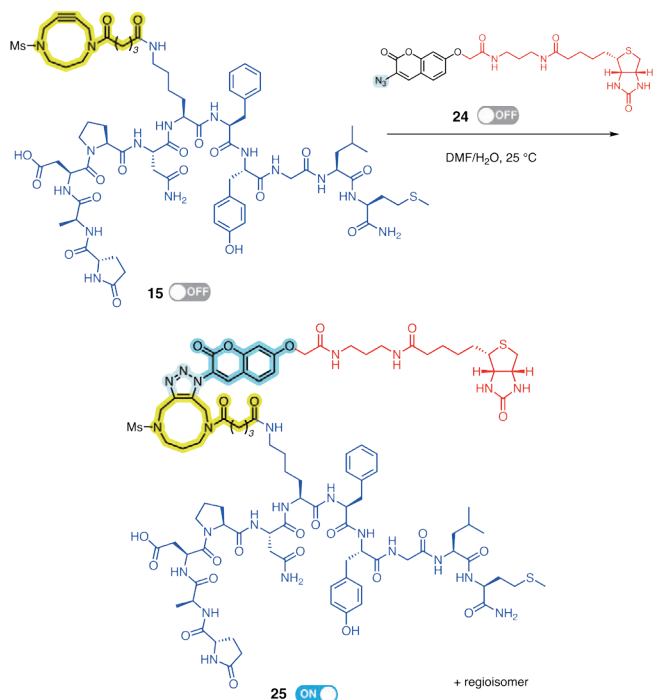


図11 SFCRIによるphysalaeminとビオチンの複合化

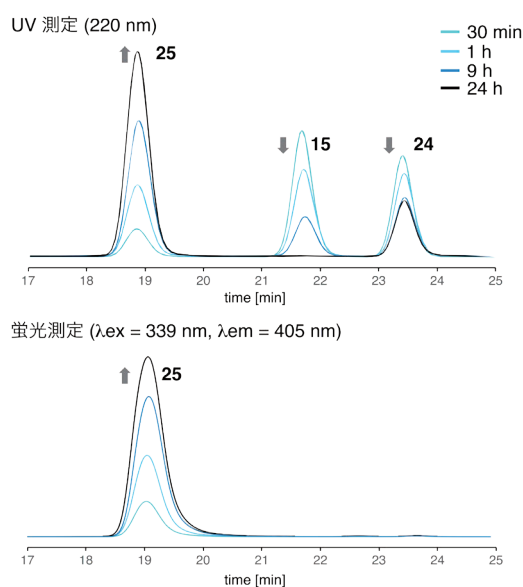


図12 **15**と**24**のSFCR (HPLC分析)

**[e]** ペプチドの望む位置にDACNを組み込んでおけば、後から位置選択的に多様な分子を連結、導入できる、と考えてDACN含有ペプチドの創製を検討した(図13)<sup>19)</sup>。トリチルレジンを用いたペプチド固相合成法により、DACN-SPA [Fmoc] (**1c**)をペプチド鎖に導入した後に、レジンから切り出すことでDACN含有ペプチド **26**を合成することに成功した。その反応の一例として、糖アジド **27**を作用させた結果、対応する糖ペプチド **28**を得ることに成功した。

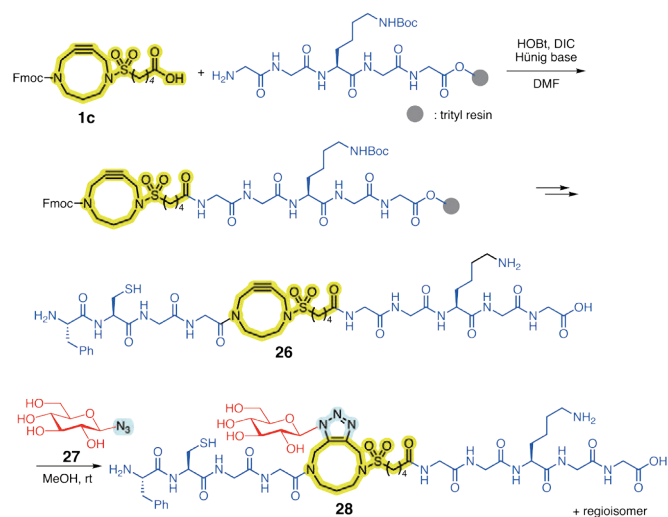


図13 糖とペプチドの複合化

**[f]** 北らは6-*N,N*-dimethylaminopyrene-*N*-acyl-*N*-alkylsulfonamide-DACNタグ (略称 dmpy-NASA-DACN) **29**を開発し、様々なリガンド解離型dmpyプローブを簡便に調製する手法を確立した(図14)<sup>20)</sup>。**29**とアジド化したリガンドとのHuisgen反応により得られたdmpy-NASAプローブ **30**を用いることで、細胞環境を模倣した条件下での標的タンパク質の効率的かつ特異的な標識化を達成した。さらに、dmpy基の疎水性を利用したポリスチレングル上でのインゲル消化およびアフィニティ精製を通じてdmpyラベル化ペプチド **31**をMALDI MSにより選択的に検出することにも成功した。

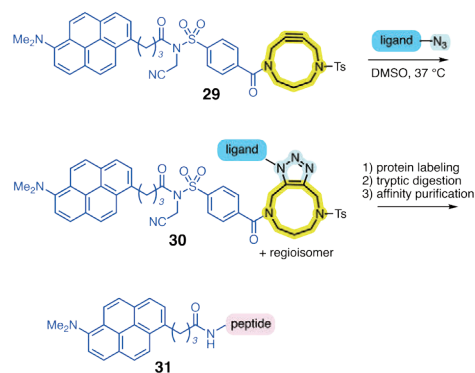


図14 dmpy-NASA-DACNタグの開発と応用

【g】 及川、入江らは海洋生理活性天然物 aculeine 類の作用研究の一環として蛍光標識化ポリアミンの合成を行った(図15)<sup>21)</sup>。ポリアミンの末端にDACNを導入した **32**とアジドを導入した蛍光色素分子 **33**とのHuisgen 反応を行うことで蛍光標識化ポリアミン **34**の合成を達成した。

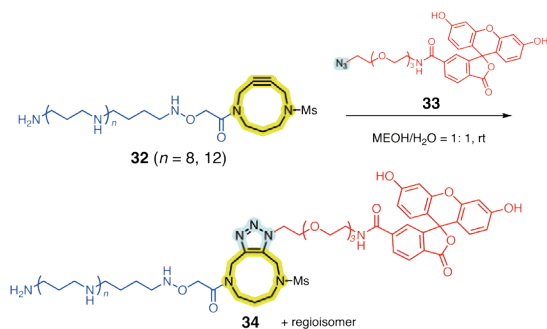


図15 ポリアミンと蛍光色素分子の複合化

【h】 Mamatらは2,2'-ジピコリルアミンを導入したDACN誘導体 **35**を設計、合成した(図16)<sup>22)</sup>。これに $[^{99m}\text{Tc}] [\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ を作用させることで $^{99m}\text{Tc}$ を導入したDACN **36**を調製し、これをアジド修飾した前立腺特異的膜抗原分子 **37**に作用させることで $^{99m}\text{Tc}$ 標識化誘導体 **38**の合成に成功した。

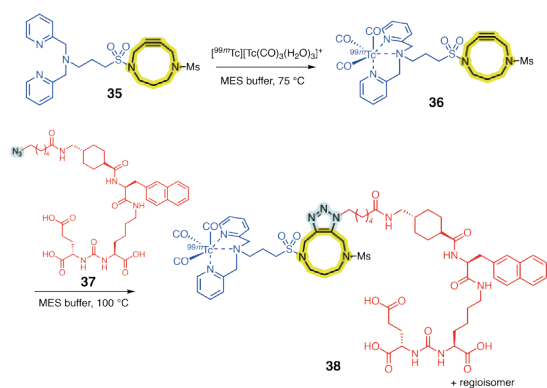


図16  $^{99m}\text{Tc}$ 標識化前立腺特異的膜抗原分子の合成

## おわりに

04

本稿ではクリック反応、特にHuisgen反応の歴史を概観するとともに、我々が開発したDACN, AOCNについてその開発の経緯、応用例について述べさせて頂いた。DACN, AOCNは優れた熱的、化学的安定性と高い無触媒Huisgen反応性とを併せ持ち、クリック反応素子として有用である。またそれらに分子連結部位を導入したDACN-MMC, AOCN-MMCは様々な生体分子や機能性分子の複合化に有用であり、ADCを含む医薬品の開発や生化学研究の道具として多様な応用が期待される。

## 謝辞

本稿で紹介した内容は共同研究者の皆さんの才能と努力の賜です。ここに謝意と敬意を表します。



## 参考文献

- H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 11, 2004-2021.
- H. C. Hang, C. Yu, D. L. Kato, and C. R. Bertozzi. A metabolic labeling approach toward proteomic analysis of mucin-type O-linked glycosylation. *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003, 100, 25, 14846-14851.
- A. Michael. Ueber die Einwirkung von Diazobenzolimid auf Acetylendicarbonsäuremethylester. *J. Prakt. Chem.* 1893, 48, 1, 94-95.
- R. Huisgen. 1,3-Dipolar Cycloaddition. *Proc. Chem. Soc.* 1961, 357-396.
- a) C. W. Tornøe, C. Christensen, and M. Meldal. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* 2002, 67, 9, 3057-3064. b) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, and K. B. Sharpless. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective Ligation of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 14, 2596-2599.
- N. J. Agard, J. A. Prescher, and C. R. Bertozzi. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide - Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 46, 15046-15047.
- G. Wittig and A. Krebs. On the existence of low-membered cycloalkynes. I. *Chem. Ber.* 1961, 94, 12, 3260-3275.
- a) difluorinated cyclooctyne (略称DIFO): J. A. Codelli, J. M. Baskin, N. J. Agard, and C. R. Bertozzi. Second-Generation Difluorinated Cyclooctynes for Copper-Free Click Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 34, 11486-11493.  
b) bicyclo[6.1.0]nonyne (略称BCN): J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. A. Hendriks, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, D. J. Lefeber, P. Friedl, and F. L. van Delft. Readily Accessible Bicyclononynes for Bioorthogonal Labeling and Three-Dimensional Imaging of Living Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 49, 9422-9425.  
c) biarylazacyclooctynone (略称BARAC): J. C. Jewett, E. M. Sletten, and C. R. Bertozzi. Rapid Cu-Free Click Chemistry with Readily Synthesized Biarylazacyclooctynones. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 11, 3688-3690.
- R. van Geel, G. J. M. Puijn, F. L. van Delft, and W. C. Boelens. Preventing Thiol-Yne Addition Improves the Specificity of Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition. *Bioconjugate Chem.* 2012, 23, 3, 392-398.
- R. Ni, N. Mitsuda, T. Kashiwagi, K. Igawa, and K. Tomooka. Heteroatom-embedded Medium-Sized Cycloalkynes: Concise Synthesis, Structural Analysis, and Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54, 4, 1190-1194.
- a) K. Tomooka, N. Komine, D. Fujiki, T. Nakai, and S. Yanagitsuru. Planar Chiral Cyclic Ether: Asymmetric Resolution and Chirality Transformation. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 35, 12182-12183.  
b) K. Tomooka, M. Suzuki, M. Shimada, S. Yanagitsuru, and K. Uehara. Planar Chiral Cyclic Amine and Its Derivatives: Synthesis and Stereochemical Behavior. *Org. Lett.* 2006, 8, 5, 963-965.  
c) K. Tomooka, C. Iso, K. Uehara, M. Suzuki, R. Nishikawa-Shimono, and K. Igawa. Planar-chiral [7]orthocyclophanes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 41, 10355-10358.  
d) 友岡克彦. 有機合成化学の芸術性. 有機合成化学協会誌. 2017, 75, 10, 1001.  
e) K. Igawa, K. Uehara, Y. Kawasaki, and K. Tomooka. Stereochemical study on planar-chiral cyclic molecules using polysaccharide-based column chromatography. *Chirality* 2022, 34, 6, 824-832.
- K. M. Nicholas. Chemistry and synthetic utility of cobalt-complexed propargyl cations. *Acc. Chem. Res.* 1987, 20, 6, 207-213.
- K. Igawa, S. Aoyama, Y. Kawasaki, T. Kashiwagi, Y. Seto, R. Ni, N. Mitsuda, and K. Tomooka. *Synlett* 2017, 28, 16, 2110-2114.
- a) N. Mihara, Y. Yamada, H. Takaya, Y. Kitagawa, S. Aoyama, K. Igawa, K. Tomooka, and K. Tanaka. Oxygen Reduction to Water by a Cofacial Dimer of Iron(III)-Porphyrin and Iron(III)-Phthalocyanine Linked through a Highly Flexible Fourfold Rotaxane. *Chem. Eur. J.* 2017, 23, 31, 7508-7514.  
b) Y. Yamada, K. Morita, N. Mihara, K. Igawa, K. Tomooka, K. Tanaka. Catalytic methane oxidation by a supramolecular conjugate based on a  $\mu$ -nitrido-bridged iron porphyrinoid dimer. *New J. Chem.* 2019, 43, 11477-11482.
- Y. Kawasaki, Y. Yamanaka, Y. Seto, K. Igawa, and K. Tomooka. Synthesis of NMs-DACN: Small and Hydrophilic Click Reaction Device. *Chem. Lett.* 2019, 48, 5, 495-497.
- R. Masuda, Y. Kawasaki, K. Igawa, Y. Manabe, H. Fujii, N. Kato, K. Tomooka, and J. Ohkanda. Copper-Free Huisgen Cycloaddition for the 14-3-3-Templated Synthesis of Fusicoccin-Peptide Conjugates. *Chem. Asian J.* 2020, 15, 6, 742-747.
- Y. Kawasaki, T. Hayashibara, Y. Seto, Y. Taniguchi, K. Igawa, and K. Tomooka. Development of DACN-NHS-ester and DACN-maleimide, and their application for the synthesis of artificial hybrid biomolecules. *Chem. Commun.* 2023, 59, 11724-11727.
- Y. Kawasaki, T. Hayashibara, K. Igawa, K. Onizuka, F. Nagatsugi, and K. Tomooka. DACN-Based Switchable Fluorescent Click Reaction. *J. Org. Chem.* 2025, 90, 39, 13969-13975.
- 河崎悠也, 河原慎太郎, 瀬戸祐樹, 井川和宣, 友岡克彦, N-Fmoc アミノ酸型 DACN 誘導体の合成とその応用, 日本化学会第 98 春季年会 (千葉, 2018-3-20/23, 日本化学会), 4H4-40.
- T. Tsuda, A. Arai, and M. Kita. Ligand-Dissociation-Type N,N-Dimethylaminopyrene Probes for In-Situ Site-Specific Protein Labeling. *Chem. Asian J.* 2022, 17, 18, e202200631.
- 及川雅人(横浜市立大), 私信.
- M. Schlesinger, C. Jentschel, H.-J. Pietzsch, K. Kopka, and C. Mamat. Copper-free click bioconjugation of technetium-99m complexes using strained cyclononyne derivatives. *Dalton Trans.* 2023, 52, 3024-3032.

