

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な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¹⁾。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²⁾。その後、半世紀以上を経

てR. Huisgen教授による詳細な研究が行われ^{3, 4)}、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)^{5, 6)}。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⁷⁾。さらに2005年にRu(II)触媒によるsyn-選択性トリアゾール化(RuAAC)がSharpless教授のグループから報告され⁸⁾、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)異性体の選択性の合成が可能となっている。

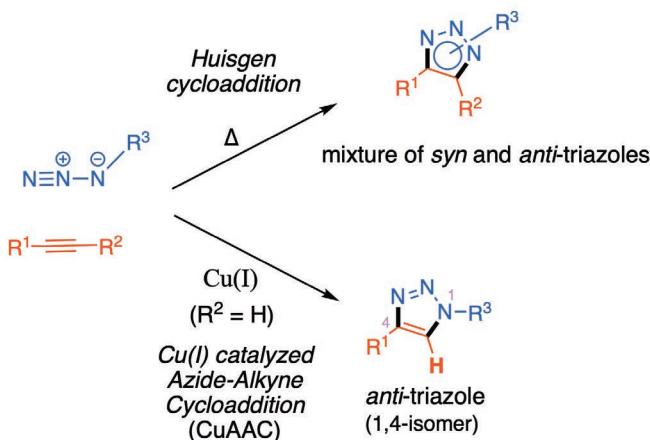
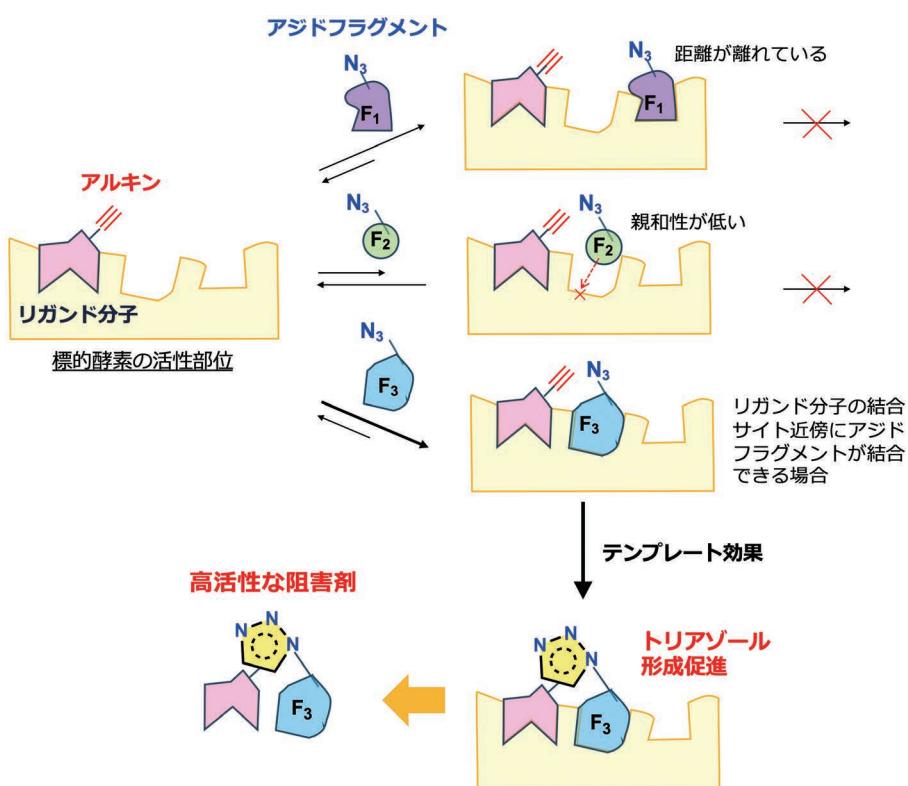


図1 有機アジドとアルキンのトリアゾール形成

「*In situ* クリックケミストリー」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^{9, 10)}。 "*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(鑄型)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、標的酵素が鑄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鑄型となるため、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¹¹⁾。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鑄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反応が酵素鑄型効果を介さず1%進行してしまうと、酵素鑄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)条件では反応が殆ど進行しないことが*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)¹⁰⁾。

