

2020 年度 課程博士学位論文

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

【薬学】生薬学分野

笠 香織

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。なお、図の転載については出版社より許可を得ている。

- 1) Kaori Ryu, Seikou Nakamura, Souichi Nakashima, Hisashi Matsuda. One-pot enantioselective synthesis of (*S*)-spirobrassinin and non-natural (*S*)-methylspirobrassinin from amino acids using a turnip enzyme. *J. Nat. Med.* **2021**, 75, in press.
DOI: 10.1007/s11418-020-01468-9 [第 1 章]

- 2) Kaori Ryu, Seikou Nakamura, Koya Miyagawa, Souichi Nakashima, Hisashi Matsuda. Synthesis of 1-methoxy-1*H*-indoles with a heterocyclic moiety via unstable indole isothiocyanate by using enzyme from *Brassicaceae* plant. *Heterocycles* **2021**, 103, in press.
DOI: 10.3987/COM-20-S(K)28 [第 2 章]

目次

序論.....	1
本論.....	5
第一章 カブ (<i>Brassica rapa</i> var. <i>rapa</i>) の酵素群を利用した spirobrassinin 類の不斉合成...5	
第一節 Spirobrassinin の単離と生成条件の検討.....	5
第二節 Brassinin および誘導体から spirobrassinin 類の合成.....	8
第三節 L-Tryptophan および誘導体から spirobrassinin 類の合成.....	14
小括.....	19
第二章 不安定中間体 isothiocyanate を介した含窒素化合物の合成.....	20
小括.....	27
結論.....	28
謝辞.....	29
実験の部.....	30
引用文献.....	82

序論

人類にとって抗ウイルス薬の開発は喫緊の課題である。ウイルス薬の開発においては薬剤耐性の出現が問題の一つとして挙げられており、従来と異なる作用機序や骨格を有する医薬品シーズの開発が求められている。そのような中で、近年、スピロオキシインドール骨格を持つ化合物群が有用な構造として注目されている。¹

スピロオキシインドールは天然物に広くみられる骨格であり、スピロリングを有することから次のような特徴を持つ。まず、コンフォメーションが固定されていることから、リガンド-タンパク質結合に望ましいコンフォメーションを保持することができる。このことは、標的分子に対して高い親和性を持つことを意味している。さらに、sp³ 混成炭素を持つことにより分子の複雑さが増すことで、P450 阻害を減らし、バイオアベイラビリティと代謝安定性を向上させる可能性がある。¹⁻⁴ 以上のように、スピロオキシインドールは医薬品シーズとして有望な骨格であると考えられる。

代表的なスピロオキシインドールとしては、抗マラリア活性をもつ NITD609 (**1**)⁵ やバソプレシン-2-受容体拮抗作用をもつ satavaptan (**2**)^{6,7} などの医薬品候補化合物が知られている。

抗ウイルス作用に関しては、HIV プロテアーゼ阻害剤 **3a** ($K_i = 3$ nM), **3b** ($K_i = 3$ nM) [3 位のエピマー化合物として得られた]⁸ や非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 SIP-1 (**4**) (IC_{50} : 0.5 μ M)⁹ などが代表的な例として挙げられる。また、2015 年に Zou らは spiropyrazolopyridone (**5**) が強い抗 DENV (デング熱ウイルス) 活性を示し、そのラセミ体のキラル分割により、*R* 体の活性が *S* 体よりも 100 倍近く強力であることを報告した (EC_{50} : *R* 体; 12 nM, *S* 体; 2710 nM)¹⁰。一方、Chen らはアブラナ科植物 *Isatis indigotica* から単離された **6a** と **6b** が抗 HSV (単純ヘルペスウイルス) 活性を示し、**6a** は抗インフルエンザ作用も有することを明らかにした。¹¹ 以上のように、スピロオキシインドールは抗ウイルス薬のシーズとして有用であると考えられる。加えて、**5** や **6** に示されるように立体構造の違いによって活性に違いがみられることがあり、その立体構造が活性に大きく影響を与えていると考えられている (Fig. 1)。

以上の背景から、スピロオキシインドールの簡便かつ立体選択的な合成手法の開発が抗ウイルス薬開発の一助となるのではないかと考え、本研究に着手した。

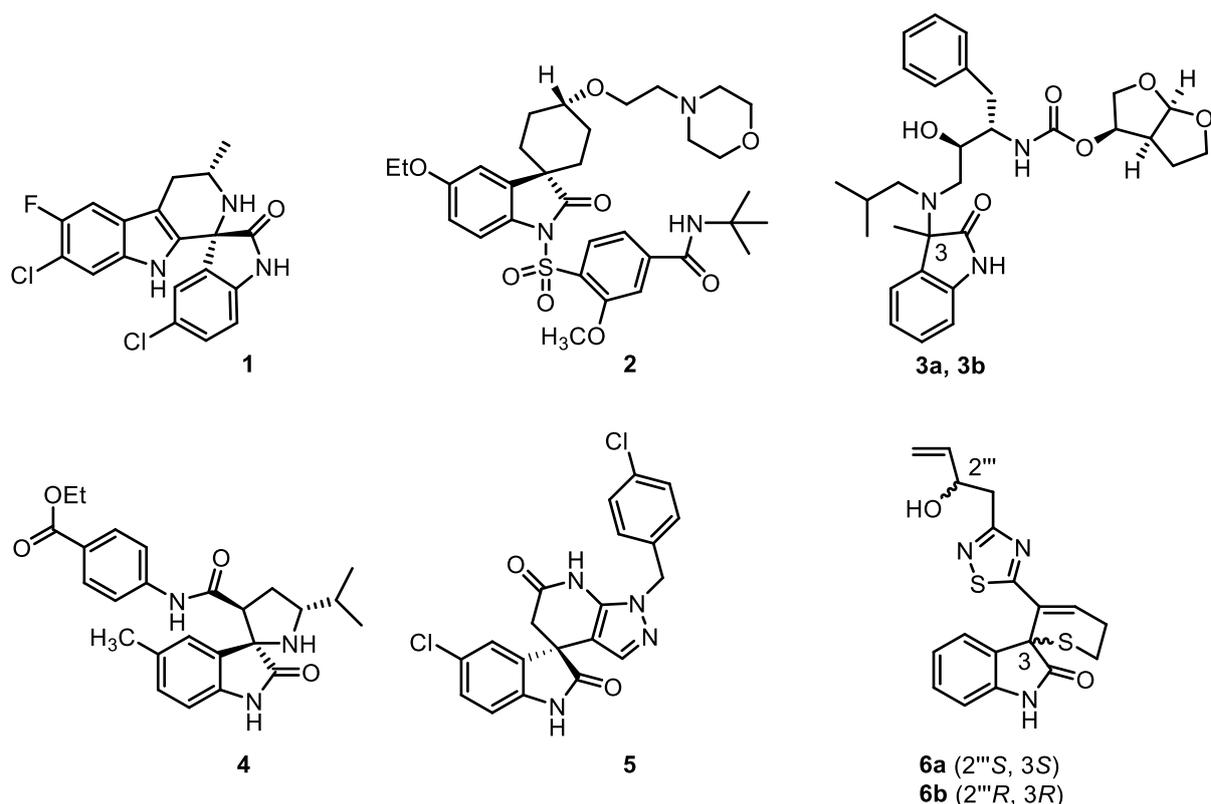


Fig. 1 代表的なスピロオキシインドール骨格を有する化合物

今回、スピロオキシインドール骨格を持つ化合物の中でも特に spirobrassinin (**7**) に着目した。**7** は1987年に土壌細菌 *Pseudomonas cichorii* を感染させたダイコン (*Rhaphanus sativus* L. var. *hortensis*) から初めて単離された化合物である。¹² 植物が紫外線 (UV) や微生物、重金属等のストレスに応答して産生する二次代謝産物はファイトアレキシンとよばれ、**7** はアブラナ科植物が産生する代表的なファイトアレキシンとして知られている。¹³

2001年に、**7** の3位での絶対配置は誘導体 1-[(1'*S*, 4'*R*)-camphanoyl]-(*R*)-spirobrassinin の X線結晶構造解析によって *S* 体であると決定された。さらに、*P. cichorii* を接種したハクサイ (*Brassica campestris*) から単離された **7** のエナンチオマー過剰率 (*ee*) は83–98% *ee* であることが報告された。^{14, 15}

一方、**7** 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¹⁶ や多発性硬化症に対する作用¹⁷、抗トリパノソーム作用¹⁸ を示すことが明らかとなっている。しかしながら、これらはラセミ体を用いて行われており、立体構造の違いによる活性の検討は著者が知る限り行われていない。そこで、立体構造の違いによる活性の検討の一助となると考え、今回、天然型である *S* 体の不斉合成を試みた。

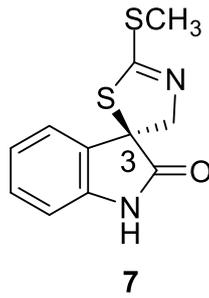


Fig. 2 (S)-(-)-Spirobrassinin の化学構造

また、これまでに **7** の不斉合成を含めた全合成が試みられてきた (Fig. 3).¹⁹⁻²³ 例えば, Zhu らは 2017 年に不斉 Friedel-Crafts 反応を伴うスピロエポキシインドールの速度論的光学分割による不斉合成を報告した.²¹ さらに, 2011 年に, シンコナルカロイド触媒を用いたエナンチオ選択的 Henry 反応を使用した **7** の不斉全合成が報告された.²²⁻²⁴ 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。

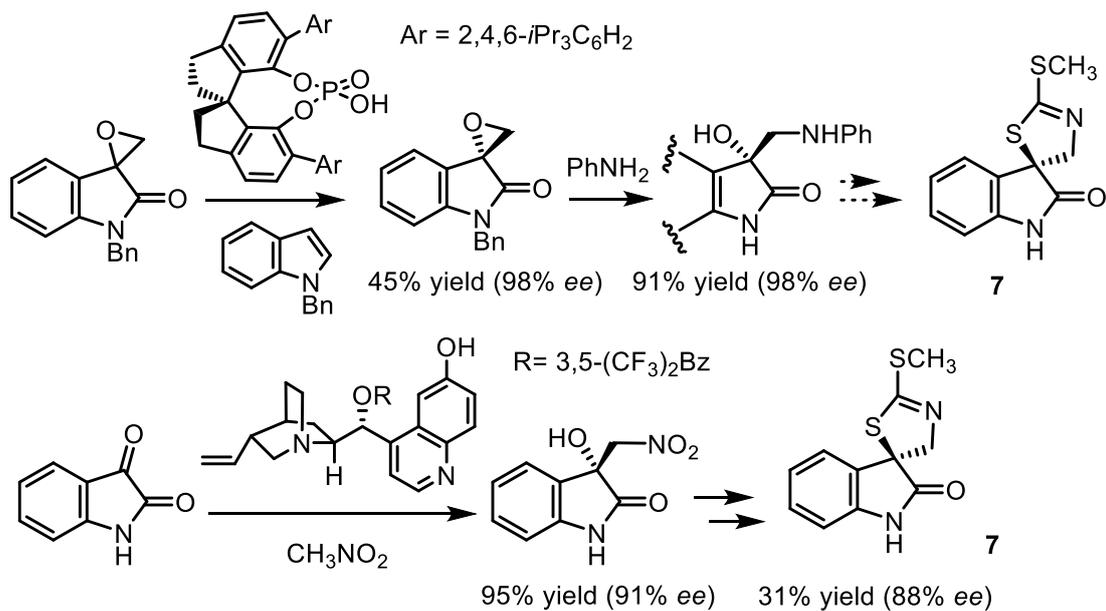


Fig. 3 Spirobrassinin (**7**) の不斉合成
[*J. Nat. Med.* (2021), Fig. 2 より一部を改変して引用]

一方, **7** 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。²⁵⁻³³ 1991 年に門出らによって **7** が tryptophan から生合成されることが報告され,^{29,30} その後, そ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 (Fig. 4).^{31, 32} この酵素は brassinin (**8**) から **7** 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.

今回, 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.

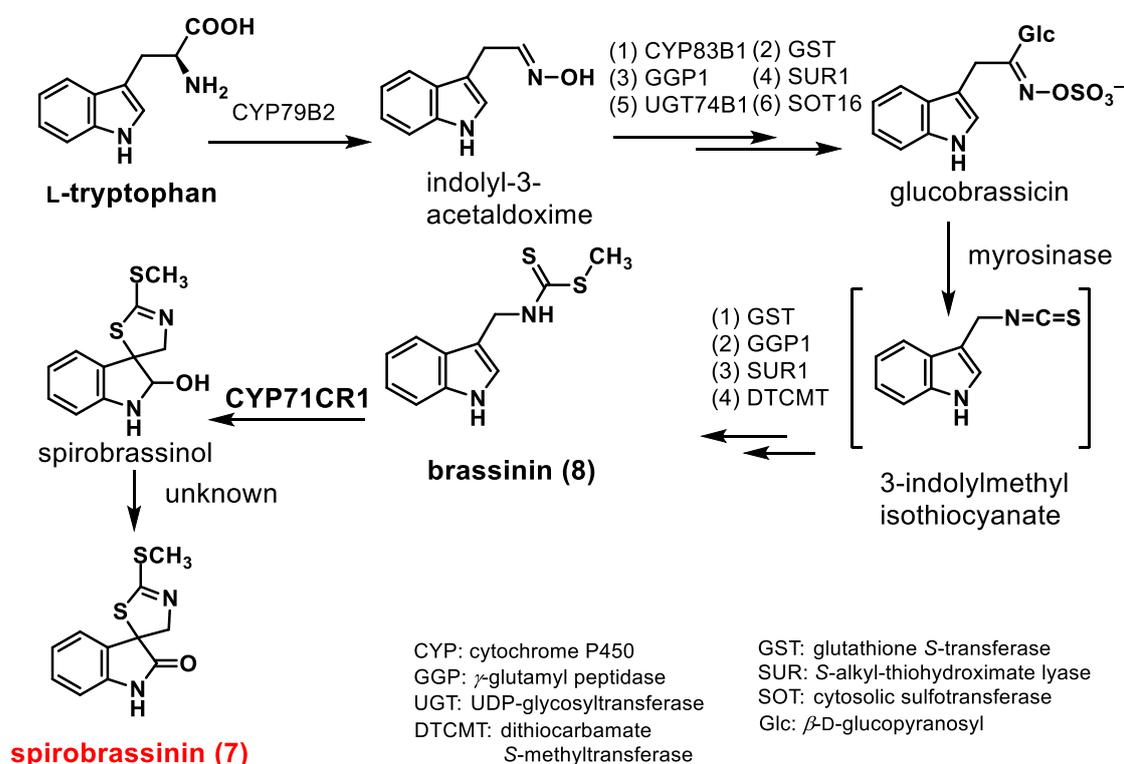


Fig. 4 Spirobrassinin (**7**) の推定生合成経路
 [J. Nat. Med. (2021), Fig. 3 より一部を改変して引用]

本論

第一章 カブ (*Brassica rapa* var. *rapa*) の酵素群を利用した spirobrassinin 類の不斉合成

第一節 Spirobrassinin の単離と生成条件の検討

Spirobrassinin (7) は L-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 (8) から 7 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. 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.

初めに, [Step I] スピロオキシインドール 7 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 8 および誘導体の添加による, 7 および半天然型スピロオキシインドール 5-methylspirobrassinin (9) 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 7 および 9 の合成とした (Fig. 5).

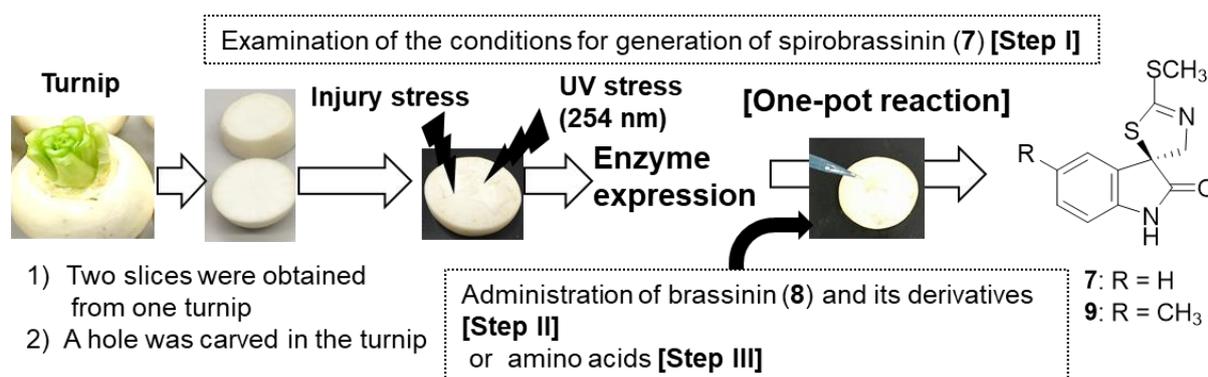


Fig. 5 実験計画

[*J. Nat. Med.* (2021), Fig. 4 より一部を改変して引用]

まず, アブラナ科植物カブ (*Brassica rapa* var. *rapa*) からの 7 の単離を行った [Step I]. UV 照射を行い (UV 波長: 254 nm, 出力: 30 W, 照射時間: 60 分), 室温遮光下 72 時間静置したカブ (4.38 kg) を methanol (MeOH) にて抽出した. 得られた MeOH エキス (744 mg) を水と ethyl acetate (AcOEt) を用いて液-液分配し, AcOEt 層 (178 mg) を得た. AcOEt 層を逆相 HPLC を用いて分離精製し, spirobrassinin (7, 3.0 mg, 0.00007%) を得た. 構造決定は水素核磁気共鳴スペクトル (¹H NMR), 炭素核磁気共鳴スペクトル (¹³C NMR), エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) の文献値³⁴ との比較により行った. 得られた 7 の旋光度は [α]_D²³-53.7 (*c* = 0.05, CHCl₃) であり, 文献値 [α]_D²⁰-53 (*c* = 0.3, CHCl₃) と比較することで絶対立体構造が *S* 体であると決定した.³⁵ また, キラルカラムを用いた 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析により, そのエナンチオマー過剰率が 91% *ee* であることを明らかにした.

次に、新鮮なカブ (*B. rapa* var. *rapa*) を使用して 7 を生産するために最適な条件を検討した [Step I]。Step I は、先行研究を参考にして実験を進め^{29,30} ファイトアレキシンを生成する外的ストレス (エリシター) として、植物に傷害ストレスおよび UV ストレスを与えた。

まず、カブをミキサーにて粉碎し、得られた組織に UV を照射することで 7 の生成を試みた。しかし、HPLC 分析の結果、この方法では 7 の生成量は少ないことが明らかとなった。この理由として、組織を粉碎による酵素の発現停止あるいは酵素の失活などが考えられた。そこで、カブを粉碎せず使用する方法を検討した。

カブに傷害ストレスのみ与えた場合と傷害ストレス・UV ストレスを与えた場合の 7 の生成を HPLC 分析により確認したところ、傷害と UV ストレスの両方を与えると、7 が比較的多く得られることが明らかとなった (Fig. 6)。また、UV 照射時間に関して検討を行ったところ、10, 30, 60, 120 分のうち 60 分が最も 7 の生成量が多かった。以上の結果より、7 の生成に最適な条件を以下のように決定した。カブを半分のスライスし [傷害ストレス], 24 時間静置し、UV 照射を行う [UV ストレス] (UV 波長: 254 nm, 出力: 30 W, 照射時間: 60 分)。そののち室温遮光下で 48 時間または 72 時間静置した。

また、他のアブラナ科植物であるハクサイ (*B. rapa* var. *pekinensis*)、キャベツ (*B. oleracea* var. *capitata*)、およびカリフラワー (*B. oleracea* var. *botrytis*) についても 7 の生成条件の検討を行った結果、4 種のうちカブが素材として適していることが明らかとなった (Fig. 6)。

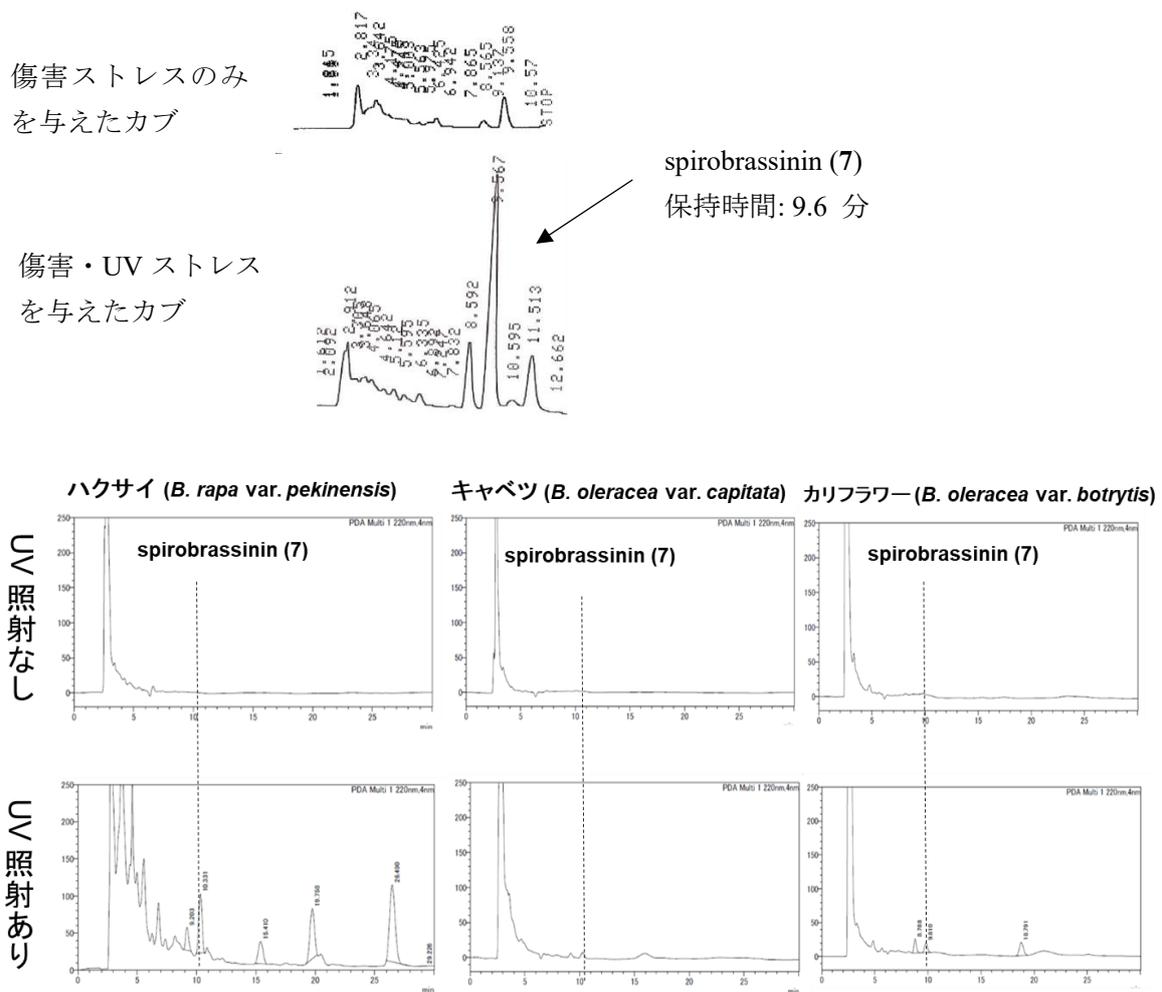


Fig. 6 カブ、ハクサイ、キャベツ、カリフラワーの spirobrassinin (7) の生成条件の検討

さらに、上記の処理を行ったカブについてドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、ファイトアレキシン合成酵素の発現を確認した。その結果、傷害・UV ストレスを与えたカブでは 57kDa 付近にバンドが確認され、このバンドは CYP71CR1 であると考えられた (Fig. 7).³⁶

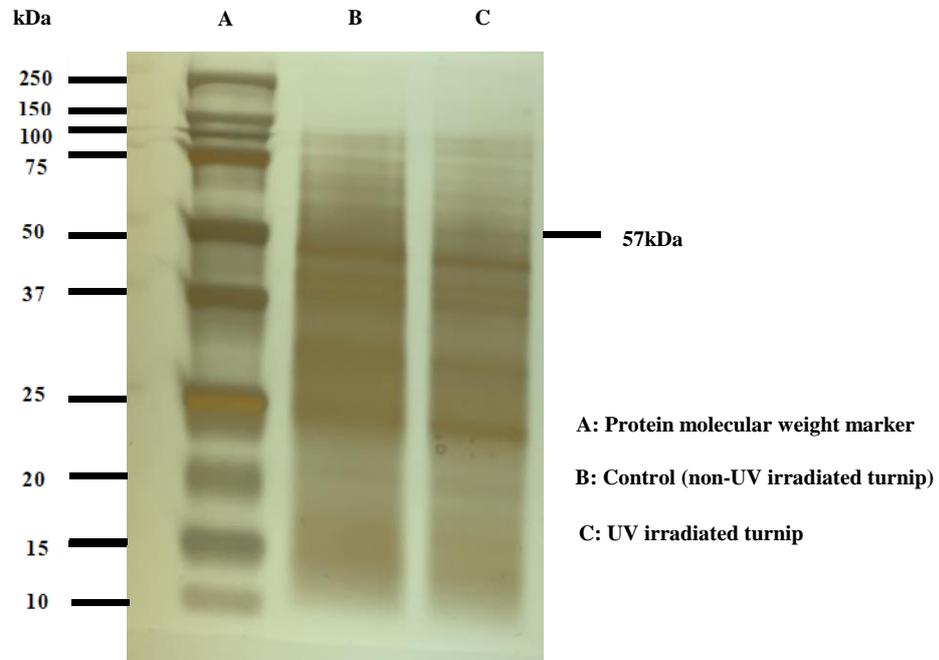


Fig. 7 ファイトアレキシン合成酵素の発現確認

第二節 Brassinin (8) および誘導体から spirobrassinin 類の合成

酵素発現したカブへの brassinin (8) および誘導体の添加による, spirobrassinin (8) および 5-methylspirobrassinin (9) の合成を試みた [Step II]. 初めに brassinin (8) について検討を行った. Brassinin (8) は 2 ステップで合成した (Fig. 8).³⁷

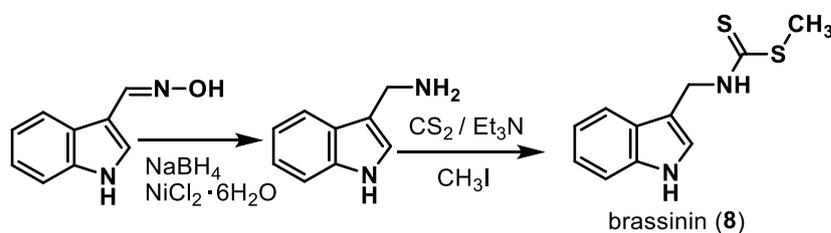


Fig. 8 Brassinin (8) の合成

カブは傷害部分の表面積を増やすために星型 (最大直径: 3 cm, 深さ: 1 cm) に穴を開け 24 時間静置し, UV 照射を行った [UV ストレス] (UV 波長: 254 nm, 出力: 30 W, 照射時間: 60 分). 界面活性剤 Tween-80 および dimethyl sulfoxide (DMSO) を含む水溶液に 8 を溶解し UV 照射直後のカブに添加した. 界面活性剤 Tween-80 は, 酵素および基質の細胞膜への透過性を高める効果を期待して用いた. DMSO は, 8 の溶解性を高める目的で使用した. カブ 1 個あたりの 8 の添加量は 0.4 mg, 1.2 mg, 2.0 mg または 4.0 mg とした. そのうち室温遮光下で 48 時間静置し, 溶液を回収した. 回収した溶液を HPLC 分析により定量分析した結果, 8 の添加量増加に伴い 7 の生成量が増加し濃度依存的に反応が進行した (Fig. 9, Table 1). また, キラルカラムを用いた HPLC 分析によりエナンチオマー過剰率を決定し, 8 の添加量の増加に伴って 7 の ee が減少することが明らかとなった (Fig. 9, Table 1).

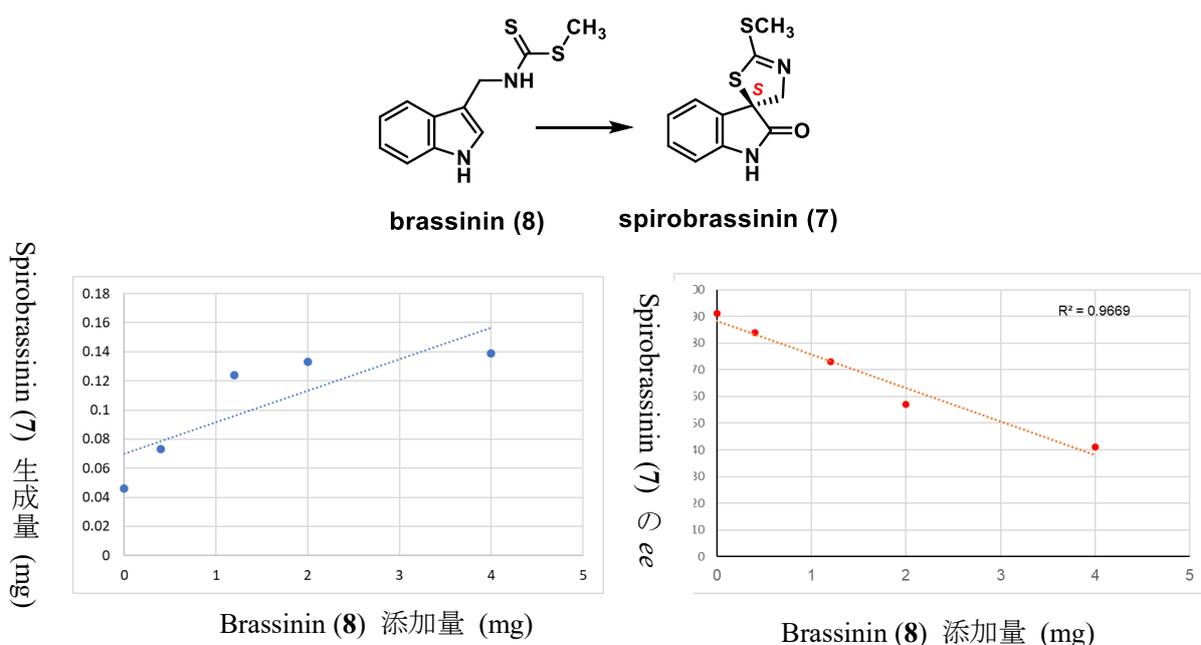
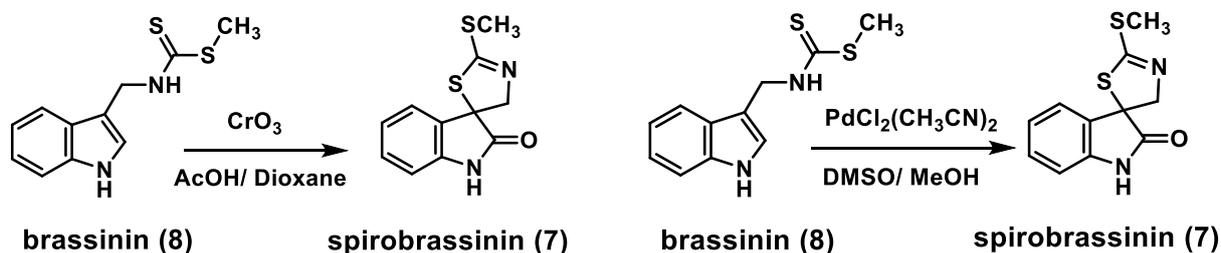


Fig. 9 Brassinin (8) の添加量に伴う spirobrassinin (7) 生成量および ee の変化

添加化合物	添加量 (mg)	8 の生成量 (mg)	ee (%)
コントロール	-	0.046	91
8	0.4	0.073	84
	1.2	0.124	73
	2.0	0.133	57
	4.0	0.139	41

Table 1 Brassinin (**8**) のカブへの添加
[*J. Nat. Med.* (2021), Table 1 より一部を改変して引用]

一方, 酸化試薬三酸化クロム (CrO_3) または触媒 $[\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$ を用いて **8** から **7** の反応を行った.^{38,39} CrO_3 では収率 17%, $\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2$ では収率 14% で **7** を得た. また, キラルカラムを用いた HPLC 分析により, いずれの方法においてもラセミ体で得られることを確認した (Table 2).



