

博士論文

論文題目 標的タンパク質のリン酸化誘導分子

氏名 境 太希



## 目次

|  |     |     |
|--|-----|-----|
| 目次                                     | ・・・ | i   |
| 略語表                                    | ・・・ | iii |
| <b>第 1 章 研究背景 -タンパク質リン酸修飾-</b>         |     |     |
| 1.1 タンパク質の翻訳後修飾系                       | ・・・ | 3   |
| 1.2 タンパク質リン酸化                          | ・・・ | 5   |
| 1.3 プロテインキナーゼとリン酸化シグナル                 | ・・・ | 6   |
| 1.4 リン酸化シグナル制御                         | ・・・ | 8   |
| 1.5 既存のリン酸化シグナル誘起手法の問題点                | ・・・ | 10  |
| <b>第 2 章 研究課題の提案</b>                   |     |     |
| 2.1 研究目的 -標的タンパク質選択的なリン酸化を誘導する有機分子の創製- | ・・・ | 13  |
| 2.2 AMP 依存性プロテインキナーゼ (AMPK)            | ・・・ | 16  |
| 2.3 AMPK の機能調節                         | ・・・ | 18  |
| 2.4 AMPK 活性化剤                          | ・・・ | 19  |
| 2.5 AMPK の基質多様性                        | ・・・ | 21  |
| 2.6 AMPK 下流基質 -ACC と HMGR-             | ・・・ | 22  |
| 2.6.1 アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC)          | ・・・ | 22  |
| 2.6.2 HMG-CoA リダクターゼ (HMGR)            | ・・・ | 24  |
| 2.7 作業仮説の提案                            | ・・・ | 26  |
| <b>第 3 章 リン酸化誘導分子の創製</b>               |     |     |
| 3.1 リン酸化誘導分子の分子設計                      | ・・・ | 29  |
| 3.2 リン酸化誘導分子の有機合成                      | ・・・ | 39  |
| 3.3 対象タンパク質に対する活性評価                    | ・・・ | 45  |
| 3.4 標的タンパク質に対するリン酸化誘導活性評価              | ・・・ | 57  |
| 3.5 標的タンパク質に対する選択的なリン酸化誘導活性の評価         | ・・・ | 64  |
| 3.6 実験結果の考察と議論                         | ・・・ | 69  |
| 総括                                     | ・・・ | 71  |
| 実験の部                                   | ・・・ | 73  |
| 参考文献                                   | ・・・ | 109 |
| 謝辞                                     | ・・・ | 115 |





## 略語表

|               |  |
|---------------|--|
| ACC           | acetyl-coA carboxylase                                     |
| AcOEt         | ethyl acetate  |
| AcOH          | acetic acid  |
| ADP           | adenosine diphosphate                                      |
| AID           | autoinhibitory domain                                      |
| Amax          | activation max   |
| AMP           | adenosine monophosphate                                    |
| AMPK          | AMP-activated protein kinase                               |
| AR            | androgen receptor  |
| Arg           | arginine   |
| Asn           | asparagine   |
| Asp           | aspartic acid  |
| ATP           | adenosine triphosphate                                     |
| CAMKK $\beta$ | calcium-calmodulin-dependent protein kinase kinase $\beta$ |
| CBM           | carbohydrate-binding module                                |
| CBS           | systathionine-beta synthase                                |
| Cbz           | benzyloxycarbonyl  |
| CDI           | carbonyldiimidazole  |
| Cdk           | cyclin-dependent kinase                                    |
| cIAP          | cellular inhibitor of apoptosis protein 1                  |
| CoA           | coenzyme A   |
| CPT-1         | carnitine palmitoyltransferase-1                           |
| CRABP         | cellular retinoic acid-binding protein                     |
| Cys           | cysteine   |
| DIAD          | diisopropyl azodicarboxylate                               |
| DIPEA         | <i>N, N</i> -diisopropylethylamine                         |
| DMF           | dimethylformamide  |
| DMSO          | dimethylsulfoxide  |
| DNA           | deoxyribonucleic acid                                      |
| EDC           | 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide             |
| EGFR          | epidermal growth factor receptor                           |

|         |  |
|---------|--|
| ERK     | extracellular signal-regulated kinase  |
| Et      | ethyl  |
| FOXO3a  | förkhead box O3  |
| FRET    | forster resonance energy transfer  |
| Gln     | glutamine  |
| Glu     | glutamic acid  |
| Gly     | glycine  |
| HATU    | 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i> ]pyridiniu-<br>m 3-oxid hexafluorophosphate |
| HEK     | human embryonic kidney   |
| His     | histidine  |
| HMG-CoA | hydroxymethylglutaryl CoA  |
| HMGR    | hydroxymethylglutaryl CoA reductase  |
| HOBt    | 1-hydroxybenzotriazole   |
| IMAC    | immobilized metal affinity chromatography  |
| Insig   | insulin induced gene   |
| LC-MS   | liquid chromatography-mass spectrometry  |
| LKB1    | liver kinase B1  |
| Lys     | lysine   |
| Me      | methyl   |
| Met     | methionine   |
| Mg      | magnesium  |
| MS      | mass spectrometry  |
| NADP    | nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  |
| NBS     | <i>N</i> -bromosuccinimide   |
| NIS     | <i>N</i> -iodosuccinimide  |
| PDB     | protein data bank  |
| PEG     | polyethyleneglycol   |
| PP2A    | protein phosphatase 2A   |
| PP2C    | protein phosphatase 2C   |
| Pro     | proline  |
| Raf     | rapidly accelerated fobrosarcoma   |
| Ras     | rat sarcoma  |

|                     |   |
|---------------------|---|
| RNA                 | ribonucleic acid  |
| RNAi                | ribonucleic acid interference   |
| SAMS peptide kinase | synthetic peptide substrate specific for AMP-activated protein kinase |
| SCAP protein        | sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein |
| SDS-PAGE            | sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis             |
| SEMCI               | 2-(Chloromethoxy)ethyltrimethylsilane                                 |
| Ser                 | serine  |
| SH2                 | Src homology 2 domain   |
| SSD                 | sterol-sensing domain   |
| TAK1                | transforming growth factor beta-activated kinase 1                    |
| TBAF                | tetrabutylammonium fluoride   |
| TFA                 | trifluoroacetic acid  |
| THF                 | tetrahydrofuran   |
| Thr                 | threonine   |
| Trp                 | tryptophan  |
| TsCl                | <i>p</i> -toluenesulfonyl chloride                                    |
| TsOH                | <i>p</i> -toluenesulfonic acid  |
| Tyr                 | tyrosine  |



## 第 1 章 研究背景 -タンパク質リン酸修飾-



## 1 章

### 研究背景-タンパク質リン酸修飾-

生体内のタンパク質は本来の機能に加えて、「翻訳後修飾」と呼ばれる化学修飾を受けることでさらなる機能多様性を獲得している。この章ではその翻訳後修飾ならびに本論文の主題であるタンパク質リン酸修飾について紹介する。

#### ● 1.1 タンパク質の翻訳後修飾系<sup>1</sup>

細胞内の全てのタンパク質は「セントラルドグマ」と呼ばれる一連の過程を経て、DNA にコードされた情報を基に翻訳される。小胞体において合成されたタンパク質は、各オルガネラへと輸送され、それぞれの局在を示しその機能を発揮している。これらのタンパク質はさらに「翻訳後修飾」と呼ばれる化学修飾を受け、その性質が制御されることが明らかとなっている<sup>1</sup>。この化学修飾には、メチル化、アセチル化、リン酸化などといった比較的小さなものから、長鎖脂肪酸化（脂質化）、グリコシル化、ユビキチン化などの大きなものが結合する例が報告されている。この翻訳後の化学修飾によって、細胞は個々のタンパク質の機能を緻密に制御し、外的環境の変化やホルモン、薬剤などの各種刺激に対する素早く、柔軟な応答を可能にしている。おそらく、翻訳後修飾無しでは、細胞内の複雑なネットワークは機能しないであろうことが予想される。

タンパク質の翻訳後修飾は主に二つのカテゴリーに分類できる。一つ目はタンパク質のアミノ酸側鎖に特定の官能基が付与するものである（表1）。これは酵素依存的または非依存的に起こりうる。その中でもタンパク質リン酸化、アシル化、アルキル化、グリコシル化、酸化（図1）は一般的によくみられる修飾系であり、その被修飾タンパク質の豊富さから、ホスホプロテオーム、アシロームなどといった造語がつくられている。二つ目のカテゴリーとしては、タンパク質の主鎖が開裂し、機能が調節されるものである。その代表的なものとして、プロインスリンの開裂によるインスリンの生成があげられる（図2）。

表 1. アミノ酸側鎖が修飾される翻訳後修飾

| Residue    | Reaction   | Residue    | Reaction   |
|------------|--|------------|--|
| <b>Asp</b> | phosphorylation  | <b>Cys</b> | S-hydroxylation<br>disulfide bond formation<br>phosphorylation<br>S-acylation<br>S-prenylation |
| <b>Glu</b> | methylation<br>carboxylation<br>polyglycination<br>polyglutaminylation | <b>Met</b> | oxydation to sulfoxide   |
| <b>Ser</b> | phosphorylation<br>O-glycosylation                                     | <b>Arg</b> | N-glycosylation<br>N-ADP-ribosylation  |
| <b>Thr</b> | phosphorylation<br>O-glycosylation                                     | <b>Asn</b> | N-methylation<br>N-ADP-ribosylation  |
| <b>Tyr</b> | phosphorylation<br>sulfation<br>ortho-nitration                        | <b>Gln</b> | transglutamination   |
| <b>His</b> | phosphorylation<br>aminocarboxypropylation<br>N-methylation            | <b>Trp</b> | C-mannosylation  |
| <b>Lys</b> | N-methylation<br>N-acylation<br>C-hydroxylation                        | <b>Pro</b> | C-hydroxylation  |
|            |  | <b>Gly</b> | C-hydroxylation  |

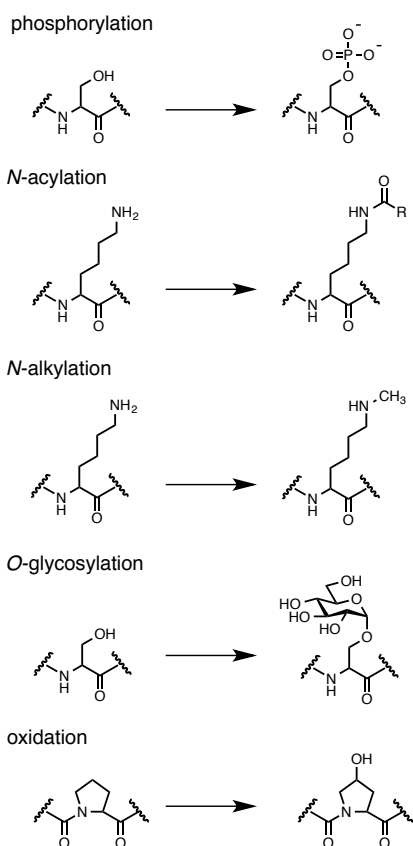


図 2. 代表的な共有結合性翻訳後修飾

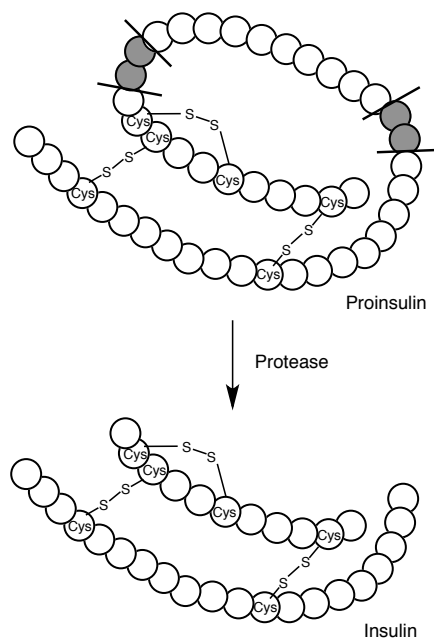


図 2. プロインスリンの開裂によるインスリンの生成



## ● 1.2 タンパク質リン酸化

先に述べた翻訳後修飾の一つとして「タンパク質リン酸化」が挙げられる。タンパク質リン酸化はタンパク質上の Ser/Thr 残基もしくは Tyr 残基に対してリン酸基が付与するという修飾系である（近年ではヒスチジンに対するリン酸化<sup>2</sup>も報告されている）。この反応はプロテインキナーゼによって触媒され、リン酸ドナーである ATP、マグネシウムの存在下で上記アミノ酸残基のヒドロキシ基に対してリン酸基を付与する（図 3）。逆反応、すなわち脱リン酸化反応はプロテインホスファターゼによって触媒される。これらキナーゼ、ホスファターゼの働きによって、被リン酸化タンパク質の機能は時空間的に緻密に制御されている。ほ乳類においてプロテインキナーゼは約 500 種以上存在するとされる<sup>3</sup>。さらに、キナーゼ触媒活性を有すると推測される遺伝子は全ゲノムの約 2% を占める<sup>4</sup>ことや、細胞内の全タンパク質の約 30% がリン酸化を受けうる<sup>5</sup>ことも推測されており、細胞環境におけるタンパク質リン酸化の重要性が伺える。この反応には細胞内に豊富に存在する ATP を利用していることから、細胞にとってリン酸化はもっとも素早くかつ便利な情報伝達手段なのであろうと考えられる。

タンパク質がリン酸修飾を受けると、その活性、構造、タンパク質間相互作用、局在などが変化する<sup>6</sup>。これにより一つのタンパク質における機能多様性が与えられ、様々な状態変化に対する柔軟性が保証される。その機能調節機構はタンパク質種によって様々であるが、触媒活性部位近傍にリン酸化が起これ、酵素の活性に影響を与える例や、負電荷をもつリン酸基とタンパク質中アルギニン残基の正電荷が引きつけあうことにより構造変化を引き起こされるという例が報告されている<sup>6</sup>（図 4）。

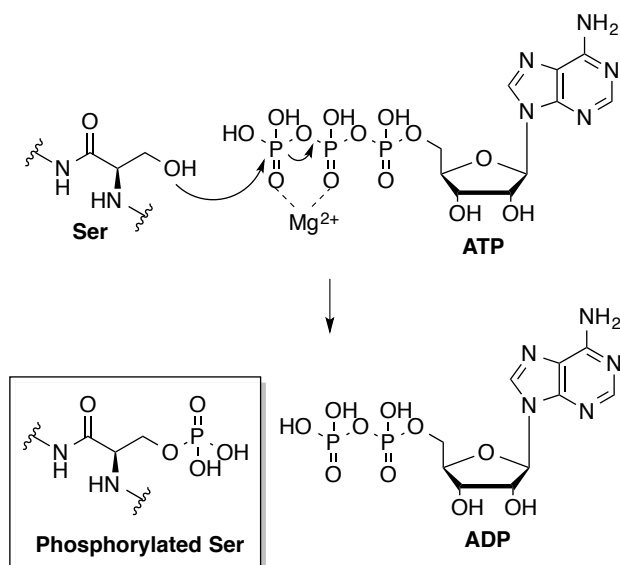


図 3. タンパク質リン酸化の反応機構

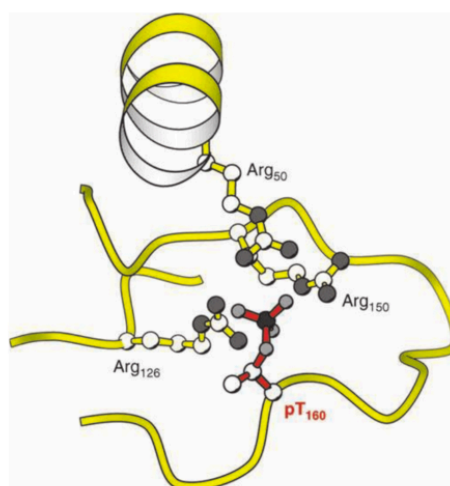


図 4. リン酸化アミノ酸残基とアルギニン残基との相互作用<sup>1</sup>  
(Cdk2 pThr160 の例を示す)

### ● 1.3 プロテインキナーゼとリン酸化シグナル

本研究の主題は「プロテインキナーゼを介したリン酸化シグナル制御」であるがため、ここでそのプロテインキナーゼについて簡単に紹介する。

前節で述べた通り、プロテインキナーゼとはタンパク質の側鎖にリン酸基を付与する機能を有する酵素の総称である。全てのプロテインキナーゼはその構造中に約 280aa ほどの高度に保存されたキナーゼ触媒活性ドメインを有しており、この部位において、ATP、基質との相互作用、つづくリン酸化反応が起こる。この領域以外の配列や三次元構造、または細胞内局在の差などにより、プロテインキナーゼは固有の機能や基質選択性を獲得しているものと考えられる。

プロテインキナーゼはチロシンに対してリン酸化を起こすもの (tyrosine kinase)、またセリン/スレオニンに対してリン酸化を触媒するもの (serine/threonine kinase) の二つに大別される。チロシンキナーゼは受容体型のものが多く知られ、例としてインスリン受容体や上皮成長因子受容体が挙げられる。セリン/スレオニンキナーゼは可溶性タンパク質が多く知られ、チロシンキナーゼ (約 100 種類) と比較して多くの種類 (約 400 種以上) が報告されている<sup>7</sup>。

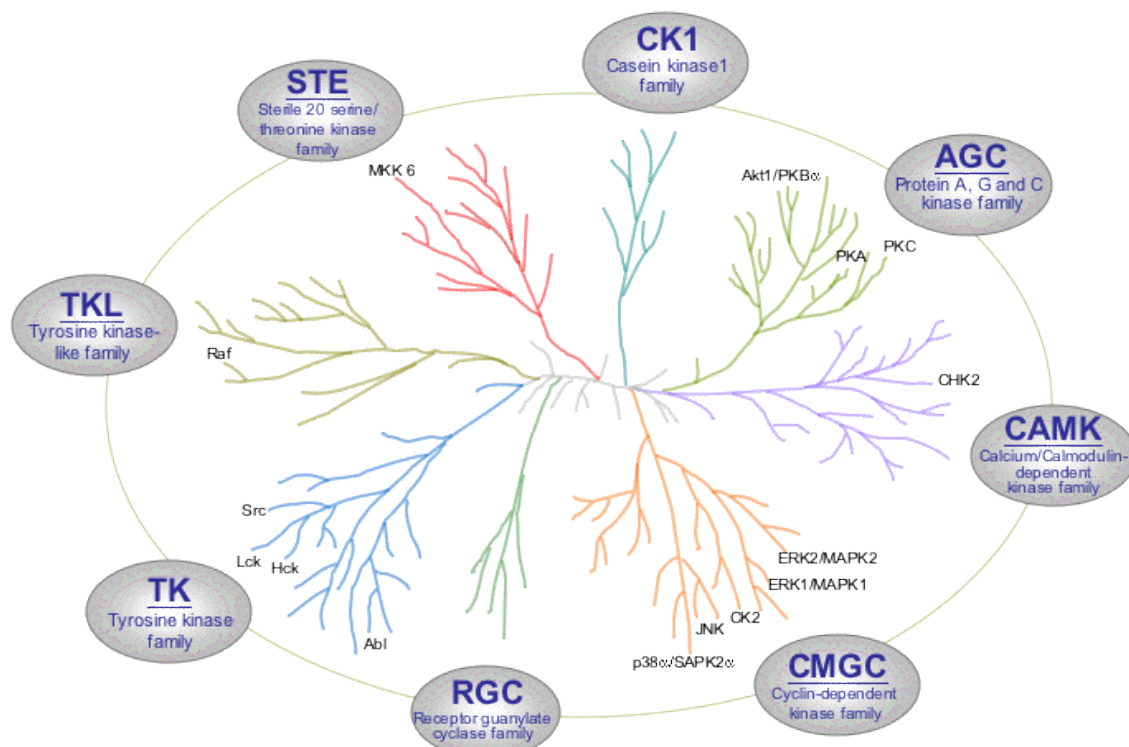


図 5. ヒトゲノムにコードされているキナーゼ遺伝子の系統樹<sup>7</sup>

⇒配列相同性などにより 8 つのファミリーに分類することができる。

**CK1**: Casein kinase1 family, **AGC**: Protein A, G and C kinase family, **CAMK**: Calcium/Calmodulin-dependent kinase family, **CMGC**: Cyclin-dependent kinase family. **RGC**: Receptor guanylate cyclase family, **TK**: Tyrosine kinase family, **TKL**: Tyrosine kinase-like family, **STE**: Sterile 20 serine/Threonine kinase family

プロテインキナーゼが関与するタンパク質リン酸化はある一連のカスケードに沿って連続して起こることが多い。その一例として Mitogen-Activated Protein (MAP) キナーゼシグナル経路を図 6 に示す<sup>8</sup>。ホルモン、薬剤などの外部刺激が受容体型キナーゼに結合することよりシグナル伝達を開始し、複数のプロテインキナーゼを含む一連のタンパク質群によってシグナルが伝達され、最終的にエフェクターと呼ばれるタンパク質を制御することで表現型が生み出される。一般的にキナーゼの発現量はシグナル下流のキナーゼの方が多くことが知られており、この発現量の差により、外部刺激が何倍、何百倍にも増幅される。このようにリン酸化シグナルカスケードはシグナル伝達系において重要な働きをしており、この伝達系を通じて様々な信号を細胞内部へと伝え、適切な生体応答を引き起こす。

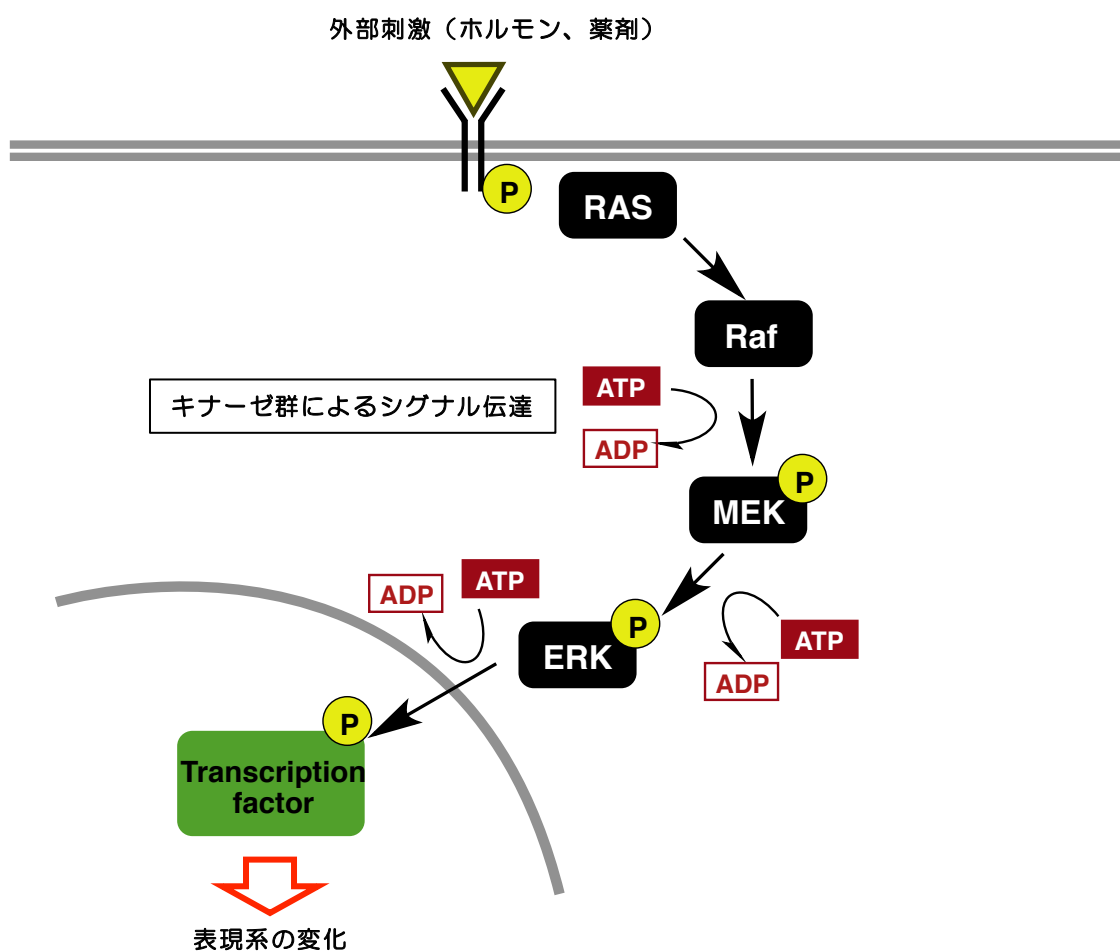


図 6. MAP キナーゼカスケード<sup>8</sup>

まず外部刺激として EGF などの増殖因子が EGFR 等の膜上チロシンキナーゼ型受容体に結合する。これは自己リン酸化活性を有し、自身のチロシン残基をリン酸化する。その後、SH2 と呼ばれるチロシンリン酸を認識するドメインを有するアダプタータンパク質の介在により、下流の Raf と呼ばれるキナーゼを活性化する。この Raf キナーゼは下流の MEK を活性化、続いて ERK の活性化が続いて起こる。この ERK は下流の様々なエフェクタータンパク質と呼ばれる基質タンパク質をリン酸化し、細胞増殖をはじめとした種々の生体応答を引き起こす。

## ● 1.4 リン酸化シグナル制御

タンパク質リン酸化は、発生、細胞増殖、オートファジー、免疫系応答、血管新生を含む様々な細胞活動に関与していることが明らかとなっている<sup>7</sup>。また、ホスファターゼ阻害剤（オカダ酸やミクロシスチン）が強力な発ガンプロモーターとして機能する<sup>9-10</sup>ことや、キナーゼ阻害剤が抗がん活性を指向した医薬として数多く開発されている<sup>11</sup>ことなどから、がんの病態生理においてもリン酸化シグナルが大きく寄与していることが推測される。さらに、エネルギー代謝経路においてもタンパク質リン酸化の関与が報告<sup>7</sup>されており、糖尿病やメタボリックシンドロームなどの代謝性疾患における治療標的としてもリン酸化経路は注目されている<sup>12</sup>。

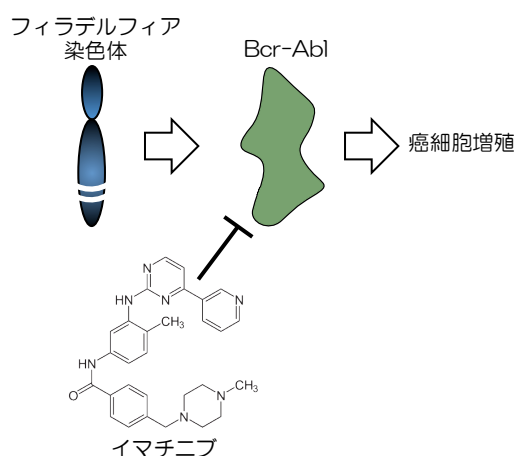


図 7. 慢性骨髄性白血病因タンパク質 Bcr-Abl と分子標的薬グリベック<sup>11,13</sup>

慢性骨髄性白血病では、フィラデルフィア染色体とよばれる異常遺伝子がみられ、Bcr-Abl という異常なチロシンキナーゼが発現する。この Bcr-Abl のキナーゼ活性を阻害する分子標的薬としてイマチニブ（グリベック<sup>®</sup>）がノバルティスファーマ社より開発された。慢性骨髄性白血病においては平均生存率が 4-5 年とされていたが、グリベックの投与により 7 年生存率 86% と大きく生存率が改善されることが報告されている。

キナーゼ、ホスファターゼの活性を制御することで、基質のリン酸化に基づくシグナルが増幅/減弱しうするため、これらの酵素の機能制御手法はリン酸化シグナル解析や、創薬化学の観点から極めて重要である。キナーゼの機能制御手法としては、RNA 干渉法などの遺伝子的な発現制御やその阻害剤を用いて行うことが一般的である。これらの手法を用いキナーゼの発現や機能を制御することで、これまでに数多くのリン酸化シグナルが解析されてきた。その解析実験の流れを図 8 に示す。まず、遺伝子的な発現調節や化合物によって特定のキナーゼの機能を増幅/減弱させる。その後、キナーゼの機能制御によりリン酸化が増減したタンパク質群を同定する（二次元電気泳動後の質量分析やリン酸化タンパク質を濃縮した後に LC-MS/MS など）。その後、相互作用解析や、精製タンパク質を用いた実験を通してキナーゼ基質を同定する。さらに、その基質の発現制御や機能制御を行い、表現型との相関を観察することで、その基質のリン酸化シグナル内における役割を明らかにする。このような手順を繰り返すことで、そのシグナルに関与すると予想される一連のタンパク質群を同定していく。

■ リン酸化シグナル解析実験（特定の表現型変化に関するシグナルを解析したい）

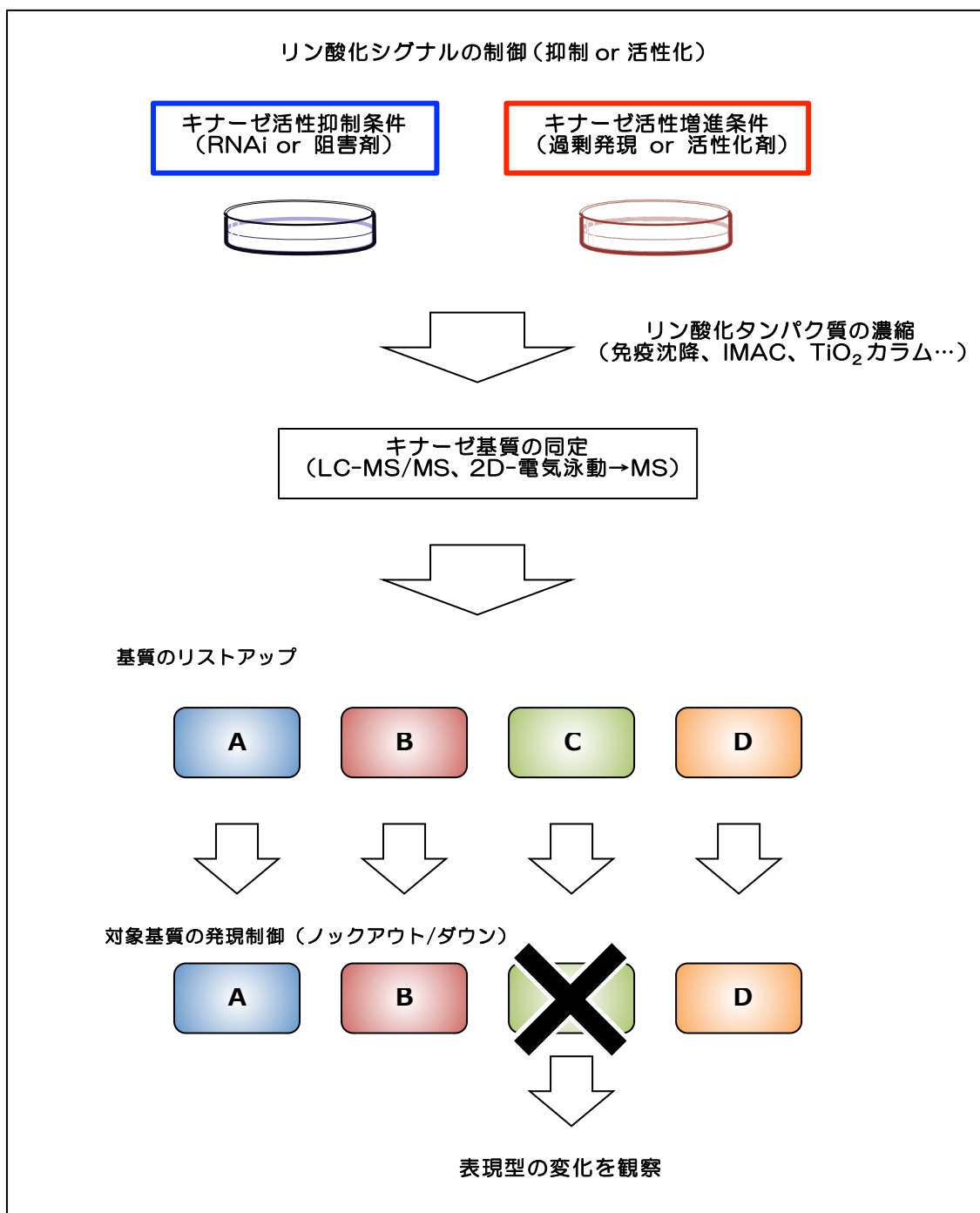


図 8. リン酸化シグナル解析手順

一般的によく用いられているリン酸化シグナル解析手順を示す。まず特定のキナーゼの活性を抑えた条件または活性化させた条件の細胞を用意する。これには遺伝子的な発現制御や阻害剤が利用される。その後、二次元電気泳動や質量分析装置を用いて、キナーゼ基質を同定する。文献調査などをもとに、同定した複数の基質からあたりを付け、その発現を制御する。この発現制御に基づく表現型の変化を観察することで、シグナルに関わるタンパク質とその機能を同定していく。

## ● 1.5 既存のリン酸化シグナル誘起手法の問題点

このような方法により大規模なリン酸化プロテオーム解析が実施され、これまでに数多くのリン酸化シグナルが解析されてきた。この解析手法において、ある特定のリン酸化シグナルを解析したい場合、時空間的に出来るだけ限定された範囲でのリン酸化シグナル誘起が重要であると考えられる。例えば、現在リン酸化シグナル解析にて利用されているキナーゼ阻害剤は十分なキナーゼ選択性を有していない<sup>14</sup>ものも多く、複数のキナーゼ阻害にもとづく多くの基質タンパク質が影響されてしまうため、観察したいシグナルを抽出して解析することは難しい。さらに強調したいことは、特定のキナーゼの発現制御や選択的な阻害剤を用いた場合においても、単一基質にもとづく特定のリン酸化シグナルの誘起は難しいということである。これは、キナーゼの基質多様性に由来する。キナーゼの多くは1種類の下流基質をリン酸化するものではなく、複数の基質をリン酸化しうることが知られている。生理的環境においては、キナーゼと基質タンパク質をつなぐアダプター分子の介入や発現、局在等の差により基質選択性を表すものと考えられているが、RNA 干渉<sup>15</sup>や阻害剤等によって強制的に機能制御した場合には下流基質の多くが非選択的にリン酸化されうる。複数のシグナルが伝達していると考えられる状況において表現型を観察したとしても、キナーゼ下流のどの基質のリン酸化に基づく表現型かは断定できず、詳細なシグナル解析を行うことは困難であると考えられる。

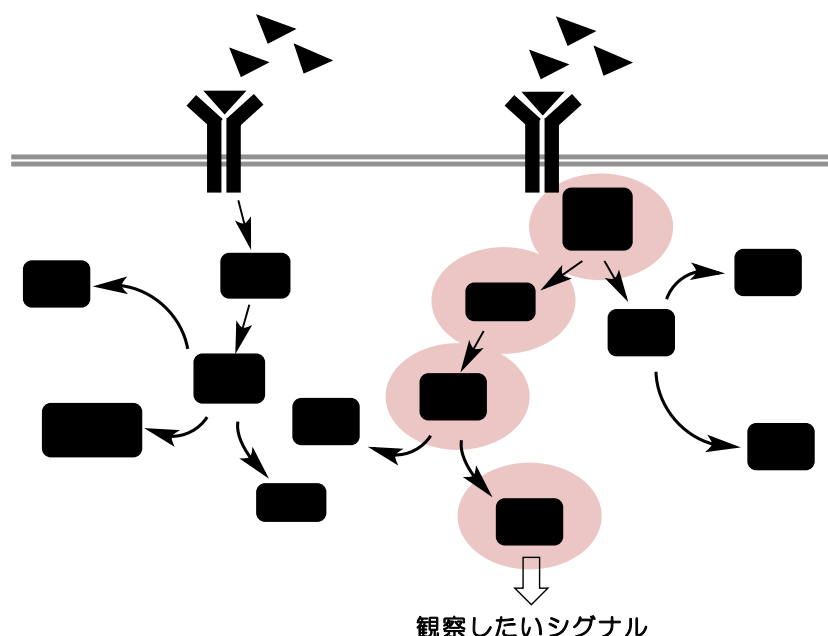


図 9. 選択的なリン酸化シグナル誘起は困難である

ある特定のシグナル伝達経路を解析したい場合には、できるだけそのシグナルのみを活性化させるように工夫すべきである。細胞内には無数のプロテインキナーゼが存在している為、非選択的なキナーゼ阻害剤を用いた場合には複数のシグナル経路が影響を受けてしまうと考えられる。



特定の基質タンパク質に基づくリン酸化シグナルを誘起する手法として、基質の Ser/Thr をアルギニン酸やグルタミン酸といった残基へと変異させるリン酸ミミック法<sup>16-18</sup>が報告されている(図 10 上)。リン酸ミミック法では負電荷を帯びたリン酸基をカルボキシル基へと変換することでリン酸修飾を模倣するというものである。しかしながら、リン酸基とカルボキシル基では価数が異なることや時空間的な制御は不可能であることなど、問題点もある。別の手法として、リン酸化タンパク質を化学的に合成する手法<sup>19</sup>が報告されている(図 10 下)。これは、化学的にリン酸化ペプチド断片を合成した後に基質タンパク質断片へとつなぎ合わせる<sup>20</sup>ことで合成される。実際にこの手法を用いて、リン酸化タンパク質を合成しその機能を解析した例<sup>19</sup>が報告されている。しかしながら、この方法では、リン酸化ペプチドの合成が短い断片に限られることから末端部位にリン酸化サイトを有するタンパク質の合成しか行う事はできない。また、合成したリン酸化タンパク質の細胞導入も煩雑な手順を踏むため汎用的とはいえない。これら二つの手法も万能ではなく、適用範囲が限定されることや、変異導入、タンパク質合成に手間がかかるなど汎用的な手法とするには問題があると言える。すなわち、既存の手法では単一基質のリン酸化を誘導することは簡単ではなく、これがリン酸化シグナル解析における足枷となっている。

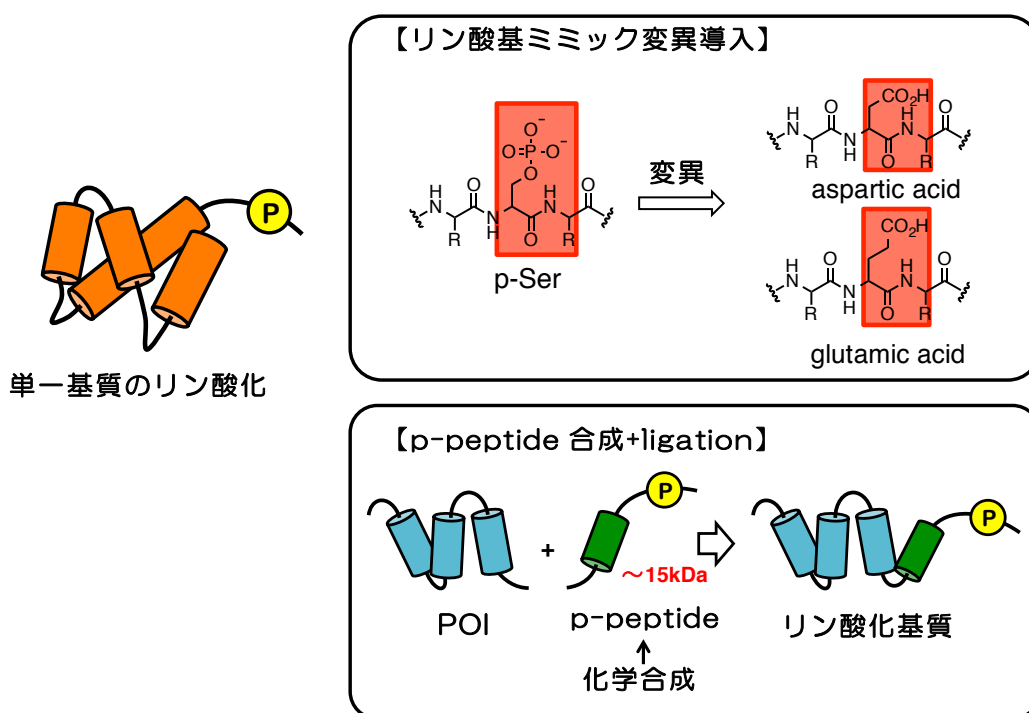


図 10. 特定タンパク質のリン酸化誘導手法

- リン酸化アミノ酸ミミック法: リン酸基の電荷を模倣し、カルボキシル基を有するアミノ酸であるアスパラギン酸やグルタミン酸へと点変異を導入する方法
- リン酸化タンパク質半合成法: タンパク質末端部位に由来するリン酸化ペプチドを化学合成した後に、対象タンパク質へとライゲーションすることでリン酸化タンパク質を得る方法





## 第 2 章 研究課題の提案



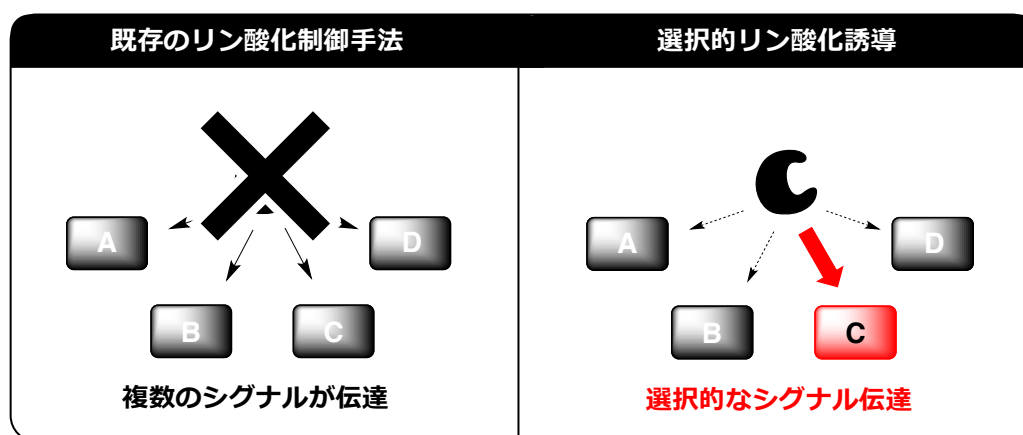
## 2 章 研究課題の提案

全章で述べた通り、遺伝子的な発現制御や阻害剤による機能制御などの既存の手法では特定のキナーゼ下流基質のリン酸化制御は困難である。本研究では、AMP 依存性プロテインキナーゼ (AMPK) に着目し、その個々の基質の選択的なリン酸化制御を目指した。本章では AMPK の紹介と、考案した選択的リン酸化誘導手法のコンセプトについて記す。

### ● 2.1 研究目的 -標的タンパク質選択的なリン酸化を誘導する有機分子の創製-

現在までに報告されている手法では、単一基質の選択的なリン酸化を誘導することは困難であり、特定のリン酸化シグナルを増幅させることは難しいと考えられる。この問題を解決するためには、標的とするタンパク質の選択的なリン酸化誘導を可能にする新たな手法の開発が求められる。また、生理的な条件における表現型の観察や時空間的なリン酸化制御を考慮すると、有機化合物処理によるリン酸化誘導が有効であると考えられる。この考えに基づき、本研究では「標的タンパク質の選択的リン酸化誘導活性を有する機能性有機分子の創製」を目的とした。

この分子の機能評価の為、今回は内在性キナーゼであり、その性質や機能がよく調べられている AMP 依存性プロテインキナーゼ (AMPK) とその下流基質に焦点を絞り、研究を開始した。



● 2.2 AMP 依存性プロテインキナーゼ (AMPK) <sup>21</sup>

前章にて述べた通り、細胞内には 500 種以上のプロテインキナーゼが存在<sup>3</sup>している。その中でも、エネルギー代謝系の中核を担うプロテインキナーゼとして、AMP 依存性プロテインキナーゼ (AMPK) が存在している (図 11)。AMPK はセリン/スレオニンキナーゼとして分類され、エネルギー状態の変化に応じた種々のシグナルを受信し、数多くの下流基質タンパク質をリン酸化することで、生体内のエネルギー恒常性を維持している<sup>22</sup>。AMPK はその名の通り、AMP に感受性を示し、細胞内の ATP/AMP 比の低下に基づき活性化されることが知られている。すなわち、エネルギーの枯渇環境 (ATP 濃度の低下) にて活性化し、エネルギーを節約 (ATP 消費を抑える) する方向へと細胞環境を変化させる。

