

# 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。

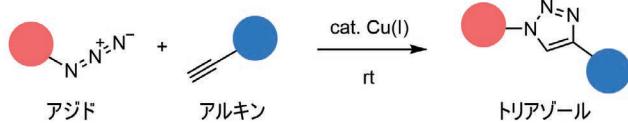
Sharplessらによりクリックケミストリーの概念が提唱<sup>1)</sup>されて以降、数多くのクリック反応が手軽に利用できる分子連結手法として開発された。その代表例が、銅触媒を用いたアジドと末端アルキンとのHuisgen型付加環化(Cu(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition; CuAAC)反応である(図1A)<sup>2)</sup>。また、触媒を必要としない、より簡便な手法として、シクロオクチンなどの内員環アルキンの歪みの解消を駆動力とするアジドとの付加環化(Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition;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

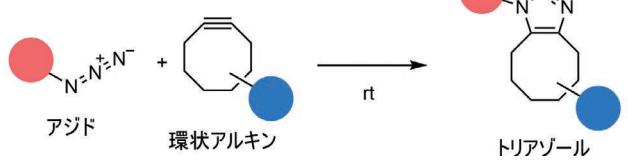


図1 代表的なクリック反応

## 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1にアジド化合

物を作成すると、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2に対して銅塩を作成することで環状アルキン-銅錯体3を形成でき、これにアジド4を作用させても付加環化生成物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成することで、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6に対して銅塩(2当量)を作成させた後、アジド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、それにつづ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合成功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)。

