

ダブルクリック反応：生体分子の新しい化学修飾法

喜井 勲¹, 吉田 優², 細谷 孝充²¹ 京都大学大学院医学研究科生体構造医学講座
形態形成機構学研究室)² 東京医科歯科大学生体材料工学研究所
生命有機化学分野)

はじめに

有機化学反応と生きた細胞は、その環境（実験条件）の違い（有機溶媒と水溶液）から長らく相容れないもの同士であった。本稿では、近年可能となってきた細胞中のタンパク質や糖鎖などの生体分子を「細胞を生かしたまま」効率良く低分子有機化合物で修飾する方法を紹介する。この方法は、クリック反応と呼ばれる水中でも高効率かつ高速に進行する化学反応を応用したものであり、主にアジド（アジド基：-N₃を有する化合物）やアルキン（アルキニル基：炭素-炭素三重結合を有する化合物、一般にアセチレンと呼ばれる）などの生体内には通常は存在しない官能基を用いる。後半では、最近我々（生物学者と有機化学者）が開発した「ダブルクリック反応」（高度に歪んだ炭素-炭素三重結合を二つ有するジイン化合物とアジドとの連続した二度のクリック反応）による簡便な生体分子の化学修飾法について紹介する（図1）。

生体分子の化学修飾

生体分子の機能を解析する手段の一つとして、以前から化学修飾法が用いられてきたが、特定の分子の特定の箇所を修飾することは、未だ困難な課題として認識されている。なぜならば、生体分子にはアミノ基やカルボキシル基、システイン残基のチオール基など化学修飾可能な多様

な官能基が存在しているが、これら生体分子に普遍的に存在する官能基を利用する方法では部位特異的な修飾が困難だからである。そこで部位特異的な修飾を可能にするために、生体内には通常存在せず、生体内に存在する官能基とはほとんど反応しないけれども、ある特定の相手とだけ、しかも水中かつ室温付近の温和な条件下で反応可能な官能基を人工的に生体分子内に導入する方法が用いられるようになった。このような特徴を備えた官能基は bioorthogonal 官能基と呼ばれ、アジド基やアルキニル基が代表的なものである。これらの官能基は小さく、ほぼ無極性で水素結合を形成しにくいことから、生体分子に導入してもその機能や構造特性を大きく変化させることはない。とくにアジド

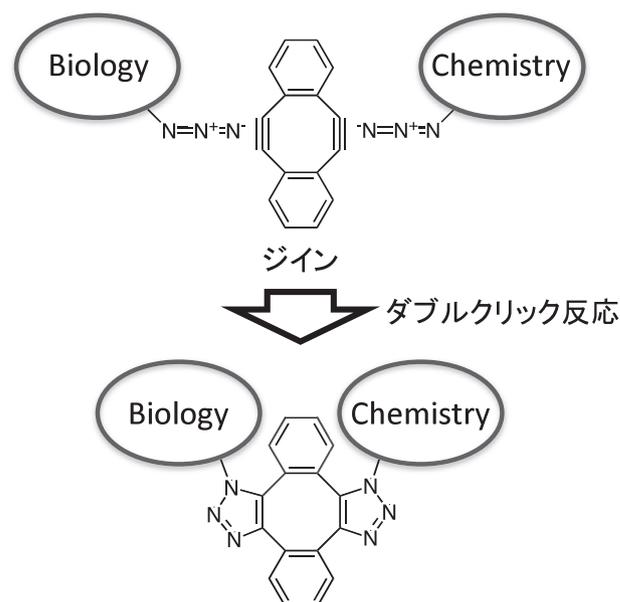


図1 ダブルクリック反応による Biology と Chemistry の融合
二つのアジド化合物を Biology と Chemistry に見立て、高度に歪んだ炭素-炭素三重結合を二つ有するジイン化合物がそれらを連結し、Chemical Biology を生み出す様子を表している。

Double click reaction: A novel method for chemical modification of biomolecules

Isao Kii,¹ Suguru Yoshida,² and Takamitsu Hosoya² (¹Department of Anatomy and Developmental Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, ¹Faculty of Medicine Bldg. C, Yoshida-Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan and ²Laboratory of Chemical Bioscience, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan)

