

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310164

研究課題名(和文)革新的クリックケミストリーによる生命科学研究

研究課題名(英文)Novel click chemistries for chemical biology researches

## 研究代表者

細谷 孝充 (Hosoya, Takamitsu)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：60273124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円

研究成果の概要(和文)：生命機能の発現機構を分子レベルで理解し、効果的に制御するための新しい方法論の開拓が求められている。本研究では、独自に見いだしたアジド基活性化原理に基づく新たな分子連結法の開発に取り組むとともに、クリック反応の反応相手であるアルキンの反応性についても精査した。その結果、これまでに見いだしてきた独自のアジド化学や環状アルキンの化学にもとづき、プラットフォームとなる分子を用いた連続骨格構築法の開発に成功し、アジドとの反応を連続的に行うことで、単純な分子を組み合わせて、多様性に富んだ複雑な化合物を簡便に合成できる新手法を開発することができた。

研究成果の概要(英文)：We have developed efficient methods to conjugate functional molecules by sequential triazole formations. One is a modular synthetic method for bis- and tris-1,2,3-triazoles that include a benzotriazole structure, which was developed on the basis of sequential azide-aryne and azide-alkyne cycloadditions. The key to success was efficient halogen-metal exchange reaction-mediated generation of aryne from ortho-iodoaryl triflates bearing a base-sensitive terminal alkyne moiety, which was achieved using trimethylsilylmethyl Grignard reagent. Another is a transient protection method of cyclooctynes from click reaction with an azide through 1:1 complexation with a cationic copper(I) salt. The application of the method to a cyclooctyne bearing a terminal alkyne enabled the selective copper-catalyzed click conjugation with an azide at the terminal alkyne moiety, which made cyclooctyne derivatives readily accessible.

研究分野：複合領域

キーワード：化学プローブ アジド クリック反応 アルキン 化学修飾

## 1. 研究開始当初の背景

様々な疾患に対して、早期診断技術や画期的な治療薬の開発が強く望まれているが、近年の科学技術の著しい進歩と比べると、それらの開発は必ずしも順調に行われているとは言えない。その要因の一つとして、生命機能発現機構の分子レベルでの理解が未だ不十分である点が挙げられる。例えば、明瞭な作用機序のもと、特定のタンパク質をターゲットに設定した分子標的治療薬が盛んに開発されているものの、実際には標的が複数である場合も珍しくない。さらに薬剤の副作用機序に至っては、ほとんど研究されていない。そこで、近年、薬剤の標的タンパク質同定、特異的な化学修飾を利用した標的生体分子イメージングといった、疾患に関わる機構解明・制御研究が活発に行われており、より確実で、より簡便な革新的な手法の開発が強く望まれている。

これに対して我々は、独自に見いだしたアジド基の多彩な反応特性を利用し、選択的光反応やダブルクリック反応などの、生命科学研究に有用な新手法を開発してきた。さらに、最近、アジド基の反応性を大きく向上させる画期的な手法を見出し、その原理を明らかにした。

以前に、我々は、二種のアジド基の反応性の差に着目することで、生物活性化化合物が標的とするタンパク質を明らかにするのに有用な「ジアジドプローブ法」の開発に成功した。具体的には、芳香族アジド基と脂肪族アジド基が、光反応条件下において異なる反応性を示し、芳香族アジド基は光反応に利用できる一方で、同じ条件では脂肪族アジド基は未反応のまま残存することを明らかにした。このアジド基の選択的光反応性を活用し、薬剤の標的タンパク質同定に有用な光親和性標識法を用いる際に、これら二種類のアジド基を導入したプローブ分子を設計し、芳香族アジド基を「光反応基」として利用して標的タンパク質と共有結合させ、残存した脂肪族アジド基をラベル化タンパク質の「検出用タグ」として利用する、新しい光親和性標識法の開発に成功した。従来法では、光反応基と、放射性同位体 (RI) やピオチン部位などの検出基とを併せ持つプローブを用いるため、プローブ分子に比較的大きな官能基を導入することになり、オリジナルの化合物の生物活性を低下させてしまう場合が多かったが、これと比べて本手法は、オリジナルの化合物の生物活性を維持しやすい革新的な手法である。すなわち、生物活性化化合物の構造中によく見られるベンゼン環に、二種のアジド基という非常に小さな官能基を導入するだけで光親和性標識プローブとできることから、活性低下を最小限に抑えることが期待できる。さらに、標的タンパク質を光ラベル化した後に、光反応で残存したアジド基に対して、蛍光団、RI、ピオチン部位などの望みの検出基を簡便に導入できることから、同一のプローブ

