

博士論文

脂質調節因子（PPAR γ 、HMGR）のアゴニスト
作用によらない機能制御化合物の創製

豊田洋介

第 I 部

HMGR 分解誘導剤 SR12813 の光親和性標識プロ ローブ候補分子の創製

1 章 研究背景

1-1 コレステロールの生合成と HMGR

コレステロールは細胞膜の 50%程度を占める主成分であり、ステロイド系ホルモンやビタミン D、胆汁酸の前駆体であることから、生体において必須の成分である。しかしながら、コレステロール量は過剰であっても不足していても生体にとっては有毒となる為、生体内におけるコレステロール量は様々なフィードバック機構により精緻に調節されている^{1,2}。

生体内のコレステロールの蓄積経路には、食物から吸収する経路と、主に肝臓において生合成される経路とがある。生体におけるコレステロール合成は、Fig. 1 のようなアセチル CoA を出発基質としたおよそ 30 段階程度の酵素反応によって行われている。コレステロール合成に関わる酵素はいずれも最終産物であるコレステロールや合成中間体によるネガティブフィードバック制御を受ける。このコレステロール合成における律速酵素となっているのが HMG-CoA からメバロン酸への還元を行う 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR) である。HMGR は転写レベルによるネガティブフィードバック制御と翻訳後レベルでのネガティブフィードバック制御を受けることが知られており、詳細については後述する。

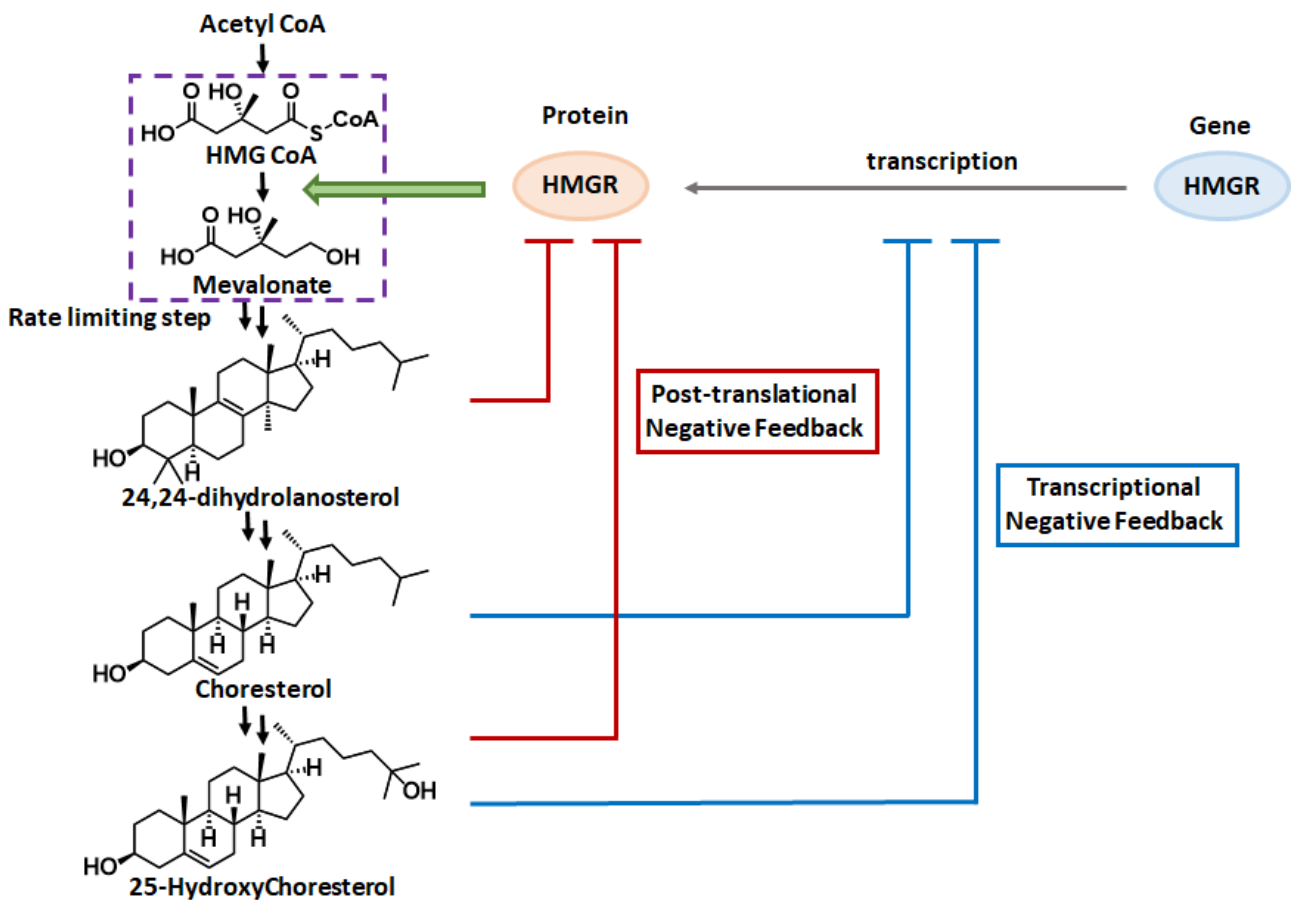


Figure 1 コレステロール生合成経路と HMGR のネガティブフィードバック制御

1-2 HMGR の構造と機能、阻害剤

HMGR は 887 アミノ酸残基からなる小胞体膜に存在する膜タンパク質である。C 末端側に 548 アミノ酸残基からなる酵素活性に必要な触媒ドメインを、N 末端側に 339 アミノ酸残基からなる 8 回膜貫通ドメインを持っている³⁻⁵。

HMGR の酵素活性を阻害する薬剤としては高コレステロール血漿治療薬であるスタチン系薬剤がある。最初に報告されたスタチンは 1970 年代に遠藤章によってアオカビの一種 *Penicillium citrinum* から単離されたコンパクチン（メバスタチン）である⁶。コンパクチンは市販化されなかったものの、その後ロバスタチンやアトルバスタチンなどが高コレステロール血漿治療薬として使用されている。

HMGR の酵素活性は触媒ドメインに依存していることから、触媒ドメインのアミノ酸配列相同性が哺乳類間で高いことは想定されるが、一方で膜貫通ドメインについても高い相同性を保っている^{7,8}。このことから、膜貫通ドメインは単に触媒ドメインを膜上に留めるアンカーとして機能するだけではないと考えられる。実際に HMGR の膜貫通ドメインには、他のいくつかの膜タンパク質に共通する構造として sterol sensing domain (SSD) が存在しており、コレステロール量依存的に酵素としての機能を調節することに関与している⁹。

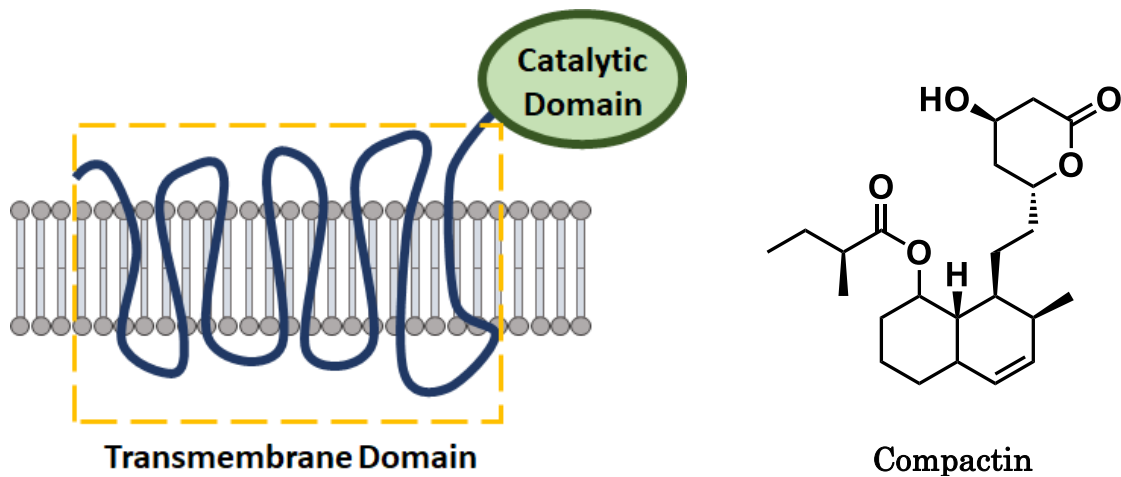


Figure 2 HMGR の構造とコンパクチンの構造

1-3 HMGR 分解活性を有する化合物

HMGR に作用しコレステロール低下作用を有する合成低分子化合物として SR12813 が知られている^{10, 11}。SR12813 はスタチンのように酵素活性を阻害するのではなく、HMGR の分解を誘導することでコレステロールの低下を引き起こすことが明らかとなっている¹²。しかしながら、SR12813 の直接的なターゲット分子は同定されておらず、その作用機序も明らかになっていない。また、このような HMGR 分解はコレステロールやコレステロール合成中間体である 24、25-ジヒドロラノステロールなどによっても引き起こされる^{13,14}。本研究ではこの SR12813 に焦点を当てている。

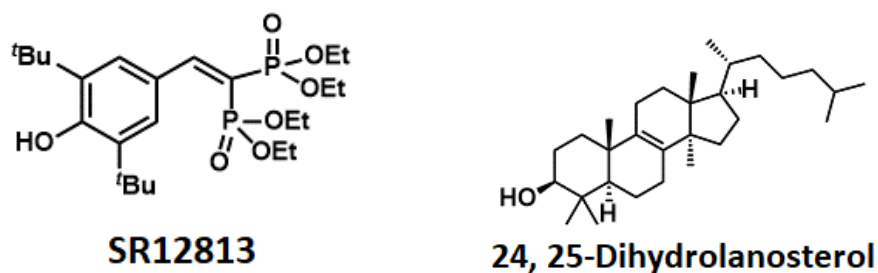


Figure 3 SR12813 と 24, 25-Dihydrolanosterol の構造

1-4 転写レベルでのネガティブフィードバック制御

HMGR の転写は転写因子である膜タンパク質 Sterol Regulatory element-binding protein (SREBP) によって制御されている¹⁵⁻¹⁸。SREBP は小胞体膜上でエスコートタンパク質である SREBP Cleavage activating protein (SCAP) と複合体を形成している。コレステロール不足時には、この複合体は COPII タンパク質と相互作用することで、小胞体からゴルジ装置へと輸送される。その後、SREBP がプロセッシングを受けることで活性化され、HMGR を含む SREBP の標的遺伝子の転写が起こる¹⁹。一方で、コレステロール過剰時には、Insulin gene (Insig) が SREBP-SCAP 複合体に結合し、SREBP-SCAP-Insig 複合体が形成される。この複合体は COPII と相互作用せず、ゴルジ装置への輸送が起こらない。すなわち、SREBP の活性化が抑制されるため、標的遺伝子の転写が起こらなくなる²⁰。この SREBP-SCAP-Insig 複合体の形成はオキシステロール (25HC) が Insig に結合すること、もしくはコレステロールが SCAP に結合することで誘導される^{21,22}。

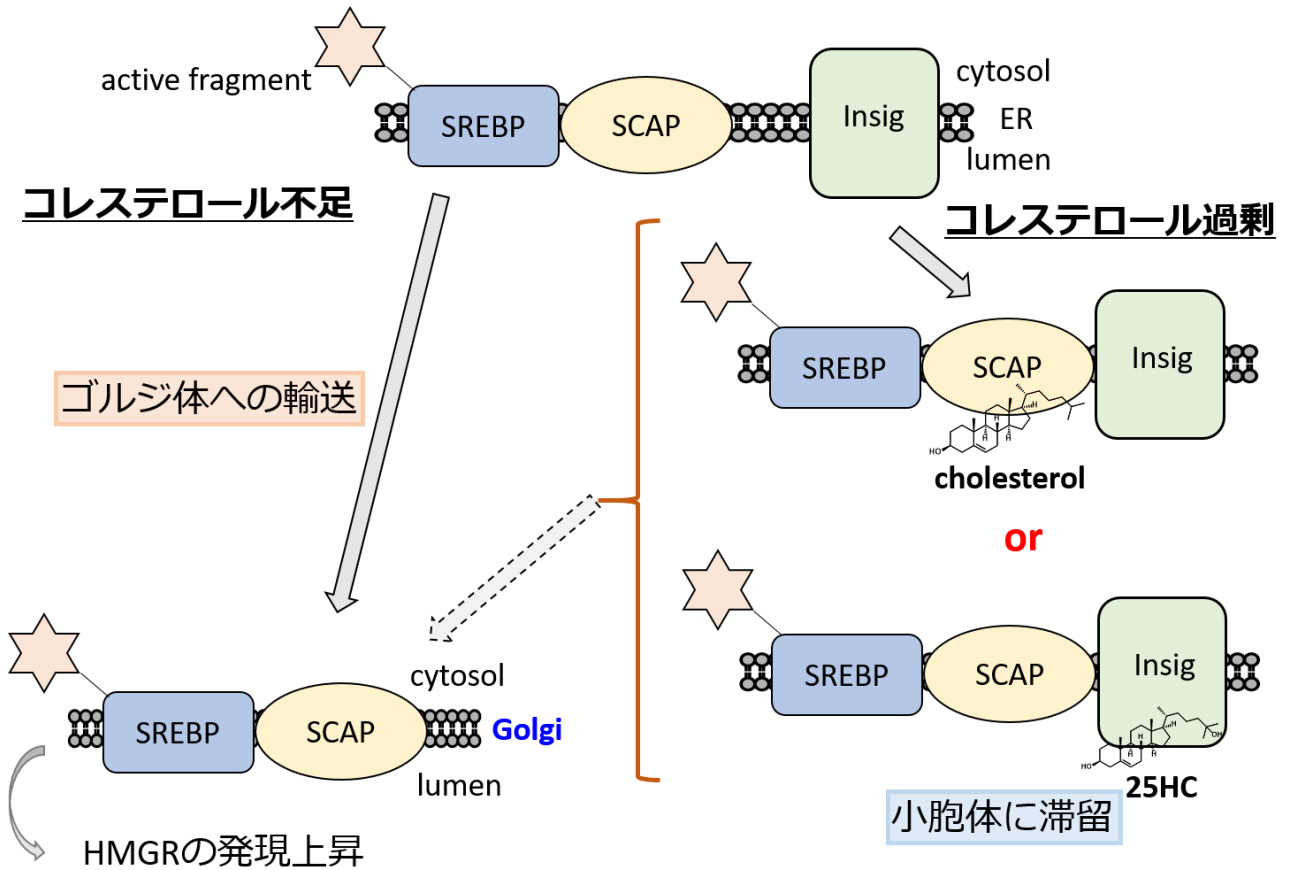


Figure 4 HMGR の転写レベルでのネガティブフィードバック制御機構

1-5 翻訳後レベルでのネガティブフィードバック制御

HMGR の翻訳後レベルでのネガティブフィードバック制御機構は未解明な部分も多く残っているが、25-Hydroxycholesterol (25HC) の場合について、現在提唱されているメカニズムを Fig. 5 に示す^{23,24}。

25HC が Insig に結合することでユビキチン E3 リガーゼ/Insig/HMGR の複合体が形成される。これにより HMGR がポリユビキチン化を受け、ユビキチンプロテアソーム系により HMGR が分解される。

HMGR 分解作用を示す化合物としては、先に紹介した SR12813 や 24、25-ジヒドロラノステロールなどがあるが、これらの化合物は Insig に結合しないことが示唆されていることから²⁵、25HC とは異なるメカニズムを介して HMGR の分解を誘導していると考えられる。

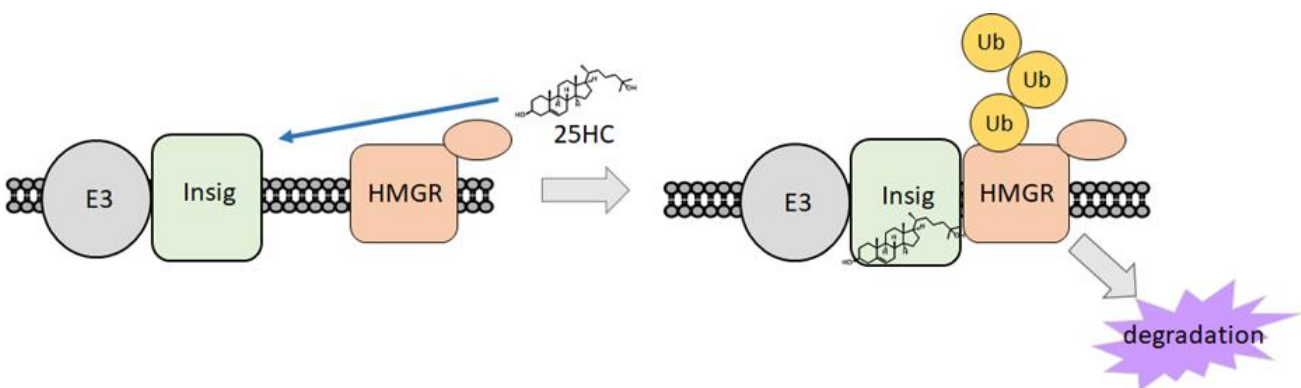


Figure 5 25HC による HMGR の翻訳後レベルでのネガティブフィードバック制御機構

1-6 HMGR にステロールや化合物が作用する可能性

先述した通り、HMGR は膜貫通ドメインに SSD を有しているが、SSD は HMGR と SCAP 間で高いアミノ酸配列相同性をもつ部位として同定された配列上のドメインである。HMGR と SCAP 以外に SSD を有する膜タンパク質としては、リソソームからコレステロールの細胞内輸送を担う NPC1、Hedgehog タンパク質の受容体 Patch1、小腸におけるコレステロール輸送体である NPC1L1 などがある⁹。

NPC1 については、SSD を含む膜貫通ドメインにステロール結合部位が存在することが示唆されており²⁶、また結晶構造解析の結果 SSD に化合物が結合できそうな空間がある事も明らかとなっている^{27,28}。さらに Ptc1 についても結晶構造が解かれ、SSD に同様の空間が存在し、さらにステロール様の電子密度があることが明らかとなった²⁹。

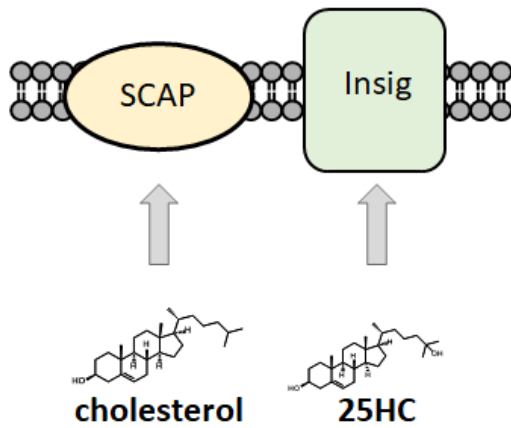
さらにステロール結合タンパク質の網羅的探索により、HMGR がコレステロールの結合タンパク質としてヒットしたという報告がある³⁰。

以上のことから、HMGR の SSD など膜貫通ドメインにステロール類が結合する可能性があると考えられる。

1-7 仮説：想定される SR12813 の作用機序

ここまで見てきたように、25HC は Insig に結合すると転写レベルと翻訳後レベルのフィードバック制御の両方を引き起こす。この Insig と 25HC の複合体が SCAP と相互作用すれば転写抑制を、HMGR と相互作用すればタンパク質分解を起こす。一方で、コレステロールは SCAP に結合することで、SCAP-Insig 間の相互作用を誘導し、転写レベルでのフィードバックを選択的に引き起こす。SR12813 は、HMGR の分解を選択的に引き起こすが、SCAP と HMGR の膜貫通領域はアミノ酸配列相同性が高いことも考慮すると、転写の場合と似たようなことが起きているのではないかと考えた。すなわち、SR12813 は HMGR に結合し、Insig と HMGR の相互作用に続く分解を引き起こすのではないかと考えた。

転写レベル



翻訳後レベル (分解)

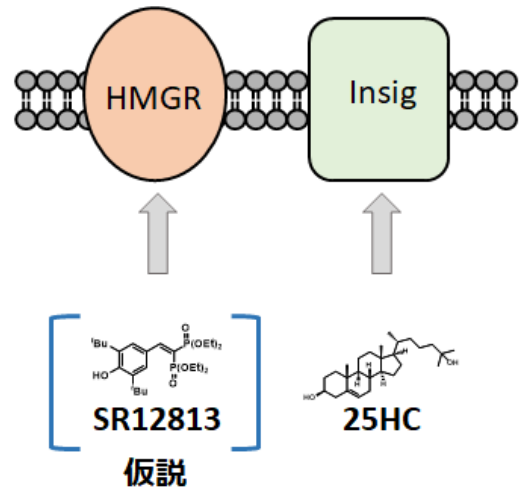


Figure 6 SR12813 の想定される作用機序

1-8 研究目的と方針

SR12813 が直接 HMGR に結合することで HMGR の分解を誘導しているという仮説を検証するため、SR12813 を光親和性標識プローブ化し、それを用いた HMGR への結合試験を行うことを目的として研究に着手した。

SR12813 を光親和性標識プローブ化する為には、Fig. 7 のように芳香族アジドやジアジリン、ベンゾフェノンなどの光親和性標識基と、検出官能基としてクリック反応を行うアルキンを、2 つとも導入する必要がある。また、ターゲットタンパク質へのラベリングを的確に行う為には、化合物のターゲットタンパク質への活性を維持することが重要である。しかしながら、ビスホスホネート構造を有する化合物について、コレステロールの合成阻害を指標とした構造活性相関の報告例はあるものの¹¹、そのコレステロールの合成阻害が HMGR 分解によるものであることは確認されておらず、SR12813 について HMGR 分解活性を指標とした構造活性相関情報がほとんどない。その為、プローブ化に必要な官能基の導入位置を明確に決めることができなかつた。そこで、これらの官能基の導入を目的とした簡易的な構造活性相関の取得を行いつつ、SR12813 のプローブ化を行うという方針で研究を進めた。