基は、トリアリールホスフィン誘導体との Staudinger ライゲーション反応やアルキンとのクリック反応（後述）等の有機化学反応により共有結合を介して繋ぐことが可能である。すなわち原理的には、生体分子の特定の箇所にアジド基（もしくはアルキニル基）を導入することができれば、蛍光等の付加したい機能を持たせたアルキン（もしくはアジド）化合物と連結することで、生体分子の特異的な箇所を修飾することができる。

クリック反応の台頭

アジドとアルキンを混合して加熱するとお互いが反応してそれぞれを連結できることは既に19世紀後期には知られていた。1950-60年代に R. Huisgen らによってアジドとアルキンの反応を含む1,3-双極子化合物による環化付加反応が詳細に調べられたことから、この形式の反応は Huisgen 1,3-双極子環化付加反応と総称される¹⁾(図2)。アジドとアルキンの反応においては、他にどのような官能基が共存していてもほぼアルキンとアジドのみが反応し、収率良く1,2,3-トリアゾール環が得られ、余計な副生成物が生じないという特徴を有している。本反応には多様な溶媒を利用することができ、水中でも反応を行えるが、一般に100℃以上の加熱を必要とするため、生体分子の化学修飾には適していなかった。ところが、2002年に一価の銅触媒(Cu(I))を用いることによりアジド-アルキン間の Huisgen 環化付加反応が100万倍以上に加速し、室温でほぼ100%の収率でトリアゾール環を与えることが発見されたことにより本反応が一気に脚光を浴びることになる^{2,3)}。事実これを契機として材料科学や創薬、さらには生物学と言った多岐に亘る分野で、この反応が爆発的に利用されるようになり、いまや Huisgen 環化付加反応は、「クリック反応」と象徴的に呼ばれる代表的な有機化学反応の一つとなった。クリック反応とは、その提唱者で2001年のノーベル賞受賞者である K.B. Sharpless の言葉に従えば、以下のように説明される。

実験操作が非常に簡便で、目的生成物のみを高収率に与え、水中を含むどのような条件下でも効率よく進行する上

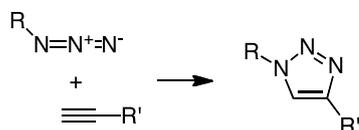


図2 アジドとアルキンの Huisgen 1,3-双極子環化付加反応
アジドとアルキンを混合して加熱するとお互いが反応し、収率良く1,2,3-トリアゾール環が得られる。

に、どのようなタイプの分子でも互いに結合させることが可能である。「クリック」という言葉は、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 (clicking)」つながるように、この手法で二つの分子が簡単につながることがを意味している^{4,5)}。

生物実験においてとくに重要な点は、大多数の有機反応の反応溶媒である「有機溶媒中」とは違い、クリック反応が「水中」でも速やかに進行することである。言うまでもなく、細胞やタンパク質等の生体分子は、ごく一部の例外を除いて、有機溶媒中ではその活性を維持することが困難だからである。銅触媒を用いたクリック反応はその有用性から生物系の実験で多用されるようになり、蛍光性アジド等、様々なクリック反応用の試薬が市販されるようになった（後述）。しかしながら、この銅触媒を用いたクリック反応は「生きた細胞」では使えないのである。なぜならば、クリック反応に必要な銅触媒濃度では細胞は死滅してしまうからである。

銅触媒を用いないクリック反応の登場： シクロオクチン誘導体の利用

銅触媒による細胞毒性を回避するため、2004年に Bertozzi らは銅触媒を用いないクリック反応を開発した⁶⁾。シクロオクチン（三重結合を有する8員環化合物）とフェニルアジドを混合するだけで環化付加体を与えることは、1961年に Wittig と Krebs が報告している⁷⁾(図3)。この反応では、シクロオクチンの三重結合が大きく歪んでいるため、フェニルアジドとの反応による歪みの解消が駆動力となることで反応が自発的に進行し、触媒等を必要としないと考えられる。Bertozzi らはこれをヒントにして、シクロオクチンのビオチン誘導体を合成し、銅触媒非存在下でも環化付加反応が進行し、アジド基を有する生体分子を修飾できることを示した。