分子を用いて複数の検出法が選択できることなども大きな利点である。実際に、これまで本法を用いて、抗高脂血症薬セリバスタチンの HMG-CoA 還元酵素の特異的ラベル化と結合部位の決定 (*Org. Biomol. Chem.* **2004**)、骨格筋細胞における運動による糖取り込みの調節分子機構の解明に向けた筋弛緩薬ダントロレンの標的タンパク質同定 (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002, 2005, 2009**; *Br. J. Pharmacol.* **2001**; *Diabetes* **2009**)、パーキンソン病発症因子候補物質 1BnTIQ の標的タンパク質同定 (*J. Neurochem.* **2010**) などに成功している。

このジアジドプローブ法における検出用官能基の導入や、生体分子の化学修飾において、銅触媒を用いるアジドとアルキンとの環化付加反応に代表されるクリック反応が有用である。最近では、歪んだ環状アルキンを用いることによって、アルキン部位の歪み解消を駆動力としてアジド基とクリック反応させることによって、銅触媒を用いることなく、室温で速やかに反応が進行するという報告がなされ (*C. R. Bertozzi et al., Science* **2008**, *320*, 664; *G. J. Boons et al., Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 2253; etc.)、銅触媒による細胞毒性を回避する手法として汎用されるようになった。しかし、検出・標識用部位を導入した歪み環状アルキン化合物の合成は容易ではなく、より簡便な手法の開発が求められている。これに対して、以前に我々は、高度に歪んだ環状アルキン部位を二つ有する Sondheimer ジーンを介して、アジド基を導入したタンパク質とアジド基を導入した標識用化合物とを 2 回のクリック反応により結合させる「ダブルクリック反応」の開発に成功した (*Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4051.)。この手法においても、前述したジアジドプローブ法と同様に、アジド基を導入した複数の標識用化合物を準備するだけで、標的タンパク質を複数の方法で検出できる点が特長である。アジド基を導入した標識用化合物は歪み環状アルキンを導入した化合物よりも簡便に合成できることから、本手法は生命科学研究を進展させる有用な新手法である。

さらに、このダブルクリック反応の開発途上、特異な反応性を示すアジド基を新たに見いだした。具体的には、芳香族アジド基のクリック反応性への置換基の影響について精査した結果、両オルト位にかさ高い置換基を有する芳香族アジド基が、その大きな立体障害にもかかわらず、著しく高い反応性を示すことを発見した。さまざまな置換形式の芳香族アジド基のクリック反応性を詳細に調べ、加えて、理論計算や各種分光測定なども行った結果、この一見矛盾した現象は、アジド基と芳香環との共鳴が、かさ高い置換基によって妨げられたことによって引き起こされていることを明らかにした。

以上のように、これまでに我々は、アジド基の多彩な反応性を見だし、これらを利用

する分子連結法の開発に取り組んできた。

## 2. 研究の目的

生命機能の発現機構を分子レベルで理解し、効果的に制御するための新しい方法論の開拓が求められている。本研究では、独自に見いだしたアジド基活性化原理に基づく新たな分子連結法の開発に取り組むとともに、クリック反応の反応相手であるアルキンの反応性についても精査した。

## 3. 研究の方法

これまでに見いだしてきた独自のアジド化学や環状アルキンの化学にもとづき、プラットフォームとなる分子を用いた連続骨格構築法を開発することで、単純な分子を複数組み合わせることで複雑な分子を簡単に合成する手法の開発に取り組んだ。具体的には、アジド基の多彩な反応性を念頭に、アジドとの反応を連続的に進める反応系の開発を目指した。

