

生命科学研究に役立つ分子プローブの創製

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所・
理化学研究所 生命機能科学研究センター

細谷孝充

はじめに

一般に分子プローブとは、分子の生体内や細胞中でのふるまいを明らかにするために、その分子に機能を付与した化合物のことであり、医学・生命科学研究や創薬研究に広く用いられている。付与する機能としては、検出のための蛍光団やラジオアイソトープなどが代表的なものであり、プローブが標的タンパク質などと高い親和性を有している場合には、その標的分子のふるまいを間接的に明らかにすることができる。本講演では、分子プローブ創製に役立つ手法開発を目指して、最近、我々の研究グループで精力的に展開しているいくつかの研究を紹介したい。

1. 機能性分子の自在連結のための逐次クリック反応の開発

近年、生命科学研究のための分子プローブ創製をはじめ、多彩な研究分野において、複数の機能を併せ持つ分子が重要な役割を果たしている。多機能性分子は、特定の機能を示す部品を組み合わせて複数の機能性部位を配置し、それぞれが適切に機能することで高度な機能を発現できる。しかし、繊細な官能基を多数配置した多機能性分子の合成は、保護・脱保護・官能基変換といった過程を含む直線的で多段階の工程を要するため容易ではなく、最先端研究のボトルネックとなっている。

多機能性分子は一般に、単純な機能性分子を複数連結することによって合成される。その際、化合物同士を確実に連結できる手法として、アジドとアルキンとのHuisgen反応に代表されるクリック反応が注目されている。その代表的なものが、アジドと末端アルキンとの銅触媒を用いる環化付加反応や、アルキンとしてシクロオクチンなどの環状アルキンを用いる、無触媒でのアジドとの環化付加反応であり、これらの反応が生体分子の化学修飾などに広く用いられている。我々は、このクリック反応を続けて利用し、機能性分子を順次つなぎ合わせることができれば、分子プローブをはじめとする様々な機能性分子を簡便に合成できると考え、アジドやアルキンの反応性を精査し、これらを制御する新手法を創出することにより、逐次クリック反応の開発を行ってきた。

1-1. 異種アジド選択的反応にもとづくマルチクリック反応

立体的・電子的環境の異なるアジド基を複数配置した分子を用い、これらのアジド基を区別することで異種アジド選択的クリック反応を続けて行うことができれば、新しい機能性分子創製法になりえると考えた。この着想のもと、トリアジドおよびテトラアジドのそれぞれのアジド基を区別してトリアゾール形成に利用する手法の開発に成功した。この開発の契機となったのが、かさ高い置換基を両オルト位に有する芳香族アジド基が示す、特異な反応性に関する発見である¹。すなわち、このかさ高い芳香族アジド基が、その立体障害にも関わらず、アルキンとの協奏的な環化付加反応において著しく高い反応性を示す一方で、段階的に進行する反応では逆に

その反応性が大きく低下することを見いだした。この知見をもとに、3種以上の異種アジド基を選択的にトリアゾール形成に利用できる反応を見いだした。さらに、3種以上のアジド基を部分骨格として併せ持つトリアジド化合物やテトラアジド化合物をプラットフォーム分子として用いる逐次クリック反応が効率よく進行することを明らかにできた (Fig. 1)。本手法により、実際にタンパク質を多機能修飾できるプローブの開発にも成功した²。

