

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¹⁾。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 10π 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²⁻⁴⁾、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⁵⁾。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⁶⁾。

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

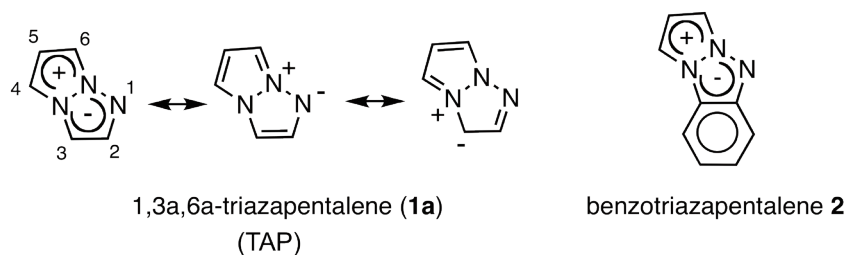


図1 1,3a,6a-トリアザペンタレン (**1a**) とベンゾトリアザペンタレン (**2**) の構造

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β脱離 (**3aB** → **3aC**)、脱プロトン化 (**3aC** → **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⁶⁾。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⁷⁾。

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^{6, 8)}。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)⁹⁾。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

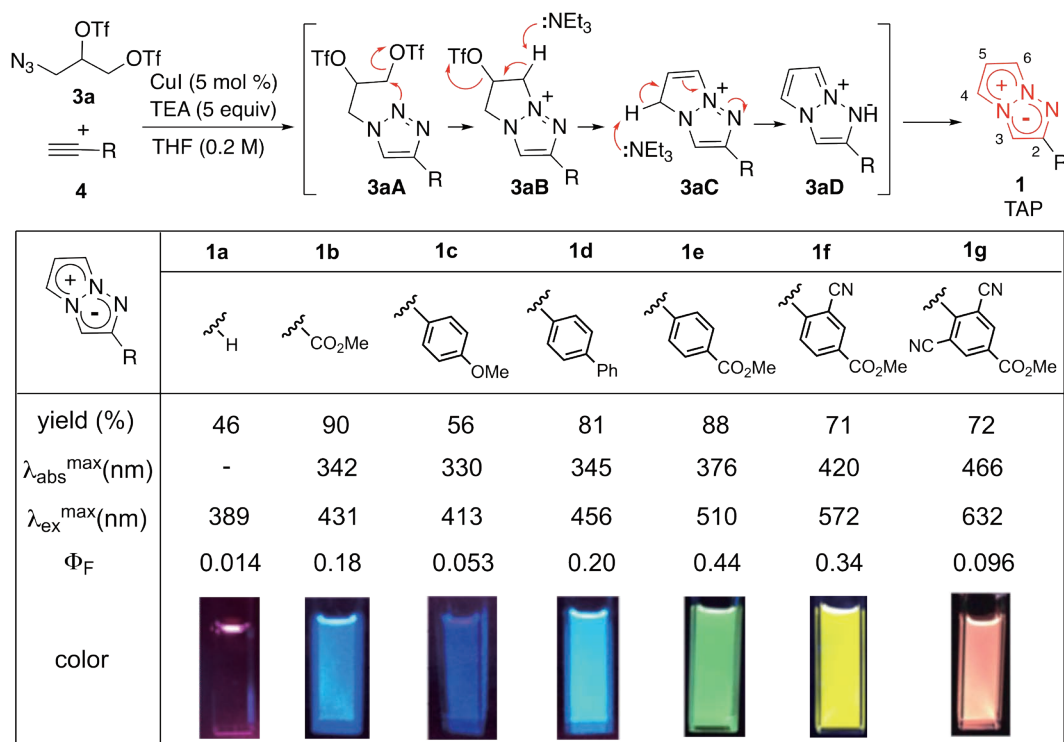


図2 TAP の一段階合成法と蛍光特性

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¹⁰⁾。

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⁸⁾。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⁹⁾。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¹⁰⁾。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)。