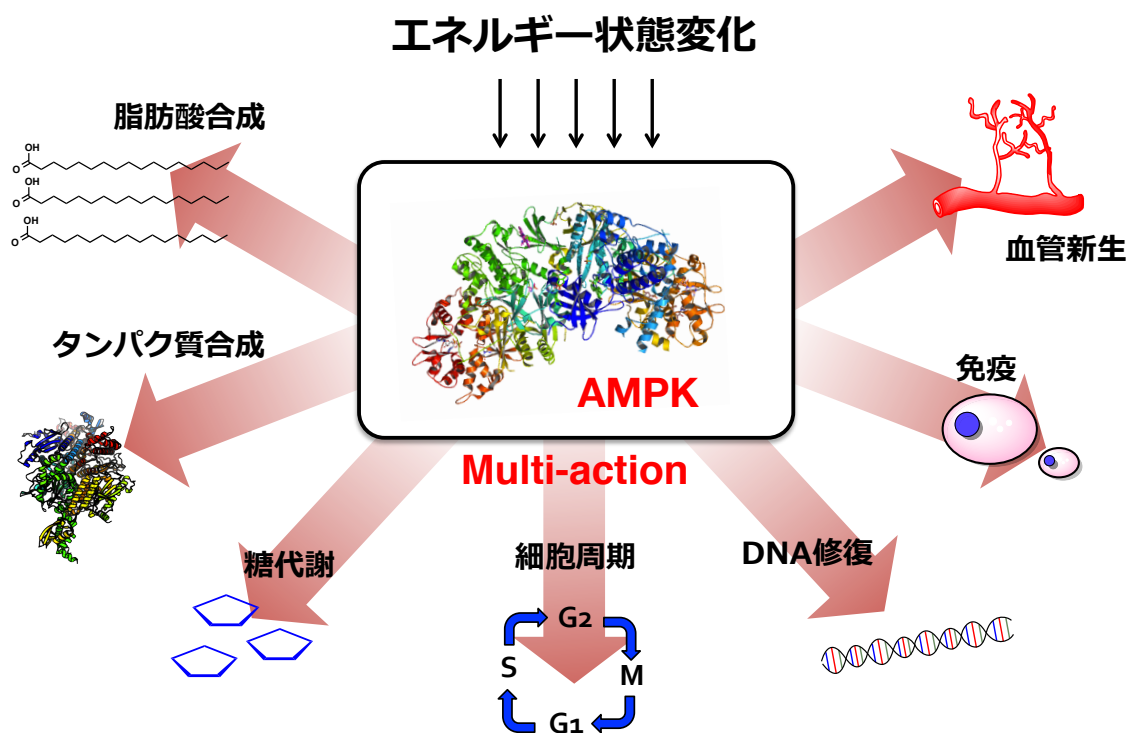


図 11. AMP 依存性プロテインキナーゼ (AMPK)

AMPK はエネルギー状態変化に応じて活性化され、生体分子 (タンパク質、脂質、糖など) の合成や代謝を支配している。AMPK はエネルギー代謝系のみならず、細胞周期の調節、DNA 修復、免疫系、血管新生系など多岐にわたる生命現象に関与することが示唆されている。

AMPKは $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットから構成される複合体として機能する<sup>23</sup> (図12)。ほ乳類においては、 $\alpha$ サブユニット二種 ( $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ )、 $\beta$ サブユニット二種 ( $\beta 1$ 、 $\beta 2$ )、 $\gamma$ サブユニット三種 ( $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ ) が存在するため、理論上は12種類の複合体が形成しうる。それぞれのサブユニットの発現は組織によって異なることが報告されている<sup>24-28</sup>。例えば、肝臓においては $\beta 1$ が多く発現するのに対し、 $\beta 2$ はほとんど発現していない。また、骨格筋などにおいては $\beta 2$ が優先的に発現している。

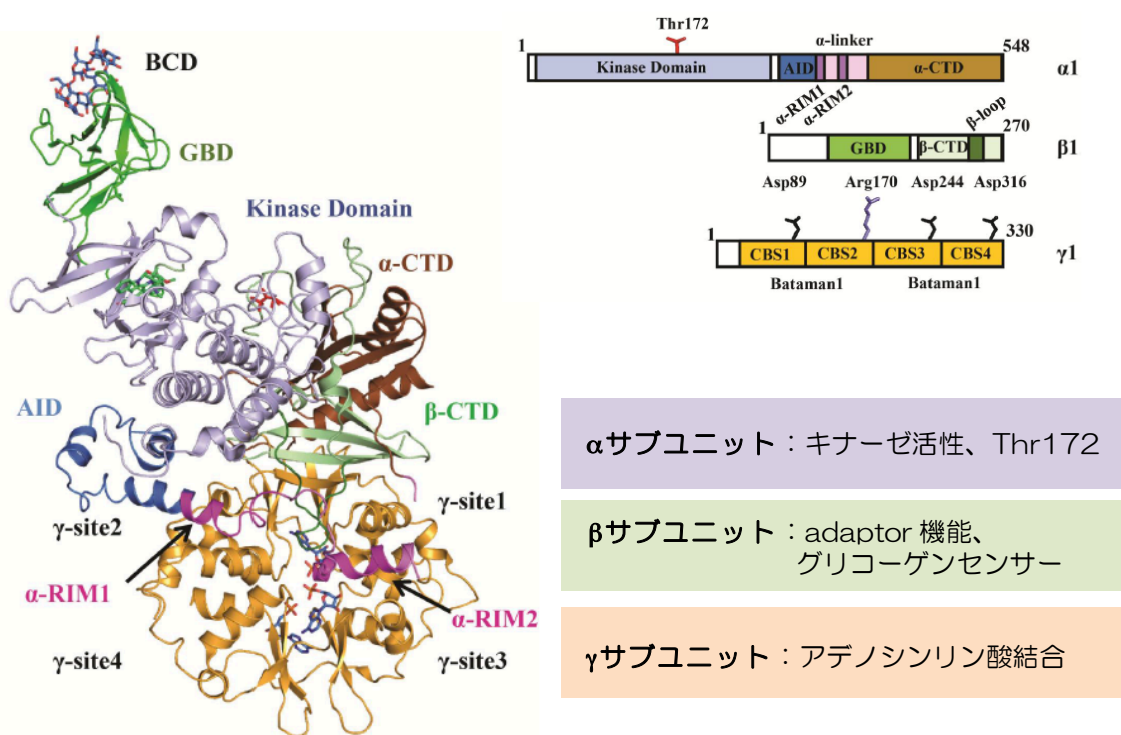


図12. AMPKの構造<sup>29</sup>

AMPKの一次構造(右上)と三次構造(左)。AMPKは $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットからなる複合体として機能する。 $\alpha$ サブユニットはキナーゼ触媒活性ドメインを含み、キナーゼ機能の中核を担うドメインである。 $\beta$ サブユニットは $\alpha$ サブユニットと $\gamma$ サブユニットとのアダプターとしての機能を示す。また、グリコーゲン結合サイトを有することから、グリコーゲンセンサーとして機能することも示唆されている。 $\gamma$ サブユニットはATPやADP、AMPといったアデノシンリン酸の結合サイトを有するユニットである。この部位にアデノシンリン酸が結合することで、AMPKの構造変化が引き起こされ、キナーゼ活性が増減することが知られている。

### ● 2.3 AMPK の機能調節

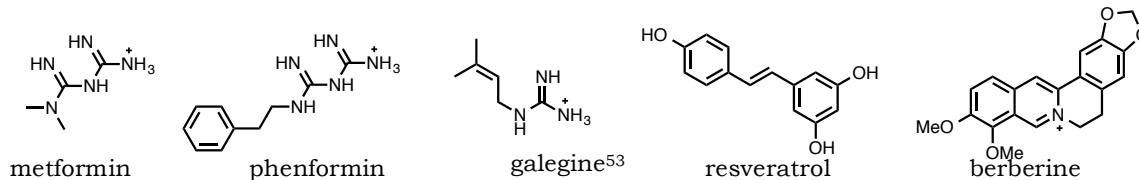
AMPK は生理的な環境において、種々の機構によって機能が活性化する<sup>29</sup>ことが知られている。まず一つ目が、AMPK 自身のリン酸化による活性化である。AMPK は $\alpha$ サブユニット activation loop に存在するスレオニン残基 (Thr172) のリン酸化により、そのキナーゼ活性が向上する。この Thr172 のリン酸化を担う上流キナーゼとしては、LKB1<sup>30</sup>、CAMKK $\beta$ <sup>31</sup>、TAK1<sup>32</sup> が報告されている。Thr172 のリン酸化はホスファターゼ PP2C<sup>33</sup> または PP2A<sup>34</sup> によって脱リン酸化されることが明らかとなっており、上流キナーゼとホスファターゼによってその機能が厳密に制御されている。二つ目の活性化機構が、AMP の結合による機能活性化である。AMP は AMPK の $\gamma$ サブユニット中の CBS 配列モチーフに直接結合し、アロステリックにそのキナーゼ活性を高める<sup>35</sup>ことが報告されている。さらに、AMP の結合により、PP2C による p-Thr172 の脱リン酸化反応を受けにくくなる<sup>36</sup>ことも報告されている。ある報告では、AMP のアロステリックな効果により、キナーゼ活性が約 10 倍、Thr172 のリン酸化により約 100 倍向上することが示されている<sup>37,38</sup>。

## ● 2.4 AMPK 活性化剤

AMPK の機能活性化は、二型糖尿病に対する治療効果（インスリン抵抗性の改善、血中グルコース量の低下）を表す<sup>39</sup>ことが報告されている。さらに、近年では、がんに対する予防効果を示す<sup>40</sup>ことや、脂質異常の改善作用<sup>41</sup>も報告されている。これらの背景より、疾患治療を目的に、AMPK の機能を活性化する化合物が精力的に開発されてきた<sup>42</sup>（図 13）。AMPK 活性化剤は、間接的に活性化するもの、また、直接 AMPK に結合することで機能を活性化するものの二つのタイプに分類できる。間接的に活性化する化合物としては、ビグアナイド誘導体であるメトホルミンやフェンホルミン<sup>43, 44</sup>、ポリフェノール誘導体であるレスベラトロール<sup>45, 46</sup>、天然物由来の化合物であるベルベリン<sup>47</sup>などがその代表として挙げられる。その作用機序は様々であるが、ビグアナイド誘導体については、ミトコンドリア呼吸鎖に作用することで、ATP 合成の阻害、AMP 濃度の亢進が引き起こされ、その結果として AMPK が間接的に活性化されるという機構が提唱されている<sup>48</sup>。

直接的に作用する活性化剤としても様々なものが報告されている。AICAR<sup>49, 50</sup>は細胞内の酵素によって活性種である ZMP へと変換される。この ZMP は AMP ミミックとして機能し、AMPK $\gamma$ サブユニットへ結合することでアロステリックにキナーゼ活性を向上させる。近年では $\gamma$ サブユニット以外に結合し、その活性を向上させる合成リガンドも報告されている。A769662<sup>51</sup>は Cool らによって見出された化合物であり、AMPK $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットの境目の領域に結合することで機能活性化を示す。この化合物の活性化作用は、アロステリックな効果によるキナーゼ活性亢進と、脱リン酸化の抑制による二つのメカニズムに基づくことが報告<sup>52</sup>されている。

### ■ indirect activators



### ■ direct activators

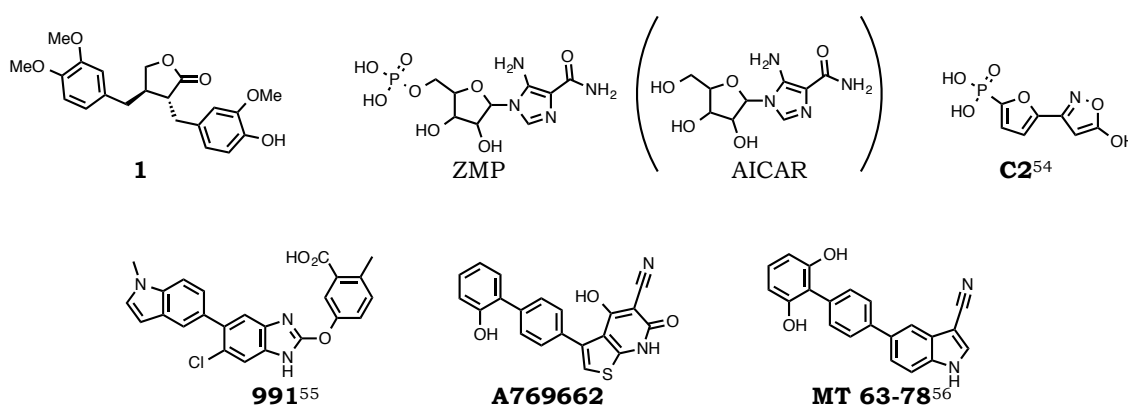


図 13. AMPK 活性化剤

間接的な活性化剤（上段）と AMPK と直接結合し、活性化する薬剤（下段）。

間接的な活性化剤は様々な作用機序にて AMPK を活性化するが、ミトコンドリアの呼吸鎖を抑制することで細胞内 AMP 比を増大させることで活性化させるものが多い。AMPK に直接結合し活性化する薬剤も多数報告されている。γサブユニット AMP 結合部位または、α-βサブユニットの境目の領域に結合し、アロステリックにキナーゼ活性を向上させることが示唆されている。また、A769662 や 991 は AMPK の脱リン酸化を抑制することも実験的に示されている。



## ● 2.5 AMPK の基質多様性

AMPK の機能活性化により様々な治療効果がもたらされるのは前節で述べた通りである。この多数の治療効果は、AMPK の下流基質多様性に基づくものと考えられる。AMPK の下流基質としては、タンパク質、脂肪酸、糖などといった生体高分子の同化に関わるタンパク質(Glycogen synthase<sup>57</sup>、Acetyl-CoA carboxylase<sup>58</sup>など)を始め、細胞周期、免疫、オートファジー、血管新生に関わるタンパク質など多岐にわたる基質が報告<sup>59-64</sup>されており、現在までに 50 以上の基質が AMPK によってリン酸化されることが明らかとなっている(図 14)。生理的な環境においては、AMPK サブタイプ、基質の発現量の調整やアダプタータンパク質を介在することでその基質選択性が担保されていることが予想される。しかしながら、AMPK 活性化剤により強制的に AMPK を活性化した場合においては、数多くの AMPK 下流基質がリン酸化される<sup>65</sup>。これは、AMPK 自体の機能制御によっては、基質選択的なリン酸化誘導は困難であることを示している。

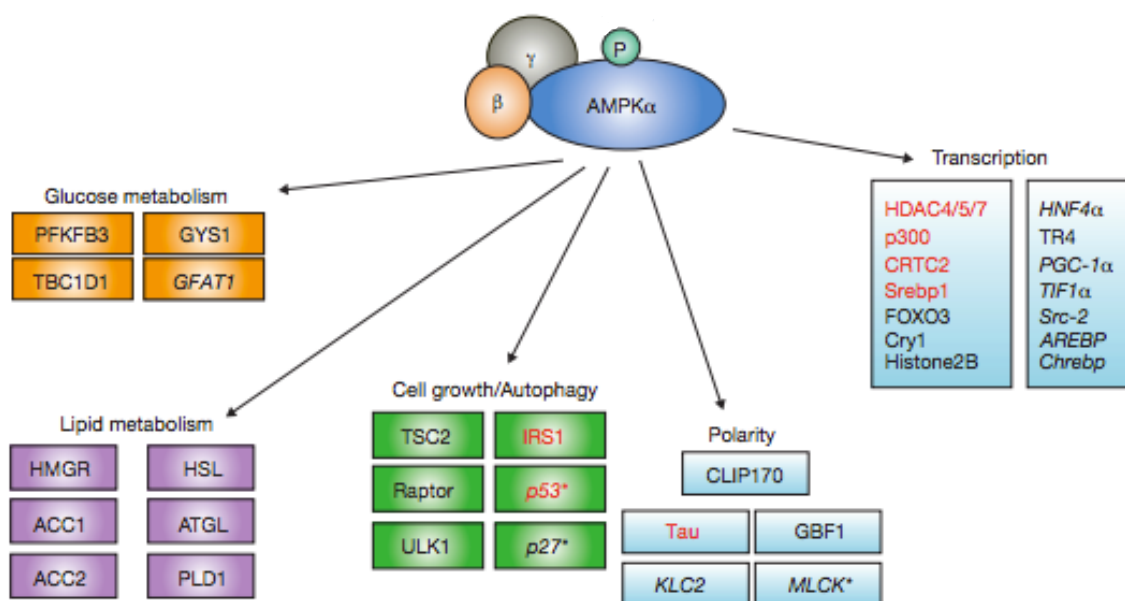


図 14. AMPK の基質多様性<sup>65</sup>

AMPK はエネルギー状態変化に基づく様々なシグナルを統合し、数多くの基質をリン酸化する。これまでに代謝系、細胞増殖、オートファジーに関わるものを含む約 50 種のタンパク質が AMPK 基質として同定されている。赤文字で記したタンパク質は他の AMPK family キナーゼ (SIK1, SIK2, MARKs, SADs) によってもリン酸化されることが明らかとなっているもの。

## ● 2.6 AMPK 下流基質- ACC と HMGR-

AMPK に基づく治療効果の中でも、代謝性疾患治療において重要であると考えられる二つの AMPK 基質が存在する。それが、HMG-CoA リダクターゼ (HMGR) とアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) である。これらのタンパク質は脂質合成系にて機能するタンパク質であり、両者とも AMPK によるリン酸化を受ける事でその機能が制御される<sup>58,66</sup>。

### 2.6.1 アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC)

アセチル CoA カルボキシラーゼ<sup>67</sup> (ACC) は長鎖脂肪酸合成に関与している酵素であり、アセチル CoA からマロニル CoA への炭酸化反応を触媒する活性を有している。ほ乳類においては ACC1、ACC2 の二種類のサブタイプが報告され、それぞれ、細胞質、ミトコンドリアにて機能する<sup>68</sup>。ACC は比較的分子量の大きいタンパク質 (ACC1 265 kDa、ACC2 280 kDa) であり、その構造は、BC ドメイン、BCCP ドメイン、CT ドメインと呼称される三つのドメインに分けられる<sup>69</sup>。BC ドメイン (Biotin carboxylase domain) は、ACC 中のビオチンに対して炭酸イオンを付加する活性を示すドメインである。この反応には ATP の加水分解エネルギーを必要とする。BCCP ドメイン (Biotin carboxyl carrier domain) は、BC ドメインにてカルボキシル化されるビオチンを含むドメインであり、BC ドメインから CT ドメインを往復することで、カルボキシル基を受け渡す機能を示す。CT ドメイン (carboxyl transferase domain) は、ビオチンに結合したカルボキシル基をアセチル CoA へと付与する活性を有し、このドメインにおいて最終生成物であるマロニル CoA が生成する。なお、この反応段階には ATP のエネルギーは必要ではない。

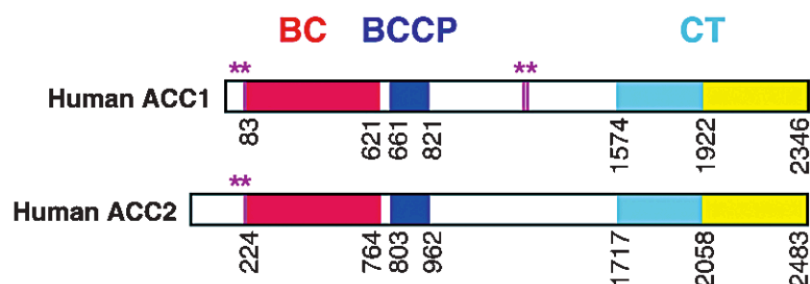


図 15. アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) の一次構造<sup>70</sup>

ヒトにおいて ACC は ACC1 と ACC2 の二つのサブタイプが存在する。単一のタンパク質として翻訳されるが、それぞれのドメイン (BC, BCCP, CT domain) ごとに異なる活性を示す。ACC はリン酸化を受けることでその機能が制御される (\*で示したアミノ酸残基)。AMPK によってリン酸化されるのは Ser79 (ACC1)、Ser212 (ACC2) の残基である。

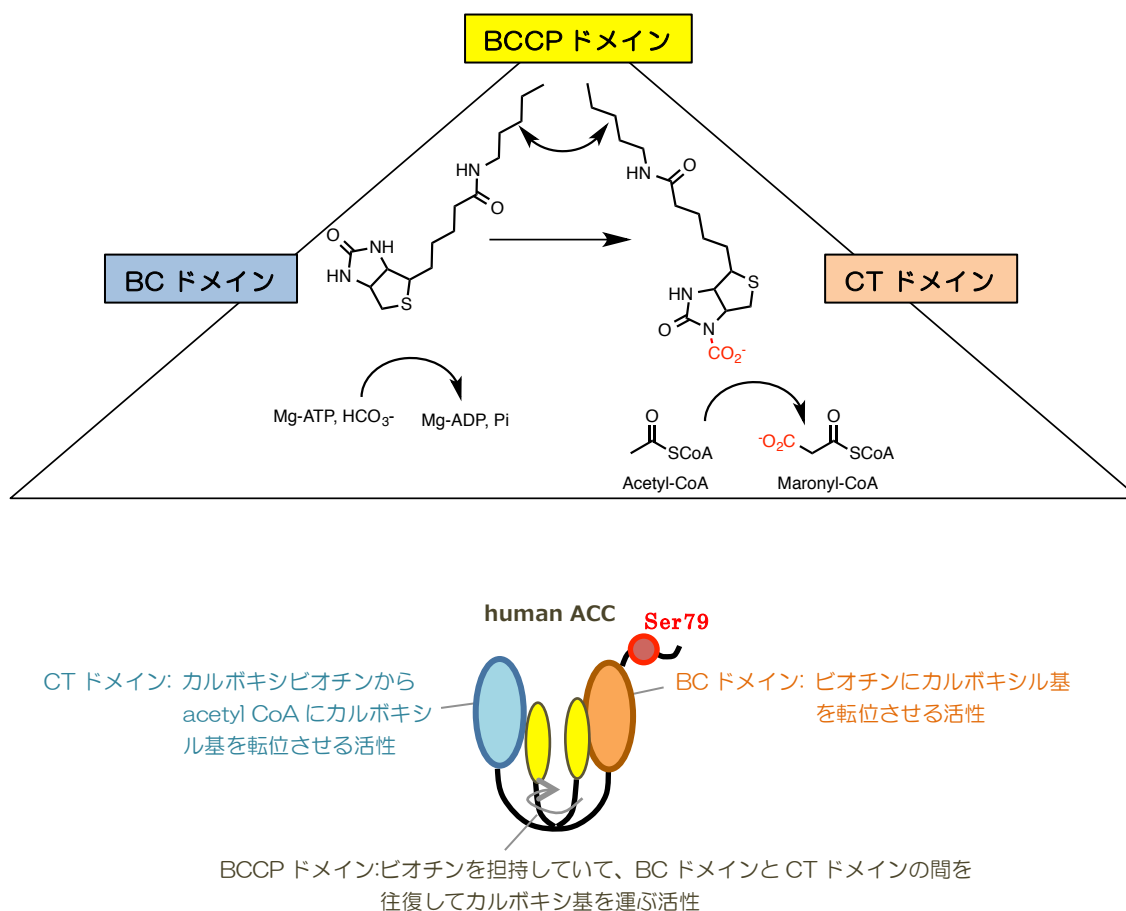


図 16. アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) の構造と機能<sup>70</sup>

ACC はその三つのドメインを協調させることでマロニル CoA を合成する。また、AMPK によりリン酸化される部位は BC ドメイン近傍であることも明らかとなっている。

ACC が脂肪酸代謝に関与するメカニズムとしては、二つのメカニズムが報告されている。一つは、長鎖脂肪酸合成材料としてマロニル CoA を生成することにより、脂肪酸合成に寄与するというものである。もう一つが、生成したマロニル CoA がミトコンドリア膜に存在するアシル脂肪酸トランスポーター-CPT1<sup>71</sup> を阻害し、結果としてβ酸化が抑制されるというものである<sup>68</sup>。脂肪酸合成は細胞質、β酸化はミトコンドリアにて行われることから、脂肪酸合成には ACC1 が、β酸化の抑制には ACC2 が寄与しているものと考えられる。

ACC は AMPK によってリン酸化を受けることでその機能が制御される<sup>58</sup> ことが明らかとなっている。BC ドメイン中の Ser 残基 (ACC1: Ser79, ACC2: Ser218) がリン酸化されることが報告されており、リン酸化体においてはその活性が約 70%抑制されることが実験的に証明されている<sup>72</sup>。また、ACC の機能阻害は、メタボリックシンドロームや二型糖尿病に対する治療効果をもたらすことが報告<sup>73-75</sup> されていることから、天然物や合成リガンドによる機能阻害剤が多数報告<sup>76,77</sup> されている。

## 2.6.2 HMG-CoA リダクターゼ (HMGR)

HMG-CoA リダクターゼ<sup>78</sup> (HMGR) は、コレステロール合成の律速段階にて働き、HMG-CoA からメバロン酸への還元反応を触媒する酵素である。この反応には補因子として NADPH を必要とし、二つの NADPH 分子を利用してメバロン酸へと変換する (図 17)。HMGR は小胞体に発現する膜タンパク質であり、小胞体にて上記反応を進行させることで細胞内のコレステロール恒常性に大きく寄与している。

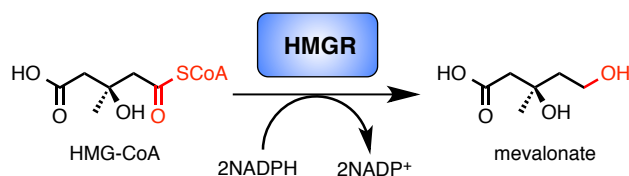


図 17. HMG-CoA リダクターゼによる還元反応  
HMGR は HMG-CoA を基質とし、NADPH のヒドリドを利用してメバロン酸へと還元する。

HMGR は構造的に大きく二つのドメインに分けられる (図 18)。N 末端側は、HMGR を小胞体膜に固定するアンカードメインであり、多くの疎水性領域を含んでいる。また、ステロールセンシングドメイン (SSD) と呼ばれる特異配列を含み、このドメインにて、SCAP や Insig などのタンパク質と相互作用し、その発現量や転写量が制御されることが報告<sup>79,80</sup>されている。対して C 末端側は、HMGR 活性の中核を担うドメインであり、この部位においてメバロン酸への還元反応を触媒する。N 末端ドメインはその大部分が脂質二重膜へと挿入 (8 回膜貫通構造) されているのに対し、C 末端ドメインは細胞質に露出している。

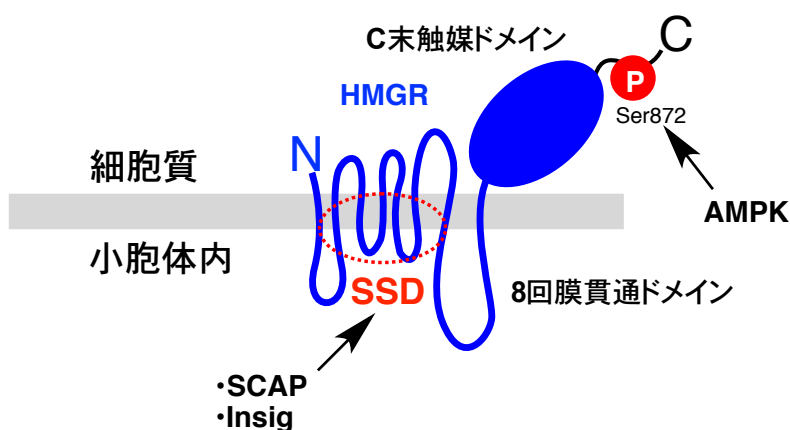


図 18. HMGR の構造と関連タンパク質

HMGR は小胞体に局在する膜タンパク質であり、N 末膜貫通領域と C 末触媒活性領域の二つの大きな構造単位を有している。膜貫通領域には sterol-sensing-domain (SSD) と呼ばれるドメインを有し、このドメインを介して SCAP や Insig と相互作用することでその発現量が調節されている。C 末端の Ser872 は AMPK によりリン酸化される。このリン酸化は HMGR の触媒活性に大きく寄与することが知られている。

HMGR も ACC 同様に AMPK によってリン酸化を受ける事でその機能が抑制される<sup>81,82</sup>。リン酸化部位は、C 末端ドメインの Ser872 であり、リン酸化体はその触媒活性が大きく低下する（～80%低下）ことが報告されている。何故リン酸化を受けることによって機能が抑制されるかについても多数の研究者によって示されており、NADPH の親和性の減少による機構<sup>83</sup>、アロステリックな機能阻害<sup>84</sup>という二つの機構が提唱されている。

HMGR の機能阻害は脂質異常症、特に高コレステロール血症の改善につながることを示唆されている。その機能阻害剤として有名なものがスタチン誘導体である。1970 年代、アオカビの一種 *penicillium citrinum* よりメバスタチンが HMG-CoA 阻害剤として発見された<sup>85</sup>。これを皮切りに、数々のスタチン誘導体が開発され、脂質異常症治療薬として臨床応用されている。スタチン類はその化学構造中にメバロン酸類似構造を有し、基質と競合することでその阻害活性を示すと考えられている<sup>86</sup>。

## ● 2.7 作業仮説の提案

私は今回、個々のキナーゼ基質の選択的リン酸化誘導活性を有する機能性有機分子を創製すべく、その題材として AMP 依存性プロテインキナーゼに着目した。AMPK は種々のシグナルを統合する “シグナリングハブ” として機能するキナーゼであり、数多くの下流基質をリン酸化制御する。多数の下流基質を有するキナーゼの基質選択性を変化させうる化学的手法はこれまでに報告がなく、このような手法の開発はリン酸化シグナル解析を始めとする分子生物学研究やリン酸化シグナル制御を指向した創薬化学研究分野におけるブレイクスルーとなる可能性がある。

さらに AMPK の活性化は、糖尿病、脂質異常症、がんなど種々の疾患治療につながることを示唆<sup>39-41</sup>されている。そのため、数多くの AMPK 活性化剤がこれらの疾患治療を指向して研究開発されてきた。しかしながら、AMPK 自体の活性化によっては、AMPK 下流基質が非選択的にリン酸化されうるため、特定の基質タンパク質に基づく狙った治療効果を最大限に引き出す事はできていないと予想される。また、AMPK 活性化剤には多数の副作用<sup>87-89</sup>が報告されており、これは治療効果に関わる基質以外の基質のリン酸化が原因である可能性がある。すなわち、AMPK 下流の個々の基質の選択的リン酸化誘導は、AMPK 活性化による狙いの治療効果を最大限に引き出すこと、また AMPK 活性化に由来する副作用の軽減につながるものと期待できる。

この問題解決には、これまでのキナーゼ制御手法とは一線を画したリン酸化誘導手法の開発が求められる。私は、このような手法の開発にむけ、当研究室にて開発された有機分子 SNIPER<sup>90</sup> (Specific and Nongenetic IAP-dependent Protein Eraser, 図 19) に着目した。この SNIPER はユビキチンリガーゼである cIAP に対するリガンドと、標的タンパク質に対するリガンドとを連結させた構造を有する分子であり、ユビキチンリガーゼと標的タンパク質とを近接させることで、標的タンパク質のユビキチン化、それに続くプロテアソーム系での分解誘導を達成している。これは、修飾酵素と標的タンパク質とが空間的に近い状態に導かれることで、選択的な化学修飾が起りうることを示している。私はこれに着想を得て、キナーゼと標的タンパク質との会合を促進することができれば、選択的なリン酸化が誘導される可能性があるのではないかと考えた。

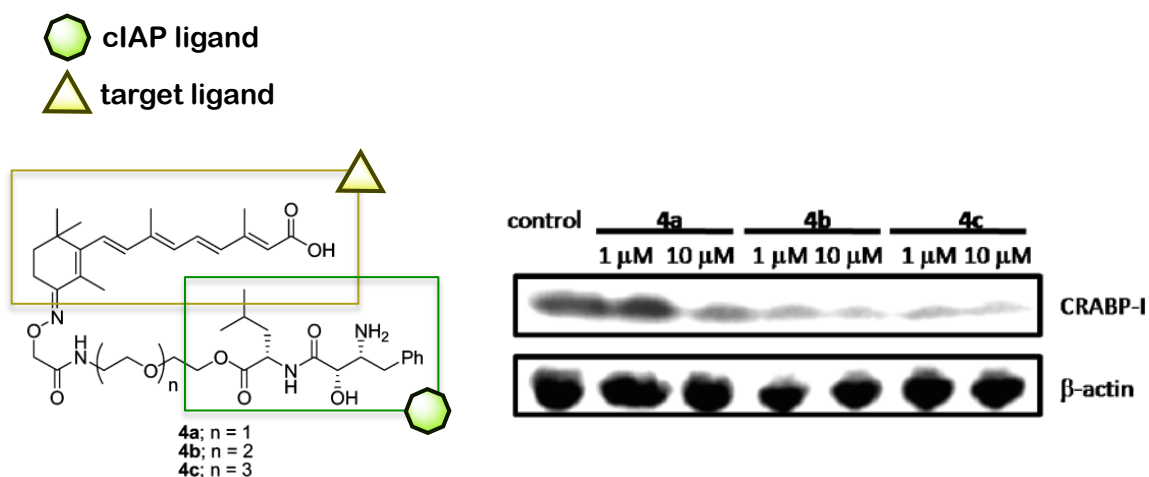
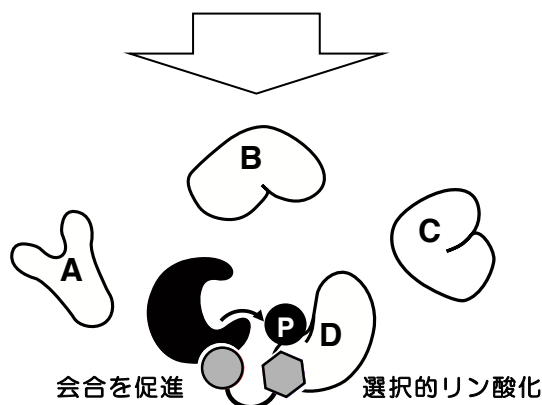


図 19. ユビキチン修飾誘導分子 SNIPER

SNIPER はユビキチンリガーゼ cIAP リガンドと標的タンパク質リガンドとを連結させた化学構造を有し、強制的に三者複合体を形成させることで標的タンパク質のユビキチン化を誘導する。これまでに、標的タンパク質として CRABP<sup>90</sup>、AR<sup>91</sup>、Halo-tag 融合タンパク質<sup>92</sup> など様々なタンパク質のユビキチン化に成功している。







### 第 3 章 リン酸化誘導分子の創製



## 第 3 章 リン酸化誘導分子の創製

上記研究背景に基づき、著者らはキナーゼ下流基質の選択的なリン酸化を誘導する機能性分子の開発に着手した。その分子設計、有機合成ならびに生物活性評価結果について詳細に記す。

### ● 3.1 リン酸化誘導分子の分子設計

私は、AMPK 下流基質である ACC、HMGR の選択的なリン酸化を誘導すべく、機能性分子の設計を行った。私は SNIPER による翻訳後修飾の誘導例をもとに、「AMPK と標的タンパク質とを近接させる機能をもつ分子」が、AMPK による標的タンパク質の選択的なリン酸化誘導を可能にするのではないかと考え、下図 20 に示すような分子を考案した。すなわち、AMPK 親和性分子と標的タンパク質親和性分子とをリンカーにて連結させた分子をリン酸化誘導分子として設計した。キナーゼ、標的タンパク質に対して親和性を示すこの分子により、二つのタンパク質を強制的に近接させることで、キナーゼによる選択的なリン酸化が誘導されることを期待した。

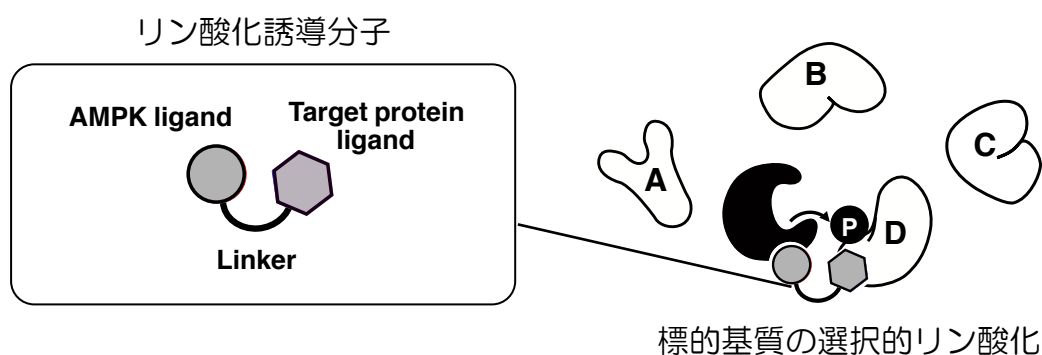
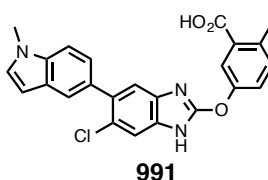


図 20. 選択的リン酸化誘導のコンセプト

具体的に、キナーゼ親和性分子としては、AMPK 活性化剤として報告されているベンズイミダゾール誘導体 **991**<sup>93</sup> という化合物を選択した (図 21)。この化合物は、AMPK に直接結合し、そのキナーゼ活性を向上させることが報告されている。この活性化には二種類の機構があることが示唆されている。一つ目の機構としては、**991** の結合により AMPK の 3 次構造が変化し、アロステリックに活性を向上させるもの、二つ目としては、AMPK 機能活性化に寄与する p-Thr172 の脱リン酸化を阻害するというものである。すなわち、この二つの機構によって、AMPK のキナーゼ活性が増大する。精製 AMPK を用いた実験においては、**991** は AMPK ( $\alpha 1/\beta 1/\gamma 1$ ) のキナーゼ活性を nM レベルの濃度にて約 5 倍向上させることが示されている。この系においては AMPK 自身のリン酸化の効果は反映されない為、AMPK 上流キナーゼが存在する生細胞系においては、さらに AMPK 活性は向上するものと予想される。AMPK に直接結合し、そのキナーゼ活性を向上する **991** の活性は、本リン酸化誘導分子において有利なものであると考えられる。



| AMPK complex                | Activation (fold) | A <sub>0.5</sub> |
|-----------------------------|-------------------|------------------|
| $\alpha 1/\beta 1/\gamma 1$ | 4.8               | 0.03             |
| $\alpha 2/\beta 1/\gamma 1$ | 2.4               | 1.1              |
| $\alpha 1/\beta 2/\gamma 1$ | 12.2              | 0.09             |
| $\alpha 2/\beta 2/\gamma 1$ | 5.4               | 0.51             |

図 21. ベンズイミダゾール誘導体 **991** の AMPK に対する活性<sup>93</sup>  
 精製した各 AMPK 複合体に対する活性を SAMS peptide assay を用いて評価したもの。\*A<sub>0.5</sub> = 最大活性の 50% に達する化合物濃度

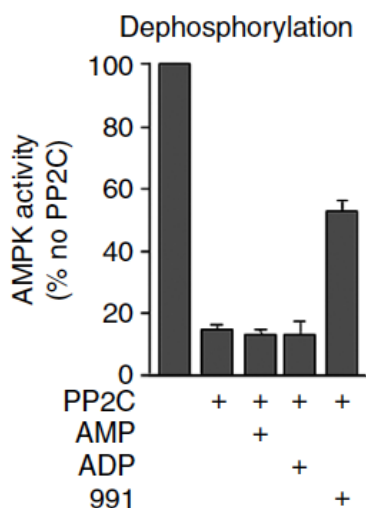


図 22. **991** は AMPK の脱リン酸化を抑制する<sup>93</sup>  
 精製 AMPK、アデノシンリン酸 (AMPK activator)、PP2C、**991** をインキュベートし、AMPK の活性を評価した。リン酸化体の AMPK はそのキナーゼ活性が高いことが知られている。**991** によって、PP2C による脱リン酸化が抑制され、AMPK の活性が亢進していることが分かる。

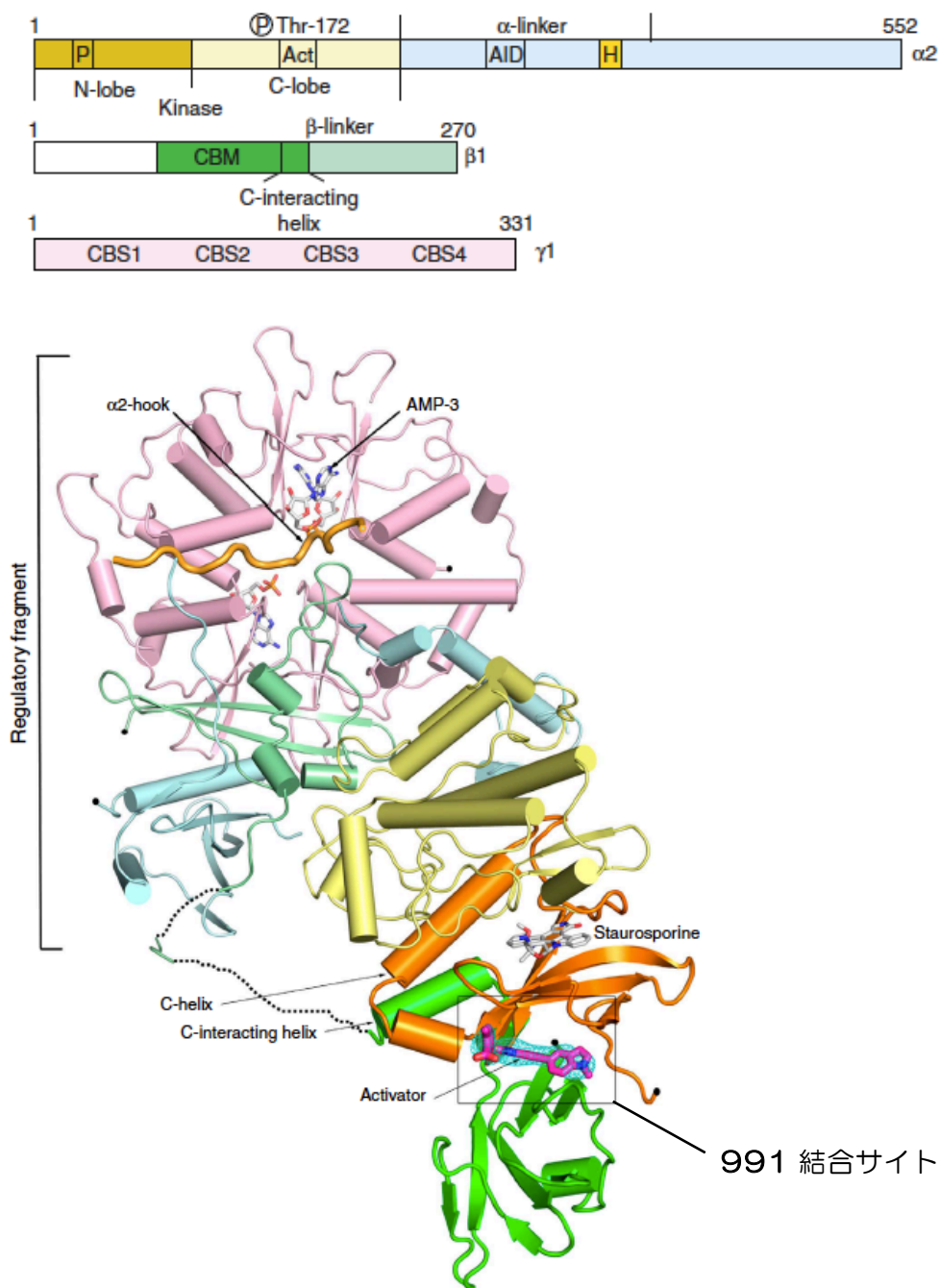


図 23. 991 は AMPK $\beta$ サブユニットと $\alpha$ サブユニットの境目に結合する<sup>93</sup>  
 AMPK の一次構造(左上)、991 と AMPK( $\alpha$ 2/ $\beta$ 1/ $\gamma$ 1) との結晶構造解析結果(PDBID: 4CFE)。991 は AMPK $\beta$ サブユニット(CBM domain)と $\alpha$ サブユニット (キナーゼ活性部位近傍) に結合することが示唆された。

ACC 親和性分子としては ACC 阻害剤として報告されているスピロ環型阻害剤を選択した(図 24)。この誘導体は 2010 年にファイザー株式会社によって見出された<sup>94</sup>化合物である。ファイザー保有の化合物ライブラリより図 24 左に示すキノリン誘導体が ACC 阻害剤として見出され、その後の構造展開によりスピロ環を有する誘導体が見出された。このスピロ環型阻害剤は hACC1、hACC2 に対して、nM レベルの高い阻害能を示す<sup>95</sup>。阻害メカニズムとしては、ACC の CT ドメインに結合し、ACC の CT 活性を阻害する機構が示唆されている(図 25)。その構造活性相関も詳細に解析され、スピロ環部位が特に活性発現に重要であることが明らかとなっている。