酸化試薬, 触媒	収率 (%)	ee (%)
CrO_3	17	-2
$\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2$	14	-1

Table 2 CrO_3 , $\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2$ を用いた spirobrassinin (**7**) の合成
[*J. Nat. Med.* (2021), Table 1 より一部を改変して引用]

以上の結果より、立体選択的な spirobrassinin (7) の合成にはカブのファイトアレキシン合成酵素が関与していることが明らかとなった。また、反応機構について考察を行い Fig. 10 に示すように epoxy の形成を経て環化反応が進行するのではないかと推定した。さらに、Table 1 において 8 の添加量の増加に伴い 7 の ee が減少していたことから、8 を過剰量加えると立体選択的の反応を行うファイトアレキシン合成酵素に対する基質としての 8 が飽和し、それ以外の酵素が関与して非立体選択的の反応が進行している可能性が考えられた。

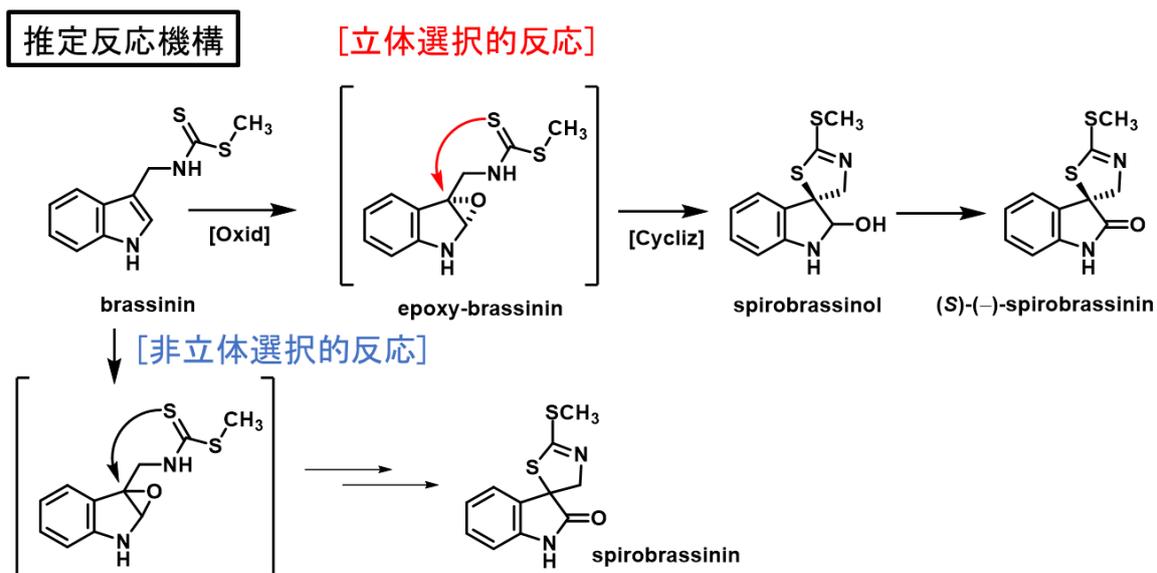


Fig. 10 Brassinin (8) 環化反応の推定反応機構

加えて、過酸化水素を基質として酸化反応を行うことが知られ、植物の防御機構に関与しているといわれている^{40, 41} 酵素ペルオキシダーゼを brassinin (**8**) と共に同様の方法でカブに添加した。結果として、**8** のみをカブに添加した場合と比べ、ペルオキシダーゼを添加すると **7** の *ee* が減少することが明らかとなった (Table 3)。ペルオキシダーゼは一般に非立体選択的に酸化を行うと考えられていることから、ペルオキシダーゼが非立体選択的な環化反応に関与していることが示唆された。

添加化合物 および酵素	添加量 (mg)	<i>ee</i> (%)
8	1.2	73
8 + ペルオキシダーゼ	1.2 + 0.6	66

Table 3 Brassinin (**8**) とペルオキシダーゼのカブへの添加
[*J. Nat. Med.* (2021), Table 1 より一部を改変して引用]

次に, brassinin (8) の誘導体について検討を行った. まず, brassinin (8) 誘導体 18–22 を 3–5 ステップで合成した (Fig. 11).^{37–40} カブは傷害部分の表面積を増やすために星型 (最大直径: 3 cm, 深さ: 1 cm) に穴を開け 24 時間静置し, UV 照射を行った [UV ストレス] (UV 波長: 254 nm, 出力: 30 W, 照射時間: 60 分). 界面活性剤 Tween-80 および DMSO を含む水溶液に 18–22 を溶解し UV 照射直後のカブに添加した. そののち室温遮光下で 48 時間静置し, 溶液を回収した. 回収した溶液の HPLC 分析を行った結果, 18 から新規化合物 5-methylspirobrassinin (9) が得られ, 20 から新規化合物 23 が得られた. 9 および 23 の化学構造は, 1D NMR 分析および ESI-MS に基づいて決定された. また, 23 の絶対立体構造は 7 の旋光度と比較することにより *S* 体であると決定した. キラルカラムを用いた HPLC 分析を行ったところエナンチオマー過剰率は (9 : 24% ee, 23 : 23% ee) を示した. 一方, 19, 22 をカブに添加した場合, 環化反応は進行しなかった (Table 4, Fig. 12).

環化前駆体の 5 位に電子供与性基を導入した 18 では環化反応が進行し, 電子求引性基が導入された 22 では進行なかったことから, インドール環の 5 位に導入する置換基が環化反応の進行に影響を及ぼすことが示唆された. すなわち, 電子供与性基が導入されると, 環化中間体である epoxy 体の生成が容易になり, 電子求引性基が導入されると, 環化中間体である epoxy 体が生成しにくくなると考えられた. 一方, 環化前駆体 20, 21 の結果より, 側鎖の部分の R³ がメチル基あるいはエチル基である場合, 基質として適していると考えられた. また, 19 では反応が進行しなかったことからインドール環の *N*位の置換基が反応の進行に関与していると予測された.

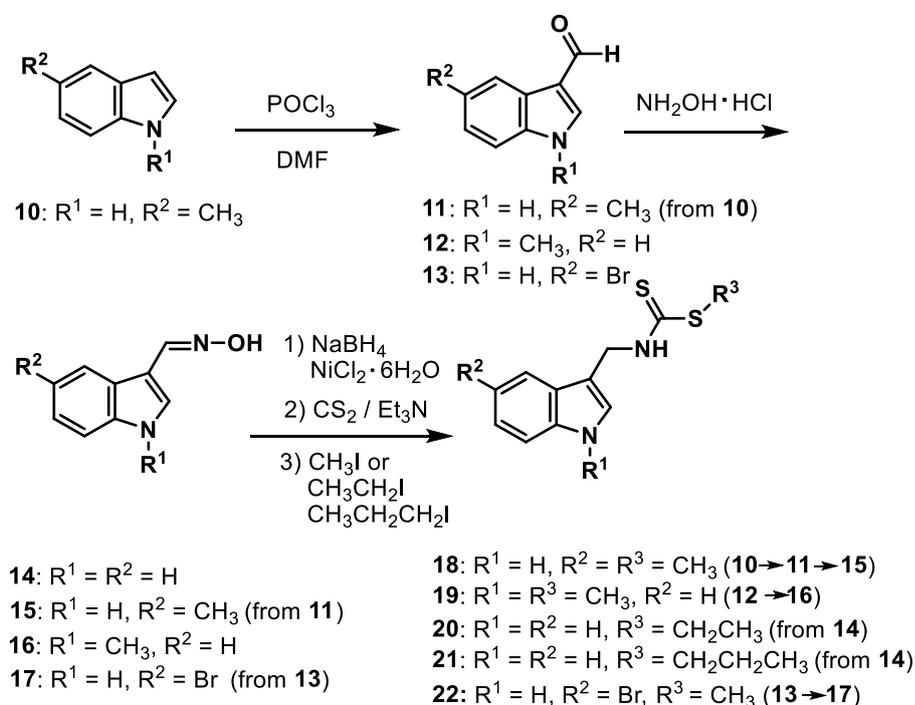
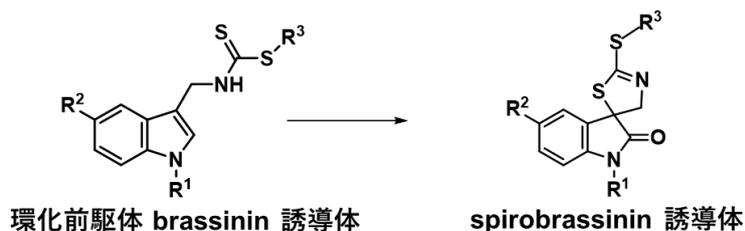


Fig. 11 Brassinin 誘導体 18–22 の合成



添加化合物	添加濃度 (mmol/L)	生成物	収率 (%)	ee (%)
18	2.0	9	8.0	24
19	2.0	-	n.d.	-
20	2.0	23	1.1	23
21	1.0	-	trace	-
22	1.0	-	n.d.	-

Table 4 Brassinin 誘導体のカブへの添加
[*J. Nat. Med.* (2021), Table 1 より一部を改変して引用]

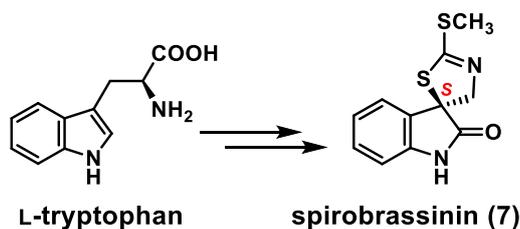
添加化合物	<p style="text-align: center;">18</p>	<p style="text-align: center;">19</p>	<p style="text-align: center;">20</p>	<p style="text-align: center;">21</p>	<p style="text-align: center;">22</p>
生成化合物	<p style="text-align: center;">9 (8.0% yield, 24% ee)</p>	not detected	<p style="text-align: center;">23 (1.1% yield, 23% ee)</p>	trace	not detected

Fig. 12 Brassinin 誘導体のカブへの添加

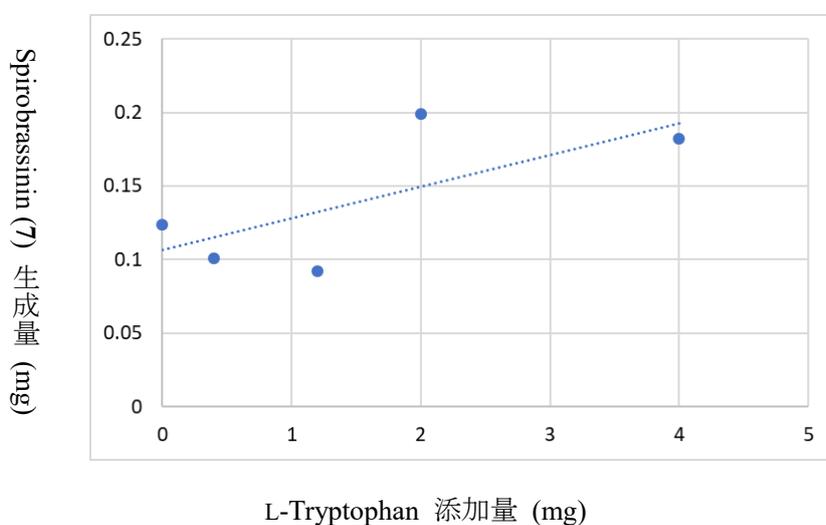
第三節 L-Tryptophan および誘導体から spirobrassinin 類の合成

L-Tryptophan および誘導体から spirobrassinin 類の合成を試みた [Step III]. Spirobrassinin (7) の推定生合成経路において, indolyl-3-acetoaldoxime から glucobrassicin への反応, 3-indolylmethyl isothiocyanate から brassinin (8) への反応では, 硫黄原子が植物中の glutathione によって導入される.³² 本反応では, カブに含有する酵素および glutathione を利用するとともに, カブを反応容器としても用いることで, アミノ酸から spirobrassinin 類を合成することを目的とした.

カブは傷害部分の表面積を増やすために星型 (最大直径: 3 cm, 深さ: 1 cm) に穴を開け 24 時間静置し, UV 照射を行った [UV ストレス] (UV 波長: 254 nm, 出力: 30 W, 照射時間: 60 分). 界面活性剤 Tween-80 および DMSO を含む水溶液に L-tryptophan を溶解し UV 照射直後のカブに添加した. カブ 1 個あたりの L-tryptophan の添加量は 0.4 mg, 1.2 mg, 2.0 mg, 4.0 mg (Method A) または 4.0 mg, 8.0 mg, 16 mg, 32 mg (Method B) とした. そのうち室温遮光下で 72 時間静置し, 溶液を回収した. 回収した溶液を HPLC 分析により定量分析した結果, L-tryptophan の添加量増加に伴い 7 の生成量が増加した (Fig. 13, Table 5). また, キラルカラムを用いた HPLC 分析によりエナンチオマー過剰率を決定したところ, 90–97% ee となり立体選択的に反応が進行していることが明らかとなった (Table 5).



Method A



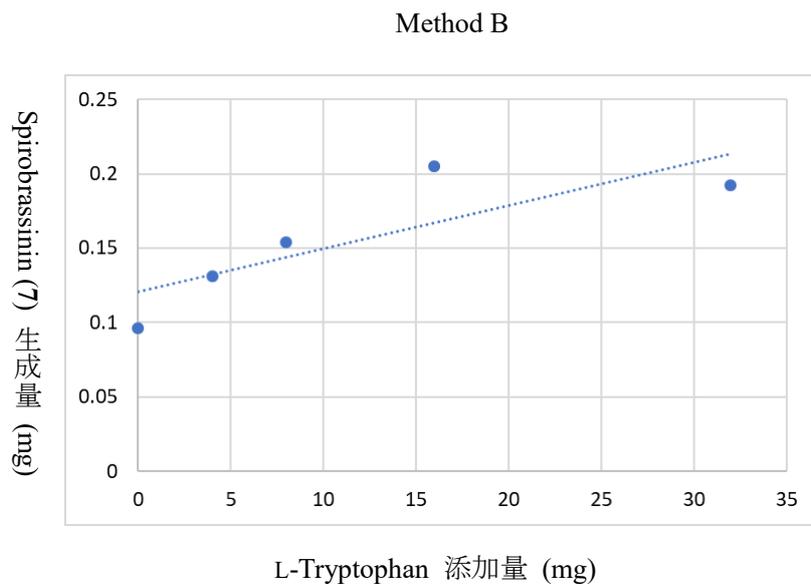


Fig. 13 L-Tryptophan の添加量に伴う spirobrassinin (7) 生成量の変化

Method A

添加化合物	添加量 (mg)	7 の生成量 (mg)	ee (%)
コントロール	-	0.124	94
L-tryptophan	0.4	0.101	97
	1.2	0.092	95
	2.0	0.199	94
	4.0	0.182	95

Method B

添加化合物	添加量 (mg)	7 の生成量 (mg)	ee (%)
コントロール	-	0.096	90
L-tryptophan	4.0	0.131	93
	8.0	0.154	90
	16	0.205	90
	32	0.192	85

Table 5 L-Tryptophan のカブへの添加
[*J. Nat. Med.* (2021), Table 2 より一部を改変して引用]

次に, 5-methyl-DL-tryptophan について検討を行った. カブは傷害部分の表面積を増やすために星型 (最大直径 : 3 cm, 深さ : 1 cm) に穴を開け 24 時間静置し, UV 照射を行った [UV ストレス] (UV 波長: 254 nm, 出力: 30 W, 照射時間: 60 分). 界面活性剤 Tween-80 および DMSO を含む水溶液に 5-methyl-DL-tryptophan を溶解し UV 照射直後のカブに添加した. カブ 1 個あたりの 5-methyl-DL-tryptophan の添加量は 4.0, 5.5, 8.0, 16 mg とした. そののち室温遮光下で 72 時間静置し, 溶液を回収した. 回収した溶液を HPLC 分析により定量分析した結果, 5-methyl-DL-tryptophan の添加量増加に伴い **9** の生成量が増加し濃度依存的に反応が進行した (Fig. 14, Table 6). 得られた **9** の絶対立体構造は **7** の旋光度と比較することにより *S* 体であると決定した. キラルカラムを用いた HPLC 分析によりエナンチオマー過剰率を決定したところ, 50–81% *ee* となり立体選択的に反応が進行していることが明らかとなった. また, 5-methyl-DL-tryptophan の添加量の増加に伴い **9** の *ee* が増加することが明らかとなった (Table 6).

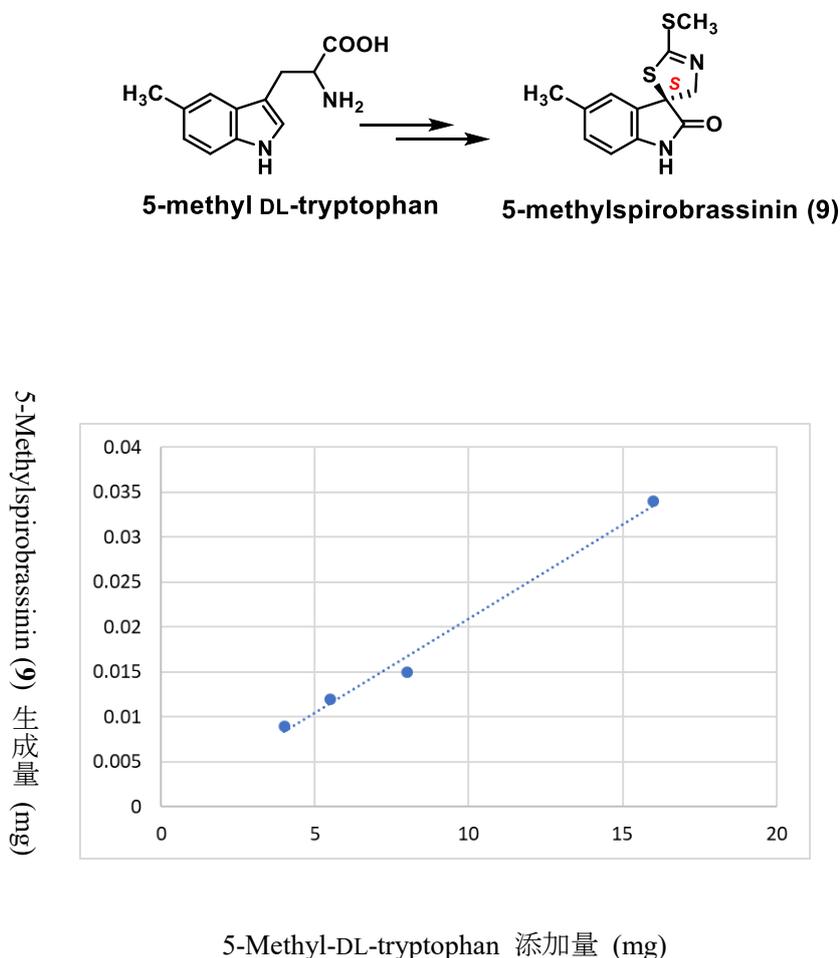


Fig. 14 5-Methyl-DL-tryptophan の添加量に伴う 5-methylspirobrassinin (**9**) 生成量の変化

添加化合物	添加量 (mg)	9 の生成量 (mg)	収率 (%)	ee (%)
5-methyl-DL-tryptophan	4.0	0.009	0.19	50
	5.5	0.012	0.18	57
	8.0	0.015	0.15	73
	16	0.034	0.18	81

Table 6 5-Methyl-DL-tryptophan のカブへの添加
[*J. Nat. Med.* (2021), Table 2 より一部を改変して引用]

以上のように、カブに添加する基質によって添加量に伴う *ee* の変化の挙動が異なることが明らかとなった。すなわち, brassinin (**8**) を添加した場合, 添加量の増加に伴って spirobrassinin (**7**) の *ee* が下がるが (Table 1), L-tryptophan を添加した場合, 添加量にかかわらず spirobrassinin (**7**) の *ee* はほぼ一定であった (Table 5)。さらに, 5-methyl-DL-tryptophan を添加した場合, 添加量の増加に伴い 5-methylspirobrassinin (**9**) の *ee* は増加した (Table 6)。

まず, brassinin (**8**) を添加した場合に添加量の増加に伴って spirobrassinin (**7**) の *ee* が下がる理由としては, **8** を過剰量加えると立体選択的反応を行うファイトアレキシン合成酵素に対して **8** が飽和し, それ以外の酵素が関与して非立体選択的反応が進行する可能性が考えられた。L-Tryptophan を添加した場合, 添加量にかかわらず spirobrassinin (**7**) の *ee* がほぼ一定である理由として, 添加した L-tryptophan から brassinin (**8**) まで到達する基質の量が制限され, 基質としての **8** が飽和する可能性が低いと考えられた。一方, 5-methyl-DL-tryptophan を添加した場合, 添加量の増加に伴い 5-methylspirobrassinin (**9**) の *ee* が増加する理由として, インドール環の 5 位にメチル基が導入されたことで 5-methyl-DL-tryptophan から 5-methylbrassinin (**18**) まで到達する基質の量が tryptophan を基質とした時よりも少なくなり, **18** が飽和する可能性がより低くなり, 飽和しない範囲においては基質 **18** の量が多くなることで立体選択的反応を行うファイトアレキシン合成酵素と反応する確率が高くなるためと考えられた。

一方, 添加アミノ酸の基質特異性について検討するため, L-tryptophan の代わりに 3-(2-naphthyl)-L-alanine をカブに添加した. その結果, 2-naphthyl-acetaldehyde-oxime が 1.3% の収率で単離され, 含硫黄化合物は得られなかった. 3-(2-naphthyl)-D-alanine を添加した場合も同様の結果が得られた. このことから, アミノ酸のインドール環の部分が反応の進行のために必要である可能性が示された (Fig. 15).

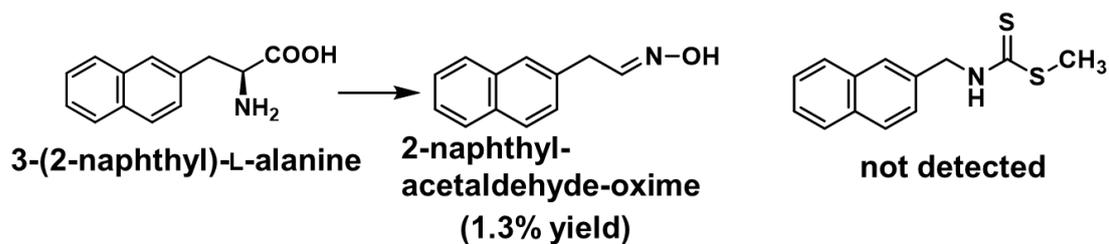


Fig. 15 3-(2-naphthyl)-L-alanine のカブへの添加

小括

第一章では、カブ (*B. rapa* var. *rapa*) の酵素群を利用した spirobrassinin 類の立体選択的合成について述べた。

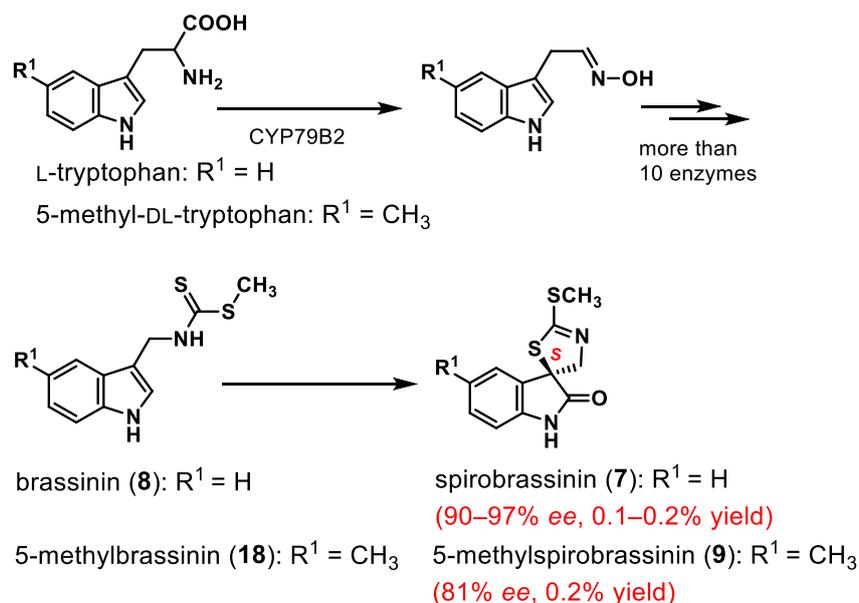
第一節では、spirobrassinin (7) の単離と生成条件の検討を行った。種々の条件検討により、カブに傷害を与え UV 照射 (254 nm, 60 分) を行うことが 7 を生成する最適条件であることを見出した。

次に、第二節では、酵素発現させたカブへの brassinin (8) および誘導体の添加による、7 および半天然型スピロオキシインドール 5-methylspirobrassinin (9) の合成を試みた。その結果、環化反応が進行し、8 から (S)-(-)-spirobrassinin (7) が得られ、5-methylbrassinin (18) から (S)-(-)-5-methylspirobrassinin (9) が得られた。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、第三節では、カブに含有する酵素および glutathione を利用するとともに、カブを反応容器としても用いることで、アミノ酸から spirobrassinin 類を合成することを目的とした。すなわち、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 (7) が 90–97% ee で得られ、5-methyl-DL-tryptophan から (S)-(-)-5-methylspirobrassinin (9) が 81% ee (収率: 0.2%) で得られた。

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。

また、今後の課題として、spirobrassinin 類の生成収率の改善が挙げられる。本反応が低収率である理由のひとつとして、ファイトアレキシンの生成量に上限があることが考えられた。従って、カブのファイトアレキシン合成酵素の単離が収率改善の鍵となるのではないかと考えられる。



第二章 不安定中間体 isothiocyanate を介した含窒素化合物の合成

第二章では, *spirobrassinin* の生合成経路の中で 3-indolylmethyl isothiocyanate が不安定であることに着目し, その反応性の高さを利用して化合物を得ることを目的とした.

Isothiocyanate はアブラナ科植物に特徴的な成分であり, 植物内では前駆体 glucosinolate として存在している. 植物組織が損傷すると分解酵素ミロシナーゼにより glucosinolate が分解され, Lossen 転位を経て isothiocyanate が生成する.⁴³

Isothiocyanate の安定性はその側鎖の種類によって異なる. 例えば, 代表的な glucosinolate である glucobrassicin の分解により生成する 3-indolylmethyl isothiocyanate は非常に不安定であることが知られている.⁴⁴⁻⁴⁶ この化合物は直ちに H₂O と反応し indole-3-methanol へと変換される (Fig. 16).⁴⁷ また, アスコルビン酸やアミノ酸との反応により, いくつかのインドール誘導体が生成されることが報告されている.⁴⁸⁻⁵⁰ 一方で, 複素環部分を持ついくつかのインドール誘導体は thromboxane synthetase 阻害作用や抗真菌作用を持つことが知られている.^{52, 53} しかしながら, 一般に複素環部分を持つ 1-methoxyindole 誘導体の合成には複数の工程を必要とする.⁵¹⁻⁵⁶

これまでに, ジアルキルアミノアリアル化インドールなどの 3-alkylindole や 1-methoxyindole の簡便な合成法が報告されているが, これらの反応は酸化剤と金属試薬を必要とする.^{57, 58} 本研究では, アブラナ科ホソバタイセイ (*Isatis tinctoria*) 含有成分として知られる neoglucobrassicin (**24**) から得られた不安定な isothiocyanate を利用して複素環部分を持つ生体機能性 1-methoxyindole を構築することを目的とした. すなわち, myrosinase 触媒による neoglucobrassicin (**24**) の脱 glucoside 化反応と Lossen 転位, 続いて複素環式化合物との求核反応を誘導することにより 1 step で 3-(isothiocyanatomethyl)-1-methoxy-1*H*-indole を得ることを試みた.

