

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350971

研究課題名(和文) マルチモダリティ型分子プローブの創製を目指した機能性分子集積法の開発

研究課題名(英文) Assembling Methods of Functional Molecules for Development of Multi-modality Molecular Probes

研究代表者

吉田 優 (Yoshida, Suguru)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授

研究者番号：10583750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：多機能性分子として、「分子プローブ」が生命科学研究を進めるために重要なツールとして注目を集めている。しかし、マルチモダリティ型分子プローブなどの多機能性分子の合成は容易ではない。これに対して我々は、確実な分子連結法として汎用されるクリック反応を連続して行うことができれば、多彩な多機能性分子を簡便に合成できると考え、その基盤となる手法の開発に取り組んだ。種々の検討の結果、マルチクリックケミストリーに役立つ、環状アルキン部位のアジドに対する反応性を一時的に保護する手法の開発に成功し、アジドとアルキンとの末端アルキン選択的クリック反応を利用した環状アルキン合成法などを実現できた。

研究成果の概要(英文)："Molecular probe" which is a multifunctional molecule for advancing life science research has attracted attention as an important tool. However, synthesis of multifunctional molecules such as multi-modality probes is not easy. We studied on multi-click chemistry to enable facile preparation of a variety of multi-functional molecules by sequential use of click reactions, which are widely used as a reliable method to conjugate two molecules. As the results, we successfully developed a method to transiently protect the clickability of cyclic alkyne moieties toward azides. This method enabled the synthesis of cyclic alkynes bearing a functional group from functional azides via a terminal alkyne-selective click reaction.

研究分野：ケミカルバイオロジー、有機合成化学

キーワード：ケミカルバイオロジー 有機化学 分子プローブ アジド クリック反応

1. 研究開始当初の背景

多機能性分子として、生命機能を解明する探索用分子である「分子プローブ」が生命科学を進めるために不可欠なツールになりつつある。なかでも、最近、蛍光部位などに代表される可視化・検出のための部位を複数有する分子プローブが注目を集めている。すなわち、医療分野などでCT、MRI、陽電子放射断層撮影法 (PET)、超音波装置などによるデータを一元管理し、これを診断に利用すると同様に、目的の生命現象に対して複数の応答を高感度、高精度で、かつ同時多角的に測定できる高機能分子プローブとして、マルチモダリティー型分子プローブの開発が行われるようになってきた (S. S. Gambhir, *et al.*, *Phys. Rev.* **2012**, *92*, 897.)。しかし、マルチモダリティー型分子プローブを創出するためには、タンパク質タグなどの目的の分子を認識する部位、複数の検出部位、刺激に応答することで検出部位に影響を与える部位、などを併せ持ち、これらがそれぞれ狙ったように機能する必要があるので、その設計・合成は容易ではない。加えて、このような高度に機能化した分子の合成には複数の繊細な官能基を順次導入する必要があるため、今のところ、保護・脱保護や官能基変換を経由しなければ複雑な多機能性分子の合成は困難である。実際、マルチモダリティー型分子プローブなどの高度な機能性分子を開発するためには直線的かつ低収率での合成を経ざるを得ないケースがほとんどである。さらに、多工程合成がボトルネックとなるため、多数の候補化合物から最適の分子を選び抜くためには多大な労力を必要とする。従って、現状の有機合成化学の力量では、その重要性にもかかわらず、多機能性分子プローブ開発研究はゆっくりとした速度でしか展開できないのが実状である。

機能性部位を連結する手法として、銅触媒を用いるアジドとアルキンとの環化付加反応が、代表的なクリック反応として幅広い分野に革新をもたらしている (図 1, K. B. Sharpless, *et al.*, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2708.)。とくに、水中・室温においても反応が進行し、その官能基許容性も極めて広いため、クリック反応が確実な 2 分子連結法として、生体分子の化学修飾などにおいて重要な役割を果たすようになってきた。

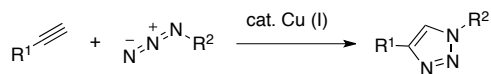


図 1 トリアゾール形成反応

これに対して我々は、確実な分子連結法として汎用されるクリック反応を連続して行うことができれば、多彩な多機能性分子を簡単に合成できると考え、その基盤となる手法の開発に取り組んできた。以前に我々は、アジドとアルキンとを連結する手法の開発が活発に行われる中、アジド同士を連結できる新手法

法として、ジイン化合物 **1** を利用した「ダブルクリック反応」の開発に成功した (図 2, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4051)。標識用の環状アルキンを用いる従来法と比べて、入手容易なアジド化合物で標識できる本手法では、より簡便に生体分子の化学修飾が行える点が特長である。