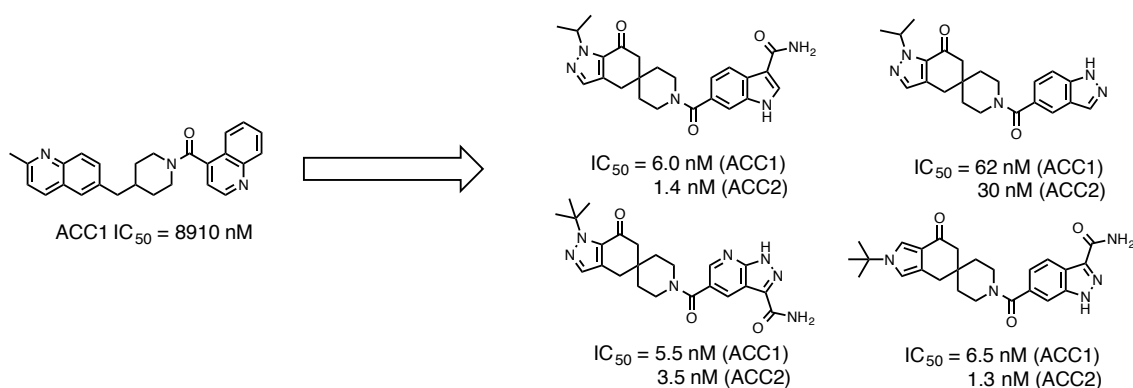


図 24. ファイザーにより見出された ACC 阻害剤<sup>94, 95</sup>

ライブラリスクリーニングにより左化合物が ACC 阻害活性を有する化合物として見出され、その後の構造展開により、約 1000 倍以上活性の高いスピロ環型阻害剤が開発された。

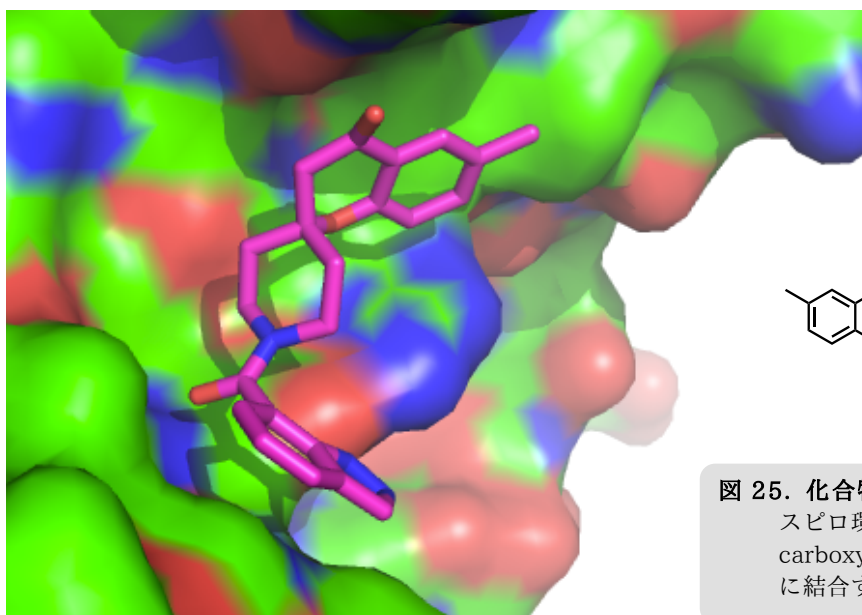


図 25. 化合物結合部位の結晶解析

スピロ環型阻害剤は、ACC の carboxyltransferase (CT) domain に結合する (PDBID: 3H0S)

HMGR 親和性分子としては、HMGR 阻害剤であるスタチン誘導体に着目した (図 26)。スタチン類は HMGR 阻害剤として発見され、その数々の誘導体が高コレステロール血症の治療薬として臨床応用されている。スタチン誘導体は、その構造中にメバロン酸模倣構造を有し、HMGR の基質結合部位に結合する事で阻害活性を表す。その中でも特に高い阻害定数<sup>96</sup> ( $K_i = 14 \text{ nM}$ )を示し、かつ HMGR との共結晶構造が解析されているアトルバスタチンを導入リガンドとして選択した。

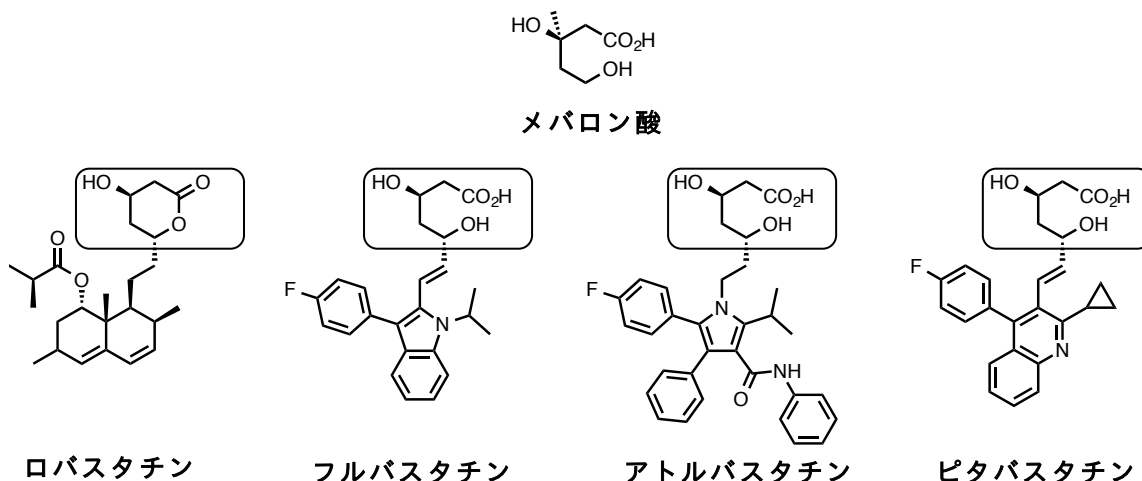


図 26. メバロン酸とスタチン薬の化学構造  
 スタチン誘導体はそれぞれその構造中にメバロン酸模倣構造を有し、  
 基質 (HMG-CoA) と競合することで HMGR 阻害活性を示す。

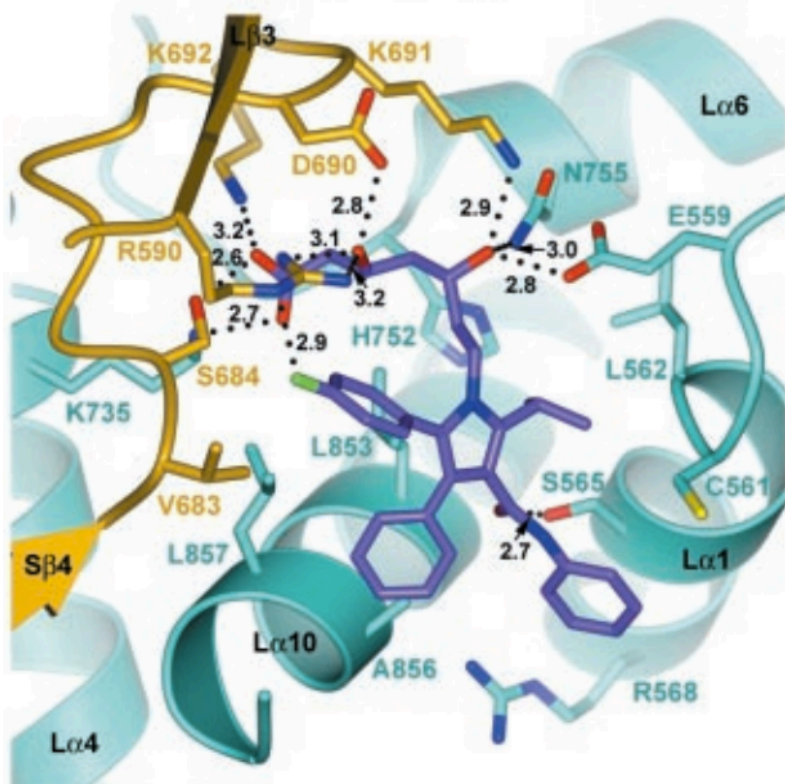


図 27. アトルバスタチンと HMGR との結晶構造 (PDBID: 1HWK)  
 アトルバスタチンは、HMGR C 末端基質結合サイトへと結合する。



本リン酸化誘導分子はリガンド連結構造を有する為、各リガンドの適した部位よりリンカーを伸長する必要がある。すなわち、各タンパク質とリガンドとの相互作用を減弱させないように、慎重にリンカー導入位置を決定することが重要である。そのリンカー導入位置を、各結晶構造より決定した。**991** に関しては、インドール部位がタンパク質表面へと突出していること、また、構造活性相関解析より、この部位の構造展開は活性に大きな影響を与えないことが示唆されたため、この部位よりリンカーを伸長することとした。

リンカー導入位置

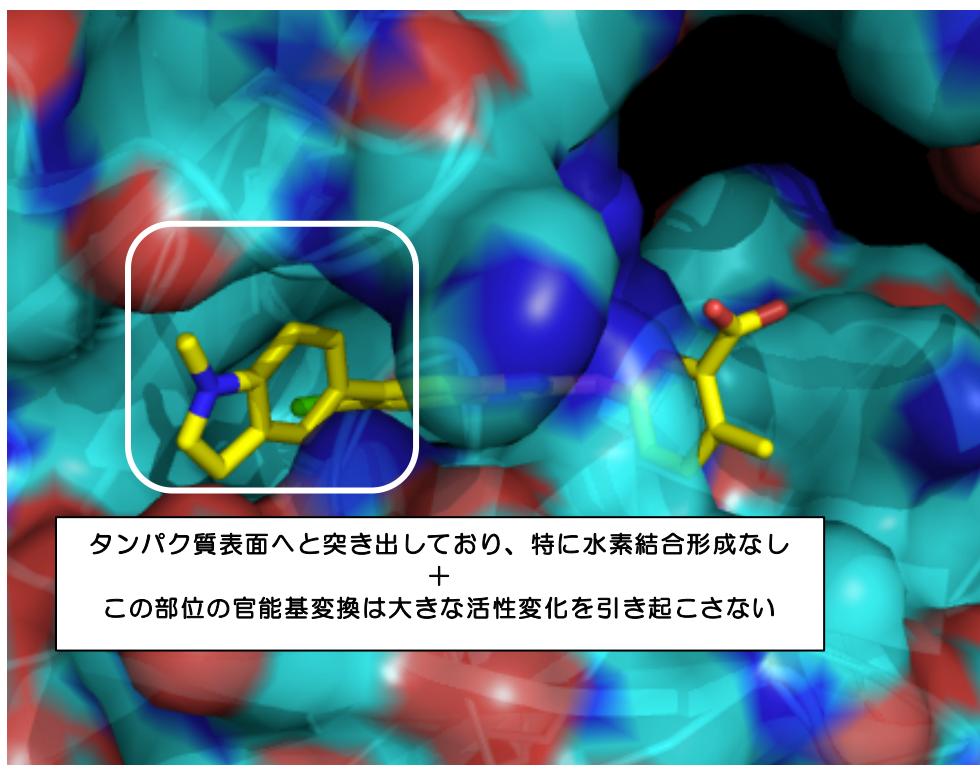
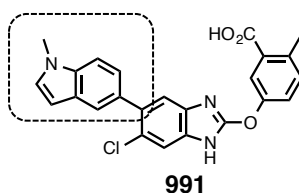


図 28. 991 と AMPK との結晶構造 (PDBID: 4CFE)

AMPK と 991 との相互作用を PDB に登録されている共結晶情報をもとに解析した。ベンズイミダゾール部位は結合ポケット最奥に位置している。両端のインドール、安息香酸部位はタンパク質表面へと突き出しているような形に位置している。安息香酸部位は AMPK アミノ酸残基との水素結合が観測された。その為、水素結合を形成しておらず、構造活性相関研究より官能基変換が許容されることが分かっているインドール部位よりリンカーを伸長することにした。



また、スピロ環型 ACC 阻害剤、アトルバスタチンについても結合タンパク質との結晶構造が解析されている。これらのリガンドからのリンカーの導入位置も結晶構造情報、構造活性相関より決定した。

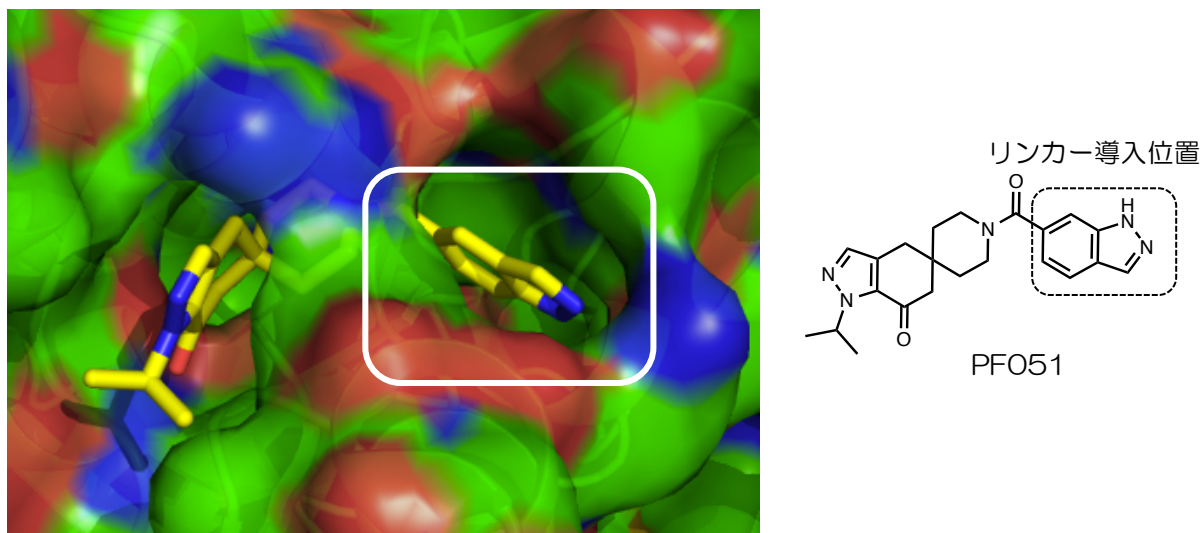


図 29. スピロ環型 ACC 阻害剤と ACC との結晶構造 (PDBID: 4WZ8)

ACC CT domain におけるスピロ環型阻害剤の結合が結晶構造解析より明らかとなっている。結晶構造、構造活性相関よりスピロ環とそれに続くピラゾール部位は活性発現に大きく寄与していることが示唆される。PF051 におけるインダゾール部位は様々な置換基に変換可能であること、比較的タンパク質表面に位置していることから、この部位からのリンカー導入を計画した。

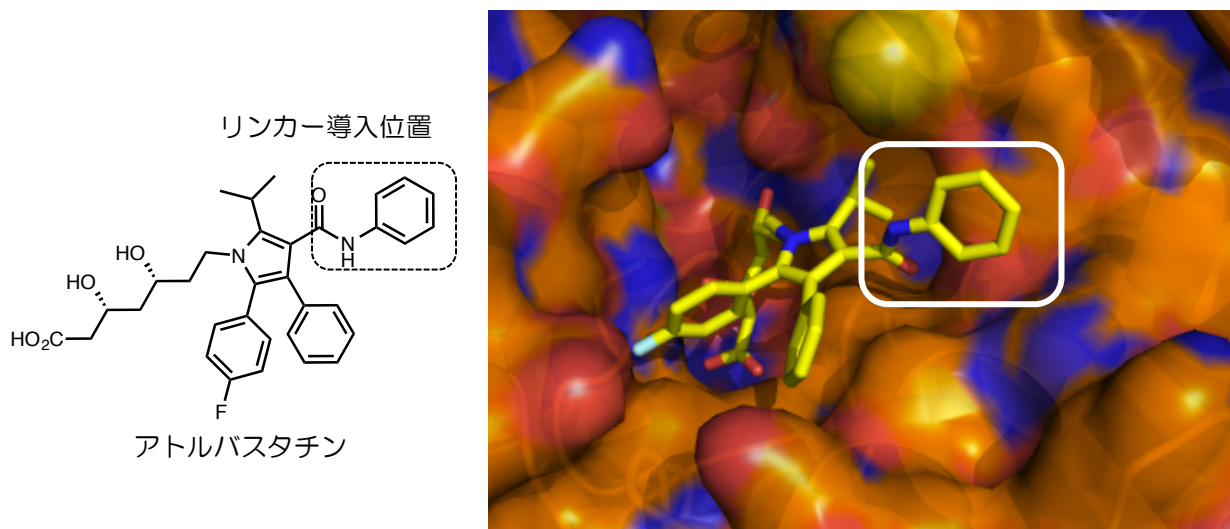


図 30. アトルバスタチンと HMGR との結晶構造 (PDBID: 1HWK)

アトルバスタチンは HMGR C 末端触媒活性部位へと結合することが結晶構造より明らかとなっている。アセトアニリド部位はよりタンパク質表面側へ位置しており、タンパク質との相互作用には大きく寄与しないであろうと予想される。

すなわち、AMPK リガンドとして AMPK 活性化剤 **991** を、各標的タンパク質リガンドとしてスピロ環型阻害剤、アトルバスタチンをそれぞれリン酸化誘導分子に組み込むリガンドとして選び出した。そしてこれらのリガンド同士を、ポリエチレングリコールリンカーを介して連結させた有機分子を ACC リン酸化誘導分子、HMGR リン酸化誘導分子とした。リンカー長については、SNPER での成功例を考慮し、トリエチレングリコールからペンタエチレングリコールの長さのリンカーを導入することにした。

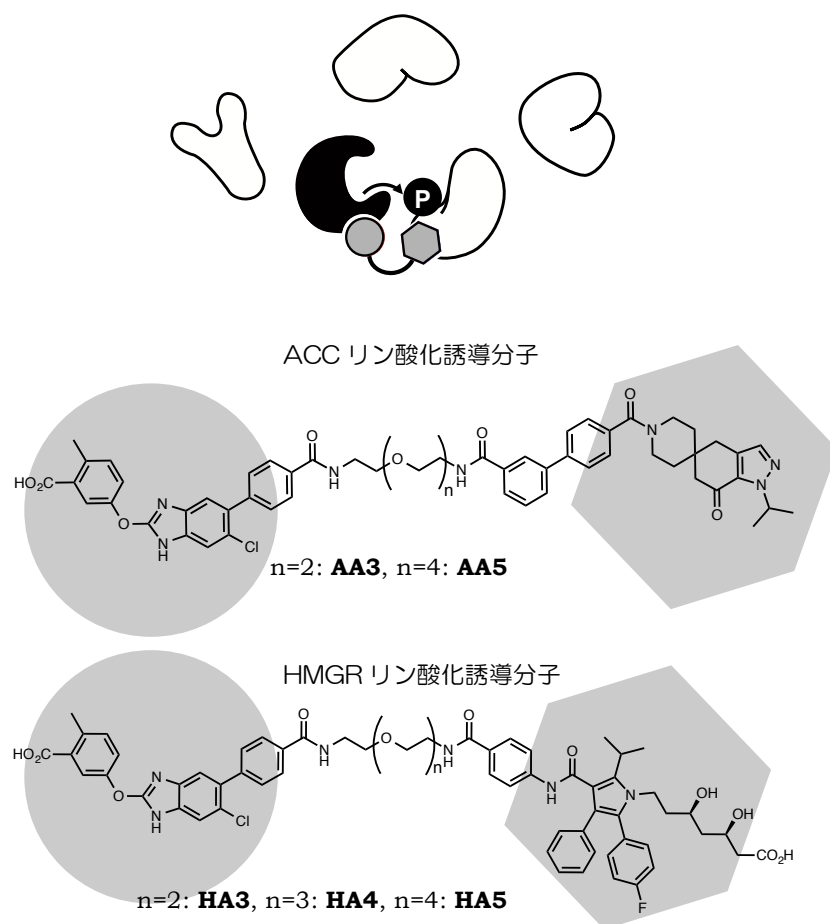
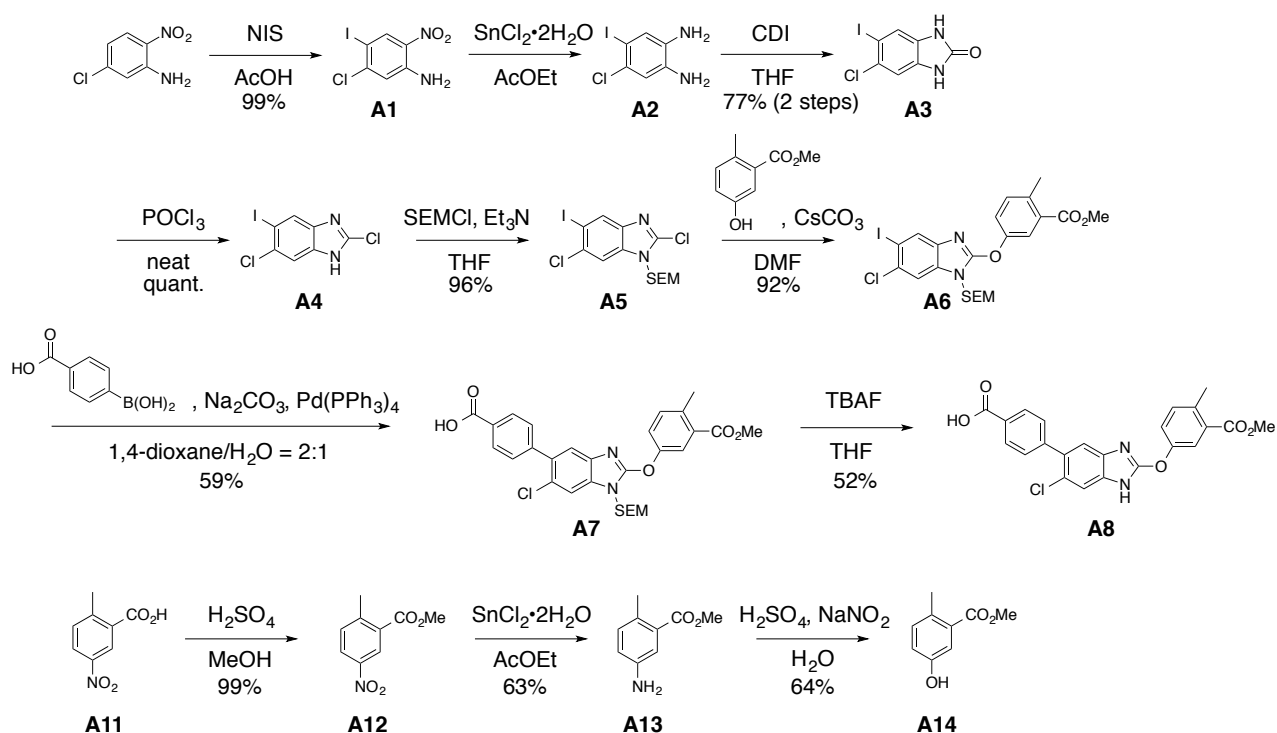


図 31. 設計した ACC リン酸化誘導分子と HMGR リン酸化誘導分子

## ● 3.2 リン酸化誘導分子の有機合成

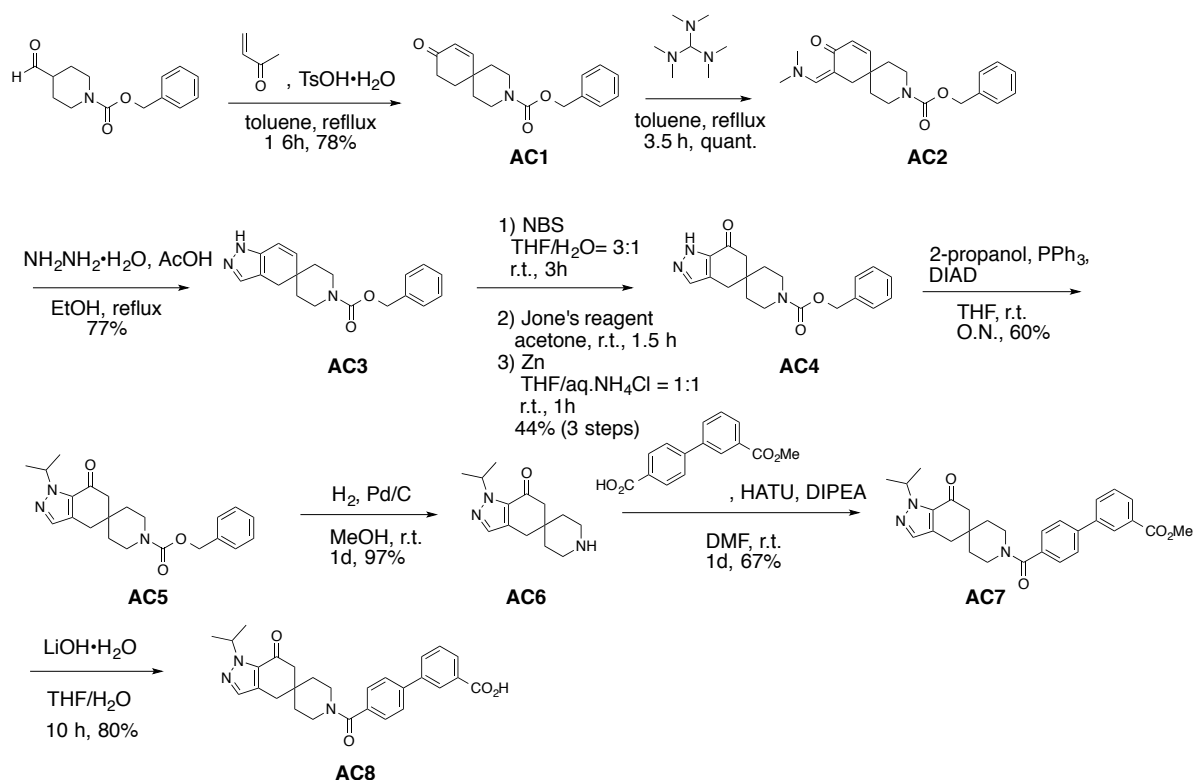
設計したリン酸化誘導分子の合成は、各リガンド、リンカーユニットをそれぞれ個別に合成した後に縮合反応によって連結する収束的な合成を計画した。まず、AMPK 活性化剤ユニットの合成に着手した。合成経路については、既に報告されているベンズイミダゾール型 AMPK 活性化剤の合成法<sup>97</sup>を参考に合成を進めた。比較的安価に入手可能な 5-クロロ-2-ニトロアニリンより出発し、NIS によるヨード化により、中間体 **A1** を得た。続く塩化スズによる還元、CDI による環化反応、塩化ホスホリルによる塩素化を経て、ベンズイミダゾール中間体 **A4** を良好な収率で得た。SEM 基による窒素原子の保護を行い、中間体 **A5** を得、1-メチル-4-ニトロ安息香酸より 3 工程で合成したフェノール誘導体 **A14** とのカップリング反応に付すことで、中間体 **A6** を得た。さらに、*p*-カルボキシフェニルボロン酸との鈴木カップリングにより中間体 **A7** を得、最後にテトラブチルアンモニウムフルオリドの処理により SEM 基を脱保護することで、目的とする AMPK リガンド **A8** を得る事に成功した。

## ■ AMPK リガンドユニットの合成



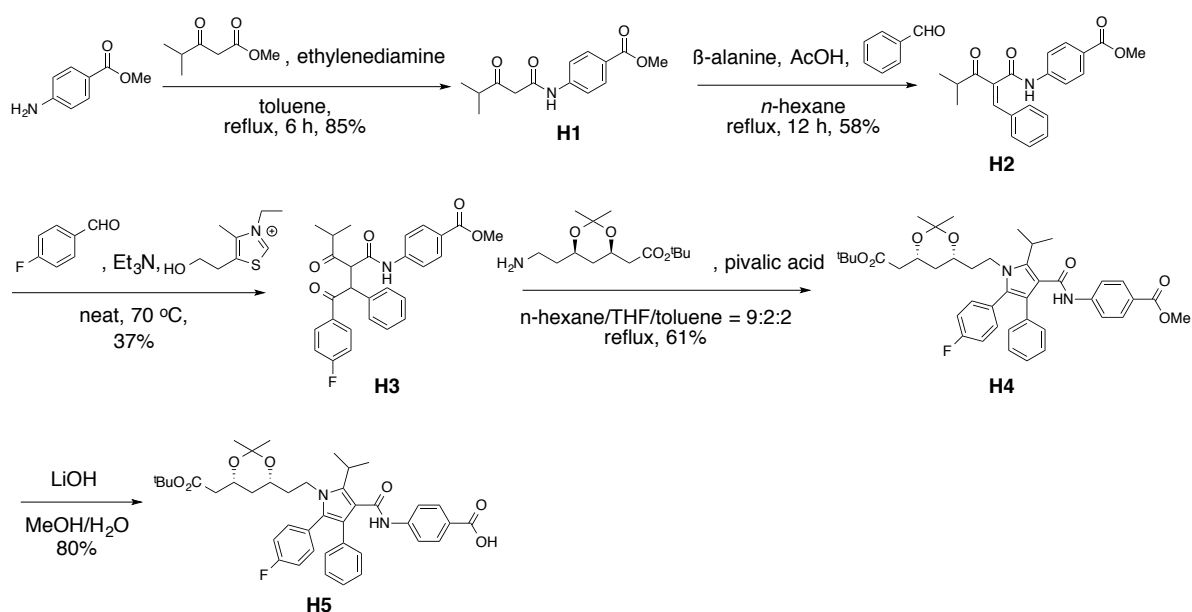
続いて ACC リガンドユニットの合成に着手した<sup>98</sup>。試薬として入手可能なホルミルピペリジン誘導体に対し、酸性条件でメチルビニルケトンと反応させることで、スピロ環化体 **AC1** を得た。続いて、トリス(ジメチルアミノ)メタンとの反応により中間体 **AC2** を得たのちに、ヒドラジンと反応させる事でピラゾール体 **AC3** を得た。水存在下、NBS によりブロモヒドリン体の合成、続く Jones 酸化、亜鉛による脱ブロモ化を経て中間体 **AC4** を得た。2-プロピル基の導入、Cbz 基の脱保護を行い、アミン体 **AC6** を得た。このアミン体に対し、4-ブロモフェニルボロン酸より調整した誘導体を縮合させることで、中間体 **AC7** を得、最後にメチルエステルの加水分解を行うことで、目的とする ACC リガンド **AC8** を得る事に成功した。

### ■ ACC リガンドユニットの合成



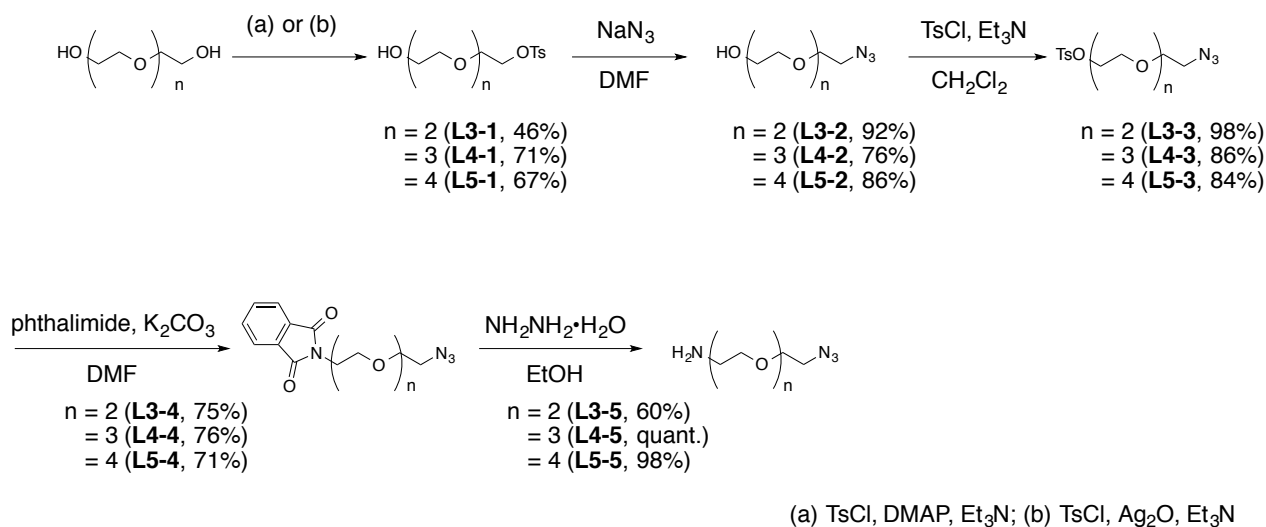
HMGR リガンドの合成についても、既知の合成経路<sup>99</sup>を参考に合成を進めた。4-アミノ安息香酸メチルより出発し、ジケトン部位の導入、アルドール反応、チアゾリウム塩を用いた極性転換型の反応を経て、中間体 **H3** を得た。脂肪族アミンとの反応によりピロール環を構築した後、末端メチルエステルを加水分解することで、目的の HMGR リガンド **H5** を得る事に成功した。

### ■ HMGR リガンドユニットの合成



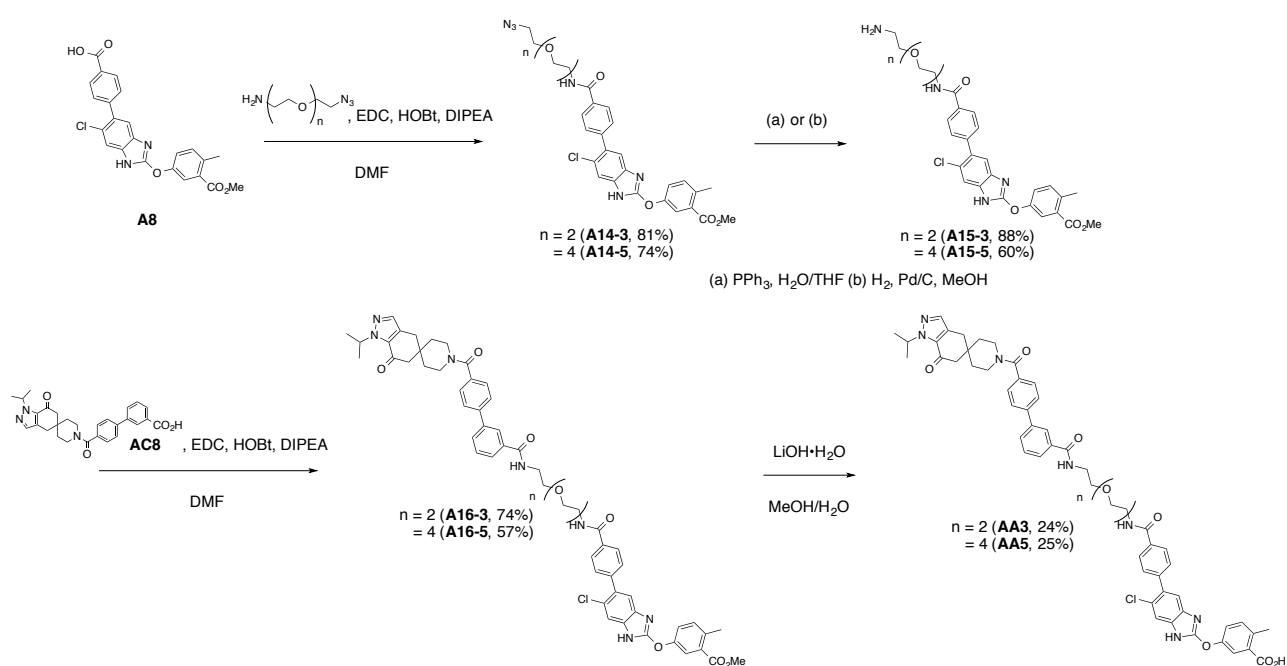
続いて、リンカーユニットの合成に着手した。対応する長さのポリエチレングリコールに対し、モノトシル化反応、アジ化ナトリウムによるアジド基の導入を行い、中間体 **Lx-2** を得た。さらに、末端ヒドロキシ基をトシル基へと変換した後に、Gabrielアミン合成法を適用することで、モノアミン体 **Lx-5** へと導き、目的のリンカーユニットを合成することに成功した。

■ PEG リンカーユニットの合成



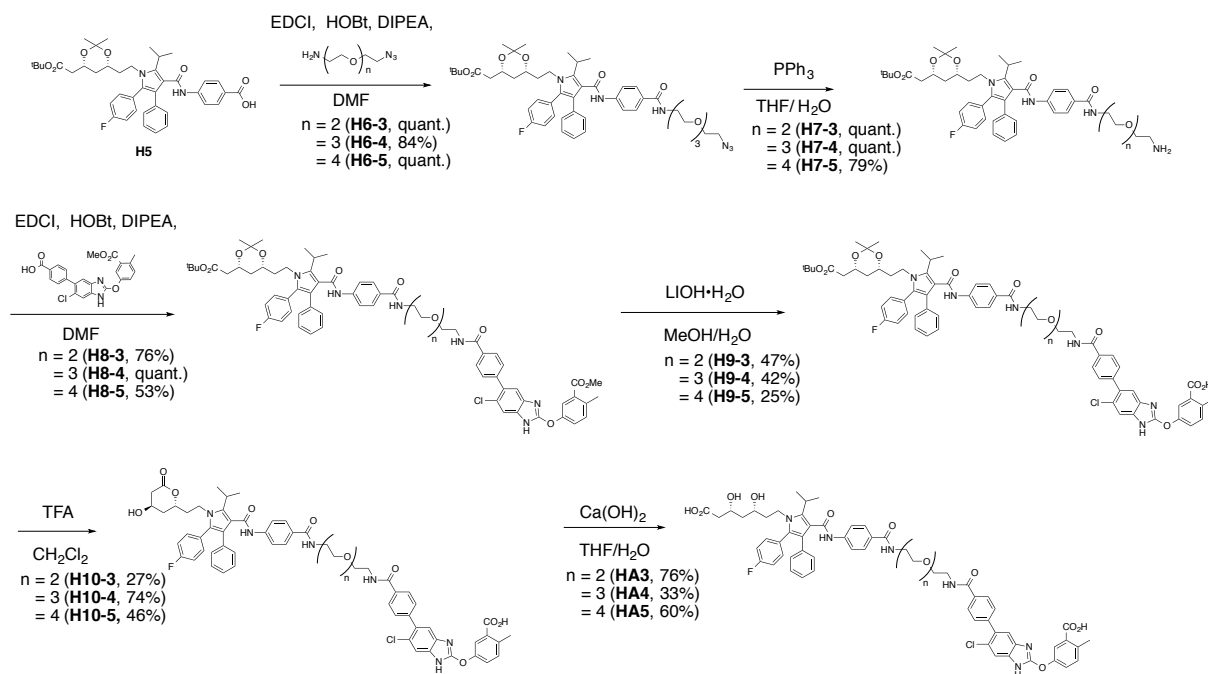
各ユニット合成が完了した為、次にユニット同士の連結反応を行い、目的のリン酸化誘導分子を得る計画を立てた。AMPK リガンド **A8** に対して、合成したモノアミンリンカーを EDC を用いて縮合させ、縮合体 **A14-x** を得た。続いて、アジド部位をアミンへと還元した後に合成した ACC リガンド **AC8** と縮合させることで、リガンド連結化合物 **A16-x** を得た。最後に AMPK リガンド上メチルエステルを水酸化リチウム条件にて加水分解することで、目的の ACC リン酸化誘導分子 **AA3**、**AA5** を得ることに成功した。

### ■ ACC リン酸化誘導分子の合成



続いて、HMGR リン酸化誘導分子の合成に着手した。合成したアトルバスタチン誘導体<sub>1</sub>
 に対して、モノアミンリンカーを EDC の条件にて縮合させ、縮合体 **H6-x** を得た。その後、
 Staudinger 反応にてアジド基を還元した後、AMPK リガンド誘導体と縮合させることで、リガ
 ンド連結構造を持つ中間体 **H8-x** を得た。さらに、AMPK リガンド上メチルエステル部位の加水
 分解を行った後、TFA 条件に付すことで、アセトニドの除去、ラクトン環を形成し、HMGR リ
 ン酸化誘導分子前駆体 **H10-x** を得た。最後に水酸化カルシウムを用いてラクトン環を加水分解
 することで、目的の HMGR リン酸化誘導分子 **HA3**、**HA4**、**HA5** を得る事に成功した。

### ■ HMGR リン酸化誘導分子の合成





### ● 3.3 対象タンパク質に対する活性評価

設計したリン酸化誘導分子の合成が完了したので、次に AMPK、ACC、HMGR に対する活性評価を行った。AMPK については、その AMPK 活性化能を、HMGR、ACC についてはその阻害能をそれぞれ評価した。このキナーゼに対する活性、標的タンパク質に対する活性は、対象タンパク質に対する結合能の指標にもなると考えられる。

AMPK 活性化能は、FRET を応用した系を用いて評価した。原理の概念図を図 32 に示す。

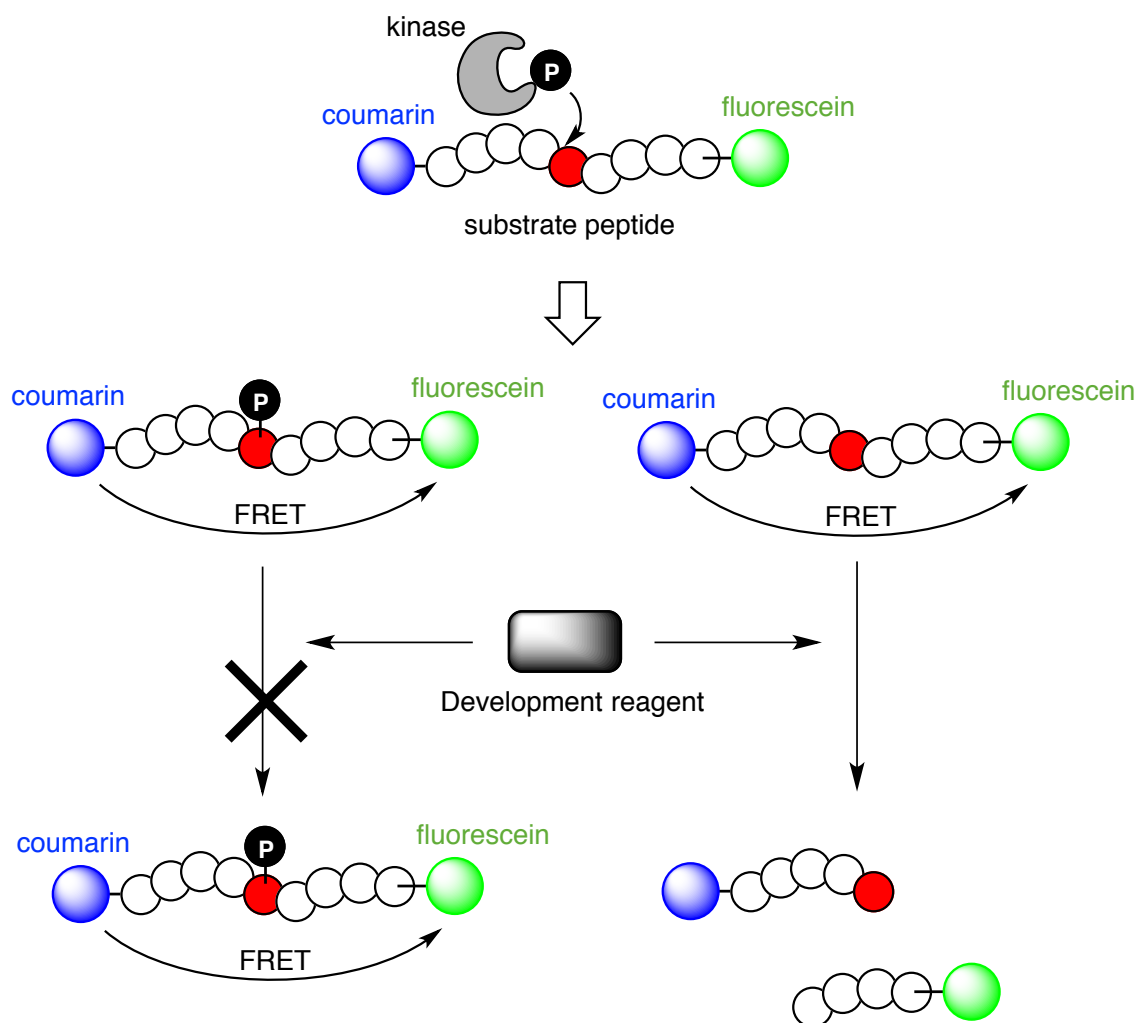


図 32. FRET-based AMPK activation assay

AMPK、ATP、FRET ペプチドを混合させ、25°C にてキナーゼ反応を進行させる。その後、FRET ペプチドを切断させる機能をもつ development 試薬を処理する。リン酸化ペプチドは development 試薬に対して反応性が低く、開裂しにくい。開裂していないペプチドは二つの蛍光団 (fluorescein、methylcoumarin) 間での FRET が起こるが、開裂したペプチドではそれが起こらない。この FRET 由来の蛍光強度はペプチドのリン酸化度合いと比例関係にあるため、各条件における蛍光強度を測定することで、キナーゼ活性を測定可能である。

ベンズイミダゾール型の AMPK 活性化剤は AMPK の  $\alpha$  サブユニットへと結合することが報告

されているため、それぞれ異なる $\alpha$ サブユニットを含む二種の AMPK 複合体 ( $\alpha 1/\beta 1/\gamma 1$  or  $\alpha 2/\beta 1/\gamma 1$ ) に対する活性を測定した。実際にこの系を用いて各化合物の AMPK 活性化能を評価した。