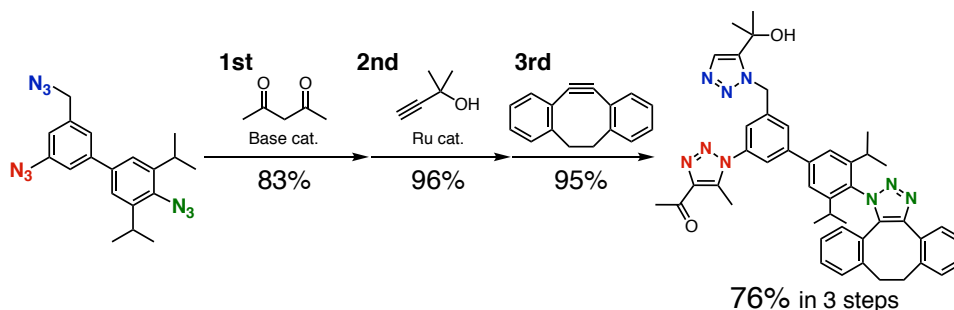


Figure 1

1-2. 環状アルキンおよびアジド基の保護法の開発

環状アルキンとアジドとを混合するだけで、2種の機能性分子を容易に連結できることから、幅広い分野で利用されるようになってきたものの、環状アルキンの合成には、古典的な求電子剤と求核剤との反応が利用されており、所望の環状アルキンを研究目的に応じて迅速に合成することは未だに容易ではない。こういった背景のもと、我々は、環状アルキンと比べて各種アジドが簡便に合成できる点に注目し、環状アルキン部位を2ヶ所有する Sondheimer ジーンを用いて2種類のアジド化合物を連結するダブルクリック反応の開発に成功した³。さらに、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手法の実現を目指し、環状アルキン部位の保護法の開発に取り組んだ。種々の検討の結果、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 (Fig. 2A)⁴。本手法は、アジド基を有するタンパク質等を、環状アルキンを有するタンパク質へと簡便にスイッチすることにも利用できた⁵。さらに、脂肪族アジド基存在下で、芳香族アジド基を選択的にホスフィンである *amphos* と反応させると安定なホスファジドを形成でき、アルキンとのクリック反応性を一時的に抑制できることを見出し、これに単体硫黄 (S_8) を加えるだけで、アジドを効率良く再生できることも明らかにした⁶。

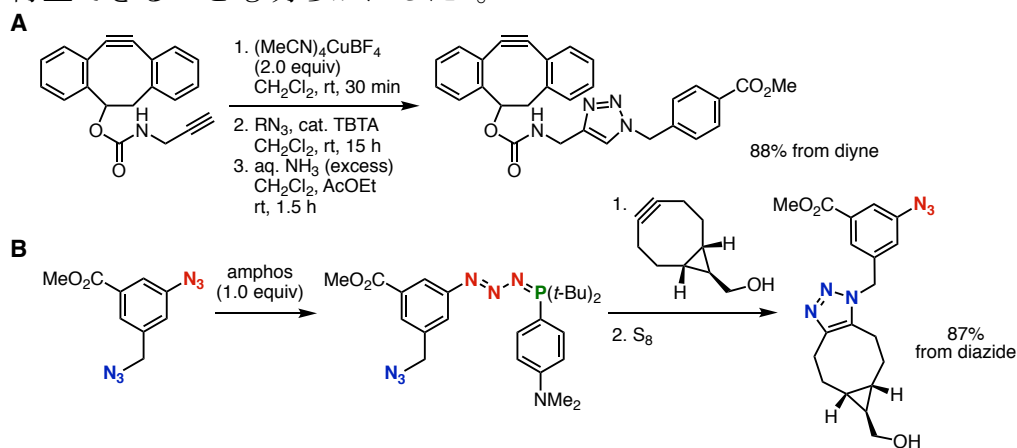


Figure 2

1-3. 標的タンパク質同定のためのジアジドプローブ簡便合成法の拡張

以前に我々は、生物活性化合物の構造中に芳香族アジドと脂肪族アジドを導入したジアジド型光親和性標識プローブを用いる標的タンパク質同定法を開発した⁷。また、形式的なC-Hアジド化反応を基盤として、様々な連結部位を有するジアジドビルディングブロックの簡便合成法の開発にも成功している⁸。最近、これらを用いた遷移金属触媒存在下での炭素-ヘテロ原子結合反応を検討した。特に、Buchwald-Hartwigカップリングによるアミノ化反応について検討したところ、一般的に用いられる反応条件では、その過酷さのためか、目的とするカップリング生成物は得られなかった。そこで条件を精査したところ、アジド基を損なうことなく、効率的にアミノ化が進行する穏和な条件を見出した (Fig. 3)。実際に本反応条件は、医薬品化合物のような多彩な官能基を有する様々なアミン類とのカップリングに適用することができた⁹。