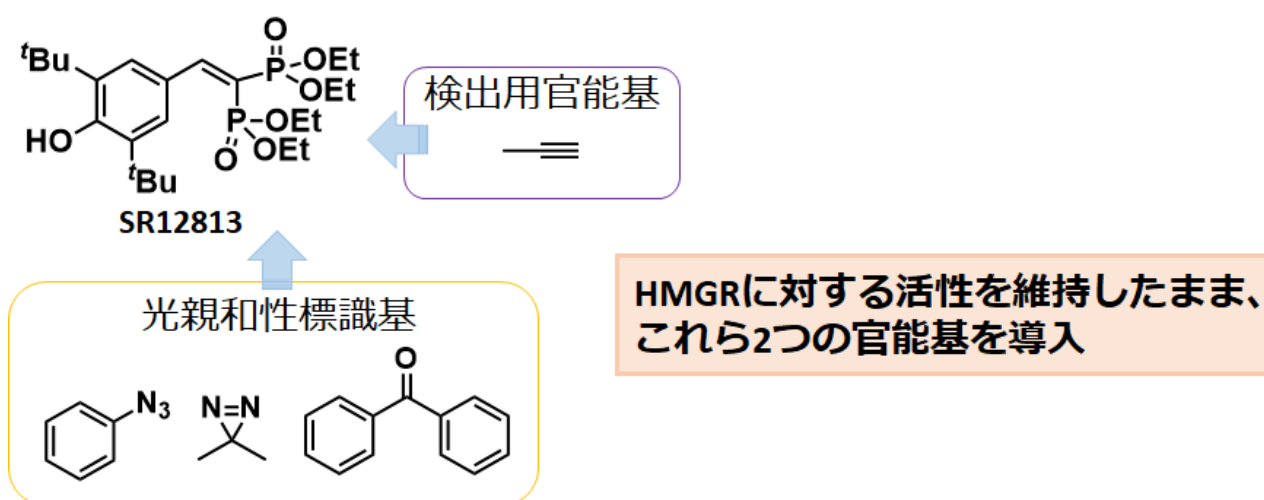


Figure 7 SR12813 の光親和性標識プローブ化

2章 SR12813のHMGR分解活性を指標とした構造活性相関

2-1 HMGR分解活性評価系の構築

HMGRの分解活性を評価するにあたり、スクリーニング性の高さを指向したルシフェラーゼを用いた評価系の構築を行った。HMGRのユビキチンプロテアソーム系による分解では、膜貫通ドメインに存在するLysine48とLysine248がユビキチン化されること、また、分解の際に起こるInsigとの相互作用には膜貫通ドメインのYIYF配列が必要であることが明らかとなっている²⁴。これらのことから、ユビキチン化を介したHMGRの分解には触媒ドメインは関与しておらず、膜貫通領域で必要十分であると考えられる。実際に触媒ドメインを欠損した変異HMGCRCで分解が起こることが確認されている^{31,32}。そこで、触媒ドメインをEmelard Lucに置変えた遺伝子(HMGR-Δcat-FLAG-Eluc)を作成し、それをHEK293細胞に発現させた安定細胞株を作成した。この細胞に対し各化合物を4時間処理し、細胞内のHMGRの減少を発光量の変化で定量した。

この評価系を用いた25ヒドロキシコレステロールのHMGR分解活性の結果をFig. 8に示す。この評価系において最大分解活性は化合物間で同程度の値を取ることから、EC₅₀での比較を行った。

HMGR-Eluc融合タンパク質

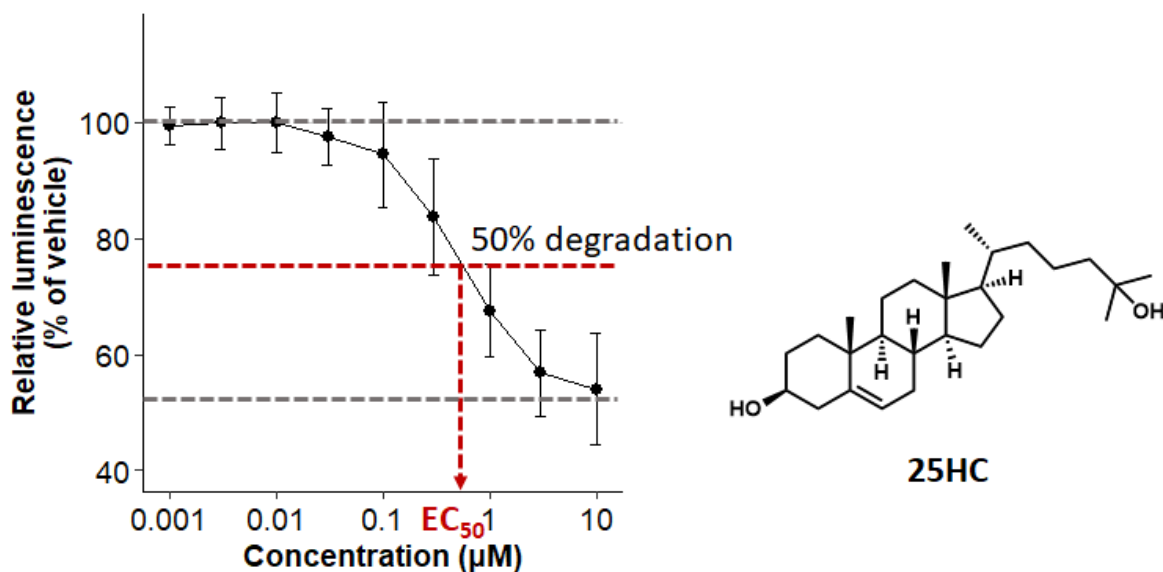
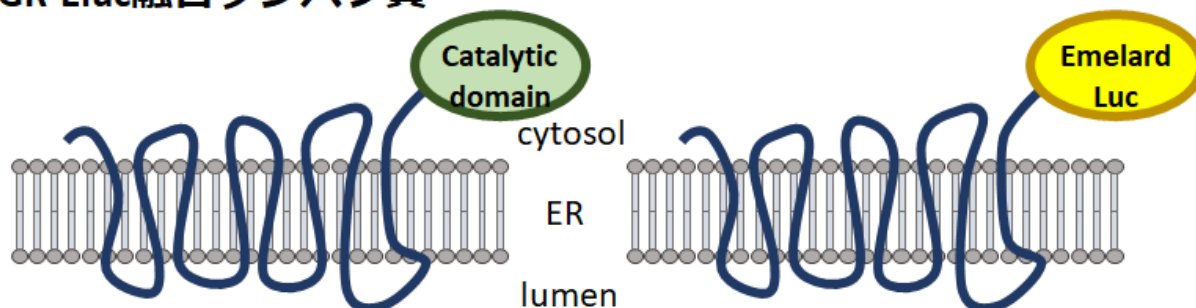
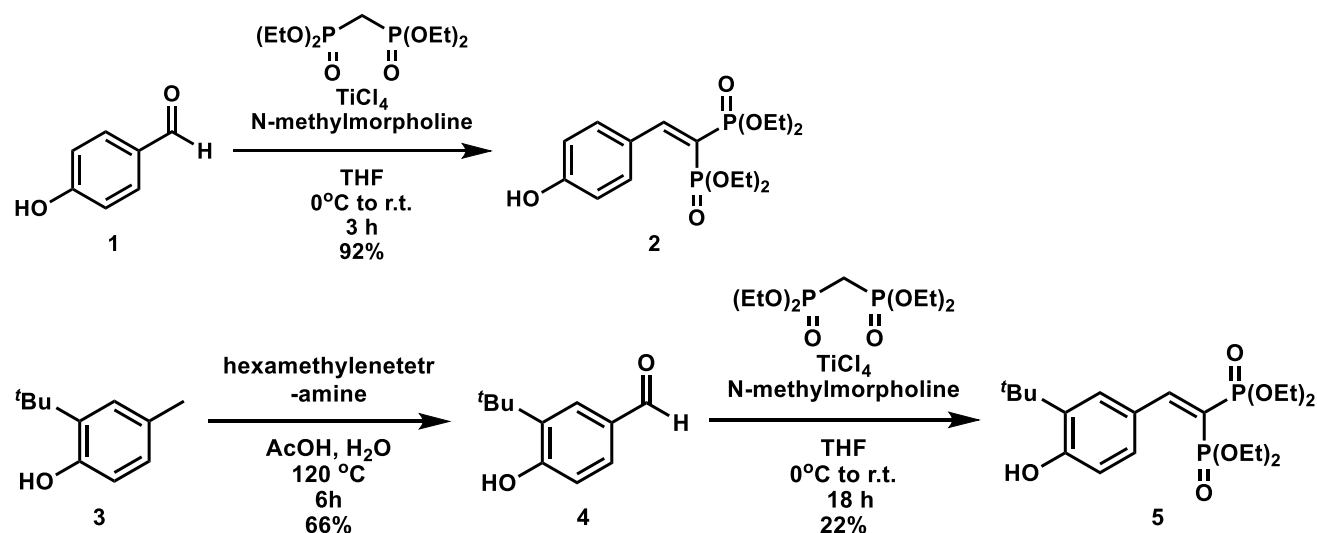


Figure 8 HMGR分解活性の評価系の構築

2-2 ターシャリーブチル基の必要性の検討

光親和性標識プローブ化に必要な置換基導入位置の検討に先んじて、リード化合物である SR12813 の構造について検討を行った。コレステロール合成阻害に関する構造活性相関の報告において、芳香環 3 位と 5 位に置換基の導入が重要であることが示唆されていたことから、HMGR 分解活性においてもこの位置に置換基の導入が必要であるかについて検討を行った。ターシャリーブチル基を 1 つ持つ化合物 **2**、1 つも持たない化合物 **5** を、Scheme 1 に沿って合成した。



Scheme 1. 化合物 **2**, **5** の合成ルート

これらの活性評価結果を table に示す。化合物 **2**、**5** のどちらにおいても活性が消失した。このことから芳香環 3 位と 5 位にはターシャリーブチル基の導入が必要であることが示唆された。

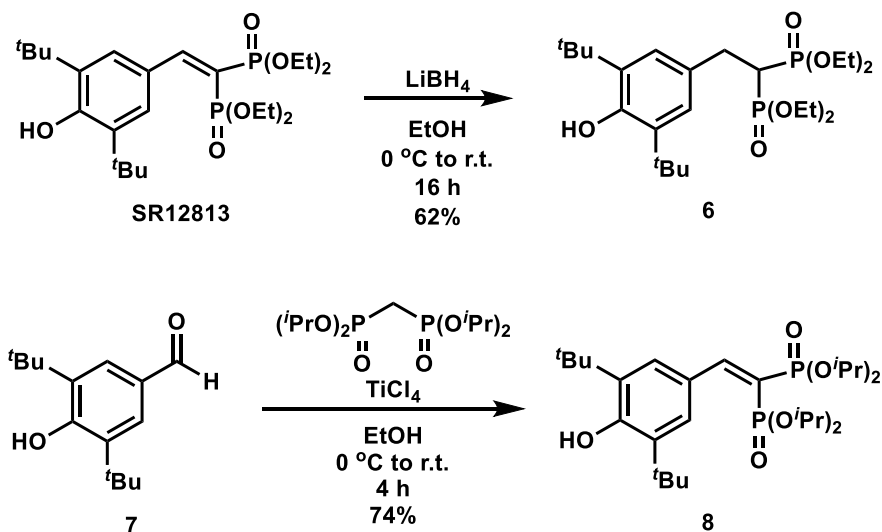
Table 1 'ターシャリーブチル基の必要性の検討におけ

Compound	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM)
SR12813	^t Bu	^t Bu	1.1
2	^t Bu	H	N.A.
5	H	H	N.A.

N.A. : No significant activity

2-3 二重結合とエステル部位の検討

続いて、SR12813 類縁体において同等の HMGR 分解活性を持つ SR45023A (Apomine) が報告されていたことから、エステルの種類と二重結合の必要性について検討を行った。単結合を有するエチルエステル体 **6**、二重結合を有するイソプロピルエステル体 **8** を下記の Scheme に沿って合成した。



Scheme 2. 化合物 **6** と **8** の合成ルート

これらと SR45023A を併せて活性評価を行ったところ、SR12813 と比較して単結合を有するイソプロピルエステル体 SR45023A で僅かに活性が向上した。また、単結合体と二重結合体では分解活性には明確な序列は見られなかったものの、活性評価時に二重結合体では高濃度で細胞毒性が見られたのに対し、単結合体では見られなかった。このことから、単結合体の方が誘導体合成を進める上で適していると考えた。

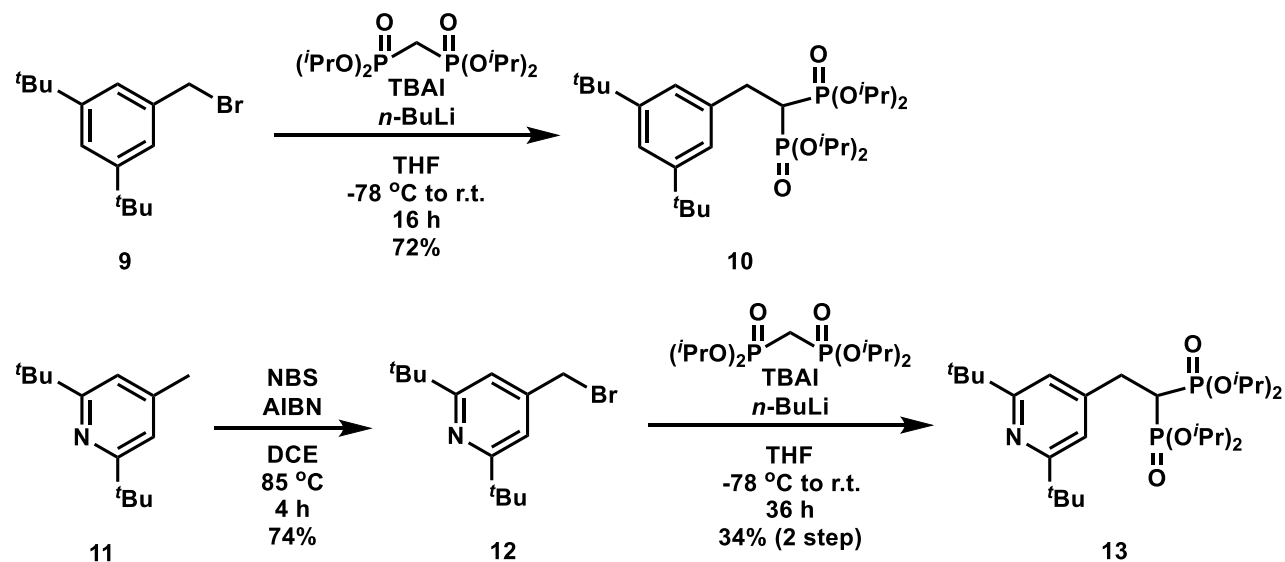
以上の結果から、以降の検討は、単結合とイソプロピルエステル構造に固定して行うこととした。

Table 2 単結合・二重結合とエステル構造の検討における活性評価

Compound	R	bond	IC ₅₀ (μM)
SR12813	Et	double	1.1
6	Et	single	2.8
8	<i>i</i> Pr	double	1.3
SR45023A	<i>i</i> Pr	single	0.88

2-4 ヒドロキシ基の必要性の検討

続いて、4位のヒドロキシ基の必要性について検討を行った。4位のフェノール性ヒドロキシ基が活性において重要であるかを検討する為、フェノール性ヒドロキシ基を持たない化合物 **10**、また水素アクセプターとしてピリジン環に変換した化合物 **13** を下記の Scheme 3 に沿って合成した。

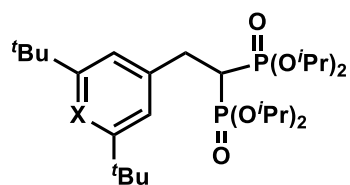


Scheme 3. 化合物 **10**、**13** の合成ルート

これらの活性を評価したところ、SR45023A と比較して化合物 **10** では活性が 2 倍程度向上した。このことから、HMGR 分解活性においてはこの位置にヒドロキシ基は不要であることが明らかとなった。またピリジン環に変換した化合物ではさらに 3 倍程度活性が向上した。この化合物 **13** は現状最も強い HMGR 分解活性を有する化合物であると考えられる。

ここまでの検討から芳香環をベンゼン環もしくはピリジン環とし、プローブ化に必要な置換基の導入部位について検討を進めた。

Table 3 ヒドロキシ基必要性の検討における活性評価



Compound	X	EC ₅₀ (μM)
SR45023A	C-OH	0.88
10	C-H	0.43
13	N	0.14

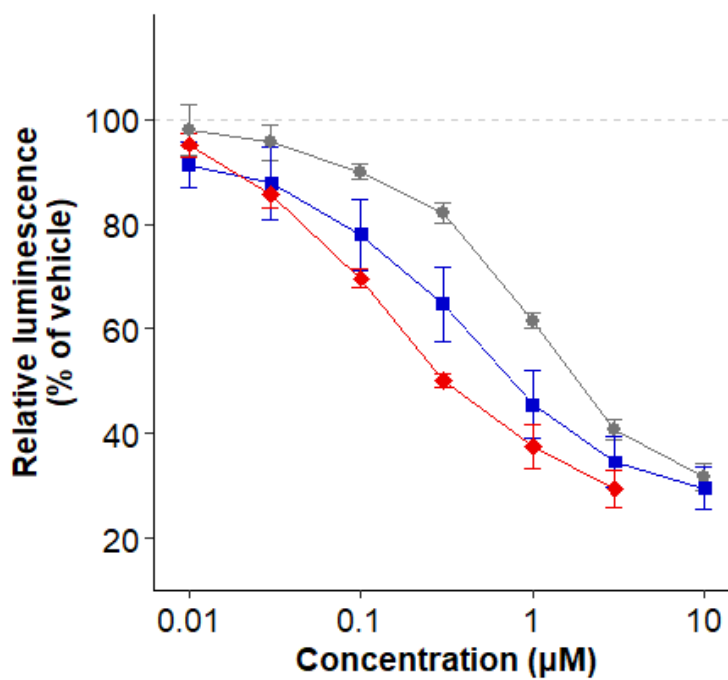
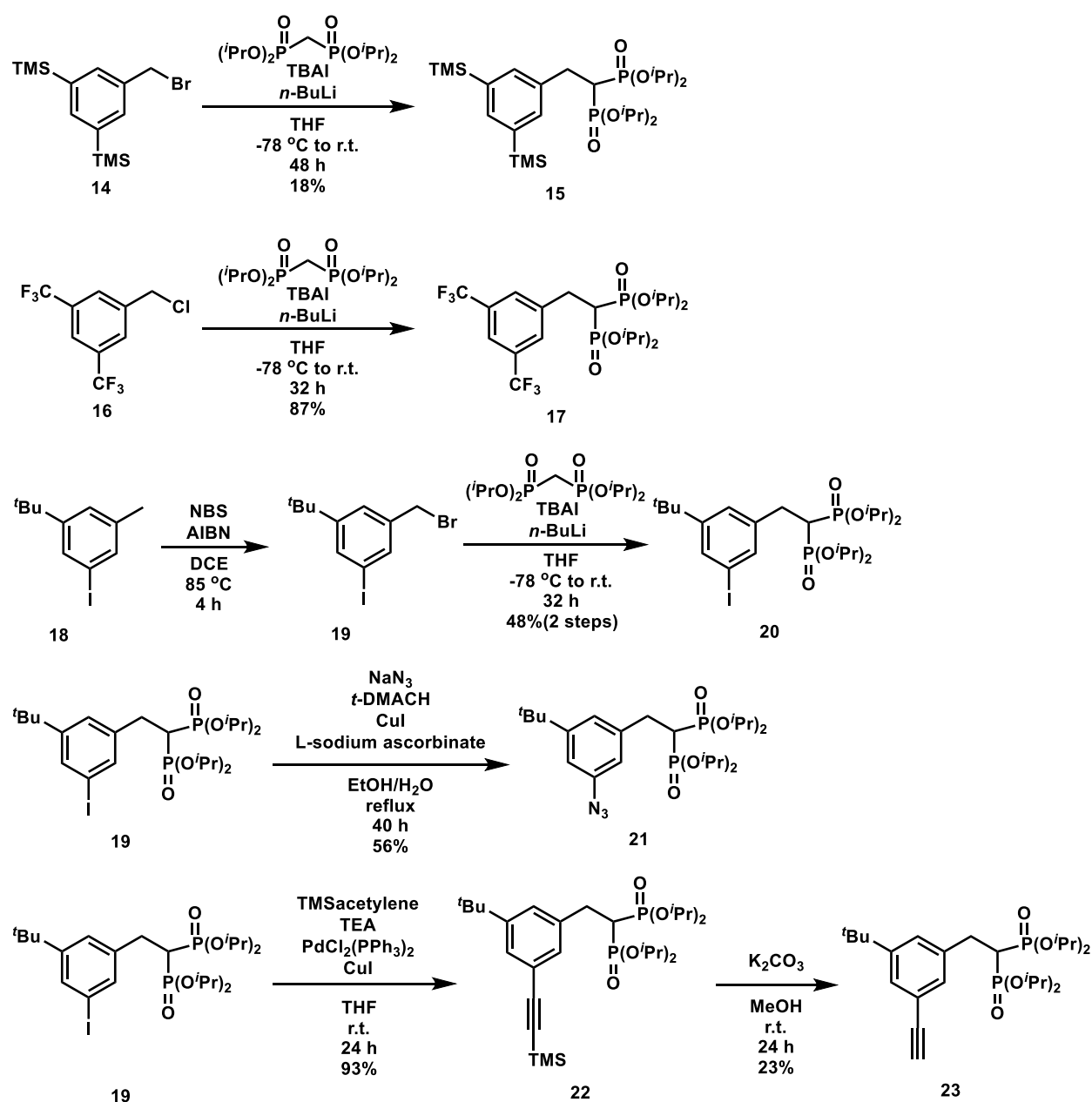


Figure 9 ヒドロキシ基必要性の検討における活性評価

2-5 ターシャリーブチル基の変換による HMGR 分解活性の変化

ここから光親和性標識プローブ化に必要な光親和性標識基と、検出基としてのアルキンの導入について検討を進めた。2-2 においてターシャリーブチル基が必要であることは示したが、この部位にどのような置換基をいれることができるのか、またプローブ化に必要なアジドやアルキンなどでも活性が残るのかについて検討を行った。なおこの検討では、合成の簡便さから、ベンゼン体 **10** をリード化合物とした。

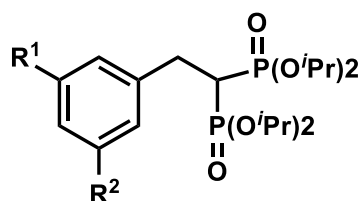
両方のターシャリーブチル基を置換した化合物 **15**、**17** や、一方のターシャリーブチル基をヨウ素に変換し、そこからカップリング反応によりプローブ化に必要なアジド基やエチニル基を導入した化合物などをデザインし、下記の Scheme 4 に沿って合成した。合成した化合物の活性評価結果を table 4 に示す。



まず、両方のターシャリーブチル基を置換した場合について、疎水性で嵩高い置換基としてターシャリーブチル基をトリメチルシリル基で置換した化合物 **15** では同程度の活性が得られたのに対し、トリフルオロメチル基に変換した化合物 **17** では一桁程の活性低下が見られた。現時点では電子的影響も否定できないが、嵩高く疎水性である置換基の重要性が再確認された。

次に、一方のターシャリーブチル基のみを変換した場合について、やはり疎水性で嵩高い置換基でない置換基に変換すると活性の低下が見られた。しかしながら、アジド基に変換した化合物 **21** やエチニル基に変換した化合物 **23** でも HMGR 分解活性が残ることから、ターシャリーブチル基の一方をプローブ化に必要な官能基の導入部位とることができることが分かった。