まず、ACC リン酸化誘導分子二種 (**AA3**, **AA5**)、HMGR リン酸化誘導分子三種 (**HA3**, **HA4**, **HA5**)、リガンド連結構造を持たない AMPK リガンド **1**、**2**、HMGR リガンド **TS659**、ポジティブコントロールとして既知 AMPK 活性化剤 A769662 の AMPK ( $\alpha 1/\beta 1/\gamma 1$ ) に対する活性化能を評価した (図 33-36)。

■ AMPK 活性化能評価 ( $\alpha 1/\beta 1/\gamma 1$ )

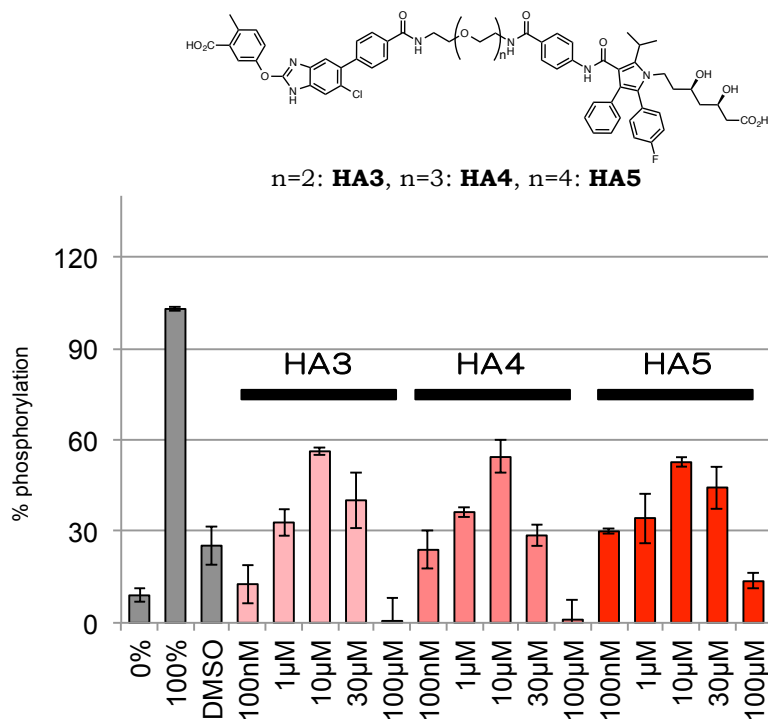


図 33. HMGR リン酸化誘導分子の AMPK ( $\alpha 1/\beta 1/\gamma 1$ ) 活性化能評価

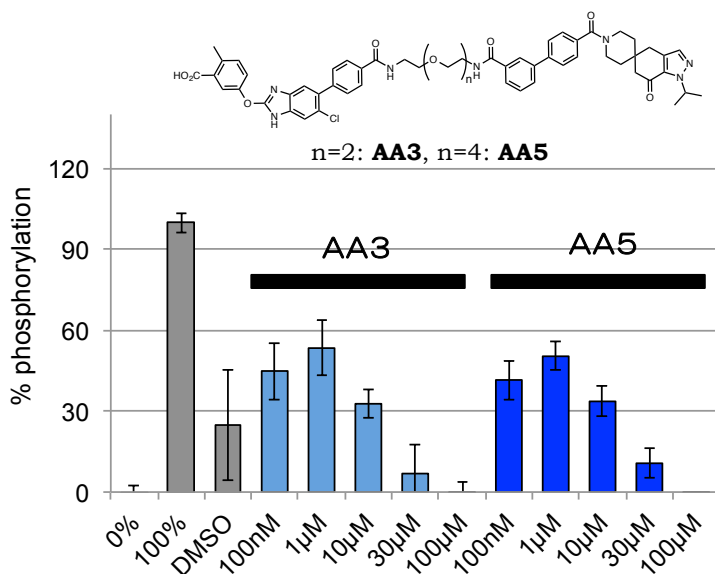


図 34. ACC リン酸化誘導分子の AMPK ( $\alpha 1/\beta 1/\gamma 1$ ) 活性化能評価

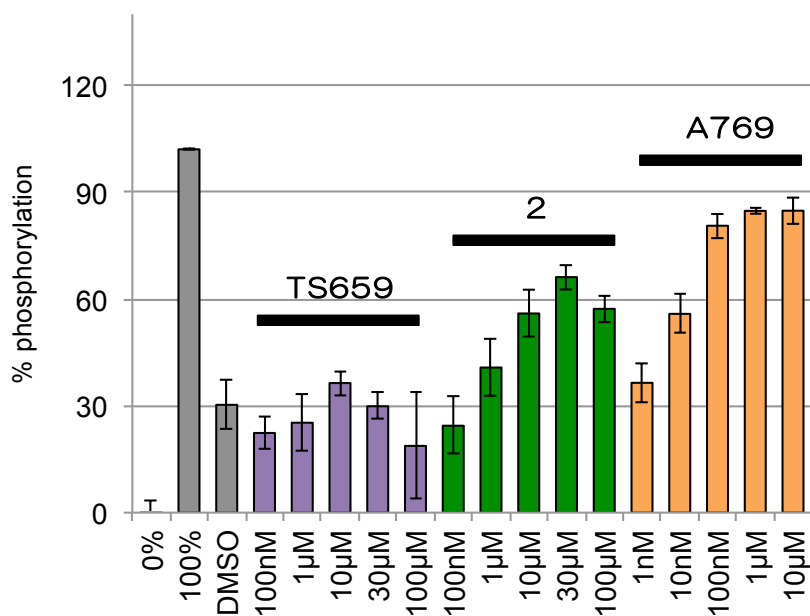
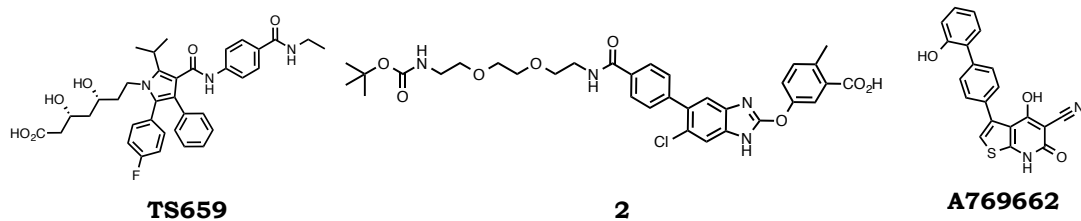


図 35. TS659, 2, A769662 の AMPK ( $\alpha 1/\beta 1/\gamma 1$ ) 活性化能評価

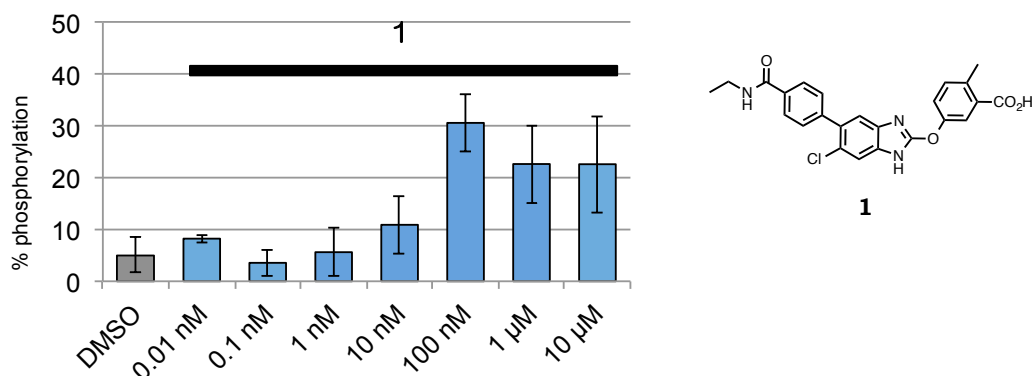


図 36. 化合物 1 の AMPK ( $\alpha 1/\beta 1/\gamma 1$ ) 活性化能評価

AMPK ( $\alpha 1/\beta 1/\gamma 1$ ) に対して、HMGR リン酸化誘導分子 (**HA3**, **HA4**, **HA5**)、ACC リン酸化誘導分子 (**AA3**, **AA5**) はそれぞれキナーゼ活性化能を示すことが明らかとなった。しかしながら、高濃度域 (>30 $\mu$ M) では、むしろ活性化能が減弱していることが示唆されるデータを得た。この理由については、① 化合物の溶解度の問題で、高濃度域では化合物が結晶化しており、その結晶が FRET に干渉している ② 化合物が development 試薬による開裂反応に影響を与えている の二つの要因が考えられるが、現段階ではそれを証明するまでには至っていない。また、 $A_{max}$  (最大キナーゼ活性 (%)) はリガンド連結構造を持たない化合物 (**1**, **2**, A769662) が 300-400%の値を示すのに対して、リン酸化誘導分子 (**HA3-5**, **AA3**, **AA5**) では 200%程度にとどまる結果であった。これについては、化合物の溶解度の問題か化合物が結合した際の AMPK 側のコンホメーション変化がリガンド連結構造によって多少制限されている可能性が考えられる。また、HMGR リガンドである **TS659** には AMPK ( $\alpha 1/\beta 1/\gamma 1$ ) 活性化能は認められなかった。

つづいて、これらの化合物の AMPK ( $\alpha 2/\beta 1/\gamma 1$ ) に対する活性化能を評価した (図 37, 38)。

■ AMPK 活性化能評価 ( $\alpha 2/\beta 1/\gamma 1$ )

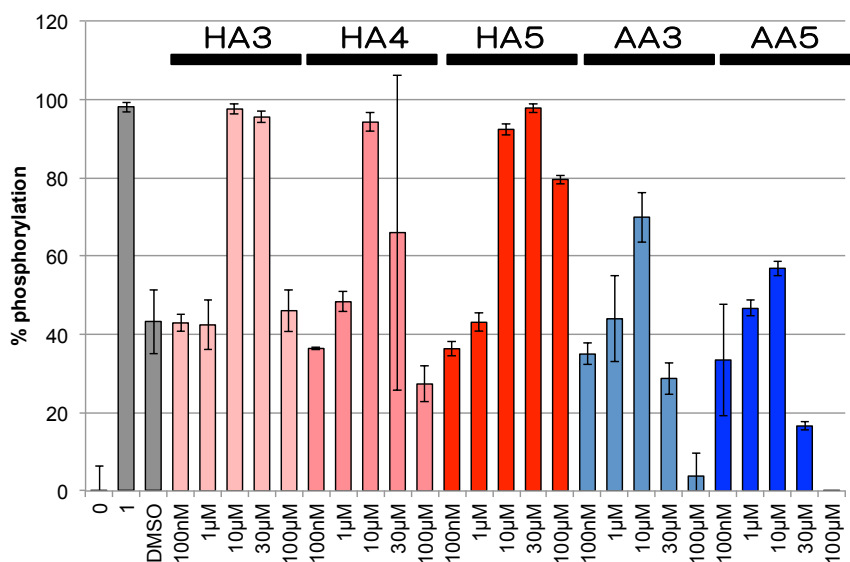
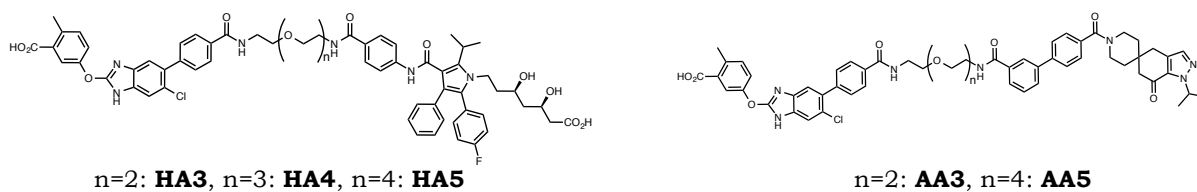


図 37. HMGR リン酸化誘導分子、ACC リン酸化誘導分子の AMPK ( $\alpha 2/\beta 1/\gamma 1$ ) 活性化能評価

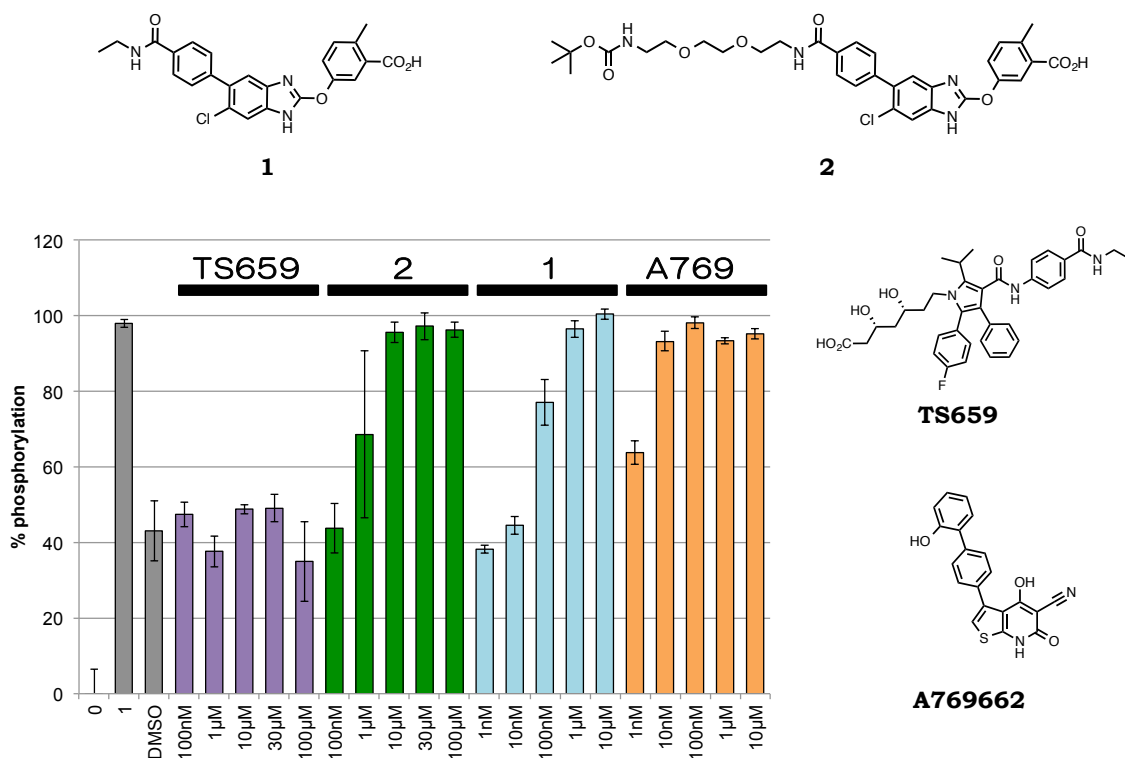
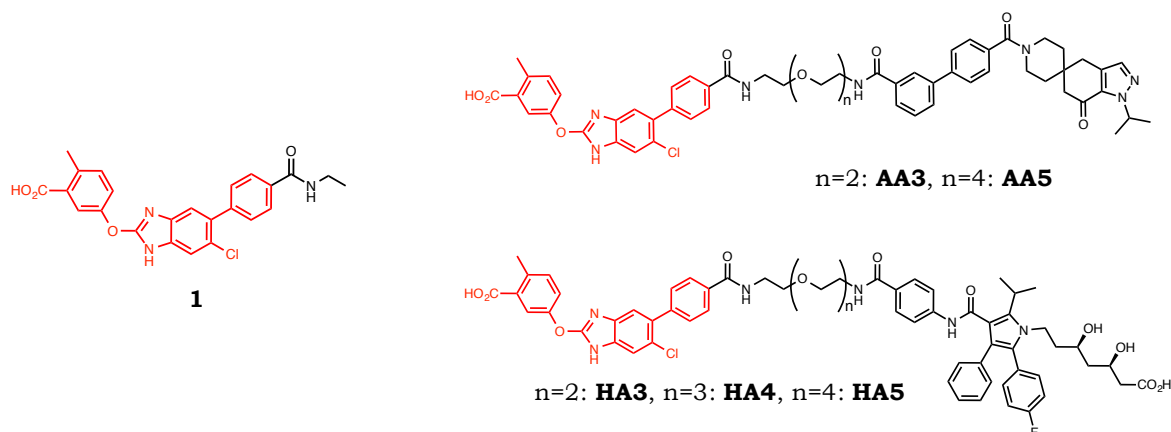


図 38. TS659, 1, 2, A769662 の AMPK ( $\alpha 2/\beta 1/\gamma 1$ ) 活性化能評価

$\alpha 1$  複合体の際と同様に、ACC リン酸化誘導分子、HMGR リン酸化誘導分子はともに、 $\mu\text{M}$  付近の濃度より AMPK 活性化能を示すことが明らかとなった。こちらについても、高濃度域 ( $>30\mu\text{M}$ ) では、活性が減弱する傾向がみられることが明らかとなった。AMPK リガンドと PEG リンカーのみを縮合させた誘導体 **2** はリン酸化誘導分子と比較して、同程度かいくぶん高い AMPK 活性化能を示した。さらに、エチルアミド体 **1** はそれと比較して 20-600 倍高い AMPK 活性化能を示した。この結果は、PEG リンカーの導入により活性化能が減弱したことを示している。すなわち、リン酸化誘導分子の PEG リンカー導入位置の検討、構造展開により、さらなるキナーゼ活性化能向上が見込めるものと考えられる。



| compound   | n | AMPK( $\alpha1/\beta1/\gamma1$ )<br>EC <sub>200</sub> ( $\mu$ M) | AMPK( $\alpha2/\beta1/\gamma1$ )<br>EC <sub>200</sub> ( $\mu$ M) |
|------------|---|--|--|
| <b>1</b>   | - | 0.0085   | 0.074  |
| <b>AA3</b> | 2 | 0.21   | 11   |
| <b>AA5</b> | 4 | 0.55   | 48   |
| <b>HA3</b> | 2 | 5.4  | 8.9  |
| <b>HA4</b> | 3 | 6.6  | 1.3  |
| <b>HA5</b> | 4 | 8.9  | 4.1  |

図 39. エチルアミド体 1 とリン酸化誘導分子の AMPK 活性化能の比較

AMPK に対する活性評価の結果、合成したリン酸化誘導分子 (**HA3-5**, **AA3**, **AA5**) は AMPK に対する活性化能を示す事が明らかとなった。また、リガンド連結構造を持たないエチルアミド体 **1** はそれと比較して 20-600 倍高い AMPK 活性化能を示した。この結果は、PEG リンカーの導入により活性化能が減弱したことを示している。リンカーの導入により化合物結合ポケットへ接近しづらくなった可能性、または AMPK 側のアロステリックな構造変化がこれらの化合物間で異なる為に活性差が現れた可能性などが考えられる。すなわち、リン酸化誘導分子の PEG リンカー導入位置の検討、構造展開により、さらなるキナーゼ活性能向上が見込めるものと考えられるが、現時点では構造展開は行わず、次の実験に着手することにした。

続いて、ACC リン酸化誘導分子の ACC に対する阻害活性を評価した。ACC 阻害活性は、図 40 に示す方法にて評価した。ACC はその触媒過程において、1 分子の反応生成物に対し、1 分子の ATP を消費する。すなわち、ある一定反応時間の間に消費された ATP の量を定量することで、間接的に ACC の酵素活性を評価することができる。反応後残存した ATP は、ルシフェリン/ルシフェラーゼの系を応用し、定量した。

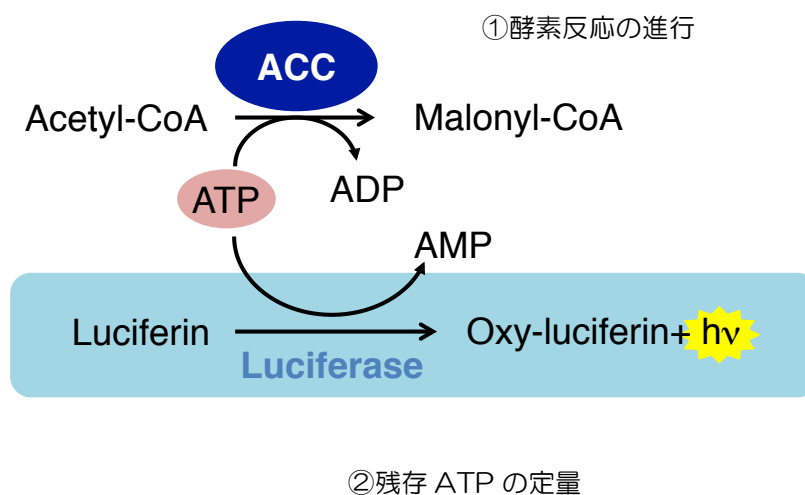


図 40. ACC 阻害活性評価系

このアッセイ系においてはまず、基質である acetyl-CoA、炭酸イオン ( $\text{CO}_3^{2-}$ )、ATP、化合物をインキュベートし、ACC による酵素反応を進行させる。その後、残存した ATP をルシフェリン/ルシフェラーゼの原理を用いて定量することで、ACC の活性を間接的に測定することができる。



この評価系を用い、合成した ACC リン酸化誘導分子 2 種 (AA3、AA5)、さらに、導入した ACC リガンドである PF051 の ACC 阻害活性を測定した (図 41)。その結果、PF051 はサブμM の濃度域より阻害活性を示したのに対し、合成したリン酸化誘導分子はμM の濃度域より阻害活性を示した。その 50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出したところ、PF051: IC<sub>50</sub>= 0.32 μM、AA3: IC<sub>50</sub>= 6.5 μM、AA5: IC<sub>50</sub>= 3.0 μM とそれぞれ算出された。この結果より、リンカーの導入により阻害活性が 10-20 倍減弱するものの、ACC リン酸化誘導分子は ACC に対する活性を維持することが示された。

■ ACC2 阻害活性評価

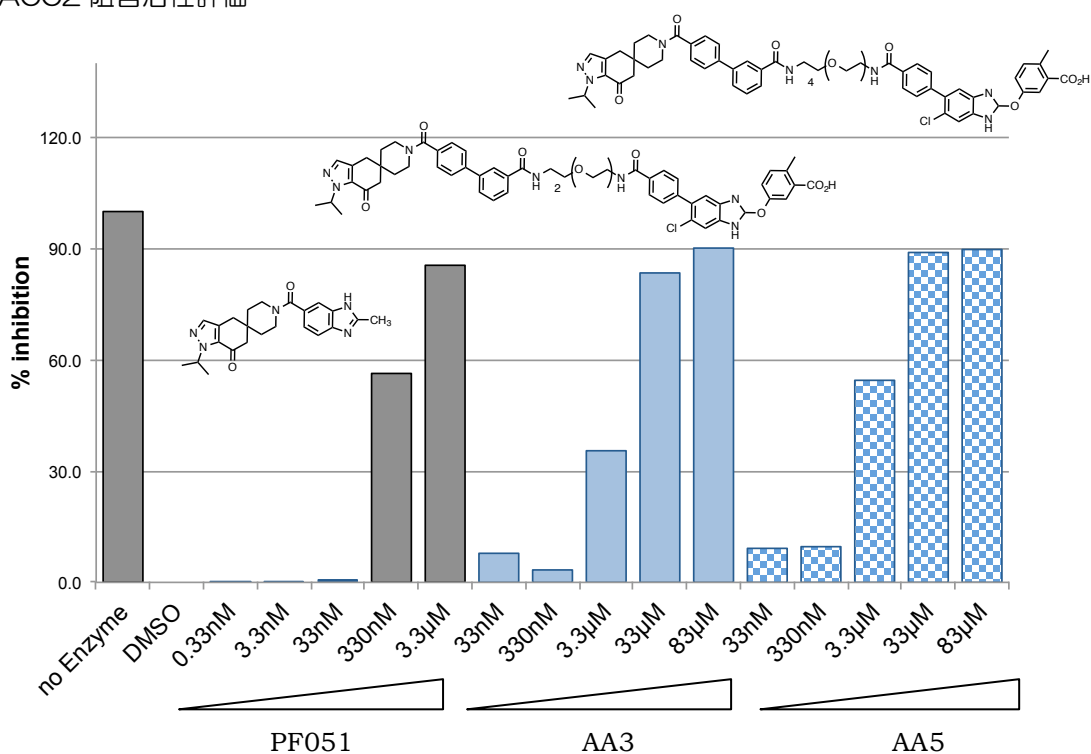


図 41. ACC リン酸化誘導分子と PF051 の ACC2 に対する阻害活性評価

| compound | n | ACC2 IC <sub>50</sub> (μM) |
|----------|---|----------------------------|
| PF051    | - | 0.32                       |
| AA3      | 2 | 6.5                        |
| AA5      | 4 | 3.0                        |

図 42. ACC2 阻害活性比較

続いて、HMGR リン酸化誘導分子の HMGR に対する阻害活性を評価した。HMGR 阻害活性は、酵素反応にて消費される NADPH 量を定量することで測定した(下図 43)。すなわち、HMGR の還元反応においては、2 分子の NADPH が消費され、2 分子の NADP<sup>+</sup>が生成する。その為、残存 NADPH 由来の吸光度 (340 nm) を測定することで、酵素活性を評価することが可能である。

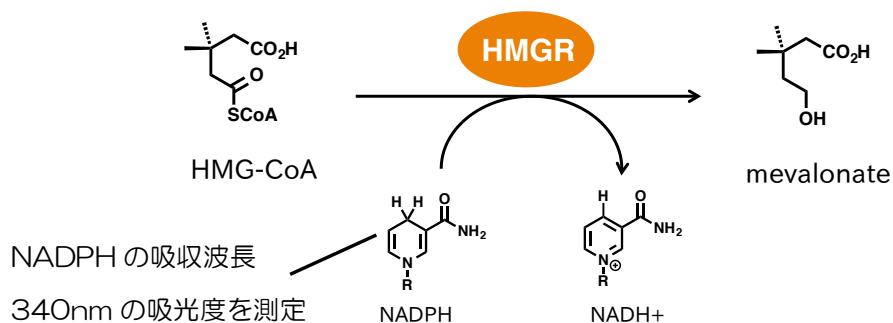


図 43. HMGR 阻害活性評価

HMG-CoA の還元反応において消費される NADPH の量を吸光度法を用いて定量することで、HMGR の酵素活性を計ることが可能である。

この評価系を用いて、合成した HMGR リン酸化誘導分子 3 種 (**HA3**、**HA4**、**HA5**) と導入したリガンドであるアトルバスタチンの HMGR 阻害活性を評価した (図 44)。その結果、**HA3**、**HA4**、**HA5**、アトルバスタチンはどれも HMGR に対し、nM レベルの高い阻害能を示した。アトルバスタチンとリン酸化誘導分子間で阻害能に差はほとんど観察されないことより、HMGR に関しては PEG リンカーの導入による活性減弱は起こっていないことが示唆された。

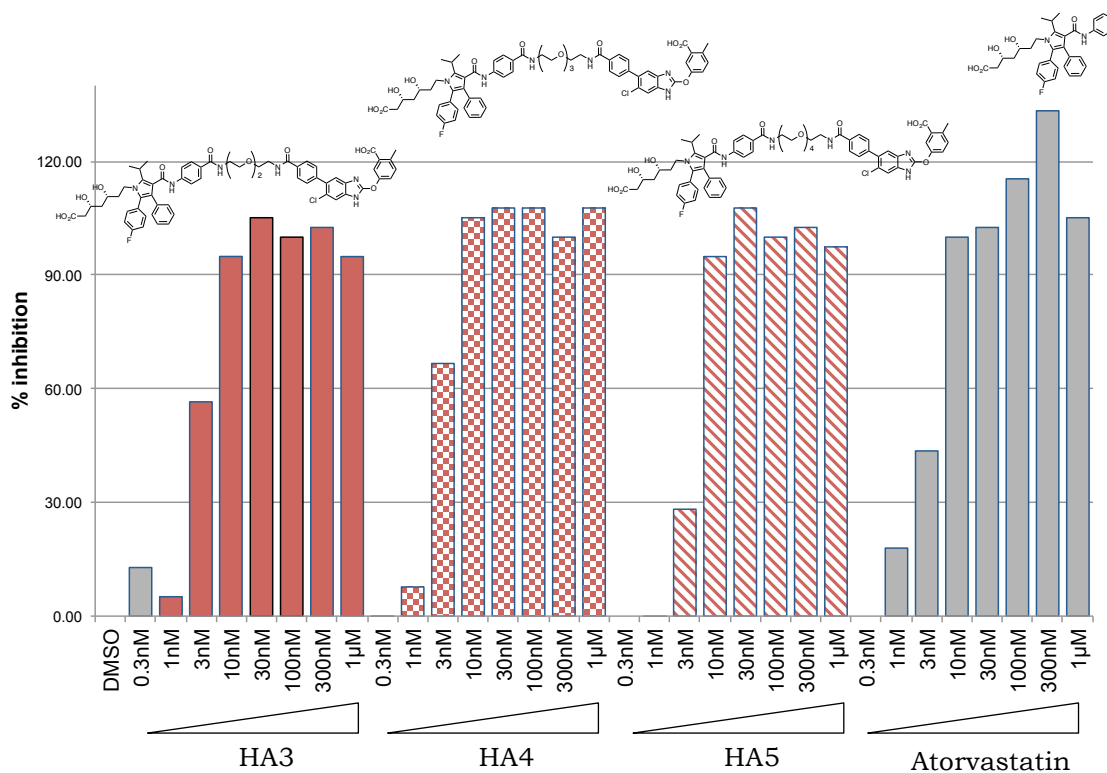
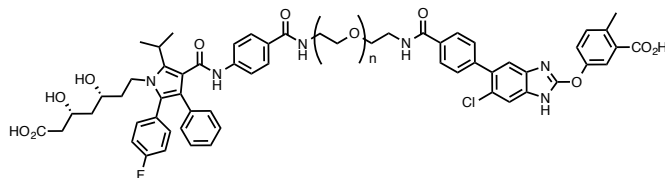


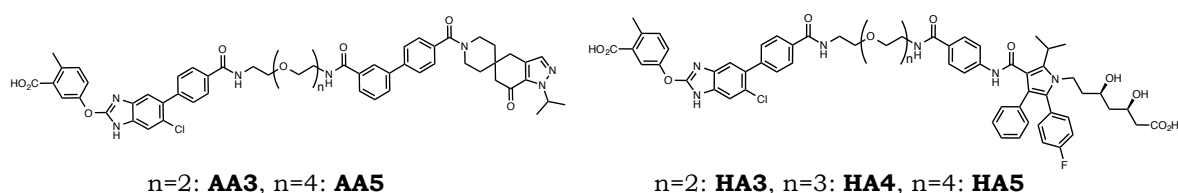
図 44. HMGR リン酸化誘導分子、atorvastatin の HMGR 阻害活性評価



| compound     | n        | HMGR IC <sub>50</sub> (nM) |
|--------------|----------|----------------------------|
| atorvastatin | -        | 2.8                        |
| <b>HA3</b>   | <b>2</b> | <b>2.5</b>                 |
| <b>HA4</b>   | <b>3</b> | <b>2.3</b>                 |
| <b>HA5</b>   | <b>4</b> | <b>2.8</b>                 |

図 45. HMGR リン酸化誘導分子、atorvastatin の HMGR 阻害活性

以上の活性評価により、合成したリン酸化誘導分子は、AMPK に結合し、さらにそのキナーゼ活性を向上させること、また、標的とするタンパク質 (ACC、HMGR) に結合する性質を有することが示唆された (図 46)。この結果より、合成したリン酸化誘導分子は本リン酸化誘導のコンセプトであるキナーゼ、リン酸化誘導分子、標的基質の三者複合体を形成しうるものと考えられる。AMPK、ACC に対する活性については、リンカーの導入により減弱することが示唆されるデータが得られた。これに関しては、リンカー導入位置の変更により改善が見込めるものと考えられるが、先にリン酸化誘導分子の標的タンパク質のリン酸化誘導活性評価に着手することにした。



| compound   | n | AMPK( $\alpha 1/\beta 1/\gamma 1$ )<br>EC <sub>200</sub> ( $\mu\text{M}$ ) | AMPK( $\alpha 2/\beta 1/\gamma 1$ )<br>EC <sub>200</sub> ( $\mu\text{M}$ ) | ACC<br>IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) | HMGR<br>IC <sub>50</sub> (nM) |
|------------|---|--|--|---|-------------------------------|
| <b>AA3</b> | 2 | 0.21   | 11   | 6.5                                       | -                             |
| <b>AA5</b> | 4 | 0.55   | 48   | 3.0                                       | -                             |
| <b>HA3</b> | 2 | 5.4  | 8.9  | -   | 2.5                           |
| <b>HA4</b> | 3 | 6.6  | 1.3  | -   | 2.3                           |
| <b>HA5</b> | 4 | 8.9  | 4.1  | -   | 2.8                           |

図 46. リン酸化誘導分子の対象タンパク質に対する活性

● 3.4 標的タンパク質に対するリン酸化誘導活性評価

合成したリン酸化誘導分子の標的タンパク質に対するリン酸化誘導活性を評価するため、精製タンパク質系におけるリン酸化誘導活性評価系を構築した。その原理、手順を図 47 に示す。精製 AMPK、精製基質タンパク質 (ACC or HMGR)、ATP、化合物をキナーゼバッファー中に混合させた後、37°Cにてキナーゼ反応を進行させる。その後、タンパク質を SDS にて変性させることで反応を停止させる。続いて、SDS-PAGE にてタンパク質を分離、PVDF 膜へのタンパク質転写を行う。膜上のリン酸化タンパク質に対して、「Phostag<sup>®</sup>」と呼ばれる、タンパク質上のリン酸基を検出可能な試薬<sup>100</sup>を処理することで、各タンパク質のリン酸化度合いを定量した。

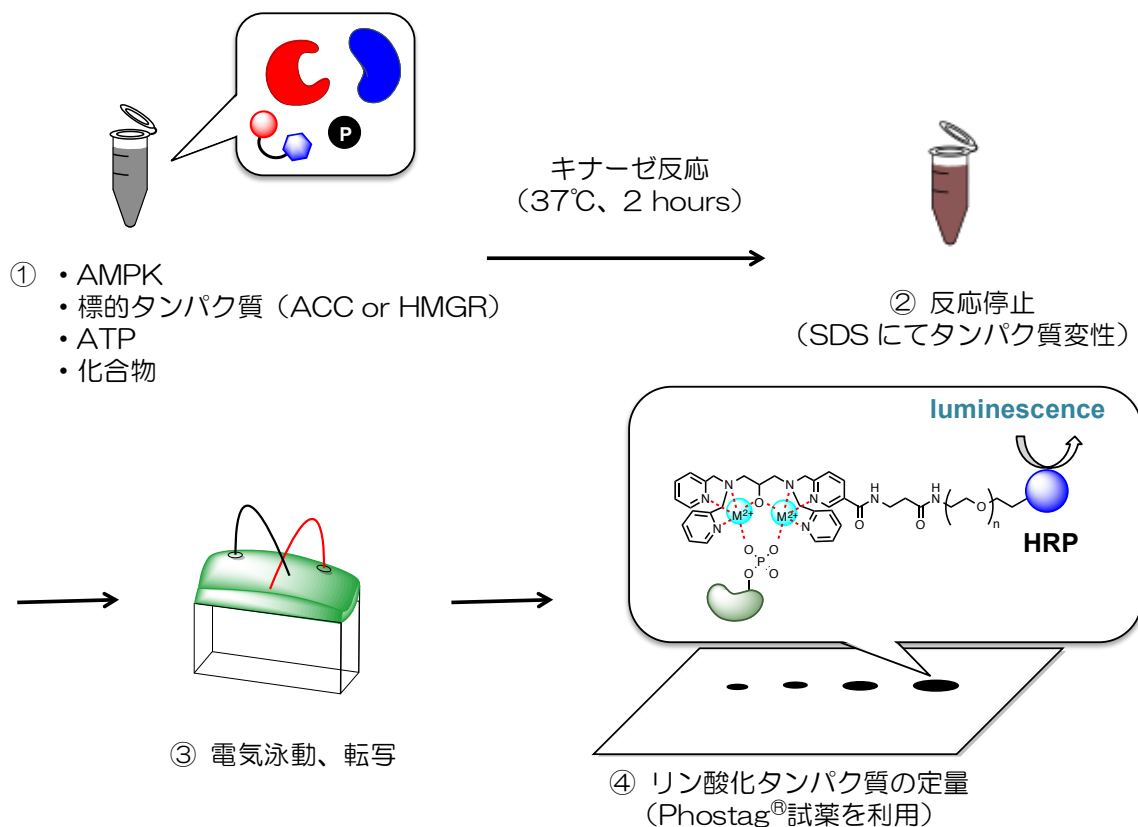
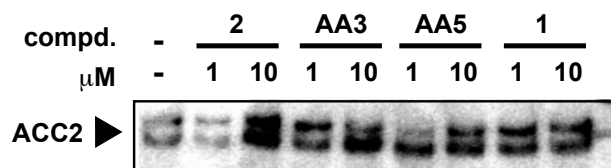
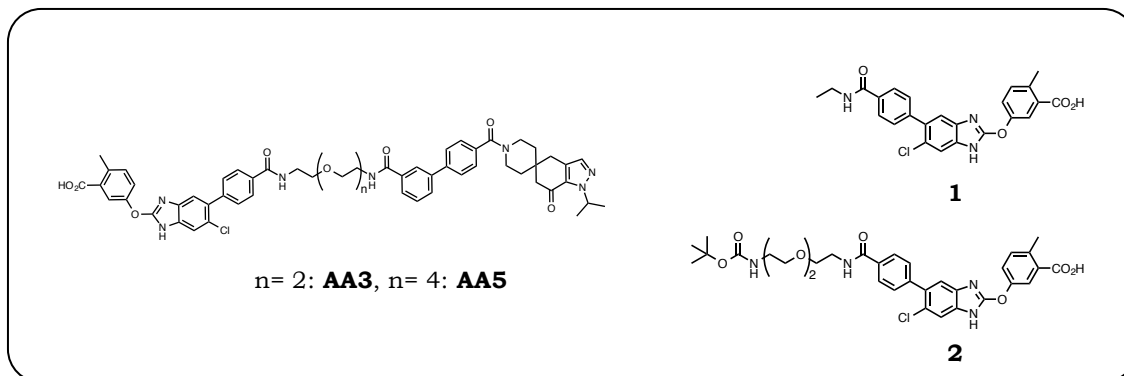


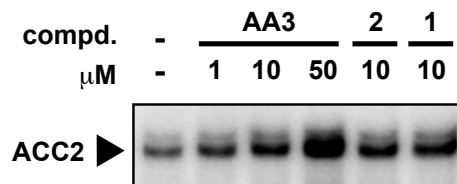
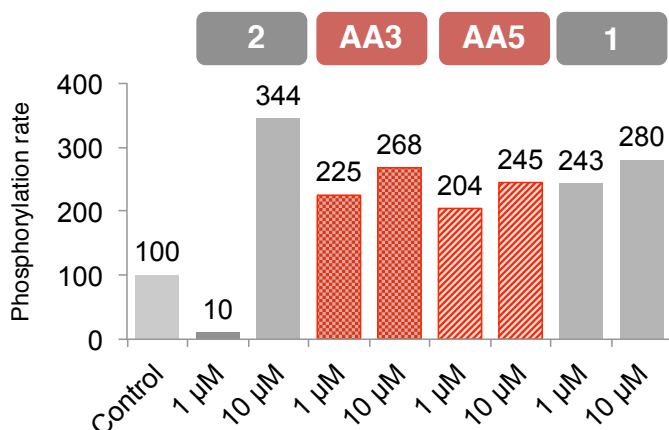
図 47. 精製タンパク質を利用したリン酸化誘導活性評価系

実際にこの系を用いて、リン酸化誘導分子の標的タンパク質に対するリン酸化誘導活性を評価した。まず、ACC リン酸化誘導分子の ACC に対するリン酸化誘導活性を評価した。hACC2 に対して、AMPK ( $\alpha 1/\beta 1/\gamma 1$ )、ATP、ACC リン酸化誘導分子 (AA3、AA5) を処理し、ACC のリン酸化を Phostag<sup>®</sup>を用いて定量した。

■ ACC リン酸化誘導活性評価



conditions: 8 ng/ $\mu\text{L}$  AMPK  $\alpha 1/\beta 1/\gamma 1$ , 18 ng/ $\mu\text{L}$  ACC2, 800  $\mu\text{M}$  ATP, 37 °C, 2 h reaction



conditions: 8 ng/ $\mu\text{L}$  AMPK  $\alpha 1/\beta 1/\gamma 1$ , 18 ng/ $\mu\text{L}$  ACC2, 800  $\mu\text{M}$  ATP, 37 °C, 2 h reaction

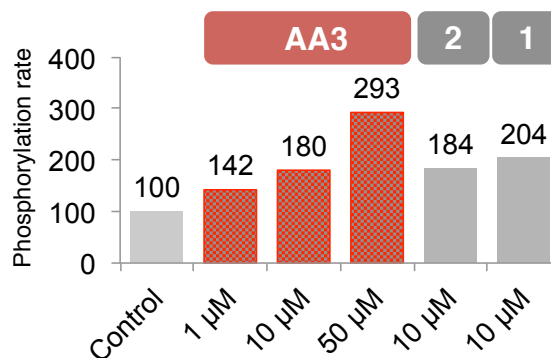


図 48. 精製タンパク質系 ACC リン酸化誘導活性評価

その結果、**AA3**、**AA5** は共に ACC のリン酸化を顕著に亢進させた (**AA3**: 268%、**AA5**: 245%)。さらに、このリン酸化亢進活性は、control として同じく評価した AMPK 活性化剤 **1**、**2** と同程度のものであった。ACC リン酸化誘導分子の AMPK 活性化能と活性化剤の AMPK 活性化能は約 40 倍程度異なる (**1**:  $EC_{200} = 0.0085 \mu\text{M}$ 、**AA3**:  $EC_{200} = 0.21 \mu\text{M}$ 、**AA5**:  $EC_{200} = 0.55 \mu\text{M}$ ) ことを前節による実験において明らかとしている。AMPK 活性化能に差があるにも関わらず、標的タンパク質のリン酸化が同程度まで亢進したという事実は、リガンドを連結構造に基づき AMPK と標的基質との接近を促したことにより、標的に対するリン酸化が効率的に誘導されたことを示唆している。また、同様の実験条件にて **AA3** の濃度依存性についても検証したところ、**AA3** は濃度依存的に ACC のリン酸化を誘導することが明らかとなった (図 48、右)。

次に、HMGR リン酸化誘導分子の HMGR に対するリン酸化誘導活性を評価した。HMGR に対して、AMPK ( $\alpha 2/\beta 1/\gamma 1$ )、ATP、HMGR リン酸化誘導分子(**HA3**、**HA4**、**HA5**)を処理し、HMGR のリン酸化度合いを定量した。

■ HMGR リン酸化誘導活性評価

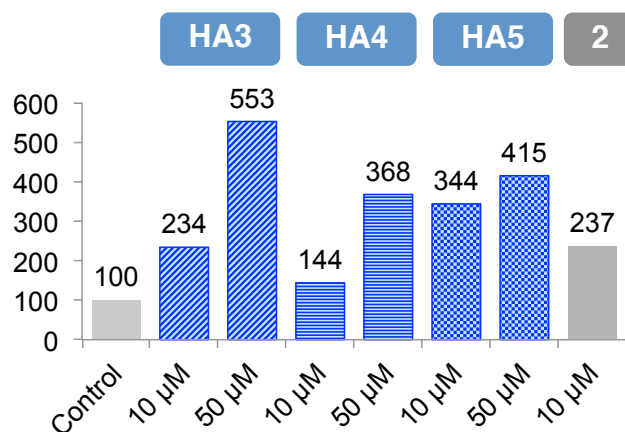
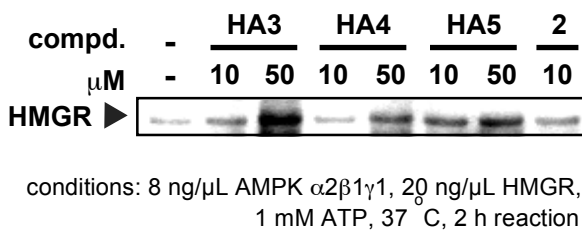
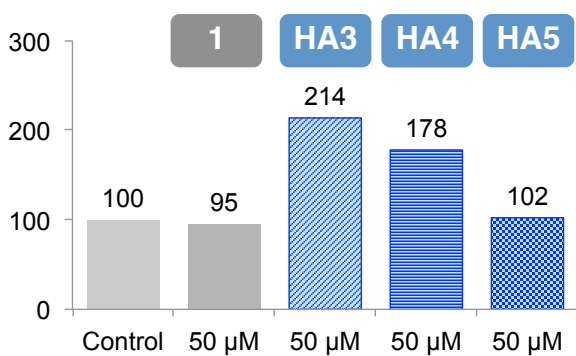
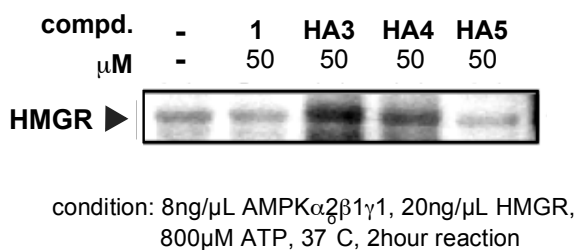
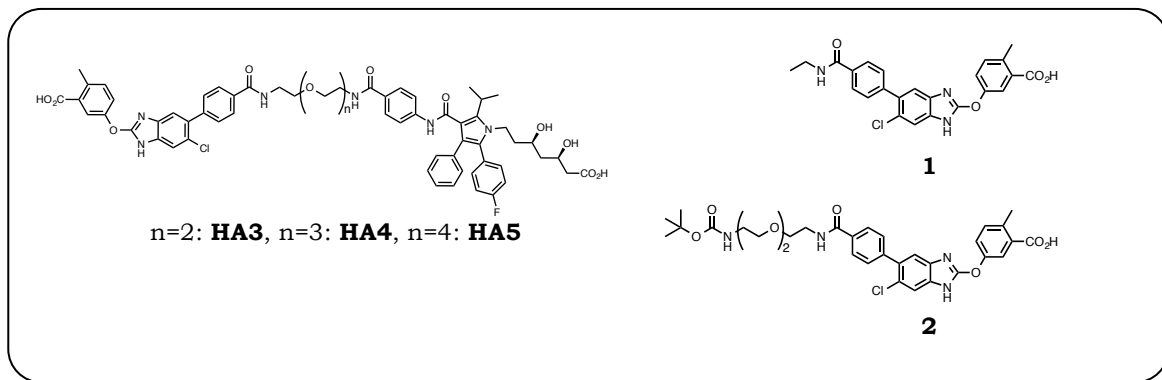


