博士論文

リガンド結合評価系確立を指向した 蛍光性 PPAR リガンドに関する研究

平成 26 年 3 月

伴 慎太郎

岡山大学大学院

医歯薬学総合研究科

博士後期課程創薬生命科学専攻

目次

緒言		1
第1章	PPARa 選択的アゴニストの合成と	
	その非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)進展抑制活性	6
1.1	デザイン	7
1.2	合成及び転写活性化試験	9
1.3	NASH 進展抑制評価	15
1.4	小括	23
	、 Nan re データ DDAD re デーマンマデーターの	
用 ⊿ 早	ビレン境を有する $PPARa/o テュノル/ コニストの$	
	二面的蛍光特性	24
2.1	合成	25
2.2	PPARaLBD, PPARoLBD 結合実験	28
2.3	X 線結晶構造及びドッキングモデルに基づいた考察	31
2.4	点変異 PPAR による結合実験	34
2.5	小括	39
第3章	PPARa, δ 結合実験系構築	40
3.1	結合実験系構築のための基礎検討	41
3.2	K _d , K _i の計算	43
3.3	PPARa に対する Kd 値の算出	47
3.4	PPARa リガンドの K _i 値の算出	48
3.5	PPAR δ に対する K _d 値の算出	50
3.6	PPARδ リガンドの K _i 値の算出	51

3.7 小括

第4章	f PPARδ 選択的アンタゴニストの合成と	
	その HCV RNA 複製抑制活性	54
4.1	合成	55
4.2	活性評価	57
4.3	併用効果	60
4.4	小括	61
総括·	今後の展望	62
実験項	Ĩ	65
参考文	98	
略号表		104
謝辞		106

緒言

ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor; PPAR) は核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド依存性の転 写因子である。PPAR はこれまでに α , $\delta(\beta)$, γ の 3 サブタイプが同定されてい る¹。PPARa は 1990 年に, PPAR β 及び PPAR γ は 1992 年にアフリカツメガエル よりクローニングが報告され,同年,ヒトから PPAR δ がクローニングされ た²⁴。PPAR β と PPAR δ は非常に高い相同性であったためこれらは同一視されて いる。PPAR α は肝臓,腎臓,骨格筋や心筋,副腎といった主に代謝的に活性な 組織で発現しており,PPAR γ は主に脂肪組織,マクロファージ,血管平滑筋で発 現している。これらとは異なり PPAR δ は全身に偏在的に発現している。PPAR はアゴニストが結合するとレチノイド X 受容体(RXR)とヘテロダイマーを形成 し標的遺伝子上流の PPAR 応答配列(PPRE)に結合し遺伝子の転写を制御してい る(Figure 1)⁵。



Figure 1. Transcription mechanism of PPAR. PPAR-RXR heterodimer binds to a PPRE located in the promoter region of target genes. Agonist-unbound PPAR associates with the corepressor complex. Agonist-bound PPAR associates with the coactivator complex.

PPARα は脂肪酸の代謝や輸送に関連する遺伝子,コレステロールや中性脂肪の代謝に関連する遺伝子の発現を制御している⁶。PPARγは脂肪細胞の分化誘導に対して中心的な役割を有しており,成熟した脂肪細胞での脂肪の貯蔵を亢進させる⁷⁻⁹。PPARδ は α, γ と比較して機能が明らかでない点が多いが,飢餓や長

期間の運動でグルコースの代謝から脂肪酸の代謝へと代謝経路の方向付けを行う因子, 飢餓状態でのエネルギー産生に関わる転写因子としての役割が報告されている¹⁰⁻¹²。このように PPAR は生活習慣病など多くの疾患の治療・予防の可能性を有している。

PPARの内因性のリガンドとしては長鎖脂肪酸やエイコサノイドが PPAR 全サ ブタイプを活性化し、ロイコトリエン B4 が PPARα, 15-deoxy-Δ^{12,14}-prostaglandin J2 が PPARγ のアゴニストとして働く(Figure 2)。脂質異常症治療薬であるフィブ ラート系薬剤が PPARα を活性化し、糖尿病治療薬であるチアゾリジンジオン系 薬剤が PPARγ を活性化することが明らかとなり PPAR アゴニストの研究が盛ん に行われるようになった¹³。またアゴニストだけでなく PPAR アンタゴニストの 疾患治療の可能性もいくつか報告されている。PPARα アンタゴニストは HCV RNA の複製を抑制することが報告されている¹⁵。PPARγ アンタゴニストは乳が んをはじめとする複数のがんに対して抗がん活性を示す¹⁶⁻¹⁸。また PPARγ アン タゴニストが高脂肪食下における脂肪細胞の肥大とインスリン抵抗性を抑制す ることが報告されている¹⁹。PPARδ の抑制はがんに対し抑制的に働くことが報 告されている^{20,21}。さらに近年では PPAR リガンドの転写を介さない機能も報告 されている^{22,28}。これらのことから PPAR の機能の全容解明には多様な PPAR リ ガンドの充実が必要であり、そのためのリガンド評価法も重要となる。



leukotriene B4 endogenous PPAR α agonist



pioglitazone synthetic PPARγ agonist



15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 endogenous PPAR γ agonist



GW9662 synthetic PPAR α/γ antagonist



bezafibrate synthetic PPAR α agonist



 $GSK3787 \\ synthetic PPAR\delta \ antagonist$

Figure 2. Representative PPAR ligands.

PPAR のリガンド評価法には PPRE の下流にレポーター遺伝子を導入した転写 活性化試験が広く用いられている²⁸。この方法は既知のアゴニストと競合させ ることによりアンタゴニスト活性を評価することができるが、リガンド探索時 にアゴニスト試験のみを行った場合アンタゴニストを見落としてしまうことに なる。また上記の通り PPAR リガンドの転写を介さない機能も報告されている ため転写活性化試験ではない、PPAR とリガンドの結合親和性を直接評価する評 価法も PPAR リガンド研究において必要である。

タンパク質とリガンドの結合評価の代表的な方法としては放射性ラベルリガ ンドを利用した方法がある。しかしタンパク質と結合しているリガンド(B)と結 合していないリガンド(F)の分離操作(B/F分離)が必要であり操作が煩雑である²⁹。 また放射性ラベルリガンドの合成も特殊な設備・取扱いが必要であり実施は容 易ではない。最近では表面プラズモン共鳴 (SPR)法や等温滴定型熱量測定(ITC) 法を用いた方法が多く報告されるようになっているが現在のところ装置が高価 であり汎用性が高いとは言い難い³⁰⁻³⁷。PPAR の結合評価に関しては時間分解蛍 光共鳴エネルギー転移(TR-FRET)法に基づく測定キットが販売されているがこ れも高価である³⁸⁻⁴¹。著者はより簡便・安価な結合評価法として蛍光プローブを 用いた方法に着目した。

TR-FRET 法を除く蛍光プローブを利用した結合評価法には蛍光偏光法と蛍光 強度法がある(Figure 3)。蛍光偏光法はタンパク結合時,非結合時における蛍光 プローブの回転ブラウン運動の差異により偏光の解消の度合が現れることを利 用した評価法である。この方法は化合物デザインによってはタンパク結合時に 蛍光団がリガンド結合ポケットに収まっている必要がなく蛍光団を導入しやす いという利点がある。しかし偏光を作り出すための光学素子が装置に備え付け られている必要がある。

蛍光強度法はタンパク質結合時・非結合時の蛍光プローブの蛍光強度変化を 利用した評価法である。蛍光分子は水に溶媒和している時,疎水性環境に比べて

3

蛍光強度が弱くなる⁴²。蛍光分子がタンパク質の疎水性ポケットと結合した時, 水中から疎水環境に移行することにより蛍光は強くなる。この時リガンドと蛍 光分子を競合させることによりリガンドの結合親和性を評価することが出来る。

著者は PPAR 選択的な蛍光プローブを用いた蛍光強度法に基づく結合評価系の構築を目的として研究に着手した。



Figure 3. Principles of ligand binding assay based on fluorescent polarization method (A) and fluorescent intensity method (B).

当研究室では PPAR リガンドの合成研究を行っている。当研究室の PPAR リガ ンドは(株)杏林製薬(現キョーリン製薬ホールディングス(株))にて創製されたチ アゾリジンジオン骨格を有する PPARα/γ デュアルアゴニスト KRP-297 (1)をリー ド化合物としている(Figure 4)。1 の PPARα 活性を向上させ PPARγ 活性を低減さ せる構造展開により,フェニルプロピオン酸骨格を有する PPARα 選択的アゴニ スト KCL (2)が見出された⁴³。KCL から PPARδ 活性の獲得を指向し PPARα/δ デ ュアルアゴニスト TIPP-401 (**3**)が見出され ⁴⁴, 更に PPARδ 活性を向上させ PPARa 活性を低減させた TIPP-204 (**4**)が合成された ⁴⁵。また PPAR γ アゴニストの合成を 指向し PPAR $\alpha/\gamma/\delta$ パンアゴニスト TIPP-703(**5**)が見出され ⁴⁶, そこから PPAR γ 選 択的アゴニスト MEKT-1 (**6**)を見出した ⁴⁷。

本論文第1章では3を基にしたより高活性な PPARa 選択的アゴニストの合成 と非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の進展に対する抑制効果について述べる⁴⁸。 第2章では3を基にした蛍光性 PPARa/δ アゴニストの合成と PPARa/δ に対する 二面的な蛍光特性について述べる⁴⁹。第3章では第2章で合成した蛍光性 PPARa/δ アゴニストを用いた蛍光強度法に基づくリガンド結合評価系の構築に ついて述べる。第4章では結合評価系構築の一環として合成した PPARδ アンタ ゴニストに認められた HCV RNA 複製抑制活性について述べる⁵⁰。



Figure 4. Structure development of phenylpropionate type PPAR agonist.

第1章 PPARa 選択的アゴニストの合成と

その非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)進展抑制活性

KCL(2)は PPARα 選択的アゴニストであるがその後の PPAR リガンドの構造情報からより高活性な PPARα 選択的アゴニストが得られる可能性が示唆された。本章では構造情報に基づいた PPARα 選択的アゴニストの合成について記す。また,代表的な化合物について非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)に対する進展抑制効果も評価したので併せて記す。

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は肝の炎症,線維化を経て最終的には肝 硬変,肝細胞癌を発症する進行性の病変である。NASH は病態がアルコール性 肝炎 (ASH) に似ているが,アルコールを摂取しなくても発症する。NASH は脂 肪肝より進展する疾患であり,近年メタボリックシンドロームを背景としてそ の動向が注目されている^{51,52}。 日本国内では少なくとも成人の約 1%が NASH であると推定されており,NASH 患者の約 50%がメタボリックシンドロームを 合併している ⁵³⁻⁵⁵。PPARα ノックアウトマウスにメチオニン・コリン欠乏食を 与えると,NASH の病態が野生株もマウスよりも悪化することや⁵⁶, PPARα ア ゴニストの投与によってメチオニン・コリン欠乏食による NASH の病態を改善 することなどから PPARα の活性化は NASH に対し抑制的に作用している ⁵⁷。 従って PPARα アゴニストは NASH 治療に対する治療的有効性を有している。

著者は PPARα/δ デュアルアゴニスト TIPP-401 (3)を基に PPARα 選択的アゴニ ストの合成を目的として研究に着手した。

6

1.1 デザイン

フェニルプロピオン酸構造を基本骨格として有する PPARα 選択的アゴニス トをデザインするために、著者はリード化合物として PPARα/δ デュアルアゴニ スト TIPP-401 (3) に着目した。PPAR & LBD に関しては、一部の塩基(265-270) が 欠損しているものの PPARδ LBD-3 の複合体 X 線構造解析に成功している (Figure 1. B, Figure 2. B)。PPARa LBD では 3 との複合体 X 線結晶構造は得られ ていないため PPARa LBD-5の複合体 X 線結晶構造のリガンド部分を3に置換 しドッキングモデルを作成した (Figure 1. A, Figure 2. A)⁵⁸。これら 2 つのモデ ルを比較した結果,3の疎水性末端部 (4-trifluoromethyl 基) が収納されている疎 水性ポケットにおいて、その形状に差異があることが判明した。3の疎水性末 端部周辺の疎水性空間を比較すると PPARδ LBD (Figure 2. B) と比較して PPARα LBD (Figure 2. A) の疎水性空間の方が大きい。このことから,著者は3 の疎水性末端部に PPARα LBD に対しては程よく,しかし PPARδ LBD に対し ては大きすぎる疎水性置換基を導入することで、3 と比較して PPARα LBD に 対する親和性が向上し、逆に PPAR LBD に対する親和性が減弱し、その結果 PPARα 選択的なアゴニストを得ることができると考えた。この作業仮説に基づ き、著者は疎水性末端部に種々の嵩高い置換基を導入した化合物を合成した。



Figure 1.1 Molecular modeling structures of PPAR LBD–**3** complexes. (A) PPARα LBD–**3** complex model (using PPARα LBD structure (PDB 2znn)); (B) PPARδ LBD–**3** complex model (amino acid residues other than 265 to 270 are taken from our previous X-ray data (PDB 2znp)).



Figure 1.2 Zoomed view of the ligand-binding domain near trifluoromethyl group of 3.(A) PPARα LBD–3 complex model; (B) PPARδ LBD–3 complex model.

1.2 合成及び転写活性化試験

ラセミ体の転写活性化能

当研究室の新谷が3の疎水性末端部を置換した化合物をラセミ体にて合成し た(7a-k, Figure 3)。転写活性化試験の結果を Table 1 に示す。末端のベンゼン環 の4位により嵩高い置換基を導入していくほど、すなわち 7a < 7b < 7c < 7fの 順に PPARα アゴニスト活性が向上した。PPARδ 活性は, 7a < 7b < 8c と 4 位 に嵩高い置換基を導入するほど活性が上昇したが 7f や 7i 程度の嵩高さにな ると若干の活性の低下が確認された。PPARy は、いずれの化合物も活性がない かもしくは弱いアゴニスト活性となった。またいずれのサブタイプについても 末端ベンゼン環の 2 位 (7d, 7g) < 3 位 (7e, 7h) < 4 位 (7f, 7i)の順で活性が高 かった。7iの環のリンカーの長さを延長した化合物 (7j, 7k) では活性が低下す る結果となった。著者はより合成が簡便で誘導体を作りやすい 7iの 4-フェノキ シベンズアミド構造に着目し S 選択的な合成を行うことにした。α-エチルフェ ニルプロピオン酸のシリーズは S体の方が R体よりも PPAR に対して高活性 であることがこれまでの研究により判明している43。しかしながら、無置換フェ ノキシ基は一般に4位が代謝されて水酸化されてしまうことが知られている。 そのため PPAR リガンドの疎水性の高さが活性に相関することを考えると、水 酸基が導入されることで活性が減弱することが予測される。著者はこの問題を 回避するとともに、活性のさらなる向上を期待してフェノキシ基の 4 位に種々 のハロゲンを導入した誘導体を合成した。



Figure 1.3 Structure of the compounds (7a-7k) prepared in this study.

			EC ₅₀ (nmol/L)			
Compd. No.	R	Stereo	PPARα	ΡΡΑRδ	PPARγ	
7a		rac	1,700	8,100	>10,000	
7b	H ₃ C	rac	100	360	9,600	
7c	F ₃ C.	rac	12	110	4,400	
7d		rac	3,600	>10,000	>10,000	
7e		rac	74	4,100	710	
7f		rac	7.6	210	340	
7g		rac	3,600	>10,000	>10,000	
7h		rac	41	4,800	4,600	
7i	\bigcirc	rac	8.8	120	820	
7j		rac	52	1,400	460	
7k		rac	60	1,400	780	

Table 1.1 PPAR transcriptional activity of the compounds.

Compounds were screened for agonist activity towards PPAR-GAL4 chimeric receptors in transiently transfected HEK-293 cells as described. The EC_{50} value is the molar concentration of the test compound that affords 50% of the maximal reporter activity. "rac" means racemic compound.

S 体の合成

4-(4-クロロフェノキシ)ベンズアミド体と 4-(4-ブロモフェノキシ)ベンズアミ ド体は既知の方法に従って合成した (Scheme 1.1, 1.2)⁴⁶。4-Formylsalicylic acid 9 を出発原料とし 10 工程で合成した。不斉点構築に用いる 9 は(*R*)-4-benzyl-2oxazolidinone (8) を butyryl chloride と反応させ合成した。 10 は potassium hydrogen carbonate 存在下カルボキシ基をベンジル基で保護して 11 を得た。11 は potassium carbonate 存在下 iodomethane と反応させ 12 を得た。12 は sodium tetrahydroborate により還元し 13 を得た。13 を phosphorus tribromide により臭 素化しブロモメチル体 14 を得た。ここで 9 と lithium hexamethyldisilazide を用 いた Evans の不斉アルキル化反応によりカルボニル基の α 位不斉炭素の立体 が *S* 体である 15 を得た⁵⁹。15 は Pd-C を用いた水素化分解によりベンジル基 を脱保護しカルボン酸 16 とした。16 は borane によって還元し, 続いて pyridinium dichromate により酸化しアルデヒド 18 を得た。18 は 4-(4substituted)phenoxy benzamide とのアミドアルキル化により 19a, b を得た⁶⁰。 不斉補助基を加水分解して目的の化合物 20a, b を得た。総収率はおよそ 5% で あった。



Scheme 1.1 Synthesis of the chiral auxiliary.



Scheme 1.2 Synthesis of 20a, b.

4 位にフッ素を導入した化合物についてはより短工程の経路による合成を検 討した。(Scheme 1.3)。4-Methoxybenzylalcohol (21) を出発原料とし 7 工程で合 成した。21 は phosphorus tribromide によってブロモ化し 22 とした。22 は 9 を 用いた Evans の不斉アルキル化反応により 23 とした。23 は lithium hydroperoxide により加水分解し, chlorotrimethylsilane によりメチルエステル 25 とした⁶¹。25 を titanium tetrachloride 存在下 dichloromethyl methyl ether で処理しアルデヒド 体 26 を得た。26 と 4-(4-fluoro)phenoxy benzamide のアミドアルキル化により 27 を得た。27 を酸性条件下加水分解し目的の化合物 28 を得た。総収率は約 40% でありこれまでの方法より大幅に改善された。



Scheme 1.3 Synthesis of 28.

S 体の転写活性化能

転写活性化試験の結果を Table 2 に示す。転写活性化試験の結果, PPARα, PPARδ ともにフェノキシ基の 4 位の置換基が Br (20b) < Cl (20a) < F (28) の順 で活性が増加した。PPARγ に関してはいずれの化合物においても弱いアゴニス ト活性であった。この結果はフェノキシ基の 4 位方向にはこれ以上の空間が無 いことを示唆している。PPARα 活性が最も高かった 28 と TIPP-401(3)を比較 すると PPARα 活性は 2 倍向上し, PPARδ 活性は 25 倍減弱し, PPARγ 活性 は低いままであった。フェノキシ基にハロゲンを導入することによって PPARα 活性はそれほど向上しなかったがサブタイプ選択性は向上した。28 は十分な PPARα 活性及びサブタイプ選択性を有すると判断し, *In vivo* での効果を検討す る化合物として選択した。



TIPP-401 (**3**)

28, 19a, 19b

Figure 1.3 Structure of TIPP-401 and the compounds prepared in this study.

