

さまざまな機能を連結できる合成化学の 新たな概念：クリックケミストリー

北山 隆
馬場良泰

きたやま たかし
近畿大学農学部 生物機能科学科
ばば よしやす
徳島大学研究支援・産官学連携センター

本年度のノーベル化学賞は、授賞理由「クリックケミストリーと生体直交化学の開発」により、Carolyn Bertozzi 博士(スタンフォード大学), Morten Meldal 博士(コペンハーゲン大学), K. Barry Sharpless 博士(スクリプス研究所)の3名に授与された。特に Sharpless 博士は、2001年に野依良治博士, William S. Knowles 博士とともに「触媒的不斉合成反応の開発」でノーベル化学賞を受賞しており、今回史上5人目のノーベル賞2回受賞(化学賞では2人目)の快挙となった。

2022年10月5日にノーベル化学賞が発表され、クリックケミストリー(click chemistry)が授賞対象となった瞬間、ある程度の予想はしていたものの「ついにこの日がきたのか」と、驚きの前に感慨深いものが先にこみ上げた。筆者らは、Sharpless 博士の1度目のノーベル賞受賞の余韻冷めやらぬ翌年2002年、クリックケミストリーの創成期に Sharpless 研究室に留学する機会を得た。当時、世界各国から集まったポスドクらとともに議論しながら、クリックケミストリーを展開したことを振り返りながら解説したい*1。

クリックケミストリー創成期の Sharpless 教授

当時の Sharpless 研究室には世界各国の研究者がひしめいていた。我々はクリックケミストリー

の応用面を探りながら、アジド-アルキンに匹敵する新たなクリック反応も模索していたが、研究開始早々、アジド-アルキンの組み合わせのすごさに驚愕したことを鮮明に覚えている。

Sharpless 教授とのエピソードをいくつか披露させていただきたい。

2002年は Sharpless 教授が前年に1度目のノーベル賞を受賞(2度目があるとはその頃はもちろん思っていなかった)したこともあり、講演旅行などで研究室を不在にすることが多かったが、早朝(6時頃)から実験する Sharpless 教授と突如出くわして驚かされたことが1度や2度ではなかった。そのときこそディスカッションをする絶好のチャンスとなった。

ある日、突然昼過ぎに指示があり、1名ずつのディスカッションが始まったかと思えば、運悪く最後の方に割り当てられていた筆者らは、長時間待たされ、ついに日をまたいでから教授室に入ることになった。すでに12時間以上ディスカッションを続けている Sharpless 教授は、まるでつい先ほど議論が始まったかのようなエネルギーで、データを見て止まることなく考察をぶつけてくれた。こちらから話を遮らなければ、延々と話し続けるのである。

またあるときは、午後のフライトで海外へ講演に行くため、時間がなかったことから午前中にディスカッションし、Sharpless 教授は慌ててサンディエゴ空港に向かったはずであるが、ほどなく走り書きの反応条件や反応機構を書いたメモが秘書から手渡された。空港のファクシミリを使って

*1—本稿の内容は文献1の解説と一部重複があることをお断りしておく。

送付してくれたのである。「どうだ！面白いだろう!？」と言わんばかりのメモであった。

当時は Sharpless 研究室の研究者がホームパーティーを行うことを全員に連絡して集まるが多かったのであるが、忙しくて連絡を見ていないと思われる Sharpless 博士が突然参加してお酒を飲み、ひとしきりクリックケミストリーについて語り(もちろん、それ以外の話もしているが)、いつの間にか去っていたことを昨日のように思い出す。

ひとことで Sharpless 教授を表現するならば、「化学を純粋に愛する青年」である。1 度目の受賞の研究内容とまったく異なる新分野を切り拓いたことによる今回の 2 度目のノーベル化学賞の受賞は必然であったように感じる。

クリックケミストリーとは

クリックケミストリーとは、2001 年に米国スク립ス研究所の Sharpless 博士らの研究グループが提唱した概念(分野)である。あたかもシートベルトのバックルが「カチッと音を立てて(クリックング)」つなぎ合わさるように、「2つの分子が簡単につながる化学合成反応」の総称であり、非常に高い選択性と効率性を兼ね備えている(図1)。

Sharpless 博士らにより最初に発表された論文²ではクリックケミストリーを以下のように定義している。

- a) モジュール(規格)型で適用範囲が広い反応
- b) 立体特異的な反応
- c) シンプルな反応条件(理想的には酸素と水に影響されない)
- d) 容易に入手できる出発物質と試薬
- e) 無溶媒か水など無害な溶媒、または容易に除去できる溶媒を使用
- f) 簡単に精製できる(必要に応じて結晶化や蒸留などの非クロマトグラフィー法で精製)
- g) 生成物は生理学的条件下で安定