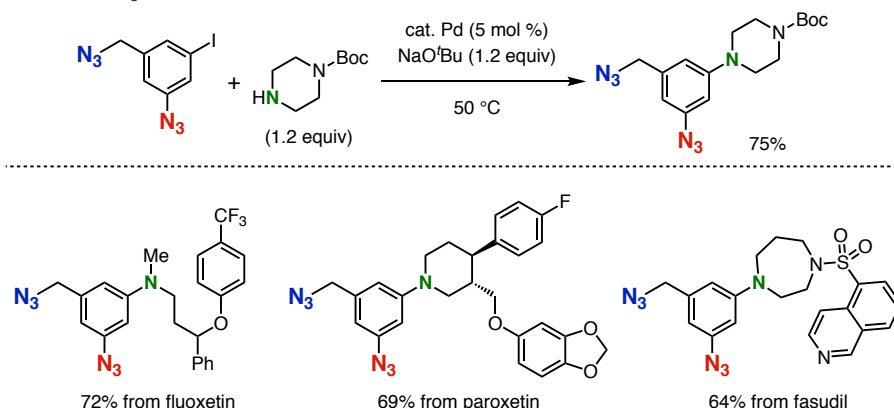


Figure 3

2. 分子プローブの迅速創製のための分子リノベーション戦略

一般に分子プローブは、高い生物活性を示す分子を基盤として設計されるため、複雑な化学構造を有することから、市販される化成品を原料として、いわば全合成研究のように合成されることが多い。しかし、その合成には多大な労力と時間を要することが多く、それが生命科学研究への応用を遅滞させる一因となっている。これに対して我々は、研究対象である生物活性化合物そのものが入手容易であることに着目し、これを出発原料とし、任意の位置の選択的な変換を通じて、短工程で機能性部位を導入するという、分子プローブの新たな合成戦略を着想した。我々はこのアプローチを「分子リノベーション戦略」と呼び、その実現に必要な反応の開発に取り組んでいる。分子プローブ中の機能性部位は、生体内での代謝等による欠落を防ぐため、化学的に安定な結合を介して分子に接続することが望ま

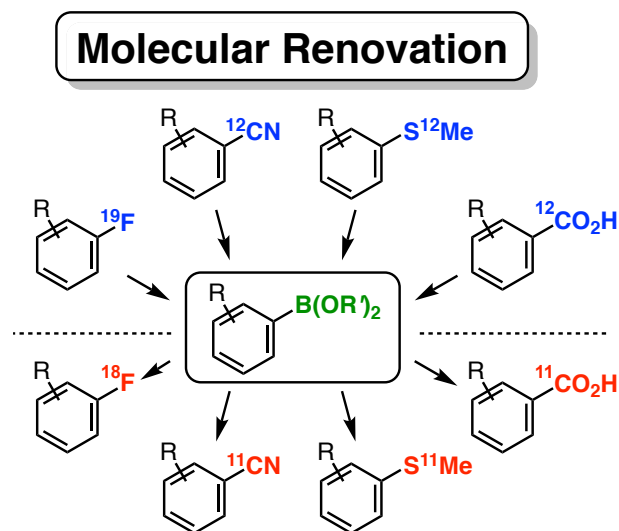


Figure 4

しい。また、PET プローブや標的分子同定のための光親和性標識プローブといった様々な機能性部位を有するプローブ類を共通の中間体から合成できると効率的である。すなわち、機能性部位を導入するための前駆体の合成には、生物活性化合物中の安定な化学結合を、多彩な変換に利用可能な炭素-ホウ素結合のような反応性部位に変換する手法が有効であると考えられる。以上の考えのもと、最近我々は、いくつかの不活性結合の切断を経るホウ素化反応の開発を行ってきた (Fig. 4)¹⁰。