# 多機能分子創製のための マルチクリック反応

Multi-Click Reactions for the Synthesis of Multifunctional Molecules

細谷 孝充  
Takamitsu Hosoya

東京科学大学総合研究院生体材料工学研究所 教授  
Laboratory for Biomaterials and Bioengineering, Institute of Integrated Research, Institute of Science Tokyo (Professor)

KEYWORD ▶

クリック反応

アジド

アルキン

受理日:2025年10月16日

## はじめに

01

有機合成は、分子と分子を連結して新たな分子を組み上げる工程を繰り返すことで、最終的には何らかの機能を持つ(と期待される)物質を生み出すことを目的に行われる。そのためには、連結するそれぞれの分子における特定の部位同士だけを結合させる必要があり、有機合成の歴史はその手法開発の歴史とも言える。

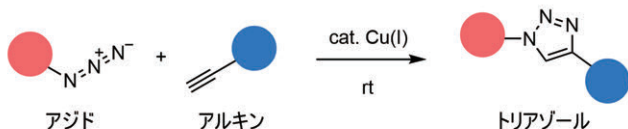
Sharplessらによりクリックケミストリーの概念が提唱<sup>1)</sup>されて以降、数多くのクリック反応が手軽に利用できる分子連結手法として開発された。その代表例が、銅触媒を用いたアジドと末端アルキンとのHuisgen型付加環化(Cu(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition; CuAAC)反応である(図1A)<sup>2)</sup>。また、触媒を必要としない、より簡便な手法として、シクロオクチンなどの中員環アルキンの歪みの解消を駆動力とするアジドとの付加環化(Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition; SPAAC)反応がBertozziらにより報告された(図1B)<sup>3)</sup>。これらの

トリアゾール形成反応をはじめとするクリック反応は、アジドとアルキンといった決まった官能基の組み合わせでのみ反応が進行する。その高い官能基許容性や、水中、室温、空気下といった条件下で行える簡便さから、材料科学、生命科学、創薬など幅広い研究分野で汎用されるようになり、2022年のノーベル化学賞の対象となった。

クリック反応は、機能性分子の創製に便利である。例えば、タンパク質を蛍光色素で化学修飾したいときには、アジド基を導入したタンパク質を用意し、これにアルキン部位を有する蛍光色素を用いてクリック連結すればよい。アジド基導入タンパク質の調製に関しては、タグタンパク質を利用する手法や、アジド基を有する非天然アミノ酸をタンパク質に組み込む手法などが開発されている。一方、機能性アルキン、とくにクリック反応において、より便利な機能性環状アルキンの合成は各論的であり、目的に合わせてその都度、対応する機能性環状アルキンを合成する必要がある。それには活性エステルと機能性アミンとの縮合反応による合成が一般的だが、機能性部位の種類によっては適用が難しいケースがあり、また、複数の機能性部位の連結も容易ではない。

これに対して、筆者らは、機能性クリック素子の合成にも官能基許容性が高いクリック反応を利用することを考えた。本稿では、多機能分子を簡便に創製するために、これまでに筆者らが開発したアジドやアルキンの反応性制御にもとづく様々なマルチクリック反応を紹介したい。

### A CuAAC反応



### B SPAAC反応

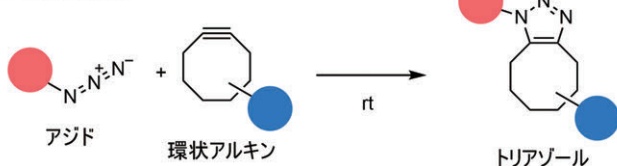


図1 代表的なクリック反応

## ダブルクリック反応

02

### 2-1.Sondheimerジインを利用する手法

機能性環状アルキンを簡単に合成する作戦として最初に思い

ついたのは、歪みアルキン部位を二つ有するSondheimerジインの利用である。機能性アジドと等モル量のSondheimerジインを反応させることで、一方のアルキン部位のみと反応した機能性環状アルキンを(収率はともかく)得ようと考えた。しかし、期待に反して、低分子アジド化合物を用いた検討では、ダブルクリック生成物であるビストリアゾールとジインが回収され、モノクリック生成物は全く得られなかった(図2A)。この結果は、ジインよりも中間体であるモノインの方がアジドとの反応性が著しく高いことを示しており、それは密度汎関数理論(DFT)計算による解析からも支持された。それでもSondheimerジインと二種の低分子アジドの混合物との反応からは、ヘテロなダブルクリック生成物が中程度の収率で得られたので、ジインを介したアジド基導入タンパク質と小分子蛍光性アジド化合物の連結を試みた。その結果、効率よく蛍光修飾タンパク質を得ることができた(図2B)<sup>4)</sup>。意外なことに、アジド基導入タンパク質にジインを作用させても二量化体はほとんど生成せず、モノクリック中間体を利用できることが分かった。これは、反応基質の濃度が通常の有機化学反応よりも千倍以上低いことに加え、サイズの大きいタンパク質同士の反応が進行しにくいためであると考えられる。機能性アジド化合物は、合成が容易なものや、市販されているものが多いことから、このダブルクリック反応を用いることでアジド基導入タンパク質に対して様々な機能を簡便に付与できる。

## 2-2. 末端アルキンを有する環状アルキンを利用する手法: 一時的な環状アルキン保護法の開発

Sondheimerジインを利用する方法は簡便にタンパク修飾を行えるものの、当初目的としていた機能性環状アルキンは合成できなかった。これに対して我々は、環状アルキン部位と末端アルキン部位を有するジイン $\mathbf{1}$ において、末端アルキン選択的にクリック反応を行えないかと考えた。しかし、ジイン $\mathbf{1}$ にアジド化合物

物を作用させると、速やかに環状アルキン部位で反応してしまう(図3A)。そこで、ジイン $\mathbf{1}$ の環状アルキン部位を保護した後、末端アルキン部位でのクリック反応を行おうと考えた。検討の結果、環状アルキン $\mathbf{2}$ に対して銅塩を作用させることで環状アルキン-銅錯体 $\mathbf{3}$ を形成でき、これにアジド $\mathbf{4}$ を作用させても付加環化生成物 $\mathbf{5}$ は全く生成しないことを見出した(図3B)<sup>5)</sup>。しかも、アンモニア水やキレート試薬などを作用させることで、簡単に元の環状アルキンに戻せることも分かった。この一連の保護・脱保護の手法は様々な環状アルキンに適用できた。

次に、当初の目的であった、末端アルキン部位を有する環状アルキンを用いて、末端アルキン部位での選択的クリック反応を試みた。その結果、ジイン $\mathbf{6}$ に対して銅塩(2当量)を作用させた後、アジド $\mathbf{4}$ を加え、最後に、アンモニア水で処理することで環状アルキン $\mathbf{7}$ が高収率で得られた(図3C)。本手法では、末端アルキンとアジドとのクリック反応を触媒する銅塩が、一方では環状アルキンとアジドとの反応を阻害するという二つの役割を果たしている。実際、本手法を応用することで、蛍光部位やタンパク質といった機能を有するアジド化合物を対応する環状アルキンへと容易に変換することに成功している<sup>6)</sup>。

## 2-3. アジド基を有する保護された環状アルキンを利用する手法

筆者らは最近、環状アルキンの一つであるジベンゾアザシクロオクチン(DIBAC)の新規合成法を開発した<sup>7)</sup>。本手法の鍵は、ジアリールアセチレンジコバルト錯体を用いたPictet-Spengler反応による分子内環化と、それに続く脱コバルト化である。とくに後者については環状アルキンに適用できる温和な条件を見出すことに成功し、従来のDIBAC合成効率を大幅に改善することができた。この合成法はアジド基を有する基質にも適用でき、CuAAC反応でアジドを機能性部位に変換後、脱コバルト化することで機能性DIBACを容易に合成することができた(図4)。

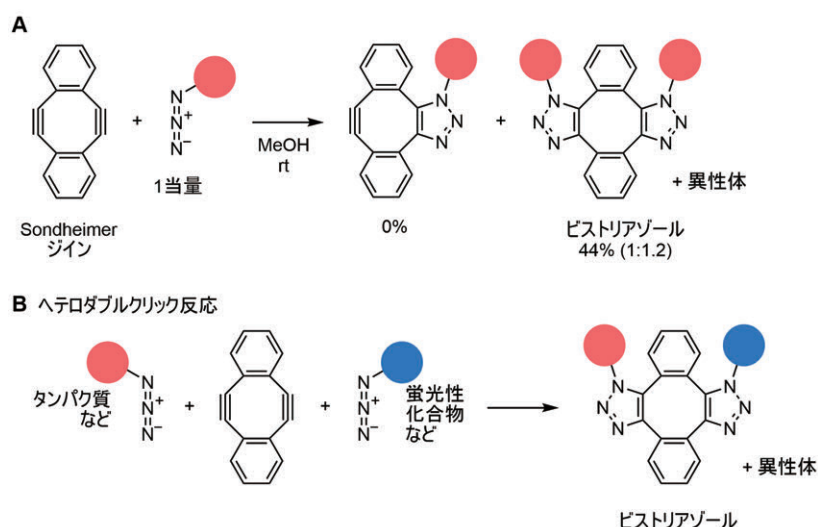


図2 Sondheimerジインを用いるダブルクリック反応



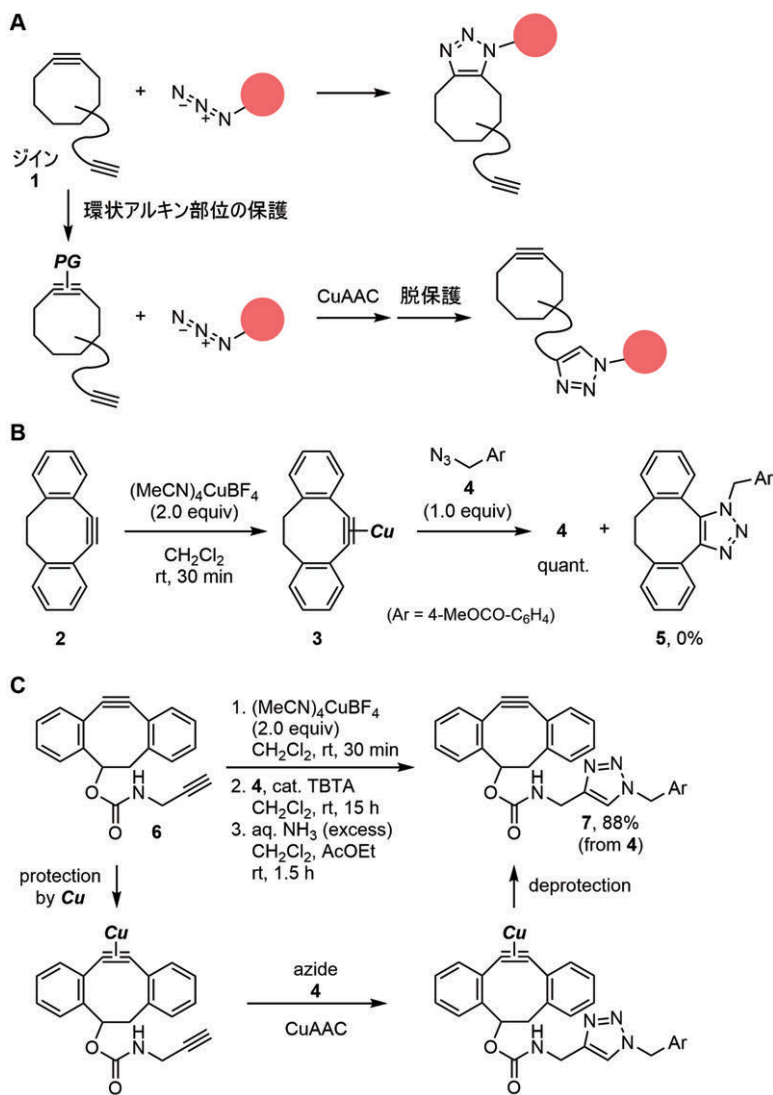


図3 銅塩による環状アルキンの保護を利用した機能性環状アルキンの合成

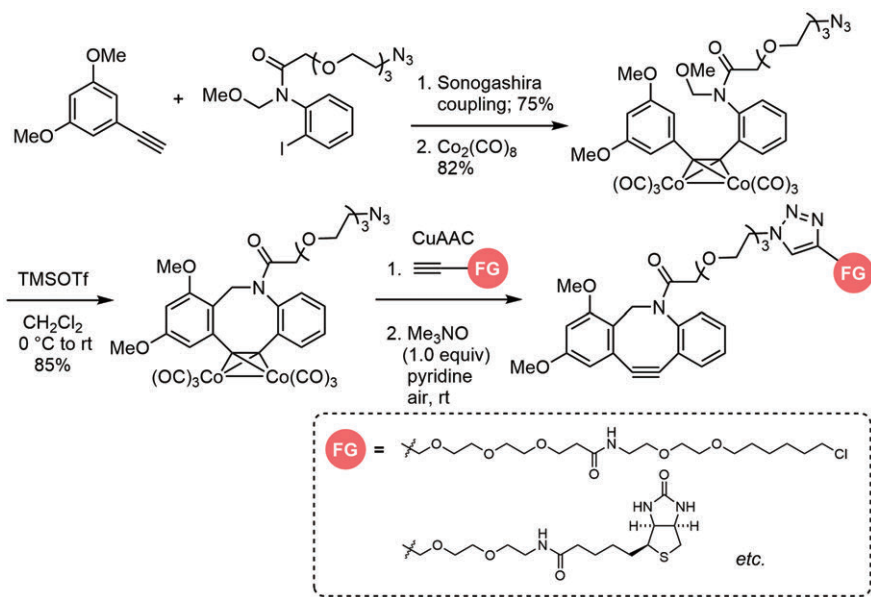


図4 アジド基を有するDIBACコバルト錯体の合成と応用

## 2-4.反応性の異なる二種のアジド基を有する化合物を利用する 手法:かさ高い芳香族アジド基の特異なクリック反応性の発見

Sondheimerジインを用いて様々なアジド化合物とのダブルクリック反応を検討中に、2,6-ジイソプロピルフェニルアジドが極めて速く反応することに気づいた。当初は、かさ高い芳香族アジドを用いれば反応性が大きく低下し、反応性の異なるアジド基を2つ有する化合物を用いることで逐次クリック反応を行えるのではないかと目論んでいたが、予想外の結果となった。Sondheimerジインとの反応速度を測定したところ、2,6-ジイソプロピルフェニルアジドが無置換のフェニルアジドより約75倍速く反応していることが分かった<sup>8)</sup>。そこで、ジアジド**8**を合成し、環状アルキン**2**と反応させたところ、高選択的にかさ高いアジド基側で反応が進行した(図5A)。その後の詳細な解析の結果、この「立体障害が反応性を高める」という一見すると不思議な現象は、両オルト位の置換基の立体効果により、アジド基とベンゼン環の共鳴が部分的に解除されているために起こることが分かった。また、電子供与能の高いアミノ基をかさ高い芳香族アジドのパラ位に配置することで環状アルキンとのクリック反応性をさらに高めることができ、反応選択性が向上することも見出した(図5B)<sup>9)</sup>。

一方で、2,6-ジイソプロピルフェニルアジドなどのかさ高い芳香族アジドは、他の形式のトリアゾール形成では反応が顕著に遅

いことも見出した。例えば、アセチリドは2,6-ジイソプロピルフェニルアジドよりもフェニルアジドと優先的に反応した(図5C)<sup>8)</sup>。これは同じトリアゾール形成であっても、環状アルキンとの協奏的な付加環化とアセチリドとの段階的な付加環化<sup>10)</sup>では立体障害が及ぼす影響が異なり、それが選択性の違いを生じさせたのである。

## マルチクリック反応

03

### 3-1.マルチアジドプラットフォーム化合物を用いる逐次トリアゾール形成

上述の結果を受けて我々は、3種以上のアジド化合物を区別して選択的に反応が行えるのではないかと考えた。そこでまず、かさ高い芳香族アジドである2,6-ジイソプロピルフェニルアジド、無置換芳香族アジドであるフェニルアジド、脂肪族アジドであるベンジルアジドの3種を混合し、それぞれと優先的に反応する反応相手(アジドフィル)との反応条件を探索した。様々なトリアゾール形成反応を調べた結果、ジベンゾシクロオクチンとの協奏的な反応では2,6-ジイソプロピルフェニルアジドが、塩基触媒を

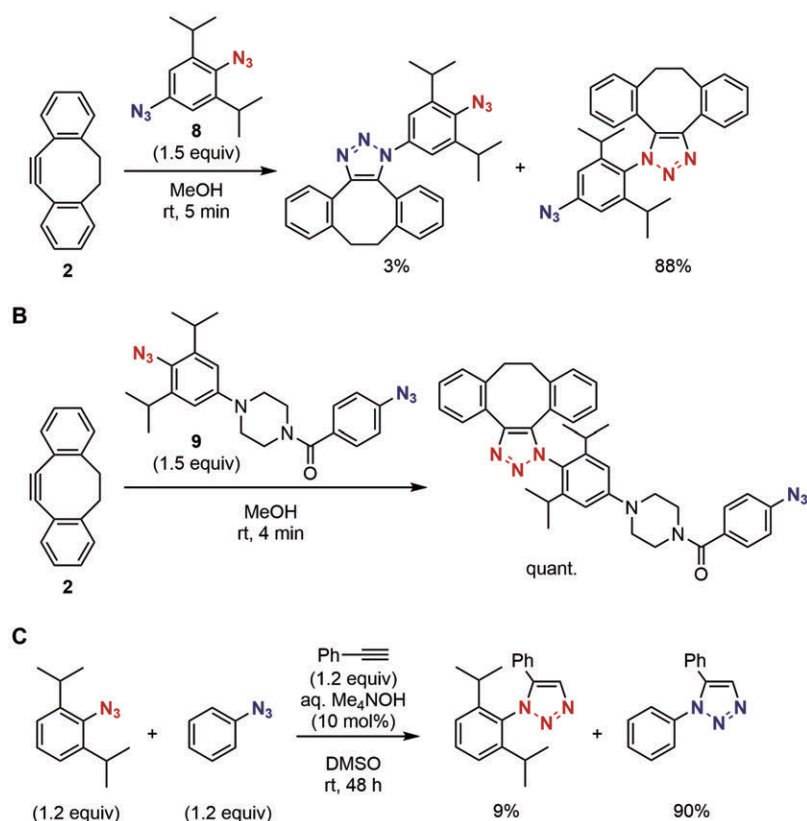


図5 かさ高い芳香族アジドを用いた選択的クリック反応

用いる1,3-ジカルボニル化合物とのアニオン付加型の反応<sup>11)</sup>ではフェニルアジドが、そしてルテニウム触媒を用いる末端アルキンとの反応ではベンジルアジドが、それぞれ高選択的に対応するトリアゾールを与えることを見出した(図6)<sup>12)</sup>。

次に、これら3種のアジド基を併せ持つトリアジド化合物**10**をプラットフォームとして用い、形式の異なる3種のトリアゾール形

成反応を連続して行ったところ、それぞれの反応が高選択的に進行し、トリストリアゾール**11**が得られた(図7A)。さらに本手法を、タンパク質を二重標識できる分子プローブの合成に応用した。具体的には、ジベンゾシクロオクチン構造を有するビオチン、蛍光団であるBODIPYが連結した末端アルキン、およびHaloTagタンパク質と共有結合可能なリガンド部位を有するβ-ケトアミド