クリック反応による糖鎖の化学修飾

Bertozzi らはさらに、蛍光性のシクロオクチン誘導体を合成し、これを用いて細胞を生かしたまま細胞表面の糖鎖

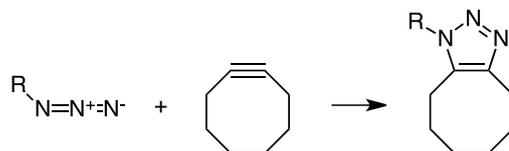


図3 アジドとシクロオクチンの自発的環化付加反応
アジドとシクロオクチン（三重結合を有する8員環化合物）の環化付加反応は、銅触媒の非存在下でも自発的に進行し、それぞれを連結することが出来る。

テクニカルノート

を修飾することに成功した⁹⁾。細胞表面には糖鎖が共有結合した糖タンパク質（膜タンパク質等）や糖脂質が細胞膜に組込まれた形で存在している。アジド基を有する単糖の誘導体（アジド糖；図4）を細胞の培養液に加えることで、この糖鎖に代謝的にアジド糖を取り込ませることができる。アジドマンノサミン誘導体（Ac₄ManNAz；細胞膜を通過させるために水酸基をアセチル化してある。アセチル基は細胞内で（エステラーゼにより）加水分解される。図4）を用いた場合には、細胞内でアジド基を持ったまま糖が代謝され、糖鎖末端のシアル酸部位にアジド基が導入される。アジド糖が取り込まれた細胞の培養液に蛍光性シクロオクチン誘導体を数μMの濃度で加えると、10分以内に糖鎖のアジド部位と環化付加反応を起こし、その結果、細胞表面の糖鎖が蛍光標識される。この反応では不可逆的な共有結合が形成されるため、細胞からタンパク質を抽出したり、変性させたりしても標識が外れることはない。さらに本手法は、培養細胞系だけでなく、生きたゼブラフィッシュの胚発生段階での複合糖質のバイオイメージング等にも適用可能であることが示されている⁹⁾。最近では、反応性や水溶性を高めたシクロオクチン誘導体が次々と開発されている。

ダブルクリック反応の開発

上記のようなシクロオクチン誘導体を用いたクリック反応により、アジド基を導入した生体分子を化学修飾する方法は、様々なバイオロジー研究において極めて有用なツールとなり得る。実験上必要となるシクロオクチン誘導体を容易に入手することができれば、汎用性が高い手法と言えるであろう。しかし、蛍光色素をはじめ、機能性部位を有するシクロオクチン誘導体を個々の実験目的に応じてオンデマンドで合成するのは容易ではない。最近、いくつかのシクロオクチン誘導体が市販されるようになったが（後述）、様々な用途に十分対応できているとは言い難いのが現状である。これに対して我々は、1974年に Sondheimer

らによって初めて合成された、歪んだ炭素-炭素三重結合を分子内に二つ持つジイン化合物に着目した（図1）¹⁰⁾。すなわち、このジインの持つ二つの高度に歪んだ炭素-炭素三重結合の一方をアジド基を有する生体分子と、そしてもう一方を機能性低分子アジド化合物と反応させる二度のクリック反応、いわば「ダブルクリック反応」を行うことを考えた¹¹⁾。機能性アジドは上述したように多様なものが市販されており、また、合成も容易である。そのため、ダブルクリック反応が思惑どおり進行すれば多様な研究目的に対応できると期待したのである。

我々はまず、有機溶媒（メタノール）中でジインと等量の低分子アジドとの反応を試みた。当初我々は、ジインの一方のアルキンのみが反応したモノイン化合物が中程度の収率で得られるものと考え、それを次のアジド生体分子とのクリック反応のプロープとして使用することを想定していた。しかし種々検討した結果、期待したモノインは全く得られず、その代わりに二分子のアジドが反応したダブルクリック生成物と原料のジインがほぼ同量ずつ得られることが分かった。このことは、モノインのアルキンがジインのアルキンよりもはるかに高い反応性を有することを示している。実際、密度汎関数理論（DFT）法を用いてメチルアジドとの反応における反応経路の計算（B3LYP/6-31G(d)）を行ったところ、モノインとの反応のほうがジインとの反応よりも活性化エネルギーが数 kcal/mol ほど低いと見積もられた。このダブルクリック反応の効率は極めて高く、どのようなアジドであっても二当量以上をジインに対して加えるだけで二重環化付加生成物をほぼ定量的に得ることができる。