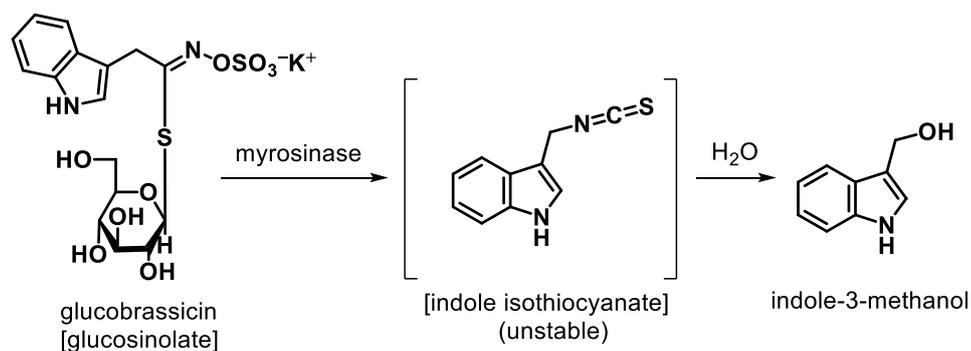


Fig. 16 Glucobrassicin の分解による indole-3-methanol の生成

まず、アブラナ科ホソバタイセイ (*Isatis tinctoria*) 乾燥根部より glucosinolate である neoglucobrassicin (**24**) を単離した.^{59, 60} *Isatis tinctoria* 乾燥根部 (5.0 kg) を MeOH にて熱時抽出し、得られた MeOH エキス (540.1 g) を HP-20 に付し 20% MeOH 分画 (13.25 g) を得た。20% MeOH 分画を順相オープンカラムクロマトグラフィーにて分離精製し、neoglucobrassicin (**24**, 2.21 g, 0.044%) を得た。構造決定は ¹H NMR, ¹³C NMR, 高分解能質量分析 (HRMS) の文献値との比較により行った。

次に、**24** が myrosinase (from *Sinapis alba*) の基質として適していることを確認した (Fig. 17). **24** と myrosinase をリン酸ナトリウム緩衝液 [pH 7.4] 中で 12 時間攪拌したところ、**24** の酵素分解によって得られた不安定な isothiocyanate と H₂O の反応によって 1-methoxyindole-3-methanol (**25**) の生成が確認された。反応開始の 5 分後と 3 時間後の **25** の生成量を HPLC を用いて求めたところ、収率はそれぞれ 1.0% と 2.9% であった (Fig. 18). 24 時間後の収率は 3 時間後と比較して変化は見られなかった。

また、**24** が完全に消費されていることを確認するため NMR 解析を行った。その結果、**24** のインドール環の 4 位のシグナル (7.75 ppm, d, *J* = 7.6 Hz) が観察されなかったことから、**24** が完全に消費されていることが確認された。**24** が完全に消費されているにも関わらず **25** の収率が低い理由を考察した。これまでに、glucobrassicin から得られる indole-3-methanol が二量体となり 3,3-diindolylmethane を生成することが報告されている。⁶¹ この結果から、本反応においては **24** から得られる **25** が重合して *N,N*-dimethoxy-diindolylmethane を生成していることが予測された。

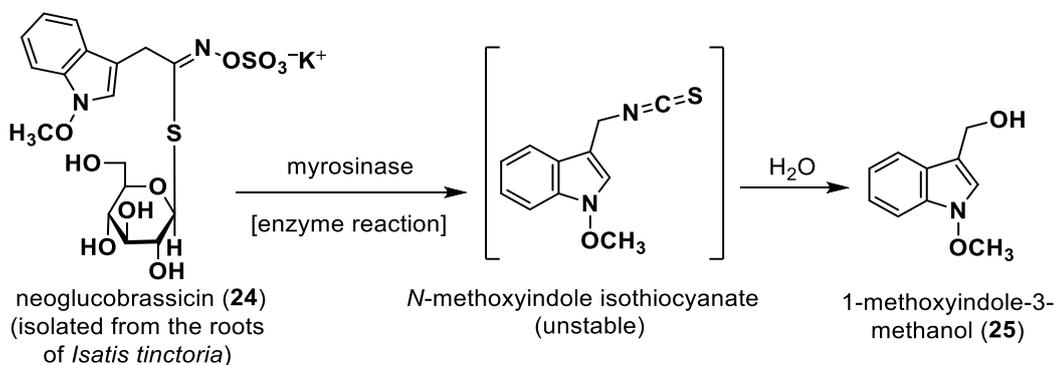
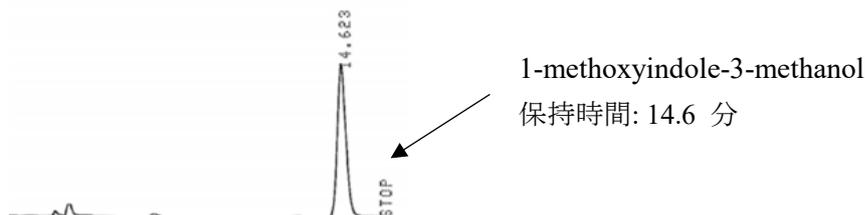
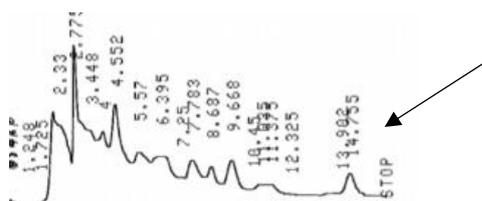


Fig. 17 Neoglucobrassicin (**24**) の分解による 1-methoxyindole-3-methanol (**25**) の生成

1-methoxyindole-3-methanol の HPLC 分析



反応開始 5 分後の HPLC 分析



反応開始 3 時間後の HPLC 分析

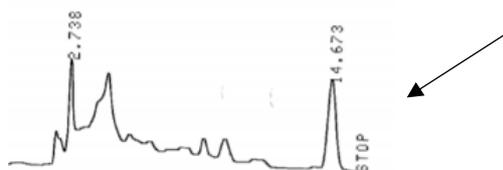


Fig. 18 1-Methoxyindole-3-methanol (**25**) の生成量の変化

次に、**24** から 3-(1*H*-imidazol-1-ylmethyl)-1-methoxy-1*H*-indole (**26**) の合成を試みた。**24** を myrosinase および imidazole とともにリン酸ナトリウム緩衝液 [pH 7.4] 中で 12 時間攪拌した。その結果、新規化合物 **26** の生成が確認された (Fig. 19)。化合物 **26** は黄色油状物質として得られ、その分子量は ESI-MS によって決定され、分子式は HRESI-MS によって $C_{13}H_{13}N_3O$ であると決定された。また、 1H および ^{13}C NMR スペクトルにより化合物 **26** が indole 部分を含むことが明らかになった (Table 7)。Imidazole 部分の位置は、Hetero-nuclear Multiple-Bond Connectivity (HMBC) において 1'-H と 2, 3, 2''-C の間に相関が観察されたことにより決定された。以上より、化合物 **26** の化学構造は 3-(1*H*-imidazol-1-ylmethyl)-1-methoxy-1*H*-indole と決定された。

また、反応に酵素 myrosinase が必要であることを確認するために myrosinase 非存在下、**24** と imidazole の反応を行った。その結果、HPLC 分析では新たなピークは確認されなかった (Fig. 19)。従って、酵素 myrosinase はこの反応に不可欠であることが明らかとなった。

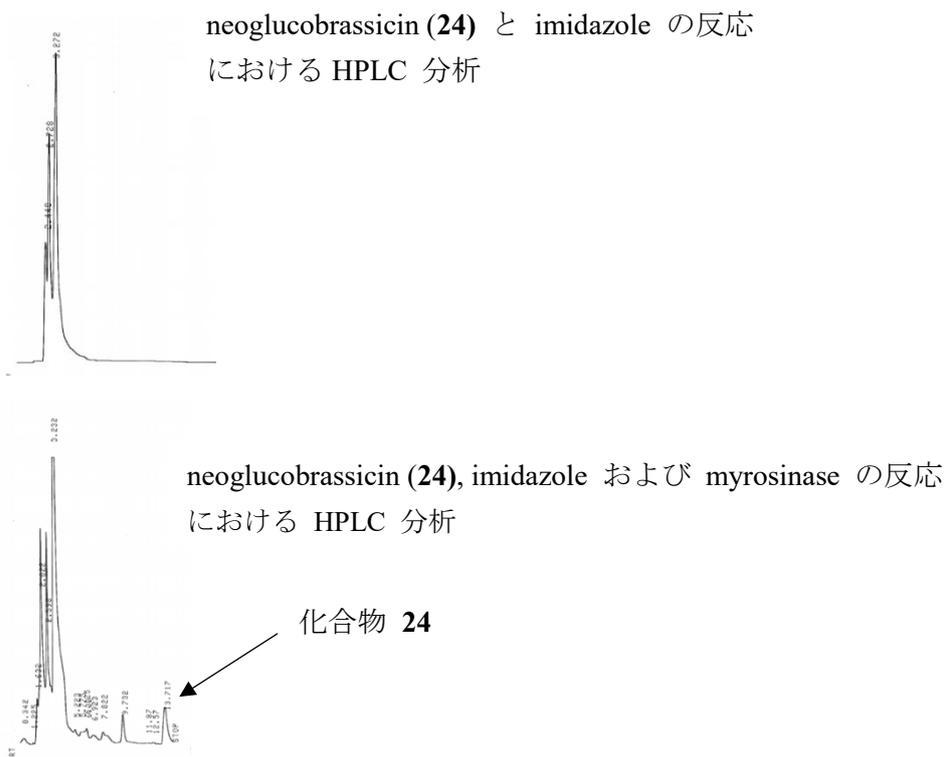


Fig. 19 Myrosinase 存在下または非存在下の neoglucobrassicin (**24**) と imidazole の反応

さらに、求核剤として imidazole の代わりに pyrazole, 1*H*-1,2,3-triazole, 1*H*-1,2,4-triazole を使用して様々な 1-methoxy-1*H*-indole の合成を試みた。すなわち、**24** と pyrazole, 1*H*-1,2,3-triazole または 1*H*-1,2,4-triazole をリン酸ナトリウム緩衝液 [pH 7.4] 中で myrosinase とともに 12 時間攪拌することにより新規化合物 **27–30** を得た (Fig. 20, 21)。化学構造は ¹H および ¹³C NMR スペクトルと 2D-NMR (DQF COSY, HMBC) スペクトルによって決定した (Table 7)。化合物 **27–30** の indole 部分と pyrazole または triazole 部分の間の結合はそれぞれ HMBC または NOESY 相関に基づいて確認した (Fig. 22)。化合物 **27**, **29** および **30** の HMBC では 1'-H と 2, 3, 5''-C (化合物 **27**), 1'-H および 2, 3, 2'', 5''-C (化合物 **29**), 1'-H および 2, 3, 5''-C (化合物 **30**) の間に相関が観察された。一方、化合物 **28** の NOESY における NOE 相関は 2-H と 5''-H, および 1'-H と 5''-H 間で観察された。以上より、化合物 **27–30** の化学構造は 1-methoxy-3-(1*H*-pyrazol-1-ylmethyl)-1*H*-indole, 1-methoxy-3-(1*H*-1,2,3-triazol-1-ylmethyl)-1*H*-indole, 1-methoxy-3-(4*H*-1,2,4-triazol-4-ylmethyl)-1*H*-indole, および 1-methoxy-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1*H*-indole であると決定した。以上、不安定な isothiocyanate を介して 1 step で 5 つの新規含窒素化合物 **26–30** を得た (Fig. 20, 21)。

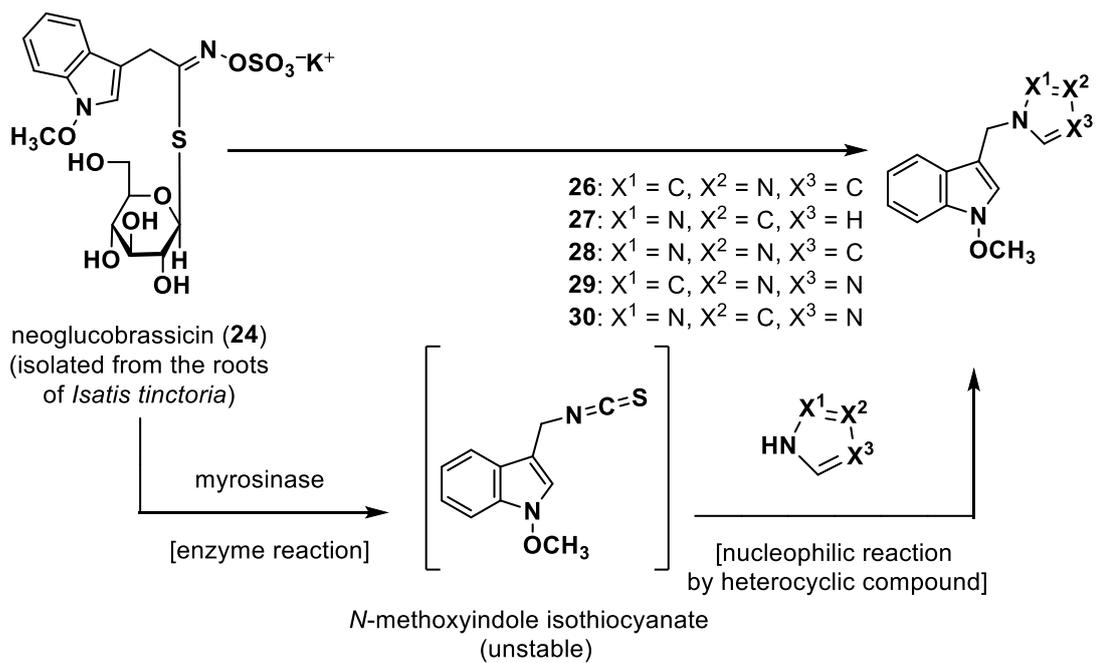


Fig. 20 新規含窒素化合物 **26-30** の合成

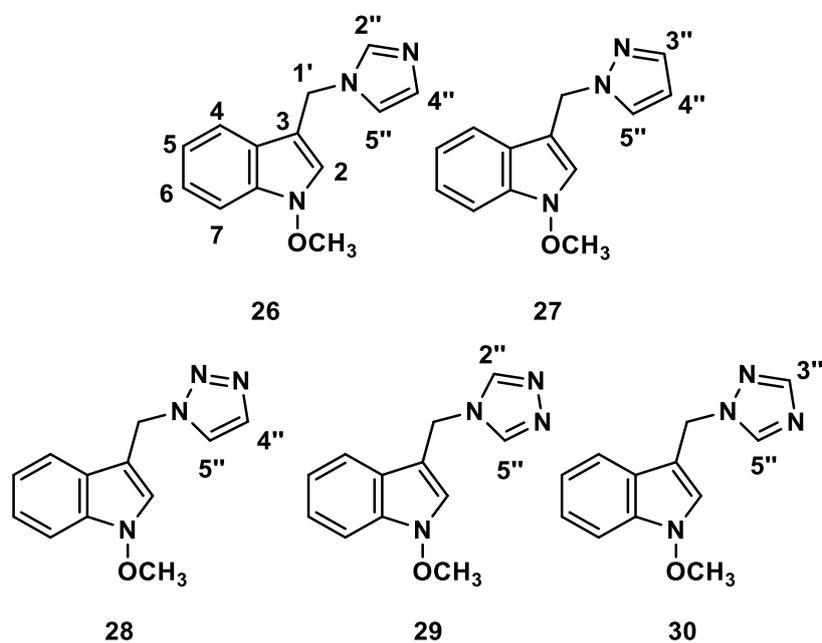


Fig. 21 新規含窒素化合物 **26-30** の化学構造

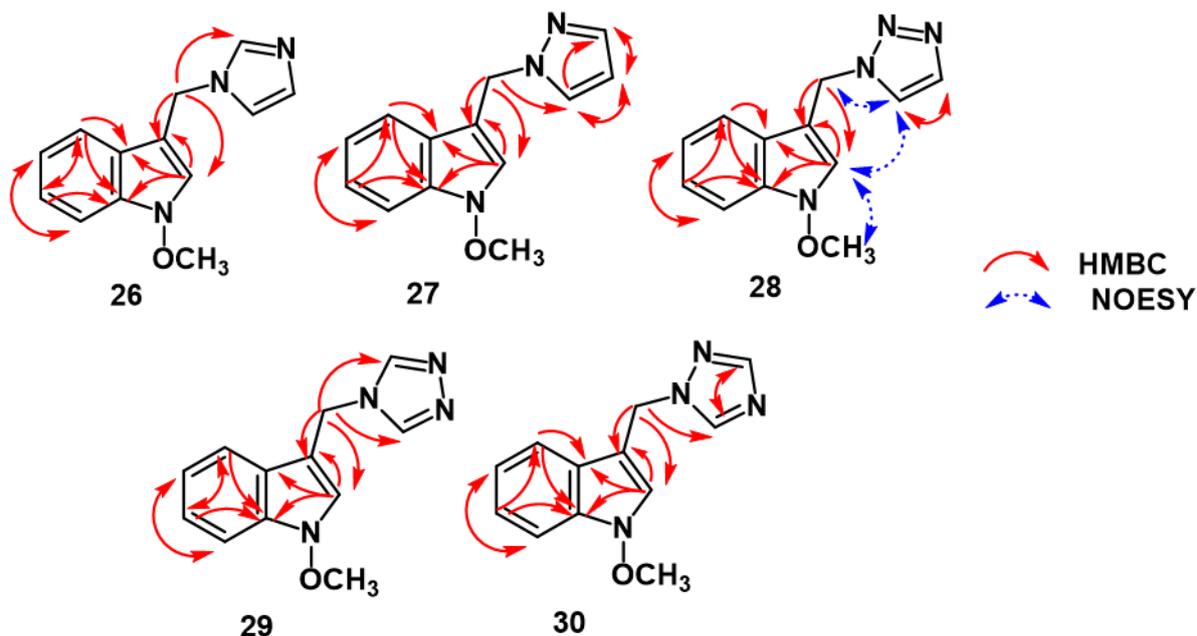


Fig. 22 新規含窒素化合物 **26–30** の HMBC および NOE 相関

Compound	26		27		28		29		30	
Position	δ_{H}	δ_{C}								
2	7.55 (s)	123.5	7.41(s)	125.2	7.64 (s)	124.6	7.65 (s)	124.1	7.60 (s)	124.7
3		107.5		109.1		106.6		105.8		106.4
3a		123.5		125.3		124.1		123.2		124.1
4	7.45 (d, $J=8.3$)	119.1	7.34 (d, $J=8.3$)	120.9	7.50 (d, $J=8.2$)	119.7	7.51 (d, $J=8.3$)	118.8	7.54 (d, $J=8.3$)	119.7
5	7.06 (dd, $J=8.3, 6.8$)	120.8	6.94 (dd, $J=8.3, 6.8$)	122.3	7.06 (dd, $J=8.2, 6.9$)	121.5	7.10 (dd, $J=8.3, 6.9$)	121.2	7.08 (dd, $J=8.3, 6.8$)	121.5
6	7.22 (dd, $J=8.2, 6.8$)	123.4	7.11 (dd, $J=8.2, 6.8$)	124.9	7.22 (dd, $J=8.3, 6.9$)	124.1	7.25 (dd, $J=8.2, 6.9$)	123.7	7.23 (dd, $J=8.3, 6.8$)	124.0
7	7.43 (d, $J=8.2$)	108.9	7.32 (d, $J=8.2$)	110.4	7.43 (d, $J=8.3$)	109.5	7.46 (d, $J=8.2$)	109.1	7.43 (d, $J=8.3$)	109.5
7a		133.3		134.9		133.7		133.2		133.7
OCH ₃	4.09 (s)	65.9	3.99 (s)	67.5	4.09 (s)	66.6	4.11 (s)	66.1	4.09 (s)	66.6
1'	5.34 (s)	42.5	5.37 (s)	49.7	5.76 (s)	46.4	5.46 (s)	41.0	5.55 (s)	46.0
2''	7.73 (s)	137.6					8.55 (s)	144.0		
3''			7.38 (d, $J=1.4$)	140.9					7.95 (s)	151.9
4''	6.92 (s like)	128.4	6.16 (dd, $J=2.0, 1.4$)	107.7	7.66 (s like)	134.5				
5''	7.12 (s like)	120.1	7.50 (d, $J=2.0$)	131.9	7.87 (s like)	125.4	8.55 (s)	144.0	8.44 (s)	144.5

Measured in CD₃OD

Table 7 新規含窒素化合物 **26–30** の ¹H, ¹³C NMR データ

これらの反応機構を考察したところ、目的の化合物は不安定な 3-(isothiocyanatomethyl)-1-methoxy-1*H*-indole と imidazole との反応によって生成されたイミダゾリウム塩の脱プロトン化によって得られることが推定された (推定反応機構 1, Fig. 23). 一方で、不安定な 3-(isothiocyanatomethyl)-1-methoxy-1*H*-indole から SCN⁻ が脱離しカチオンを形成して imidazole と反応する機構も考えられた (推定反応機構 2, Fig. 24).

また、求核剤として imidazole の代わりに pyrrole および第一級アミンである propylamine を使用したところ、目的化合物である 1-methoxyindole 誘導体の生成は確認されなかった. 求核剤として用いた化合物の塩基性を比較したところ、反応が進行しなかった pyrrole は反応が進行した imidazole, pyrazole, triazole よりも塩基性が弱く, propylamine は imidazole, pyrazole, triazole よりも塩基性が強いことから、本反応の進行は塩基性の強さに依存しないと考えられた.

本反応が推定反応機構 1 において進行するとした場合、求核剤として imidazole, pyrazole, triazole を用いると, pyrrole, propylamine を用いるよりも生成する塩が共鳴により比較的安定であるため、反応が進行し易いのではないかと考えた. 従って、本反応では推定反応機構 1 により反応が進行している可能性が高いと考えられた.

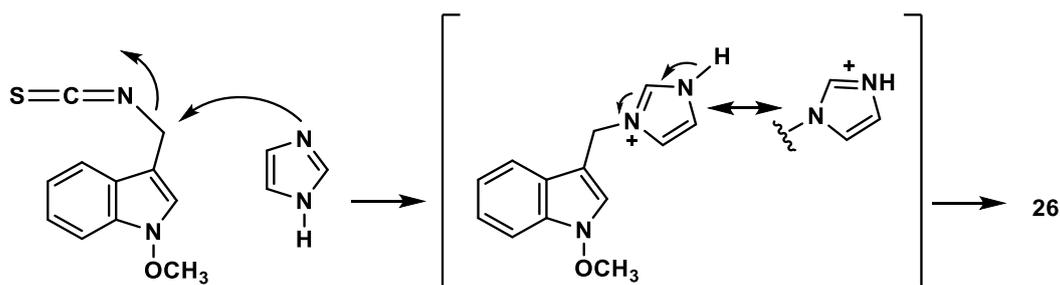


Fig. 23 化合物 26 の推定反応機構 1

[*Heterocycles* (2021), Scheme 4 より一部を改変して引用]

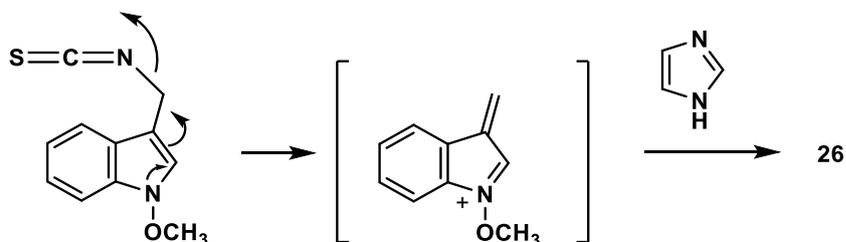


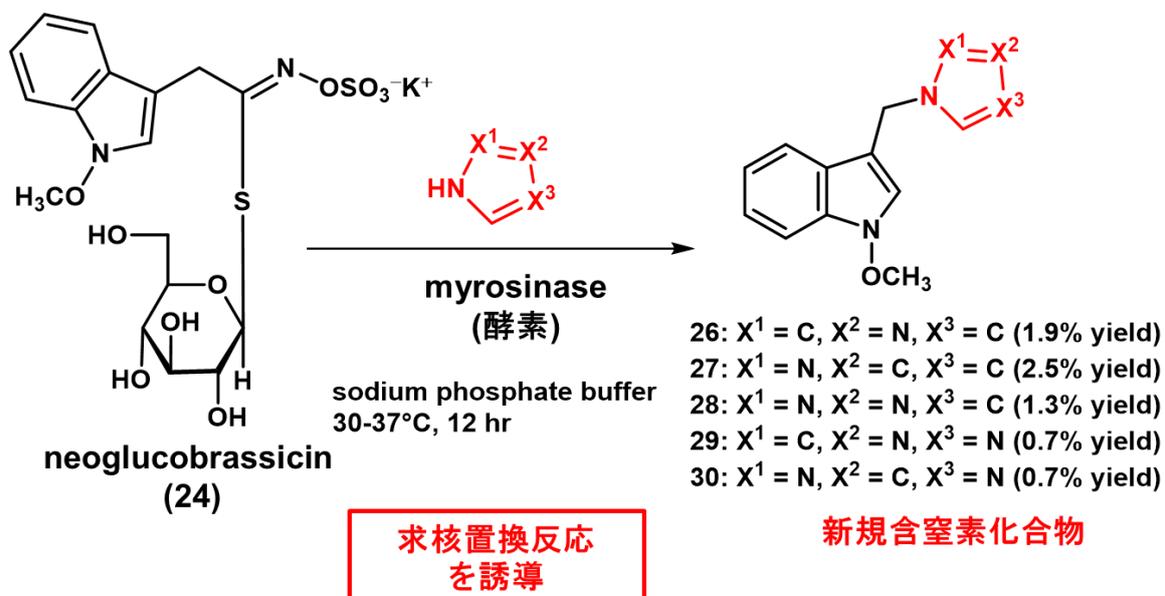
Fig. 24 化合物 26 の推定反応機構 2

小括

第二章では, spirobrassinin の生合成経路の中で 3-indolylmethyl isothiocyanate が不安定であることに着目し, その反応性の高さを利用して含窒素複素環化合物を得ることを目的とした.

アブラナ科ホソバタイセイ (*I. tinctoria*) より glucosinolate である neoglucobrassicin (**24**) 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新規含窒素化合物 **26–30** を得, isothiocyanate への求核反応が進行することを確認した.

また, この方法は “green and sustainable chemistry” の例として重要と考えられる. この合成法における目的化合物の収率については改善する必要があるが, 医薬品シーズの開発の一助となることが期待される.



結論

第一章では、カブ (*B. rapa* var. *rapa*) の酵素群を利用した spirobrassinin 類の立体選択的合成について述べた。Spirobrassinin (7) および誘導体を簡便かつ立体選択的に合成することを目的とし、アブラナ科植物のファイトアレキシン合成酵素群を利用することで spirobrassinin (7) および誘導体を簡便かつ立体選択的に合成できるのではないかという仮説を立て研究を進めた。種々の条件検討の結果、L-tryptophan から (S)-(-)-spirobrassinin (7) が 90–97% ee で得られ、5-methyl-DL-tryptophan から (S)-(-)-5-methylspirobrassinin (9) が 81% ee (収率: 0.2%) で得られた。この反応においては、多段階に酵素反応が進行していると考えられた。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。

第二章では、spirobrassinin の生合成経路の中で 3-indolylmethyl isothiocyanate が不安定であることに着目し、その反応性の高さを利用して化合物を得ることを目的とした。アブラナ科ホソバタイセイ (*I. tinctoria*) より neoglucobrassicin (24) 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新規含窒素化合物 26–30 を得、isothiocyanate への求核反応が進行することを確認した。

結論として、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立体選択的に天然型、半天然型 spirobrassinin 類を得た。収率の向上のためさらなる改良が必要と考えられるが、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。

謝辞

本研究に際し、終始ご懇意なるご指導とご高配を賜りました京都薬科大学生薬学分野 松田久司教授、ならびに中村誠宏准教授、中嶋聡一助教に深甚なる謝意を表します。

本論文の作成に際し、副査としてご助言いただくとともに、細部にわたってご指導をいただきました薬品製造学分野 山下正行教授、薬品分析学分野 武上茂彦教授に深謝申し上げます。

本研究に際し、高分解能質量測定におきまして、大変お世話になりました共同利用機器センター 長谷川功紀准教授、服部恭尚講師、安東友繁助教に深謝いたします。

本研究に際し、ご助言ご討論をいただきました細胞生物学分野 藤室雅弘教授、公衆衛生学分野 松本崇宏助教、薬用植物園 月岡淳子助教、生薬学分野 尾田好美博士、松本朋子博士、太田智絵博士、小川慶子博士、深谷匡博士に感謝申し上げます。

また、本研究の一部は日本学術振興会科学研究費の助成を受けたものです。深く御礼申し上げます。

そして、本研究の遂行にあたり、実験にご協力いただきました 中村紗子氏、角岡常成氏、濱本桜子氏、宮川晃也氏をはじめとする京都薬科大学生薬学分野の皆様には厚く御礼申し上げます。

実験の部

水素核磁気共鳴スペクトル (^1H NMR), 炭素核磁気共鳴スペクトル (^{13}C NMR), Hetero-nuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC) スペクトル, Hetero-nuclear Multiple-Bond Connectivity (HMBC), NOE correlated spectroscopy (NOESY) スペクトルは JEOL JNM-ECA 600K (600 MHz) を用いて測定した. 旋光度は Horiba SEPA-300 digital polarimeter ($l = 5$ cm)を用いて測定した. 赤外吸収スペクトル (IR) は JASCO FT/IR-4600 Fourier Transform Infrared Spectrometer を用いて測定した. 高分解能質量分析 (High resolution ESI-MS, EI-MS) および質量分析 (ESI-MS) は SHIMADZU LCMS-IT-TOF (HRESI-MS), JEOL JMS-GCMATE mass spectrometer (HREI-MS) および Agilent Technologies Quadrupole LC/MS 6130 (ESI-MS)を用いて測定した. 高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS) については, 高速液体クロマトグラフは Nexera UHPLC システム, トリプル四重極型質量分析計は SHIMADZU LCMS 8040 を用いた. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は, ポンプ: SHIMADZU LC-6AD, LC-20AR, 紫外可視分光光度計検出器: SHIMADZU SPD-20A および SPD-10A, SPD-10AVP を用いた. カラムクロマトグラフィーの吸着剤は, 順相系: シリカゲル Silica Gel BW-200 (Fuji Silysia Chemical, 150–350 mesh), 逆相系: Cosmosil140C₁₈-OPN (Nacalai Tesque) を用いた. 合成吸着剤は DIAION ion exchange Resin HP-20 (MISUBISHI CHEMICAL CORPORATION) を用いた. 薄層クロマトグラフィー (TLC) には silica gel 60F₂₅₄ (Merck, 順相), RP-18 60F₂₅₄ (Merck, 逆相) を使用し, スポットの検出は UV (254, 365 nm), ニンヒドリンスプレー (和光純薬社製試薬), および 1% $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2/10\%\text{H}_2\text{SO}_4$ 水溶液を噴霧し, 加熱時の呈色により行った. Peroxidase (from Horseradish) は富士フィルム和光純薬株式会社より購入したものをを用いた. Myrosinase (from *Sinapis alba*) は Sigma-Aldrich より購入したものをを用いた.