		_	EC ₅₀ (nM)				
Compd. No.	Х	stereo	PPARα	$PPAR\delta$	ΡΡΑRγ		
TIPP-401 (3)	-	S	10	12	1,900		
28	F	S	5.0	300	920		
20a	Cl	S	15	580	830		
20b	Br	S	29	800	990		

Table 1.2 Potency of the compounds

Compounds were screened for agonist activity towards PPAR-GAL4 chimeric receptors in transiently transfected HEK-293 cells as described. The EC_{50} value is the molar concentration of the test compound that affords 50% of the maximal reporter activity.

1.3 NASH 進展抑制評価

先に得られた 28 の NASH の進行に対する抑制効果を岡山大学大学院医歯薬 学総合研究科 高山房子 准教授の研究グループに依頼して評価していただいた。 以下その結果の詳細について述べる。

実験プロトコール

第1章で合成した化合物の in vivo での効果を評価するために化合物 28 を NASH モデルマウス^{62,63}に投与し NASH の進行に対する抑制効果を評価した。 動物は C57BL/c 系雄性マウス (6 週齡)を使用し, Control 群, CDHF 群, NASH 群, 28 投与群に分けた (Figure 1.4)。Control 群には通常飼料を, その他の群に はコリン欠乏高脂肪飼料 (CDHF)を10 週間与えた。NASH マウスは CDHF を 4 週間与え脂肪肝を形成させた後, 6 週間反復性・間欠的酸化ストレスを負荷す るため亜硝酸ナトリウムを投与し作製した。実験的飼育期間終了後, 開腹し障害 評価試料として血液, 肝臓を採取し生化学的, 病理組織学的検討を行った。



Figure 1.4 *In vivo* experimental protocol. NC: normal chow; CDHF: choline deficient high-fat diet; OS: oxidative stress (sodium nitrite)

肝臓の肉眼的所見

NASH 群の肝臓は、固く萎縮しており、肝臓表面に多数の結節が観察された (Figure 1.5)。CDHF 群においては、NASH 群で観察された肝萎縮や結節は認め られなかったが、Control群と比較して肝肥大が認められた。28 投与群は NASH 群と比較して結節の形成は抑制されていた。



Figure 1.5 liver of mice. (A) Control; (B) CDHF; (C) NASH; (D) NASH + 28.

病理組織学的所見

hematoxylin eosin 染色

肝組織の構造の比較検討を行うため肝切片に hematoxylin eosin 染色を施した (Figure 1.6)。Control 群と比較して NASH 群と CDHF 群では肝細胞が大きくな っており, 肝細胞の高度な脂肪化が認められた。また NASH 群と比べて 28 投 与群では脂肪化の進行は軽減されていた。



Figure 1.6 Histological evaluation of mouse liver. Effects of **28** on liver were assessed by hematoxylin eosin staining in Control (A), CDHF (B), NASH (C), NASH + **28** 1mg/kg/day (D) mice. Data show typical results. Scale bar = 500 µm.

Masson trichrome 染色

肝線維化について比較検討を行うため肝切片に Masson trichrome 染色を施し た(Figure 1.7)。Control 群と比較して NASH 群では高度な大滴性の脂肪化及び 線維化像を呈しており, CDHF 群においては肝細胞の高度な脂肪化が認められ たが,線維化所見はほとんど認められなかった。一方,28 投与群では,CDHF 群同様に大滴性の脂肪が認められたが,NASH 群と比べて線維化の進行は軽減 されていた。



fibrosis

Figure 1.7 Effects of **28** on liver fibrosis were examined by Masson Trichrome staining in control (A), CDHF (B), NASH (C), NASH + **28** 1mg/kg/day (D) mice. Data show typical results. Scale bar = 500 μm.

生化学的所見

肝機能障害の程度を比較検討するために,肝機能障害のマーカーであるアラ ニンアミノトランスフェラーゼ (ALT),アスパラギン酸アミノトランスフェラ ーゼ (AST)及びアルカリフォスファターゼ (ALP)の血中への逸脱を測定する ことで NASH 群に対する 28 投与の評価を行った⁶⁴。

血中 ALT 活性

血中 ALT 活性の測定結果を Figure 1.8 に示す。血中 ALT 活性は Control 群 と比較して NASH 群と CDHF 群で増大していたが, 28 投与群では NASH 群 と比較して有意に低下した。



Figure 1.8 Effect of **28** for plasma ALT activity of Control, CDHF, NASH and NASH + **28** 1mg/kg/day groups. Each value denotes the mean \pm S.E.M. for 4-12 mice. ***p*<0.01, compared with control. ##*p*<0.01, compared with NASH. Assessed by Tukey's test.

血中 AST 活性

血中 AST 活性の測定結果を Figure 1.9 に示す。血中 AST 活性は、コントロ ール群に比べて、NASH 群と CDHF 群で増大していたが、28 投与群では NASH 群と比較して有意に低下した。



Figure 1.9 Effect of **28** for plasma AST activity of Control, CDHF, NASH and NASH + **28** 1mg/kg/day groups. Each value denotes the mean \pm S.E.M. for 4-12 mice. ***p*<0.01, compared with control. ##*p*<0.01, compared with NASH. Assessed by Tukey's test.

血中 ALP 活性

血中 ALP 活性の測定結果を Figure 1.10 に示す。血中 ALP 活性は、コント ロール群と比較して、NASH 群と CDHF 群で増大していたが、28 投与群では NASH 群と比較して有意に低下した。



Figure 1.10 Effect of **28** for plasma ALT activity of Control, CDHF, NASH and NASH + **28** 1mg/kg/day groups. Each value denotes the mean \pm S.E.M. for 4-12 mice. ***p*<0.01, compared with control. ##*p*<0.01, compared with NASH. Assessed by Tukey's test.

以上の結果から, 肝臓の肉眼的変化においては, NASH マウスで惹起される肝 表面の凹凸が, 28 投与により軽減されており, 表面の凹凸で明瞭に示される肝 線維化による結節形成に対する軽減作用から, 肝線維化進行に対する改善効果 が確認された。次に肝臓の病理組織学的変化においては, 肝切片の hematoxylin eosin 染色標本や膠原繊維を青く染める Masson trichrome 染色標本から, CDHF および NASH マウスでは, 肝細胞に取込まれた大脂肪が白く観察され, NASH マウス肝標本において青染色領域が顕在化し、線維化の進行が明らかと なっていた。28 投与により、青染色領域の大きさは縮小し、大脂肪滴の蓄積も 軽減した。最後に肝機能障害の血液生化学的マーカーにおいては全ての肝障害 マーカーの血清中活性は、Control 群と比較して NASH 群で有意に上昇してい た(AST, ALT, ALP)。NASH マウスへの 28 投与は、NASH におけるこれら血清 中活性上昇を有意に低下させた。これらより、肝、胆道にわたる障害が軽減され ていることが確認された。 PPARα 選択的アゴニスト 28 が NASH の進行を抑 制していることを確認した。

1.4. 小括

著者は新規 PPARa 選択的アゴニストの合成を目的として研究に着手した。 まずリード化合物としてフェニルプロピオン酸型 PPARa/δ 選択的アゴニスト 3 に着目し PPARa LBD-3 複合体及び PPARδ LBD-3 複合体モデルをコンピュー タを用いて作成し両者を比較した。その結果,3の疎水性末端部により嵩高い置 換基を導入することで PPARa 選択的アゴニストを得ることができるという仮 説を得た。この仮説に基づき,3の疎水性末端部に種々の嵩高い置換基を導入し た化合物を合成した。転写活性化試験の結果,疎水性末端部に 4-(4fluorophenoxy)benzamide 構造を有する化合物 28 が最も良好な PPARa 活性及 びサブタイプ選択性を示した。以上のことから,著者は新規フェニルプロピオン 酸型 PPARa 選択アゴニストを構造情報に基づき創製することに成功した。次 に合成した PPARa 選択的アゴニスト 28 を NASH モデルマウスに投与し, NASH の進行に対する抑制効果を評価した。その結果,肝臓の病理組織学的所 見及び生化学的所見において 28 の NASH の進行に対する抑制効果を確認し た。

第2章 ピレン環を有する PPARa/ô デュアルアゴニストの 二面的蛍光特性

蛍光プローブは一般に周囲の極性によって蛍光強度が変化する。PPAR 結合 時・非結合時に蛍光強度のコントラストを得るためには,PPAR 結合時にプロー ブの蛍光団が疎水性である PPAR のリガンド結合ポケット内部に収まっていな ければならない。そこで上記の条件を満たす PPAR リガンドの合成を目的とし て研究に着手した。本章ではまず当研究室のフェニルプロピオン酸型 PPAR リ ガンドを基にした,PPAR 結合時に蛍光団が PPAR リガンド結合ポケット内部に 収まる蛍光性 PPAR リガンドへの展開について述べる。次に合成した蛍光性 PPARa/δ リガンドがプローブとして機能するか確認するために PPARa LBD 及び PPARδ LBD 溶液を滴定し蛍光プローブの蛍光強度変化を測定する実験を行った ところ PPARa と PPARδ とで逆の変化が認められるという珍しい現象が観察さ れたため、その理由を考察・検証した結果について述べる。

2.1 蛍光性 PPAR リガンドの合成

当研究室で見出されたフェニルプロピオン酸型 PPARα/δ デュアルアゴニスト TIPP-401 (3)は PPARδ LBD との複合体 X 線結晶構造(PDB code : 2ZNQ)が得られ ている(Figure 2.1)。この構造より 3 の疎水性末端部がリガンド結合ポケット内 部に収まり,また周辺は平面的な空間である。このことから当研究室の新谷は 3 の疎水性末端部を平面的な蛍光団に置換した化合物を合成している(29a-g) (Figure 2.1 B, 2.2)。転写活性化試験の結果 PPARα 活性を保持した化合物(29a-d, f), PPARδ 活性を保持した化合物(29a, c, f)が得られた。また 29g のような嵩高く 平面的でない置換基では PPAR 活性は失われた。新谷はピレン環を有する 29f の S 体を用いて蛍光偏光法に基づく PPARα, δ リガンド結合実験系を報告している ⁶⁵。著者は 29f の S 体の合成を行い蛍光強度法に基づく結合実験系の構築を検討 した。



Figure 2.1 (A) The structure of PPARδ-**3** complex; (B) The structure of **3** and the strategy for synthesizing fluorescent PPAR ligand.

Table 1.1 Transcriptional activity of 29a-29g.

Р Н СО 29а-д ОН											
	EC ₅₀ (nmol/L)							EC ₅₀ (nmol/L)			
Compd. No.	R	PPARα	PPARδ	PPARγ	Cor	mpd. Jo.	R	PPARα	PPARδ	PPARγ	
29a		' 12	130	4400	296	e(7d)		3600	i.a.	i.a.	
29b	Q	180	2600	7500	2	9f	W.	24	66	i.a.	
29c(7f)		6.2	210	320	2	9g		i.a.	i.a.	i.a.	
29d(7e)		5 71	3300	7000							

Compounds were screened for agonist activity towards PPAR-GAL4 chimeric receptors in transiently transfected HEK-293 cells as described. The EC_{50} value is the molar concentration of the test compound that affords 50% of the maximal reporter activity. "i.a." means inactive at the concentration of 10 μ mol/L.

第1章の Scheme 1.2 よりも短経路で合成を行った(Scheme 2.2)。ピレンの導入 に用いる 31 は 1-pyrenecarboxylic acid (30) をアミドに変換して得た(Scheme 2.1)。 23 の合成までは Scheme 1.2 と共通である。23 をホルミル化により 32 とし 31 と 還元的 *N*-アルキル化反応により 33 とした。最後に不斉補助基を外し目的の化合 物 34 とした。主要ルートは 5 工程であり,第1章 Scheme 1.2 より短工程化に成 功したが,総収率は 30% あり, 28 の合成より少なくなった。



Scheme 2.1 Synthesis of benzamide 31.



Scheme 2.2 Synthesis of benzamide 34.

2.2 PPARa LBD, PPARo LBD 結合実験

まず **34** の励起極大波長と蛍光極大波長を調べた。2 μmol/L の **34** のエタノー ル溶液について励起蛍光マトリクス(EEM)を測定した(Figure 2.2)。その結果励起 極大波長は 340-345 nm, 蛍光極大波長は約 380-400 nm であった。尚 Figure 2.2 において直線状に見える部分は光源の光である。この結果を基に更に詳細なス ペクトル測定を行った(Figure 2.3)。その結果,本条件下での励起極大波長は 343 nm, 蛍光極大波長は 386 nm であった。



Figure 2.2 The excitation-emission matrix (EEM) fluorescence spectrum of 34.



Figure 2.3 Excitation and emission spectra of **34**. blue line : excitation spectrum; red line : emission spectrum. The maximum intensity sets 100%.

次に 34 が PPARα または PPARδ との結合時に蛍光強度が変化するかどうかを 確認するために 500 nmol/L の 34 溶液に PPARα LBD 溶液及び PPARδ LBD 溶液 を加えていき, 蛍光スペクトルを測定した。測定の結果, PPARα LBD では PPARα LBD 濃度依存的に蛍光強度が増強した(Figure 2.4)。一方, PPARδ LBD では逆に PPARδ LBD 濃度依存的に蛍光強度が減弱することが判明した(Figure 2.5)。前述 の通り, 蛍光プローブがタンパク質の疎水性部分に結合すると一般に蛍光強度 が増強する。このことから PPARα LBD は予想通りの結果となったが, PPARδ LBD での結果は予想とは異なる珍しい現象である。この結果を無視して結合実 験を行うことはできないため, 著者は PPARδ LBD で観察された蛍光強度減弱の 理由について考察及び検証を行った。



Figure 2.4 (A) Fluorescence spectra of 500 nmol/L of **34** during cumulative addition of hPPARα LBD. Excitation wavelength was 345 nm. (B) Fluorescence intensity of (A) at 386 nm.



Figure 2.5 (A) Fluorescence spectra of 500 nmol/L of **34** during cumulative addition of hPPARδ LBD. Excitation wavelength was 345 nm. (B) Fluorescence intensity of (A) at 386 nm.

2.3 X線結晶構造及びドッキングモデルに基づいた考察

PPARα LBD-**34** 複合体(PDB code: 3VI8)⁶⁶ 及び PPARδ LBD-**3** 複合体(PDB code: 2ZNQ)の X 線結晶構造を用いて考察した(Figure 2.6 A-D)。複合体構造の疎水性 末端部の周囲を比較すると, PPARα LBD では **34** の疎水性末端部の周囲にはバ リン, ロイシン, イソロイシンといった疎水性アミノ酸に囲まれている。一方, PPARδ LBD では, **3** の疎水性末端部近傍に蛍光性アミノ酸であるトリプトファ ンが存在することが示唆された。PPAR δ LBD のアミノ酸配列より Trp264 及び Trp256 が疎水性末端部周辺に存在する可能性が考えられた(Figure 2.6 E)。



Figure 2.6 (A) hPPAR α LBD–**34** complex. Protein is represented as a brown ribbon model and the ligand is depicted as a cylinder model. (B) Zoomed view of the binding mode of the hydrophobic pyrene moiety of **34** in hPPAR α LBD–**34** complex. The surrounding amino acids are depicted as magenta cylinder models. (C) hPPAR δ LBD–**3** complex. Protein is represented as a brown ribbon model and the ligand is depicted as a cylinder model. (D) Zoomed view of the binding mode of the hydrophobic 4-trifluorophenyl moiety of **3** in the hPPAR δ LBD–1 complex. The surrounding amino acids are depicted as magenta cylinder. The surrounding amino acids are depicted as a brown ribbon model and the ligand is depicted as a cylinder model. (D) Zoomed view of the binding mode of the hydrophobic 4-trifluorophenyl moiety of **3** in the hPPAR δ LBD–1 complex. The surrounding amino acids are depicted as magenta cylinder models. (E) Primary and secondary structures of hPPAR δ LBD. Helical regions are shown as yellow cylinders. Two tryptophan residues are circled in red.
次に PPARδ LBDX 線結晶構造と 34 のドッキングモデルを構築した(Figure 2.7, ソフトウェアは Molecular Operating Environment (MOE)を,ドッキングアルゴリ ズムは ASEDock を使用⁶⁷)。この複合体モデルからも疎水性末端部であるピレン の近傍に Trp264,少し離れた位置に Trp256 が存在することが示唆された。トリ プトファンは他の蛍光団の蛍光を消光することが知られており⁶⁸, PPARδ LBD 結合時の 34 の蛍光減弱の理由としてトリプトファンによる 34 のピレン環の消 光が考えられた。これを検証するために各種点変異 PPAR を用いて実験を計画 した。



Figure 2.7 Docking model of **34** in the ligand-binding pocket of PPARδ LBD (PDB code : 2ZNQ). The distances between pyrene and indoles of Trp256 or Trp264 are represented.

2.4 点変異 PPAR による結合実験

PPARδ LBD の Trp256 を Ala に, Trp264 を Ala もしくは Leu に変異させたミ ュータント PPARδ を, PPARα LBD の Leu258 を Trp に変異したミュータント PPARα を作成し 34 との結合実験を行った。ミュータント PPAR の作成は共同研 究者の山梨大学生命環境学部 大山拓次助教に御担当いただき恵与されたもの を使用した。

野生型 PPARα LBD, PPARδ LBD を用いた場合の実験と同様の方法で,点変異 PPAR を加えた時の 34 の蛍光スペクトル変化を測定した。PPARδ LBD W256A で は濃度依存的に蛍光強度が減弱した(Figure 2.8)。これは野生型の PPARδ LBD と 同じ挙動である。このことから PPARδ LBD の Trp256 は 34 の蛍光強度の減弱に 関与していないか,若しくは関与していたとしてもその影響は極めて小さいと 考えられる。一方, PPARδ LBD W264A では濃度依存的に蛍光強度が増強した (Figure 2.9)。これは野生型 PPARδ LBD とは逆の挙動であり,本来予想された一 般的なタンパク質と蛍光プローブとでの挙動に合致する結果である。このこと から PPARδ LBD の Trp264 が 34 の蛍光強度の減弱に関与していることが判明し た。PPARδ LBD W264L においても PPARδ W264A と同様に濃度依存的に蛍光強 度が増強した(Figure 2.10)。この結果も 34 の蛍光減弱に Trp264 が関与している ことを裏付けている。

34



Figure 2.8 (A) Fluorescence spectra of 500 nmol/L of **34** during cumulative addition of hPPARδ LBD W256A. Excitation wavelength was 345 nm. (B) Fluorescence intensity of (A) at 386 nm.



Figure 2.9 (A) Fluorescence spectra of 500 nmol/L of **34** during cumulative addition of hPPARδ LBD W264A. Excitation wavelength was 345 nm. (B) Fluorescence intensity of (A) at 386 nm.