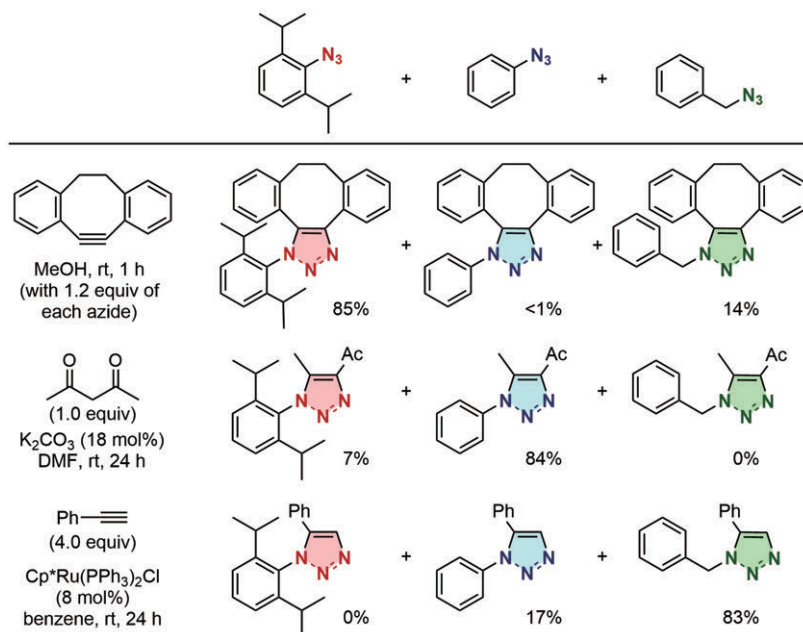


図6 異種アジド選択的クリック反応

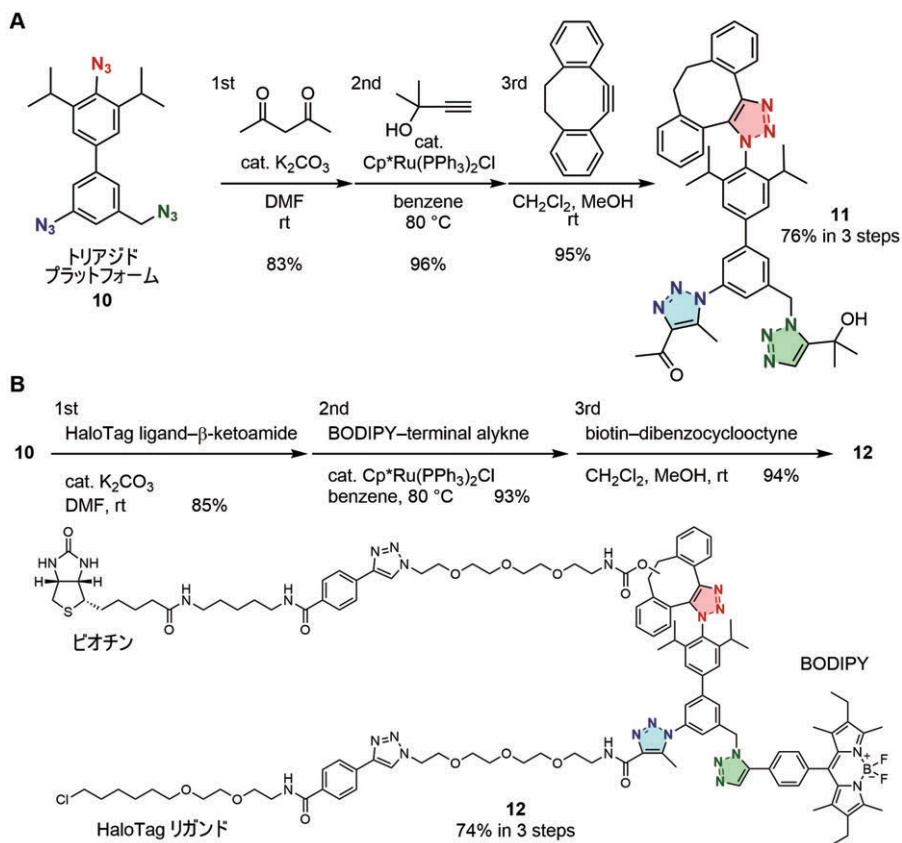


図7 トリアジドプラットフォームを用いる逐次連結



を用意し、それらを順次トリアジドプラットフォーム化合物と反応させた。この時、リンカー長の異なるユニットを用いて複数のプローブ候補分子を合成し、その中から蛍光およびストレプトアビジンによる検出感度が最も高いトリストリアゾール**12**を得ることができた(図7B)<sup>12)</sup>。

我々はさらに、本手法を拡張するために、上述のアジド3種と区別して利用できる第4のアジドを探索した。その結果、かさ高い脂肪族アジドである1-アダマンチルアジドがいずれの形式のトリアゾール形成反応においても著しく反応性が低いことを見出した<sup>13)</sup>。一方、反応は遅いものの、CuAACやSPAAC反応では、ほぼ定量的に対応するトリアゾールを与えた。そこで、これら4種のアジド基を有するテトラアジドプラットフォーム化合物**13**を合成し、形式の異なる4種のトリアゾール形成を連続して行ったところ、それぞれ高選択的に反応が進行し、テトラキストリアゾール**14**が高収率で得られた(図8)。また、本手法を用いて4種の機能性部位を有する分子量3000以上の化合物**15**を4工程で合成するこ

とも成功した。

さらに最近我々は、第5のアジドの探索も進めており、その過程で近接効果により加速されるトリアゾール形成反応を見出した。具体的には、2-アジドフェニルボロン酸(**16**)と*N*-プロパルギルジエタノールアミン(**17**)を混合するだけで、ボラート**18**の形成に伴い反応点が近づくことでトリアゾール**19**の形成が進行するというものである(図9)<sup>14)</sup>。本反応は、オルト位にボリル基がある場合にしか進行せず、他の添加剤なしで、中性、室温付近の温度で行えることから分子連結法として有望であると考えている。

### 3-2. トリアルキンプラットフォーム化合物を用いる逐次トリアゾール形成

マルチアジドプラットフォームは、それぞれのアジド基を区別する仕掛けを作る都合上、分子の構造がどうしても大きくなってしまい、水溶性が低くなるなどの懸念が生じる。これに対して我々は、2炭素であるアルキンユニットの小ささに着目し、コン

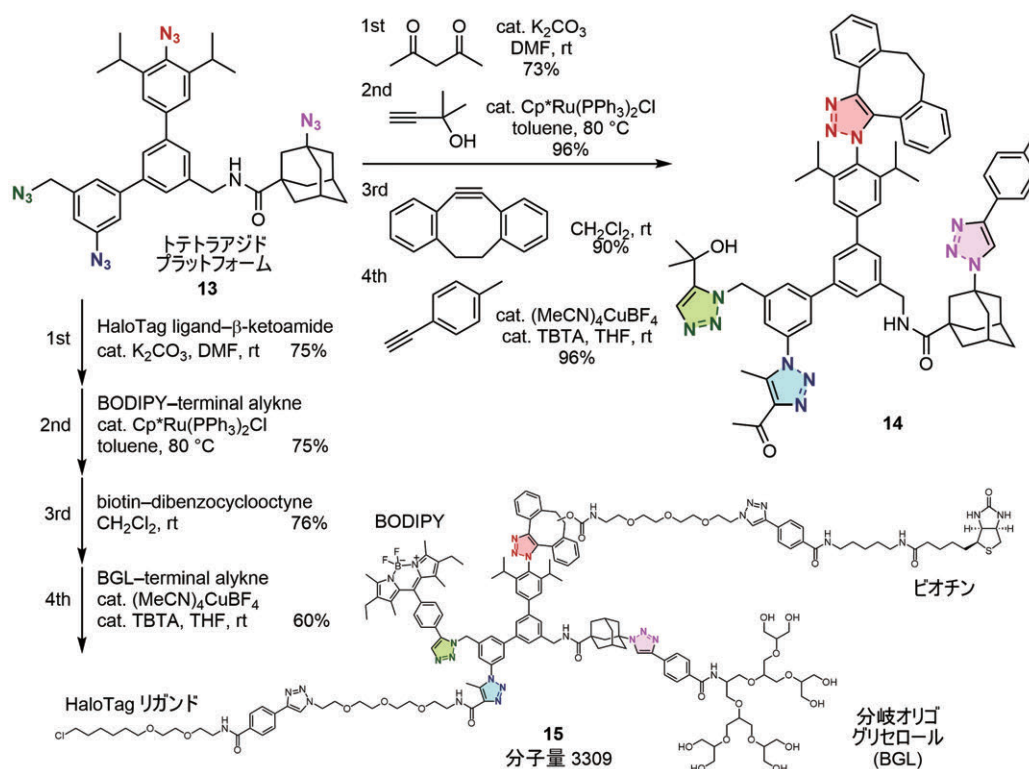


図8 テトラアジドプラットフォームを用いる逐次連結

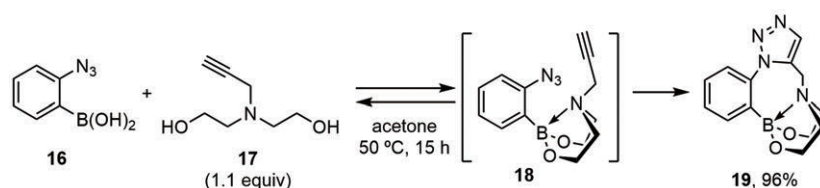


図9 ボラート形成を起点とするトリアゾール形成反応

パクトなマルチクリックプラットフォーム化合物の開発に取り組んだ。検討の結果、3-ブチニル基と1-トリメチルシリル-1,3-ブタジニル基を、硫黄原子を介して連結したトリアルキンプラットフォーム**20**を見出した(図10A)<sup>15)</sup>。このプラットフォーム化合物**20**には、末端アルキン、チオアルキン、シリル保護アルキンの3種のアルキンが含まれており、まずCuAAC反応を行うと末端アルキン選択的にトリアゾール形成が進行する。次にルテニウム触媒反応によるチオアルキン選択的なトリアゾール形成<sup>16)</sup>を行った後、保護アルキン部におけるシリル基の脱保護に続いてCuAAC反応を行うことでトリストリアゾールを得ることができる。実際、トリアルキン**20**に対して、HaloTagリガンド、ローダミン、ビオチンの各アジド誘導体を集積させたトリストリアゾール**21**を合成し、これを用いてHaloTagタンパク質の二重標識を行うことに成功した(図10B)。また、プラットフォームのコンパクトさを活用し、小分子化合物ライブラリーを構築できることもこの手法の利点である。例えば、トリアルキン**20**と3種類のアジドのみを組み合わせると、3種類のモノトリアゾール、18種類のビストリアゾール、27種類のトリストリアゾールと、最大で48種類のトリアゾール化合物を合成できる。我々は実際に、分子量が335から641の範囲にある16種類のトリアゾール化合物を合成し、化合物ライブラリーを構築した。

## おわりに

04

近年、生命科学研究や創薬研究などにおいて、多機能分子の重要性が増している。例えば、複数のイメージングモダリティを有する分子プローブを用いれば、同一個体においてほぼ同時に多面的な解析が可能になる。また、複数の薬剤を導入したマルチペイロード型の抗体薬物複合体(ADC)なども次世代医薬品として利用されていくものと考えられる。しかし、これら多機能分子の合成法は各論的であり、それらの開発に向けて利用しやすいマルチ反応型プラットフォーム化合物の開発が今後ますます重要になると考えられる。

そのような背景下、我々は多機能分子の開発に役立つ方法論の確立を目指して研究を行ってきた。本稿では、我々がこれまで開発した様々なマルチクリック反応を紹介した(一部、脱保護の工程を必要とする場合や、クリック反応の定義を厳密には満たしていない形式の反応を利用している場合もあるが、その点のご容赦いただきたい)。それぞれのトリアゾール形成は既知の反応であるが、同じアジドやアルキンであってもその置かれた環境や反応条件の違いで反応性が異なる複数の組み合わせを見出すとともに、適切なプラットフォーム化合物を設計し、それらを効率的に合成することで選択的な逐次反応を実現することができ

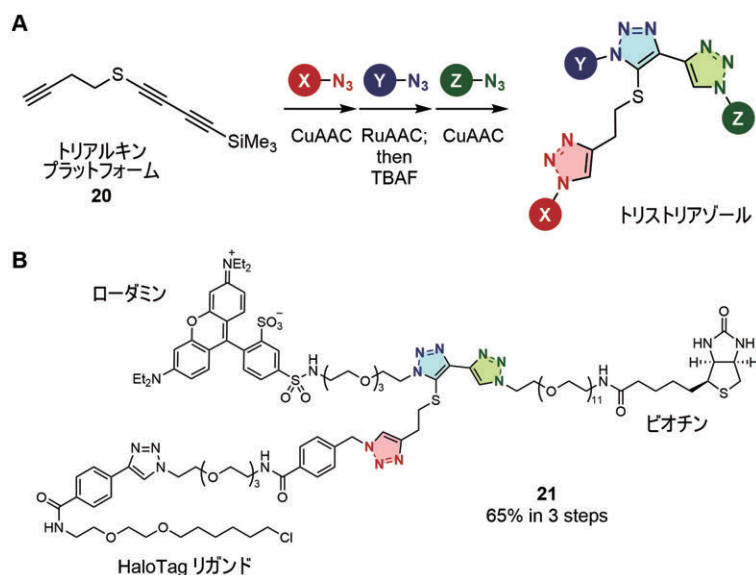


図10 トリアルキンプラットフォームを用いる逐次連結

た。様々な同族異種官能基選択的反応が知られているが、3回以上続けて分子連結ができる同族官能基は多くない。アジドやアルキンは、反応機構の異なる様々な反応が知られていることに加え、穏和な条件で進行するクリック(あるいはそれに準ずる)反応が行えることから、官能基許容性が高く、機能性部位の集積に適している。今後もアジドやアルキンをはじめとする生体直交型官能基の新たな反応性の開拓とそれを利用した実用性の高い分子連結法の開発が期待される。

## 謝辞

本稿で紹介した成果は多くの共同研究者の着想にもとづいており、特に研究室スタッフと学生らの多大なる努力の賜物である。ここに深く感謝する。

## 参考文献

1. H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 11, 2004-2021.
2. (a) C. W. Tornøe, C. Christensen, and M. Meldal. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* 2002, 67, 9, 3057-3064.; (b) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, and K. B. Sharpless. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective Ligation of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 15, 2596-2599.
3. N. J. Agard, J. A. Prescher, and C. R. Bertozzi. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide – Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 46, 15046-15047.
4. I. Kii, A. Shiraishi, T. Hiramatsu, T. Matsushita, H. Uekusa, S. Yoshida, M. Yamamoto, A. Kudo, M. Hagiwara, and T. Hosoya. Strain-promoted double-click reaction for chemical modification of azido-biomolecules. *Org. Biomol. Chem.* 2010, 8, 18, 4051-4055.
5. S. Yoshida, Y. Hatakeyama, K. Johmoto, H. Uekusa, and T. Hosoya. Transient Protection of Strained Alkynes from Click Reaction via Complexation with Copper. *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 39, 13590-13593.
6. S. Yoshida, T. Kuribara, H. Ito, T. Meguro, Y. Nishiyama, F. Karaki, Y. Hatakeyama, Y. Koike, and I. Kii. T. Hosoya. A facile preparation of functional cycloalkynes via an azide-to-cycloalkyne switching approach. *Chem. Commun.* 2019, 55, 24, 3556-3559.
7. Y. Sakata, R. Nabekura, Y. Hazama, M. Hanya, T. Nishiyama, I. Kii, and T. Hosoya. Synthesis of Functionalized Dibenzoazacyclooctynes by a Decomplexation Method for Dibenzo-Fused Cyclooctyne-Cobalt Complexes. *Org. Lett.* 2023, 25, 7, 1051-1055.
8. S. Yoshida, A. Shiraishi, K. Kanno, T. Matsushita, K. Johmoto, H. Uekusa, and T. Hosoya. Enhanced clickability of doubly sterically-hindered aryl azides. *Sci. Rep.* 2011, 1, 82.
9. S. Yoshida, J. Tanaka, Y. Nishiyama, Y. Hazama, T. Matsushita, and T. Hosoya. Further enhancement of the clickability of doubly sterically-hindered aryl azides by para-amino substitution. *Chem. Commun.* 2018, 54, 96, 13499-13502.
10. S. W. Kwok, J. R. Fotsing, R. J. Fraser, V. O. Rodionov, and V. V. Fokin. Transition-Metal-Free Catalytic Synthesis of 1,5-Diaryl-1,2,3-triazoles. *Org. Lett.* 2010, 12, 19, 4217-4219.
11. E. P. J. Ng, Y.-F. Wang, B. W.-Q. Hui, G. Lapointe, and S. Chiba. Orthogonal synthesis of pyrroles and 1,2,3-triazoles from vinyl azides and 1,3-dicarbonyl compounds. *Tetrahedron* 2011, 67, 40, 7728-7737.
12. S. Yoshida, K. Kanno, I. Kii, Y. Misawa, M. Hagiwara, and T. Hosoya. Convergent synthesis of trifunctional molecules by three sequential azido-type-selective cycloadditions. *Chem. Commun.* 2018, 54, 30, 3705-3708.
13. S. Yoshida, Y. Sakata, Y. Misawa, T. Morita, T. Kuribara, H. Ito, Y. Koike, I. Kii, T. Hosoya. Assembly of four modules onto a tetraazide platform by consecutive 1,2,3-triazole formations. *Chem. Commun.* 2021, 57, 7, 899-902.
14. J. Taguchi, Y. Ohata, H. Akimoto, H. Tabuchi, K. Igawa, K. Tomooka, T. Niwa, and T. Hosoya. Boronate Formation-Triggered Azide-Alkyne Cycloaddition. *Org. Lett.* 2025, 27, 17, 4428-4433.
15. J. Taguchi, K. Tokunaga, H. Tabuchi, T. Nishiyama, I. Kii, and T. Hosoya. 1,3-Butadiynyl sulfide-based compact trialkyne platform molecule for sequential assembly of three azides. *Chem. Commun.* 2024, 60, 98, 14581-14584.
16. P. Destito, J. R. Couceiro, H. Faustino, F. López, and J. L. Mascareñas. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, 56, 36, 10766-10770.