## 4. 研究成果

種々の検討の結果、我々は、アジドとアルキンの環化付加反応を、アジドとアラインとの環化付加反応と組み合わせることで、二度の反応を望みの順で連続的に進める柔軟な手法の開発に成功した(図1)。すなわち、末端アルキン部位を有するアライン前駆体 **1** に対して、二種の環化付加反応を連続的に進めることで、ビス-1,2,3-トリアゾール **4** を合成する手法である。この連続反応により、二種類のアジド化合物をベンゾトリアゾール部位と 1,2,3-トリアゾール部位とでつないだ分子が簡単に合成できるため、複数のファーマコフォアを適切に配置した化合物群を容易に合成できる。

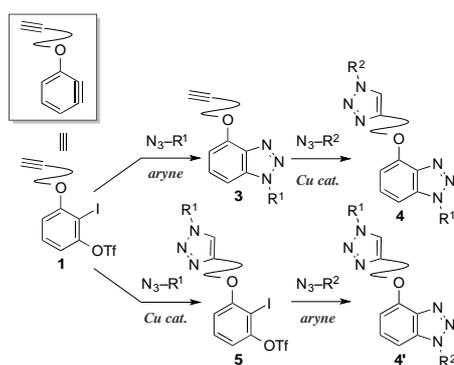


図 1

具体的には、レゾルシノールから容易に合成できる 3-プロパルギルオキシベンザイン前駆体 **1a** をプラットフォーム分子として用いて、ビストリアゾール合成法の検討を行った。その結果、**1a** とベンジルアジドとの混合物に対して、シリルメチルマグネシウム反応剤を作用させることで、ハロゲン-金属交換を穏和な条件下で実現でき、末端アルキン部

位を損なうことなく、効率よくアラインとアジドとの反応が進行し、ベンゾトリアゾール **3** が高収率で得られることを見いだした(図2)。得られたベンゾトリアゾール **3** の末端アルキンと、別のアジド化合物との反応により、多彩なビストリアゾールを合成することも明らかにできた。たとえば、銅触媒を用いる環化付加反応により、1,4-置換トリアゾールを効率よく形成でき、種々のビストリアゾール **4** を得ることができた。さらに、ルテニウム触媒を用いることで位置選択性が逆転したビストリアゾール **6** を得ることもできた。このように、本手法を利用することで、多様性に富んだビストリアゾール群を簡単に構築できる。加えて、プラットフォーム分子 **1** に対する反応順を入れ替えることで、アジドと末端アルキンとの環化付加反応の後に、アジド-アライン環化付加反応が行えることも明らかにできた。この特長を利用することで、三度の連続する環化付加反応を続けて行うこともでき、たとえば、トリス-1,2,3-トリアゾールの効率的な合成にも成功した。今後、本手法を利用して合成した化合物群から成る化合物ライブラリーから、特異な生物活性を有する分子が見いだされると期待される。

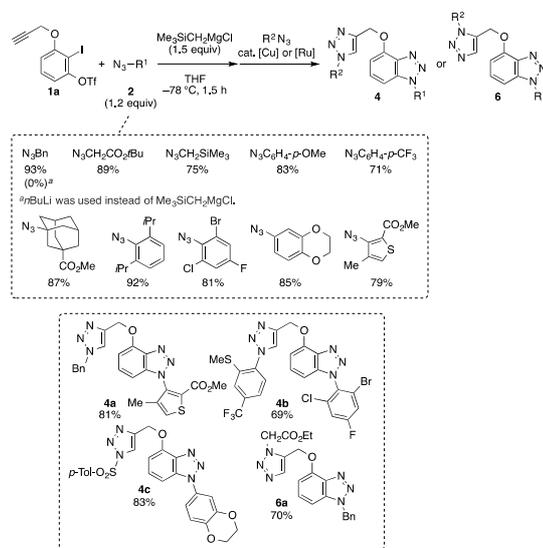


図 2

プローブ分子の簡便な合成を念頭に、クリック反応を経て環状アルキンプローブを合成できる新手法も見いだした。通常は、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 **7** 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、より反応性の高い環状アルキンがアジドと先に反応したトリアゾール **8** が得られる(図3)。すなわち、環状アルキン部位の反応性の高さゆえに、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。これに対して、我々は、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 **10** を合成できると考えた。