Figure 2.10 (A) Fluorescence spectra of 500 nmol/L of **34** during cumulative addition of hPPARδ LBD W264L. Excitation wavelength was 345 nm. (B) Fluorescence intensity of (A) at 386 nm.

PPARα LBD L258W では Em = 386 (nm)においてはわずかに増強, Em = 397 (nm) ではわずかに減弱, Em = 392 (nm)ではほとんど変化せず,全体的に見て大きな 変化は認められなかった(Figure 2.11)。これは PPARδ 程ではないが 34 がトリプ トファンの影響を受けていることを示している。

PPARα LBD L258W と 34 のドッキングによる解析を行った。PPARα LBD L258W は PPARα LBD の X 線結晶構造の 258 番のロイシンをトリプトファンに 置換し最適化計算をした後に 34 とのドッキング計算を行った(Figure 2.12)。ド ッキングの結果 PPARα LBD L258W の 258 番のトリプトファンと 34 のピレン環 は PPARδ の Trp264 よりは距離が離れており Trp256 よりは近くに存在すること が示唆された。これは蛍光強度実験の結果に合致するものであった。



Figure 2.11 (A) Fluorescence spectra of 500 nmol/L of **34** during cumulative addition of hPPARα LBD L258W. Excitation wavelength was 345 nm. (B) Fluorescence intensity of (A) at 386 nm (blue), 392 nm (red) and 397 nm (green).



Figure 2.12 Docking model of **34** in the ligand-binding pocket of PPARα LBD L258W. The distance between pyrene and indole of Trp258 is represented.

蛍光分子の動的な消光機構は大きく分けてフェルスター機構とデクスター機 構が存在する⁶⁹。またピレンを有する34では励起会合体(Exciplex,エキシプレ ックス)の形成による消光も起こりうる。また光誘起電子移動(PET)による消光も 考えられる。フェルスター機構は双極子相互作用に基づくエネルギー移動であ りドナー分子が励起状態から基底状態に戻る際の電子遷移とアクセプター分子 が基底状態から励起状態に移る際の電子遷移が許容である場合に起こる。本研 究では34のピレンとトリプトファンはその関係にないためフェルスター機構に よる消光の可能性は否定される。またエキシプレックスが形成された場合、ピレ ンでは 500 nm 付近に会合体由来の蛍光が観察されるはずであるが本実験では観 察されていない。デクスター機構は分子の衝突による電子交換に基づいた消光 機構である。デクスター機構は 3-10A以内の近距離で起こるとされており、こ れはドッキングの結果と合致している³⁴。しかしデクスター機構による消光の 場合,エネルギーの移動によってトリプトファンから蛍光が放出される。トリプ トファンの蛍光は 340 nm 付近で観察されるため本実験結果では、その有無を断 言することはできない。PET による消光は分子の励起により空となった HOMO に電子が流れこむことにより起こる。トリプトファンは酸化ポテンシャルが高 く電子を放出しやすいため電子交換が起こりやすい。実際トリプトファンのPET による蛍光の消光が報告されているが、本研究結果のみでは PET の関与を直接 的に証明することはできない^{68,70-73}。しかし現時点の結果だけでも Trp264 の関 与は明らかであり蛍光の減弱が意味のある挙動であることは確認できた。

38

1.5 小括

著者は蛍光性 PPARα/δ デュアルアゴニスト 34 を用いて蛍光強度法に基づいた PPAR リガンド結合実験系構築を目的として, 34 の蛍光強度が PPARα LBD 及び PPARδ LBD 結合時に変化するかどうかを調べた。その結果, PPARα LBD では PPARα LBD 濃度依存的に蛍光強度が増強したのに対し, PPARδ LBD では逆に PPARδ LBD 濃度依存的に蛍光強度が減弱するという珍しい現象が観察された。 そこでその理由を明らかにするために複合体 X 線結晶構造やドッキング解析を 踏まえた考察を行った。その結果, PPARδ LBD では 34 のピレン環近傍にトリプ トファンが存在し, トリプトファンとの相互作用によってピレンが消光してい る可能性が示唆された。そこで点変異 PPARLBD を用いて 34 の蛍光強度変化を 調べたところ Trp264 をアラニンもしくはロイシンに置換した点変異 PPARδ LBD において, PPARδ LBD 濃度依存的に蛍光強度が増強した。このことから PPARδ LBD 結合時における 34 の蛍光強度減弱の理由として Trp264 が 34 のピレン環の 蛍光を消光していることを明らかにした。

第3章 PPARa, δ 結合実験系構築

第2章において蛍光性 PPARα/δアゴニストを合成した。また、PPARα LBD と PPARδ LBD をプローブ溶液に添加した時、PPAR 濃度依存的に蛍光強度が変化 することも確認した。しかしながら、蛍光プローブが PPAR リガンドと競合し、 蛍光のコントラストを得ることができるかどうかは不明である。特に PPARδ に おいては従来の蛍光強度法による蛍光プローブ周囲の極性の変化に基づいた蛍 光強度変化ではなく、PPARδ のリガンド結合ポケット内部のトリプトファンに よる、プローブの蛍光の消光に基づいた蛍光強度変化が起きているため、この珍 しい現象を用いたリガンド結合評価が可能であるかどうかを検討する意義は大 きい。そこで著者は第2章で合成した蛍光プローブを用いて PPARα 及び PPARδ のリガンド結合実験系を構築することを目的として本研究に着手した。本章で はまず結合実験を行うための基礎検討を行った、次に蛍光プローブと PPARα LBD 及び PPARδ LBD の解離定数 Kd を算出し、実際の PPAR リガンドを用いた IC₅₀及び阻害定数 Ki の算出について述べる。

3.1 結合実験系構築のための基礎検討

溶媒

タンパク質の保存にはグリセロールバッファーが広く使用されており,著者 が使用する PPAR LBD もグリセロールバッファー溶液として保存している。従 って希釈に使用する溶媒もグリセロールバッファーとした。

内部遮蔽効果

高濃度の溶液になると励起光がセルの液表層で吸収されすぎ、奥まで届かないことがある。これを内部遮蔽効果といい、検出される蛍光は弱くなってしまう⁶⁹。34 の内部遮蔽効果を調べるために 0.1-100 µmol/L 34 溶液を調製し蛍光強度を測定した(Figure 3.1)。測定の結果、約 20 µmol/L から検量線からのずれが観察された。これは 20 µmol/L の辺りから内部遮蔽効果の影響が無視できなくなっていることを意味している。従って 34 の濃度は 10 µmol/L 以下に設定する必要があることを確認した。



Figure 3.1 (A) Fluorescence spectra of 0.1-100 μmol/L of **34** (B) Fluorescence intensity of (A) at 386 nm.

エキシマーの有無

ピレンはエキシマーという二量体を形成することが知られている。分子間で のエキシマーはかなり高濃度の溶液でなければ普通観察されないが,もし実際 のアッセイに用いる溶液濃度においてエキシマーが形成されるようであれば, 390 nm 付近の蛍光に消光が起こりアッセイにおける蛍光強度の増減に影響を与 えることになる。そこで 10 µmol/L の 34 溶液の蛍光強度を測定しエキシマーの 有無を調べた(Figure 3.2)。ピレンのエキシマー由来の蛍光は 490 nm 付近に現れ る⁷⁴。測定の結果,10 µmol/L の濃度においてエキシマー由来の蛍光は観察され なかった。従って 10 µmol/L 以下の濃度においてエキシマーは形成されていない と判断した。



Figure 3.2 Fluorescence spectra of 10 μ mol/L of 34. The excimer signal is not appeared.

3.2 K_d, K_iの計算

ICsoと結合親和性は競合するプローブとの間では関連しているが、ICsoは親 和性を示す直接的な指標ではなくプローブの種類・濃度に依存して変化する。 一方のK_iは結合親和性を示す直接的・絶対的な値である。従って結合親和性に ついて議論する際、より普遍的な指標としてK_i値を提示できることが望まし い。リガンドのK_iを算出するにはプローブの平衡解離定数K_dが必要となる。 放射性ラベルプローブを用いた実験ではタンパク質を一定としプローブの濃度 を変化させK_d値を求める。しかし蛍光プローブの場合B/F分離操作を行わな いため結合に伴わないプローブ濃度の増加による蛍光の増強が起こり、また濃 度の変化により内部遮蔽効果の影響も変化するので適切な実験手順とは言えな い。従って蛍光プローブを用いた結合実験系におけるK_d値の算出に当たって は蛍光プローブの濃度を一定にし、タンパク質濃度を変化させることによって K_d値を求める必要がある。一般にリガンドとタンパク質が式(1)のような平衡状 態にある時、K_dは式(2)のように表される。

$L + R \rightleftarrows LR \tag{1}$

$$K_d = \frac{[L][R]}{[LR]} \tag{2}$$

ここで [L] は非結合状態のプローブ濃度, [R] は非結合状態のタンパク質濃度, [LR] は結合状態のタンパク質ープローブ複合体の濃度である。この式からプローブータンパク質結合における Kd は「全タンパク質の 50%とプローブが結合している時の結合していないプローブの量」となる。また式(2)よりリガンドとタンパク質は式中で対称の関係にある。このことから例えば「1 µmol/Lの濃度のタンパク質の 50%に応答する蛍光プローブの濃度」と「1 µmol/L の濃

度の蛍光プローブの 50%に応答するタンパク質の濃度」は同値となる。また B/F 分離を行わないため非結合型のプローブ濃度は直接測定できない。著者は より簡便に K_dを算出するために EC₅₀ 値より K_dを算出することにした。ここで の EC₅₀ は「全タンパク質の 50% とプローブが結合している時の全プローブ濃 度」である。定義より以下の式が成り立つ。

$$[L] + [LR] = [L_t]$$
(3)

$$[R] + [LR] = [R_t]$$
(4)

ここで[L₁]は全プローブ濃度, [R₁]は全タンパク質濃度である。またプローブの 50%が受容体と結合している時,以下の式が成り立つ。

$$[L] = [LR] \tag{5}$$

$$EC_{50} = [R_t] \tag{6}$$

この時,式(2)と式(5)より式(7)が,式(3)と式(5)より式(8)が,導かれる。

$$K_d = [R] \tag{7}$$
$$[LR] = \frac{1}{2} [L_t] \tag{8}$$

式(4)を[R]について整理し式(7)に代入して

$$K_d = [R_t] - [LR] \tag{9}$$

式(9)に式(6)及び式(8)を代入して

$$K_d = EC_{50} - \frac{1}{2}[L_t] \tag{10}$$

式(10)により最初に設定したプローブ濃度[L]及び測定より得られた 50%応答濃度 EC₅₀より K_dを求めることが出来る。

次に Ki 値は式(11)の Cheng-Prusoff 式によって表される。

$$K_{i} = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_{d}}}$$
(11)

ここで IC₅₀ はプローブの反応を 50%阻害するリガンド濃度である。[L]は設定し たプローブ濃度, タンパク質濃度における非結合状態のプローブ濃度であり B/F 分離を行わないので直接求めることはできない。従って他のパラメータを用い て[L]を求めた。式(3)を[LR]について整理して式(12)が得られ,式(3)及び式(4)よ り[LR]を消去し[R]について整理して式(13)が得られる。

$$[LR] = [L_t] - [L]$$
(12)

$$[R] = [R_t] - [L_t] + [L] (13)$$

式(12)及び式(13)を式(2)に代入して

$$K_d = \frac{[L]([R_t] - [L_t] + [L])}{[L_t] - [L]} \quad (14)$$

式(14)を[L]に関する2次関数として整理して

$$[L]^{2} + (K_{d} + [R_{t}] - [L_{t}])[L] - K_{d}[L_{t}] = 0$$
(15)

式(15)を[L]について解いて

$$[L] = \frac{[L_t] - [R_t] - K_d \pm \sqrt{(K_d + [R_t] - [L_t])^2 + 4K_d[L_t]}}{2}$$
(16)

ここでプラスマイナス記号の左側と右側の大小関係は次のようになる。

$[L_t] - [R_t] - K_d < \sqrt{(K_d + [R_t] - [L_t])^2 + 4K_d[L_t]}$ (17)

従って式(16)においてプラスマイナス記号の符号が負の場合, [L]の値は負になってしまうため不適である。よって式(16)のプラスマイナス記号の符号は正である。よって[L]を求める式は以下のようになる。

$$[L] = \frac{[L_t] - [R_t] - K_d + \sqrt{(K_d + [R_t] - [L_t])^2 + 4K_d[L_t]}}{2}$$
(18)

式(18)を用いて,予め求めたプローブの K_d及び設定した[L_t], [R_t]から[L]を求めることができ, [L], K_d, 測定から得られた IC₅₀ から Cheng-Prusoff 式(11)を用いて K_iを求めることができる。

3.3 PPARa に対する Kd 値の算出

34を1 μmol/L, PPARα LBD を 0.1-10 μmol/L とし蛍光強度を測定した(**Figure 3.3**)。Buffer は 20% glycerol buffer を使用した。各濃度につき 3 点測定を行いその 平均値をプロットした。以降の実験も同様である。測定の結果 **34** の蛍光強度は PPARα LBD 濃度依存的に増加した。統計ソフト GraphPad Prism で計算した結果 EC₅₀ = 1.06 (μmol/L)となり,式(10)より K_d = 0.56 (μmol/L)となった。



Figure 3.3 (A) Fluorescence spectra of **34** (1 μ mol/L) and PPAR α LBD (0.01-10 μ mol/L) solution. Ex = 345 nm. (B) Emission intensity at 386 nm.

3.4 PPARa リガンドの Ki 値の算出

34 の K_d値を用いて 3,及び当研究室で見出された PPARa 選択的アゴニスト 28,35 (Figure 2.4)の結合実験を行った。35 は当研究室の伴藤が合成した。34 の 濃度はリガンドの競合によってコントラストを観察できる濃度に設定しなくて はならない。Figure 3.3 より 34 の濃度は 1 µmol/L とした。PPARa LBD 1 µmol/L, 34 を 1 µmol/L, 3, 28, 35 を 0.1-100 µmol/L とし蛍光強度を測定した。測定の結 果,いずれの化合物も蛍光強度は濃度依存的に減弱した(Figure 2.5)。第 1 章で 示した X 線結晶構造より 34 は PPARa のリガンド結合ポケットと結合している ことが分かっている。従って 3, 28, 35 も PPARa 中の同じ部位に結合し, 34 と 競合していることを確認した。式(18)より[L] = 0.519 (µmol/L)である。IC₅₀ を GraphPad Prism で計算し,式(11)より K_iを求めた結果 3 は IC₅₀ = 1.81 (µmol/L), K_i = 0.939 (µmol/L), 28 は IC₅₀ = 0.936 (µmol/L), K_i = 0.485 (µmol/L), 35 は IC₅₀ = 3.04 (µmol/L), K_i = 1.57 (µmol/L)となった。レポータージーンアッセイによる EC₅₀ の値はそれぞれ 10 nmol/L, 0.31 nmol/L, 30 nmol/L であり活性の強弱の序列は一 致していた。



Figure 3.4 PPARα selective ligands.



Figure 3.5 Fluorescence spectra of 34 (1 μmol/L), PPARα LBD (1 μmol/L) and (A)
3 (0.1-100 μmol/L); (C) 28 (0.1-100 μmol/L); (E) 35 (0.1-100 μmol/L) solution.
Ex = 345 nm. Emission intensity of PPARα LBD and (B) 3; (D) 28; (F) 35 at 386 nm.

3.5 PPARδ に対する Kd 値の算出

34 について PPARα LBD の結合実験に関しては従来の蛍光強度法に基づく評価であるが、PPARδ LBD の結合実験はトリプトファンとの相互作用による消光に基づく評価となる。上田らはトリプトファンによる蛍光色素の消光に基づく免疫測定法を報告している⁷⁵。

PPARα と同様に PPARδ LBD についても **34** の K_d 値の算出を行った。PPARα で用いた濃度は測定に十分な蛍光の強さであったが,高価である PPARα LBD の 使用量が多かったため PPARδ ではより低濃度で実験を実施した。**34**を 0.1 μ mol/L, PPARδ LBD を 0.01-2.0 μ mol/L とし蛍光強度を測定した(**Figure 3.6**)。386 nm のピ ークでは蛍光の増減が小さいため 400 nm における蛍光強度をプロットした。3 回実験を行った結果, EC₅₀ = 0.159, K_d = 0.109 μ mol/L となった。



Figure 3.6 Fluorescence spectra of **34** (0.1 μ mol/L) and PPAR α LBD (0.01-2 μ mol/L) solution. Ex = 345 nm. (B) Emission intensity at 400 nm.

3.6 PPAR りガンドの K_i 値の算出

Figure 3.6の結果より PPARδ LBD 濃度及び **34**の濃度をそれぞれ 0.1 µmol/L, 0.4 µmol/L と設定した。**3** 及び PPARδ 選択的アゴニスト TIPP-204 (**4**) (**Figure 3.7**) の結合評価試験を行った(**Figure 3.8**)。測定の結果,リガンド濃度依存的に蛍光強 度が増加した。**3**,**4** は PPARδ LBD との複合体 X 線結晶構造が得られており, PPARδ のリガンド結合ポケットに結合することが明らかとなっている(**Figure 3.9**)⁵⁸。従って **34** も **3**,**4** と同様にリガンド結合ポケットに結合しており **3**,**4** が **34** と競合していることを確認した。式(18)より[L]=0.325 (µmol/L)となった。K_d の結果に対応させて 400 nm における蛍光強度で計算を行った。**3** は IC₅₀ = 1.20 (µmol/L), K_i = 0.301 (µmol/L),**4** は IC₅₀ = 0.224 (µmol/L), K_i = 0.0562 (µmol/L)と なった。レポータージーンアッセイにおける EC₅₀ はそれぞれ 12 nmol/L, 0.91 nmol/L であり強弱の序列は一致していた。



TIPP-204 (4)

Figure 3.7 The structure of TIPP-204 (4).



Figure 3.8 Fluorescence spectra of **34** (0.4 μ mol/L), PPAR δ LBD (0.1 μ mol/L) and (A) **3** (0.01-10 μ mol/L); (B) **4** (0.01-10 μ mol/L) solution. Emission intensity of PPAR δ LBD and (B) **3**; (D) **4** at 400 nm .



Figure 3.9 The structure of (A) PPARδ-**3** complex (PDB code : 2ZNQ); (B) PPARδ-**4** complex (PDB code : 2ZNP).