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 $K_d = 18 \text{ nM}$ 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 $K_d = 1.1 \mu\text{M}$ 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鋳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($K_d = 99 \text{ fM}$)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¹²⁻¹⁵⁾、プロテインチロシンfosfataーゼ¹⁶⁾、金属プロテアーゼ^{17, 18)}、HIV-1プロテアーゼ¹⁹⁾、セラチアキチナーゼ(SmChi)²⁰⁻²²⁾、結核菌のEthRタンパク質²³⁾、Akt1²⁴⁾、アセチルコリン結合タンパク質²⁵⁾、G-Quadruplex²⁶⁾、ビオチンタンパク質リガーゼ²⁷⁾ および、シクロオキシゲナーゼ²⁸⁾を標的とした新規阻害剤の探索が報告されている。

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²⁰⁻²²⁾。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²⁹⁻³³⁾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³⁴⁾。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、

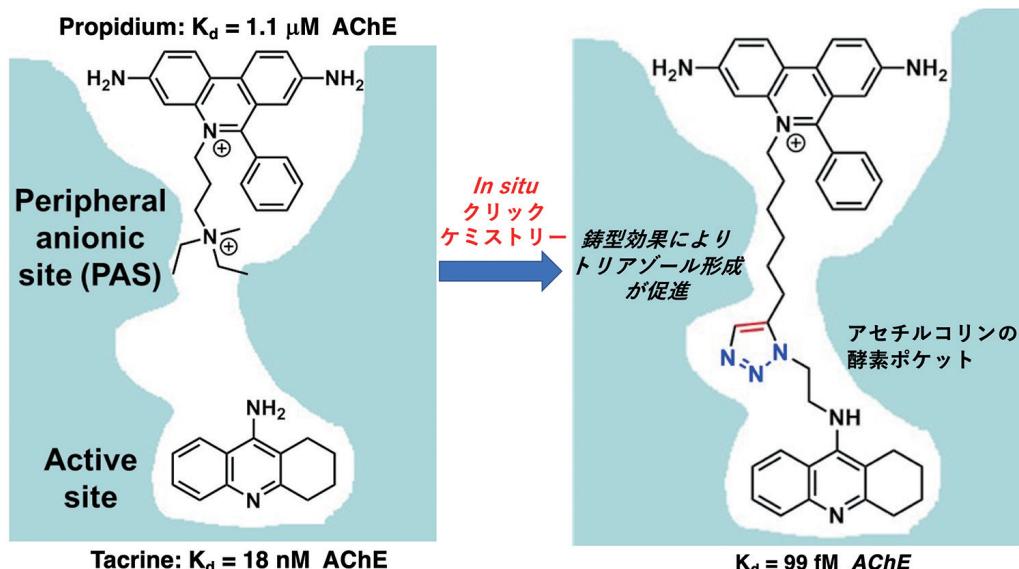


図3 *In situ* クリックケミストリーの初の報告例

前脳内に豊富に存在していることが示唆されている³⁵⁾。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により発見されたラビン酵素として知られている³⁶⁾。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 α -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 α -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)³⁷⁾。

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しう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³⁸⁾。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。