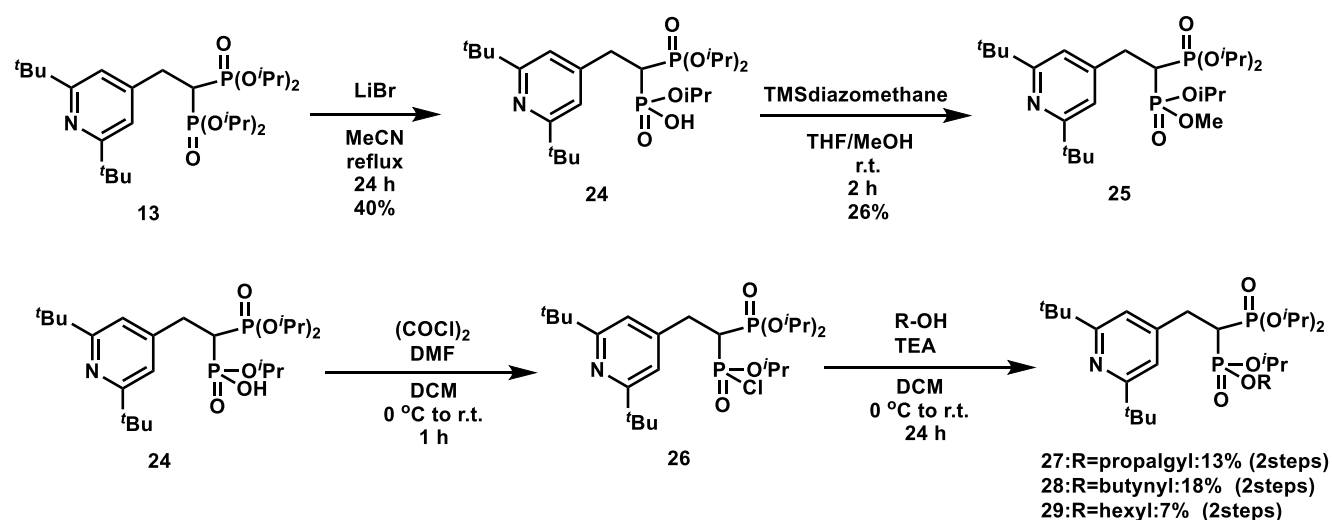
Table 4 ターシャリーブチル基の変換における活性評価



Compound	R ¹	R ²	EC ₅₀ (μM)
11	^t Bu	^t Bu	0.43
15	Me ₃ Si	Me ₃ Si	0.44
17	CF ₃	CF ₃	3.7
19	I	^t Bu	1.4
21	N ₃	^t Bu	1.4
23		^t Bu	2.7

2-6 エステル上イソプロピル基の変換による HMGR 分解活性の変化

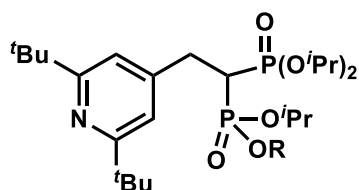
2-5 における検討で、ターシャリーブチル基の 1 つをプローブ化に必要な置換基の導入部位とすることができることが分かったことから、もう 1 つの導入部位としてエステル上アルキル基の変換について検討した。なおこの検討では、最も活性の高いピリジン体 **13** をリードと化合物とした。エステル構造の重要性の確認としてフリーのホスホン酸に変換した化合物 **24** を、また他のアルキル基に変換した化合物 **25**、**27**~**29** について下記の Scheme 5 に沿って合成した。合成した化合物の活性評価結果を table 5 に示す。

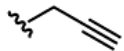
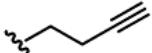
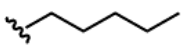


Scheme 5 化合物 **25**、**27**~**29** の合成ルート

化合物 **24** のフリーのホスホン酸で活性が消失したことから、ホスホン酸エステル上の 4 つのアルキル基の必要性が示唆された。また、**25**~**27** のようにメチル基、プロパルギル基、ブチニル基に変換した場合には 3~5 分の 1 程度の活性低下にとどまったが、**28** のようにヘキシル基への変換では 10 分の 1 以上の活性低下が見られた。このことから、炭素数 3 程度までで活性が極大となり、それより大きくなると徐々に活性が低下することが示唆された。今回はプローブ化を目的としていたため官能基として末端アルキンのみしか検討していないが、他の官能基の導入で傾向は変わるかもしれない。

Table 5 エステル上アルキル基の変換における活性評価



Compound	R	EC ₅₀ (μM)
13	<i>i</i> Pr	0.14
24	H	N.A.
25	Me	0.44
27		0.60
28		0.76
29		2.4

2-8 得られた構造活性相関のまとめ

得られた HMGR 分解活性を指標とした構造活性相関について Fig.まとめる。

- (1) 芳香環の 3 位と 5 位にはターシャリーブチル基のような嵩高い疎水性基を持つことが活性の維持に重要ではある。ただ、現時点では電子的要因などがどれくらい寄与するかは分かっていない。一方のターシャリーブチル基をアジド基に変換しても活性は残ったことから、この位置をプローブ化に必要な官能基の導入点とすることができる。
- (2) 4 位のヒドロキシ基は不要であり、ベンゼン環、ピリジン環への変換で活性が向上する。
- (3) 二重結合と単結合では活性はほとんど変わらず、細胞毒性を考慮すると単結合が望ましい。
- (4) エステル構造は必須であるが、他のアルキル基に変換してもある程度活性が維持する。また、大きすぎる置換基の導入は活性低下が大きくなる可能性がある。プロパルギル基やブチニル基に変換しても活性が残ったことから、ここをプローブ化に必要な官能基の導入位置とすることができる。

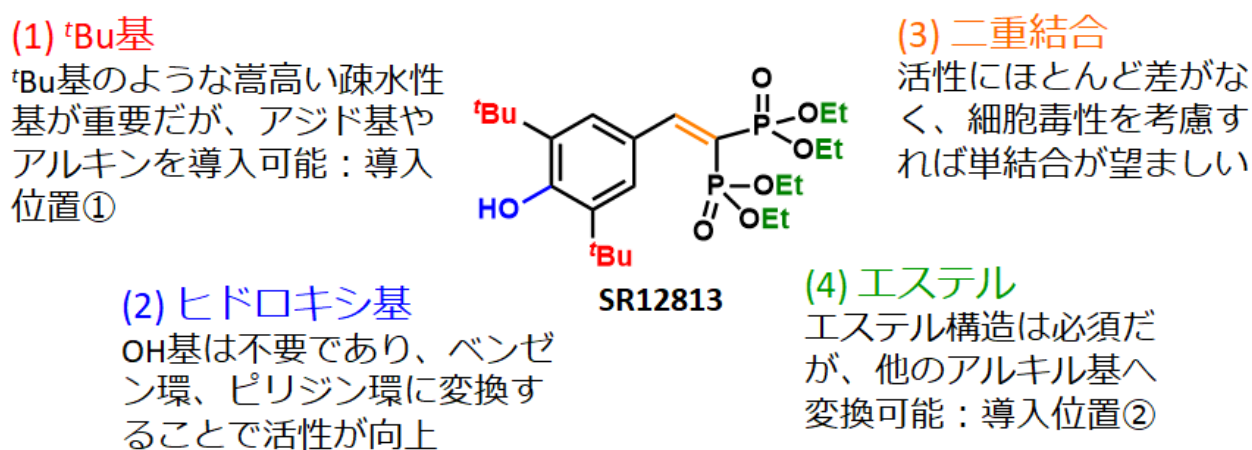


Figure 10 得られた構造活性相関

3章 光親和性標識プローブ分子の創製と HMGR 結合試験

3-1 光親和背標識プローブ分子のデザインと合成

得られた構造活性相関から、一方のターシャリーブチル基をアジド基に、エステル上アルキル基の1つをプロパルギル基に変換した化合物 **srbAZY** をデザインした。また、エステル上アルキル基の変換による HMGR 分解活性の低下はターシャリーブチル基の変換によるものよりも緩やかであり、**srbAZY** と同等以上の活性が得られるのではないかと考え、エステル上アルキル基の1つをジアジリン基とアルキンを含むプローブユニットに変換した化合物 **srpDHY** も併せてデザインした。これらのプローブ候補分子を Scheme 6 に沿って合成した。

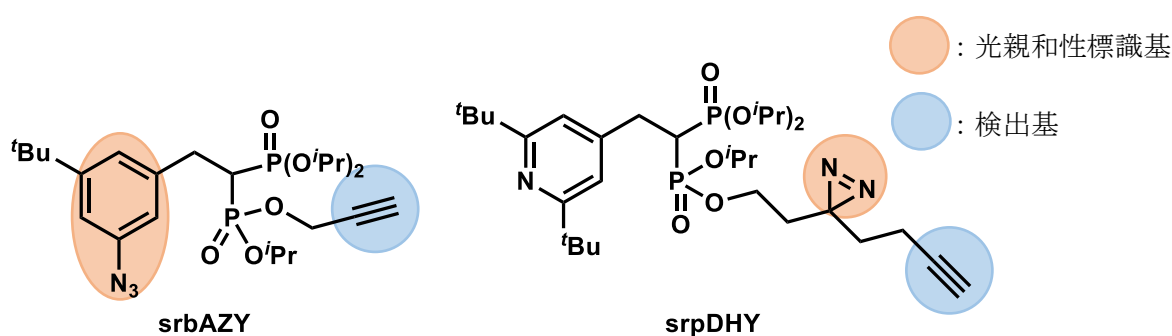
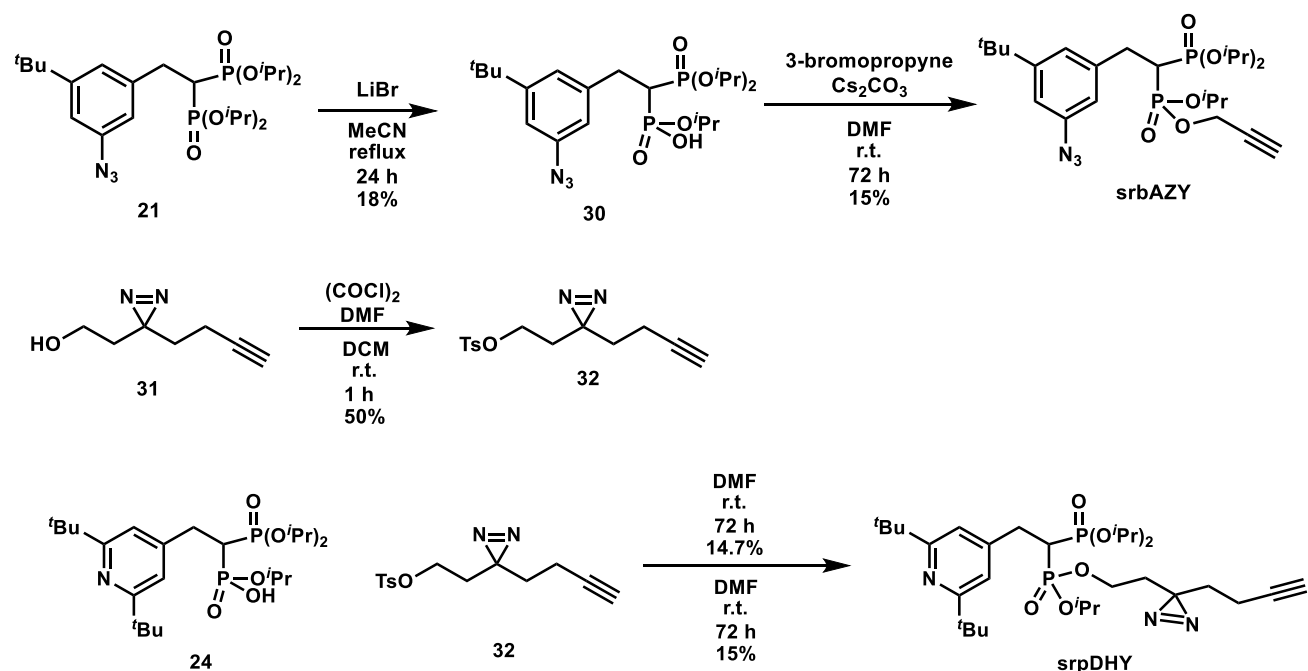


Figure 11 光親和性標識プローブ候補分子のデザイン



Scheme 6 **srbAZY** と **srpDHY** の合成ルート

3-2 srpDHY と srbAZY の HMGR 分解活性評価

合成した **srbAZY** と **srpDHY** について、活性評価を行った結果を Table 6 と Fig. 12 に示す。エステル上にジアジリンとアルキンを含むプローブユニットを導入した **srpDHY** は SR12813 よりも 2 倍以上強い HMGR 分解活性を有していた。同じくピリジン環を有する化合物 **13** と比較しても 3 分の 1 程度の活性低下にとどまった。2-6 での検討においてエステル上アルキル基の 1 つへキシル基に変換した際には大きく活性の低下が見られたことから、やはり置換基の大きさだけでなくジアジリンやアルキンといった官能基も活性に寄与すると考えられる。一方で、**srbAZY** は SR12813 と比較して 6 分の 1 以上の活性低下が見られた。ターシャリーブチル基 1 つと、エステル上アルキル基 1 つの変換で見られた活性低下を考慮すると、概ね予想される程度の活性低下となった。

以上の結果から、SR12813 よりも強い HMGR 分解活性を有する光親和性標識プローブ候補分子 **srpDHY** の創製に成功した。

Table 6 **srbAZY** と **srpDHY** の活性評価

Compound	EC ₅₀ (μM)
SR12813	1.1
13	0.14
srpDHY	0.42
srbAZY	7.1

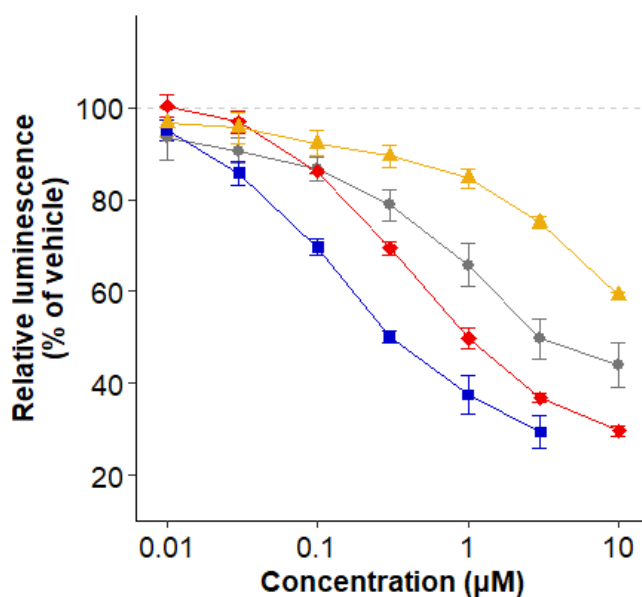


Figure 12 **srbAZY** と **srpDHY** の活性評価

3-3 srpDHY を用いた HMGR 結合試験

3-3-1 HMGR 結合試験プロトコール

得られた光親和性標識プローブ srpDHY を用いて HMGR の結合試験を進めた。

HMGR の結合試験においてもこれまで HMGR 分解活性評価を行ってきた HMGR- Δ cat-FLAG-Eluc 安定発現株を用いた。この細胞中で HMGR の発現量は多くないことから、Compactin の前処理により HMGR の発現量を上昇させた状態でアッセイを行った。アッセイのプロトコールを Fig. 13 に示す。Compactin (3 μ M) を 16 時間処理した細胞から超遠心を用いて膜画分を調製した。得られた膜画分に対し srpDHY を加えた後 UV を照射し、srpDHY と HMGR 間で共有結合を形成させた。その後 クリック反応試薬 (Biotin-PEG-Azido と触媒) を加えクリック反応を行うことでビオチンを結合させた。そして FLAG ビーズを用いた免疫沈降を行い、ウエスタンブロッティングにより HMGR タンパク量の検出を行った。

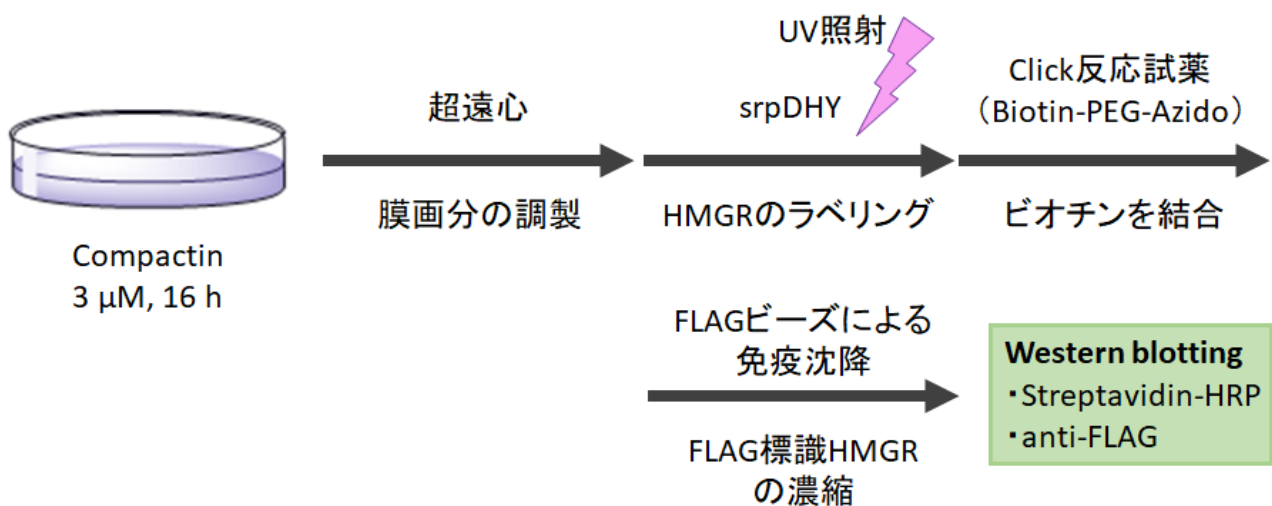


Figure 13 HMGR ラベリング試験のプロトコール

3-3-2 srpDHY の UV 依存的な HMGR のラベリング

まずは UV 依存的に **srpDHY** による **HMGR** のラベリングが起こることを確認した。結果を Fig. 14 に示す。**Streptavidin-HRP** で検出を行った場合、通常の **HEK293** 細胞においては **HMGR** に対応する 100 kD 程度でのバンドは確認されず、**HMGR- Δ cat-FLAG-Eluc** 安定発現株において 100 kD 程度に UV 依存的に生じるバンドを確認した。また、UV の照射時時間を 1 分から 10 分にすることでそのバンドが濃くなった。一方で、抗 **FLAG** 抗体で検出した場合、同じ 100 kD 付近に条件によらず一様に染まるバンドを確認した。これらのことから、100 kD 付近に検出されたこのバンドは **HMGR** であると考えられ、UV 依存的に **srpDHY** によるラベリングが起きていることが示唆された。

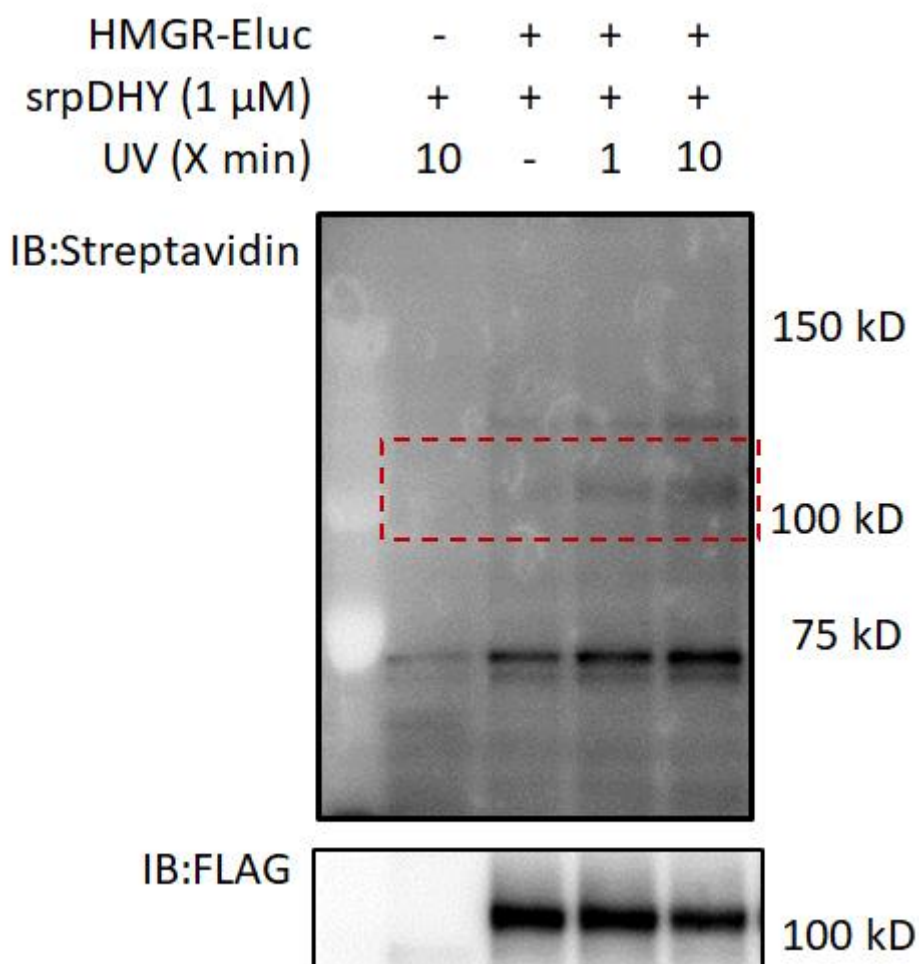


Figure 14 srpDHY の UV 依存的な HMGR のラベリング

3-3-3 化合物 13 による競合試験

次に、3-1 で検出したバンドが非特異的なタンパク質への結合によるものでないことを確認する為、化合物 13 による競合試験を行った。化合物 13 は **srpDHY** と同じポケットに結合すると考えられるので、過剰量の 13 の共存下では **srpDHY** による **HMGR** のラベリングは阻害されるはずである。結果を Fig. 15 に示す。6 μ M の **srpDHY** に対し、過剰の 13 を競合させると、**srpDHY** による **HMGR** のラベリングが阻害された。このことから、**srpDHY** は非特異的なタンパク質ではなく、**HMGR** をラベリングしていることが確認された。