3.7 小括

34 を用いて蛍光強度変化に基づく PPARa, PPARδの結合実験系構築を検討し た。まず PPARα LBD を用いて結合実験を実施し Kd 値を算出した。次に **3**, PPARα 選択的アゴニスト 28.35 を用いて 34 との競合実験を実施した。その結果、リガ ンド濃度依存的に蛍光強度は減弱した。34はX線結晶構造解析よりPPARaLBD のリガンド結合ポケットに結合していることが明らかであることから3,28,35 も PPARα LBD のリガンド結合ポケットにおいて 34 と競合し結合実験系が機能 していることを確認した。また 34 と PPARα LBD の K_d 値, 及び 3, 28, 35 の IC50 値を用いてリガンドの Ki 値を求めることが出来た。このことから 34 を用い て PPARα リガンド結合評価系を構築することが出来た。また通常とは異なり34 結合時、トリプトファンによる消光によって蛍光強度が変化する PPAR& LBD を 用いて結合実験を実施し Kd 値を算出した。次に 3 及び PPARδ 選択的アゴニス ト4を用いて343との競合実験を実施した。その結果、リガンド濃度依存的に 蛍光強度は増強した。3及び4はX線結晶構造解析より PPARδLBD のリガンド 結合ポケットに結合していることが明らかとなっており、3、4は PPAR & LBD の リガンド結合ポケットにおいて 34 と競合し結合実験系が機能していることを確 認した。また **34** と PPARδ LBD の K_d 値,及び **3**,4 の IC₅₀ 値を用いてリガンドの Ki 値を求めることが出来た。トリプトファンによる消光によって蛍光強度が変 化する 34 と PPARδ LBD においてリガンド結合評価系を構築することができた。 以上より,著者はピレン環を有する PPARα/δ デュアルアゴニスト 34 を用いて蛍 光強度変化に基づく PPARα 及び PPARδ のリガンド結合評価系を構築すること に成功した。今後, サンプル数を増やし他の評価法との比較により, この方法の 実用性が高まることを期待する。

53

第4章 PPARδ 選択的アンタゴニストの合成と

その HCV RNA 複製抑制活性

PPARδ リガンド結合評価系の確立の一環として PPARδ アンタゴニストを合成 する必要があったが、これまでに PPARδ アンタゴニスト合成の報告は少ない。 この章では PPARδ 選択的アンタゴニストの合成と PPARδ アンタゴニストが HCV RNA 複製抑制活性を示すことを見出したので報告する。

C型肝炎ウイルス (hepatitis C virus, HCV) はフラビウイルス科へパシウイル ス属に分類される RNA ウイルスである。HCV に感染すると高確率で慢性肝炎 を発症し, 肝硬変, 肝細胞癌へと進展する。感染者数は日本国内に約 200 万人, 世界で約1億7,000万人と推定されている⁷⁶。C型肝炎の治療には現在, ペグイ ンターフェロンとリバビリンの併用療法が用いられている。しかしその持続性 ウイルス学著効 (SVR) は約 50%である⁷⁷。従ってより効果の高い薬剤が求めら れている。

2006 年 Rakic らが PPARα/γ アンタゴニストが HCV RNA の複製を抑制するこ とを報告している。またその作用が PPARα の転写抑制によるものであり PPARγ の転写抑制は HCV RNA 複製抑制に関与していないことも報告している¹⁴。し かし PPARδ のアンタゴニストと HCV RNA の複製抑制についてはこれまでに報 告が無かった。そこで著者は当研究室で見出された PPARδ アンタゴニスト及び その類縁体を合成しその HCV RNA 複製抑制活性について検討した。

4.1 合成

43a-cは既報に従い合成した(**Scheme 4.1, 4.2**)⁷⁸。4-Bromophenol (**38**)を出発原料 とし水酸基を iodobutane と反応させ **39** とした。**39** の *n*-butoxy 基のオルト位をホ ルミル化し **40** とした。次に 2-fluoro-4-trifluoromethylbenzoic acid (**36**)より合成し たアミド(**37**)と **40** を反応させ **41** とした。**41** をボロン酸エステル **42** とし,鈴木 ー宮浦カップリングにより目的のビフェニルカルボン酸 **43a-c** を得た。

アルコキシ側鎖の鎖長を変えた化合物の合成も行った(Scheme 4.3, 4.4)。37 と 5-bromosalicylaldehyde (46)を反応させ 47 とした。次に methyl 4-bromo-3methylbenzoate (44)より合成したボロン酸エステル(45)と47を鈴木-宮浦カップ リングにより反応させ 48 とした。48 を種々のヨウ化アルキルと反応させ 49a-c とし, エステルを加水分解して目的の化合物 50a-c を得た。



Scheme 4.1 Synthesis of benzamide 37.



Scheme 4.2 Synthesis of 43a-c.



Scheme 4.3 Synthesis of 45.



Scheme 4.4 Synthesis of 50a-c.

4.2 活性評価

PPAR アンタゴニスト試験は当研究室の大橋 雅生が実施した。HCV RNA 複製 抑制活性の評価は本学医歯薬学総合研究科 加藤 宜之 教授のグループに依頼 した。比較対象として T0070907 (51), HCV 治療において臨床で使用されている ribavirin (52)についても評価した。PPAR アンタゴニスト試験の競合物質には PPAR パンアゴニスト TIPP-703 (53) (EC₅₀ of PPAR $\alpha/\delta/\gamma = 61/120/43$ (nmol/L))を使 用した(Figure 3.1)。



Figure 4.1 The structure of PPAR α/γ antagonist T0070907 (**51**), anti HCV reagent ribavirin (**52**), PPAR pan agonist TIPP-703 (**53**).

Table 4.1に HCV RNA 複製抑制活性,細胞毒性,選択阻害, PPARδ アンタゴ ニスト活性, PPARa アンタゴニスト活性を示した。HCV RNA 複製抑制活性は レニラルルシフェラーゼを発現する全長 HCV RNA 複製細胞(OR6 細胞)に化合 物を添加し相対的なルシフェラーゼ活性を測定し 50%効果濃度(EC₅₀)で評価し ている ^{79,80}。細胞毒性は WST-1 アッセイにより 50%細胞毒性濃度(CC₅₀)で評価 している ⁸¹。選択毒性値(SI)は CC₅₀ 値を EC₅₀ 値で除したものである。PPARδ ア ンタゴニスト活性はルシフェラーゼアッセイにより **53** (1µmol/L)を競合物質と したときの 50%阻害濃度(IC₅₀)で評価している。PPARa アンタゴニスト活性は **53** (1 µmol/L)を競合物質としたときの化合物 10 µmol/L 添加時のルシフェラーゼ活 性阻害率(%)で評価している。 HCV RNA 複製抑制活性は 43a-c, 50a-c 全てにおいて T0070907, リバビリンよ り強い活性を示した。43a-c を比較すると R¹の置換基はメチル基が最も高活性 であった。43c, 50a-c を比較すると R²の置換基はプロピルが最も高活性であっ た。全ての化合物の中で 50b が最も高活性であった。しかしながら 30b は細胞 毒性も最も強かった。選択阻害は 43c が最も高くリバビリンと同程度であった。 PPARδ アンタゴニスト活性は 43a-c, 50a-c いずれも高活性であり, 43b が最も高 活性であった。PPARα アンタゴニスト活性は PPARδ アンタゴニスト活性と比較 していずれも非常に弱かった。

Table 4.1 Structure-activity relationships of biphenyl carboxylic acid derivatives for HCV RNA replication inhibition and for hPPAR α/δ antagonistic activity.



			HCV RNA replication inhibition			<u>PPARδ antagonism</u>	<u>PPARα antagonism</u>
compound	\mathbf{R}^1	\mathbf{R}^2	EC ₅₀ (µmol/L)	CC ₅₀ (µmol/L)	SI	IC ₅₀ (µmol/L)	% inhibition @10 µmol/L
43a	\mathbf{F}	<i>n</i> -butyl	3.9	8.1	2.1	0.1	25.4
43b	Cl	<i>n</i> -butyl	1.8	3.2	1.8	0.013	30.7
43c	Me	<i>n</i> -butyl	0.28	5	18	0.019	12.6
50a	Me	ethyl	0.39	3.9	10.0	0.028	49.5
50b	Me	<i>n</i> -propyl	0.22	2.2	11	0.029	49.5
50c	Me	<i>n</i> -pentyl	0.53	2.7	5	0.092	23.3
T0070907 (51)			4.9	2.7	0.55	> 10	31.8
ribavirin (52)			5.6	100	18	nt	nt

Figure 4.2 に化合物の PPARδ アンタゴニスト活性測定の詳細を示した。化合物の最大阻害率 I_{max} はいずれも高い値であったが **43a** と **43b** は比較的値が低く フルアンタゴニストではなくパーシャルアンタゴニスト(パーシャルアゴニスト)と表現する方が適切である。これは HCV RNA 複製抑制活性において **43a** と





Figure 4.2 PPARδ antagonistic activity of the compounds.

4.3 併用効果

HCV RNA 複製抑制活性が比較的高く最も選択阻害の高かった **43c** についてリ バビリン及び IFN-α との併用効果を評価した。IFN-α と併用時, IFN-α, リバビ リン併用時のどちらの場合も相加的に HCV RNA の複製を抑制した。このこと から PPARδ アンタゴニストは既存の治療薬との併用が期待できる。



Figure 4.3 Additive effect on HCV RNA replication of the 43c.

4.4 小括

著者は PPARα アンタゴニストが HCV RNA 複製抑制活性を示し, PPARγ アン タゴニストが HCV RNA 複製抑制活性を示さないという報告を基に PPARδ アン タゴニストの HCV RNA 複製への関与を明らかにするためにビフェニルカルボ ン酸型 PPARδ 選択的アンタゴニストを合成した。活性評価の結果,高い HCV RNA 複製抑制活性を有する化合物を見出した。また,PPARδ アンタゴニスト試 験において最大阻害率の低い化合物が比較的弱い HCV RNA 複製抑制活性であ ることも PPARδ の阻害が HCV RNA の複製に関与していることを裏付けた。更 に代表的な化合物 43c においてペグインターフェロン-α,リバビリンとの併用効 果を評価した結果,43c が相加的に HCV RNA 複製抑制活性を示すことを明らか にした。このことは PPARδ アンタゴニストが C 型肝炎治療において既存薬との 併用が期待できることを示唆している。

総括・今後の展望

著者は蛍光性 PPAR リガンドを用いた蛍光強度法に基づくリガンド結合評価系の確立を目的として研究に着手した。

第1章では蛍光性 PPAR リガンドに至る構造展開の1つとして、新規 PPARa 選択的アゴニストの合成とその NASH 進展抑制効果について述べた。リード化 合物としてフェニルプロピオン酸型 PPARa/δ 選択的アゴニスト 3 に着目し PPARa LBD-3 複合体及び PPARδ LBD-3 複合体モデルを作成し両者を比較した。 その結果、3 の疎水性末端部により嵩高い置換基を導入することで PPARa 選択 的アゴニストを得ることができるという仮説を得た。この仮説に基づき、3 の疎 水性末端部に種々の嵩高い置換基を導入した化合物を合成した。転写活性化試 験の結果、疎水性末端部に 4-(4-fluorophenoxy)benzamide 構造を有する化合物 28 が最も良好な PPARa 活性及びサブタイプ選択性を示した。以上のことから、 著者は新規フェニルプロピオン酸型 PPARa 選択アゴニストを構造情報に基づ き創製することに成功した。次に合成した PPARa 選択的アゴニスト 28 を NASH モデルマウスに投与し、NASH の進行に対する抑制効果を評価した。そ の結果、肝臓の病理組織学的所見及び生化学的所見において 28 の NASH の進 行に対する抑制効果を確認した。

第2章では蛍光性 PPARα/δ デュアルアゴニスト 34 の蛍光強度が PPARα LBD 及び PPARδ LBD 結合時に変化するかどうかを調べた。その結果, PPARα LBD では逆は PPARα LBD 濃度依存的に蛍光強度が増強したのに対し, PPARδ LBD では逆に PPARδ LBD 濃度依存的に蛍光強度が減弱するという珍しい現象が観察された。そこでその理由を明らかにするために複合体 X 線結晶構造やドッキングを 用いて考察を行った。その結果, PPARδ LBD では 34 のピレン環近傍にトリプトファンが存在し, トリプトファンとの相互座用によってピレンが消光している 可能性が示唆された。そこで点変異 PPAR LBD を用いて 34 の蛍光強度変化を調

べたところ Trp264 をアラニンもしくはロイシンに置換した点変異 PPAR& LBD において, PPAR&LBD 濃度依存的に蛍光強度が増強した。このことから PPAR& LBD 結合時における 34 の蛍光強度減弱の理由として Trp264 が 34 のピレン環の 蛍光を消光していることを明らかにした。

第3章では34を用いて蛍光強度変化に基づく PPARa, PPARるの結合実験系構 築を検討した。まず PPARα LBD を用いて結合実験を実施し Kd 値を算出した。 次に PPARα リガンドを用いて 34 との競合実験を実施した。その結果, リガンド 濃度依存的に蛍光強度は減弱した。34 は X 線結晶構造解析より PPARα LBD の リガンド結合ポケットに結合していることが明らかであることから測定に使用 したリガンドも PPARα LBD のリガンド結合ポケットにおいて 34 と競合し結合 実験系が機能していることを確認した。また 34 と PPARα LBD の Kd 値, リガン ドの IC₅₀ 値を用いてリガンドの K_i 値を求めることが出来た。このことから 34 を 用いて PPARα リガンド結合評価系を構築することが出来た。また通常とは異な り 34 結合時、トリプトファンによる消光によって蛍光強度が変化する PPARδ LBD においても結合評価系構築を検討した。PPARa LBD と同様に Ka 値を算出 し、PPARa/δ デュアルアゴニスト3及び PPARδ 選択的アゴニスト4を用いて34 との競合実験を実施した。その結果、リガンド濃度依存的に蛍光強度は増強した。 3 及び4はX線結晶構造解析より PPARδLBD のリガンド結合ポケットに結合し ていることが明らかとなっており、3、4は PPARδ LBD のリガンド結合ポケット において 34 と競合し結合実験系が機能していることを確認した。また 34 と PPARδ LBD の K_d 値, 及び 3, 4 の IC₅₀ 値を用いてリガンドの K_i 値を求めること が出来た。従ってトリプトファンによる消光によって蛍光強度が変化する 34 と PPARδ LBD においてリガンド結合評価系を構築することができた。以上より, 著者はピレン環を有する PPARα/δ デュアルアゴニスト 34 を用いて蛍光強度変化 に基づく PPARα 及び PPARδ のリガンド結合評価系を構築することに成功した。 第4章では PPARa アンタゴニストが HCV RNA 複製抑制活性を示し, PPARγ

アンタゴニストが HCV RNA 複製抑制活性を示さないという報告を基に PPARδ アンタゴニストの HCV RNA 複製への関与を明らかにするためにビフェニルカ ルボン酸型 PPARδ 選択的アンタゴニストを合成した。活性評価の結果,高い HCV RNA 複製抑制活性を有する化合物を見出した。また, PPARδ アンタゴニスト試 験において最大阻害率の低い化合物が比較的弱い HCV RNA 複製抑制活性であ ることも PPARδ の阻害が HCV RNA の複製に関与していることを裏付けた。更 に代表的な化合物 43c においてペグインターフェロン-α, リバビリンとの併用効 果を評価した結果, 43c が相加的に HCV RNA 複製抑制活性を示すことを明らか にした。このことは PPARδ アンタゴニストが C 型肝炎治療において既存薬との 併用が期待できることを示唆している。

本研究のような簡便なリガンド結合評価法と転写活性化試験を組み合わせる ことで PPAR アンタゴニスト,転写を介さない機能に優れた PPAR リガンド等 の探索や,他サブタイプと比較して研究の遅れている PPAR 研究が進展し, PPAR の機能全容解明が深まることを期待する。

実験項

一般的測定法

蛍光スペクトルの測定は日立 分光蛍光光度計 F-4500 を使用した。セルは東 ソー・クォーツ 石英ガラスセルを使用した。NMR スペクトルの測定は Varian MERCURY-300 (300 MHz) SC-NMR spectrameter, Varian VNMRS-400 (400 MHz)
SC-NMR spectrameter, Varian UNITY-500 (500 MHz) SC-NMR spectrameter を使用 し, tetramethylsilane を内部標準物質とした。融点の測定は As one 融点測定器 ATM-01 を使用した。質量分析は日本電子 JMS-700 MStation を使用した。

第1章に関する実験

合成

(R)-4-Benzyl-3-butyryl-2-oxazolidinone (9)



Potassium *t*-butoxide (2.28 g, 20.3 mmol) を THF (60 mL) に溶解し、0°C, Ar 雰 囲気下 THF (30 mL) に溶解した(*R*)-4-benzyl-2-oxazolidinone (8) (3.00 g, 16.9 mmol) を滴下し0°C で 30 分撹拌した。Butyryl chloride (2.1 mL, 20 mmol) を THF (30 mL) に溶解し反応液に滴下し、0°C で 10 分,室温で 3 時間撹拌した。 10%NH4Cl 水溶液に反応液を加え酢酸エチルで 3 回抽出操作を行い、有機層を brine で洗浄し MgSO4 で乾燥させた。溶液を濾過して濃縮しシリカゲルカラムク ロマトグラフィー(eluant; *n*-hexane:ethyl acetate = 5:1 v/v) により精製し無色の油 状物質(9) (4.30 g, 17.3 mmol, quant.)を得た。

¹H-NMR (400MHz CDCl₃) δ 7.36-7.26 (m, 3H), 7.23-7.20 (m, 2H), 4.71-4.65 (m, 2H), 4.20-4.15 (m, 2H), 3.30 (dd, *J* = 13.2, 3.2 Hz, 1H), 3.00-2.84 (m, 2H), 2.77 (dd, *J* = 13.2, 9.6 Hz, 1H), 1.78-1.63 (m, 2H), 1.01 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).





5-Formylsalicylic acid (10) (5.00 g, 30.1 mmol) 及び potassium hydrogencarbonate (3.01 g, 30.1 mmol) $\delta N,N$ -dimethylformamide (50 mL) に溶解しbenzyl bromide (3.22 mL, 27.1 mmol) $\delta m \lambda$, 室温で1晩攪拌した。反応液を氷水 (750 mL) に滴 下し, 沈殿物を濾取した。得られた固体を酢酸エチルに溶解しMgSO4 で乾燥し た。溶液を濾過して溶媒留去しシリカゲルカラムクロマトグラフィー(eluant; *n*hexane/ethyl acetate = 3:1, v/v) により, 白色固体 (11) (5.70 g, 22.2 mmol, 82%) を得た。

¹H-NMR (500 MHz CDCl₃) δ 11.38 (s, H), 9.87 (s, 1H), 8.40 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.00 (dd, *J* = 9.0 Hz, 2.5 Hz, 1H), 7.48-7.39 (m, 5H), 7.11 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 5.43 (s, 2H); MS (FAB) 257 (M+H)⁺.

Benzyl 5-formyl-2-methoxybenzoate (12)



Benzyl 5-formyl-2-hydroxybenzoate (11) (3.00 g, 11.7 mmol), iodomethane (2.00 mL, 14.1 mmol) 及び potassium carbonate (1.94 g, 14.1 mmol) を *N*,*N*-dimethylformamide (30 mL) に溶解し, 室温で 6 時間撹拌した。反応液を氷水 (450 mL) に滴下し, 析出した沈殿物を濾取した。得られた固体を酢酸エチルに 溶解し MgSO4 で乾燥した. 溶液を濾過して溶媒留去しシリカゲルカラムクロ マトグラフィー (eluant; *n*-hexane/ethyl acetate = 3:1, v/v) により, 白色固体 (12) (2.92 g, 10.8 mmol, 92%) を得た。

¹H-NMR (500 MHz CDCl₃) δ 9.91 (s, 1H), 8.34 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.03 (dd, *J* = 8.5 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.41-7.33 (m, 3H), 7.11 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 5.37 (s, 2H), 4.00 (s, 3H); MS (FAB) 271 (M+H)⁺.