第一章の実験

植物の入手

カブ (*Brassica rapa* var. *rapa*) は青森産および千葉県産を農業協同組合 (JA) より購入した。ハクサイ (*B. rapa* var. *pekinensis*), キャベツ (*B. oleracea* var. *capitata*), カリフラワー (*B. oleracea* var. *botrytis*) は京都市市場品を用いた。

第一節の実験

カブからの spirobrassinin (7) の単離

カブ新鮮胚軸を切断し室温遮光条件下で 24 時間静置した後、殺菌灯 (30 W, 254 nm) を 60 分間照射した。さらに室温遮光条件下で 72 時間静置した後、カブ (4.38 kg) に MeOH (1.7 L) を加えミキサーにて粉碎し室温で 2 時間抽出した。MeOH 抽出液を減圧下溶媒留去し MeOH 抽出エキス (744 mg) を得た。AcOEt と H₂O にて液-液分配を行い AcOEt 分画 (178 mg, 0.004%) を得た。得られた AcOEt 分画を逆相 HPLC [HPLC column: YMC triart C18 (5 μm particle size, 250 × 10 mm i.d.); detection: UV (220 nm); mobile phase: MeOH-H₂O (65:35); flow rate: 4.5 mL/min; column temperature: 25 °C] にて精製し, spirobrassinin (7, 3.0 mg, 0.00007%) を得た。構造決定は ¹H NMR, ¹³C NMR, および HREI-MS 分析に基づいて行った。また, 7 の旋光度を文献値と比較することで絶対配置を *S* と決定した。キラルカラムを用いた HPLC 分析 [column: CHIRALCEL OJ-H (5 μm particle size, 250 × 4.6 mm i.d.); detection: UV (250 nm); mobile phase: 2-propanol:*n*-hexane (10:90); flow rate: 1.0 mL/min; column temperature: 25 °C; injection volume: 20 μL] によりエナンチオマー過剰率は 91% *ee* と決定した。

(*S*)-(-)-Spirobrassinin (7)

Yellow oil: $[\alpha]_D^{23} -53.7$ [CHCl₃, compound with the enantiomeric excess (91% *ee*) was used for the measuring of the optical rotation. reference data: $[\alpha]_D^{20} -53$ (c=0.05, CHCl₃); High resolution EI-MS: Calcd for C₁₁H₁₀N₂OS₂ (M)⁺: 250.0235; Found 250.0231; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ 7.30 (br d, 1H, *J* = 7.7), 7.24 (ddd, 1H, *J* = 7.7, 7.7, 1.3), 7.04 (ddd, 1H, *J* = 7.7, 7.7, 1.0), 6.88 (br d, 1H, *J* = 7.7), 4.53 (d, 1H, *J* = 15.2), 4.43 (d, 1H, *J* = 15.2), 2.59 (s, 3H); ¹³C NMR (600 MHz, CD₃OD) δ 179.7, 166.5, 142.1, 132.2, 130.9, 125.2, 124.4, 111.4, 75.5, 65.9, 15.7.

カブへの UV 照射による spirobrassinin (7) の生成確認

カブ新鮮胚軸を切断しスライスの各表面に星型 (最大直径 : 3 cm, 深さ : 1 cm) の穴を開けた。室温遮光条件下で 24 時間静置した後、殺菌灯 (30 W, 254 nm) を 60 分間照射した。UV 照射しないものをコントロールとして使用した。照射直後に界面活性剤 Tween-80 (0.1%), DMSO (1.0%) を含む水溶液 [計 6.0 mL, 1 スライスあたり 2.0 mL (カブ 1 個あたり 4.0 mL)] をカブの穴に投与した。各スライスを室温下暗所で 72 時間静置し, 穴の溶液を回収した。各溶液を AcOEt と H₂O にて液-液分配を行い AcOEt 分画を得た。減圧下溶媒留去した AcOEt 分画を 2.0 mL メスフラスコを用いて MeOH で容量調製した。各溶液を HPLC 分析し [column: YMC triart C18, 250 × 4.6 mm i.d.; mobile phase: 65% MeOH; detection: UV (220 nm); flow rate: 1.0 mL/min; column temperature: 25°C injection volume: 10 μL.], 7 の定性分析を行った

ファイトアレキシン合成酵素の発現確認

UV 照射または非照射のカブのスライスを、プロテイナーゼ阻害剤 (Thermo Fisher Scientific) を含む溶解バッファーでホモジナイズし 10,000 xg で 10 分間遠心分離した。Amicon Ultra-15 10K (Merck Millipore Ltd.) を使用して 10 kDa で限外濾過した後、濃縮タンパク質を 2%SDS 含有バッファーで煮沸して変性させた。タンパク質濃度は Protein Assay BCA Kit (Nacalai Tesque) を使用して決定した。各レーンあたり 5 µg のタンパク質を SDS-PAGE で処理した。電気泳動後 Silver Stain MS Kit (Fujifilm Wako Pure Chemical) を使用した銀染色によりタンパク質を確認した。

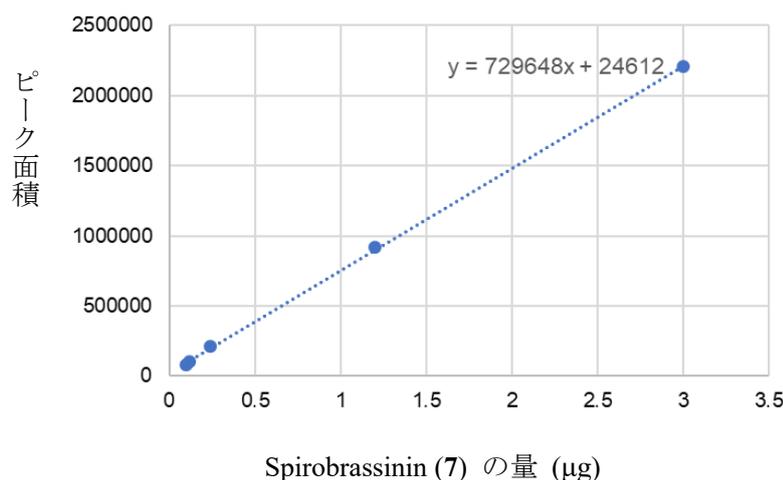
アブラナ科植物への UV 照射による spirobrassinin (7) の生成確認

アブラナ科植物ハクサイ (*B. rapa* var. *pekinensis*, 130.6 g), キャベツ (*B. oleracea* var. *capitata*, 135.4 g), カリフラワー (*B. oleracea* var. *botrytis*, 41.0 g) を室温遮光条件下で 24 時間静置した後、殺菌灯 (30 W, 254 nm) を 60 分間照射した。さらに室温遮光条件下で 72 時間静置した後、それぞれに MeOH (300 mL) を加えミキサーにて粉碎し室温で抽出した。各 MeOH 抽出液を減圧下溶媒留去し MeOH 抽出エキスを得た。AcOEt と H₂O にて液-液分配を行い AcOEt 分画を得た。AcOEt 分画を MeOH にて溶解し、逆相 HPLC [column: YMC triart C18, 250 × 4.6 mm i.d.; mobile phase: 65% MeOH; detection: UV (220 nm); flow rate: 1.0 ml/min; column temperature: 25°C] にて分析を行った。

第二節の実験

Spirobrassinin (7) の検量線の作成

Spirobrassinin (7) (0.6 mg) を 5 mL メスフラスコに入れ MeOH で容量調製した。この溶液を標準溶液 (120 µg/mL) として使用した。検量線を作成するための各溶液 (3.84 µg/mL, 4.8 µg/mL, 9.6 µg/mL, 48 µg/mL) は、標準溶液を希釈して調製した。各溶液をそれぞれ次の条件下で HPLC 分析を行った [HPLC column: YMC triart C18 (5 µm particle size, 250 × 4.6 mm i.d.); detection: UV (220 nm); mobile phase: MeOH-H₂O (65:35); flow rate: 1.0 mL/min; column temperature: 25 °C; injection volume: 25 µL.]. 検量線の回帰式は $y = 729648x + 24612$ [y : ピーク面積, x : 7 の量 (µg)], 相関係数 (R^2) は 0.9998 であり, 測定範囲 (3.84–120 µg / mL) において優れた直線性を示した。

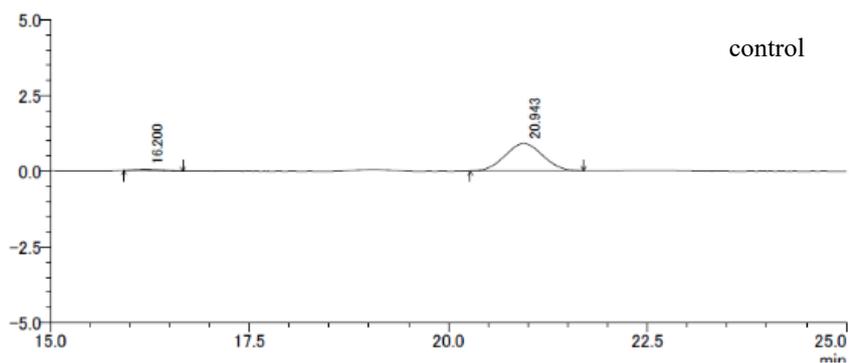


Spirobrassinin (7) の検量線

カブへの brassinin (8) 添加により生成する 7 の定量分析およびエナンチオマー過剰率の決定

カブ新鮮胚軸を半分切断しスライスの各表面に星型 (最大直径 : 3 cm, 深さ : 1 cm) の穴を開けた。室温遮光条件下で 24 時間静置した後, 殺菌灯 (30 W, 254 nm) を 60 分間照射した。照射直後に界面活性剤 Tween-80 (0.1%), DMSO (1.0%) を含む brassinin (8, 0, 0.4, 1.2, 2.0, および 4.0 mg) の水溶液 [計 4.0 mL, 1 スライスあたり 2.0 mL (カブ 1 個あたり 4.0 mL)] をカブの穴に投与した。各スライスを室温遮光条件下で 48 時間静置し, サンプルの濃度ごとに穴の中の溶液を回収した。各溶液を AcOEt と H₂O にて液-液分配を行い AcOEt 分画を得た。減圧下溶媒留去した AcOEt 分画を 2.0 mL メスフラスコに入れ MeOH で容量調製した。この溶液を化合物 7 の定量分析およびエナンチオマー過剰率の決定に使用した。定量分析は, 各溶液を HPLC 分析し [column: YMC triart C18, 250 × 4.6 mm i.d.; mobile phase: 65% MeOH; detection: UV (220 nm); flow rate: 1.0 mL/min; column temperature: 25°C injection volume: 10 μL.], 検量線より 7 の含量を計算した。

7 のエナンチオマー過剰率を求めるため, 各溶液を HPLC にて精製した [column: YMC triart C18, 250 × 10 mm i.d.; mobile phase: 65% MeOH; detection: UV (220 nm); flow rate: 4.0 mL/min; column temperature: 25°C]. 得られた 7 を MeOH に溶解し, 次の条件下で HPLC 分析を行った [column: CHIRALCEL OJ-H (5 μm particle size, 250 × 4.6 mm i.d.); detection: UV (250 nm); mobile phase: 2-propanol:n-hexane (10:90); flow rate: 1.0 mL/min; column temperature: 25 °C; injection volume: 20 μL].

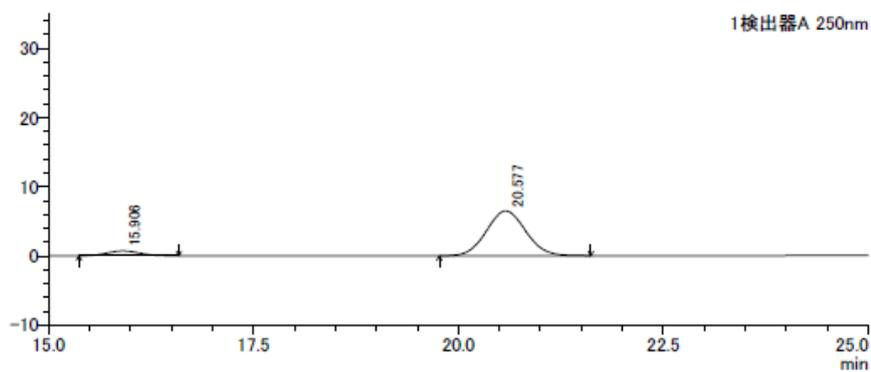


(*R*)-(+)-spirobrassinin: Retention time: 16.20 min; Peak area: 1376

(*S*)-(-)-spirobrassinin: Retention time: 20.94 min; Peak area: 30039

The (*S*)-enantiomeric excess: 91% *ee*.

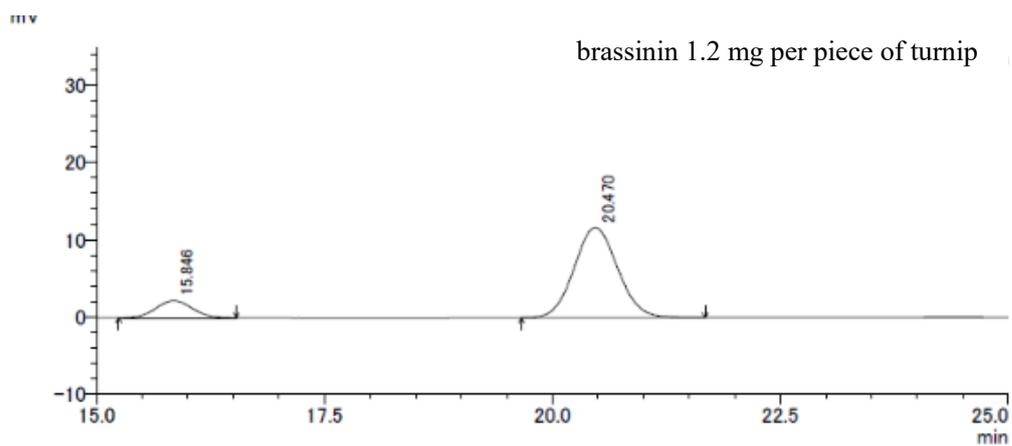
brassinin 0.4 mg per piece of turnip



(*R*)-(+)-spirobrassinin: Retention time: 15.91 min; Peak area: 19312

(*S*)-(-)-spirobrassinin: Retention time: 20.58 min; Peak area: 216475

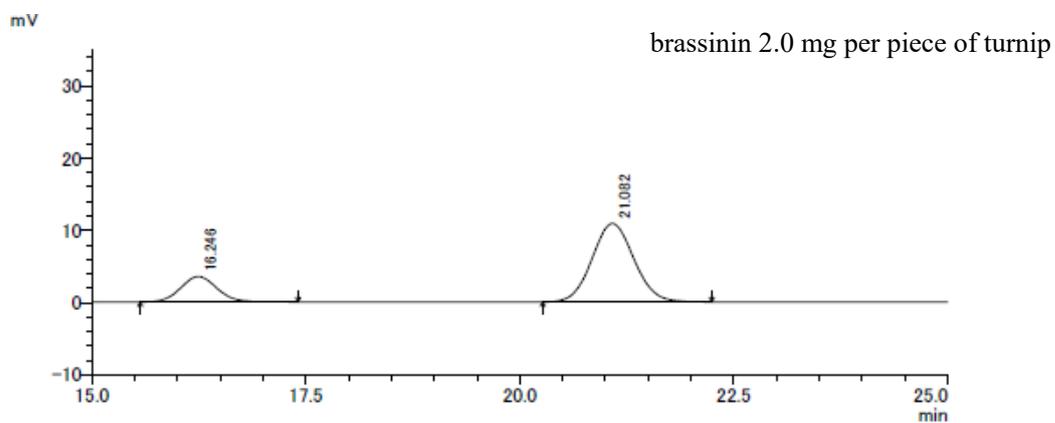
The (*S*)-enantiomeric excess: 84% *ee*.



(*R*)-(+)-spirobrassinin: Retention time: 15.85 min; Peak area: 61523

(*S*)-(-)-spirobrassinin: Retention time: 20.47 min; Peak area: 389417

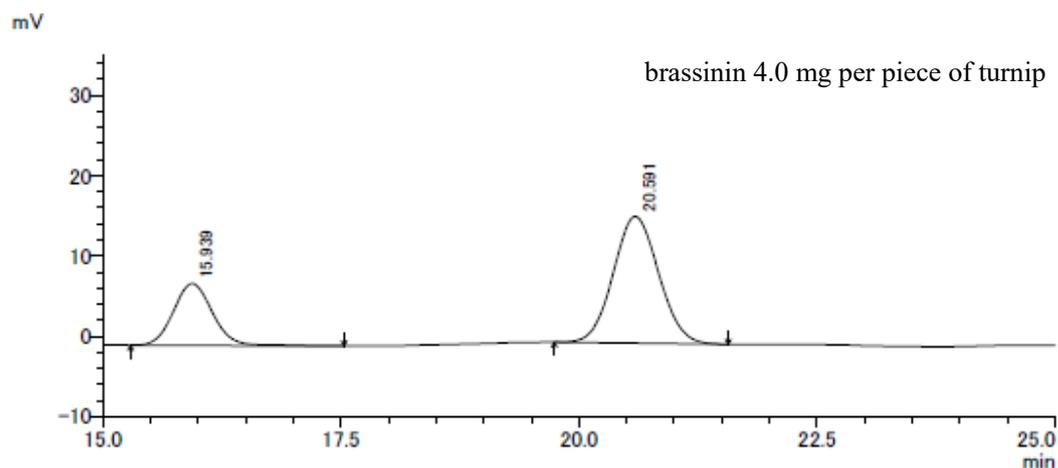
The (*S*)-enantiomeric excess: 73 % *ee*.



(*R*)-(+)-spirobrassinin: Retention time: 16.25 min; Peak area: 103203

(*S*)-(-)-spirobrassinin: Retention time: 21.08 min; Peak area: 369545

The (*S*)-enantiomeric excess: 57% *ee*.



(*R*)-(+)-spirobrassinin: Retention time: 15.94 min; Peak area: 219760

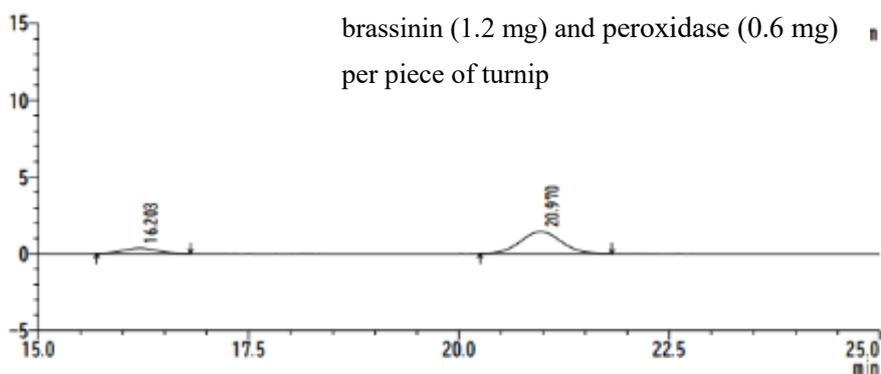
(*S*)-(-)-spirobrassinin: Retention time: 20.59 min; Peak area: 524043

The (*S*)-enantiomeric excess: 41% *ee*.

カブへの brassinin (8) とペルオキシダーゼ添加により生成する 7 のエナンチオマー過剰率の決定

カブ新鮮胚軸を半分切断しスライスの各表面に星型 (最大直径 : 3 cm, 深さ : 1 cm) の穴を開けた。室温遮光条件下で 24 時間静置した後、殺菌灯 (30 W, 254 nm) を 60 分間照射した。照射直後に界面活性剤 Tween-80 (0.1%), DMSO (1.0%) を含む brassinin (8, 1.8 mg) と horse radish peroxidase (0.9 mg) の水溶液 [計 6.0 mL, 1 スライスあたり 2.0 mL (カブ 1 個あたり 4.0 mL)] をカブの穴に投与した。各スライスを室温遮光条件下で 48 時間静置し、穴の中の溶液を回収した。溶液を AcOEt と H₂O にて液-液分配を行い AcOEt 分画を得た。減圧下溶媒留去した AcOEt 分画を 2.0 mL メスフラスコに入れ MeOH で容量調製した。この溶液をエナンチオマー過剰率の決定に使用した。

7 のエナンチオマー過剰率を求めるため、各溶液を HPLC にて精製した [column: YMC triart C18, 250 × 10 mm i.d.; mobile phase: 65% MeOH; detection: UV (220 nm); flow rate: 4.0 mL/min; column temperature: 25°C]. 得られた 7 を MeOH に溶解し、次の条件下で HPLC 分析を行った [column: CHIRALCEL OJ-H (5 μm particle size, 250 × 4.6 mm i.d.); detection: UV (250 nm); mobile phase: 2-propanol:n-hexane (10:90); flow rate: 1.0 mL/min; column temperature: 25 °C; injection volume: 20 μL].



(*R*)-(+)-spirobrassinin: Retention time: 16.20 min; Peak area: 9773

(*S*)-(-)-spirobrassinin: Retention time: 20.97 min; Peak area: 47988

The (*S*)-enantiomeric excess: 66 % *ee*.

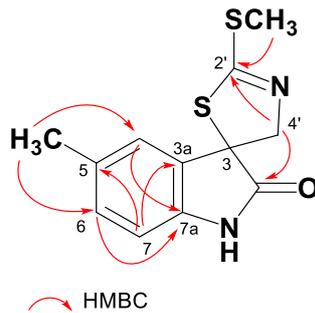
カブへの 5-methylbrassinin (18) 添加により生成する 9 の単離

カブ新鮮胚軸を半分切断しスライスの各表面に星型 (最大直径 : 3 cm, 深さ : 1 cm) の穴を開けた。室温遮光条件下で 24 時間静置した後, 殺菌灯 (30 W, 254 nm) を 60 分間照射した。照射直後に界面活性剤 Tween-80 (0.1%), DMSO (10.0%) を含む 5-methylbrassinin (18, 5.0 mg, 2.0 mmol/L) の水溶液 [計 10.0 mL, 1 スライスあたり 2.0 mL (カブ 1 個あたり 4.0 mL)] をカブの穴に投与した。各スライスを室温遮光条件下で 48 時間静置し, 穴の中の溶液を回収した。溶液を AcOEt と H₂O にて液-液分配を行い AcOEt 分画を得た。減圧下溶媒留去した AcOEt 分画を 2.0 mL メスフラスコに入れ MeOH で容量調製した。

溶液を HPLC にて精製し [column: YMC triart C18, 250 × 10 mm i.d.; mobile phase: 65% MeOH; detection: UV (220 nm); flow rate: 3.5 ml/min; column temperature: 25°C], 新規化合物 5-methylspirobrassinin (9, 0.4 mg, 8.0%) を得た。構造決定は 1DNMR および ESIMS 分析に基づいて行った。

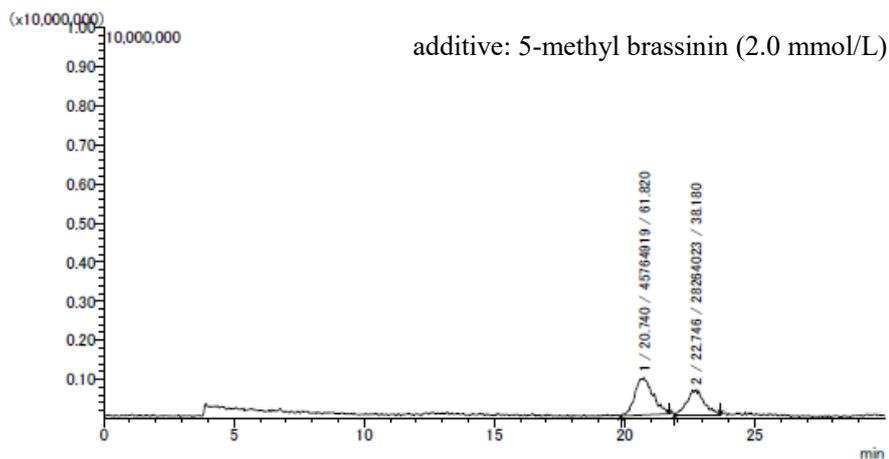
(*S*)-(-)-5-Methylspirobrassinin (9)

Yellow oil: $[\alpha]_D^{23} -11.9$ [$c = 0.07$, CHCl₃, compound with the enantiomeric excess (57% *ee*) was used for the measuring of the optical rotation.]; HREI-MS: Calcd for C₁₂H₁₂N₂OS₂ (M)⁺: 264.0391; Found 264.0392; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ 7.13 (s, 1H), 7.07 (d, 1H, $J = 7.9$), 6.77 (d, 1H, $J = 7.9$), 4.52 (d, 1H, $J = 15.2$), 4.43 (d, 1H, $J = 15.2$), 2.60 (s, 3H), 2.28 (s, 3H); ¹³C NMR (600 MHz, CD₃OD) δ 179.8, 166.6, 139.5, 134.3, 132.3, 131.3, 125.7, 111.2, 75.6, 66.0, 21.0, 15.7.; IR (ATR): 1717, 1622, 1492 cm⁻¹.



カブへの 5-methylbrassinin (**18**) の添加により生成する **9** のエナンチオマー過剰率の決定

調製した **9** の溶液の LC-MS 分析を行った[column: Ceramospher RU-1 (5 μm particle size, 250 \times 4.6 mm i.d.); detection: UV (254 nm); mobile phase: MeOH; flow rate: 0.3 mL/min; column temperature: 25 $^{\circ}\text{C}$; injection volume: 10 μL]. MS 測定は Q3 スキャンモードにて, 以下の測定条件で行った: nebulizer gas flow (3 L/min), drying gas flow (15 L/min), desolvation line (DL) temperature (250 $^{\circ}\text{C}$), heat block (HB) temperature (400 $^{\circ}\text{C}$). **9** はポジティブイオンで 287 [M+Na]⁺ として検出された. ピーク面積から計算したところ, **9** のエナンチオマー過剰率は 24 % *ee* であった.



(*S*)-(-)-5-methyl spirobrassinin: Retention time: 20.74 min; Peak area: 45764919

(*R*)-(+)-5-methyl spirobrassinin: Retention time: 22.75 min; Peak area: 28264023

The (*S*)-enantiomeric excess: 24 % *ee*

カブへの **20** の添加により生成する **23** の単離

カブ新鮮胚軸を半分切断しスライスの各表面に星型 (最大直径 : 3 cm, 深さ : 1 cm) の穴を開けた。室温遮光条件下で 24 時間静置した後, 殺菌灯 (30 W, 254 nm) を 60 分間照射した。照射直後に界面活性剤 Tween-80 (0.1%), DMSO (0.5%) を含む (**20**, 35.1 mg, 2.0 mmol/L) の水溶液 [計 70.2 mL, 1 スライスあたり 2.3 mL (カブ 1 個あたり 4.7 mL)] をカブの穴に投与した。各スライスを室温遮光条件下で 48 時間静置し, 穴の中の溶液を回収した。溶液を AcOEt と H₂O にて液-液分配を行い AcOEt 分画を得た。減圧下溶媒留去した AcOEt 分画を 2.0 mL メスフラスコに入れ MeOH で容量調製した。

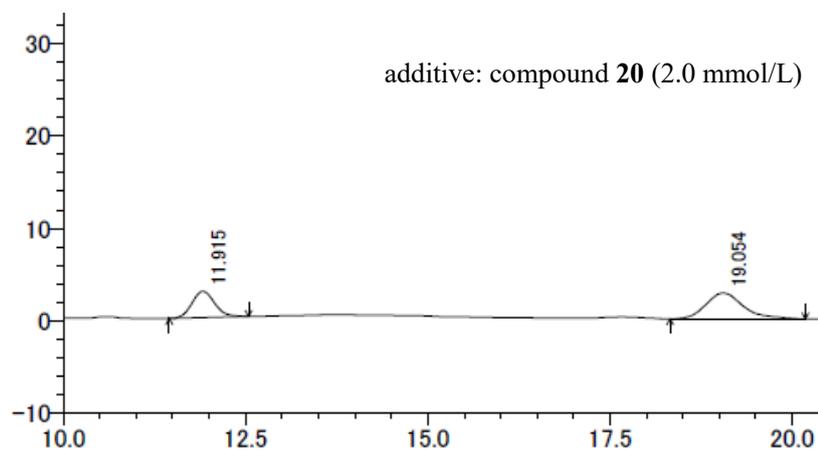
溶液を HPLC にて精製し [column: YMC triart C₁₈, 250 × 10 mm i.d.; mobile phase: 65% MeOH; detection: UV (220 nm); flow rate: 4.0 ml/min; column temperature: 25°C], (**23**, 0.4 mg, 1.1%) を得た。構造決定は 1DNMR および ESIMS 分析に基づいて行った。また, **23** の旋光度を測定し, **7** の旋光度と比較することで絶対配置を *S* と決定した。

Compound **23**

Yellow oil; [α]_D²³ -8.9 [*c* = 0.04, CHCl₃, compound with the enantiomeric excess (23% *ee*) was used for the measuring of the optical rotation.]; HREI-MS: Calcd for C₁₂H₁₂N₂OS₂ (M)⁺: *m/z* 264.0391; Found *m/z* 264.0390; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ 7.27 (br d, 1H, *J* = 7.0), 7.24 (br dd, 1H, *J* = 7.7, 7.7), 7.04 (br dd, 1H, *J* = 7.7, 7.7), 6.87 (br d, 1H, *J* = 7.7), 4.52 (d, 1H, *J* = 15.3), 4.43 (d, 1H, *J* = 15.3), 3.18 (q, 2H, *J* = 7.4), 1.37 (t, 3H, *J* = 7.4); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ 179.3, 165.2, 141.6, 131.8, 130.5, 124.8, 124.0, 111.0, 75.2, 65.1, 28.0, 14.7.; IR (ATR): 1717, 1620, 1472 cm⁻¹.

カブへの **20** の添加により生成する **23** のエナンチオマー過剰率の決定

調製した **23** の溶液の LC-MS 分析を行った [column: CHIRALCEL OJ-H (5 μ m particle size, 250 \times 4.6 mm i.d.); detection: UV (250 nm); mobile phase: 2-propanol:n-hexane (10:90); flow rate: 1.0 mL/min; column temperature: 25 $^{\circ}$ C; injection volume: 20 μ L]. **23** のエナンチオマー過剰率は 23 % *ee* であった.



(*R*)-(+)- compound **23**: Retention time: 11.92 min; Peak area: 62053

(*S*)-(-)- compound **23**: Retention time: 19.05 min; Peak area: 100025

The (*S*)-enantiomeric excess: 23 % *ee*.