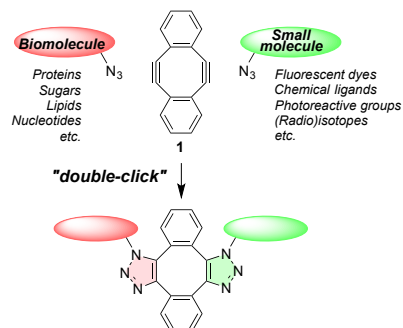


図 2 ジイン **1** を用いるダブルクリック反応

さらに、この研究の途上で我々は、かさ高い置換基を両オルト位に有する芳香族アジド化合物が顕著に高いクリック反応性を有することを見いだした (*Sci. Rep.* **2011**, *1*, 82)。従って、ジアジド **2** において、2 種類のアジド基を区別して利用できる (図 3)。

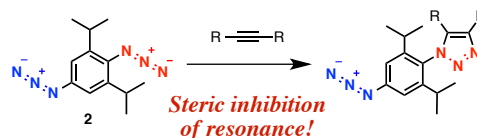


図 3 かさ高いアジド基の特異な反応性

加えて、段階的な機構で進行する反応においては、このアジド基の反応性は低いという二面性を持つことを見いだした。さらに、この特異な反応性は、オルト位の置換基によってアジド基と芳香環との共鳴が禁止されたことで引き出されたということ、実験化学と理論計算による解析から明らかにすることができた。本知見は、アジド基のクリック反応性を向上させた稀有な例であるだけでなく、通常は反応を著しく減速する、反応点近傍の置換基の大きさが、むしろ反応性を大きく向上させ得るといふ新しい可能性を提示する重要な結果である。さらに最近、かさ高い置換基の効果に加えて、芳香環上の置換基の電子的な影響によってもアジド基の反応性が大きく向上することも見いだしている (第 24 回基礎有機化学討論会, 平成 25 年 9 月, 東京にて発表)。

本研究では、我々がこれまでに見いだした独自のアジド化学を足がかりとして、クリック反応を連続して利用するための基盤技術を開発し、多機能性分子プローブ開発に役立つ手法の創出に取り組んだ。

2. 研究の目的

マルチクリックケミストリーの創成を念頭に、アジドとアルキンとのクリック反応を利用した環状アルキン合成法の開発を目指し、環状アルキン部位の反応性を一時的に保護する手法の開発に取り組んだ。すなわち、環状アルキン部位と末端アルキン部位とを併せ持つジイン化合物 **3** に対して、銅触媒を用いてアジドとの環化付加反応を試みても、通常は、より反応性の高い環状アルキンがアジドと先に反応してしまい、末端アルキンとアジドとを優先して反応させることはできない(図4)。これに対して、環状アルキン部位の反応性を抑える保護法を開発できれば、まず、ジインの環状アルキン部位を保護した後、末端アルキン部位をアジド基と反応させ、次に環状アルキン部位の脱保護を行うことで、環状アルキン **6** が合成できると期待される。そこで、まず、環状アルキン部位の反応を抑える手法の開発に着手した。

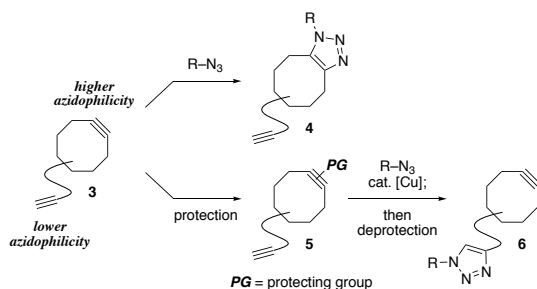


図4 ジイン **3** を用いる末端アルキン選択的クリック反応

3. 研究の方法

マルチクリックケミストリーの骨子のひとつとして、環状アルキン部位の反応を抑える手法の開発のため、環状アルキンと適度な強さで配位する金属塩を探索した。

4. 研究成果

まず、通常のアルキンを保護する手法として知られている、コバルト錯体 ($\text{Co}_2(\text{CO})_8$) を用いて環状アルキンとの錯形成を試みた。カルボニル基や水酸基といった官能基とは異なり、アルキン部位の反応性を抑える手法は少なく、コバルト錯体との錯形成によりアルキン部位を保護し、コバルト錯体からアルキンを再生するためには酸化剤である CAN ($\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$) を作用させるのが常法である。直線構造の通常のアルキンにコバルト錯体を作用させると折れ曲がり構造となることから、中員環の構築に利用された例も多いものの、環状アルキン-コバルト錯体から環状アルキンを再生した例は決して多くなく、シクロオクチンなどの歪みの大きな環状アルキンでは報告例はない。実際に、ジベンゾシクロオクチン **7** に対して二核コバルト錯体を