図 49. 精製タンパク質系 HMGR リン酸化誘導活性評価



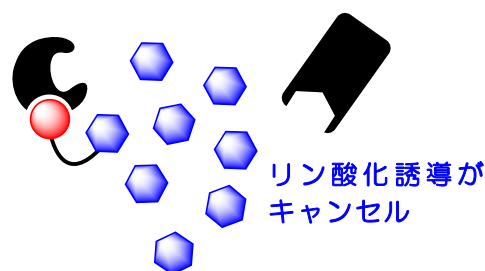
その結果、**HA3**、**HA4**、**HA5** は HMGR のリン酸化を亢進させ、濃度依存性も確認された。ACC の場合と同様に、そのリン酸化誘導活性は AMPK 活性化剤 **2** と同程度のもの（図 49 右、活性化剤 **2**: 237%、**HA3**: 234%）であった。さらに、その最大活性については、リンカー長の最も短い **HA3** が最大であることが明らかとなった。**HA3-HA5** 間の AMPK のキナーゼ活性化能で比較すると、**HA3** が最もキナーゼ活性化能が低いにも関わらず、HMGR のリン酸化誘導活性が最大であるこの実験結果は興味深い。おそらく、最も短い PEG リンカーを有する **HA3** が HMGR のリン酸化サイト（Ser872）に AMPK が効率よく近接させうということが予想される。このリンカー長による活性差は、リンカー長の最適化により、さらなるリン酸化誘導活性向上の余地があることを示唆している。

次に行ったのが、連結構造の必要性の検証実験である。本リン酸化誘導のコンセプトは、「キナーゼ-リン酸化誘導分子-標的タンパク質の三者複合体を形成した上でリン酸化が効率的に誘導される」というものである。この機構に基づくリン酸化誘導を証明すべく、標的タンパク質リガンドによる競合実験を計画した。もしも、コンセプト通りのリン酸化誘導であれば、標的タンパク質リガンドを高濃度共存させた条件においては、三者複合体形成が阻害され、標的タンパク質に対するリン酸化誘導が減弱するはずである。

■ 標的タンパク質リガンドなし

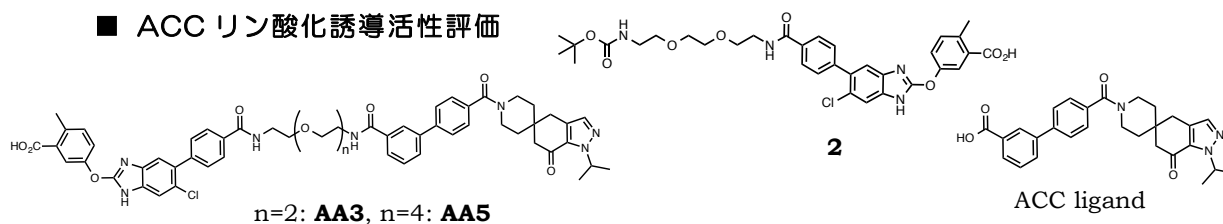


■ 標的タンパク質リガンド共存



まず、ACC リン酸化誘導分子 (**AA3**, **AA5**) の連結構造の必要性証明実験に着手した (図 50)。ACC、AMPK、ATP 存在下、**AA3**、**AA5** は ACC のリン酸化を亢進させたが、ACC リガンドを 10 倍量共存させた条件においては、そのリン酸化誘導が溶媒コントロールと同程度まで減弱する結果が得られた。この結果より、ACC リン酸化誘導分子はコンセプト通りの三者複合体形成に基づき、ACC のリン酸化を誘導していることが示唆された。

■ ACC リン酸化誘導活性評価



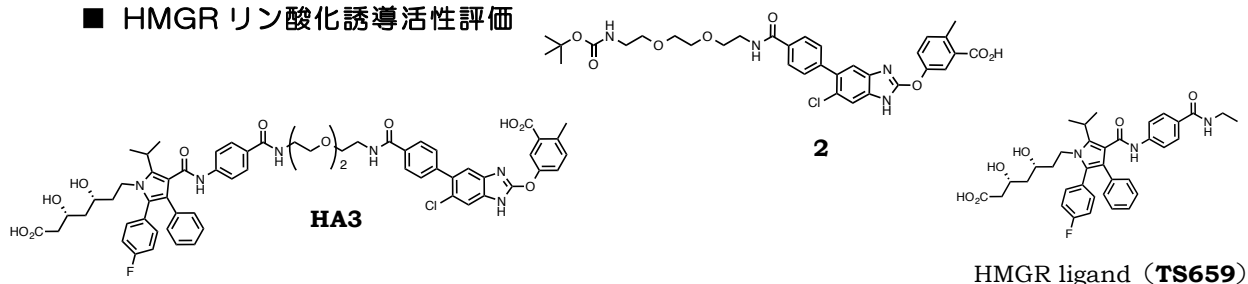
| compd. (10 $\mu$ M)      | - | - | <b>2</b> |   | <b>AA3</b> |   | <b>AA5</b> |   |
|--------------------------|---|---|----------|---|------------|---|------------|---|
| ACC ligand (100 $\mu$ M) | - | + | -        | + | -          | + | -          | + |
| ACC2                     |   |   |          |   |            |   |            |   |

conditions: 8 ng/ $\mu$ L AMPK  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 $\gamma$ 1, 26 ng/ $\mu$ L ACC2, 800  $\mu$ M ATP, 37  $^{\circ}$ C, 2 h reaction, 10  $\mu$ M test compounds, 100  $\mu$ M ACC ligand

図 50. ACC リン酸化誘導活性評価 (ACC リガンド競合条件)

同様に、HMGR リン酸化誘導分子についてもリガンド競合実験を実施した (図 51)。

■ HMGR リン酸化誘導活性評価



|             |   |   |            |   |          |   |
|-------------|---|---|------------|---|----------|---|
| compd.      | - | - | <b>HA3</b> |   | <b>2</b> |   |
| HMGR ligand | - | + | -          | + | -        | + |
| HMGR        | ▶ |   |            |   |          |   |

conditions: 8ng/μL AMPKα2β1γ1, 20ng/μL, HMGR  
1mM ATP, 60μM, TS659 (HMGR ligand)  
37 C, 2hour reaction

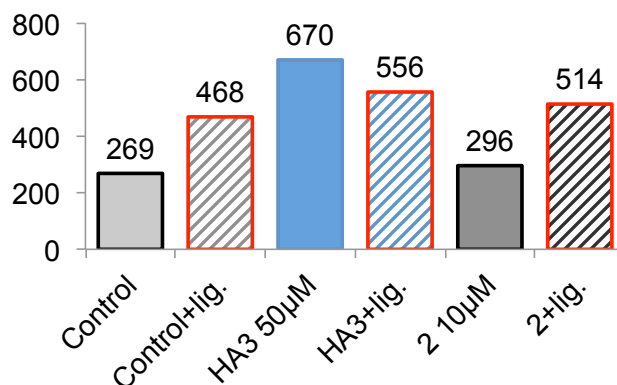


図 51. HMGR リン酸化誘導活性評価 (HMGR リガンド競合条件)

HA3 について検証した結果、リガンド非共存下では、HMGR のリン酸化を顕著に亢進させた。HMGR リガンド (TS659) を共存させた条件 (図 51. HA3+lig.) においては、HMGR のリン酸化が減弱することが明らかとなった。しかしながら、そのリン酸化誘導活性の減弱度合いは、ACC リン酸化誘導分子の場合と比較して小さいことが分かった。これは、HMGR リガンド TS659 自身による HMGR の被リン酸化能亢進活性の寄与が示唆される。溶媒コントロール (DMSO and DMSO+TS659) のバンドを観察すると、TS659 の処理により、HMGR のリン酸化が亢進することが分かる。前節で示した AMPK 活性化能評価では、TS659 は AMPK 活性化能を示さなかったことから、TS659 は HMGR に結合し、HMGR の AMPK による被リン酸化能を向上していることが示唆される。HMGR リガンドのこのような活性は報告例がなく、詳しい作用機序については明言できないが、今後、この機構解明に向けた実験を行い、精査していきたい。

● 3.5 標的タンパク質に対する選択的なリン酸化誘導活性の評価

続いて着手したのが、標的とするタンパク質に対する選択性の実証実験である。この証明の為に、まず精製タンパク質を利用した活性評価系を構築した(図 52)。具体的には、二種の AMPK 基質タンパク質 (HMGR or ACC) に対して、AMPK、ATP、化合物 (AA3 or HA3 or AMPK 活性化剤 2) を処理し、キナーゼ反応を進行させる。その後、基質のリン酸化度合いを Phostag<sup>®</sup> を用いて定量し、各化合物の標的基質に対するリン酸化誘導活性を比較することで基質選択性を評価した。

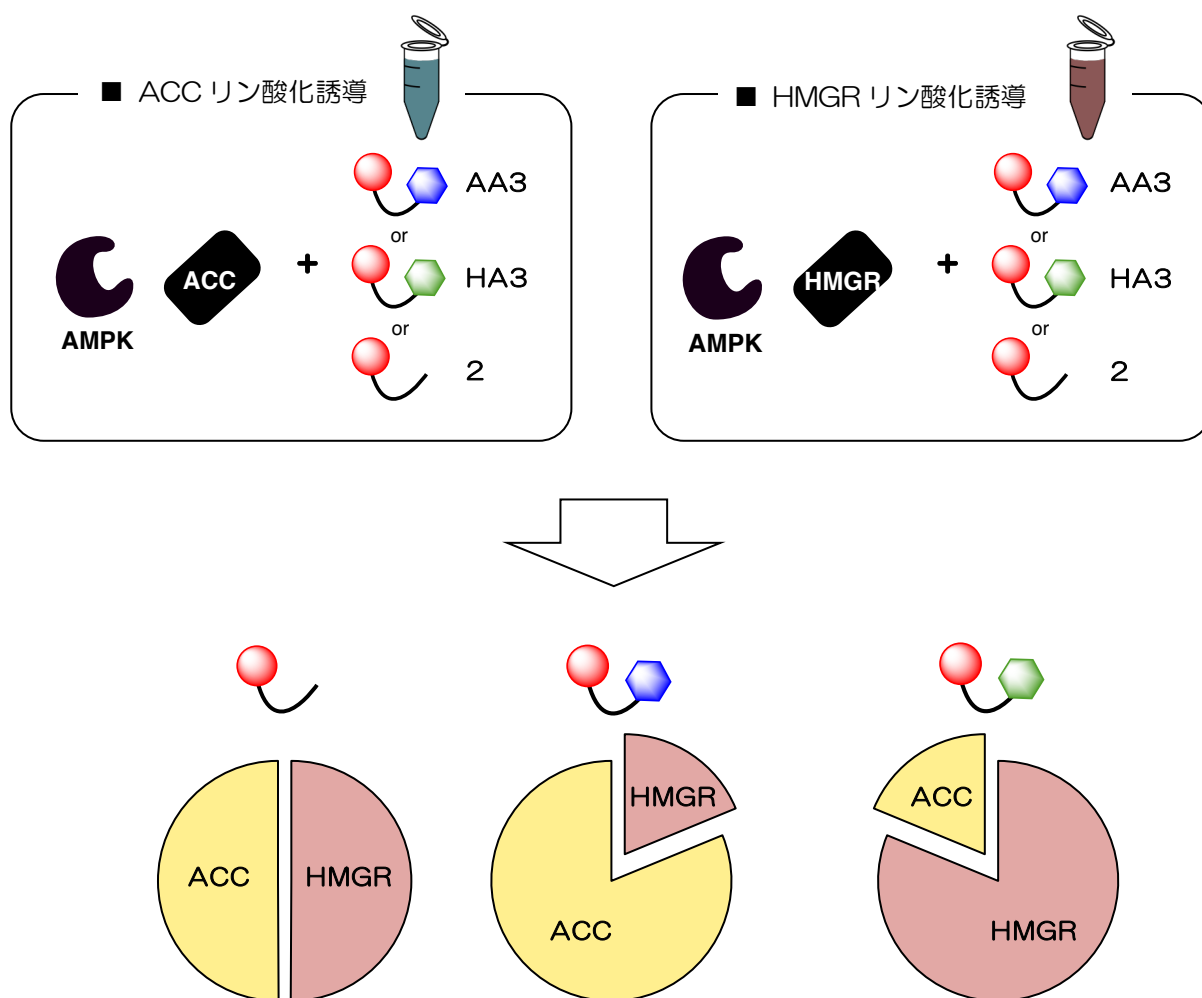


図 52. 精製タンパク質系における基質選択性評価

実際にこの実験系を用いて、リン酸化誘導分子の基質選択性を評価した (図 53)。単純な AMPK 活性化剤である **2** は AMPK 基質二種のリン酸化をどちらも亢進させた (ACC: 195%、HMGR: 130%)。対して、**AA3** は ACC のリン酸化を **2** と同程度まで亢進させたが、HMGR に対するリン酸化誘導活性は示さないという結果が得られた (ACC: 198%、HMGR: 111%)。さらに、**HA3** については、HMGR のリン酸化を **2** 以上に顕著に亢進させるのに対して、ACC のリン酸化は **2** と同程度にとどまるという結果が得られた (ACC: 191%、HMGR: 154%)。

■ 基質選択性評価

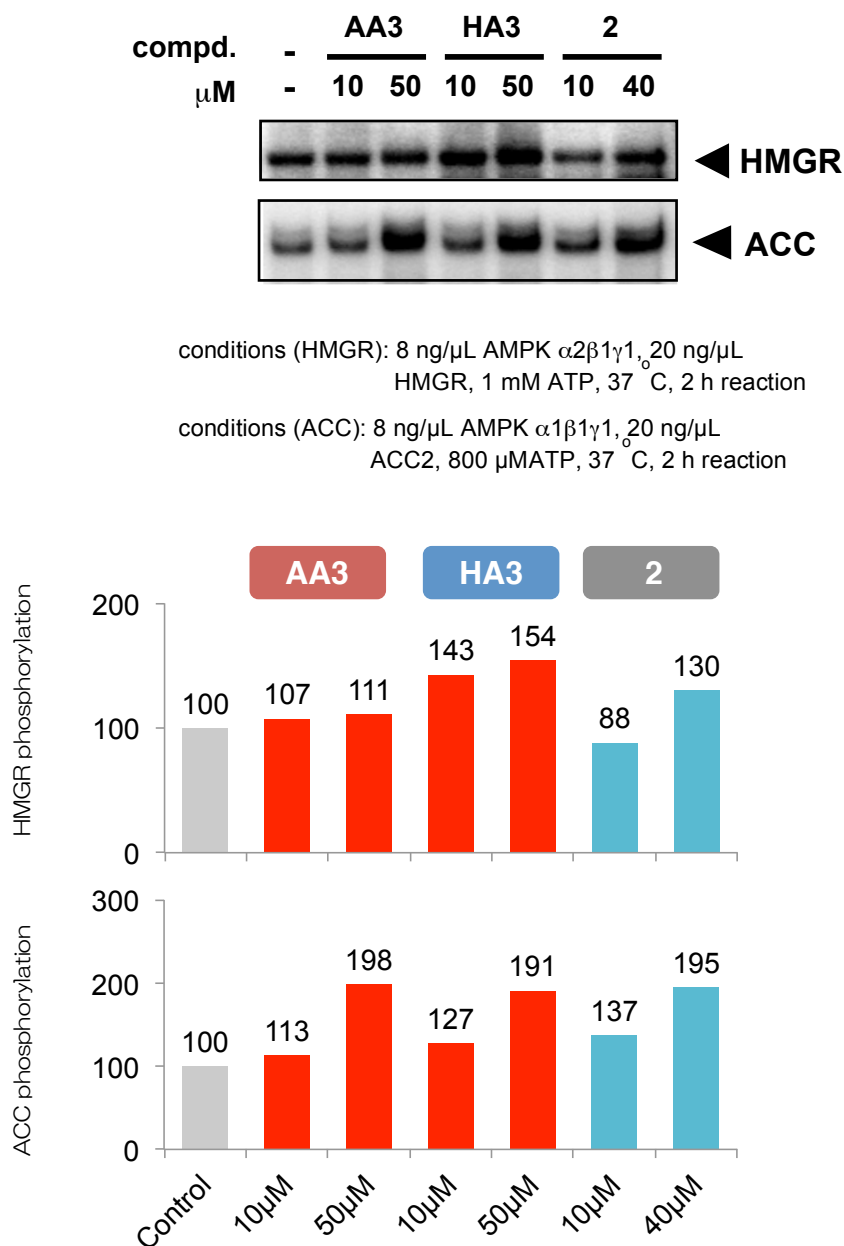


図 53. 精製タンパク質系における基質選択性評価結果

上の結果をもとに、リン酸化誘導分子の基質選択性を考察した。同濃度処理の **AA3**、**HA3** の HMGR に対するリン酸化誘導活性の比較 (**AA3** 50  $\mu$ M: 111%、**HA3** 50  $\mu$ M: 154%)、また、**AA3** の HMGR、ACC に対するリン酸化誘導活性 (to HMGR: 111%、to ACC: 198%) を考慮すると、各標的タンパク質に対する選択的なリン酸化誘導活性が示唆される。また、各基質タンパク質に対するリン酸化誘導の度合いを数値化し、リガンド連結構造を持たない AMPK 活性化剤 **2** と各リン酸化誘導分子とでそのリン酸化度合いを比較した (図 54)。その結果、AMPK 活性化剤 **2** と比較すると、**AA3** は約二倍、**HA3** では約三倍の値が得られた。この結果は、リン酸化誘導分子のリガンド連結構造、それに基づくキナーゼ、標的基質の複合体形成により、標的とするタンパク質に対して優先的なリン酸化誘導が引き起こされている可能性を示唆している。

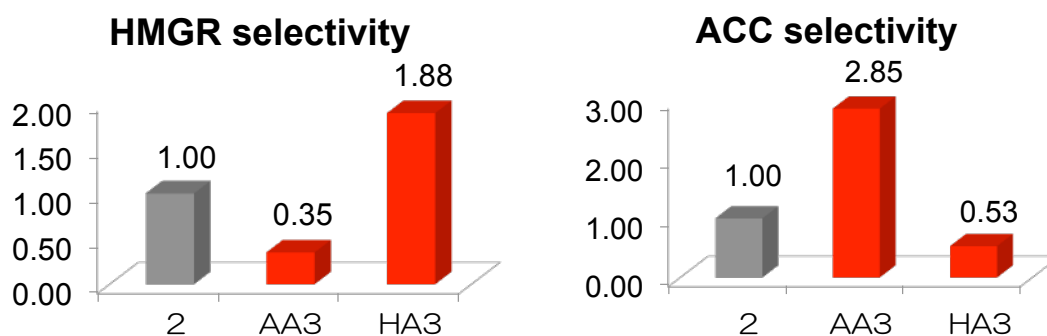


図 54. 各化合物の HMGR、ACC に対する選択性

続いて、さらなる高次評価系として細胞破碎液中における化合物のリン酸化誘導活性評価を行い、様々な夾雑物が混在する系におけるリン酸化誘導活性ならびに基質選択性を評価することとした (図 55)。細胞株としては、ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞を利用した。化合物としては ACC リン酸化誘導分子 **AA3**、AMPK 活性化剤 **1** の細胞破碎液へと処理し、内在性 ACC、または別の AMPK 基質である FOXO3a<sup>101</sup> と Raptor<sup>102</sup> のリン酸化度合いを定量した。

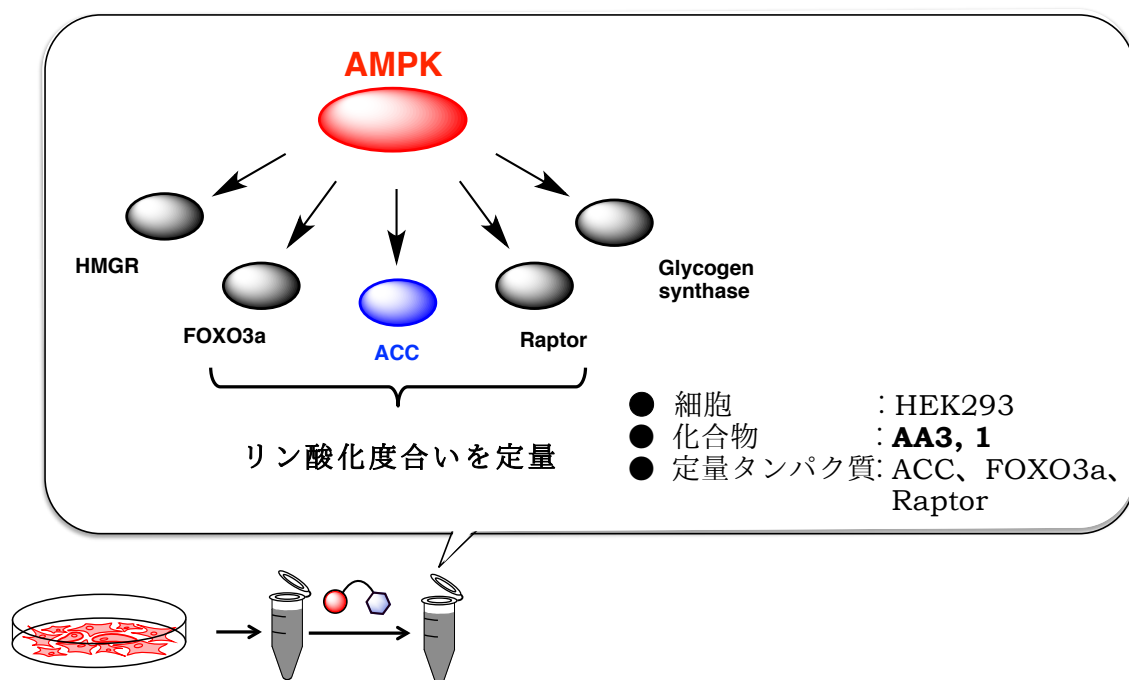


図 55. 細胞破碎液を用いたリン酸化誘導活性ならびに基質選択性評価

調整した細胞破碎液に対して、化合物 (100  $\mu\text{M}$ )、ATP を処理し、37°Cにて 2 時間キナーゼ反応を進行させた後に、ウエスタンブロット法を用いて各 AMPK 基質のリン酸化度合いを定量した。その結果、AMPK 活性化剤 **1** は三種の AMPK 基質のリン酸化を顕著に亢進させ、非選択的なリン酸化誘導活性を示した (ACC: 297%、FOXO3a: 353%、Raptor: 155%)。対して **AA3** は FOXO3a、Raptor のリン酸化はほとんど亢進させず、ACC に対してのみリン酸化を誘導するという結果が得られた (ACC: 146%、FOXO3a: 88%、Raptor: 110%)。この結果より、リン酸化誘導分子は多種多様なタンパク質が混在する条件においても標的とするタンパク質のリン酸化を誘導すること、また、単純な AMPK 活性化剤と比較して標的基質選択的にリン酸化誘導可能であることが示された。

■ HEK293 細胞破碎液中におけるリン酸化誘導活性評価

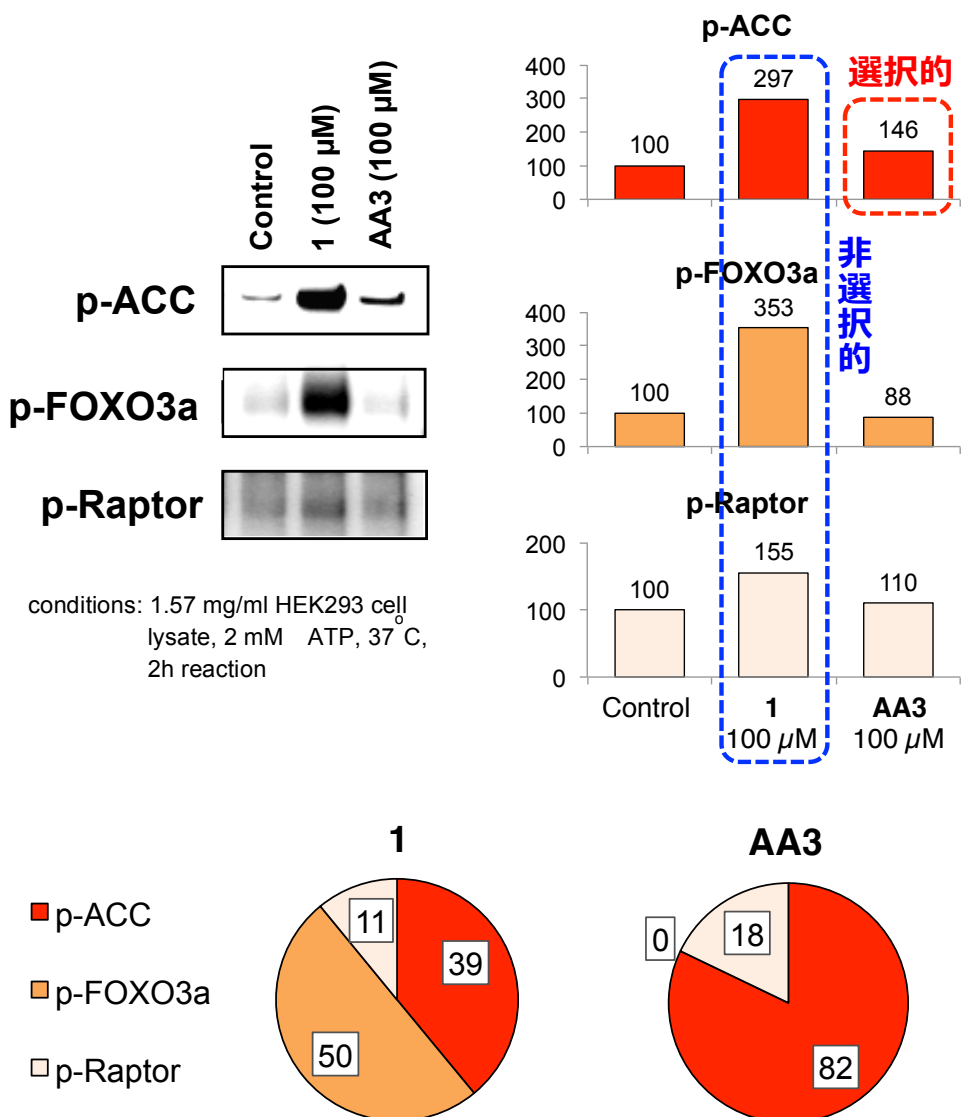


図 56. 細胞破碎液中におけるリン酸化誘導活性評価結果



### ● 3.6 実験結果の考察と議論

本研究において設計したリン酸化誘導分子は

- AMPK、標的タンパク質の双方に結合能を示す
- キナーゼ活性化能を併せ持つ
- 標的とするタンパク質のリン酸化を効率的に促進する
- 三者複合体を形成することでリン酸化を誘導する
- 精製タンパク質系、細胞破碎液系において標的選択的なリン酸化を誘導する

ことを種々の実験により明らかとした。

#### リン酸化誘導活性について

AMPK、ACC に対する活性は、リンカーの導入により減弱することが明らかとなった (AMPK: 30-600 倍減、ACC: 10-20 倍減)。これについてはリンカーの導入位置の変更や導入部位の化学構造を変換することにより改善が見込めると考えている。また、ベンズイミダゾール型のもとは構造が異なる AMPK 活性化剤として **C2** という化合物<sup>54</sup>が報告されている。この化合物は EC<sub>50</sub> 値が 6 nM にて AMPK を活性化することが報告されている (991: 0.03 μM (α1β1γ1), 0.09 μM (α2β1γ1)) ことから、こちらのリガンドを **991** の代わりに導入することによりさらにリン酸化誘導活性が向上する可能性がある。さらに HMGR リン酸化誘導分子においては、リンカー長の最も短い **HA3** がより強いリン酸化誘導活性を示した。この結果は、リンカー長の最適化によりリン酸化誘導活性の向上が期待できることを示唆している。今後、細胞系における活性評価や、医薬応用等を考慮すると、さらなるリン酸化誘導活性の向上が望まれるため、上記のような改善策を適用してリン酸化誘導分子の活性を向上したいと考えている。

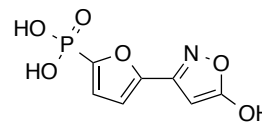


図 57. AMPK 活性化剤 **C2** の化学構造<sup>54</sup>

#### リン酸化部位の同定について

リン酸化されたアミノ酸残基の同定も重要な課題であると考えている。一つのタンパク質が有する被リン酸化アミノ酸残基はかならずしも単一ではなく、複数個存在することも多くある。そのリン酸化残基によって機能制御様式は大きく異なるため、どの残基がリン酸化されたのか、また複数個リン酸化されていないかなどの証明は必須な実験であると考えられる。この同定には質量分析装置 (MS/MS) による解析が、より直接的に判断できる手法として有用であると考えられる。また、リン酸化されるアミノ酸残基に対する点変異導入 (例: Ser→Ala) によるリン酸化の減少をもとに判断する手法や、配列特異的なリン酸化抗体を利用する手法が代替実験として考えられる。リン酸化残基の数については、Phostag-gel<sup>®</sup>を応用した方法<sup>103</sup>により決定可能であると考えられる。しかし、現段階においてはその検証までは行えていない。

### 基質選択性について

また、リン酸化誘導分子の標的タンパク質選択性について精製タンパク質系、細胞破碎液系の二系において評価した。その結果、リン酸化誘導分子は精製タンパク質系においては単純な AMPK 活性化剤と比較して 2-3 倍の選択性を示し、細胞破碎液系においても標的タンパク質選択的なリン酸化誘導活性を示した。特異的と呼べるまで選択性を高めることができれば、より実用性の高い機能性分子となるが、現段階では選択性向上策は考案できていない。それでもこれらの実験事実は、創製したリン酸化誘導分子により AMPK の基質選択性が変動しうることを示している。これはキナーゼの機能阻害や発現制御といった既存の手法では成し得ないものであり、本リン酸化誘導分子により選択的リン酸化シグナル伝達の新たな方法論を提案できたものと考えている。この方法は、特定のリン酸化シグナルの詳細な解析手法への応用が期待できる。また、タンパク質のリン酸化は細胞増殖、分化、免疫応答、オートファジーなどありとあらゆる表現型を生み出す。すなわち、特定のタンパク質のリン酸化を誘導することで、その基質のリン酸化に基づく狙いの表現型を強く引き出せる可能性がある。

## 総括

タンパク質リン酸修飾はグリコーゲンホスホリラーゼのリン酸化の発見により80年以上も前に見出された修飾系である。これまでに世界中の研究者によりその修飾機構や修飾意義の解明、ヒトゲノムにコードされた数多くのキナーゼ、ホスファターゼの同定が行われ、タンパク質リン酸化の生命活動における重要性が次々と明らかとされた。現在では、プロテインキナーゼの機能制御法（RNA 干渉法や選択的阻害剤）や、質量分析を始めとする効率的なキナーゼ下流基質の同定手法が開発され、タンパク質リン酸化シグナルの解明に拍車をかけている。

本研究において筆者は、タンパク質リン酸化シグナル制御法における“ある問題点”を提起した。それは、キナーゼ下流基質の選択的なリン酸化、すなわちキナーゼ-基質一対のリン酸化誘導を起こすことは既存の手法では困難ということである。これはキナーゼの基質多様性に起因するため、キナーゼそのものを標的にする既存の制御法ではその下流基質すべてが影響を受けてしまうのである。これは狙いのリン酸化シグナルを誘起し、解析したい場合においては大きな問題である。また、疾患治療を指向して数多くのキナーゼ阻害剤が開発されているが、この阻害剤によっても上述の理由により複数のリン酸化シグナルが影響を受けていることが予想され、狙いの治療効果を最良の形で発揮していないという可能性も否定できない。つまり特定の基質のリン酸化を促進ないし阻害することができる手法は、リン酸化シグナル解析や創薬化学の分野におけるブレークスルーとなると考えられる。

筆者はこの研究課題に対し、「キナーゼ-標的基質の近接を促進する機能性分子」を創製することでその解決を目指した。キナーゼリガンドと標的基質のリガンドとを連結させた有機化合物がこの機能を示すものと仮説を立て、リン酸化誘導分子の設計、有機合成を実施した。種々の実験の結果、合成したリン酸化誘導分子は標的とするタンパク質に対して効率的にリン酸化を誘導すること、また標的タンパク質選択的なリン酸化誘導活性を示すことを明らかにした。有機化合物により標的とするタンパク質のリン酸化を誘導した例はおそらく世界初のものである。

今後、リン酸化誘導分子の構造展開により、さらなるリン酸化誘導活性、基質選択性の改善の可能性を精査していきたいと考えている。さらに、キナーゼ-標的タンパク質の近接効果により、キナーゼの本来の基質以外のタンパク質に対してもリン酸化が誘導されるのか否かは非常に興味深く、これについても追加の実験を行い、検証していきたいと考えている。

本リン酸化誘導手法が今後、リン酸化シグナル解析や創薬へと応用されることを強く期待する。



## 実験の部



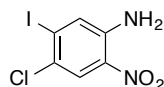
## 1. Chemistry

### 1.1 General Comments

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a JEOL JNM-ECA500 (500 MHz) spectrometer in the indicated solvent. Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in parts per million relative to internal standard tetramethylsilane ( $^1\text{H}$  NMR) or the centerline of the triplet at 77.0 ppm of  $\text{CDCl}_3$  ( $^{13}\text{C}$  NMR). The following abbreviations are used: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad. ESI and FAB mass spectrum were recorded on a BRUKER microTOF II mass spectrometer and JMA-HX110 mass spectrometer, respectively. Unless otherwise noted, chemical reagents and solvents were purchased from Aldrich Inc., Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Wako Pure Chemical Industries, Ltd., and Kanto chemical co., inc., and used without purification. Routine TLC was performed on silica gel 60 F254 plates (Merck, Germany). Flash column chromatography was performed on Silica gel 60 (spherical, particle size 40-50  $\mu\text{M}$ ; Kanto Chemical, Japan).

### 1.2 Synthesis of AMPK ligand unit

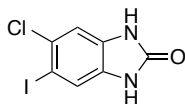
#### 4-chloro-5-iodo-2-nitroaniline (A1)



5-Chloro-2-nitroaniline (500 mg, 2.90 mmol) was dissolved in AcOH (5.0 mL) and added *N*-iodo succinimide (720 mg, 3.20 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 50 °C for 24 h. The reaction mixture was cooled down to room temperature and filtered. The obtained orange solid was washed with AcOH,  $\text{H}_2\text{O}$ , sat.  $\text{NaHCO}_3$  aq. and re washed with  $\text{H}_2\text{O}$ , and then dried in vacuo to afford **A1** as an orange solid (856 mg, 99%).

- $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.56 (1H, s, Ar-H), 6.99 (1H, s, Ar-H), 6.10 (2H, brs, -NH $_2$ ).
- FAB-MS  $m/z$ : 298(M) $^+$ .

#### 5-chloro-6-iodo-1,3-dihydro-2H-benzo[d]imidazol-2-one (A3)



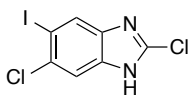
#### STEP 1.

**A1** (2.00 g, 6.70 mmol) was dissolved in AcOEt (40 mL) and added  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (7.60 g, 33.5 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 80 °C for 5 h. The mixture was added sat.  $\text{NaHCO}_3$  aq. at 0 °C to adjust the pH to 8. The suspension was filtered on celite and the residue was extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The organic layer was concentrated in vacuo and the resulting brown solid was used for next step without any purification.

## STEP 2.

The brown solid (91.2 mg) prepared in STEP 1 was dissolved in anhydrous THF (1.0 mL) and added CDI (83.0 mg, 0.512 mmol) at room temperature. The mixture was refluxed for 18 h and then, white solid was precipitated gradually in the reaction solution. The white solid precipitated under the reaction condition was filtered and washed with  $\text{CHCl}_3$  and  $\text{H}_2\text{O}$ , and then dried to afford **A3** as a white solid with adequate purity (77 mg, 77%).

- $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 10.88 (1H, s,  $-\text{CONH-}$ ), 10.82 (1H, s,  $-\text{CONH-}$ ), 7.34 (1H, s, Ar-H), 7.10 (1H, s, Ar-H).
- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_7\text{H}_4\text{ClIN}_2\text{O-H}$ : 292.8973; found: 292.8972 (M-H).

2,6-dichloro-5-iodobenzo[d]imidazole (**A4**)

**A3** (77 mg, 0.26 mmol) in flask (displaced with Ar gas) was added  $\text{POCl}_3$  (725  $\mu\text{L}$ , 7.8 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 90  $^\circ\text{C}$  for 18 h. The reaction mixture was added  $\text{H}_2\text{O}$  and neutralized with  $\text{NaHCO}_3$  aq at 0  $^\circ\text{C}$ . The resultant aqueous layer was extracted with  $\text{AcOEt}$  and the combined organic layer was washed with brine and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The solvent was removed, and the residue was purified with silica gel column chromatography (solvent:  $\text{AcOEt}/n\text{-hexane} = 1:10$  to  $1:3$ ) to afford **A4** as a white solid (138 mg, quant.).

- $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.01 (1H, s, Ar-H), 7.65 (1H, s, Ar-H).
- FAB-MS  $m/z$ : 313 (M+H) $^+$ .

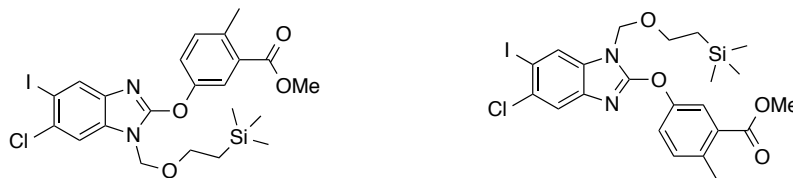
mixture of 2,6-dichloro-5-iodo-1-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-1H-benzo[d]imidazole and 2,5-dichloro-6-iodo-1-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-1H-benzo[d]imidazole (**A5**)

**A4** (17 mg, 0.053 mmol) was dissolved in THF (300  $\mu\text{L}$ ) and added triethylamine (15  $\mu\text{L}$ , 0.11 mmol) and  $\text{SEMCl}$  (14  $\mu\text{L}$ , 0.080 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction solution was added  $\text{H}_2\text{O}$  and the resultant aqueous layer was extracted with  $\text{AcOEt}$ . The organic layer was washed with 2N  $\text{HCl}$  aq. and brine, and then dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The organic layer was concentrated in vacuo to afford **A5** as a white solid with sufficient purity (22 mg, 96%).

- $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.22 (0.5H, s, Ar-H), 8.01 (0.5H, s, Ar-H), 7.85 (0.5H, s, Ar-H), 7.66 (0.5H, s, Ar-H), 5.54 (2H, s,  $-\text{CH}_2-$ ), 3.59 (2H, m,  $-\text{CH}_2-$ ), 0.98-0.93 (2H, m,  $-\text{CH}_2-$ ), 0.01 (9H, s,  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ).
- FAB-MS  $m/z$ : 443 (M+H) $^+$ .



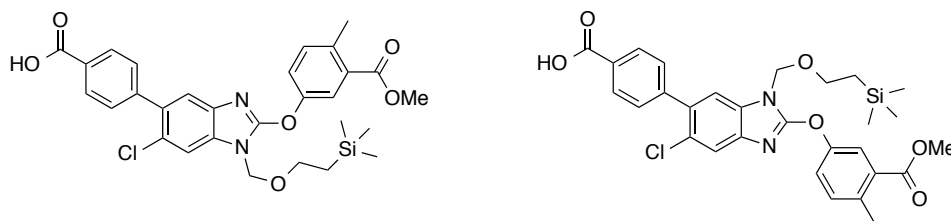
mixture of methyl 5-((6-chloro-5-iodo-1-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoate and methyl 5-((5-chloro-6-iodo-1-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoate (A6).



A5 (22 mg, 0.050 mmol) was dissolved in DMF (500  $\mu$ L) and added methyl 5-hydroxy-2-methylbenzoate (12 mg, 0.075 mmol) and  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (49 mg, 0.15 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 3 h. The reaction solution was added  $\text{H}_2\text{O}$  and the resultant aqueous layer was extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The organic layer was concentrated in vacuo, and the residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: AcOEt/*n*-hexane = 1:10 to 1:3) to afford A6 as a white solid (29 mg, 92%).

- $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.02 (0.5H, s, Ar-H), 7.89 (0.5H, d,  $J = 2.9$  Hz, Ar-H), 7.89 (0.5H, s, Ar-H), 7.87 (0.5H, s, Ar-H), 7.66 (0.5H, d,  $J = 2.9$  Hz, Ar-H), 7.54 (0.5H, s, Ar-H), 7.43 (1H, dd,  $J = 8.3, 2.6$  Hz, Ar-H), 7.34 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz, Ar-H), 5.49 (2H, s,  $-\text{OCH}_2-$ ), 3.89 (3H, s,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.65-3.64 (2H, m,  $-\text{CH}_2-$ ), 2.63 (3H, s,  $-\text{CH}_3$ ), 0.98-0.94 (2H, m,  $-\text{CH}_2-$ ), -0.01 (9H, s,  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ).
- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{ClIN}_2\text{O}_4\text{Si}+\text{Na}$ : 595.0270; found: 595.0287 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ .

mixture of 4-(6-chloro-2-(3-(methoxycarbonyl)-4-methylphenoxy)-1-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)benzoic acid and 4-(5-chloro-2-(3-(methoxycarbonyl)-4-methylphenoxy)-1-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-1H-benzo[d]imidazol-6-yl)benzoic acid (A7).



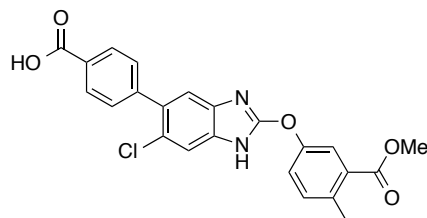
A6 (30 mg, 0.052 mmol), 4-carboxyphenylboronic acid (10 mg, 0.057 mmol),  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (1 mg, catalytic amount) and  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (8 mg, 0.073 mmol) were dissolved in 1,4-dioxane/ $\text{H}_2\text{O}$  (750  $\mu$ L, 2:1). After Ar gas displacement in the flask, the reaction solution was stirred at 80  $^\circ\text{C}$  for 10 h under Ar atmosphere. The reaction solution was added  $\text{H}_2\text{O}$  and the resultant aqueous layer was extracted with AcOEt. Then, the organic layer was washed with brine and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The solvent was removed, and the residue was purified with silica gel column chromatography (solvent:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=70:1$ ) to afford A7 as a white solid (17 mg, 59%).

- $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.19 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz, Ar-H), 8.17 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz, Ar-H), 7.94 (1H, d,  $J = 2.9$  Hz, Ar-H), 7.71 (0.5H, s, Ar-H), 7.61 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz), 7.58 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 7.56 (0.5H, s, Ar-H), 7.56 (0.5H, s, Ar-H), 7.50-7.47 (1H, m, Ar-H), 7.38 (0.5H, s, Ar-H), 7.36 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, Ar-H), 5.58 (2H, s,  $-\text{OCH}_2-$ ), 3.91 (3H, s,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.74-3.69 (2H, m,  $-\text{CH}_2-$ ), 2.66 (3H, s,  $-\text{CH}_3$ ), 1.04-0.97 (2H, m,  $-\text{CH}_2-$ ), 0.03 (3H, s,  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ).