Benzyl 5-formyl-2-methoxybenzoate (12) (2.45g, 9.06 mmol) を ethanol (80 mL) に 溶解し,氷冷下 sodium tetrahydroborate (340 mg, 9.06 mmol) を加え,室温で1時 間攪拌した。反応液を濃縮し水を注ぎ酢酸エチルで 3 回抽出操作を行い,得ら れた有機層を brine で洗浄し, MgSO4 で乾燥した。溶液を濾過して溶媒留去し, シリカゲルカラムクロマトグラフィー(eluant; *n*-hexane/ethyl acetate = 1:1, v/v) に より精製し, 無色の油状物質 (13) (2.26 g,8.30 mmol, 92%) を得た。 ¹H-NMR (400 MHz CDCl₃) δ 7.78 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.50-7.31 (m, 6H), 6.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.34 (s, 2H), 4.64 (s, 2H), 3.90 (s, 3H); MS (FAB) 273 (M+H)⁺.

Benzyl [(S)-2-((R)-4-benzyl-2-oxooxazolidine-3-carbonyl)butyl]-2methoxybenzoate (15)



Benzyl 5-(hydroxymethyl)-2-methoxybenzoate (13) (4.17 g,15.3 mmol) を diethyl ether (50 mL) に溶解し、0 °C、Ar 雰囲気下 phosphorus tribromide (1.45 mL, 15.3 mmol) を滴下し、0 °C で 30 分攪拌した。反応後冷水を注ぎ ether で 3 回 抽出操作を行い、有機層を MgSO4 で乾燥した。溶液を濾過して溶媒留去しシリ カゲルカラムクロマトグラフィー (eluant; *n*-hexane : ethyl acetate = 3:1 v/v) によ り精製し白色粉末の benzyl 5-(bromomethyl)-2-methoxybenzoate (14) (4.43 g, 13.2 mmol, 86%) を得た。

次に (*R*)-4-benzyl-3-butyryloxazolidin-2-one (**9**) (1.33 g, 5.37 mmol)を dry tetrahydrofuran (40 mL) に溶解し, -50 °C で攪拌し lithium bis(trimethylsillyl)amide (17.9 mL, 17.9 mmol) を滴下した。-50 °C で 5 分, -15 °C で 15 分攪拌し, 再び-50 °C に冷却した。Dry tetrahydrofuran (20 mL) に溶解した benzyl 5-(bromomethyl)-2-methoxybenzoate (**14**) (2.00 g, 5.97 mmol) を反応液に滴下し1 時間 30 分で-5 °C まで温度を上昇させた。反応液に 10% NH₄Cl 水溶液を加え酢酸エチルで 3 回抽 出操作を行い有機層を brine で洗浄し, MgSO₄ で乾燥させた。溶液を濾過して 濃縮し, シリカゲルカラムクロマトグラフィー (eluant; *n*-hexane : ethyl acetate = 3:1 v/v) により精製し, 淡黄色の油状物質 (**15**) (1.44 g, 2.87 mmol, 53%) を得た。¹H-NMR (400 MHz CDCl₃) δ 7.72 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.42-7.20 (m, 9H), 7.03 (dd, *J* = 7.6 Hz, 2.0 Hz, 2H), 6.91 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.31 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 5.27 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.65-4.63 (m, 1H), 4.15-4.03 (m, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.08-2.99 (m, 2H), 2.75 (dd, *J* = 13.6 Hz, 6.4 Hz, 1H), 2.43 (dd, *J* = 13.2 Hz, 9.6 Hz, 1H), 1.82-1.71 (m, 1H), 1.63-1.51 (m, 1H), 0.98(t, *J* = 7.2 Hz, 3H); MS (FAB) 502 (M+H)⁺.
5-[(S)-2-((R)-4-Benzyl-2-oxooxazolidine-3-carbonyl)butyl]-2-methoxybenzoic acid (16)



Benzyl 5-((*S*)-2-((*R*)-4-benzyl-2-oxooxazolidine-3-carbonyl)butyl)-2methoxybenzoate (**15**) (2.87 g, 5.72 mmol) を ethyl acetate (50 mL) に溶解し 10% palladium 担持活性炭 (0.56 g) を加え,初期圧力 0.30 MPa で 2 時間水素化し た。反応液をセライトを用いて濾過して溶媒留去しシリカゲルカラムクロマト グラフィー (eluant; *n*-hexane : ethyl acetate = 3:1 v/v) により精製し,淡黄色の油 状物質 (**16**) (2.63 g, 6.39 mmol, 76%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz CDCl₃) δ 8.06 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.55 (dd, J = 8.8 Hz, 2.4 Hz, 1H), 7.31-7.23 (m, 3H), 7.09 (dd, J = 7.6 Hz, 2.0 Hz, 2H), 7.00 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.69-4.67 (m, 1H), 4.19-4.10 (m, 2H), 4.05 (m, 3H), 4.05-3.99 (m, 1H), 3.15 (dd, J = 13.2 Hz, 3.2 Hz, 1H), 3.09 (dd, J = 13.6 Hz, 7.2 Hz, 1H), 2.78 (dd, J = 13.6 Hz, 6.8 Hz, 1H), 2.58 (dd, J = 13.2 Hz, 9.6 Hz, 1H), 1.78 (m, 1H), 1.59- 1.49 (m, 1H), 0.93 (t, J = 7.2 Hz, 3H); MS (FAB) 412 (M+H)⁺.

(*R*)-4-Benzyl-3-{(*S*)-2-[3-(hydroxymethyl)-4-methoxybenzyl]butanoyl}oxazolidin-2one (17)



5-[(S)-2-((R)-4-Benzyl-2-oxooxazolidine-3-carbonyl)butyl]-2-methoxybenzoic acid (16) (1.45 g, 3.52 mmol) を dry tetrahydrofuran (30 mL) に溶解し、0°C、Ar 雰囲

気下 1.08 mol/L borane-tetrahydrofuran 錯体 tetrahydrofuran 溶液 (7.00 mL, 7.56 mmol) を滴下し、0 °C で 2 時間、室温で 3 時間攪拌した。反応後、反応液 に 10% NH4Cl 水溶液を加え酢酸エチルで 3 回抽出操作を行い、有機層を MgSO4 で乾燥した。その後、液を濾過して溶媒留去しシリカゲルカラムクロマトグラフ ィー (eluant; *n*-hexane : ethyl acetate = 2:1 v/v) により精製し、無色の油状物質 (17) (1.35 g, 3.40 mmol, 96%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz CDCl₃) δ 7.32-7.16 (m, 5H), 7.05 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 6.80 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.70-4.60 (m, 3H), 4.17-4.03 (m, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.07 (dd, *J* = 13.2 Hz, 3.2 Hz, 1H), 3.01 (dd, *J* = 13.6 Hz, 8.0 Hz, 1H), 2.73 (dd, *J* = 13.2 Hz, 6.8 Hz, 1H), 2.50 (dd, *J* = 13.6 Hz, 9.6 Hz, 1H), 1.81-1.70 (m, 1H), 1.61-1.50 (m, 1H), 0.92 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H); MS (FAB) 398 (M+H)⁺.

5-[(S)-2-((R)-4-Benzyl-2-oxooxazolidine-3-carbonyl)butyl]-2-methoxybenzaldehyde (18)



Pyridinium dichromate (1.00 g, 2.66 mmol) を dichloromethane (10 mL) に加え, dichloromethane (5 mL) に溶解した(*R*)-4-benzyl-3-{(*S*)-2-[3-(hydroxymethyl)-4methoxybenzyl] butanoyl}oxazolidin-2-one (17) (0.65 g, 1.64 mmol)を滴下し室温で1 晩攪拌した。反応液を濾過し,濾液を溶媒留去しシリカゲルカラムクロマトグラ フィー (eluant; *n*-hexane : ethyl acetate = 2:1 v/v) により精製し,淡黄色のアモル ファス (18) (425 mg, 1.74 mmol, 66%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz CDCl₃) δ 10.42 (s, 1H), 7.70 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.52 (dd, J = 8.4 Hz, 2.4 Hz, 1H), 7.39-7.20 (m, 3H), 7.07 (dd, J = 8.0 Hz, 2.0 Hz, 2H), 6.93 (d, J = 8.4

Hz, 1H), 4.70-4.64 (m, 1H), 4.18-4.13 (m, 1H), 4.10 (dd, *J* = 8.8 Hz, 2.8 Hz, 1H), 4.08-4.01 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.11 (dd, *J* = 8.4 Hz, 2.4 Hz, 1H), 3.06 (dd, *J* = 14.0 Hz, 8.0 Hz, 1H), 2.76 (dd, *J* = 13.6 Hz, 6.4 Hz, 1H), 2.53 (dd, *J* = 13.6 Hz, 9.6 Hz, 1H), 1.82-1.71 (m, 1H), 1.60-1.49 (m, 1H), 0.93 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

N-{5-[(*S*)-2-((*R*)-4-Benzyl-2-oxooxazolidine-3-carbonyl)butyl]-2- methoxybenzyl}-4-(4- chlorophenoxy)benzamide (19a)



5-[(*S*)-2-((*R*)-4-Benzyl-2-oxooxazolidine-3-carbonyl)butyl]-2-methoxybenzaldehyde (18) (530 mg, 1.33 mmol) 及び 4-(4-chlorophenoxy)benzamide (800 mg, 2.91 mmol) を dry toluene (20 mL) に溶解し, Ar 雰囲気下, triethylsilane (0.51 mL, 2.9 mmol) 及び trifluoroacetic acid (0.23 mL, 2.9 mmol) を滴下し 2 晩 reflux した。反応液に 水を加え酢酸エチルで3回抽出し有機層をbrine で洗浄し, MgSO4 で乾燥した。 溶液を濾過して溶媒留去し,シリカゲルカラムクロマトグラフィー (eluant; *n*hexane:ethyl acetate = 3:1 v/v) により精製し,黄色のアモルファス (19a) (801 mg, 1.28 mmol, 96%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz CDCl₃) δ 7.69 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.27-7.18 (m, 5H), 6.99-6.92 (m, 6H), 6.82 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.50 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.68-4.55 (m, 3H), 4.15-4.08 (m, 2H), 4.05 (dd, J = 8.8 Hz, 2.4 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.02-2.96 (m, 2H), 2.76 (dd, J = 13.6 Hz, 6.4 Hz, 1H), 2.48 (dd, J = 13.6 Hz, 9.2 Hz, 1H), 1.82-1.68 (m, 1H), 1.66-1.53 (m, 1H), 0.93 (t, J = 7.6 Hz, 3H); MS (FAB) 627, 629 (M+H)⁺.

N-{5-[(*S*)-2-((*R*)-4-Benzyl-2-oxooxazolidine-3-carbonyl)butyl]-2- methoxybenzyl}-

4-(4-bromophenoxy)benzamide (19b)



5-[(*S*)-2-((*R*)-4-Benzyl-2-oxooxazolidine-3-carbonyl)butyl]-2-methoxybenzaldehyde (18) (450 mg, 1.14 mmol) 及び 4-(4-bromophenoxy)benzamide (600 mg, 2.05 mmol) を dry toluene (20 mL) に溶解し, Ar 雰囲気下, triethylsilane (0.33 mL, 2.1 mmol) 及び trifluoroacetic acid (0.15 mL, 2.0 mmol) を滴下し 2 晩 reflux した。反応液に 水を加え酢酸エチルで3回抽出し有機層をbrine で洗浄し, MgSO4 で乾燥した。 溶液を濾過して溶媒留去し,シリカゲルカラムクロマトグラフィー (eluant; *n*hexane:ethyl acetate = 3:1 v/v) により精製し,黄色のアモルファス (19b) (700 mg, 1.04 mmol, 92%) を得た。

¹H-NMR (500 MHz CDCl₃) δ 7.70 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.46 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.29-7.17 (m, 5H), 7.00-6.89 (m, 6H), 6.82 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.51 (t, *J* = 4.0 Hz, 1H), 4.67-4.61 (m, 2H), 4.58 (dd, *J* = 14.5 Hz, 7.0 Hz, 1H), 4.14-4.09 (m, 2H), 4.05 (dd, *J* = 9.0 Hz, 3.5 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.02-2.96 (m, 2H), 2.77 (dd, *J* = 13.5 Hz, 6.5 Hz, 1H), 2.48 (dd, *J* = 13.5 Hz, 9.0 Hz, 1H), 1.81-1.70 (m, 1H), 1.64-1.54 (m, 1H), 0.93 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H); MS (FAB) 671, 673 (M+H)⁺.

(S)-2-(3-{[4-(4-Chlorophenoxy)benzamido]methyl}-4-methoxybenzyl) butanoic

acid (20a)



N-{5-[(*S*)-2-((*R*)-4-Benzyl-2-oxooxazolidine-3-carbonyl)butyl]-2-methoxybenzyl}-4-(4-chlorophenoxy)benzamide (**19a**) を tetrahydrofuran と水の混合溶媒(50 mL, THF:water = 4:1)に溶解し0°C で 30% H₂O₂ 水溶液(1.27 mL, 11.2 mmol)を滴下し た。次に水(10 mL) に溶解した lithium hydroxide monohydrate (180 mg, 4.48 mmol) を滴下し 0°C で 2 時間,室温で 3 時間攪拌し,その後再び 0°C に冷却し NaHSO₃ を加えた。溶液を水酸化ナトリウム水溶液で塩基性にし,酢酸エチルで 抽出を行った。水層を酸性にし、酢酸エチルで 3 回抽出操作を行い、得られた有 機層を brine で洗浄し、MgSO4 で乾燥した。溶液を濾過して溶媒留去し、シリカ グルカラムクロマトグラフィー (eluant; *n*-hexane:ethyl acetate = 1:1 v/v) により精 製し、白色固体 (**20a**) (300 mg, 0.641 mmol, 57%) を得た。

Mp. 108-109 °C; ¹H-NMR (400 MHz CDCl₃) δ 7.73 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.16 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.08 (dd, *J* = 8.0 Hz, 2.4 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.96 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.79 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.68 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.62-4.52 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.88 (dd, *J* = 14.0 Hz, 8.4 Hz, 1H), 2.71 (dd, *J* = 13.6 Hz, 6.4 Hz, 1H), 2.59-2.52 (m, 1H), 1.71-1.51 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); [α] $_{D}^{20}$ = +20; MS (FAB) 468, 470 (M+H)⁺; HRMS (FAB) calcd. for C₂₆H₂₇ClNO₅ 468.1578; found 468.1555 (M+H)⁺.

(S)-2-(3-{[4-(4-Bromophenoxy)benzamido]methyl}-4-methoxybenzyl) butanoic acid (20b)



N-{5-[(*S*)-2-((*R*)-4-Benzyl-2-oxooxazolidine-3-carbonyl)butyl]-2-methoxybenzyl}-4-(4-bromophenoxy)benzamide (**19b**) を tetrahydrofuran と水の混合溶媒(50 mL, THF:water = 4:1)に溶解し0°C で 30% H₂O₂ 水溶液(1.18 mL, 10.4 mmol)を滴下し た。次に水(10 mL) に溶解した lithium hydroxide monohydrate (170 mg, 4.17 mmol) を滴下し0°C で 2 時間,室温で 3 時間攪拌し,その後再び 0°C に冷却し NaHSO₃ を加えた。溶液を水酸化ナトリウム水溶液で塩基性にし,酢酸エチルで 抽出を行った。水層を酸性にし、酢酸エチルで 3 回抽出操作を行い、得られた有 機層を brine で洗浄し、MgSO₄ で乾燥した。溶液を濾過して溶媒留去し、シリカ グルカラムクロマトグラフィー (eluant; *n*-hexane:ethyl acetate = 1:1 v/v) により精 製し、白色固体 (**20b**) (320 mg, 0.625 mmol, 60%) を得た。

Mp. 106-107 °C; ¹H-NMR (500 MHz CDCl₃) δ 7.73 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.46 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.16 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.08 (dd, *J* = 8.5 Hz, 2.4 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.90 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.79 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.66 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.61-4.53 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.88 (dd, *J* = 13.5 Hz, 9.0 Hz, 1H), 2.71 (dd, *J* = 14.0 Hz, 6.0 Hz, 1H), 2.58-2.54 (m, 1H), 1.70-1.53 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H); [α]_D²⁰= +19; MS (FAB) 512, 514 (M+H)⁺; HRMS (FAB) calcd. for C₂₆H₂₇BrNO₅ 512.1073; found 512.1055 (M+H)⁺.

74





4-Methoxybenzyl alcohol (21) (0.55 mL, 4.4 mmol) を dry ether (10 mL) に溶解し, 0°C, Ar 雰囲気下 phosphorus tribromide (0.25 mL, 2.7 mmol) を滴下し, 0 ℃ で 30 分攪拌した。反応液に冷水を加え ether で 4 回抽出操作を行い,得られた有 機層を MgSO4 で乾燥した。溶液を濾過して溶媒留去し 4-methoxybenzyl bromide (22) (880 mg, 4.38 mmol, 98%) を無色の液体として得た。次に(R)-4-Benzyl-3butyryloxazolidin-2-one (9) (970 mg, 3.94 mmol) を dry tetrahydrofuran (20 mL) に 溶解し -50 °C, Ar 雰囲気下, 1.0 mol/L lithium bis(trimethylsilyl)amide / tetrahydrofuran 溶液 (13.1 mL, 13.1 mmol) を滴下した。-50 ℃ で5 分, -15 ℃ で15 分攪拌し, その後再び-50 ℃ に冷却し, dry tetrahydrofuran (10 mL) に溶解 した 4-methoxybenzyl bromide (880 mg, 4.38 mmol) を滴下し, 1 時間 30 分で-5 ℃ まで温度を上昇させた。反応液に 10% NH4Cl 水溶液を加え酢酸エチルで 3 回 抽出操作を行い有機層を brine で洗浄し, MgSO4 で乾燥させた。溶液を濾過し て濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (eluant; n-hexane:ethyl acetate = 4:1 v/v) により精製し、無色の油状物質 (23) (960 mg, 2.61 mmol, 67%) を得た。 ¹H-NMR (400 MHz CDCl₃) δ 7.30-7.24 (m, 3H) 7.20 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.04 (dd, J =8.0 Hz, 2.0 Hz, 2H), 6.82 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 4.69-4.63 (m, 1H), 4.16-4.10 (m, 2H), 4.06 (dd, J = 9.2 Hz, 2.8 Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.04 (dd, J = 14.0 Hz, 2.8 Hz, 1H), 2.99 (dd, *J* = 13.6 Hz, 8.4 Hz, 1H), 2.71 (dd, *J* = 13.6 Hz, 6.8 Hz, 1H), 2.45 (dd, *J* = 13.6 Hz, 9.2 Hz, 1H), 1.81-1.70 (m, 1H), 1.62-1.52 (m, 1H), 0.93 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H); MS (FAB) $368 (M+H)^+$.