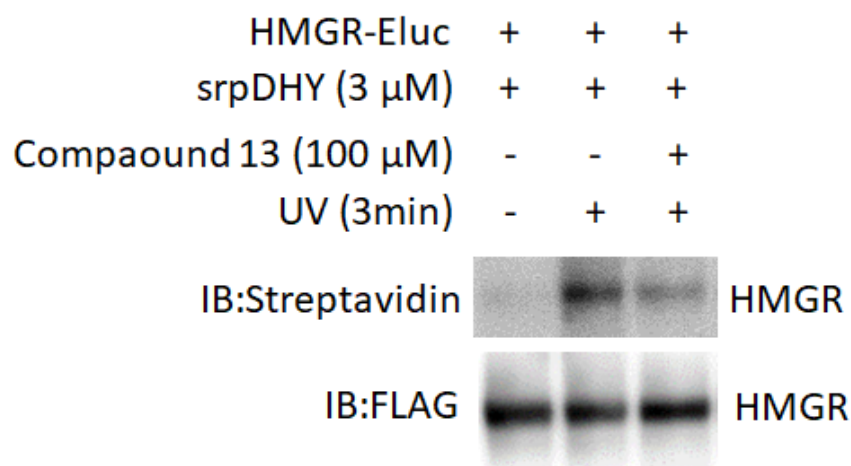


Figure 15 化合物 13 を用いた競合試験

以上の結果から、**srpDHY** は **HMGR** に結合していることが示唆された。このことから、**SR12813** 類縁体による **HMGR** の分解は、**SR12813** が **HMGR** に直接結合することで誘導されるものであると考えられる。

総括

生体内におけるコレステロール制御に関する研究が始まり 100 年近く経ち、律速酵素である HMGR については遠藤らのコンパクチンの創出により飛躍的に解明が進んだ。しかしながら、HMGR の分解機構など未だに未解明な部分が多く残っている。

本研究では、これまで不明であったコレステロール低下作用を持つ合成低分子化合物 SR12813 の HMGR 分解の作用機序を解明すべく、SR12813 の光親和性標識プローブ化と HMGR への結合試験を行った。プローブ化の過程で簡易的ではあるものの SR12813 の HMGR 分解活性を指標とした構造活性相関の一端を明らかにすることができた。また、現状報告のある中で最も強い HMGR 分解活性を有する化合物 **13** の創製に成功した。そして SR12813 よりも強い分解活性を有する光親和性標識プローブ **srpDHY** の創製にも成功した。SR12813 誘導体の HMGR 分解活性において、芳香環のターシャリーブチル基が重要であることは確認することが出来たが、この位置によりバルキーな置換基や、電子求引基や電子供与基を導入することでどのように活性が変化するのは更なる検討が必要であると考え。また、ホスホン酸エステル上アルキル基についても、**srpDHY** のような大きい置換基の導入で活性が維持されたことから、末端アルキンやジアジリン基などの導入による活性の変化をより詳細に検討する必要があると考える。

得られたプローブ **srpDHY** を用いて HMGR に対する結合試験を行うことで、SR12813 類縁体が HMGR に結合することを明らかにした。この結果は、SR12813 が HMGR に直接結合することで HMGR の分解を誘導しているという仮説を支持するものだと考える。

一方で、現在検討段階ではあるものの、25HC のように HMGR ではなく **Insig** に結合することで HMGR 分解を誘導するとされている化合物においても **srpDHY** のラベリングに対する競合が起こるという結果も得られている。このことについては、25HC も HMGR に結合することで直接的に競合が起こる、もしくは **Insig** への結合を介することで間接的に競合が起こるという 2 つの可能性が考えられる。現状では結論を見出すには至っていないが、**CRISPER** などにより **Insig** をノックアウトした条件でラベリング実験を行い **Insig** の必要性を検討することで解決できるのではないかと考える。

このような点に留意した上で、**srpDHY** を用いることでラノステロールや 24、25-ジヒドロラノステロールといった HMGR 分解活性を有するがターゲットタンパク質が同定されていない分子に対して、間接的ではあるものの HMGR に結合するかを確認することができるのではないかと考える。

また、現在類縁の膜タンパク質の結晶構造が解かれ始めており、HMGR に関しても結晶構造が明らかになることが期待される。その際に今回得られた知見や化合物が貢献できるのではないかと考える。

第Ⅱ部

PPAR γ における transactivation 作用と transrepression 作用の相関関係の検証

1 章 研究背景

1-1 核内受容体

核内受容体は構造的に良く保存されたリガンド依存的な転写因子であり(Fig. 1-1)、ヒトにおいては 48 種類が同定されており、3 種類に分類されている^{1,2}。1 つ目は Glucocorticoid Receptor (GR)や Estrogen receptor (ER)といったステロイドホルモン受容体、2 つ目は内因性リガンドが見出されていないオーファン受容体、3 つ目は thyroid hormone receptor や retinoid X receptor (RXR)、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)、liver X receptor (LXR)といった様々な内因性・外因性リガンドによって制御されるリガンド依存性の核内受容体である。それぞれの機能は多岐にわたり、発生や恒常性維持など生命活動に関わるさまざまな側面を調節している。

核内受容体の構造は、N 末から Activation Function 1 (AF1)と呼ばれる N 末活性化ドメイン、DNA と結合する DNA 結合ドメイン(DNA-binding domain; DBD)、そして一般にリガンドと結合する部位を有するリガンド結合ドメイン(Ligand-binding domain; LBD)の 3 つのドメインからなる。特にリガンド依存的な転写活性発現において LBD は重要な働きを担っており、また多くの場合、各受容体のホモ二量体化やヘテロ二量体化において重要な働きを担っていると考えられる。LBD は三次元構造において 12 個の α -Helix を有しており、C 末の 12 番目の Helix (Helix12、AF2 と呼ばれる) の空間の占め方 (適切な折りたたみ方) で活性が規定される。すなわち、アゴニスト結合時に helix 12 がリガンド結合ポケットに蓋をするように折りたたみ構造が変化し、この構造変化により co-activator がリクルートされる³。

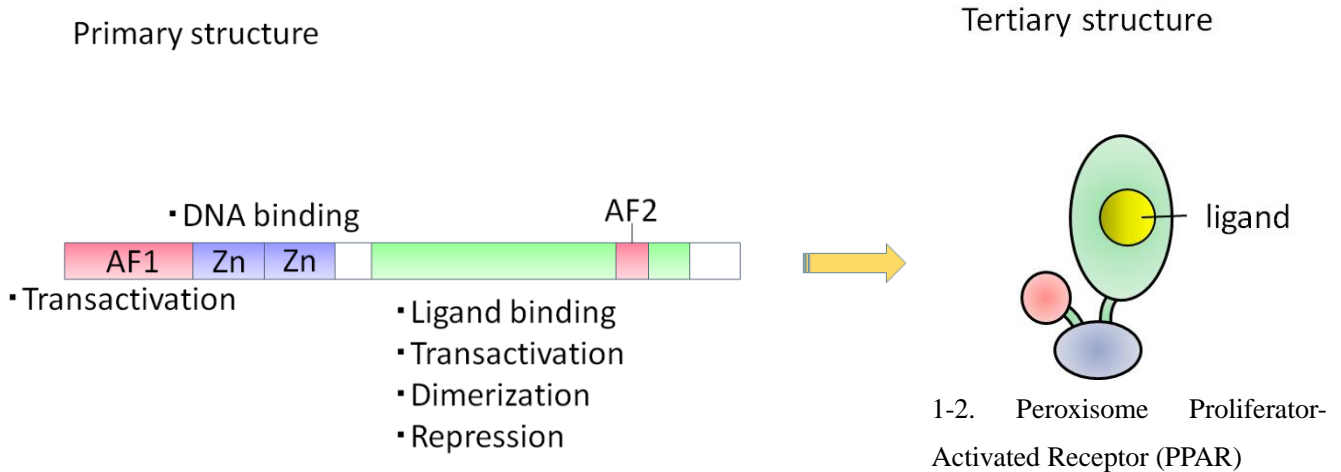


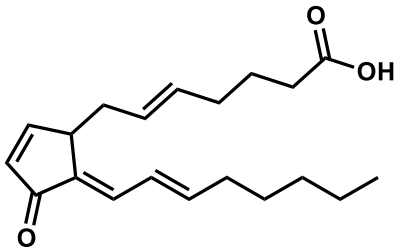
Figure 1-1. 核内受容体の構

1-2 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ)

PPAR は核内受容体スーパーファミリーに属する転写因子である。その作用は多岐に渡り、中性脂肪低下作用などの脂質代謝、インスリン感受性増強作用などの糖質代謝、さらに動脈硬化、免疫・炎症反応、細胞増殖、悪性腫瘍の制御など様々な生理活性を有するとされている。PPAR には α 、 δ (β)、 γ の 3 つのサブタイプが存在し、それぞれ機能、発現に違いがみられる。

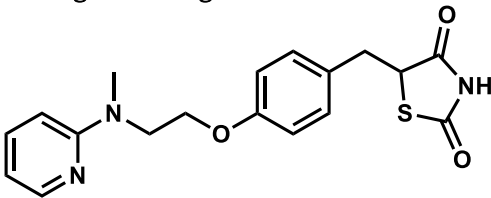
本研究で焦点を当てる PPAR γ は、主に脂肪組織や副腎、脾臓などに高発現しており、脂肪細胞の分化やグルコースの恒常性維持、抗炎症、コレステロール逆輸送に関与している。内因性リガンドとしては、15 デオキシ- Δ 12,14-プロスタグランジン J₂ やアラキドン酸、リノレン酸などの脂肪酸やその代謝物がある。また、外因性リガンドとしては、主にチアゾリジンジオン系薬剤(TZDs)であるロシグリタゾンやピオグリタゾンなどがある(Fig. 1-2)。また、PPAR γ リガンドとして、GW9662 や BADGE といったアンタゴニストも報告されている⁴。

Endogenous Ligand

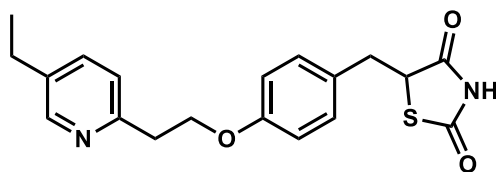


15d- Δ 12,14-deoxy prostaglandin J₂

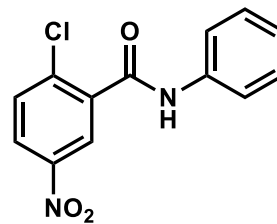
Exogenous Ligand



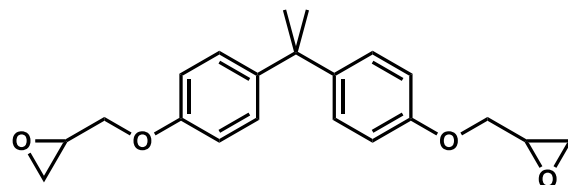
Rosiglitazon



Pioglitazone



GW9662



BADGE

Figure 1-2. PPAR γ の内因性・外因性リガンド

1-3 PPAR γ における transactivation 作用

(1) Transactivation 作用のメカニズム

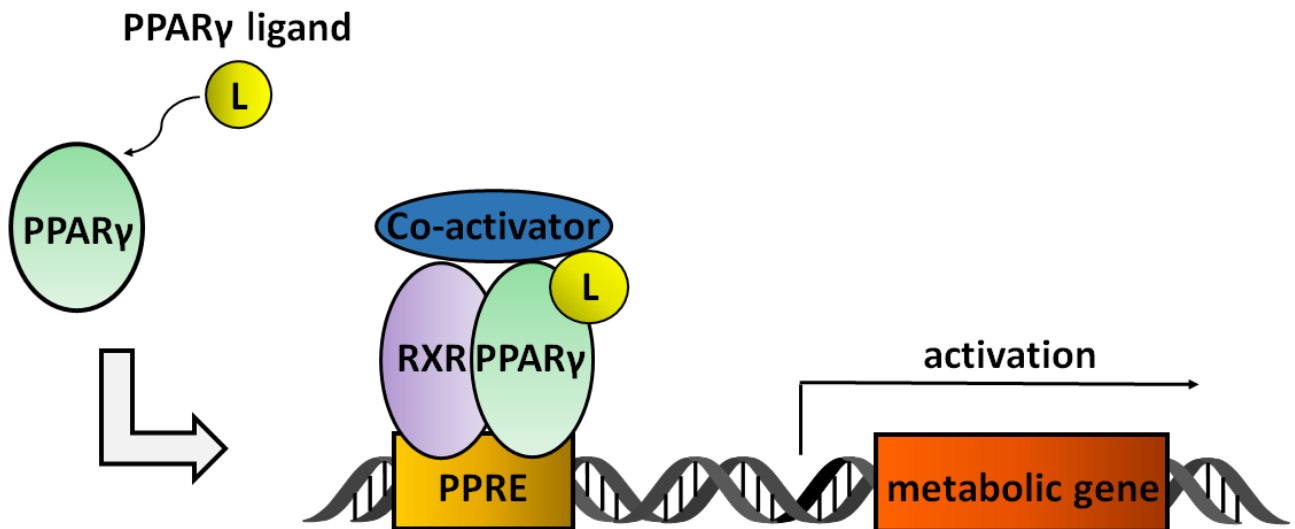


Figure 1-3. PPAR γ の transactivation のメカニズム

PPAR γ の転写活性化状態を Fig. 1-3 に示した。PPAR γ にアゴニストが結合すると、PPAR γ は retinoid X receptor (RXR) とヘテロ二量体を形成する。そのヘテロ二量体が PPA response element (PPRE：応答配列) に結合することで Co-activator がリクルートされ、標的遺伝子の転写を調節する。本論文ではこれを PPAR の transactivation 作用と呼ぶ。PPAR γ の transactivation 作用は、遺伝子上流のプロモーター領域に PPRE を有する cluster of differentiation 36 (*Cd36*)、lipoprotein lipase (*LPL*)、fatty acid binding protein (*FABP*) といった脂質代謝に関わる遺伝子の発現を誘導し、脂肪代謝を制御する⁵。また、グルコース取り込みに関与する glucose transporter type 4 (*Glut4*)、insulin receptor substrate 1 and 2 (*IRS-1, 2*)、c-Cbl-associated protein (*CAP*)などの遺伝子発現も誘導し、グルコースの恒常性維持に寄与する⁵。

(2) PPAR γ と糖尿病

前述したような PPAR γ の transactivation 作用に着目した医薬としては、II型糖尿病治療薬として使用されているピオグリタゾンがある。II型糖尿病とは、膵臓の β 細胞からインスリン分泌が減少すること、筋肉・脂肪組織へのグルコース取り込み機能が低下すること、即ちインスリン抵抗性になることが原因となり、高い血糖値を示す疾患である。II型糖尿病の原因は、以下のように提唱されている。飽食により増加した血中の脂肪は脂肪細胞に取り込まれ、脂肪細胞が肥大化する。肥大化脂肪細胞により、インスリン抵抗性を惹起する遊離脂肪酸、TNF α (tumor necrosis factor α)、レプチン、レジスチン、MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1)、PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1)などが分泌される。レプチンは遊離脂肪酸を脂肪細胞から血中に放出する。脂肪細胞から放出された遊離脂肪酸と TNF α は、リン酸化を介してインスリン受容基質(IRS)を不活化する。ピオグリタゾンは、このインスリン抵抗性の改善に寄与する⁵ (Fig. 1-4)。脂肪細胞上の PPAR γ がピオグリタゾンにより活性化されるとアディポネクチンの発現を誘導し、トリグリセリドを蓄積させ、肥大化脂肪細胞のアポトーシスが誘導され、インスリン抵抗性を惹起する遊離脂肪酸、TNF α 、レプチンなどの分泌を抑制する。また PPAR γ の transactivation 作用による C/EBP α (CCAAT/enhancer-binding protein α)などの発現を介して前駆脂肪細胞を小型脂肪細胞へと分化させることでもアディポネクチンの分泌が促進される。これらの効果によりインスリン抵抗性が改善される。

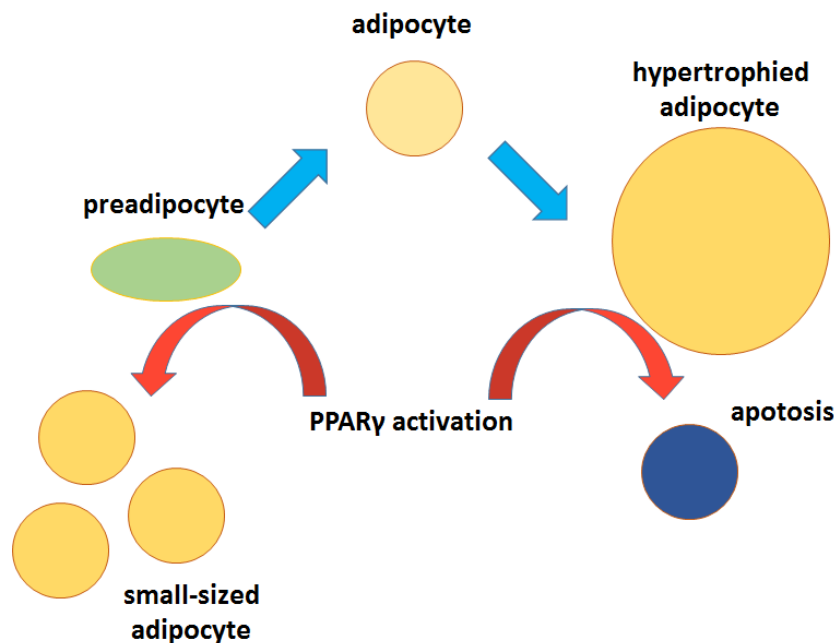


Figure 1-4. PPAR γ のインスリン抵抗性改善のメカニズム

一方、PPAR γ アゴニストであるチアゾリジン系薬剤には、体重増加や浮腫、体液貯留、骨密度減少などの副作用が臨床レベルで報告されている。浮腫と体液貯留に関しては、PPAR γ の transactivation による標的遺伝子 ENac (epithelial Na⁺ channel)が原因である可能性⁶、骨密度減少に関しても、PPAR γ 依存的に破骨細胞分化が促進されること⁷が報告されている。

1-4 PPAR γ における transrepression 作用

(1) Transrepression 作用

これまで述べてきたような核内受容体の転写調節因子としての transactivation 作用が注目されてきたが、近年 transactivation 作用とは異なるメカニズムで炎症性遺伝子の転写を抑制するという報告がなされている^{8,9,10}。細菌感染やリポ多糖(LPS: lipopolysaccharide)刺激がマクロファージ細胞などに加わると、PPAR γ リガンド非存在下では、NF- κ B、AP-1 などの転写因子がその応答配列(NF- κ B response element: NF κ BRE、AP-1 response element)に結合することにより転写が活性化され、炎症性サイトカイン類(*TNF α* 、*iNOS* (inducible nitric oxide synthase)、*IL-6* (interleukin-6)等)の遺伝子の転写が活性化される。これに対して、リガンドが PPAR γ に結合した状態では PPAR γ の SUMO 化が誘導され、この SUMO 化が PPAR γ を含む Co-repressor 複合体を安定化し、プロモーター領域に PPRE を持たない上記炎症性サイトカイン類の遺伝子の転写を抑制するというものである¹¹(Fig. 1-5)。このような作用は transrepression 作用と呼ばれている。

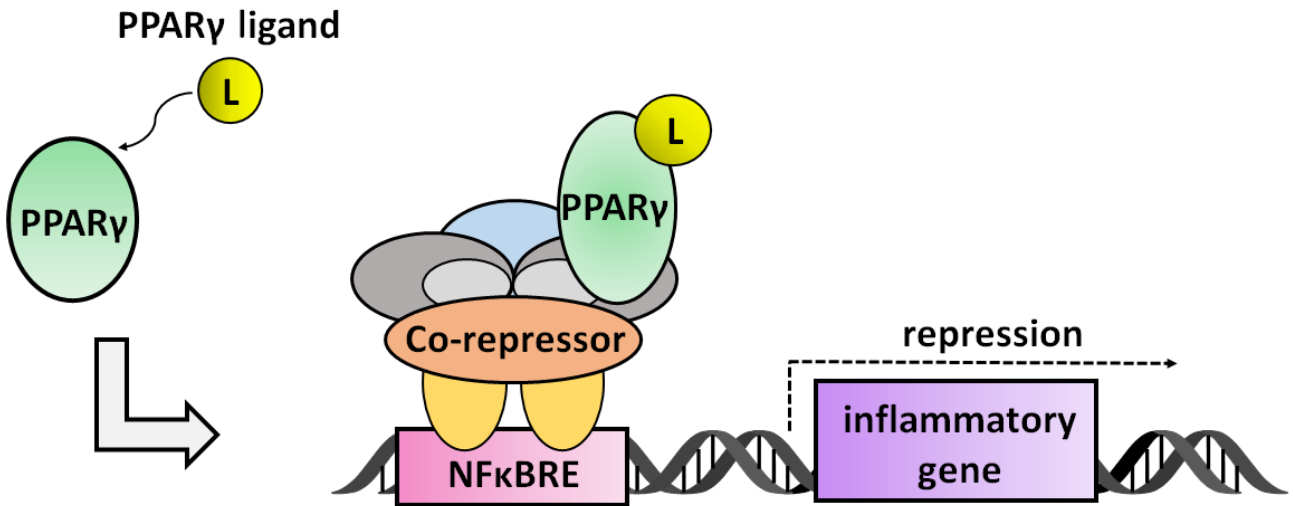


Figure 1-5. PPAR γ の transrepression 作用のメカニズム

(2) PPAR γ における transactivation 作用と transrepression 作用の独立性

PPAR γ における transactivation 作用と transrepression 作用が付随的に起こるものか、もしくは独立に起こるものかについて検証を行った例を示す¹¹。PPAR γ の transactivation 作用により発現が制御される *Cd36* 遺伝子、transrepression 作用により発現が制御される *iNOS* 遺伝子について、変異 PPAR γ を用いて実験を行っている(Fig. 1-6)。PPRE への結合能を失った点変異 PPAR γ を用いると *Cd36* 遺伝子は発現が抑制されるようになり、一方で *iNOS* 遺伝子は抑制状態を保つことが明らかになった。即ち、この変異 PPAR γ を用いた実験により、transactivation 作用を失いつつも、transrepression 作用は維持する変異 PPAR γ が存在することが明らかになり、この2つの作用が独立に起こるものであることが示唆された。