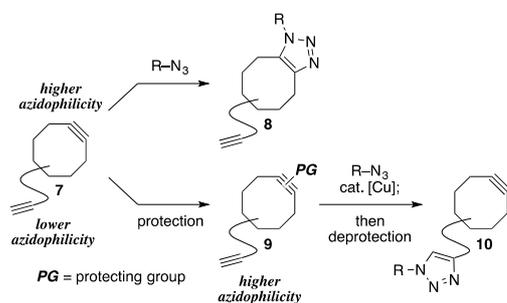


図 3

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ところ、銅との錯形成によって環状アルキンのアジドとの反応性を抑制できることを見いだした。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を試みた。検討の結果、ジイン **11** に対して銅塩 (2 当量) を作用させた後、クリック反応を加速させることが知られている TBTA (トリス[(1-ベンジル-1*H*-1,2,3-トリアゾール-4-イル)メチル]アミン) とともにアジド **12** を加え、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 4)。すなわち、ジイン **11** の二つのアルキン部位のうち、環状アルキン部位で選択的に銅との錯形成が進行し、アジドとの反応が抑制されるとともに、保護に利用しているカチオン性銅塩が、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クリック反応が選択的に進行したと考えられる。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面性を示したことは興味深い。

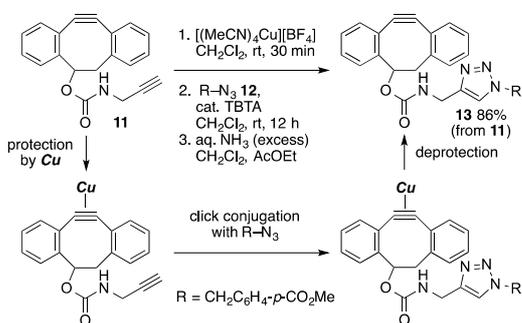


図 4

以上のように、我々は、カチオン性銅塩を利用する錯形成により、環状アルキンのアジド化合物とのクリック反応性を一時的に抑えられることを見だし、これを用いること

で、末端アルキン選択的クリック反応による環状アルキン誘導体の簡便の開発に成功した。今後、本手法にもとづき、アジド基を有する蛍光色素などの幅広いアジド化合物とのクリック反応を経て、様々な環状アルキンプローブが簡便に合成できると期待される。

## 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 8 件)

- (1) S. Yoshida, F. Karaki, K. Uchida, and \*T. Hosoya, Generation of cycloheptynes and cyclooctynes *via* a sulfoxide-magnesium exchange reaction of readily synthesized 2-sulfinylcycloalkenyl triflates. *Chem. Commun.*, **51** (42), 8745-8748 (2015). 査読有り, 10.1039/C5CC01784J
- (2) S. Yoshida, K. Uchida, and \*T. Hosoya, Generation of Arynes Using Trimethylsilylmethyl Grignard Reagent for Activation of *ortho*-Iodoaryl or *ortho*-Sulfinylaryl Triflates. *Chem. Lett.*, **44** (5), 691-693 (2015). 査読有り, 10.1246/cl.150060
- (3) 細谷孝充, 吉田 優, 第3章 異種アジド基の反応性の差を利用した分子連結。「クリックケミストリー —基礎から実用まで—」(高田十志和、小山靖人、深瀬浩一 編) シーエムシー出版, pp. 18-28 (2014). 査読無し
- (4) Y. Sumida, R. Harada, T. Kato-Sumida, K. Johmoto, H. Uekusa, and \*T. Hosoya, Boron-Selective Biaryl Coupling Approach to Versatile Dibenzoxaborins and Application to Concise Synthesis of Defucogilvocarcin M. *Org. Lett.*, **16** (23), 6240-6243 (2014). 査読有り, 10.1021/ol5031734
- (5) S. Yoshida, K. Uchida, K. Igawa, K. Tomooka, and \*T. Hosoya, An efficient generation method and remarkable reactivities of 3-triflyloxybenzynes. *Chem. Commun.*, **50** (95), 15059-15062 (2014). 査読有り, 10.1039/C4CC07058E
- (6) \*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.*, **136** (39), 13590-13593 (2014). 査読有り, 10.1021/ja507660x
- (7) S. Yoshida, T. Nonaka, T. Morita, and \*T. Hosoya, Modular synthesis of bis- and tris-1,2,3-triazoles by permutable sequential azide-aryne and azide-alkyne cycloadditions. *Org. Biomol. Chem.*, **12** (38), 7489-7493 (2014). 査読有り, 10.1039/C4OB01654H
- (8) 細谷孝充, 吉田 優, 「くすり (候補)」の効き方を調べる—新しい光親和性標識法の開発. 実験医学増刊「研究成果を薬につなげる アカデミア創薬の戦略と実例」(長野哲雄 編), **32** (2), 212-221 (2014). 査読無し