# クリック反応を基盤とした小型蛍光分子 1,3a,6a-Triazapentaleneの開発と応用

Development and Application of Compact Fluorescent Chromophores  
Based on Click Chemistry: 1,3a,6a-Triazapentalenes

難波 康祐  
Kosuke Namba

大阪大学大学院理学研究科化学専攻 教授  
Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University (Professor)

KEYWORD ▶ クリック反応 蛍光分子 1,3a,6a-トリアザペンタレン

受理日:2025年10月20日

## はじめに

01

生物活性分子に蛍光基を連結する蛍光プローブ化は、生物活性分子の作用機序を解明するために有効な手法とされている<sup>1)</sup>。生物活性分子の生体内での挙動を蛍光で追跡する(光らせて見る)ことが可能となるためである。しかしながら、対象となる生物活性分子が分子サイズの小さな低分子化合物の場合、蛍光分子の性質(サイズ、極性、電荷など)が生物活性低分子の本来の挙動に大きく影響を与えてしまうことが懸念される。従って、生物活性低分子の生体内挙動に影響を与えないコンパクトな蛍光分子の開発が望まれている。著者らはクリック反応を利用することで、新たなコンパクト蛍光分子 1,3a,6a-Triazapentalene (TAP) を開発し、TAP の置換基効果や機能性分子としての応用に取り組んできた。本稿では TAP を利用した機能性分子開発の最近の展開について紹介する。

## 1,3a,6a-トリアザペンタレンの 一段階合成法と蛍光評価

02

TAP (**1a**) は分子内に特異な双極性構造を有する  $10\pi$  系芳香族である(図1)。著者らが研究を開発した当時、TAP の合成例は極めて少なく、ベンゾトリアザペンタレン **2** など芳香環が縮環した誘導体は幾つか報告例があるものの<sup>2-4)</sup>、芳香環が縮環していない TAP 誘導体は 2 位にメチル基およびフェニル基を有する誘導体が報告されているのみであった<sup>5)</sup>。さらに、無置換 TAP (**1a**) の合成は未だ達成されておらず、TAP 類の蛍光特性についての知見も殆ど得られていなかった。そこで著者らは、TAP 類の簡便かつ網羅的な合成法の開発を行い、TAP の蛍光特性を明らかにした<sup>6)</sup>。

著者らは、TAP の構造中に1,2,3-トリアゾール環が含まれていることに注目し、クリック反応を利用した網羅的な TAP 合成法を開発した(図2)。すなわち、二つの脱離基を有するアジド**3a** とアルキン **4** との クリック反応をトリエチルアミン存在下で行うと、クリック反応の進行によって1,2,3-トリアゾール体 **3aA** が生

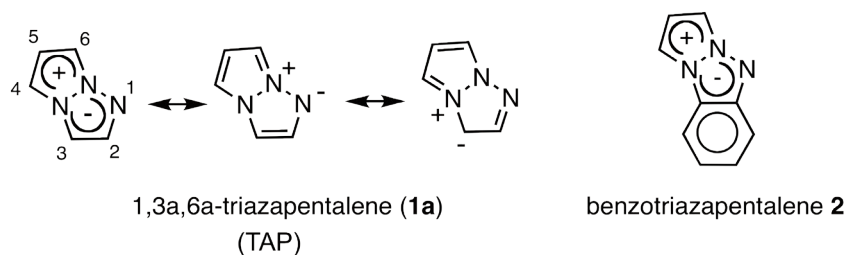


図1 1,3a,6a-トリアザペンタレン (**1a**) とベンゾトリアザペンタレン (**2**) の構造



成すると共に、2 位窒素からの分子内  $S_N2$  反応によってトリアゾリウムイオン **3aB** を与える。ついで、共存塩基の作用により  $\beta$  脱離 (**3aB**  $\rightarrow$  **3aC**)、脱プロトン化 (**3aC**  $\rightarrow$  **3aD**)、芳香族化が連続して進行することで目的とする TAP を一段階で与えるというものである<sup>6)</sup>。本法を用いて2 位に種々の側鎖を有する TAP を合成し、その蛍光特性を評価した。その結果、全ての TAP において、ジクロロメタン溶媒中、300~500 nm の特徴的な吸収帯および 389~632 nm の蛍光波長が観測され、TAP 骨格が蛍光分子として機能することが初めて実験的に証明された。特に、2 位にベンゼン環を有する基質では、ベンゼン環上の置換基の性質に応じて蛍光波長が大きくシフトした。この性質を利用することで、同じ蛍光発色団 (TAP) を用いて青色から赤色に至る全ての波長領域をカバーすることに成功した<sup>7)</sup>。

### 1,3a,6a-トリアザペンタレンの置換基効果 03

2 位置換 TAP の合成法が確立できたので、次に TAP の他の位置に導入した置換基の効果について調査した。4 位に置換基を有する 2,4-二置換 TAP は先の2 位置換体の合成法を適用することで合成できた<sup>6, 8)</sup>。すなわち、アルキン**4h**に対して、予めメチル基を導入したアジドトリフラート**3b**を先のTAP形成反応

の条件に付したところ、同様のカスケード反応が円滑に進行し、4 位にメチル基を有する2,4-二置換TAP (**1h**) が86%の収率で得られた(図3a)。また、フェニル基を有するアジドトリフラートでも反応は同様に進行した。5位に置換基を有する2,5-二置換TAPの合成では、アジドトリフラートの対応する部位(5位)にメチル基を導入するとトリフラートが3級となるため、同様の手法を適用することは困難であった。そこで、5位に相当するトリフラートをメトキシ基に変更したアジドモノトリフラート**3c**を出発原料に用いた。**3c**を同様のクリック反応の条件に付したところ、トリフラートがネオペンチル位にあるため続く分子内  $S_N2$  反応が室温では進行せず、トリアゾール体**3cA**で反応は停止した。そこで反応系中を加熱環流することで環化反応を進行させた後、-78 °Cまで冷却しKHMDsを過剰量加えたところ、メトキシ基の脱離が進行し、5 位にメチル基を有する2,5-二置換 TAP (**1i**) が63% の収率で得られた(図3b)<sup>9)</sup>。メチル基以外の置換基も同様の手法によって合成可能であった。一方、6 位に置換基を有する2,6-二置換TAPは、同様のアジドトリフラートを出発原料に用いる手法での合成は困難であった。6 位にメチル基を導入したアジドトリフラートを用いると、立体障害のためトリアゾール窒素からの環化反応が進行しなかったためである。そこでクリック反応のアジドユニットをエポキシド**3d**に変更することで望む2,6-二置換 TAP を得た(図3c)。すなわち本反応は、①**3d**と**4h**を化学量論量の銅を用いるクリック反応の条件に付してトリアゾール体**3dA**を得る。②**3dA**を超強酸で処理するとトリアゾール

	1a	1b	1c	1d	1e	1f	1g
yield (%)	46	90	56	81	88	71	72
$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}(\text{nm})$	-	342	330	345	376	420	466
$\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}(\text{nm})$	389	431	413	456	510	572	632
$\Phi_F$	0.014	0.18	0.053	0.20	0.44	0.34	0.096
color							

図2 TAP の一段階合成法と蛍光特性

からの環化反応が進行しトリアソリウム塩 **3dB** を与える。③ついで2級水酸基をアセチル化した後に KHMDS を作用させ脱離反応を進行させることで 6 位置換 TAP を得るというものである(図3c)。本法により、低収率ながら 6 位にメチル基を有する 2,6-二置換 TAP (**1j**) を得ることができた<sup>10)</sup>。

TAPのそれぞれの部位に置換基を導入する手法が確立できたので、二置換TAPの蛍光特性を調査した。4 位にメチル基を導入した場合には、蛍光極大波長に30 nm 程度の長波長シフトが観測された。またフェニル基を導入した場合にはメチル基と同程度の長波長シフトが観測されたが、モル吸光係数の大幅な向上が

見られた<sup>8)</sup>。5 位に電子供与基を導入すると、対応する5 位無置換体と比べて蛍光極大波長に大きな変化は見られなかったが、蛍光量子収率が大幅に向上する傾向が見られた。一方、シアノ基などの電子求引基を導入すると、同様の蛍光量子収率の向上が観測されたが、蛍光極大波長は短波長側に50 nm 以上シフトした<sup>9)</sup>。6位にメチル基を有する TAP 誘導体は対応する無置換体に比べて蛍光極大波長が長波長シフトする傾向が見られた。この特性を利用することで、赤色光を発する TAP 誘導体も合成できた<sup>10)</sup>。以上のように、TAP の蛍光特性は4, 5, 6位でそれぞれ特徴的な置換基効果が得られることが明らかになった(図4)。

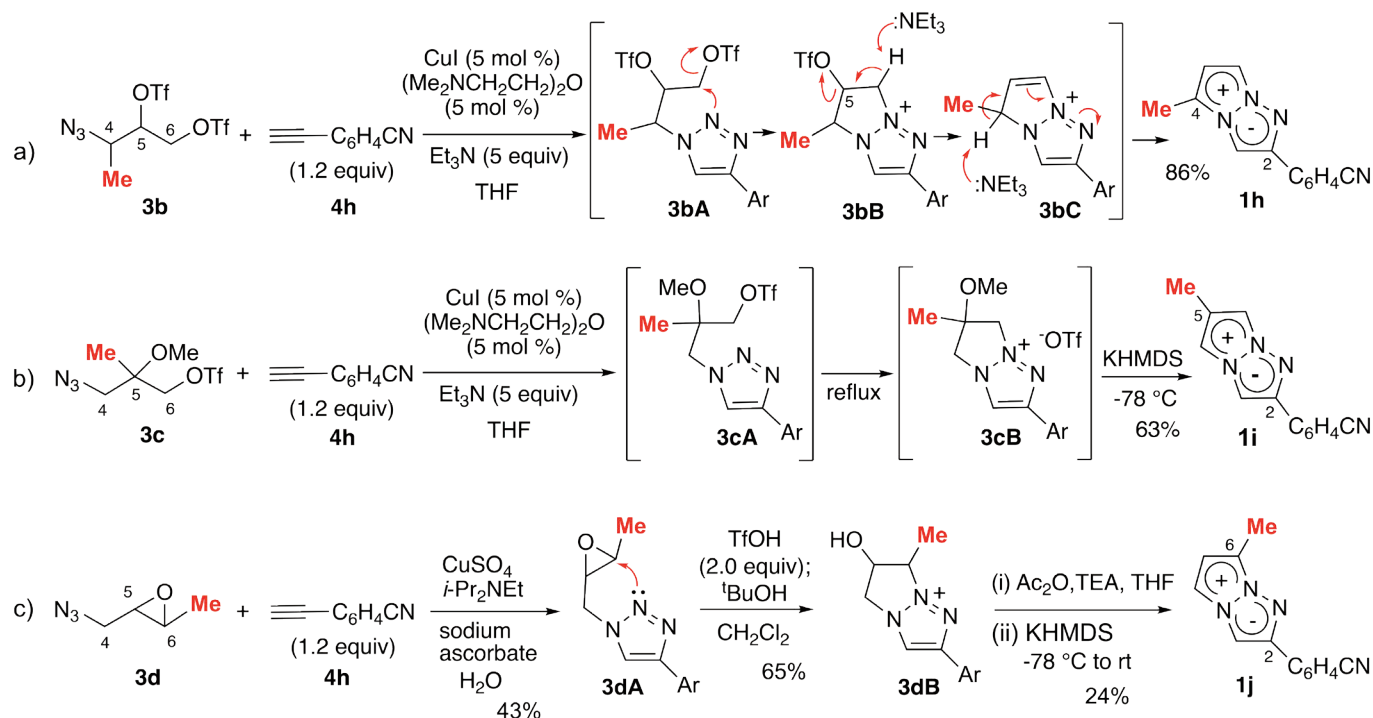


図3. 二置換TAPの合成経路。a) 2,4-二置換TAPの合成。b) 2,5-二置換TAPの合成。c) 2,6-二置換TAPの合成

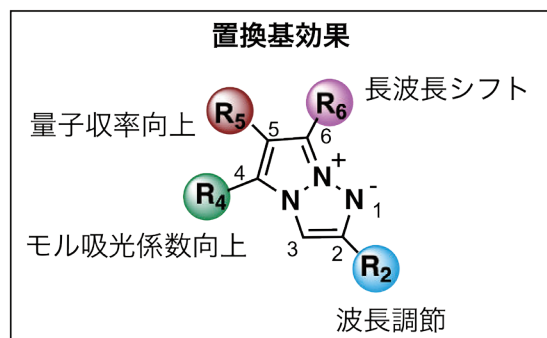


図4 TAPの置換基効果

TAPワイヤーの合成と評価<sup>11)</sup>

04

TAPの5位に置換基を有する2,5-二置換TAPの合成法が確立できたので、次にTAPワイヤーの合成を試みた<sup>11)</sup>。ベンゼン環を連結させたワイヤー状分子では、ベンゼン環が平面状に配置するとオルト位の水素が互いに立体障害となる。このため、ベンゼン環は平面状に配列せずにツイスト型の配置を取ることが知られている(図5a)。一方、TAPは5員環と5員環が縮環した構造であるため、平面状に配列してもTAP環上の水素原子は互いに立体障害とならない。すなわち、TAPを2位と5位で連結させていくと、 $10\pi$ 系芳香環が平面状に配列した剛直なワイヤー状分子が形成できると考えられた(図5a)。

TAP環を連結させるためには、5位にアルキン基を有するTAPを合成し、5位のアルキン基に対して先の2,5-二置換TAP形成反応(図3b)を繰り返すことでTAPワイヤーが合成できると考えられた。そこで2,5-二置換TAP形成反応(図3b)における**3c**のメチル基をエチニル基に変更したアジド基質**4b**を2,5-二置換TAP形成反応に適用し、5位にアルキン基を有するTAP**1k**を得た。ついで**1k**のTBS基を除去した後、**4b**を用いた2,5-二置換TAP形成反応を繰り返すことでTAP-dimer**5a**を得ることに成功した。さらに**5a**のTBSを除去した後、再度**4b**とのTAP形成反応を行うことで三量体であるTAP-trimer**6a**の合成に成功した(図5b)。TAP連結体が得られたので、次に連結体の蛍光特性について調査した。

高希釈溶液の条件ではTAP単量体**1k**と二量体**5a**および三量体**6a**で蛍光特性に顕著な違いは見られなかった。しかしな

がら、TAP連結体の平面構造は分子間相互作用により容易に凝集するため、濃縮状態および固体状態における分子間相互作用が興味深い蛍光特性を誘導すると期待された。TAP二量体**5a**のアルキル置換基をフェニル基に変えた誘導体**5b**がより強い蛍光と高い安定性を示したため、**5b**を用いて高濃度条件での蛍光特性を調査した。**5b**を濃縮していくと、濃度の上昇に伴って**5b**の蛍光は消失し、より長波長領域で新たな蛍光が出現・増大した。この結果は、TAP二量体**5b**が濃縮溶液中で何らかの分子間相互作用を形成していることを示唆している。一方、固相においてTAP二量体**5b**は蛍光メカノクロミズムを示した。未処理の**5b**粉末(**5b-G**)はUV照射下で黄緑色発光を示す(図5c)。機械的刺激を加えると、**5b-G**の発光色はオレンジ色に変化し、粉碎粉末**5b-O**となる(図5c)。**5b-G**は535 nmを蛍光極大波長とする広い蛍光スペクトルを示し(図6cの緑線)、機械的刺激が加えられた**5b-O**は590 nmに極大波長を持つ広い蛍光スペクトルを示した(図6cのオレンジ線)。この機械的刺激(粉碎)による55 nmの長波長シフトはメカノクロミック蛍光分子の典型的な現象である。また、**5b**の粉末X線回折を測定したところ、未処理の**5b-G**は結晶性を示し、機械的刺激後の**5b-O**は非晶質形態を示した。これは、**5b**の蛍光メカノクロミズムが典型的な結晶-非結晶相転移に基づくことを示唆している。従って、TAP連結体は固体状態においてメカノクロミック蛍光分子となることが明らかになった。TAP連結体は新規のメカノクロミック蛍光分子であるため、今後は分子構造のさらなる最適化により、蛍光強度の増大や蛍光波長の伸長といったクロミズム特性の更なる向上が期待される。

