

PPAR γ アゴニストへの
クマリン骨格導入法の開発

2020 年度

吉川 智理

目次

略語集	2
序論	4
本論	
第1章 クマリン骨格導入法の検討	
第1節 メトキシクマリン誘導体の合成	17
第2節 ジエチルアミノクマリン誘導体の合成	37
第2章 クマリン型ロシグリタゾンの結合評価系への適用と結晶構造	
第1節 結合評価系への適用	62
第2節 X線結晶構造解析	70
結論	75
実験の部	76
謝辞	102
参考文献	103
本論文内容の誌上発表	111

略語一覽

Ac	: acetyl
Az	: azulene
Boc	: <i>tert</i> -butoxycarbonyl
Cbz	: benzyloxycarbonyl
DABCO	: 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DBU	: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DCE	: 1,2-dichloroethane
DEAD	: diethyl azodicarboxylate
DIPEA	: <i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMF	: <i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	: dimethyl sulfoxide
EC ₅₀	: half maximal (50%) effective concentration
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	: electrospray ionization
FG	: functional group
FRET	: fluorescence resonance energy transfer
IC ₅₀	: half maximal (50%) inhibitory concentration
IL	: ionic liquid
IPTG	: isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
K _d	: equilibrium dissociation constant
K _i	: inhibition constant
LBD	: ligand-binding domain
LDA	: lithium diisopropylamide
LHMDS	: lithium bis(trimethylsilyl)amide
M. W.	: microwave
mRNA	: messenger ribonucleic acid
MS	: mass spectrometry
NMR	: nuclear magnetic resonance
PDB	: protein data bank
PPAR	: peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	: PPAR response element
PTSA	: <i>p</i> -toluenesulfonic acid
rt	: room temperature

SDS-PAGE	: sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis
TBAF	: tetra- <i>n</i> -butylammonium fluoride
TBS	: <i>tert</i> -butyldimethylsilyl
TCEP	: tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEV	: tobacco etch virus
Tf	: trifluoromethylsulfonyl
TFA	: trifluoroacetic acid
THF	: tetrahydrofuran
TMS	: trimethylsilyl
Tris	: tris(hydroxymethyl)aminomethane
TZD	: thiazolidinedione
VDR	: vitamin D receptor

序 論

蛍光現象は、核酸・タンパク質検出、細胞染色、*in vivo* イメージング、細胞・酵素活性測定など生物学的研究において使用されている。¹ 実験に使用される蛍光試薬には、有機系蛍光色素や蛍光タンパク質がある。有機系蛍光色素については、これまで数多く報告されており、分析用試薬として市販もされている。^{2,3} Figure 1 に代表例を示す。

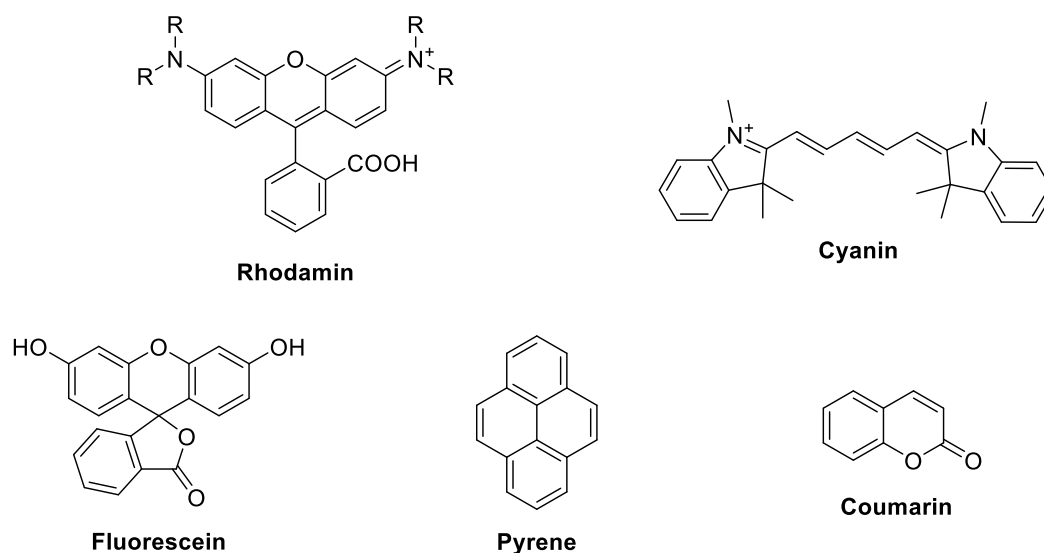


Figure 1. 代表的な有機系蛍光色素の基本骨格

代表的な蛍光団の中でも、クマリンは分子が小さいため、標識による化合物の性質や標的タンパク質への影響が少ないと考えられる。⁴ さらに、蛍光色素や蛍光増白剤などに使用されている。⁵ またクマリン骨格を有する化合物は、蛍光色素として利用される以外にも様々な用途に使われている。血栓塞栓症の予防を目的に抗凝固剤として使用されている Warfarin をはじめ、抗 HIV 活性を示す Calanolide や抗生剤の Novobiocin など、様々な生物活性を示す化合物や医薬品にクマリン骨格が含まれている (Figure 2)。⁶⁻⁸ このように医薬品化学の観点から有用である上に、有機合成化学の分野としても興味深い構造と言える。クマリン骨格を化学構造の観点からみると、ベンゼン環を母骨格として、フェノール性水酸基に由来するラクトン構造や α,β -不飽和エステル構造、*Z*-オレフィンを含んでおり、様々な合成アプローチが可能であり、世界中の有機合成化学者の興味を引き付けている。そのため、クマリン骨格の構築法に関する研究は古くから世界中で行われており、これまでにクマリン環に関する総説も数多く発表されている。⁹⁻¹³

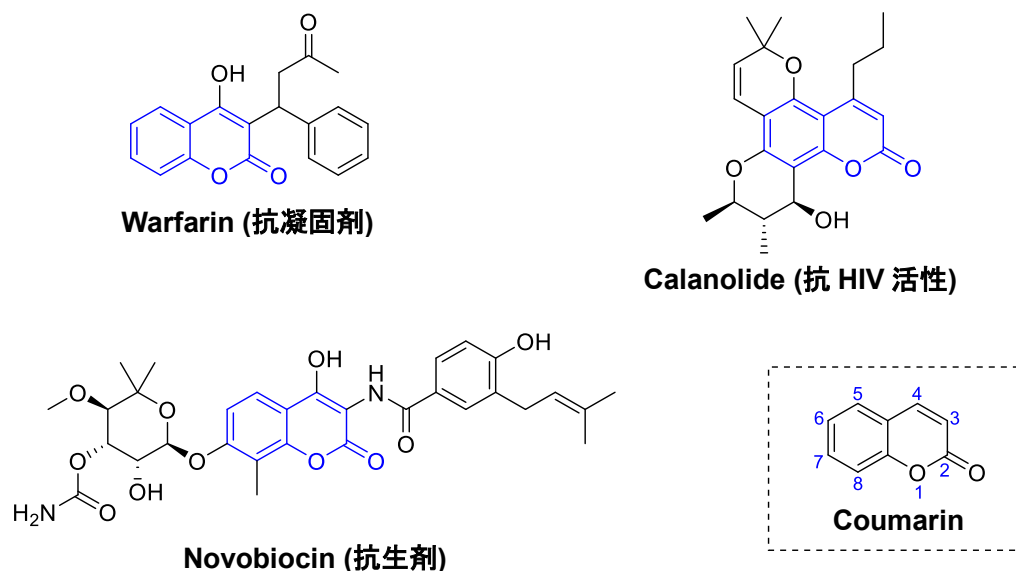
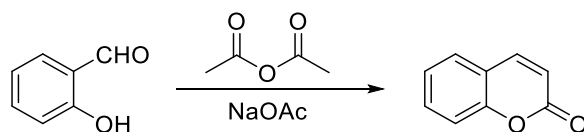


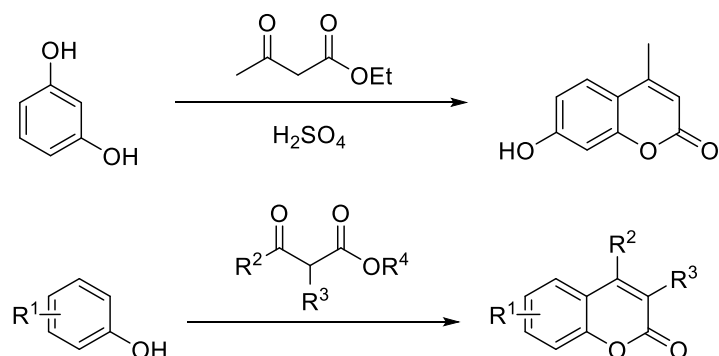
Figure 2. クマリン骨格を含む生理活性物質

クマリン骨格の合成法に関する研究の歴史は古く、19 世紀後半までさかのぼることができる。Perkin は 1868 年にサリチルアルデヒドのナトリウム塩を無水酢酸中で加熱することでクマリンが得られるワンポット合成を報告した (Scheme 1)。¹⁴ この Perkin 反応は芳香族アルデヒドを弱塩基存在下、脂肪族にもアズラクトン類の合成にも活用されている。



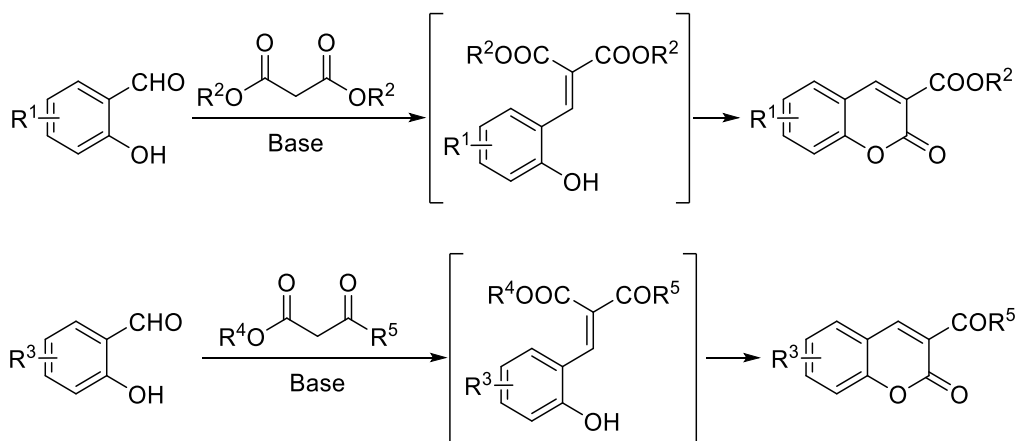
Scheme 1.¹⁴ Perkin 反応を用いたクマリン合成

Pechmann と Duisberg は濃硫酸存在下、アセト酢酸エチルとレゾルシノールを混和して、4-メチル-7-ヒドロキシクマリンを合成したことを 1883 年に報告した (Scheme 2)。¹⁵ さらに、Pechmann らはレゾルシノールとマレイン酸を反応させ、同様の反応が進行することで主生成物として 7-ヒドロキシクマリンを得た。¹⁶ その後、様々なグループで研究がなされ、フェノール類をブレンステッド酸または Lewis 酸存在下、 β -ケトエステル類を縮合させて、置換基を含むクマリン類を与える Pechmann 反応として知られている。

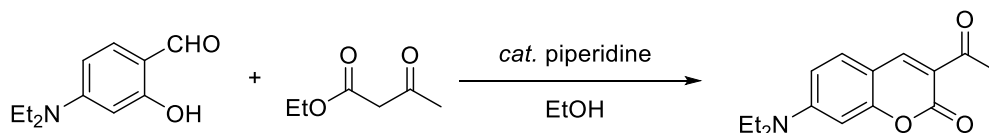


Scheme 2. Pechmann らが報告したクマリン合成 (Pechmann 反応)

また、クマリン構造の構成要素である α,β -不飽和エステル構造を合成する Knoevenagel 反応 (縮合) を用いたクマリン合成法も報告されている。弱塩基存在下、活性メチレン化合物とアルデヒド (またはケトン) から α,β -不飽和ジカルボニルおよびその類縁化合物が得られる反応である Knoevenagel 反応は、フェノール誘導体にも適用可能であり、クマリン骨格の合成に利用されている (Scheme 3)。一例として、Seferoğlu らはフェノール性水酸基を有するサリチルアルデヒドを出発原料に設定することで、Knoevenagel 反応につづく異性化、分子内環化反応を経て、3-アシルクマリン骨格の構築を報告している (Scheme 4)。¹⁷

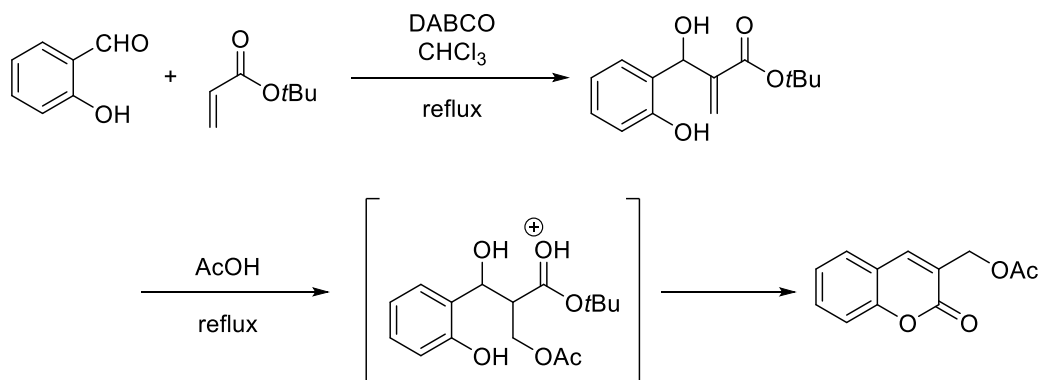


Scheme 3. Knoevenagel 反応を用いたクマリン合成



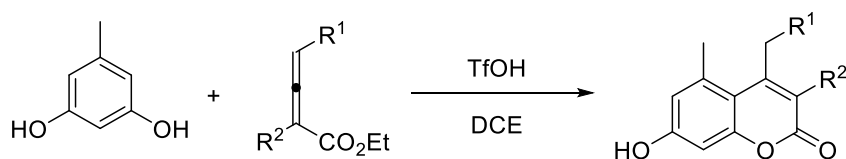
Scheme 4.¹⁷ Seferoğlu らによる Knoevenagel 反応を用いたクマリン合成

さらに前述の Knoevenagel 反応と同様に、クマリン構造内の α,β -不飽和エステル構造に着目した合成としては、Morita-Baylis-Hillman 反応を用いた合成法が報告されている。第三級アミンなどの求核触媒存在下、アクリル酸エステル（アミド）などの共役カルボニル化合物が α 位でアルデヒドやケトンなどの炭素求電子剤と C-C 単結合を形成する反応である Morita-Baylis-Hillman 反応を用いて、Kaye らのグループは、エキソメチレンを有する付加体を経てクマリン骨格を合成する反応を見出した (Scheme 5)。¹⁸

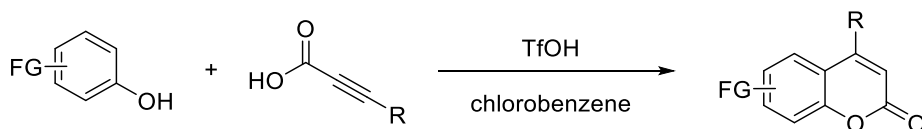


Scheme 5.¹⁸ Kaye らによる Morita-Baylis-Hillman 反応を用いたクマリン合成

また、フェノール骨格からクマリン骨格を合成するアプローチも数多く報告されている。Lee らは、ラクトン環部を構築するユニットとしてアレン¹⁹やプロピオール酸²⁰を用いて、トリフルオロメタンスルホン酸などの強酸を酸触媒として作用させることによって、クマリン骨格のワンポット合成を達成している (Scheme 6, 7)。



Scheme 6.¹⁹ Lee らによるアレンを用いたクマリン合成



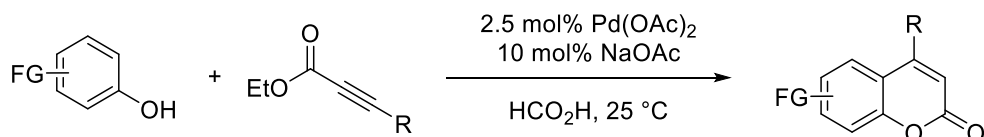
Scheme 7.²⁰ Lee らによるプロピオール酸を用いたクマリン合成

一方で、強酸など過激な反応条件を用いずにクマリン骨格を構築する反応も数多く報告^{11,12}されており、その多くは Pd, Pt, Co, Cu, Au, Fe, Ni, Rh, Ru, Zn 触媒など金属触媒を

用いて比較的穏和な反応条件で進行することが特長である。

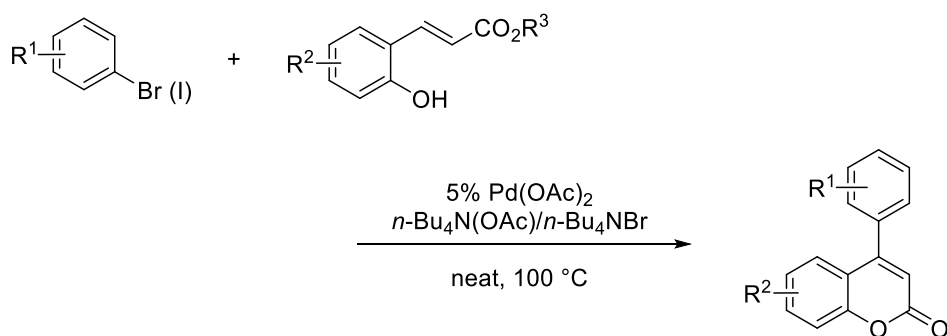
特に Pd 触媒を用いた合成例は多く、分子間/分子内ヒドロアリール化反応や溝呂木-Heck 反応に続く環化反応、分子内/分子間カルボニル化環化反応などを用いたクマリン骨格の構築法など多数報告されている。

Trost らは、1996 年に Pd 触媒による C-H 活性化を経るクマリン骨格の合成法を報告した (Scheme 8)。^{21,22} フェノールとプロピオール酸エステルから、触媒量の Pd(II)を用いて分子間ヒドロアリール化反応に続く環化反応によりクマリン環を合成した。ギ酸中ではあるものの、クマリン合成法としては比較的穏和な反応条件で反応が進行する。またアトムエコノミー²³に優れるとしている。



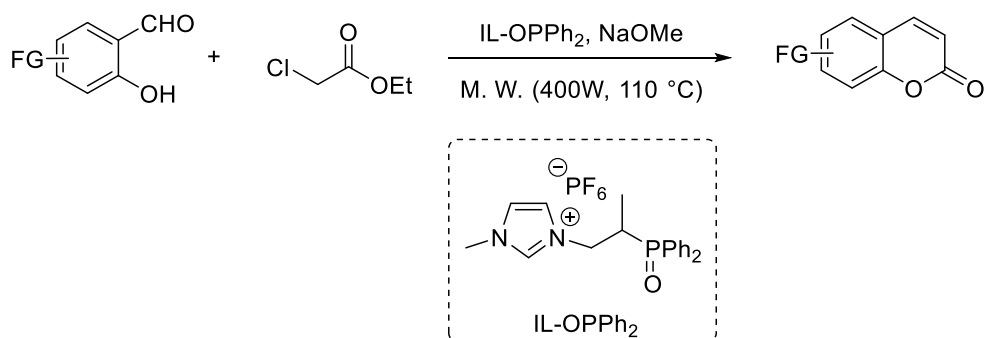
Scheme 8.^{21,22} Trost らによる分子間ヒドロアリール化/環化反応を用いたクマリン合成

さらに、同じく Pd(II)触媒を用いたカップリング反応である溝呂木-Heck 反応^{24,25}をクマリン骨格の合成に応用すると、4 位にアリール基を導入したクマリン構造を合成できることが報告された (Scheme 9)。²⁶



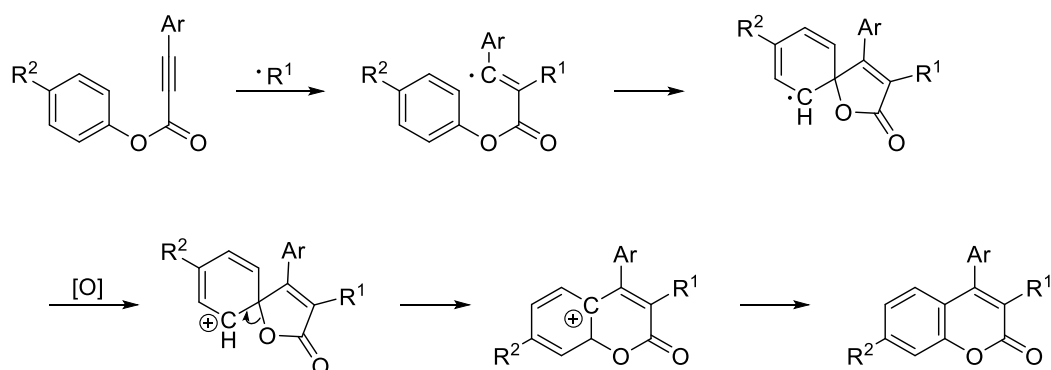
Scheme 9.²⁶ Cacchi らによる溝呂木-Heck 反応/環化反応によるクマリン合成

その他のアプローチとして、Horner–Wadsworth–Emmons タイプの反応を用いたクマリン骨格の合成例も報告されている (Scheme 10)。²⁷ 通常の Horner–Wadsworth–Emmons 反応において、精製を困難にする要因である副生成物のホスフィンオキシドの除去を、イオン液体を活用することで容易にしている。



Scheme 10.²⁷ Horner–Wadsworth–Emmons 型反応を用いたクマリン合成

また、前述のクマリン合成法はいずれも C-C 結合を形成後、最後にクマリン構造のラクトン部位 (エステル部位) を構築するアプローチである。そのため、フェノール性水酸基とエステル構造を有する環化前駆体となっている。一方で、報告例は少ないものの、C-C 結合を最終段階で構築する合成法も報告されている。その一例がラジカルカスケード反応を用いたクマリンの合成である (Scheme 11)。²⁸ Wu らのグループは、Pd 触媒を用いた酸化的カルボニル化により環化前駆体を合成した後、ワンポットで Pd 触媒を再度酸化して環化反応を行うことに成功した。²⁹



Scheme 11.²⁸ ラジカル反応を用いたクマリン合成

このように多くのクマリン合成の報告があるが、C-C 結合を伴う、反応条件が厳しい、あるいは金属触媒を用いるという反応が大勢を占める。そのためリガンドや阻害剤へのクマリン骨格の導入展開を図る場合、収束的合成への適用に不利な反応や、官能基許容性の課題、高度な有機化学の知識・経験が必要となる。

医薬品の構造を見てみると、一般的に末端の芳香環ユニットをもつ割合が高く、それらはヘテロ原子を介して結合していることが多い。医薬品化学的にコアである中央部より末端部の方が全体のコンフォメーション変化が少なく、生物活性に与える影響が少ないとの予測が成り立つ。

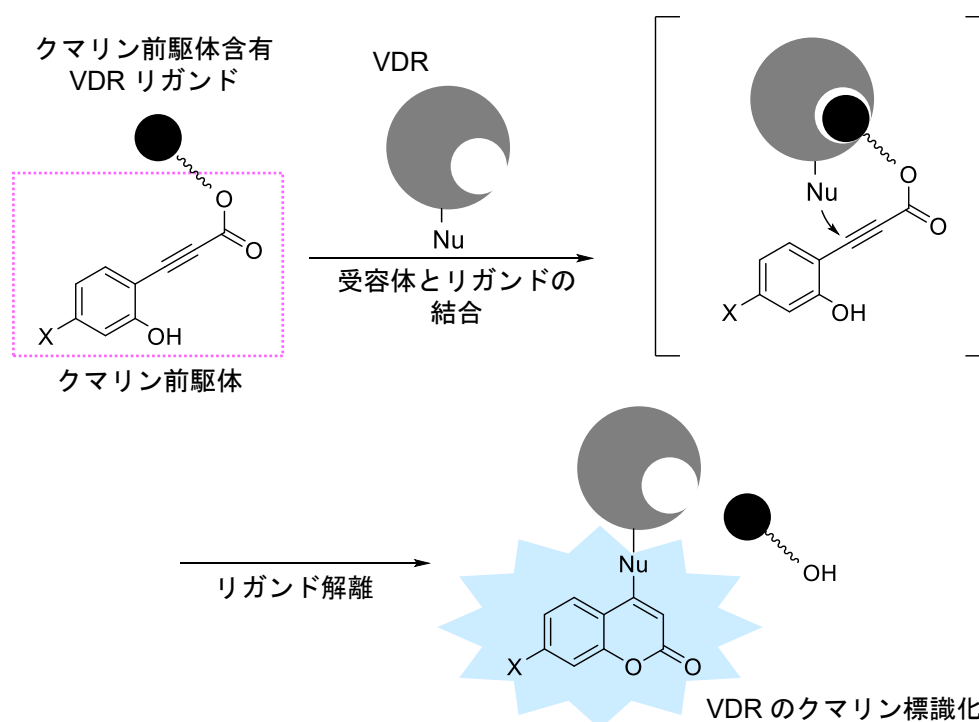
著者は、末端の芳香環ユニットの代わりにクマリンユニットを導入できれば、医薬品

の特性を維持しやすいため、蛍光標識の手法として提案できると考えた。さらに、クマリンユニットを最終工程で導入できると、既知の医薬品合成スキームが活用可能となり、合成戦略上の大きなメリットになると考えられる。

小島らは、以前ビタミンD受容体 (VDR) のアミノ酸側鎖がクマリン前駆体に求核付加反応をすることで、VDR をクマリン標識する Turn-On 型蛍光プローブを報告した (Figure 3A)。³⁰ これは、タンパク質中の求核性官能基が非蛍光性のクマリン前駆体への共役付加反応を起点として、クマリン骨格を構築する。この反応は、タンパク質とリガンドの親和性を利用した近接効果を駆動力としたものであった。

本研究では、先行研究で報告したクマリン前駆体の反応特性に着目し、低分子化合物の効率的なクマリン標識法の開発を目的とした (Figure 3B)。

A) ビタミンD受容体 (VDR) を標的とした Turn-On 型蛍光プローブ



B) 本研究の目的

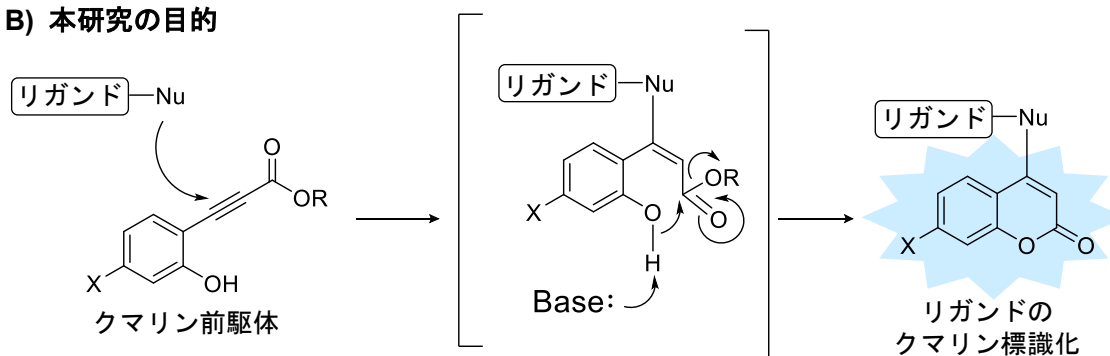


Figure 3. (A) 小島らが報告した Turn-On 型蛍光プローブ (B) 本研究の目的

また本研究においては、クマリン標識化の対象として、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor; PPAR) のリガンドであるロシグリタゾンを選択することにした。PPAR が盛んに研究されている核内受容体スーパーファミリーの一種であり、クマリン蛍光標識することで、新たな PPAR 蛍光プローブになり、PPAR γ リガンド開発の発展につながると考えたからである。

PPAR は α および β/δ 、 γ のサブタイプが同定されている。ロシグリタゾンはその中で PPAR γ 選択的なアゴニストであり、糖尿病治療薬として開発されている。³¹ これまで PPAR を標的とした受容体リガンドは、ロシグリタゾン以外にも医薬品として用いられている。それぞれ3つのサブタイプは異なる組織で発現し、標的遺伝子の転写を介して様々な生理作用を示す。それぞれのサブタイプが発現している部位を Table 1 にまとめた。

PPAR α は肝臓、心臓、筋肉、血管壁に発現し、脂質の代謝に関与する。フェノフィブラート、ベザフィブラート、シプロフィブラートなどのフィブラート系薬物が PPAR α アゴニストの医薬品として、脂質代謝異常症治療薬に使用される。ごく最近、ペマフィブラートが新たに開発されており、PPAR は新薬の標的として認知されている。³² 一般に PPAR α の活性化は遊離脂肪酸の酸化を促進し、リポタンパク質濃度を調節する複数の遺伝子の発現を制御し、抗炎症効果をもたらす。³³ また PPAR β/δ は全身に発現しているが、骨格筋とマクロファージで比較的高いレベルで発現し、脂肪酸の代謝に関与する。PPAR β/δ に対する選択的な医薬品はこれまでに開発されていない。さらに PPAR γ は脂肪組織、マクロファージ、血管平滑筋、免疫系で主に発現している。PPAR γ アゴニストであるピオグリタゾンやロシグリタゾンは、チアゾリジンジオン誘導体であり抗糖尿病薬として使用されている。これらは肝臓及び末梢のインスリン抵抗性を低下させることにより、高血糖を改善する。³⁴⁻³⁷

サブタイプ	PPAR α	PPAR β/δ	PPAR γ
発現部位	肝臓	全身	脂肪組織
	心臓		マクロファージ
	筋肉		血管平滑筋
	血管壁		免疫系

Table 1. PPAR α および β/δ 、 γ の主要な発現部位

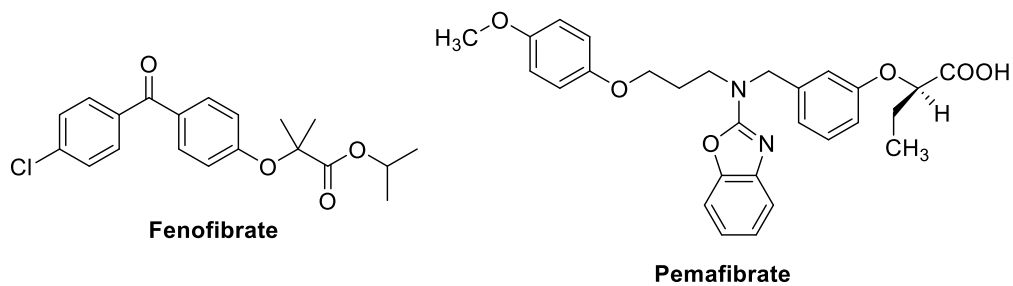


Figure 4. 医薬品として使用される PPAR α アゴニスト

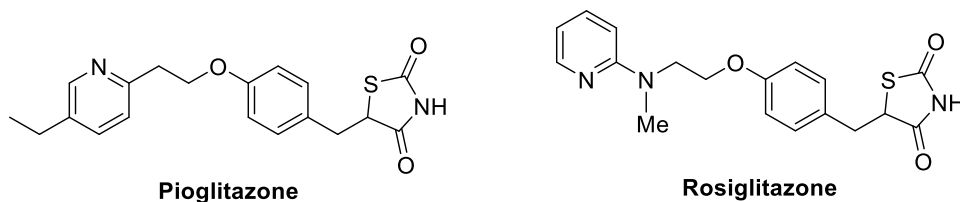


Figure 5. 医薬品として使用される PPAR γ アゴニスト

PPAR γ リガンドは医薬品として使われている化合物以外にも、多くのリガンドが報告されている。その一部を Figure 6 に示した。LT175 は PPAR γ のパーシャルアゴニストであり、PPAR α にも結合するデュアルアゴニストである。³⁸ さらにこの LT175 に関しても、置換基を変更した誘導体が合成され、さらなる研究が進められている。³⁹⁻⁴¹ またチロシンを骨格とした Farglitazar も報告されており、ピオグリタゾン、ロシグリタゾンよりも強力なアゴニストである。^{42,43} 上述の LT175 と同様に Farglitazar も PPAR α/γ のデュアルアゴニストであり、数多くの誘導体が研究されている。⁴⁴ このように PPAR リガンドの開発は数多く行われているため、PPAR に対する効率の良い評価系も重要となる。

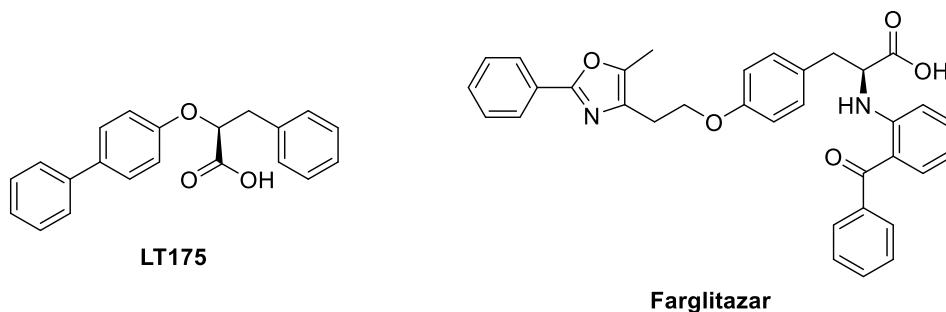


Figure 6. 医薬品以外に報告されている PPAR リガンド

核内受容体は、生理作用を発現するメカニズムに共通点がある。Figure 7 には核内受容体の中でも PPAR の生理作用発現機構を示した。核内受容体が生理作用を示すには、核内受容体が二量体構造をとって (PPAR の場合、レチノイド X 受容体 (RXR) と二量

体化している)、標的 DNA に結合しているところに、細胞内・核内へと移行してきたリガンドが核内受容体に結合する。⁴⁵⁻⁴⁹ その後、コアクチベーターの結合を合図に、標的遺伝子の転写が開始され、発現したタンパク質が生理作用を示す。

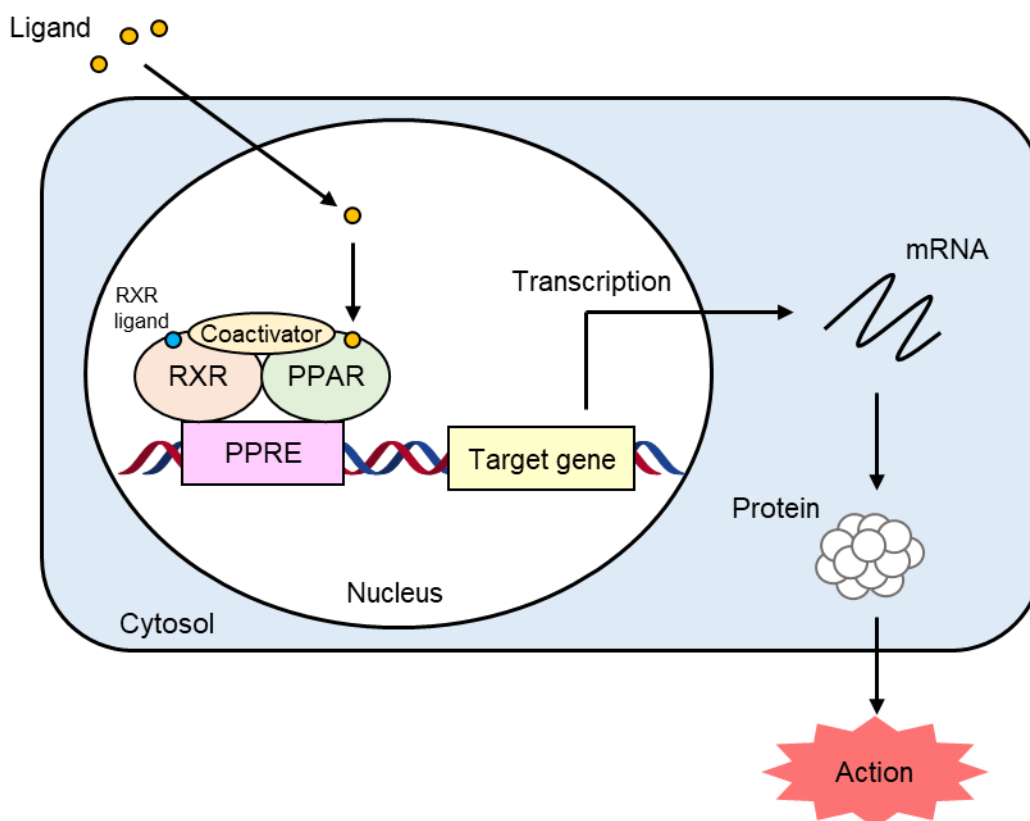


Figure 7.^{45,49,50} PPAR の生理作用発現機構

このように、PPAR を含めた核内受容体は、遺伝子転写を介して生理作用を発現する。そこで核内受容体を標的としたリガンドの評価には、対象の遺伝子コーディング領域にレポーター遺伝子を挿入し、レポータータンパク質の酵素活性を測定することで遺伝子転写能を評価するアッセイ系が広く使用されている。⁵¹⁻⁵⁴ また核内受容体の評価用レポーターアッセイキットも市販されている。^{55,56} 最近の研究では、チアゾリジンジオン (TZD) 系が受容体非依存的にミトコンドリア機能に直接影響を与えるという研究も報告されている。⁵⁷ このような予想外の作用メカニズムもあるため、レポーター遺伝子アッセイのような間接的な評価法だけでなく、直接的な評価法も重要となる。直接的な評価法はハイスループットスクリーニング (HTS) にも適しているが、親和性に関する正しいデータが得られやすいという特長がある。⁵⁸ この手法は遺伝子転写を介さずに、リガンドと受容体の結合や活性化を評価する。これまでによく用いられてきた実験手法の一例として、放射性標識リガンドと競合させる評価方法がある。しかし、放射性化合物は取り扱いに特別な施設が必要であり、廃棄法や使用者への影響も懸念される。そこで

分子生物学分野の研究において、蛍光や化学発光を利用した評価法が代替法として提案されてきた。核内受容体においても、シンチレーションプロキシミティアッセイ法 (Scintillation Proximity Assay; SPA) や蛍光偏光アッセイ、時間分解蛍光共鳴エネルギー移動 (TR-FRET) アッセイが利用されている。^{58,59} PPAR に対する親和性評価にも蛍光を利用した評価法が研究されており、PPAR α/γ デュアルリガンドである Farglitazar にリンカーを介して、蛍光団フルオレセインを連結した化合物が開発されている (Figure 8)。⁶⁰⁻⁶² また蛍光を用いて測定する PPAR γ リガンドスクリーニング用のアッセイキットも市販されている。⁶³

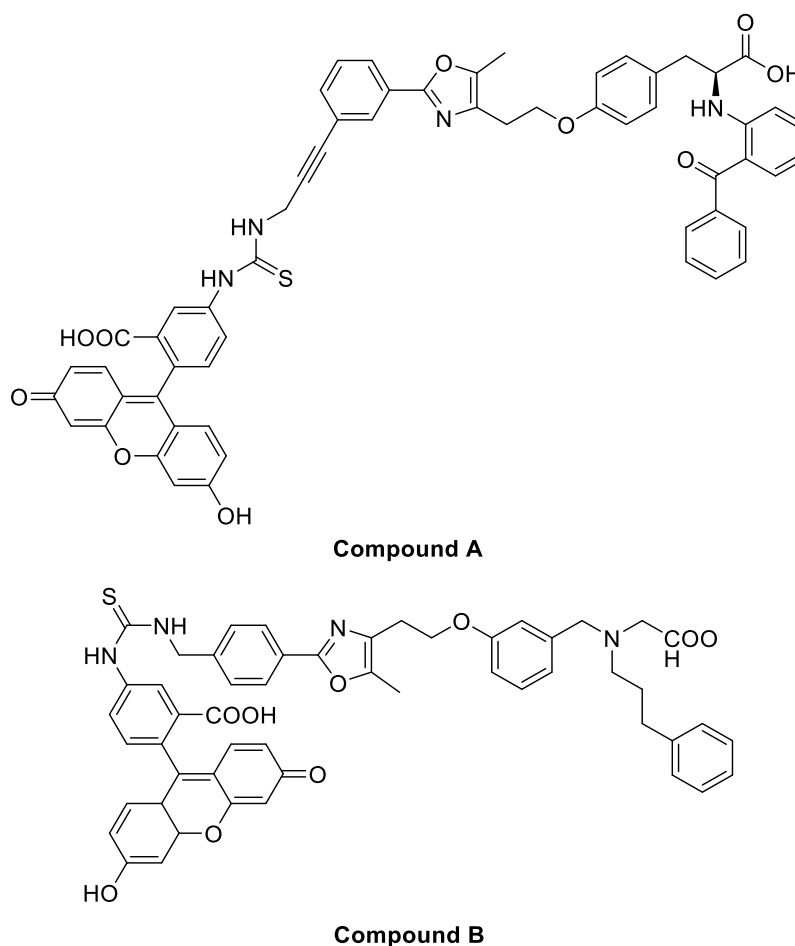


Figure 8. PPAR binding assay を目的に報告された蛍光プローブ

一般に、蛍光団は周辺環境によって蛍光特性が変化することが知られており、多くは有機溶媒中では蛍光強度が増大し、水系溶媒中では蛍光強度が減少し、長波長シフトする。^{1,64} 本研究で用いるクマリンも同様の性質を示すことが知られている。つまり、蛍光リガンドが受容体に結合し、その結合部位が疎水性アミノ酸残基の豊富な環境下であれば、蛍光強度が増大し、短波長側に蛍光極大を示す。一方、タンパク質から解離しているときは水中環境下であり、蛍光強度が減少し、長波長側に蛍光極大を示す (Figure 9)。この性質を利用して、標的タ

ンパク質存在下、蛍光プローブと結合能を評価する化合物を競合させることで、特定の波長の蛍光強度を観測することで、標的タンパク質に対する結合能が評価できる。⁶⁵⁻⁶⁷ 著者はこの方法論に基づいた新たな PPAR γ 評価系研究へ応用可能なクマリン蛍光標識した PPAR γ リガンドを合成することを計画した。