2-1. 芳香族フッ素化合物の脱フッ素ホウ素化反応

フッ素原子が持つ特異な性質を活用し、医薬品や機能性材料など多彩な有用化合物にフッ素原子の導入が行われてきた。近年のフッ素化反応の開発に伴い、取得可能な含フッ素化合物の幅が急速に拡大していることから、これらを起点とする誘導体化の重要性が増している。我々は含フッ素ユニットとして多用されるフッ化アレーンに着目し、その炭素-フッ素結合の切断を起点とする自在合成法の開発を目指し、研究に取り組んだ。その結果、ニッケルと銅の触媒を併用することで、炭素-フッ素結合の切断を経るホウ素化反応 (脱フッ素ホウ素化反応) が進行することを見いだした¹¹。得られたホウ素化合物は、その多様な反応性を活かして、様々な誘導が可能である。例えば、高脂血症治療薬であるスタチン誘導体を出発原料に用いた変換により、¹⁸F-標識 PET プローブやアジド基を有する光親和性標識プローブをわずか 2 段階で合成することができた

(Fig. 5)。また最近、銅触媒のみを用いる実用性の高い脱フッ素ホウ素化反応の開発にも成功している¹²。

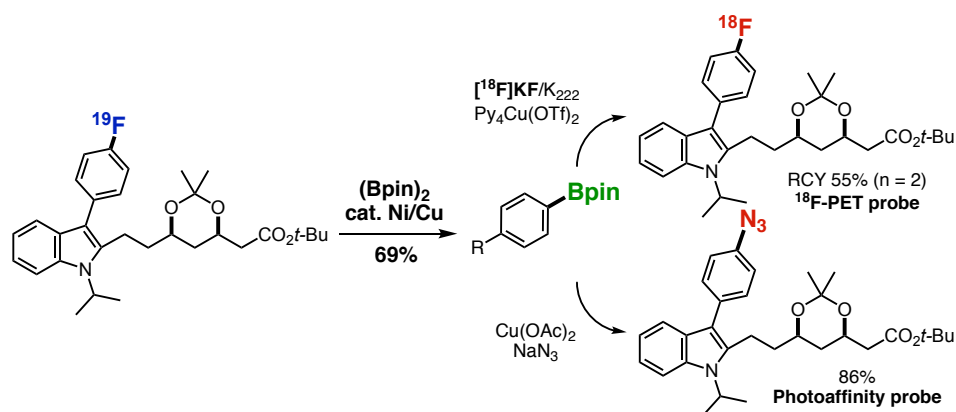


Figure 5

2-2. 芳香族カルボン酸の形式的脱炭酸ホウ素化反応

芳香族カルボン酸は普遍的に存在する基本的な化合物群であるため、カルボキシ基の脱離 (脱炭酸) を起点とする自在変換が実現できれば、広範な有用化合物が簡単に合成可能となる。直接的な脱炭酸を経る変換や芳香族アミドおよびエステル類の脱カルボニル化を経るホウ素化反応がこれまで報告されてきたが、これらは 150 度以上の強熱条件が必要であり、基質適用範囲に課題が残されていた。これに対し我々は、カルボン酸から容易に誘導可能なチオエステルにし、ロジウム触媒を作用させることで、炭素-硫黄結合の切断を経る脱カルボニルホウ素化が温和な条件下で進行することを見いだした¹³。本手法は高い官能基許容性を

