

氏名 (生年月日)	りゅう 笠	か 香	おり 織 (1991年4月14日)
学位の種類	博士 (薬学)		
学位記番号	博薬 第207号		
学位授与の日付	2021年3月20日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	アブラナ科植物の多段階酵素反応に基づくエナンチオ選択的 spirobrassinin 類およびその関連化合物の合成研究		
論文審査委員	(主査)	教授	松田 久司
	(副査)	教授	山下 正行
	(副査)	教授	武上 茂彦

論文内容の要旨

序章

アブラナ科植物は、紫外線 (UV) や微生物等のストレスに応答し、二次代謝産物であるファイトアレキシンを産生する。スピロオキシインドール骨格を有する spirobrassinin (**1**) は、1987年に初めて単離されたファイトアレキシンである (Fig. 1)。その絶対立体構造は **1** の誘導体の X 線結晶構造解析により *S* 体であると決定され、エナンチオマー過剰率は 83–98% *ee* であることが報告されている。スピロオキシインドール骨格を持つ化合物は近年その顕著な生物活性から医薬品シーズとして注目されており、**1** はヒト急性 T 細胞性白血病細胞由来 Jurkat 細胞の増殖抑制作用や多発性硬化症に対する作用が報告されている。また、これまでに **1** の不斉合成を含めた全合成が試みられてきた。例えば、Zhu らは 2017 年にスピロオキシインドールの不斉合成を報告した。しかしながら、これらの反応は 6 ステップ以上の工程を要し、多数の有機試薬を必要とする。一方、**1** の生合成経路についていくつかの研究が報告されている。1991年に門出らによって **1** が tryptophan から生合成されることが報告され、その後、**1** の生合成には少なくとも 10 以上の酵素が関与していることが明らかにされた。特に、Klein らによって 2015 年にその生合成経路に関与する酵素 CYP71CR1 が発見された。この酵素は brassinin (**3**) から **1** の前駆体である spirobrassinol の生成を触媒することが提案され、UV のようなストレスにより発現することが予測された。著者は、これらの生合成過程から発想を得て、CYP71CR1 を含むファイトアレキシン合成酵素を利用することで spirobrassinin 類を簡便に立体選択的に合成できるのではないかと考えた。本研究では、多段階酵素反応を利用した spirobrassinin 類および類縁体の合成を行った。

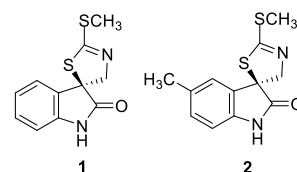


Fig. 1 Chemical structures of (S)-(-)-spirobrassinin (**1**) and **2**.

第 1 章: カブ (*Brassica rapa* var. *rapa*) の酵素群を利用した spirobrassinin 類の不斉合成

Spirobrassinin (**1**) は tryptophan を出発原料として多段階を経て生合成される。このうち、brassinin (**3**) から **1** への環化反応は CYP71CR1 の関与によって進行することが明らかとなっている (Fig. 2)。そこで、CYP71CR1 などのファイトアレキシン合成酵素を利用した天然型および半天然型スピロオキシインドールの立体選択的合成を目的とし、次の 3 つの計画を立案した。まず、[Step I] スピロオキシイ