(S)-2-(4-Methoxybenzyl) butanoic acid (24)



(*R*)-4-Benzyl-3-[(*S*)-2-(4-methoxybenzyl) butanoyl] oxazolidin-2-one (23) (1.04 g, 2.83 mmol) を tetrahydrofuran と水の混合溶媒(50 mL, THF:water = 4:1)に溶解し 0°C で 30% H₂O₂ 水溶液(3.5 mL, 31 mmol)を滴下した。次に水(10 mL) に溶解し た lithium hydroxide monohydrate (480 mg, 11.4 mmol)を滴下し 0°C で 2 時間, 室 温で 3 時間攪拌し, その後再び 0°C に冷却し NaHSO₃ を加えた。溶液を水酸化 ナトリウム水溶液で塩基性にし, 酢酸エチルで抽出を行った. 水層を酸性にし, 酢酸エチルで 3 回抽出操作を行い, 得られた有機層を brine で洗浄し, MgSO₄ で 乾燥した。溶液を濾過して溶媒留去し, シリカゲルカラムクロマトグラフィー (eluant; *n*-hexane:ethyl acetate = 3:1 v/v) により無色の油状物質 (24) (570 mg, 2.74 mmol, 97%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz CDCl₃) δ 7.10 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.82 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 2.90 (dd, *J* = 14.0 Hz, 6.0 Hz, 1H), 2.71 (dd, *J* = 14.0 Hz, 6.8 Hz, 1H), 2.61-2.53 (m, 1H), 1.71-1.53 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H); MS (FAB) 209 (M+H)⁺.

(S)-Methyl 2-(4-methoxybenzyl)butanoate (25)



(S)-2-(4-Methoxybenzyl) butanoic acid (24) (562 mg, 2.70 mmol) を dry methanol (50 mL) に溶解し, Ar 雰囲気下, chlorotrimethylsilane (0.70 mL, 6.8 mmol) を滴下 し室温で一晩攪拌した。反応液を濃縮し, カラムクロマトグラフィー (eluant; *n*-

hexane:ethyl acetate = 5:1 v/v) により精製し, 無色の液体 (25) (553 mg, 2.49 mmol, 92%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz CDCl₃) δ 7.07 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.81 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.61 (s, 3H) 2.87 (dd, *J* = 14.0 Hz, 8.4 Hz, 1H), 2.67 (dd, *J* = 13.6 Hz, 6.4 Hz, 1H), 2.59-2.51 (m, 1H), 1.69-1.50 (m, 2H), 0.90 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H); MS (FAB) 223 (M+H)⁺.

(S)-Methyl 2-(3-formyl-4-methoxybenzyl)butanoate (26)



(S)-Methyl 2-(4-methoxybenzyl)butanoate (25) (553 mg, 2.49 mmol) を dichloromethane (20 mL) に溶解し, -20 °C, Ar 雰囲気下, Titanium (IV) chloride (0.85 mL, 7.75 mmol) を滴下し, 次いで dichloromethyl methyl ether (0.35 mL, 3.87 mmol) を滴下し, -20 °C から室温で 8 時間攪拌した。10% HCl 水溶液 (50 mL) を加え, 0 °C で 30 分攪拌した。反応液に水を加え ether で 3 回抽出操作を行 い, 得られた有機層を NaHCO₃ 水溶液で洗浄し MgSO₄ で乾燥した。液を濾過 して濃縮しカラムクロマトグラフィー (eluant; *n*-hexane:ethyl acetate = 3:1 v/v) に より精製し淡黄色の油状物質 (26) (569 mg, 2.27 mmol, 91%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz CDCl₃) δ 10.44 (s, 1H), 7.62 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.35 (dd, J = 8.4 Hz, 2.4 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.61 (s, 3H), 2.90 (dd, J = 14.0 Hz, 8.4 Hz, 1H), 2.73 (dd, J = 13.6 Hz, 6.4 Hz), 2.61-2.53 (m, 1H), 1.69-1.52 (m, 2H), 0.91 (t, J = 7.4 Hz, 3H); MS (FAB) 251 (M+H)⁺.

77

(S)-Methyl-2-(3-{[4-(4-fluorophenoxy)benzamido]methyl}-4-methoxybenzyl)

butanoate (27)



(S)-Methyl 2-(3-formyl-4-methoxybenzyl)butanoate (26) (565 mg, 2.26 mmol) 及び 4-(4-fluorophenoxy) benzamide (1.27 g, 5.49 mmol) を dry toluene (30 mL) に溶解 し, Ar 雰囲気下, triethylsilane (1.10 mL, 6.89 mmol) 次いで trifluoroacetic acid (0.50 mL, 6.8 mmol) を滴下し, 2 晩 reflux した。反応液に水を加え酢酸エチル で 3 回抽出操作を行い,得られた有機層を MgSO4 で乾燥した.溶液を濾過して 濃縮し,シリカゲルカラムクロマトグラフィー (eluant; *n*-hexane: ethyl acetate = 3:1 v/v) により淡黄色の固体 (27) (970 mg, 2.08 mmol, 92%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz CDCl₃) δ 7.73 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.12 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.09-6.98 (m, 5H), 6.96 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.80 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.58 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.59 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.61 (s, 3H), 2.87 (dd, *J* = 13.6 Hz, 8.4 Hz, 1H), 2.68 (dd, *J* = 14.0 Hz, 6.4 Hz, 1H), 2.59-2.51 (m, 1H), 1.69-1.49 (m, 2H), 0.90 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); MS (FAB) 466 (M+H)⁺.

(S)-2-(3-{[4-(4-fluorophenoxy)benzamido]methyl}-4-methoxybenzyl) butanoic acid (27)



(S)-Methyl 2-(3-{[4-(4-fluorophenoxy)benzamido]methyl}-4-methoxybenzyl) butanoate (26) (960 mg, 2.06 mmol) を 1,4- dioxane (20 mL) 及び 10% HCl 水溶液 (20 mL) に溶解し、80°C で 12 時間攪拌した。反応液に水を加え酢酸エチルで3
回抽出操作を行い、brine で洗浄し MgSO4 で乾燥した。溶液を濾過して濃縮し シリカゲルカラムクロマトグラフィー (eluant; *n*-hexane:ethyl acetate = 3:1 v/v) で
精製し 27 (801 mg, 1.77 mmol, 86%) を無色のアモルファスとして得た。
Mp. 58-60 °C; ¹H-NMR (400 MHz CDCl₃) δ 7.72 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.16 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.09-6.97 (m, 5H), 6.93 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.79 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.68 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.61-4.52 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 2.88 (dd, *J* = 14.0 Hz, 8.4 Hz, 1H), 2.70 (dd, *J* = 14.0 Hz, 6.4 Hz, 1H), 2.58-2.51 (m, 1H), 1.71-151 (m, 2H), 0.94 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); MS (FAB) 452 (M+H)⁺; HRMS (FAB) calcd for C₂₆H₂₇FNO₅ 452.1873; found 452.1894 (M+H)⁺.

第2章に関する実験

合成

1-Pyrenecarboxamide (31)



1-Pyrenecarboxylic acid (**30**) (800 mg, 3.25 mmol) を dichloromethane (20 mL) に溶解し 0°C, Ar 雰囲気下, oxalyl dichloride (0.28 mL, 3.3 mmol) 次いで DMF (3 drops) を滴下し室温で一晩撹拌した。溶媒を留去し 残差を THF (20 mL) に溶解し 0°C で 28% アンモニア水に滴下し 1 時間撹拌し た。10%塩酸水溶液で中和し THF を留去し, 析出した個体を濾取して **31** (751 mg, 3.06 mmol, 94%)を昇華性の無色の針状結晶として得た。 ¹H-NMR (400MHz DMSO-*d*6) 8.62 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 8.37-8.11 (m, 10H), 7.79 (s, 1H).

5-[(S)-2-((R)-4-Benzyl-2-oxooxazolidine-3-carbonyl)butyl]-2methoxybenzaldehyde (32)



(R)-4-Benzyl-3-[(S)-2-(4-methoxybenzyl) butanoyl] oxazolidin-2-one (23) (1.53 g, 4.15 mmol) を dichloromethane (50 mL) に溶解し, -20 °C, Ar 雰囲気下, Titanium (IV) chloride (1.37 mL, 12.5 mmol) を滴下し, 次いで dichloromethyl methyl ether (0.42 mL, 4.64 mmol) を滴下し, -20 °C から室温で 8 時間攪拌した。10% HCl 水溶液 (50 mL) に反応液を加え, 0 °C で 30 分攪拌した。反応液に水を加え ether で 3 回抽出操作を行い,得られた有機層を NaHCO₃ 水溶液で洗浄し MgSO₄ で 乾燥した。液を濾過して濃縮しカラムクロマトグラフィー (eluant; *n*-hexane:ethyl acetate = 3:1 v/v) により精製し無色の油状物質 (32)(1.49 g, 3.78 mmol, 91%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz CDCl₃) δ 10.42 (s, 1H), 7.70 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.52 (dd, J = 8.4 Hz, 2.4 Hz, 1H), 7.39-7.20 (m, 3H), 7.07 (dd, J = 8.0 Hz, 2.0 Hz, 2H), 6.93 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.70-4.64 (m, 1H), 4.18-4.13 (m, 1H), 4.10 (dd, J = 8.8 Hz, 2.8 Hz, 1H), 4.08-4.01 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.11 (dd, J = 8.4 Hz, 2.4 Hz, 1H), 3.06 (dd, J = 14.0 Hz, 8.0 Hz, 1H), 2.76 (dd, J = 13.6 Hz, 6.4 Hz, 1H), 2.53 (dd, J = 13.6 Hz, 9.6 Hz, 1H), 1.82-1.71 (m, 1H), 1.60-1.49 (m, 1H), 0.93 (t, J = 7.2 Hz, 3H).

$N-\{5-[(S)-2-((R)-4-Benzyl-2-oxooxazolidine-3-carbonyl)butyl]-2-$

methoxybenzyl}pyrene-1-carboxamide (33)



5-[(*S*)-2-((*R*)-4-Benzyl-2-oxooxazolidine-3-carbonyl)butyl]-2methoxybenzaldehyde (**32**) (536 mg, 1.36 mmol) 及び 4-(4-chlorophenoxy)benzamide (**31**) (338 mg, 1.38 mmol) を toluene (50 mL) に溶解し, Ar 雰囲気下, triethylsilane (1.28 mL, 8.01 mmol) 及び trifluoroacetic acid (0.32 mL, 4.3 mmol) を滴下し 2 晩 reflux した。反応液に水を加え酢酸エチルで 3 回抽出し有機層を brine で洗浄 し, MgSO4 で乾燥した。溶液を濾過して溶媒留去し、シリカゲルカラムクロマ トグラフィー (eluant; *n*-hexane:ethyl acetate = 3:1 v/v) により精製し, **33** (627 mg, 1.00 mmol, 74%)を黄色のアモルファスとして得た。

¹H-NMR (400 MHz CDCl₃) δ 8.57 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 8.21 (dd, J = 7.6, 1.2 Hz, 2H), 8.13-8.10 (m, 3H), 8.06-8.02 (m, 3H), 7.39 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.24 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 7.14-7.11 (m, 3H) 6.90-6.88 (m, 2H), 6.85 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.52 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.78 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 4.67-4.61 (m, 1H), 4.16-4.01 (m, 2H), 4.00 (dd, J = 9.2, 2.8 Hz, 1Hz), 3.85 (s, 3H), 3.05 (dd, J = 13.2, 8.0 Hz, 1H), 2.99 (dd, J = 13.6, 3.2 Hz, 1H), 2.78 (dd, J = 13.2, 6.4 Hz, 1H), 2.48 (dd, J = 13.2, 9.2 Hz, 1H), 1.82-1.72 (m, 1H), 1.67-1.54 (m, 1H), 0.94 (t, J = 7.6 Hz, 3H).

(S)-2-{3-[(pyrene-1-carboxamido)methyl]-4-methoxybenzyl} butanoic acid (34)



 $N-\{5-[(S)-2-((R)-4-Benzyl-2-oxooxazolidine-3-carbonyl)butyl]-2-methoxybenzyl}pyrene-1-carboxamide ($ **33**) (170 mg, 0.272 mmol)を tetrahydrofuran (2.5 mL)と水(0.50 mL)に溶解し 0°C で 30% H₂O₂ 水溶液(0.15 mL)を滴下した. 次 に水(1.25 mL) に溶解した lithium hydroxide monohydrate (21 mg, 0.50 mmol) を滴 下し 0°C で 2 時間, 室温で 3 時間攪拌し, その後再び 0°C に冷却し NaHSO₃ を加えた. 溶液を水酸化ナトリウム水溶液で塩基性にし, 酢酸エチルで抽出を行 った。水層を酸性にし, 酢酸エチルで 3 回抽出操作を行い, 得られた有機層を brine で洗浄し, MgSO₄ で乾燥した。溶液を濾過して溶媒留去し, シリカゲルカ ラムクロマトグラフィー (eluant;*n*-hexane:ethyl acetate = 1:1 v/v) により精製し, 自色の砂状結晶 (**34**) (79 mg, 0.17 mmol, 62%) を得た。

Mp 130-131°C. ¹H-NMR (400 MHz DMSO-*d*6) δ 12.09 (s, 1H), 9.04 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 8.48 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 8.35-8.32 (m, 3H), 8.26-8.21 (m, 3H), 8.17 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.11 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.08 (dd, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.56 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 2.79 (dd, *J* = 14.0, 8.0 Hz, 1H), 2.61 (dd, *J* = 14.0, 7.2 Hz, 1H), 2.52-2.41 (m, 1H), 1.54-1.43 (m, 2H), 0.84 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). [α] ρ^{20} = +24.6.

蛍光実験

EMM 測定

34 をエタノールに溶解し2 µmol/L とし 10 分間超音波処理で脱気し 25℃ にて EMM スペクトルを測定した。

バッファー

蛍光スペクトル測定の実験における希釈溶媒はグリセロールバッファーを使用 した。組成は以下の通りである。 glycerol buffer (50 mmol/L Na₂HPO₄, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, 20% glycerol, pH 7.2)

第2章の実験で用いているバッファーも同じである。

34-PPARα LBD 滴定実験

34 を 500 nmol/L 20% グリセロールバッファー溶液とした。 647 µmol/L PPARα LBD 溶液を 20% グリセロールバッファー溶液で 10 倍希釈し 64.7 µmol/L 溶液とした。500 nmol/L **34** 溶液 500 µL に 64.7 µmol/L PPARα LBD 溶液を 2 µL ずつ加えていき, 25℃, 励起波長 345 nm に て蛍光スペクトルを測定した。

12-PPARδ LBD 滴定実験

34 を 500 nmol/L 20% グリセロールバッファー溶液とし, **34** 溶液 500 μL に 21.6 μmol/L PPARδ LBD 溶液を 4 μL ずつ加えていき, 25°C, 励起波長 345 nm に て蛍光スペクトルを測定した。

12-PPARδ LBD W256A 滴定実験

34を 500 nmol/L 20% グリセロールバッファー溶液とした。 388 µmol/L PPARδ LBD W256A 溶液を 20% グリセロールバッファー溶液で 10 倍 希 釈 し 38.8 µmol/L 溶 液 と し た 。 500 nmol/L **34** 溶 液 500 µL に 38.8 µmol/L PPARδ LBD W256A 溶液を 2 µL ずつ加えていき, 25℃, 励 起波長 345 nm にて蛍光スペクトルを測定した。

34-PPARδ LBD W264A 滴定実験

34 を 500 nmol/L 20% グリセロールバッファー溶液とし,**34** 溶液 500 µL に 24.5 µmol/L PPARδ LBD W264A 溶液を 4 µL ずつ加えていき,25℃,励起波長 345 nm にて蛍光スペクトルを測定した。

34-PPARδ LBD W264L 滴定実験

34 を 500 nmol/L 20%グリセロールバッファー溶液とし, **34** 溶液 500 µL に 18.3 µmol/L PPARδ LBD W264L 溶液を 4 µL ずつ加えていき, 25℃, 励起波長 345 nm にて蛍光スペクトルを測定した。

34-PPARα LBD L258W 滴定実験

34 を 500 nmol/L 20%グリセロールバッファー溶液とし, **34** 溶液 500 µL に 117 µmol/L PPARα LBD L258W 溶液を 2 µL ずつ加えていき, 25℃, 励起波長 345 nm にて蛍光スペクトルを測定した。

ドッキングスタディ

ドッキングソフトは Chemical Computing Group Inc の Molecular Operating Environment (MOE)を使用しドッキングアルゴリズムは ASEDock を使用した。

第3章に関する実験

共通の方法

使用する溶媒は予め10分間,超音波処理により脱気した。タンパク質を取り 扱う工程は全て氷上で操作した。蛍光測定は室温及び還流液の温度を25℃とし て測定した。溶液を入れたセルを装置にセットし3分後に測定した。励起波長 を345 nm として蛍光スペクトルを測定した。EC50及びIC50は統計ソフト GraphPad Prismで計算した。

PPARa と 34 の Kd を求める実験

34を DMSO に溶解し 200 µmol/L の溶液とした。**34**の 200 µmol/L 溶液を 20% グリセロールバッファーで希釈し 2 µmol/L 溶液とした。647 µmol/L PPARa LBD 溶液を 20% グリセロールバッファーで希釈していき 0.02, 0.2, 0.4, 0.8, 2, 4, 8, 20 µmol/L とした。2 µmol/L **34** 溶液と各濃度の PPARa LBD 溶液を等量混和し, **34**の終濃度を 1 µmol/L, PPARaLBD の終濃度を 0.01, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2, 4, 10 µmol/L とした。

PPARα LBD と 34 を用いて PPARα リガンドの K_iを求める実験

各リガンド(3, 28, 34)を DMSO で溶解し 30000 µmol/L の溶液とした。各リガン ドの 30000 µmol/L 溶液を 20%グリセロールバッファーで希釈し 300 µmol/L 溶 液とした。各化合物の 300 µmol/L 溶液を 20%グリセロールバッファー: DMSO = 99:1 v/v 溶液で希釈していき 0.3, 0.9, 3, 9, 30, 90 µmol/L とした。200 µmol/L 34 溶液を 20%グリセロールバッファーで希釈し 3 µmmol/L とした。647 µmol/L PPARα LBD 溶液を 20%グリセロールバッファーで希釈し 3 µmmol/L とした。12, PPARα LBD, 各濃度のリガンド溶液を等量混和し, 34 の終濃度を 1 µmol/L, PPARα LBD の終濃度を 1 µmol/L, 各リガンドの終濃度を 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 µmol/L とした。

PPARδ と 34 の K_d を求める実験

200 µmol/L の **34** のストック溶液を 20% グリセロールバッファーで希釈し 0.2 µmol/L 溶液とした。111 µmol/L PPAR black LBD 溶液を 20% グリセロールバッフ アーで希釈していき 0.02, 0.04, 0.08, 0.2, 0.4, 0.8, 2.0, 4.0 µmol/L とした。0.2 µmol/L **34** 溶液と各濃度の PPAR black LBD 溶液を等量混和し, **34** の終濃度を 0.1 µmol/L, PPAR black D の終濃度を 0.01, 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.4, 1.0, 2.0 µmol/L とした。

PPARδ LBD と 34 を用いて PPARδ リガンドの K_iを求める実験

85

3 の 30000 µmol/L 溶液を 20%グリセロールバッファーで希釈し 30 µmol/L 溶液とした。3 の 30 µmol/L 溶液を 20%グリセロールバッファー: DMSO = 999:1 v/v 溶液で希釈していき 0.03, 0.06, 0.12, 0.3, 0.6, 1.2, 3, 6, 12, 30 µmol/L とした。200 µmol/L 34 溶液を 20%グリセロールバッファーで希釈し 1.2 µmmol/L とした。99 µmol/L PPARδ LBD 溶液を 20%グリセロールバッファー で希釈し 0.3 µmol/L とした。34, PPARδ LBD, 各濃度の 3 溶液を等量混和し, 34 の終濃度を 0.4 µmol/L, PPARδ LBD の終濃度を 0.1 µmol/L, 3 の終濃度を 0.01, 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2, 4, 10 µmol/L とした。

4の30 μmol/L 溶液を20% グリセロールバッファー:DMSO = 999:1 v/v 溶液 で希釈していき0.03,0.09,0.3,0.9,3,9,30 μmol/L とした。200 μmol/L 34 溶液を 20% グリセロールバッファーで希釈し1.2 μmmol/L とした。99 μmol/L PPARδ LBD 溶液を20% グリセロールバッファーで希釈し0.3 μmol/L とした。34, PPARδ LBD, 各濃度の4 溶液を等量混和し,34 の終濃度を0.4 μmol/L, PPARδ LBD の終濃度 を0.1 μmol/L,34 の終濃度を0.01,0.03,0.1,0.3,1,3,10 μmol/L とした。

第4章に関する実験

合成

2-Fluoro-4-(trifluoromethyl)benzamide (37)



2-Fluoro-4-(trifluoromethyl)benzoic acid (36) (2.50 g, 12.0 mmol)を塩化チオニル (25 mL)に溶解し 60℃ で 3 時間撹拌した。溶媒を留去し残差を少量のアセトンに

溶解し,0℃で28%アンモニア水(25 mL)に滴下し30分撹拌した。析出した個体 を濾取し37 (1.54g, 7.44 mmol, 62%)を昇華性の無色の針状結晶として得た。 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.27 (dd, *J* = 8.0, 8.0 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 6.68 (br, 1H), 6.07 (br, 1H).