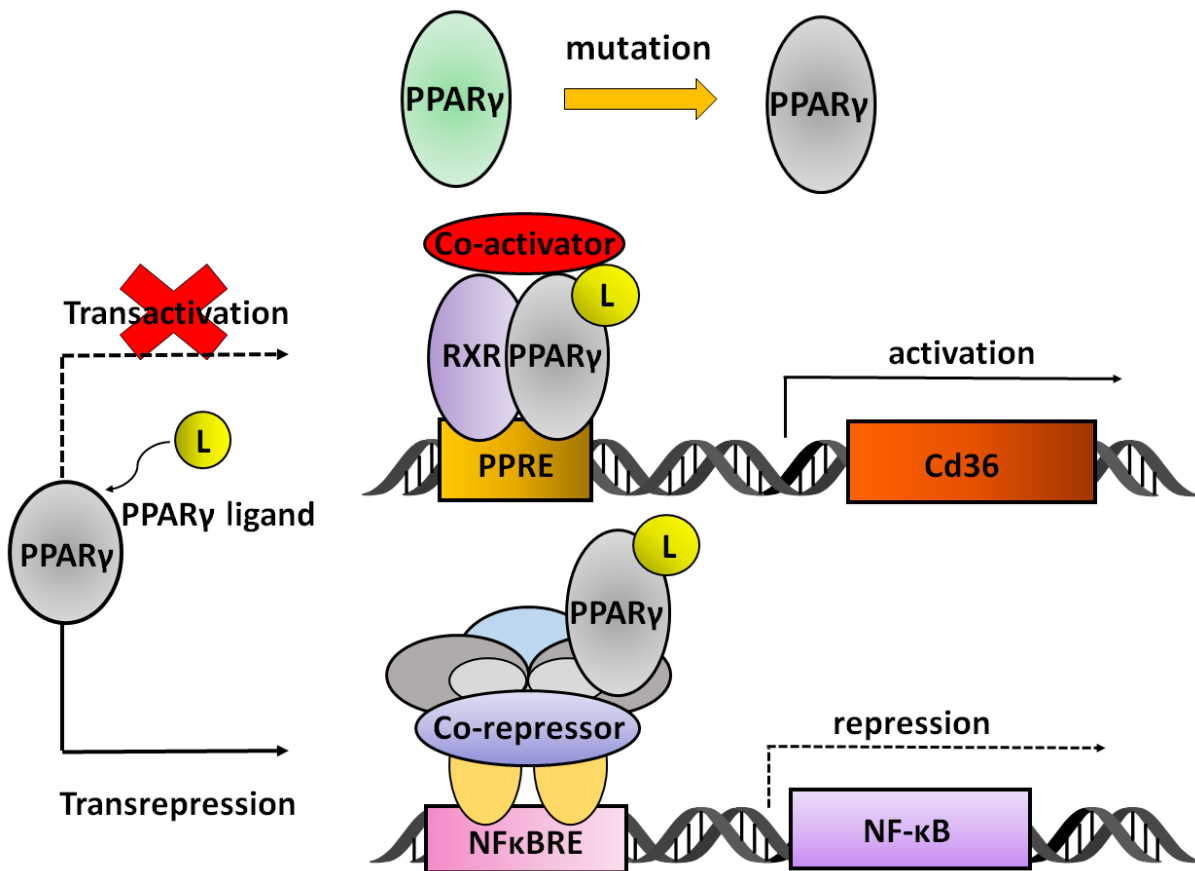


Figure 1-6. 変異 PPAR γ を用いた transactivation 作用と transrepression 作用独立性の確認

(3) 免疫関連疾患に対する PPAR γ リガンドの有用性

PPAR γ リガンドは種々の炎症誘発性遺伝子の転写を抑制するtransrepression作用を有している。故に、関節リウマチ、多発性硬化症やキャッスルマン病など様々な免疫関連疾患に関わっていることが考えられる。実際に、関節リウマチ¹²や喘息¹³では、PPAR γ アゴニストであるロシグリタゾンやピオグリタゾンが症状の改善に寄与するという臨床データが得られている。糖尿病患者のコホート研究では、チオゾリジオン投薬患者群(2178例)では、他の経口糖尿病治療薬投薬患者群(10700例)に比べて、喘息症状の悪化と、経口ステロイド薬の処方量を有意に減少させる結果が報告されている。また、リウマチ患者に対するプラセボ対照二重盲検クロスオーバー試験において、ピオグリタゾン投与群(34例)は、非投与群に比べて、関節炎の指標(DAS28-CRP : Disease Activity Score in 28 joints using C-reactive protein)を有意に減少させた。以上、チアゾリジオン系PPAR γ アゴニストの抗炎症作用は強力であり、ヒトに対する有効性も、一部確認されている。

以下では対象となる疾患について簡潔に示す。

関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis; RA)

自己の免疫により手足の関節が侵され、関節痛や関節の変形が生じる代表的な膠原病の一つであり、炎症性自己免疫疾患である。治療薬としてはステロイド性抗炎症薬(GR リガンド：グルココルチコイド)、非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)、抗リウマチ薬(DMARDs)、TNF α もしくはIL-6を標的とした生物学的製剤などがある。

喘息(asthma)

発作性の呼吸困難、喘鳴、咳を繰り返す疾患で、慢性的な炎症が気道に起こり、気道の過敏性が亢進することがその原因と考えられている。現在治療薬としては吸入ステロイド性抗炎症薬(GR リガンド：グルココルチコイド)などが用いられている。

ステロイドを用いる点や、その他の治療薬でも副作用などが問題となっており、新規の治療薬の開発が望まれている。

(4) 他の核内受容体での transrepression 作用との比較

Transrepression 作用は、glucocorticoid receptor (GR)や liver X receptor (LXR)など他の核内受容体でも報告されている¹⁴。GR リガンドであるグルココルチコイドは、上述の通り、強力な抗炎症・免疫抑制作用、増殖抑制作用を持ち、アレルギー疾患、膠原病、リウマチ、癌の治療に使用されている。一方で、ステロイドの薬理作用による糖尿病、骨粗鬆症、皮膚萎縮、高脂血症、高血圧、易感染性、精神障害などの副作用がある。これらの副作用が原因で、グルココルチコイドは非常に強い治療効果にも関わらず、アレルギーでは基本的に局所投与に限定され、リウマチや膠原病では第一選択薬ではない。このことから、副作用を軽減したグルココルチコイドが臨床の場で求められている。グルココルチコイドの抗炎症・免疫抑制作用には transrepression 作用が、副作用のいくつかには transactivation 作用が関係していると言われている^{15,16}。GR が 2 量体化できず transactivation 作用を持たない遺伝子改変マウスが、transrepression 作用を持つという報告があることから、transactivation 作用と transrepression 作用の分離は可能であると考えられる¹⁷。近年、LXR の transrepression 作用も報告された。PPAR γ と LXR の transrepression 作用には多くの共通点もあるが、ターゲットとする遺伝子やそのメカニズムに違いが見られる¹⁸。PPAR γ と LXR を比較してみると、どちらも corepressor の 1 種 NCoR にリクルートされる際に SUMO 化されることが明らかになっているが、PPAR γ では PIAS1 (protein inhibitor of activated STAT-1) 依存的かつ SUMO1 の SUMO 化を受け、LXR ではヒストン脱アセチル化酵素 HDAC 依存的に SUMO2/3 の SUMO 化を受ける (Fig. 1-7)。また、制御される炎症性サイトカイン類にも違いが見られ、iNOS に関する transrepression 作用は PPAR γ 、LXR のいずれでも起こるが、TNF α は PPAR γ のみで、i11 β では LXR のみで transrepression 作用が起こることが報告されている。

transrepression

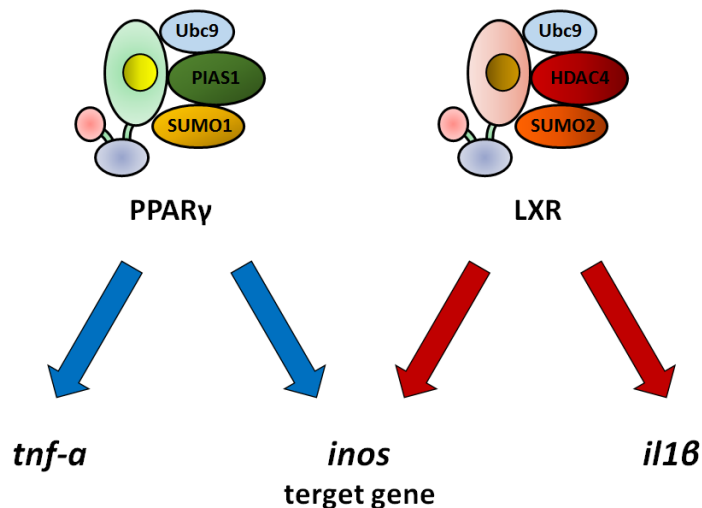


Figure 1-7. Transrepression 作用における PPAR γ と LXR の差異

このように個々の transrepression 作用のメカニズムや、ターゲットとなる遺伝子には違いがみられ、より詳細な transrepression 作用の機能やメカニズムの解明には、種々の核内受容体に共通する包括的な transrepression 作用の側面と、個別の transrepression 作用の側面の両方を調べる必要があると考えられる。

(5) Transrepression 選択的リガンドの創製

前述の通り、変異 PPAR γ や変異 GR を用いた実験により、transactivation 作用と transrepression 作用は付随して起きるものではなく、独立していることが示唆された。加えて、同一タンパク質が有する異なる二つの作用が、リガンドの種類・構造によって分離できる可能性は、GR リガンドにより始めて報告された^{19,20}(Fig. 1-8)。Hexahydroimidazo[1,5b]isoquinoline (化合物 a) は、AP-1 転写抑制を指標とした transrepression 作用はグルココルチコイドと比較して 6 倍弱い、transactivation の EC₅₀ は 1000 倍以上弱い化合物である。Dibenzoxepane (化合物 b) は、IL-1 β を指標とした transrepression 作用はグルココルチコイドと同等で、10 μ M における transactivation 作用の内活性はグルココルチコイドより弱い(化合物 b: 53%, プレドニゾン: 114%)。本化合物は、ラットリウマチモデルにおいても、グルココルチコイドと同様の有効異性を示した。近年、当研究室では transrepression 作用選択的な LXR^{21,22} リガンドの創製に成功している。青山博士は、dibenz[b,e]azepinone 骨格を有する化合物 c が LXR に結合し、LXR 依存的な IL-6 量を指標とした transrepression 作用を示し、30 μ M の高濃度でも transactivation 作用を示さないことを見出した。本化合物が、Transactivation 作用にもとづく副作用の原因となる mRNA を上昇させずに、transrepression 関連の mRNA を抑制することも細胞系にて確認した。野村修士は、styrylphenylphthalimide 化合物 d が、同様に LXR に結合し、LXR 依存的な IL-6 量を指標とした transrepression 作用を示し、30 μ M の高濃度でも transactivation 作用を示さないことを見出した。本化合物も、Transactivation 作用にもとづく副作用の原因となる mRNA を上昇させずに、transrepression 関連の mRNA を抑制することも細胞系にて確認している。

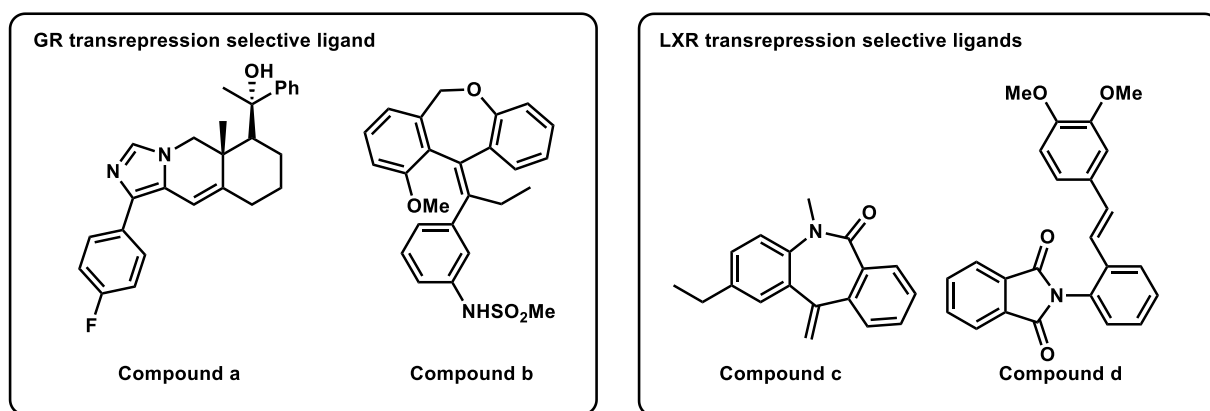


Figure 1-8. LXR と GR の transrepression 作用選択的リガンド

なお、本論文で述べる核内受容体 transrepression 作用選択的リガンドとは、transactivation 作用に対するアゴニスト作用を示さず、transrepression 作用を示す核内受容体リガンドを指す。この transrepression 作用選択的リガンドは、transactivation 作用に対するアゴニスト作用を示さないものの、核内受容体のリガンド結合ポケットに結合するため、transactivation に対してアンタゴニストとして働く。

以上の結果より、GR および LXR においては、transactivation 作用と transrepression 作用が分離可能であることが、リガンドの構造展開により明らかになった。

1-5 研究目的

これまでに述べたように、他の核内受容体 GR や LXR では transrepression 作用選択的なリガンドが報告されており、当研究室でも transrepression 作用選択的な LXR リガンドの創製に成功している。しかしながら、PPAR γ においてはそのようなリガンドの報告例はない。また、自身の修士課程におけるロシグリタゾンとピオグリタゾンの誘導体合成研究においても、transrepression 活性を有するパーシャルアゴニストの創製にとどまった。そこで、PPAR γ においてはアゴニスト作用の変化に応じて transrepression 作用がどのように変化するか、両作用に相関関係があるのかということをも明らかにすることを目的として研究に着手した。

2章 Transactivation 作用と transrepression 作用の相関関係

2-1 活性評価系

(1) Transactivation 作用評価 (PPAR γ agonist 活性)

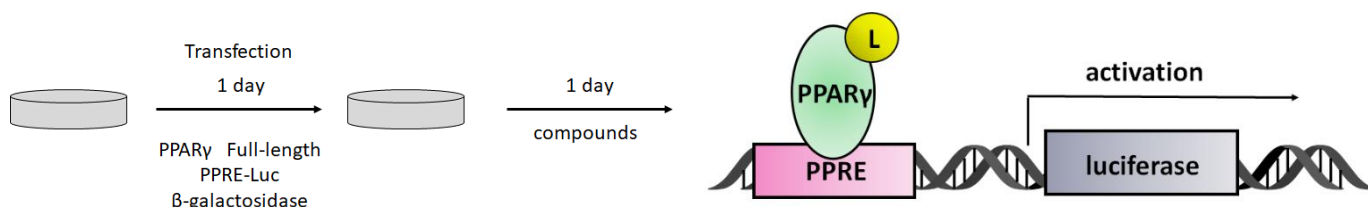


Figure 2-1. Transactivation 作用の評価系

Hela 細胞に、full length human PPAR γ と、PPRE の下流にルシフェラーゼを発現する遺伝子を Lipofectamine により一過的に共トランスフェクションし、化合物処理を行った。通常、PPAR γ は転写抑制状態にあるが、ここにアゴニストが添加されると co-activator がリクルートされ、luciferase の転写が活性化される。アゴニスト活性として、この転写活性、すなわち transactivation 活性の強弱を luciferin の発光量で評価した。EC₅₀ は各化合物の最大活性の 50% となる濃度である。最大活性 E_{max} は、ロシグリタゾンの最大活性を 100% とした時の各化合物の最大活性を相対的に定義したものである。なお、 β -galactosidase を発現するプラスミドを同時にトランスフェクションしており、その活性で細胞数やトランスフェクション効率を規格化した。

(2) Transrepression 作用評価 (NF- κ B 抑制活性)

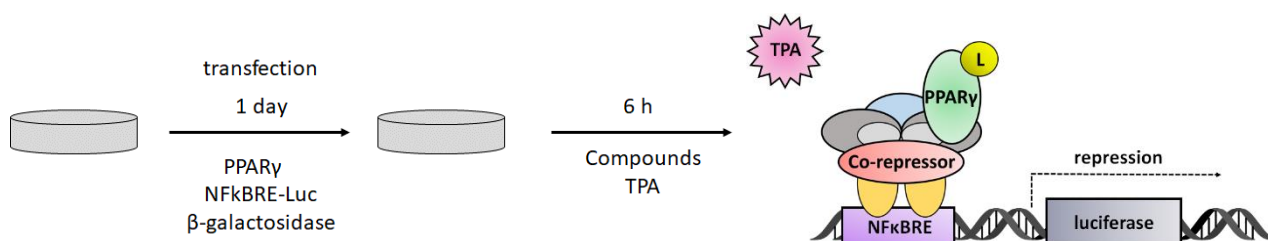


Figure 2-2. Transrepression 作用の評価系

Hela 細胞に、full length human PPAR γ と、NF κ BRE の下流に luciferase を発現する遺伝子を Lipofectamine により一過的に共トランスフェクションし、化合物処理（2 時間）を行った後、TPA 刺激（4 時間）を行った。通常、NF- κ B プロモーターは Co-repressor 複合体により転写抑制状態にあるが、TPA 刺激を加えることで、Co-repressor 複合体が除去され、luciferase の転写が活性化される。しかし、リガンドが結合した PPAR γ リクルートされることで、Co-repressor 複合体が安定化され、luciferase の転写が抑制されたままの状態となる。この転写抑制活性、すなわち transrepression 作用の強弱を luciferin の発光量で評価した。IC₅₀ は DMSO のみを処理した際を最低値、TPA 刺激を行った際を最大値として、その半分の障害を示す濃度である。なお、 β -galactosidase を発現するプラスミドを同時にトランスフェクションしており、その活性で細胞数やトランスフェクション効率を規格化した。

2-2 Transactivation 作用の EC₅₀ と transrepression 作用の IC₅₀

Transactivation 作用と transrepression 作用はいずれもリガンドの結合の結果起こる作用であることから、ロシグリタゾンにおける両作用の活性濃度域について調べた。結果を Fig. 2-3 に示す。Transactivation 作用の EC₅₀ は、transrepression 作用の IC₅₀ となっており、概ね一致した。この傾向は他のリガンドも見られたことから、以降では両者の最大活性における変化について比較を行うこととした。

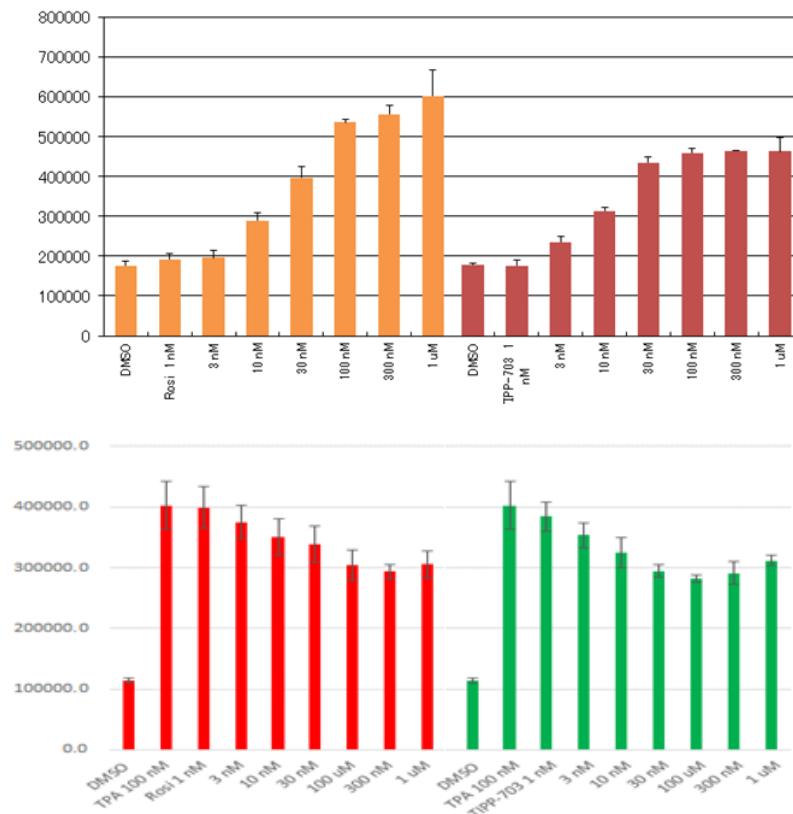
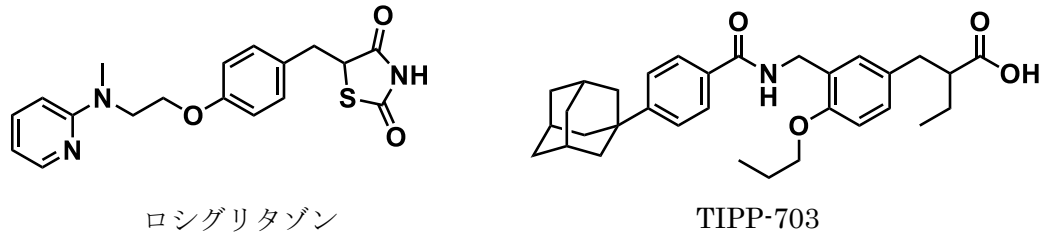


Figure2-3 ロシグリタゾンと TIPP-703 の transactivation 作用（上）と transrepression 作用（下）

Table 2-1 ロシグリタゾンと TIPP-703 の EC₅₀ と IC₅₀

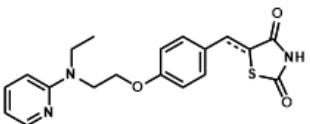
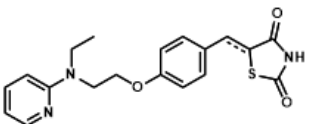
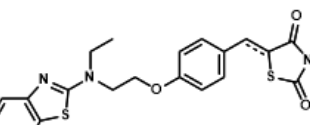
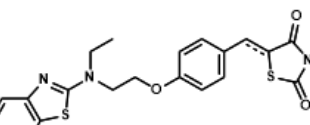
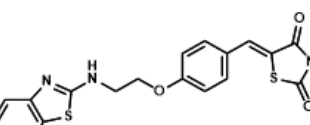
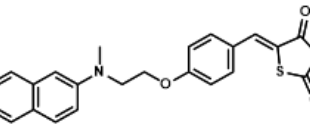
Compound	transactivation	transrepression
	EC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
Rosiglitazone	0.023	0.010
TIPP-703	0.010	0.006

2-3 ロシグリタゾン誘導体における活性の比較

まずは transrepression 研究において汎用されているグリタゾン系化合物について調べた。修士課程において合成したロシグリタゾン誘導体から化合物を抜粋して両作用の最大活性の比較を行った結果を Table 2-2. に示す。

グリタゾン系化合物はチアゾリジンジオン環 5 位の結合を単結合から二重結合にすることで transactivation 作用の最大活性が低下する。**1** と **2** についてみると、二重結合体にするだけで transrepression 作用の最大活性も低下した。また、**3d** や **4d** のように transactivation 作用の最大活性が **1** や **2** と比較して大きく低下している場合には、transrepression 作用の最大活性も同様に大きく低下していた。これらの結果から、グリタゾン系化合物においては、transactivation 作用の最大活性と transrepression 作用の最大活性は相関して変化する傾向があることが示唆された。

Table 2-2. ロシグリタゾン誘導体における最大活性の比較

Compound	bond	transactivation	transrepression
		E_{\max} (%)	Maximum inhibition of NF-kB transcription (%)
1d 	d	38	40
1s 	s	113	57
2d 	d	41	43
2s 	s	120	57
3d 	d	11	20
4d 	d	19	24

2-4 グリタゾン以外の PPAR γ アゴニストにおける transrepression 作用

これまで transrepression 研究はロシグリタゾンやピオグリタゾンなどグリタゾン薬剤を用いたものがほとんどであったことから、このような傾向が他の構造を有する PPAR γ アゴニストにおいても見られるかを確認することとした。所属研究室で創製された TIPP-703、市販されている GW1992、さらに岡山大学の宮地先生から提供して頂いた当研究室の化合物を由来とする化合物群 (MEKT21、T-714644、T-714646) である。これらの活性評価結果を Table 2-3. に示す。

TIPP-703、GW1992、MEKT21 のようにフルアゴニストに近い transactivation 作用の最大活性を持つアゴニストは transrepression 作用の最大活性についても同程度を維持していた。一方で、T-714644、T-714646 のように弱いパーシャルアゴニストになると、transrepression 作用の最大も大きく低下していた。これらの結果から、グリタゾン系以外の PPAR γ アゴニストにおいても、transactivation 作用の最大活性と transrepression 作用の最大活性は相関して変化する傾向があることが示唆された。

Table 2-3. グリタゾン以外の PPAR γ アゴニストにおける最大活性の比較

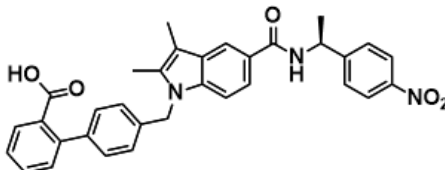
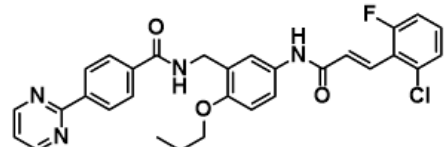
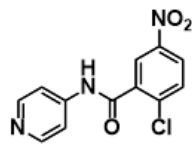
Compound	transactivation	transrepression
	E_{\max} (%)	Maximum inhibition of NF- κ B transcription (%)
TIPP-703	77	41
GW1929	83	44
MEKT-21	73	42
T-714644	13	8
T-714646	16	20

2-5 アンタゴニストにおける transrepression 作用

PPAR γ におけるアンタゴニストの報告例は多くはないが、それらの中でも異なる活性発現のメカニズムを持つ以下の3つのアンタゴニストについて活性を評価した。SR1664 はニトロ基が Phe282 と立体反発することで PPAR γ のコンフォメーションを変化させ、アンタゴニスト作用を発揮する。T-714657 は宮地先生から Helix12 の折り畳み阻害によってアンタゴニスト活性を発揮し、コリプレッサーNCoR との親和性も高いことが特徴である。T0070907 は汎用されている共有結合型のアンタゴニストである。これらの活性評価結果を Table 2-4. に示す。

いずれの場合においても transrepression 作用は示さないことが分かった。このことからアンタゴニストにおいてもアゴニスト作用と transrepression 作用が相関するということが示唆された。

Table 2-4. グリタゾン以外の PPAR γ アゴニストにおける最大活性の比較

Compound	transactivation	transrepression
	E_{\max} (%)	Maximum inhibition of NF- κ B transcription (%)
SR1664 	N.A.	N.A.
T-714657 	N.A.	N.A.
T0070907 	N.A.	N.A.