上記の条件を満たす可能性のあるクリック反応は、通常 20 kcal/mol を超える高い熱力学的駆動力が必要であり、熱力学的に有利な発熱反応によ

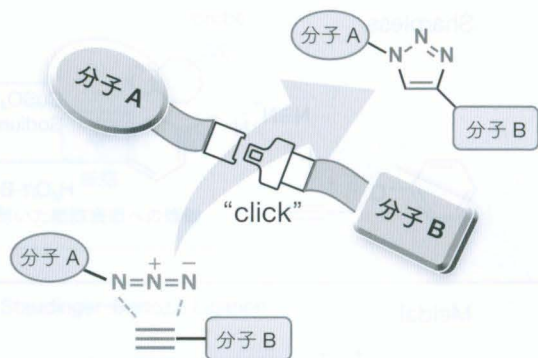


図1—クリックケミストリーのイメージ

って安定な生成物を与えることがポイントとなる。このような条件を満たす反応基質として、多重結合やひずみをもった化合物、分極したヘテロ原子を有する化合物が挙げられているが、これらの反応はすでに知られていたものがほとんどである。

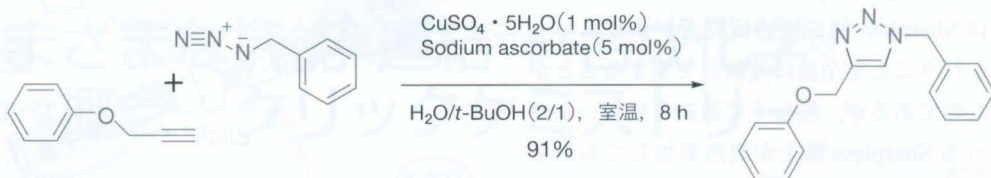
ではなぜ「クリックケミストリー」という概念を彼らは提唱したのであろうか。当時の有機合成化学者は複雑な天然有機化合物や医薬品など生物活性化合物を、新規手法を利用あるいは開発しながら、競い合って(全)合成してきた。もちろん現在であっても化学の発展のために必要不可欠な非常に重要な研究展開である。

一方で、オリゴヌクレオチド、ポリペプチド、あるいは多糖類など、自然界に存在する生体分子は、規格化(モジュール化)された数種類の単位分子(ビルディングブロック)であるヌクレオチド、アミノ酸、糖の組み合わせの結合で、驚くほど多様な機能を獲得している。

Sharpless 博士は「合成化学の目的は、新しい(複雑な)化合物を得ることではなく、有用な特性(すなわち機能性)を生み出すこと」であり、そのためにはモジュール化されたビルディングブロックを簡単につなぎ合わせることができる「クリックケミストリー」が、有用な特性をもつ物質の発見を加速する、と提唱した。

複雑性やエレガント性を追求する有機合成化学から針路を変え、簡便な有機合成反応を活用して新たな機能性分子の創製を目指すことへの宣言でもあった。

Sharpless



Meldal

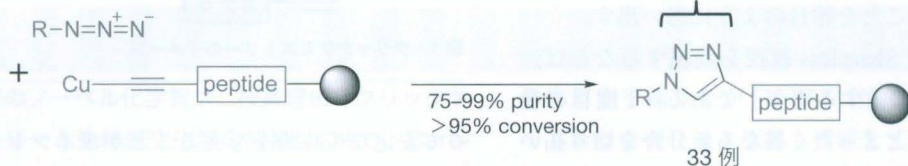


図2—代表的なクリック反応(CuAAC)

クリックケミストリーを進展させた代表的な反応：銅触媒アジド-アルキン環化付加反応(CuAAC)

先述したようにクリックケミストリーとして条件を満たす反応基質はすでに知られているものがほとんどであった。ただ、ひとつひとつは一見単純そうに見えるが、これらの条件すべてを十分に満足する反応は存在しなかった。

クリックケミストリーの概念が発表された翌年、Sharpless博士とMeldal博士らは、Huisgen型1,3-付加環化反応に着目し、それぞれ独自に銅触媒を用いるアジドとアルキンの銅触媒アジド-アルキン環化付加反応(Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition: CuAAC)を開発した^{3,4}。室温下で高収率、高選択的に進行し、約45 kcal/molを超える高い発熱反応⁵を示すこの反応がクリックケミストリーの代表的な連結反応となった(図2)。

