

PPAR γ アゴニストへのクマリン骨格導入法の開発

医薬分子化学研究室 吉川 智理

緒言

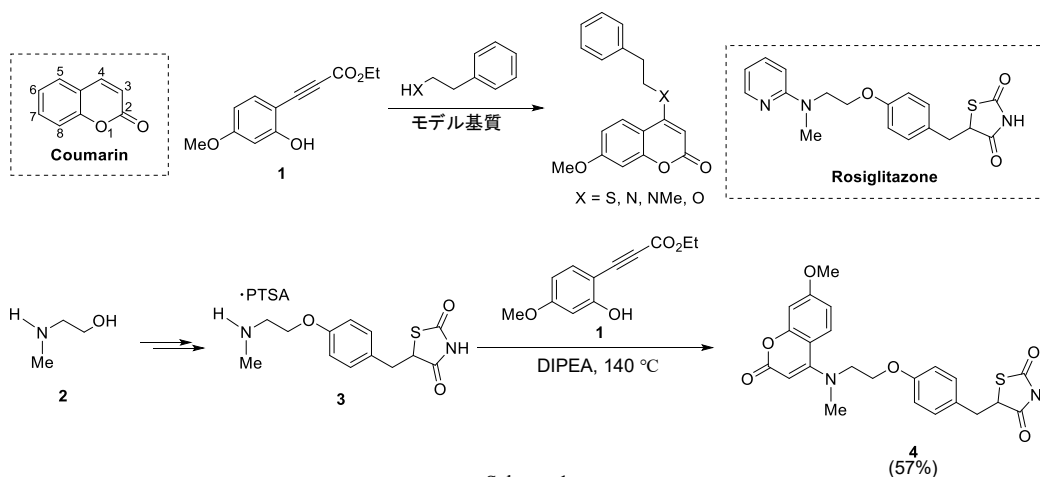
蛍光現象は、核酸・タンパク質検出や細胞染色、タンパクとの親和性評価など幅広い研究分野で使用されている。これまで数多くの蛍光団が報告されているが、クマリンは分子が小さいため、標識による化合物の性質や標的タンパク質への影響が少ないと考えられる。多くのクマリン合成の報告があるが、小島らは、以前ビタミン D 受容体 (VDR) のアミノ酸残基がクマリン前駆体に求核付加反応をすることで、VDR 上でクマリンを構築する Turn-On 型蛍光プローブ報告した。本反応は、タンパク質へのリガンドの親和力を利用した近接効果を駆動力としたものであった。本研究では、先行研究で報告したクマリン前駆体の反応特性に着目し、低分子化合物の効率的なクマリン標識法の開発を行った。クマリン標識する化合物はペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR γ) アゴニストであるロシグリタゾンモデル化合物とし、クマリン環を導入した化合物が結合評価に応用できるか検討した。

結果・考察

1. リガンドへのメトキシクマリン環の導入

既知のメトキシクマリン前駆体 **1** に、求核種を含むモデル基質との付加反応を行い、クマリン構築条件の検討を行った。効率的な条件を見出した後、PPAR γ アゴニストのロシグリタゾンへクマリン環の導入を試みた。既知の合成方法により、**2** からロシグリタゾン合成中間体 **3** を得た後、メトキシクマリン前駆体 **1** を反応させ、メトキシクマリン型ロシグリタゾン **4** を得た。得られた **4** はロシグリタゾンの生物