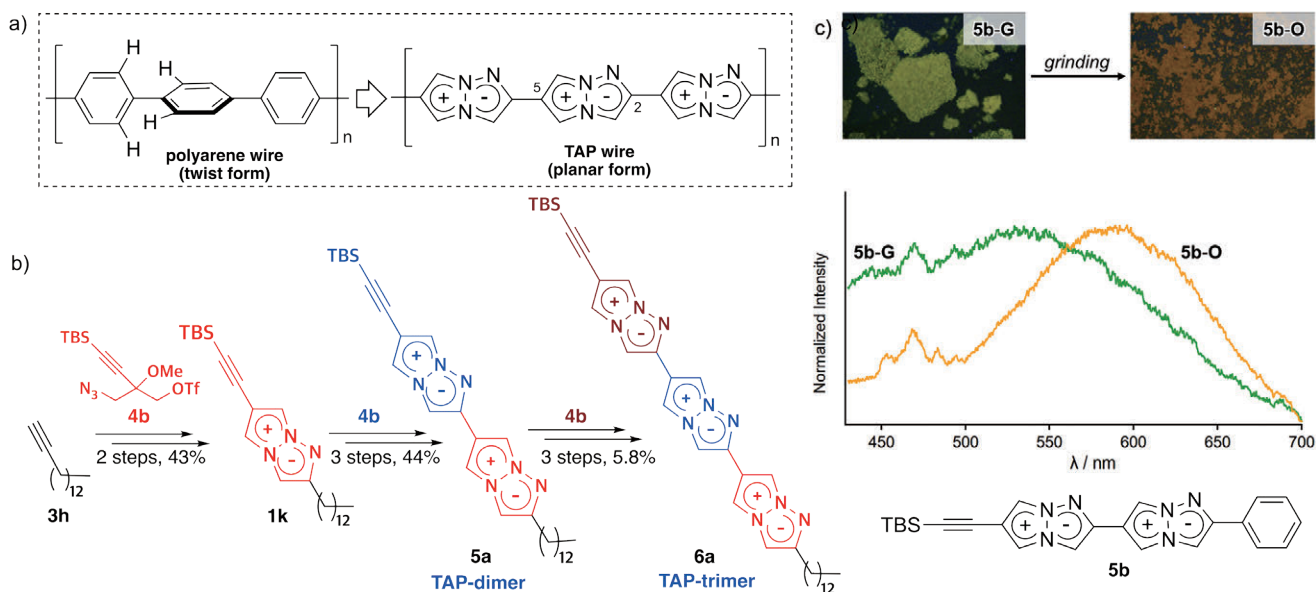


図5 TAPワイヤーの合成と評価。a) Polyarene wireとTAP wire。b) TAP連結体の合成。c) TAP二量体のメカノクロミック蛍光。図5aおよび5bは参考文献11より引用



最小の蛍光標識基TAP-VK1<sup>12)</sup>

05

はじめに述べた通り、分子サイズの小さな生物活性分子の生体内での挙動を追跡するためには、生物活性分子の本来の挙動を阻害しないコンパクトな蛍光分子との連結が望まれる。著者らはコンパクトな蛍光分子 TAP を開発し、TAP をメカノクロミック蛍光分子や細胞染色試薬など様々な機能性分子へと展開してきた。様々な機能を有する TAP 誘導体の開発研究において、2 位にフェニル基を有する TAP 誘導体が高い安定性と強い蛍光を有する傾向にあった。しかしながら、TAP のコンパクトな骨格を蛍光標識基として活用するためには、フェニル環を持たない誘導体の開発が望まれた。そこで2位にフェニル基を持たないコンパクトな蛍光標識基の開発に取り組んだ。

2 位にアルキル、アミド、エステル、ケトンなどの官能基を導入したTAP 誘導体に400 Wの水銀ランプを連続照射し、分解の半減期を調査した。その結果、アルキル基が8分、アミド基が15分、エステル基が45分、ケトン基が90分とケトン誘導体が光照射に対して最も高い安定性を示した。そこで2位にケトン基を連結させた標識基の開発に取り組み、ビニルケトンを連結させたTAP-VK1 (**7**) (図6a)を開発した。TAP-VK1はチオールとの1,4-付加反応を容易に進行させるため、チオール性官能基の標識基として用いることができる。また、アミンやアルコール等の他の求核剤とは全く反応せず、チオールのみと特異的に反応する。さらに、TAP-VK1がチオールに付加するとビニルケトン部位の共役が解消されるため、蛍光波長は大幅に短波長シフトし、かつ蛍光強度も10倍程度増強される(図6a)。このようにTAP-VK1は様々な官能基が共存する系においてもチオールのみと特異的に反応し、反応後に蛍光を大幅に増強させるため、チオールセンサーとしての利用も可能である。実際に、TAP-VK1を利用して呼気中の悪臭成分であるメタンチオールを簡便に検知する手法を開発中である<sup>13)</sup>。TAP-VK1をチオール化合物の蛍光標識として利用する場合、水中の反応ではチオール分子と混ぜておくだけで良く、また未反応のTAP-VK1は蛍光強度が弱いためバックグラウンド蛍光とはならない。したがって、TAP-VK1の標識反応の粗生成物や反応混合物を精製することなくそのまま用いることが可能である。

TAP-VK1が開発できたので、実際にチオールを有する生物活性低分子としてカプトプリル(**9**)の標識を試みた(図6b)。カプトプリルは高血圧や心不全の治療に用いられるアンジオテンシン変換酵素阻害薬(ACE阻害薬)であり、分子量はわずか217と非常にコンパクトな低分子薬である。生体内や細胞内のカプトプリルの検出に質量分析が用いられた例があるが、蛍光標識によるカプトプリルの細胞内や組織内での可視化が検討されたことはなかった。

カプトプリル**9**をジクロロメタン中、テトラメチルグアニジン(TMG) 存在下、1.5当量のTAP-VK1を作用させたと、付加反応は円滑に進行しVK1-Captopril **10** を収率82%で得た(図

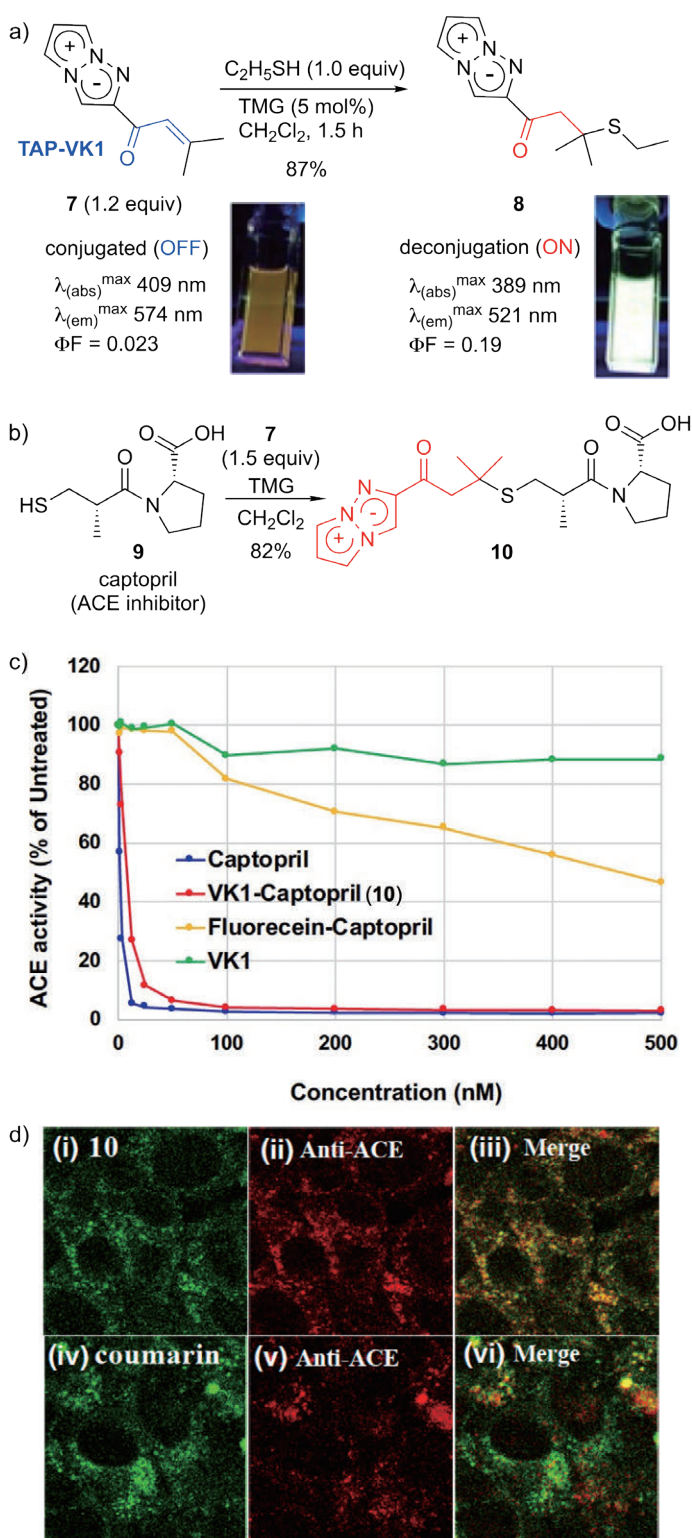


図6 最小蛍光標識基TAP-VK1の開発。a) TAP-VK1 の反応と蛍光特性。b) TAP-VK1 によるカプトプリルの標識。c) 標識カプトプリルの ACE 阻害活性。d) 血管内皮細胞における TAP 標識カプトプリルとクマリン標識カプトプリルの蛍光観察。図6a-dは参考文献12より引用



6b)。ついで、蛍光標識したカプトプリル **10** のACE 阻害活性を調査したところ、活性はカプトプリルに比べてわずかに低下したものの、**10** は強い ACE 阻害活性を維持していた。一方、一般的な蛍光分子である Fluorecein をカプトプリルに導入すると、カプトプリルのACE阻害活性が殆ど失われてしまう結果となった。また、TAP-VK1 そのものが阻害活性を示すことはなかった(図6c)。以上よりTAP-VK1は、分子サイズの小さい生物活性低分子においても、その活性を損なわない優れた蛍光標識基であることが示唆された。

TAP-VK1で蛍光標識したカプトプリル **10** が ACE 阻害活性を保持していたことから、実際に血管内皮細胞での **10** の局在を蛍光で観察した(図6d)。その結果、血管内皮細胞で **10** の蛍光が観測され、その局在は抗体で染色した ACE の局在と完全に一致していた。すなわち、ACE 阻害薬であるカプトプリルが ACE 特異的に作用している様子を可視化できたことになる。一方、クマリンで標識したカプトプリルの血管内皮細胞での局在を蛍光観察したところ、抗体で染色した ACE の局在とは一致しなかった。これはクマリンがカプトプリルの本来の挙動を妨げてしまったことを示唆している。以上の検討により、TAP-VK1 は分子量わずか217程度の小さな低分子薬に導入しても、低分子の生物活性や挙動に影響を与えない優れたコンパクト蛍光標識基であることが示された。

## おわりに

06

TAPを利用した機能性分子開発の最近の展開について紹介してきた。著者らが2011年に新たな蛍光分子としてTAPを発表して以降、TAPは世界中の有機化学者の研究題材とされてきた。実際に、欧米の研究者らによってTAPのレビュー論文も発表されており<sup>14, 15)</sup>、TAPは既に一つの研究領域となっている。誌面の都合上、TAPを利用した機能性分子の全てを紹介することはできなかったが、本稿で紹介した機能性分子以外にも、TAPと細菌のシデロフォアを利用したTAP-シデロフォア鉄イオンセンサー<sup>16)</sup>、既に市販されているTAP細胞染色試薬<sup>17)</sup>およびその発展型であるTAP緑色染色試薬とTAP赤色染色試薬<sup>18)</sup>、TAP-VK1を利用した歯周病の簡易検査キット<sup>13)</sup>、癌光線治療に利用可能なTAP色素の開発などを行っている<sup>19)</sup>。これらのTAP機能性分子についてはまたの機会に紹介させていただきたい。

## 参考文献

- M. Ueda. Chemical Biology of Natural Products on the Basis of Identification of Target Proteins. *Chem. Lett.* 2012, 41, 7, 658-666., and references are therein.
- O. Tsuge, and H. Samura. STUDIES OF POLYAZAPENTALENES. III. ELECTROPHILIC REACTIONS OF 8-SUBSTITUTED DIBENZO[b,e]-1,3a,6a-TRIAZAPENTALENE. *Chem. Lett.* 1973, 2, 2, 175-180.
- T. Kim, K. Kim, and Y. Park. A Novel Method for the Synthesis of 2,3-Benzo-1,3a,6a-triazapentalenes through Pummerer-Type Reactions of  $\gamma$ -(Benzotriazol-1-yl)allylic Sulfoxides. *Eur. J. Org. Chem.* 2002, 3, 493-502..
- C. Carra, T. Bally, T. A. Jenny, and A. Albin. Thermoreversible photocyclization of a pyrazolotriazole to a triazasemibullvalene: a novel electrocyclic reaction. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2002, 1, 38-44.
- H. Koga, M. Hirobe, and T. Okamoto. Mesionic 1,3a,6a-triazapentalenes. *Tetrahedron Lett.* 1978, 19, 15, 1291-1294.
- K. Namba, A. Osawa, S. Ishizaka, N. Kitamura, and K. Tanino. Direct Synthesis of Fluorescent 1,3a,6a-Triazapentalene Derivatives via Click-Cyclization-Aromatization Cascade Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 30, 11466-11469.
- K. Namba, A. Osawa, A. Nakayama, A. Mera, F. Tano, Y. Chuman, E. Sakuda, T. Taketsugu, K. Sakaguchi, N. Kitamura, and K. Tanino. Synthesis of yellow and red fluorescent 1,3a,6a-triazapentalenes and the theoretical investigation of their optical properties. *Chem. Sci.* 2015, 6, 1083-1093.
- A. Nakayama, S. Nishio, A. Otani, A. Mera, A. Osawa, K. Tanino, and K. Namba. Substituent Effect at the C4-Position of 1,3a,6a-Triazapentalene. *Chem. Pharm. Bull.* 2016, 64, 7, 830-837.
- K. Namba, A. Mera, A. Osawa, E. Sakuda, N. Kitamura, and K. Tanino. One-Pot Synthesis of Highly Fluorescent 2,5-Disubstituted-1,3a,6a-triazapentalene. *Org. Lett.* 2012, 14, 21, 5554-5557.
- A. Mera, M. Ito, A. Nakayama, and K. Namba. Synthesis of 2,6-Disubstituted-1,3a,6a-Triazapentalenes and Their Fluorescence Properties. *Chem. Lett.* 2017, 46, 4, 539-542.
- M. Ito, A. Mera, T. Mashimo, T. Seki, S. Karanjit, E. Ohashi, A. Nakayama, K. Kitamura, T. Hamura, H. Ito, and K. Namba. Synthesis and Evaluation of a 1,3a,6a-Triazapentalene (TAP)-Bonded System. *Chem. Eur. J.* 2018, 24, 67, 17727-17733.
- A. Nakayama, A. Otani, T. Inokuma, D. Tsuji, H. Mukaiyama, A. Nakayama, K. Itoh, A. Otaka, K. Tanino, and K. Namba. Development of a 1,3a,6a-triazapentalene derivative as a compact and thiol-specific fluorescent labeling reagent. *Commun. Chem.* 2020, 3, 6.
- 難波 康祐, 中山 淳, 大谷 彬「蛍光色素を用いた歯周病の簡易検査」特許第6782978号(2020年10月)。
- Y. Wang, T. Opsomer, and W. Dehaen. Chapter Two - Developments in the chemistry of 1,3a,6a-triazapentalenes and their fused analogs. *Adv. Heterocycl. Chem.* 2022, 137, 25-70.
- Y. Wang, T. Opsomer, and W. Dehaen. Bicyclic 1,3a,6a-Triazapentalene Chromophores: Synthesis, Spectroscopy and Their Use as Fluorescent Sensors and Probes. *Chemosensors.* 2021, 9, 16.
- T. Hayashi, A. Osawa, T. Watanabe, Y. Murata, A. Nakayama, and K. Namba. *Tetrahedron Lett.* 2017, 58, 20, 1961-1964.
- R. Kamada, F. Tano, F. Kudoh, N. Kimura, Y. Chuman, A. Osawa, K. Namba, K. Tanino, and K. Sakaguchi. Effective Cellular Morphology Analysis for Differentiation Processes by a Fluorescent 1,3a,6a-Triazapentalene Derivative Probe in Live Cells. *PLoS ONE.* 2016, 11, 8, e0160625.
- Y. Kondo, T. Nakamura, D. Tsuji, R. Sato, S. Karanjit, R. Akagi, and K. Namba. Development of 1,3a,6a-triazapentalene derivatives as practical erasable fluorescent cell staining reagents. *Tetrahedron Lett.* 2024, 138, 154986.
- D. Tsuji, A. Nakayama, R. Yamamoto, S. Nagano, T. Taniguchi, R. Sato, S. Karanjit, N. Muguruma, T. Takayama, K. Itoh, and K. Namba. 1,3a,6a-Triazapentalene derivatives as photo-induced cytotoxic small fluorescent dyes. *Commun. Chem.* 2023, 6, 37.