これまで有機合成反応は熟練の有機化学者の特権であったが、CuAAC反応の開発により、誰もがこの反応を利用できるようになり、またたく間に創薬、ケミカルバイオロジー、材料化学など幅広い分野で活用されるようになった。

生体直交化学への応用

ケミカルバイオロジーの分野では、化学の技術を活用し、核酸、タンパク質、糖鎖など、生体内分子の機能や反応の分子レベルでの解明を試みている。今回共同受賞となったBertozzi博士は、複雑な細胞系の生体分子に影響を与えたり、生化学的プロセスを妨害したりすることなく、多様な官能基を含む生理的条件下(官能基の海の中)で特定の生体内分子を選択的に化学修飾する方法を「生体直交型反応(Bioorthogonal Chemistry)」⁶と名づけ、生体機能の解明に大きな貢献を果たした。生体直交(bioorthogonal)とは、生体分子そのものには影響を及ぼさない機能の例外性を表している。博士らはStaudinger反応を改良したStaudinger-Bertozzi Ligation(連結反応)を開発し、細胞に蛍光試薬を結合させるなど、生体直交化学による細胞表面の機能解明を進めていた⁷。しかしながらこの反応は、生体適合性を備えてはいるものの、用いるホスフィン試薬の酸化と調製に課題があり、いっぽう代表的なクリック反応であるCuAACでは、用いるCu(I)触媒が細胞に対する毒性を示すため、*in vivo*への適用が困難であった。

2004年にBertozzi博士は無触媒でも生理的条件下で反応が進行する高歪みシクロオクテンとア

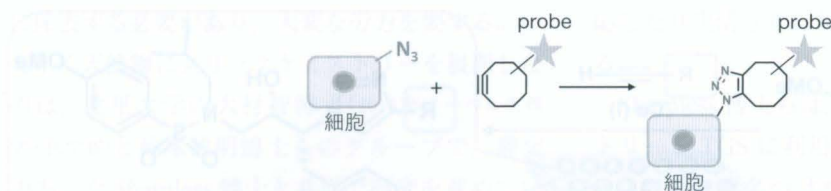


図3—生体直交型反応 SPAAC を用いた細胞表面への修飾

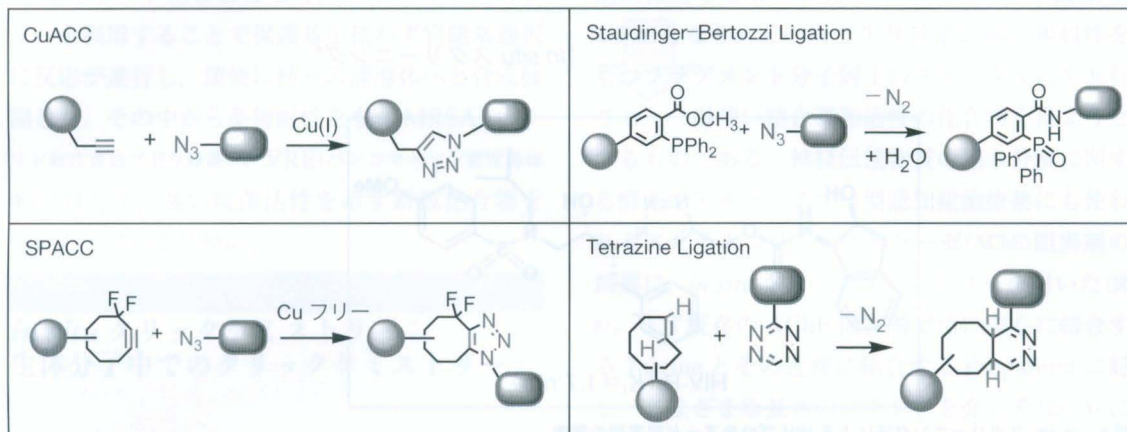


図4—生体直交化学に用いられる代表的なクリック反応

ジドとの 1,3-双極子環状付加 (Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition: SPAAC) を開発し、細胞表面にアジ化誘導体化糖タンパク質を発現したヒト Jurkat 細胞 (ヒト白血病 T 細胞由来) に対し、生理的条件下でビオチン化シクロオクチンを結合させることに成功した⁸。さらに、電子不足型高歪みアルキンを用いることで、より反応の効率性を上げ、Cu フリーのクリックケミストリーとして、多くの生体直交型反応に汎用されるようになった⁹(図3)。