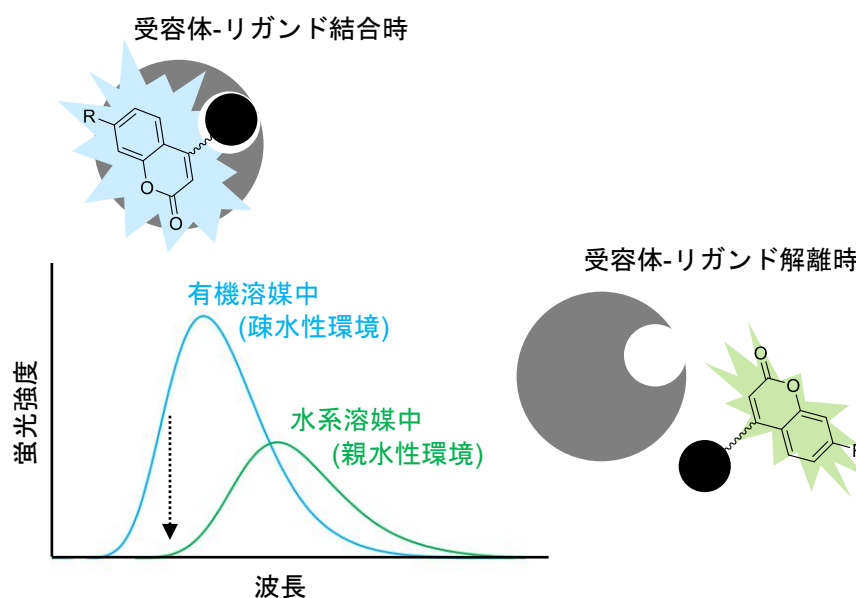


Figure 9. 周囲環境とタンパク結合時によって変化する蛍光特性

上述したように核内受容体リガンドの場合、リガンドが細胞内に入り、さらに核内へ移行して核内受容体に結合する必要がある。クマリン骨格は他の蛍光団のように構造的に大きくないため、膜透過性など化合物の物性に大きな影響を与えることなく導入可能な点がクマリン骨格の利点であると言える。本研究では、最初に受容体リガンドや生物活性化合物、医薬品などに含まれるヘテロ原子に着目し、アルコールやチオールなどのヘテロ原子を求核剤として、1段階の反応でのクマリン骨格を構築する方法を検討する。これは様々な受容体のリガンドにクマリン環が簡便に導入可能かの検討材料になり得る。また求核付加反応をする原子種によって、クマリン環の蛍光特性が変化することが考えられる。その後、検討した反応条件に基づいて PPAR γ リガンドに応用し、クマリン型ロシグリタゾン合成する。また、クマリン骨格がリード化合物であるロシグリタゾンの活性に影響を与えないか、ルシフェラーゼアッセイを用いて評価する。前述のように、ルシフェラーゼアッセイは核内受容体の評価系としてよく利用されており、本研究においても活用可能である。以上のアプローチにより、PPAR γ を標的としたクマリン型リガンドの合成法を確立し、その蛍光特性を利用した結合能評価系へ適用する。また本手法を確立できれば、他の受容体に関する研究にも容易に応用可能であり、標的受容体への結合能を評価するための蛍光プローブが合成でき、結合評価が可能になる。そのた

め波及効果が高く、汎用性の高い成果になると期待した。

本論文第 1 章では、低分子化合物へのクマリン骨格導入法について論述する。第 2 章では、第 1 章で合成した PPAR γ プローブの結合評価系への適用について論述する。

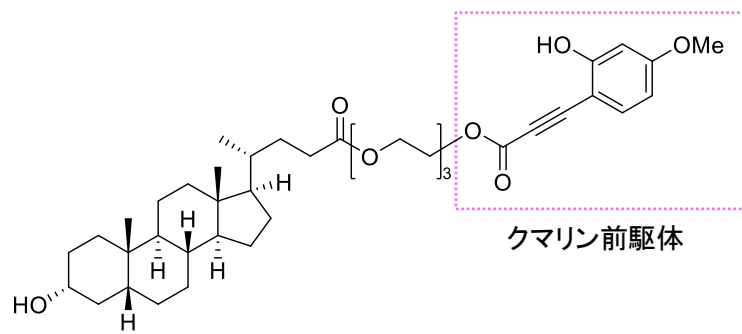
本 論

第 1 章 クマリン骨格導入法の検討

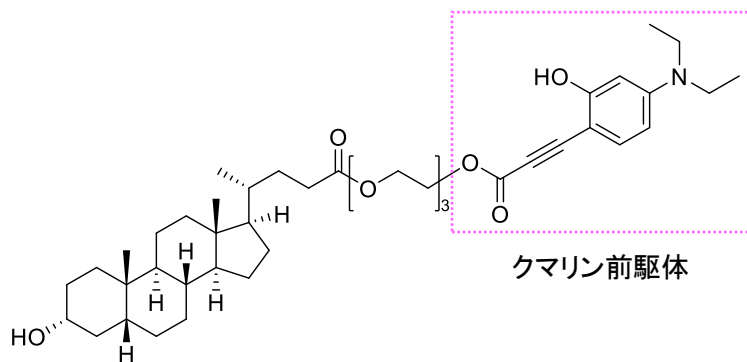
第 1 節 メトキシクマリン誘導体の合成

クマリンは、置換基によって蛍光特性が変化する。7 位への電子供与基の導入は、強い効果が期待できる。⁶⁸ 7 位置換体としては、メトキシクマリン、ジエチルアミノクマリン、ジシクロヘキシルアミノクマリンがよく知られているが、特にジエチルアミノクマリンは、高い蛍光量子収率、可視領域での吸収および発光スペクトルなどの蛍光特性を備えているため、蛍光センサーの開発に広く使われているクマリン誘導体である。⁶⁹ 著者が所属する研究室では、Figure 10 に示した 7 位メトキシクマリン型リトコール酸誘導体、7 位ジエチルアミノクマリン型リトコール酸誘導体、および 7 位ジシクロヘキシルアミノクマリン型リトコール酸誘導体を報告している。³⁰ 著者は、これらクマリン前駆体ユニット開発の知見を基に、各種医薬品や生物活性化合物へ、1 段階かつ合成の最終段階でクマリン環を導入する方法を検討することにした。

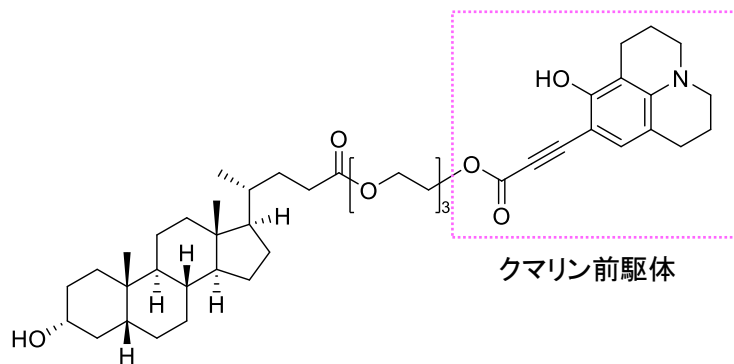
最初に、安定性の高い 7 位メトキシクマリン前駆体を用いて、ロシグリタゾン骨格に 7 位メトキシクマリン環を導入することにした。ロシグリタゾンは、2-アミノピリジン構造を有している。ピリジン環をクマリン環に置き換え、アミノ基を求核種として活用できるため、ロシグリタゾンはモデル化合物として最適であると考えた。



7-メトキシクマリン型リトコール酸誘導体



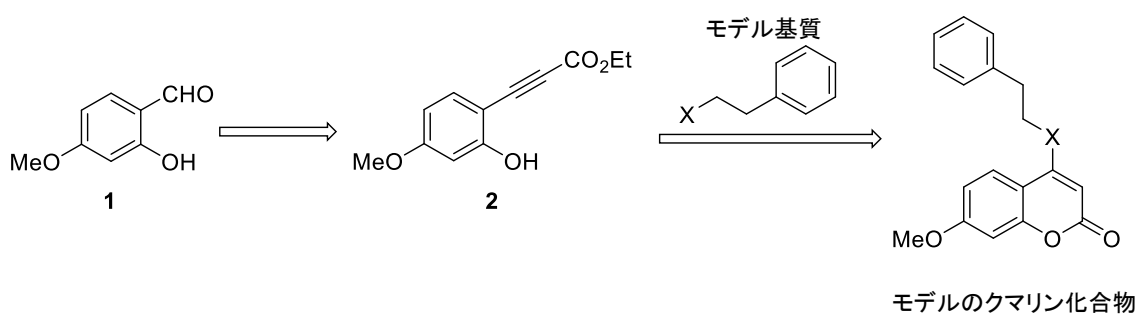
7-ジエチルアミノクマリン型リトコール酸誘導体



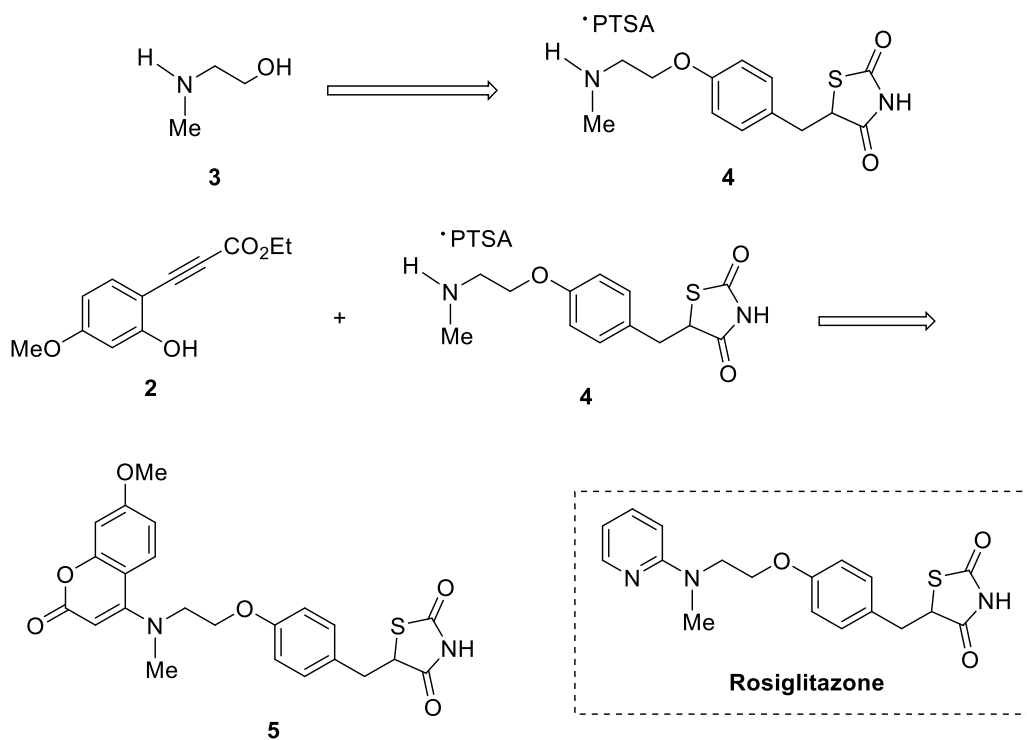
7-ジシクロヘキシルアミノクマリン型リトコール酸誘導体

Figure 10. クマリン前駆体を含むリトコール酸誘導体

合成計画を以下の Scheme 12, 13 に示す。2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (**1**) を出発物質として既知の合成方法¹⁵でクマリン前駆体 **2** を合成する (Scheme 12)。モデル基質による求核付加反応の検討を実施し、クマリン前駆体 **2** からの効率的なクマリン骨格構築法を見出す。ここで得られた知見をもとにリガンドへのクマリン導入を行う。2-(Methylamino)ethanol (**3**) から既知の合成方法^{70,71}で、求核種としてアミノ基を含むロシグリタゾンの合成中間体 **4** を得た後、合成したロシグリタゾン骨格のアミノ基からクマリン前駆体への求核付加反応により、クマリン環を導入する計画を立案した (Scheme 13)。



Scheme 12. 合成計画 (クマリン前駆体 **2** とモデル基質による検討)

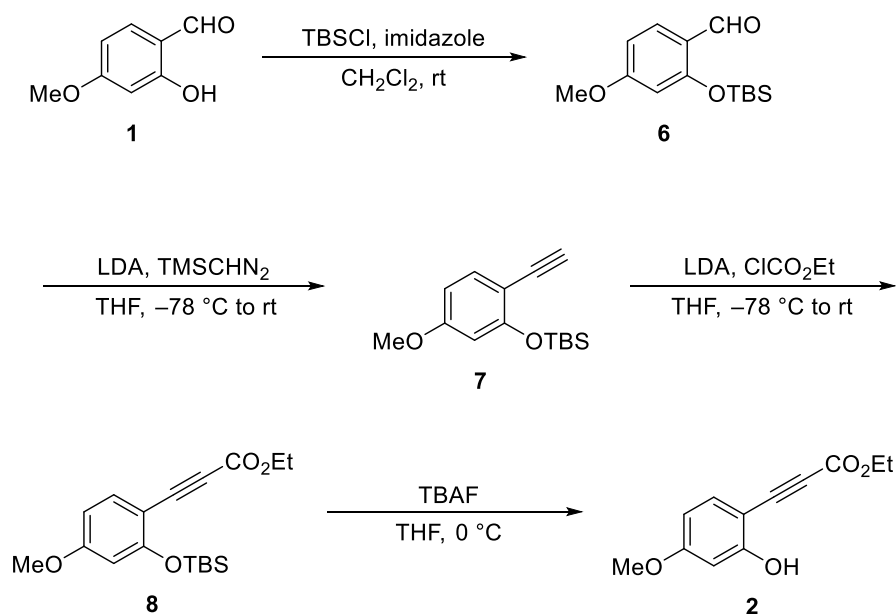


Scheme 13. 合成計画 (ロシグリタゾン合成中間体 **4** の合成とクマリン環の導入)

次いで、化合物の各種評価を行う。合成した PPAR リガンド **5** のクマリン環が、PPAR γ の活性発現に影響を与えないカルシフェラーゼアッセイを用いて評価する。合成したクマリン誘導体に関する蛍光特性も評価する。モデル基質を用いて合成したクマリン化合物については、求核付加した原子種の違いによる蛍光特性を検証する。合成したクマリン型ロシグリタゾン **5** の蛍光特性を考察する。

クマリン前駆体 2 の合成

クマリン前駆体 **2** は既知の方法³⁰ で合成した (Scheme 14)。2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (**1**) を出発原料とし、水酸基を TBS 基で保護をして **6** を合成し、Seyferth-Gilbert アルキン合成によりアルキン体 **7** を得た。次いで、LDA 存在下アルキン体 **7** に ethyl chloroformate を作用させ、エステル体 **8** とし、最後に TBAF により脱保護を行い、目的であるクマリン前駆体 **2** を合成した。



Scheme 14. クマリン前駆体 **2** の合成

モデル基質を用いたクマリン骨格構築の検討

モデル基質の求核種は、Figure 11 に示したチオール **9**、一級アミン **10**、二級アミン **11**、アルコール **12**、フェノール (**13**) を用いることにした。モデル基質とクマリン前駆体を用いて、クマリン構築条件を検討した。

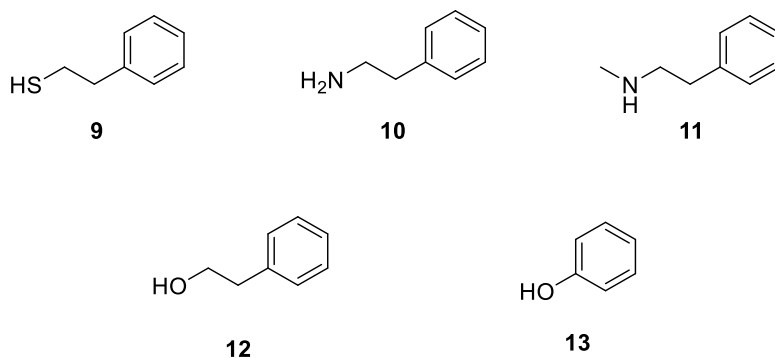
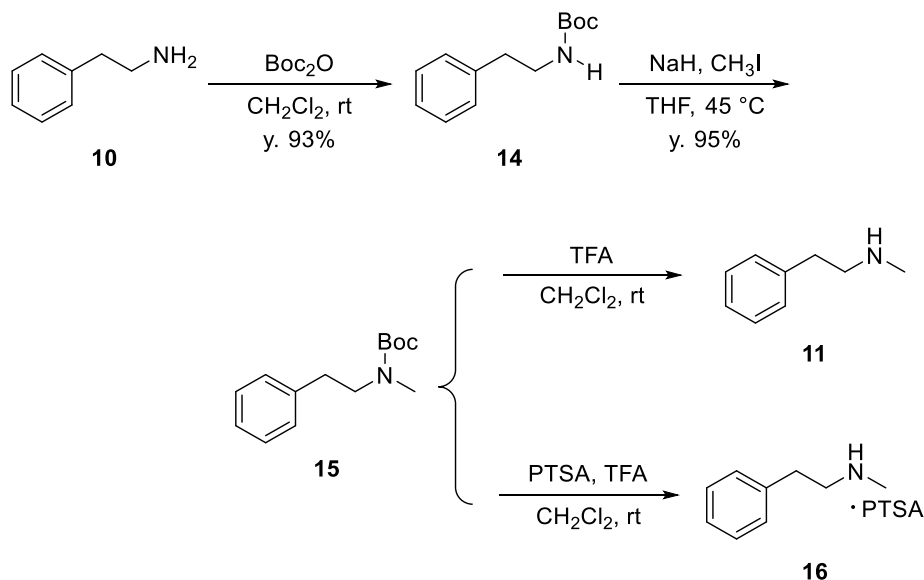


Figure 11. クマリン構築条件の検討に用いるモデル基質の求核種

メチルアミノ基を有するモデル基質 **11** の合成

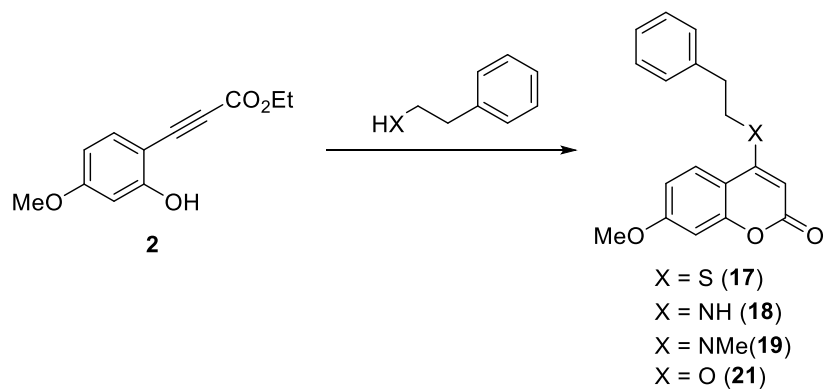
メチルアミノ基を有する **11** は、**10** を出発物質とし、類似化合物の合成法⁷²⁻⁷⁵を参照して合成した (Scheme 15)。**10** のアミノ基を Boc 保護し、**14** を収率 93% で得た。NaH 存在下、CH₃I を作用させ **15** を 95% で合成した。**15** は 2 通りの方法で脱保護を行った。1) 酸性条件下 Boc 脱保護する方法で **11** を得た。2) PTSA 存在下、脱保護し PTSA 塩である **16** を得た。**11** および **16** は精製せずに次の反応に用いた。



Scheme 15. メチルアミノ基を有するモデル基質 **11** の合成

モデル基質を用いたメトキシクマリン前駆体との反応条件検討

合成したクマリン前駆体 **2** とモデル基質を用いて、メトキシクマリン骨格を構築するための適切な塩基、反応温度、溶媒を検討した (Scheme 16, Table 2)。溶媒は、求核反応でよく使われる非プロトン性溶媒である DMF または 1,4-dioxane を選択した。塩基は、無機弱塩基として K_2CO_3 、無機強塩基として KOH または NaH、有機塩基として Et_3N 、DBU を検討した。⁷⁶⁻⁸³ 次ページ以降で各反応の詳細について述べる。



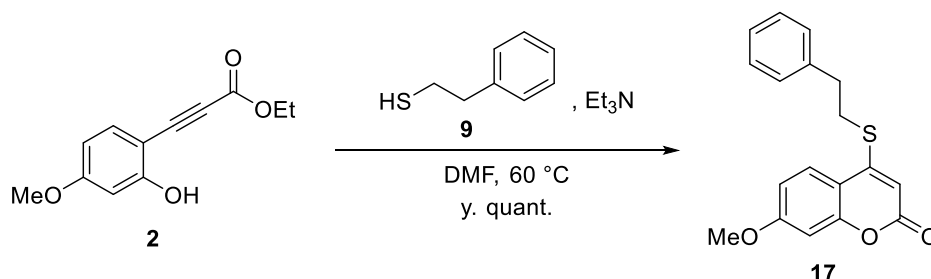
Scheme 16. モデル基質を用いたメトキシクマリン前駆体との反応

Entry	X (1.5 equiv.)	Base (2.0 equiv.)	Solvent	Temp. (°C)	Results
1	S	-	1,4-dioxane	80	no reaction
2	S	K ₂ CO ₃	DMF	60	y. 91%
3	S	KOH	DMF	60	y. 8%
4	S	Et ₃ N	DMF	60	quant.
5	S	DBU	DMF	60	y. 93%
6	NH	-	1,4-dioxane	80	no reaction
7	NH	K ₂ CO ₃	DMF	60	decomposition
8	NH	KOH	DMF	60	decomposition
9	NH	Et ₃ N	DMF	60	y. 88%
10	NH	DBU	DMF	60	decomposition
11	NMe	Et ₃ N	DMF	60	y. 30%
12	NMe	-	Et ₃ N	100	y. 31%
13	NMe·PTSA	-	Et ₃ N	100	y. 70%
14	O	-	1,4-dioxane	80	no reaction
15	O	K ₂ CO ₃	DMF	60	decomposition
16	O	KOH	DMF	60	decomposition
17	O	Et ₃ N	DMF	60	dimerization
18	O	DBU	DMF	60	decomposition
19	O	Et ₃ N	toluene	100	dimerization
20	O	NaH	DMF	60	decomposition

Table 2. 反応条件検討

チオール **9** との反応 (Scheme 17)

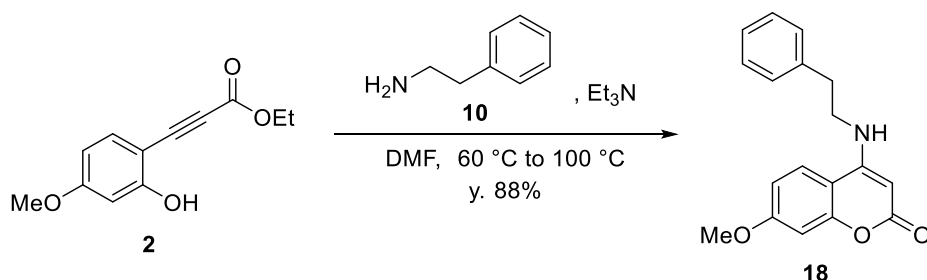
entry 1 では、**2** に対し塩基を添加せず反応を行ったが、反応は進行しなかった。塩基として K_2CO_3 を用いたとき (entry 2) は、収率 91%で目的とする求核付加環化体 **17** を得た。KOH を使用した場合 (entry 3)、収率 8%で目的物 **17** が得られ、複雑な混合物を多く与えた。Et₃N を作用させた場合 (entry 4)、目的物 **17** が定量的に得られ、同じ有機塩基である DBU を用いた際 (entry 5) でも、収率 93%と高収率で **17** を得られた。



Scheme 17. 前駆体 **2** とチオール体 **9** の反応

一級アミン **10** との反応 (Scheme 18)

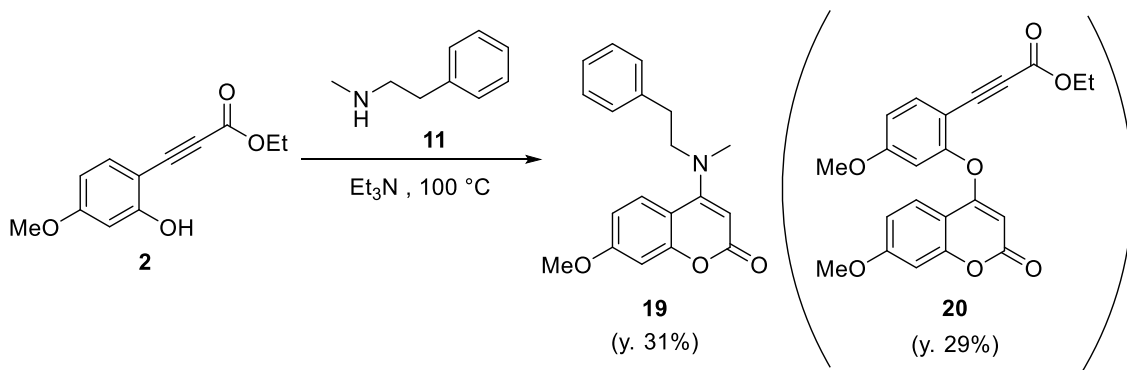
次に前駆体 **2** に対し、一級アミン **10** を求核剤として用させた。塩基には K_2CO_3 , KOH, DBU を用いるといずれも複雑な混合物を与えるのみであった (entry 7, 8, 10)。一方で Et₃N を塩基として用いた場合のみ (entry 9)、クマリン環化体 **18** を収率 88%で合成することに成功した。



Scheme 18. 前駆体 **2** と一級アミン **10** の反応

二級アミン **11** との反応 (Scheme 19, 20)

続いて、二級アミン **11** をモデル基質とした検討を行った。前駆体 **2** に対し 2.0 当量の Et₃N を塩基としてを用いた場合 (entry 11)、クマリン環化体 **19** が 30%と低収率であった。次に Et₃N を溶媒として **11** との反応を行った場合 (entry 12)、目的の **19** を 31%、前駆体 **2** が二量体化した **20** を 29%の収率でそれぞれ得た (Scheme 19)。なお **20** の構造は、X 線結晶構造解析によって決定した (Figure 12)。一方、PTSA 塩とした **16** を求核種として用い反応を行ったところ (entry 13)、**20** の生成が抑制され、**19** の収率が 70%に改善した (Scheme 20)。



Scheme 19. 前駆体 **2** と二級アミン **11** の反応

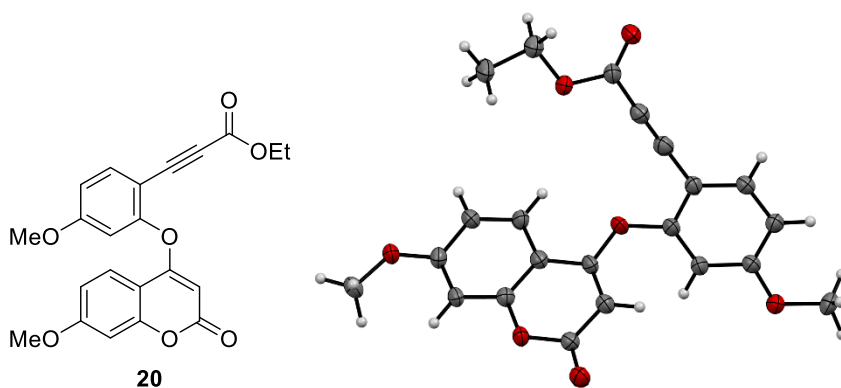
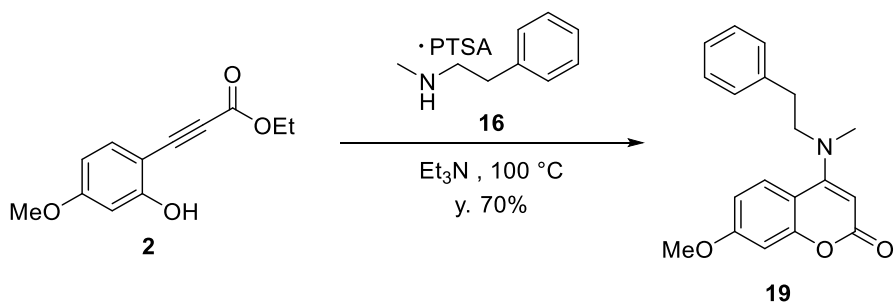


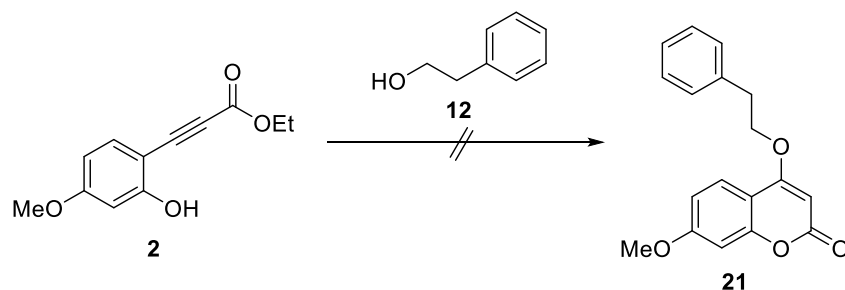
Figure 12. 二量体 **20** の X 線結晶構造解析



Scheme 20. 前駆体 **2** と二級アミン PTSA 塩 **16** の反応

アルコール **12** との反応 (Scheme 21)

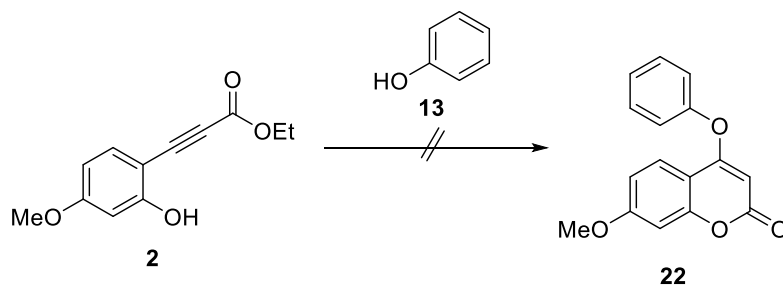
次に、アルコール **12** を用いてクマリン環合成の検討を行った。前駆体 **2** に対し、塩基として K_2CO_3 , KOH , DBU , Et_3N , NaH を作用させて条件検討を行ったが (entry 14–20)、二量体 **20** の生成、または複雑な混合物を与えるのみであり、所望の **21** は全く得られなかった。アルコールの求核性は他のモデル基質に比べて弱く、付加反応が進行せず、前駆体 **2** へのアルコール付加は難しいと考え、ここでは断念した。



Scheme 21. 前駆体 **2** とアルコール体 **12** の反応

フェノール (**13**) との反応 (Scheme 22, Table 3)

反応条件を検討していく中で、クマリン前駆体 **2** のフェノール性水酸基がもう 1 分子の前駆体 **2** に付加することで、クマリン環化が進行した二量体 **20** が得られた。これよりアルキルアルコールでは所望の付加反応が進行しないが、フェノール性水酸基は付加が進行することが示唆された。そこでフェノール (**13**) を求核剤として、塩基として KOH , K_2CO_3 , NaH を用いて条件検討を行ったが (entry 1–3)、反応は進行しないか、複雑な混合物を与えるのみであり、予想に反して **22** は全く得られなかった。この結果より、これまでの条件検討において二量体 **20** が得られていた原因としては、クマリン前駆体 **2** が反応溶液中で水素結合などお互いに相互作用することで接近していた可能性が考えられる。



Scheme 22. 前駆体 **2** とフェノール (**13**) の反応

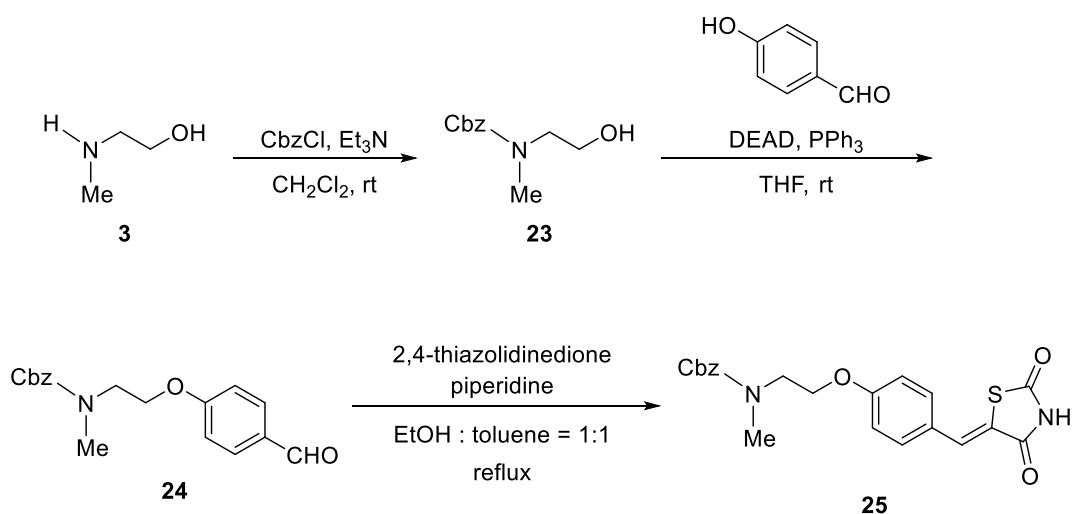
Entry	Base	Solvent	Temp. (°C)	Results
1	KOH	DMF	60	decomposition
2	K ₂ CO ₃	DMF	60	no reaction
3	NaH	DMF	60	decomposition

Table 3. 前駆体 **2** とフェノール (**13**) の反応条件検討

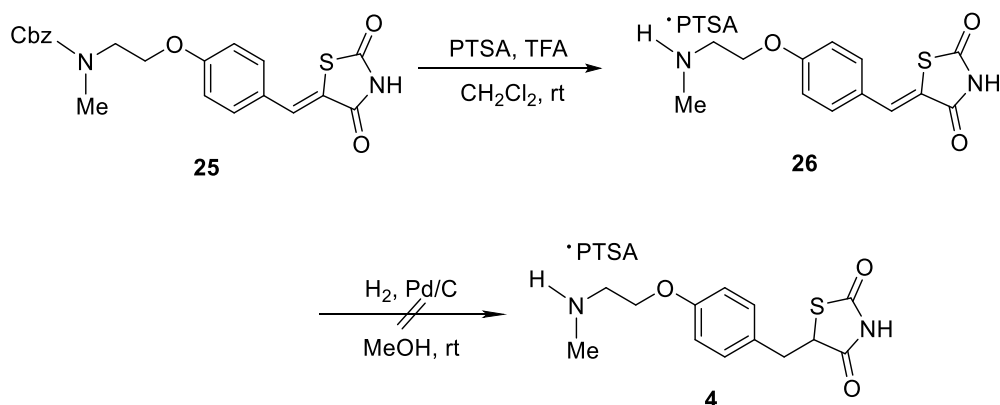
以上の結果をまとめると、モデル基質を用いた反応条件の検討において、目的物 (**17**, **18, 19**) を与えた最も良い収率は、チオール体 **9** では定量的、一級アミン **10** は収率 88%、二級アミン **16** は収率 70%であった。このとき使用した塩基はいずれも Et₃N であり、どのモデル基質においても、塩基として Et₃N を用いた場合が最も収率よく目的化合物を合成できることを見出した。一方、アルコール体 **12** では反応が進行しないか、複雑な混合物が得られるのみであり、求核種として水酸基 (アルキルアルコール、フェノール性水酸基) を用いることは難しいという結果となった。

ロシグリタゾン骨格の合成

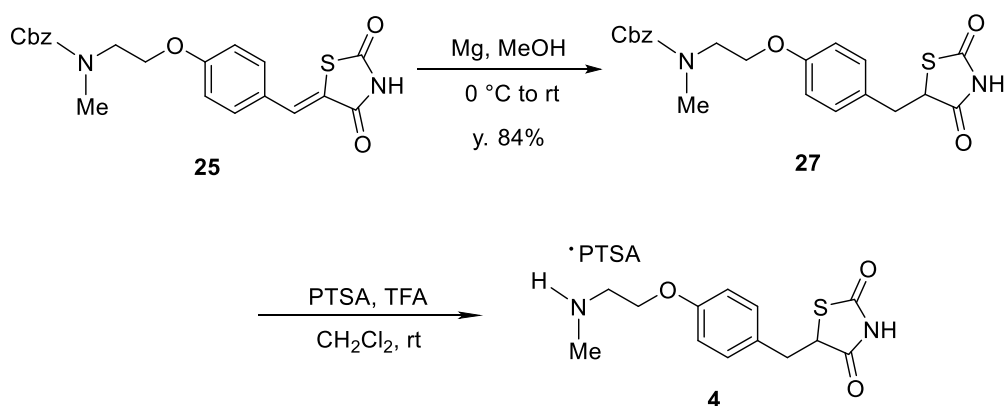
以上のモデル実験の結果を踏まえて、PPAR γ アゴニストであるロシグリタゾン構造へのクマリン環導入に着手した。まず、ロシグリタゾン骨格を既知の方法⁷⁰で合成した。2-(methylamino)ethanol (**3**)を出発原料として、アミノ基のCbz保護を行い、**23**を得た。次に4-hydroxybenzaldehydeを用いて、光延反応により**24**を得て、続いてアルデヒド体**24**と2,4-thiazolidinedioneをKnoevenagel縮合に付し、**25**を合成した (Scheme 23)。次に、PTSAとTFA存在下Cbz基を脱保護し、PTSA塩として**26**を得た。最後に、**26**を接触水素化に付して**4**の合成を試みたが、所望の反応は進行せず**26**を回収した (Scheme 24)。そこで**25**をMg還元⁷¹によりオレフィンの還元を行い、**27**を収率84%で得た後、最後にPTSAとTFA存在下Cbz基の脱保護を行い、PTSA塩として**4**を合成することができた (Scheme 25)。**4**は精製せずに次の反応へ用いることとした。



Scheme 23. ロシグリタゾン合成中間体 **25** の合成



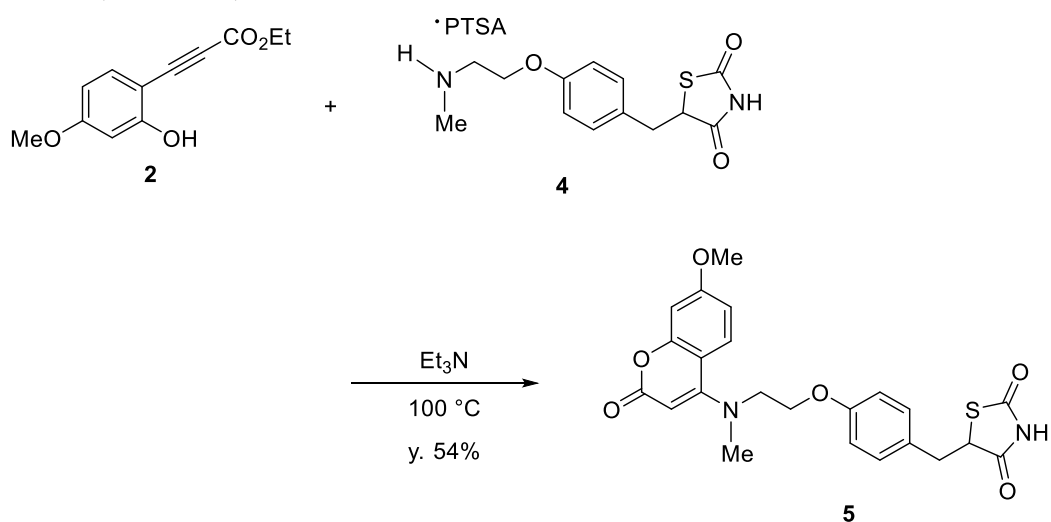
Scheme 24. 接触水素化によるロシグリタゾン中間体 **4** の合成



Scheme 25. Mg 還元によるロシグリタゾン中間体 4 の合成

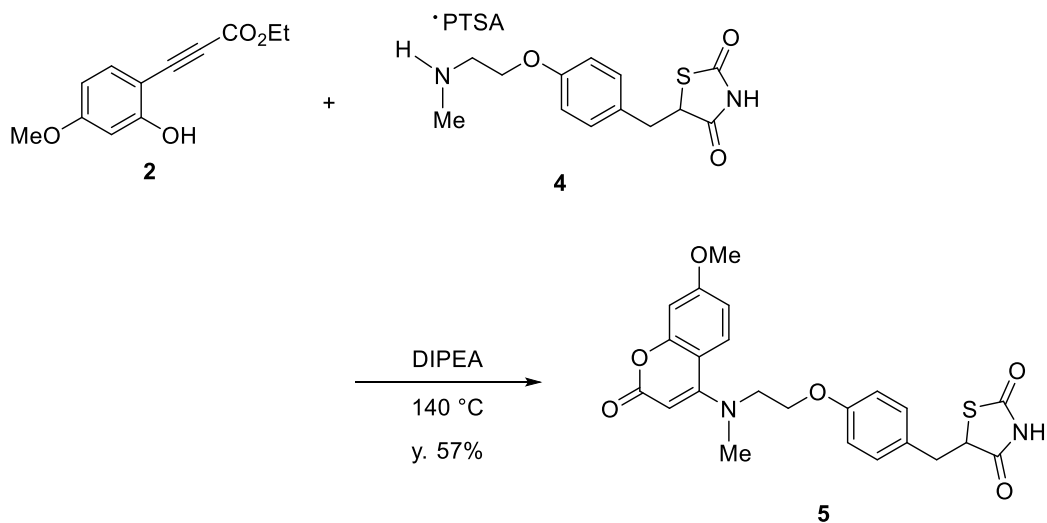
ロシグリタゾン骨格へのクマリン構造導入

ロシグリタゾン中間体 4 が得られたので、メトキシクマリン前駆体 2 を作用させ、目的化合物 5 の合成を試みた。Et₃N を溶媒として加熱還流したところ、求核付加に続く環化反応が進行し、クマリン構造が導入されたロシグリタゾン誘導体 5 を収率 54% で得られた (Scheme 26)。



Scheme 26. Et₃N 溶媒条件におけるロシグリタゾン骨格へのクマリン構造の導入

また、Et₃N (89 °C) より高沸点である DIPEA (127 °C) を反応溶媒に用いたところ、収率 57%とわずかではあるが向上した (Scheme 27)。



Scheme 27. DIPEA 溶媒条件におけるロシグリタゾン骨格へのクマリン構造の導入

以上、モデル基質を用いて、求核付加反応に続く環化反応により、クマリン環を構築する方法を確立した。さらにその反応を応用して、ロシグリタゾン骨格 **4** にメトキシクマリンを導入した目的化合物 **5** を合成することができた。

遺伝子転写活性の評価

メトキシクマリン型ロシグリタゾン **5** が、ロシグリタゾンの遺伝子転写活性化能を保持できているか評価するために、COS-7 細胞を用いた dual luciferase assay を行った (Figure 13)。⁸⁴ その結果、最大活性はロシグリタゾンと同程度であった。またロシグリタゾンの EC₅₀ は 0.13 μM に対し、目的化合物 **5** の EC₅₀ は 0.45 μM であり、ほぼ同等の活性を保持していた (Table 4)。この結果から、ピリジン環を置き換えたメトキシクマリン環は比較的小さい構造であるため、期待した通り PPAR γ のアゴニスト活性に大きな影響を与えず、本法による末端へのクマリン構造導入が有用であると考察した。