2-6 考察

ここまで見てきたように PPAR γ においては transactivation 作用（アゴニスト作用）と transrepression 作用がある程度相関して変化するということが示唆された。PPAR γ は核内受容体の中でも結晶構造の報告例に富んでおり、アゴニスト・アンタゴニストのいずれにおいても報告がある。ロシグリタゾンやピオグリタゾンの示す PPAR γ のフルアゴニスト活性には、リガンドと PPAR γ の Helix12 中にある Thy473 との水素結合の形成が重要であることが明らかとなっている。同様にフルアゴニストに準ずる強いアゴニスト作用をもつ MEKT-21 などでも Tyr473 との水素結合が形成されており、同じ Helix12 の折り畳みによるフォールディング構造を有している。パーシャルアゴニストでは Tyr473 との水素結合は形成せず、代わりに Helix 3 や β シートなどリガンドポケット中の異なる部位との相互作用をすることが明らかとなっている。このように transactivation 作用においてはリガンドとリガンドポケットにおける相互作用の差が大きく活性の強さに影響する。

Transrepression 作用は明らかになっていないことが多いが、PPAR γ では transrepression 作用の発現においてリガンド依存的に K367 の SUMO 化が起こることが分かっており、SUMO 化を介する機構は LXR でも共通であると考えられている。そこで transrepression 作用における PPAR γ の SUMO 化部位 (K367) と LXR β における SUMO 化部位 (K410 と K488) に着目する。Transrepression 作用を有する PPAR γ アゴニストであるロシグリタゾンと PPAR γ との結晶構造と、Transrepression 作用を有する LXR β アゴニストである GW3965 と LXR β との結晶構造を Fig. 2-4. に示す。PPAR γ においては K367 が LBP にかなり近い位置にあることが分かる。すなわち、リガンドと LBP の相互作用の変化によるコンフォメーション変化が大きく影響すると考えられる。本研究結果と合わせると、フルアゴニストの結合時におけるコンフォメーションが SUMO 化において最も有利な状態であり、そこからパーシャルアゴニスト、アンタゴニストと変化していく過程で SUMO 化が起こりにくいコンフォメーションに移っているのではないかと推察される。一方で、LXR の transrepression 作用においては、PPAR γ の場合と比較すると SUMO 化部位 (特に K410) が LBP から遠い位置にあることが分かる。すなわち LXR ではリガンドと LBP との相互作用によるコンフォメーション変化の影響を受けにくいのではないかと考えられる。このような理由から LXR においてはリガンド構造の変化による transactivation 作用の変化とはある程度独立して transrepression 作用を維持することができ、その結果 transrepression 作用を有するアンタゴニストの創製が出来たのではないかと考える。

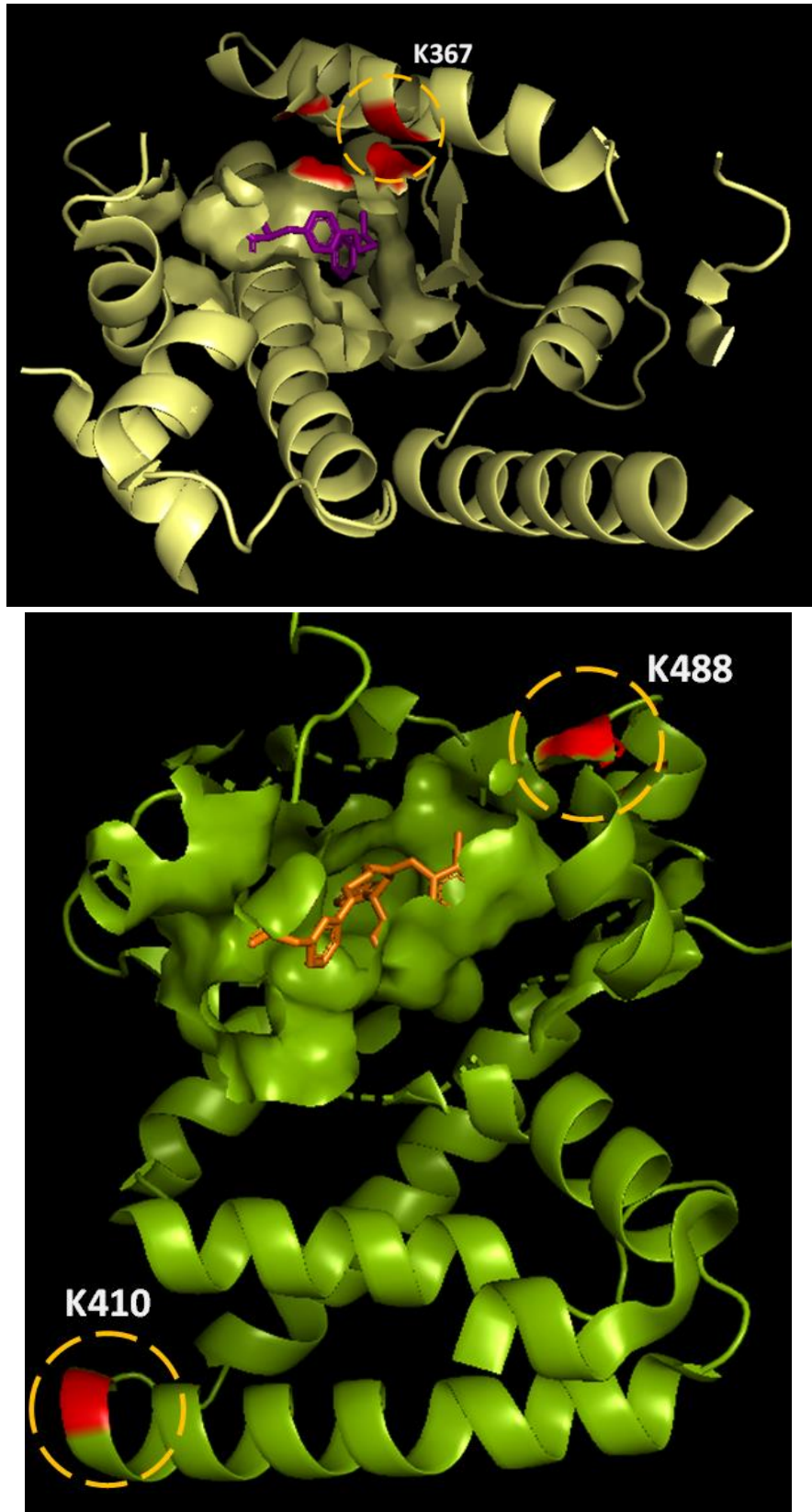


Figure 2-4. 複合体 X 線結晶構造におけるリガンドポケットと SUMO 化を受けるリジン残基の位置
(上 : PPAR γ とロシグリタゾン、下 : LXR β と GW3956)

総括

これまでに核内需要体をターゲットとして多くの医薬品が創製されてきたが、それらの多くは **transactivation** 作用に着目したものであることから、**transrepression** 作用の解明が出来ればそのような **transactivation** 作用中心の核内受容体研究に一石を投じることが出来るのではないかと考える。しかしながら、**transrepression** 作用はそのメカニズムの一端が明らかにはなっているが、リガンド情報など未解明な部分が多く残っている。そこでリガンド側からのアプローチを行うことで新しい知見を見出せるのではないかと考え、研究を行った。

本研究では、PPAR γ において **transactivation** 作用と **transrepression** 作用の両方を持つリガンドしか報告例がなかったことから、**transactivation** 作用の活性変化に応じて **transrepression** 作用がどのように変化するか、両作用の間の相関関係を検証した。その結果、この2つの作用は相関して変化する傾向があることが明らかとなった。これは PPAR γ では **transrepression** 作用において重要な Lys367 がリガンド結合ポケットの近傍に位置しており、**transactivation** 作用の変化による PPAR γ のコンフォメーション変化の影響を受けやすいためではないかと考える。

現在 PPAR γ のリガンド研究ではフルアゴニスト活性発現において重要な Thy473 との水素結合をせず、他の部位での相互作用を調製することで様々なパーシャルアゴニストやモジュレーターの新薬創製が行われている。しかしながら、**transrepression** 作用のみを示すリガンド、即ち **transrepression** 作用を示すアンタゴニストを創製するには上記のようなアプローチでは難しいと考えられる。そのようなリガンドの新薬創製には、PPAR γ の Lys367 の SUMO 化能を指標にスクリーニングを行い、既存のアゴニストとは異なる結合様式を持つリガンドを見出すなど、別のアプローチを試みる必要があると考える。

参考文献

第 I 部

HMGR 分解誘導剤 SR12813 の光親和性標識プローブ候補分子の創製

1. M. J. Martin , S. B. Hulley, W. S. Browner, L. H. Kuller, D. Wentworth, *Lancet* , **1986**, *2*, 933
2. J. Luo, H. Yang , B. L. Song. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasi *Mol. Cell. Biol.* **2019**.
3. P. A. Edwards, D. Lemongello, A. M. Fogelman, *Biochem. Biophys. Acta.*, **1975**, *574*, 123
4. M. S. Brown, S. E. Dana, J. M. Dietschy, M. D, *J. Biol. Chem.*, **1973**, *248*, 4731
5. J. L. Goldstein, M. S. Brown. *J. Biol. Chem*, **1990**, *343*, 425
6. Liscum L, et al. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 522.
7. K. L. Luskey, B. Stevens, *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 10271
8. F. B. Gertler, C. Y. Chiu, L. Richeter-Mann, D. J. Chin, *Mol. Cell. Biol.*, **1988**, *8*, 2713
9. P. E. Kuwabara, M. Labouesse, *Trends in Genetics*, **2002**, *18*, 193
10. T. A. Berkout, H. M, Simon, B. Jackson, J. Yates, N. Pearce, Groot PHE, C. Bentzen, E. Niesor, W. D. Kems, K. E. Suckling, *Atherosclerosis*, **1997**, *133*, 203
11. L. Nguyen, E. Niesor, C. Bentzen, H. Phan, *Curr. Med. Chem.*, **2002**, *2*, 205
12. T. A. Berkout, H. M, Simon, B. Jackson, J. Yates, N. Pearce, Groot PHE, C. Bentzen, E. Niesor, W. D. Kems, K. E. Suckling, *Atherosclerosis*, **1997**, *133*, 203
13. B. L. Song, N. B. Javvit, R. A. DeBose-Byod, *Cell Metabolism* **2005**, *1*, 179
14. A. D. Nguyen, J. G. McDonald, R. K. Buick, R. A. DeBose-Boyd, *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*, 27436
15. C. Yokoyama, X. Wang, M. R. Briggs, A. Admon, J. L. Goldstein, M. S. Brown, *Cell*, **1993**, *7*, 187
16. X. Hua, C. Yokoyama, J. Wu, M. R. Briggs, M. S. Brown, J. L. Goldstein, X. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, 11603
17. R. Sato, J. Yang, X. Wang, M. J. Evans, Y. K. Ho, J. L. Goldstein, M. S. Brown, *J. Biol. Chem*, **1994**, *269*, 17267
18. X. Wang, R. Sato, J. L. Goldstein, M. S. Brown, *Cell*, **1994**, *77*, 53
19. H. Shimano, R. Sato, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **2017**, *13*, 710

20. T. Yang, P. J. Espenshade, M. E. Wright, D. Yabe, Y. Gong, R. Aebersold, J. L. Goldstein, M. S. Brown, *Cell*, **2002**, *110*, 489
21. C. M. Adams, J. Reitz, J. K. Brabander, J. D. Feramisco, L. Li, A. Radhakrishnan, T. Yang, P. J. Espenshade, M. E. Wright, D. Yabe, Y. Gong, R. Aebersold, M. S. Brown, J. L. Goldstein, *J. Biol. Chem*, **2004**, *279*, 52772
22. A. Radhakrishnan, Y. Ikeda, H. J. Kwon, M. S. Brown, J. L. Goldstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, *104*, 6511
23. N. Sever, M. S. Brown, J. L. Goldstein, R. A. DeBose-Boyd, *Proc. Mol. Cell*, **2003**, *11*, 25
24. N. Sever, B. L. Song, D. Yabe, J. L. Goldstein, M. S. Brown, R. A. DeBose-Boyd, *J. Biol. Chem*, **2003**, *278*, 52479
25. A. D. Nguyen, S. H. Lee, R. A. DeBose-Boyd, *J. Biol. Chem*, **2009**, *284*, 26778
26. K. Ohgane, F. Karaki, K. Dodo, Y. Hashimoto, *Chem. Biol.*, **2013**, *20*, 391
27. X. Gong, H. Qian, X. Zhou, J. Wu, T. Wan, P. Cao, W. Huang, X. Zhao, X. Wang, P. Wang, Y. Shi, G. F. Gao, Q. Zhou, N. Yan, *Cell*, **2016**, *165*, 1467
28. X. Li, F. Lu, M. N. Trinh, P. Schmiede, J. Seemann, J. Wang, G. Blobel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2017**, *114*, 9116
29. X. Gong, H. Qian, P. Cao, X. Zhao, Q. Zhou, J. Lei, N. Yan, *Science*, **2018**, *150*, 8935
30. J. J. Hulce, A. B. Coggnetta, M. J. Niphakis, S. E. Tully, B. F. Cravatt, *Nat. Methods*, **2013**, *10*, 259
31. G. Gil, J. R. Faust, D. J. Chin, J. L. Goldstein, M. S. Brown, *Cell*, **1985**, *41*, 249
32. D. G. Skalnik, H. Narita, C. Kent, R. D. Simoni, *J. Biol. Chem*, **1988**, *263*, 6863

第II部

PPAR γ における transactivation 作用と transrepression 作用の相関関係の検証

1. Evans, R.M. *Science* **1988**, *240*, 889-895
2. McKenna, N.J. *et al. Endocr. Rev.* **1999**, *20*, 321-344
3. D.L. Bain *et al. Annu. Rev. Physiol.* **2007**, *69*, 201
4. Garcia-Vallvé S. *et al. J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 5381-5394
5. Ahmadian M. *et al. Nature Med.* **2013**, *19*, 557-566

6. YouFei G. *et al. Nature Med.* **2005**, *11*, 861-866
7. Gray A. *Osteoporos Int* **2008**, *19*, 129-137
8. Evan D. R. *et al. Gene & Development* **2002**, *16*, 22-26
9. Mercedes R. *Nature* **1998**, *391*, 79-82
10. Chengyu J. *et al. Nature* **1998**, *391*, 82-86
11. Pasucal G. *et al. Nature* **2005**, *437*, 759-763
12. Ormseth J. M. *et al. Arthritis Research & Therapy* **2013**, *15*, 110-118
13. Rinne T. S. *et al. Allergy, Asthma & Clinical Immunology* **2014**, *10*, 34-39
14. Glass K. C. *Nature Review Immunology*, **2010**, *10*, 365-376
15. Scheinman R. *et al. Molecular and Cellular Biology* **1995**, *15*, 943-953
16. Cindy, S. *et al. Nature Clinical Practice Rheumatology* **2008**, *4*, 525-533
17. Reichardt, H.M. *et al. EMBO J*, **2001**, *20*, 7168-7173
18. Serena G. *et al. Molecular Cell*, **2007**, *25*, 57-70
19. Baell b. j. *et al. J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1270-1280
20. Carson W. M. *et al. J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 849-860
21. Aoyama A. *et al. J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 7360-7377
22. Nomura S. *et al. ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 902-907
23. Pasucal G. *et al. Nature* **2005**, *437*, 759-763
24. Sohda T. *YAKUGAKU ZASSHI* **2002**, *122*, 909-918

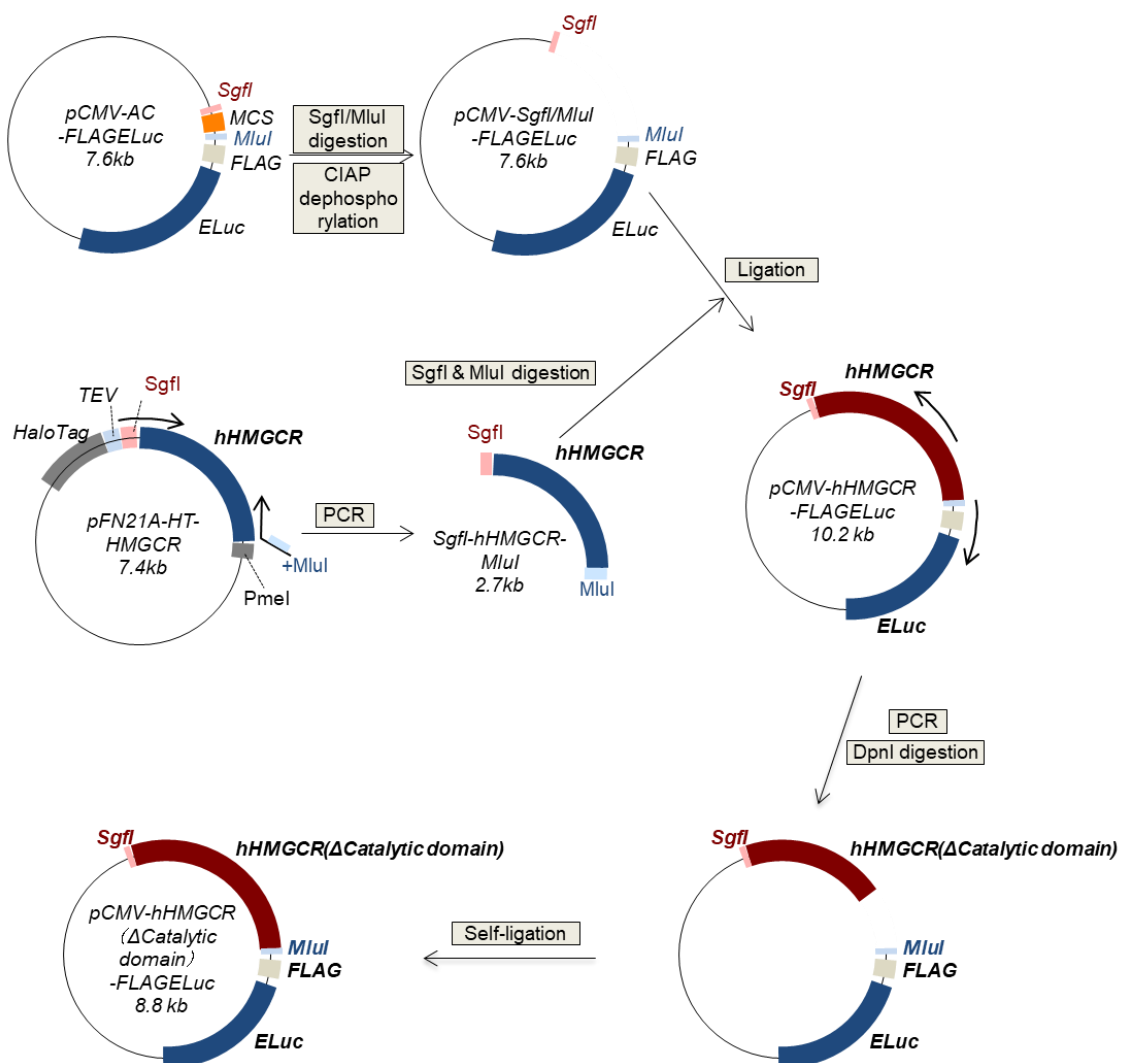
実験項

1. Biology

1-1 Cell culture

HEK293 cells, Hela cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin and streptomycin at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator.

1-2 Preparation of pCMV-hHMGCRC(ΔCatalytic domain)-ELuc vector



1-3 Stable cell line expressing hHMGCRCR(Δ Catalytic domain)-ELuc

HEK293 cells were seeded onto 3.5 cm dish. After overnight culture, the cells were transfected with pCMV-hHMGCRCR(Δ Catalytic domain)-ELuc. Cells stably expressing hHMGCRCR(Δ Catalytic domain)-ELuc were obtained by applying selection pressure with G418.

1-4 Luciferase assay for HMGR degradation

HEK293 cells stably expressing hHMGCRCR(Δ Catalytic domain)-ELuc were plated onto a 96 well plate. After 48 h, cells were treated with the test compounds or DMSO pre-diluted with DMEM (final DMSO concentration was 0.1%). After 4 h, cells were assayed for luciferase activity with a Wallac ARVO SX 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer).