その後も多くの研究者が反応開発に参画し、Tetrazine Ligation など有用な生体直交型反応が報告されている(図4)。

このような生体直交化学としても利用できるクリックケミストリーは、どのように活用されているのか、創薬、ケミカルバイオロジーそして材料科学の分野での事例を次項以下で紹介する。

創薬研究での活用

創薬研究では、あらかじめ準備した多種類の化合物群(化合物ライブラリー)に対し、生物活性評価に

よるスクリーニングを行い、その中から基本骨格となるリード化合物を選定する。さらに活性や体内動態の向上を目指して、化合物の構造最適化を行うが、その際、多様性に富んだ化合物を効率的に合成する必要がある。そのため汎用性があり簡便な合成法が望ましい。クリックケミストリーの特性を利用することで、多種多様な化合物を効率的に合成・評価し、活性化化合物を迅速に見いだした例を紹介する。

in situ スクリーニング法

副生成物を生じず、目的の化合物が高純度で合成できれば、手間のかかる精製操作を省いてそのまま生物活性評価に用いることができるため、スループット向上が期待できる。スクリプス研究所の Wong 博士、Sharpless 博士らは、エイズ治療薬に用いられる HIV プロテアーゼ阻害剤の探索において、マイクロプレート中で化合物合成を行った後、精製することなくそのままスクリーニングアッセイを行う“*in situ* スクリーニング”法を

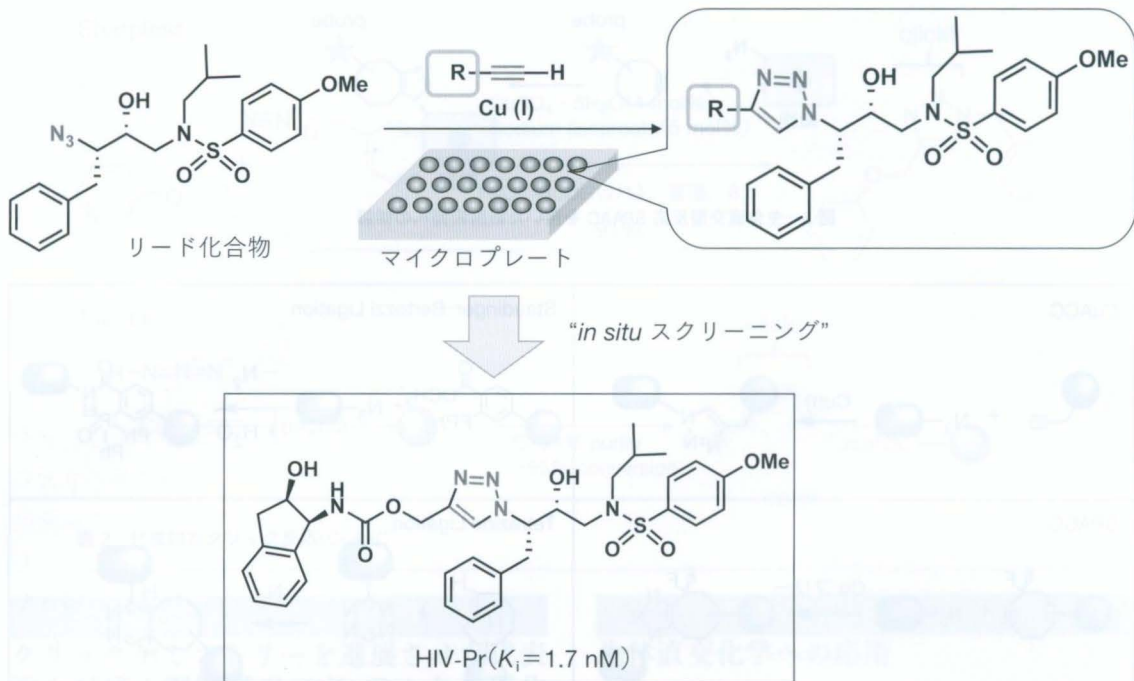
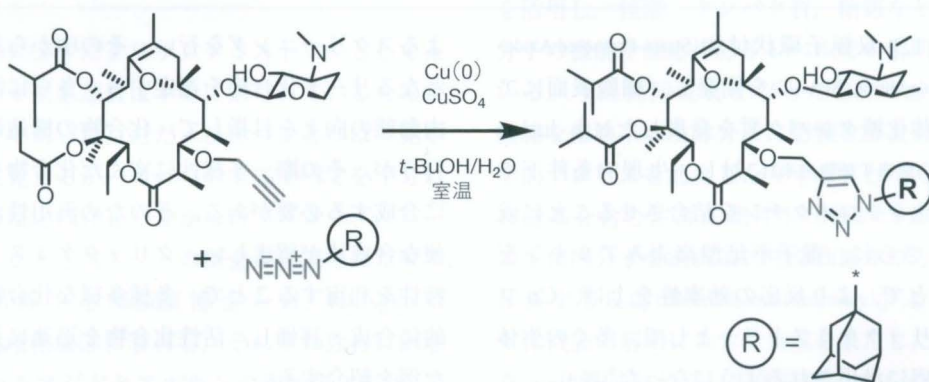