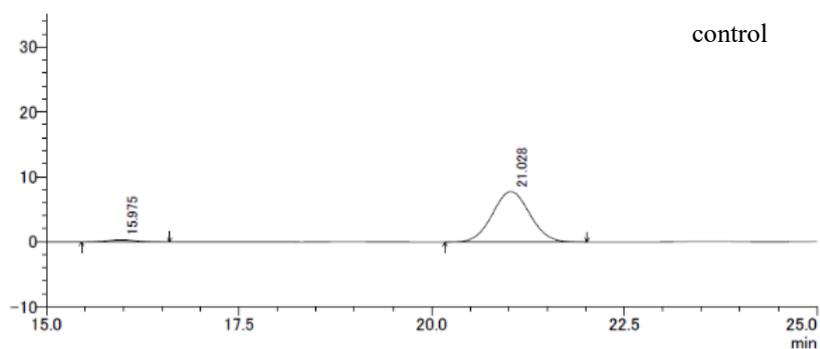
第三節の実験

カブへの L-tryptophan 添加により生成する **7** の定量分析およびエナンチオマー過剰率の決定

カブ新鮮胚軸を半分切断しスライスの各表面に星型 (最大直径 : 3 cm, 深さ : 1 cm) の穴を開けた。室温遮光条件下で 24 時間静置した後, 殺菌灯 (30 W, 254 nm) を 60 分間照射した。照射直後に界面活性剤 Tween-80 (0.1%), DMSO (1.0%) を含む L-tryptophan (Method A: 0, 0.4, 1.2, 2.0, および 4.0 mg) (Method B: 0, 4.0, 8.0, 16, および 32 mg) の水溶液 [計 10.0 mL, 1 スライスあたり 2.0 mL (カブ 1 個あたり 4.0 mL)] をカブの穴に投与した。各スライスを室温遮光条件下で 72 時間静置し, サンプルの濃度ごとに穴の中の溶液を回収した。各溶液を AcOEt と H₂O にて液-液分配を行い AcOEt 分画を得た。減圧下溶媒留去した AcOEt 分画を 2.0 mL メスフラスコに入れ MeOH で容量調製した。この溶液を化合物 **7** の定量分析およびエナンチオマー過剰率の決定に使用した。定量分析は, 各溶液を HPLC 分析し [column: YMC triart C18, 250 × 4.6 mm i.d.; mobile phase: 65% MeOH; detection: UV (220 nm); flow rate: 1.0 mL/min; column temperature: 25°C injection volume: 10 μL.], 検量線より **7** の含量を計算した。

7 のエナンチオマー過剰率を求めるため, 各溶液を HPLC にて精製した [column: YMC triart C18, 250 × 10 mm i.d.; mobile phase: 65% MeOH; detection: UV (220 nm); flow rate: 4.0 mL/min; column temperature: 25°C]. 得られた **7** を MeOH に溶解し, 次の条件下で HPLC 分析を行った [column: CHIRALCEL OJ-H (5 μm particle size, 250 × 4.6 mm i.d.); detection: UV (250 nm); mobile phase: 2-propanol:n-hexane (10:90); flow rate: 1.0 mL/min; column temperature: 25 °C; injection volume: 20 μL].

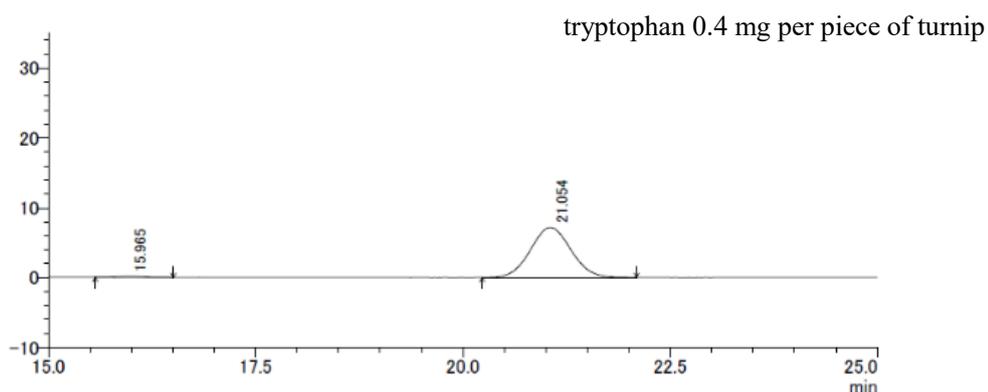
Method A



(*R*)-(-)-spirobrassinin: Retention time: 15.98 min; Peak area: 8575

(*S*)-(+)-spirobrassinin: Retention time: 21.03 min; Peak area: 264139

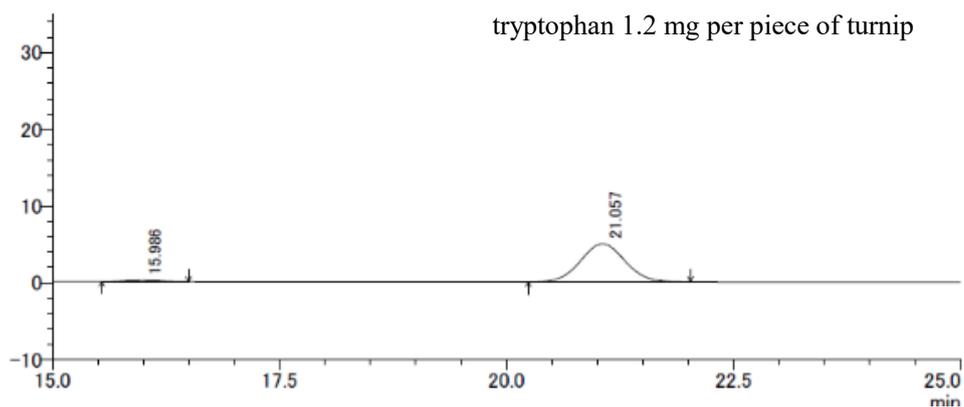
The (*S*)-enantiomeric excess: 94% *ee*.



(*R*)-(-)-spirobrassinin: Retention time: 15.97 min; Peak area: 3831

(*S*)-(+)-spirobrassinin: Retention time: 21.05 min; Peak area: 243988

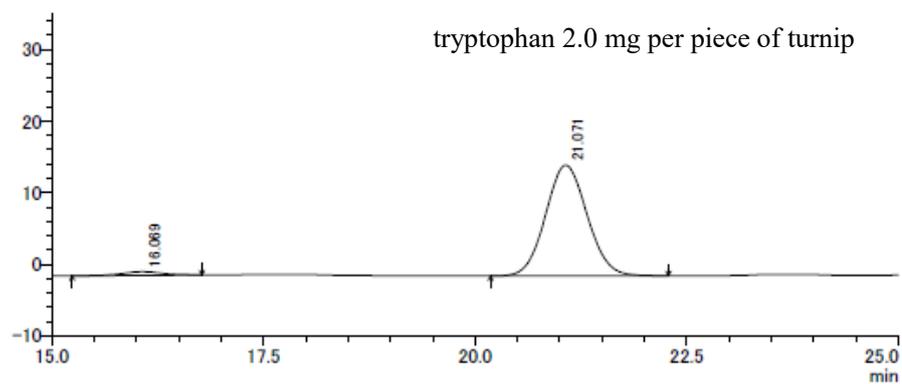
The (*S*)-enantiomeric excess: 97% *ee*.



(*R*)-(-)-spirobrassinin: Retention time: 15.99 min; Peak area: 4346

(*S*)-(+)-spirobrassinin: Retention time: 21.06 min; Peak area: 168768

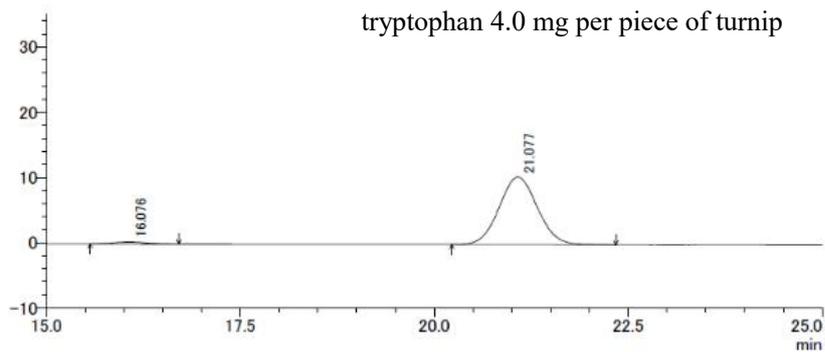
The (*S*)-enantiomeric excess: 95% *ee*.



(*R*)-(+)-spirobrassinin: Retention time: 16.07 min; Peak area: 16864

(*S*)-(-)-spirobrassinin: Retention time: 21.07 min; Peak area: 528960

The (*S*)-enantiomeric excess: 94% *ee*.

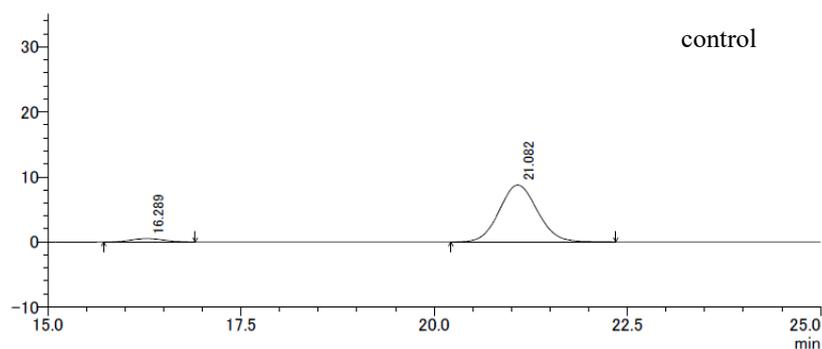


(*R*)-(-)-spirobrassinin: Retention time: 16.08 min; Peak area: 8715

(*S*)-(+)-spirobrassinin: Retention time: 21.08 min; Peak area: 355605

The (*S*)-enantiomeric excess: 95% *ee*.

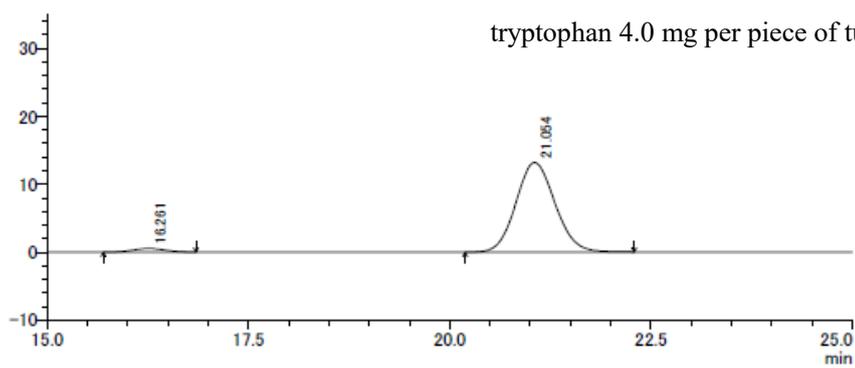
Method B



(*R*)-(+)-spirobrassinin: Retention time: 16.29 min; Peak area: 15237

(*S*)-(-)-spirobrassinin: Retention time: 21.08 min; Peak area: 300447

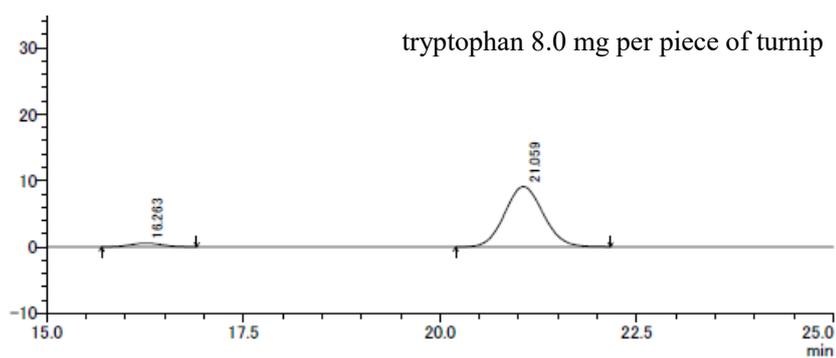
The (*S*)-enantiomeric excess: 90% *ee*.



(*R*)-(+)-spirobrassinin: Retention time: 16.26 min; Peak area: 15225

(*S*)-(-)-spirobrassinin: Retention time: 21.05 min; Peak area: 444701

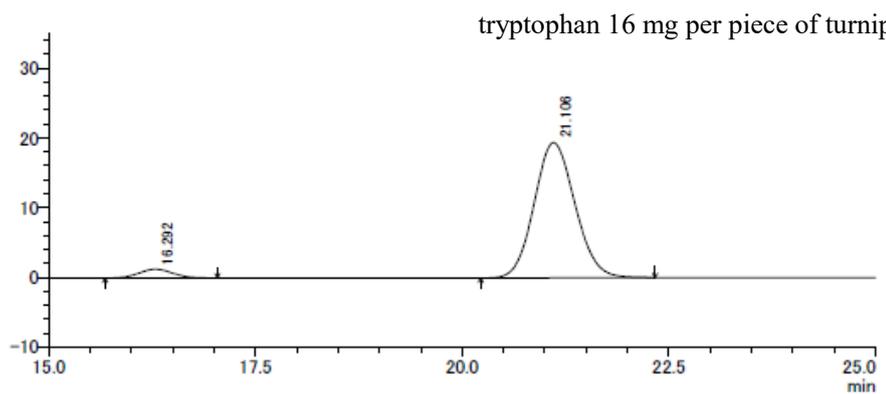
The (*S*)-enantiomeric excess: 93 % *ee*.



(*R*)-(+)-spirobrassinin: Retention time: 16.26 min; Peak area: 15655

(*S*)-(-)-spirobrassinin: Retention time: 21.06 min; Peak area: 310320

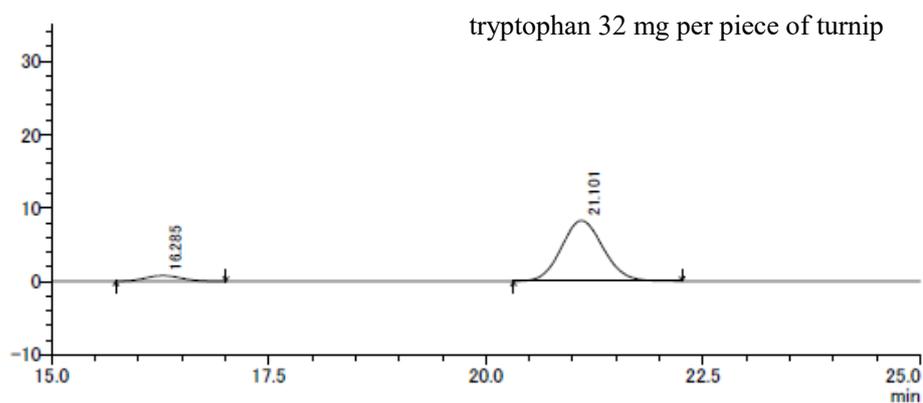
The (*S*)-enantiomeric excess: 90% *ee*.



(*R*)-(+)-spirobrassinin: Retention time: 16.29 min; Peak area: 36435

(*S*)-(-)-spirobrassinin: Retention time: 21.10 min; Peak area: 665840

The (*S*)-enantiomeric excess: 90 % *ee*.



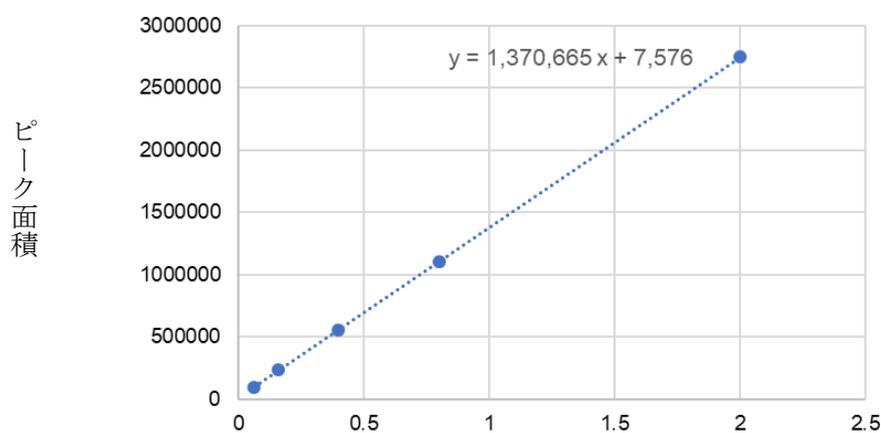
(*R*)-(+)-spirobrassinin: Retention time: 16.29 min; Peak area: 21972

(*S*)-(-)-spirobrassinin: Retention time: 21.10 min; Peak area: 277505

The (*S*)-enantiomeric excess: 85% *ee*.

5-Methylspirobrassinin (9) の検量線の作成

5-Methylspirobrassinin (9) (1.0 mg) を 10 mL メスフラスコに入れ MeOH で容量調製した. この溶液を標準溶液 (100 µg/mL) として使用した. 検量線を作成するための各溶液 (3.2 µg/mL, 8.0 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL) は, 標準溶液を希釈して調製した. 各溶液をそれぞれ次の条件下で HPLC 分析を行った [HPLC column: YMC triart C18 (5 µm particle size, 250 × 4.6 mm i.d.); detection: UV (220 nm); mobile phase: MeOH-H₂O (65:35); flow rate: 1.0 mL/min; column temperature: 25 °C; injection volume: 20 µL]. 検量線の回帰式は $y = 1370665x + 7576$ [y : ピーク面積, x : 9 の量 (µg)], 相関係数 (R^2) は 1.000 であり, 測定範囲 (3.2–100 µg/mL) において優れた直線性を示した.



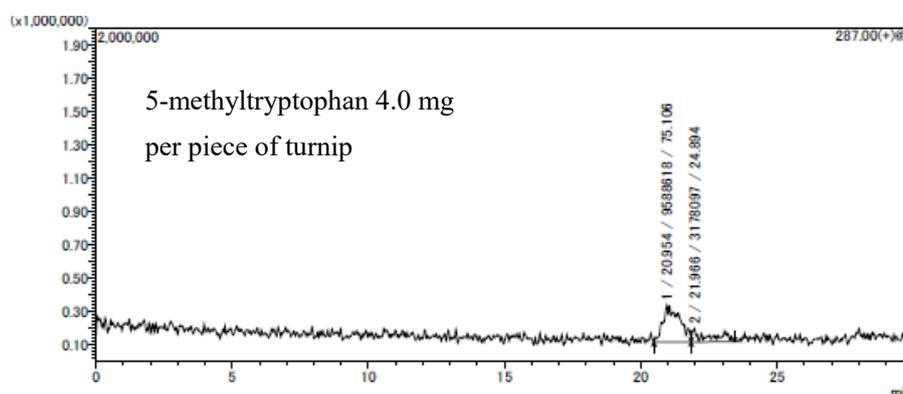
5-Methylspirobrassinin (9) の量 (µg)

5-Methylspirobrassinin (9) の検量線

カブへの 5-methyl DL-tryptophan 添加により生成する **9** の定量分析およびエナンチオマー過剰率の決定

カブ新鮮胚軸を半分切断しスライスの各表面に星型 (最大直径 : 3 cm, 深さ : 1 cm) の穴を開けた。室温遮光条件下で 24 時間静置した後, 殺菌灯 (30 W, 254 nm) を 60 分間照射した。照射直後に界面活性剤 Tween-80 (0.1%), DMSO (1.0%) を含む 5-methyl DL-tryptophan (4.0, 8.0, 16.0 mg) の水溶液 [計 10.0 mL, 1 スライスあたり 2.0 mL (カブ 1 個あたり 4.0 mL)] をカブの穴に投与した。各スライスを室温下暗所で 72 時間静置し, サンプルの濃度ごとに穴の中の溶液を回収した。各溶液を AcOEt と H₂O にて液-液分配を行い AcOEt 分画を得た。減圧下溶媒留去した AcOEt 分画を 2.0 mL メスフラスコに入れ MeOH で容量調製した。この溶液を化合物 **9** の定量分析およびエナンチオマー過剰率の決定に使用した。定量分析は, 各溶液を HPLC 分析し [column: YMC triart C18, 250 × 4.6 mm i.d.; mobile phase: 65% MeOH; detection: UV (220 nm); flow rate: 1.0 mL/min; column temperature: 25 °C injection volume: 20 μL.], 検量線より **9** の含量を計算した。

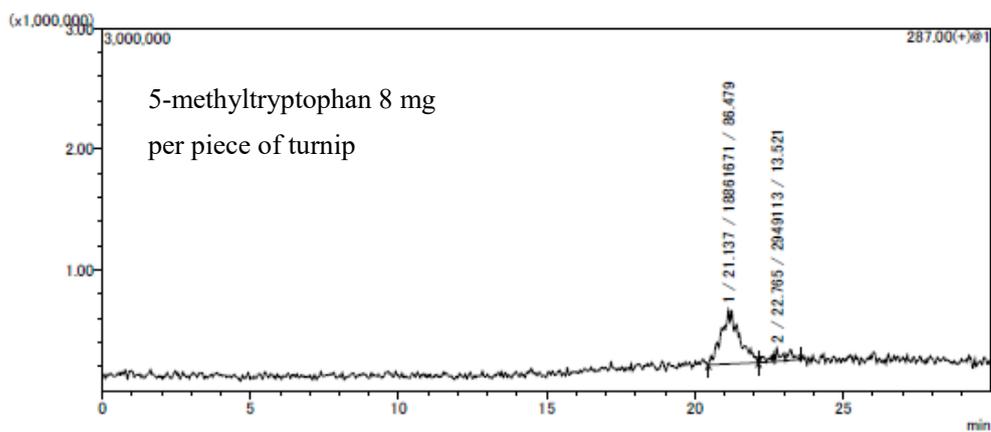
9 のエナンチオマー過剰率を求めるため, 各溶液を次の条件下で LC-MS 分析を行った [column: Ceramospher RU-1 (5 μm particle size, 250 × 4.6 mm i.d.); detection: UV (254 nm); mobile phase: MeOH; flow rate: 0.3 mL/min; column temperature: 25 °C; injection volume: 10 μL]. MS 測定は Q3 スキャンモードにて, 以下の測定条件で行った: nebulizer gas flow (3 L/min), drying gas flow (15 L/min), desolvation line (DL) temperature (250 °C), heat block (HB) temperature (400 °C). **9** はポジティブイオンで 287 [M+Na]⁺ として検出された。



(*S*)-(-)-5-methyl spirobrassinin: Retention time: 20.95 min; Peak area: 9588618

(*R*)-(+)-5-methyl spirobrassinin: Retention time: 21.97 min; Peak area: 3178097

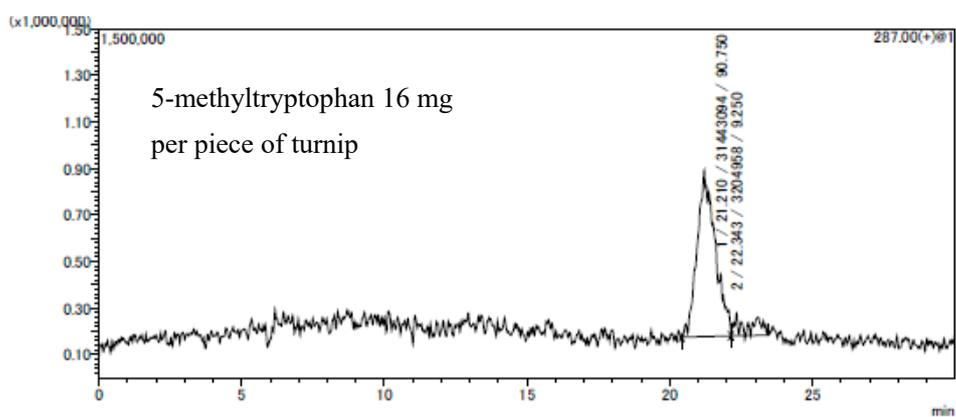
The (*S*)-enantiomeric excess: 50 % *ee*.



(*S*)-(-)-5-methyl spirobrassinin: Retention time: 21.14 min; Peak area:18861671

(*R*)-(+)-5-methyl spirobrassinin: Retention time: 22.77 min; Peak area: 2949113

The (*S*)-enantiomeric excess: 73 % *ee*.



(*S*)-(-)-5-methyl spirobrassinin: Retention time: 21.21 min; Peak area: 31443094

(*R*)-(+)-5-methyl spirobrassinin: Retention time: 22.34 min; Peak area: 3204958

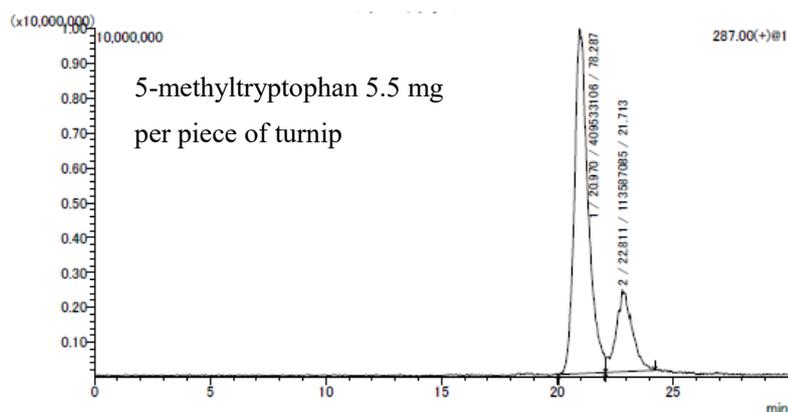
The (*S*)-enantiomeric excess: 81 % *ee*.

カブへの 5-methyl DL-tryptophan 添加により生成する **9** の単離

カブ新鮮胚軸を半分切断しスライスの各表面に星型 (最大直径 : 3 cm, 深さ : 1 cm) の穴を開けた。室温遮光条件下で 24 時間静置した後、殺菌灯 (30 W, 254 nm) を 60 分間照射した。照射直後に界面活性剤 Tween-80 (0.1%), DMSO (0.5%) を含む 5-methyl DL-tryptophan (329 mg) [5.5 mg, カブ 1 個あたり 0.025 mmol] の水溶液 [計 315 mL (カブ 1 個あたり 5.25 mL)] をカブの穴に投与した。各スライスを室温遮光条件下で 72 時間静置し、穴の中の溶液を回収した。溶液を AcOEt と H₂O にて液-液分配を行い AcOEt 分画を得た。減圧下溶媒留去した AcOEt 分画を MeOH に溶解し HPLC を用いて精製し [column: YMC triart C18, 250 × 4.6 mm i.d.; mobile phase: 65% MeOH; detection: UV (220 nm); flow rate: 4.0 ml/min; column temperature: 25°C], (**9**, 0.7 mg, 0.18 %) を得た。構造決定は 1D NMR, および ESIMS 分析に基づいて行った。また、**9** の旋光度を測定し、**7** の旋光度と比較することで絶対配置を *S* と決定した。

カブへの 5-methyl DL-tryptophan 添加により生成する **9** のエナンチオマー過剰率の決定

得られた **9** を MeOH で溶解し、LC-MS 分析を行った [column: Ceramospher RU-1 (5 μm particle size, 250 × 4.6 mm i.d.); detection: UV (254 nm); mobile phase: MeOH; flow rate: 0.3 mL/min; column temperature: 25 °C; injection volume: 10 μL]. MS 測定は Q3 スキャンモードにて、以下の測定条件で行った: nebulizer gas flow (3 L/min), drying gas flow (15 L/min), desolvation line (DL) temperature (250 °C), heat block (HB) temperature (400 °C). **9** はポジティブイオンで 287 [M+Na]⁺ として検出された。ピーク面積から計算したところ、**9** のエナンチオマー過剰率は 57 % *ee* であった。



(*S*)-(-)-5-methyl spirobrassinin: Retention time: 20.97 min; Peak area: 409533106

(*R*)-(+)-5-methyl spirobrassinin: Retention time: 22.81 min; Peak area: 113587085

The (*S*)-enantiomeric excess: 57 % *ee*.

カブへの 3-(2-naphtyl-L-alanin) および 3-(2-naphtyl-D-alanin) の添加

カブ新鮮胚軸を半分切スライス各表面に星型 (最大直径 : 3 cm, 深さ : 1 cm) の穴を開けた。室温遮光条件下で 24 時間静置した後、殺菌灯 (30 W, 254 nm) を 60 分間照射した。照射直後に界面活性剤 Tween-80 (0.1%), DMSO (0.5%) を含む 3-(2-naphtyl-L-alanin) (127.4 mg) [12.7 mg] の水溶液 [計 120 mL (カブ 1 個あたり 12.0 mL)] をカブの穴に投与した。各スライスを室温遮光条件下で 72 時間静置し、穴中の溶液を回収した。溶液を AcOEt と H₂O にて液-液分配を行い AcOEt 分画を得た。減圧下溶媒留去した AcOEt 分画を MeOH に溶解し HPLC を用いて精製し [column: YMC triart C18, 250 × 4.6 mm i.d.; mobile phase: 65% MeOH; detection: UV (220 nm); flow rate: 4.0 ml/min; column temperature: 25°C], 2-naphthyl-acetaldehyde-oxime (1.4 mg, 1.3%) を得た。3-(2-naphtyl-D-alanin) によるカブへの添加は上記と同じ方法で行い、HPLC パターンの比較により 2-naphthyl-acetaldehyde-oxime の生成が確認された。硫黄含有化合物は得られなかった。

Brassinin (8) の合成

Indole-3-carboxaldehyde oxime (**14**, 497 mg, 3.1 mmol), NaBH₄ (757 mg, 20.0 mmol) を NiCl₂·6H₂O (736.8 mg, 3.1 mmol) 存在下 MeOH (20 mL) 中で 5 分間攪拌した。溶液を濾過し 28% NH₄OH (8.0 mL) と H₂O (200 mL) を加えた。AcOEt を用いて分液し有機層を無水硫酸ナトリウム (Na₂SO₄) で乾燥した。減圧下溶媒留去し、indol-3-yl-methylamine の混合物を得た。これを CH₂Cl₂ (20 mL) に溶解し、triethylamine (0.44 mL, 3.12 mmol), carbon disulfide (1.31 mL, 21.9 mmol) を加え室温で 5 分間攪拌した。Iodomethane (0.98 mL, 15.6 mmol) を加えさらに 15 分間攪拌した後、減圧下溶媒留去した。混合物を順相カラムクロマトグラフィーにて精製し [n-hexane-AcOEt (3:1, v/v)], brassinin (**8**, 172 mg, 24% from **14**) を得た。

5-Methyl brassinin (18) の合成

POCl₃ (0.5 mL) を N,N-dimethyl formamide (DMF) (1.5 mL) に溶解し 0 °C で 10 分間攪拌した。これに DMF (3.0 mL) 中 5-methyl indole (**10**, 600 mg, 4.7 mmol) を加え、2 時間攪拌した。1N NaOH 水溶液を加え H₂O と AcOEt を用いて分液し有機層を Na₂SO₄ で乾燥した。溶液を減圧下溶媒留去し、5-methyl indole-3-carboxaldehyde (**11**) の混合物 (1.3 g) を得た。得られた 5-methyl indole-3-carboxaldehyde 混合物 (**11**, 1.15 g) を ethanol (EtOH) (40 mL), H₂O (4.0 mL) に溶解し hydroxylamine hydrochloride (0.85 g, 12.2 mmol), sodium carbonate (0.97 g, 9.2 mmol) を加え、室温で 50 分間攪拌した。溶液を減圧下溶媒留去し、H₂O と AcOEt を用いて分液し有機層を Na₂SO₄ で乾燥し、5-methyl indole-3-carboxaldehyde oxime (**15**) の混合物 (0.58 g) を得た。5-Methyl brassinin (**18**) の合成は 5-methyl indole-3-carboxaldehyde oxime (**15**, 572 mg) の混合物を用いて **8** と同様の方法で行い、5-methyl brassinin (**18**, 85 mg, 7.2% from **10**) を得た。

1-Methyl brassinin (19) の合成

Sodium hydroxide solution (15 mL, 10 w/v%), tetrabutylammonium bromide (224 mg, 0.69 mmol), iodomethane (0.43 mL, 6.9 mmol) を benzene (20 mL) に溶解した indole-3-carboxaldehyde (1.0 g, 6.9 mmol) に加え, 室温で 2 時間攪拌した. Benzene を用いて分液し有機層を Na₂SO₄ で乾燥した. 減圧下溶媒留去し, 1-methyl indole-3-carboxaldehyde (12) の混合物 (1.106 g) を得た. 得られた 1-methyl indole-3-carboxaldehyde 混合物 (12, 1.09 g) を EtOH (30 mL), H₂O (4.5 mL) に溶解し hydroxylamine hydrochloride (0.86 g, 12.4 mmol), sodium carbonate (564 mg, 5.3 mmol) を加え, 室温で 3 時間攪拌した. 溶液を減圧下溶媒留去し, H₂O と AcOEt を用いて分液し有機層を Na₂SO₄ で乾燥し, 1-methyl indole-3-carboxaldehyde oxime (16) の混合物 (837 mg) を得た. 1-Methyl brassinin (19) の合成は 1-methyl indole-3-carboxaldehyde oxime (16, 837 mg) の混合物を用いて 8 と同様の方法で行い, 1-methyl brassinin (19, 58 mg, 3.4% from indole-3-carboxaldehyde) を得た.