1-Bromo-4-butoxybenzene (39)



DMF (25 mL) に溶解した 4-bromophenol (**38**) (2.00 g, 11.6 mmol) に 1iodobutane (2.55 g, 13.9 mmol), K₂CO₃ (1.92 g, 13.9 mmol) を加えて室温で一晩攪 拌した。反応石を水に注ぎ AcOEt で抽出し, 有機層を MgSO₄ で乾燥した。溶液 を濾過して溶媒留去し残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(eluent; hexane/AcOEt = 10:1 v/v) により精製し **39** (2.52 g, 11.0 mmol, 95%) を無色の液体 として得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.36 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 6.77 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 3.92 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 1.79-1.72 (m, 2H), 1.53-1.43 (m, 2H), 0.97 (t, J = 7.6 Hz, 3H).

5-Bromo-2-butoxybenzaldehyde (40)



DCM (25 mL) に溶解した **39** (2.47 g, 10.8 mmol) を-50°C, Ar 雰囲気下 TiCl₄ (3.55 mL, 32.3 mmol), 次いで CH₃OCHCl₂ (1.03 mL, 11.3 mmol) を滴下し-50°C で

3 時間撹拌した。反応液を 0°C で 10%塩酸水溶液に滴下し 0°C で 30 分撹拌した。溶液を ether で抽出し,有機層を brine で洗浄し MgSO₄ で乾燥した。溶液を 濾過して溶媒留去し残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (eluent; hexane/AcOEt = 5:1 v/v) により精製し 40 (2.52 g, 9.81 mmol, 91%) を淡黄色の液体として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.42 (s, 1H) 7.92 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.61 (dd, *J* = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.07 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.87-1.80 (m, 2H), 1.57-1.47 (m, 2H), 0.99 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H).

N-[(5-Bromo-2-butoxy-phenyl)methyl]-2-fluoro-4-(trifluoromethyl) benzamide (41)



40 (125 mg, 0.486 mmol) 及び 2-fluoro-4-trifluoromethylbenzamide (**37**)(120 mg, 0.579 mmol) を toluene (20 mL) に溶解し, TFA (0.24 mL, 3.2 mmol), 次いで Et₃SiH (0.52 mL, 3.2 mmol)を溶解し 2 日間還流した。反応液を溶媒留去し, 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(eluent; hexane/AcOEt = 5:1 v/v) により精製し **41** (133 mg, 0.297 mmol, 61%) を白色個体として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (dd, *J* = 7.6, 7.6 Hz, 1H), 7.53 (dd, *J* = 8.0, 0.8 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.40 (dd, *J* = 11.6, 1.2 Hz, 1H), 7.36 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 7.33-7.30 (mn, 1H), 6.76 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.64 (dd, *J* = 6.0, 1.2 Hz, 2H), 4.01 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.85-1.77 (m, 2H), 1.56-1.46 (m, 2H), 0.99 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H).

N-{[2-Butoxy-5-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]methyl}-2-

fluoro-4-(trifluoromethyl)benzamide (42)



41 (115 mg, 0.257 mmol), bis(pinacolato)diboron (90 mg, 0.35 mmol), (Ph₃P)₂PdCl₂ (18 mg, 0.026 mmol), AcOK (100 mg, 1.02 mmol) を 1,4-dioxane (4 mL) に溶解し Ar 雰囲気下 100°C で 3 時間攪拌した。反応液を水に注ぎ AcOEt で抽出した。有 機層を brine で洗浄し MgSO₄ で乾燥した。溶液を濾過して溶媒留去し残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(eluent; hexane/AcOEt = 10:1 v/v) により精製し **42** (86 mg, 0.17 mmol, 68%) を無色の油状物資として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (dd, *J* = 7.6, 7.6 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.47-7.38 (m, 4H), 6.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.73 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.06 (t, *J* = 6.4 Hz,

2H), 1.88-1.81 (m, 2H), 1.58-1.49 (m, 2H), 1.25 (s, 12H), 1.00 (t, J = 7.2 Hz, 3H).

4-[4-Butoxy-3-({[2-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzoyl]amino}methyl)phenyl]-3fluoro-benzoic acid (43a)



42 (87 mg, 0.18 mmol), 4-bromo-3-fluorobenzoic acid (35 mg, 0.16 mmol) を THF (4 mL), H₂O (1 mL) に溶解し K₂CO₃ (36 mg, 0.26 mmol), (Ph₃P)₂PdCl₂ (10 mg, 0.014 mmol) を加えAr雰囲気下, 5分間 sonication

を行い, 50℃ で 5 時間撹拌した。反応液を水に注ぎ 1 mol/L 塩酸水溶液で酸性 化し AcOEt で抽出した。有機層を brine で洗浄し MgSO4 で乾燥した。溶液を濾 過して溶媒留去し残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (eluent; hexane/AcOEt = 3:1 v/v) により精製し 43a (65 mg, 0.13 mmol, 80%) を砂状結晶と して得た。

Mp 219-221°C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.29 (dd, *J* = 8.0, 8.0 Hz, 1H), 7.88 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 7.82 (dd, *J* = 11.2, 1.6 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.55-7.49 (m, 4H), 7.41 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.76 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.12 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.96-1.84 (m, 2H), 1.60-1.51 (m, 2H), 1.02 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). HRMS (FAB) calcd for C₂₆H₂₃F₅NO₄ 508.1548; found 508.1543 (M+H)⁺

4-[4-Butoxy-3-({[2-Fluoro-4-(trifluoromethyl)benzoyl]amino}methyl)phenyl]-3chloro-benzoic acid (43b)



42 (87 mg, 0.18 mmol), 4-bromo-3-chlorobenzoic acid (38 mg, 0.16 mmol) を THF (4 mL), H₂O (1 mL) に溶解し K₂CO₃ (36 mg, 0.26 mmol), (Ph₃P)₂PdCl₂ (10 mg, 0.014 mmol) を加え Ar 雰囲気下, 5 分間 sonication を行い, 50°C で 5 時間撹拌した。反応液を水に注ぎ 1 mol/L 塩酸水溶 液で酸性化し AcOEt で抽出した。有機層を brine で洗浄し MgSO₄ で乾燥した。 溶液を濾過して溶媒留去し残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(eluent; hexane/AcOEt = 3:1 v/v) により精製し **43b** (60 mg, 0.12 mmol, 74%) を砂状結晶 として得た。

Mp 212-214°C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.29 (dd, *J* = 7.6, 7.6 Hz, 1H), 8.17 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.95 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 7.55-7.50 (m, 3H), 7.44-7.40 (m, 3H), 6.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.76 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.12 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.91-1.84 (m, 2H), 1.61-1.51 (m, 2H), 1.02 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). HRMS (FAB) calcd for C₂₆H₂₃ClF₄NO₄ 524.1253; found 524.1247 (M+H)⁺

4-[4-Butoxy-3-({[2-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzoyl]amino}methyl)phenyl]-3methyl-benzoic acid (43c)



42 (86 mg, 0.17 mmol), 4-bromo-3-methylbenzoic acid (30 mg, 0.14 mmol) を THF (4 mL), H₂O (1 mL)に溶解し K₂CO₃ (180 mg, 1.30 mmol), (Ph₃P)₂PdCl₂ (10 mg, 0.014 mmol) を加え Ar 雰囲気下, 5 分間 sonication を行い, 50°C で 5 時間攪拌した。反応液を水に注ぎ 1 mol/L 塩酸水溶液で酸性 化し AcOEt で抽出した。有機層を brine で洗浄し MgSO₄ で乾燥した。溶液を濾 過して溶媒留去し, 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (eluent; hexane/AcOEt = 3:1 v/v) により精製し **43c** (25 mg, 0.050 mmol, 36%) を砂状結晶 として得た。

Mp 241-243°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6) δ 12.86 (br, 1H) 8.93 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.83-7.76 (m, 4H), 7.66 (d, *J* = 8.4, 1H), 7.27-7.24 (m, 3H), 7.07 (d, *J* = 9.2, 1H), 4.50 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.06 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.27 (s, 3H), 1.78-1.72 (m, 2H), 1.54-1.44 (m, 2H), 0.94 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). HRMS (FAB) calcd for C₂₇H₂₆F₄NO₄ 504.1798; found 504.1798 (M+H)⁺

Methyl 3-methyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzoate (45)



Methyl 4-Bromo-3-methylbenzoate 44 (1.64 g, 7.16 mmol), bis(pinacolato)diboron (2.00 g, 7.88 mmol), (Ph₃P)₂PdCl₂ (100 mg, 0.142 mmol), AcOK (2.80 g, 28.5 mmol) を 1,4-dioxane (50 mL) に溶解し Ar 雰囲気下 100°C で 3 時間攪拌した。反応液を 水に注ぎ AcOEt で抽出した。有機層を brine で洗浄し MgSO₄ で乾燥した。溶液 を濾過して溶媒留去し残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(eluent; hexane/AcOEt = 10:1 v/v) により精製し 45 (1.84 g, 6.61 mmol, 92%) を無色の油状 物資として得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.82-7.80 (m, 3H), 3.91 (s, 3H), 2.57 (s, 3H), 1.36 (s, 12H).

N-[(5-Bromo-2-hydroxy-phenyl)methyl]-2-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzamide (47)



5-Bromosalicylaldehyde (46) (2.50 g, 12.1 mmol) 及び 17 (800 mg, 3.98 mmol) を toluene (50 mL) に溶解し, TFA (2.21 mL, 29.8 mmol), 次いで triethylsilane

(4.77 mL, 29.9 mmol) を溶解し 48 時間還流した。反応液を溶媒留去し, 残渣を シリカゲルカラムクロマトグラフィー(eluent; hexane/AcOEt = 5:1 v/v) により精 製し 47(470 mg, 1.20 mmol, 30%) を白色固体として得た。 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.19 (s, 1H), 8.28 (dd, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.60-7.52 (m, 2H), 7.44 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 7.34-7.31 (m, 2H), 4.54 (dd, *J* = 6.4, 1.2 Hz, 2H).

Methyl 4-[3-({[2-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzoyl]amino}methyl)-4-hydroxyphenyl]-3-methyl-benzoate (48)



47 (550 mg, 1.40 mmol), methyl 3-methyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzoate(**45**) (470 mg, 1.69 mmol) を 1,4-dioxane (5 mL), H₂O (1.2 mL) に溶解 し K₂CO₃ (290 mg, 2.10 mmol), (Ph₃P)₂PdCl₂ (50 mg, 0.071 mmol) を加え Ar 雰囲 気下, 5 分間 sonication を行い, 60°C で 5 時間攪拌した。反応液を水に注ぎ 1 mol/L 塩酸水溶液で酸性化し AcOEt で抽出した。有機層を brine で洗浄し MgSO₄ で乾燥した。溶液を濾過して溶媒留去し残渣をシリカゲルカラムクロマトグラ フィー(eluent; hexane/AcOEt = 3:1 v/v) により精製し **48** (128 mg, 0.277 mmol, 20%) を自色粉末として得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.17 (s, 1H), 8.31 (dd, *J* = 7.6, 7.6 Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.87 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 7.64-7.58 (m, 1H), 7.57 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.21 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.65 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 2.32 (s, 3H).

Methyl 4-[4-ethoxy-3-({[2-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzoyl]amino} methyl) phenyl]-3-methyl-benzoate (49a)



DMF (2 mL) に溶解した **48** (150 mg, 0.325 mmol) に iodoethane (58 mg, 0.37 mmol), K₂CO₃ (51 mg, 0.37 mmol) を加え室温で一晩撹拌した。反応 液を水に注ぎ AcOEt で抽出し,有機層を brine で洗浄し MgSO₄ で乾燥した。溶 液を濾過して溶媒留去し残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(eluent; hexane/AcOEt = 5:1 v/v) により精製し **49a** (98 mg, 0.20 mmol, 62%) を白色粉末と して得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.26 (dd, J = 7.6, 7.6 Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.87 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 7.56-7.48 (m, 2H), 7.39 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.24 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.73 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.17 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 1.52 (t, J = 7.2 Hz, 3H).

Methyl 4-[3-({[2-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzoyl]amino}methyl)-4-propoxyphenyl]-3-methyl-benzoate (49b)



DMF (1 mL) に溶解した **48** (43 mg, 0.093 mmol) に iodopropane (19 mg, 0.11 mmol), K₂CO₃ (15 mg, 0.11 mmol) を加え室温で一晩撹拌した。反応 液を水に注ぎ AcOEt で抽出し, 有機層を brine で洗浄し MgSO₄ で乾燥した。溶 液を濾過して溶媒留去し残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(eluent; hexane/AcOEt = 5:1 v/v) により精製し **49b** (36 mg, 0.072 mmol, 73%) を白色粉末 として得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (dd, *J* = 7.6, 7.6 Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.87 (dd, *J* = 7.6, 1.6 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.48-7.42 (m, 1H), 7.39 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H),

7.32 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.28-7.26 (m, 1H), 7.24 (dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.74 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 4.06 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 1.96-1.86 (m, 2H), 1.11 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H).

Methyl 4-[3-({[2-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzoyl]amino}methyl)-4-pentoxyphenyl]-3-methyl-benzoate (49c)



DMF (1 mL) に溶解した **48** (43 mg, 0.093 mmol) に iodopentane (21 mg, 0.12 mmol), K₂CO₃ (15 mg, 0.11 mmol) を加え室温で一晩撹拌した。反応 液を水に注ぎ AcOEt で抽出し, 有機層を brine で洗浄し MgSO₄ で乾燥した。溶 液を濾過して溶媒留去し残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(eluent; hexane/AcOEt = 5:1 v/v) により精製し **49c** (45 mg, 0.085 mmol, 89%) を白色粉末 として得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (dd, *J* = 8.0, 8.0 Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.87 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 7.53 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 7.46-7.42 (m, 1H), 7.39 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.28-7.26 (m, 1H), 7.24 (dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.73 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.09 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 1.92-1.82 (m, 2H), 1.53-1.37 (m, 2H), 0.94 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

4-[4-Ethoxy-3-({[2-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzoyl]amino}methyl) phenyl]-3methyl-benzoic acid (50a)



49a (97 mg, 0.20 mmol), LiOH-H₂O (17 mg, 0.41 mmol) を THF (5 mL), MeOH (3 mL), 水 (3.5 mL) に溶解し 100°C で 3 時間攪拌した。THF, MeOH を留去し 1 mol/L HCl 水溶液を加えて酸性にした。AcOEt で抽出し, 有機 層を brine で洗浄し MgSO₄ で乾燥した。溶液を濾過して溶媒留去し残渣をシリ カゲルカラムクロマトグラフィー(eluent; hexane/AcOEt = 3:1 v/v) により精製し **50a** (90 mg, 0.19 mmol, 96%) を砂状結晶として得た。

Mp 260-261°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.86 (s, 1H), 8.94 (dd, J = 6.0, 6.0 Hz, 1H), 7.83-7.74 (m, 4H), 7.65 (d, J = 8.0, 1H), 7.27-7.22 (m, 3H), 7.07 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 4.49 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 4.12 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 2.27 (s, 3H), 1.38 (t, J = 6.8 Hz, 3H). HRMS (FAB) calcd for C₂₅H₂₂F₄NO₄ 476.1485; found 476.1466 (M+H)⁺.

4-[3-({[2-Fluoro-4-(trifluoromethyl)benzoyl]amino}methyl)-4-propoxy-phenyl]-3methyl-benzoic acid (50b)



49b (36 mg, 0.072 mmol), LiOH-H₂O (6.0 mg, 0.14 mmol) を THF (5 mL), MeOH (3 mL), 水 (3.5 mL) に溶解し 100°C で 3 時間撹拌した。THF, MeOH を留去し 1 mol/L HCl 水溶液を加えて酸性にした。AcOEt で抽出し, 有機

層を MgSO₄ で乾燥した。溶液を濾過して溶媒留去し残渣をシリカゲルカラムク ロマトグラフィー(eluent; hexane/AcOEt = 3:1 v/v) により精製し **50b** (33 mg, 0.067 mmol, 93%) を砂状結晶として得た。

Mp 224-225°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.87 (s, 1H), 8.92 (dd, *J* = 6.0, 6.0 Hz, 1H), 7.85-7.76 (m, 4H), 7.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.27-7.24 (m, 3H), 7.07 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.51 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.03 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.27 (s, 3H), 1.96-1.86 (m, 2H), 1.11 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). HRMS (FAB) calcd for C₂₆H₂₄F₄NO₄ 490.1642; found 490.1647 (M+H)⁺.