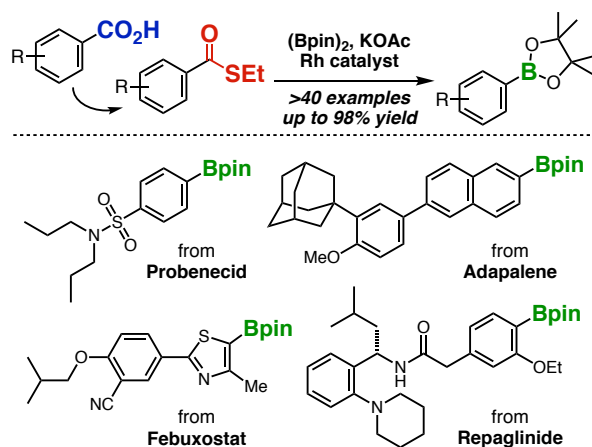


Figure 6

示し、市販医薬品を含む多彩な芳香族カルボン酸を 2 段階の反応でホウ素化合物へと誘導できた (Fig. 6)。

2-3.パラジウム錯体を用いるアリールボロン酸誘導体の ^{11}C -シアノ化反応

シアノアレーンは、医薬品によく見られる重要な骨格の一つであることから、その体内動態を解析するためにシアノ基を炭素 11 で標識した PET プローブの合成を可能とする ^{11}C -シアノ化反応の開発は重要な課題である。従来 ^{11}C シアノアレーン類は、パラジウムや銅を用いたハロゲン化アリールの ^{11}C -シアノ化反応により合成されていたが、我々は、パラジウム錯体を用いることで、アリールボロン酸並びにそのエステル誘導体の ^{11}C -シアノ化が円滑に短時間で進行することを見出した¹⁴。本反応は高い官能基許容性を有しており、標識前駆体であるアリールボロン酸誘導体が入手容易であることから、多彩な化学構造を有する ^{11}C シアノアレーンの合成へ適用できる。実際に本手法と、鳶巣、茶谷らにより開発された脱シアノホウ素化反応とを組み合わせることで、生物活性シアノアレーンをわずか 2 段階で対応する ^{11}C -標識 PET プローブへと誘導することに成功した (Fig. 7)。

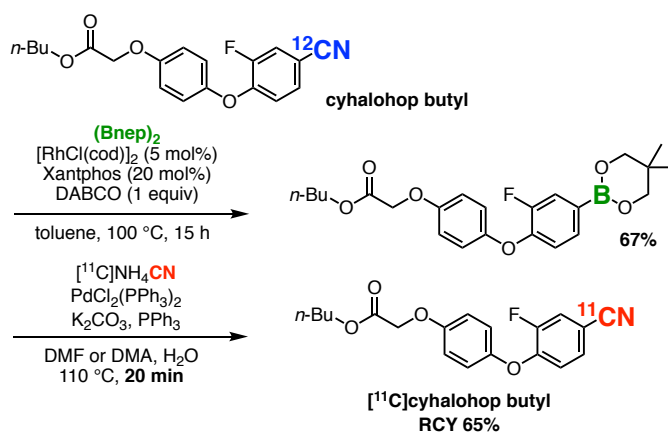


Figure 7

2-4. 2,2-ジフルオロビニルアレーンの脱フッ素ホウ素化反応によるモノフルオロアルケン合成法の開発

アミド結合は多彩な生物活性化合物や生体内分子に見られる基本的な骨格である。炭素 11 により標識できれば、広範な化合物の PET プローブ化が実現できるが、現時点ではその手法は限られている。これに対し、アミド結合と高い相同性を有するモノフルオロアルケンに置換すれば、生物活性を維持しつつフッ素 18 による標識が可能となる。この背景のもと、我々はこれまでに開発した脱フッ素ホウ素化反応を *gem*-ジフルオロアルケンに適用することで、*trans* 位が選択的にホウ素化された生成物が得られることを見いだした (Fig. 8)¹⁵。本手法で得られたボリル (フルオロ) アルケンを用いて、高脂血症治療薬として知られるアトルバスタチンのフルオロアルケンミミックを合成し、その活性の差を比較した。その結果、アミド結合のフルオロアルケン部位への置き換えが、生物活性に大きな影響を与えないことを確認した。現在、対応するフルオロアルケンミミックの ^{18}F -標識体の合成法の確立を進めている。

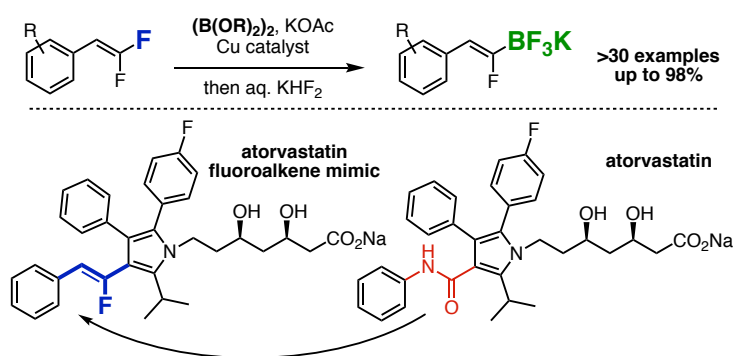


Figure 8

おわりに

近年の有機合成手法の発展に伴い、複雑な分子を容易に合成できるようになってきたものの、特に多機能性の分子プローブを合成するにはまだ克服すべき課題が山積している。今後、多くの研究者がこれらに挑戦して生命科学や創薬研究の発展に貢献することを期待している。