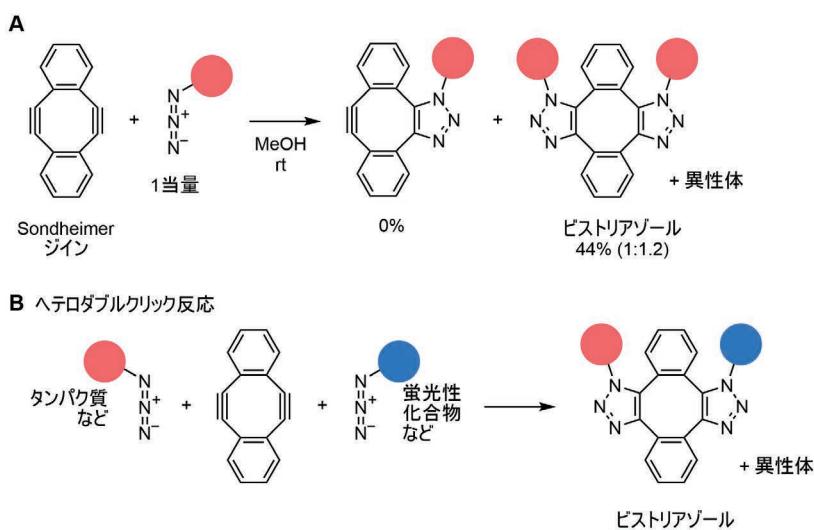


図2 Sondheimerジインを用いるダブルクリック反応

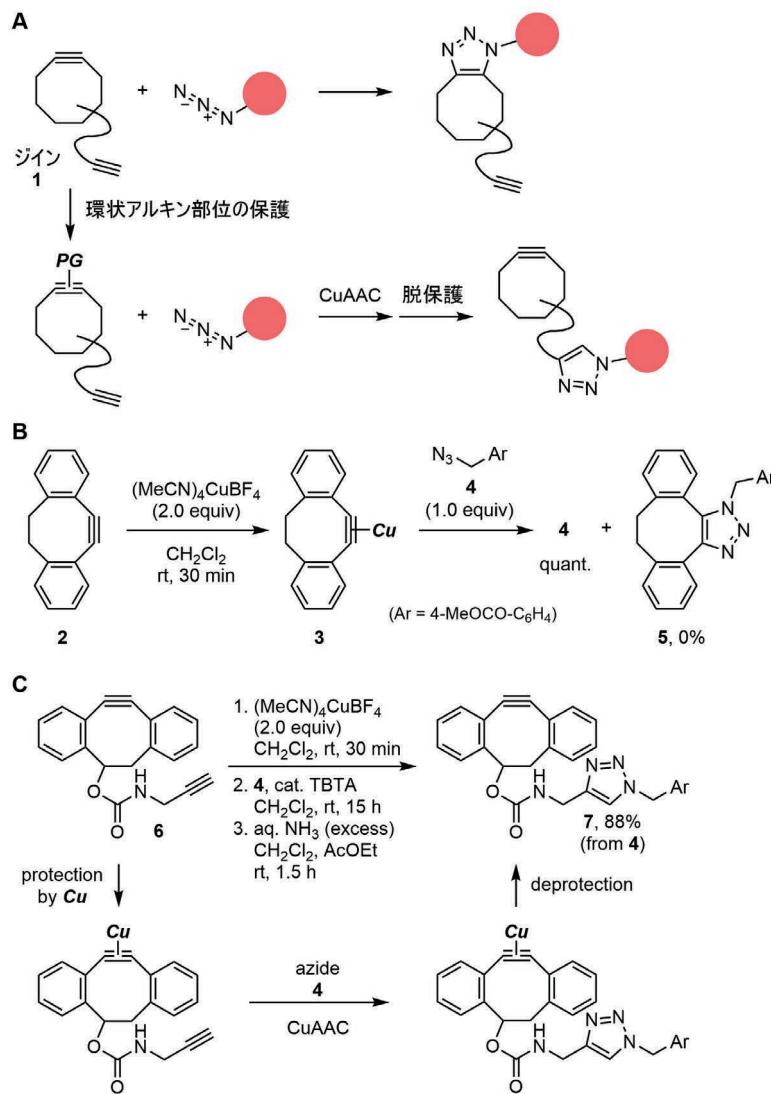


図3 銅塩による環状アルキンの保護を利用した機能性環状アルキンの合成

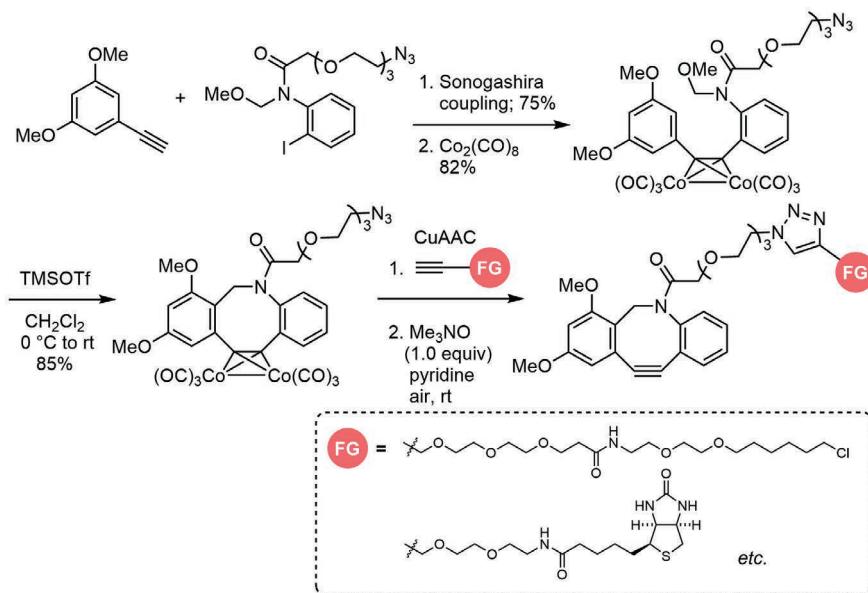


図4 アジド基を有するDIBACコバルト錯体の合成と応用