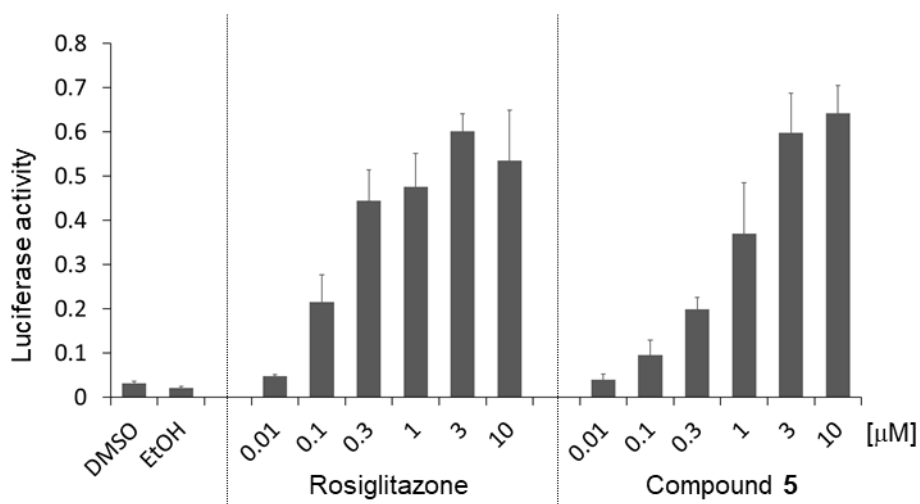
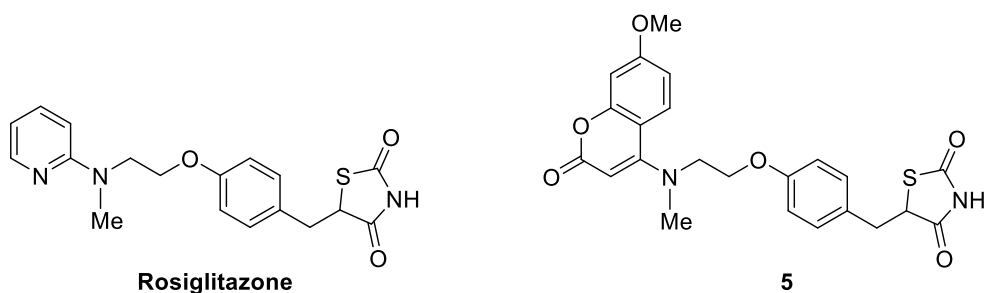


Figure 13. COS-7 細胞を用いた dual luciferase assay



	Rosiglitazone	compound 5
EC ₅₀ (μM)	0.13	0.45

Table 4. ロシグリタゾンと化合物 **5** の EC₅₀

合成した化合物の蛍光特性

続いてチオールを付加させた **17**、一級アミンを付加させた **18**、二級アミンを付加させた **19** とメトキシクマリン型ロシグリタゾン **5** の様々な溶媒中での蛍光スペクトルを測定した。非プロトン性/プロトン性および無極性/極性の性質をもつ溶媒の中から、 CH_2Cl_2 , THF, MeOH, H_2O を選択した。その結果を Figure 14, 15 と Table 5 に示す。さらに **17**, **18**, **19** については hexane 中での測定を行ったが、化合物 **5** は hexane に溶解しなかったため、hexane 中での測定はできなかった。また、いずれの実験においても励起波長は吸収極大を示した波長を用いた。

モデル化合物の蛍光スペクトル

まずモデル化合物 **17**, **18**, **19** の蛍光極大波長であるが、 CH_2Cl_2 溶液中では、**17** は 397 nm、**18** は 369 nm、**19** は 471 nm を極大とした。したがって、 CH_2Cl_2 溶液中では **19** が最も長波長の蛍光を示した。

THF 溶液中では、**17** は 398 nm、**18** は 339 nm、**19** は 474 nm を極大とする蛍光を示した。つまり、THF 溶液中においても、 CH_2Cl_2 溶液中と同様の傾向を示した。

一方、プロトン性溶媒の MeOH, H_2O を用いたとき、蛍光極大波長に差が生じた。**17** は約 400 nm を極大とした、他溶媒中と同様の蛍光を示した。**18** は長波長にシフトしたが、**19** と **5** は短波長にシフトした。さらに無極性溶媒の hexane 中では、**17** と **19** が短波長シフトしたが、**18** は CH_2Cl_2 , THF 中と変わらなかった。

CH_2Cl_2 溶液と THF 溶液中では、求核付加反応した原子種によって蛍光極大波長が顕著に異なり、短波長側から順に **18**, **17**, **19** であり、**18** と **19** の差は CH_2Cl_2 溶液で $\Delta 102$ nm、THF 溶液中で $\Delta 135$ nm であった。hexane 溶液中においても、示した蛍光極大波長の順位に変化はなかったが、 CH_2Cl_2 溶液と THF 溶液と比べて変化が小さく、**18** と **19** の差は $\Delta 24$ nm であった。MeOH 溶液中では、短波長側から順に **18**, **19**, **17** であり、**18** と **17** の差は $\Delta 30$ nm と変化が小さかった。一方、 H_2O では、求核付加反応した原子種によって蛍光極大波長は大きく変化せず、いずれも約 400 nm であった。4 位置換基の違いのみでソルバトクロミズムの様相が異なることが明らかになった。

PPAR γ リガンドの蛍光スペクトル

次にメトキシクマリン型ロシグリタゾン **5** の蛍光スペクトルを測定したところ、 CH_2Cl_2 溶液中では 469 nm、THF 溶液中では 467 nm を極大とする蛍光を示した。MeOH 溶液中では 392 nm、 H_2O 溶液中では 451 nm を極大とした。

また、同様の *N*-メチル構造を有する **19** とメトキシクマリン型ロシグリタゾン **5** を比較すると、 CH_2Cl_2 , THF, MeOH 溶液中では吸収極大波長と蛍光極大波長に変化が見られなかった。

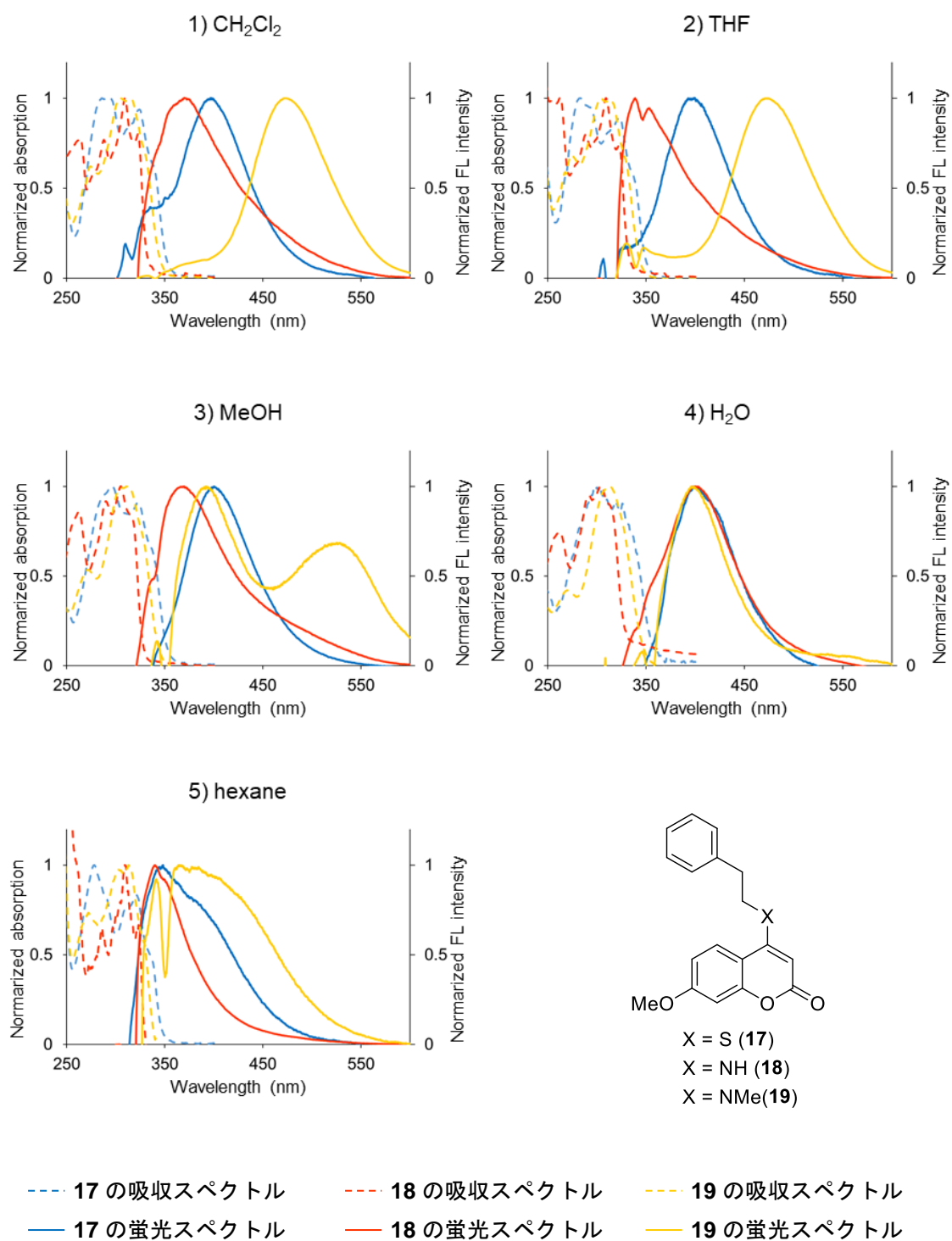


Figure 14. モデル化合物 17, 18, 19 の吸収スペクトルと蛍光スペクトル

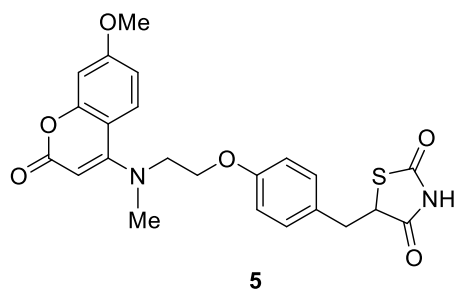
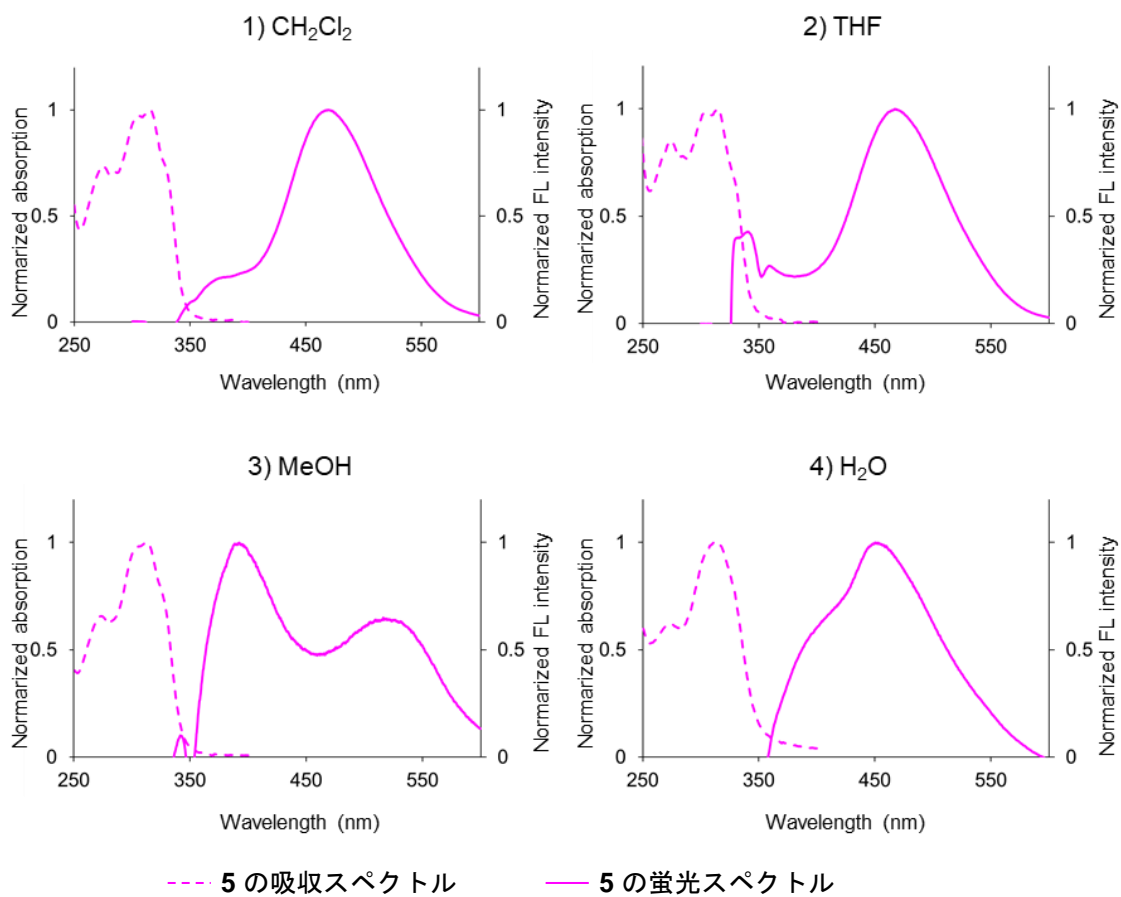
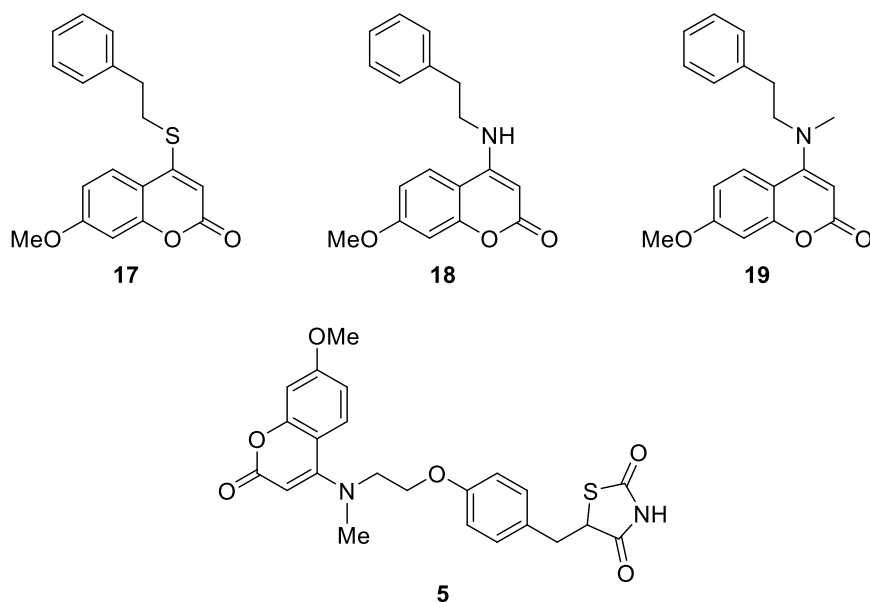


Figure 15. メトキシクマリン型ロシグリタゾン **5** の吸収スペクトルと蛍光スペクトル



Compound	λ (nm)	CH ₂ Cl ₂	THF	MeOH	H ₂ O	hexane
17	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$	286	283	296	298	278
	$\lambda_{\max}^{\text{f}}$	397	398	400	398	348
18	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$	309	309	305	303	309
	$\lambda_{\max}^{\text{f}}$	369	339	370	400	340
19	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$	304	305	313	312	313
	$\lambda_{\max}^{\text{f}}$	471	474	392	396	364
5	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$	316	314	314	312	—
	$\lambda_{\max}^{\text{f}}$	469	467	392	451	—

Table 5. 化合物の各種溶媒中での吸収極大波長と蛍光極大波長

メトキシクマリン型ロシグリタゾン **5** の相対蛍光量子収率

さらにメトキシクマリン型ロシグリタゾン **5** は、0.1 M H₂SO₄ 中での硫酸キニーネ ($\Phi = 0.577$) を基準物質として、相対蛍光量子収率を求めた (Table 6)。⁸⁵ しかし、どの溶媒中についても相対蛍光量子収率は低く、最も高い値でも THF 溶液中の 0.00461 であった。

	CH ₂ Cl ₂	THF	MeOH	H ₂ O
5	0.00359	0.00461	0.00392	0.00369

Table 6. 硫酸キニーネ ($\Phi = 0.577$) を標準物質とした相対蛍光量子収率

第1章 第1節の総括

メトキシクマリン前駆体 **2** に対して、化合物 **9, 10, 11, 12, 13** を作用させて、効率よいクマリン構築条件を検討した。その結果、チオール基を有する **9**、アミノ基を有する **10**、メチルアミノ基を有する **11** では、DMF 溶媒中 Et₃N を添加することでメトキシクマリン環を構築できた。しかし、アルコール体 **12**、フェノール (**13**) では、所望のメトキシクマリン構造が得られなかった。

またメトキシクマリン環を導入したメトキシクマリン型ロシグリタゾン **5** を合成した。導入したメトキシクマリン構造は、PPAR γ のアゴニスト活性に与える影響が小さく、合成した **5** はロシグリタゾンと同程度の活性を維持していた。さらに **5** は蛍光量子収率が低いことが示された。

第2節 ジエチルアミノクマリン誘導体の合成

前節で合成した7位メトキシクマリン型ロシグリタゾン **5** は、蛍光が弱いことが明らかになった。さらに強い蛍光を有する7位ジエチルアミノクマリン構造をロシグリタゾンに導入することを計画した。

しかしジエチルアミノクマリン前駆体を脱保護したフェノール **28** は不安定であり、単離できないことが報告されている。³⁰ また、前節で問題となったメトキシクマリン二量体 **20** の形成を防ぐことを目的に、TBS 保護体に共役付加させた後、TBS 基の脱保護をすることにした (Scheme 28)。

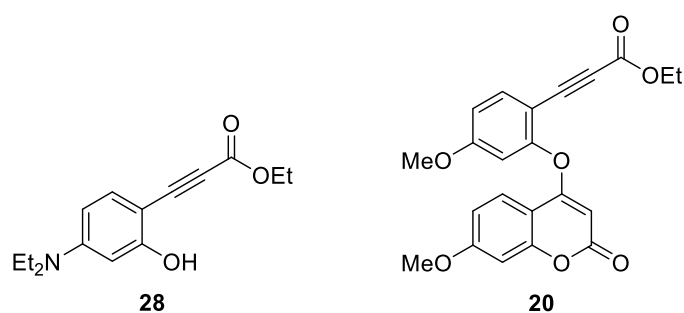
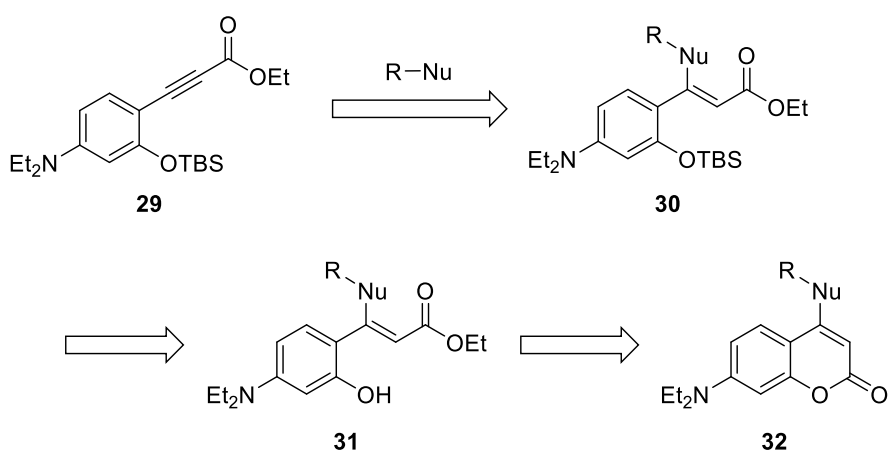


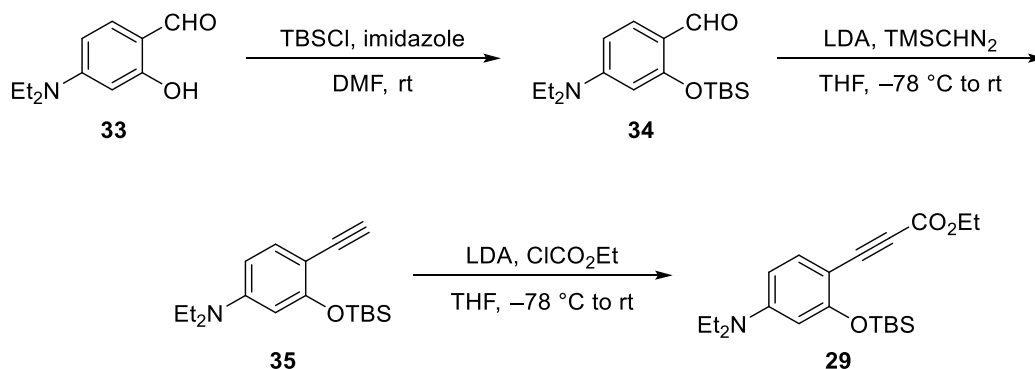
Figure 16. ジエチルアミノクマリン前駆体 **28** とメトキシクマリン二量体 **20** の構造



Scheme 28. ジエチルアミノクマリン誘導体の合成計画

ジエチルアミノクマリン前駆体 **29** の合成

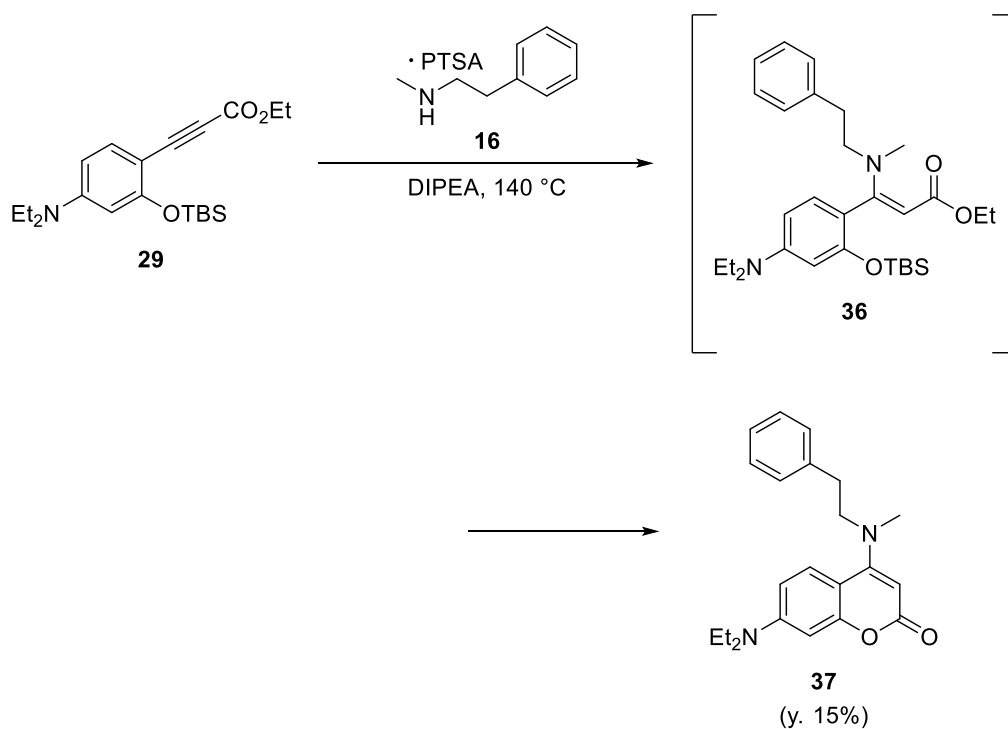
はじめに、既知の方法³⁰でジエチルアミノクマリン前駆体 **29** を合成した。4-(diethylamino) salicylaldehyde (**33**) を出発原料とし、水酸基 TBS 保護、Seyferth-Gilbert アルキン合成によりアルキン体 **35** とした。続いて、**35** に LDA 存在下 ethyl chloroformate を作用させ、目的であるエステル体 **29** を得た (Scheme 29)。



Scheme 29. ジエチルアミノクマリン前駆体 **29** の合成

ジエチルアミノクマリン前駆体 **29** とモデル基質 **16** の反応検討

ジエチルアミノクマリン前駆体 **29** を合成したところで、**29** に求核付加反応が起こるか検討することにした。ジエチルアミノクマリン前駆体 **29** と二級アミンモデル基質 **16** を DIPEA 中で加熱還流したところ、予想外にも付加体 **36** ではなく、次の異性化・環化まで進行した **37** を収率 15% で得た。また原料である **29** を回収 (77%) した (Scheme 30)。前述のように、メトキシクマリン前駆体 **2** では、二級アミン **16** との反応は 70% で進行している (Scheme 20, entry 13) ことから、7-メトキシ体 **2** と比較して明らかに反応性が低下していると言える結果であった。



Scheme 30. ジエチルアミノクマリン前駆体 **29** と二級アミン **16** の反応検討

トリフルオロエチルエステル体への変更

ジエチルアミノクマリン前駆体 **29** に対して、モデル基質 **16** は求核付加反応を起こさなかった。これは、メトキシ基よりもジエチルアミノ基は電子供与性が高いために、イノエートの β 炭素の求電子性が低下していることが原因であると考えた。そこで、求電子性を向上させるため、エチルエステルである **29** から、新たなクマリン前駆体として電気陰性度の高いフッ素を有する **38** を設計した (Figure 17)。またメトキシクマリン前駆体 **2** においても、アルコール体 **12** とフェノール (**13**) は付加していない。そこでメトキシクマリン前駆体に関しても、エチルエステルを有する **8** からトリフルオロエチルエステルを有する **39** に変更することにした。

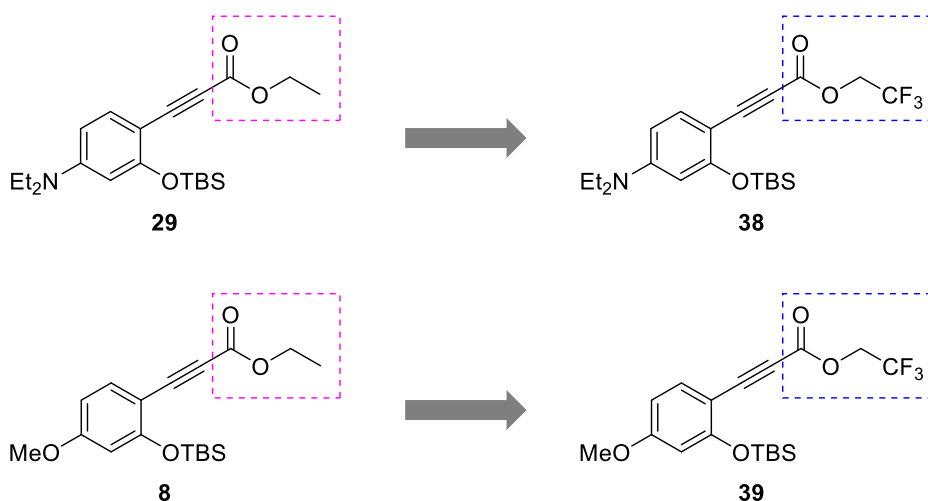
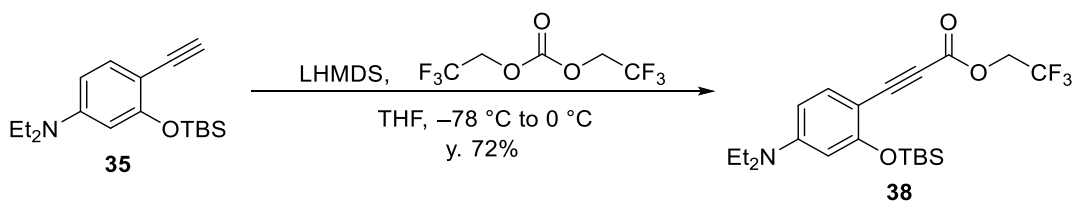


Figure 17. エステル部位の再設計

トリフルオロエチルエステル前駆体 **38** の合成

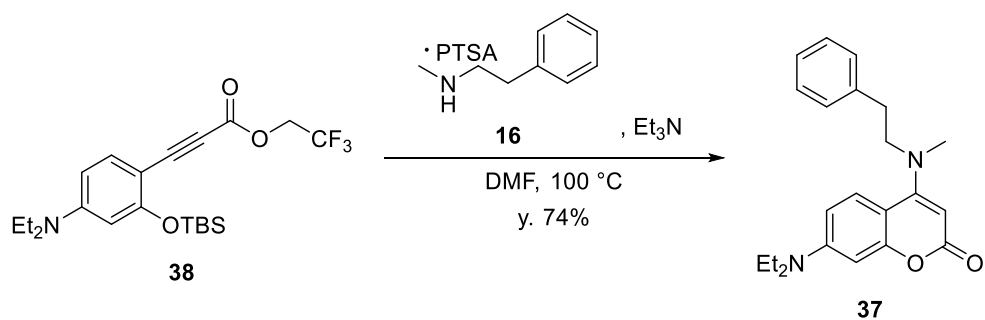
トリフルオロエチルエステル化は以下の方法で行った。アルキン体 **35** を LHMDS で処理した後、Bis(2,2,2-trifluoroethyl) carbonate を THF 中 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ で作用させ、 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ に昇温したところ、所望のトリフルオロエチルエステル前駆体 **38** が 72% で得られた (Scheme 31)。



Scheme 31. トリフルオロエチルエステル前駆体 **38** の合成

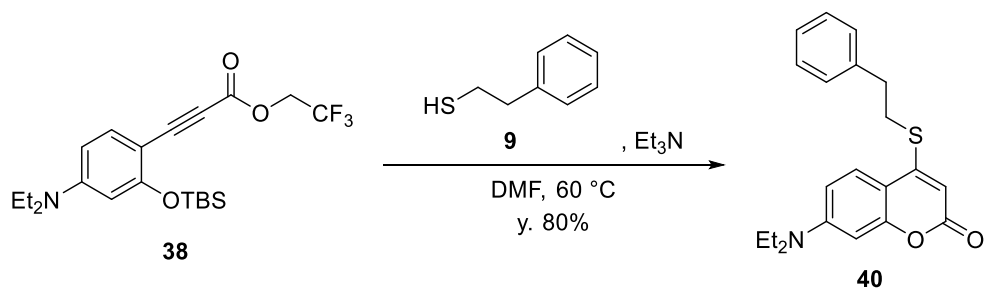
モデル基質との反応

続いて、トリフルオロエチルエステルを有するジエチルアミノクマリン前駆体 **38** と二級アミンモデル基質 **16** を用いて、付加反応を行った。上述の二級アミン **16** とエチルエステルを有するジエチルアミノクマリン前駆体 **28** の反応では、収率 15% であったが、電子吸引力を向上したトリフルオロエチルエステルに変換した前駆体 **38** では、予想通り、DMF 中 Et_3N 存在下で、付加反応に続く異性化・環化反応が進行し、**37** の収率は 74% に向上した (Scheme 32)。



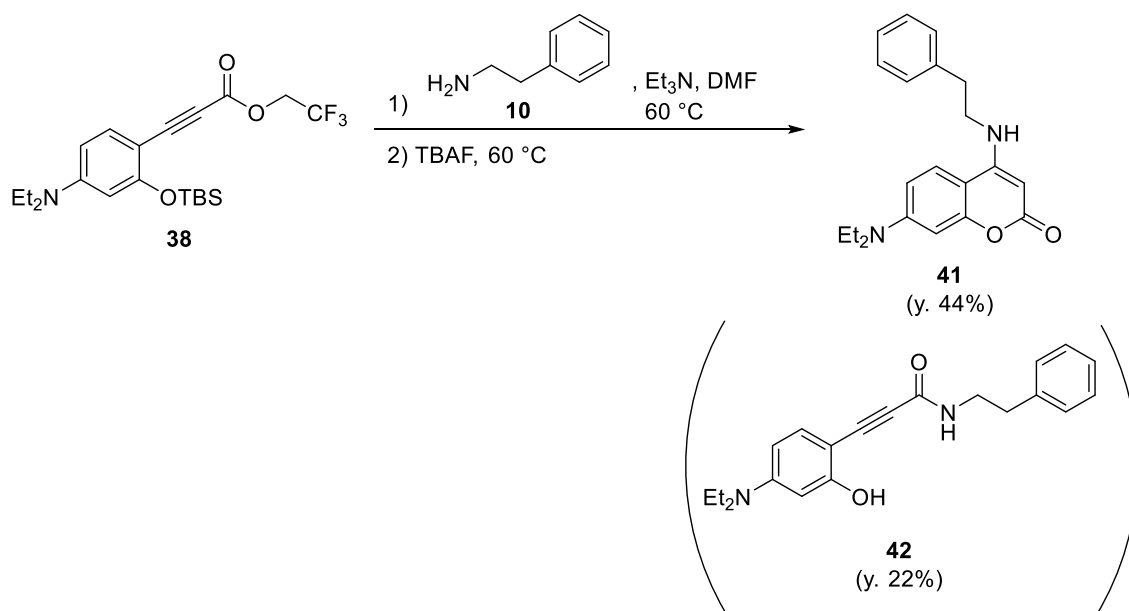
Scheme 32. ジエチルアミノクマリン前駆体 **38** と二級アミン **16** の反応

次に他の原子種の求核剤での反応性を検討した。まず、トリフルオロエチルエステル体 **38** にチオール体 **9** を作用させた場合、**40** は収率 80% で得られた (Scheme 33)。



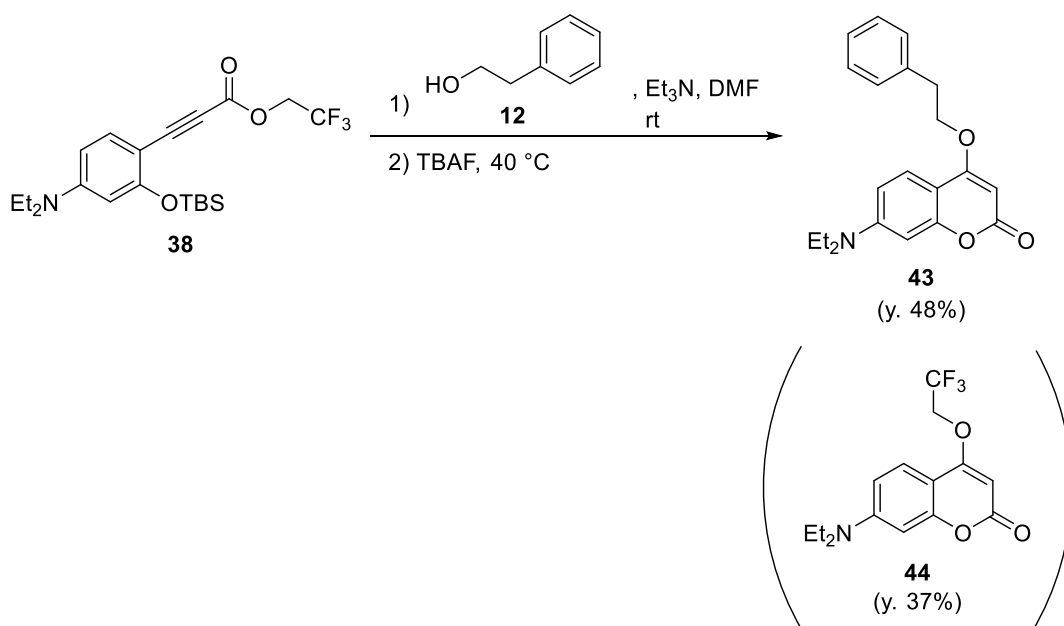
Scheme 33. ジエチルアミノクマリン前駆体 **38** とチオール体 **9** の反応

続いてトリフルオロエチルエステル体 **38** と一級アミン **10** を用いた反応では、途中で TBAF を添加して TBS 基を脱保護するワンポット化を行った。その結果、目的物 **41** が収率 44% で得られ、同時に、アミド化と TBS 基の脱保護が進行した副生成物 **42** が収率 22% で得られた (Scheme 34)。



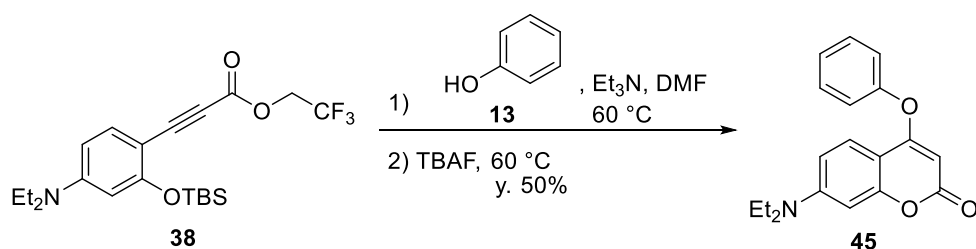
Scheme 34. ジエチルアミノクマリン前駆体 **38** と一級アミン **10** の反応

第1節の合成で用いたクマリン前駆体 **2** では、アルコール体 **12** に対し目的化合物が得られることはなかった (Scheme 21)。しかし求電子性を向上させたトリフルオロエチルエステル体 **38** を用いたところ、付加および環化反応が進行し、目的物 **43** が収率 48% で得られた。さらに副生成物として脱離したトリフルオロエタノールが付加した **44** が 37% 得られた (Scheme 35)。



Scheme 35. ジエチルアミノクマリン前駆体 **38** とアルコール体 **12** の反応

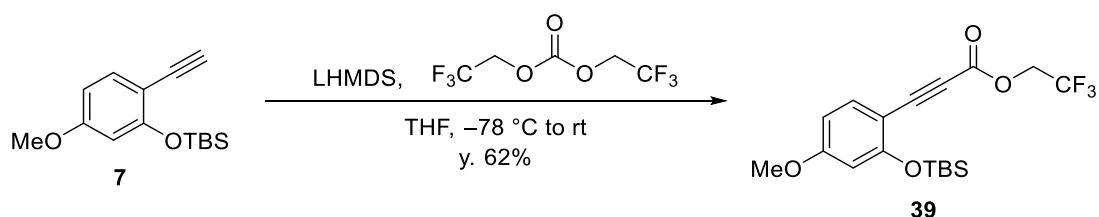
また **12** と同じく、クマリン構造の合成ができなかったフェノール (**13**) も、トリフルオロエチルエステル前駆体 **38** に変更することで、求核付加反応が初めて進行し、目的物 **45** を収率 50% で得た (Scheme 36)。



Scheme 36. ジエチルアミノクマリン前駆体 **38** とフェノール (**13**) の反応

メトキシクマリン前駆体のトリフルオロエチルエステルへの変更

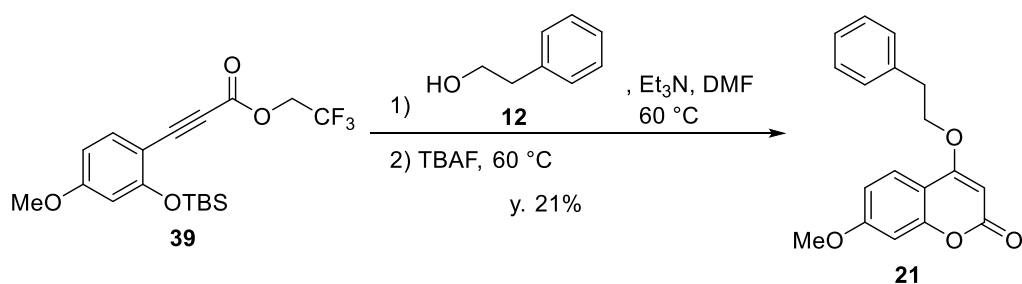
前述した通り、ジエチルアミノクマリン骨格の合成において、クマリン前駆体のエチルエステルをトリフルオロエチルエステルに変更することで、酸素求核種であっても所望の付加・環化反応が進行することを見出した。そこで、この知見に基づき、7位メトキシクマリン前駆体のエチルエステルをトリフルオロエチルエステルに変更して、酸素求核種の付加を検討することにした。ジエチルアミノクマリン前駆体の合成と同様の手順で、アルキン体 **7** を LHMDS で処理した後、Bis (2,2,2-trifluoroethyl) carbonate を作用させ、トリフルオロエチルエステル前駆体 **39** を得た (Scheme 37)。



Scheme 37. トリフルオロエチルエステルを有するメトキシクマリン前駆体 **39** の合成

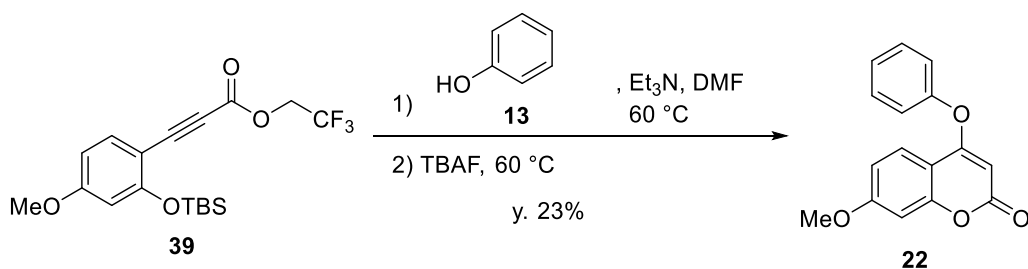
メトキシクマリン前駆体 **39** とモデル基質 **12**, **13** との反応

得られたクマリン前駆体 **39** に酸素求核種としてアルコール **12** とフェノール (**13**) を作用させた。エチルエステル体 **2** をクマリン前駆体として用いた場合、前述した通り、**12** や **13** を作用させても、目的化合物 **21**, **22** は得られなかったが、イノエートβ位の求電子性を高めたトリフルオロエチルエステル体 **39** では、付加反応が進行し目的物が得られた。すなわち、**39** にアルコールを有する **12** を DMF 溶媒中 Et₃N 存在下作用させると、クマリン環が形成した **21** が収率 21% で得られた (Scheme 38)。



Scheme 38. メトキシクマリン前駆体 **39** とアルコール体 **12** の反応

また、**39** にフェノール (**13**) を DMF 溶媒中 Et₃N 存在下作用させると、付加に続いて異性化・環化反応が進行した **22** が収率 23% で得られた (Scheme 39)。