-Si-CH<sub>3</sub>), 0.00 (6H, s, -Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

- HRMS (ESI-TOF) calcd for C<sub>29</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Si+H: 567.1718; found: 567.1713 (M+H)<sup>+</sup>.

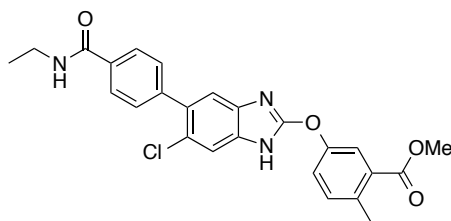
4-(6-chloro-2-(3-(methoxycarbonyl)-4-methylphenoxy)benzo[d]imidazol-5-yl)benzoic acid (A8)



A7 (30 mg, 0.0529 mmol) was dissolved in THF (300 μL). Tetrabutylammonium fluoride (159 μL, 0.159 mmol, 1M in THF) was added to the solution, and the resulting mixture was refluxed for 11h. The solvent was removed on evaporator, and the residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 20:1 to 10:1) to afford A8 as a white solid (12 mg, 52%).

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 8.15 (2H, d, J = 8.0 Hz, Ar-H), 7.94 (1H, d, J = 2.9 Hz, Ar-H), 7.56 (2H, d, J = 8.6 Hz, Ar-H), 7.46 (1H, dd, J = 8.0, 2.9 Hz, Ar-H), 7.34 (1H, d, J = 8.6 Hz, Ar-H), 3.89 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 2.62 (3H, s, -CH<sub>3</sub>).
- HRMS (ESI-TOF) calcd for C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 435.0742; found: 435.0733 (M-H).

methyl 5-((6-chloro-5-(4-(ethylcarbamoyl)phenyl)benzo[d]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoate (A9)



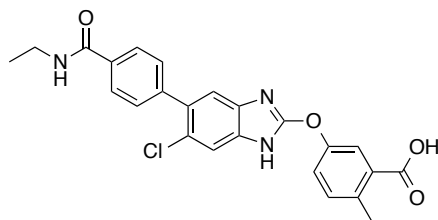
A8 (30 mg, 0.0687 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (687 μL). EDCI (43 mg, 0.275 mmol), HOBT (23 mg, 0.172 mmol) and ethylamine (9.0 μL, 0.172 mmol, 70% in water) were added to the solution at room temperature, and the resulting mixture was stirred for 12 h. The reaction solution was diluted with AcOEt and washed with water and brine. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the solvent was removed. The residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 30:1) to afford A9 as colorless oil (19 mg, 59%).

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 7.91 (1H, d, J = 2.3 Hz, Ar-H), 7.81 (2H, d, J = 8.0 Hz, Ar-H), 7.46 (3H, d, J = 8.6 Hz, Ar-H), 7.42 (1H, dd, J = 8.0, 2.9 Hz, Ar-H), 7.28 (1H, d, J = 8.6 Hz, Ar-H), 6.32 (1H, s, Ar-H), 3.86 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.58-3.52 (2H, m, -CH<sub>2</sub>-), 2.57 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1.29 (3H, t, J = 7.4 Hz, -CH<sub>3</sub>).
- HRMS (ESI-TOF) calcd for C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>+Na: 486.1191; found: 486.1185 (M+Na)<sup>+</sup>.

---

 5-((6-chloro-5-(4-(ethylcarbamoyl)phenyl) benzo[d]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoic acid (A10)
 

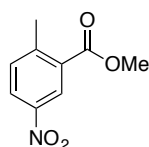
---



A9 (19 mg, 0.0410 mmol) was dissolved in MeOH/water (1 mL, 1:1). Then, LiOH•H<sub>2</sub>O (3.0 mg, 0.0633 mmol) was added to the solution at room temperature, and the resulting mixture was stirred at this temperature for 21 h. The reaction solution was added water, and acidified with 2N HCl aq., and the resultant aqueous layer was extracted with AcOEt. The combined organic layer was washed with brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Then, solvent was removed and the residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 10:1) and by washing with CHCl<sub>3</sub> to afford A10 as a white solid (6 mg, 33%).

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ : 8.51 (1H, t, *J* = 5.4 Hz, -CONH-), 7.88 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, Ar-H), 7.76 (1H, d, *J* = 2.9 Hz, Ar-H), 7.55 (1H, s, Ar-H), 7.51-7.48 (3H, m), 7.39 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, Ar-H), 7.35 (1H, s, Ar-H), 3.29 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, -CH<sub>2</sub>-), 2.53 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1.13 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, -CH<sub>3</sub>).
  - HRMS (ESI-TOF) calcd for C<sub>24</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 448.1059; found: 448.1069 (M-H).
- 

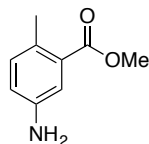
## methyl 2-methyl-5-nitrobenzoate (A11)



2-Methyl-5-nitrobenzoic acid (5.0 g, 0.028 mol) was dissolved in MeOH (50 mL) and added H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (500 μL, 1 v/v%) at room temperature. The reaction mixture was stirred at 50 °C for 24 h. The mixture was neutralized with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq., and then, the solid precipitated was filtered and dried to afford A11 as a yellow solid (5.39 g, 99%).

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 8.78 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, Ar-H), 8.24 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.6 Hz, Ar-H), 7.44 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, Ar-H), 3.96 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 2.73 (3H, s, -CH<sub>3</sub>).
- HRMS (ESI-TOF) calcd for C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub>+Na: 218.0424; found: 218.0414 (M+Na)<sup>+</sup>.

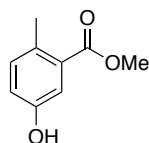
---

 methyl 5-amino-2-methylbenzoate (A12)


A11 (100 mg, 0.51 mmol) was dissolved in AcOEt (2.0 mL) and added SnCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (587 mg, 2.6 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 80 °C for 2.5 h. The mixture was added sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. at 0 °C and modified pH to 8. The suspension was filtered on celite and the residue was extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The organic layer was concentrated in vacuo to afford A12 as a yellow solid (53 mg, 63%) with adequate purity.

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CHCl<sub>3</sub>) δ: 7.25 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, Ar-H), 7.02 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, Ar-H), 6.75 (1H, dd, *J* = 8.0, 2.3 Hz, Ar-H), 3.87 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.68 (2H, brs, -NH<sub>2</sub>), 2.46 (3H, s, -CH<sub>3</sub>).
  - HRMS (ESI-TOF) calcd for C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>+H: 166.0863; found: 166.0869 (M+H)<sup>+</sup>.
- 

## methyl 5-hydroxy-2-methylbenzoate (A13)

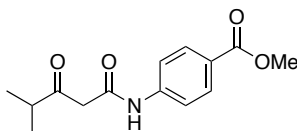


Methyl 5-amino-2-methylbenzoate (2.7 g, 0.016 mol) was suspended in H<sub>2</sub>O (12 mL) and added H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2.6 mL, 0.048 mol) at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C for 1.5 h. The mixture was added NaNO<sub>2</sub> (1.1 g, 0.016 mol) in H<sub>2</sub>O (5 mL) at 0 °C, and the resulting mixture was further stirred at 100 °C for 2 h. The reaction mixture was neutralized with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. at 0 °C. The aqueous layer was extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The organic layer was concentrated in vacuo and the residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: AcOEt/*n*-hexane = 1:7 to 1:2) to afford A13 as a yellow solid (2.66 g, 64%).

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.43 (1H, d, *J* = 2.9 Hz, Ar-H), 7.10 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, Ar-H), 6.92 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.9 Hz, Ar-H), 5.83 (1H, brs, -OH), 3.89 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 2.50 (3H, s, -CH<sub>3</sub>).
- HRMS (ESI-TOF) calcd for C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>+Na: 189.0519; found: 189.0522 (M+Na)<sup>+</sup>.

### 1.3 Synthesis of HMGR ligand unit

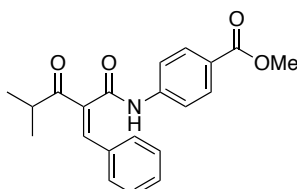
#### methyl 4-(4-methyl-3-oxopentanamido)benzoate (H1)



Ethyl isobutyrylacetate (5.0 g, 0.0347 mol) was dissolved in toluene (173 mL) and added methyl 4-aminobenzoate (5.25 g, 0.0347 mol) and ethylenediamine (23  $\mu$ L, 0.347 mmol) at room temperature. The mixture was refluxed for 9 h. Then, the solvent was removed in vacuo, and the residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: AcOEt/*n*-Hexane = 1:5 to 1:2) to afford **H1** as a white solid (7.73 g, 85% yield).

- $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 9.54 (1H, s, -CONH-), 8.02 (2H, d,  $J$  = 8.9 Hz, Ar-H), 7.65 (2H, d,  $J$  = 8.9 Hz, Ar-H), 3.90 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.64 (2H, s, -CH<sub>2</sub>-), 2.78-2.70 (1H, m-CHR<sub>2</sub>), 1.19 (6H, d,  $J$  = 6.9 Hz, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).
- $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 211.6, 166.6, 163.8, 141.7, 130.8, 125.8, 119.2, 52.0, 46.6, 42.4, 17.7;
- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_4+\text{Na}$ : 286.1050; found: 286.1056 ( $\text{M}+\text{Na}$ )<sup>+</sup>.

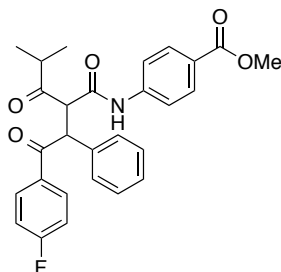
#### methyl (Z)-4-(2-benzylidene-4-methyl-3-oxopentanamido)benzoate (H2)



**H1** (2.0 g, 7.60 mmol) was suspended in *n*-hexane (25 mL) and added benzaldehyde (1.55 mL, 15.2 mmol),  $\beta$ -alanine (339 mg, 3.80 mmol) and acetic acid (43  $\mu$ L, 0.760 mmol) at room temperature. The mixture was refluxed on dean-stark apparatus for 17 h. The reaction mixture was added water and the resultant aqueous layer was extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated. The residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: AcOEt/*n*-Hexane = 1:5 to 1:2) to afford **H2** as pale yellow amorphous (1.56 g, 58% yield).

- $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.01 (2H, d,  $J$  = 8.6 Hz, Ar-H), 7.95 (1H, s, -CONH-), 7.64 (1H, s, =CHR), 7.59 (2H, d,  $J$  = 8.6 Hz, Ar-H), 7.54 (2H, d,  $J$  = 6.3 Hz, Ar-H), 7.40-7.34 (3H, m), 3.90 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.40-3.32 (1H, m, -CHR<sub>2</sub>), 1.22 (6H, d,  $J$  = 6.9 Hz, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).
- $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 202.8, 166.5, 165.4, 141.6, 141.6, 135.7, 132.7, 130.9, 129.9, 129.0, 126.2, 119.2, 52.1, 36.5, 19.1;
- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}_4+\text{Na}$ : 374.1363; found: 386.1358 ( $\text{M}+\text{Na}$ )<sup>+</sup>.

methyl 4-(2-(2-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1-phenylethyl)-4-methyl-3-oxopentanamido)benzoate (H3)

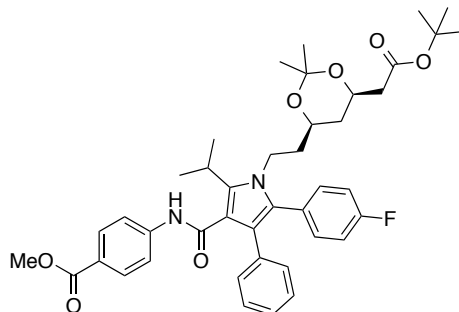


H2 (1.00 g, 2.85 mmol) was added Et<sub>3</sub>N (2.70 mL, 20.0 mmol), 3-ethyl-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazolium bromide (719 mg, 2.85 mmol) and 4-fluorobenzaldehyde (450 μL, 4.28 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at 70 °C for 17 h. Et<sub>3</sub>N was removed on evaporator, and the residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: Acetone/*n*-Hexane = 1:7 to 1:2) to afford diastereomeric mixture of H3 (504 mg, 37% yield).

- HRMS (ESI-TOF) calcd for C<sub>28</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>5</sub>+Na: 498.1687; found: 498.1688 (M+Na)<sup>+</sup>.

methyl

4-(1-(2-((4R,6R)-6-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-yl)ethyl)-5-(4-fluorophenyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1*H*-pyrrole-3-carboxamido)benzoate (H4)

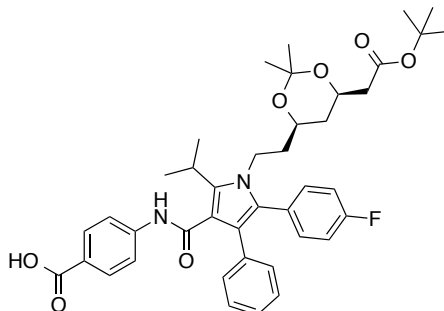


H3 (500 mg, 1.05 mmol) was dissolved in *n*-hexane/THF/toluene (6 mL, 9:2:2) and added *t*-butyl 2-[(4R,6R)-6-(2-aminoethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-yl]acetate (306 mg, 1.12 mmol) and pivalic acid (79 μL, 0.704 mmol) at room temperature. The mixture was refluxed for 23 h. The reaction solution was washed with 0.5N NaOH aq., 0.5N HCl aq., brine and then dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solution was concentrated and the residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: Acetone/*n*-Hexane = 1:5) to afford H4 as pale brown amorphous (455 mg, 61%).

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.84 (2H, d, *J* = 9.2 Hz, Ar-H), 7.23-7.14 (7H, m), 7.09 (2H, d, *J* = 9.2 Hz, Ar-H), 7.00-6.98 (3H, m), 4.18-4.13 (1H, m, -CH(OR)-), 4.12-4.06 (1H, m, -CH(OR)-), 3.85 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.83-3.81 (1H, m), 3.70-3.68 (1H, m), 3.65-3.60 (1H, m, -CHMe<sub>2</sub>), 2.36 (1H, dd, *J* = 14.5, 6.5 Hz), 2.24 (1H, dd, *J* = 14.5, 6.5 Hz), 1.69-1.65 (2H, m), 1.53 (6H, d, *J* = 6.9 Hz, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.43 (9H, s, -(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.36 (3H, s), 1.35-1.34 (1H, m), 1.30 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1.05 (1H, q, *J* = 11.8 Hz).

- $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.2, 166.7, 164.6, 162.3 (d,  $J = 246.3$  Hz), 142.7, 142.5, 134.5, 133.1 (d,  $J = 7.1$  Hz), 130.6, 130.5, 129.1, 128.5, 130.0 (d,  $J = 3.6$  Hz), 126.8, 124.6, 121.8, 118.2, 115.4 (d,  $J = 21.5$  Hz), 114.6, 98.7, 80.7, 66.4, 65.9, 51.8, 42.4, 41.0, 38.0, 35.9, 29.9, 28.1, 26.0, 21.5, 21.3, 19.6
- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_{42}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_7+\text{Na}$ : 735.3416; found: 735.3423 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ .

4-(1-(2-((4*R*,6*R*)-6-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-yl)ethyl)-5-(4-fluorophenyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1*H*-pyrrole-3-carboxamido)benzoic acid (**H5**)



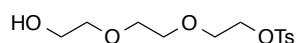
**H4** (20 mg, 0.0281 mmol) was dissolved in MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$ /THF (210  $\mu\text{L}$ , 1:1:1) and added LiOH $\cdot\text{H}_2\text{O}$  at room temperature. The solution was stirred at 60  $^\circ\text{C}$  for 6 h. The reaction solution was acidified with 2N HCl aq. to pH 2 and the resultant aqueous layer was extracted with AcOEt. The organic layer was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated. The residue was purified with silica gel column chromatography (solvent:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 30:1$  to 15:1) to afford **H5** as white solid (16 mg, 80%).

- $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.91 (2H, d,  $J = 9.2$  Hz, Ar-H), 7.24-7.14 (7H, m), 7.12 (2H, d,  $J = 9.2$  Hz, Ar-H), 7.06 (1H, brs), 6.99 (2H, dd,  $J = 8.9, 8.9$  Hz, Ar-H), 4.19-4.13 (1H, m-CH(OR-)), 4.09-4.07 (1H, m-CH(OR-)), 3.87-3.80 (1H, m), 3.70-3.68 (1H, m), 3.66-3.60 (1H, m, -CHMe<sub>2</sub>), 2.39 (1H, dd,  $J = 15.4, 7.7$  Hz), 2.24 (1H, dd,  $J = 15.4, 7.7$  Hz), 1.70-1.65 (2H, m), 1.53 (6H, d,  $J = 6.9$  Hz, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.43 (9H, s, -(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.36 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1.35-1.34 (1H, m), 1.30 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1.05 (1H, q,  $J = 11.8$  Hz).
- $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 171.1, 170.1, 164.6, 162.3 (d,  $J = 246.3$ ), 143.4, 142.7, 134.5, 133.1 (d,  $J = 8.4$  Hz), 131.3, 130.6, 129.1, 128.5, 127.9 (d,  $J = 3.5$  Hz), 126.9, 123.6, 121.9, 118.2, 115.4 (d,  $J = 21.5$ ), 114.6, 98.7, 80.7, 66.4, 65.9, 42.4, 41.0, 38.0, 35.9, 29.9, 28.1, 26.0, 21.5, 21.3, 19.6;
- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_{41}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_7+\text{Na}$ : 721.3260; found: 721.3252 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ .

---

### 1.3 Synthesis of linker unit.

#### 2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate(L3-1)

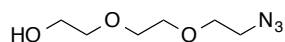


Triethylene glycol (2.0 g, 0.0133 mol) was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (133 mL) and the solution was added *p*-toluene sulfonyl chloride (2.54 g, 0.0133 mol),  $\text{Ag}_2\text{O}$  (3.71 g, 0.0160 mol) and KI (1.10 g, 0.00665 mol) at room temperature. The solution was stirred at ambient temperature for 19 h. The reaction mixture was filtered on celite to remove  $\text{Ag}_2\text{O}$ . The solvent was removed in vacuo and the residue was purified with silica gel column chromatography (solvent:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 30:1$ ) to afford **L3-1** as colorless oil (2.16 g, 53%).

- $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.80 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz, Ar-H), 7.35 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz, Ar-H), 4.17 (2H, t,  $J = 4.9$  Hz, TsO-CH<sub>2</sub>), 3.73-3.70 (4H, m), 3.61 (4H, s), 3.58 (2H, t,  $J = 4.3$  Hz, HO-CH<sub>2</sub>), 2.45 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 2.24 (1H, brs, -OH).
- FAB-MS  $m/z$ : 305 (M+H)<sup>+</sup>.

---

#### 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethan-1-ol (L3-2)

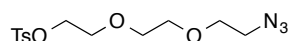


**L3-1** (1.0 g, 3.3 mmol) was dissolved in DMF (5.0 mL). The solution was added  $\text{NaN}_3$  (342 mg, 5.26 mmol) and stirred at 60 °C for 4 h. The reaction solution was added  $\text{H}_2\text{O}$  and the resultant aqueous layer was extracted with AcOEt. The combined organic layer was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and then, the solvent was removed. The residue was dried in vacuo to afford **L3-2** as a colorless oil (364 mg, 63%).

- $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.75-3.67 (8H, m), 3.63 (2H, t,  $J = 4.3$  Hz, -CH<sub>2</sub>), 3.41 (2H, t,  $J = 4.9$  Hz, -CH<sub>2</sub>), 2.25 (1H, brs, -OH).
- FAB-MS  $m/z$ : 176(M+H)<sup>+</sup>.

---

#### 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (L3-3)



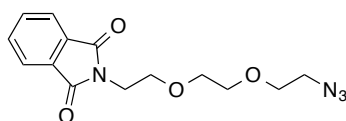
**L3-2** (231 mg, 1.3 mmol) was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The solution was added *p*-toluenesulfonyl chloride (301 mg, 1.58 mmol) and  $\text{Et}_3\text{N}$  (366 mL, 2.64 mmol) at 0 °C. The reaction solution was stirred at room



temperature for 11 h. Then, the solvent was removed in vacuo, and the residue was purified with silica gel column chromatography (solvent : AcOEt/Hexane = 1:4) to afford **L3-3** as a colorless oil (368 mg, 85%).

- $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 7.80 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz, Ar-H), 7.34 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz, Ar-H), 4.17 (2H, t,  $J = 4.9$  Hz, TSO- $\text{CH}_2$ ), 3.70 (2H, t,  $J = 4.6$  Hz,  $-\text{CH}_2$ ), 3.64 (2H, t,  $J = 4.9$  Hz,  $-\text{CH}_2$ ), 3.61 (4H, s), 3.37 (2H, t,  $J = 4.9$  Hz,  $-\text{CH}_2$ ), 2.45 (3H, s,  $-\text{CH}_3$ ).
- FAB-MS  $m/z$ : 330(M+H) $^+$ .

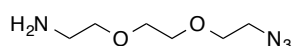
2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl)isoindoline-1,3-dione (**L3-4**)



**L3-3** (175 mg, 0.531 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (1.8 mL). Phthalimide (117 mg, 0.797 mmol) and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (220 mg, 1.59 mmol) were added to the solution at room temperature. The reaction solution was stirred and heated at 100 °C for 43 h. The mixture was added water and the resultant aqueous layer was extracted with AcOEt. The combined organic layer was washed with brine and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The solvent was removed in vacuo and the residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: AcOEt/*n*-Hexane = 1:4) to **L3-4** as a pale red oil (121 mg, 75%).

- $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 7.86-7.84 (2H, m, Ar-H), 7.73-7.71 (2H, m, Ar-H), 3.91 (2H, t,  $J = 6.0$  Hz,  $-\text{CH}_2$ ), 3.76 (2H, d,  $J = 5.7$  Hz,  $-\text{CH}_2$ ), 3.67-3.65 (2H, m,  $-\text{CH}_2$ ), 3.62-3.60 (4H, m), 3.31 (2H, t,  $J = 4.9$  Hz,  $-\text{CH}_2$ );
- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_4 + \text{Na}$ : 327.1064; found: 327.1074 (M+Na) $^+$ .

2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethan-1-amine (**L3-5**)



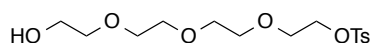
**L3-4** (117 mg, 0.384 mmol) was dissolved in EtOH (4.0 mL) and added  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (170  $\mu\text{L}$ , 3.46 mmol) at room temperature. The solution was stirred at 55 °C for 12 h. Then, the reaction solution was diluted with toluene and the precipitated white solid was filtered off (washed with toluene and  $\text{CHCl}_3$ ). Excess  $\text{NH}_2\text{NH}_2$  was removed in vacuo to afford **L3-5** as a pale brown oil (40 mg, 60%) without further purification.

- $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 3.70-3.64 (6H, m,  $-\text{CH}_2$ ), 3.53 (2H, t,  $J = 5.4$  Hz,  $-\text{CH}_2$ ), 3.40 (2H, t,  $J = 5.2$  Hz,  $-\text{CH}_2$ ), 2.88 (2H, t,  $J = 5.2$  Hz,  $-\text{CH}_2$ ), 1.60 (2H, brs,  $-\text{NH}_2$ ).
- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2 + \text{H}$ : 175.1190; found: 175.1179 (M+H) $^+$ .

---

 2-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (L4-1)
 

---

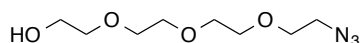


Tetraethylene glycol (2 g, 0.0103 mol) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) and added *p*-toluenesulfonyl chloride (1.96 g, 0.0103 mol), Ag<sub>2</sub>O (2.87 g, 0.0124 mol) and KI (855 mg, 0.00515 mol) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 17 h. The reaction mixture was filtered on celite to remove Ag<sub>2</sub>O, and the solvent was removed. The residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: AcOEt/MeOH = 30:1 to 15:1) to afford **L4-1** as a colorless oil (2.13 g, 59%).

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 7.80 (2H, d, *J* = 7.9 Hz, Ar-H), 7.35 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, Ar-H), 4.17 (2H, t, *J* = 4.9 Hz, TsO-CH<sub>2</sub>), 3.72-3.59 (14H, m), 2.45 (3H, s, -CH<sub>3</sub>).
  - FAB-MS *m/z*: 349 (M+H)<sup>+</sup>.
- 

 2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-ol (L4-2)
 

---

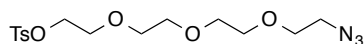


**L4-1** (342 mg, 0.98 mmol) was dissolved in DMF (2.0 mL). The solution was added NaN<sub>3</sub> (90 mg, 1.39 mmol) and stirred at 60 °C for 4 h. The reaction solution was added H<sub>2</sub>O and the resultant aqueous layer was extracted with AcOEt. The combined organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and then, the solvent was removed. The residue was dried in vacuo to afford **L4-2** as a colorless oil (164 mg, 76%).

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 3.74 (2H, t, *J* = 4.3 Hz, -CH<sub>2</sub>), 3.70-3.67 (10H, m), 3.62 (2H, t, *J* = 4.6 Hz, -CH<sub>2</sub>), 3.41 (2H, t, *J* = 5.2 Hz, -CH<sub>2</sub>), 2.51 (1H, brs, -OH).
  - FAB-MS *m/z*: 220(M+H)<sup>+</sup>.
- 

 2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (L4-3)
 

---



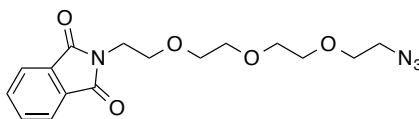
**L4-2** (300 mg, 1.37 mmol) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3.5 mL) and added *p*-toluenesulfonyl chloride (312 mg, 1.64 mmol) and triethylamine (380 μL, 2.74 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 35 h. Then, the solvent was removed on evaporator and the residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: AcOEt/*n*-Hexane = 1:7) to afford **L4-3** as a colorless oil (440 mg, 86% yield).

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 7.80 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, Ar-H), 7.34 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, Ar-H), 4.16 (2H, t, *J* = 4.9 Hz, TsO-CH<sub>2</sub>), 3.70-3.59 (12H, m), 3.39 (2H, t, *J* = 5.2 Hz,

-CH<sub>2</sub>), 2.45 (3H, s).

- HRMS (ESI-TOF) calcd for C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S+Na: 396.1200; found: 396.1209 (M+Na)<sup>+</sup>.

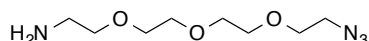
2-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)isoindoline-1,3-dione (**L4-4**)



**L4-3** (340 mg, 0.910 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (3.0 mL). Phthalimide (202 mg, 1.37 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (377 mg, 2.73 mmol) were added to the solution at room temperature. The reaction solution was stirred and heated at 100 °C for 3 days. The mixture was added water and the resultant aqueous layer was extracted with AcOEt. The combined organic layer was washed with brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solution was filtered and the solvent was removed. The residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: AcOEt/*n*-Hexane = 1:2) to afford **L4-4** as a colorless oil (240 mg, 76%).

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.86-7.84 (2H, m, Ar-H), 7.74-7.70 (2H, m, Ar-H), 3.90 (2H, t, J = 6.0 Hz, -CH<sub>2</sub>-), 3.75 (2H, t, J = 6.0 Hz, -CH<sub>2</sub>-), 3.68-3.58 (10H, m), 3.37 (2H, t, J = 5.2 Hz, -CH<sub>2</sub>-);
- <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 168.2, 133.9, 132.1, 123.2, 70.6 (70.63), 70.6 (70.59), 70.1, 70.0, 67.9, 50.6, 37.2;
- HRMS (ESI-TOF) calcd for C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>+Na: 371.1326; found: 371.1353 (M+Na)<sup>+</sup>.

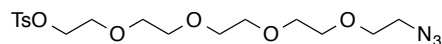
2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-amine (**L4-5**)



**L4-4** (240 mg, 0.689 mmol) was dissolved in EtOH (7.0 mL) and added NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (340 μL, 6.20 mmol) at room temperature. The solution was stirred at 55 °C for 4 h. Then, the reaction solution was diluted with toluene, and the white solid was filtered off (washed with toluene and CHCl<sub>3</sub>). Excess NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> was removed in vacuo to afford **L4-5** as a pale green oil (153 mg, quantitative yield) without further purification.

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.69-3.63 (10H, m), 3.52 (2H, t, J = 5.2 Hz, -CH<sub>2</sub>-), 3.40 (2H, t, J = 5.2 Hz, -CH<sub>2</sub>-), 2.87 (2H, t, J = 5.4 Hz, -CH<sub>2</sub>-), 1.69 (2H, brs, -NH<sub>2</sub>).
- HRMS (ESI-TOF) calcd for C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>+H: 219.1452; found: 219.1467 (M+H)<sup>+</sup>.

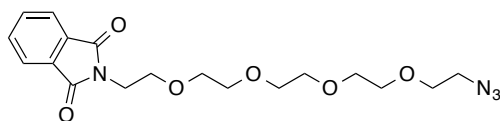
---

 14-azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl 4-methylbenzenesulfonate (L5-3)


L5-2 (500 mg, 1.90 mmol) was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) and added *p*-toluenesulfonyl chloride (435 mg, 2.28 mmol) and triethylamine (527  $\mu\text{L}$ , 3.80 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 5 h. Then, the solvent was removed on evaporator and the residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: AcOEt/MeOH = 30:1) to afford L5-3 as a colorless oil (664 mg, 84%).

- $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.73 (2H, d,  $J$  = 8.0 Hz, Ar-H), 7.27 (2H, d,  $J$  = 8.0 Hz), 4.09 (2H, t,  $J$  = 4.9 Hz, TsO-CH $_2$ -), 3.62-3.52 (16H, m), 3.31 (2H, t,  $J$  = 5.2 Hz, -CH $_2$ -), 2.38 (3H, s, -CH $_3$ ).
  - HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{SN}_3\text{O}_7+\text{Na}$ : 440.1462; found: 440.1483 (M+Na) $^+$ .
- 

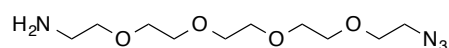
## 2-(14-azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)isoindoline-1,3-dione (L5-4)



L5-3 (362 mg, 0.867 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (3.0 mL). Phthalimide (191 mg, 1.30 mmol) and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (360 mg, 2.60 mmol) were added to the solution at room temperature. The reaction solution was stirred and heated at 100 °C for 3 days. The mixture was added water and the resultant aqueous layer was extracted with AcOEt. The combined organic layer was washed with brine and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The solution was filtered and the solvent was removed. The residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: AcOEt/*n*-Hexane = 1:1) to afford L5-4 as a colorless oil (240 mg, 71% yield).

- $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.86-7.83 (2H, m, Ar-H), 7.73-7.71 (2H, m, Ar-H), 3.90 (2H, t,  $J$  = 6.0 Hz, -CH $_2$ -), 3.74 (2H, t,  $J$  = 6.0 Hz, -CH $_2$ -), 3.66-3.62 (14H, m), 3.39 (2H, t,  $J$  = 4.9 Hz, -CH $_2$ -).
  - $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 168.2, 133.9, 132.1, 123.2, 70.6, 70.6, 70.5, 70.0, 70.0, 67.9, 50.6, 37.2;
  - HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_6+\text{Na}$ : 415.1588; found: 415.1616 (M+Na) $^+$ .
- 

## 14-azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecan-1-amine (L5-5)



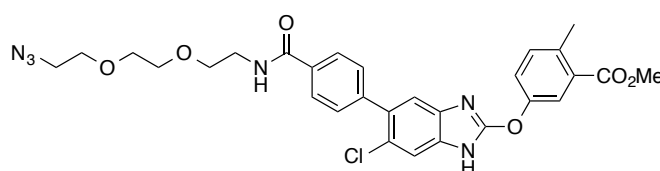
L5-4 (240 mg, 0.612 mmol) was dissolved in EtOH (6.0 mL) and added  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (270  $\mu\text{L}$ , 5.50 mmol) at room temperature. The solution was stirred at 55 °C for 4 h. Then, the reaction solution was

diluted with toluene and the white solid was filtered off (washed with toluene and  $\text{CHCl}_3$ ). Excess  $\text{NH}_2\text{NH}_2$  was removed in vacuo afford **L5-5** as a pale green oil (158 mg, 98%) without further purification.

- $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.69-3.62 (16H, m), 3.52 (2H, t,  $J = 4.6$  Hz,  $-\text{CH}_2-$ ), 3.39 (2H, t,  $J = 5.2$  Hz,  $-\text{CH}_2-$ ), 2.88 (2H, brs,  $-\text{NH}_2$ ).
- $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 70.7, 70.6, 70.6, 70.6, 70.5, 70.3, 70.0, 50.7;
- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4+\text{H}$ : 263.1714; found: 263.1742 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

#### 1.4 Syntheses of ACC phosphorylation inducers.

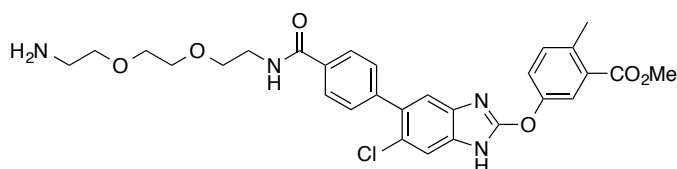
methyl  
5-((5-(4-((2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)phenyl)-6-chlorobenzo[d]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoate (**A14-3**)



**A8** (75 mg, 0.172 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (1.7 mL) and added EDC (107 mg, 0.688 mmol), HOBt (58 mg, 0.430 mmol), DIPEA (120 mL, 0.688 mmol) and the amine linker **L3-5** (36 mg, 0.207 mmol) at 0 °C. The solution was stirred for 4 h at ambient temperature. Then, the solution was added water and the resultant aqueous layer was extracted with AcOEt. The combined organic layer was washed with brine and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The solution was filtered and removed solvent in vacuo. The residue was purified with silica gel column chromatography (solvent:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 50:1$ ) to afford **A14-3** as a white solid (102 mg, 81%).

- $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.88 (1H, s), 7.82 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, Ar-H), 7.54 (1H, s), 7.43 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, Ar-H), 7.39 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, Ar-H), 7.29 (1H, s), 7.14 (1H, s), 6.94 (1H, s), 3.85 (3H, s,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.70-3.66 (10H, m), 3.35 (2H, t,  $J = 4.9$  Hz,  $-\text{CH}_2-$ ), 2.55 (3H, s,  $-\text{CH}_3$ ).
- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{ClN}_6\text{O}_6+\text{Na}$ : 615.1729; found: 615.1720 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ .

methyl  
5-((5-(4-((2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)phenyl)-6-chlorobenzo[d]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoate (**A15-3**)



**A14-3** (72 mg, 0.121 mmol) was dissolved in THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (927  $\mu\text{L}$ , 3:1) and added  $\text{PPh}_3$  (48 mg, 0.182 mmol) at room temperature. The solution was stirred for 32 h at ambient temperature. The solvent was removed in vacuo and the residue was purified with silica gel column chromatography (solvent:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 30:1$ ) to afford **A15-3** as a colorless oil (60 mg, 88%).

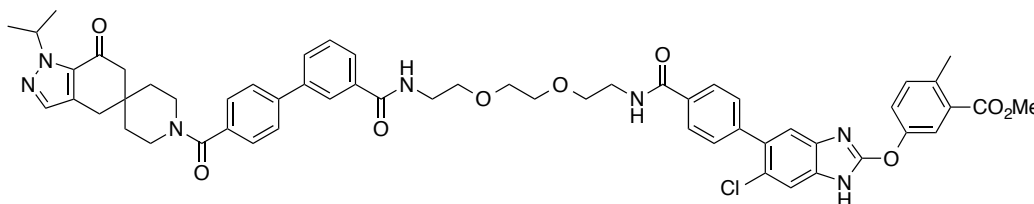
- $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 8.35 (1H, s), 7.97 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, Ar-H), 7.85 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz,

Ar-H), 7.59-7.55 (4H, m), 7.48 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, Ar-H), 7.41 (1H, s), 3.92 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.68-3.47 (12H, m), 2.80 (2H, t,  $J = 5.7$  Hz, -CH<sub>2</sub>-), 2.61 (3H, s, -CH<sub>3</sub>).

- HRMS (ESI-TOF) calcd for C<sub>29</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>6</sub>H: 565.1848; found: 565.1877 (M-H).

methyl

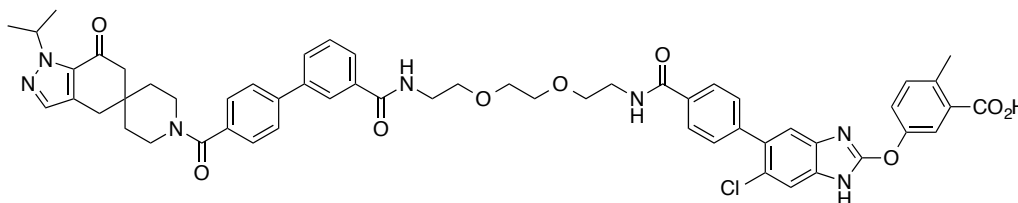
5-((6-chloro-5-(4-((2-(2-(2-(4'-(1-isopropyl-7-oxo-1,4,6,7-tetrahydrospiro[indazole-5,4'-piperidine]-1'-carbonyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl-3-carboxamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)phenyl)benzo[d]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoate (A16-3)



A15-3 (30 mg, 0.0529 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (530  $\mu$ L) and added EDC (33 mg, 0.212 mmol), HOBT (18 mg, 0.132 mmol), DIPEA (37  $\mu$ L, 0.212 mmol) and the ACC ligand AC8 (30 mg, 0.0635 mmol) at 0  $^{\circ}$ C. The solution was stirred for 21 h at ambient temperature. Then, the solution was added water and the resultant aqueous layer was extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solution was filtered and removed solvent in vacuo. The residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: CHCl<sub>3</sub>/MeOH= 50:1) to afford A16-3 as a white amorphous (54 mg, 74%).

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 8.43 (1H, s), 8.31-8.29 (2H, m), 8.21 (1H, s), 7.97 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, Ar-H), 7.93 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, Ar-H), 7.89-7.88 (2H, m), 7.84 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, Ar-H), 7.64-7.60 (3H, m), 7.58-7.56 (4H, m), 7.51-7.50 (2H, m), 7.43 (1H, s), 5.39-5.32 (1H, m, -CHMe<sub>2</sub>), 3.94 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.71-3.53 (15H, m), 2.90 (2H, s, -CH<sub>2</sub>-), 2.69 (2H, s, -CH<sub>2</sub>-), 2.63 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1.64-1.61 (4H, m), 1.46 (6H, d,  $J = 6.3$  Hz, -CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.
- HRMS (ESI-TOF) calcd for C<sub>57</sub>H<sub>58</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>9</sub>+Na: 1042.3877; found: 1042.3880 (M+Na)<sup>+</sup>.

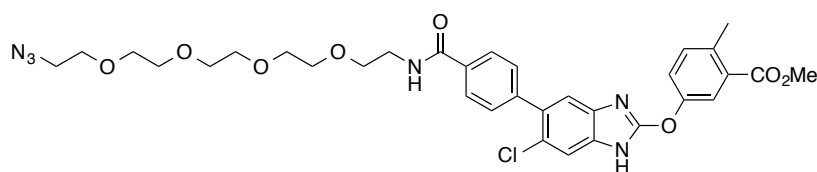
5-((6-chloro-5-(4-((2-(2-(2-(4'-(1-isopropyl-7-oxo-1,4,6,7-tetrahydrospiro[indazole-5,4'-piperidine]-1'-carbonyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl-3-carboxamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)phenyl)benzo[d]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoic acid (AA3)



A16-3 (24 mg, 0.0235) was dissolved in MeOH/H<sub>2</sub>O (240  $\mu$ L, 2:1) and added LiOH  $\cdot$  H<sub>2</sub>O (2 mg, 0.0353 mmol) at room temperature. The solution was stirred for 4 h at room temperature. Then, the solution was diluted with AcOEt, and adjusted pH to 2-3 with 1.5 N HCl aq. at 0  $^{\circ}$ C. The aqueous layer was extracted with AcOEt, and the combined organic layer was washed with brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solution was filtered and removed solvent in vacuo. The residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: CHCl<sub>3</sub>/MeOH= 50:1) to afford AA3 as a white solid (6 mg, 25%).

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.51 (1H, s, -CONH<sub>2</sub>), 8.38 (1H, t, *J* = 5.4 Hz, -CONH<sub>2</sub>), 7.99 (1H, t, *J* = 1.7 Hz, Ar-H), 7.73-7.71 (4H, m), 7.65 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, Ar-H), 7.60 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, Ar-H), 7.41 (1H, dd, *J* = 7.7 Hz, Ar-H), 7.37-7.36 (3H, m), 7.33-7.30 (5H, m), 7.17 (1H, s), 5.32-5.24 (1H, m, -CHMe<sub>2</sub>), 3.74 (1H, s), 3.62-3.45 (14H, m), 3.36-3.33 (2H, m), 2.75 (2H, d, *J* = 5.7 Hz), 2.52-2.50 (5H, m), 1.56 (2H, s, -CH<sub>2</sub>), 1.42 (2H, s, -CH<sub>2</sub>), 1.31 (6H, d, *J* = 5.7 Hz, -CH<sub>3</sub>).
- HRMS (ESI-TOF) calcd for C<sub>56</sub>H<sub>56</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>9</sub>H: 1004.3744; found: 1004.3763 (M-H).

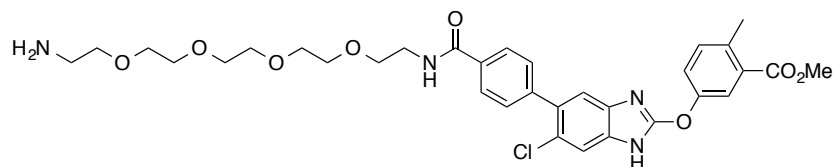
methyl  
5-((5-(4-((14-azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)carbamoyl)phenyl)-6-chlorobenzo[d]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoate (A14-5)



A8 (55 mg, 0.127 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (1.3 mL) and added EDC (87 mg, 0.560 mmol), HOBT (43 mg, 0.318 mmol), DIPEA (89 mL, 0.508 mmol) and the amine linker L5-5 (40 mg, 0.152 mmol) at 0 °C. The solution was stirred for 12 h at ambient temperature. Then, the solution was added water and resultant aqueous layer was extracted with AcOEt. The combined organic layer was washed with brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solution was filtered and removed solvent in vacuo. The residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: CHCl<sub>3</sub>/MeOH= 50:1) to afford A14-5 as a white amorphous (87 mg, 74%).

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 11.74 (1H, s, -NH<sub>2</sub>), 7.94 (1H, s), 7.90 (2H, d, *J* = 7.4 Hz, Ar-H), 7.66-7.57 (1H, m), 7.50 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, Ar-H), 7.44 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, Ar-H), 7.28 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, Ar-H), 7.23-7.11 (1H, m), 6.82 (1H, s), 3.86 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.74-3.62 (18H, m), 3.35 (2H, t, *J* = 5.2 Hz, -CH<sub>2</sub>), 2.56 (3H, s, -CH<sub>3</sub>).
- HRMS (ESI-TOF) calcd for C<sub>33</sub>H<sub>37</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>8</sub>+Na: 703.2254; found: 703.2275 (M+Na)<sup>+</sup>.

methyl  
5-((5-(4-((14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)carbamoyl)phenyl)-6-chlorobenzo[d]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoate (A15-5)



A14-5 (60 mg, 0.0881 mmol) was dissolved in MeOH (3.5 mL). The solution was added Pd/C (6 mg, 10 % w/w) and the air in the flask was displaced with H<sub>2</sub> gas. The reaction solution was stirred for 18 h under H<sub>2</sub> atmosphere. The solid of Pd/C was filtered off on celite and the solvent was removed in vacuo. The residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: CHCl<sub>3</sub>/MeOH= 10:1 to 3:1) to afford A15-5 as a brown oil (35 mg, 60%).

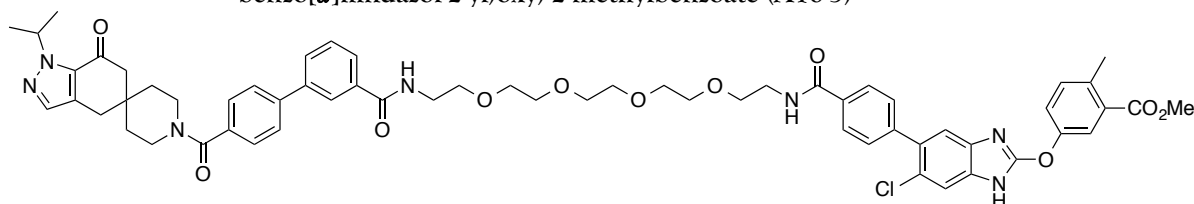
- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.99 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, Ar-H), 7.91 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, Ar-H), 7.88 (1H,

s, -CONH), 7.55 (1H, s), 7.48 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, Ar-H), 7.43 (1H, dd,  $J = 8.3, 2.6$  Hz, Ar-H), 7.31 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, Ar-H), 7.18 (1H, s), 3.87 (3H, s), 3.78-3.54 (20H, m), 2.95 (2H, t,  $J = 4.9$  Hz), 2.61 (3H, s).

- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $C_{33}H_{39}ClN_4O_8+H$ : 655.2529; found: 655.2513 (M+H)<sup>+</sup>.

methyl

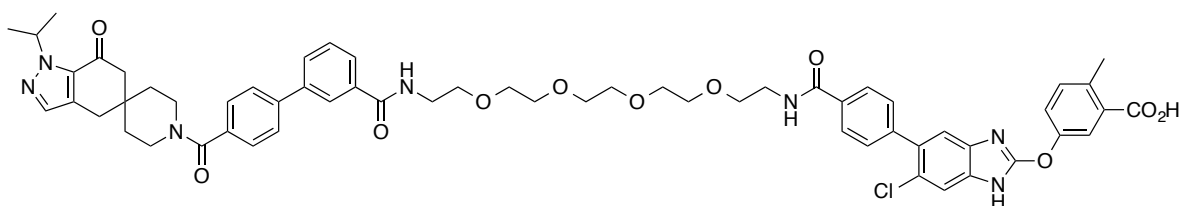
5-((6-chloro-5-(4-((1-(4'-(1-isopropyl-7-oxo-1,4,6,7-tetrahydrospiro[indazole-5,4'-piperidine]-1'-carbonyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)-1-oxo-5,8,11,14-tetraoxa-2-azahexadecan-16-yl)carbamoyl)phenyl)benzo[d]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoate (A16-5)



A16-5 (33 mg, 0.0504 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (500  $\mu$ L) and added EDC (35 mg, 0.225 mmol), HOBt (17 mg, 0.126 mmol), DIPEA (35  $\mu$ L, 0.201 mmol) and the ACC ligand AC8 (29 mg, 0.605 mmol) at 0 °C. The solution was stirred for 24 h at ambient temperature. Then, the solution was added water and the resultant aqueous layer was extracted with AcOEt. The combined organic layer was washed with brine and dried over  $Na_2SO_4$ . The solution was filtered and removed solvent in vacuo. The residue was purified with silica gel column chromatography (solvent:  $CHCl_3/MeOH = 30:1$ ) to afford A16-5 as a colorless oil (32 mg, 57%).

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 8.44 (1H, s), 8.33 (1H, s), 8.20 (1H, t,  $J = 1.7$  Hz, -CONH), 7.96 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, Ar-H), 7.92 (1H, d,  $J = 7.4$  Hz, Ar-H), 7.88 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, Ar-H), 7.86 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, Ar-H), 7.83 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, Ar-H), 7.63-7.58 (3H, m), 7.57-7.55 (4H, m), 7.51-7.48 (2H, m), 7.42 (1H, s), 5.38-5.30 (1H, m, -CHMe<sub>2</sub>), 3.92 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.67-3.51 (25H, m), 2.88 (2H, s), 2.67 (2H, s), 2.61 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1.60 (4H, s), 1.44 (6H, d,  $J = 6.3$  Hz, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).
- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $C_{61}H_{66}ClN_7O_{11}+Na$ : 1130.4401; found: 1130.4418 (M+Na)<sup>+</sup>.

5-((6-chloro-5-(4-((1-(4'-(1-isopropyl-7-oxo-1,4,6,7-tetrahydrospiro[indazole-5,4'-piperidine]-1'-carbonyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)-1-oxo-5,8,11,14-tetraoxa-2-azahexadecan-16-yl)carbamoyl)phenyl)benzo[d]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoic acid (AA5)



A16-5 (28 mg, 0.0252 mmol) was dissolved in solvent (252  $\mu$ L,  $MeOH/H_2O = 2:1$ ) and added  $LiOH \cdot H_2O$  (1.6 mg, 0.0353 mmol) at room temperature. The solution was stirred for 7 h at room temperature. Then, the solution was diluted with AcOEt, and adjusted pH to 2-3 with 1.5 N HCl aq. at 0 °C. The aqueous layer was extracted with AcOEt, and the combined organic layer was washed with brine and dried over  $Na_2SO_4$ . The solution was filtered and removed solvent in vacuo. The residue was purified with Preparative TLC (solvent:  $CHCl_3/MeOH = 50:1$ ) to afford AA5 as a white solid (7 mg, 25%).

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 8.65 (1H, t,  $J = 5.4$  Hz, -CONH), 8.54 (1H, t,  $J = 5.4$  Hz, -CONH), 8.30 (1H, s, Ar-H), 8.14 (1H, s, Ar-H), 7.89 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, Ar-H), 7.85-7.82 (2H, m), 7.78-7.76 (3H, m), 7.56-7.53 (2H, m), 7.50-7.47

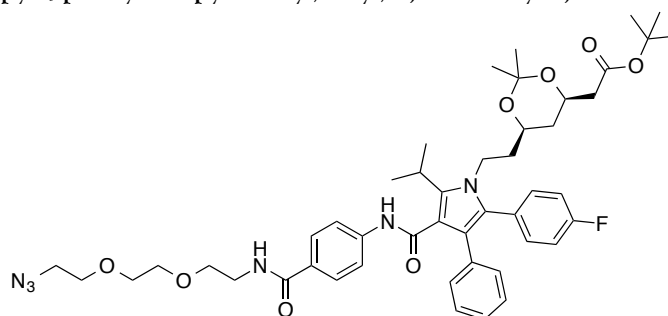


(5H, m), 7.44 (1H, s), 7.38 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz), 7.34 (1H, s), 5.30-5.22 (1H, m,  $-\underline{\text{CH}}\text{Me}_2$ ), 3.69 (1H, s), 3.55-3.41 (24H, m), 2.79 (2H, s), 2.60 (2H, s), 2.53 (3H, s,  $-\underline{\text{CH}}_3$ ), 1.55-1.45 (4H, m), 1.34 (6H, d,  $J = 6.3$  Hz,  $-\underline{\text{CH}}_3$ ).

- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_{60}\text{H}_{64}\text{ClN}_7\text{O}_{11}+\text{Na}$ : 1116.4245; found: 1116.4235 ( $\text{M}+\text{Na}$ )<sup>+</sup>.

### 1.5 Synthesis of HMGR phosphorylation inducers.

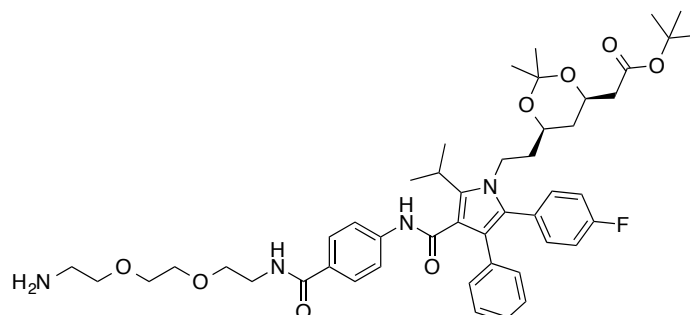
**tert-butyl**  
 2-((4*R*,6*R*)-6-(2-(3-((4-((2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)phenyl)carbamoyl)-5-(4-fluorophenyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1*H*-pyrrol-1-yl)ethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-yl)acetate (**H6-3**)



**H5** (60 mg, 0.0859 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (750  $\mu\text{L}$ ) and added amine linker **L3-5** (30 mg, 0.172 mmol), EDCI (53 mg, 0.344 mmol), HOBt (29 mg, 0.215 mmol) and DIPEA (60  $\mu\text{L}$ , 0.344 mmol) at 0  $^{\circ}\text{C}$ . The reaction solution was stirred at ambient temperature for 12 h. The reaction solution was added water and the resultant aqueous layer was extracted with AcOEt. The combined organic layer was washed with brine and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated. The residue was purified with silica gel column chromatography (solvent:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20:1$ ) to afford **H6-3** as a colorless oil (73 mg, quantitative yield).

- $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.61 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, Ar-H), 7.21-7.14 (7H, m), 7.10 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, Ar-H), 7.01-6.97 (3H, m), 6.53 (1H, s), 4.18-4.13 (1H, m,  $-\underline{\text{CH}}_2$ ), 4.11-4.05 (1H, m,  $-\underline{\text{CH}}_2$ ), 3.86-3.70 (1H, m,  $-\underline{\text{CH}}_2$ ), 3.70-3.60 (13H, m), 3.36 (2H, t,  $J = 5.2$  Hz,  $-\underline{\text{CH}}_2$ ), 2.38 (1H, dd,  $J = 15.5, 6.6$  Hz), 2.24 (1H, dd,  $J = 15.5, 6.6$  Hz), 1.69-1.64 (2H, m), 1.53 (6H, d,  $J = 6.9$  Hz,  $-\underline{\text{CH}}_3$ ), 1.43 (9H, s,  $-\underline{\text{CH}}_3$ ), 1.36 (3H, s,  $-\underline{\text{CH}}_3$ ), 1.35-1.34 (1H, m), 1.30 (3H, s,  $-\underline{\text{CH}}_3$ ), 1.05 (1H, q,  $J = 12.0$  Hz).
- $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.2, 166.9, 164.6, 162.3 (d,  $J = 246.3$  Hz), 142.3, 141.4, 134.6, 133.1 (d,  $J = 8.4$  Hz), 130.6, 129.0, 128.5, 128.0 (d,  $J = 3.6$  Hz), 127.8, 126.8, 121.9, 118.5, 115.4 (d,  $J = 20.3$  Hz), 114.8, 98.7, 80.7, 70.6, 70.3, 70.1, 70.0, 66.4, 65.9, 50.6, 42.5, 41.0, 39.6, 38.0, 36.0, 29.9, 28.1, 26.0, 21.6, 21.4, 19.7;
- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_{47}\text{H}_{59}\text{FN}_6\text{O}_8+\text{Na}$ : 877.4271; found: 877.4275 ( $\text{M}+\text{Na}$ )<sup>+</sup>.

*tert*-butyl  
 2-((4*R*,6*R*)-6-(2-(3-((4-((2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)phenyl)carbamoyl)-5-(4-fluoro-phenyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1*H*-pyrrol-1-yl)ethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-yl)acetate (**H7-3**)

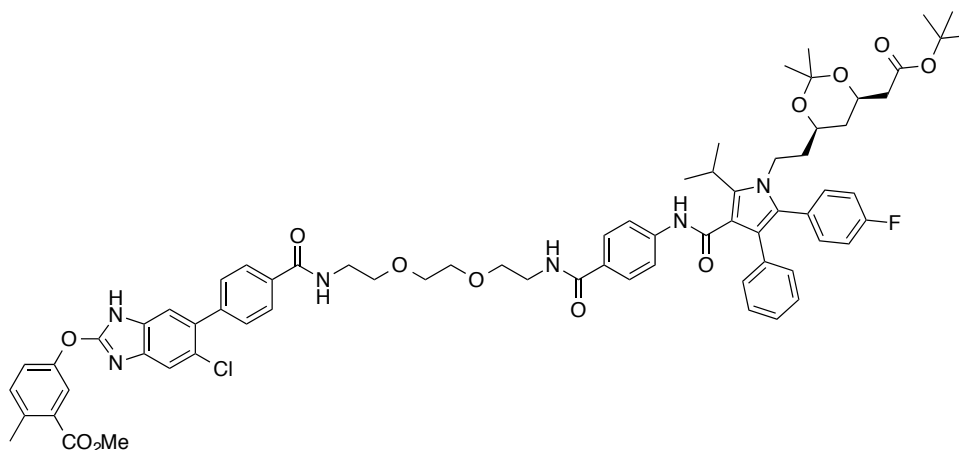


**H6-3** (55 mg, 0.0663 mmol) was dissolved in THF (450  $\mu$ L) and H<sub>2</sub>O (65  $\mu$ L), and added PPh<sub>3</sub> (26 mg, 0.0995 mmol) at room temperature. The solution was stirred at ambient temperature for 13 h. The solution was concentrated and the residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 10:1 to 1:1) to afford **H7-3** as a colorless oil (56 mg, quantitative yield).

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.64 (2H, d,  $J$  = 8.6 Hz, Ar-H), 7.20-7.13 (7H, m), 7.10 (2H, d,  $J$  = 8.6 Hz, Ar-H), 7.01-6.98 (3H, m), 6.84 (1H, t,  $J$  = 4.9 Hz, -CONH-), 4.19-4.13 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-), 4.11-4.05 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-), 3.86-3.81 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-), 3.71-3.60 (10H, m), 3.51 (2H, t,  $J$  = 5.2 Hz, -CH<sub>2</sub>-), 2.85 (2H, t,  $J$  = 5.2 Hz, -CH<sub>2</sub>-), 2.39 (1H, dd,  $J$  = 15.5, 6.9 Hz), 2.24 (1H, dd,  $J$  = 15.5, 6.3 Hz), 1.87 (2H, brs, -NH<sub>2</sub>), 1.70-1.66 (2H, m), 1.53 (6H, d,  $J$  = 7.4 Hz, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.43 (9H, s, -(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.36 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1.35-1.34 (1H, m), 1.30 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1.05 (1H, q,  $J$  = 11.8 Hz).
- <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 170.2, 170.0, 164.6, 162.2 (d,  $J$  = 246.8 Hz), 142.3, 141.3, 134.5, 133.1 (d,  $J$  = 8.4 Hz), 130.6, 129.1, 129.0, 128.5, 128.0 (d,  $J$  = 2.4 Hz), 127.8, 126.8, 121.8, 118.5, 115.3 (d,  $J$  = 21.5 Hz), 114.7, 98.7, 80.7, 73.0, 70.2, 70.1, 69.9, 66.4, 65.9, 42.4, 41.5, 41.0, 39.6, 38.0, 35.9, 29.9, 28.1, 26.0, 21.6, 21.4, 19.6;
- HRMS (ESI-TOF) calcd for C<sub>47</sub>H<sub>61</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>8</sub>+H: 829.4546; found: 829.4559 (M+H)<sup>+</sup>.

## methyl

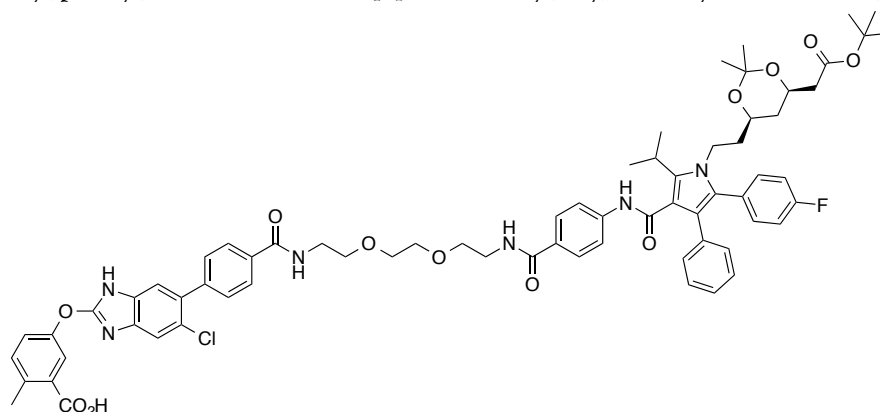
5-((6-(4-((2-(2-(2-(4-(1-(2-((4R,6R)-6-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-yl)ethyl)-5-(4-fluorophenyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxamido)benzamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)phenyl)-5-chloro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoate (H8-3)



**H7-3** (27 mg, 0.0330 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (660  $\mu$ L) and added **A8** (12 mg, 0.0275 mmol), EDCI (17 mg, 0.110 mmol), HOBt (9 mg, 0.0688mmol) and DIPEA (19  $\mu$ L, 0.110 mmol) at 0  $^{\circ}$ C. The solution was stirred at room temperature for 7 h. The reaction solution was added water and the resultant aqueous layer was extracted with AcOEt. The combined organic layer was washed with brine and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated. The residue was purified with silica gel column chromatography (solvent:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20:1$  to  $10:1$ ) to afford **H8-3** as a colorless oil (31 mg, 76%).

- $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 9.55 (1H, s,  $-\text{NH}_2$ ), 8.28 (1H, s,  $-\text{CONH}_2$ ), 8.04 (1H, s,  $-\text{CONH}_2$ ), 7.90 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, Ar-H), 7.79 (1H, d,  $J = 2.9$  Hz, Ar-H), 7.70 (2H, d,  $J = 9.2$  Hz, Ar-H), 7.54-7.49 (6H, m), 7.43 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz, Ar-H), 7.36 (1H, s), 7.27-7.24 (2H, m), 7.18-7.14 (2H, m), 7.10-7.05 (5H, m), 7.02-6.99 (1H, m), 4.13-4.08 (1H, m,  $-\text{CH}_2-$ ), 4.00-3.92 (1H, m,  $-\text{CH}_2-$ ), 3.86 (3H s,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.84-3.79 (1H, m,  $-\text{CH}_2-$ ), 3.78-3.73 (1H, m,  $-\text{CH}_2-$ ), 3.61-3.39 (12H, m), 3.31-3.25 (1H, m,  $-\text{CHMe}_2$ ), 2.55 (3H, s), 2.27 (1H, dd,  $J = 14.9, 5.2$  Hz), 2.19 (1H, dd,  $J = 15.2, 7.7$  Hz), 1.63-1.53 (2H, m), 1.40-1.38 (15H, m), 1.37-1.32 (4H, m), 1.19 (3H, s), 0.95 (1H, q,  $J = 11.8$  Hz).
- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_{70}\text{H}_{76}\text{ClF}_6\text{N}_6\text{O}_{12}+\text{Na}$ : 1269.5086; found: 1269.5068 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ .

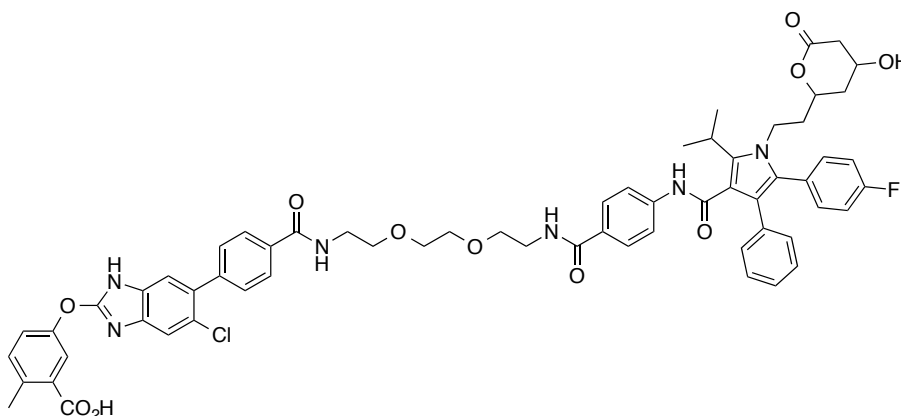
5-((6-(4-((2-(2-(2-(4-(1-(2-((4R,6R)-6-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-yl)ethyl)-5-(4-fluorophenyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxamido)benzamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)phenyl)-5-chloro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoic acid (H9-3)



**H8-3** (254 mg, 0.204 mmol) was dissolved in THF/H<sub>2</sub>O (1 mL, 2:1) and added LiOH•H<sub>2</sub>O (12 mg, 0.301 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred at 55 °C for 6 h. Then, the mixture was added 2N HCl aq. to adjust pH to 2. The aqueous layer was extracted with AcOEt, the combined organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 30:1) to afford **H9-3** as a colorless oil (118 mg, quantitative yield).

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.84 (1H, s), 7.77 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, Ar-H), 7.56 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, Ar-H), 7.40-7.33 (3H, m), 7.14-7.05 (14H, m), 6.98-6.95 (2H, m), 6.65 (1H, s, -CONH-), 4.18-4.05 (2H, m, -CH<sub>2</sub>-), 3.86-3.80 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-), 3.72-3.59 (15H, m), 2.50 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 2.38 (1H, dd, *J* = 15.5, 6.9 Hz, -CH<sub>2</sub>-), 2.24 (1H, dd, *J* = 15.5, 6.3 Hz, -CH<sub>2</sub>-), 1.67-1.61 (2H, m, -CH<sub>2</sub>-), 1.52 (6H, d, *J* = 6.9 Hz, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.43 (9H, s, -(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.35 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1.33-1.32 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-), 1.29 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1.02 (1H, q, *J* = 11.8 Hz, -CH<sub>2</sub>-). ;
- HRMS (ESI-TOF) calcd for C<sub>69</sub>H<sub>74</sub>ClFN<sub>6</sub>O<sub>12</sub>+Na: 1255.4929; found: 1255.4904 (M+Na)<sup>+</sup>.

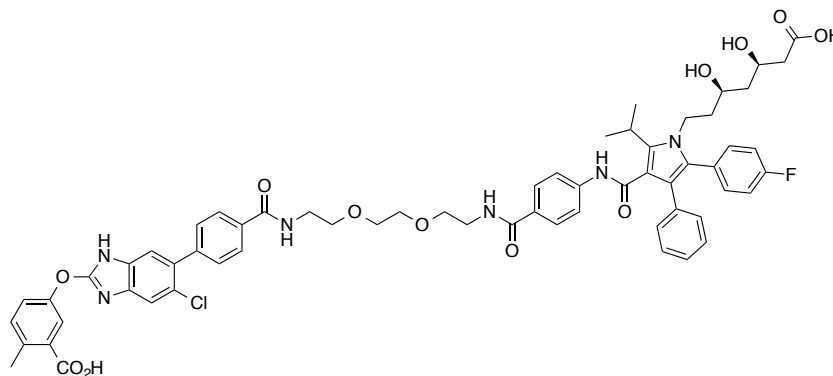
5-((5-chloro-6-(4-((2-(2-(4-(5-(4-fluorophenyl)-1-(2-(4-hydroxy-6-oxotetrahydro-2H-pyran-2-yl)ethyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxamido)benzamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)phenyl)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoic acid (**H10-3**)



**H9-3** (104 mg, 0.0843 mmol) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.5 mL) and added trifluoroacetic acid (65 μL, 0.843 mmol) at 0 °C. The solution was stirred at room temperature for 15h. Then, the solution was diluted with toluene and trifluoroacetic acid was removed in vacuo. The residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 15:1) to afford **H10-3** as a white solid (25 mg, 27%).

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.40 (1H, s), 8.24 (1H, s), 7.80-7.74 (4H, m), 7.59 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, Ar-H), 7.39-7.10 (11H, m), 7.01-6.88 (7H, m), 4.45-4.41 (1H, m), 4.06-4.04 (2H, m), 3.96-3.90 (1H, m), 3.57-3.42 (14H, m), 3.28-3.24 (1H, m), 2.55 (1H, dd, *J* = 17.8, 4.6 Hz, -CH<sub>2</sub>-), 2.50 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 2.37 (1H, d, *J* = 17.8 Hz, -CH<sub>2</sub>-), 1.74-1.50 (4H, m), 1.35 (6H, d, *J* = 6.9 Hz, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). ;
- HRMS (ESI-TOF) calcd for C<sub>62</sub>H<sub>60</sub>ClFN<sub>6</sub>O<sub>11</sub>-H: 1117.3920; found: 1117.3901 (M-H).

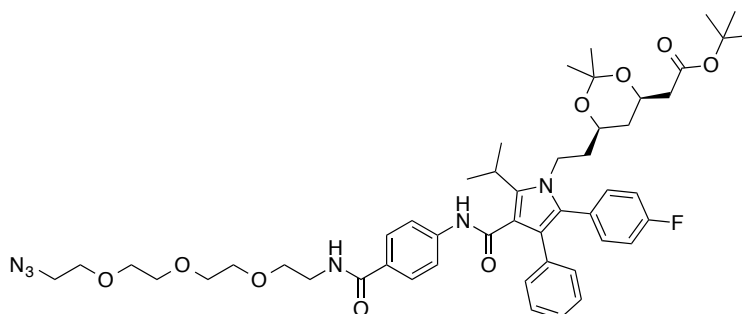
5-((6-(4-((2-(2-(2-(4-(1-((3*R*,5*R*)-6-carboxy-3,5-dihydroxyhexyl)-5-(4-fluorophenyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1*H*-pyrrole-3-carboxamido)benzamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)phenyl)-5-chloro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoic acid (**HA3**)



**H10-3** (25 mg, 0.0223 mmol) was dissolved in THF/H<sub>2</sub>O (500 μL, 5:1) and added Ca(OH)<sub>2</sub> (3 mg, 0.0446 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at this temperature for 3 h. Then, AcOEt was added to the solution and white solid was precipitated. The precipitate was filtered and washed with MeOH, water and AcOEt to afford **HA3** as a white solid (19 mg, 76%).

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 10.08 (1H, s, -NH-), 8.50 (1H, t, *J* = 5.7 Hz, -CONH-), 8.31 (1H, s), 7.84 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, Ar-H), 7.70 (2H, d, *J* = 9.2 Hz, -Ar-H), 7.57-7.56 (3H, m), 7.46 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, -Ar-H), 7.32 (1H, s), 7.23-7.15 (5H, m), 7.09 (2H, s), 7.05-6.94 (5H, m), 3.95-3.89 (1H, m), 3.76-3.70 (2H, m), 3.56-3.50 (17H, m), 2.07-2.04 (1H, m), 1.97-1.93 (1H, m), 1.61-1.55 (1H, m), 1.51-1.46 (1H, m), 1.41-1.34 (1H, m), 1.30 (6H, d, *J* = 6.9 Hz, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.25-1.21 (1H, m). ;
- HRMS (ESI-TOF) calcd for C<sub>62</sub>H<sub>62</sub>ClF<sub>6</sub>O<sub>12</sub>H: 1135.4015; found: 1135.4005 (M-H).

**tert-butyl**  
2-((4*R*,6*R*)-6-(2-(3-((4-((2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)phenyl)carbamoyl)-5-(4-fluorophenyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1*H*-pyrrol-1-yl)ethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-yl)acetate (**H6-4**)



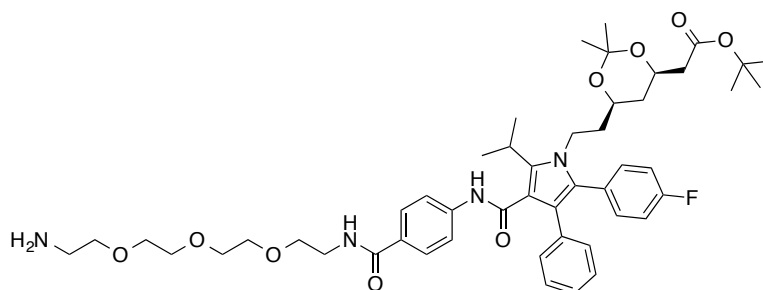
**H5** was dissolved in anhydrous DMF (6 mL) and added amine linker **L4-5** (153 mg, 0.701 mmol), EDCI

(363 mg, 2.34 mmol), HOBt (197 mg, 1.46 mmol) and DIPEA (410  $\mu$ L, 2.34 mmol) at 0 °C. The reaction solution was stirred at ambient temperature for 12 h. The reaction solution was added water and the resultant aqueous layer was extracted with AcOEt. The combined organic layer was washed with brine and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated. The residue was purified with silica gel column chromatography (solvent:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 15:1$ ) to afford **H6-4** as a colorless oil (538 mg, quantitative yield).

- $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.62 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, Ar-H), 7.22-7.13 (7H, m), 7.10 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, Ar-H), 7.01-6.98 (3H, m), 6.65 (1H, t,  $J = 5.2$  Hz, -CONH-), 4.19-4.13 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-), 4.11-4.05 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-), 3.86-3.81 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-), 3.72-3.58 (16H, m), 3.35 (2H, t,  $J = 5.2$  Hz, -CH<sub>2</sub>-), 2.39 (1H, dd,  $J = 15.2, 6.9$  Hz, -CH<sub>2</sub>-), 2.24 (1H, dd,  $J = 15.2, 6.3$  Hz, -CH<sub>2</sub>-), 1.70-1.64 (2H, m, -CH<sub>2</sub>-), 1.53 (6H, d,  $J = 6.9$  Hz, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.43 (9H, s, -(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.36 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1.35-1.34 (1H, m), 1.30 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1.05 (1H, q,  $J = 12.0$  Hz).
- $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.2, 166.9, 164.6, 162.3 (d,  $J = 246.3$  Hz), 142.3, 141.4, 134.5, 133.1 (d,  $J = 8.4$  Hz), 130.6, 129.1, 129.0, 128.5, 128.0 (d,  $J = 3.6$  Hz), 127.8, 126.8, 121.8, 118.5, 115.4 (d,  $J = 20.3$  Hz), 114.8, 98.7, 80.7, 70.7, 70.6, 70.6, 70.2, 70.0, 69.9, 66.4, 65.9, 50.6, 42.4, 40.9, 39.6, 38.0, 35.9, 29.9, 29.7, 28.1, 26.0, 21.6, 21.4, 19.6;
- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_{49}\text{H}_{63}\text{FN}_6\text{O}_9+\text{Na}$ : 921.4533; found: 921.4558 (M+Na)<sup>+</sup>.

**tert-butyl**

2-((4*R*,6*R*)-6-(2-(3-((4-((2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)phenyl)carbamoyl)-5-(4-fluorophenyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1*H*-pyrrol-1-yl)ethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-yl)acetate (H7-4)



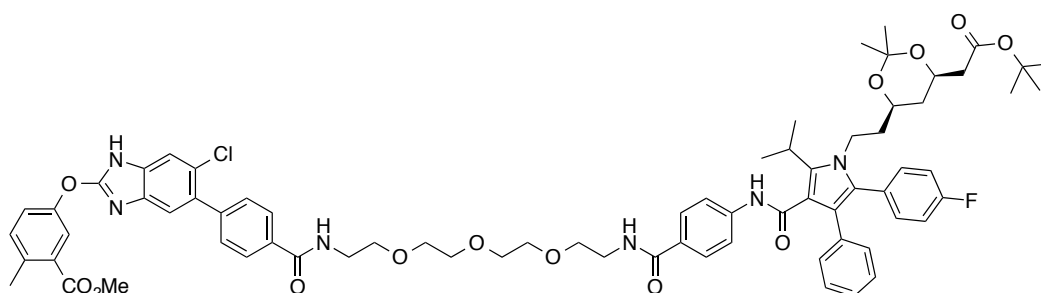
**H6-4** (538 mg, 0.598 mmol) was dissolved in THF (4.0 mL) and  $\text{H}_2\text{O}$  (600  $\mu$ L) and added  $\text{PPh}_3$  (236 mg, 0.898 mmol) at room temperature. The solution was stirred at ambient temperature for 22 h. The solution was concentrated and the residue was purified with silica gel column chromatography (solvent:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 10:1$  to 1:1) to afford **H7-4** as a white amorphous (448 mg, 86%).

- $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.66 (2H, d,  $J = 9.2$  Hz, Ar-H), 7.22-7.13 (8H, m), 7.09 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, Ar-H), 7.01-6.98 (3H, m), 4.19-4.13 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-), 4.11-4.05 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-), 3.86-3.80 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-), 3.71-3.60 (14H, m), 3.48 (2H, t,  $J = 5.2$  Hz, -OCH<sub>2</sub>-), 2.82 (2H, t,  $J = 5.2$  Hz, -OCH<sub>2</sub>-), 2.39 (1H, dd,  $J = 14.9, 6.9$  Hz, -CH<sub>2</sub>-), 2.24 (1H, dd,  $J = 14.9, 6.3$  Hz, -CH<sub>2</sub>-), 1.76 (2H, brs, -NH<sub>2</sub>), 1.69-1.63 (2H, m, -CH<sub>2</sub>-), 1.53 (6H, d,  $J = 6.9$  Hz, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.43 (9H, s, -(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.36 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1.35-1.34 (1H, m), 1.30 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1.05 (1H, q,  $J = 11.8$  Hz).

- $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.2, 170.0, 164.6, 162.3 (d,  $J = 245.6$  Hz), 142.2, 141.2, 134.5, 133.1 (d,  $J = 8.4$  Hz), 130.6, 129.2, 129.0, 128.4, 128.0, 126.7, 121.8, 118.4, 115.3 (d,  $J = 21.3$  Hz), 114.8, 98.7, 80.7, 73.2, 70.5, 70.5, 70.2, 70.1, 66.4, 65.9, 42.4, 41.6, 40.9, 39.7, 38.0, 35.9, 29.9, 28.1, 26.0, 21.6, 21.4, 19.6
- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_{49}\text{H}_{65}\text{FN}_4\text{O}_9+\text{Na}$ : 895.4628; found: 895.4615 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ .

## methyl

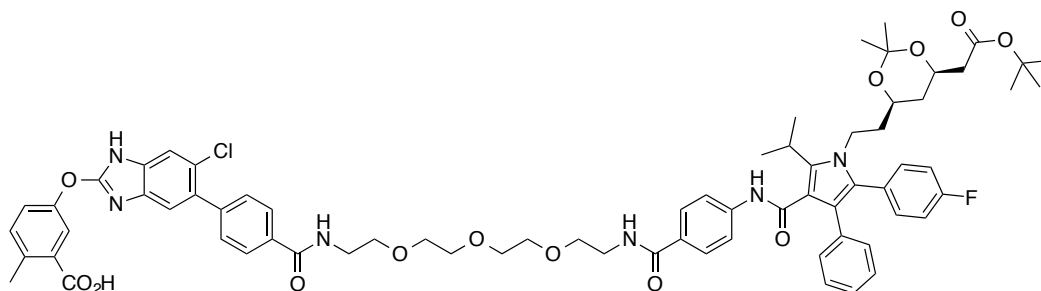
5-((5-(4-((1-(4-(1-(2-((4*R*,6*R*)-6-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-yl)ethyl)-5-(4-fluorophenyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1*H*-pyrrole-3-carboxamido)phenyl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatri-decan-13-yl)carbamoyl)phenyl)-6-chloro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoate (**H8-4**)



**H7-4** (240 mg, 0.275 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (3.0 mL) and added **A8** (100 mg, 0.229 mmol), EDCI (142 mg, 0.916 mmol) and HOBT (77 mg, 0.573 mmol) at 0°C. The solution was stirred at room temperature for 25 h. The reaction solution was added water and the resultant aqueous layer was extracted with AcOEt. The combined organic layer was washed with brine and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated. The residue was purified with silica gel column chromatography (solvent:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 15:1$ ) to afford **H8-4** as a white amorphous (169 mg, 48%).

- $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 11.02 (1H, s,  $-\text{NH}$ ), 7.91 (1H, s), 7.85-7.83 (2H, m), 7.61-7.60 (3H, m), 7.42-7.40 (3H, m), 7.29-7.24 (1H, m), 7.14-7.08 (12H, m), 6.96-6.94 (3H, m), 6.71 (1H, s), 4.18-4.11 (1H, m,  $-\text{CH}_2-$ ), 4.10-4.04 (1H, m,  $-\text{CH}_2-$ ), 3.86 (3H, s,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.83-3.78 (1H, m,  $-\text{CH}_2-$ ), 3.69-3.57 (16H, m), 2.59 (3H, s,  $-\text{CH}_3$ ), 2.38 (1H, dd,  $J = 15.5, 6.9$  Hz), 2.23 (1H, dd,  $J = 15.2, 6.0$  Hz), 1.63 (2H, brs), 1.51 (6H, d,  $J = 6.9$  Hz,  $-(\text{CH}_3)_2$ ), 1.43 (9H, s,  $-(\text{CH}_3)_3$ ), 1.35-1.32 (4H, m), 1.29 (3H, s,  $-\text{CH}_3$ ), 1.00 (1H, q,  $J = 11.5$  Hz).
- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_{72}\text{H}_{80}\text{ClFN}_6\text{O}_{13}+\text{Na}$ : 1313.5348; found: 1313.5365 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ .

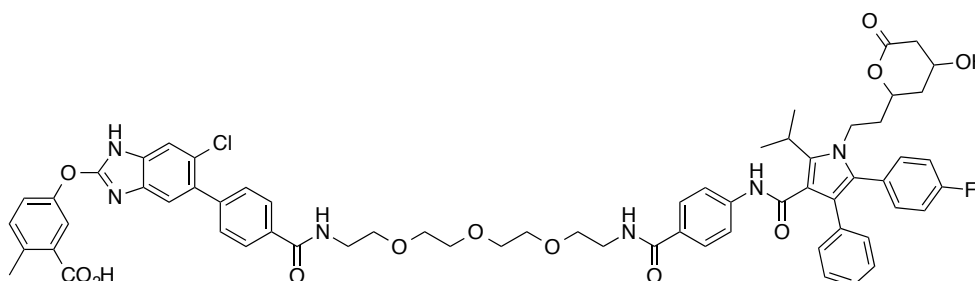
5-((5-(4-((1-(4-(1-(2-((4R,6R)-6-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-yl)ethyl)-5-(4-fluorophenyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxamido)phenyl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatriodecan-13-yl)carbamoyl)phenyl)-6-chloro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoic acid (H9-4)



**H8-4** (157 mg, 0.122 mmol) was dissolved in MeOH/THF/H<sub>2</sub>O (1.2 mL, 1:1:1) and added LiOH·H<sub>2</sub>O (8 mg, 0.182 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred at this temperature for 3.5h. Then, the mixture was added 2N HCl aq. to adjust pH to 2. The aqueous layer was extracted with AcOEt and the combined organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 50:1) to afford **H9-4** as a white solid (67 mg, 42%).

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.82 (1H, s), 7.77 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, Ar-H), 7.61 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, Ar-H), 7.35 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, Ar-H), 7.31-7.27 (2H, m), 7.14-7.08 (11H, m), 6.97-6.94 (3H, m), 4.17-4.11 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-), 4.10-4.03 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-), 3.84-3.78 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-), 3.73-3.55 (18H, m), 2.40-2.35 (4H, m), 2.23 (1H, dd, *J* = 15.2, 6.0 Hz), 1.65-1.63 (2H, m), 1.50 (6H, d, *J* = 7.4 Hz, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.42 (9H, s, -(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.35 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1.32-1.31 (1H, m), 1.28 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1.02 (1H, q, *J* = 11.8 Hz). ;
- HRMS (ESI-TOF) calcd for C<sub>71</sub>H<sub>78</sub>ClFN<sub>6</sub>O<sub>13</sub>+Na:1299.5192; found: 1299.5167(M+Na)<sup>+</sup>.

5-((6-chloro-5-(4-((1-(4-(5-(4-fluorophenyl)-1-(2-(4-hydroxy-6-oxotetrahydro-2H-pyran-2-yl)ethyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxamido)phenyl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatriodecan-13-yl)carbamoyl)phenyl)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoic acid (H10-4)

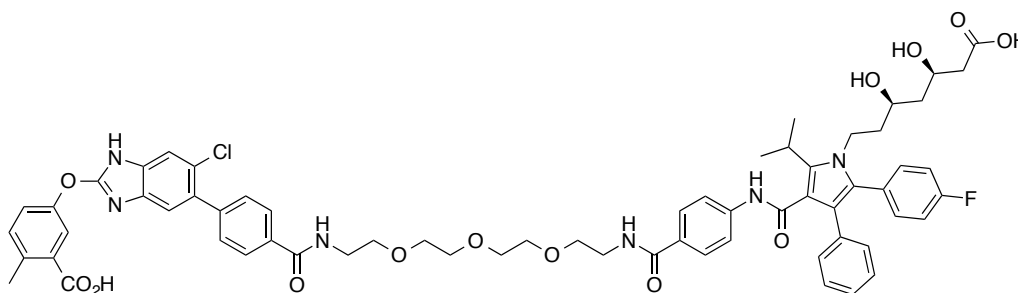




**H9-4** (67 mg, 0.0524 mmol) was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1.5 mL) and added trifluoroacetic acid (40  $\mu\text{L}$ , 0.524 mmol) at 0 °C. The solution was stirred at room temperature for 24h. Then, the solution was diluted with toluene and trifluoroacetic acid was removed in vacuo. The residue was purified with silica gel column chromatography (solvent:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20:1$  to 5:1) to afford **H10-4** as a white solid (45 mg, 74%).

- $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 8.41 (1H, t,  $J = 5.4$  Hz,  $-\text{CONH}-$ ), 8.22 (1H, t,  $J = 5.4$  Hz,  $-\text{CONH}-$ ), 7.79-7.73 (4H, m), 7.59 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, Ar-H), 7.38-7.19 (9H, m), 7.10-7.07 (2H, m), 6.98-6.88 (8H, m), 4.45-4.39 (1H, m), 4.08-4.02 (2H, m), 3.95-3.89 (1H, m), 3.55-3.40 (17H, m), 3.28-3.22 (1H, m), 2.55 (1H, dd,  $J = 17.8, 4.6$  Hz), 2.50 (3H, s,  $-\text{CH}_3$ ), 2.38-2.34 (1H, m), 1.76-1.48 (4H, m), 1.35 (6H, dd,  $J = 7.2, 1.4$  Hz,  $-(\text{CH}_2)_2$ ), 1.09-1.06 (1H, m). ;
- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_{64}\text{H}_{64}\text{ClFN}_6\text{O}_{12}\text{H}$ : 1161.4171; found: 1161.4184(M-H).

5-((5-(4-((1-(4-(1-((3*R*,5*R*)-6-carboxy-3,5-dihydroxyhexyl)-5-(4-fluorophenyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1*H*-pyrrole-3-carboxamido)phenyl)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-yl)carbamoyl)phenyl)-6-chloro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoic acid (**HA4**)

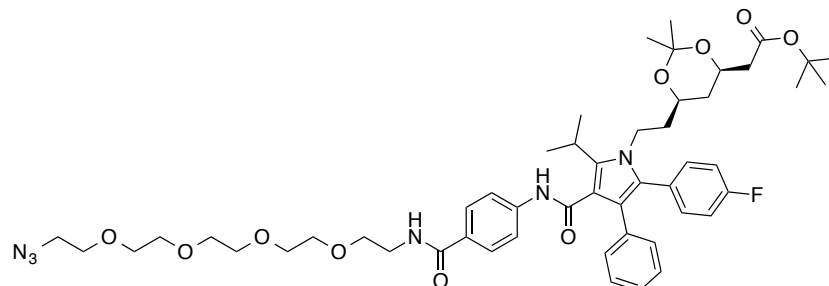


**H10-4** (45 mg, 0.0387 mmol) was dissolved in THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (1 mL, 5:1) and added  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (6 mg, 0.0773 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at this temperature for 4h. Then, AcOEt was added to the solution and white solid was precipitated. The precipitate was filtered and washed with MeOH, water and AcOEt to afford **HA4** as a white solid (15 mg, 33%).

- $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 10.04 (1H, s,  $-\text{NH}-$ ), 8.52 (1H, t,  $J = 5.4$  Hz,  $-\text{CONH}-$ ), 8.32-8.30 (2H, m), 7.86 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, Ar-H), 7.70 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, Ar-H), 7.63 (1H, s), 7.56 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, Ar-H), 7.45 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, Ar-H), 7.38 (1H, s), 7.23 (1H, s), 7.20-6.94 (11H, m), 3.94-3.88 (1H, m), 3.78-3.70 (2H, m), 3.51-3.516 (17H, m), 2.47 (3H, s,  $-\text{CH}_3$ ), 2.10-2.06 (2H, m), 2.00-1.95 (1H, m), 1.75 (1H, s), 1.59-1.52 (1H, m), 1.50-1.43 (1H, m), 1.38-1.34 (1H, m), 1.30 (6H, d,  $J = 6.9$  Hz,  $-(\text{CH}_2)_2$ ), 1.23-1.18 (1H, m). ;
- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_{64}\text{H}_{66}\text{ClFN}_6\text{O}_{13}+\text{Na}$ : 1203.4253; found: 1203.4224(M+Na) $^+$ .

*tert*-butyl

2-((4*R*,6*R*)-6-(2-(3-((4-((14-azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)carbamoyl)phenyl)carbamoyl)-5-(4-fluorophenyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1*H*-pyrrol-1-yl)ethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-yl)acetate (**H6-5**)

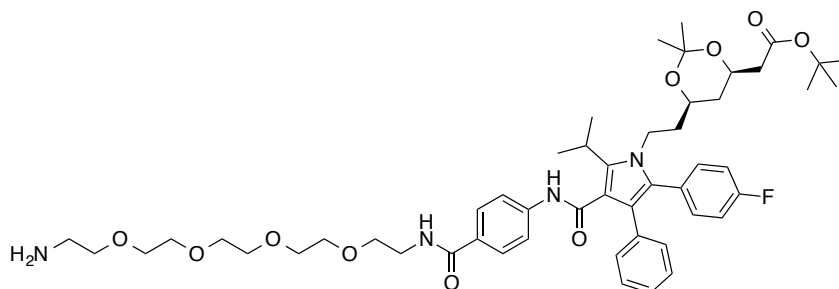


**H5** (351 mg, 0.502 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (5.0 mL) and added amine linker **L5-5** (158 mg, 0.602 mmol), EDCI (310 mg, 2.00 mmol), HOBT (170 mg, 1.26 mmol) and DIPEA (349  $\mu$ L, 2.00 mmol) at 0 °C. The reaction solution was stirred at ambient temperature for 11 h. The reaction solution was added water and the resultant aqueous layer was extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 15:1) to afford **H6-5** as a pale yellow oil (500 mg, quantitative yield).