図5—*in situ*スクリーニング法による HIV プロテアーゼ阻害剤の探索



MRSA/VRE に対する抗菌活性
(最小発育阻止濃度 : 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

図6—クリックケミストリーを用いたエリスロマイシン A 構造最適化と抗菌活性

用いて、効率的に高い阻害活性をもつ化合物を見いだすことに成功した¹⁰。既存の HIV プロテアーゼ阻害剤の骨格をリード化合物としてアジド基を導入し、マイクロプレート中、種々のアセチレンフラグメントと Cu 触媒存在下、室温で 48 時間インキュベーションすることによって、ほぼ原料は消失し、定量的に対応する生成物が得られることを確認した。続いて反応液を精製することな

くそのまま順次希釈してアッセイし、高い HIV プロテアーゼ (HIV-Pr) 阻害活性 ($K_i = 1.7 \text{ nM}$) を示す化合物が見いだされた (図 5)。高収率で進行し、かつ一切の副生成物を生じないクリックケミストリーの特徴を活用した好例といえる。

天然有機化合物は、構造が複雑で多くの官能基をもっているため、官能基選択的に反応するには、反応させたくない官能基に保護基をつけ、反応後

に除去する必要がある、大変な労力を要する。いち早く天然物にクリックケミストリーを展開したのは、北里大学の太田智博博士(2015年ノーベル生理学・医学賞)と砂塚敏明博士らのグループで、親交のあった Sharpless 博士と共同で研究を進めていた。抗菌活性を有する天然有機物エリスロマイシン A をリード化合物として、クリックケミストリーを利用することで保護基を使わず官能基選択に反応が進行し、簡便に種々の誘導体へと合成展開した。その中から薬物耐性をもつ MRSA(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)や VRE(バンコマイシン耐性腸球菌)に対して、強い抗菌活性を示す新規化合物を見いだしている¹¹⁾(図6)。

in situ クリックケミストリー： 生体分子中でのクリックケミストリー

フラグメント創薬(小分子をつなぎ合わせる創薬：FBDD)では、標的(ターゲット)タンパク質に対し、選択的(弱くとも)に結合親和性をもつ小分子を見だし、その小分子間をいかに結合するかが重要になる。標的タンパク質と親和性をもつ2つの小分子がそれぞれ、タンパク質の異なる結合ポケットに入り込むことによってテンプレート(鋳型)効果でエントロピー的に有利になるため、小分子同士を化学的に結合させ、より強い親和性をもつ化合物を創出する標的誘導型合成(Target-guided synthesis: TGS)の手法がある¹²⁾(図7)。その際、TGSに用いる反応は、生理的条件下で反応し、不可逆反応であること、またタンパク質など生体内分子と反

応したり失活させたりしないことが必要条件となる。

Sharpless 博士らは、2002年にクリックケミストリーをTGSに利用した「*in situ* クリックケミストリー」と名づけた最初の論文を発表した⁷⁾。「*in situ*」とは、「生体分子の中で」という意味で、創薬標的となる生体分子(タンパク質など)が鋳型(反応容器)となり、その中で生体分子に結合親和性をもつフラグメント分子同士のクリック反応を進行させ、一層強い結合親和性の化合物を得ようとするものである。神経伝達物質の加水分解に関する酵素でアルツハイマー型認知症治療薬にも使われるアセチルコリンエステラーゼ(AChE)阻害剤の創製に、*in situ* クリックケミストリーを用いた(図8)。まず既存のAChE阻害剤で活性中心に結合する Tacrine とその近傍に結合する Propidium に対し、さまざまな長さのメチレンを介しそれぞれに反応基(アジドとアルキン)を導入したフラグメント分子(Tacrine($m=1\sim3$)-アジドと Propidium($n=5\sim8$)-アルキン)をAChE共存下、室温で6日間インキュベーションした。この反応混合物を質量分析で解析し、Tacrine(2)-Propidium(6)-トリアゾールのみが生成していることを見いだした。これはフラグメント分子がそれぞれAChEの結合ポケットに入り込むことでエントロピー的に有利になり、かつ最適な長さのメチレン鎖を介した組み合わせのフラグメント分子のみがクリック反応したと考えられる。この化合物はAChEに対し非常に強い阻害活性($K_d=99$ fM)を示し、*in situ* クリックケミストリーが実際の生物活性化合物の探索に有効な手