化合物 20 の合成

化合物 20 の合成は iodomethane の代わりに iodoethane (1.25 mL, 15.6 mmol) を用いて 8 と同様の方法で行い, 化合物 20 (70 mg, 9.4% from 14) を得た.

化合物 21 の合成

化合物 21 の合成は iodomethane の代わりに iodopropane (1.52 mL, 15.6 mmol) を用いて 8 と同様の方法で行い, 化合物 21 (27 mg, 4.4% from 14) を得た.

5-Bromo brassinin (22) の合成

5-Bromo brassinin (22) の合成は 11 の代わりに 5-bromo indole-3-carboxaldehyde (13, 1.60 g, 7.2 mmol) を用いて 18 と同様の方法で行い, 5-bromo brassinin (22, 41 mg, 1.8% from 13) を得た.

CrO₃ を用いた 7 の合成

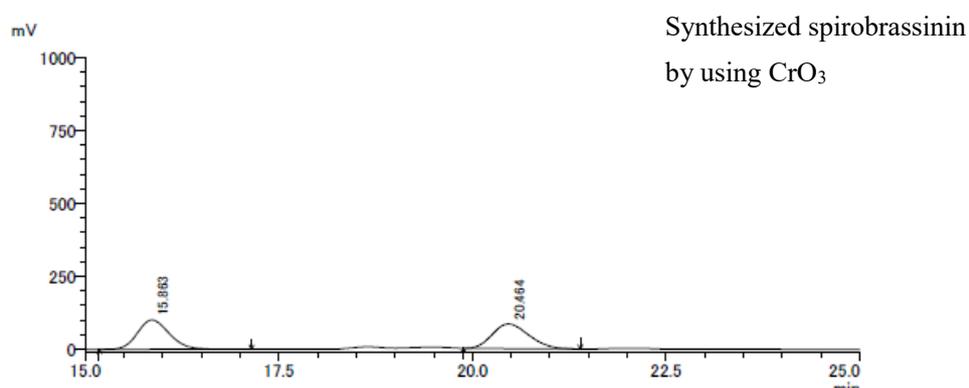
CrO₃ (29.4 mg, 0.29 mmol) を H₂O (0.5 mL) に溶解し, acetic acid (0.5 mL), dioxane (0.2 mL) 中 brassinin (8, 11 mg, 0.047 mmol) に加えた. 室温で 20 分間攪拌し, 飽和食塩水 (10 mL) を加え AcOEt を用いて分液し有機層を Na₂SO₄ で乾燥した. 減圧下溶媒留去し混合物を逆相 HPLC にて精製し [column: YMC triart C₁₈, 250 × 10 mm i.d.; mobile phase: 65% MeOH; detection: UV (220 nm); flow rate: 4.0 ml/min; column temperature: 25°C], spirobrassinin (7, 2.0 mg, 17%) を得た.

PdCl₂(CH₃CN)₂ を用いた 7 の合成

DMSO (2.7 mL), MeOH (0.3 mL) に溶解した brassinin (8, 30 mg, 0.13 mmol) と PdCl₂(CH₃CN)₂ (3.9 mg, 0.013 mmol) を 80 °C で 1.5 時間攪拌した. 反応液に飽和食塩水 (10 mL) を加え AcOEt を用いて分液し有機層を Na₂SO₄ で乾燥した. 減圧下溶媒留去し混合物を順相カラムクロマトグラフィーにて精製し [*n*-hexane-AcOEt (4:1, v/v)], spirobrassinin (7, 4.4 mg, 14%) を得た.

CrO₃ および PdCl₂(CH₃CN)₂ を用いて合成した 7 のエナンチオマー過剰率の決定

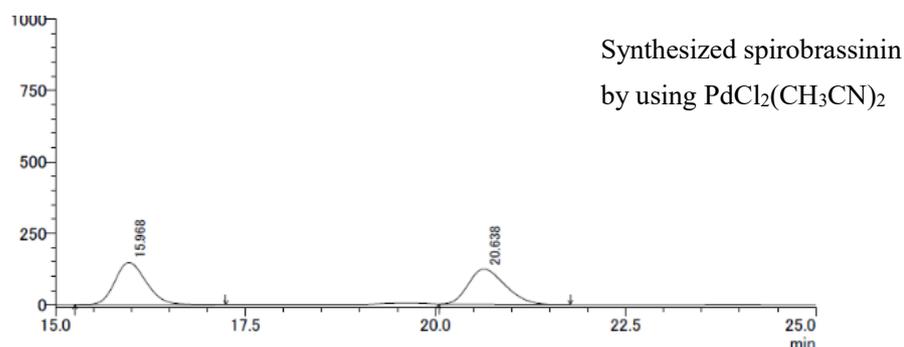
合成した spirobrassinin (7) を MeOH で溶解し, HPLC 分析を行った [column: CHIRALCEL OJ-H (5 μm particle size, 4.6 × 250 mm i.d.); detection: UV (250 nm); mobile phase: 2-propanol:*n*-hexane (10:90); flow rate: 1.0 mL/min; column temperature: 25 °C; injection volume: 20 μL].



(*R*)-(+)-spirobrassinin: Retention time: 15.86 min; Peak area: 2878257

(*S*)-(–)-spirobrassinin: Retention time: 20.46 min; Peak area: 2772951

The (*S*)-enantiomeric excess: –1.9 % *ee*.



(*R*)-(+)-spirobrassinin: Retention time: 15.97 min; Peak area: 4213421

(*S*)-(–)-spirobrassinin: Retention time: 20.64 min; Peak area: 4159050

The (*S*)-enantiomeric excess: –0.7 % *ee*.

第二章の実験

植物の入手

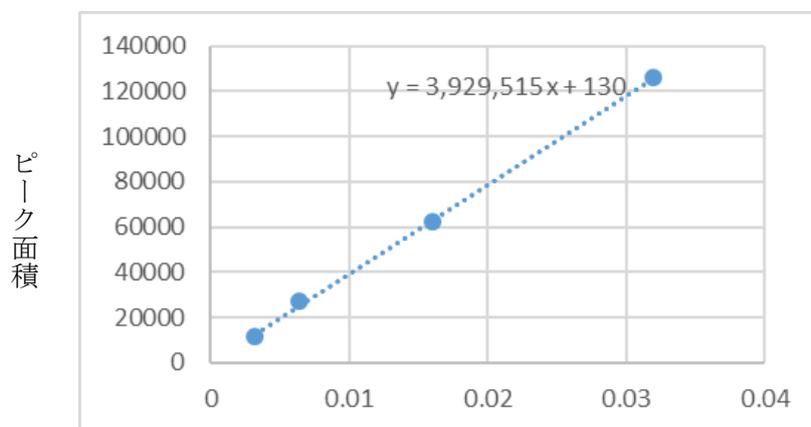
ホソバタイセイ (*Isatis tinctoria*) 乾燥根部 [板藍根] (産地: 中国, 安徽省) は株式会社栃本天海堂より購入した。

ホソバタイセイ(*I. tinctoria*) からの neoglucobrassicin (**24**) の単離

ホソバタイセイ(*I. tinctoria*) 乾燥根部 (5.0 kg) を MeOH を用いて 80 °C で熱時抽出後、抽出液を濾取した。残渣に MeOH を加え、同様の抽出操作を計 3 回行った。MeOH 抽出液を減圧下溶媒留去し、MeOH 抽出エキス (540.1 g, 乾燥根部からの収率 10.8%) を得た。得られた MeOH エキスを HP-20 に付し、20% MeOH 分画 (13.25 g, 0.27%) を得た。20% MeOH 分画を順相カラムクロマトグラフィー [CHCl₃-MeOH (1:0→6:1→5:1→3:1, v/v)] にて分画し、4 フラクシオンに分離した。Fr. 4 (2.29 g, 0.046%) を逆相カラムクロマトグラフィー [CHCl₃-MeOH (1:0→6:1→5:1→3:1, v/v)] にて精製し、neoglucobrassicin (**24**, 2.21 g, 0.044%) を得た。

1-Methoxyindole-3-methanol (**25**) の検量線の作成

Neoglucobrassicin (**24**) 200 mg より 1-methoxyindole-3-methanol (**25**) (0.8 mg) を得た。得られた 1-methoxyindole-3-methanol (**25**) (0.8 mg) を 10 mL メスフラスコに入れ MeOH で容量調製した。この溶液を標準溶液 (80 µg/mL) として使用した。検量線を作成するための各溶液 (3.2 µg/mL, 6.4 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL) は、標準溶液を希釈して調製した。各溶液をそれぞれ 10mL 調製し、次の条件下で HPLC 分析を行った [HPLC column : YMC Triart C18 (5 µm particle size, 250×4.6 mm i.d.; detection : UV (280 nm); mobile phase : MeOH-H₂O (50:50); flow rate : 1.0 mL / min; column : 25°C; injection volume : 10 µL]。検量線の回帰式は $y = 3929515x + 130$ [y : ピーク面積, x : **25** の濃度 (mg/mL)], 相関係数 (R²) は 0.9993 であり、測定範囲 (3.2–32 µg/mL) において優れた直線性を示した。



1-Methoxyindole-3-methanol (**25**) の濃度 (mg/mL)

1-Methoxyindole-3-methanol (**25**) の検量線

Neoglucobrassicin (24) と myrosinase の反応

Neoglucobrassicin (**24**, 50 mg, 0.11 mmol) および myrosinase (20–40 mU) を 5 mL リン酸ナトリウム緩衝液 (100 mM, pH 7.4) 中, 30–37°C で各 5 分, 3 時間, 24 時間攪拌した. 各溶液を逆相 ODS カラムクロマトグラフィー [H₂O (3 mL) → CH₃CN (6 mL)] にて分画し得られた MeCN 層を 2 mL メスフラスコを用いて MeOH で計 2 ml になるよう容量調製した. 得られた溶液をメンブレンフィルター (MILEX LH フィルターユニット, 0.45 μM) で濾過し, このうち 200 μL を 2 mL メスフラスコに入れ MeOH で計 2 mL になるように容量調製した. 各溶液を HPLC にて分析し各収量を検量線により計算した [HPLC column : YMC Triart C18 (5 μm particle size, 250×4.6 mm i.d.; detection : UV (280 nm); mobile phase : MeOH–H₂O (50:50); flow rate : 1.0 mL/min; column : 25°C; injection volume : 10 μL]. 反応開始 5 分後と 3 時間後の収率はそれぞれ 1.0% と 2.9% であった. また, H₂O 層および MeCN 層の ¹H NMR スペクトルにおいて **24** のインドール部分の 4 位のシグナル (7.75 ppm, d, *J* = 7.6 Hz) が検出されなかったため **24** は myrosinase によって完全に消費されることが確認された.

Neoglucobrassicin (24) と imidazole の反応

Neoglucobrassicin (**24**, 6.6 mg, 0.014 mmol) および imidazole (0.14 mmol, 10.0 eq.) を 1 mL リン酸ナトリウム緩衝液 (100 mM, pH 7.4) 中, 30–37°C で 12 時間攪拌した. 溶液を逆相 ODS カラムクロマトグラフィー [H₂O–CH₃CN (1:0→0:1, v/v)] にて分画し, 得られた MeCN 層を MeOH にて希釈し HPLC 分析を行った [HPLC column: YMC triart C18 (5 μm particle size, 250 × 4.6 mm i.d.); detection: UV (220 nm); mobile phase: MeOH–H₂O (55:45); flow rate: 1.0 mL/min; column temperature: 25 °C]. 化合物 **26** の生成は確認されなかった.

新規含窒素化合物 26–30 の合成

Neoglucobrassicin (**24**, 100–200 mg, 0.21–0.42 mmol, 1.0 eq) と myrosinase (20–40 mU) および 求核剤 [imidazole, pyrazole, 1*H*-1,2,3-triazole, or 1*H*-1,2,4-triazole] (2.1–4.2 mmol, 10 eq.) を 10–20 mL リン酸ナトリウム緩衝液 (100 mM, pH 7.4) 中, 30–37°C で 12 時間攪拌した. 各溶液を逆相 ODS カラムクロマトグラフィー [H₂O–CH₃CN (1:0→0:1, v/v)] にて分画し得られた MeCN 層をそれぞれ HPLC にて精製した [HPLC column: YMC triart C18 (5 μm particle size, 250 × 4.6 mm i.d.); detection: UV (220 nm); mobile phase: MeOH–H₂O (55:45, v/v for compounds **26** and **27**, 50:50, v/v for compounds **28**, and 45:55, v/v for compounds **29** and **30**); flow rate: 1.0 mL/min; column temperature: 25 °C].

新規含窒素化合物 **26–30**

3-(1*H*-Imidazol-1-ylmethyl)-1-methoxy-1*H*-indole (26). 0.9 mg, 1.9% yield from compound **24** (100 mg, 0.21 mmol), yellow oil. IR (ATR) 1598, 1101, 739 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ_{H} : and $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ_{C} : given in Table 7. HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 228.1131, found 228.1130.

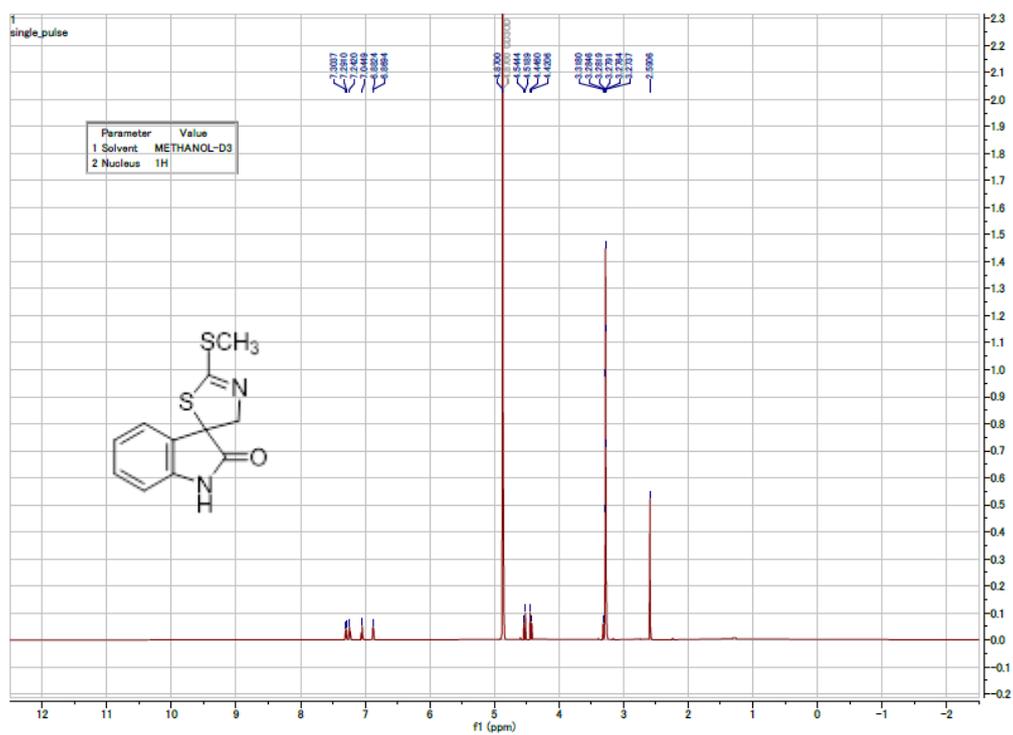
1-Methoxy-3-(1*H*-pyrazol-1-ylmethyl)-1*H*-indole (27). 1.2 mg, 2.5% yield from compound **24** (100 mg, 0.21 mmol), yellow oil. IR (ATR) 1581, 1087, 742 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ_{H} : and $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ_{C} : given in Table 7. HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 250.0951, found 250.0947.

1-Methoxy-3-(1*H*-1,2,3-triazol-1-ylmethyl)-1*H*-indole (28). 1.2 mg, 1.3% yield from compound **24** (200 mg, 0.21 mmol), yellow oil. IR (ATR) 1586, 1078, 746 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ_{H} : and $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ_{C} : given in Table 7. HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 251.0903, found 251.0908.

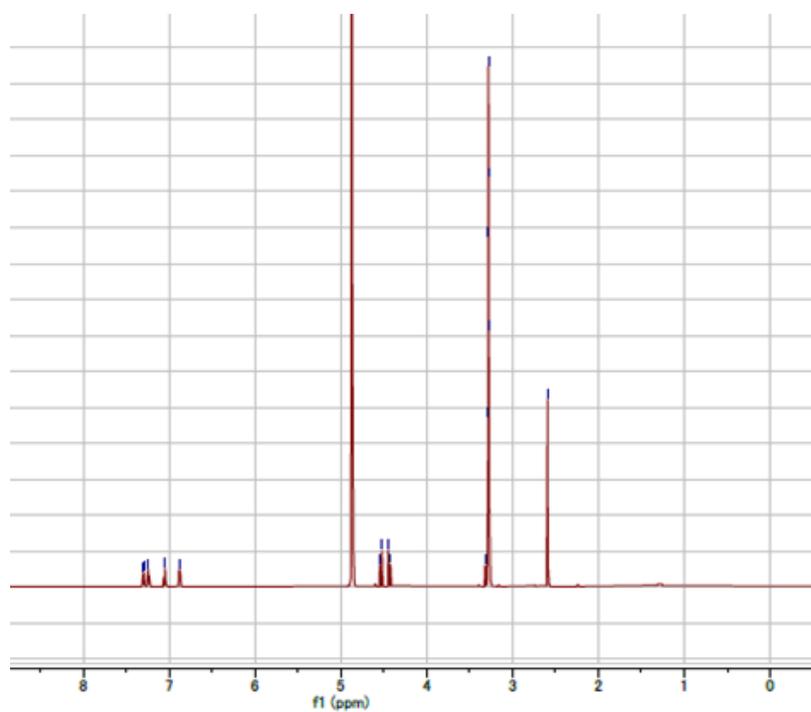
1-Methoxy-3-(4*H*-1,2,4-triazol-4-ylmethyl)-1*H*-indole (29). 0.7 mg, 0.7% yield from compound **24** (200 mg, 0.21 mmol), yellow oil. IR (ATR) 1592, 1103, 741 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ_{H} : and $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ_{C} : given in Table 7. HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 251.0903, found 251.0907.

1-Methoxy-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1*H*-indole (30). 0.7 mg, 0.7% yield from compound **24** (200 mg, 0.21 mmol), yellow oil. IR (ATR) 1580, 1101, 742 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ_{H} : and $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ_{C} : given in Table 7. HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 251.0903, found 251.0900.

The ^1H and ^{13}C NMR, and 2D NMR spectrum data of compound 7, 8, 9, 18, 20, 21, and 23

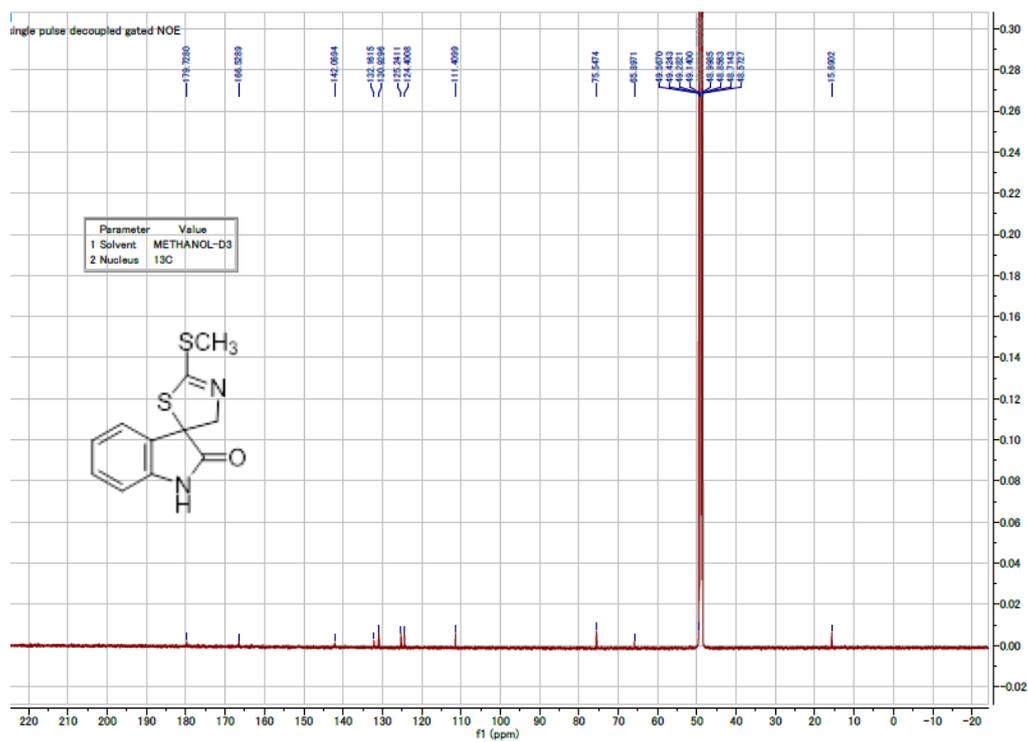


^1H NMR spectrum of spirobrassinin (7). Measured in CD_3OD .

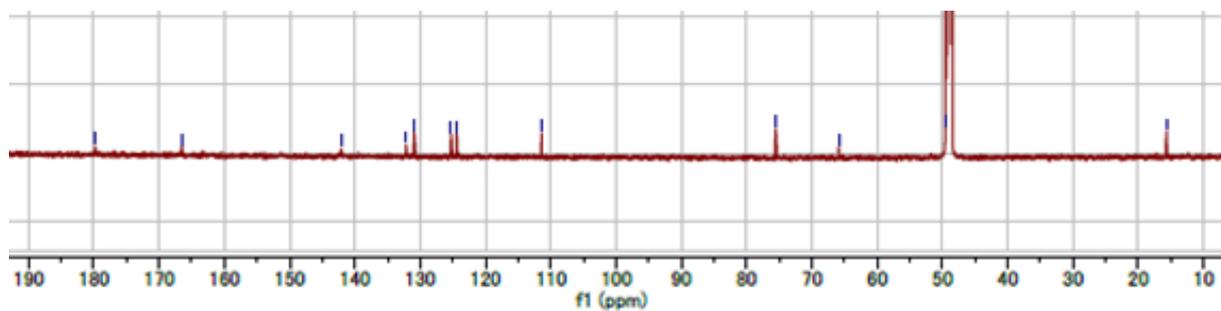


Enlarged view:

^1H NMR spectrum of spirobrassinin (7).

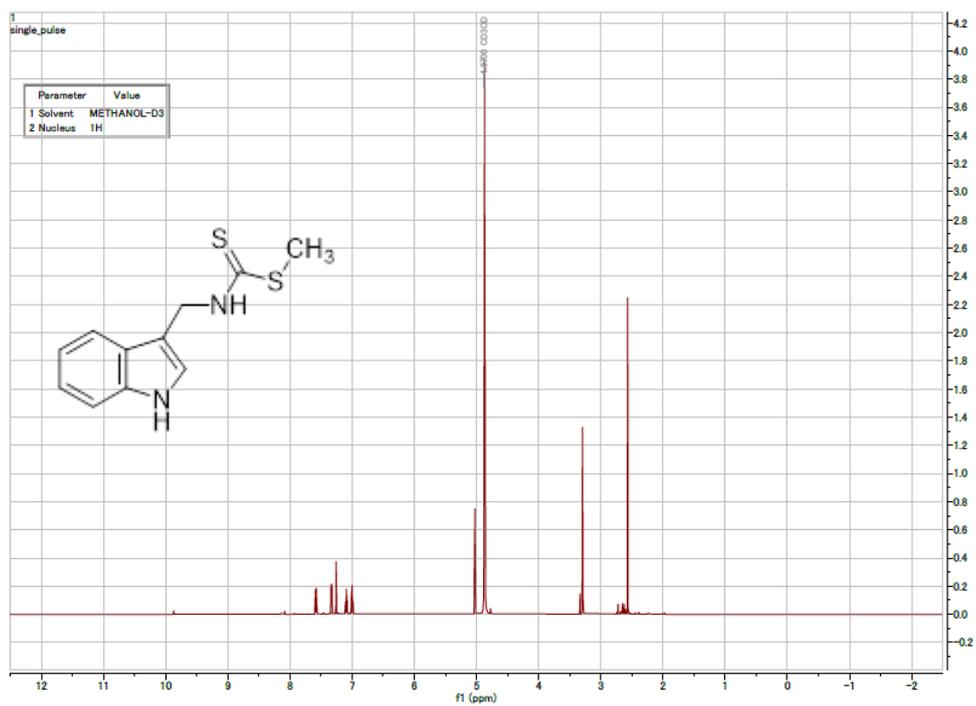


^{13}C NMR spectrum of spirobrassinin (7). Measured in CD_3OD .

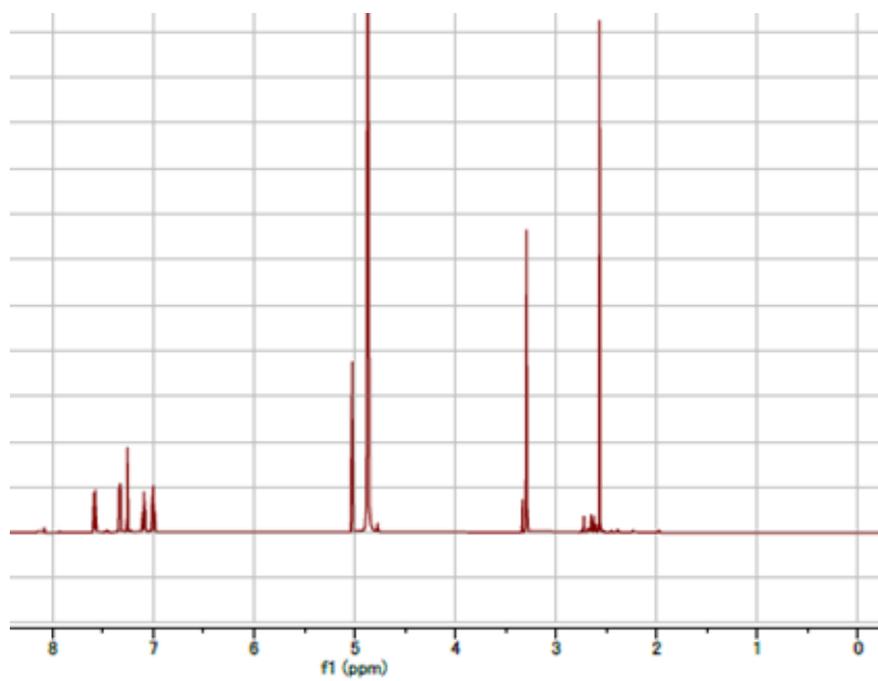


Enlarged view:

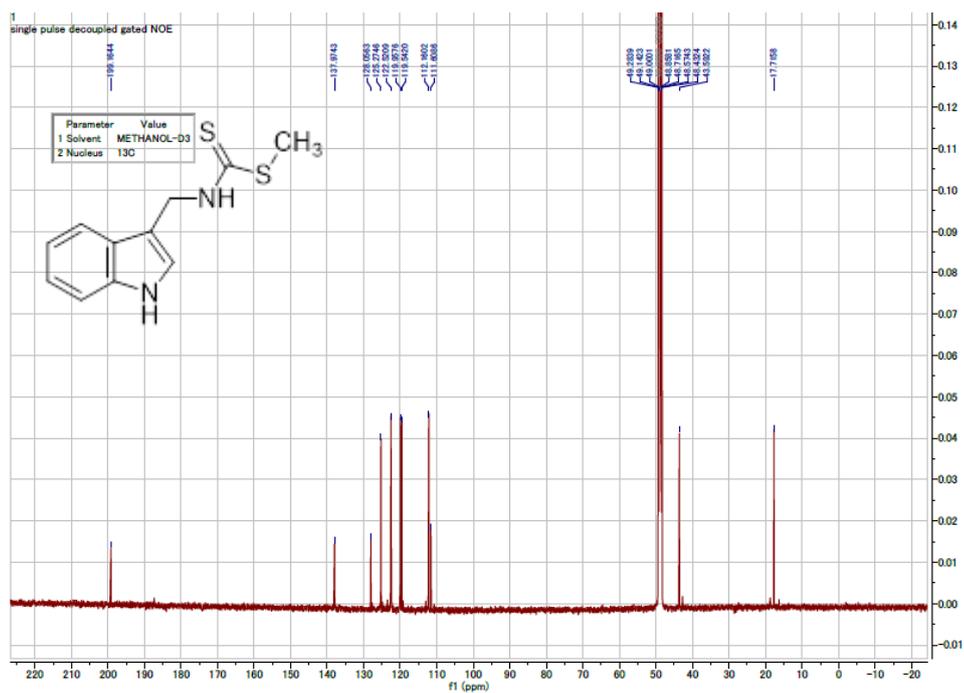
^{13}C NMR spectrum of spirobrassinin (7).