1-5 Photoaffinity Labeling

Membrane fraction was prepared from HEK293 cells or HEK293 cells ably expressing hHMGCRCR(Δ Catalytic domain)-ELuc which were pre-treated 3 μ M compacitn for 16 h. The membrane fraction (98 μ L, adjusted to 2.0 μ g total protein) were incubated with srpDHY or srpDHY and compound 13 for 30 min. Then, the samples were irradiated with UV (365 nm) for 1 or 3min using LED365-SPT/L. The membrane fractions were lysed and denatured by adding 1/10 volume of 10% [w/v] SDS -10% [v/v] Triton X-100 stock solution on ice for 30 min. Solubilized membrane was mixed with biotin-PEG3-azido (5 μ M in DMDO, 1 μ L) by gentle pipetting . Click reaction was performed. Click reaction mixture were prepared by vortexing 2.5 μ L of 100 mM aqueous CuSO₄, 113 μ L of water, 7.5 μ L of 1.7 mM TBTA in 'BUOH/DMSO(4:1, v/v), 31.3 μ L of 200 mM aminoguanidine, and 62.5 μ L of freggly prepared 100 mM sodium ascorbate. To the membarane ftactions containig biotin-PEG3-azido (112.5 μ L) was added 12.5 μ L each of this ckick reaction mixture, and the mixtures were incubatef at room temperature for 1 h. After the click reaction, the mixtures were diluted 10-fold with 1125 μ L of TNET supplemented with cOmplete protease inhibitor cocktail. The diluted mixtures was mixed with pre-washed anti-FLAG M2 magnetiv beads and the mixtures were roated overnight at 4 $^{\circ}$ C. The beas were washed with 400 μ L of TBS twicw, and 400 μ L TNET and eluted with 15 μ L of 1xSDS sample buffer heating 37 for 30 min and cooled on ice for 15 min. SDS-PAGE, transfer to PVDF membranes and blocking the membranes were probed with immunoPure streptavidin-HRP (Pierce, x12,000 in TBST) for 1 h and chemeluuminescence detection was performed. Similarly, the membranes were re-probewdwith anti-FLAG antibody after stripping.

1-6 Luciferase reporter assay for transactivation

Hela cells were plated onto a 96 well plate. After 24 h, cells were transfected plasmids (PPAR γ , PPRE-Luc, β -glacsitase) with Lipofectamin 2000 (Thermo Fisher). After 24h, the test compounds or DMSO pre-diluted with DMEM (final DMSO concentration was 0.5%). After 24 h, cells were assayed for luciferase activity with a Wallac ARVO SX 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer).

1-7 Luciferase reporter assay for transrepression

Hela cells were plated onto a 96 well plate. After 24 h, cells were transfected plasmids (PPAR γ , NFkBRE-Luc, β -glacsitase) with Lipofectamin 2000 (Thermo Fisher). After 24h, the test compounds or DMSO pre-diluted with DMEM (final DMSO concentration was 0.5%). After 2 h, cells were stimulated with 10 nM TPA. After 4 h, cells were assayed for luciferase activity with a Wallac ARVO SX 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer).

2. Chemistry

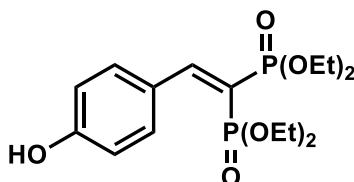
1-1 General Comments

All chemical reagents and solvents were purchased from Sigma-Aldrich, Kanto Chemical Industry and Wako Pure Chemical Industries, and used without further purification. Moisture sensitive reaction were performed under an atmosphere of argon, unless otherwise noted, and monitored by thin-layer chromatography (TLC, Merck silica gel 60 F254 plate). Bands were visualized using UV light or by application of appropriate reagents followed by heating. Flash chromatography was carried out with silica gel (Silica gel 60 N, 40-50 μm particle size) purchased from Kanto Chemical. NMR spectra were recorded on a JEOL JNM-ECA500 (500 MHz) spectrometer, operating at 500 MHz for ^1H NMR and at 125 MHz for ^{13}C NMR. Proton and carbon chemical shifts are expressed in δ values (ppm) relative to internal tetramethylsilane (0.00 ppm), residual CHCl_3 (7.26 ppm) for ^1H NMR and internal tetramethylsilane (0.00 ppm) or CDCl_3 (77.16 ppm) for ^{13}C NMR. Data are reported as follows chemical shift, multiplicity (s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet; br, broad), coupling constants (Hz), and integration. High-resolution mass spectrum was recorded using a Bruker micrOTOF II mass spectrometer.

2-2 Synthesis of SR12813 derivatives

tetraethyl 2-(4-hydroxyphenyl)ethenylidene-1,1-bisphosphonate (2)

(General Procedure 1)



The Knoevenagel condensation of aldehydes and methylenediphosphonates was performed by the method reported by Lehnert, W. et al. [Lehnert W (1974) Knoevenagel kondensationen mit TiCl_4 /base-IV : Umsetzungen von aldehyden und ketonen mit phosphonoessigester und methylenediphosphonsäureestern. *Tetrahedron* 30: 301–305].

To a solution of 4-hydroxybenzaldehyde (248 mg, 2.03 mmol) in dry THF (6 mL) was slowly added TiCl_4 (0.69 mL, 6.1 mmol) at 0 °C under Ar. To the resulting mixture was added tetraethyl methylenebisphosphonate (0.710 mL, 2.84 mmol), and the mixture was treated dropwise with N-methylmorpholine (1.34 mL, 12.2 mmol) at 0 °C. The reaction was allowed to warm up to the ambient temperature and stirred for 3 h. The reaction was cooled to 0 °C, and quenched by adding ice chips followed by saturated aqueous NH_4Cl solution. The mixture was extracted with AcOEt, and the organic layer was washed with water and brine, dried over MgSO_4 , and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (AcOEt/ CH_2Cl_2 /MeOH 10/10/0 to 10/10/1) to afford the title compound (732 mg, 1.87 mmol, 92%) as pale yellow oil..

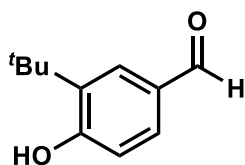
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, δ): 9.64 (s, 1H), 8.24 (dd, $J = 49.0, 29.5$ Hz, 1H), 7.74 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.90 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 4.21–4.15 (m, 4H), 4.12–4.06 (m, 4H), 1.37 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 1.24 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz, δ): 162.80, 161.13, 133.83 (2C), 125.14 (dd, $J = 21.6, 8.4$ Hz), 115.64 (2C), 113.05 (dd, $J = 173.9, 169.1$ Hz), 62.73 (d, $J = 6.0$ Hz, 2C), 62.57 (d, $J = 6.0$ Hz, 2C), 16.26 (d, $J = 6.0$ Hz, 2C), 16.04 (d, $J = 6.0$ Hz, 2C).

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 202 MHz, δ): 18.62 (d, $J = 51.2$ Hz, 1P), 13.82 (d, $J = 51.2$ Hz, 1P).

HRMS–ESI (m/z): $[\text{M} - \text{H}]^-$ calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_7\text{P}_2$, 391.1081; found, 391.1093.

3-*tert*-butyl-4-hydroxybenzaldehyde (4)



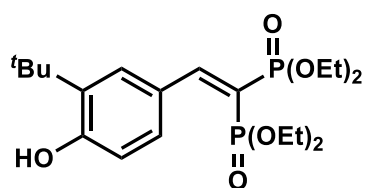
To oxidize the methyl group on 3-*tert*-butyl-*p*-cresol, DDQ/MeOH condition was applied [Bird, C. W. and Chauhan, Y. -P. S. (1980) A convenient synthesis of *p*-hydroxybenzaldehydes. *Org. Prep. Procedures Int.* 12, 201-202]. Note that the DDQ oxidation of this particular cresol was reported to give poor yield of the aldehyde (<5%), due to oxidative coupling of the cresol [Hewgill, F. R. and Howie, G. B. (1978) On the oxidation of 2-*t*-butyl-*p*-cresol. *Aust. J. Chem.* 31, 907-917]. A Cobalt-catalyzed aerobic oxidation (1 mol% $\text{Co}(\text{OAc})_2$, 1 atm O_2 , 6 eq NaOH in ethyleneglycol, 80 °C for 10 h) was also tested, but the yield was quite low (4.2%) [Jiang J-A. et al. (2014) Efficient $\text{Co}(\text{OAc})_2$ -catalyzed aerobic oxidation of WWG-substituted 4-cresols to access 4-hydroxybenzaldehydes. *Tet. Lett.* 55, 1406-1411].

A solution of 2-*tert*-butyl-*p*-cresol (386 mg, 2.35 mmol) in MeOH (3 mL) was treated with a solution of DDQ (1068 mg, 4.70 mmol) in MeOH (5 mL), and the solution was stirred at the ambient temperature for 3 h. After evaporation of the solvent, the residue was suspended in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (10/1) and filtered through a pad of silica gels to remove insoluble materials. Purification by flash column chromatography (hexane/AcOEt 5/1 to 4/1) gave the aldehyde (76.4 mg, 0.429 mmol, 18%) as pale brown oil. $R_f = 0.25$ (hexane/AcOEt 2/1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, δ): 9.85 (s, 1H), 7.84 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.64 (dd, $J = 8.0, 2.3$ Hz, 1H), 6.83 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.28 (br s, 1H), 1.44 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz, δ): 191.64, 160.41, 137.05, 130.09, 129.64, 129.61, 117.00, 34.70, 29.28 (3C).

tetraethyl 2-(3-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)ethenylidene-1,1-bisphosphonate (5)



To a solution of OGK2136 (85.2 mg, 0.478 mmol) in dry THF (4 mL) was slowly added TiCl_4 (0.160 mL, 1.46 mmol) at 0 °C under Ar. To the resulting mixture was added tetraethyl methylenebisphosphonate (0.119 mL, 0.478 mmol), and the mixture was treated dropwise with *N*-methylmorpholine (0.315 mL, 2.87 mmol) at 0 °C. The reaction was allowed to warm up to the ambient temperature and stirred for 18 h. The reaction was cooled to 0 °C, and quenched by adding ice tips followed by saturated aqueous NH_4Cl solution. The mixture was extracted with AcOEt, and the organic layer was washed with water and brine, dried over MgSO_4 , and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (AcOEt/ CH_2Cl_2 /MeOH 100/100/2 to 100/100/5 to 100/100/10) to afford the title compound (46.8 mg, 0.104 mmol, 22%) as red oil. $R_f = 0.25$ (AcOEt/ CH_2Cl_2 /MeOH 10/10/1).

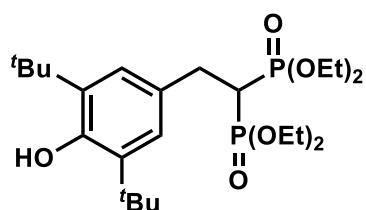
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, δ): 9.46 (s, 1H), 8.25 (dd, $J = 49.0, 29.5$ Hz, 1H), 7.79 (dd, $J = 8.6, 2.3$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.89 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 4.22–4.15 (m, 4H), 4.13–4.08 (m, 4H), 1.37 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 1.37 (s, 9H), 1.24 (t, $J = 6.9$ Hz, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz, δ): 163.79, 160.25, 135.80, 132.56, 130.91, 124.59 (dd, $J = 21.6, 8.4$ Hz), 116.84, 111.34 (dd, $J = 174.5, 169.7$ Hz), 62.63 (d, $J = 6.0$ Hz, 2C), 62.48 (d, $J = 4.8$ Hz, 2C), 34.67, 29.25 (3C), 16.29 (d, $J = 7.2$ Hz, 2C), 16.05 (d, $J = 7.2$ Hz, 2C).

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 202 MHz, δ): 19.36 (d, $J = 52.0$ Hz, 1P), 14.34 (d, $J = 52.0$ Hz, 1P).

HRMS–ESI (m/z): $[\text{M} - \text{H}]^-$ calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_7\text{P}_2$, 447.1707; found, 447.1722.

tetraethyl 2-(4-hydroxy-3,5-di-*tert*-butylphenyl)ethan-1,1-bisphosphonate (6)



To a solution of SR12813 (33.6 mg, 0.0666 mmol) in EtOH (1 mL) was slowly added LiBH_4 (20.1 mg, 0.923 mmol) at 0 °C, and the reaction mixture was stirred for 1 h at the ambient temperature. Additional portion of LiBH_4 (24.2 mg, 1.11 mmol) was added at the temperature, and the bright yellow suspension was stirred for 16 h. The reaction was cooled to 0 °C, and quenched by adding saturated aqueous NH_4Cl solution. The colorless mixture was extracted with AcOEt, and the organic layer was washed with water and brine, dried over MgSO_4 , and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (AcOEt/ CH_2Cl_2 /MeOH = 50/50/1 to 10/10/1) to afford the title compound (21.0 mg, 0.0415 mmol, 62%) as colorless oil. $R_f = 0.25$ (AcOEt/ CH_2Cl_2 /MeOH 10/10/1), slightly more polar than the starting material.

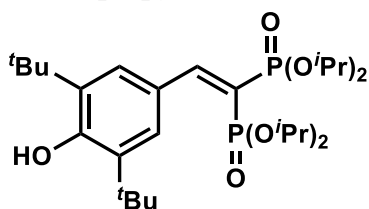
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, δ): 7.07 (s, 2H), 5.08 (s, 1H), 4.14–4.04 (m, 8H), 3.17 (td, $J = 16.6, 6.3$ Hz, 2H), 2.64 (tt, $J = 24.1, 6.3$ Hz, 1H), 1.42 (s, 18H), 1.27 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 1.25 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz, δ): 152.29, 135.57 (2C), 130.08 (t, $J = 7.2$ Hz), 125.44 (2C), 62.46 (d, $J = 6.0$ Hz, 2C), 62.31 (d, $J = 6.0$ Hz, 2C), 39.47 (t, $J = 131.4$ Hz), 34.24 (2C), 31.05 (t, $J = 4.8$ Hz), 30.27 (6C), 16.29 (d, $J = 7.1$ Hz, 4C).

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 202 MHz, δ): 23.05.

HRMS–ESI (m/z): $[\text{M} - \text{H}]^-$ calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{O}_7\text{P}_2$, 505.2490; found, 505.2483.

tetraisopropyl 2-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)ethenylidene-1,1-bisphosphonate (8)

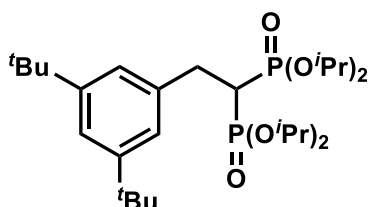


To a solution of 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzaldehyde (0.469 g, 2.0 mmol) in dry THF (4 mL) was added titanium tetrachloride (0.658 mL, 6.0 mmol), tetraisopropyl methylenediphosphonate (0.910 mL, 2.8 mmol), *N*-methylmorpholine (1.25 mL, 11.4 mmol) at 0°C under argon atmosphere. After stirring for 4 h at room temperature, saturated aqueous ammonium chloride was added. THF was removed under reduced pressure. The residue was extracted with EtOAc and washed brine, combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc : Hexane = 4 : 1) to give title compound as a pale yellow solid (0.8315 g, 74%).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.20 (dd, $J = 48.1, 30.4$ Hz, 1H), 7.77 (s, 2H), 5.60 (s, 1H), 4.83–4.74 (m, 2H), 4.72–4.63 (m, 2H), 1.44 (s, 18H), 1.39 (d, $J = 5.7$ Hz, 6H), 1.35 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H), 1.22 (d, $J = 5.7$ Hz, 6H), 1.16 (d, $J = 5.7$ Hz, 6H)

tetraisopropyl 2-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)ethan-1,1-bisphosphonate (10)

(General Procedure 1)



To a solution of tetraisopropyl methylenediphosphonate (347 mg, 1.01 mmol) in dry THF (5 mL) was added *n*BuLi (0.61 mL, 0.958 mmol) at -78 °C under argon atmosphere. After 10 min, to the solution was added solution of 3, 5-di-*tert*-butylbenzyl bromide (9) (90.8 mg, 0.321 mmol) and TBAI (22.7 mg, 0.0615 mmol). After stirring for 16 h at room temperature, water was added and the residue was extracted with EtOAc and

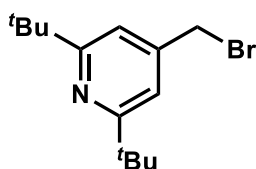
washed water and brine, combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc : DCM = 1 : 1) to give title compound as a colorless solid (126.5 mg, 72%).

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ): 7.25 (s, 1H), 7.10 (s, 2H), 4.79-4.70 (m, 4H), 3.21 (td, *J* = 16.5, 6.0 Hz, 2H), 2.59 (tt, *J* = 24.0, 6.0 Hz, 1H), 1.31–1.29 (m, 30H), 1.23 (d, *J* = 6.3, 6H), 1.20 (d, *J* = 6.3, 6H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, δ): 150.36, 138.97 (t, *J* = 7.2 Hz, 2C), 123.17 (2C), 120.28, 71.11 (t, *J* = 3.6 Hz, 2C), 70.83 (t, *J* = 3.0 Hz, 2C), 40.89 (t, *J* = 133.8 Hz), 34.75 (2C), 32.00 (t, *J* = 4.8 Hz), 31.49 (6C), 24.17 (4C), 23.88 (t, *J* = 2.4 Hz, 2C), 23.70 (t, *J* = 2.4 Hz, 2C).

³¹P-NMR (CDCl₃, 202 MHz, δ): 21.05 (s, 2P).

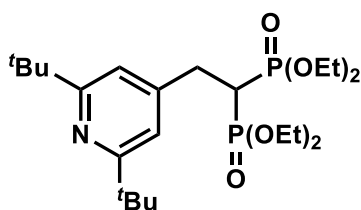
4-(Bromomethyl)-2,6-di-tert-butylpyridine (12)



To a solution of 2,6-di-tert-butyl-4-methylpyridine (577.6 mg, 32.81 mmol) in dry DCM (9 mL) was added NBS (521.5 mg, 3.37 mmol) and AIBN (92.4 mg, 0.563 mmol) at room temperature under argon atmosphere. The solution was stirred with irradiating light and adding AIBN every other hour at 85 °C. After stirring for 4 h, hexane was added and the white precipitation was filtered to get the crude product of title compound. This crude compound was used in next reaction without further purification.

tetraisopropyl 2-(2,6-di-tert-butylpyridine)ethan-1,1-bisphosphonate (13)

(General Procedure 1)

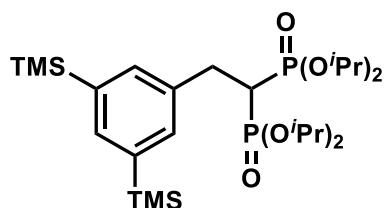


To a solution of tetraisopropyl methylenediphosphonate (1.21 mL, 3.74 mmol) in dry THF (8 mL) was added *n*BuLi (2.17 mL, 3.37 mmol) at -78 °C under argon atmosphere. After 10 min, to the solution was added solution of 4-(Bromomethyl)-2,6-di-tert-butylpyridine (12) (531 mg, 1.87 mmol) and TBAI (138 mg, 0.374 mmol). After stirring for 48 h at room temperature, water was added and the residue was extracted with EtOAc and washed brine, combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc : DCM = 1 : 1) to give title compound as a pale yellow oil (0.8315 g, 74%).

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ): 6.99 (s, 2H), 4.80-4.71 (m, 4H), 3.15 (td, *J* = 16.3, 6.3 Hz, 2H), 2.56 (tt, *J* =

24.1, 6.3 Hz, 1H), 1.33 (s, 18H), 1.31 (d, $J = 6.3$ Hz, 12H), 1.23 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H), 1.22 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H).
 ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz, δ): 167.30 (2C), 148.46 (t, $J = 7.2$ Hz), 116.01 (2C), 71.37 (t, $J = 3.5$ Hz, 2C), 71.06 (t, $J = 3.5$ Hz, 2C), 40.02 (t, $J = 135.0$ Hz), 37.50 (2C), 31.67 (t, $J = 4.8$ Hz), 30.17 (6C), 24.15 (4C), 23.92-23.86 (m, 2C), 23.76 -23.71 (m, 2C).
 ^{31}P -NMR (CDCl_3 , 202 MHz, δ): 20.47 (s, 2P).

tetraisopropyl 2-(3,5-di-trimethylsilyl-4-hydroxyphenyl)ethan-1,1-bisphosphonate (15)



This compound was prepared from **14** (33.4 mg, 0.105 mmol) by means of GP-1. A colorless oil (10.9 mg, 0.019 mmol, 18%).

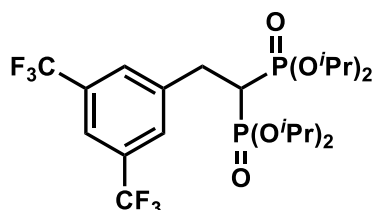
^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ): 7.47 (s, 1H), 7.38 (d, 1.2 Hz, 1H), 4.77-4.69 (m, 4H), 3.21 (td, $J = 16.0, 6.3$ Hz, 2H), 2.56 (tt, $J = 24.1, 6.3$ Hz, 1H), 1.30 (d, $J = 6.3$ Hz, 12H), 1.23 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H), 1.18 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H), 0.25 (s, 18H).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz, δ): 139.23, 138.33 (t, $J = 7.2$ Hz, 2C), 136.15, 134.66 (2C), 71.22 (t, $J = 3.6$ Hz, 2C), 70.98 (t, $J = 3.6$ Hz, 2C), 40.99 (t, $J = 133.5$ Hz), 31.89 (t, $J = 4.8$ Hz), 29.78 (6C), 24.23 (4d, $J = 6.0$ Hz 4C), 23.97 (2C), 23.77 (t, $J = 2.4$ Hz, 2C).

^{31}P -NMR (CDCl_3 , 202 MHz, δ): 21.75 (s, 2P).

HRMS-ESI (m/z): $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{52}\text{O}_6\text{P}_2\text{Si}_2$, 601.2670; found, 601.2657

tetraisopropyl 2-(3,5-bis-trifluoromethyl-4-hydroxyphenyl)ethan-1,1-bisphosphonate (17)



This compound was prepared from **16** (217 mg, 0.826 mmol) by means of GP-1. A colorless oil (409 mg, 0.717 mmol, 87%).

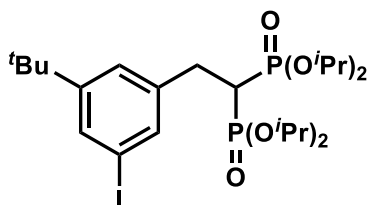
^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ): 7.76 (s, 2H), 7.73 (s, 1H), 4.82-4.75 (m, 4H), 3.33 (td, $J = 16.2, 6.5$ Hz, 2H), 2.47 (tt, $J = 24.1, 6.3$ Hz, 1H), 1.34 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H), 1.31 (d, $J = 5.7$ Hz, 6H), 1.25 (d, $J = 5.7$ Hz, 6H), 1.24 (d, $J = 5.7$ Hz, 6H).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz, δ): 142.49 (t, $J = 7.8$ Hz, 2C), 131.32 (q, $J = 33.2$ Hz), 129.64 (2C), 123.39 (q, $J = 272.7$ Hz, 2C), 120.37 (t, $J = 3.6$ Hz), 71.71-71.64 (m, 2C), 71.43-71.38 (m, 2C), 40.17 (t, $J = 134.4$ Hz),

31.63 (t, $J = 4.8$ Hz), 24.09 (4C), 23.90-23.86 (m, 2C), 23.78 -23.72 (m, 2C).