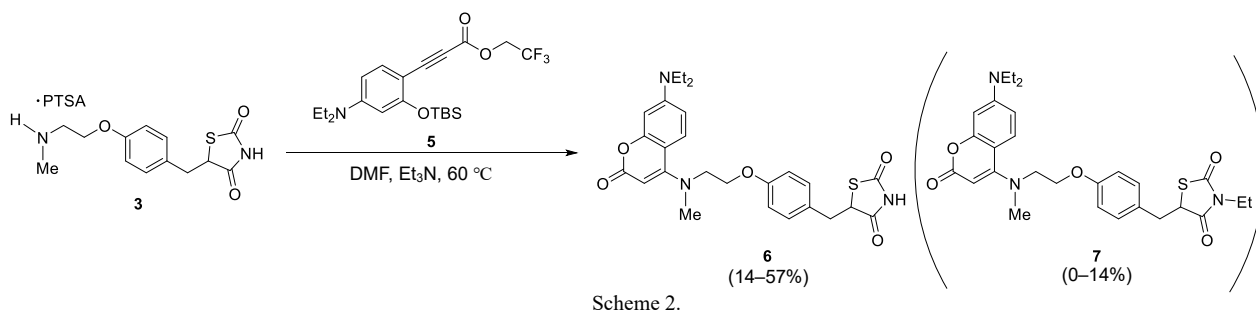
活性を維持しており、所期の目的を達成した。しかし蛍光強度は弱かったため、蛍光強度に優れたジエチルアミノクマリンを導入することに



2. ジエチルアミノクマリン型ロシグリタゾンの合成

既知のジエチルアミノクマリン前駆体ではモデル基質の求核付加反応が起こらなかった。ジエチルアミノ基の電子供与性に問題があると考え、クマリン前駆体のエチルエステル部をトリフルオロエチルエステルに変更した **5** を用いて反応を行ったところ、ジエチルアミノクマリンを構築することができた。そして前駆体 **5** を用いてロシグリタゾンにジエチルアミノクマリンを導入した **6** を得ることに成功した。

また **6** のイミドがエチル化された **7** が副生成物として得られた。合成した **6** の遺伝子転写活性は期待したとおり、ロシグリタゾンと同程度のアゴニストであった。副生成物 **7** は PPAR のパーシャルアゴニストであった。また **6** と **7** は、メトキシクマリン体 **4** よりも強い蛍光を有しているため、リガンドの結合親和性の評価を行うこととした。



3. 合成したクマリン導入リガンドを用いた結合評価系への応用

合成した **6** または **7** を用いて、既知の PPAR γ アゴニストの結合親和性を評価した。その結果、**6** または **7** による実験にて算出した各アゴニストの PPAR γ へ結合性は、報告されているものと矛盾のない結果となった。**6** と **7** は PPAR γ リガンドの結合評価に適用できることが示された。

4. 化合物 **6** と PPAR γ 複合体の X 線結晶構造解析

合成したクマリン型ロシグリタゾン **4** および **6**、**7** の結合様式解明のため、X 線結晶構造解析を試みた。化合物 **6**/PPAR γ -LBD 複合体においては良質な結晶が得られ、回析実験と構造解析に成功した。その結果、**6** はロシグリタゾンと同じ結合様式であることが明らかになった (Figure 1)。また得られた **6** の結晶構造に **7** を重ね合わせたところ、**7** のパーシャルアゴニストメカニズムは、既知の PPAR γ パーシャルアゴニストとは異なるアクティブ型のメカニズムであることが推測された。

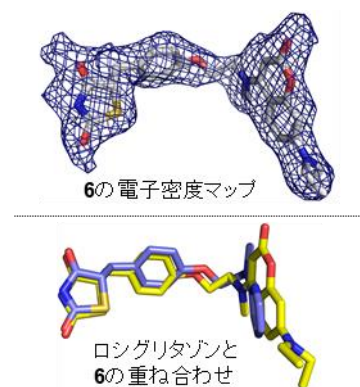


Figure 1.

結論

PPAR γ アゴニストのロシグリタゾンにメトキシクマリン環とジエチルアミノクマリン環を導入した **4** および **6** を合成した。導入したクマリン骨格は PPAR γ のアゴニスト活性に与える影響が小さいことが明らかになった。得られたジエチルアミノ体 **6** とエチル化された副生成物 **7** が PPAR γ 結合性評価に適用できる可能性を示した。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ため、本法は PPAR γ 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、本法で得た化合物は評価系に利用できるため、本研究は核内受容体リガンドの探索研究に貢献するものと考えている。

本研究の誌上発表

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