ンドール **1** の単離と生成に最適な条件の検討、次に、**[Step II]** 酵素発現したカブへの **3** および誘導体の添加による、**1** および半天然型スピロオキシインドール 5-methylspirobrassinin (**2**) の合成、最後に、**[Step III]** 酵素発現したカブへの L-tryptophan および 5-methyl-DL-tryptophan の添加による **1** および **2** の合成とした (Fig. 3)。はじめに、種々の条件検討により、カブ (*B. rapa* var. *rapa*) に傷害を与え UV 照射 (254 nm、60 min) を行う条件が **1** の生成に適していることを見出し、**1** を単離した **[Step I]**。次に、Step I の条件により酵素を発現させたカブに、合成した環化前駆体 brassinin (**3**) およびその誘導体を添加した。その結果、環化反応が進行し、**3** から (S)-(-)-spirobrassinin (**1**) が得られ、5-methylbrassinin から (S)-(-)-5-methylspirobrassinin (**2**) が得られた **[Step II]** (Fig. 4)。さらに、種々の検討から環化反応への CYP71CR1 以外の酵素の関与が示唆された。最後に、ファイトアレキシン合成酵素を発現させたカブに L-tryptophan および 5-methyl-DL-tryptophan を添加した。その結果、多段階の酵素反応を経て、L-tryptophan から (S)-(-)-spirobrassinin (**1**) が 90–97% ee で得られ、5-methyl-DL-tryptophan から (S)-(-)-5-methylspirobrassinin (**2**) が 81% ee (収率: 0.2%) で得られた **[Step III]** (Fig. 4)。以上、カブの生合成経路を利用し、アミノ酸からワンポットで立体選択的に spirobrassinin 類を得ることに成功した。

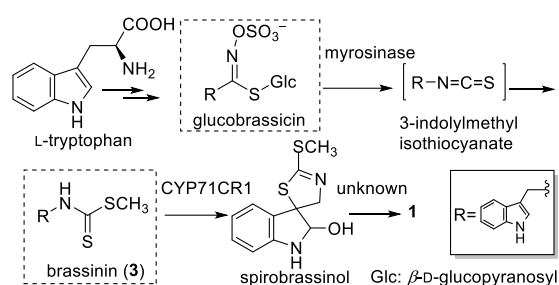


Fig. 2 Biosynthesis of spirobrassinin (**1**).

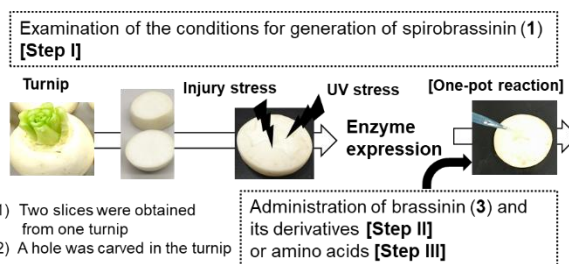


Fig. 3 Strategy for the construction of spirobrassinin (**1**) and its derivatives.

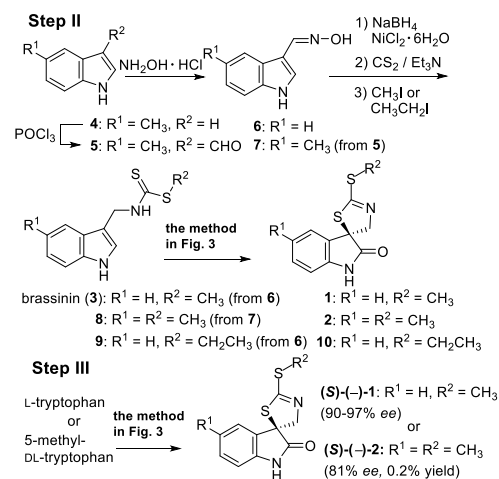


Fig. 4 Enantioselective synthesis of spirobrassinin (**1**) and its derivatives.

第 2 章: 不安定中間体 isothiocyanate を介した含窒素化合物の合成

アブラナ科植物に特徴的な成分である isothiocyanate は、植物内では glucosinolate として存在し、酵素ミロシナーゼと反応することで生成する。Isothiocyanate の中でも 3-indolylmethyl isothiocyanate は特に不安定であることが知られている。今回、その反応性の高さを利用して化合物を得ることを試みた。アブラナ科ホソバタイセイ (*Isatis tinctoria*) より glucosinolate である neoglucobrassicin (**11**) を単離し、**11** をミロシナーゼにより分解し、生成した isothiocyanate に種々の複素環化合物を加えることで新規含窒素化合物 **12–16** を得、isothiocyanate への求核反応が進行することを確認した (Fig. 5)。

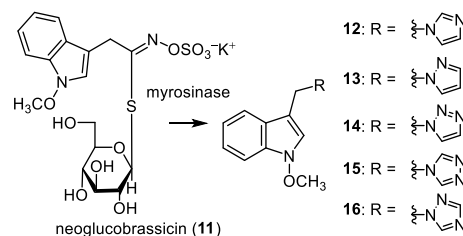


Fig. 5 Chemical structures of new nitrogen-containing compounds **12–16**.