## 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

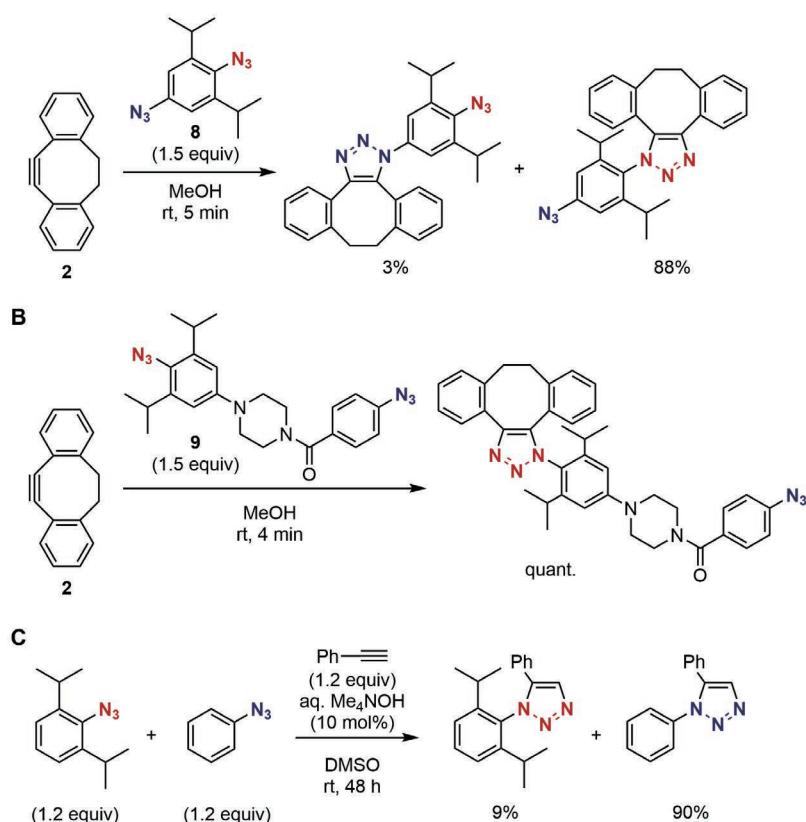


図5 かさ高い芳香族アジドを用いた選択的クリック反応

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、ジベンジ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りガンド部位を有する $\beta$ -ケトアミド

