

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15138

研究課題名(和文) 化学的翻訳後修飾を指向した非古典的な核内受容体制御法の開発

研究課題名(英文) Development of novel nuclear receptor modulators based on the chemical posttranslational modifications

研究代表者

藤井 晋也 (Fujii, Shinya)

東京大学・分子細胞生物学研究所・講師

研究者番号：60389179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：核内受容体型転写因子は医薬開発の重要な標的であるが、古典的なリガンドでは制御できない種々の生理機能が報告されている。本研究では、低分子化合物による核内受容体の新たな制御法開発を目的として、古典的リガンドとは異なる新規作用メカニズムを有する制御化合物の創製を行った。具体的標的としてアンドロゲン受容体(AR)を設定し、化学的翻訳後修飾を意図したARコバレントモディファイアの創製を行った。ARのN末端ドメイン(NTD)に結合すると報告されているジフェニルメタン誘導体について周辺化合物の構造展開を行い、AR-NTDの転写活性を促進あるいは抑制する化合物の創製に成功した。

研究成果の概要(英文)：Nuclear receptors, ligand-dependent transcription factors, are promising targets of drug discovery. Recent studies have revealed various physiological functions of nuclear receptors which are not able to be modulated by the conventional ligands. In this study, development of new type of nuclear receptor modulators bearing novel mechanism of action have been investigated. Focusing on the diphenylmethane derivative which was reported to bind the N-terminal domain of nuclear androgen receptor covalently, structural development studies were investigated. As a result, compounds exerting transcription inducing or repressing activity were obtained.

研究分野：創薬化学

キーワード：転写因子 核内受容体 アンドロゲン受容体 化学的翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

核内受容体は、リガンド依存的に標的遺伝子の転写を制御する誘導性転写因子であり、発生や分化、エネルギー代謝など生物の根源的な活動を制御しているため医薬開発の重要な標的である。核内受容体の機能は、通常、そのC末端側に存在するリガンド結合ドメイン(LBD)への特異的リガンドの結合により制御されるため、これまでに様々な機能を有するリガンド化合物の創製が行われてきた。しかしながら、LBDの変異体やリガンド結合能を失ったC末側欠損の核内受容体が種々の生理機能を示したり、あるいは疾患の原因となり得ることが示されるなど、古典的リガンドのみでは制御できない機能も明らかになっている。特に、アンドロゲン受容体(AR)をはじめとするステロイドホルモン受容体では、N末端ドメイン(NTD)のリガンド非依存的な転写活性の重要性が注目されつつある。そのため、LBDへのリガンド結合に依存しない核内受容体モジュレーターの創製は、核内受容体による転写制御の統合的制御法の開発、および新規メカニズムによる医薬品の創製につながると考えられる。2010年に初めて、ARのNTDに結合し、その転写活性を抑制するジフェニルメタン誘導体(図1:1)が報告された[文献1]。ARは男性ホルモンであるジヒドロテストステロンなどのアンドロゲンの受容体であるが、前立腺癌の発症および進行と強く関わっていることから、医薬標的として非常に重要な核内受容体である。化合物1は、新規作用メカニズムを有するARモジュレーター創製のリード化合物として期待されるが、その構造活性相関についてはほとんど明らかにされていなかった。

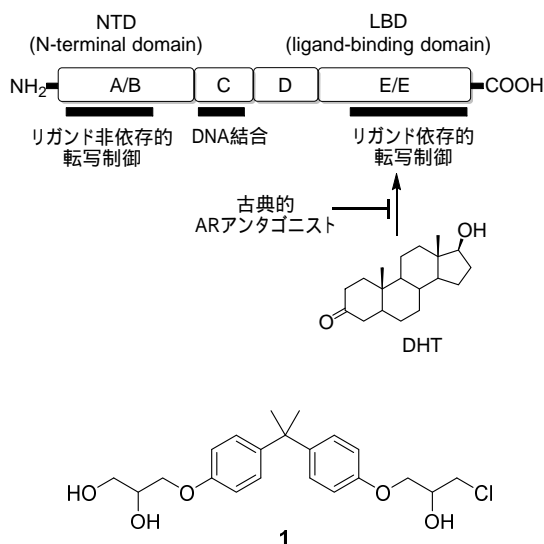


図1.(上)ARのドメイン構造と機能。(下)化合物1。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ARに対して、従来の標的部であるLBDには非依存的に、その転写活性を制御する化合物を創製することである。先行研究により、化合物1はARのNTDにコバレントに結合し活性を示すことが示唆されている。1は、新規メカニズムのARモジュレーターのリード化合物として有益であるのみでなく、コバレントに結合し得ることから、人工的な翻訳後修飾法を開発する際の足掛かりの化合物としても非常に有望であると考えられた。またその結合様式や構造活性相関の解明は、ARを初めとする核内受容体全般に対する新規制御法開発に重要な知見を与えると考えられた。そのため本研究においては、下記の4つの課題について検討した。