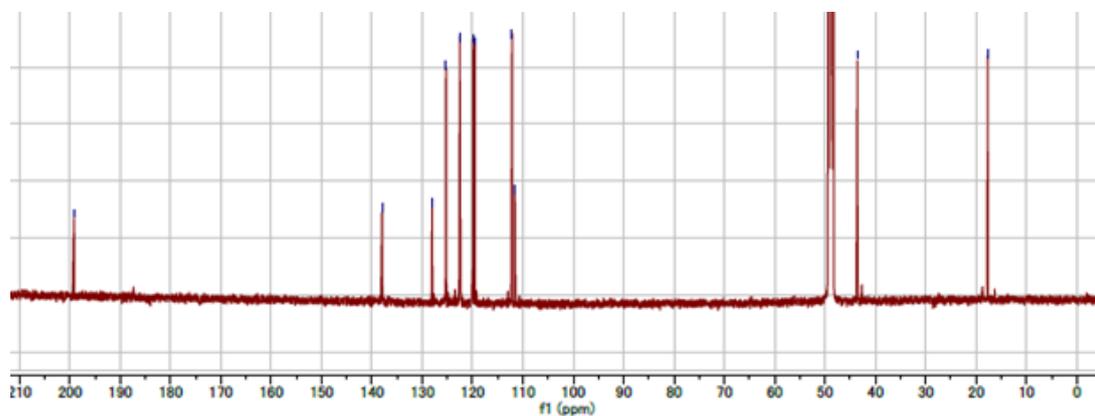
^1H NMR spectrum of brassinin (**8**). Measured in CD_3OD .



Enlarged view:
 ^1H NMR spectrum of brassinin (**8**).

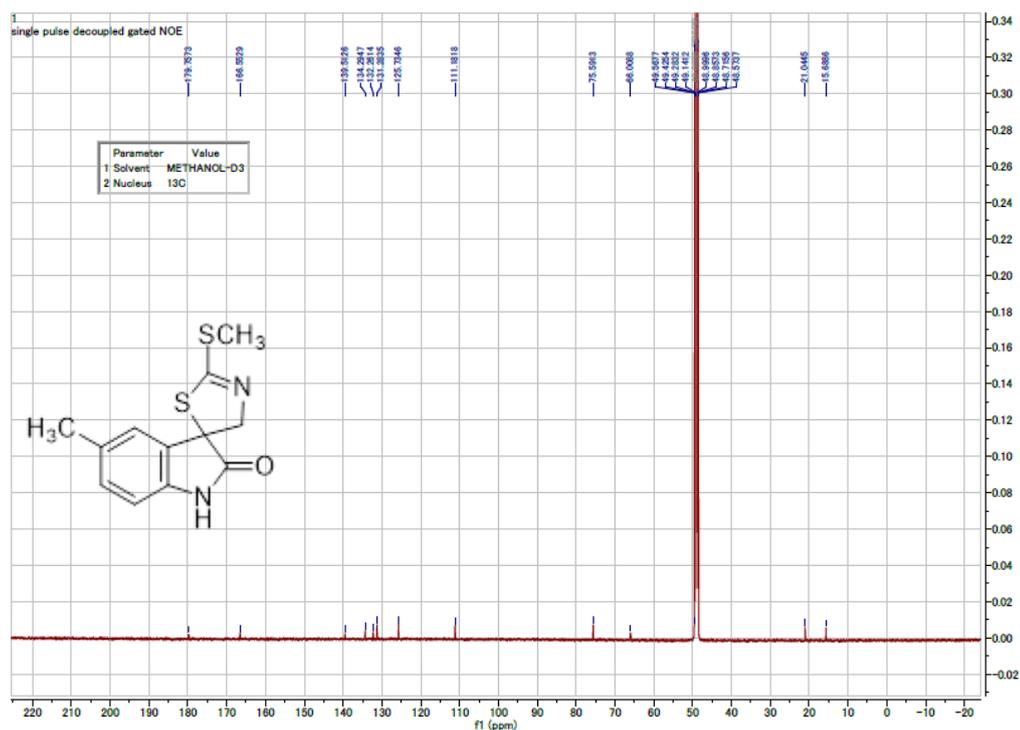


¹³C NMR spectrum of brassinin (**8**). Measured in CD₃OD.

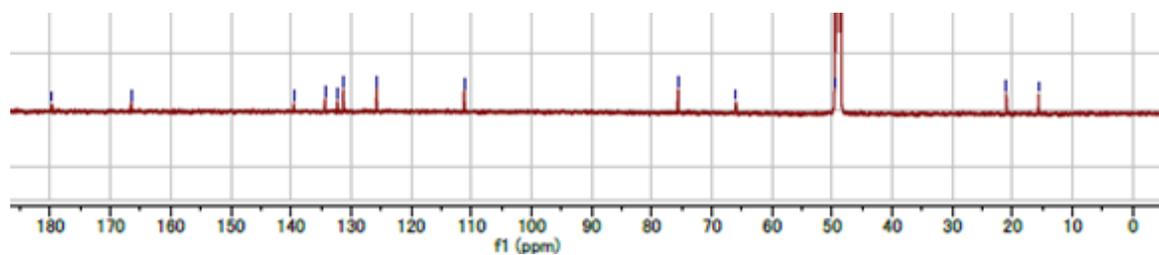


Enlarged view:

¹³C NMR spectrum of brassinin (**8**).

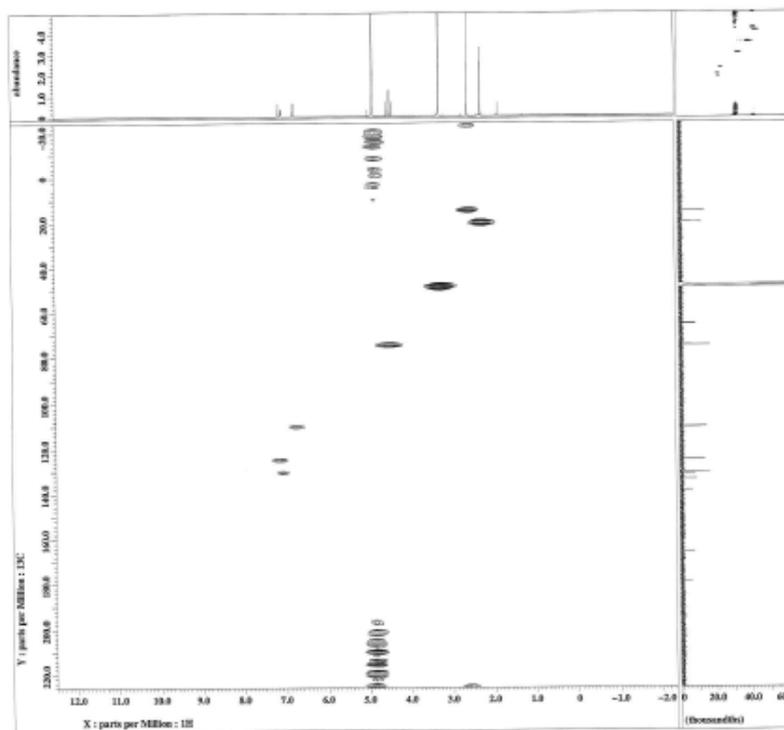


^{13}C NMR spectrum of 5-methylspirobrassinin (**9**). Measured in CD_3OD .

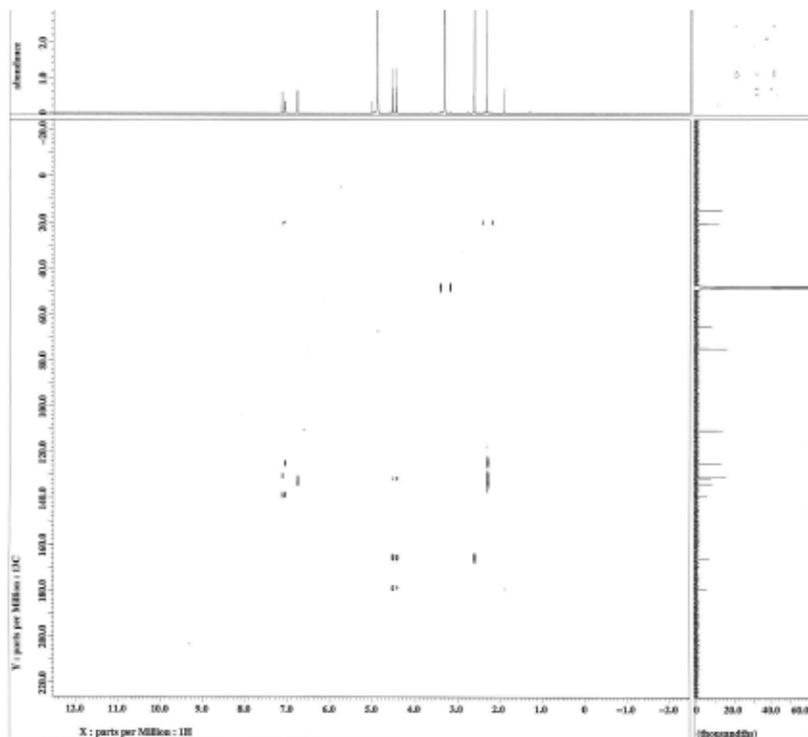


Enlarged view:

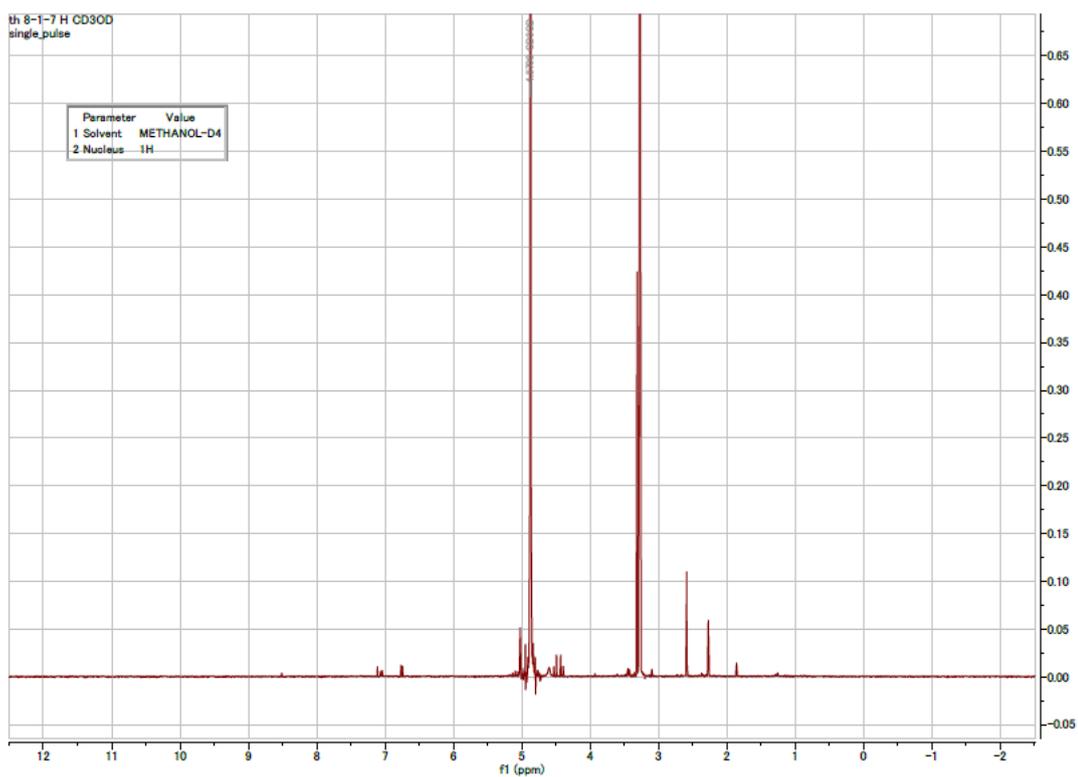
^{13}C NMR spectrum of 5-methylspirobrassinin (**9**).



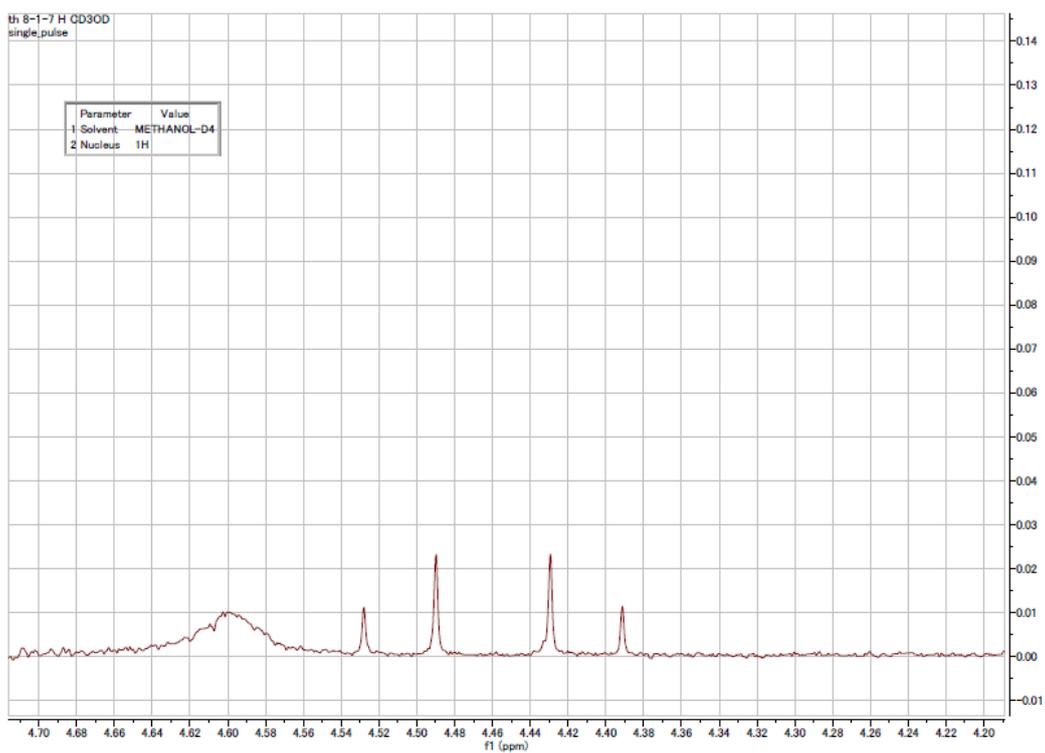
HMQC spectrum of 5-methylspirobrassinin (9). Measured in CD₃OD.

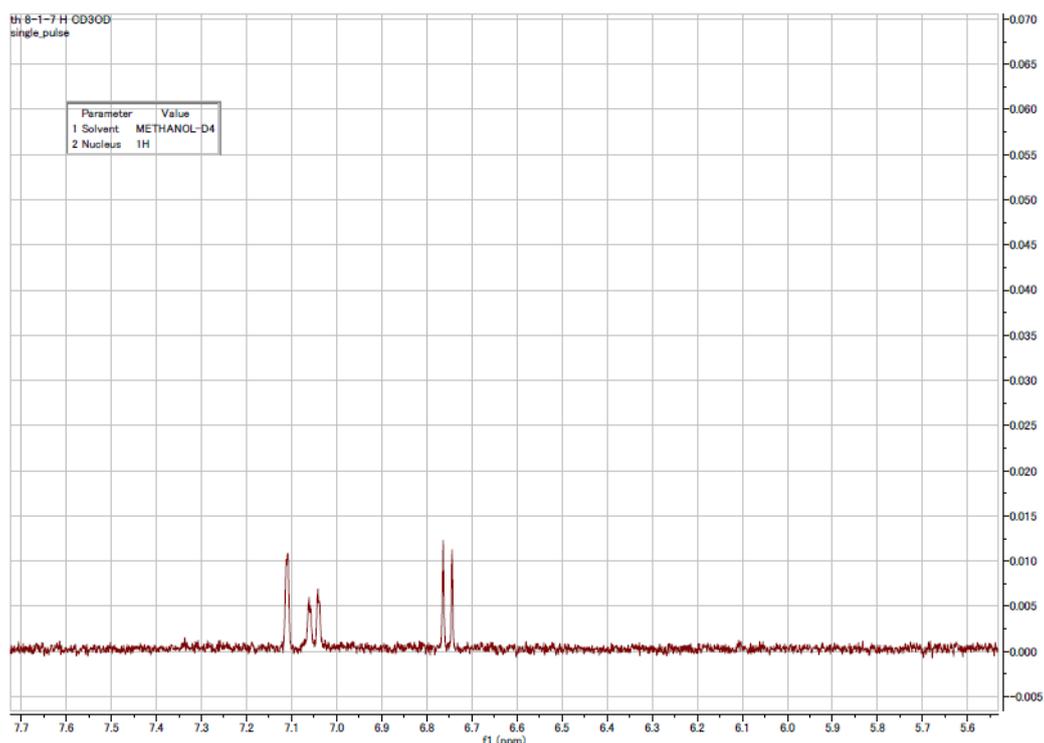


HMBC spectrum of 5-methylspirobrassinin (9). Measured in CD₃OD.



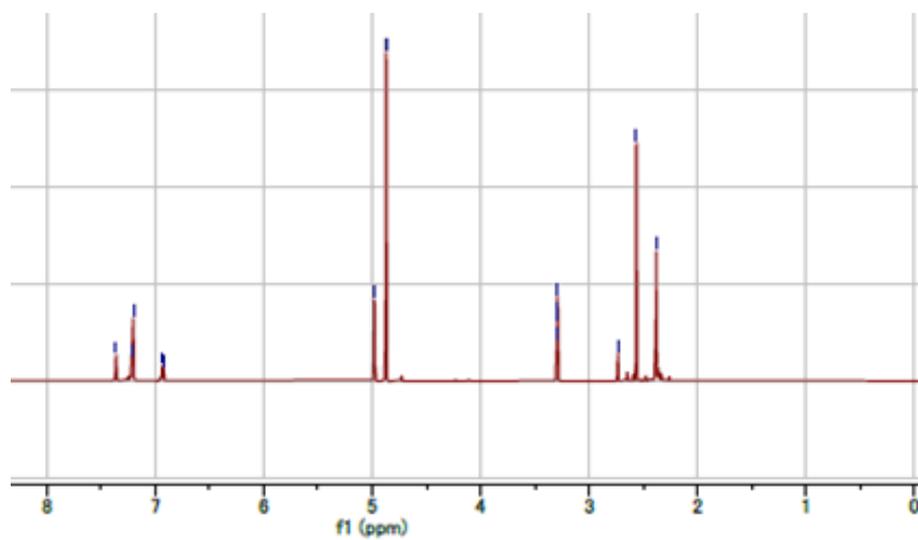
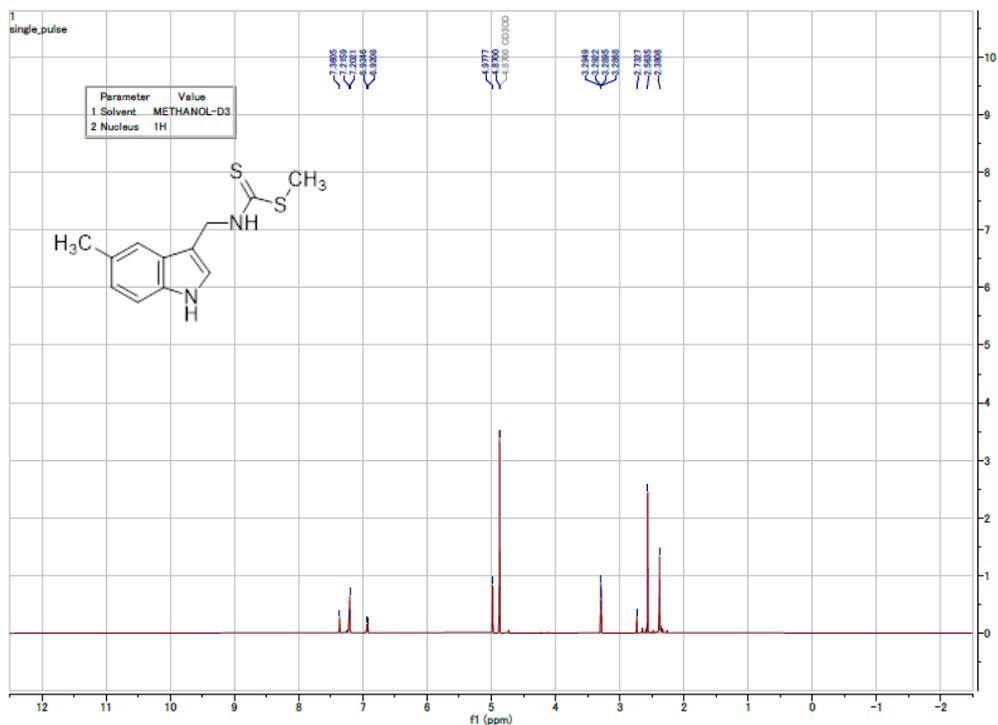
^1H NMR spectrum of 5-methylspirobrassinin (**9**) by administrating 5-methyl-DL-tryptophan to the turnip. Measured in CD_3OD .



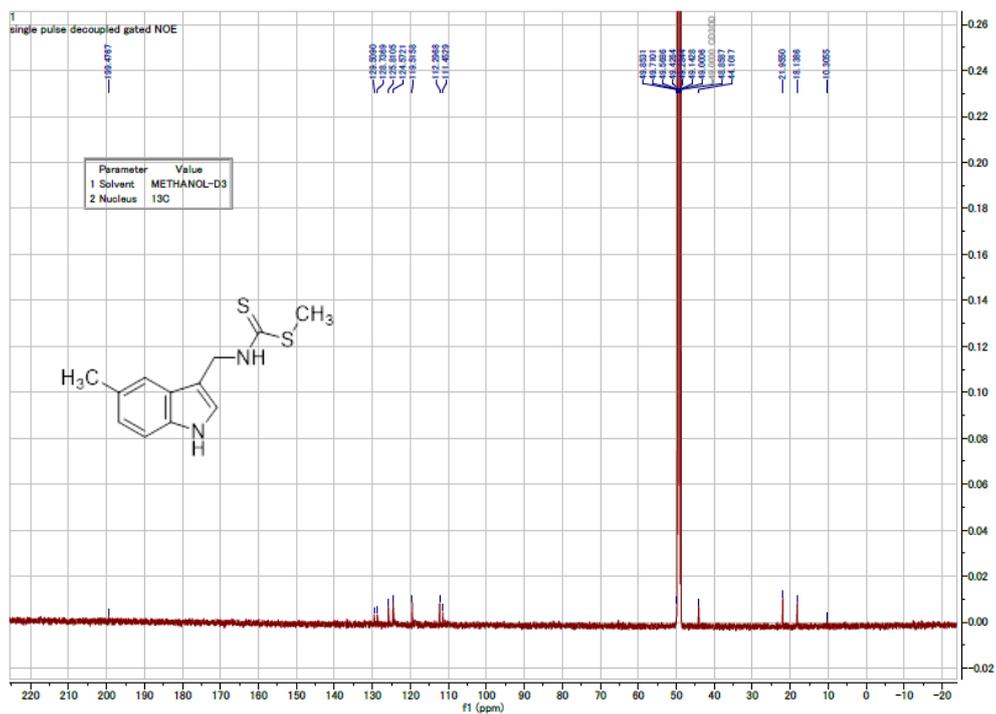


Enlarged view:

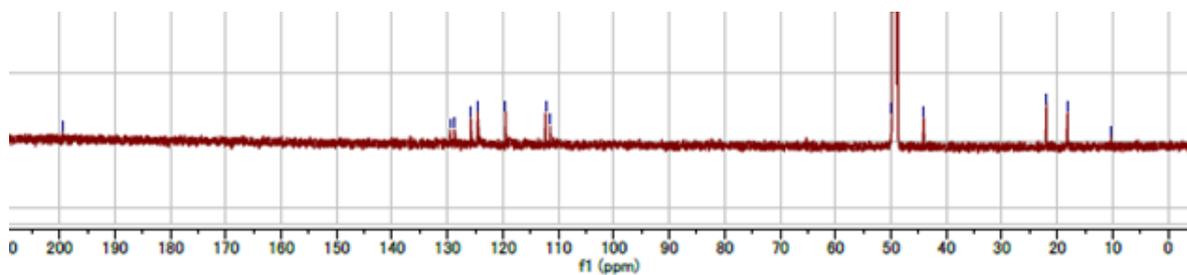
¹H NMR spectrum of 5-methylspirobrassinin (**9**) by administrating 5-methyl-DL-tryptophan to the turnip.



Enlarged view:
¹H NMR spectrum of 5-methylbrassinin (18).

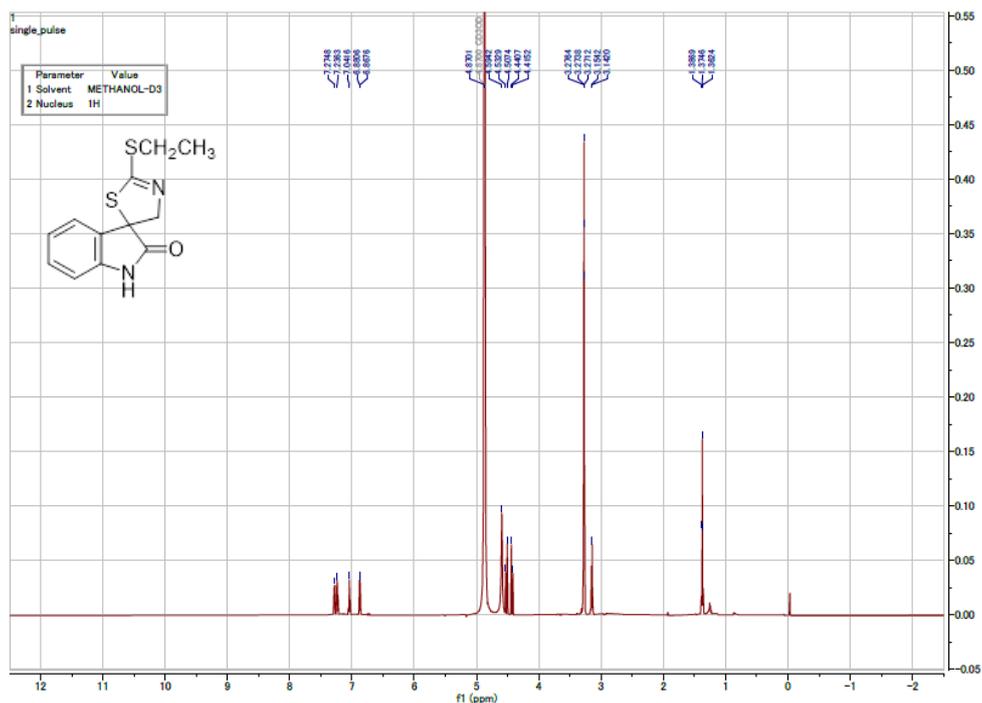


^{13}C NMR spectrum of 5-methylbrassinin (**18**). Measured in CD_3OD .

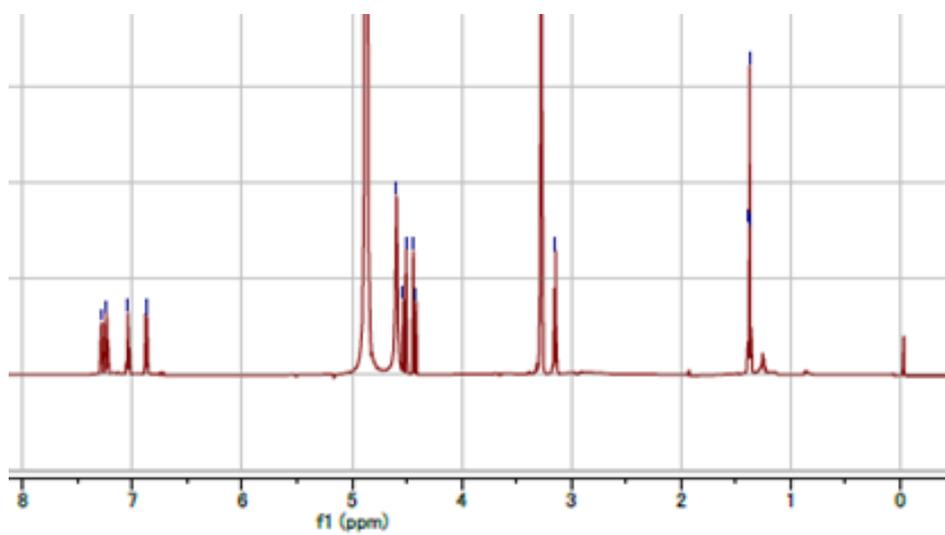


Enlarged view:

^{13}C NMR spectrum of 5-methylbrassinin (**18**).

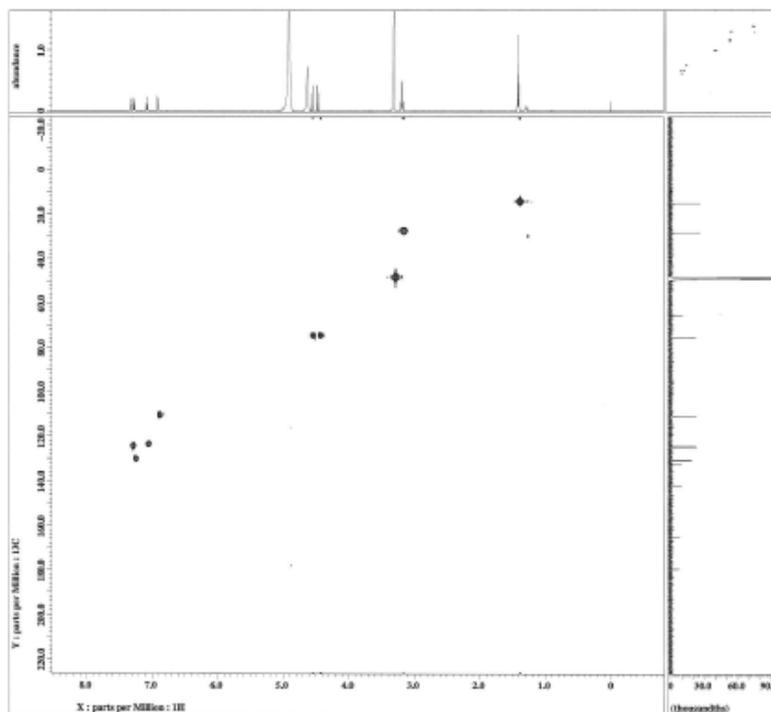


¹H NMR spectrum of compound **23**. Measured in CD₃OD.