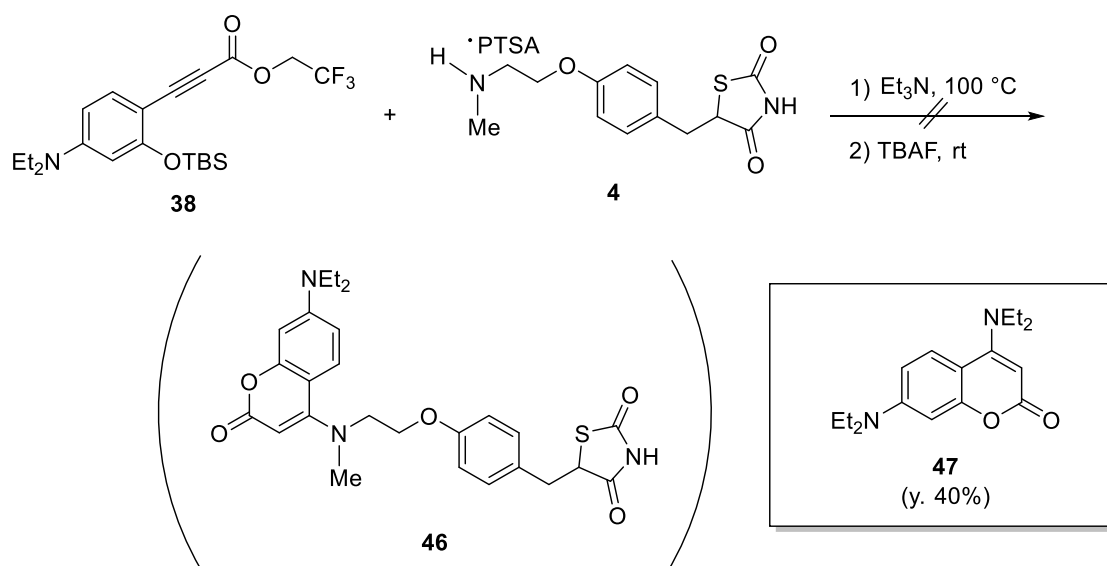
Scheme 39. メトキシクマリン前駆体 **39** とフェノール (**13**) の反応

上記 Scheme 38 および 39 で示した反応は、いずれも TLC 上で副生成物の生成が少なかったが、単離すると目的物 **21**, **22** の収率は極端に低かった (**21**: 22%, **22**: 23%)。この原因としては目的物 **21** および **22** の分子量が小さく、揮発性があるためと考えている。

ロシグリタゾンへのクマリンの導入

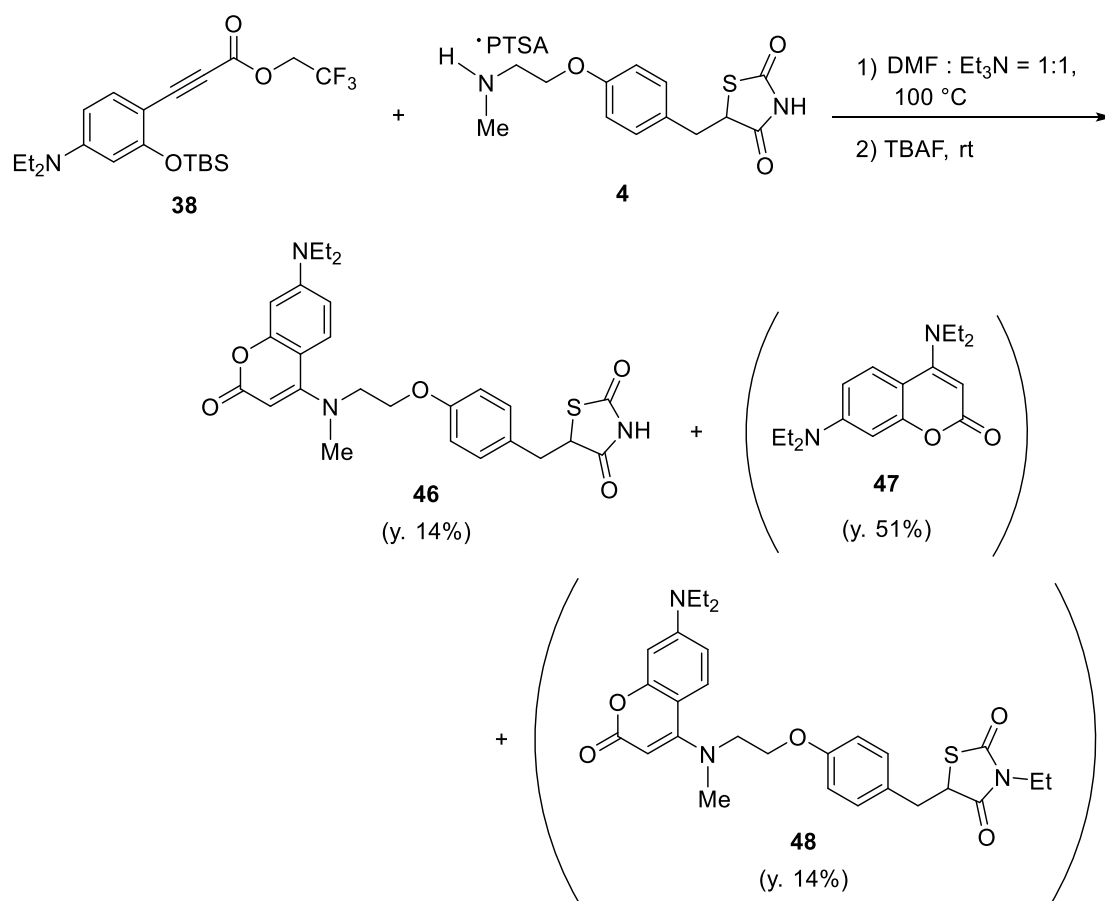
続いて、モデル基質を用いて検討したクマリン骨格構築の最適条件を、ロシグリタゾン構造に応用して、ジエチルアミノクマリン構造の導入を試みた。

はじめに、メトキシクマリン前駆体をロシグリタゾン骨格に導入した条件 (Et₃N 中 100 °C で加熱攪拌) で、ジエチルアミノクマリン前駆体 **38** をロシグリタゾン骨格 **4** と反応させたところ、目的化合物 **46** は得られず、**47** が主生成物として収率 40% で得られるのみであった (Scheme 40)。



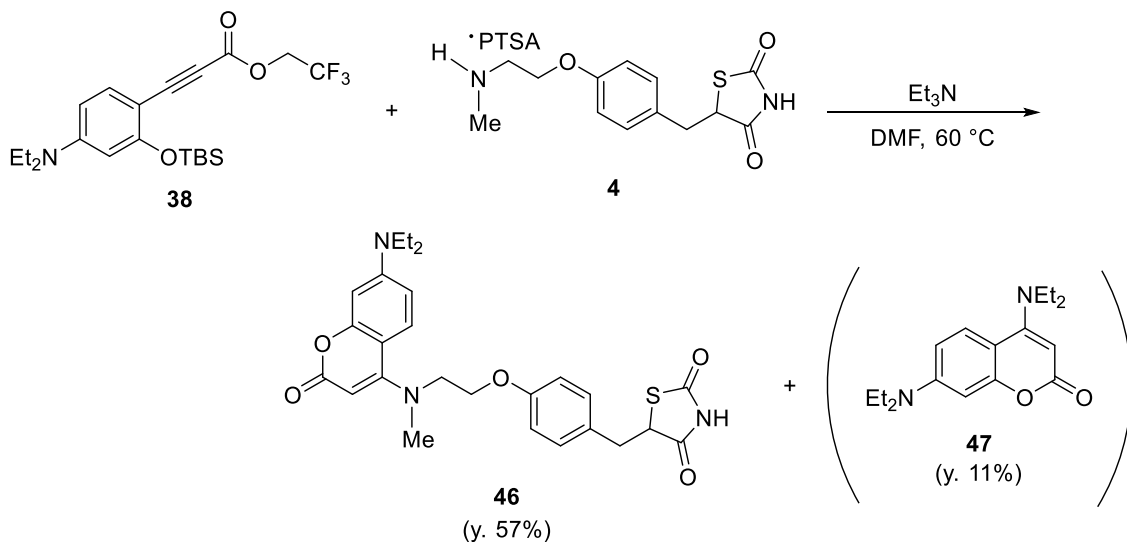
Scheme 40. ロシグリタゾンへのジエチルアミノクマリン導入検討 1

そこで Et_3N を減らし、 $\text{DMF}:\text{Et}_3\text{N}=1:1$ で反応を行うと、目的物 **46** (14%)、ジエチルアミン付加体 **47** (51%) のほかに、TZD のイミド窒素がエチル化された **48** (14%) も得られた (Scheme 41)。この **48** は、カルボン酸の生物学的等価体である TZD のイミドが保護され、酸性官能基が失われている。このような $\text{PPAR}\gamma$ リガンドは着目されていなかったため、 $\text{PPAR}\gamma$ の研究上意味のある化合物であると思われる。



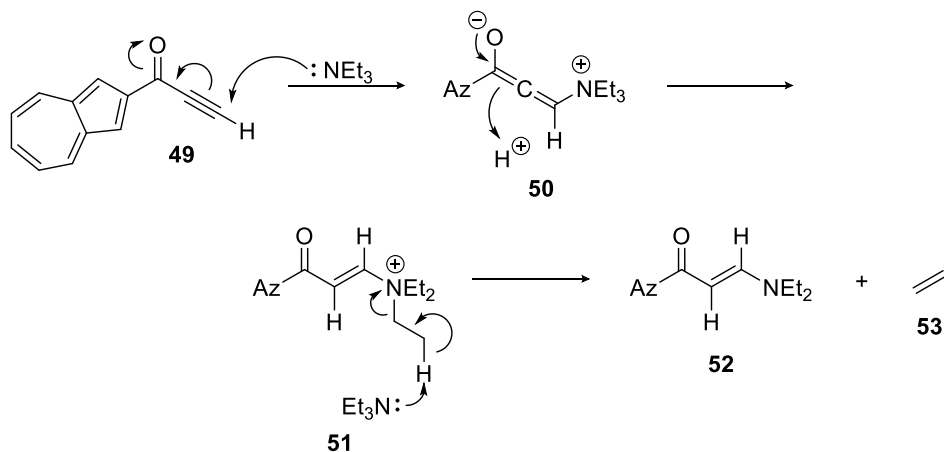
Scheme 41. ロシグリタゾンへのジエチルアミノクマリン導入検討 2

これまでの検討結果を踏まえて、本反応では過剰量の Et_3N が原因で所望の反応ではなく、副反応が優先して進行している可能性が示唆された。そこで DMF 溶媒中 3 当量の Et_3N 存在下 **4** と **38** を 60°C で加熱攪拌したところ、TBS 基の脱保護を伴い、付加・環化反応が進行した目的化合物 **46** を収率 57% で得ることに成功した。また、副生成物 **47** も 11% で得られた (Scheme 42)。



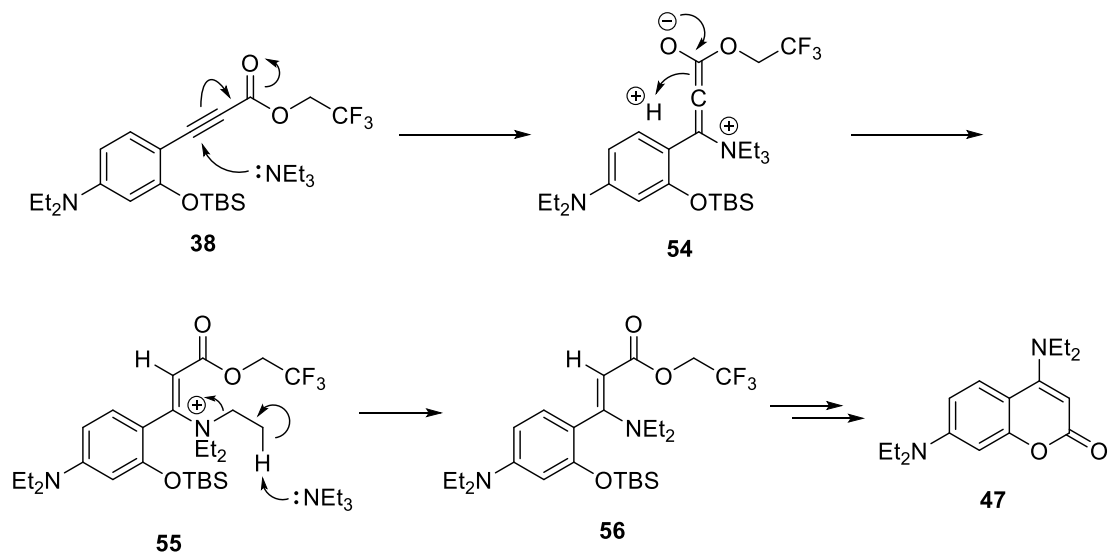
Scheme 42. ロシグリタゾンへのジエチルアミノクマリン導入検討 3

次に **47**, **48** の生成メカニズムについて考察する。このような反応例は少ないが、Scheme 43 に示したように、アズレンを有するイノンに 3 級アミンが付加することが報告されており、次の反応機構が示されている。⁸⁶



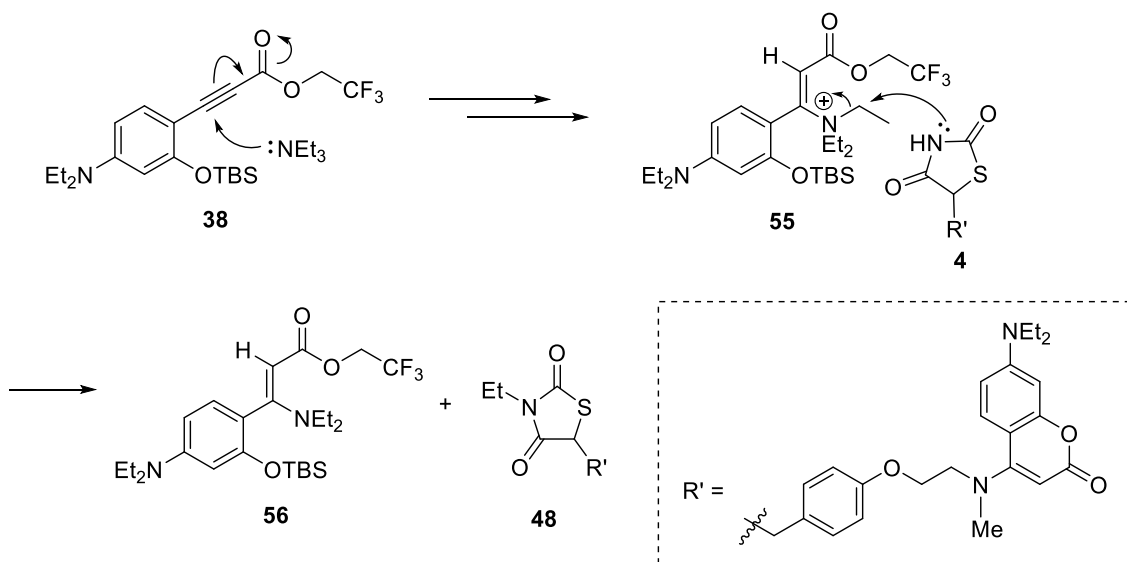
Scheme 43. イノンに Et₃N が付加する反応機構

上述した反応機構を参考に推定した反応機構は以下の通りである。クマリン前駆体 **38** に Et₃N が付加することで、**54** を経て **55** が生成した後、β脱離により **56** が得られる。その後 TBS 基の脱保護、異性化・環化が進行して、ジエチルアミン付加体 **47** が生成すると推定した (Scheme 44)。



Scheme 44. ジエチルアミン付加体 **47** 生成の推定反応機構

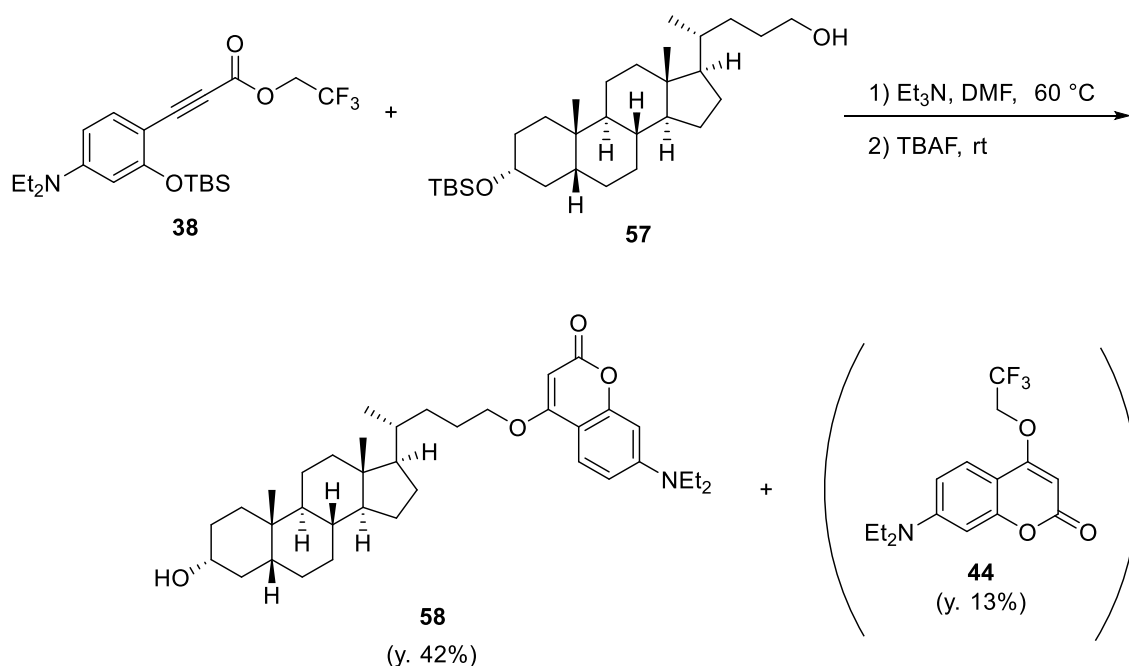
また、TZD のイミド窒素がエチル化された **48** は、**55** の生成後、 β 脱離ではなく **4** のイミドが窒素からの S_N2 反応もしくは遊離したエチルカチオンをイミド窒素が捕捉することで得られたと推定した (Scheme 45)。



Scheme 45. 副生成物 **48** 生成の推定反応機構

ステロイド骨格へのクマリン環導入

トリフルオロエチルエステル基を導入したジエチルアミノクマリン前駆体 **38** を用いることで、様々な原子 (S, N, O) の求核種を用いて、クマリン環を構築することが可能となった。そこで本法のアプリケーション拡大の一例として、ステロイド骨格を有する化合物へのクマリン環導入を行った。所属研究室の化合物ライブラリーの中から、TBS保護基を有するステロイド型アルコール **57** を選択し、クマリン環の導入を試みた。トリフルオロエチルエステル体 **38** と **57** を DMF 溶媒中、3 当量の Et₃N 存在下 60 °C で加熱撹拌した後、TBAF を滴下し室温で撹拌することで、ジエチルアミノクマリンを有する **58** をワンポットで得ることができた (Scheme 46)。トリフルオロエチルエステル体に変更したことにより、求核性の低い水酸基を足がかりに、アルコール化合物にもクマリン骨格を最終工程で導入可能であることを示した。



Scheme 46. ステロイド型アルコール **57** へのクマリン環導入

遺伝子転写活性能の評価

次に COS-7 細胞を用いて、ロシグリタゾン、合成したメトキシクマリン型ロシグリタゾン **5** とジエチルアミノクマリン型ロシグリタゾン **46** の PPAR γ に対する遺伝子転写活性化能を dual luciferase assay で評価した。その結果を Figure 18 に示す。**46** もロシグリタゾンと同等の生物活性を示した。このことから、7 位メトキシ基をジエチルアミノ基に変更しても、PPAR γ のアゴニスト活性には影響を与えないことが判明した。一方、TZD のイミド窒素がエチル化された副生成物 **48** はロシグリタゾンの最大活性よりも低い活性を示すことが明らかになり、パーシャルアゴニストであることが判明した。

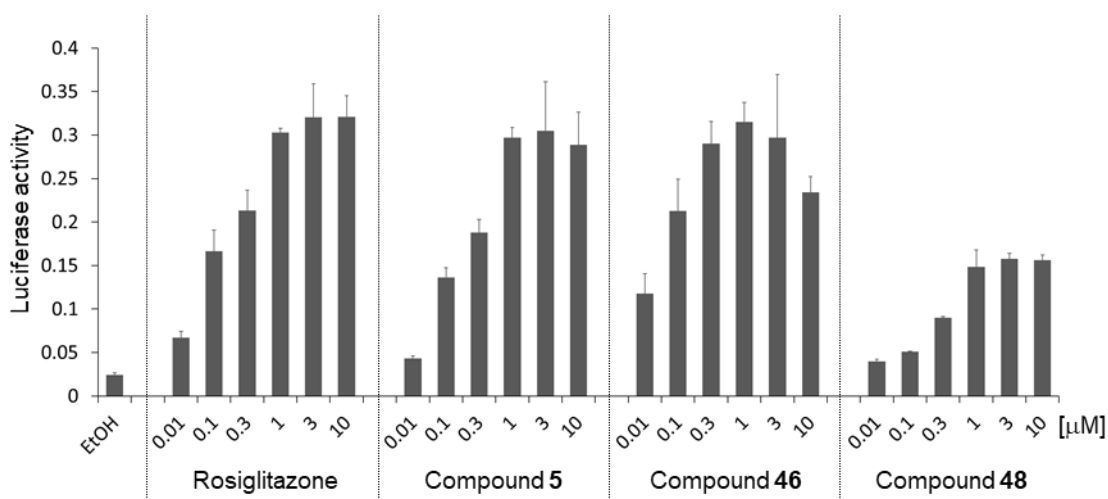


Figure 18. PPAR γ に対する遺伝子転写活性能の評価

compound	Rosiglitazone	5	46	48
EC ₅₀ (μ M)	0.17	0.18	0.034	0.35

Table 7. ロシグリタゾンと化合物 **5**, **46**, **48** の EC₅₀

また同じく COS-7 細胞を用いて、PPAR α に対する遺伝子転写活性化能も評価した (Figure 19)。ロシグリタゾンの代わりに、PPAR α/γ デュアルアゴニストである Farglitazar をポジティブコントロールとして用いた。合成した **5**, **46**, **48** はどれも PPAR α に対してアゴニスト活性を示さなかった。したがって、**5**, **46**, **48** は PPAR α よりも PPAR γ に選択性が高いアゴニストであることが示され、期待した通りロシグリタゾンの生物活性を保持していた。

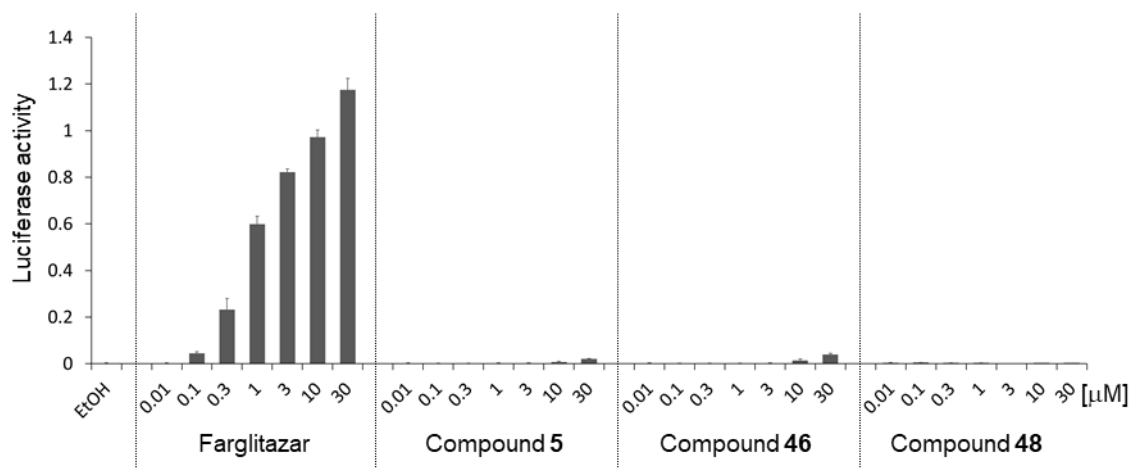


Figure 19. PPAR α に対する遺伝子転写活性化能の評価

モデル化合物の蛍光スペクトル

続いて、クマリン4位に結合した原子種の違いによる蛍光スペクトルへの影響を明らかにするため、チオール、一級アミン、二級アミン、アルコール、フェノールのモデル基質を付加させたジエチルアミノクマリン型化合物 **40**, **41**, **37**, **43**, **45** と、アルコールおよびフェノールが付加したメトキシクマリン型化合物 **21**, **22** の CH₂Cl₂, THF, MeOH, H₂O 溶媒中での蛍光スペクトルを測定した。その結果を Figure 20 と Table 8 に示す。なお、ジエチルアミノクマリン型化合物 **40**, **41**, **37**, **43**, **45** は励起波長 360 nm、メトキシクマリン型化合物 **21**, **22** は励起波長 310 nm で蛍光スペクトルを測定した。

ジエチルアミノクマリン型化合物の蛍光スペクトル

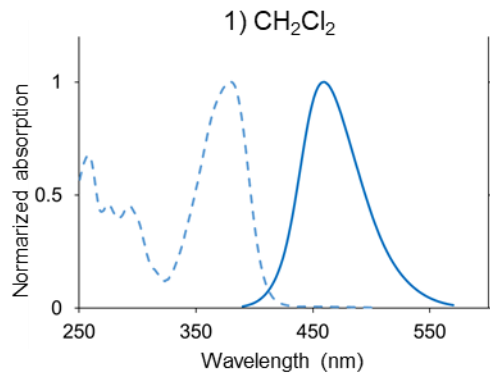
ジエチルアミノクマリン型化合物 **40**, **41**, **37**, **43**, **45** の蛍光スペクトルを比較したところ、どの溶媒系においても、最も短波長側に蛍光極大を示したのは、一級アミンが付加した **41** であった。また、最も長波長側に蛍光極大を示したのは、チオールが付加した **40** であった。アルコールが付加した **43** とフェノールが付加した **45**、すなわち酸素原子が付加した場合には、どの溶媒系においても、蛍光波長に変化が見られなかった。

メトキシクマリン型化合物の蛍光スペクトル

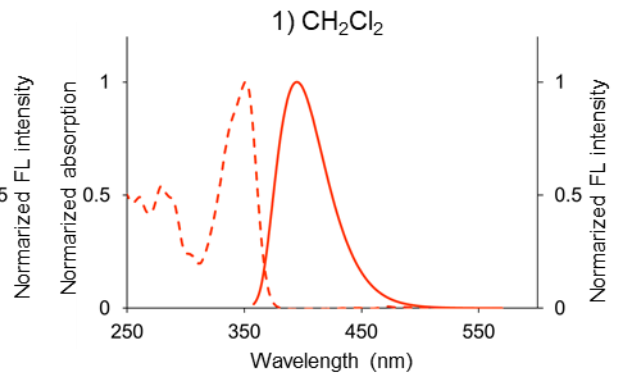
第2節において初めて得られた酸素求核付加体である、アルコールが付加したメトキシクマリン型化合物 **21** とフェノールが付加したメトキシクマリン型化合物 **22** についても蛍光スペクトルを測定した。その結果、ジエチルアミノクマリン型の酸素付加体である **43** および **45** と同様に、各溶媒系における蛍光スペクトルに変化が見られなかった。つまり酸素原子がクマリン4位に付加した場合には、どの溶媒系においても、蛍光波長に変化が見られなかった。さらに第1節で得られたモデル化合物も含めてメトキシクマリン型化合物について比較すると、若干の違いはあるがジエチルアミノクマリン型と同様に、一級アミンが付加した **18** は最も短波長側に蛍光極大を示した。

以上より、付加した原子によって蛍光極大波長が異なることが明らかになった。

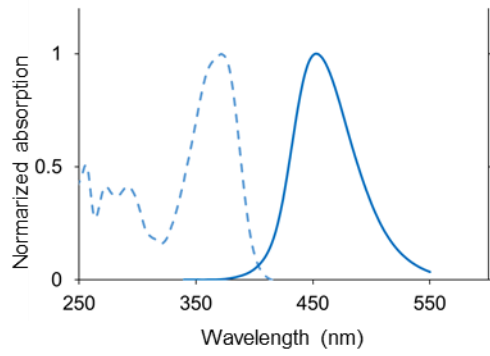
A) 化合物40



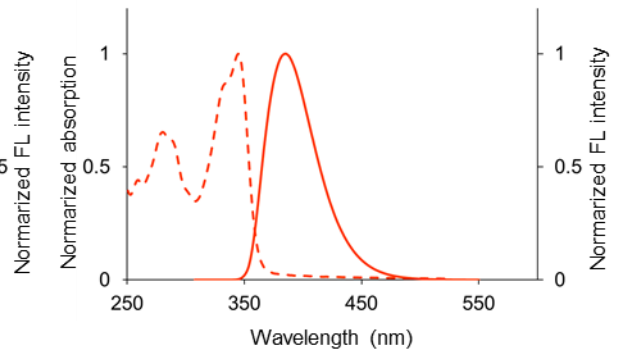
B) 化合物41



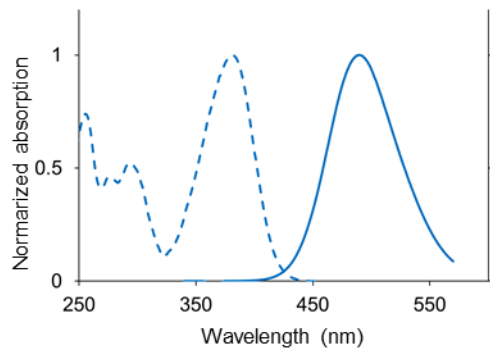
2) THF



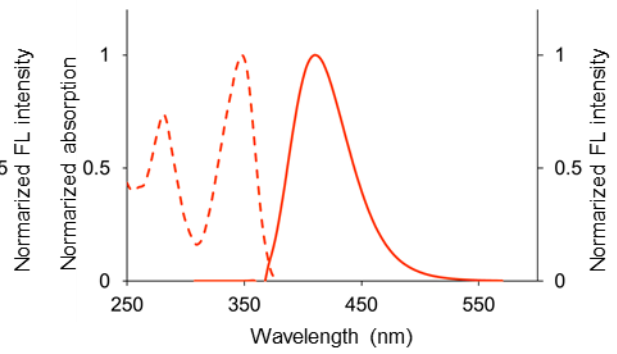
2) THF



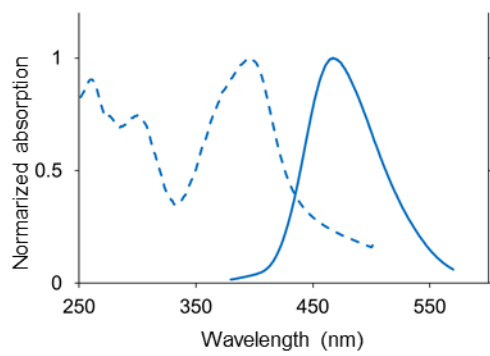
3) MeOH



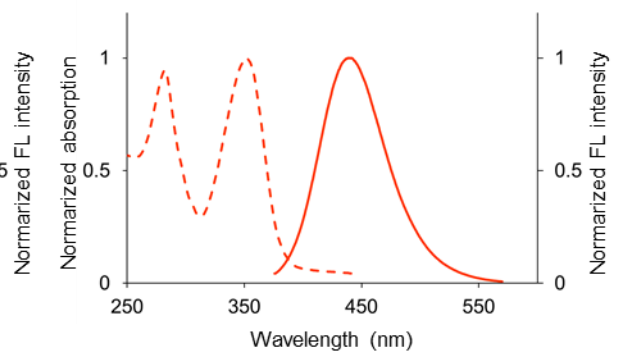
3) MeOH



4) H₂O

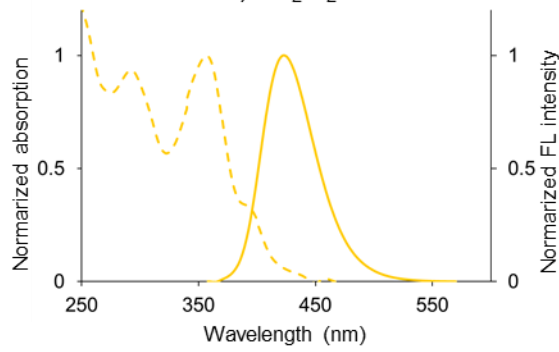


4) H₂O



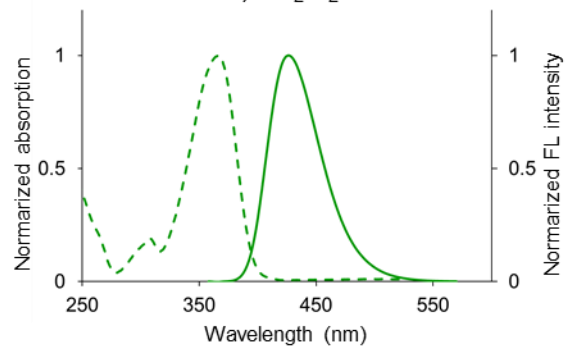
C) 化合物37

1) CH₂Cl₂

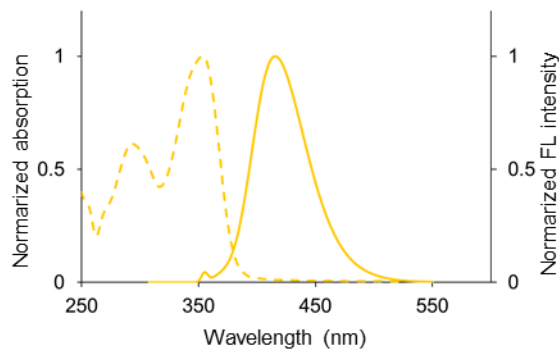


D) 化合物43

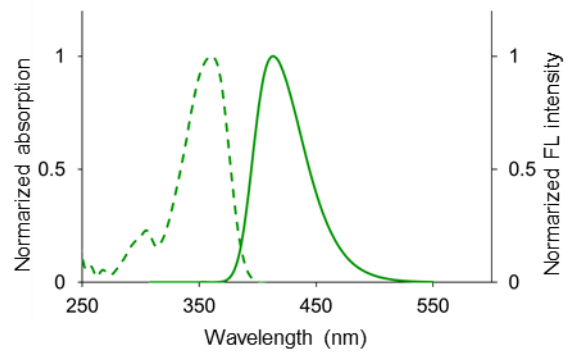
1) CH₂Cl₂



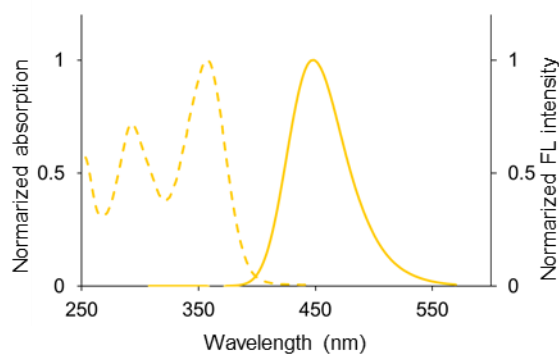
2) THF



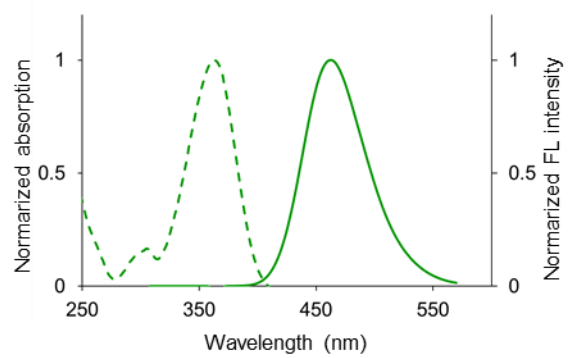
2) THF



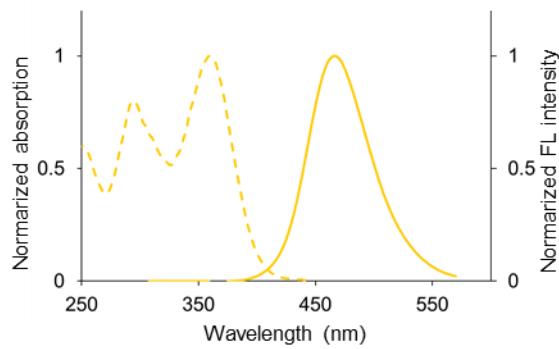
3) MeOH



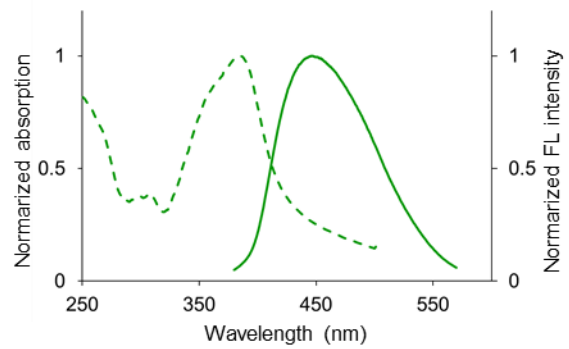
3) MeOH



4) H₂O

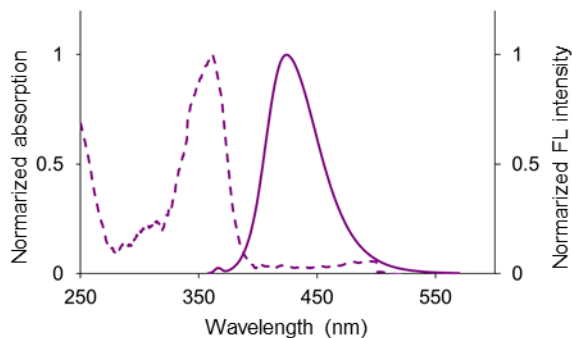


4) H₂O

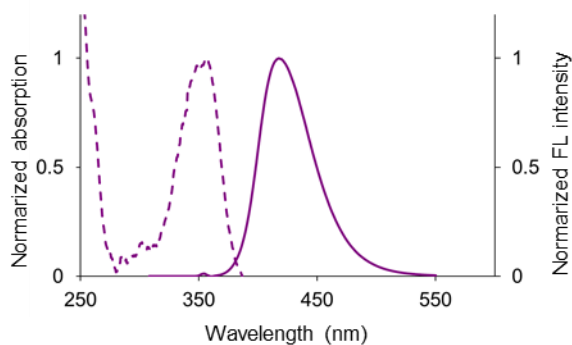


E) 化合物45

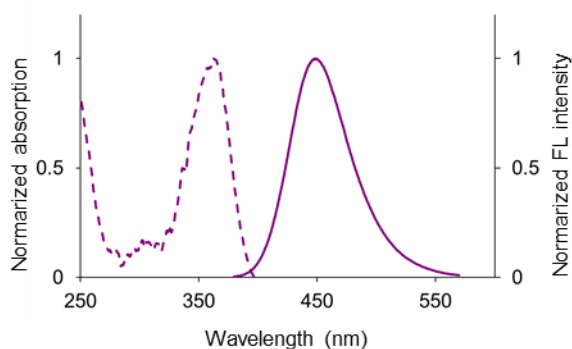
1) CH₂Cl₂



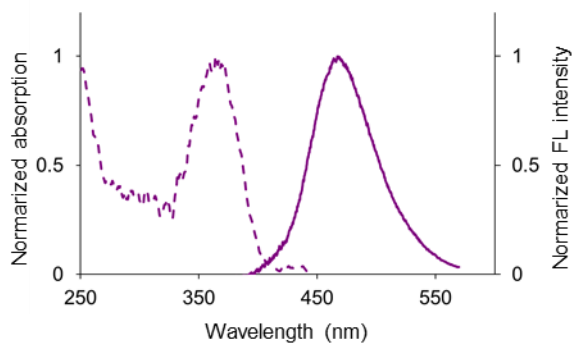
2) THF



3) MeOH

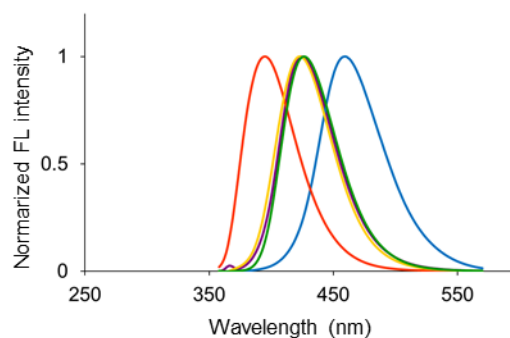


4) H₂O

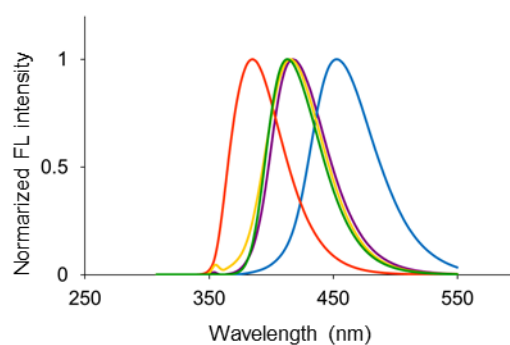


F) 40, 41, 37, 43, 45の蛍光スペクトルの重ね合わせ

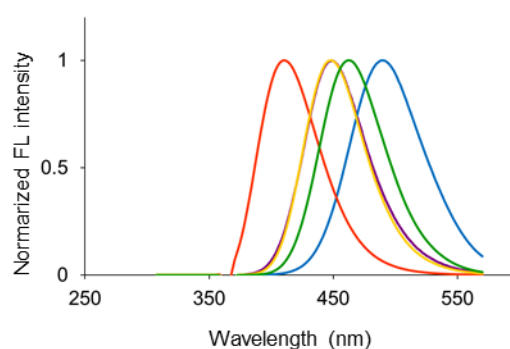
1) CH₂Cl₂



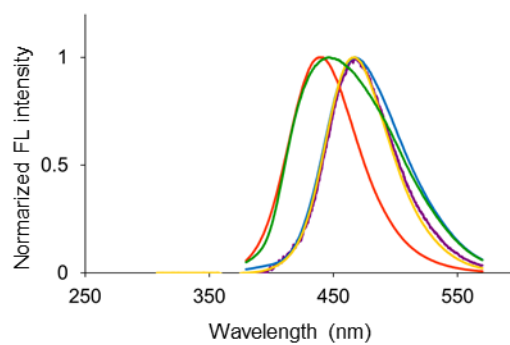
2) THF



3) MeOH



4) H₂O



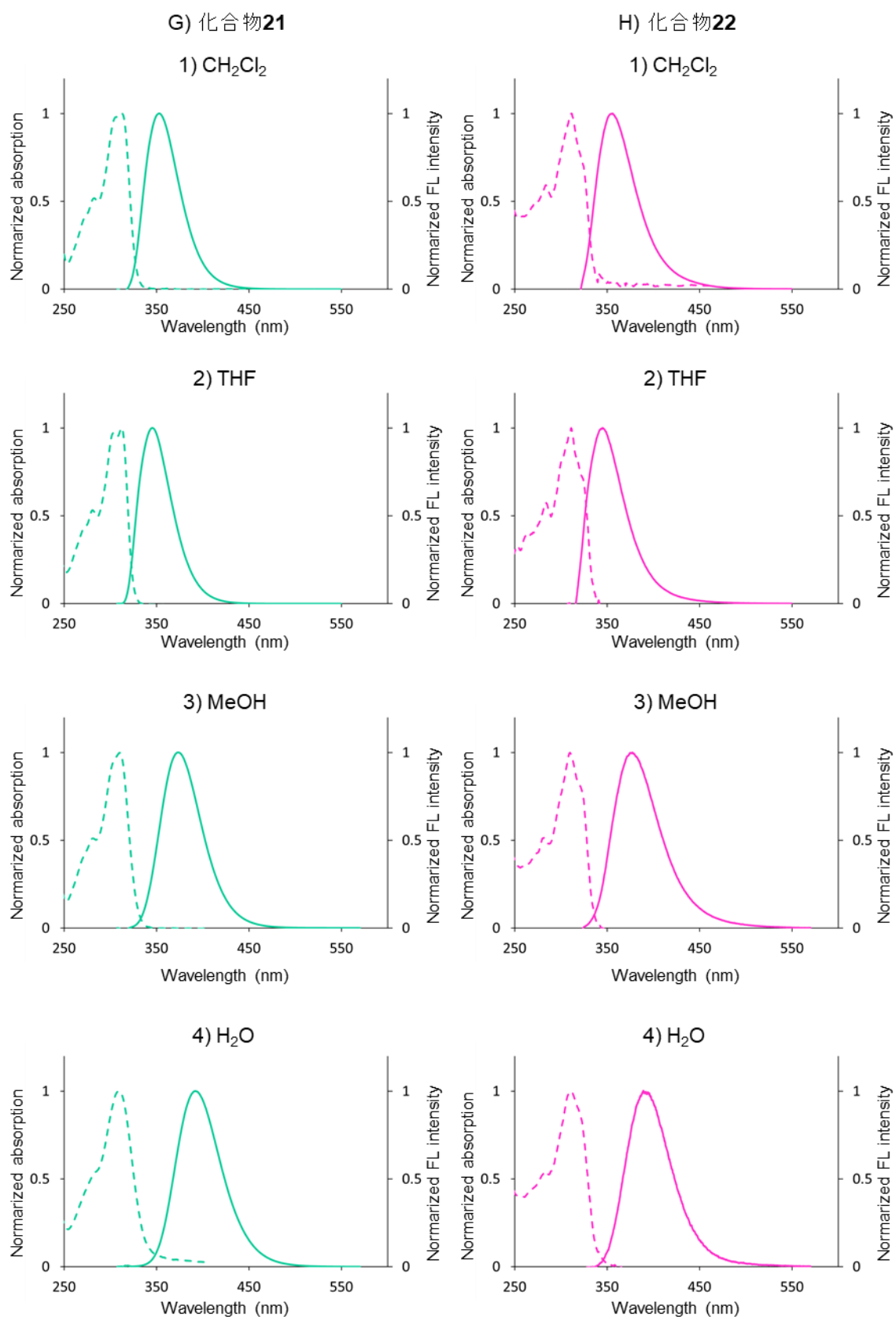
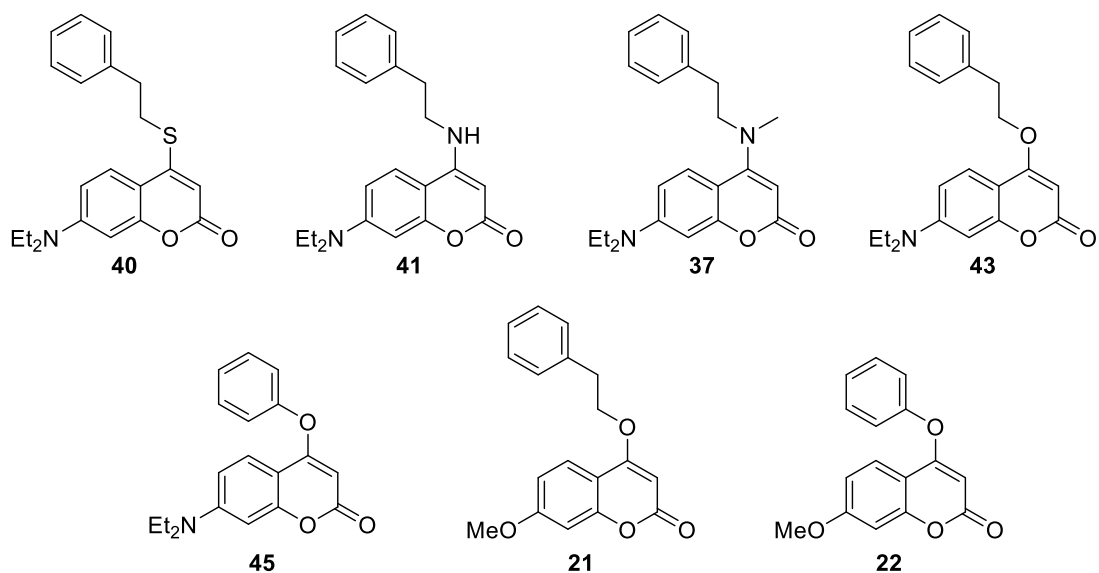