〔学会発表〕(計59件)

- (1) 内田圭祐、吉田 優、細谷孝充, 3-トリフリルオキシアライン: 改良発生法の開発と発生における位置選択性の検討、及び多環式骨格構築への応用, 日本化学会第 95 春季年会, 2015 年 3 月 27 日, 日本大学理工学部船橋キャンパス(千葉県船橋市)
- (2) 目黒友啓、吉田 優、細谷孝充, 生体分子の化学修飾法の開発を指向したチオフェン-S,S-ジオキソドと環状アルキンとの環化付加反応に関する研究, 日本化学会第 95 春季年会, 2015 年 3 月 27 日, 日本大学理工学部船橋キャンパス(千葉県船橋市)
- (3) 後藤沙由里、吉田 優、松下武司、細谷孝充, アルケニルアジドと環状アルキンとの環化付加反応, 日本化学会第 95 春季年会, 2015 年 3 月 27 日, 日本大学理工学部船橋キャンパス(千葉県船橋市)
- (4) 畠山泰朋、吉田 優、上本紘平、植草秀裕、細谷孝充, 銅塩を用いる環状アルキンの保護・脱保護法の開発, 第 68 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム(新潟シンポジウム), 2014 年 11 月 30 日, 新潟大学五十嵐キャンパス(新潟県新潟市)
- (5) 内田圭祐、吉田 優、細谷孝充, 穏和な Grignard 反応剤を用いたアライン発生法の開発, 第 68 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム(新潟シンポジウム), 2014 年 11 月 29 日, 新潟大学五十嵐キャンパス(新潟県新潟市)
- (6) 田中淳子、吉田 優、松下武司、細谷孝充, クリック反応の高速化を目指した新しい芳香族アジドの開発, 第 106 回有機合成シンポジウム, 2014 年 11 月 7 日, 早稲田大学早稲田キャンパス国際会議場(東京都新宿区)
- (7) 森田隆太、吉田 優、細谷孝充, アジドとアラインとの分子内環化付加反応による新規縮環型ベンゾトリアゾールの合成, 第 44 回複素環科学討論会, 2014 年 9 月 10 日, 札幌市民ホール(北海道札幌市)
- (8) 田中淳子、吉田 優、松下武司、細谷孝充, 両オルト位への置換基導入による芳香族アジドのクリック反応性の向上, 第 25 回基礎有機化学討論会, 2014 年 9 月 8 日, 東北大学川内キャンパス萩ホール(宮城県仙台市)
- (9) 吉田 優、内田圭祐、松下武司、細谷孝充, 3-トリフリルオキシベンザインの発生とその利用, 第 105 回有機合成シンポジウム, 2014 年 6 月 10 日, 東京工業大学大岡山キャンパス(東京都目黒区)
- (10) 畠山泰朋、吉田 優、上本紘平、植草秀裕、細谷孝充, 高機能環状アルキン合成のための銅錯体による高歪みアルキン保護法の開発, 日本化学会第 94 春季年会, 2014 年 3 月 28 日, 名古屋大学東山キャンパス(愛知県名古屋市)
- (11) 吉田 優、野中貴子、森田隆太、内田圭祐、細谷孝充, 新しいアライン発生法にもとづくピストリアゾール類の簡便合成, 日本化学会第 94 春季年会, 2014 年 3 月 28 日, 名古屋