- (1) 評価系の構築と予備的な構造活性相関の取得
- (2) 構造展開 コバレント結合形成部位の構造活性相関
- (3) 構造展開 多様な受容体機能制御を意図した構造活性相関の検討
- (4) 化合物の受容体に対する結合位置の同定と作用メカニズムの解明

3. 研究の方法

- (1) 評価系の構築と予備的な構造活性相関の取得

AR-NTDとGAL4Nを融合したタンパク質を作成し、MH100-ルシフェラーゼを用いてAR-NTD転写活性に対するレポーター遺伝子アッセイ系を構築した。また、本評価系を用いて化合物1およびその周辺誘導体について予備的な活性評価を行い、構造活性相関を取得した。

- (2) 構造展開 コバレント結合形成部位の構造活性相関

化合物1は、求電子反応置換基であるクロロヒドリンを有し、本部位で標的であるAR-NTDとコバレントに結合していることが示唆されている。標的タンパク質にコバレントに結合する化合物(コバレントモディファイア)においては、コバレント結合形成部位の化学的反応性と安定性のバランスが活性や選択性を支配されると考えられる。そのため、本化合物群における求電子性官能基の必要性の検討と、マイケルアクセプター、ハロアルカン、ハロアセチル基など種々の求電子性官能基へ変換し、構造活性相関および最適化を検討した。

- (3) 構造展開 多様な受容体機能制御を意図した構造活性相関の検討

上記(2)で最適化したコバレント結合形成部位を用い、化合物の骨格構造の変換や種々の極性あるいは疎水性部分構造の導入を検討した。標的タンパク質に結合したコバレントモディファイアは、タンパク質の構造や機能を様々に修飾し得る。活性の向上のみでなく、AR-NTD転写活性の促進あるいは抑

制を自在に制御し得る化合物の創製を目指した。

(4) 化合物の受容体に対する結合位置の同定と作用メカニズムの解明

化合物1はAR-NTDにコバレントに結合することが示唆されているが、その詳細な結合部位は明らかではない。また、AR以外に結合する可能性についてもあまり検討されていない。そこで、上記(3)までにおいて創製した活性化合物をプローブ化し、標的との結合について知見を得ることを目指した。

#### 4. 研究成果

(1) 評価系の構築と予備的な構造活性相関の取得

AR-NTD-GAL4N および MH100-ルシフェラーゼを HEK293 細胞にトランスフェクションし、化合物の活性を評価した。その結果、コントロール化合物において文献1の報告とは異なる応答が見られた。この差異の原因については現時点では明確ではない。また、化合物1の周辺誘導体について活性評価を行ったところ、1は本評価系ではAR-NTDの転写活性に影響を与えなかった。その一方で、プロパンジオール部位を変換した誘導体がAT-NTD転写促進活性を有することを見いだした。

(2) 構造展開 コバレント結合形成部位の構造活性相関

上記(1)で見いだした転写促進活性を基準として、化合物のコバレント結合形成部位に関する構造活性相関を検討した。クロロヒドリン誘導体やエポキシ誘導体において転写促進活性が認められたのに対し、アクリルアミドやハロケトンでは活性が認められず、また一部の誘導体で細胞毒性が見られた。求電子性を有さない化合物も活性を示さず、本部位の化学的反応性と安定性のバランスが重要であることが示された。種々の誘導体の活性評価から、コバレント結合形成部位としては、クロロヒドリンが最適であると判断した。

(3) 構造展開 多様な受容体機能制御を意図した構造活性相関の検討

(2)の結果からコバレント結合形成部位をクロロヒドリンとし、まず骨格構造の変換を検討した。種々のジフェニルX構造について構造活性相関を検討した結果、ジフェニルエーテル誘導体が高いAR-NTD転写促進活性を示すことを見いだした。次にベンゼン環上の置換基について検討した結果、アルキル鎖の長さ依存して転写促進活性が変化することを見いだした。また、転写促進活性だけでなく、本研究で作成した評価系で転写抑制活性を示す化合物を見いだした。