Figure 20. モデル化合物の吸収スペクトル (破線) と蛍光スペクトル (実線)



Compound	λ (nm)	CH ₂ Cl ₂	THF	MeOH	H ₂ O
40	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$	379	372	382	396
	$\lambda_{\max}^{\text{f}}$	460	453	489	467
41	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$	351	345	348	352
	$\lambda_{\max}^{\text{f}}$	395	385	410	440
37	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$	357	354	357	359
	$\lambda_{\max}^{\text{f}}$	423	415	449	467
43	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$	367	360	363	385
	$\lambda_{\max}^{\text{f}}$	426	413	463	445
45	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$	361	357	362	365
	$\lambda_{\max}^{\text{f}}$	424	418	449	468
21	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$	312	312	310	310
	$\lambda_{\max}^{\text{f}}$	353	346	373	392
22	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$	311	311	310	311
	$\lambda_{\max}^{\text{f}}$	355	345	377	389

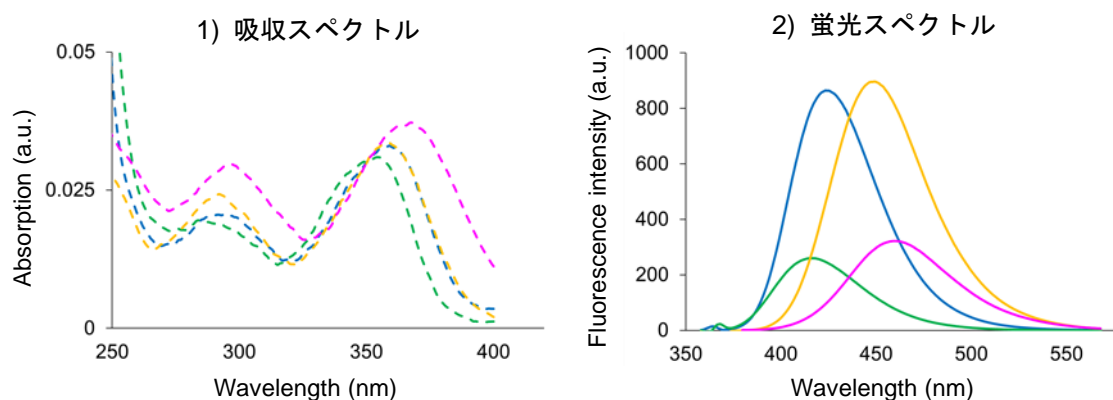
Table 8. ジエチルアミノクマリン型化合物 **40**, **41**, **37**, **43**, **45** とメトキシクマリン型化合物 **21**, **22** の吸収スペクトルと蛍光スペクトル

ジエチルアミノクマリン型ロシグリタゾン **46** と副生成物 **48** の蛍光スペクトル

次に、合成したジエチルアミノクマリン型ロシグリタゾン **46** とその副生成物 **48** の CH_2Cl_2 , THF, MeOH, H_2O 溶媒中での蛍光スペクトルを測定した。そのスペクトルデータを Figure 21 と Table 9 に示す。ジエチルアミノクマリン体 **46** は、励起波長 360 nm において、 CH_2Cl_2 溶液中で 423 nm を極大とする蛍光を示した。THF 溶液中では 416 nm、MeOH 溶液中では 449 nm、 H_2O 溶液中では 460 nm を極大とする蛍光を示した。一方、副生成物 **48** は、励起波長 360 nm において、 CH_2Cl_2 溶液中で 423 nm を極大とする蛍光を示した。THF 溶液中では 416 nm、MeOH 溶液中では 449 nm、 H_2O 溶液中では 461 nm を極大とする蛍光を示した。

また **46**, **48** は有機溶媒中 (CH_2Cl_2 , THF, MeOH) よりも、 H_2O では長波長シフトすることが明らかになった (Figure 21)。予想したとおり、**46** と **48** は溶媒の違いにおいて、蛍光波長の変化は同様であった。

A) 化合物 **46**



B) 化合物 **48**

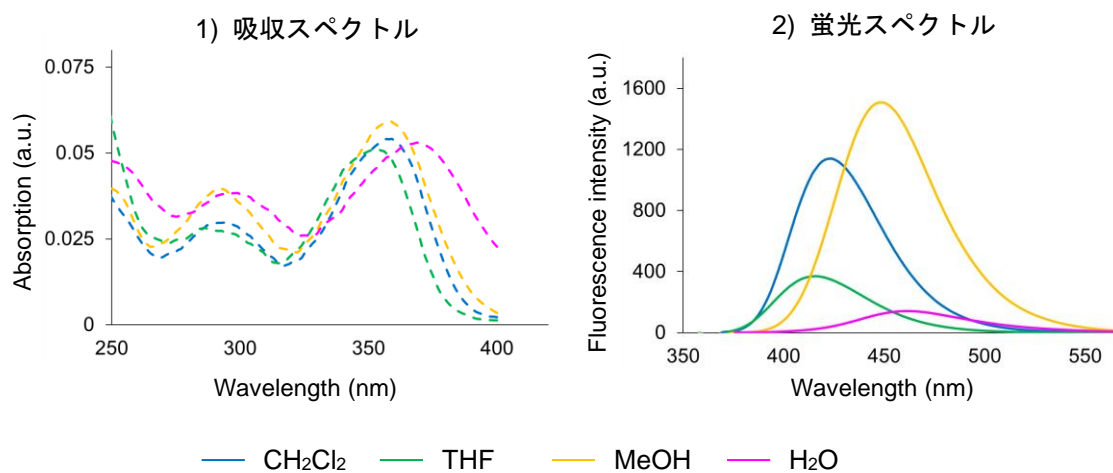
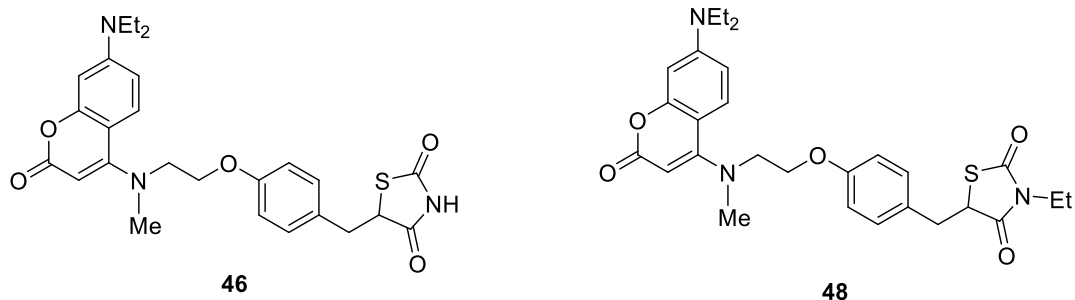


Figure 21. CH_2Cl_2 , THF, MeOH, H_2O 溶媒中でのジエチルアミノクマリン型ロシグリタゾン **46** と副生成物 **48** の吸収スペクトル (破線) と蛍光スペクトル (実線)



Compound	λ (nm)	CH ₂ Cl ₂	THF	MeOH	H ₂ O
46	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$	359	354	359	368
	$\lambda_{\max}^{\text{f}}$	423	416	449	460
48	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$	359	353	358	369
	$\lambda_{\max}^{\text{f}}$	423	416	449	461

Table 9. ジエチルアミノクマリン型ロシグリタゾン **46** と副生成物 **48** の吸収極大波長と蛍光極大波長

一般に、溶媒の極性が増加するとストークスシフトが増加する。⁸⁷ これは励起状態の双極子モーメントが増大することに起因する。励起状態の双極子モーメントの決定には Lippert-Mataga 方程式がよく使用される。この式では誘電率と屈折率を用いて溶媒の極性を決定する。溶媒の極性は誘電率によって評価できるが、ここで用いた溶媒の誘電率は、CH₂Cl₂: 8.9, THF: 7.4, MeOH: 32.6, H₂O: 78.5 である。⁸⁸ つまり、誘電率は CH₂Cl₂ < THF < MeOH < H₂O であり、これは **46** および **48** のストークスシフトと同じ関係であった。またモデルクマリン化合物 **18, 21, 22, 41, 37, 45** においても同様の傾向であった。

次に 0.1 M H₂SO₄ 溶液中での硫酸キニーネ ($\Phi = 0.577$) を基準物質として、相対蛍光量子収率を求めた。⁸⁵ メトキシクマリン型ロシグリタゾン **5** はどの溶媒においても小さな値 (0.0359–0.00461) を示した。これに対し、ジエチルアミノクマリン型ロシグリタゾン **46** は 0.143–0.541、その副生成物 **48** は 0.0865–0.764 と、期待したとおりメトキシ体 **5** よりも高い蛍光量子収率を示した。**46** と **48** は有機溶媒中では蛍光量子収率は高い値を示したが、水中では低い値を示した。

	CH ₂ Cl ₂	THF	MeOH	H ₂ O
5	0.00359	0.00461	0.00392	0.00369
46	0.541	0.191	0.532	0.143
48	0.764	0.172	0.432	0.0865

Table 10. 硫酸キニーネ ($\Phi = 0.577$) を標準物質とした相対蛍光量子収率

以上の性質から、**46** および **48** はタンパク質の疎水性結合部位へ結合した際、蛍光が変化すると期待できる。さらに、**46** と **48** は PPAR γ に対する生物活性は異なるが、同等の蛍光特性を有することが示唆された。

第1章 第2節の総括

エチルエステルを有するジエチルアミノクマリン前駆体 **29** に対して、二級アミン **16** を作用させたところ、求核付加反応はほとんど起きなかった。そこで、イノエートβ位の求電子性を向上させるため、エチルエステルを有する **28** からトリフルオロエチルエステルを有する **38** に変更したことで、チオール体 **9**、一級アミン **10**、二級アミン **16**、アルコール体 **12**、フェノール (**13**) のすべてのモデル求核剤においてジエチルアミノクマリン (**40, 41, 43, 37, 45**) を構築することができた。また前節で検討した7-メトキシクマリン環の構築についても、前駆体のエステル部をトリフルオロエチルエステルに置き換えた前駆体 **39** に変更したことで、モデル基質であるアルコール体 **12**、フェノール (**13**) でもメトキシクマリン (**21, 22**) を合成することに成功した。これにより、クマリン4位にS原子、N原子、O原子を導入する手法を確立できた。さらに二量体 **20** の抑制を目的に、TBS 保護体に対する求核付加反応を行い、続けて TBS 基の脱保護を行うと同時に環化反応が進行する、一連の反応のワンポット合成に変更した。ワンポット化により、前駆体同士の二量体化を抑えることはできたが、望まない付加反応もいくつか見られた。これはトリフルオロエチルエステルにしたことで、求電子性が上がったことが原因であり、求核剤の反応性に合わせて求電子性を調節することで副生成物の生成を抑えることができると考えている。

さらにジエチルアミノクマリン環を導入したジエチルアミノクマリン型ロシグリタゾン **46** を合成した。また **46** のイミド窒素にエチル基が付加した副生成物 **48** が得られた。**46** と **48** の遺伝子転写活性を評価した結果、導入したジエチルアミノクマリンはPPAR γ 活性に与える影響が小さく、**46** はロシグリタゾンと同程度の活性を維持していた。一方で副生成物 **48** は、PPAR γ を活性化するが、ロシグリタゾンや合成した **5** および **46** よりも弱い活性を示した。さらに **46** と **48** は、前節で合成したメトキシクマリン型ロシグリタゾン **5** よりも強い蛍光を示した。

以上の結果より、ジエチルアミノ体 **46** はPPAR γ に対しロシグリタゾンと同程度の生物活性を有するPPAR γ アゴニストであることを明らかにした。また **48** は、PPAR γ に示す生物活性は **46** より弱い、蛍光特性は **46** と同等であることが示唆された。つまり **46** および **48** は、有機溶媒中ではH₂O中よりも強い蛍光を示す一方で、H₂O中では蛍光が減弱し長波長シフトする環境応答能を示した。受容体のリガンド結合部位は一般的に疎水性の環境である。このためリガンド結合部位と水溶液中の環境は大きく異なる。この性質の違いから、PPAR γ アゴニスト **46** と **48** はPPAR γ に対する結合親和性評価に適用可能な蛍光プローブになることが期待できる結果を第1章で示した。

第 2 章 クマリン型ロシグリタゾンの結合評価系への適用 と結晶構造

第 1 節 結合評価系への適用

前章で合成したジエチルアミノクマリン型ロシグリタゾン **46, 48** は環境応答能を有する PPAR リガンドであると推測された。

そこで **46, 48** を PPAR 結合評価系に適用可能か検討したので、以下第 2 章で詳しく述べる。まず、**46** の PPAR γ との結合親和性を評価するため、解離定数 K_d 値を求めた。

PPAR γ に対する化合物 46 の K_d 値算出

1 μM の化合物 46 に、0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 μM の PPAR γ を加え、励起波長 367 nm における蛍光スペクトルを測定した (Figure 22A)。PPAR γ の濃度が高くなるにつれて、蛍光極大は短波長側にシフトし、蛍光強度は強くなることが観測された。各 PPAR γ 濃度につき、それぞれ3回測定を行った。410 nm における蛍光強度の平均値を用いて、統計解析ソフト GraphPad Prism で K_d 値を算出すると 1558 nM となった (Figure 22B)。

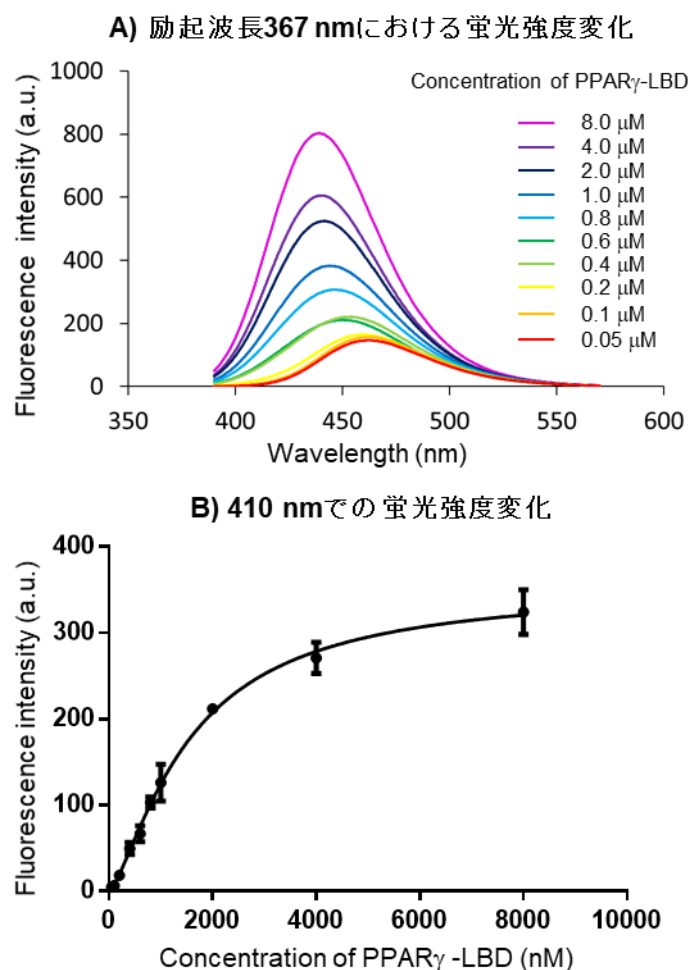


Figure 22. 化合物 46 の K_d 値算出 (A) PPAR γ -LBD 存在下で励起波長 367nm での化合物 46 の蛍光波長 (B) 410 nm の蛍光強度変化 ($n = 3$)

また統計解析ソフト GraphPad Prism で、 EC_{50} 値 (410 nm) を計算したところ 2103 nM になった。次に、式^{89,90} $K_d = EC_{50} - [L] / 2$ に代入すると ($[L]$ は蛍光プローブ全濃度であり、この場合 1000 nM である)、 $K_d = 1603$ nM となり GraphPad Prism で求めた K_d 値に近い値であった。このことから K_d 値算出の実験の信頼性は高いものと判断し、次の検討を行うこととした。

化合物 46 を用いた PPAR γ リガンドの K_i 値算出

次に化合物 46 を蛍光プローブに用いた競合的結合試験により、PPAR γ リガンドとして知られている、ロシグリタゾン、Farglitazar、ピオグリタゾン、LT175 の K_i 値を算出することにした。報告されている K_i 値と 46 を用いて算出した K_i 値を比較して、化合物 46 が PPAR γ に対する結合評価系に適用可能か検討した。

ロシグリタゾンの K_i 値算出

はじめにロシグリタゾンの K_i 値の算出を行った。0.6 μ M の PPAR γ と 0.72 μ M の化合物 46 に 1.17 nM, 4.69 nM, 18.75 nM, 75 nM, 0.3 μ M, 1.2 μ M, 4.8 μ M, 19.2 μ M, 76.8 μ M のロシグリタゾンを加えて、励起波長 367 nm における蛍光スペクトルを測定した (Figure 23A)。高濃度のロシグリタゾンを添加していくと、PPAR γ に結合していた化合物 46 が PPAR γ から遊離し、代わりにロシグリタゾンが PPAR γ に結合する。そのため PPAR γ に結合していない、溶液中に遊離した 46 が増加して、蛍光極大波長が長波長側にシフトし、蛍光強度が減少した。なお各ロシグリタゾン濃度について、それぞれ 3 回測定を行った。410 nm の蛍光強度の平均値を用いて解析 (GraphPad Prism) すると、 $IC_{50} = 1692$ nM となった (Figure 23B)。また、先の実験より算出した 46 の K_d 値 (GraphPad Prism) を使い、 K_i 値を計算 (GraphPad Prism) すると 1157 nM になった。

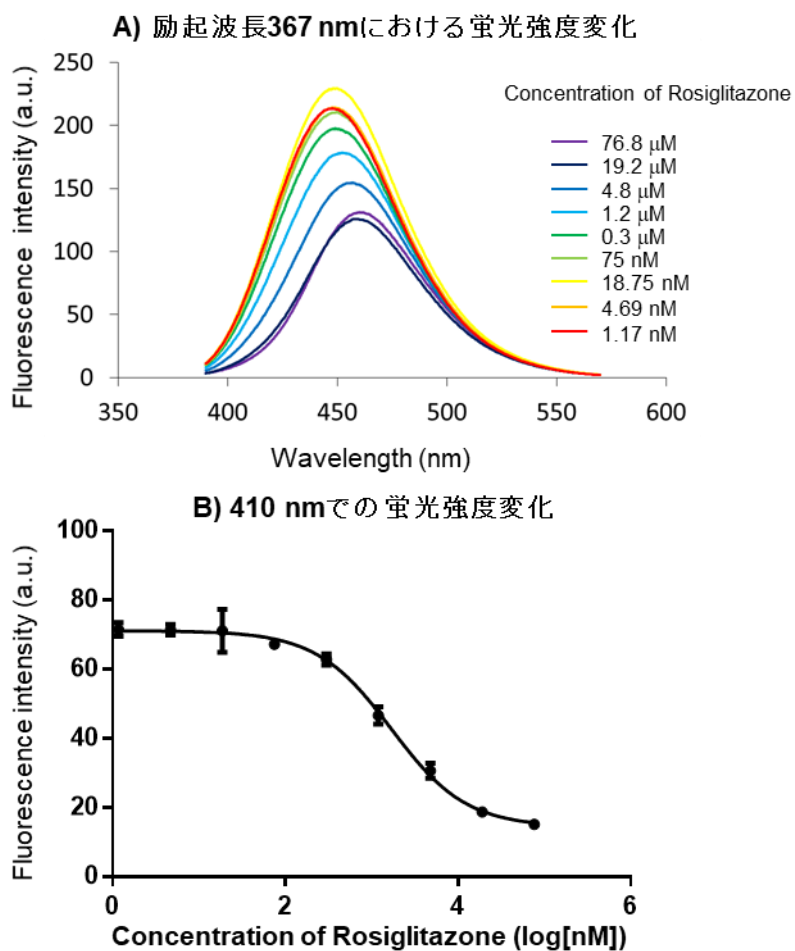


Figure 23. ロシグリタゾンの K_i 値算出 (A) PPAR γ -LBD、ロシグリタゾン存在下で励起波長 367nm での化合物 46 の蛍光波長 (B) 410 nm の蛍光強度変化 ($n = 3$)

Farglitazar の K_i 値算出

続いて Farglitazar の K_i 値算出を行った。先と同様に $0.6 \mu\text{M}$ の $\text{PPAR}\gamma$ と $0.72 \mu\text{M}$ の化合物 **46** に 0.59 nM , 2.34 nM , 9.38 nM , 37.5 nM , 150 nM , 600 nM , $2.4 \mu\text{M}$, $9.6 \mu\text{M}$ の Farglitazar を加えて、励起波長 367 nm における蛍光スペクトルを測定した。各 Farglitazar 濃度について、それぞれ 3 回測定を行った。410 nm の蛍光強度の平均値を用いて解析 (GraphPad Prism) すると、 $\text{IC}_{50} = 193.4 \text{ nM}$ となった (Figure 24)。また先の実験より算出した **46** の K_d 値 (GraphPad Prism) を使い、 K_i を計算 (GraphPad Prism) すると 132.3 nM になった。

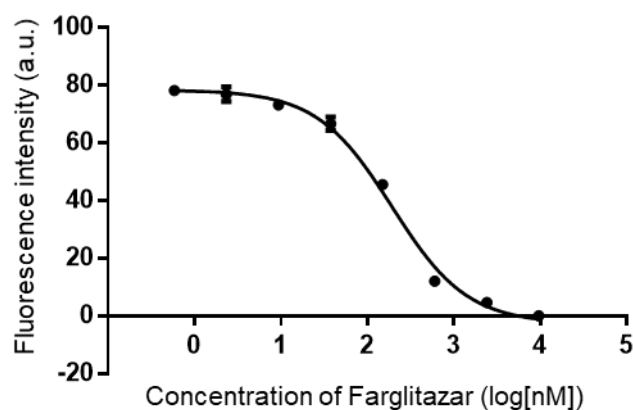


Figure 24. Farglitazar の K_i 値算出 ($n = 3$)

ピオグリタゾンの K_i 値算出

次にピオグリタゾンの K_i 値算出であるが、ピオグリタゾンは PPAR との親和性が他の $\text{PPAR}\gamma$ リガンドと比べて低いため、⁶² 基準となる $\text{PPAR}\gamma$ と化合物 **46** を低濃度にして、高濃度領域のロシグリタゾンを多く測定することにした。 $0.1 \mu\text{M}$ の $\text{PPAR}\gamma$ と $0.12 \mu\text{M}$ の化合物 **46** に 6.25 nM , 25 nM , $0.1 \mu\text{M}$, $0.4 \mu\text{M}$, $1.6 \mu\text{M}$, $6.4 \mu\text{M}$, $25.6 \mu\text{M}$, $51.2 \mu\text{M}$, $102.4 \mu\text{M}$ のピオグリタゾンを加えて、励起波長 367 nm における蛍光スペクトルを測定した。その結果、高濃度側ではピオグリタゾンが十分溶解せず、ばらつきが大きく再現性のない結果になった (Figure 25)。ピオグリタゾンは、ロシグリタゾンより結合親和性が弱い。一方、化合物 **46** は遺伝子転写活性がロシグリタゾンと同程度であるため、**46** は $\text{PPAR}\gamma$ に対する結合親和性が高く、ピオグリタゾンを高濃度添加しても、 $\text{PPAR}\gamma$ に結合していた **46** に置き換わることができないと考えた。そこで、 $\text{PPAR}\gamma$ に対する結合親和性が低い蛍光プローブを用いることで、ピオグリタゾンの K_i 値を求めることができるのではと考え、副生成物 **48** に着目した。遺伝子転写活性試験より、**48** は **46** よりも活性が低いことから、**48** の $\text{PPAR}\gamma$ に対する結合能は **46** よりも弱いと推測できる。そこで、**48** を結合親和性評価に用いるため、まずは **48** の K_d 値を求めることにした。

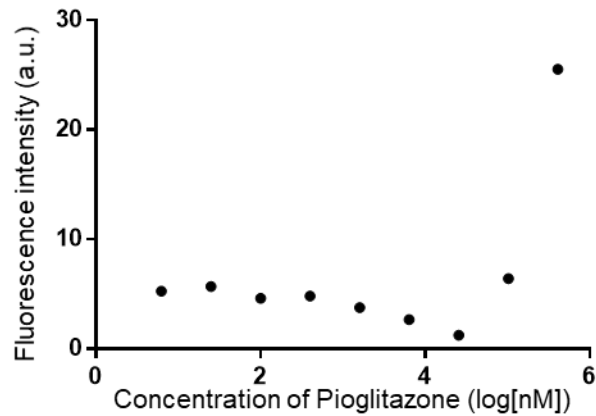


Figure 25. ピオグリタゾンの K_i 値算出

PPAR γ に対する化合物 48 の K_d 値算出

K_d 値の算出は、化合物 46 の実験と同様に行った。1 μ M の化合物 48 に、0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 10.0, 15.0 μ M の PPAR γ を加え、励起波長 367 nm における蛍光スペクトルを測定した (Figure 26)。各 PPAR γ 濃度につき、それぞれ 3 回測定し、410 nm の値を用いて K_d 値を算出 (GraphPad Prism) すると 4082 nM となった。

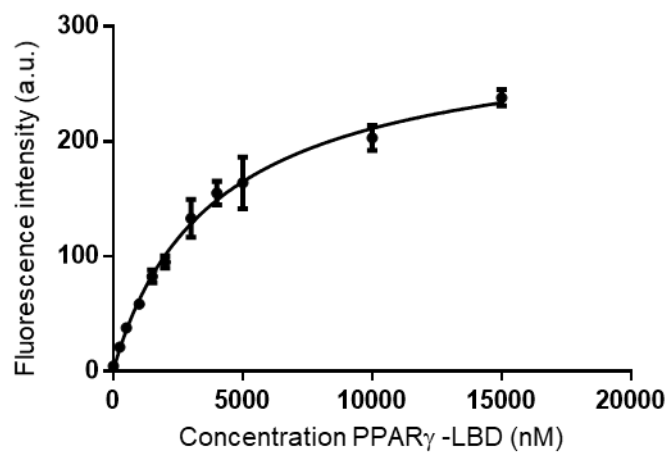


Figure 26. 化合物 48 の K_d 値算出 (n = 3)

また、GraphPad Prism より、 EC_{50} は 4008 nM になり、式^{89,90} $K_d = EC_{50} - [L]/2$ に代入すると、 $K_d = 3508$ nM になった。

以上より、48 の PPAR γ に対する結合能は、46よりも弱いことが明らかになった。

化合物 48 を用いたピオグリタゾンの K_i 値算出

続いて、化合物 48 を用いてピオグリタゾンの K_i 値を算出した。0.6 μM の PPAR γ と 1.44 μM の 48 に 4.69 nM, 18.75 nM, 75 nM, 0.3 μM , 1.2 μM , 4.8 μM , 19.2 μM , 76.8 μM のピオグリタゾンを加えて、励起波長 367 nm における蛍光スペクトルを測定した。各ピオグリタゾン濃度についてはそれぞれ 3 回測定を行い、410 nm の値を用いて解析 (GraphPad Prism) すると、 $\text{IC}_{50} = 7434$ nM、 $K_i = 5495$ nM になった。

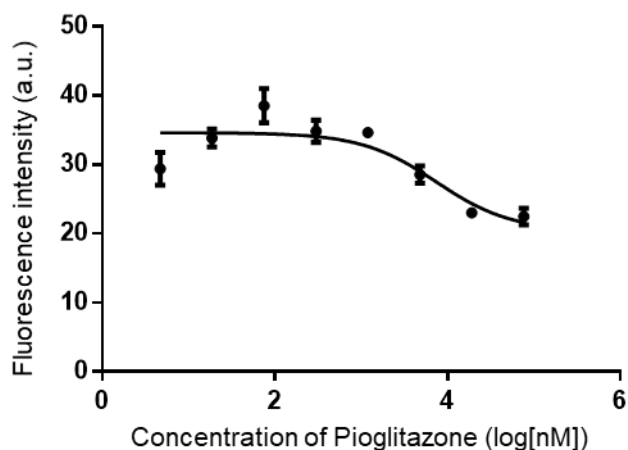


Figure 27. ピオグリタゾンの K_i 値算出 (n = 3)

化合物 48 を用いた LT175 の K_i 値算出

次に PPAR γ のパーシャルアゴニストとして知られている LT175 の K_i 値を算出した。0.6 μM の PPAR γ と 1.44 μM の化合物 48 に 4.69 nM, 18.75 nM, 75 nM, 0.3 μM , 1.2 μM , 4.8 μM , 19.2 μM , 76.8 μM の LT175 を加えて、励起波長 367 nm における蛍光スペクトルを測定した。各 LT175 濃度について、それぞれ 3 回測定を行い、410 nm の蛍光強度の値を用い解析 (GraphPad Prism) すると、 $\text{IC}_{50} = 3158$ nM、 $K_i = 2334$ nM になった。

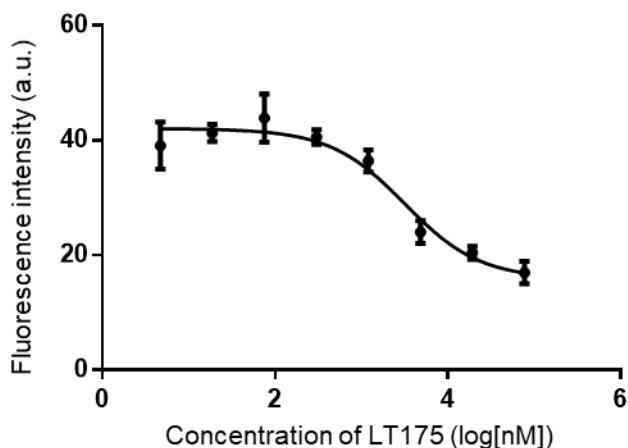
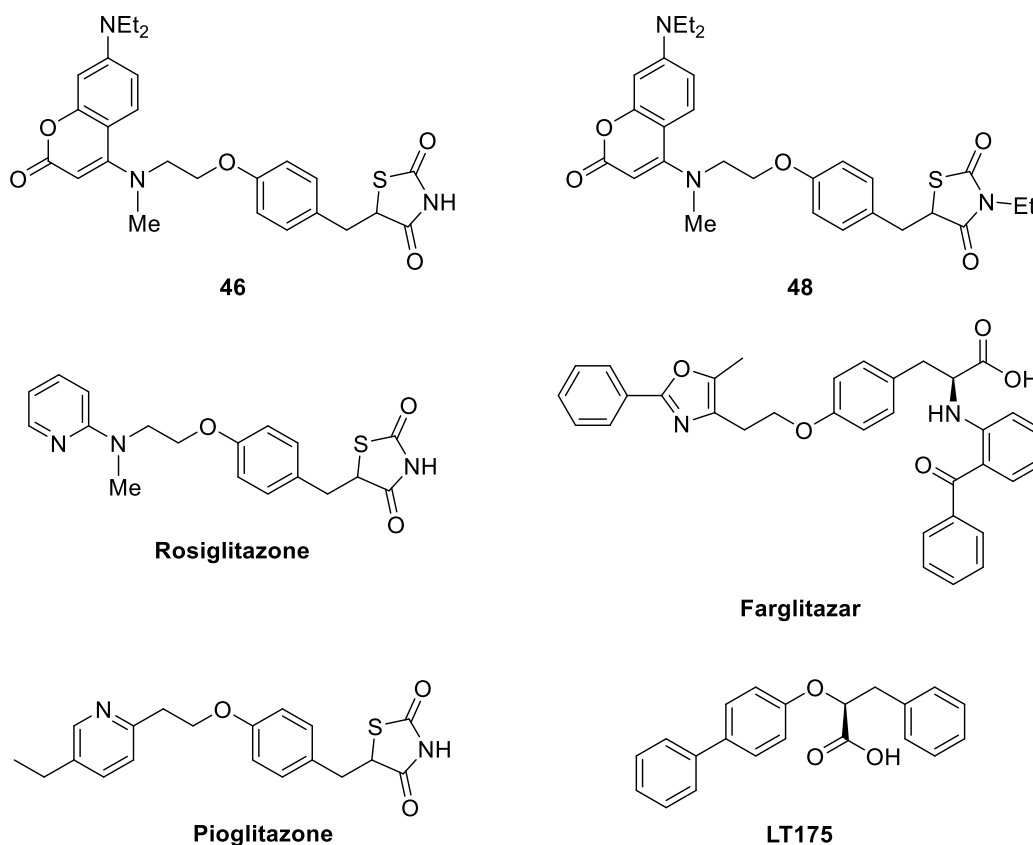


Figure 28. LT175 の K_i 値算出 (n = 3)

以上の実験より、算出した K_i 値の大小関係は、小さい値から Farglitazar、ロシグリタゾン、LT175、ピオグリタゾンの順であった (Table 11)。報告されているロシグリタゾンおよび Farglitazar、ピオグリタゾンの IC_{50} 値⁶²と比較すると、同じ大小関係であった。さらに報告されている EC_{50} 値^{38,91}は小さい値から Farglitazar、ロシグリタゾン、LT175、ピオグリタゾンである。得られた K_i 値の大小関係は、 EC_{50} 値で比較しても同じ順序であった。したがって、合成したクマリン型 PPAR 蛍光リガンド **46** と **48** は、PPAR γ に対する親和性評価に適用できることが示された。



	Rosiglitazone	Farglitazar	Pioglitazone	LT175
K_i (nM)	1157 ± 1.08	132.3 ± 1.13	5495 ± 3.14	2334 ± 1.46
既知の IC_{50} (nM) ⁶²	660 ± 252	90 ± 34	4500 ± 465	-
既知の EC_{50} (nM) ⁹¹	18 ± 4	0.20 ± 0.05	280 ± 42	-
既知の EC_{50} (nM) ³⁸	40 ± 20	-	-	480 ± 80

Table 11. 算出した K_i 値と既知の IC_{50} 、 EC_{50} 値

第2節 X線結晶構造解析

合成したクマリン導入型ロシグリタゾンの **5**, **46**, **48** の PPAR γ -LBD への結合様式を明らかにするため、PPAR γ -LBD の共結晶構造解析を試みた。まず、化合物 **5**/PPAR γ -LBD、化合物 **46**/PPAR γ -LBD、化合物 **48**/PPAR γ -LBD 複合体の結晶化を行った。結晶化は、Tris-HCl buffer に沈殿剤としてクエン酸ナトリウムを添加するリザーバー溶液で行った。本条件は apo 体でも結晶化できるため、リガンドを apo 体結晶に添加するソーキング法が適用できる。このため、比較的多くの結晶構造が PDB 上に報告されている。一方、本結晶化条件でのフルアゴニストの共結晶化は困難とされており、現在までに報告がない。理由は、本結晶化条件では PPAR γ -LBD が活性型 : 非活性型 = 1 : 1 で結晶化するが、フルアゴニストはすべての PPAR γ 分子を活性型にしてしまうため、パッキングが不利になるからと考えられる。アゴニスト結合型の PPAR γ は活性型となり、アゴニスト非結合型の PPAR γ は非活性型となる。ここで活性型 : 非活性型 = 1 : 1 に制御できれば、互いにパッキングし結晶化すると考えた。そこで、非活性型の分子を存在させるため、PPAR γ に対し 0.5 当量の合成アゴニストを用いることにした。その結果、化合物 **46**/PPAR γ -LBD 複合体において良好な結晶を得ることができた。回折実験は高エネルギー加速器研究 BL-5A で行い、回折データを収集した。反射ファイルは iMOSFLM で作製し、Phaser による分子置換法 (PDB code: 2VV3) によって位相を決定した。Coot によるモデリングと Refmac による精密化を行い、タンパク質の配座を決定した。ここで残された電子密度マップに着目したところ、リガンドと考えられる電子密度は非活性型には見られず、活性型のみで見られた (Figure 29)。この結果は、戦略上予想した通りであり、**46** は活性型の PPAR γ にのみ存在が認められ、非活性型には見られず、リガンドとタンパク質の当量を調整することにより、パッキングをコントロールすることに成功した。本結晶の回折データ収集と精密化の統計情報を Table 12 にまとめた。

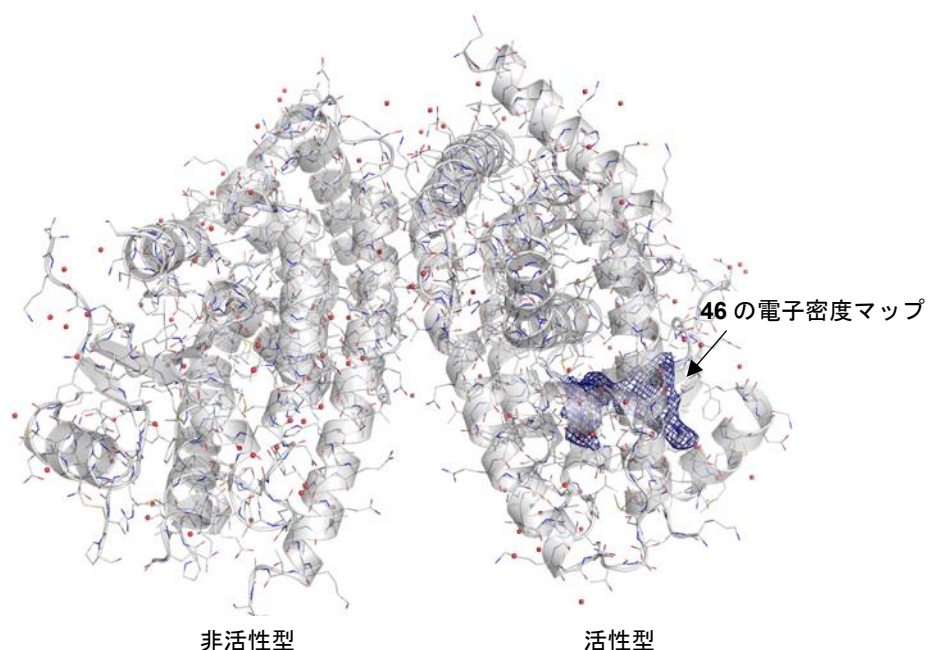


Figure 29. 化合物 46/PPAR γ -LBD の構造

データ収集				精密化の統計値	
空間群	C 1 2 1			分解能 (Å)	26.77-2.30
格子定数				使用反射数 all/free	29502/1515
a, b, c (Å)	93.33, 61.9, 119.37			R-factor/R-free	0.223 / 0.262
α, β, γ (°)	90, 102.29, 90			RMS Deviations	
分解能 (Å)	Overall	Inner	Outer	Bond lengths (Å)	0.0137
Low resolution limit	26.75	26.75	2.38	Bond angles (°)	1.894
High resolution limit	2.3	8.91	2.3	原子数	
R_{merge}	0.051	0.021	0.4	タンパク質	8150
総反射数	87204	1830	8301	リガンド	64
独立反射数	29512	533	2829	水	72
完全性 (%)	99.1	96.2	97	B-factors	
多重度	3	3.4	2.9	タンパク質	32.1
				リガンド	37.8
				水	48