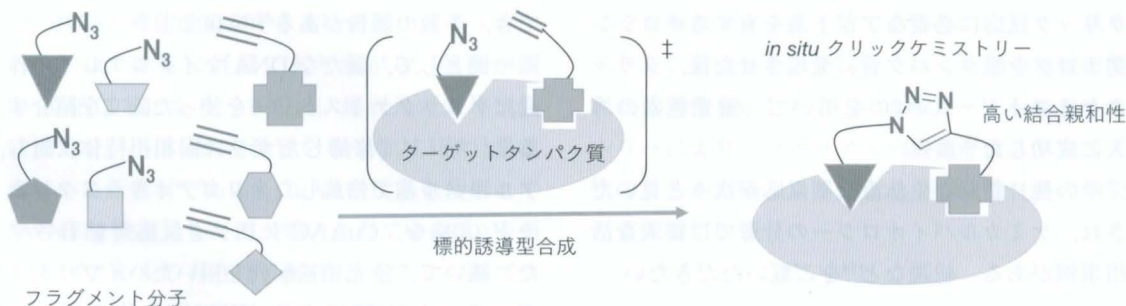


図7 生体分子中での標的誘導型合成(TGS)

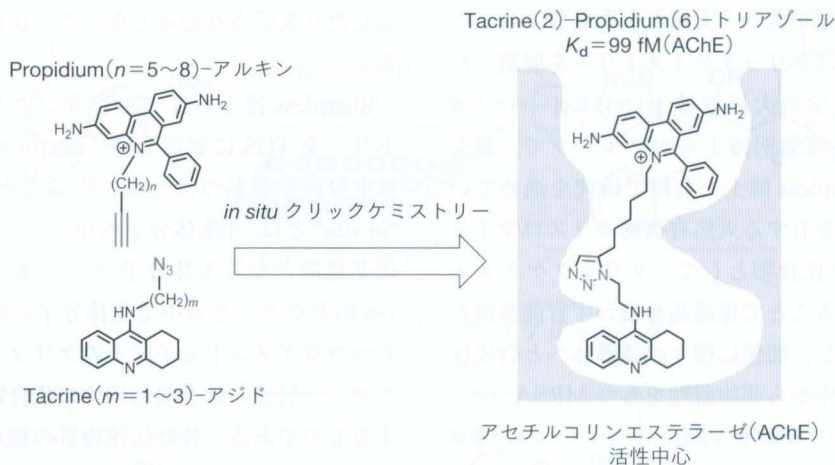


図8—*in situ* クリックケミストリーを用いた AChE 阻害剤の探索

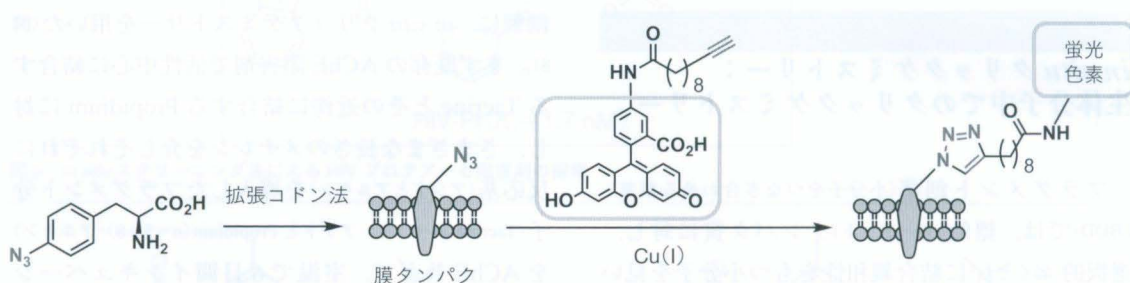


図9—クリックケミストリーを用いた蛍光色素のタンパク質への導入

法であることを証明した。

生体機能の解明を目指すケミカルバイオロジーでの活用

ケミカルバイオロジーでのクリックケミストリーの先駆的な活用事例を紹介する。Schultz 博士らは、終止コドンを利用し、非天然型アミノ酸をタンパク質に導入する「拡張コドン法」により、クリック反応に必要なアジド基を有するチロシンアナログを膜タンパク質に発現させた後、クリックケミストリー(CuACC)を用いて、蛍光色素の導入に成功した¹³(図9)。