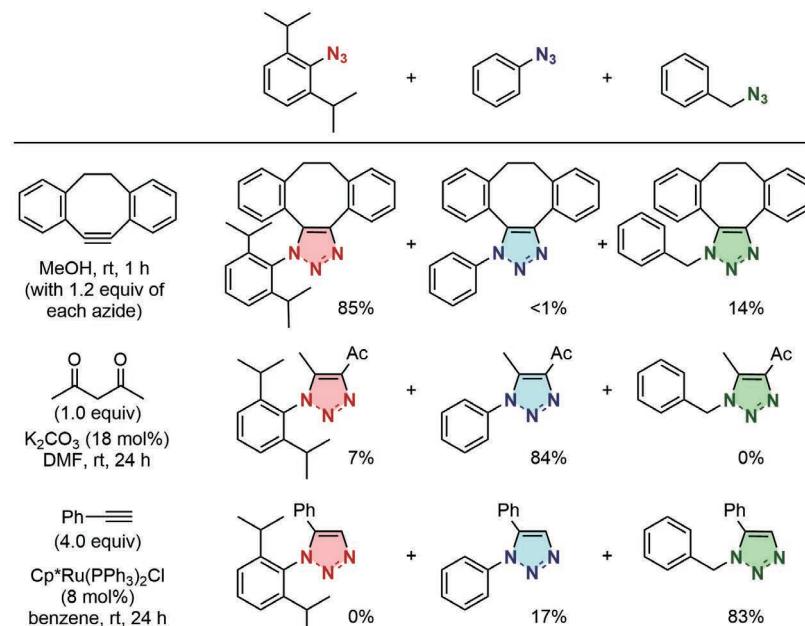


図6 異種アジド選択的クリック反応

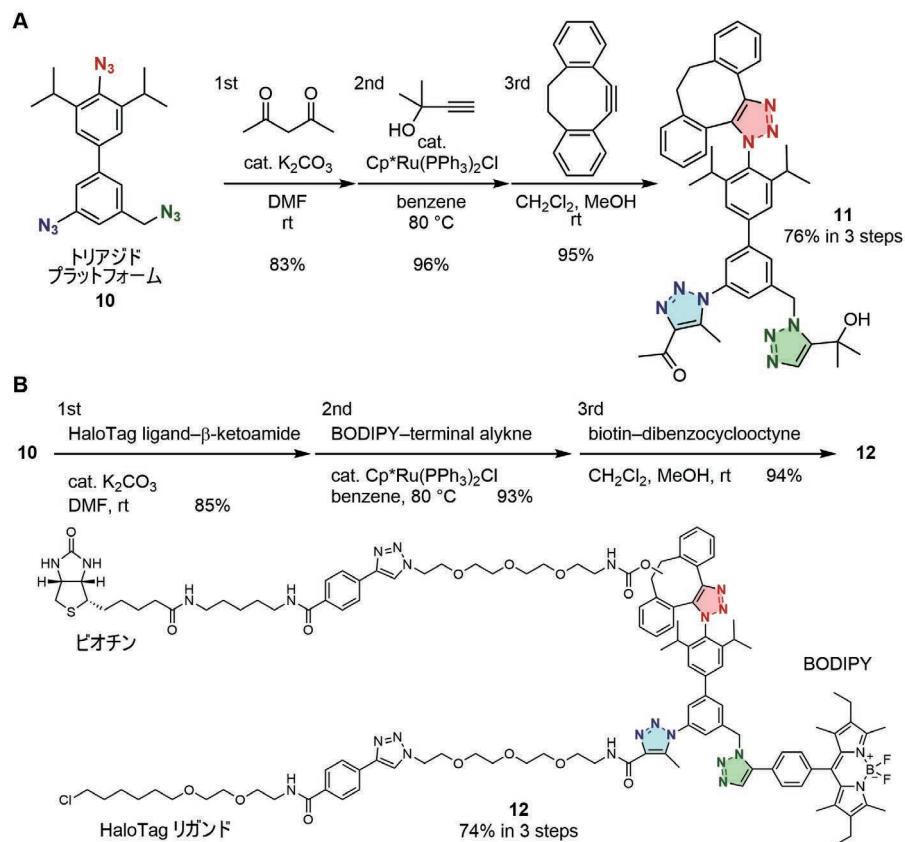


図7 トリアジドプラットフォームを用いる逐次連結

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シンによる検出感度が最も高いトリリストリアゾール<sup>12</sup>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のアジドを探査した。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<sup>13</sup>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<sup>14</sup>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<sup>15</sup>を4工程で合成すること

にも成功した。

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<sup>18</sup>の形成に伴い反応点が近づくことでトリアゾール<sup>19</sup>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