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.63 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, Ar-H), 7.22-7.13 (7H, m), 7.10 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, Ar-H), 7.01-6.98 (3H, m), 6.75 (1H, t, *J* = 5.2 Hz, -CONH-), 4.19-4.13 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-), 4.12-4.05 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-), 3.86-3.80 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-), 3.70-3.58 (20H, m), 3.35 (2H, t, *J* = 4.9 Hz, -OCH<sub>2</sub>-), 2.39 (1H, dd, *J* = 15.2, 6.9 Hz), 2.24 (1H, dd, *J* = 15.2, 6.3 Hz), 1.70-1.65 (2H, m), 1.53 (6H, d, *J* = 6.9 Hz, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.43 (9H, s, -(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.36 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1.35-1.34 (1H, m), 1.30 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1.05 (1H, q, *J* = 12.0 Hz).
- <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 170.2, 166.9, 164.6, 162.3 (d, *J* = 246.3 Hz), 142.2, 141.3, 134.5, 133.1 (d, *J* = 8.4 Hz), 130.6, 129.1, 129.0, 128.5, 128.0 (d, *J* = 3.6 Hz), 127.8, 126.8, 121.8, 118.5, 115.4 (d, *J* = 21.4 Hz), 114.8, 98.7, 80.7, 70.6, 70.6, 70.5, 70.5, 70.2, 70.0, 69.9, 66.4, 65.9, 50.6, 42.4, 40.9, 39.7, 38.0, 35.9, 29.9, 29.7, 28.1, 26.0, 21.6, 21.4, 19.6;
- HRMS (ESI-TOF) calcd for C<sub>51</sub>H<sub>67</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub>+Na: 965.4795; found: 965.4792 (M+Na)<sup>+</sup>.

*tert*-butyl

2-((4*R*,6*R*)-6-(2-(3-((4-((14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecyl)carbamoyl)phenyl)carbamoyl)-5-(4-fluorophenyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1*H*-pyrrol-1-yl)ethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-yl)acetate (**H7-5**)



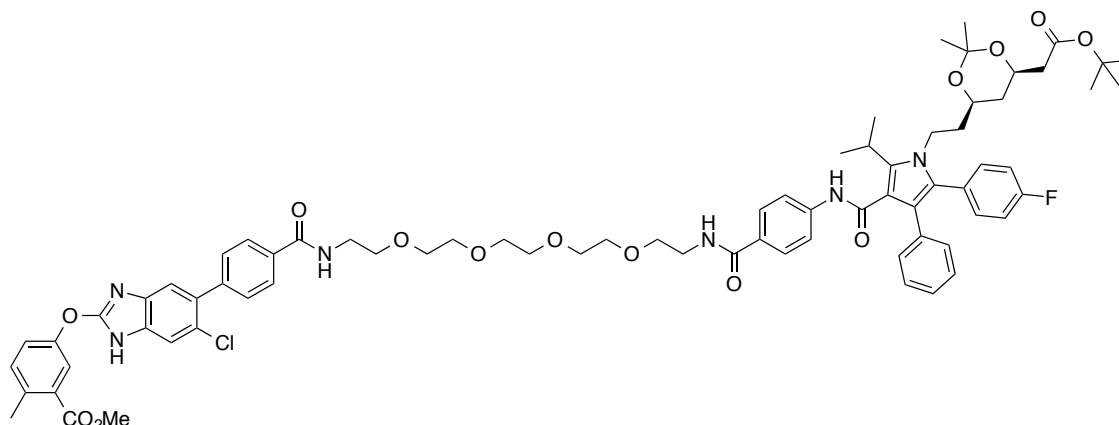
**H6-5** (521 mg, 0.552 mmol) was dissolved in THF (4.0 mL) and H<sub>2</sub>O (600  $\mu$ L) and added PPh<sub>3</sub> (217 mg,

0.829 mmol) at room temperature. The solution was stirred at ambient temperature for 39 h. The solution was concentrated, and the residue was purified with silica gel column chromatography (solvent:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 10:1$  to  $1:1$ ) to afford **H7-5** as a white amorphous (402 mg, 79%).

- $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.65 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, Ar-H), 7.22-7.13 (7H, m), 7.11 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, Ar-H), 7.05-6.98 (4H, m), 4.19-4.13 (1H, m,  $-\text{CH}_2-$ ), 4.11-4.05 (1H, m,  $-\text{CH}_2-$ ), 3.86-3.81 (1H, m,  $-\text{CH}_2-$ ), 3.70-3.58 (19H, m), 3.48 (2H, t,  $J = 5.2$  Hz,  $-\text{OCH}_2-$ ), 2.81 (2H, d,  $J = 5.2$  Hz), 2.38 (1H, dd,  $J = 15.5, 6.9$  Hz), 2.24 (1H, dd,  $J = 15.5, 6.3$  Hz), 1.72-1.64 (4H, m), 1.53 (6H, d,  $J = 7.4$  Hz,  $-(\text{CH}_3)_2$ ), 1.43 (9H, s,  $-(\text{CH}_3)_3$ ), 1.36 (3H, s,  $-\text{CH}_3$ ), 1.35-1.34 (1H, m), 1.30 (3H, s,  $-\text{CH}_3$ ), 1.05 (1H, q,  $J = 11.8$  Hz).
- $^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 170.1, 166.9, 164.6, 162.2 (d,  $J = 246.3$  Hz), 142.1, 141.3, 134.5, 133.1 (d,  $J = 8.4$  Hz), 130.5, 129.1, 129.0, 128.4, 128.0 (d,  $J = 3.6$  Hz), 127.9, 126.7, 121.8, 118.4, 115.3 (d,  $J = 21.4$  Hz), 114.8, 98.6, 80.7, 73.3, 70.5, 70.5, 70.2, 70.2, 70.0, 66.3, 65.8, 42.4, 41.7, 40.9, 39.7, 38.0, 35.9, 29.9, 28.0, 26.0, 21.6, 21.4, 19.6, 18.4;
- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_{51}\text{H}_{69}\text{FN}_4\text{O}_{10}+\text{H}$ : 917.5070; found: 917.5090 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

methyl

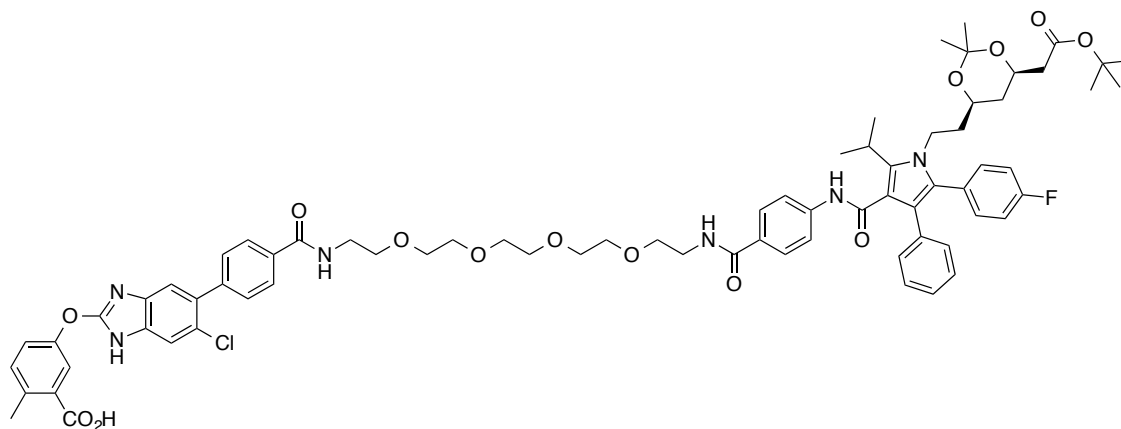
5-((5-(4-((1-(4-(1-(2-((4R,6R)-6-(2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-yl)ethyl)-5-(4-fluorophenyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxamido)phenyl)-1-oxo-5,8,11,14-tetraoxa-2-azahexadecan-16-yl)carbamoyl)phenyl)-6-chloro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoate  
(**H8-5**)



**H7-5** (188 mg, 0.205 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (2.5 mL) and added **A8** (75 mg, 0.171 mmol), EDCI (106 mg, 0.683 mmol) and HOBT (58 mg, 0.428 mmol) at 0 °C. The solution was stirred at room temperature for 21 h. The reaction solution was added water and the resultant aqueous layer was extracted with AcOEt. The combined organic layer was washed with brine and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated. The residue was purified silica gel column chromatography (solvent:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 30:1$ ) to afford **H8-5** as a white amorphous (145 mg, 53%).

- $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 10.95 (1H, s,  $-\text{NH}-$ ), 7.90-7.88 (3H, m), 7.62-7.60 (3H, m), 7.47-7.29 (5H, m), 7.21-7.05 (11H, m), 6.98-6.91 (3H, m), 6.80 (1H, s), 4.18-4.12 (1H, m,  $-\text{CH}_2-$ ), 4.11-4.05 (1H, m,  $-\text{CH}_2-$ ), 3.87-3.79 (4H, m), 3.70-3.54 (22H, m), 2.60 (3H, s,  $-\text{CH}_3$ ), 2.38 (1H, dd,  $J = 14.9, 6.9$  Hz), 2.23 (1H, dd,  $J = 15.5, 6.3$  Hz), 1.95 (2H, s), 1.52 (6H, d,  $J = 6.9$  Hz,  $-(\text{CH}_3)_2$ ), 1.43 (9H, s,  $-(\text{CH}_3)_3$ ), 1.36 (3H, s,  $-\text{CH}_3$ ), 1.33-1.32 (1H, m), 1.29 (3H, s,  $-\text{CH}_3$ ), 1.02 (1H, q,  $J = 11.8$  Hz);
- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_{74}\text{H}_{84}\text{ClFN}_6\text{O}_{14}+\text{Na}$ : 1357.5610; found: 1357.5634 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ .

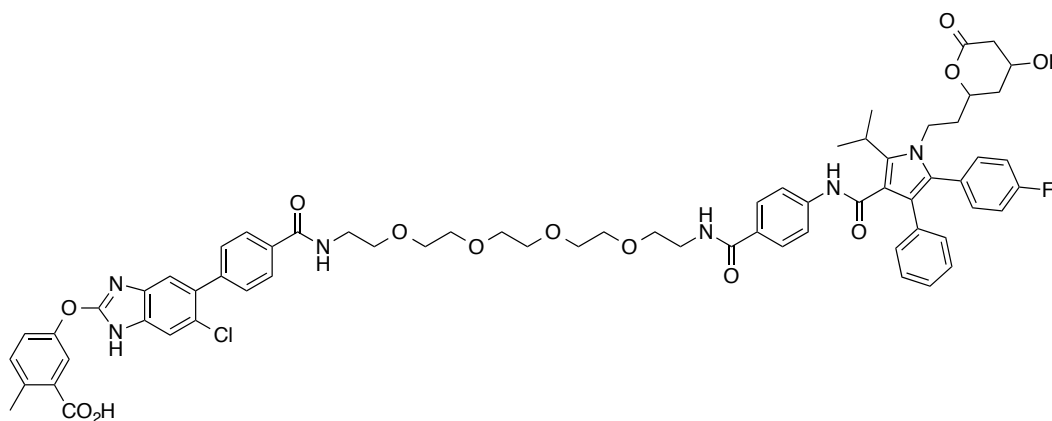
5-((5-(4-((1-(4-(1-(2-((4R,6R)-6-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-yl)ethyl)-5-(4-fluorophenyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxamido)phenyl)-1-oxo-5,8,11,14-tetraoxa-2-azahexadecan-16-yl)carbamoyl)phenyl)-6-chloro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoic acid (H9-5)



**H8-5** (124 mg, 0.0928 mmol) was dissolved in MeOH/THF/H<sub>2</sub>O (1 mL, 1:1:1) and added LiOH·H<sub>2</sub>O (5 mg, 0.111 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred at this temperature for 7 h. Then, the mixture was added 2N HCl aq. to adjust pH to 2. The aqueous layer was extracted with AcOEt, and the combined organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified with silica gel column chromatography (solvent: CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 15:1) to afford **H9-5** as a white solid (31 mg, 25%).

- <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.83 (1H, s), 7.81 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, Ar-H), 7.63 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, Ar-H), 7.42-7.30 (5H, m), 7.16-7.07 (12H, m), 6.99-6.95 (2H, m), 4.18-4.12 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-), 4.10-4.04 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-), 3.85-3.78 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-), 3.66-3.54 (22H, m), 2.43 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 2.38 (1H, dd, *J* = 15.5, 6.9 Hz), 2.23 (1H, dd, *J* = 15.2, 6.0 Hz), 1.67-1.62 (2H, m), 1.51 (6H, d, *J* = 6.9 Hz, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.43 (9H, s, -(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.35 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1.33-1.32 (1H, m), 1.29 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1.03 (1H, q, *J* = 11.8 Hz).
- HRMS (ESI-TOF) calcd for C<sub>73</sub>H<sub>82</sub>ClFN<sub>6</sub>O<sub>14</sub>+Na: 1343.5454; found: 1343.5438 (M+Na)<sup>+</sup>.

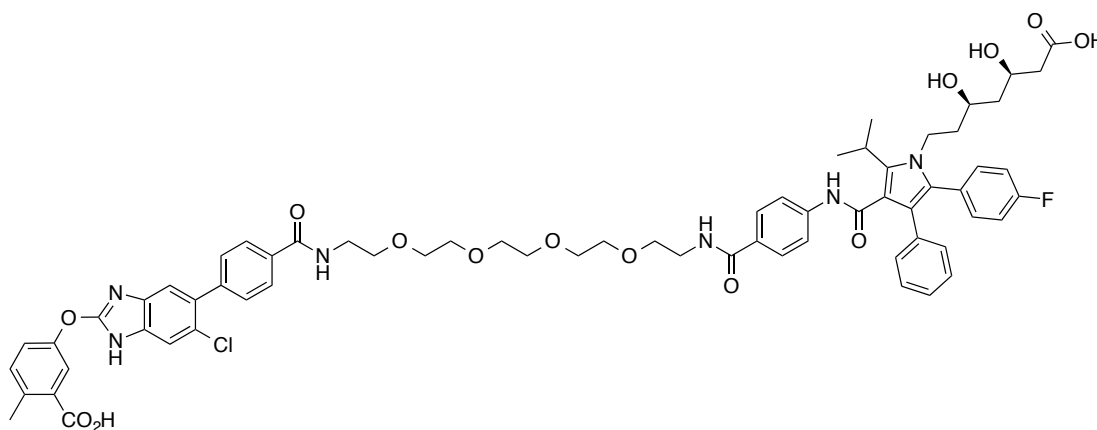
5-((6-chloro-5-(4-((1-(4-(5-(4-fluorophenyl)-1-(2-(4-hydroxy-6-oxotetrahydro-2H-pyran-2-yl)ethyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1H-pyrrole-3-carboxamido)phenyl)-1-oxo-5,8,11,14-tetraoxa-2-azahexadecan-16-yl)carbamoyl)phenyl)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoic acid (H10-5)



**H9-5** (31 mg, 0.0235 mmol) was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1.2 mL) and added trifluoroacetic acid (18  $\mu\text{L}$ , 0.235 mmol) at 0 °C. The solution was stirred at room temperature for 36h. Then, the solution was diluted with toluene and trifluoroacetic acid was removed in vacuo. The residue was purified with silica gel column chromatography (solvent:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 10:1$ ) to afford **H10-5** as a white solid (13 mg, 46%).

- $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.80-7.71 (4H, m), 7.60 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, Ar-H), 7.40-7.38 (3H, m), 7.34-7.22 (5H, m), 7.13-7.09 (2H, m), 7.00-6.90 (7H, m), 4.45-4.41 (1H, m), 4.07-4.03 (2H, m), 3.96-3.90 (1H, m), 3.56-3.46 (20H, m), 3.41 (2H, t,  $J = 5.2$  Hz,  $-\text{OCH}_2-$ ), 3.29-3.23 (1H, m), 2.58-2.53 (1H, m), 2.50 (3H, s,  $-\text{CH}_3$ ), 2.37 (1H, d,  $J = 17.8$  Hz), 1.74-1.65 (2H, m), 1.61-1.49 (2H, m), 1.36 (6H, d,  $J = 7.4$  Hz,  $-\text{CH}_3$ );
- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_{66}\text{H}_{68}\text{ClFN}_6\text{O}_{13}$  -H: 1205.4433; found: 1205.4409 (M-H).

5-((5-(4-((1-(4-(1-((3*R*,5*R*)-6-carboxy-3,5-dihydroxyhexyl)-5-(4-fluorophenyl)-2-isopropyl-4-phenyl-1*H*-pyrrole-3-carboxamido)phenyl)-1-oxo-5,8,11,14-tetraoxa-2-azahexadecan-16-yl)carbamoyl)phenyl)-6-chloro-1*H*-benzo[d]imidazol-2-yl)oxy)-2-methylbenzoic acid (**HA5**)



**H10-5** (10 mg, 0.00814 mmol) was dissolved in  $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$  (200  $\mu\text{L}$ , 5:1) and added  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (1.2 mg, 0.0163 mmol) at room temperature. The mixture was stirred at this temperature for 7 h. Then,  $\text{AcOEt}$  was added to the solution, and a white solid was precipitated. The precipitate was filtered and washed with  $\text{MeOH}$ , water and  $\text{AcOEt}$  to afford **HA5** (6 mg, 60%).

- $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 10.06 (1H, s,  $-\text{NH}-$ ), 8.53 (1H, t,  $J = 5.2$  Hz,  $-\text{CONH}-$ ), 8.34 (1H, t,  $J = 5.2$  Hz,  $-\text{CONH}-$ ), 7.86 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, Ar-H), 7.71 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, Ar-H), 7.57-7.56 (3H, m), 7.46 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, Ar-H), 7.38 (1H, s), 7.23-7.11 (7H, m), 7.05-6.94 (5H, m), 3.94-3.88 (1H, m), 3.75-3.69 (2H, m), 3.53-3.40 (24H, m), 2.05 (1H, dd,  $J = 14.9, 4.0$  Hz), 1.96-1.91 (1H, m), 1.59-1.54 (1H, m), 1.50-1.44 (1H, m), 1.38-1.34 (1H, m), 1.30 (6H, d,  $J = 6.9$  Hz,  $-\text{CH}_3$ ), 1.22-1.19 (2H, m);
- HRMS (ESI-TOF) calcd for  $\text{C}_{66}\text{H}_{70}\text{ClFN}_6\text{O}_{14}$  -H: 1223.4539; found: 1223.4548 (M-H).

## 2. Biology

### 2.1 Cell culture

HEK293 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin and streptomycin at 37 °C in a humidified incubator (5% CO<sub>2</sub>). These cells were used for experiments within 5-20 passages.

### 2.2 Western blotting

A solution of recombinant proteins or a cell lysate used in phosphorylation inducing assay was boiled for 5 min with Laemmli buffer (2% SDS, 50 mM Tris pH6.8, 0.1 M DTT, 10% glycerol, 0.02% bromophenol blue) ,and the sample was resolved by SDS-PAGE with SuperSep™ Ace 5-12% (Wako Pure Chemical Industries, 199-15191) and transferred onto PVDF membrane. After blocking with TBS-T (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5) containing 1% bovine serum albumin, the transblotted membrane was probed with Phostag® reagent (Wako Pure Chemical Industries, BTL-104) or anti-phospho ACC Ser79 (Cell Signaling, #3661, 1/1500), anti-phospho-FOXO3a Ser413 (Cell Signaling, #8174, 1/1000), anti-phospho-Raptor Ser792 (Cell Signaling, #2083, 1/1000) and anti-Rabbit IgG antibody (Cell Signaling, #7074, 1/2000) in Can Get Signal® solution (Toyobo, NKB-101). After the probing, the membrane was washed with TBST, and the immunoblots were visualized by enhanced chemiluminescence with Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, WBKL0500).

### 2.3 *in vitro* AMPK activation assay

AMPK ( $\alpha 1/\beta 1/\gamma 1$  or  $\alpha 2/\beta 1/\gamma 1$ ) activities were measured by FRET-based AMPK activity assay (Invitrogen, Z-Lyte kinase assay kit, PV4644). This assay was performed in accordance with manufacture's protocol. Briefly, recombinant AMPK (0.44.2 ng/well) and FRET-peptide substrate were mixed in Z-Lyte kinase buffer and transferred to 384-well microplate. Then, test compounds (dissolved in DMSO) and ATP were added in the solution to start the kinase reaction. The reaction solution was incubated at 25 °C for 1 h and then, development reagent was added to each wells. The resultant was further incubated for 1 h at the same temperature. Stop reagent was added, and the plate was immediately measured the fluorescent signals. The signal was converted to % phosphorylation according to the manufacturer's calculation procedure. EC<sub>200</sub> values (compound concentrations leading to a 2-fold AMPK activity increase) were calculated from the dose-response curve.

### 2.4 *in vitro* ACC inhibition assay

The enzymatic activity of ACC2 was determined by means of an ATP consumption assay. The assay was performed using 30 mM HEPES buffer (pH 7.5), 18 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.0 mg/mL BSA, 0.5 μM ATP, 1 mM DTT, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM sodium citrate, 0.5 mM acetyl-CoA, 1% DMSO, and 50 ng of enzyme (human ACC2, BPS Bioscience, #50201) per well (96-well half plate). The ACC inhibitor (dissolved in DMSO) was added at concentrations between 0 and 100 μM. The reaction was started by addition of enzyme (50 ng/well) followed by incubation at 37 °C for 90 min. Unconverted ATP was determined using ATP monitoring reagent (Lonza, ViaLight plus kit, LT07) according to the manufacturer's instructions. IC<sub>50</sub> values were calculated from the dose-response curves.

### 2.4 *in vitro* HMGR inhibition assay

HMGR inhibitory activity was measured by means of quantification of un-converted NADPH, which is co-substrate of HMGR reaction (Biovision, HMG-CoA Reductase Activity/Inhibitor Screening Kit, K588-100). Briefly, recombinant HMGR (3.5 μg/well) and test inhibitors (dissolved in DMSO) were diluted in assay buffer and transferred to the wells. Then, HMG-CoA and NADPH were added, and the plate was immediately measure the absorbance (340 nm) of NADPH+ by the minute to evaluate the kinetic

activity of HMGR. The equation designated by manufacturer's protocol was used to calculate the inhibitory activities (% inhibition). IC<sub>50</sub> values were calculated from the dose-response curves.

### **2.5 Evaluation of phosphorylation inducing activities to recombinant proteins**

Recombinant AMPK (Invitrogen, PV4672 ( $\alpha 1/\beta 1/\gamma 1$ ) or Cyclex, #CY-SEA21 ( $\alpha 2/\beta 1/\gamma 1$ )), target protein (human ACC2, BPS Bioscience, #50201 or human HMGR, Cayman Chemical, Item No. 14944) and test compounds were mixed in kinase buffer containing Mg<sup>2+</sup>. Then, ATP (0.8-1 mM) was added to start the kinase reaction. The solution was incubated at 37 °C for 2 h. The reaction solution was added Laemmli buffer, and the resultant was boiled at 100 °C to stop the reaction. Then, proteins were resolved with electrophoresis and transferred to PVDF membrane. The phosphorylated proteins were quantified with Phostag<sup>®</sup> reagent, which can detect phosphoryl group on proteins.

### **2.5 Evaluation of phosphorylation inducing activities in cell lysate**

Cultured HEK293 cells (~80% confluent) were washed with PBS and lysed using SDS lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA and 50 mM Tris, pH 8.1) containing protease and phosphatase inhibitor cocktail. Protein concentrations were determined using BCA protein assay. This cell lysate was diluted with kinase buffer to the concentration of 1.5 mg/ml and then, test compounds and ATP (2 mM) were added to the solution. This solution was incubated at 37 °C for 2 h. The reaction solution was added Laemmli buffer, and the resultant was boiled at 100 °C to stop the reaction. Then, proteins were resolved with electrophoresis and transferred to PVDF membrane. Phosphorylated AMPK substrates were quantified with corresponding phosphorylated protein-specific antibodies to evaluate the phosphorylation inducing activities of the compounds.





## References

- <sup>1</sup> Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ Jr. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *1*; *44*, 7342.
- <sup>2</sup> Yan JX, Packer NH, Gooley AA, Williams KL. Protein phosphorylation: technologies for the identification of phosphoamino acids. *J. Chromatogr.* **1998**, *A 808*, 23.
- <sup>3</sup> M. Mann, S. E. Ong, M. Gronborg, H. Steen, O. N. Jensen, A. Pandey, Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 261.
- <sup>4</sup> Hunter T, Plowman GD. The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci.* **1997**, *22*, 18.
- <sup>5</sup> Cohen P. The origins of protein phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4*, E127.
- <sup>6</sup> Johnson LN, Lewis RJ. Structural basis for control by phosphorylation. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2209.
- <sup>7</sup> Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science.* **2002**, *6*, 1912.
- <sup>8</sup> McKay MM, Morrison DK. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene.* **2007**, *26*, 3113.
- <sup>9</sup> M Suganuma, H Fujiki, H Suguri, S Yoshizawa, M Hirota, M Nakayasu, M Ojika, K Wakamatsu, K Yamada, and T Sugimura. Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1988**, *85*, 1768.
- <sup>10</sup> Nishiwaki-Matsushima R, Ohta T, Nishiwaki S, Suganuma M, Kohyama K, Ishikawa T, Carmichael WW, Fujiki H. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1992**, *118*, 420.
- <sup>11</sup> Wu P, Nielsen TE, Clausen MH. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36*, 422.
- <sup>12</sup> Weikel KA, Ruderman NB, Cacicedo JM. Unraveling the actions of AMP-activated protein kinase in metabolic diseases: Systemic to molecular insights. *Metabolism.* **2016**, *65*, 634.
- <sup>13</sup> Roskoski R Jr. STI-571: an anticancer protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *309*, 709.
- <sup>14</sup> Roskoski R Jr. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacol. Res.* **2015**, *100*, 1.
- <sup>15</sup> Wilson RC, Doudna JA. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu. Rev. Biophys.* **2013**, *42*, 217.
- <sup>16</sup> Chacko BM, Qin B, Correia JJ, Lam SS, de Caestecker MP, Lin K. The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization. *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 248.
- <sup>17</sup> Potter LR, Hunter T. Phosphorylation of the kinase homology domain is essential for activation of the A-type natriuretic peptide receptor. *Mol. Cell Biol.* **1998**, *18*, 2164.
- <sup>18</sup> Hao M, Lowy AM, Kapoor M, Deffie A, Liu G, Lozano G. Mutation of phosphoserine 389 affects p53 function in vivo. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 29380.
- <sup>19</sup> Muir TW, Sondhi D, Cole PA. Expressed protein ligation: a general method for protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1998**, *95*, 6705.
- <sup>20</sup> Dawson PE, Muir TW, Clark-Lewis I, Kent SB. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science.* **1994**, *266*, 776.
- <sup>21</sup> Carling D, Aguan K, Woods A, Verhoeven AJ, Beri RK, Brennan CH, Sidebottom C, Davison MD, Scott J. Mammalian AMP-activated protein kinase is homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 11442.
- <sup>22</sup> Dasgupta B, Chhipa RR<sup>2</sup>. Evolving Lessons on the Complex Role of AMPK in Normal Physiology and Cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* **2016**, *37*, 192.
- <sup>23</sup> Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy.

- Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 774.
- <sup>24</sup> Mahlapuu M, Johansson C, Lindgren K, Hjälm G, Barnes BR, Krook A, Zierath JR, Andersson L, Marklund S. Expression profiling of the gamma-subunit isoforms of AMP-activated protein kinase suggests a major role for gamma3 in white skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2004**, *286*, E194.
- <sup>25</sup> Puliniilkunnit T, He H, Kong D, Asakura K, Peroni OD, Lee A, Kahn BB. Adrenergic regulation of AMP-activated protein kinase in brown adipose tissue in vivo. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 8798.
- <sup>26</sup> Putman CT, Martins KJ, Gallo ME, Lopaschuk GD, Pearcey JA, MacLean IM, Saranchuk RJ, Pette D. Alpha-catalytic subunits of 5'AMP-activated protein kinase display fiber-specific expression and are upregulated by chronic low-frequency stimulation in rat muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2007**, *293*, R1325.
- <sup>27</sup> Quentin T, Kitz J, Steinmetz M, Poppe A, Bär K, Krätzner R. Different expression of the catalytic alpha subunits of the AMP activated protein kinase--an immunohistochemical study in human tissue. *Histol. Histopathol.* **2011**, *26*, 589.
- <sup>28</sup> Turnley AM, Stapleton D, Mann RJ, Witters LA, Kemp BE, Bartlett PF. Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. *J. Neurochem.* **1999**, *72*, 1707.
- <sup>29</sup> Li J, Li S, Wang F, Xin F. Structural and biochemical insights into the allosteric activation mechanism of AMP-activated protein kinase. *Chem. Biol. Drug Des.* **2016**, doi: 10.1111/cbdd.12897
- <sup>30</sup> Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M, Carling D. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr. Biol.* **2003**, *13*, 2004.
- <sup>31</sup> Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, Johnstone SR, Carlson M, Carling D. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab.* **2005**, *2*, 21.
- <sup>32</sup> Xie M, Zhang D, Dyck JR, Li Y, Zhang H, Morishima M, Mann DL, Taffet GE, Baldini A, Khoury DS, Schneider MD. A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2006**, *103*, 17378.
- <sup>33</sup> Steinberg GR, Michell BJ, van Denderen BJ, Watt MJ, Carey AL, Fam BC, Andrikopoulos S, Proietto J, Görgün CZ, Carling D, Hotamisligil GS, Febbraio MA, Kay TW, Kemp BE. Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab.* **2006**, *4*, 465.
- <sup>34</sup> Wu Y, Song P, Xu J, Zhang M, Zou MH. Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 9777.
- <sup>35</sup> Xiao B, Heath R, Saiu P, Leiper FC, Leone P, Jing C, Walker PA, Haire L, Eccleston JF, Davis CT, Martin SR, Carling D, Gamblin SJ. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature.* **2007**, *449*, 496.
- <sup>36</sup> Meng S, Cao J, He Q, Xiong L, Chang E, Radovick S, Wondisford FE, He L. Metformin activates AMP-activated protein kinase by promoting formation of the  $\alpha\beta\gamma$  heterotrimeric complex. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 3793.
- <sup>37</sup> Gowans GJ, Hawley SA, Ross FA, Hardie DG. AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell Metab.* **2013**, *18*, 556.
- <sup>38</sup> Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Mäkelä TP, Alessi DR, Hardie DG. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J. Biol.* **2003**, *2*, 28.
- <sup>39</sup> Dowling RJ, Goodwin PJ, Stambolic V. Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment. *BMC Med.* **2011**, *9*, 33.
- <sup>40</sup> Quinn BJ, Kitagawa H, Memmott RM, Gills JJ, Dennis PA. Repositioning metformin for cancer prevention and treatment. *Trends Endocrinol. Metab.* **2013**, *24*, 469.
- <sup>41</sup> Zang M, Zuccollo A, Hou X, Nagata D, Walsh K, Herscovitz H, Brecher P, Ruderman NB, Cohen RA. AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of

- metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 47898.
- <sup>42</sup> Rana S, Blowers EC, Natarajan A. Small molecule adenosine 5'-monophosphate activated protein kinase (AMPK) modulators and human diseases. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2.
- <sup>43</sup> Witters LA. **The blooming of the French lilac.** *J. Clin. Invest.* **2001**, *108*, 1105.
- <sup>44</sup> Dykens JA, Jamieson J, Marroquin L, Nadanaciva S, Billis PA, Will Y. Biguanide-induced mitochondrial dysfunction yields increased lactate production and cytotoxicity of aerobically-poised HepG2 cells and human hepatocytes in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *233*, 203.
- <sup>45</sup> Zang M, Xu S, Maitland-Toolan KA, Zuccollo A, Hou X, Jiang B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Cohen RA. Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes.* **2006**, *55*, 2180.
- <sup>46</sup> Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature.* **2006**, *444*, 337.
- <sup>47</sup> Lee YS, Kim WS, Kim KH, Yoon MJ, Cho HJ, Shen Y, Ye JM, Lee CH, Oh WK, Kim CT, Hohnen-Behrens C, Gosby A, Kraegen EW, James DE, Kim JB. Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states. *Diabetes.* **2006**, *55*, 2256.
- <sup>48</sup> Foretz M, Viollet B. New promises for metformin: advances in the understanding of its mechanisms of action. *Med. Sci. (Paris).* **2014**, *30*, 82.
- <sup>49</sup> Hardie DG. AMP-activated protein kinase as a drug target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2007**, *47*, 185.
- <sup>50</sup> Rothbart SB, Racanelli AC, Moran RG. Pemetrexed indirectly activates the metabolic kinase AMPK in human carcinomas. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 10299.
- <sup>51</sup> Cool B, Zinker B, Chiou W, Kifle L, Cao N, Perham M, Dickinson R, Adler A, Gagne G, Iyengar R, Zhao G, Marsh K, Kym P, Jung P, Camp HS, Frevert E. Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab.* **2006**, *3*, 403.
- <sup>52</sup> Göransson O, McBride A, Hawley SA, Ross FA, Shpiro N, Foretz M, Viollet B, Hardie DG, Sakamoto K. Mechanism of action of A-769662, a valuable tool for activation of AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 32549.
- <sup>53</sup> Mooney MH, Fogarty S, Stevenson C, Gallagher AM, Palit P, Hawley SA, Hardie DG, Coxon GD, Waigh RD, Tate RJ, Harvey AL, Furman BL. Mechanisms underlying the metabolic actions of galegine that contribute to weight loss in mice. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 1669.
- <sup>54</sup> Gómez-Galeno JE, Dang Q, Nguyen TH, Boyer SH, Grote MP, Sun Z, Chen M, Craigo WA, van Poelje PD, MacKenna DA, Cable EE, Rolzin PA, Finn PD, Chi B, Linemeyer DL, Hecker SJ, Erion MD. A Potent and Selective AMPK Activator That Inhibits de Novo Lipogenesis. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 478.
- <sup>55</sup> Xiao B, Sanders MJ, Carmena D, Bright NJ, Haire LF, Underwood E, Patel BR, Heath RB, Walker PA, Hallen S, Giordanetto F, Martin SR, Carling D, Gamblin SJ. Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 3017.
- <sup>56</sup> Schiewer MJ, Knudsen KE. AMPed up to treat prostate cancer: novel AMPK activators emerge for cancer therapy. *EMBO Mol. Med.* **2014**, *6*, 439.
- <sup>57</sup> Bultot L, Guigas B, Von Wilamowitz-Moellendorff A, Maisin L, Vertommen D, Hussain N, Beullens M, Guinovart JJ, Foretz M, Viollet B, Sakamoto K, Hue L, Rider MH. AMP-activated protein kinase phosphorylates and inactivates liver glycogen synthase. *Biochem. J.* **2012**, *443*, 193.
- <sup>58</sup> Carling D, Zammit VA, Hardie DG. A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett.* **1987**,

223, 217.

- <sup>59</sup> van Veelen W<sup>1</sup>, Korsse SE, van de Laar L, Peppelenbosch MP. The long and winding road to rational treatment of cancer associated with LKB1/AMPK/TSC/mTORC1 signaling. *Oncogene*. **2011**, *30*, 2289.
- <sup>60</sup> Joe SG, Yoon YH, Choi JA, Koh JY. Anti-angiogenic effect of metformin in mouse oxygen-induced retinopathy is mediated by reducing levels of the vascular endothelial growth factor receptor Flk-1. *PLoS One*. **2015**, *10*, e0119708
- <sup>61</sup> Takemura Y, Osuga Y, Yoshino O, Hasegawa A, Hirata T, Hirota Y, Nose E, Morimoto C, Harada M, Koga K, Tajima T, Yano T, Taketani Y. Metformin suppresses interleukin (IL)-1beta-induced IL-8 production, aromatase activation, and proliferation of endometrial stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2007**, *92*, 3213.
- <sup>62</sup> Eikawa S, Nishida M, Mizukami S, Yamazaki C, Nakayama E, Udono H. Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2015**, *112*, 1809.
- <sup>63</sup> Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW. Network organization of the human autophagy system. *Nature*. **2010**, *466*, 68.
- <sup>64</sup> Lee JW, Park S, Takahashi Y, Wang HG. The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PLoS One*. **2010**, *5*, e15394.
- <sup>65</sup> Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 1016.
- <sup>66</sup> Sato R, Goldstein JL, Brown MS. Replacement of serine-871 of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase prevents phosphorylation by AMP-activated kinase and blocks inhibition of sterol synthesis induced by ATP depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1993**, *90*, 9261.
- <sup>67</sup> Wakil SJ, Stoops JK, Joshi VC. Fatty acid synthesis and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 537.
- <sup>68</sup> Munday MR. Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochem. Soc. Trans.* **2002**, *30*, 1059.
- <sup>69</sup> Barber MC, Price NT, Travers MT. Structure and regulation of acetyl-CoA carboxylase genes of metazoa. *Biochim. Biophys. Acta*. **2005**, *1733*, 1.
- <sup>70</sup> Tong L. Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cell Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 1784.
- <sup>71</sup> Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A, Bastin J. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol. Aspects Med.* **2004**, *25*, 495.
- <sup>72</sup> Rubink DS, Winder WW. Effect of phosphorylation by AMP-activated protein kinase on palmitoyl-CoA inhibition of skeletal muscle acetyl-CoA carboxylase. *J. Appl. Physiol.* **2005**, *98*, 1221.
- <sup>73</sup> Friedman JM. A war on obesity, not the obese. *Science*. **2003**, *299*, 856.
- <sup>74</sup> Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*. **2004**, *116*, 337.
- <sup>75</sup> Lazar MA. How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science*. **2005**, *307*, 373.
- <sup>76</sup> Harwood HJ Jr. Treating the metabolic syndrome: acetyl-CoA carboxylase inhibition. *Expert Opin. Ther. Targets*. **2005**, *9*, 267.
- <sup>77</sup> Corbett JW. Review of recent acetyl-CoA carboxylase inhibitor patents: mid-2007-2008. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2009**, *19*, 943.
- <sup>78</sup> Sharpe LJ, Brown AJ. Controlling cholesterol synthesis beyond 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR). *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 18707.
- <sup>79</sup> Sun LP, Seemann J, Goldstein JL, Brown MS. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2007**, *104*, 6519.
- <sup>80</sup> Skalnik DG, Narita H, Kent C, Simoni RD. The membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase confers endoplasmic reticulum localization and sterol-regulated degradation onto beta-galactosidase. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 6836.

- <sup>81</sup> Clarke PR, Hardie DG. Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver. *EMBO J.* **1990**, *9*, 2439.
- <sup>82</sup> Hardie DG, Hawley SA, Scott JW. AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. *J. Physiol.* **2006**, *574(Pt 1)*, 7.
- <sup>83</sup> Istvan ES, Palnitkar M, Buchanan SK, Deisenhofer J. Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. *EMBO J.* **2000**, *9*, 819.
- <sup>84</sup> Taberero L, Bochar DA, Rodwell VW, Stauffacher CV. Substrate-induced closure of the flap domain in the ternary complex structures provides insights into the mechanism of catalysis by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1999**, *96*, 7167.
- <sup>85</sup> Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinum*. *J. Antibiot. (Tokyo).* **1976**, *29*, 1346.
- <sup>86</sup> Istvan ES. Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Am. Heart J.* **2002**, *144*, S27.
- <sup>87</sup> Bingzhong Xue, Barbara B Kahn. AMPK integrates nutrient and hormonal signals to regulate food intake and energy balance through effects in the hypothalamus and peripheral tissues. *J. Physiol.* **2006**, *574(Pt 1)*, 73.
- <sup>88</sup> Goodyear LJ. The exercise pill--too good to be true? *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 1842.
- <sup>89</sup> Chen Y, Zhou K, Wang R, Liu Y, Kwak YD, Ma T, Thompson RC, Zhao Y, Smith L, Gasparini L, Luo Z, Xu H, Liao FF. Antidiabetic drug metformin (GlucophageR) increases biogenesis of Alzheimer's amyloid peptides via up-regulating BACE1 transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2009**, *106*, 3907.
- <sup>90</sup> Itoh Y, Ishikawa M, Naito M, Hashimoto Y. Protein knockdown using methyl bestatin-ligand hybrid molecules: design and synthesis of inducers of ubiquitination-mediated degradation of cellular retinoic acid-binding proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5820.
- <sup>91</sup> Itoh Y, Kitaguchi R, Ishikawa M, Naito M, Hashimoto Y. Design, synthesis and biological evaluation of nuclear receptor-degradation inducers. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 6768.
- <sup>92</sup> Tomoshige S, Hashimoto Y, Ishikawa M. Efficient protein knockdown of HaloTag-fused proteins using hybrid molecules consisting of IAP antagonist and HaloTag ligand. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 3144.
- <sup>93</sup> Xiao B, Sanders MJ, Carmena D, Bright NJ, Haire LF, Underwood E, Patel BR, Heath RB, Walker PA, Hallen S, Giordanetto F, Martin SR, Carling D, Gamblin SJ. Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 3017.
- <sup>94</sup> Corbett JW, Freeman-Cook KD, Elliott R, Vajdos F, Rajamohan F, Kohls D, Marr E, Zhang H, Tong L, Tu M, Murdande S, Doran SD, Houser JA, Song W, Jones CJ, Coffey SB, Buzon L, Minich ML, Dirico KJ, Tapley S, McPherson RK, Sugarman E, Harwood HJ Jr, Esler W. Discovery of small molecule isozyme non-specific inhibitors of mammalian acetyl-CoA carboxylase 1 and 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2383.
- <sup>95</sup> Patent, US20120270893 A1.
- <sup>96</sup> Carbonell T, Freire E. Binding thermodynamics of statins to HMG-CoA reductase. *Biochemistry.* **2005**, *44*, 11741.
- <sup>97</sup> Patent, WO2010036613A1.
- <sup>98</sup> Bagley SW, Southers JA, Cabral S, Rose CR, Bernhardson DJ, Edmonds DJ, Polivkova J, Yang X, Kung DW, Griffith DA, Bader SJ. Synthesis of 7-oxo-dihydrospiro[indazole-5,4'-piperidine] acetyl-CoA carboxylase inhibitors. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 1497.
- <sup>99</sup> Patent, WO2007054896.
- <sup>100</sup> Kinoshita E, Takahashi M, Takeda H, Shiro M, Koike T. Recognition of phosphate monoester dianion by an alkoxide-bridged dinuclear zinc(II) complex. *Dalton Trans.* **2004**, *21*, 1189.
- <sup>101</sup> Greer EL, Oskoui PR, Banko MR, Maniar JM, Gygi MP, Gygi SP, Brunet A. The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 30107.

<sup>102</sup> Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell.* **2008**, *30*, 214.

<sup>103</sup> Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T. Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 1513.

## 謝辞

本研究遂行ならびに本論文執筆にあたり、下記の方々に多大なるご協力を賜りました。本研究成果は、決して私1人の力では成し遂げられなかったものと存じます。この場をかりて心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜り、最高の研究環境を提供していただきました東京大学 分子細胞生物学研究所 生体有機化学研究分野 教授 橋本祐一先生に心より感謝申し上げます。入学当初は胎児のような存在であった私がここまでこられたのは、偏に橋本先生のおかげであります。研究者、指導者として、また、一人の人間として誠に尊敬しております。

本研究を遂行するにあたり、数多くのご指導、ご助言を頂きました分子細胞生物学研究所 准教授 石川稔先生、同講師 藤井晋也先生、同助教 山口卓男先生、谷内出友美先生、東北大学 がん化学療法薬学分野 講師 松本洋太郎先生、国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部研究員 三澤隆史氏に心より感謝申し上げます。研究に関しては勿論のこと、人間的にもとても魅力的であり、私にとっての目標となる方々でありました。今後ともどうぞ宜しくお願い申し上げます。

修士時代、主に有機合成実験に関して多大なるご指導を頂きました星薬科大学 薬品製造化学教室 教授 杉田和幸先生に厚く御礼申し上げます。

また、本研究室において研究生活を共にし、様々な刺激を与えてくださった生体有機化学研究の諸先輩方、同期、後輩達に心より感謝申し上げます。一人一人、個性にあふれ、とても楽しい共同生活を送る事ができました。また、色々のご迷惑をおかけしたと存じます。この場をかりてお詫び申し上げます。卒業後もつながりを切らずに交流できたらとても嬉しく思います。

本研究の一部は日本学術振興会の特別研究員として行った成果であります。財政的な支援をいただきました日本学術振興会に感謝いたします。

最後に、大学院進学に関して快諾して下さり、財政的に、また精神的な支えになってくださった境家の皆様心より感謝申し上げます。こうして未だに夢を追いつづけられるのも境家の皆様のご理解があつてのことと存じます。本当にありがとう。

平成 29 年 春