Table 12. データ収集と精密化の統計情報

化合物 46/PPAR γ -LBD 複合体とロシグリタゾン/PPAR γ -LBD 複合体では PPAR γ の結晶構造に大きな変化は見られなかった (Figure 30)。また化合物 46 は、Figure 31 のような電子密度で PPAR γ -LBD に存在しており、ロシグリタゾンと 46 は重なり合う配座であった。

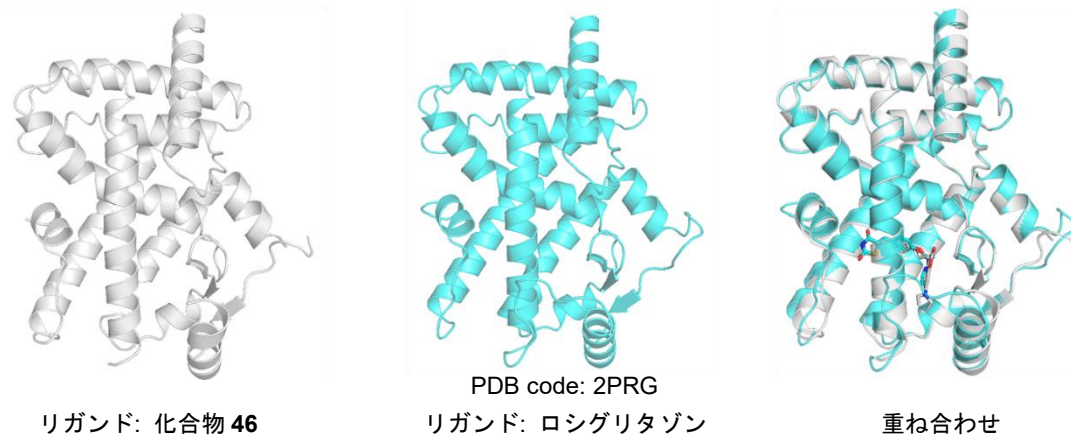


Figure 30. 化合物 **46**/PPAR γ -LBD 複合体とロシグリタゾン/PPAR γ -LBD 複合体

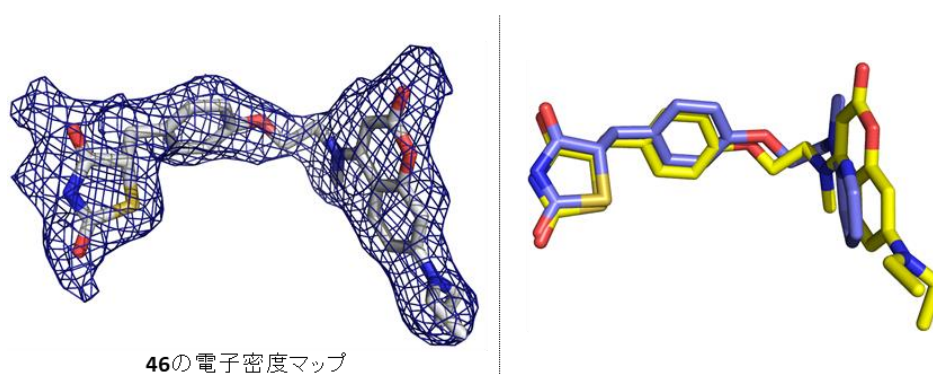


Figure 31. **46** の電子密度 (右) とロシグリタゾン (紺) と **46** (黄) の重ね合わせ (左)

46 のチアゾリジンジオン (TZD) 部分の相互作用様式は、ロシグリタゾンと同様であり、Ser289, His323, Gln286, Tyr473 の4つのアミノ酸と水素結合を形成していた (Figure 32)。Tyr473 は Helix12 上にあり、この水素結合により、Helix12 が安定化され PPAR γ が活性化すると考えられている。このため、**46** はアゴニスト活性を示したと強く示唆された。

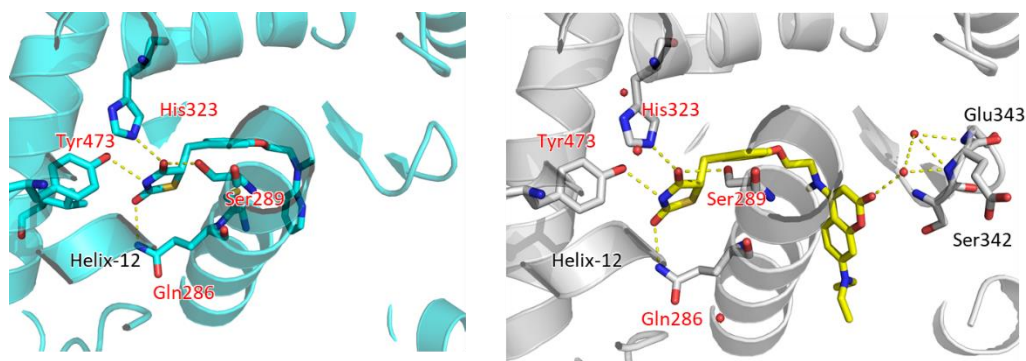


Figure 32. ロシグリタゾン (左) と **46** (右) の PPAR γ との水素結合様式

46 の X 線結晶構造にイミドがエチル化された副生成物 48 を重ね合わせた (Figure 33)。TZD 環は 46 の場合、4 つの水素結合が形成していた。48 では、イミドがエチル化しているため、チロシンとの水素結合が失われ、可能な水素結合は 3 つである。したがって、副生成物 48 の結合能がメトキシマリン型ロシグリタゾン 5 やジエチルアミノクマリン型ロシグリタゾン 46 よりも低かった理由は、水素結合が 3 つに減少したからと考えられる。

副生成物 48 はパーシャルアゴニストであった (Figure 18)。活性が上がり切らなかった理由について考察する。48/PPAR γ -LBD 複合体についても結晶化を試みたが、得られた結晶構造はアポ体であり、リガンドは結晶構造中に存在しなかった。エチル基は Helix12 の Leu469 と Tyr473 と立体反発を起こす位置関係であり (Figure 33)、Helix12 を多少押し出したためパッキングが不利となり、アポ体同士がパッキングし、優先してアポ体が結晶化したものと推測される。

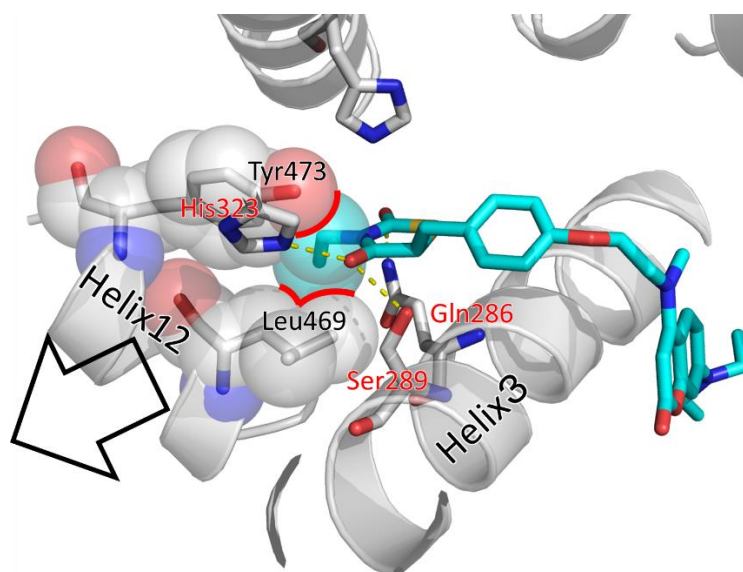


Figure 33. 46 の X 線結晶構造への副生成物 48 の重ね合わせ

したがって、パーシャルアゴニスト作用の機構は、Helix12 を押し出すことにあり、Helix12 の配座を認識するコアクチベーターの結合が不利になり、完全な活性化に至らなかったためと考えられる。PPAR γ パーシャルアゴニストは、フルアゴニストより副作用が少ないと考えられており、多くのパーシャルアゴニストが合成されてきた。⁹² パーシャルアゴニストの多くは、Helix12 には直接働きかけないパーシャルアゴニスト、「パッシブ」なアゴニストである。⁹³ 江川らは、非活性型、活性型が平衡して存在することで、その活性の和によってパーシャルアゴニスト活性が成立するというメカニズムを提案している。⁹⁴ これに対し 48 は Helix12 を押し出す「アクティブ」なパーシャルアゴニストである。このようなメカニズムの PPAR γ パーシャルアゴニストは珍しいため、新規 PPAR γ パーシャルアゴニストとして、意義があると考えられる。

第2章の総括

第1章 第2節で合成したジエチルアミノクマリン型ロシグリタゾン **46, 48** を用いて、PPAR γ アゴニストであるロシグリタゾン、Farglitazar、ピオグリタゾン、LT175 の PPAR 結合性評価を行った。その結果、PPAR γ への結合親和性は、これまでに報告されている順序と一致し、合成した **46, 48** は PPAR γ 結合性評価に適用できることが示された。特に **46** は PPAR γ への結合親和性が高い化合物、**48** は PPAR γ への結合親和性が弱い化合物への評価に適用できると考えられる。

さらに、PPAR γ -LBD との X 線結晶構造解析により、化合物 **46** の PPAR γ への結合様式は、ロシグリタゾンと変わらないことを明らかにした。またエチル基が付加した副生成物 **48** が、PPAR γ に対する水素結合が減少し、Helix12 を押し出す、珍しい作用メカニズムのパーシャルアゴニストであることを示した。

結 論

本研究では、クマリン環の簡便な導入法の提案と、その化合物を応用した受容体結合性評価への適用を目指し研究を行ったところ、以下の知見が得られた。

第 1 章

クマリン前駆体とモデル基質の反応により、4 位に付加する原子が異なるモデル化合物を合成した。付加する原子種によって、蛍光波長が異なることが示された。また核内受容体である PPAR γ アゴニスト、ロシグリタゾンの骨格にメトキシクマリン環を最終工程で導入することができた。さらに不安定で反応性の低いジエチルアミノクマリン環を導入することに成功した。クマリン骨格の導入は、PPAR γ 活性に与える影響が小さいことが示された。

第 2 章

合成したジエチルアミノクマリン型ロシグリタゾン **46** とエチル化された副生成物 **48** が、PPAR γ 結合性評価に適用できる可能性を示した。また **46** の PPAR γ への結合様式がロシグリタゾンと同様であった。**48** の PPAR γ に対する結合様式とパーシャルアゴニストのメカニズムについて考察した結果、報告されている PPAR γ パーシャルアゴニストとは違うアクティブ型のメカニズムである可能性を示した。

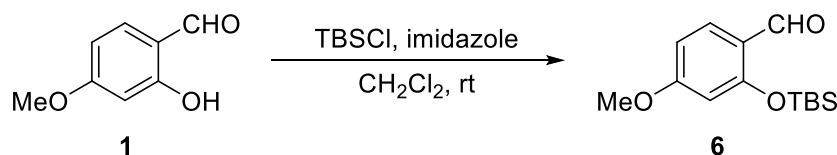
チオールやアルコールなどを含むモデル化合物との反応においてもクマリンを構築することができた。そのため本法は PPAR γ リガンドのみならず、他の核内受容体リガンドへ適用可能であると考えられる。受容体リガンドを簡便にクマリン蛍光標識し、本法で得たプローブは化合物と標的分子の結合性の評価に適用できるため、本研究はリガンドの探索研究に貢献できるものと考えている。

実験の部

試薬はすべて購入したものを使用した。使用前に再結晶や蒸留が必要な試薬に関しては適切な処理を行ってから使用した。有機溶媒はソルベントサプライシステム (関東化学) あるいは標準的な方法に従って蒸留した無水溶媒を使用した。すべての反応は、窒素雰囲気下で行った。薄層クロマトグラフィーには、silicagel 70F₂₅₄ plates (Wako)、chromatorex DNH を用いた。カラムクロマトグラフィーには、中性シリカゲル 60N (40-50 μm または 63-210 μm 、関東化学)、NH シリカゲル (100-200 mesh、富士シリシア化学) を用いた。NMR 測定は特に記載がない限り、内部標準物質としてテトラメチルシラン (TMS) を含有した重クロロホルムを使用し、Bruker AV-300M にて ¹H NMR は 300 MHz、¹³C NMR は 75 MHz、または Bruker AV-600M にて ¹³C NMR は 150MHz で測定した。高分解能質量分析は JEOL AccuTOF LC-plus JMS-T100LP を使用して測定した。赤外吸収スペクトル (IR) は Jasco FT/IR-420 を使用して測定した。紫外可視分光スペクトルは JASCO V-630 BIO (日本分光) を用いて測定した。蛍光は分光蛍光光度計 F-7100 (HITACHI) を使用して測定した。単結晶 X 線結晶構造解析は、XtaLAB Synergy Custom (Rigaku) および CrysAlisPro, Olex2 を用いて測定・解析した。

第 1 章に関する実験

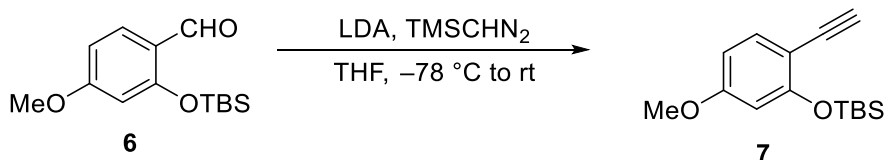
2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-4-methoxybenzaldehyde (**6**)



2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (3.01 g, 19.8 mmol) を CH₂Cl₂ (100 mL) に溶解させ、TBSCl (5.98 g, 39.6 mmol, 2.0 equiv.) と imidazole (4.06 g, 59.4 mmol, 3.0 equiv.) を加え、室温で 14 時間攪拌した。反応溶液を 1*N*HCl 洗浄 (1 回)、brine 洗浄 (1 回)、MgSO₄ 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を SiO₂ オープンカラムクロマトグラフィー (5% AcOEt/hexane) で精製し、**6** (9.57 g, 17.1 mmol, 86%) を得た。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 10.29 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.58 (ddd, *J* = 8.8, 2.3, 0.7 Hz, 1H), 6.34 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 1.02 (s, 9H), 0.28 (s, 6H).

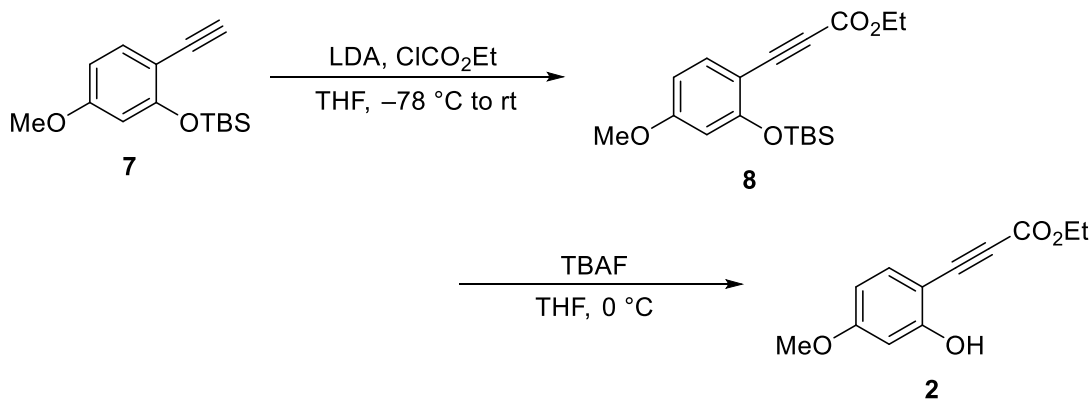
tert-butyl(2-ethynyl-5-methoxyphenoxy)dimethylsilane (**7**)



i-Pr₂NH (146 μL, 1.04 mmol) を THF (1 mL) に溶解させ、氷冷下 *n*-BuLi (620 μL, 1.55 M in hexane, 0.962 mmol) を滴下し、10 分間攪拌した。-78 °C に冷却し、TMSCHN₂ (480 μL, 2.0 M in Et₂O, 0.962 mmol) を滴下し、30 分間攪拌した。次に **7** (213.5 mg, 0.801 mmol) の THF 溶液 (6 mL) を滴下し、氷冷下 30 分攪拌後、室温で 12 時間攪拌した。反応溶液に H₂O を加え、CH₂Cl₂ 抽出 (3 回)、MgSO₄ 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を SiO₂ オープンカラムクロマトグラフィー (5% AcOEt/hexane) で精製し、**7** (86.5 mg, 0.330 mmol, 41%) を得た。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7.33 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.48 (dd, *J* = 8.6, 2.5 Hz, 1H), 6.37 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.11 (s, 1H), 1.03 (s, 9H), 0.24 (s, 6H).

ethyl 3-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)propiolate (2)

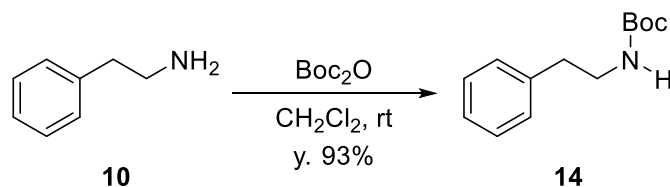


i-Pr₂NH (731 μL, 5.21 mmol) を THF (6 mL) に溶解させ、氷冷下 *n*-BuLi (3.1 mL, 1.55 M in hexane, 4.81 mmol) を滴下し、10 分間攪拌した。続いて -78 °C に冷却し、**8** (1.05 g, 4.01 mmol) の THF 溶液 (14 mL) を滴下し、10 分間攪拌後、ethyl chloroformate (916 μL, 9.62 mmol) を滴下し、30 分間攪拌した後、さらに室温で 17 時間攪拌した。反応溶液に *sat.* NaHCO₃ aq. を加え、AcOEt 希釈後、H₂O 洗浄 (2 回)、brine 洗浄 (1 回)、MgSO₄ 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を SiO₂ オープンカラムクロマトグラフィー (3% AcOEt/hexane) で精製した。

続いて、**8** を THF (19.8 mL) に溶解させ、氷冷下 TBAF (7.9 mL, 1.0 M in THF, 7.9 mmol) を滴下し、1 時間攪拌した。反応溶液を AcOEt 希釈し、*sat.* NH₄Cl aq. 洗浄 (1 回)、MgSO₄ 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を SiO₂ オープンカラムクロマトグラフィー (40% Et₂O/hexane) で精製し、**2** (502.7 mg, 2.28 mmol, 57% in 2steps) を得た。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7.36 (m, 1H), 6.50–6.46 (overlapped, 2H), 4.30 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

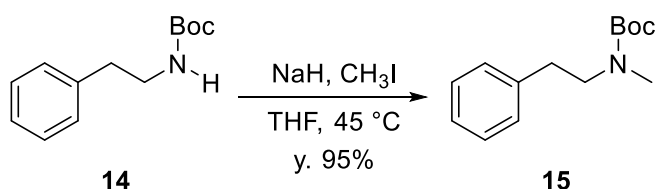
tert-butyl phenethylcarbamate (14)



phenethylamine (2.1 mL, 16.67 mmol) を CH₂Cl₂ (167 mL) に溶解させ、Et₃N (4.7 mL, 33.34 mmol, 2.0 equiv.) と Boc₂O (4.6 mL, 20.01 mmol, 1.2 equiv.) を滴下し、室温で N₂ 雰囲気下 13 時間攪拌した。反応溶液を 1N HCl 洗浄 (1 回)、*sat.* NaHCO₃ aq. 洗浄 (1 回)、brine 洗浄 (1 回)、MgSO₄ 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を SiO₂ オープンカラムクロマトグラフィー (0–20% AcOEt/hexane, SiO₂: 150g) で精製し、**14** (3.42 g, 15.46 mmol, 93%) を得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.33–7.28 (overlapped, 2H), 7.25–7.18 (overlapped, 3H), 4.56 (br-s, 1H), 3.38 (m, 2H), 2.79 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.43 (s, 9H).

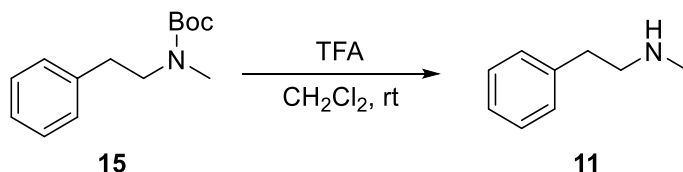
***tert*-butyl methyl(phenethyl)carbamate (15)**



NaH (1.69 g, 2.2equiv.) を N_2 雰囲気下、dry hexane を加えて洗浄 (3 回) したところに、THF (155 mL) を加え、次に **14** (3.42 g, 15.46 mmol) の THF 溶液 (30 mL) を加えた。さらに CH_3I (2.5 mL, 2.4 equiv.) を滴下し、45 °C で N_2 雰囲気下、18.5 時間加熱攪拌した。反応溶液に H_2O を加え、減圧濃縮した後、残渣を AcOEt 希釈後、brine 洗浄 (1 回)、 MgSO_4 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を SiO_2 オープンカラムクロマトグラフィ (0–10% AcOEt/hexane, SiO_2 : 100g) で精製し、**15** (3.44 g, 14.61 mmol, 95%) を得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.32–7.26 (overlapped, 2H), 7.23–7.18 (overlapped, 3H), 3.42 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.83–2.80 (overlapped, 5H), 1.40 (s, 9H).

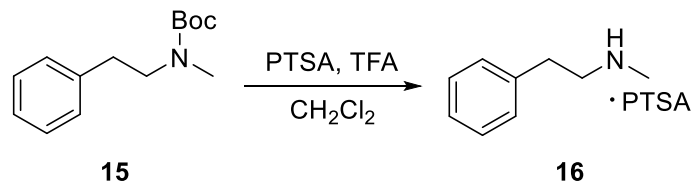
***N*-methyl-2-phenylethan-1-amine (11)**



15 (448.0 mg, 1.904 mmol) を CH_2Cl_2 (9.5 mL) に溶解させ、TFA (7.1 mL, 49 equiv.) を滴下し、室温で N_2 雰囲気下、18.5 時間加熱攪拌した。反応溶液を N_2 乾燥後、氷冷下 2M NaOH aq. を加え、AcOEt 抽出 (3 回)、 MgSO_4 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。得られた残渣は精製せずに、次の反応に用いた。

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ [ppm]: 7.33–7.28 (overlapped, 2H), 7.24–7.19 (overlapped, 3H), 2.90 (m, 2H), 2.79 (m, 2H), 2.43 (s, 3H).

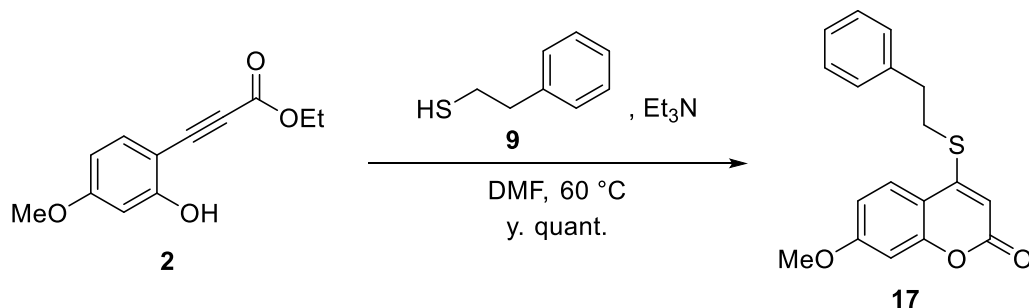
N-methyl-2-phenylethan-1-amine *p*-toluenesulfonic acid salt (**16**)



15 (483.2 mg, 2.053 mmol) を CH₂Cl₂ (10 mL) に溶解させ、*p*-toluenesulfonic acid monohydrate (536.7 mg, 1.5 equiv.) を加え、TFA (7.7 mL, 49 equiv.) を滴下し、N₂ 雰囲気下、室温で 16 時間加熱攪拌した。その後、反応溶液を減圧濃縮した。得られた残渣は精製せずに、次の反応に用いた。

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ [ppm]: 7.73–7.69 (overlapped, 2H), 7.36–7.22 (overlapped, 7H), 3.22 (m, 2H), 2.96 (m, 2H), 2.70 (s, 3H), 2.37 (s, 3H).

7-methoxy-4-(phenethylthio)-2*H*-chromen-2-one (**17**)



2-phenylethanethiol (**9**) (91 μL, 0.681 mmol, 1.5 equiv.) を DMF (4.5 mL) に溶解させ、Et₃N (0.908 mmol, 2.0 equiv.) と **2** (97.3 mg, 0.442 mmol) を加え、60 °C で 24 時間加熱攪拌した。反応溶液に氷冷下 H₂O を加え、AcOEt 抽出 (3 回)、brine 洗浄 (1 回)、MgSO₄ 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を SiO₂ オープンカラムクロマトグラフィー (10–30% AcOEt/hexane) で精製し、**17** (141.8 mg, 0.454 mmol, quant.) を得た。

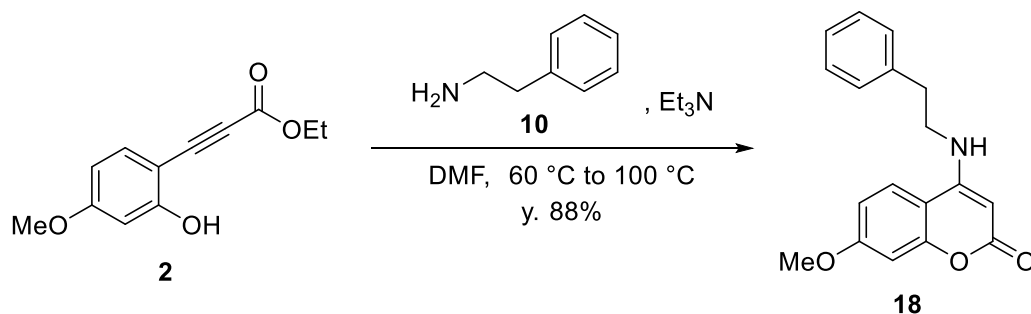
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7.62 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.35 (m, 2H), 7.30–7.27 (overlapped, 2H), 7.26–7.25 (overlapped, 1H), 6.83 (dd, *J* = 8.7, 2.6 Hz, 1H), 6.80 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.06 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.28 (m, 2H), 3.09 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 163.0, 159.8, 156.3, 154.0, 138.8, 128.8 (2 carbons), 128.5 (2 carbons), 127.0, 125.0, 112.3, 111.7, 104.9, 100.8, 55.8, 34.0, 32.1.

ESI-HRMS: *m/z* calcd for C₁₈H₁₆NaO₃S [M+Na]⁺: 335.07178; found: 335.07037.

IR (NaCl): 1707 cm⁻¹.

7-methoxy-4-(phenethylamino)-2H-chromen-2-one (18)



Phenethylamine (**10**) (86 μL , 0.681 mmol, 1.5 equiv.) を DMF (4.5 mL) に溶解させ、 Et_3N (0.908 mmol, 2.0 equiv.) と **2** (100.0 mg, 0.454 mmol) を加え、60 °C で 113 時間加熱撹拌した。原料が残っていたため、100 °C に昇温し、24 時間撹拌した。反応溶液に氷冷下 H_2O を加え、AcOEt 抽出 (3 回)、brine 洗浄 (1 回)、 MgSO_4 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を SiO_2 オープンカラムクロマトグラフィー (30–60% AcOEt/hexane) で精製し、**18** (118.6 mg, 0.402 mmol, 88%) を得た。

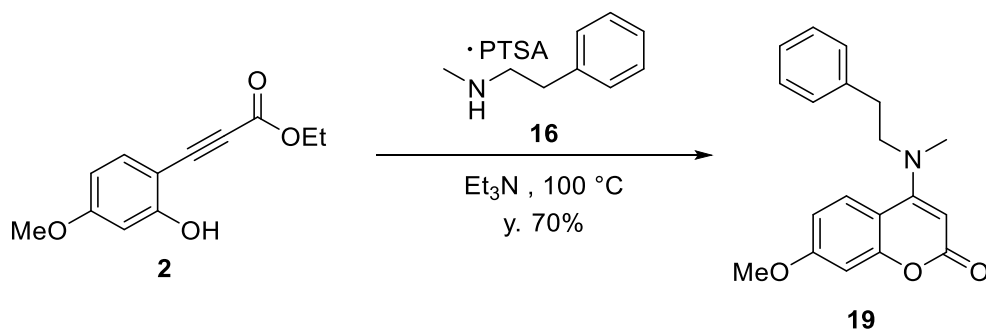
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.39–7.28 (overlapped, 3H), 7.25–7.23 (overlapped, 2H), 7.12 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.79–6.76 (overlapped, 2H), 5.30 (s, 1H), 4.97 (br-s, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.55 (q, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.03 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 163.3, 162.6, 155.4, 152.8, 137.8, 129.0 (2 carbons), 128.7 (2 carbons), 127.1, 120.8, 111.9, 107.4, 101.3, 82.3, 55.7, 43.7, 34.4.

ESI-HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NNaO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 318.11061; found: 318.11204.

IR (NaCl): 3270, 1656 cm^{-1} .

7-methoxy-4-(methyl(phenethyl)amino)-2H-chromen-2-one (19)



16 (63.8 mg, 0.208 mmol, 1.5 equiv.) を Et_3N (1.4 mL) に溶解させ、**2** (30.4 mg, 0.138 mmol) を加え、100 °C で 4 時間加熱撹拌した。反応溶液に氷冷下 H_2O を加え、 CH_2Cl_2 抽出 (3 回)、brine 洗浄 (1 回)、 MgSO_4 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を SiO_2 オープンカラムクロマトグラフィー (30% AcOEt/hexane) で精製し、**19** (29.8 mg, 0.0963 mmol, 70%) を得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.47 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.33–7.27 (overlapped, 2H), 7.25–7.16 (overlapped, 3H), 6.80 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 6.76 (dd, $J = 8.9, 2.6$ Hz, 1H), 5.51 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.58 (m, 2H), 3.02 (s, 3H), 2.99 (m, 2H).

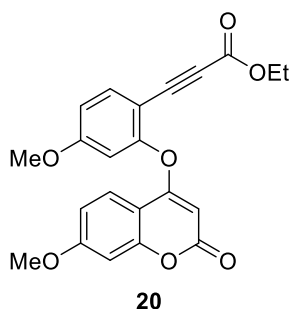
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 163.0, 162.1, 160.7, 156.1, 138.2, 128.7 (4 carbons), 126.8, 126.2, 111.4, 109.6, 101.2, 92.8, 56.2, 55.7, 39.9, 33.6.

ESI-HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NNaO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 332.12626; found: 332.12804.

IR (NaCl): 1698 cm^{-1} .

ethyl 3-(4-methoxy-2-((7-methoxy-2-oxo-2H-chromen-4-yl)oxy)phenyl)propiolate (dimer) (20)

AcOEt/hexanae 溶媒を用いて再結晶を行い、無色針状結晶を得た後、X 線結晶構造解析を行った。

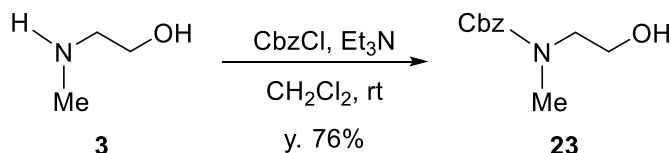


^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.95 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.91 (m, 2H), 6.86 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 5.26 (s, 1H), 4.09 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 1.16 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 165.8, 163.7, 162.9 (2 carbons), 155.9, 155.6, 153.6, 136.0, 124.3, 112.9, 112.5, 108.4, 108.3, 105.7, 100.5, 91.5, 85.1, 80.3, 61.9, 55.9, 55.8, 13.86.

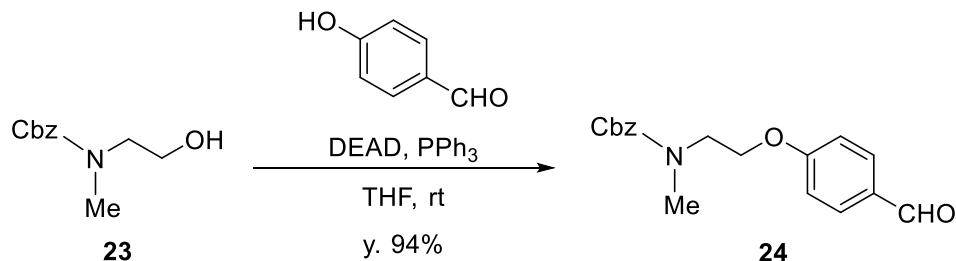
ESI-HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 417.09502; found: 417.09511.

benzyl (2-hydroxyethyl)(methyl)carbamate (23)

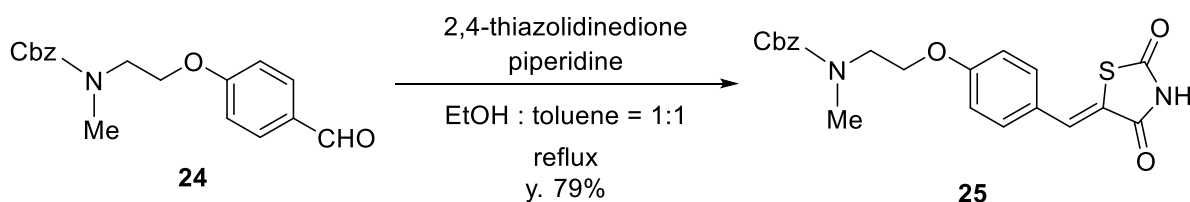


2-(methylamino)ethanol (4.4 mL, 54.0 mmol) を CH_2Cl_2 (180mL) に溶解させ、氷冷下、benzylchloroformate (8.4 mL, 55.9 mmol) と Et_3N (9.6 mL, 68.8mmol) を滴下し、 N_2 雰囲気下、室温で 49 時間攪拌した。 CH_2Cl_2 希釈し、10%クエン酸水溶液で洗浄 (1 回)、 H_2O 洗浄 (1 回)、brine 洗浄 (1 回)し、 MgSO_4 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を SiO_2 オープンカラムクロマトグラフィー (40–60% AcOEt/hexane) で精製し、**23** (8.54 g, 40.8 mmol, 76%) を得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.37–7.28 (overlapped, 5H), 5.14 (s, 2H), 3.77 (br-s, 2H), 3.45 (br-s, 2H), 3.00 (s, 3H).

benzyl (2-(4-formylphenoxy)ethyl)(methyl)carbamate (24)

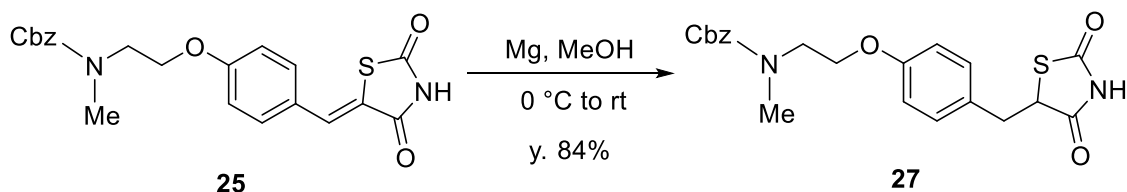
23 (1.98 g, 6.28 mmol) を THF (40 mL) に溶解させ、PPh₃ (3.40 g, 13.0 mmol) と 4-hydroxybenzaldehyde (1.55 g, 12.6 mmol) を加え、DEAD (6.0 mL, 13.1 mmol) を滴下し、室温で 16 時間攪拌した。溶媒留去後、Et₂O 希釈し、*sat.* NaHCO₃ aq. 洗浄 (3 回)、brine 洗浄 (1 回)、MgSO₄ 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を SiO₂ オープンカラムクロマトグラフィー (30% AcOEt/hexane) で精製し、**24** (3.07 g, 9.81 mmol, 94%) を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 9.88 (s, 1H), 7.84–7.77 (overlapped, 2H), 7.37–7.30 (overlapped, 5H), 7.01–6.90 (overlapped, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.19 (m, 2H), 3.70 (m, 2H), 3.08 (s, 3H).

benzyl (Z)-(2-(4-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenoxy)ethyl)(methyl)carbamate (25)

24 (2.18 g, 4.78 mmol) を THF (30 mL) と toluene (30 mL) に溶解させ、2,4-thiazolidinedione (1.34 g, 11.3 mmol) と piperidine (186 μ L, 1.89 mmol) を加え、Dean-Stark 装置を用い、18 時間加熱還流した。溶媒留去し、AcOEt 希釈し、brine 洗浄 (2 回)、MgSO₄ 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を SiO₂ オープンカラムクロマトグラフィー (40–50% AcOEt/hexane–30% MeOH/CH₂Cl₂) で精製し、**25** (2.04 g, 4.94 mmol, 79%) を得た。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 8.76 (br-s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.45–7.32 (overlapped, 7H), 6.99–6.88 (overlapped, 2H), 5.15 (s, 2H), 4.17 (m, 2H), 3.70 (m, 2H), 3.08 (s, 3H).

benzyl (2-(4-((2,4-dioxothiazolidin-5-yl)methyl)phenoxy)ethyl)(methyl)carbamate (**27**)



25 (537.7 mg, 1.30 mmol) を MeOH に懸濁させ、氷冷下 magnesium turnings (635.2 mg, 26.1 mmol, 20 equiv.) を加え、室温で 5 時間攪拌した。氷冷下、5 N HCl を加え、CH₂Cl₂ 抽出 (3 回)、brine 洗浄 (1 回)、MgSO₄ 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を SiO₂ オープンカラムクロマトグラフィー (40% AcOEt/hexane) で精製し、**27** (452.9 mg, 1.09 mmol, 84%) を得た。

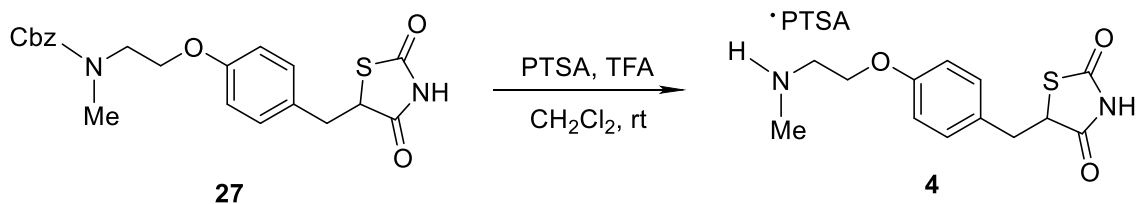
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 8.71 (s, 1H), 7.37–7.33 (overlapped, 5H), 7.12 (m, 2H), 6.81 (m, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.48 (dd, *J* = 9.3, 3.7 Hz, 1H), 4.08 (m, 2H), 3.66 (m, 2H), 3.44 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 3.11 (m, 1H), 3.06 (s, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 173.8, 169.8, 158.2, 136.8, 130.4, 130.3, 128.4, 128.1, 127.9, 127.8, 114.9, 67.3, 66.5, 53.5, 48.7, 37.8, 35.9.

ESI-HRMS: *m/z* calcd for C₂₁H₂₂N₂NaO₅S [M+Na]⁺: 437.11471; found: 437.11780.

IR (NaCl): 3166, 1753, 1699, 1611 cm⁻¹.

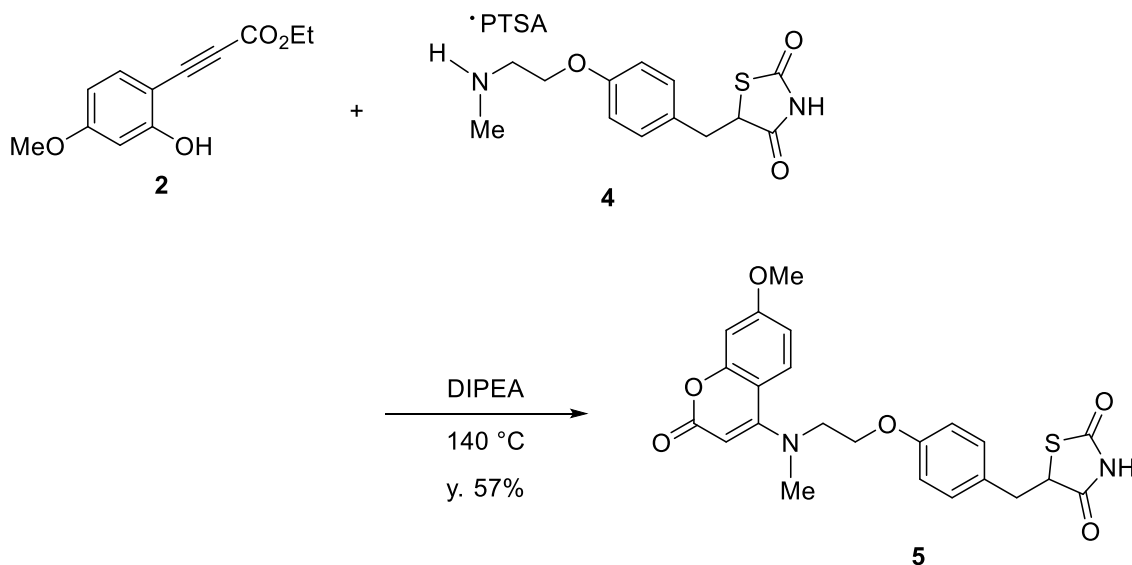
5-(4-(2-(methylamino)ethoxy)benzyl)thiazolidine-2,4-dione *p*-toluenesulfonic acid salt (**4**)



27 (100.3 mg, 0.242 mmol) を CH₂Cl₂ (1.2 mL) に溶解させ、*p*-toluenesulfonic acid monohydrate (70.9 mg, 0.363 mmol, 1.5 equiv.) と trifluoroacetic acid (927 μL) を加え、室温で 21 時間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、精製せずに次の反応へ進んだ。

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ [ppm]: 7.70 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.23 (d, *J* = 2.7 Hz, 2H), 7.20 (d, *J* = 3.6 Hz, 2H), 6.95 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.71 (dd, *J* = 8.7, 4.3 Hz, 1H), 4.23 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.43 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.36 (m, 1H), 3.14 (dd, *J* = 14.2, 8.6 Hz, 1H), 2.78 (s, 3H), 2.37 (s, 3H).