その他、新たな生体直交型反応が次々と見いだされ、ケミカルバイオロジーの分野では膨大な活用事例がある。総説など¹⁴をご覧ください。

材料科学への展開

材料科学(マテリアルサイエンス)では、望む機能性の付与にクリックケミストリーを用い、ポリマーのさまざまな機能化、表面修飾、多孔質化、あるいは弾性率、ガラス転移温度、屈折率、透明度など物理化学的性質をコントロールした新たなブロック共重合体や dendrimer を簡便に得ることができ、多数の報告がある¹⁵(図10)。

一例として、新たな DNA マイクロアレイの作成にクリックケミストリーを使った論文を紹介する¹⁶。アジドで修飾したガラス固相担持体に対し、アルキニル基で修飾したオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)を、CuAAC クリック反応で結合させた。続いて、蛍光相補配列を用いたハイブリダイゼーション実験により、固相担持体表面への ODN の結合を確認した(図11)。ODN のように多

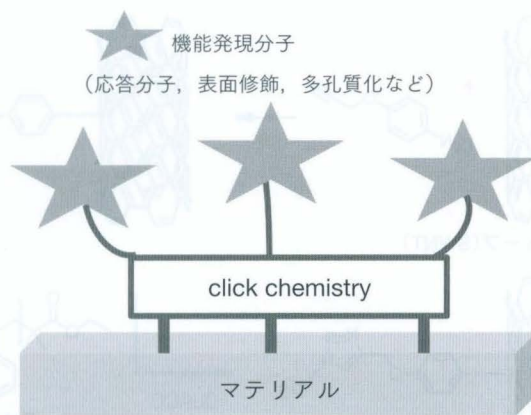


図10—クリックケミストリーの材料科学への展開

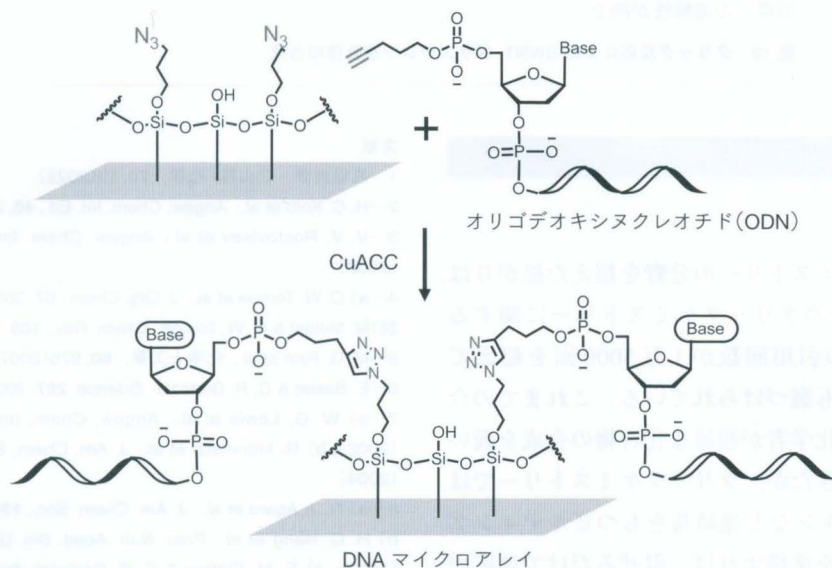


図11—固相担持体上へのODNの結合

くの官能基が存在しても、分解せず選択的にCuAACクリック反応は進行する。

またクリックケミストリーを用いる簡単な合成で、材料の機能改変ができる。単層ナノチューブ(SWNT)は、非常に軽量でありながら、強度が鋼の20倍ほどになり、さらに、優れた電気導電性に加えて、半導体的な性質をもつなど、注目を集めている新素材である。CuAAC反応を使用してSWNTを機能化した例が報告されている¹⁷。亜硝酸イソアミルの存在下、*p*-アミノフェニルプロパルギルエーテルを用いて、SWNT上にアルキンを導入し、続いてアジド末端ポリスチレンを、

CuAACクリック反応によりSWNTに固定した(図12)。非修飾ナノチューブとアルキン修飾ナノチューブのいずれもTHF、クロロホルム、およびジクロロメタンに不溶であったのに対し、ポリスチレン官能化ナノチューブはこれらの溶媒に優れた溶解性を示した。このようにクリックケミストリーにより、マテリアルの機能をカスタマイズすることが容易となり、新たな機能性材料の創製に貢献している。