ジインから、先に機能性モノインを合成することは難しいことが分かったが、二種類の異なるアジド化合物の等量混合物に対してジインを反応させた場合には、それぞれのアジド由来のホモ二重環化付加体に加え、ジインを介して二種類のアジドが連結したヘテロ二重環化付加体が中程度の収率で得られた。そこで実用上は問題ないと考え、次に

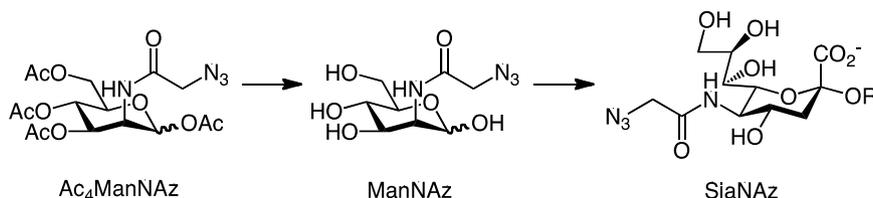


図4 アセチル化アジドマンノサミン（Ac₄ManNAz）の細胞内での脱アセチル化と糖鎖末端のシアル酸部位への代謝的取り込み

細胞膜を透過させるため水酸基をアセチル化した Ac₄ManNAz は、細胞内でエステラーゼによる加水分解を受け、アジドマンノサミン（ManNAz）へと変換される。その後、細胞内でアジド基を持ったまま糖が代謝され、糖鎖末端のシアル酸部位にアジド基が導入される。

我々には実際にアジド基を有するタンパク質をジインを介して低分子アジドと連結する実験を試みることにした。

ダブルクリック反応によるタンパク質の化学修飾

アジド基等の非天然官能基を有するタンパク質の調製方法は幾つか知られているが、我々はダブルクリック反応による化学修飾のモデル実験に HaloTag タンパク質を利用した。HaloTag タンパク質は、HaloTag リガンドと呼ばれる長鎖クロロアルカン構造を有する低分子化合物と特異的に反応して共有結合を形成する性質を有しているため、簡便に望む官能基をタンパク質に導入することができる¹²⁾。我々は、アジド基を有する HaloTag リガンドを用いることで、アジド基を導入した HaloTag タンパク質を調製した(図5)。このアジドタンパク質に対して、蛍光性アジド化合物およびジインを順次加えたところ、ダブルクリック反応が期待した通り進行し、効率よく HaloTag タンパク質を蛍光修飾することができた。この際、HaloTag タンパク質は、ビーズに固定化した状態と、溶液中に浮遊させた状態のいずれの場合でもダブルクリック反応により化学修飾することが可能である。興味深いことに、ビーズに固定化したアジドタンパク質を用いた場合には、過剰のジインを反応させた後、未反応のジインを洗い落とし、その後蛍光性アジドを反応させる段階的な修飾が可能であった。このことは、有機溶媒中における反応とは異なり、アジドタンパク質とジインが反応して生成すると考えられるモノイン中間

体が一定時間安定に存在していることを示している。さらに、浮遊状態のアジドタンパク質を用いた場合には、タンパク質同士がジインを介して連結した二量体が生成する懸念があったが、実際にはそのような二量化はほとんど進行せず、浮遊タンパク質も同様に効率よく修飾できることが分かった。これは、有機溶媒中における反応の場合と比べ、用いているアジドタンパク質の濃度が著しく低いこととタンパク質間の立体障害が大きいためであると考えられる。以上のように、ダブルクリック反応により簡便にタンパク質を化学修飾することができる。

ダブルクリック反応による生細胞表面糖鎖の化学修飾

ダブルクリック反応は、前述したアジド糖誘導体を用いた生細胞表面糖鎖の化学修飾に利用することもできる。アジド糖を取り込ませた細胞にジインを添加し、未反応のジインを除いた後、速やかに蛍光性アジドを加えることで、細胞表面の糖鎖が蛍光修飾される¹¹⁾。蛍光性シクロオクチン誘導体を用いた従来法との比較実験では、ほぼ同程度の蛍光標識効率を示した¹¹⁾。