4-[3-({[2-fluoro-4-(trifluoromethyl)benzoyl]amino}methyl)-4-pentoxy-phenyl]-3methyl-benzoic acid (50c)



49c (45 mg, 0.085 mmol), LiOH-H₂O (8.0 mg, 0.19 mmol) を THF (5 mL), MeOH (3 mL), 水 (3.5 mL) に溶解し 100°C で 3 時間撹拌した。THF, MeOH を留去し 1 mol/LHCl 水溶液を加えて酸性にした。AcOEt で抽出し, 有機層を MgSO₄ で乾燥した。溶液を濾過して溶媒留去し残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(eluent; hexane/AcOEt = 3:1 v/v) により精製し **50c** (39 mg, 0.075 mmol, 89%) を砂状結晶として得た。

Mp 228-230°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.87 (s, 1H), 8.93 (dd, J = 5.6, 5.6 Hz, 1H), 7.83-7.76 (m, 4H), 7.65 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.27-7.24 (m, 3H), 7.06 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 4.50 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 4.05 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.27 (s, 3H), 1.80-1.73 (m, 2H), 1.48-1.31 (m, 4H), 0.88 (t, J = 7.2 Hz, 3H). HRMS (FAB) calcd for C₂₈H₂₈F₄NO₄ 518.1956; found 518.1965 (M+H)⁺.

参考文献

- (1) Nuclear Receptors Nomenclature Committee. Cell 1999, 97, 161-163.
- (2) Issemann I.; Green S. Nature 1990, 347, 645-650.
- (3) Dreyer C.; Krey G.; Keller H.; Givel F.; Helftenbein G.; Wahli W. *Cell* 1992, 68, 879-887.
- (4) Schmidt A.; Endo N.; Rutledge S. J.; Vogel R.; Shinar D.; Rodan G. A. Mol. Endocrinol. 1992, 6, 1634-1641.
- (5) Willson, T. M.; Brown, P. J.; Sternbach, D. D.; Henke, B.R. J. Med. Chem. 2000, 43, 527-550.
- (6) Aoyama, T.; Peters, J. M.; Iritani, N.; Nakajima, T.; Furihata, K.; Hashimoto, T.;Gonzalez, F. J. J. Biol. Chem. 1998, 273, 5678-5684.
- (7) Lambe, K. G.; Tugwood, J. D. Eur. J. Biochem. 1996, 239, 1-7.
- (8) Tontonoz, P.; Hu, E.; Devine, J.; Geale, E. G.; Spiegelman, B. M. Mol. Cell. Biol. 1995, 15, 351-357.
- (9) Tai, T. A.; Jennermann, C.; Brown, K. K.; Oliver, B. B.; MacGinnitie, M. A.;
 Wilkison, W. O.; Brown, H. R.; Lehmann, J. M.; Kliewer, S. A.; Morris, D. C.;
 Graves, R. A. J. Biol. Chem. 1996, 271, 29909-29914.
- (10) Amri, E. Z.; Bonino, F.; Ailhaud, G.; Abumrad, N. A.; Grimaldi, P. A. J. Biol Chem. 1995, 270, 2367-2371.
- (11) Oliver, W. R. Jr.; Shenk, J. L.; Snaith, M. R.; Russell, C. S.; Plunket, K. D.; Bodkin, N. L.; Lewis, M. C.; Winegar, D. A.; Sznaidman, M. L.; Lambert, M. H.; Xu, E.; Sternbach, D. D.; Kliewer, S. A.; Hansen, B. C.; Willson, T. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001, 98, 5306-5311.
- (12) Tanaka, T.; Yamamoto, J.; Iwasaki, S.; Asaba, H.; Hamura, H.; Ikeda, Y.;Watanabe M.; Magoori, K.; Ioka, R. X.; Tachibana, K.; Watanabe, Y.; Uchiyama, Y.;

Sumi, K.; Iguchi, H.; Ito, S.; Doi, T.; Hamakubo, T.; Naito, M.; Auwerx, J.; Yanagisawa, M.; Kodama, T.; Sakai, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100, 15924-15929.

- (13) Desvergne, B.; Wahli, W. Endocr. Rev. 1999, 20, 649-688.
- (14) Rakic, B.; Sagan, S. M.; Noestheden, M.; Belanger, S.; Nan, X.; Evans, C. L.; Xie, X. S.; Pezacki, J. P. *Chem. Biol.* 2006, 13, 23-30.
- (15) Seargent, J. M.; Yates, E. A.; Gill, J. H. Brit. J. Pharmacol. 2004, 143, 933-937.
- (16) Burton, J. D.; Goldenberg, D. M.; Blumenthal, R. D. PPAR Res. 2008, 2008, 494161.
- (17) Zaytseva, Y. Y.; Wallis, N. K.; Southard, R. C.; Kilgore, M. W. Anticancer Res. 2011, 31, 813-823.
- (18) Rieusset, J.; Touri, F.; Michalik, L.; Escher, P.; Desvergne, B.; Niesor, E.; Wahli, W. *Mol. Endocrinol.* 2002, 16, 2628-2644.
- (19) He, T. C.; Chan, T. A.; Vogelstein, B.; Kinzler, K. W. Cell 1999, 99, 335-345.
- (20) Janne, P. A.; Mayer, R. J. New Engl. J. Med. 2000, 342, 1960-1968.
- (21) Barbier, O.; Fontaine, C.; Fruchart, J.; Staels, B. *Trends Endocrin. Met.* **2004**, 15, 324-330.
- (22) Feinstein, D. L.; Spagnolo, A.; Akar, C.; Weinberg, G.; Murphy, P.; Gavrilyuk, V.;Russo, C. D. *Biochem. Pharmacol.* 2005, 70, 177-188.
- (23) Gardner, O. S.; Dewar, B. J.; Graves, L. M. Mol. Pharmacol. 2005, 68, 933-941.
- (24) Ropero, A. B.; Juan-Pico, P.; Rafacho, A.; Fuentes, E.; Bermudez-Silva, F. J.; Roche,
 E.; Quesada, I.; Rodriguez de Fonseca, F.; Nadal, A. J. Endocrinol. 2009, 200,127-138.
- (25) Gustafsson, M. C. U.; Knight, D.; Palmer, C. N. A. PLoS One 2009, 4, e7046.
- (26) Moraes, L. A.; Spyridon, M.; Kaiser, W. J.; Jones, C. I.; Sage, T.; Atherton, R. E. L.;
 Gibbins, J. M. J. Thromb. Haemost. 2010, 8, 577-587.
- (27) Genini, D.; Garcia-Escudero, R.; Carbone, G. M.; Catapano, C. V. *PLoS One* 2012, 7, e46009.

- (28) Marcus, S. L.; Miyata, K. S.; Zhang, B.; Subramani, S.; Rachubinski, R. A.; Capone,
 J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, 90, 5723-5727.
- (29) Elbrecht, A.; Chen, Y.; Cullinan, C. A.; Hayes, N.; Leibowitz, M. D.; Moller, D. E.;
 Berger, J. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **1996**, 224, 431-437.
- (30) Yue, L.; Ye, F.; Xu, X.; Shen, J.; Chen, K.; Shen, X.; Jiang, H. *Biochimie* **2005**, 87, 539-550.
- (31) Yue, L.; Ye, F.; Gui, C.; Luo, H.; Cai, J.; Shen, J.; Chen, K.; Shen, X.; Jiang, H.Protein Sci. 2005, 14, 812-822.
- (32) Ye, F.; Zhang, Z.; Luo, H.; Shen, J.; Chen, K.; Shen, X.; Jiang, H. *ChemBioChem* 2006, 7, 74-82.
- (33) Yang, Y.; Shang, W.; Zhou, L.; Jiang, B.; Jin, H.; Chen, M. Biochem. Bioph. Res. Co. 2007, 353, 225-230.
- (34) Li, Y.; Li, L.; Chen, J.; Hu, T.; Huang, J.; Guo, Y.; Jiang, H.; Shen, X. Acta Pharmacol. Sin. 2009, 30, 1351-1358.
- (35) Lu, W.; Che, P.; Zhang, Y.; Li, H.; Zou, S.; Zhu, J.; Deng, J.; Shen, X.; Jiang, H.; Li, J.; Huang J. J. Steroid Biochem. 2011, 124, 112-120.
- (36) Malek, M.; Hoang, M.; Jia, Y.; Lee, J.; Jun, H.; Lee, D.; Lee, H.; Lee, C.; Lee, M.;
 Hwang, B.; Lee, S. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 2013, 430, 1322-1328.
- (37) Temporini, C.; Pochetti, G.; Fracchiolla, G.; Piemontese, L.; Montanari, R.; Moaddel, R.; Laghezza, A.; Altieri, F.; Cervoni, L.; Ubiali, D.; Prada, E.; Loiodice, F.; Massolini, G.; Calleri, E. *J. Chromatogr. A* 2013, 1284, 36-43.
- (38) Lieber, S.; Scheer, F.; Meissner, W.; Naruhn, S.; Adhikary, T.; Mueller-Bruesselbach, S.; Diederich, W. E.; Mueller, R. J. Med. Chem. 2012, 55, 2858-2868.
- (39) Nevin, D. K.; Peters, M. B.; Carta, G.; Fayne, D.; Lloyd, D. G. J. Med. Chem.
 2012, 55, 4978-4989.
- (40) Hurtado, O.; Ballesteros, I.; Cuartero, M. I.; Moraga, A.; Pradillo, J. M.; Ramirez-

Franco, J.; Bartolome-Martin, D.; Pascual, D.; Torres, M.; Sanchez-Prieto, J.; Salom,J. B.; Lizasoain, I.; Moro, M. A.; *Neurochem. Int.* 2012, 61, 119-127.

- (41) Qin, Q.; Knapinska, A.; Dobri, N.; Madoux, F.; Chase, P.; Hodder, P.; Petrukhin, K.*J. Ocul. Pharmacol. Th.* 2013, 29, 298-309.
- (42) 八木 国夫,吉田 善一,太幡 利一 1958 『螢光-理論・測定・応用』南江堂
- (43) Miyachi, H. Yakugaku Zasshi 2004, 124, 803-813.
- (44) Kasuga, J.; Makishima, M.; Hashimoto, Y.; Miyachi, H. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006, 16, 554-558.
- (45) Kasuga, J.; Nakagome, I.; Aoyama, A.; Sako, K.; Ishizawa, Michiyasu; Ogura, Michitaka; Makishima, Makoto; Hirono, Shuichi; Hashimoto, Yuichi; Miyachi, H. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 5177-5190.
- (46) Kasuga, J.; Yamasaki, D.; Ogura, K.; Shimizu, M.; Sato, M.; Makishima, M.; Doi, T.; Hashimoto, Y.; Miyachi, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, 18, 1110-1115.
- (47) Ohashi, M.; Oyama, T.; Nakagome, I.; Satoh, M.; Nishio, Y.; Nobusada, H.; Hirono, S.; Morikawa, K.; Hashimoto, Y.; Miyachi, H. J. Med. Chem. 2011, 54, 331-341.
- (48) Ban, S.; Kasuga, J.; Nakagome, I.; Nobusada, H.; Takayama, F.; Hirono, S.; Kawasaki, H.; Hashimoto, Y.; Miyachi, H. *Bioorg. Med. Chem.* 2011, 19, 3183-3191.
- (49) Ban, S.; Oyama, T.; Kasuga, J.; Ohgane, K.; Nishio, Y.; Morikawa, K.; Hashimoto,Y.; Miyachi, H. *Bioorg. Med. Chem.* 2012, 20, 3460-3464.
- (50) Ban, S.; Ueda, Y.; Ohashi, M.; Matsuno, K.; Ikeda, M.; Kato, N.; Miyachi, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013, 23, 4774-4778.
- (51) Younossi, Z. M. Aliment. Pharmacol. Therapeut. 2008, 28, 2-12.
- (52) Ludwig, J.; Viggiano, T. R.; McGill, D. B.; Oh, B. J. Mayo Clin. Proc. **1980**, 55, 434-438.

- (53) 西原利治, 大西三朗 *肝臓*, 2003, 44, 541-545.
- (54) 大西三朗 肝臓, 2004, 45, 57.
- (55) 大西三朗 西原利治. 日本内科学会雜誌, 2009, 98, 2101-2111.
- (56) Ip, E.; Farrell G. C.; Robertson G.; Hall P.; Kirsch R.; Leclercq I. *Hepatology* 2003, 28, 123-132.
- (57) Ip E.; Farrell G.; Hall P.; Robertson G.; Leclercq I. *Hepatology* **2004**, 39, 1286-1296.
- (58) Oyama, T.; Toyota, K.; Waku, T.; Hirakawa, Y.; Nagasawa, N.; Kasuga, J.; Hashimoto, Y.; Miyachi, H.; Morikawa, K. *Acta Crystallogr., Sect.D* **2009**, 65, 786-795.
- (59) Evans, D. A.; Takacs, J. M. Tetrahedron Lett. 1980, 21, 4233-4236.
- (60) Dubie, D.; Scholte, A. A. Tetrahedron Lett. 1999, 40, 2295-2298.
- (61) Brook, M. A.; Chan, T. H. Synthesis. 1983, 201-203.
- (62) Takayama, F.; Egashira, T.; Kawasaki, H.; Mankura, M.; Nakamoto, K.; Okada, S.;Mori, A. J. Clin. Biochem. Nutr. 2009, 45, 335-340.
- (63) Nakamoto, K.; Takayama, F.; Mankura, M.; Hidaka, Y.; Egashira, T.; Ogino, T.;Kawasaki, H.; Mori. A. J. Clin. Biochem. Nutr. 2009, 44, 239-246.
- (64) Holoman, J.; Glasa, J.; Galbavy, S.; Danis, D.; Molnarova, A.; Kazar, J.; Bednarova, A.; Misianik, J. *Bratisl. Lek. Listy.* 2002, 103, 70-75.
- (65) Araya, Y.; Kasuga, J.; Toyota, K.; Hirakawa, Y.; Oyama, T.; Makishima, M.; Morikawa, K.; Hashimoto, Y.; Miyachi, H. *Chem. Pharm. Bull.* 2008, 56, 1357-1359.
- (66) Kuwabara, N.; Oyama, T.; Tomioka, D.; Ohashi, M.; Yanagisawa, J.; Shimizu, T.; Miyachi, H. *J.Med.Chem.* 2012, 55, 893-902.
- (67) Goto, J.; Kataoka, R.; Muta, H.; Hirayama, N. J. Chem. Inf. Model. 2008, 48, 583-590.
- (68) Marme, N.; Knemeyer, J.; Sauer, M.; Wolfrum, J. *Bioconjugate Chem.* 2003, 14, 1133-1139.

- (69) 井上 晴夫, 高木 克彦, 佐々木 政子, 朴 鐘震 1999 『光化学 I』 丸善
- (70) De, R.; Ganguly, T.; Banerjee, S. B. Chem. Phys. Lett. 1992, 199, 17-20.
- (71) Periasamy, N.; Bicknese, S.; Verkman, A. S. Photochem. Photobiol. **1996**, 63, 265-271.
- (72) Vaiana, A. C.; Neuweiler, H.; Schulz, A.; Wolfrum, J.; Sauer, M.; Smith, J. C. J. Am.
 Chem. Soc. 2003, 125, 14564-14572.
- (73) Doose S.; Neuweiler H.; Sauer M. Chemphyschem 2005, 6, 2277-2285.
- (74) 木下 一彦, 御橋 廣眞 1983 『螢光測定』学会出版センター
- (75) Abe, R.; Ohashi, H.; Iijima, I.; Ihara, M.; Takagi, H.; Hohsaka, T.; Ueda, H. J. Am.
 Chem. Soc. 2011, 133, 17386-17394
- (76) Thomas, D. L. Curr. Top. Microbial. Immunol. 2000, 242, 25-41.
- (77) Chevaliez, S.; Pawlotsky, J. M. Adv. Drug. Deliv. Rev. 2007, 59, 1222-1241.
- (78) Kasuga, J.; Ishida, S.; Yamasaki, D.; Makishima, M.; Doi, T.; Hashimoto, Y.; Miyachi, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, 19, 6595-6599.
- (79) Ikeda, M.; Abe, K.; Dansako, H.; Nakamura, T.; Naka, K.; Kato, N.*Biochem. Bioph. Res. Co.* 2005, 329, 1350-1359.
- (80) Kato, N.; Mori, K.; Abe, K.; Dansako, H.; Kuroki, M.; Ariumi, Y.; Wakita, T.; Ikeda,
 M. *Virus Res.* 2009, 146, 41-50.
- (81) Ueda, Y.; Mori, K.; Ariumi, Y.; Ikeda, M.; Kato, N. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 2011, 409, 663-668.

略号表

Ala : alanine

- ALP : alkaline phosphatase
- ALT : alanine aminotransferase

aq. : aqueous

arb. unit : arbitrary unit

ASH : alcoholic steatohepatitis

ASP: aspartate aminotransferase

CC₅₀ : 50% cytotoxic concentration

CDHF : choline deficient high-fat diet

Compd. : compound

conc. : concentration

DCM : dichloromethane

DMF : N, N-dimethylformamide

DMSO : dimethyl sulfoxide

DTT : dithiothreitol

 EC_{50} : 50% effective concentration

EEM : excitation-emission matrix

HCV : hepatitis C virus

IC₅₀: 50% inhibitory concentration

 I_{max} : maximum percent inhibition

IFN- α : interferon α

ITC : isothermal titration calorimeter

IU : international unit

LBD : ligand binding domain
Leu : leucine

LiHMDS : lithium hexamethyldisilazide

MOE : molecular operating environment

NASH : non-alcoholic steatohepatitis

NC : normal chow

NMR : nuclear magnetic resonance

No. : numero (number)

OS : oxidative stress

PDB : Protein Data Bank

PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor

PPRE : PPAR response element

quant. : quantitative

RBV : Ribavirin

RNA : ribonucleic acid

rt : room temperature

RXR : retinoid X receptor

SI : selective index

SPR : surface plasmon resonance

t-BuOK : potassium *tert*- butoxide

TFA : trifluoroacetic acid

THF : tetrahydrofuran

TR-FRET : time-resolved fluorescence resonance energy transfer

Trp : tryptophan

本研究の実施において終始懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 宮地弘幸 教授, 松野研司 准教 授, 脇稔 助教に心より感謝の意を表します。

本論文の審査を行って頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研 究科 竹内靖雄 教授, 榎本秀一 教授, 澤田大介 教授に深く感謝申し 上げます。

本研究において X 線結晶構造解析,タンパク質の作成を実施して 下さいました山梨大学生命環境学部 大山拓次 助教に深く御礼申し 上げます。抗 HCV 活性を測定して下さいました岡山大学大学院医歯 薬学総合研究科 加藤宜之 教授,池田正徳 准教授,上田優輝 修士に 深く御礼申し上げます。PPAR 転写活性化試験を実施して下さいまし た本研究室 大橋雅生 修士に深く御礼申し上げます。

本研究において様々な面でご協力下さいました有機医薬品開発学 分野の皆様に心より感謝の意を表します。

106