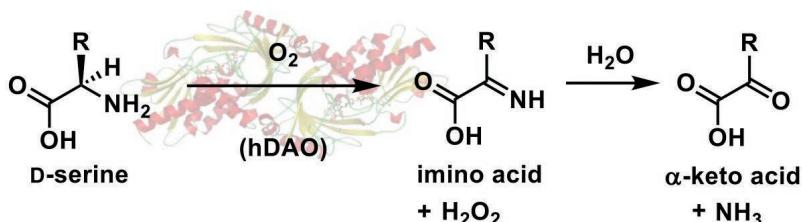


図4 ヒトD-アミノ酸酸化酵素(hDAO)によるD-セリンの酸化

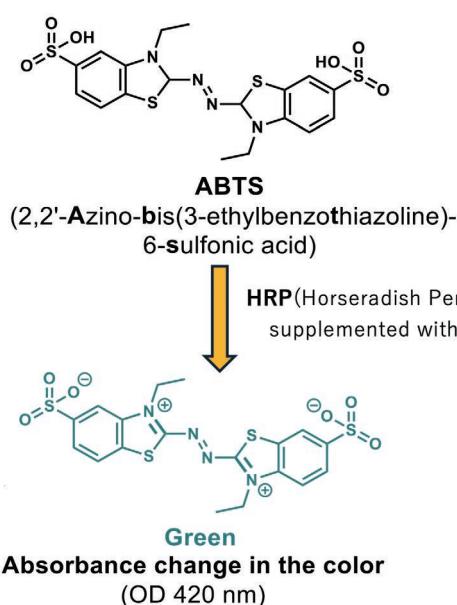


図5 H_2O_2 を定量するアッセイ(HRP/ABTS法)

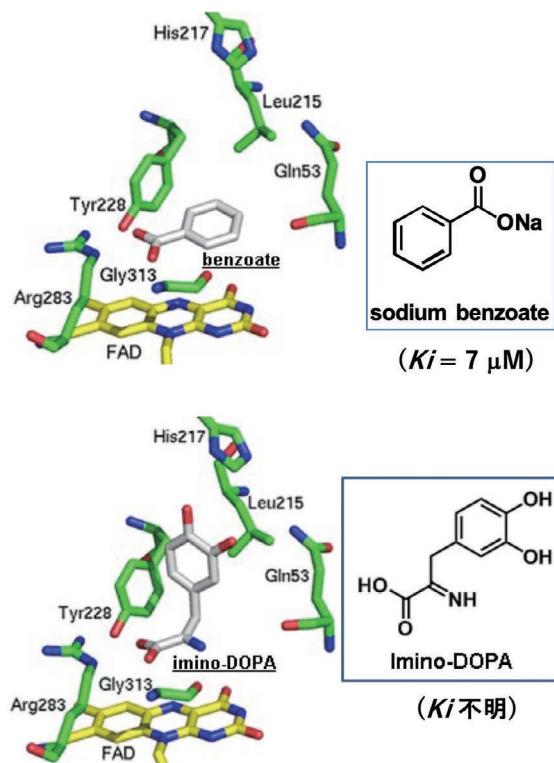


図6 hDAO/sodium benzoate³⁸⁾およびhDAO/imino-DOPA³⁹⁾の結晶構造

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)^{38,39}。

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** ($K_i = 2.5 \mu\text{M}$)を見出しが出来た、**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)⁴⁰。

*In situ*クリックケミストリーにおいてhDAOを鉄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なった(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 μM)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 °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**⁴¹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好に確認された。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 °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**をバッファー中に混合し25 °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鉄型効果によって約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の鉄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