# *In situ* クリックケミストリーを利用した 酵素阻害剤の探索

Search for enzyme inhibitors using *in situ* click chemistry

廣瀬 友靖

Tomoyasu Hirose

北里大学大村智記念研究所/大学院感染制御科学府 教授

Omura Satoshi Memorial Institute & Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University (Professor)

KEYWORD ▶ *in situ* クリックケミストリー

Huisgen反応

D-アミノ酸酸化酵素

受理日: 2025年8月22日

## はじめに

01

2022年10月に発表されたノーベル化学賞は、様々な分子の連結を可能とする「クリックケミストリー」と呼ばれる手法の開発に携わった欧米の研究者3名へ贈られたことは記憶に新しい。特にその中の米国スクリプス研究所K. Barry Sharpless教授は2001年に「キラル触媒による不斉合成の研究」により、1度目のノーベル化学賞を受賞しており、今回が2回目の受賞である。そのSharpless教授によって、2種類の官能基間で起こる選択的かつシンプルでヘテロ原子を介した結合形成反応の総称として、1度目のノーベル化学賞受賞年の2001年に「クリックケミストリー」の概念が提唱された<sup>1)</sup>。その中で最も代表的な反応はアジドとアルキンによるトリアゾール化反応であることは広く認知されている。トリアゾール化反応の歴史を遡ると、1世紀以上前の1893年にマイケル付加反応で有名なA. Michael教授によって初めての報告がなされている<sup>2)</sup>。その後、半世紀以上を経

てR. Huisgen教授らによる詳細な研究が行われ<sup>3, 4)</sup>、現在では一般にHuisgen's 1,3-dipolar cycloadditionと呼ばれている(図1上部)。

Huisgen's 1,3-dipolar cycloadditionは加熱条件で協奏的に進行する付加環化反応で、非対称なアルキン化合物を用いた場合、2種類の異性体を与える。その選択性の制御は難しく、一般的に2種類の混合物が得られる。また、歪みアルキンを用いることでその反応性が飛躍的に向上し、生理学的条件下で速やかに本反応が進行するが、その詳細な解説は本誌別稿を参照されたい。

2002年にSharpless教授とMeldal教授の2グループから金属触媒によるトリアゾール形成反応がほぼ同時に報告された(図1下部)<sup>5, 6)</sup>。両報告は末端アルキンと有機アジドを用いたトリアゾール化においてCu(I)触媒による*anti*-トリアゾール形成(1,4-二置換トリアゾール)の反応促進効果の発見であり、現在では一般的にCuAAC [Cu(I) catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition] として表記される。本報告を皮切りに「クリックケミストリー」が飛躍的に利用されるようになったといえる。CuAACはHuisgen's 1, 3-dipolar cycloadditionの協奏的付加環化反応とは異なり、銅アセチリドからの段階的な機構で*anti*-トリアゾールを与える<sup>7)</sup>。さらに2005年にRu(II)触媒による*syn*-選択的トリアゾール化(RuAAC)がSharpless教授のグループから報告され<sup>8)</sup>、これにより、金属触媒による*anti*-(1,4-二置換トリアゾール)および*syn*-(1,5-二置換トリアゾール)異性体の選択的な合成が可能となっている。

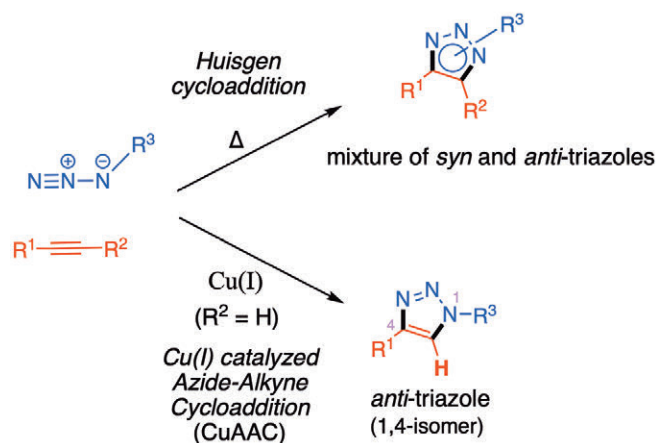


図1 有機アジドとアルキンのトリアゾール形成

## In situ クリックケミストリー

02

「In situ クリックケミストリー」は2002年にSharpless教授によってその概念と実際の研究例が報告されており、前述した「クリックケミストリー」の中でHuisgen's 1,3-dipolar cycloaddition (以下、Huisgen反応)を用いる手法である<sup>9, 10)</sup>。「In situ」とは「生体分子(酵素など)の中で」という意味である。すなわち、in situ クリックケミストリーとはHuisgen反応を利用して、標的酵素のリガンド(阻害剤)作用部位を反応場として、様々なフラグメント基質 [(有機アジドとアルキン分子; どちらかがリガンド分子) 図中ではリガンド分子にアルキン官能基を導入] を添加した時、それらがリガンド作用部位周辺に親和性を有する時、標的酵素のテンプレート(鋳型)効果によりトリアゾール形成が促進されることを指標に、より高活性な阻害剤を探索する方法論である(図2)。図中では始めに標的酵素の活性部位にリガンド分子(アルキン分子)が結合する。次にフラグメント分子であるF1アジドが結合した場合では、F1は標的酵素に対して親和性を有しているが、その結合位置はリガンド分子と離れているため、トリアゾール化反応促進の駆動力にならない。F2アジドは標的酵素に対して親和性が低いことから、標的酵素が鋳型として機能しない。F3アジドは、リガンド分子の近傍に親和性を有することから

トリアゾール形成促進効果を引き起こし、誘導されたトリアゾール体は元のリガンド分子に比べ標的酵素への親和性が向上する。本手法はダイナミックに動いている標的酵素が鋳型となるため、静的な構造情報からのリガンドデザインと比べ予期せぬヒット化合物の発見が期待できる。

ここでなぜin situ クリックケミストリーにおいてHuisgen反応の利用が有効かについてだが、有機アジドとアルキンとの環化反応は官能基選択性が高く、さらに水性緩衝液中においても無機塩や有機物などの干渉を受けず、また生体成分との反応も起こさない。さらにHuisgen反応は反応基質以外の試薬を必要とせず、反応進行に伴う副生成物も一切生成しない。それに加えてHuisgen反応のアジド-アルキン間のトリアゾール形成は26 kcal/molという適度な反応活性化エネルギー障壁のため、室温～酵素反応至適温度(～37 °C)条件で混合しても殆ど反応が進行しないのが特徴である<sup>11)</sup>。この点が非常に重要となる。In situ クリックケミストリーでは標的酵素鋳型効果により導かれるトリアゾール生成物の変換率は一般的な有機合成化学から想像するよりはるかに低い。例えばトリアゾール形成促進効果により、変換率として0.1%程度のトリアゾール化合物が生成したと仮定した場合、Huisgen反応が酵素鋳型効果を介さずに1%進行してしまうと、酵素鋳型効果によるトリアゾール形成促進効果はバックグラウンド反応に埋もれてしまう。Huisgen反応は酵素反応至適温

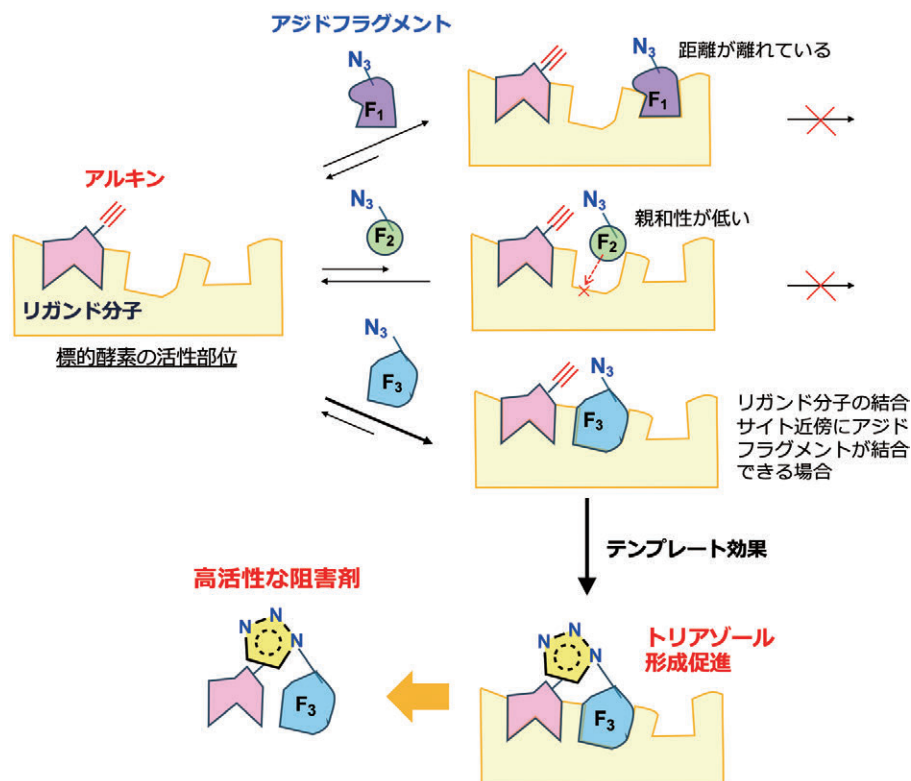


図2 In situ クリックケミストリーのイメージ



度(〜37 °C)条件では反応が始動進行しないことが*in situ* クリックケミストリーへの適応において重要な要素の一つである。

*In situ* クリックケミストリーの初めての報告は2002年にSharpless教授のグループから報告されている(図3)<sup>10)</sup>。

その標的酵素は神経伝達物質であるアセチルコリンを酢酸とコリンに加水分解するアセチルコリンエステラーゼ(AChE)であり、その阻害剤は、アルツハイマー病などの治療薬として展開されている。AChEは、触媒部位とポケット入口の二つの阻害剤結合が知られており、それら結合部位は20 Åとお互い近傍に存在する。また、特異的に相互作用する阻害剤tacrineは触媒部位の阻害剤で $K_d = 18$  nMと強力な結合親和性を有し、一方propidiumはポケット入口部位に $K_d = 1.1$  μMで結合親和性を有する。Sharpless教授らはtacrineとpropidiumの窒素上にそれぞれ炭素鎖長の異なる末端アルキン-アルキル基およびアジド-アルキル基を導入した。そしてAChE存在下でそれらを混合したところ図3右側に示すトリアゾール体がその前駆体となるアジドとアルキンからAChE鑄型効果により選択的に誘導されることを見出した。そのトリアゾール体のAChEに対する阻害活性は非常に強力( $K_d = 99$  fM)であり、本結果は*in situ* クリックケミストリーの概念を具現化している。

その他にも*in situ* クリックケミストリーは、Sharpless教授のグループを中心に精力的に研究が展開されており、炭酸脱水酵素<sup>12-15)</sup>、プロテインチロシンフォスファターゼ<sup>16)</sup>、金属プロテアーゼ<sup>17, 18)</sup>、HIV-1プロテアーゼ<sup>19)</sup>、セラチアキチナーゼ(*SmChi*)<sup>20-22)</sup>、結核菌のEthRタンパク質<sup>23)</sup>、Akt1<sup>24)</sup>、アセチルコリン結合タンパク質<sup>25)</sup>、G-Quadruplex<sup>26)</sup>、ビオチンタンパク質リガーゼ<sup>27)</sup> および、シクロオキシゲナーゼ2<sup>28)</sup>を標的とした新規阻害剤の探索が報告されている。

## 北里大学大村智記念研究所における *in situ* クリックケミストリーの展開

03

当研究所ではSharpless教授と徳島大学疾患酵素学研究センター(現・徳島大学先端酵素学研究所)との連携で*in situ* クリックケミストリーを展開してきた。

### 3-1.キチナーゼ阻害剤の探索

2009年に、バクテリアの糖加水分解酵素の1種であるセラチアキチナーゼ(*SmChi*)を用いた*in situ* クリックケミストリーの研究を報告した<sup>20-22)</sup>。本研究では当研究室で見出された天然物Argifinから*in situ* クリックケミストリーに利用可能なアジドリガンド分子の設計および合成を行い、そのアジドリガンドと71種のアルキンフラグメントを用いて*SmChi* 存在下、*in situ* クリックケミストリーのスクリーニングを行うことで、Argifinに比べ約300倍活性向上した阻害剤の創製に成功した。尚、本研究成果はこれまで多くの書籍等<sup>29-33)</sup>で紹介してきたので、本稿ではその詳細は割愛させていただく。

### 3-2.ヒトD-アミノ酸酸化酵素阻害剤の探索

#### 3-2-1. D-アミノ酸酸化酵素

ヒトD-アミノ酸酸化酵素(human D-amino acid oxidase, hDAO)は、統合失調症との関連が示唆されている。哺乳動物については1980年代に遊離型D-アスパラギン酸、1990年代初めに遊離型D-セリンが見いだされ、2002年にhDAOの統合失調症への関与が報告された<sup>34)</sup>。D-アミノ酸は広範囲の生物中に存在しているにも関わらず、多くの場合、非天然型アミノ酸と呼ばれていたが、現在では、哺乳類の生体内にD-アミノ酸が存在し、特にヒト脳内において遊離しているD-セリンがグルタミン酸受容体の活性化因子(内因性のコアゴニスト)として作用するため、

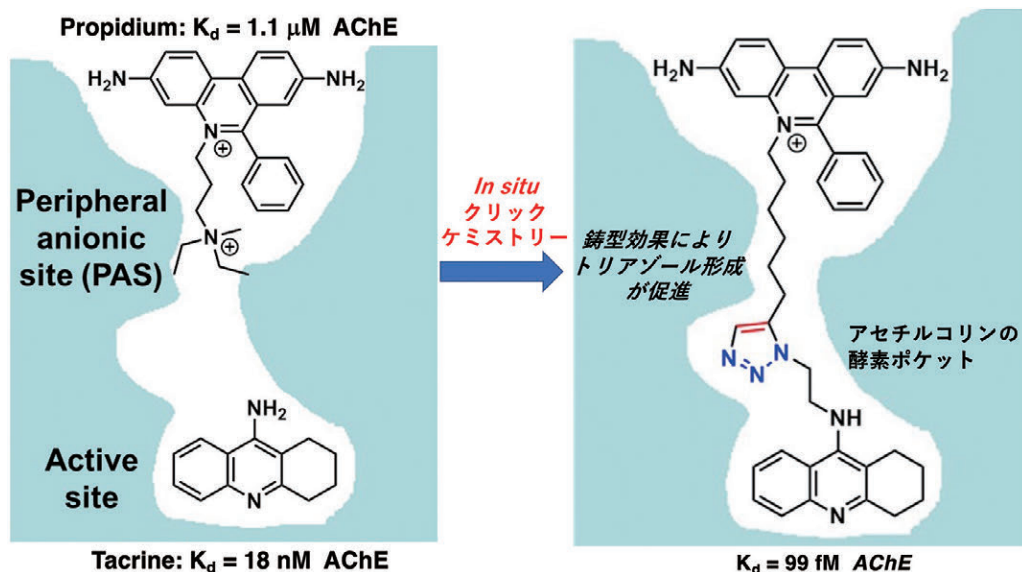


図3 *In situ* クリックケミストリーの初の報告例



前脳内に豊富に存在していることが示唆されている<sup>35)</sup>。従って、脳内hDAOの過剰発現は、適切な神経機能に必要なD-セリン量を減少させることから、hDAO阻害剤が統合失調症に対する新たな治療薬として期待されている。しかし、現在この作用機序に基づいた治療薬は存在していない。

DAOは、1935年にHans Adolf Krebsにより発見されたフラビン酵素として知られている<sup>36)</sup>。hDAOは脳内D-セリンの調整因子として作用するが、hDAOによりD-アミノ酸は酸化的脱アミノ反応を経由してイミノ酸に変換され、イミノ酸は非酵素的な加水分解反応により最終的には $\alpha$ -ケト酸とアンモニアに分解される(図4)。

### 3-2-2. ヒトD-アミノ酸酸化酵素阻害剤のスクリーニング

hDAOは、D-セリンに作用し、酸化的脱アミノ化反応により、最終的に $\alpha$ -ケト酸へと変換される。その際、酸素分子を消費し過酸化水素を生成する(図4)。hDAOに対するハイスループットな阻害剤スクリーニング系の一つとして、hDAO酵素反応により生成

する過酸化水素と西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)が2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン)-6-スルホン酸(ABTS)を酸化することで緑色蛍光剤(OD 420 nm)を与えるため、この蛍光強度を定量する方法が用いられる(図5)<sup>37)</sup>。

これまで当研究所において、本方法を利用して、大村天然化合物ライブラリーや微生物培養抽出液ライブラリーからのhDAO阻害活性の探索が行われていたが、hDAO阻害剤を見出すことができなかった。本スクリーニング法の問題点として、培養液中や天然物自体に硫黄を含む化合物などの過酸化水素と反応する基質が多いことが挙げられ、多くのヒットサンプルが見出されるものの、それらは偽陽性として検出されたに過ぎず、その評価に限界があった。一方で、正確にhDAOの阻害活性を評価できる方法として、hDAO酵素反応により消費される酸素量を測定するオキシグラフ法がある<sup>38)</sup>。本手法は正確な阻害活性が評価できるが、その測定と解析に多大な時間と労力を要するためスクリーニング法としては適さない。