謝辞

以上の研究成果は、吉田優 准教授（東京医科歯科大学）、丹羽節 副チームリーダー（理化学研究所）を中心に、それぞれの研究室メンバーの多大な努力、ならびに多くの共同研究者のご協力のもと得られたものであり、皆様に感謝申し上げます。

参考文献

1. (a) Yoshida, S.; Shiraishi, A.; Kanno, K.; Matsushita, T.; Johmoto, K.; Uekusa, H.; Hosoya, T. *Sci. Rep.* **2011**, *1*, 82. (b) Yoshida, S.; Tanaka, J.; Nishiyama, Y.; Hazama, Y.; Matsushita, T.; Hosoya, T. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 13499. (c) Yoshida, S.; Goto, S.; Nishiyama, Y.; Hazama, Y.; Kondo, M.; Matsushita, T.; Hosoya, T. *Chem. Lett.* **2019**, *48*, 1038.
2. Yoshida, S.; Kanno, K.; Kii, I.; Misawa, Y.; Hagiwara, M.; Hosoya, T. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 3705.
3. Kii, I.; Shiraishi, A.; Hiramatsu, T.; Matsushita, T.; Uekusa, H.; Yoshida, S.; Yamamoto, M.; Kudo, A.; Hagiwara, M.; Hosoya, T. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4051.
4. Yoshida, S.; Hatakeyama, Y.; Johmoto, K.; Uekusa, H.; Hosoya, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 13590.
5. Yoshida, S.; Kuribara, T.; Ito, H.; Meguro, T.; Nishiyama, Y.; Karaki, F.; Hatakeyama, Y.; Koike, Y.; Kii, I.; Hosoya, T. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 3556.
6. Meguro, T.; Yoshida, S.; Igawa, K.; Tomooka, K.; Hosoya, T. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 4126.
7. (a) Hosoya, T.; Hiramatsu, T.; Ikemoto, T.; Nakanishi, M.; Aoyama, H.; Hosoya, A.; Iwata, T.; Maruyama, K.; Endo, M.; Suzuki, M. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 637. (b) Hosoya, T.; Inoue, A.; Hiramatsu, T.; Aoyama, H.; Ikemoto, T.; Suzuki, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2490. (c) Yoshida, S.; Hosoya, T. Target Identification of Bioactive Compounds by Photoaffinity Labeling Using Diazido Probes. Chapter 14 in *Cutting-Edge Organic Synthesis and Chemical Biology of Bioactive Molecules – The Shape of Organic Synthesis to Come* (Ed. Y. Kobayashi; Springer Nature Singapore), **2019**, pp. 335–355.
8. (a) Yoshida, S.; Misawa, Y.; Hosoya, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 3991. (b) Nishiyama, Y.; Misawa, Y.; Hazama, Y.; Oya, K.; Yoshida, S.; Hosoya, T. *Heterocycles* **2019**, *99*, 1053.
9. Sakata, Y.; Yoshida, S.; Hosoya, T. *To be submitted*.
10. Niwa, T.; Hosoya, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2020**, *93*, 230.
11. Niwa, T.; Ochiai, H.; Watanabe, Y.; Hosoya, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 14313.
12. Niwa, T.; Ochiai, H.; Hosoya, T. *ACS Catal.* **2017**, *7*, 4535.
13. (a) Ochiai, H.; Uetake, Y.; Niwa, T.; Hosoya, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 2482. (b) Niwa, T.; Ochiai, H.; Isoda, M.; Hosoya, T. *Chem. Lett.* **2017**, *46*, 1315.
14. Zhang, Z.; Niwa, T.; Watanabe, Y.; Hosoya, T. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 7711.
15. Sakaguchi, H.; Uetake, Y.; Ohashi, M.; Niwa, T.; Ogoshi, S.; Hosoya, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 12855.