総括

本研究では、アブラナ科植物カブの酵素群を利用し、低収率ではあるが、tryptophan およびその誘導体からワンポットで天然型、半天然型 spirobrassinin 類を得た。さらに、得られた化合物のエナンチオマー過剰率を明らかにし、立体選択的に反応が進行することを見出した。本反応は、スピロオキシインドールの構築方法として有用であると考えられる。また、不安定な isothiocyanate を介して簡便に新規含窒素化合物を得ることができた。これらの反応はいずれも新しい含硫黄・含窒素医薬品の開発の一助となることが期待される。

審査の結果の要旨

《緒言》

アブラナ科植物は、ストレスに応答し二次代謝産物であるファイトアレキシンを産生することが知られている。ファイトアレキシンのひとつである spirobrassinin はスピロオキシインドール骨格を有する化合物であり、白血病細胞増殖抑制作用や多発性硬化症に対する作用が報告されている。Spirobrassinin について、これまでに不斉合成を含めた全合成が試みられてきたが、これらの反応は多段階の工程を要し多数の有機試薬を必要とする。一方、spirobrassinin は tryptophan を出発原料として多段階を経て生合成され、環化前駆体から spirobrassinin への環化反応は CYP71CR1 の関与によって進行することが明らかとなっている。申請者は、これらの生合成過程から発想を得て、CYP71CR1 を含むファイトアレキシン合成酵素を利用することで spirobrassinin 類を簡便に立体選択的に合成できるのではないかと考え、多段階酵素反応を利用した spirobrassinin 類および類縁体の合成を行った。

《審査結果の要旨》

1. カブ (*Brassica rapa* var. *rapa*) の酵素群を利用した spirobrassinin 類の不斉合成

はじめに、カブ (*B. rapa* var. *rapa*) が spirobrassinin を生成する最適な条件を決定し単離を行った。次に、ファイトアレキシン合成酵素を発現させたカブに合成した環化前駆体およびその誘導体を添加し、天然型スピロオキシインドール spirobrassinin および半天然型スピロオキシインドール (S)-(-)-5-methylspirobrassinin を得た。さらに、ファイトアレキシン合成酵素を発現させたカブに L-tryptophan および 5-methyl-DL-tryptophan を添加し、L-tryptophan から (S)-(-)-spirobrassinin を、5-methyl-DL-tryptophan から (S)-(-)-5-methylspirobrassinin を得た。また、そのエナンチオマー過剰率を明らかにし立体選択的に反応が進行することを見出した。

2. 不安定中間体 isothiocyanate を介した含窒素化合物の合成

アブラナ科植物に特徴的な成分である isothiocyanate は、植物内では glucosinolate として存在し酵素ミロシナーゼと反応することで生成する。Isothiocyanate の中でも 3-indolylmethyl isothiocyanate は特に不安定であることが知られている。申請者は、その反応性の高さを利用して化合物を得ることを試みた。すなわち、アブラナ科ホソバタイセイ (*Isatis tinctoria*) より glucosinolate を単離しミロシナーゼにより分解し、生成した isothiocyanate に種々の複素環化合物を加えることで 5 種の新規含窒素化合物を得、isothiocyanate への求核反応が進行することを確認した。

《結論》

以上、申請者はアブラナ科植物カブの酵素群を利用し、低収率ではあるがアミノ酸からワンポットで立体選択的に天然型、半天然型 *spirobrassinin* 類を得た。本反応はスピロオキシンドールの構築方法として有用であると考えられる。また、不安定な *isothiocyanate* を介し簡便に新規含窒素化合物を得た。これらの反応はいずれも新しい含硫黄・含窒素医薬品の開発の一助となることが期待される。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。