(4) 化合物の受容体に対する結合位置の同定と作用メカニズムの解明

(3)の構造展開において、アルキル鎖としてプロパルギル基を有する化合物が高い活性を保持していたことから、当化合物をア

ルキンタゲ化プローブとして用い、標的タンパク質との共有結合に関する知見を得るための検討を行った。AR-NTDをトランスフェクションしたHEK293細胞を用いてアルキンタゲ化プローブと結合するタンパク質を探索したが、現時点でARとの特異的な結合は見出されていない。

上記(1)~(4)の結果により、本研究の最大の目的であるARの転写活性をLBDに非依存的に制御する化合物の創製および構造活性相関の取得に成功した。特に、(2)および(3)で得られた化合物および構造活性相関の知見は、画期的なARモジュレーター創製に大きく貢献すると考えている。その結合様式や作用メカニズムについては未だ不明な点を残しているためさらなる検討が必要であるが、本研究はARをはじめとする核内受容体型転写因子の新たな制御法開発に一つの可能性を示したと考えている。

<引用文献>

Andersen, R. J. et al. *Cancer Cell* **2010**, *17*, 535-546.

5. 主な発表論文等  
(研究代表者は下線)

[雑誌論文](計11件)

Yoshioka, H.; Yamada, A.; Nishiyama, Y.; Kagechika, H.; Hashimoto, Y.; Fujii, S. Development of nonsteroidal glucocorticoid receptor modulators based on N-benzyl-N-(4-phenoxyphenyl) benzenesulfonamide scaffold. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25* (13), 3461-3470. 査読有  
DOI: 10.1016/j.bmc.2017.04.032.

Kaitoh, K.; Toyama, H.; Hashimoto, Y.; Fujii, S. Design and synthesis of 1,3,5-triazine derivatives as novel inverse agonists of nuclear retinoic acid receptor-related orphan receptor- (ROR ). *Heterocycles* **2017**, *95* (1), 547-556. 査読有  
DOI: 10.3987/COM-16-S(S)16

Yamada, A.; Kazui, Y.; Yoshioka, H.; Tanatani, A.; Mori, S.; Kagechika, H.; Fujii, S. Development of N-(4-phenoxyphenyl)benzenesulfonamide derivatives as novel nonsteroidal progesterone receptor antagonists. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7* (12), 1028-1033. 査読有  
DOI: 10.1021/acsmchemlett.6b00184

Fujii, S.

Expanding the chemical space of hydrophobic pharmacophores: Role of hydrophobic substructures in the development of novel transcription modulators.

*Med. Chem. Commun.* **2016**, 7 (6), 1082-1092.  
査読有

DOI: 10.1039/C6MD00012F

Toyama, H.; Sato, S.; Shirakawa, H.; Komai, M.; Hashimoto, Y.; Fujii, S.

Altered activity profile of a tertiary silanol analog of multi-targeting nuclear receptor modulator T0901317

*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26 (7), 1817-1820. 査読有

DOI:10.1016/j.bmcl.2016.02.231.

〔学会発表〕(計23件)

ビスフェノール構造を基盤としたケイ素官能基の構造物性および構造活性相関：松本雄一朗、橋本祐一、藤井晋也：日本薬学会第138年会(2018年)

レチノイド標的遺伝子のゲノムワイドな探索を指向した低分子プローブの創製研究：藤井晋也，森修一，影近弘之，Marco Antonio Mendoza Parra, Hinrich Gronemeyer：日本レチノイド研究会第28回学術集会(2017年)

新規アンドロゲン受容体 AF-1 モジュレーター の構造展開：沼館慧剛、梅田香織、榎島誠、橋本祐一、藤井晋也：日本レチノイド研究会第27回学術集会(2016年)

ベンゼンスルホンアミドを基盤骨格とした非ステロイド型 GR リガンドの創製：吉岡広大、西山郵子、山田歩、影近弘之、橋本祐一、藤井晋也：日本レチノイド研究会第27回学術集会(2016年)

ベンゼンスルホンアミドを基盤とした新規 GR リガンドの創製：吉岡広大、西山郵子、山田歩、影近弘之、橋本祐一、藤井晋也：第60回日本薬学会関東支部大会(2016年)

アンドロゲン受容体 AF-1 モジュレーター の構造展開：沼館慧剛、谷内出友美、梅田香織、榎島誠、橋本祐一、藤井晋也：日本ケミカルバイオロジー学会第11回年会(2016年)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/chem/IMCB-8ken-HP/Index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤井 晋也 (FUJII, Shinya)

東京大学・分子細胞生物学研究所・講師

研究者番号：60389179

### (2) 研究協力者

〔その他の研究協力者〕

沼館 慧剛 (NUMADATE, Akiyoshi)