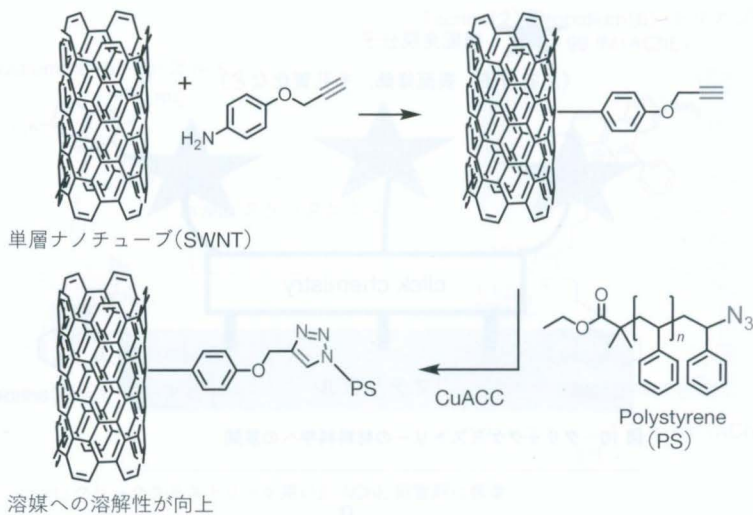


図 12—クリック反応による SWNT-ポリスチレン複合体の合成

今後の展望

クリックケミストリーの分野を超えた拡がり、Sharpless 博士のクリックケミストリーに関する最初の論文²の引用回数が 1 万 5000 回を超えていることから裏づけられている。これまでの合成化学は熟練化学者が複雑な化合物の合成を競い合い発展してきたが、クリックケミストリーでは、アジド/アルキンなど連結基をもつビルディングブロック分子を準備すれば、混ぜるだけで反応が完結する。合成化学の最高峰である天然有機化合物の全合成は、芸術的な「分子の彫刻」にたとえられるが、クリックケミストリーは、モジュール化された分子を連結させながら機能を付加していく「分子のレゴブロック LEGO®」といえるだろう。実際、クリックケミストリー専用のビルディングブロックを販売しているメーカーもあり、さまざまなクリック試薬が簡単に入手できるようになった。

クリックケミストリーの活用から生まれたさらなる発見が、再びノーベル賞に輝くことを期待している。

文献

- 1—馬場良泰・北山隆: 化学, **70**, 12(2022)
- 2—H. C. Kolb et al.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 2004(2001)
- 3—V. V. Rostovtsev et al.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 2596(2002)
- 4—a) C. W. Tornøe et al.: *J. Org. Chem.*, **67**, 3057(2002); b) (総説) M. Meldal & C. W. Tornøe: *Chem. Rev.*, **108**, 2952(2008)
- 5—M. G. Finn et al.: 化学と工業, **60**, 976(2007)
- 6—E. Saxon & C. R. Bertozzi: *Science*, **287**, 2007(2000)
- 7—a) W. G. Lewis et al.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 1053(2002); b) R. Manetsch et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 12809(2004)
- 8—a) N. J. Agard et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 15046(2004); b) H. C. Hang et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 14846(2003); c) E. M. Sletten & C. R. Bertozzi: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 6974(2009)
- 9—J. M. Baskin et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 16793(2007)
- 10—a) A. Brik et al.: *ChemBioChem.*, **4**, 1246(2003); b) A. Brik et al.: *Org. Biomol. Chem.*, **4**, 1446(2006)
- 11—A. Sugawara et al.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 6340(2007)
- 12—a) D. Rideout: *Science*, **233**, 561(1986); b) D. Rideout et al.: *Biopolymers*, **29**, 247(1990)
- 13—A. Deiters et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 11782(2003)
- 14—(成書)高田十志和・他監修: 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); (総説) a) N. K. Devaraj & M. G. Finn: *Chem. Rev.*, **121**(12), 6697(2021); b) R. E. Bird et al.: *Bioconj. Chem.*, **32**, 2457(2021)
- 15—(総説) W. Xi et al.: *Adv. Funct. Mater.*, **24**, 2572(2014)
- 16—B. Uszczyńska et al.: *Lab Chip*, **12**, 1151(2012)
- 17—B. Yameen et al.: *Chem. Commun.*, **49**, 6734(2013)