ダブルクリック反応に用いる試薬の入手方法

本稿で紹介したダブルクリック反応に用いる試薬等の入手方法について紹介する。

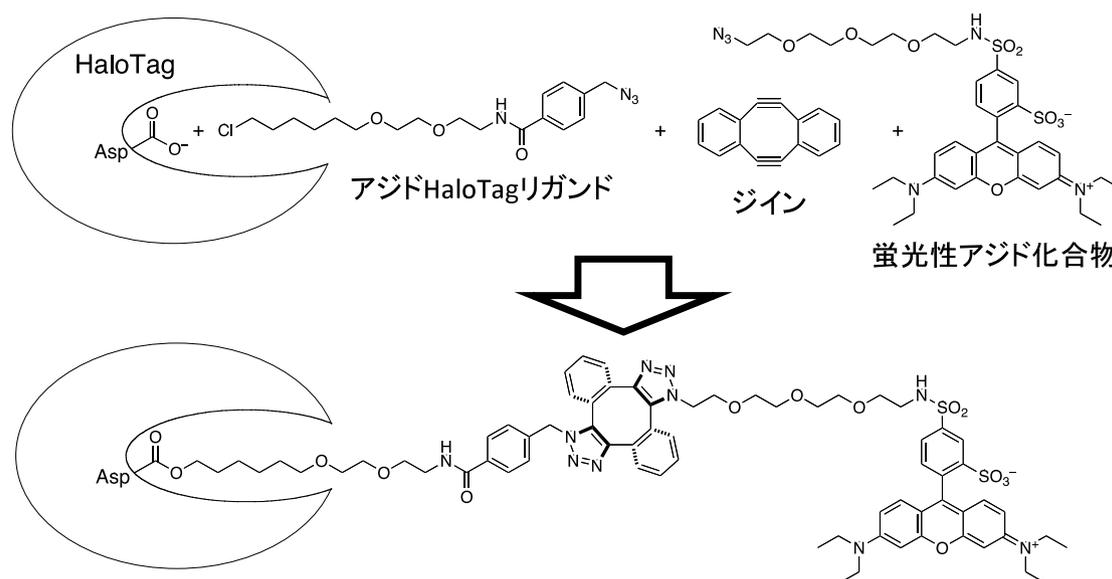


図5 リコンビナント HaloTag タンパク質のダブルクリック反応による化学修飾

アジド基を有する低分子化合物 HaloTag リガンド (アジド HaloTag リガンド) を HaloTag タンパク質に共有結合させることで、アジド基を有するタンパク質を調製する。その後、ジインおよび蛍光アジド化合物を順次加えることでダブルクリック反応が進行し、それぞれが連結した蛍光タンパク質が得られる。

テクニカルノート

1) 代謝的に生細胞内の生体分子へアジド基を導入するための試薬

	試薬	使用方法	製造元/販売元
糖鎖の化学修飾	アセチル化 <i>N</i> -アジドアセチルガラクトサミン (Ac ₄ GalNAz), アセチル化 <i>N</i> -アジドアセチルグルコサミン (Ac ₄ GlcNAz), アセチル化 <i>N</i> -アジドアセチルマンノサミン (Ac ₄ ManNAz)	細胞培養液への添加	Sigma-Aldrich Invitrogen 等
脂質の化学修飾	アジドパルミチン酸 (15-azidopentadecanoic acid), アジドミリスチン酸 (15-azidopentadecanoic acid), アジドフェルネシルアルコール (farnesyl alcohol, azide), アジドゲラニルゲラニルアルコール (geranylgeranyl alcohol, azide)	細胞培養液への添加	Invitrogen
新規合成タンパク質の化学修飾	L-azidohomoalanine	アジドメチオニン類縁体として翻訳時に取り込まれ, 新規合成タンパク質にアジド基が導入される。	Invitrogen
	<i>p</i> -azido-L-phenylalanine 3-azido-L-tyrosine	非天然アミノ酸の <i>in vitro</i> 導入法	渡辺化学工業 BACHEM 等

2) タンパク質や核酸の標識

	試薬	使用方法	製造元/販売元
リコンビナントタンパク質の化学修飾	HaloTag SNAP タグ CLIP タグ ACP/MCP タグ	融合タンパク質として発現させた後, それぞれに特異的に共有結合するアジド基導入低分子化合物を結合させる。	Promega New England Biolabs
核酸の標識	人工アジド基導入塩基	プライマーとして合成する際に, アジド基導入塩基を組込む。	NGRL