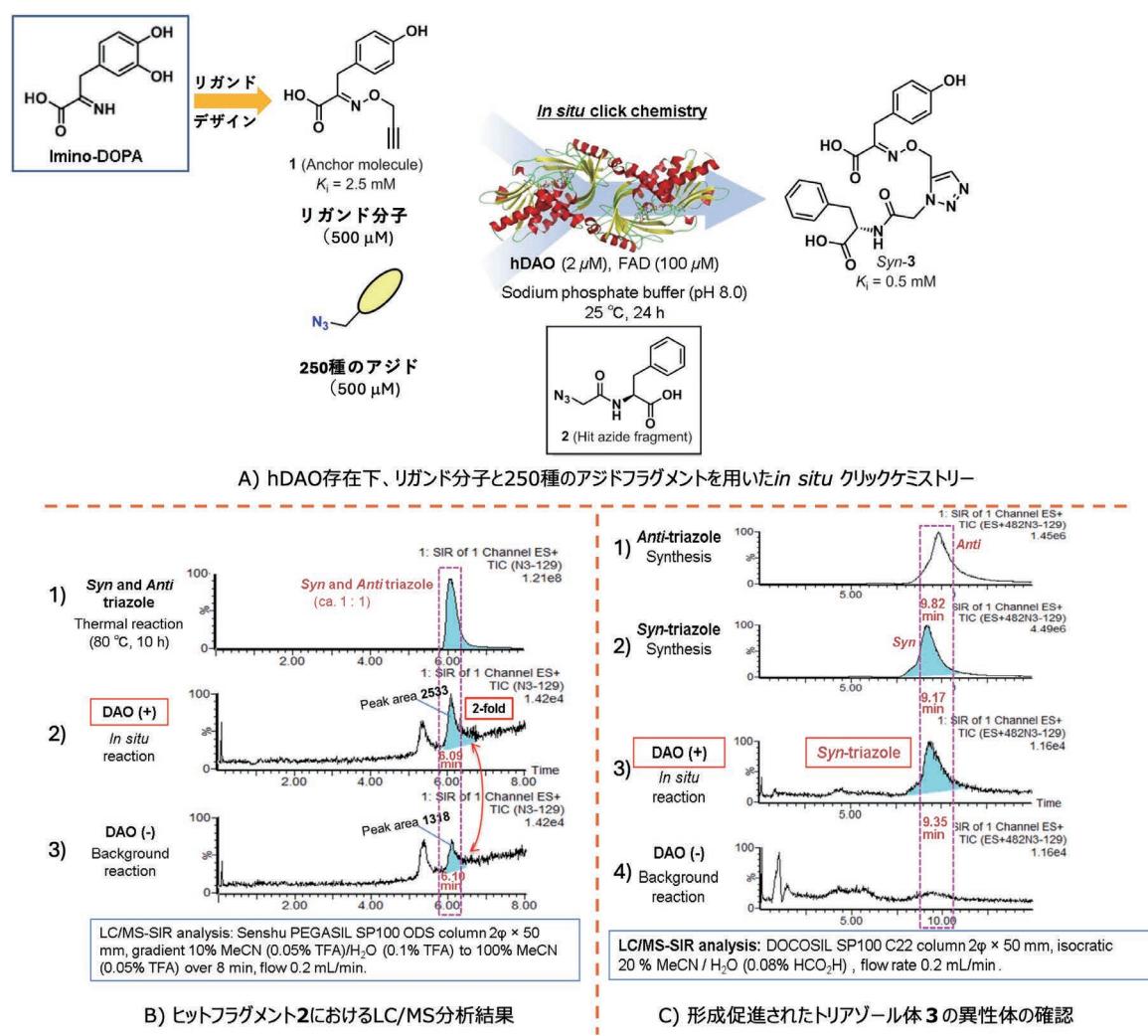


図7 hDAO存在下でのリガンド分子**1**を用いた*in situ*クリックケミストリーによるスクリーニングとヒット化合物のLC/MS分析⁴⁰⁾

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 ($K_i = 0.5$ mM)はその出発となるリガンド分子1 ($K_i = 2.5$ 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の酵素反応部位が鋳型となっていることを確認を行なった。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 ($K_i = 10 \mu\text{M}$)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)⁴⁰。

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 μM)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物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