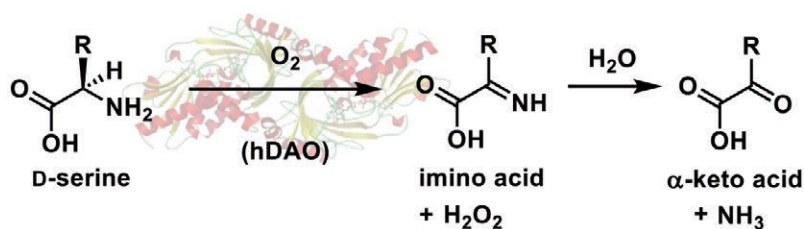


図4 ヒトD-アミノ酸酸化酵素(hDAO)によるD-セリンの酸化

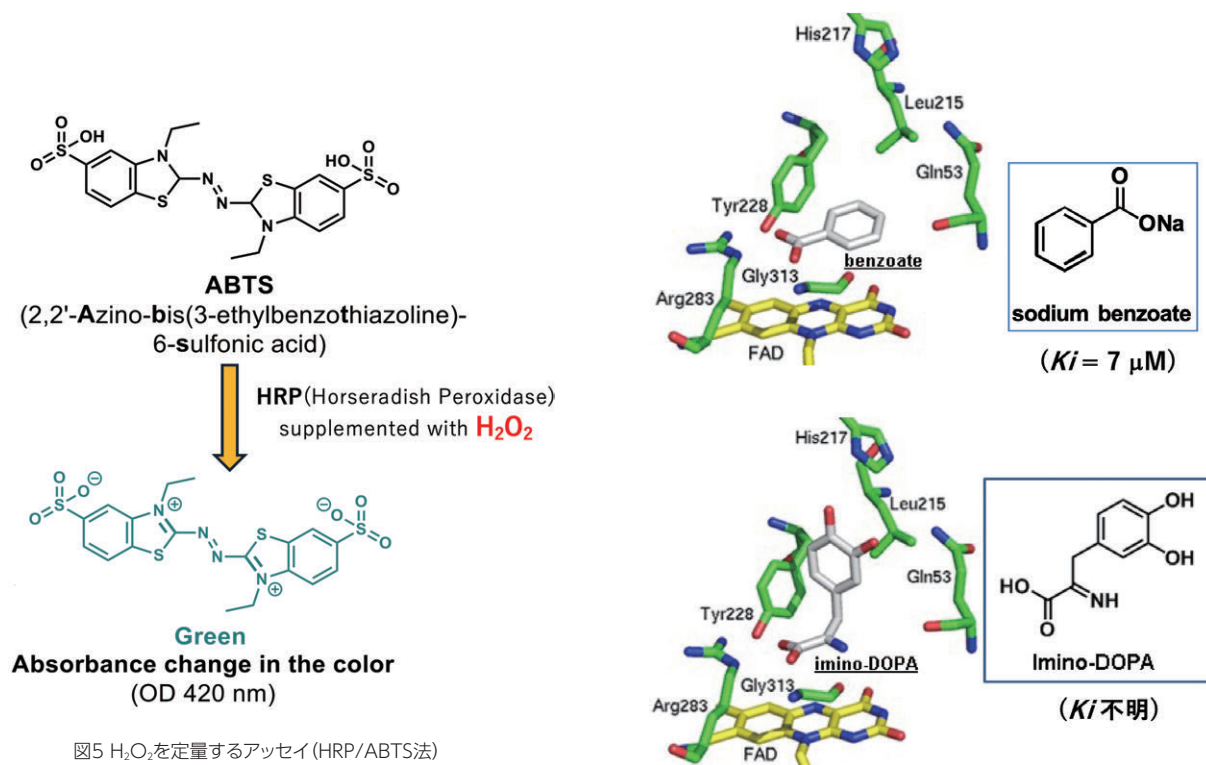


図5  $\text{H}_2\text{O}_2$ を定量するアッセイ (HRP/ABTS法)

図6 hDAO/sodium benzoate<sup>38)</sup>およびhDAO/imino-DOPA<sup>39)</sup>の結晶構造

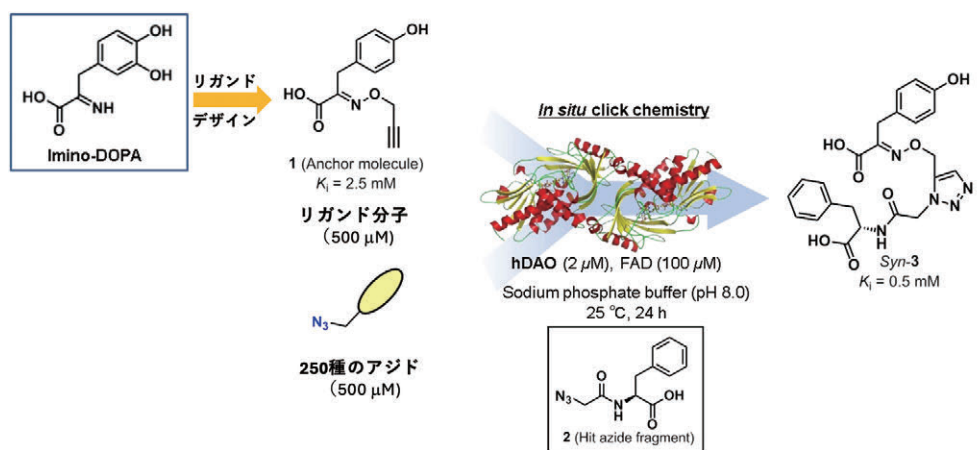
### 3-2-3. *In situ* クリックケミストリーによるhDAO阻害剤の探索

上述の背景から、当研究室では非天然物で既存のhDAO阻害剤を基にアルキンリガンドを調製し、*in situ* クリックケミストリーによる高活性hDAO阻害剤の探索を試みた。hDAOの酵素反応ポケットに結合する低分子リガンドとして安息香酸ナトリウム ( $K_i = 7 \mu\text{M}$ ) およびイミノDOPA ( $K_i$  不明) が知られており、それらのX線共結晶解析が徳島大学 福井教授のグループにより解かれていた(図6)<sup>38,39)</sup>。

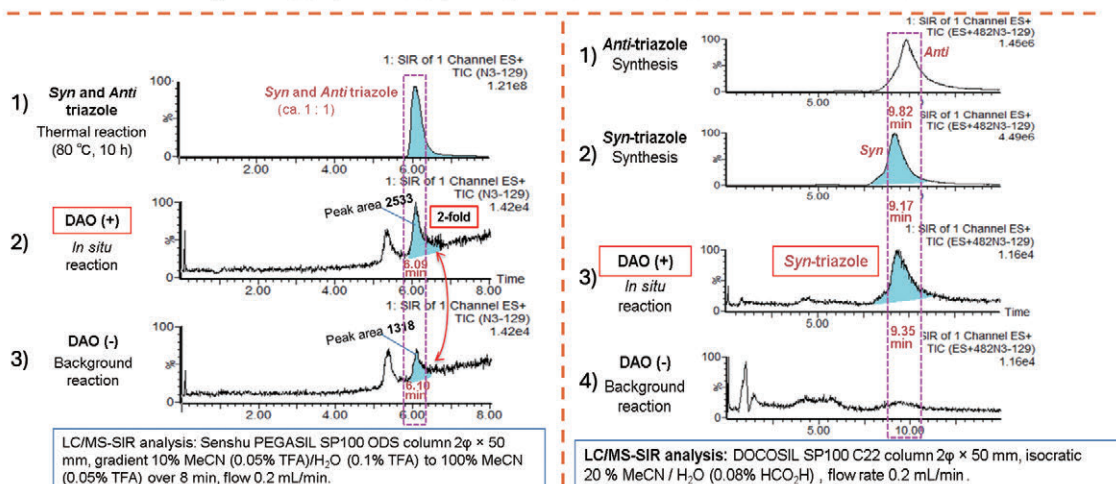
そこでhDAO/イミノDOPAのX線共結晶図を参考にし、*in situ* クリックケミストリーのリガンドをデザイン、合成した結果、hDAO阻害活性を有するO-プロパルギルオキシム **1** ( $K_i = 2.5 \text{ mM}$ ) を見出すことが出来たため、**1** をアルキンリガンドとして *in situ* クリックケミストリーのスクリーニングを実施した(図7-A)<sup>40)</sup>。

*In situ* クリックケミストリーにおいてhDAOを鋳型としたトリアゾールの形成促進効果の探索は、96穴マイクロプレート上で並列に行った(図7-A)。創製したリガンド分子**1**と多様な構造を有する250種の有機アジドライブラリーを用い、pH8.0リン酸バッファーを含む10%メタノール中、hDAO (2  $\mu\text{M}$ ) の存在下で実施した。96穴プレート上でそれぞれの混合溶液を25  $^{\circ}\text{C}$  に

て24時静置させた後、LC/MS-SIR(Liquid chromatography/mass spectrometry-selected ion recording)分析により、各反応混合物の分析を行い、hDAOによるトリアゾール形成促進効果の有無を判定した(図7-B)。その結果、リガンド分子**1**とアジド**2**<sup>41)</sup>から、hDAO依存的にトリアゾール体 **3** の形成促進効果が再現性良く確認された。図7-B-1)のチャートは**1**と**2**から一般的なHuisgen反応条件である80  $^{\circ}\text{C}$ 、10時間加熱を行った時に得られたトリアゾール体 (*syn* : *anti* = 1 : 1) の分析結果である。それと比較して図7-B-3)のチャートはhDAO非存在下で**1**と**2**をバッファー中で混合し25  $^{\circ}\text{C}$  にて24時静置後の分析結果であり、*in situ* クリックケミストリーのバックグラウンド反応を示しており、本反応条件下もしくは本分析条件下においてもわずかにトリアゾール化が進行しているのが確認された。そして図7-B-2)はhDAO存在下での反応であり、バックグラウンド反応と比較して酵素存在下ではその鋳型効果によって約2倍のトリアゾール形成促進が認められたため、リガンド分子**1**とアジド**2**の組み合わせは、hDAOを用いた *in situ* クリックケミストリースクリーニングのヒットと判断した。次にhDAOの鋳型効果により誘導されたトリアゾール体の幾何異性 (*syn* or *anti*) を決定するため、それぞ



A) hDAO存在下、リガンド分子と250種のアジドフラグメントを用いた *in situ* クリックケミストリー



B) ヒットフラグメント**2**におけるLC/MS分析結果

C) 形成促進されたトリアゾール体**3**の異性体の確認

図7 hDAO存在下でのリガンド分子**1**を用いた *in situ* クリックケミストリーによるスクリーニングとヒット化合物のLC/MS分析<sup>40)</sup>

れ対応する*syn*および*anti*トリアゾール異性体をRuAACおよびCuAACにより調製し、それらを標品として詳細なLC/MSの分析を行った。その結果を図7-C)に示すが、hDAO存在下では*syn*-トリアゾール (*Syn-3*)が優先して誘導されていることが確認できた。また*Syn-3*のhDAO阻害活性 ( $K_i = 0.5 \text{ mM}$ )はその出発となるリガンド分子**1** ( $K_i = 2.5 \text{ mM}$ )と比べておよそ5倍向上していた。

以上のようにhDAO存在下で*Syn-3*の選択的な誘導が認められたので、次に*Syn-3*の形成誘導においてhDAOの酵素反応ポケット部位が鋳型となっていることの確認を行なった。そこで図6で示した既知のhDAO阻害剤である安息香酸ナトリウム ( $K_i = 10 \text{ }\mu\text{M}$ )を*in situ* クリックケミストリーの条件に添加することで、その競合拮抗効果を検証した(図8)<sup>40)</sup>。

図8ではアルキンリガンド**1**、およびヒットアジド**2**と同濃度(最終濃度500  $\mu\text{M}$ )の安息香酸ナトリウムを加え、図7-A)と同条件にて*in situ* クリックケミストリーを行った結果を示す。図8中のチャート1) は*Syn-3*のリファレンスピークとなる。それに比べてチャート2) はhDAOにより形成促進された*Syn-3*のピークであるが、チャート3)ではそこに安息香酸ナトリウムを加えることで、

*Syn-3*のピーク面積が約1/5程度に抑制されていることが確認された。なおチャート4)は*in situ* クリックケミストリーのバックグラウンド反応の分析結果である。この結果から今回の*in situ* クリックケミストリーで見出された*Syn-3*は、hDAOの酵素反応部位の鋳型効果によって誘導されていることを証明することが出来た。

### 3-2-4. *In situ* クリックケミストリーを利用した大村天然化合物ライブラリーからのhDAO阻害剤探索

アルキンリガンド**1**とヒットアジド**2**との*in situ* クリックケミストリーでは、安息香酸ナトリウムを添加することでhDAOの鋳型効果が解除されることを確認した。冒頭で述べた通りhDAO阻害剤探索のための効率的なスクリーニング方法がないため、信頼性およびスループット性の高いスクリーニング法の確立が望まれていた。この*in situ* クリックケミストリーの手法ではhDAO酵素反応部位に親和性を有する化合物[=阻害剤(安息香酸ナトリウム)]を用いて、その酵素鋳型効果の有用性を証明したが、阻害剤の探索においてもこのトリアゾール形成促進効果の抑制を指標とすることができると考え、当研究所で保有する大村天然化合物ライブラリー(315化合物)からのhDAO阻害剤の探索を行

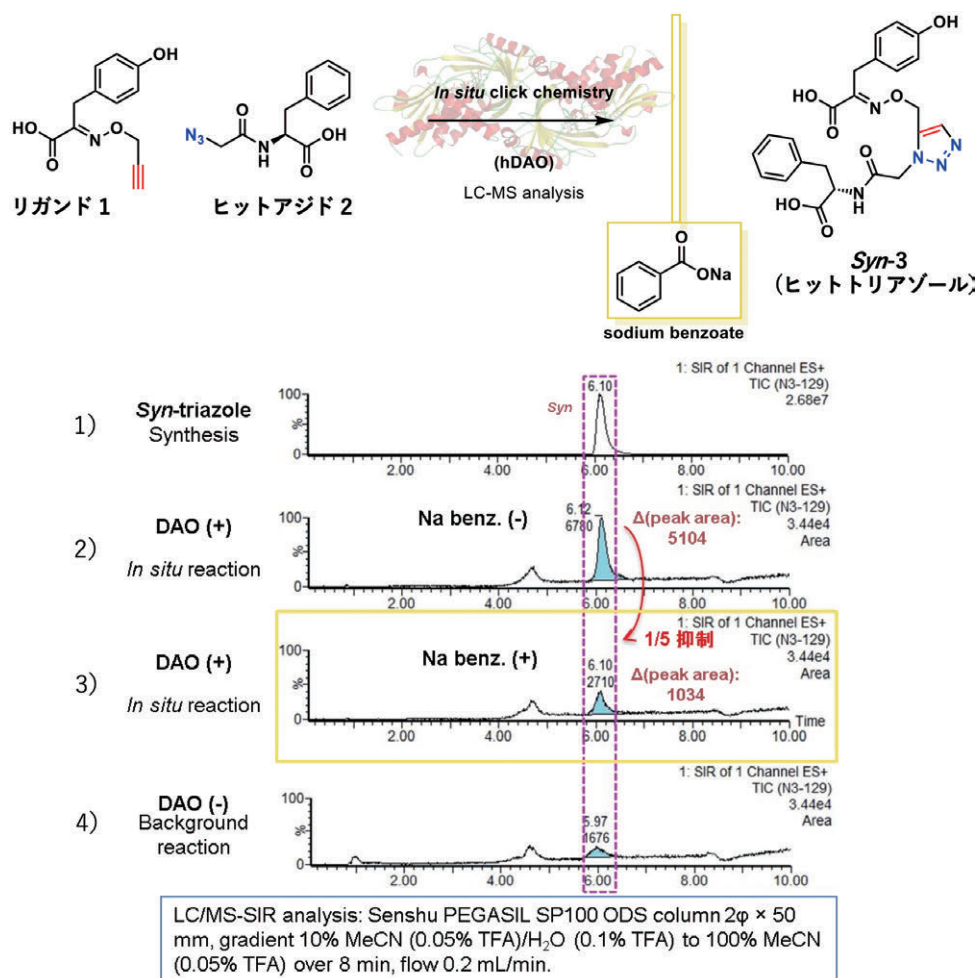


図8 hDAO阻害剤(安息香酸ナトリウム)共存下での*in situ* クリックケミストリー (LC/MSチャート)<sup>40)</sup>



なった(図9)<sup>42)</sup>。

スクリーニング条件は図8で示したアルキンリガンド分子**1**とヒットアジド**2**をhDAO存在下で混合し、そこに天然物サンプルを加えるという簡便なものである。その後、トリアゾール形成促進の抑制効果の有無をLC/MSで判断した。その結果の一例を図9に示した。通常はチャート1)および2)のように、*in situ* クリックケミストリーの反応系に天然物を添加しても、トリアゾール形成促進効果に影響を与えないが、今回のスクリーニングサンプル中でチオラクトマイシンを添加した時、チャート3)のようにトリアゾール形成促進効果は強く抑制されたため、本物質にhDAO阻害活性作用があることが期待された。チオラクトマイシンは抗嫌気性菌活性、type III脂肪酸合成酵素阻害物質として報告されていたが、本天然物の生物活性を詳細に調査したところ、奇しくも2010年に他の研究グループによってそのhDAO阻害活性( $K_d = 0.4 \mu\text{M}$ )が報告<sup>43)</sup>されており、今回の結果は *in situ* クリックケミストリーから見出されたヒット化合物のトリアゾール形成促進効果を利用することで、その標的酵素の阻害活性物質スクリーニングに活用できることを実証したものである。