5-(4-(2-((7-methoxy-2-oxo-2*H*-chromen-4-yl)(methyl)amino)ethoxy)benzyl)thiazolidine-2,4-dione (5)



4 (0.168 mmol, 2.0 equiv.) に DIPEA (1.7 mL) と **2** (0.0842 mmol) を加え、12 時間 140 °C で加熱還流した。溶媒を減圧留去し、残渣を SiO₂ オープンカラムクロマトグラフィー (20% AcOEt/CH₂Cl₂) で精製し、**5** (21.8 mg, 0.0480 mmol, 57%, from compound **2**) を得た。

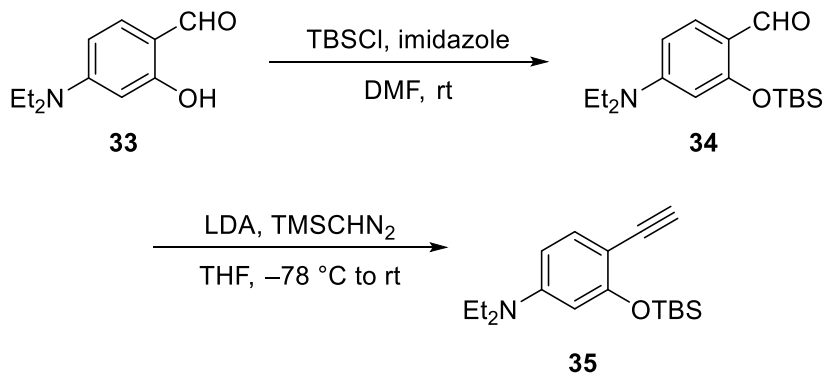
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 8.27 (br-s, 1H), 7.74 (m, 1H), 7.15 (dd, *J* = 7.1, 2.0 Hz, 2H), 6.81 (m, 4H), 5.51 (s, 1H), 4.50 (dd, *J* = 8.5, 4.0 Hz, 1H), 4.24 (m, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.83-3.71 (overlapped, 2H), 3.36 (dd, *J* = 14.1, 3.9 Hz, 1H), 3.19 (dd, *J* = 14.1, 8.4 Hz, 1H), 3.03 (s, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 173.7, 169.9, 163.2, 162.2, 161.2, 157.6, 156.1, 130.8 (2 carbons), 128.0, 126.4, 114.8 (2 carbons), 111.6, 109.5, 101.3, 93.5, 65.0, 55.7, 53.9, 53.3, 39.7, 37.6.

ESI-HRMS: *m/z* calcd for C₂₃H₂₂N₂NaO₆S [M+Na]⁺: 477.10963; found: 477.11123.

IR (NaCl): 3566, 1749, 1698, 1657 cm⁻¹.

3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-*N,N*-diethyl-4-ethynylaniline (35)

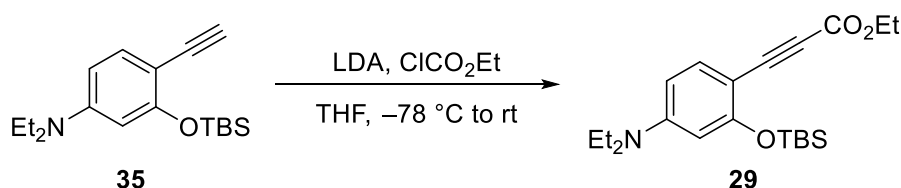


4-(diethylamino)salicylaldehyde (**33**) (3.29 g, 17.02 mmol) を DMF (100 mL) に溶解させ、氷冷下、imidazole (3.55 g, 52.11 mmol, 3.1 equiv.) と TBSCl (5.19 g, 34.44 mmol, 2.0 equiv.) を加え、N₂ 下室温で 14 時間攪拌した。氷冷下、反応溶液に H₂O を加え、AcOEt 抽出 (3 回)、brine 洗浄 (1 回)、MgSO₄ 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を SiO₂ オープンカラムクロマトグラフィー (5–10% AcOEt/hexane, SiO₂ : 165 g) で精製した。

i-Pr₂NH (3.4 mL, 24.25 mmol, 1.4 equiv.) を THF (15 mL) に溶解させ、氷冷下、*n*-BuLi (1.57 M in hexane, 14.2 mL, 22.29 mmol, 1.3 equiv.) を滴下し、10 分間攪拌した。次に -78 °C に冷却し、TMSCHN₂ (2.0 M in Et₂O, 11.2 mL, 1.3 equiv.) を滴下し、30 分攪拌した。続いて、得た化合物の THF 溶液 (25 mL) を滴下し、氷冷下 1 時間攪拌した。その後、室温に昇温し、4 時間攪拌した。氷冷下、反応溶液に H₂O を加え、CH₂Cl₂ 抽出 (3 回)、brine 洗浄 (1 回)、Na₂SO₄ 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を NH-SiO₂ オープンカラムクロマトグラフィー (hexane, NH-SiO₂ : 160 g) で精製し、**35** (4.18 g, 13.76 mmol, 81%, 2 steps) を得た。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7.22 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.22 (dd, *J* = 8.7, 2.6 Hz, 1H), 6.08 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.31 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 3.07 (s, 1H), 1.15 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H), 1.03 (s, 9H), 0.24 (s, 6H).

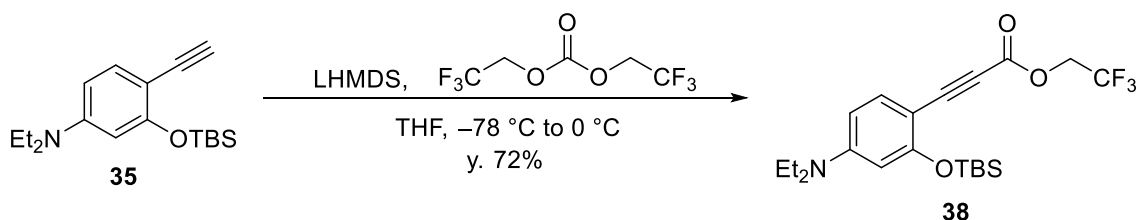
ethyl 3-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-4-(diethylamino)phenyl)propiolate (**29**)



i-Pr₂NH (2.5 mL, 17.87 mmol, 1.3 equiv.) を THF (29 mL) に溶解させ、氷冷下、*n*-BuLi (1.55M hexane 溶液, 10.6 mL, 16.50 mmol, 1.2 equiv.) を滴下し、N₂ 雰囲気下 10 分間攪拌した。次に -78 °C に冷却し、**35** (4.17 g, 13.75 mmol) の THF 溶液 (40 mL) 滴下し、10 分間攪拌した。続いて ethyl chloroformate (3.1 mL, 33.0 mmol, 2.4 equiv.) を滴下し、-78 °C で 30 分間攪拌し、さらに氷冷下 30 分間、室温で 21 時間攪拌した。反応溶液に *sat.* NaHCO₃ aq. を加え、AcOEt 希釈し、H₂O 洗浄 (2 回)、brine 洗浄 (1 回)、MgSO₄ 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を SiO₂ オープンカラムクロマトグラフィー (3–5% AcOEt/hexane, SiO₂ : 130 g) で精製し、**29** (4.61 g, 12.3 mmol, 89%) を得た。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7.31 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.24 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 6.05 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 4.24 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.34 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.17 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H), 1.05 (s, 9H), 0.26 (s, 6H).

2,2,2-trifluoroethyl 3-(2-((*tert*-butyldimethylsilyloxy)-4-(diethylamino)phenyl)propiolate
(38)



35 (557.5 mg, 1.84 mmol) を THF (18 mL) に溶解させ、 $-78\text{ }^\circ\text{C}$ で LHMDS (1.0 M in THF, 5.5 mL, 5.51 mmol, 3.0 equiv.) を滴下し、10 分間攪拌した。次に Bis (2,2,2-trifluoroethyl) carbonate (825 μL , 5.51 mmol, 3.0 equiv.) を滴下し、1 時間攪拌、氷冷下 1 時間攪拌した。反応溶液に *sat.* NaHCO_3 aq. を加え、 CH_2Cl_2 抽出 (3 回)、brine 洗浄 (1 回)、 Na_2SO_4 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を $\text{NH}-\text{SiO}_2$ オープンカラムクロマトグラフィー (hexane, $\text{NH}-\text{SiO}_2$: 6.5 g) で精製し、**38** (566.7 mg, 1.32 mmol, 72%) を得た。

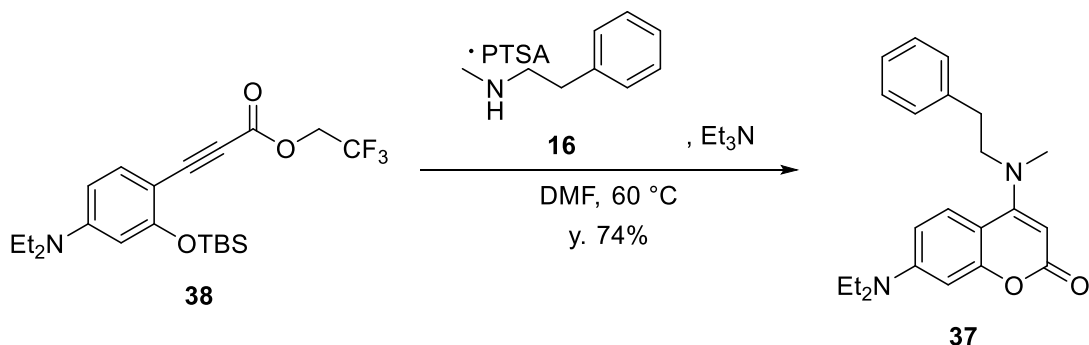
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.33 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 6.26 (dd, $J = 8.9, 2.5$ Hz, 1H), 6.04 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 4.54 (q, $J = 8.4$ Hz, 2H), 3.35 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 1.18 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 1.04 (s, 9H), 0.25 (s, 6H).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 160.7, 152.9, 151.4, 136.3, 122.9 (q, $J = 275.6$ Hz), 105.5, 102.0, 97.2, 91.8, 82.7, 60.7 (q, $J = 36.3$ Hz), 44.6 (2 carbons), 25.6 (3 carbons), 18.2, 12.6 (2 carbons), -4.4 (2 carbons).

ESI-HRMS: m/z calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{F}_3\text{NO}_3\text{SiNa}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 452.18447; found: 452.18357.

IR (NaCl): 1717 cm^{-1} .

7-(diethylamino)-4-(methyl(phenethyl)amino)-2H-chromen-2-one (37)



16 (55.5 mg, 0.181 mmol, 1.5 equiv.) を DMF (0.3 mL) に溶解させ、 Et_3N (81 μL , 0.585 mmol, 5.0 equiv.) を滴下し、次に **38** (50.3 mg, 0.117 mmol) の DMF 溶液 (0.9 mL) を滴下し、 N_2 雰囲気下、 $60\text{ }^\circ\text{C}$ で 20 時間加熱攪拌した。反応溶液を室温にした後、反応溶液を減圧濃縮した。残渣を SiO_2 オープンカラムクロマトグラフィー (10–75% AcOEt /hexane, SiO_2 : 11 g) で精製し、**37** (30.3 mg, 0.0865 mmol, 74%) を得た。

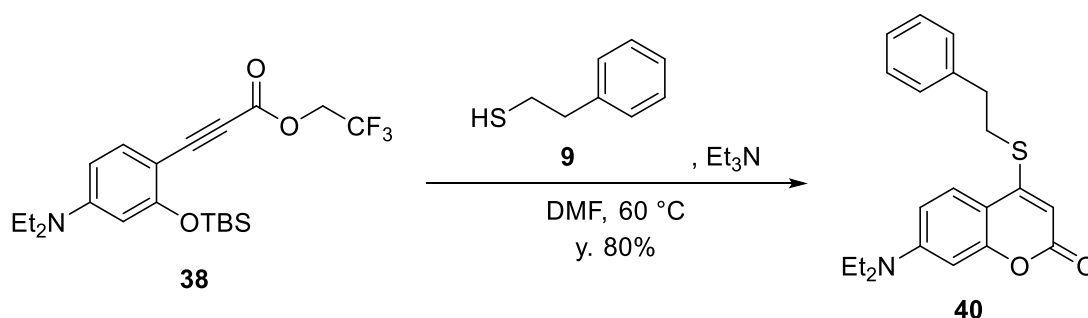
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.40 (m, 1H), 7.33–7.26 (overlapped, 2H), 7.25–7.18 (overlapped, 3H), 6.52–6.48 (overlapped, 2H), 5.34 (s, 1H), 3.57 (m, 2H), 3.40 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 3.02–2.97 (overlapped, 5H), 1.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 163.8, 161.2, 156.7, 150.0, 138.5, 128.7 (2 carbons), 128.6 (2 carbons), 126.6, 126.2, 107.4, 104.6, 98.2, 90.2, 56.2, 44.6 (2 carbons), 40.0, 33.7, 12.5 (2 carbons).

ESI-HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 351.20725; found: 351.20812.

IR (NaCl): 1698 cm^{-1} .

7-(diethylamino)-4-(phenethylthio)-2H-chromen-2-one (40)



38 (24.5 mg, 0.0693 mmol) を DMF (4.5 mL) に溶解させ、2-phenylethanethiol (**9**) (14 μL , 0.104 mmol, 1.5 equiv.) と Et_3N (19 μL , 0.139 mmol, 2.0 equiv.) を加え、 N_2 雰囲気下 $60\text{ }^\circ\text{C}$ で3時間加熱攪拌した。反応溶液に氷冷下 H_2O を加え、 AcOEt 抽出 (3回)、brine 洗浄 (1回)、 Na_2SO_4 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を NH-SiO_2 オープンカラムクロマトグラフィー (0–20% AcOEt /hexane, NH-SiO_2 : 11 g) で精製し、**40** (19.7 mg, 0.0557 mmol, 80%) を得た。

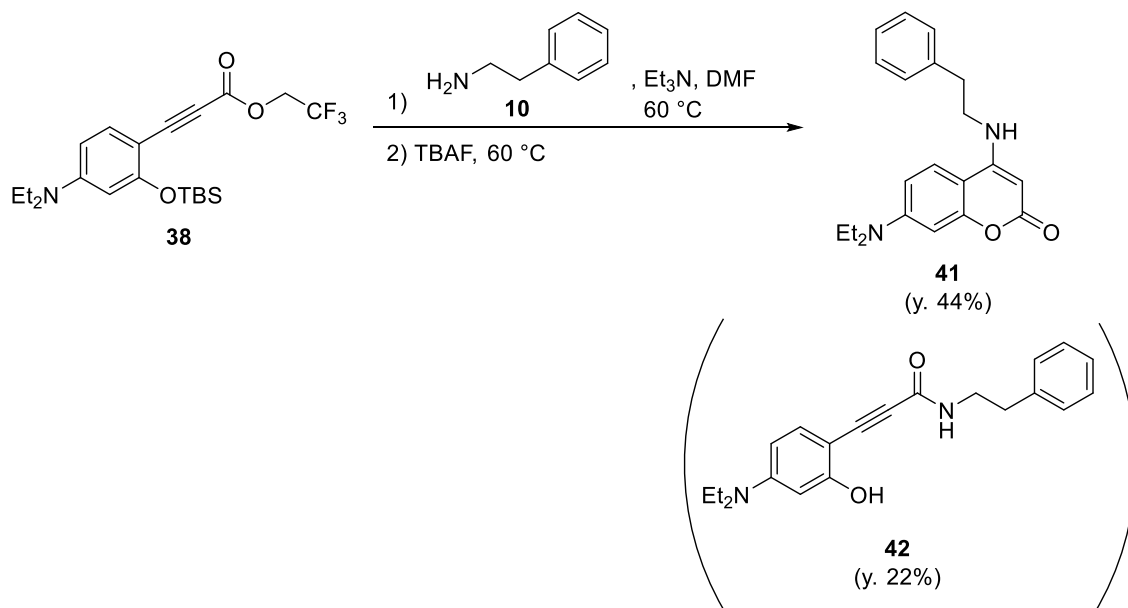
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.49 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.34 (m, 2H), 7.28–7.27 (overlapped, 2H), 7.25–7.23 (overlapped, 1H), 6.55 (dd, $J = 9.1, 2.6$ Hz, 1H), 6.46 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 5.90 (s, 1H), 3.41 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 3.25 (m, 2H), 3.07 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 160.7, 156.3, 154.7, 150.8, 139.1, 128.7 (2 carbons), 128.5 (2 carbons), 126.9, 124.9, 108.4, 107.2, 100.8, 97.4, 44.6 (2 carbons), 34.3, 31.9, 12.4 (2 carbons).

ESI-HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_2\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 376.13472; found: 376.13428.

IR (NaCl): 1704 cm^{-1} .

7-(diethylamino)-4-(phenethylamino)-2*H*-chromen-2-one (41)



38 (128.2 mg, 0.298 mmol) を DMF (3.0 mL) に溶解させ、phenethylamine (**10**) (56 μ L, 0.448 mmol, 1.5 equiv.) と Et₃N (83 μ L, 0.60 mmol, 2.0 equiv.) を滴下し、N₂ 雰囲気下、60 °C で 2 時間加熱攪拌した。続いて氷冷下、TBAF (448 μ L, 1.0 M in THF, 0.448 mmol, 1.5 equiv.) を滴下し、N₂ 雰囲気下、60 °C で 17 時間攪拌した。反応溶液に氷冷下 H₂O を加え、CH₂Cl₂ 抽出 (3 回)、brine 洗浄 (2 回)、Na₂SO₄ 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を NH-SiO₂ オープンカラムクロマトグラフィー (10–60% AcOEt/hexane, NH-SiO₂: 12 g) で精製し、**41** (44.3 mg, 0.132 mmol, 44%) と副生成物 **42** (22.1 mg, 0.0657 mmol, 22%) を得た。

41

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7.38–7.27 (overlapped, 3H), 7.25–7.22 (overlapped, 2H), 7.03 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.52–6.48 (overlapped, 2H), 5.19 (s, 1H), 4.92 (br-s, 1H), 3.53 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.44 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 3.00 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 164.1, 155.9, 153.4, 150.5, 138.1, 128.9 (2 carbons), 128.7 (2 carbons), 126.9, 120.8, 107.8, 102.3, 98.3, 80.5, 44.6 (2 carbons), 43.6, 34.6, 12.4 (2 carbons).

ESI-HRMS: *m/z* calcd for C₂₁H₂₄N₂O₂ [M+H]⁺: 337.19160; found: 337.19182.

IR (NaCl): 3311, 1698 cm⁻¹.

42

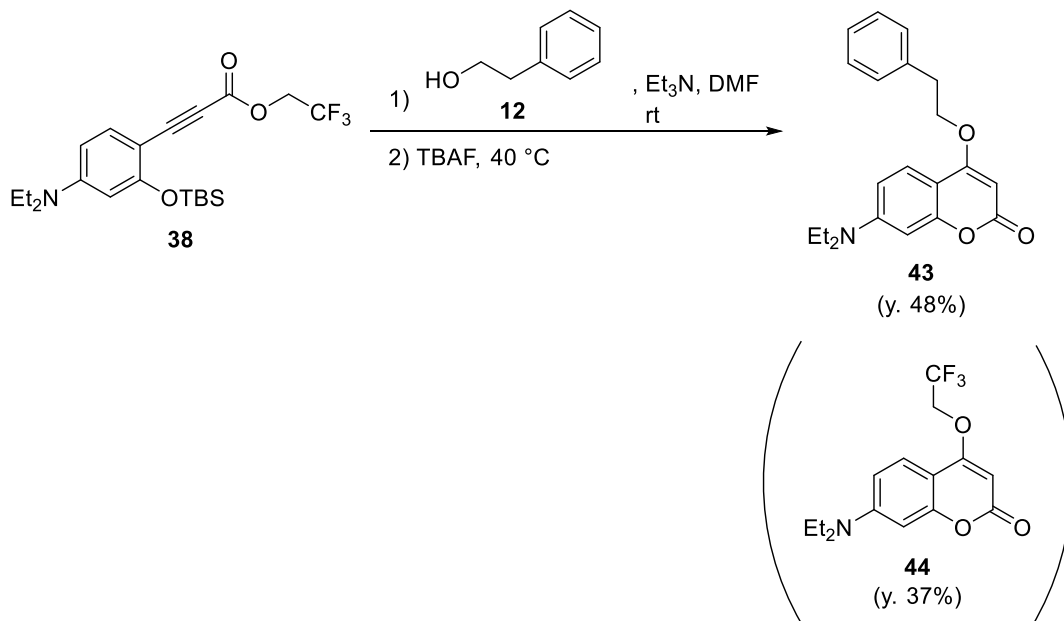
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7.42 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.36–7.31 (overlapped, 3H), 7.27 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.71 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 6.64 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.55 (br-t, *J* = 5.1 Hz, 1H), 3.72 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.40 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 2.94 (t, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 159.3, 157.5, 148.2, 146.3, 138.9, 128.8 (2 carbons), 128.7 (2 carbons), 126.5, 122.8, 116.7, 110.8, 110.4, 93.2, 44.9 (2 carbons), 40.5, 36.0, 12.5 (2 carbons).

ESI-HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 337.19178; found: 359.17385.

IR (NaCl): 3295, 1626 cm^{-1} .

7-(diethylamino)-4-phenethoxy-2H-chromen-2-one (43)



38 (112.8 mg, 0.263 mmol) を DMF (2.6 mL) に溶解させ、2-phenylethanol (**12**) (47 μL , 0.394 mmol, 1.5 equiv.) と Et_3N (73 μL , 0.525 mmol, 2.0 equiv.) を滴下し、 N_2 雰囲気下、室温で 2 時間攪拌した。次に氷冷下、TBAF (131 μL , 1.0 M in THF, 0.131 mmol, 0.5 equiv.) を滴下し、 N_2 雰囲気下、室温で 22 時間攪拌した。40 °C に昇温し、18 時間 30 分攪拌した。反応溶液に氷冷下 *sat.* NaHCO_3 aq. を加え、 CH_2Cl_2 抽出 (3 回)、brine 洗浄 (1 回)、 Na_2SO_4 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を NH- SiO_2 オープンカラムクロマトグラフィー (0–60% Et_2O /hexane, SiO_2 : 11 g) で精製し、**43** (42.1 mg, 0.125 mmol, 48%) を得た。また副生成物 **44** (31.0 mg, 37%) 得た。

43

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.43 (m, 1H), 7.37–7.27 (overlapped, 5H), 7.23 (m, 1H), 6.75–6.72 (overlapped, 2H), 4.54 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.41 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 3.09 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 159.8, 158.7, 148.7, 142.7, 137.7, 129.0 (2 carbons), 128.6 (2 carbons), 126.6, 123.0, 116.0, 114.8, 110.8, 93.2, 65.3, 45.0, 35.3, 12.5.

ESI-HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 338.17562; found: 338.17494.

IR (NaCl): 1716 cm^{-1} .

44

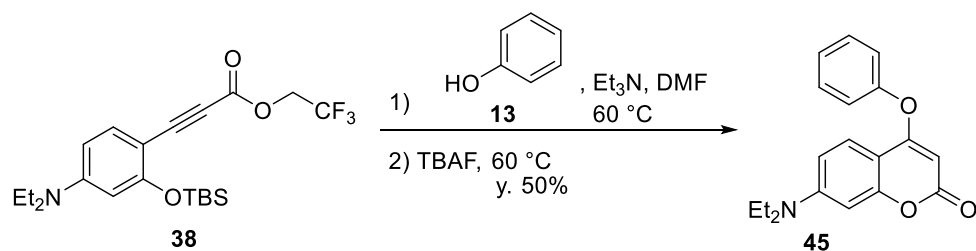
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.59 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.59 (dd, $J = 9.1, 2.5$ Hz, 1H), 6.47 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 5.37 (s, 1H), 4.43 (q, $J = 7.8$ Hz, 2H), 3.42 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 1.21 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 165.0, 163.4, 155.9, 151.5, 123.9, 122.6 (q, $J = 275.8$ Hz), 108.6, 102.7, 97.1, 86.1, 65.2 (q, $J = 36.9$ Hz), 44.8 (2 carbons), 12.4 (2 carbons).

ESI-HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{NNaO}_3$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 338.09800; found: 338.09828.

IR (NaCl): 1732 cm^{-1} .

7-(diethylamino)-4-phenoxy-2H-chromen-2-one (45)



38 (20.9 mg, 0.0487 mmol) を DMF (0.5 mL) に溶解させ、**13** (14.6 mg, 0.155 mmol, 3.2 equiv.) と Et_3N (14 μL , 0.0973 mmol, 2.0 equiv.) を滴下し、 N_2 雰囲気下、 $60\text{ }^\circ\text{C}$ で 2 時間加熱攪拌した。氷冷下、TBAF (73 μL , 1.0 M in THF, 0.0730 mmol, 1.5 equiv.) を滴下し、 N_2 雰囲気下、 $60\text{ }^\circ\text{C}$ で 18 時間攪拌した。反応溶液に氷冷下 *sat.* NaHCO_3 aq. を加え、 Et_2O 抽出 (4 回)、0.25 M NaOH aq. 洗浄 (1 回)、brine 洗浄 (1 回)、 Na_2SO_4 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を NH-SiO_2 オープンカラムクロマトグラフィー (0–50% Et_2O /hexane, NH-SiO_2 : 11 g) で精製し、**45** (7.5 mg, 0.0242 mmol, 50%) を得た。

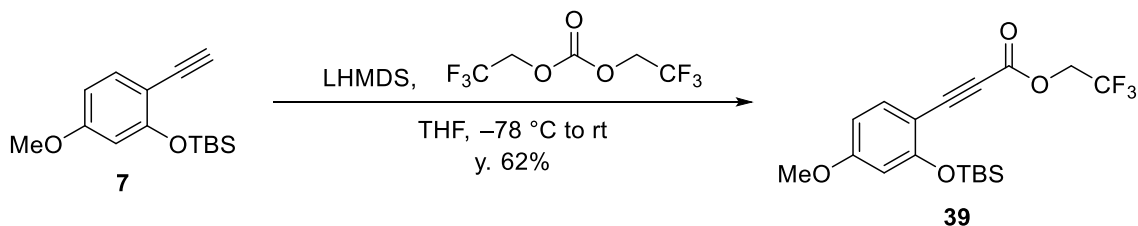
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.78 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.48–7.42 (overlapped, 2H), 7.30 (m, 1H), 7.17–7.13 (overlapped, 2H), 6.63 (dd, $J = 8.9, 2.5$ Hz, 1H), 6.51 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 5.10 (s, 1H), 3.43 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 1.23 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 167.3, 164.0, 156.3, 152.8, 151.4, 130.2 (2 carbons), 126.4, 124.0, 121.5 (2 carbons), 108.4, 103.6, 97.3, 88.6, 44.8 (2 carbons), 12.4 (2 carbons).

ESI-HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_3$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 310.14432; found: 310.14361.

IR (NaCl): 1717 cm^{-1} .

2-trifluoroethyl 3-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-4-methoxyphenyl)propiolate (39)



7 (256.1 mg, 0.976 mmol) を THF (9.8 mL) に溶解させ、 $-78\text{ }^\circ\text{C}$ に冷却し、LHMDS (1.0 M in THF, 2.0 mL, 2.00 mmol, 2.0 equiv.) を滴下後、10 分間攪拌した。次に Bis(2,2,2-trifluoroethyl) carbonate (292 μL , 1.95 mmol, 2.0 equiv.) を滴下し、 $-78\text{ }^\circ\text{C}$ で 45 分間攪拌後、氷冷下 30 分間攪拌し、さらに室温で 30 分間攪拌した。反応溶液に氷冷下 *sat.* NaHCO_3 aq. を加え、AcOEt 抽出 (3 回)、brine 洗浄 (1 回)、 MgSO_4 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を SiO_2 オープンカラムクロマトグラフィー (3–5% AcOEt/hexane, SiO_2 : 20 g) で精製し、**39** (234.3 mg, 0.603 mmol, 62%) を得た。

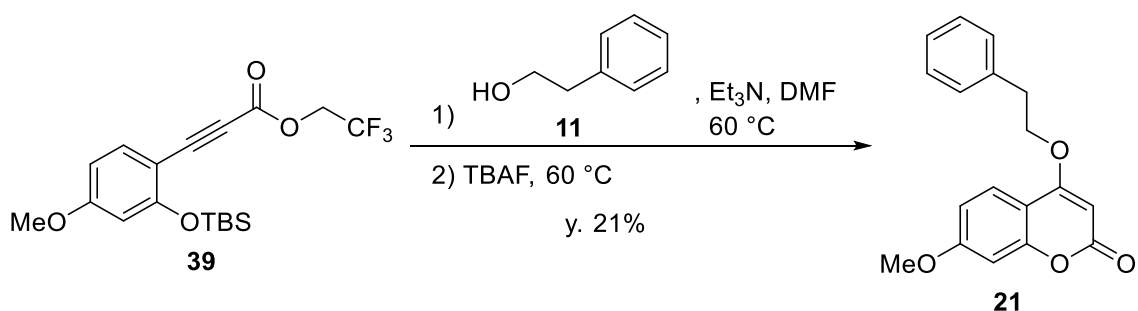
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.45 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.53 (dd, $J = 8.7, 2.4$ Hz, 1H), 6.37 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.56 (q, $J = 8.3$ Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 1.04 (s, 9H), 0.26 (s, 6H).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 163.4, 160.5, 152.5, 136.2, 122.7 (q, $J = 275.6$ Hz), 107.6, 105.9, 104.0, 88.6, 82.4, 60.9 (q, $J = 36.6$ Hz), 55.5, 25.5 (3 carbons), 18.2, -4.43 (2 carbons).

ESI-HRMS: m/z calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{O}_4\text{SiNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 411.12154; found: 411.12433.

IR (NaCl): 1725 cm^{-1} .

7-methoxy-4-phenethoxy-2H-chromen-2-one (21)



39 (24.0 mg, 0.0619 mmol) を DMF (0.6 mL) に溶解させ、2-phenylethanol (**11**) (11 μL , 0.0927 mmol, 1.5 equiv.) と Et_3N (17 μL , 0.124 mmol, 2.0 equiv.) を滴下し、 N_2 雰囲気下、 $60\text{ }^\circ\text{C}$ で 2 時間攪拌した。次に氷冷下、TBAF (93 μL , 1.0 M in THF, 0.0927 mmol, 1.5 equiv.) を滴下し、 N_2 雰囲気下、 $60\text{ }^\circ\text{C}$ で 16 時間 30 分攪拌した。反応溶液に氷冷下 H_2O を加え、AcOEt 抽出 (3 回)、brine 洗浄 (1 回)、 MgSO_4 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を SiO_2 オープンカラムクロマトグラフィー (0–30% AcOEt/hexane, SiO_2 : 12 g) で精製し、**21** (3.9 mg, 0.0132 mmol, 21%) を得た。

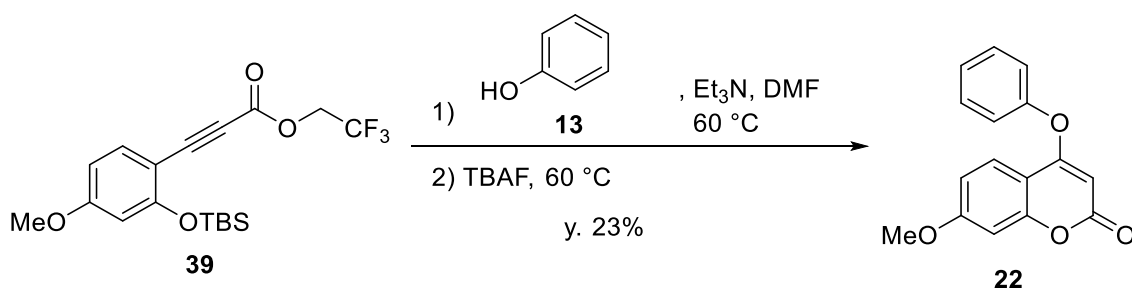
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.53 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H), 7.36–7.22 (overlapped, 5H), 7.06 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.94 (dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz, 1H), 4.56 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.09 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 160.6, 159.5, 157.2, 144.7, 137.5, 129.0 (2 carbons), 128.6 (2 carbons), 126.7, 123.1, 120.2, 114.2, 114.1, 95.7, 65.6, 55.7, 35.2.

ESI-HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 319.09463; found: 319.09339.

IR (NaCl): 1717 cm^{-1} .

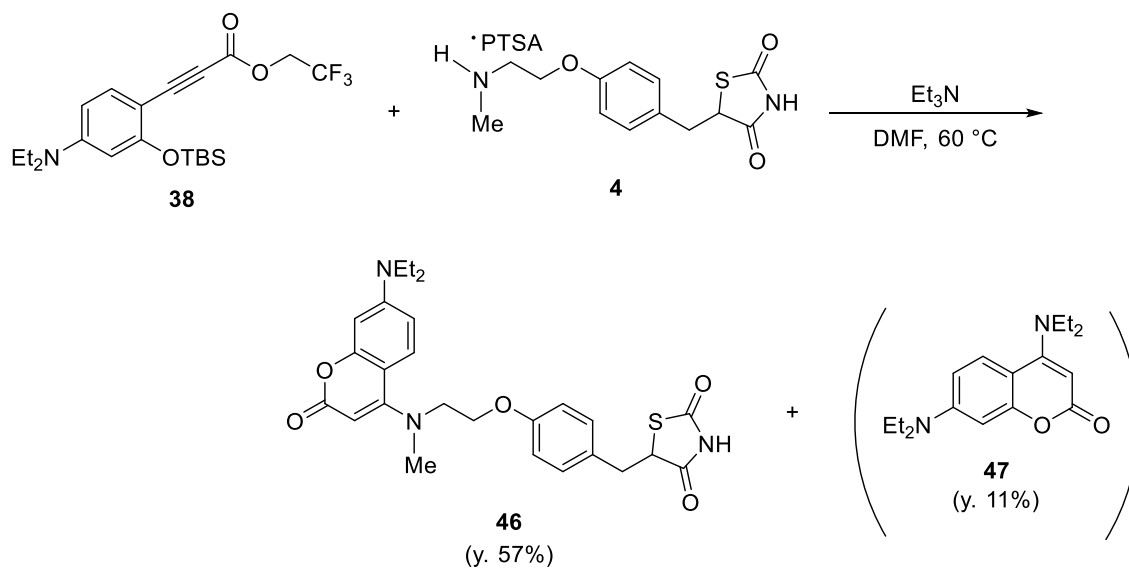
7-methoxy-4-phenoxy-2H-chromen-2-one (**22**)⁹⁴



39 (21.7 mg, 0.0559 mmol) を DMF (0.6 mL) に溶解させ、**13** (13.6 mg, 0.145 mmol, 2.6 equiv.) と Et_3N (16 μL , 0.112 mmol, 2.0 equiv.) を滴下し、 N_2 雰囲気下、 $60\text{ }^\circ\text{C}$ で 2 時間加熱攪拌した。氷冷下、TBAF (84 μL , 1.0 M in THF, 0.0838 mmol, 1.5 equiv.) を滴下し、 N_2 雰囲気下、 $60\text{ }^\circ\text{C}$ で 18 時間攪拌した。反応溶液に氷冷下 *sat.* NaHCO_3 aq. を加え、 Et_2O 抽出 (4 回)、0.045 M NaOH aq. 洗浄 (2 回)、brine 洗浄 (1 回)、 Na_2SO_4 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を SiO_2 オープンカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 , SiO_2 : 12 g) で精製し、**22** (3.4 mg, 0.0127 mmol, 23%) を得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.92 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.48 (m, 2H), 7.33 (m, 1H), 7.17 (m, 2H), 6.92 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 5.27 (s, 1H), 3.91 (s, 3H).

**5-(4-(2-((7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)
(methyl)amino)ethoxy)benzyl)thiazolidine-2,4-dione (46)**



4 (19.8 mg) を DMF (0.9 mL) に溶解させ、 Et_3N (18 μL , 0.131 mmol, 3.0 equiv.) を滴下し、**38** (18.8 mg, 0.0438 mmol) の DMF 溶液 (0.6 mL) を加え、 N_2 雰囲気下、 60°C で 16 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣を SiO_2 オープンカラムクロマトグラフィー (5–100% AcOEt/hexane, SiO_2 : 7 g) で精製し、**46** (12.4 mg, 0.0250 mmol, 57%, from compound **38**) と **47** (1.4 mg, 0.000485 mmol, 11%) を得た。

46

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.63 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.81 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.56–6.50 (overlapped, 2H), 5.36 (s, 1H), 4.49 (dd, $J = 8.5, 3.9$ Hz, 1H), 4.22 (m, 2H), 3.79 (m, 2H), 3.44–3.34 (overlapped, 5H), 3.18 (dd, $J = 14.2, 8.6$ Hz, 1H), 3.03 (s, 3H), 1.21 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 173.9, 170.1, 164.1, 161.6, 157.8, 156.7, 150.1, 130.7 (2 carbons), 127.9, 126.3, 114.9 (2 carbons), 107.7, 104.5, 98.2, 90.8, 65.3, 53.9, 53.4, 44.6 (2 carbons), 39.9, 37.7, 12.5 (2 carbons).

ESI-HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 496.19062; found: 496.18896.

IR (NaCl): 1749, 1698, 1658, 1245 cm^{-1} .

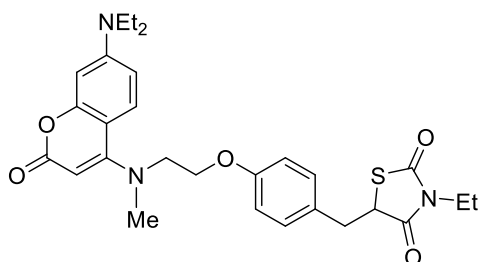
47

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 7.43 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 6.53 (d, $J = 9.1, 2.7$ Hz, 1H), 6.48 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 5.38 (s, 1H), 3.39 (quin, $J = 7.0$ Hz, 8H), 1.23 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 1.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 164.0, 160.1, 156.7, 149.9, 126.1, 107.5, 105.1, 98.2, 90.7, 45.5 (2 carbons), 44.6 (2 carbons), 12.5 (2 carbons), 12.3 (2 carbons).

ESI-HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 289.19160; found: 289.19162.

IR (NaCl): 1698 cm⁻¹.



48

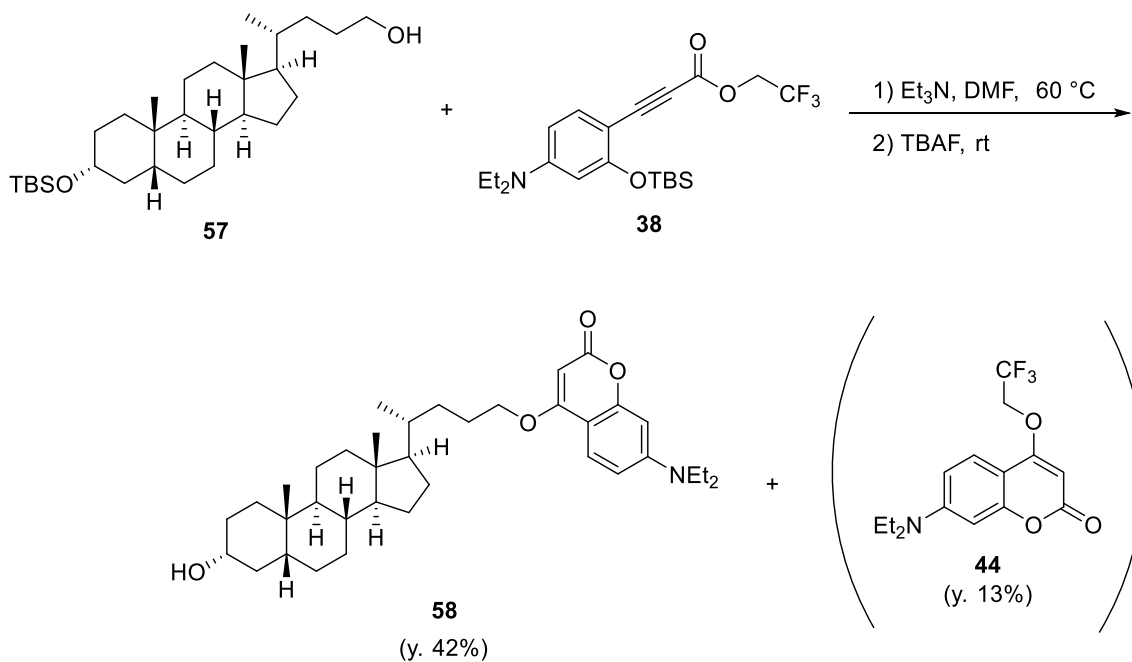
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7.61 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.17–7.12 (overlapped, 2H), 6.86–6.81 (overlapped, 2H), 6.55–6.49 (overlapped, 2H), 5.43 (s, 1H), 4.41 (dd, J = 9.0, 3.9 Hz, 1H), 4.21 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 3.76 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 3.61 (m, 2H), 3.46–3.35 (overlapped, 5H), 3.09 (dd, J = 14.1, 8.9 Hz, 1H), 3.04 (s, 3H), 1.20 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 1.11 (t, J = 7.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 173.8, 170.9, 163.7, 161.5, 157.8, 156.7, 150.1, 130.6 (2 carbons), 128.3, 126.3, 114.7 (2 carbons), 107.6, 104.5, 98.2, 91.0, 65.3, 53.7, 51.6, 44.6 (2 carbons), 39.9, 37.8, 36.9, 12.8, 12.5 (2 carbons).

ESI-HRMS: m/z calcd for C₂₈H₃₄N₃O₅S [M+H]⁺: 524.22192; found: 524.22030.

IR (NaCl): 1745, 1682, 1613 cm⁻¹.

7-(diethylamino)-4-(((*R*)-4-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*R*)-3-hydroxy-10,13-dimethylhexadecahydro-1*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-17-yl)pentyl)oxy)-2*H*-chromen-2-one (58)



38 (27.5 mg, 0.0640 mmol) を DMF (0.5 mL) に溶解させ、**57** (31.5 mg, 0.0640 mmol, 1.0 equiv.) と Et₃N (13 μ L, 0.096 mmol, 1.5 equiv.) を滴下し、N₂ 雰囲気下、60 °C で 1 時間攪拌した。氷冷下、TBAF (32 μ L, 1.0 M in THF, 0.0320 mmol, 0.5 equiv.) を滴下し、N₂ 雰囲気下、室温で 1 時間 30 分攪拌した。再び、氷冷下 TBAF (32 μ L, 1.0 M in THF, 0.0320 mmol, 0.5 equiv.) を滴下し、N₂ 雰囲気下、室温で 117 時間攪拌した。反応溶液に氷冷下 *sat.* NaHCO₃ aq. を加え、AcOEt 抽出 (3 回)、brine 洗浄 (1 回)、Na₂SO₄ 乾燥、ろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を NH-SiO₂ オープンカラムクロマトグラフィー (10–30% AcOEt/hexane, NH-SiO₂: 7.4 g) で精製し、**58** (15.6 mg, 0.0270 mmol, 42%) を得た。また **44** (2.7 mg, 0.00856 mmol, 13%) を得た。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7.44 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 6.76–6.72 (overlapped, 2H), 4.30 (m, 2H), 3.62 (m, 1H), 3.41 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H), 1.99–1.31 (overlapped, 20H), 1.22–1.18 (overlapped, 9H), 1.13–1.00 (overlapped, 5H), .096–0.94 (overlapped, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.65 (s, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 160.0, 158.6, 148.6, 143.0, 122.9, 116.0, 114.5, 110.7, 93.3, 71.9, 65.5, 56.5, 56.1, 45.0 (2 carbons), 42.7, 42.1, 40.4, 40.2, 36.5, 35.9, 35.41, 35.36, 34.6, 31.9, 30.6, 28.3, 27.2, 26.4, 25.4, 24.2, 23.4, 20.8, 18.6, 12.5 (2 carbons), 12.1.