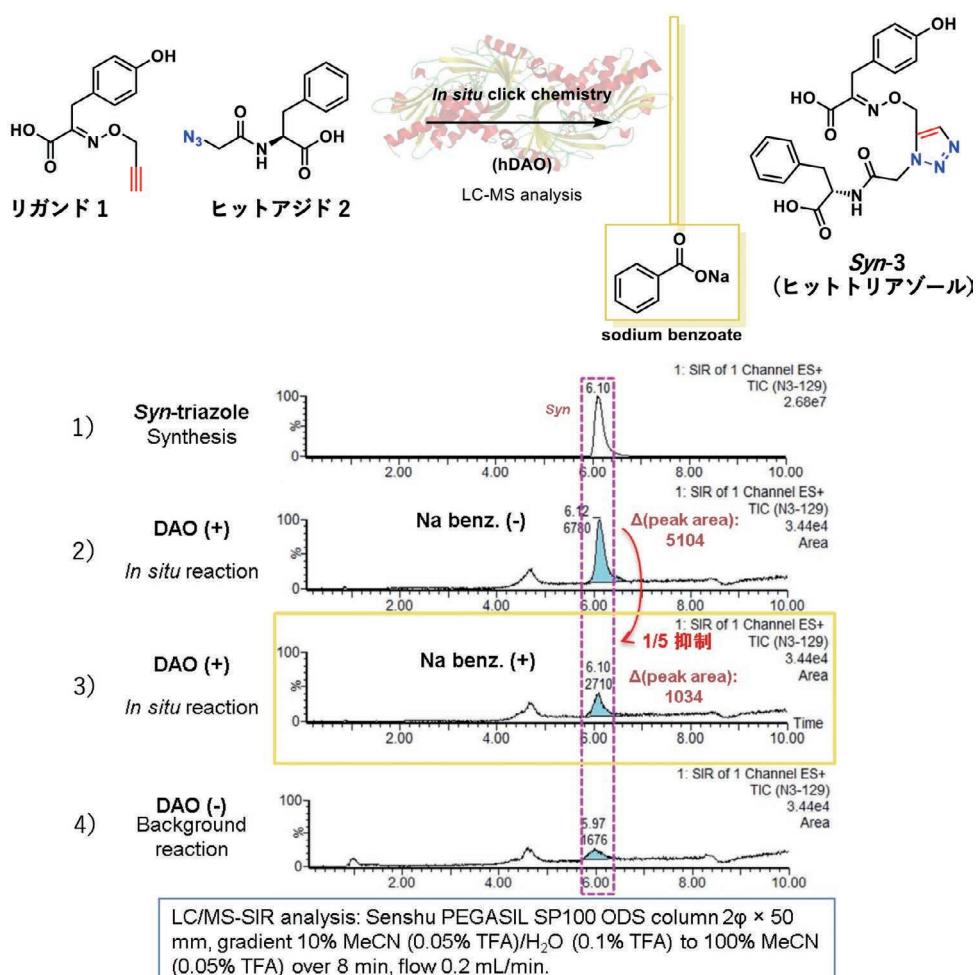
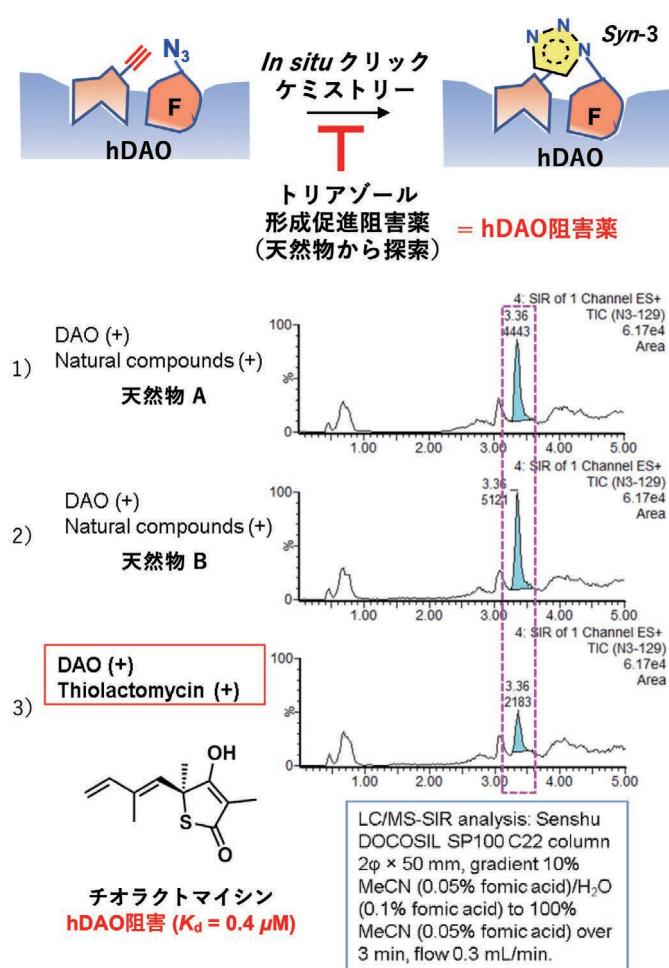


図8 hDAO阻害剤(安息香酸ナトリウム)共存下での*in situ* クリックケミストリー (LC/MSチャート)⁴⁰

なった(図9)⁴²⁾。

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単なものである。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⁴³⁾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してすることで、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。



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的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、頬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いり、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. Noddleman, 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/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. Uji, 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. Dirié, Z. Lens, V. Villeret, P. Rucktoo, 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, Á. Nemecz, 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.