作用させたところ、複雑な混合物が得られてしまった。また、得られた混合物に対して、CAN を作用させたものの、目的とする環状アルキン **7** を得ることはできず、目的とする環状アルキン-コバルト錯体はほとんど形成されていないことがわかった(図5)。

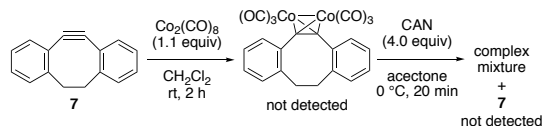
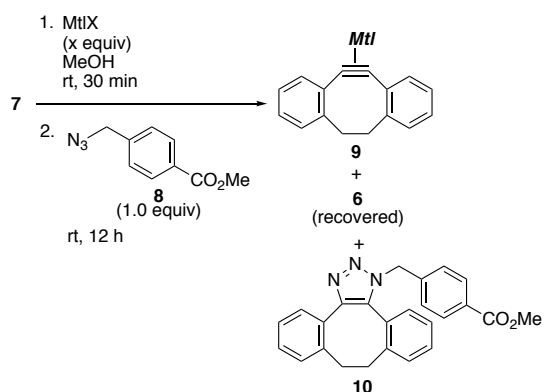


図5 コバルト塩を用いる環状アルキン保護の検討

これに対して、我々は、通常のアルキンの場合には、弱い結合でしか配位しないために「保護」とは考えられないアルキン-遷移金属錯体に着目し、通常のアルキンよりも強い配位力を有している環状アルキンの場合には、遷移金属との錯形成によって十分に安定化され、アジドとの反応を阻害できると考えた。そこで、ジベンゾシクロオクチン **7** に対して、メタノール中、金属塩を作用させた後、等量のアジド **8** を作用させ、アジド **8** の回収量とトリアゾール **10** の生成量を調べた(図6)。



entry	MtlX	x (equiv)	8/%	10/%
1	none	—	0	97 ^b
2	AgBF ₄	1.0	18	77
3	AuCl	1.0	11	61
4	AuCl + AgBF ₄	1.0	40	50
5	CuCl	1.0	12	78
6	(MeCN) ₄ CuBF ₄	1.0	quant.	0
7	(MeCN) ₄ CuBF ₄	2.0	quant.	0
8	(MeCN) ₄ CuBF ₄	0.5	46	47

図6 金属塩を用いる環状アルキン保護の検討

種々の検討の結果、環状アルキンのアジドに対する反応性を、等量の銅塩の添加によって抑制できることを見いだした。すなわち、金属塩を加えない場合にはほぼ定量的にトリアゾール **10** が得られた一方で (entry 1)、銀塩、金塩、銅塩を作用させた場合には、トリアゾール **10** の生成が阻害されることがわかった (entries 2-5)。なかでも、カチオン性の銅塩である $(\text{MeCN})_4\text{CuBF}_4$ を等量作用させると、アジドとの反応を完全に抑制でき、アジド **8** を定量的に回収できることを見いだした (entry 6)。さらに、2 当量のカチオン性銅塩を作用させても同様の結果を与えた一方で (entry 7)、0.5 当量の銅塩を作用させた場合には 46% のアジド **8** が回収され、47% のトリアゾール **10** が生じた (entry 7)。これらの結果から、環状アルキン **7** と銅塩とが 1:1 で錯体を形成し、アジド **8** との反応が阻害されたと考えられる。この環状アルキンと銅塩との 1:1 での錯形成は、 ^1H および ^{13}C NMR による解析や単結晶 X 線結晶解析の結果からも確認できた。たとえば、NMR による解析から、錯形成と解離とが平衡であることを示唆する結果が得られた。さらに、環状アルキン **7** と等量の銅塩との錯形成の後、溶媒を留去し、塩化メチレンとヘキサンとの混合溶媒を用いて結晶化を試みたところ、良好な単結晶を得ることに成功した (図 7)。単結晶 X 線結晶解析の結果、銅と環状アルキンとが 1:1 で配位した錯体が生じていることを明らかにできた。さらに、銅はアセトニトリルと水を配位子として有していることもわかった。配位している水に関しては、メタノール中における錯形成時はメタノールが配位しており、これを結晶化する際、溶媒中あるいは空気中の水と置換したと考えている。