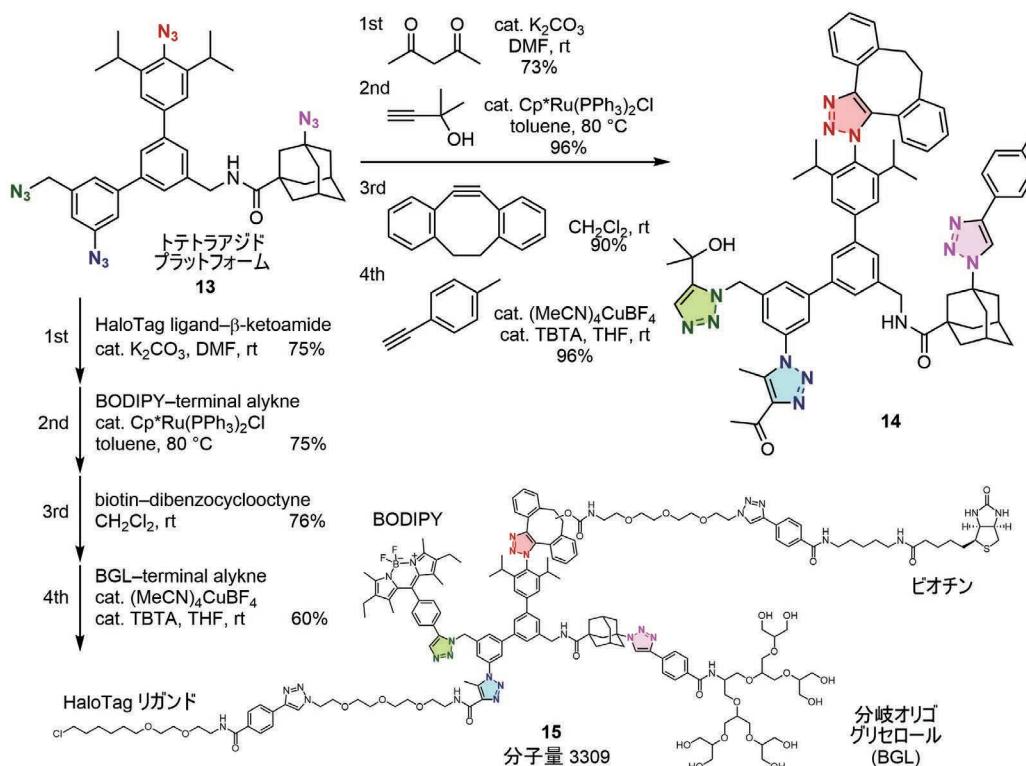


図8 テトラアジドプラットフォームを用いる逐次連結

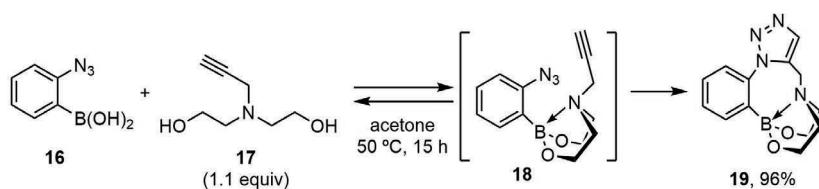


図9 ボラート形成を起点とするトリアゾール形成反応

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。

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、我々がこれまでに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、その点は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

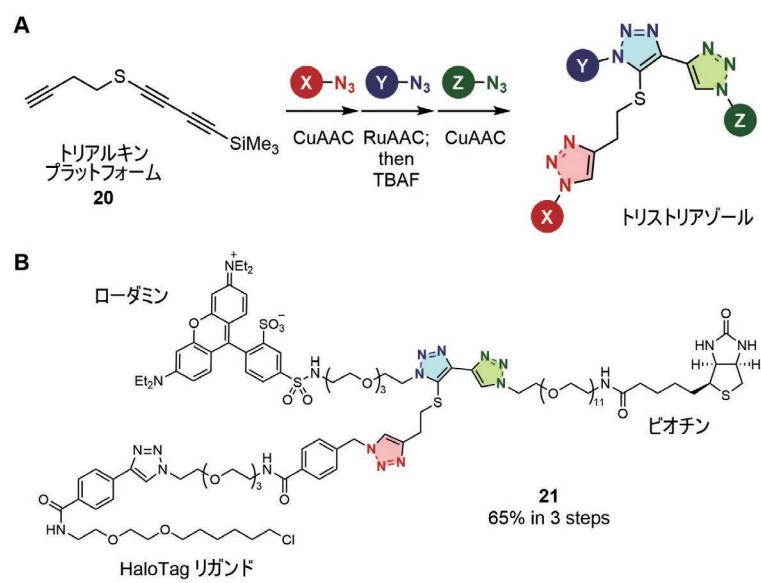


図10 トリアルキンプラットフォームを用いる逐次連結

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

- 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.
- (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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- P. Destito, J. R. Couceiro, H. Faustino, F. López, and J. L. Mascareñas, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, 56, 36, 10766-10770.