^{31}P -NMR (CDCl_3 , 202 MHz, δ): 19.63 (s, 2P).

tetraisopropyl 2-(3-iodo-5-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)ethan-1,1-bisphosphonate (20)



This compound was prepared from **19** (975 mg, 2.76 mmol) by means of GP-1. A pale yellow oil (396 mg, 0.643 mmol, 48% (2 steps)).

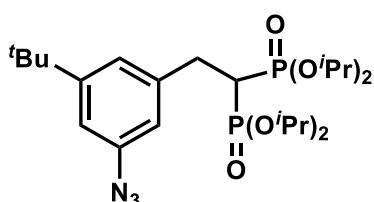
^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ): 7.52 (t, $J = 1.7$, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.21 (s, 1H), 4.78-4.69 (m, 4H), 3.12 (td, $J = 16.1, 5.8$ Hz, 2H), 2.45 (tt, $J = 24.1, 6.3$ Hz, 1H), 1.31–1.25 (m, 33H).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz, δ): 153.44, 142.10 (t, $J = 7.2$ Hz), 135.42, 132.63, 125.67, 94.29, 71.44 (t, $J = 3.6$ Hz, 2C), 71.18 (t, $J = 3.6$ Hz, 2C), 40.91 (t, $J = 133.5$ Hz), 34.78, 31.46 (t, $J = 4.8$ Hz), 31.30 (3C), 24.27 (4C), 23.99 (d, $J = 2.4$ Hz, 2C), 23.87 (d, $J = 2.4$ Hz, 2C).

^{31}P -NMR (CDCl_3 , 202 MHz, δ): 21.34 (s, 2P).

HRMS-ESI (m/z): $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{43}\text{O}_6\text{P}_2\text{I}$, 639,1427; found, 6391445

tetraisopropyl 2-(3-azido-5-(*tert*-butyl))ethan-1,1-bisphosphonate (21)



To a solution of **19** (116.4 mg, 0.189 mmol) in EtOH (2.7 mL) and water (1.8 mL) was added NaN_3 (24.5 mg, 0.378 mmol), *t*-DMACH (4.5 mL, 0.028 mmol), CuI (3.6 mg, 0.019 mmol) and L-sodium ascorbate (1.9 mg, 0.0095 mmol), then degassed by sonication at room temperature. The solution was refluxed. After stirring for 40 h, the solution was extracted by CHCl_3 and EtOAc, combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc : DCM : MeOH= 10 : 10 : 1) to give title compound as a pale yellow oil (13.7 mg, 56%).

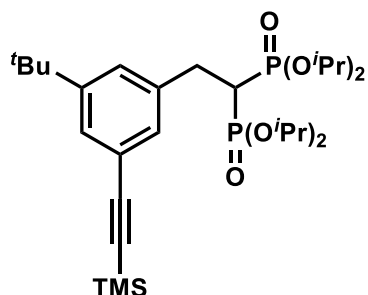
^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ): 7.06 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 4.81-4.70 (m, 4H), 3.18 (td, $J = 16.6, 6.3$ Hz, 2H), 2.49 (tt, $J = 36.7, 5.8$ Hz, 1H), 1.31–1.25 (m, 33H).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz, δ): 153.19, 141.78, 139.41, 123.08, 116.93, 114.40, 71.22 (t, $J = 3.6$ Hz, 2C), 71.18 (t, $J = 3.6$ Hz, 2C), 40.86 (t, $J = 133.5$ Hz), 34.92, 31.46 (t, $J = 4.8$ Hz), 31.32 (3C), 24.27 (4C), 23.99 (d, $J = 2.4$ Hz, 2C), 23.87 (d, $J = 2.4$ Hz, 2C).

^{31}P -NMR (CDCl_3 , 202 MHz, δ): 21.49 (s, 2P).

HRMS-ESI (m/z): $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{43}\text{O}_6\text{P}_2\text{I}$, 639,1427; found, 554.24

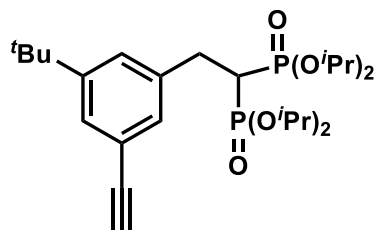
tetraisopropyl 2-(3-azido-5-(tert-butyl)ethan-1,1-bisphosphonate (22)



To a solution of **19** (123.5 mg, 0.200 mmol) in THF (2.0 mL) was added TMS-acetylene (69.2 μL , 0.500 mmol), triethylamine (69.3 μL , 0.500 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)$ (11.2 mg, 0.016 mmol) and CuI (1.5 mg, 0.0080 mmol) at room temperature. After stirring for 24 h, the solution was extracted by DCM, combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure to give title compound as a brown oil (108.8 mg, 93%).

^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ): 7.31 (s, 1H), 7.24 (s, 2H), 4.79-4.72 (m, 4H), 3.16 (td, $J = 16.6, 6.3$ Hz, 2H), 2.49 (tt, $J = 24.1, 6.3$ Hz, 1H), 1.31-1.24 (m, 33H), 0.23 (s, 9H).

tetraisopropyl 2-(3-ethynyl-5-(tert-butyl)benzene)ethan-1,1-bisphosphonate (23)



To a solution of **13** (66.9 mg, 0.126 mmol) in MeCN (1.0 mL) was added LiBr (11.0 mg, 0.126 mmol) at room temperature, then the solution was refluxed. After stirring for 24 h, 1 M HCl was added. The solution was extracted by DCM, combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure to give title compound as a pale pink oil (20.1 mg, 23.3%).

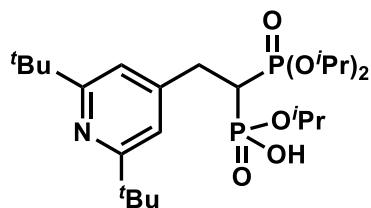
^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ): 6.99 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H), 4.83-4.67 (m, 3H), 3.72 (t, $J = 10.9$ Hz, 3H), 3.20-3.11 (m, 2H), 2.62 (tt, $J = 24.3, 6.3$ Hz, 1H), 1.35-1.30 (m, 24H), 1.28-1.18 (m, 12H).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz, δ): 167.41 (2C), 148.24-148.13 (m), 115.19 (2C), 71.54 (dd, $J = 49.8, 6.6$ Hz), 71.37 (dd, $J = 35.4, 7.8$ Hz, 2C), 53.03 (dd, $J = 77.4, 6.6$ Hz), 39.27 (td, $J = 134.7, 30.4$ Hz), 37.49 (2C), 31.40 (dd, $J = 10.8, 4.8$ Hz), 30.14 (6C), 24.20-23.61 (m, 6C).

^{31}P -NMR (CDCl_3 , 202 MHz, δ): 23.11 (dd, $J = 45.7, 2.3$ Hz, 1P), 20.13 (dd, $J = 22.5, 3.9$ Hz, 1P)

2-(-2,6-di-tert-butylpyridine)ethan-1,1-bisphosphonic acid tri-isopropyl ester (24)

(General Procedure 2)

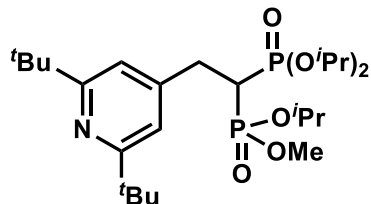


To a solution of **22** (108.8 mg, 0.185 mmol) in MeOH (2.0 mL) was added K_2CO_3 (3.0 mg, 0.0217 mmol) at room temperature. After stirring for 24 h, the solution was extracted with DCM, combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc : DCM : MeOH= 3.5 : 3.5 : 1) to give title compound as a pale yellow oil (24.9 mg, 18%).

1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, δ): 6.93 (s, 2H), 4.91-4.87 (m, 1H), 4.55 (s, 1H), 4.41-4.35 (m, 1H), 3.34-3.23 (m, 1H), 2.95-2.86 (m, 1H), 1.44-1.14 (m, 30H), 0.89 (d, $J = 5.8$, 3H), 0.84 (d, $J = 5.7$, 3H).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz, δ): 167.00 (2C), 148.46, 116.36 (2C), 71.94, 70.47, 68.19, 37.48 (t, $J = 135.0$ Hz), 37.50 (2C), 31.67 (t, $J = 4.8$ Hz), 30.24 (6C), 24.15 (4C), 23.92-23.86 (m, 2C), 23.76 -23.71 (m, 2C).

^{31}P -NMR ($CDCl_3$, 202 MHz, δ): 27.63 (s, 1P), 12.72 (s, 1P).



triisopropyl-methyl-2-(-2,6-di-tert-butylpyridine)ethan-1,1-bisphosphonate (25)

To a solution of **24** (26.5 mg, 0.0524 mmol) in MeOH (2.0 mL) and THF (2.0 mL) was TMS-diazomethane (0.075 mL, 0.150 mmol) at room temperature. After stirring for 2 h, the solution was quenched with EtOAc, then water and $NaHCO_3$ was added. The solution was extracted with EtOAc, combined organic layers were washed with water and brine, dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc : DCM = 10 : 10) to give title compound as a fairly yellow oil (7.2 mg, 26%).

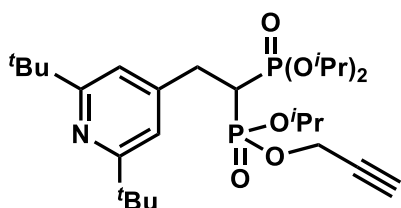
1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, δ): 6.99 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H), 4.83-4.67 (m, 3H), 3.72 (t, $J = 10.9$, 3H), 3.20-3.11 (m, 2H), 2.62 (tt, $J = 24.3, 6.3$ Hz, 1H), 1.35-1.30 (m, 24H), 1.28-1.18 (m, 12H).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz, δ): 167.41 (2C), 148.24-148.13 (m), 115.19 (2C), 71.54 (dd, $J = 49.8, 6.6$ Hz), 71.37 (dd, $J = 35.4, 7.8$ Hz, 2C), 53.03 (dd, $J = 77.4, 6.6$ Hz), 39.27 (td, $J = 134.7, 30.4$ Hz), 37.49 (2C), 31.40 (dd, $J = 10.8, 4.8$ Hz), 30.14 (6C), 24.20-23.61 (m, 6C).

^{31}P -NMR ($CDCl_3$, 202 MHz, δ): 23.11 (dd, $J = 45.7, 2.3$ Hz, 1P), 20.13 (dd, $J = 22.5, 3.9$ Hz, 1P).

triisopropyl-propargyl-2-(2,6-di-tert-butylpyridine)ethan-1,1-bisphosphonate (27)

(General Procedure 3)



To a solution of compound **24** (64.1 mg, 0.127 mmol) in 1.0 mL DCM was added oxalyl chloride (43.8 μ L, 0.51 mmol) and DMF (4.0 μ L, 0.051 mmol) at 0 °C. After 30 min stirring, the solution was stirred at room temperature for 1 h. The solution was concentrated under reduced pressure to get crude product of compound **26**. Compound **26** was used in next reaction without further purification. To the solution of compound **26** in 1.5 mL DCM was added 2-propyn-1-ol (15.0 μ L, 0.254 mmol) and triethylamine (70.0 μ L, 0.508 mmol) at 0 °C. After 24 h stirring at room temperature, 1 N HCl was added, and the solution was extracted with EtOAc and washed brine, combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc : Hexane = 6 : 1) and PTLC (EtOAc: MeOH = 10:1) to give title compound as a colorless oil (6.1 mg, 8.8%).

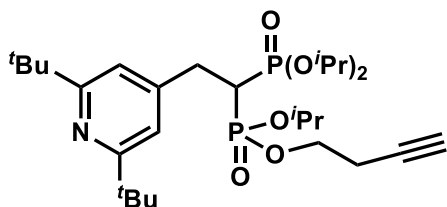
¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ): 6.98 (s, 1H), 6.97 (s, 1H), 4.83–4.54 (m, 5H), 3.20–3.11 (m, 2H), 2.70–2.58 (m, 1H), 2.49–2.47 (m, 1H), 1.36–1.17 (m, 36H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, δ): 167.51 (2C), 148.19–148.02 (m), 116.013 (2C), 78.70 (dd, J = 76.3, 6.0 Hz), 64.40 (dd, J = 76.3, 6.0 Hz), 39.65 (td, J = 134.7, 17.9 Hz), 37.60 (2C), 31.64 (d, 3.6 Hz), 30.25 (6C), 24.35–23.77 (m, 6C).

³¹P-NMR (CDCl₃, 202 MHz, δ): 23.79 (dd, J = 80.5, 4.6 Hz, 1P), 20.73 (dd, J = 29.4, 3.1 Hz, 1P).

HRMS–ESI (m/z): [M + Na]⁺ calcd for C₂₇H₄₇O₆NP₂, 566.2771; found, 566.2770.

triisopropyl-butynyl-2-(2,6-di-tert-butylpyridine)ethan-1,1-bisphosphonate (28)



This compound was prepared from **24** (55.4 mg, 0.11 mmol) by means of GP-3. A pale colorless oil (5.7 mg, 0.010 mmol, 9.3%).

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ): 6.98 (s, 1H), 6.97 (s, 1H), 4.82–4.68 (m, 3H), 4.19–4.10 (m, 2H), 3.19–3.12 (m, 2H), 2.67–2.58 (m, 1H), 2.49–2.46 (m, 2H), 1.97–1.94 (m, 1H), 1.35–1.20 (m, 38H).

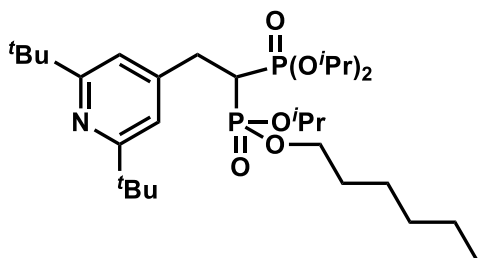
¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, δ): 167.51 (2C), 148.27 (t, J = 7.2 Hz), 116.01 (2C), 80.04 (d, J = 15.5 Hz), 71.54 (dt, J = 56.0, 7.2 Hz, 2C), 70.15 (d, J = 14.3 Hz), 64.40 (dd, J = 76.3, 6.0 Hz), 39.65 (td, J = 134.7, 17.9 Hz),

37.60 (2C), 31.64, 30.26 (6C), 29.78, 24.33-23.77 (m, 6C), 20.96-20.87 (m).

^{31}P -NMR (CDCl_3 , 202 MHz, δ): 22.73 (dd, $J = 61.9, 6.2$ Hz, 1P), 20.98 (dd, $J = 26.3, 4.6$ Hz, 1P).

HRMS-ESI (m/z): $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{49}\text{O}_6\text{NP}_2$, 580.2927; found, 580.2917.

triisopropyl-hexyl-2-(-2,6-di-tert-butylpyridine)ethan-1,1-bisphosphonate (29)



This compound was prepared from **24** (60.6 mg, 0.12 mmol) by means of GP-3. A colorless oil (4.5 mg, 0.0077 mmol, 7.0%).

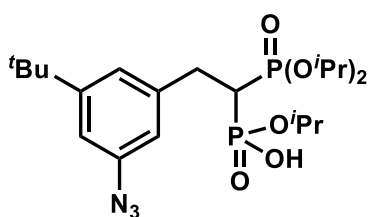
^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ): 6.97 (s, 2H), 4.77–4.70 (m, 3H), 4.06–3.95 (m, 2H), 3.15 (td, $J = 17.4, 6.8$ Hz, 2H), 2.48 (tt, $J = 21.2, 7.9$ Hz, 1H), 1.31-1.22 (m, 46H), 0.86 (t, $J = 6.0$ Hz, 3H).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz, δ): 167.39 (2C), 148.84, 115.95 (2C), 71.52-71.02 (m, 2C), 66.56 (dd, $J = 98.3, 9.6$ Hz), 39.55 (td, $J = 215.8, 40.5$ Hz), 37.53 (2C), 31.62, 31.40, 30.49 (t, $J = 9.6$ Hz), 30.20 (6C), 29.73, 25.20 (d, $J = 13.5$ Hz), 24.20-23.79 (m, 6C), 22.55, 14.00.

^{31}P -NMR (CDCl_3 , 202 MHz, δ): 22.47 (dd, $J = 35.6, 4.6$ Hz, 1P), 21.27 (dd, $J = 10.8, 3.1$ Hz, 1P).

HRMS-ESI (m/z): $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{57}\text{O}_6\text{NP}_2$, 612.3553; found, 612.3532.

2-(3-azido-5-(tert-butyl)benzene)ethan-1,1-bisphosphonic acid tri-isopropyl ester (30)

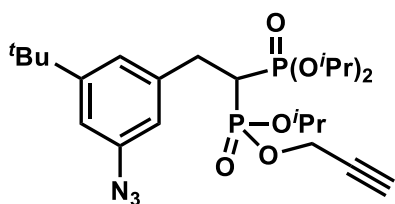


This compound was prepared from **21** (66.9 mg, 0.126 mmol) by means of GP-2. A pale yellow oil (11.2 mg, 0.023 mmol, 18.2%).

^{31}P -NMR (CDCl_3 , 202 MHz, δ): 28.17 (s, 1P), 14.82 (s, 1P).

MS (FAB) m/z 512 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.

triisopropyl-2-ptoparugyl-2-(3-azido-5-(tert-butyl) benzene)ethan-1,1-bisphosphonate (srbAZY)

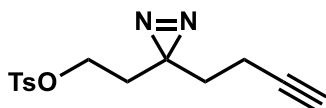


Compound **30** (11.0 mg, 0.022 mmol) and Cs₂CO₃ (11.0 mg, 0.043 mmol) was dissolved in 150 μL DMF at room temperature. After 10 min stirring, to the solution was added 3-bromopropyne (5.8 μL, 0.067 mmol). After 72 h stirring, water and DCM was added, and the solution was washed with brine. The organic solvent was evaporated, then flash column chromatography (EtOAc: Hexane = 5:1) and PTLC (EtOAc: MeOH = 10:1) was used to get purified title compound as a pale yellow oil (1.71 mg, 14.7%).

A pale yellow oil (1.71 mg, 14.7%). ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ): 7.06 (d, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 4.786–4.64 (m, 3H), 3.18 (td, *J* = 15.4, 6.6 Hz, 2H), 2.64–2.47 (m, 3H), 1.36–1.22 (m, 27H).

MS (FAB) *m/z* 550 (M+Na)⁺.

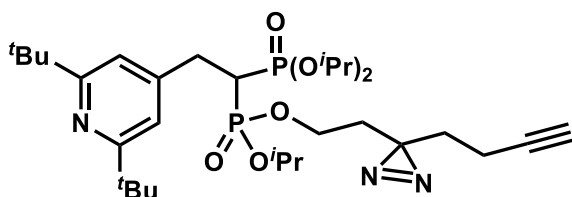
2-(3-But-3-ynyl-3H-diazirin-3-yl)-ethyl-*p*-toluensulsonate (32)



Compound **31** (22 μL, 0.172 mmol) was dissolved in 150 μL DCM at 0 °C. After addition of pyridine (41.6 μL, 0.516 mmol), TEA (71.5 μL, 0.516 mmol) and DMAP (1 mg), Tosyl chloride (98.3 mg, 0.516 mmol) dissolved in 150 μL DCM was added dropwise for 5 min. Then the reaction was stirred at room temperature overnight. Enough 1 N HCl was added, and the solution was washed with ether twice. The organic solvent was evaporated, then flash column chromatography (PE:EA=20:1) was used to get purified title compound as a yellow oil (28.1 mg, 50.3%).

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ): 7.81 (d, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 5.1 Hz, H), 3.89 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.45 (s, 3H), 1.96–1.93 (m, 4H), 1.76 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.60 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H)

triisopropyl-2-(3-But-3-ynyl-3H-diazirin-3-yl)-2-(2,6-di-tert-butylpyridine)ethan-1,1-bisphosphonate (srpDHY)



Compound **24** (61.7 mg, 0.122 mmol) and Compound **32** (23.7 mg, 0.081 mmol) was dissolved in 600 μL DCM and 600 μL DMF at r.t. Then Cs₂CO₃ (79.2 mg, 0.243 mmol) was added. Then the reaction was stirred at 60 °C for 72 h. Enough 1 N HCl was added, and it was extracted with EtOAc and washed brine, combined organic

layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc : Hexane = 6 : 1) to give title compound as a colorless oil (7.6 mg, 15%).

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ): 6.98 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.86–4.66 (m, 3H), 4.01–3.93 (m, 2H), 3.19–3.11 (m, 2H), 2.67–2.54 (m, 2H), 2.02–1.94 (m, 3H), 1.78–1.65 (m, 4H), 1.26–1.19 (m, 36H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, δ): 167.41 (2C), 148.29–148.23 (m), 115.19 (2C), 82.62, 71.92–71.24 (m, 2C), 69.39 (d, *J* = 6.0 Hz), 61.41 (dd, *J* = 71.5, 6.0 Hz, 2C), 39.62 (td, *J* = 133.5, 20.7 Hz), 37.61 (2C), 34.17 (d, *J* = 6.7 Hz), 32.23 (d, *J* = 3.6 Hz), 31.67–31.58 (m), 30.26 (6C), 29.78, 26.24, 24.28–23.82 (m, 6C), 13.33.

³¹P-NMR (CDCl₃, 202 MHz, δ): 22.89 (dd, *J* = 57.2, 4.6 Hz, 1P), 20.92 (dd, *J* = 24.0, 3.1 Hz, 1P).

HRMS–ESI (*m/z*): [M + Na]⁺ calcd for C₃₁H₅₃O₆N₃P₂, 648.3302; found, 648.3295

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇篤なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました
東京大学定量生命科学研究so 生体有機化学研究分野 橋本 祐一 教授 に深い謝意を申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、研究展開の方向性をはじめ有機合成化学、機器分析や生化学試験について
多大なる御助言、御指導、御討論を賜りました東京大学定生命科学研究so 生体有機化学研究分野 谷
内出 友美 准教授、大金 賢司 助教に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、プラスミドを提供して頂いた日本大学 榎島誠 教授並びに、化合物を提供して
頂いた岡山大学大学院 宮地 弘幸 教授に深く感謝いたします。

有機化学、創薬化学に関する多くの助言を下さいました東北大学 石川 稔 教授、東京医科歯科大学
藤井 晋也 准教授に深く感謝いたします。

博士課程在籍時において、日々活発な御討論、御助言、御指導を頂きました、東京大学定量生命科学研究so
生体有機化学研究分野の皆様は深く感謝いたします。

また、大学、大学院生活に専念できる環境を整え、精神的に支え続けてくれた家族に心から感謝いたします。

平 32 年 豊田 洋介