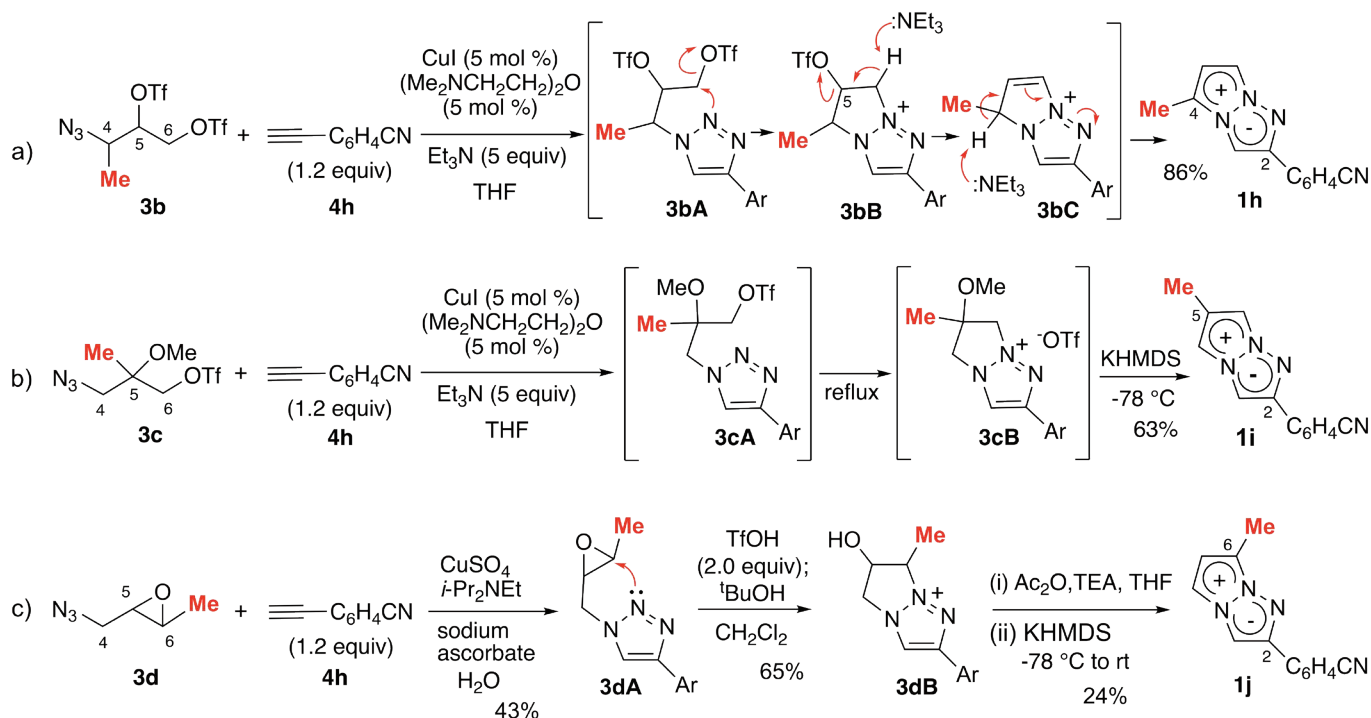


図3. 二置換TAPの合成経路。a) 2,4-二置換TAPの合成。b) 2,5-二置換TAPの合成。c) 2,6-二置換TAPの合成

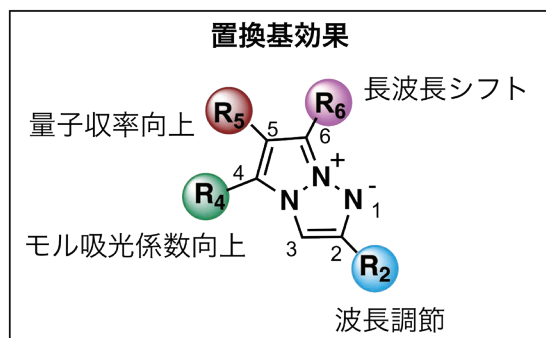


図4 TAPの置換基効果

TAPワイヤーの合成と評価¹¹⁾

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¹¹⁾。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、 10π 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。