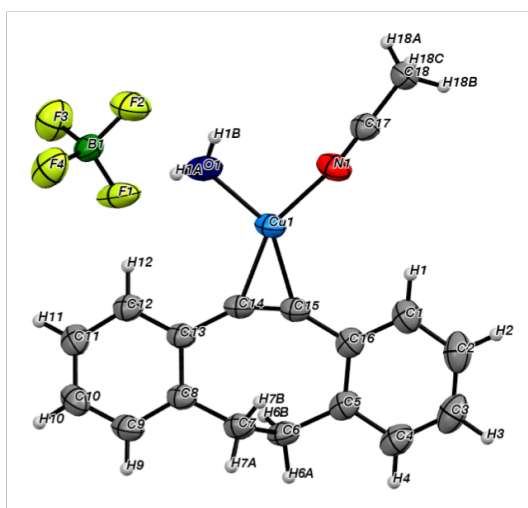


図 7 銅塩と環状アルキンとの錯体の X 線結晶構造解析

次に、環状アルキン-銅錯体 **11** から銅塩を除去し、環状アルキン **7** を再生する手法に関して検討した。具体的には、ジベンゾシクロオクテン **7** に対して銅塩を作用させ、アルキン-銅錯体 **11** を形成させた後、アンモニア水を作用させたところ、環状アルキン **7** をほぼ定量的に回収できることが明らかになった (図 8)。

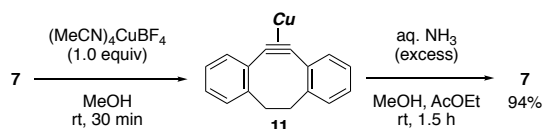


図 8 銅-環状アルキン錯体からの銅塩の除去

以上の検討から、銅との錯形成によって環状アルキンとアジドとの反応を阻害できることが明らかになった。次に、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の検討に着手した (図 9)。検討の結果、ジイン **12** に対して銅塩を作用させたところ、環状アルキン部位で選択的に錯形成が進行することが明らかになった。このとき、保護に利用しているカチオン性銅塩は、アジドと末端アルキンとの環化付加反応を触媒することから、余剰の銅塩によって末端アルキン部位での選択的クリック反応が行えると期待される。そこで、アルキン-銅錯体の形成後、アジド **8** と、配位子として働く TBTA (tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine) を加えたところ、末端アルキン部位での環化付加反応が効率よく進行することが明らかになった。最後に、アンモニア水で処理することで、目的とする環状アルキン **13** を高収率で合成できることが明らかになった。

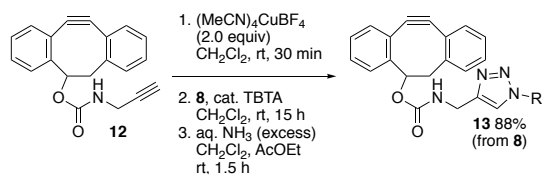


図 9 銅-環状アルキン錯体の形成を経る末端アルキン選択的クリック反応

本研究で開発できた末端アルキン選択的クリック反応により、入手および合成の容易な機能性アジドから機能性環状アルキンを簡便合成できる。そのため、複数のアジド基に対する逐次集積による多機能性分子創製を念頭に置いた、ケミカルバイオロジー研究に役立つマルチクリックケミストリーにおける重要な成果を挙げることができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 21 件)

1. “Transient Protection of Strained Alkynes from Click Reaction via Complexation with Copper.”
S. Yoshida, Y. Hatakeyama, K. Johmoto, H. Uekusa, and T. Hosoya
J. Am. Chem. Soc. **2014**, *136*, 13590–13593.

2. “Direct Thioamination of Arynes via Reaction with Sulfilimines and Migratory *N*-Arylation.”
S. Yoshida, T. Yano, Y. Misawa, Y. Sugimura, K. Igawa, S. Shimizu, K. Tomooka, and T. Hosoya
J. Am. Chem. Soc. **2015**, *137*, 14071–14074.

3. “Single C–F Bond Cleavage of Trifluoromethylarenes with an *ortho*-Silyl Group.”
S. Yoshida, K. Shimomori, Y. Kim, and T. Hosoya
Angew. Chem., Int. Ed. **2016**, *55*, 10406–10409.

4. “Facile Synthesis of Multisubstituted Benzo[*b*]furans via 2,3-Disubstituted 6,7-Furanbenzynes Generated from *ortho*-Iodoaryl Triflate-type Precursors.”

T. Morita, Y. Nishiyama, S. Yoshida, and T. Hosoya

Chem. Lett. **2017**, *46*, 118–121.

[Open Access, Selected as Editor’s Choce (優秀論文)]

ほか 17 件

[学会発表] (計 23 件)

1. 2017 年 3 月 16 日 (木)

日本化学会第 97 春季年会

慶應義塾大学日吉キャンパス(神奈川県横浜市)

○吉田 優

“高活性化学種の反応性制御にもとづく分子連結法の開発”

(招待講演)

ほか 22 件

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://chembiolab.sakura.ne.jp/Home.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 優 (YOSHIDA, Suguru)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准

教授

研究者番号 : 10583750