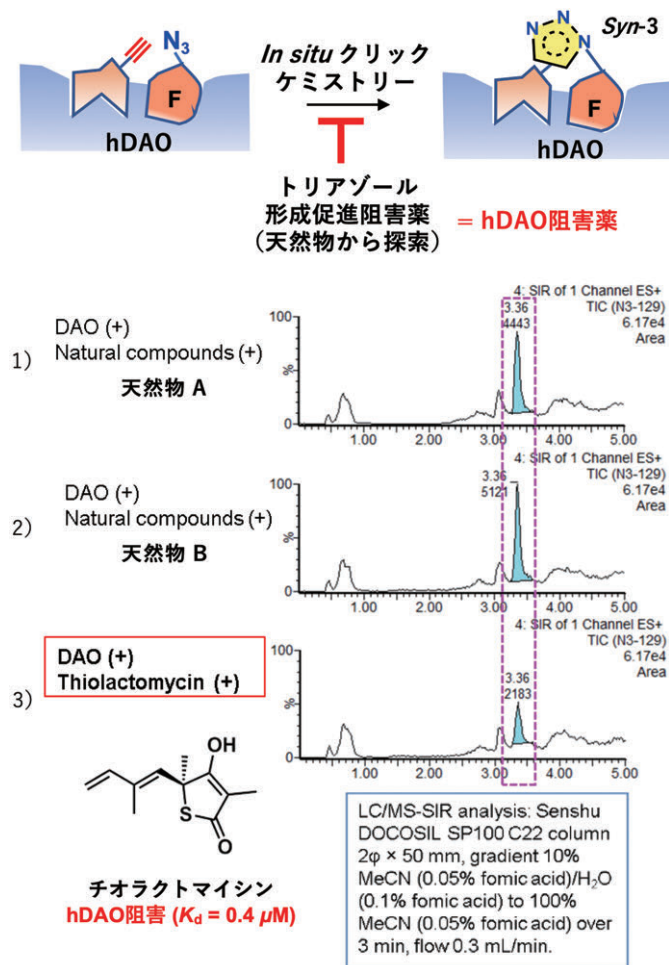


図9 Syn-3の形成促進阻害を指標とした天然物ライブラリーからのhDAO阻害剤探索<sup>42)</sup>

## おわりに

04

当研究所では、これまで天然有機化合物を基盤に*in situ* クリックケミストリーを駆使することで高効率な高活性誘導体の創製研究を実施し、キチナーゼを用いたスクリーニングを実践した経験があった。今回紹介したhDAO阻害剤探索では、広範囲な化合物ライブラリーからの効率的なスクリーニング法がなく、研究開始当初は天然物からの阻害剤探索が暗礁に乗り上げていた。そこで天然物には囚われず、既存の低分子リガンドから*in situ* クリックケミストリーを実践した。さらに、その方法を標的酵素の特異的な阻害剤探索のスクリーニング法に転用することで、天然化合物ライブラリーから効率的にその阻害剤を見出すことが出来た。今回紹介したように*in situ* クリックケミストリーは医薬品や生化学試薬の開発には非常に有用なツールであることを改めて示すことが出来たと考えている。今後幅広い創薬研究分野での益々の利活用を期待したい。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、精力的に実験を行なっていただきました共同研究者である先生方、大学院生、またタンパク質の発現、酵素阻害活性測定にご支援ご尽力いただきました徳島大学福井清先生、頼田和子先生に心よりお礼申し上げます。特に*in situ* クリックケミストリーの研究に熱意を注ぎ、努力と不屈の精神で取り組んでくれた当時の博士課程大学院生 戸口翔平博士に感謝します。また本研究の遂行に必要なアジドライブラリーをご提供くださり、また多くのご助言、ご指導を賜りましたスクリプス研究所 K. B. Sharpless教授に深く感謝いたします。最後に、多大なご指導、ご配慮を賜りました北里大学特別栄誉教授 大村智先生、北里大学学長 砂塚敏明先生に心から感謝申し上げます。

## 参考文献

1. H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 11, 2004-2021.
2. A. Michael and J. Prakt. On the Reaction between Phenyl Azide and Dimethyl Acetylenedicarboxylate. *Chem. Eur. J.* 1893, 48, 94-95.
3. R. Huisgen. Kinetics and reaction mechanisms: selected examples from the experience of forty years. *Pure Appl. Chem.* 1989, 61, 4, 613-628.
4. R. Huisgen. In 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry. Vol. 1 (Ed.: A. Padwa). Wiley, 1984, 1-176.
5. V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, and K. B. Sharpless. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective Ligation of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 14, 2596-2599.
6. C. W. Tornøe, C. Christensen, and M. Meldal. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* 2002, 67, 9, 3057-3064.
7. B. T. Worrell, J. A. Malik, and V. V. Fokin. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science*. 2013, 340, 6131, 457-460.
8. L. Zhang, X. Chen, P. Xue, H. H. Y. Sun, I. D. Williams, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, and G. Jia. Ruthenium-Catalyzed



- Cycloaddition of Alkynes and Organic Azides. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 46, 15998-15999.
9. K. B. Sharpless and R. Manetsch. In situ click chemistry: a powerful means for lead discovery. *Expert Opin. Drug. Discov.* 2006, 1, 6, 525-538.
  10. W. G. Lewis, L. G. Green, F. Grynszpan, Z. Radić, P. R. Carlier, P. Taylor, M. G. Finn, and K. B. Sharpless. Click Chemistry In Situ: Acetylcholinesterase as a Reaction Vessel for the Selective Assembly of a Femtomolar Inhibitor from an Array of Building Blocks. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 6, 1053-1057.
  11. F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, and V. V. Fokin. Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 1, 210-216.
  12. V. P. Mocharla, B. Colasson, L. V. Lee, S. Röper, K. B. Sharpless, C.-H. Wong, and H. C. Kolb. In Situ Click Chemistry: Enzyme-Generated Inhibitors of Carbonic Anhydrase II. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 1, 116-120.
  13. J. Wang, G. Sui, V. P. Mocharla, R. J. Lin, M. E. Phelps, H. C. Kolb, and H.-R. Tseng. Integrated Microfluidics for Parallel Screening of an In Situ Click Chemistry Library. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 32, 5276-5281.
  14. Y. Wang, W.-Y. Lin, K. Liu, R. J. Lin, M. Selke, H. C. Kolb, N. Zhang, X.-Z. Zhao, M. E. Phelps, C. K. F. Shen, K. F. Faull, and H.-R. Tseng. An integrated microfluidic device for large-scale in situ click chemistry screening. *Lab. Chip.* 2009, 9, 2281-2285.
  15. S. S. Lee, J. Lim, S. Tan, J. Cha, S. Y. Yeo, H. D. Agnew, and J. R. Heath. Accurate MALDI-TOF Sequencing of One-Bead-One-Compound Peptide Libraries with Application to the Identification of Multiligand Protein Affinity Agents Using in Situ Click Chemistry Screening. *Anal. Chem.* 2010, 82, 672-679.
  16. R. Srinivasan, M. Uttamchandani, and S. Q. Yao. Rapid Assembly and in Situ Screening of Bidentate Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatases. *Org. Lett.* 2006, 8, 4, 713-716.
  17. A. Saghatelian, N. Jessani, A. Joseph, M. Humphrey, and B. F. Cravatt. Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004, 101, 27, 10000-10005.
  18. S. A. Sieber, S. Niessen, H. S. Hoover, and B. F. Cravatt. Proteomic profiling of metalloprotease activities with cocktails of active-site probes. *Nat. Chem. Biol.* 2006, 2, 274-281.
  19. M. Whiting, J. Muldoon, Y.-C. Lin, S. M. Silverman, W. Lindstrom, A. J. Olson, H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, J. H. Elder, and V. V. Fokin. Inhibitors of HIV-1 protease by using in situ click chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 1435-1439.
  20. T. Hirose, T. Sunazuka, A. Sugawara, A. Endo, K. Iguchi, T. Yamamoto, H. Ui, K. Shiomi, T. Watanabe, K. B. Sharpless, and S. Ōmura. Chitinase inhibitors: extraction of the active framework from natural argifin and use of in situ click chemistry. *J. Antibiot.* 2009, 62, 277-282.
  21. T. Hirose, T. Sunazuka, and S. Ōmura. Recent development of two chitinase inhibitors, Argifin and Argadin, produced by soil microorganisms. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.* 2010, 86, 2, 85-102.
  22. T. Hirose, N. Maita, H. Gouda, J. Koseki, T. Yamamoto, A. Sugawara, H. Nakano, S. Hirono, K. Shiomi, T. Watanabe, H. Taniguchi, K. B. Sharpless, S. Ōmura, and T. Sunazuka. Observation of the controlled assembly of preclick components in the In situ Click Chemistry generation of a chitinase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013, 110, 40, 15892-15897.
  23. N. Willand, M. Desroses, P. Toto, B. Diré, Z. Lens, V. Villeret, P. Rucktooa, C. Locht, A. Baulard, and B. Deprez. Exploring Drug Target Flexibility Using in Situ Click Chemistry: Application to a Mycobacterial Transcriptional Regulator. *ACS Chem. Biol.* 2010, 5, 11, 1007-1013.
  24. S. W. Millward, R. K. Henning, G. A. Kwong, S. Pitram, H. D. Agnew, K. M. Deyle, A. Nag, J. Hein, S. S. Lee, J. Lim, J. A. Pfeilsticker, K. B. Sharpless, and J. R. Heath. Iterative in Situ Click Chemistry Assembles a Branched Capture Agent and Allosteric Inhibitor for Akt1. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 45, 18280-18288.
  25. N. P. Grimster, B. Stump, J. R. Fotsing, T. Weide, T. T. Talley, J. G. Yamauchi, A. Nemezc, C. Kim, K.-Y. Ho, K. B. Sharpless, P. Taylor, and V. V. Fokin. Generation of Candidate Ligands for Nicotinic Acetylcholine Receptors via in situ Click Chemistry with a Soluble Acetylcholine Binding Protein Template. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 15, 6732-6740.
  26. M. D. Antonio, G. Biffi, A. Mariani, E.-A. Raiber, R. Rodriguez, and S. Balasubramanian. Selective RNA Versus DNA G-Quadruplex Targeting by In Situ Click Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 44, 11073-11078.
  27. W. Tieu, T. P. Soares da Costa, M. Y. Yap, K. L. Keeling, M. C. J. Wilce, J. C. Wallace, G. W. Booker, S. W. Polyak, and A. D. Abell. Optimising in situ click chemistry: the screening and identification of biotinprotein ligase inhibitors. *Chem. Sci.* 2013, 4, 3533-3537.
  28. A. Bhardwaj, J. Kaur, M. Wuest, and F. Wuest. In situ click chemistry generation of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Nat. Commun.* 2017, 8, 1-14.
  29. 廣瀬友靖, 大村智. クリックケミストリーと創薬 - 生物活性天然物の誘導体を迅速につくる. 化学と工業. 2007, 60, 10, 984-986.
  30. 廣瀬友靖. 天然物を基にした特異的かつ強力なキチナーゼ阻害剤の創製研究. YAKUGAKU ZASSHI. 2012, 132, 9, 1001-1010.
  31. 廣瀬友靖, 砂塚敏明. 天然物を基盤とした in situ クリックケミストリー. 月刊ファインケミカル. 2014, 2, 37-44.
  32. 廣瀬友靖, 砂塚敏明. クリックケミストリー - 基礎から - 実用まで. シーエムシー出版, 2014.
  33. 廣瀬友靖 徳島大学疾患酵素学研究センター ニュースレター 7, 9 (2014)
  34. I. Chumakov, et al. Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for d-amino acid oxidase in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002, 99, 21, 13675-13680.
  35. H. K. Park, Y. Shishido, S. Ichise-Shishido, T. Kawazoe, K. Ono, S. Iwana, Y. Tomita, K. Yorita, T. Sakai, and K. Fukui. Potential Role for Astroglial d-Amino Acid Oxidase in Extracellular d-Serine Metabolism and Cytotoxicity. *J. Biochem.* 2006, 139, 2, 295-304.
  36. H. A. Krebs. Metabolism of amino-acids. *Biochem. J.* 1935, 29, 7, 1620-1644.
  37. M. Gabler, M. Hensel, and L. Fischer. Detection and substrate selectivity of new microbial D-amino acid oxidases. *Enzyme Microb. Technol.* 2000, 27, 8, 605-611.
  38. T. Kawazoe, H. Tsuge, M. S. Pilone, and K. Fukui. Crystal structure of human D-amino acid oxidase: Context-dependent variability of the backbone conformation of the VAAGL hydrophobic stretch located at the si-face of the flavin ring. *Protein Sci.* 2006, 15, 12, 2708-2717.
  39. T. Kawazoe, H. K. Park, S. Iwana, H. Tsuge, and K. Fukui. Human D-amino acid oxidase: an update and review. *Chem. Rec.* 2007, 7, 5, 305-315.
  40. S. Toguchi, T. Hirose, K. Yorita, K. Fukui, K. B. Sharpless, S. Ōmura, and T. Sunazuka. In Situ Click Chemistry for the Identification of a Potent D-Amino Acid Oxidase Inhibitor. *Chem. Pharm. Bull.* 2016, 64, 7, 695-703.
  41. S. W. Millward, R. K. Henning, G. A. Kwong, S. Pitram, H. D. Agnew, K. M. Deyle, A. Nag, J. Hein, S. S. Lee, J. Lim, J. A. Pfeilsticker, K. B. Sharpless, and J. R. Heath. Iterative in Situ Click Chemistry Assembles a Branched Capture Agent and Allosteric Inhibitor for Akt1. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 45, 18280-18288.
  42. 北里大学大学院 感染制御科学府 戸口翔平 博士論文 (2016)
  43. M. Katane, Y. Saitoh, T. Hanai, M. Sekine, T. Furuchi, N. Koyama, I. Nakagome, H. Tomoda, S. Hirono, and H. Homma. Thiolactomycin inhibits d-aspartate oxidase: A novel approach to probing the active site environment. *Biochimie.* 2010, 92, 10, 1371-1378.

[illegible][illegible]

有機合成をはじめ、材料化学、電気化学などの研究開発に

# 脱水溶媒のリーディングカンパニー

日本初 「脱水溶媒」を製造販売

業界初

溶存酸素量( $O_2$ として) **1 ppm**以下、

水分値 **1 ppm**以下 を保証する分析技術

## 1 Arガスを充填し、安定した品位でご提供

※ジエチルエーテルを除く

## 2 多彩な溶媒×容量で、 研究・生産を強力サポート！

※アセトニトリル、アニソール、ジクロロメタン、

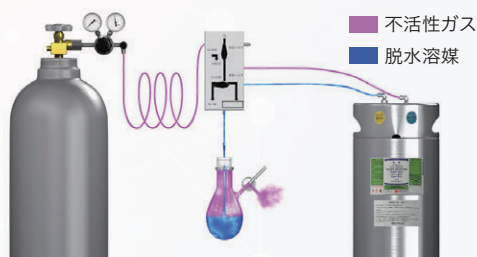
N,N-ジメチルホルムアミドなど約40種をラインアップ

※容量は100 mL、500 mL、3 Lから100 Lなどの大型容器まで、

用途に応じたサイズをご用意



グレード	水分値	溶存酸素量(as $O_2$ )
-Super <sup>2</sup> plus-	< 1 ppm	< 1 ppm
-Super <sup>2</sup> -	< 1 ppm	—
-Super plus-	< 10 ppm	< 1 ppm
-Super-	< 10 ppm	—
脱水溶媒	< 20-50 ppm	—



配管接続例

ガス圧送式供給システムを組む  
ことにより、高い気密性・品位を  
保ちながらご使用いただくこと  
ができます。

製品紹介動画



# キーワード解説

## ■ クリックケミストリー

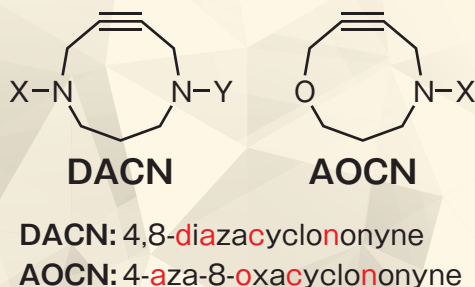
「カチッ」と音がすると同時に結合が完了するシートベルトのように、簡単に分子を連結して新たな機能性分子を創り出す手法のこと。1998年にスクリプス研究所のバリー・シャープレス教授により提唱され、2022年に「クリックケミストリーと生体直交化学」の開発の業績により、モーデン・メルダン教授、キャロライン・ベルトツィ教授らとともにノーベル化学賞が授与された。

## ■ Huisgen環化反応

ヘテロ原子を含む双極子とアルキン/アルケンとの間で進行する[3+2]環化付加反応のこと。ドイツ ミュンヘン大学のヒュスゲン名誉教授が開発した有名な人名反応のひとつです。なかでもアジドとアルキンからトリアゾール誘導体を与える反応は、クリックケミストリーにおける中心的役割を担っている。

## 高性能アルキン DACN・AOCN 新規ラインナップ追加決定!!

DACN、AOCNは九州大学 先導物質化学研究所 友岡教授、河崎助教、  
熊本大学大学院先端科学研究部 井川教授らによって開発された  
無触媒クリック反応素子です。



### 特長

- 高収率・高選択的なクリック反応素子
- 人体に有害なCu触媒不要
- 高い生体直交性
- 高い安定性

当社HPでは、ケミカルタイムス最新号、バックナンバーを公開しております。

ケミカルタイムス URL  
<https://www.kanto.co.jp/times.html>

関東化学 URL  
<https://www.kanto.co.jp/>

2次元バーコードはこちらです ▶▶▶



※無断転載および複製を禁じます。

 関東化学株式会社

〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号  
室町東三井ビルディング

電話(03)6214-1090 FAX(03)3241-1047

E-mail: chemiti-info@kanto.co.jp 編集責任者: 菅 孝剛

2026年1月発行