- 屋大学東山キャンパス(愛知県名古屋市)
- (12) 細谷孝充, 官能基の歪みに着目した分子連結法の開発, 日本化学会第 94 春季年会”有機合成化学を起点とするものづくり戦略”特別企画シンポジウム, 2014 年 3 月 27 日, 名古屋大学東山キャンパス(愛知県名古屋市)
- (13) 吉田 優、野中貴子、森田隆太、細谷孝充, アルキンとアラインに対するアジドの連続環化付加反応によるビス-1,2,3-トリアゾールの合成, 第 104 回有機合成シンポジウム, 2013 年 11 月 7 日, 早稲田大学早稲田キャンパス(東京都新宿区)
- (14) 細谷孝充, 吉田 優、菅野貴美幸、喜井 勲、森田隆太、田中淳子、松下武司、萩原正敏, 異種アジド基の特性にもとづく逐次マルチクリック反応の開発, 第 43 回複素環化学討論会, 2013 年 10 月 17 日, 長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)
- (15) Yoshida S, Kanno K, Kii I, Matsushita T, Hagiwara M, Hosoya T, Facile Synthesis of Trifunctional Probe by a Sequential Triple-click Reaction, 2nd Annual Conference of the International Chemical Biology Society (ICBS2013-Kyoto), Oct. 8. 2013, Kyoto University (Kyoto, Japan)
- (16) 森田隆太、吉田 優、白石 旭、細谷孝充, かさ高い脂肪族アジドを利用した逐次マルチクリック反応の開発研究, 第 24 回基礎有機化学討論会, 2013 年 9 月 5 日, 学習院大学目白キャンパス(東京都豊島区)
- (17) Hosoya T, Yoshida S, Kanno K, Kii I, Matsushita T, Hagiwara M, Sequential Triple-Click Reaction by Three Azido-Type Selective Cycloadditions, The First Asian Conference for "MONODUKURI" Strategy by Synthetic Organic Chemistry (ACMS), July 18. 2013, Southern Beach Hotel & Resort (Okinawa, Japan)
- (18) 吉田 優、菅野貴美幸、喜井 勲、松下武司、萩原正敏、細谷孝充, 異種アジド選択的トリプルクリック反応による機能性分子集積, 日本ケミカルバイオロジー学会第 8 回年会, 2013 年 6 月 20 日, 東京医科歯科大学湯島キャンパス(東京都文京区)
- (19) 吉田 優、菅野貴美幸、喜井 勲、松下武司、萩原正敏、細谷孝充, 多機能性分子プローブ創製に有用な異種アジド選択的逐次クリック反応の開発, 第 103 回有機合成シンポジウム, 2013 年 6 月 5 日, 慶應義塾大学芝共立キャンパス(東京都港区)
- (20) 田中淳子、吉田 優、松下武司、細谷孝充, パラ位置置換基導入によるかさ高い芳香族アジドのクリック反応性の向上, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 3 月 23 日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県草津市)
- (21) Hosoya T, Azido-type selective reactions promoting chemical biology, The First Official Conference of the International Chemical Biology Society (ICBS), Oct. 4. 2012, (Boston, USA)

(22) 吉田 優、菅野貴美幸、松下武司、細谷孝充、多機能性分子の創製を指向した逐次トリブルクリック反応の開発、日本ケミカルバイオロジー学会第7回年会、2012年6月9日、京都大学百周年時計台記念館（京都府京都市）  
他、37件

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

細谷 孝充 (HOSOYA, Takamitsu)  
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・  
教授  
研究者番号：60273124

### (2) 連携研究者

喜井 勲 (KII, Isao)  
京都大学・大学院医学研究科・特定助教  
研究者番号：80401561