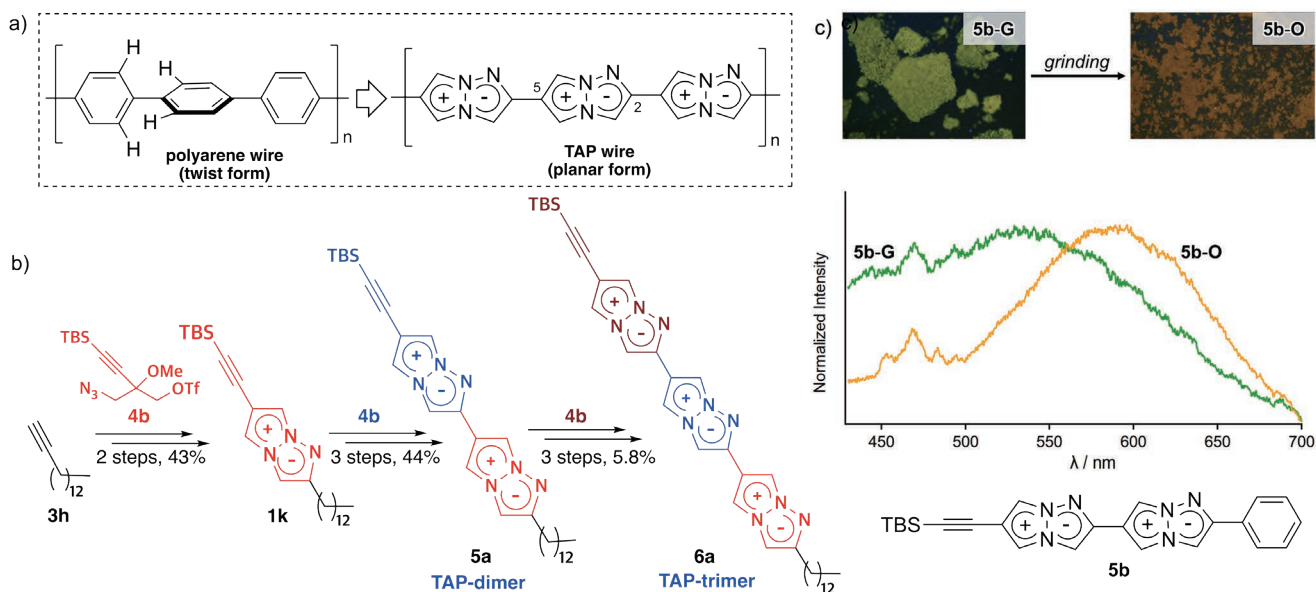


図5 TAPワイヤーの合成と評価。a) Polyarene wireとTAP wire。b) TAP連結体の合成。c) TAP二量体のメカノクロミック蛍光。図5aおよび5bは参考文献11より引用

最小の蛍光標識基TAP-VK1¹²⁾

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¹³⁾。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を作用させたところ、付加反応は円滑に進行しVK1-Captopril 10 を収率82%で得た(図

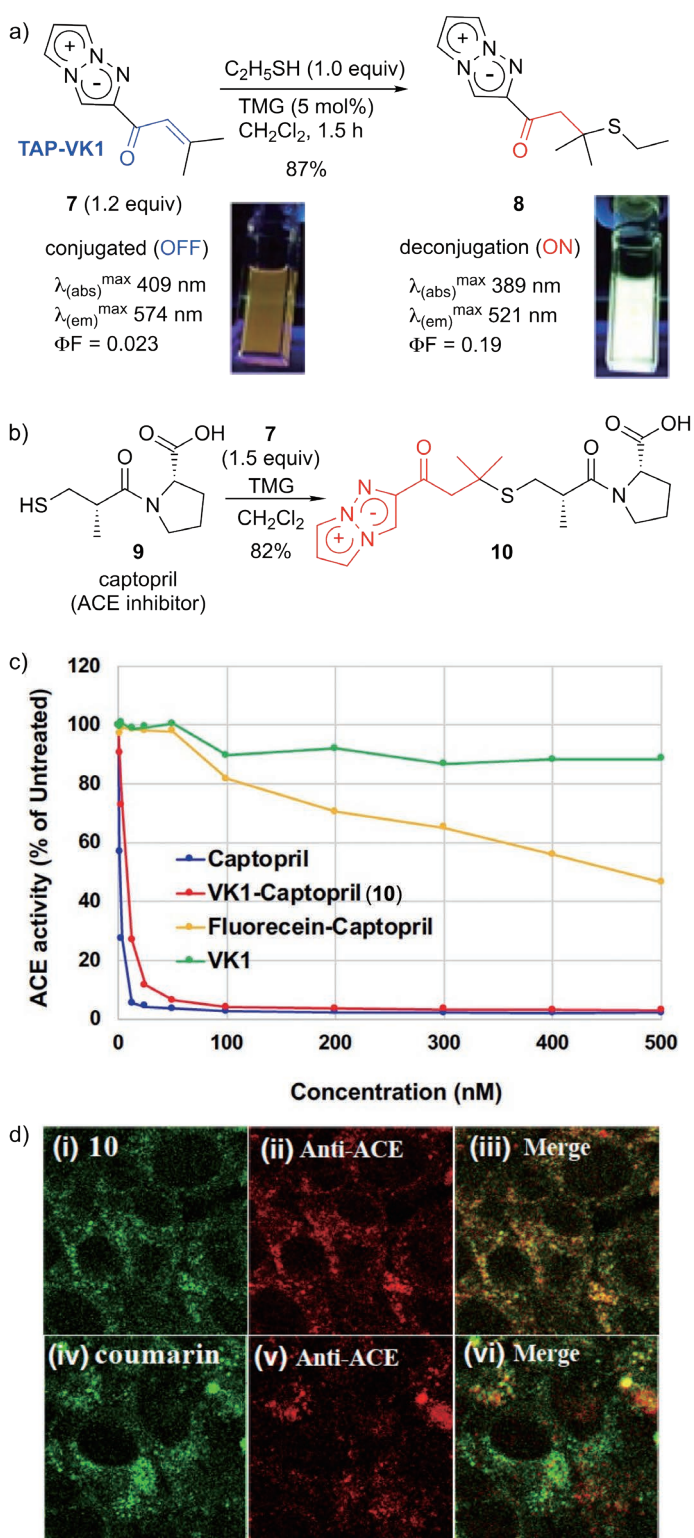


図6 最小蛍光標識基TAP-VK1の開発。a) TAP-VK1 の反応と蛍光特性。b) TAP-VK1 によるカプトプリルの標識。c) 標識カプトプリルの ACE 阻害活性。d) 血管内皮細胞における TAP 標識カプトプリルとクマリン標識カプトプリルの蛍光観察。図6a-dは参考文献12より引用

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^{14, 15)}、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¹⁶⁾、既に市販されているTAP細胞染色試薬¹⁷⁾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¹⁸⁾、TAP-VK1を利用した歯周病の簡易検査キット¹³⁾、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¹⁹⁾。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 γ -(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.