ESI-HRMS: *m/z* calcd for C₃₇H₅₅NO₄ [M+H]⁺: 578.42093; found: 578.42075.

IR (NaCl): 3404, 2929, 1716 cm⁻¹.

遺伝子転写活性

COS-7 細胞を 5% ウシ胎児血清および抗生物質-抗真菌剤溶液 (100 unit/mL, streptomycin 100 μ g/mL) を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培地で 5% CO₂ 雰囲気下、37 °C で培養した。COS-7 細胞を 4 \times 10⁴ cells/mL に調製し、24 well plate に 500 μ L ずつ播種し、37 °C で 24 時間培養した。核内受容体プラスミド (PPAR γ : pSG5-GAL-hPPAR γ 0.05 μ g/well) およびレポータープラスミド (MH100 \times 4-TK-Luc 0.18 μ g/well)、内標準としてシーパンジールシフェラーゼ発現遺伝子を含むプラスミド (pRL-CMV 0.02 μ g/well) を無血清 DMEM (25 μ L/well) 培地で希釈したポリエチレンジアミン (0.75 μ L/well) を用いて導入した。調製したポリエチレンジアミン/プラスミド混合溶液を培養した細胞に添加し、37 °C で 8 時間培養した。続いて、リガンド (EtOH 溶液) あるいはネガティブコントロール (EtOH または DMSO) を 5 μ L/well 添加し、37 °C で 16 時間培養した。これ以降の操作はルシフェラーゼアッセイキット (Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega)) を使用して行った。24 well plate から培地を除去し、調整した細胞溶解液 (5 \times Passive Lysis Buffer 20%, Milli-Q 80%) を 100 μ L/well で加え、15 分間振盪することで細胞を溶解した。細胞溶解液を 20 μ L ずつ 96 well plate に移し、2

種類の発光基質を用いて、ルミノメーター (GloMax Multilamnescence System with Instinct Software with. Shaking and Dual Injector, Promega) で発光量を測定した。ルシフェラーゼ活性は内標準により規格化した。本実験は $n = 3$ で行った。

UV スペクトル

第1節: 10 μM に調製したサンプル (17, 18, 19, 5, Rosiglitazone) の各種溶液 (CH_2Cl_2 , THF, MeOH, H_2O , hexane) を石英製のマイクロセルに 800 μL 加えて測定した。測定条件はスペクトル測定モード, 開始波長 600 nm, 終了波長 200 nm, スキャンスピード 400 nm/min, データ間隔 0.5 nm である。

第2節: 10 μM または 5 μM に調製したサンプル (40, 41, 37, 43, 45, 21, 22)、または 2 μM に調製したサンプル (46, 48) の各種溶液 (CH_2Cl_2 , THF, MeOH, H_2O) を石英製のマイクロセルに 500 μL 加えて測定した。測定条件はスペクトル測定モード, 開始波長 600 nm, 終了波長 200 nm, スキャンスピード 400 nm/min または 1000 nm/min, データ間隔 1.0 nm である。

蛍光スペクトル

第1節: 10 μM に調製したサンプル (17, 18, 19, 5, Rosiglitazone) の各種溶液 (MeOH, THF, Toluene) を石英製のマイクロセルに 800 μL 加えて測定を行った。データから溶媒のデータをバックグラウンドとして差し引き、蛍光スペクトルとした。測定条件は波長スキャンモード, 蛍光開始波長 200 nm, 蛍光終了波長 600 nm, 蛍光側サンプリング間隔 0.2 nm, スキャンスピード 240 nm/min, 励起側スリット 5 nm, 蛍光側スリット 5 nm, ホトマル電圧 400 V, レスポンス 0.002 s である。

第2節: 10 μM または 5 μM に調製したサンプル (40, 41, 37, 43, 45, 21, 22) と 2 μM に調製したサンプル (46, 48) の各種溶液 (CH_2Cl_2 , THF, MeOH, H_2O) を石英製のマイクロセルに 500 μL 加えて測定した。データから溶媒のデータをバックグラウンドとして差し引き、蛍光スペクトルとした。測定条件は波長スキャンモード, 蛍光開始波長 300 nm, 蛍光終了波長 570 nm, 蛍光側サンプリング間隔 0.2 nm, スキャンスピード 2400 nm/min, 励起側スリット 5 nm, 蛍光側スリット 5 nm, ホトマル電圧 400 V, レスポンス 0.002 s である。蛍光量子収率は、標準物質 硫酸キニーネ 0.1 M H_2SO_4 溶液 ($\Phi = 0.577$) との相対法を用いて求めた。⁸⁵

第 2 章に関する実験

human PPAR γ -LBD の発現および精製

hPPAR γ -LBD は N 末端に TEV プロテアーゼで除去可能な 6 × His タグを含む pET30a ベクターを使用して発現を行った。Rosetta™ (DE3) pLysS (50 μ L) にプラスミド (1 μ L) を加え、氷上で 20 分間静置した後、200 μ L の 2 × TY (tryptone 16 g/L, yeast extract 10 g/L, NaCl 5 g/L) を加え、37 °C で 40 分間振盪培養した。その後、kanamycin (34 μ g/mL) と chloramphenicol (34 μ g/mL) を添加した LB plate (20 mL) に播種し、37 °C で 16 時間培養した。得られたコロニーの 1 つを採取し、kanamycin (34 μ g/mL) と chloramphenicol (34 μ g/mL) を添加した 2 × TY (20 mL) に加え、37 °C で 16 時間振盪培養した。次に、chloramphenicol (34 μ g/mL) と kanamycin (34 μ g/mL) を添加した 2 × TY (1 L) に培養液を 5 mL ずつ加え、O.D.₆₀₀=0.6–1.0 になるまで 37 °C で振盪して培養した。IPTG を 500 μ L 加え、20 °C で 16 時間振盪培養した。遠心分離 (8,000 × g, 5 min, 4 °C) にて集菌後、細胞溶解用緩衝液 50 mL (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP, 0.5 mM EDTA) により、細胞を懸濁させ、氷上で超音波にて破碎した。遠心分離 (18,000 × g, 30 min, 4 °C) し、可溶性画分と cComplete His-Tag Purification Resin (Roche) を 4 °C で 1 時間混和して、hPPAR γ -LBD を樹脂に吸着させた。50 mL の洗浄用緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP, 0.5 mM EDTA, 5 mM imidazole) により樹脂を洗浄した。次に、溶出用緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 1 mM TCEP, 250 mM imidazole, 100 mM NaCl) をタンパク質が溶出しなくなるまで流した。タンパク質の溶出はブラッドフォードアッセイ (ブラッドフォード溶液 48 μ L : タンパク質溶液 2 μ L) により確認した。得られたタンパク質溶液を限外ろ過によって 10 mL まで濃縮し、TEV プロテアーゼ (0.5 mL) を加えた後、500 mL の緩衝溶液 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 1 mM TCEP) を用い、4 °C で一晩透析を行った。電気泳動 (SDS-PAGE) にて His タグが切断されていることを確認した後、cComplete His-Tag Purification Resin (ビーズとして 3 mL) と 4 °C で 1 時間混和した。溶出液を全量回収し、限外ろ過によって 4 mL まで濃縮した。RESOURCE Q (6 mL) column (GE Healthcare) にタンパク質溶液を吸着させ、buffer A (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM TCEP, 0.5 mM EDTA) と buffer B (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM TCEP, 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl) を 1%/min のグラジエントで流し、96 deep well plate に 1 fr./min でタンパク質溶液を回収した。電気泳動 (SDS-PAGE) で hPPAR γ -LBD 溶出画分の確認を行い、回収したタンパク質溶液を限外ろ過によって 1 mL まで濃縮した。Superdex 75 Increase 10/300 GL (24 mL) gel-filtration column によるゲ

ろ過クロマトグラフィーを行った。buffer C (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl) を流し、96 deep well plate に 1 fr./min でタンパク質溶液を回収した。電気泳動 (SDS-PAGE) で hPPAR γ -LBD の溶出画分ならびに純度を確認した。hPPAR γ -LBD 溶液はタンパク質結晶化用緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM TCEP, 0.5 mM EDTA) へ限外ろ過を利用して buffer 置換した。タンパク質濃度は 280 nm における吸光度から推定し、hPPAR γ -LBD 濃度 0.19 mM (6.0 mg/mL) に調製した。

hPPAR γ -LBD に対する親和性評価実験

解析には GraphPad Prism6 を用いた。なお EC₅₀, K_d, IC₅₀, K_i 値は、以下の式を用いて算出した。

EC₅₀: $\text{LogEC} = \text{LogEC}_{50}\text{Control}$

$\text{LogEC} = \text{LogEC}_{50}\text{Control} + \log(\text{EC}_{50}\text{Ratio})$

$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC} - X) * \text{HillSlope}))}$

K_d: $Y = B_{\text{max}} * X^h / (K_d^h + X^h)$

IC₅₀: $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{(X - \text{LogIC}_{50})})$

K_i: $\text{logEC}_{50} = \text{log}(10^{\text{logK}_i} * (1 + \text{RadioliganNM} / \text{HotK}_d\text{NM}))$

$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{(X - \text{LogEC}_{50})})$

(Radioligand は化合物 **46** または **48** の濃度であり、720 nM または 1440 nM、

HotK_d は化合物 **46** または **48** の K_d = 1603 nM または 4082 nM を代入した。)

化合物 46 の K_d 値算出

調製した 0.19 mM hPPAR γ -LBD 溶液を緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM TCEP, 0.5 mM EDTA) で 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 μ M に希釈した。そこに化合物 **46** を終濃度 1.0 μ M になるように加え、石英製のマイクロセルに 200 μ L 加えて測定した。測定条件は波長スキャンモード、蛍光開始波長 350 nm, 蛍光終了波長 570 nm, 蛍光側サンプリング間隔 0.2 nm, スキャンスピード 2400 nm/min, 励起側スリット 5 nm, 蛍光側スリット 5 nm, ホトマル電圧 400 V, レスポンス 0.002 s, 励起波長 367 nm である。データから緩衝液の測定データをバックグラウンドとして差し引き、410 nm の蛍光強度を用いて計算を行った。以下、同様に蛍光スペクトルを測定した。

ロシグリタゾンの K_i 値算出

調製した 0.19 mM hPPAR γ -LBD 溶液を緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM TCEP, 0.5 mM EDTA) で 0.6 μ M に希釈した。希釈した hPPAR γ -LBD 溶液に化合物 **46** を終濃

度 0.72 μM 、さらにロシグリタゾンを終濃度 1.17 nM, 4.69 nM, 18.75 nM, 75 nM, 0.3 μM , 1.2 μM , 4.8 μM , 19.2 μM , または 76.8 μM になるように加え、石英製のマイクロセルに 200 μL 加えて測定した。測定は同様の条件で行い、410 nm の蛍光強度 (測定 3 回の平均値) を用いて、GraphPad Prism で解析を行った。

Farglitazar の K_i 値算出

調製した 0.19 mM hPPAR γ -LBD 溶液を緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM TCEP, 0.5 mM EDTA) で 0.6 μM に希釈した。希釈した hPPAR γ -LBD 溶液に化合物 **46** を終濃度 0.72 μM 、さらに Farglitazar を終濃度 0.59 nM, 2.34 nM, 9.38 nM, 37.5 nM, 150 nM, 600 nM, 2.4 μM , 9.6 μM , または 38.4 μM になるように加え、石英製のマイクロセルに 200 μL 加えて測定した。測定は同様の条件で行い、410 nm の蛍光強度 (測定 3 回の平均値) を用いて、GraphPad Prism で解析を行った。

化合物 **48** の K_d 値算出

調製した 0.19 mM hPPAR γ -LBD 溶液を緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM TCEP, 0.5 mM EDTA) で 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 10.0, 15.0 μM に希釈した。そこに化合物 **48** を終濃度 1.0 μM になるように加え、石英製のマイクロセルに 200 μL 加えて測定した。測定は同様の条件で行い、410 nm の蛍光強度 (測定 3 回の平均値) を用いて、GraphPad Prism で解析を行った。

ピオグリタゾンおよび LT175 の K_i 値算出

調製した 0.19 mM hPPAR γ -LBD 溶液を緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM TCEP, 0.5 mM EDTA) で 0.6 μM に希釈した。希釈した hPPAR γ -LBD 溶液に化合物 **48** を終濃度 1.44 μM 、さらにピオグリタゾン (または LT175) を終濃度 4.69 nM, 18.75 nM, 75 nM, 0.3 μM , 1.2 μM , 4.8 μM , 19.2 μM , または 76.8 μM になるように加え、石英製のマイクロセルに 200 μL 加えて測定した。測定は同様の条件で行い、410 nm の蛍光強度 (測定 3 回の平均値) を用いて、GraphPad Prism で解析を行った。

タンパク質の結晶化

結晶化プレートは QIAGEN の EasyXtal 15-Well Tool を使用し、hanging drop 法にて結晶化を行った。マイクロチューブに、0.19 mM hPPAR γ -LBD 溶液 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM TCEP, 0.5 mM EDTA) を加えた後、リガンド (0.5 当量) の DMSO 溶液を加え、よ

く混和した。結晶化プレートの各ウェルに沈殿剤 (sodium citrate) を含むリザーバー溶液を 300 μ L 加えた。結晶化プレートの蓋上で 5/hPPAR γ -LBD 混合溶液 (1 μ L) とリザーバー溶液 (1 μ L) を混和し、蓋を閉めて室温で静置した。結晶は約 2 週間で生成した。良質な結晶は、リザーバー溶液 0.1 M Tris-HCl pH 7.27, 0.8 M sodium citrate で得られ、解析に用いた。

X 線結晶構造解析

X 線回折実験はすべて茨城県つくば市にある高エネルギー加速器研究機構 (KEK) で行った。化合物 46/hPPAR γ -LBD 複合体はビームライン BL-5A を使用して回折データを収集した。結晶は凍結を防ぐため LV CryoOil (MiTeGen) に浸してから解析実験に用いた。解析データは、窒素ガス気流下、100 K にて収集した。反射ファイルは 1.0°につき 1 枚取得した。回折データの指数付け、精密化、積分、スケーリングはプログラム iMOSFLM^{95,96} を用いて行った。プログラム CCP4⁹⁷ に含まれているソフトウェア Phaser⁹⁸ により、既知の hPPAR γ -LBD 座標ファイル (PDB code: 2VV3) を用いて分子置換法によって複合体の構造を解いた。そして、モデリングソフトウェア Coot⁹⁹ により電子密度マップにモデルを適合させ、Refmac5¹⁰⁰⁻¹⁰⁴ を用いて精密化した。

謝 辞

本研究にあたり、研究に対する姿勢、考え方から有機化学や構造生物学についての御助言、論文作成まで、丁寧に御指導いただきました昭和薬科大学 医薬分子化学研究室 伊藤俊将 教授に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。

有機化学から生物実験まで、数多くの研究に際し熱心かつ丁寧に御教授いただきました昭和薬科大学 医薬分子化学研究室 石田寛明 助教に心より感謝いたします。

蛍光実験や生物学的実験に関する技術や知識について、多くの御助言をいただきました昭和薬科大学 大橋南美 助教に深く感謝いたします。

研究室配属時から4年間にわたって、創薬研究の基礎、考え方を熱心に御指導いただきました昭和薬科大学 山本恵子 学長に深く御礼申し上げます。

お忙しい中、本論文の主査として、ご審査賜りました昭和薬科大学 薬品化学研究室 岡本巖 教授に謹んで深謝の意を表します。本論文の副査として、ご審査賜りました昭和薬科大学 薬化学研究室 田村修 教授および昭和薬科大学 薬品分析化学研究室 唐澤悟 教授に謹んで深謝の意を表します。

NMR 測定や質量分析について御助言と御指導いただきました昭和薬科大学 機器分析研究施設 清谷多美子 助教、千葉一良 教育技術員に厚く御礼申し上げます。

研究室配属時から、実験の基礎技術を御教授いただき、公私にわたって様々な御協力していただきました加藤晃 博士、小島拓之 博士 (現 昭和薬科大学 薬物治療学研究室 特任助教)、吉澤麻美 博士 (現 医薬分子化学研究室 特任助教)、金森聡 博士、久保惇 博士、ならびに大学院生 矢野哲也氏に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、様々な面で協力していただきました医薬分子化学研究室的皆様に心より感謝いたします。

最後に、長年にわたる研究室生活を支えて下さった両親、家族に心より感謝致します。

参考文献

1. 三輪佳宏『蛍光・発光試薬の選び方と使い方』 羊土社, 2007年.
2. 東京化成工業株式会社 「蛍光発光分光分析用試薬」 のホームページ
URL: <https://www.tcichemicals.com/JP/ja/c/10041#>
3. フナコシ株式会社 「バイオラベリング用蛍光色素標識試薬」 のホームページ
URL: <https://www.funakoshi.co.jp/contents/67571>
4. Nadler, A.; Yushchenko, D. A.; Müller, R.; Stein, F.; Feng, S.; Mülle, C.; Carta, M.; Schultz, C.; Exclusive photorelease of signalling lipids at the plasma membrane. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 10056.
5. Kitamura, N.; Kohtani, S.; Nakagaki, R.; Molecular aspects of furocoumarin reactions: Photophysics, photochemistry, photobiology, and structural analysis. *J. Photochem. Photobiol. C-Photochem. Rev.* **2005**, *6*, 168–185.
6. Bhatia, R.; Pathania, S.; Singh, V.; Rawal, R. K.; Metal-catalyzed synthetic strategies toward coumarin derivatives. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2018**, *54*, 280–291.
7. Sekino, E.; Kumamoto, T.; Tanaka, T.; Ikeda, T.; Ishikawa, T.; Concise Synthesis of Anti-HIV-1 Active (+)-Inophyllum B and(+)-Calanolide A by Application of (-)-Quinine-Catalyzed Intramolecular Oxo-Michael Addition.. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2760–2767.
8. Donnelly, A. C.; Mays, J. R.; Burlison, J. A.; Nelson, J. T.; Vielhauer, G.; Holzbeierlein, J.; Blagg, B. S. J.; The Design, Synthesis, and Evaluation of Coumarin Ring Derivatives of the Novobiocin Scaffold that Exhibit Antiproliferative Activity. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 8901–8920.
9. Salem, M. A.; Helal, M. H.; Gouda, M. A.; Ammar, Y. A.; El-Gaby M S. A.; Abbas, S. Y.; An overview on synthetic strategies to coumarins. *Synth. Commun.* **2018**, *48*, 1534–1550.
10. Borges, F.; Roleira, F.; Milhazes, N.; Santana, L.; Uriarte, E.; Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 887–916.
11. Bhatia, R.; Pathania, S.; Singh, V.; Rawal, R.K.; Metal-catalyzed synthetic strategies toward coumarin derivatives. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2018**, *54*, 280–291.
12. Priyanka; Sharma, R.K.; Katiyar, D.; Recent Advances in Transition-Metal-Catalyzed Synthesis of Coumarins. *Synthesis*, **2016**, *48*, 2303–2322.
13. Lončarić, M.; Gašo-Sokač, D.; Jokić, S.; Molnar, M. Recent Advances in the Synthesis of Coumarin Derivatives from Dierent Starting Materials. *Biomolecules* **2020**, *10*, 151–185.
14. Perkin, W. H. XXIII.—On the hydride of aceto-salicyl. *J. Chem. Soc.* **1868**, *21*, 181–186.
15. v. Pechmann, H.; Duisberg, C. Ueber die Verbindungen der Phenole mit Acetessigäther. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1883**, *16*, 2119–2128.

16. v. Pechmann, H.; Neue Bildungsweise der Cumarine. Synthese des Daphnetins. I. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1884**, *17*, 929–936.
17. Aydiner, B.; Seferoğlu, Z.; Proton Sensitive Functional Organic Fluorescent Dyes Based on Coumarin-imidazo[1,2-*a*]pyrimidine; Syntheses, Photophysical Properties, and Investigation of Protonation Ability. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 5921–5934.
18. Kaye, P.T.; Musa, M.A.; Nocanda, X.W.; Efficient and Chemoselective Access to 3-(Chloromethyl)coumarins via Direct Cyclisation of Unprotected Baylis–Hillman Adducts. *Synthesis*, **2003**, 531–534.
19. Kim, S.; Kang, D.; Lee, C.H.; Lee, P.H.; Synthesis of Substituted Coumarins via Brønsted Acid Mediated Condensation of Allenes with Substituted Phenols or Anisoles. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 6530–6537.
20. Choi, H.; Kim, J.; Lee, K.; Metal-Free, Brønsted Acid-Mediated Synthesis of Coumarin Derivatives from Phenols and Propiolic Acids. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 3600–3603.
21. Trost, B.M.; Toste, F.D. A New Palladium-Catalyzed Addition: A Mild Method for the Synthesis of Coumarins. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6305–6306.
22. Trost, B. M.; Toste, F. D.; Greenman, K.; Atom Economy. Palladium-Catalyzed Formation of Coumarins by Addition of Phenols and Alkynoates via a Net C–H Insertion. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4518–4526.
23. (a) Trost, B.M.; The atom economy--a search for synthetic efficiency. *Science*, **1991**, *254*, 1471–1477. (b) Trost, B.M.; Atom Economy-A Challenge for Organic Synthesis: Homogeneous Catalysis Leads the Way. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1995**, *34*, 259–281.
24. Mizoroki, T.; Mori, K.; Ozaki, A.; Arylation of Olefin with Aryl Iodide Catalyzed by Palladium. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1971**, *44*, 581.
25. Heck, R. F.; Nolley, Jr., J.P. Palladium-catalyzed vinylic hydrogen substitution reactions with aryl, benzyl, and styryl halides. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2320–2322.
26. Battistuzzi, G.; Cacchi, S.; De Salve, I.; Fabrizi, G.; Parisi, L.M.; Synthesis of Coumarins in a Molten *n*-Bu₄NOAc/*n*-Bu₄NBr Mixture through a Domino Heck Reaction/Cyclization Process. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 308–312.
27. Valizadeh, H.; Shockravi, A.; Task-Specific Ionic Liquid as Reagent and Reaction Medium for the One-Pot Horner–Wadsworth–Emmons–Type Reaction Under Microwave Irradiation. *Synth. Commun.* **2009**, *39*, 4341–4349.
28. Moskvina, V.S.; Khilya, V.P.; Aryl alkynoates in the radical synthesis of coumarins. *Chem. Heterocycl. Comp.*, **2019**, *55*, 300–306.
29. Zhu, F.; Wu, X.F.; Selectivity Controlled Palladium-Catalyzed Carbonylative Synthesis of Propiolates and Chromenones from Phenols and Alkynes. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 3422–3425.
30. Kojima, H.; Fujita, Y.; Takeuchi, R.; Ohashi, N.; Itoh, T.; Cyclization Reaction-Based Turn-

- on Probe for Covalent Labeling of Target Proteins. *Cell Chem. Biol.* **2020**, *27*, 334–349.
31. Cuzzocrea, S.; Pisanob, B.; Dugoa, L.; Ianarob, A.; Maffiab, P.; Patel, N. S.A.; Paola, R. D.; Ialenti, A.; Genovese, T.; Chatterjee, P.K.; Rosab, M.D.; Caputi, A.P.; Thiemermann, C.; Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ , reduces acute inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *483*, 79–93.
 32. パルモディア錠 医薬品インタビューフォーム 2020年1月改定 (第11版)
 33. Yki-Järvinen, H.; Thiazolidinediones, *N Engl J Med*, **2004**, *351*, 1106–1118.
 34. Ohashi, M.; Oyama, T.; Nakagome, I.; Satoh, M.; Nishio, Y.; Nobusada, H.; Hirono, S.; Morikawa, K.; Hashimoto, Y.; Miyachi, H.; Design, Synthesis, and Structural Analysis of Phenylpropanoic Acid-Type PPAR γ -Selective Agonists: Discovery of Reversed Stereochemistry-Activity Relationship. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 331–341.
 35. Ivanova, E. A.; Parolari, A.; Myasoedova, V.; Melnichenko, A. A.; Bobryshev, Y. V.; Orekhov, A. N.; Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma in cardiovascular disorders and cardiovascular surgery. *J. Cardiol.* **2015**, *66*, 271–278.
 36. Lee, W. S.; Kim, J.; Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and the Heart: Lessons from the Past and Future Directions. *PPAR Res.* **2015**, *2015*, 1–15.
 37. Sakamoto, J.; Kimura, H.; Moriyama, S.; Odaka, H.; Momose, Y.; Sugiyama, Y.; Sawada, H.; Activation of Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) Subtypes by Pioglitazone, *Biochem. Biophys.* **2000**, *278*, 704–711.
 38. Montanari, R.; Saccoccia, F.; Scotti, E.; Crestani, M.; Godio, C.; Gilardi, F.; Loiodice, F.; Fracchiolla, G.; Laghezza, A.; Tortorella, P.; Lavecchia, A.; Novellino, E.; Mazza, F.; Aschi, M.; Pochetti, G.; Crystal Structure of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) Ligand Binding Domain Complexed with a Novel Partial Agonist: A New Region of the Hydrophobic Pocket Could Be Exploited for Drug Design. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7768–7776.
 39. Gilardi, F.; Giudici, M.; Mitro, N.; Maschi, O.; Guerrini, U.; Rando, G.; Maggi, A.; Cermenati, G.; Laghezza, A.; Loiodice, F.; Pochetti, G.; Lavecchia, A.; Caruso, D.; Fabiani, E. D.; Bamberg, K.; Crestani, M.; LT175 Is a Novel PPAR/ Ligand with Potent Insulin-sensitizing Effects and Reduced Adipogenic Properties. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 6908–6920.
 40. Laghezza, A.; Pochetti, G.; Lavecchia, A.; Fracchiolla, G.; Faliti, S.; Piemontese, L.; Giovanni, Di C.; Iacobazzi, V.; Infantino, V.; Montanari, R.; Capelli, D.; Tortorella, P.; Loiodice, F.; New 2-(Aryloxy)-3-phenylpropanoic Acids as Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α/γ Dual Agonists Able To Upregulate Mitochondrial Carnitine Shuttle System Gene Expression. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 60–72.
 41. Laghezza, A.; Piemontese, L.; Cerchia, C.; Montanari, R.; Capelli, D.; Giudici, M.; Crestani, M.; Tortorella, P.; Peiretti, F.; Pochetti, G.; Lavecchia, A.; Loiodice, F.; Identification of the

- First PPAR α/γ Dual Agonist Able To Bind to Canonical and Alternative Sites of PPAR γ and To Inhibit Its Cdk5- Mediated Phosphorylation. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 8282–8298.
42. Henke, B. R.; Blanchard, S. G.; Brackeen, M. F.; Brown, K. K.; Cobb, J. E.; Collins, J. L.; Harrington, Jr., W. W.; Hashim, M. A.; Hull-Ryde, E. A.; Kaldor, I.; Kliewer, S. A.; Lake, D. H.; Leesnitzer, L. M.; Lehmann, J. M.; Lenhard, J. M.; Orband-Miller, L. A.; Miller, J. F.; Mook, Jr., R. A.; Noble, S. A.; Oliver, W.; Parks, D. J.; Plunket, K. D.; Szewczyk, J. R.; Willson, T. M.; N-(2-Benzoylphenyl)-L-tyrosine PPAR γ Agonists. 1. Discovery of a Novel Series of Potent Antihyperglycemic and Antihyperlipidemic Agents. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 5020–5036.
43. Gampe, Jr, R. T.; Montana, V. G.; Lambert, M. H.; Miller, A. B.; Bledsoe, R. K.; Milburn, M. V.; Kliewer, S. A.; Willson, T. M.; Xu, H. E.; Asymmetry in the PPAR γ /RXR α Crystal Structure Reveals the Molecular Basis of Heterodimerization among Nuclear Receptors. *Mol. Cell*, **2000**, *5*, 545–555.
44. Bénardeau, A.; Benz, J.; Binggeli, A.; Blum, D.; Boehringer, M.; Grether, U.; Hilpert, H.; Kuhn, B.; Märki, H. P.; Meyer, M.; Püntener, K.; Raab, S.; Ruf, A.; Schlatter, D.; Mohr, P.; Aleglitazar, a new, potent, and balanced dual PPAR α/γ agonist for the treatment of type II diabetes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *192*, 468–2473.
45. 井上 聡.; 核内受容体研究の最近の進歩, 日老医誌, 2000; 37: 265–270.
46. 加藤茂明『核内レセプターと情報伝達』 羊土社, 1994 年.
47. Chandra, V.; Huang, P.; Hamuro, Y.; Raghuram, S.; Wang, Y.; Burriss, T.P.; Rastinejad, F.; Structure of the intact PPAR- γ -RXR- α nuclear receptor complex on DNA. *Nature*, **2008**, *456*, 350–357.
48. Willson, T.M.; Brown, P.J.; Sternbach, D.D.; Henke, B.R.; The PPARs: From Orphan Receptors to Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 527–550.
49. Yang, C.; Li, Q.; Li, Y.; Targeting Nuclear Receptors with Marine Natural Products. *Mar. Drugs*, **2014**, *12*, 601–635.
50. Kersten, S.; Desvergne, B. A.; Wahli, W.; Roles of PPARs in health and disease. *Nature*, **2000**, *405*, 421–424.
51. Thermo Fisher Scientific 「レポーター遺伝子アッセイ」のホームページ
URL: <https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/reporter-gene-assays.html>
52. Jiang, C.; Ting, A. T.; Seed, B.; PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, **1998**, *391*, 82–86.
53. Mohri, T.; Nakajima, M.; Takagi, S.; Komagata, S.; Yoko, T.; MicroRNA regulates human vitamin D receptor. *Int. J. Cancer*, **2009**, *125*, 1328–1333.
54. Fan, M.; Rickert, E. L.; Chen, L.; Aftab, S. A.; Nephew, K. P.; Weatherman, R. V.;

- Characterization of molecular and structural determinants of selective estrogen receptor downregulators. *Breast Cancer Res Treat*, **2007**, *103*, 37–44.
55. コスモ・バイオ株式会社 「商品情報核内受容体レポーターアッセイキット」 のホームページ
URL: https://www.cosmobio.co.jp/product/detail/idg_20100305.asp?entry_id=5777
56. Promega 社 「Nuclear Receptor Analysis Luciferase Vectors」 の製品情報ホームページ
URL: <https://www.promega.jp/products/luciferase-assays/genetic-reporter-vectors-and-cell-lines/nuclear-receptor-analysis-luciferase-vectors/?catNum=E1360>
57. Feinstein, D.L.; Spagnolo, A.; Akar, C.; Weinberg, G.; Murphy, P.; Gavriilyuk, V.; Russo, C. D.; Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: Is mitochondrial function the key? *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *70*, 177–188.
58. Raucy, J. L.; Lasker, J. M.; Current In Vitro High Throughput Screening Approaches to Assess Nuclear Receptor Activation. *Curr. Drug Metab.* **2010**, *11*, 806–814.
59. Inglese, J.; Johnson, R. L.; Simeonov, A.; Xia, M.; Zheng, W.; Austin, C. P.; Auld, D. S.; High-throughput screening assays for the identification of chemical probes. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 466–479.
60. Leopoldo, M.; Lacivita, E.; Berardi, F.; Perrone, R.; Developments in fluorescent probes for receptor research. *Drug Discovery Today*, **2009**, *14*, 706–712.
61. DeGrazia, M. J.; Thompson, J.; Heuvelb, J. P. V.; Peterson, B. R.; Synthesis of a High-Affinity Fluorescent PPAR γ Ligand for High-Throughput Fluorescence Polarization Assays. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 4325–4332.
62. Seethala, R.; Golla, R.; Ma, Z.; Zhang, H.; O'Malley, K.; Lippy, J.; Cheng, L.; Mookhtiar, K.; Farrelly, D.; Zhang, L.; Hariharan, N.; Cheng, P.T.A.; A rapid, homogeneous, fluorescence polarization binding assay for peroxisome proliferator-activated receptors α and γ using a fluorescein-tagged dual PPAR α/γ activator. *Anal. Biochem.* **2007**, *363*, 263–274.
63. Bio vision 社 「PPAR γ Ligand Screening/Characterization Assay Kit (Fluorometric)」
ホームページ URL: <https://www.biovision.com/ppar-ligand-screening-characterization-assay-kitfluorometric.html>
64. Loving, G. S.; Sainlos, M.; Imperiali, B.; Monitoring protein interactions and dynamics with solvatochromic fluorophores. *Trends in Biotechnology*, **2010**, *28*, 73–83.
65. Reymond, J. L.; Substrate Arrays for Fluorescence-Based Enzyme Fingerprinting and High-Throughput Screening. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2008**, *1130*, 12–20.
66. Nomura, W.; Ohashi, N.; Okuda, Y.; Narumi, T.; Ikura, T.; Ito, N.; Tamamura, H.; Fluorescence-Quenching Screening of Protein Kinase C Ligands with an Environmentally Sensitive Fluorophore. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 923–930.

67. Yamada, S.; Takamura, Y.; Fujihara, M.; Kawasaki, M.; Ito, S.; Nakano, S.; Kakuta, H.; Fluorescence properties of retinoid X receptor antagonist NEt-SB. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, *31*, 127666.
68. Setsukinai, K.; Urano, Y.; Kikuchi, K.; Higuchi, T.; Nagano, T.; Fluorescence switching by O-dearylation of 7-aryloxy coumarins. Development of novel fluorescence probes to detect reactive oxygen species with high selectivity. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2000**, *2*, 2453–2457.
69. Long, L.; Li, X.; Zhang, D.; Meng, S.; Zhang, J., Sun, X.; Zhang, C.; Zhou, L.; Wang, L.; Amino-coumarin based fluorescence ratiometric sensors for acidic pH and their application for living cells imaging. *RSC Adv.*, **2013**, *3*, 12204–12209.
70. Mohler, D. L.; Shena, G.; The synthesis of tethered ligand dimers for PPAR γ -RXR protein heterodimers. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2082–2087.
71. Chittiboyina, A. G.; Venkatraman, M. S.; Mizuno, C. S.; Desai, P. V.; Patny, A.; Benson, S. C.; Ho, C. I.; Kurtz, T.W.; Pershadsingh, H. A.; Avery, M. A.; Design and Synthesis of the First Generation of Dithiolane Thiazolidinedione- and Phenylacetic Acid-Based PPAR γ Agonists. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4072–4084.
72. McPherson, C. G.; Caldwell, N.; Jamieson, C.; Simpson, I.; Watson, A. J. B.; Amidation of unactivated ester derivatives mediated by trifluoroethanol. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 3507–3518.
73. Hanada, S.; Ishida, T.; Motoyama, Y.; Nagashima, H.; The Ruthenium-Catalyzed Reduction and Reductive N-Alkylation of Secondary Amides with Hydrosilanes: Practical Synthesis of Secondary and Tertiary Amines by Judicious Choice of Hydrosilanes. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 7551–7559.
74. Du, F.; Zhou, Q.; Fu, Y.; Zhao, H.; Chen, Y.; Chen, G.; tert-Butyl(3-cyano-4,6-dimethylpyridin-2-yl)carbonate as a green and chemoselective N-tert-butoxycarbonylation reagent. *New J. Chem.* **2019**, *43*, 6549–6554.
75. Mathieu, G.; Patel, H.; Lebel, H.; Convenient Continuous Flow Synthesis of N-Methyl Secondary Amines from Alkyl Mesylates and Epoxides. *Org. Process Res. Dev.* **2020**, *24*, 2157–2168.
76. Piers, E.; Wong, T.; Coish, P. D.; Rogers, C.; A convenient procedure for the efficient preparation of alkyl (Z)-3-iodo-2-alkenoates. *Can. J. Chem.* **1994**, *72*, 1816–1819.
77. Cai, S.; Shen, Y.; Lu, P.; Wang, Y.; Condition-controlled selective synthesis of coumarins and flavones from 3-(2-hydroxyphenyl)propiolates and iodine. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 4164–4167.
78. Yamamoto, Y.; Kirai, N.; Synthesis of 4-Arylcoumarins via Cu-Catalyzed Hydroarylation with Arylboronic Acids. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5513–5516.
79. Enders, D.; Fronert, J.; Bisschops, T.; Boeck, F.; Asymmetric total synthesis of smyrindiol

- employing an organocatalytic aldol key step. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 1112–1117.
80. Lunazzi, L.; Mancinelli, M.; Mazzanti, A.; Pierini, M.; Stereomutation of Axially Chiral Aryl Coumarins. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 5927–5933.
 81. Punner, F.; Schieven, J.; Hilt, G.; Synthesis of Fluorenone and Anthraquinone Derivatives from Aryl- and Aroyl-Substituted Propiolates. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 4888–4891.
 82. Reed, M. W.; Moore, H. W.; Efficient Synthesis of Furochromone and Furocoumarin Natural Products (Khellin, Pimpinellin, Isophellopterin) by Thermal Rearrangement of 4-Furyl-4-hydroxycyclobutenones. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4166–4171.
 83. Vidadala, S. R.; Waldmann, H.; One-pot synthesis of a natural product inspired pyrrolocoumarine compound collection by means of an intramolecular 1,3-dipolar cycloaddition as key step. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 3358–3360.
 84. Egawa, D.; Itoh, T.; Akiyama, Y.; Saito, T.; Yamamoto, K.; 17-OxoDHA Is a PPAR α / γ Dual Covalent Modifier and Agonist. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 2447–2455.
 85. Shiraishi, T.; Kagechika, H.; Hirano, T.; 6-Arylcoumarins: versatile scaffolds for fluorescent sensors. *New J. Chem.*, **2015**, *39*, 8389–8396.
 86. Yamaguchi, J.; Sugiyama, S.; Conjugate addition of an ynone containing azulene with a tertiary amine. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 4514–4518.
 87. Raikar, U.S.; Renuka, C.G.; Nadaf, Y.F.; Mulimani, B.G.; Karguppikar, A.M.; Soudagar M.K.; Solvent effects on the absorption and fluorescence spectra of coumarins 6 and 7 molecules: Determination of ground and excited state dipole moment. *Spectrochim. Acta A*, **2006**, *65*, 673–677.
 88. Mayer, U.; Gutmann, V.; Gerger, W.; The Acceptor Number -- A Quantitative Empirical Parameter for the Electrophilic Properties of Solvents. *Monatsh. Chem.* **1975**, *106*, 1235–1257.
 89. 岡山大学大学院 博士論文 伴 慎太郎 「リガンド結合評価系確率を指向した蛍光性 PPAR リガンドに関する研究」
 90. Hulme, E. C.; Trevethick, M. A.; Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *161*, 1219–1237.
 91. Xu, H. E.; Lambert, M. H.; Montana, V. G.; Plunket, K. D.; Moore, L. B.; Collins, J. L.; Oplinger, J. A.; Kliewer, S. A.; Gampe, R. T. Jr.; McKee, D. D.; Moore, J. T.; Willson, T. M.; Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. *PNAS*, **2001**, *98*, 13919–13924.
 92. Capelli, D.; Cerchia, C.; Montanari, R.; Loiodice, F.; Tortorella, P.; Laghezza, A.; Cervoni, L.; Pochetti, G.; Lavecchia, A.; Structural basis for PPAR partial or full activation revealed by a novel ligand binding mode. *Sci. Rep.*, **2016**, *6*, 34792.
 93. Bruning, J. B.; Chalmers, M. J.; Prasad, S.; Busby, S. A.; Kamenecka, T. M.; He, Y.; Nettles, K. W.; Griffin, P. R.; Partial Agonists Activate PPAR γ Using a Helix 12 Independent

- Mechanism. *Structure*, **2007**, *15*, 1258–1271.
94. Gao, W.; Xu, L.; Gong, C.; Ding, Q.; Peng, Y.; An efficient route to 4-aryloxy coumarins via one-pot reactions of 4-hydroxy coumarins with hypervalent iodine reagents. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 4020–4023.
 95. Leslie, A. G. W.; Powell, H. R. Processing Diffraction Data with Mosflm. In *Evolving Methods for Macromolecular Crystallography*; Read, R. J., Sussman, J. L., Eds.; NATO Science Series II, Physics and Chemistry; Springer Netherlands: Dordrecht, **2007**, *245*, 41–51.
 96. Batty, T. G. G.; Kontogiannis, L.; Johnson, O.; Powell, H. R.; Leslie, A. G. W. iMOSFLM: A New Graphical Interface for Diffraction-Image Processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 271–281.
 97. Collaborative Computational Project, N. 4. The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **1994**, *50*, 760–763.
 98. McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J. Phaser Crystallographic Software. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 658–674.
 99. Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. Features and Development of Coot. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486–501.
 100. Murshudov, G. N.; Vagin, A. A.; Dodson, E. J. Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **1997**, *53*, 240–255.
 101. Pannu, N. S.; Murshudov, G. N.; Dodson, E. J.; Read, R. J. Incorporation of Prior Phase Information Strengthens Maximum-Likelihood Structure Refinement. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **1998**, *54*, 1285–1294.
 102. Winn, M. D.; Isupov, M. N.; Murshudov, G. N. Use of TLS Parameters to Model Anisotropic Displacements in Macromolecular Refinement. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2001**, *57*, 122–133.
 103. Steiner, R.; Lebedev, A. A.; Murshudov, G. N. Fisher's Information in Maximum-Likelihood Macromolecular Crystallographic Refinement. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2003**, *59*, 2114–2124.
 104. Murshudov, G. N.; Skubák, P.; Lebedev, A. A.; Pannu, N. S.; Steiner, R. A.; Nicholls, R. A.; Winn, M. D.; Long, F.; Vagin, A. A. REFMAC 5 for the Refinement of Macromolecular Crystal Structures. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 355–367.

本論文内容の誌上発表

Yoshikawa, C.; Ishida, H.; Itoh, T.; Incorporation of a coumarin unit by nucleophilic addition reaction into a PPAR γ ligand. *Tetrahedron Letters*, **2020**, *61*, 151842.

(査読あり)

Yoshikawa, C.; Ishida, H.; Ohashi, N.; Kojima, H.; Itoh, T.;
Construction of 7-diethylaminocoumarins promoted by an electron-withdrawing group. *Chem. Pharm. Bull.* **2021**, *Accepted.*; <https://doi.org/10.1248/cpb.c21-00228> (査読あり)

Yoshikawa, C.; Ishida, H.; Ohashi, N.; Itoh, T.; Synthesis of a Coumarin-Based PPAR γ
Fluorescence Probe for Competitive Binding Assay. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4034;
<https://doi.org/10.3390/ijms22084034> (査読あり)