3) 各種アジド基導入プローブ

	試薬	製造元/販売元
蛍光	Alexa Fluor 488 azide Alexa Fluor 555 azide Alexa Fluor 594 azide Alexa Fluor 647 azide 等	Invitrogen Click Chemistry Tools
ビオチン	Biotin azide	Invitrogen Click Chemistry Tools
HaloTag リガンド	アジド HaloTag リガンド	問い合わせ先: プロメガ (株) マーケティング部 Tel: 03-3669-7981 E-mail: mktg@jp.promega.com

4) シクロオクチン誘導体 (クリック反応)

ビオチンや蛍光色素が結合したシクロオクチン誘導体は Click Chemistry Tools (<http://www.clickchemistrytools.com/>), invitrogen (<http://www.invitrogen.jp>), SynAffix (<http://www.synaffix.com>) から購入可能である。マレイミドや *N*-ヒドロキシスクシニミジルエステル誘導体等も取り扱っており, これらに個々の実験に必要な修飾を加えることもできる。

5) Sondheimer ジーン (ダブルクリック反応)

現在は市販されていないが, 文献 10) に従い合成できる。

ま と め

水中, 温和な条件下で速やかに進行するクリック反応の台頭により, タンパク質等の生体分子の化学修飾が生細胞においても可能になってきた¹³⁾。近年, クリック反応以外の反応形式に基づく生体分子の化学修飾法も多く開発されており, この分野の発展が著しい (テトラジン-トランスシクロオクテン, 浜地法, 田中法など)。我々が新たに開発したダブルクリック反応は, ジーンを介して二つの異なるアジド化合物を一挙に連結することができるため, アジド基を導入した生体分子を任意の低分子アジド化合物により簡便に化学修飾することができる。今後, 生体分子の任意の部位にアジド基を導入する手法のさらなる発展とともに本手法の有用性が高まり, これまで困難であった生体分子の機能解析に役立つものと期待される。

謝辞

本稿で紹介したダブルクリック反応に関する研究は, JNC 石油化学株式会社五井研究所 松下武司博士, 東京工

業大学大学院理工学研究科 植草秀裕准教授ら、文献 11) に記載の方々との共同研究により行われたものであり、感謝の意を表します。

- 1) Huisgen, R. (1963) *Angew. Chem, Int. Ed. Eng.*, **11**, 633–645.
 - 2) Rostovtsev, V.V., Green, L.G., Fokin, V.V., & Sharpless, K.B. (2002) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **14**, 2596–2599.
 - 3) Tornøe, C.W., Christensen, C., & Meldal, M. (2002) *J. Org. Chem.*, **9**, 3057–3064.
 - 4) Kolb, H.C., Finn, M.G., & Sharpless, K.B. (2001) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 2004–2021.
 - 5) Finn, M.G., Kolb, H.C., Fokin, V.V., & Sharpless, K.B., 訳：北山 隆 (2007) 化学と工業, vol. 60, pp. 976–980, 日本化学会, 東京.
 - 6) Agard, N.J., Prescher, J.A., & Bertozzi, C.R. (2004) *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 15046–15047.
 - 7) Wittig, G. & Krebs, A. (1961) *Chem. Ber.*, **94**, 3260–3275.
 - 8) Baskin, J.M., Prescher, J.A., Laughlin, S.T., Agard, N.J., Chang, P.V., Miller, I.A., Lo, A., Codelli, J.A., & Bertozzi, C.R. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **104**, 16793–16797.
 - 9) Laughlin, S.T., Baskin, J.M., Amacher, S.L., & Bertozzi, C.R. (2008) *Science*, **320**, 664–667.
 - 10) Wong, H.N.C., Garratt, P.J., & Sondheimer, F. (1974) *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 5604–5605.
 - 11) Kii, I., Shiraishi, A., Hiramatsu, T., Matsushita, T., Uekusa, H., Yoshida, S., Yamamoto, M., Kudo, A., Hagiwara, M., & Hosooya, T. (2010) *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, **8**, 4051–4055.
 - 12) Los, G.V., Encell, L.P., McDougall, M.G., et al. (2008) *ACS Chem. Biol.*, **3**, 373–382.
 - 13) van Hest, J.C. & van Delft, F.L. (2011) *ChemBioChem*, **12**, 1309–1312.
-