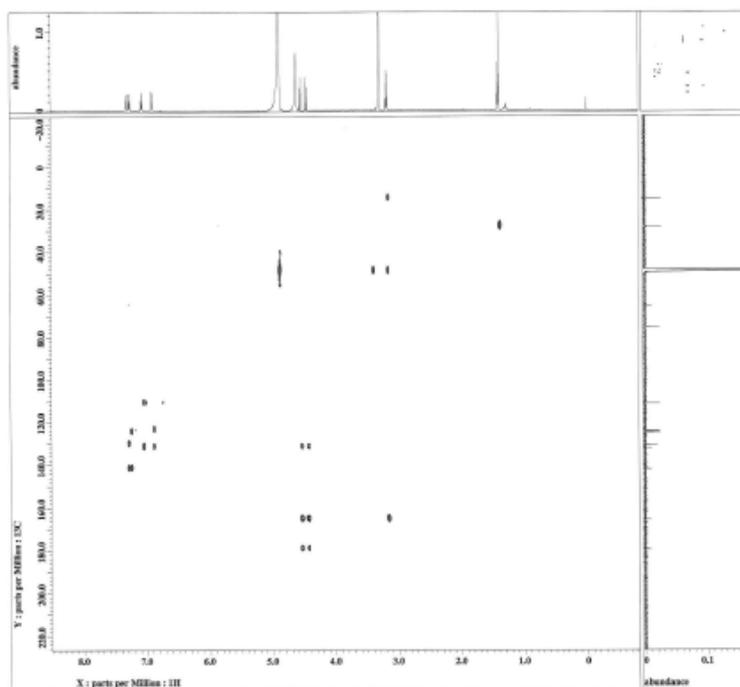


Enlarged view:

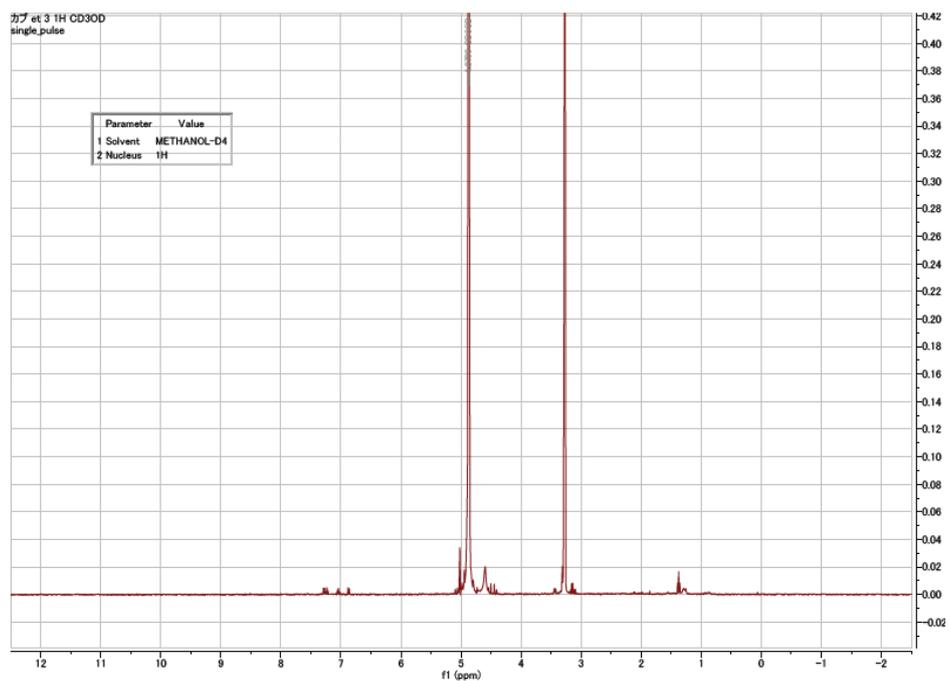
¹H NMR spectrum of compound **23**.



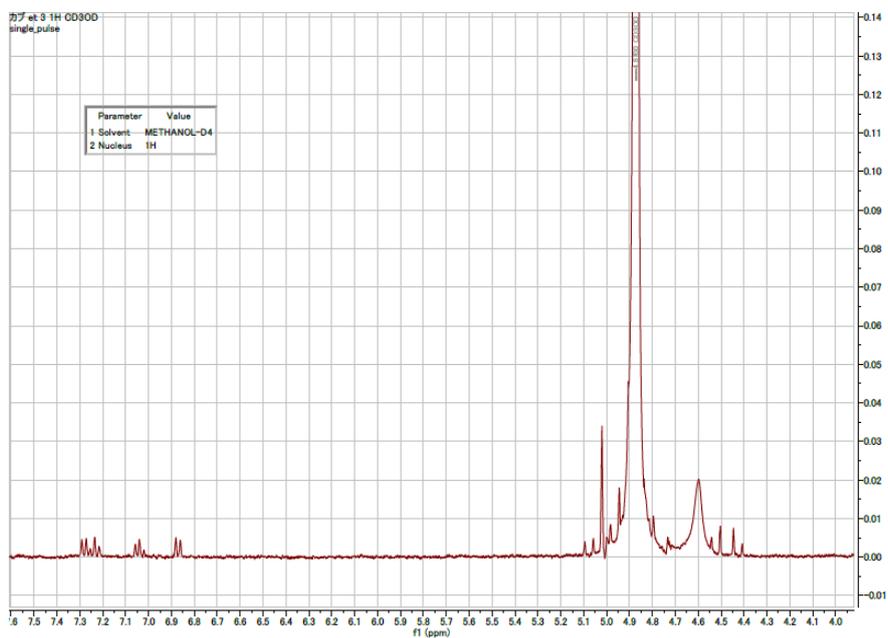
HMQC spectrum of compound **23**. Measured in CD₃OD.



HMBC spectrum of compound **23**. Measured in CD₃OD.

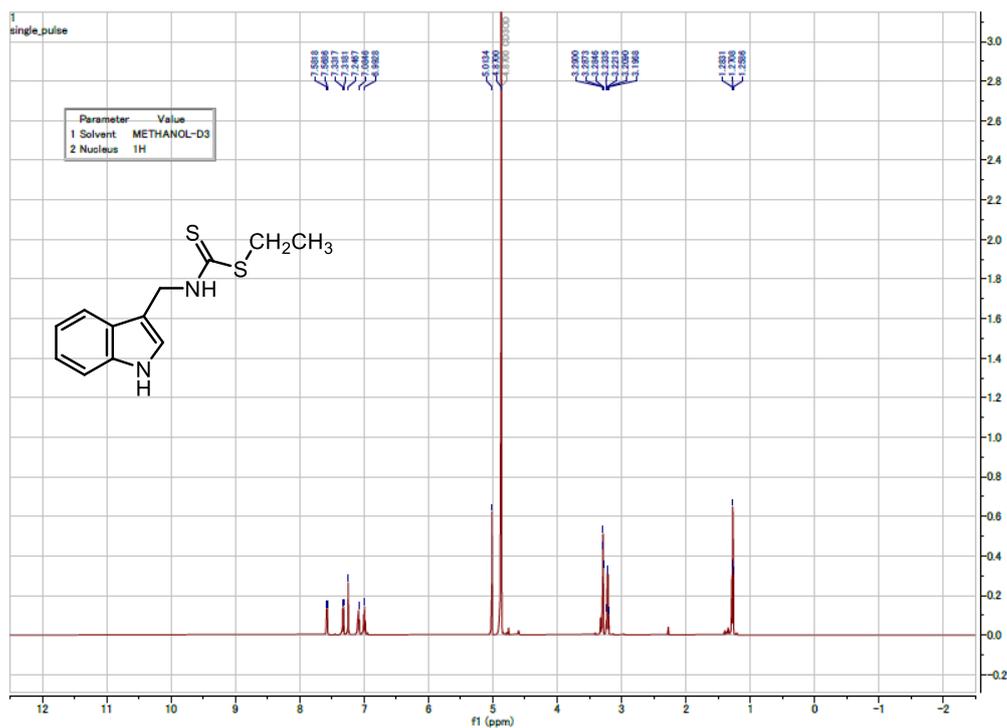


^1H NMR spectrum of compound **23** by administrating compound **20** to the turnip.
Measured in CD_3OD .

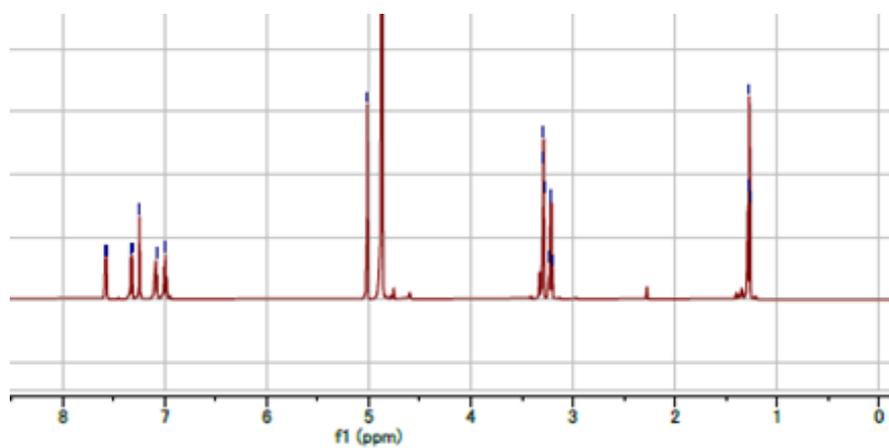


Enlarged view:

^1H NMR spectrum of compound **23** by administrating compound **20** to the turnip.

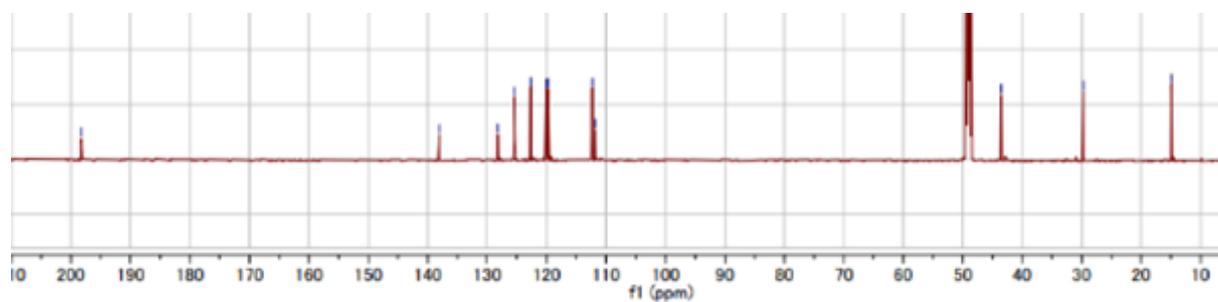
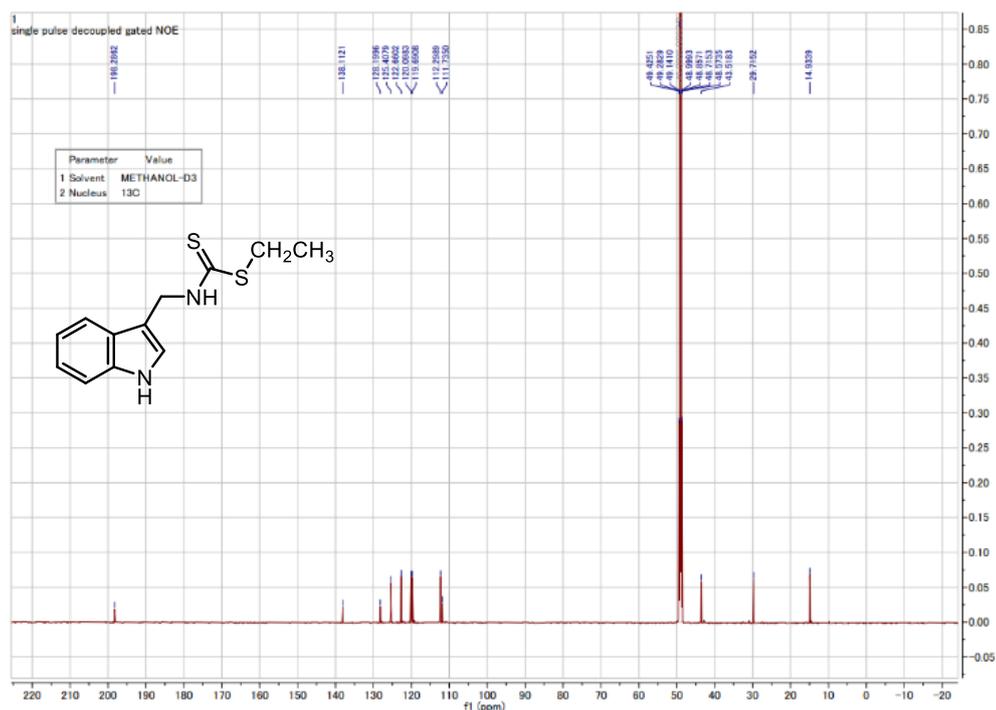


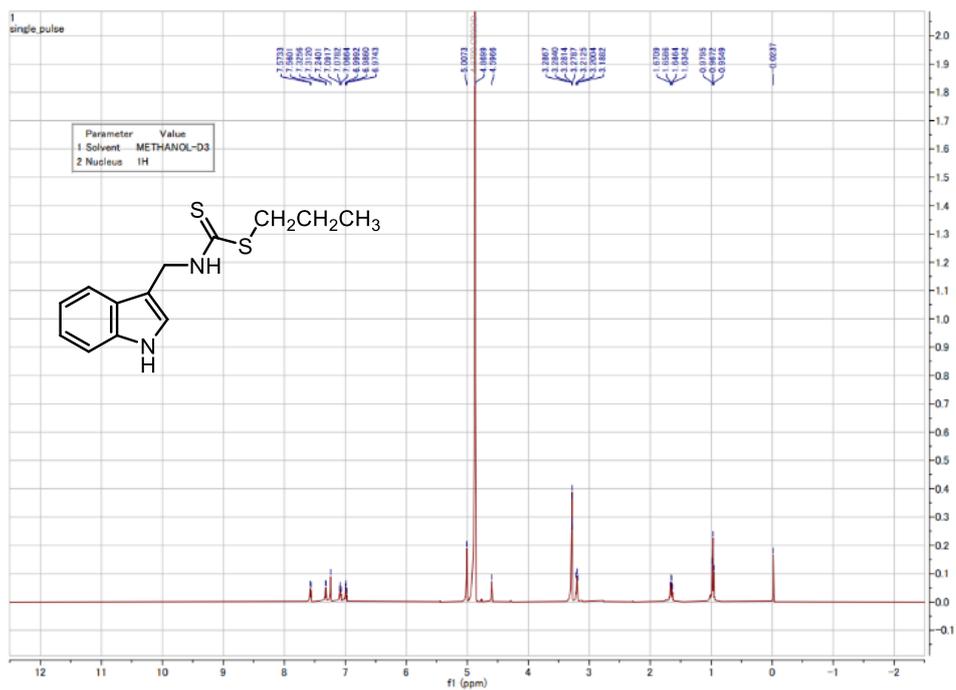
^1H NMR spectrum of compound **20**. Measured in CD_3OD .



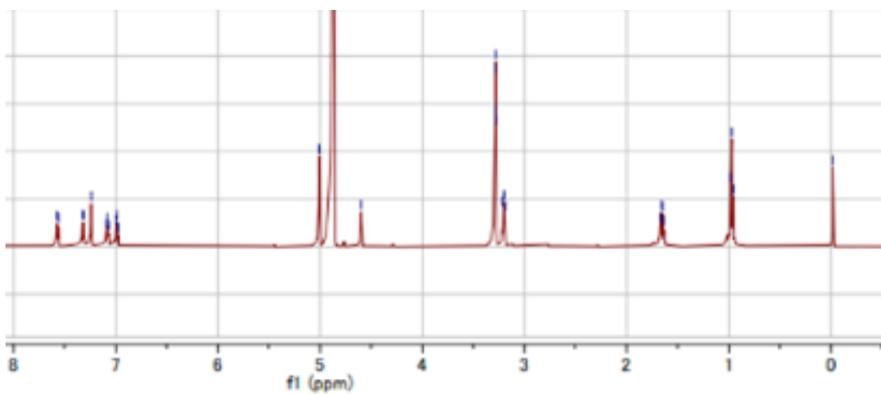
Enlarged view:

^1H NMR spectrum of compound **20**.





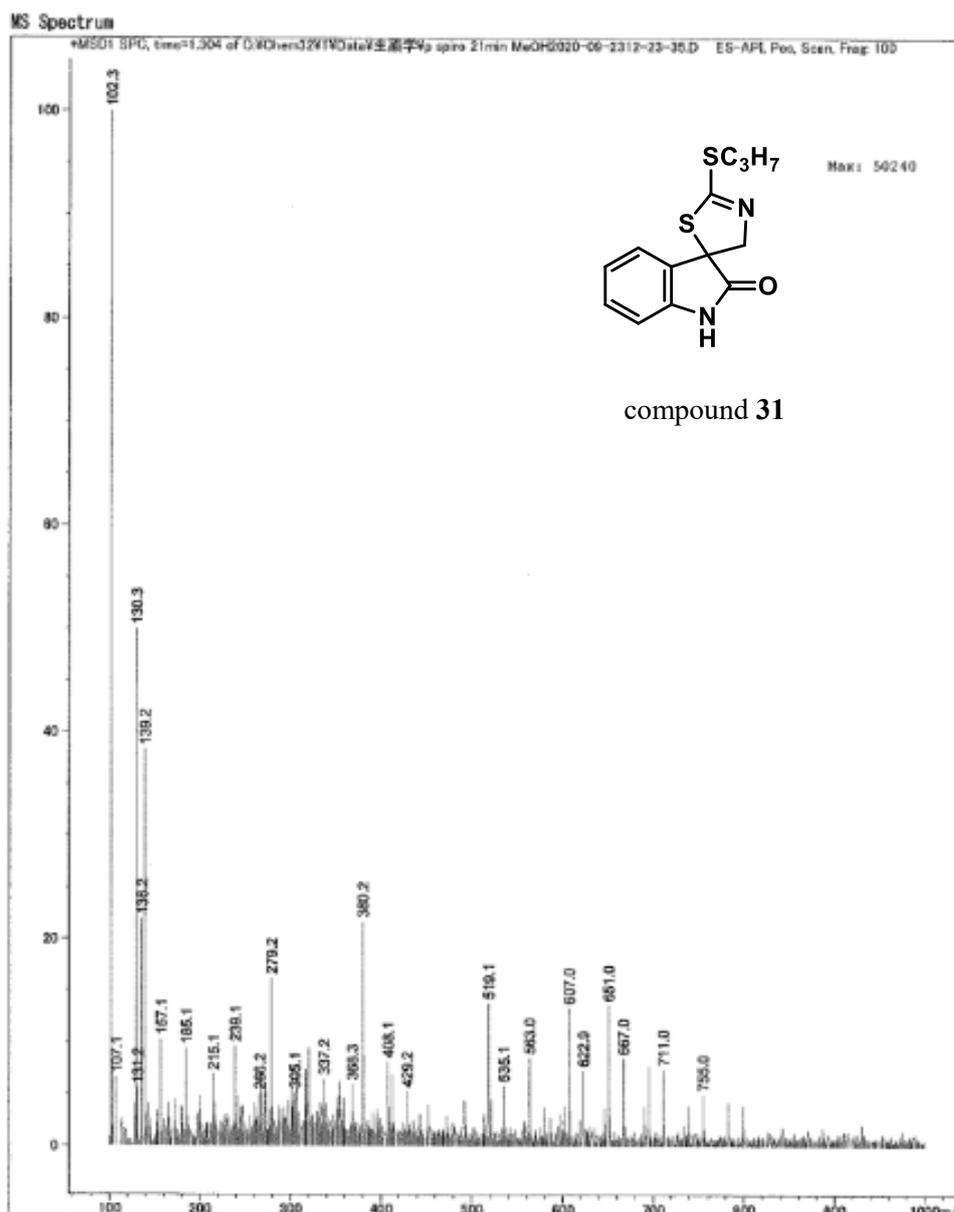
^1H NMR spectrum of compound **21**. Measured in CD_3OD .



Enlarged view:

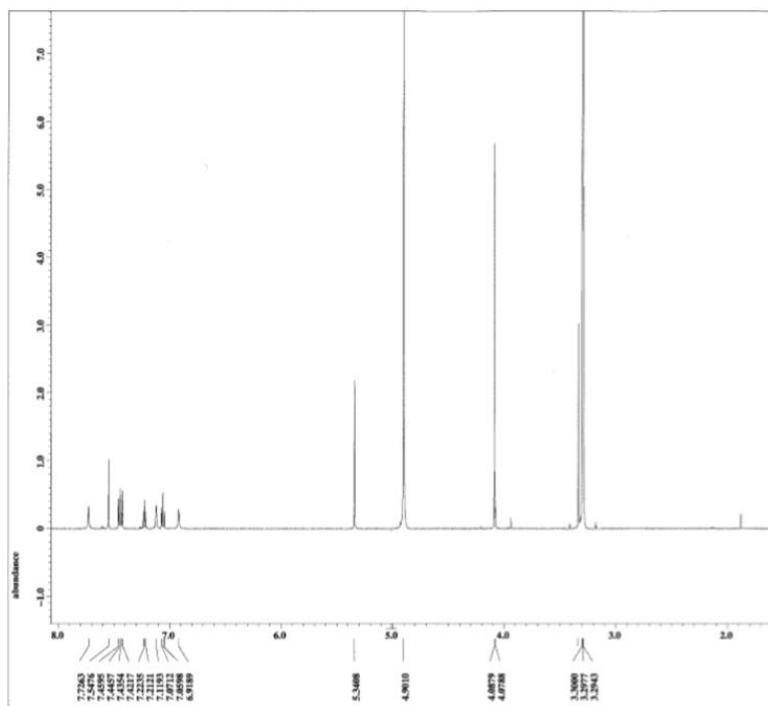
^1H NMR spectrum of compound **21**.

MS spectra of compound **31** by administrating compound **21** to the turnip

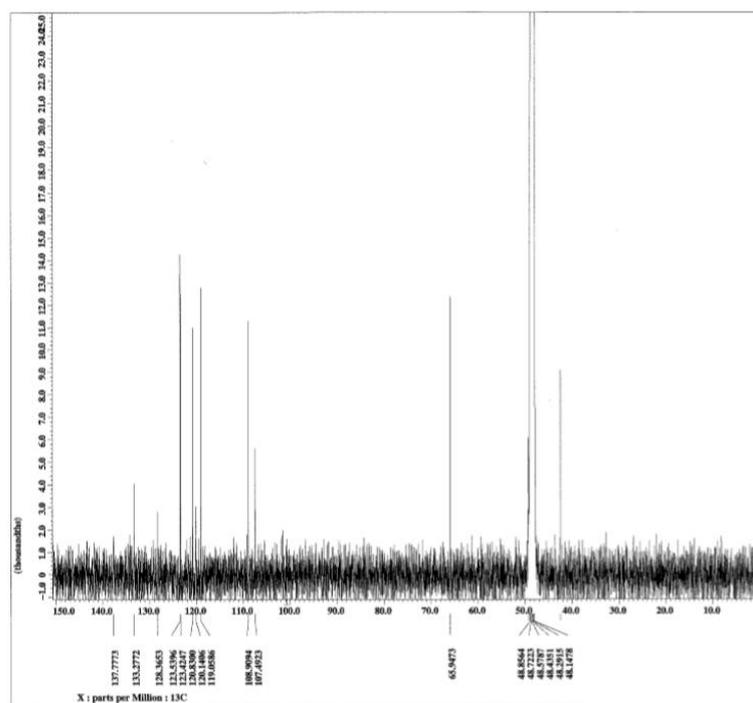


MS spectrum of compound **31** by administrating compound **21** to the turnip.
279 $[M+H]^+$ ion was observed.

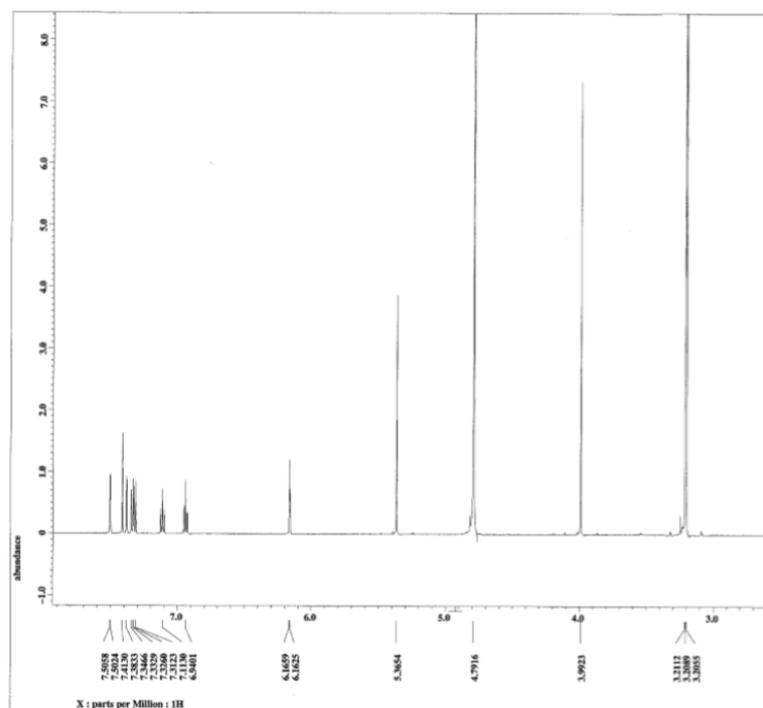
The ^1H and ^{13}C NMR spectrum data of compound 26, 27, 28, 29, and 30



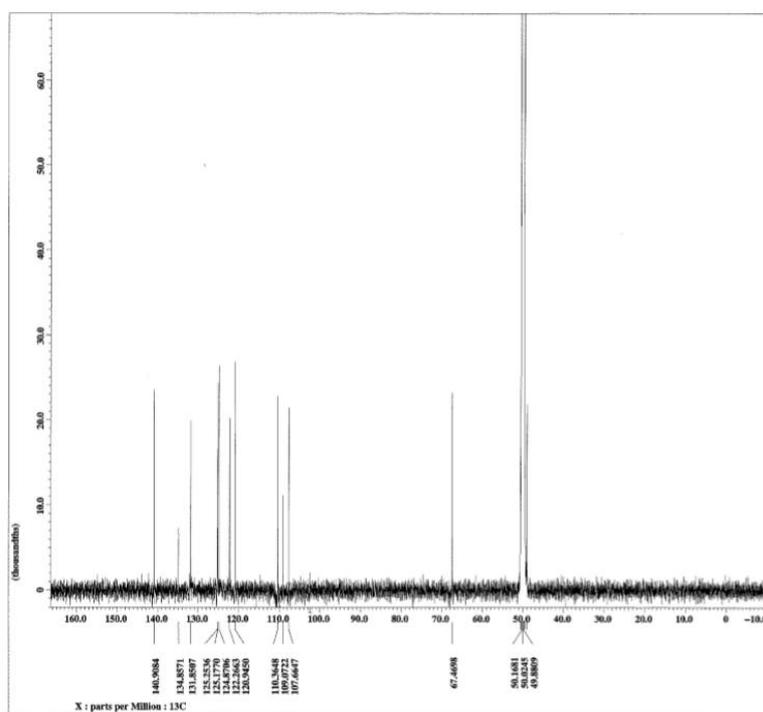
^1H -NMR spectrum of compound 26. Measured in CD_3OD .



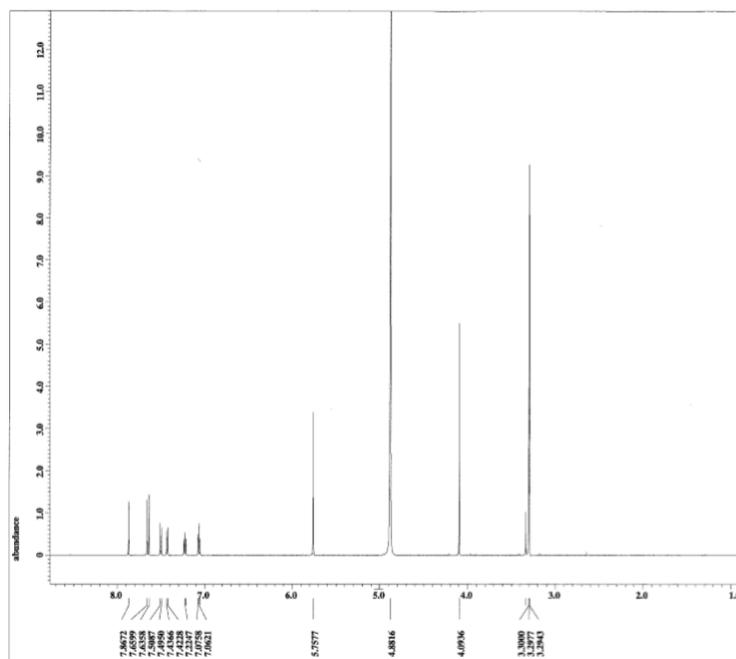
^{13}C -NMR spectrum of compound 26. Measured in CD_3OD .



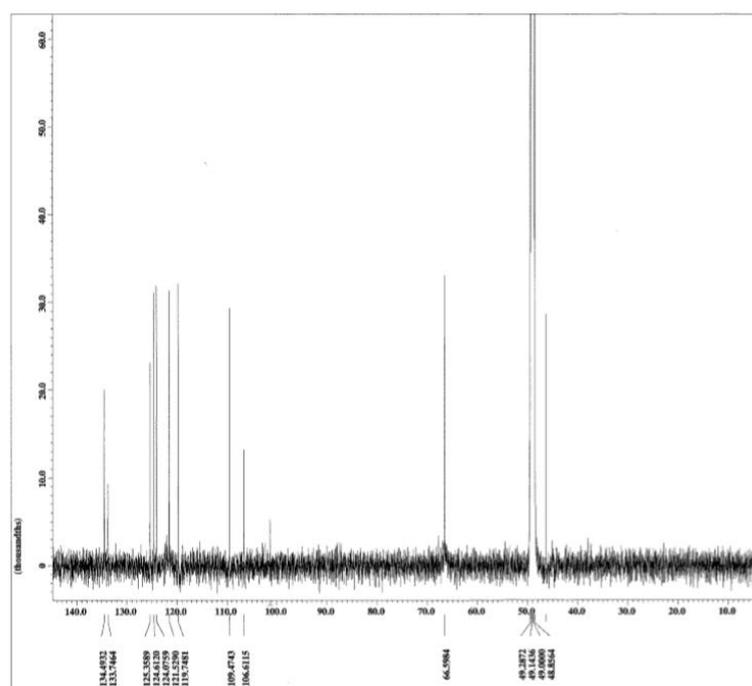
^1H -NMR spectrum of compound **27**. Measured in CD_3OD .



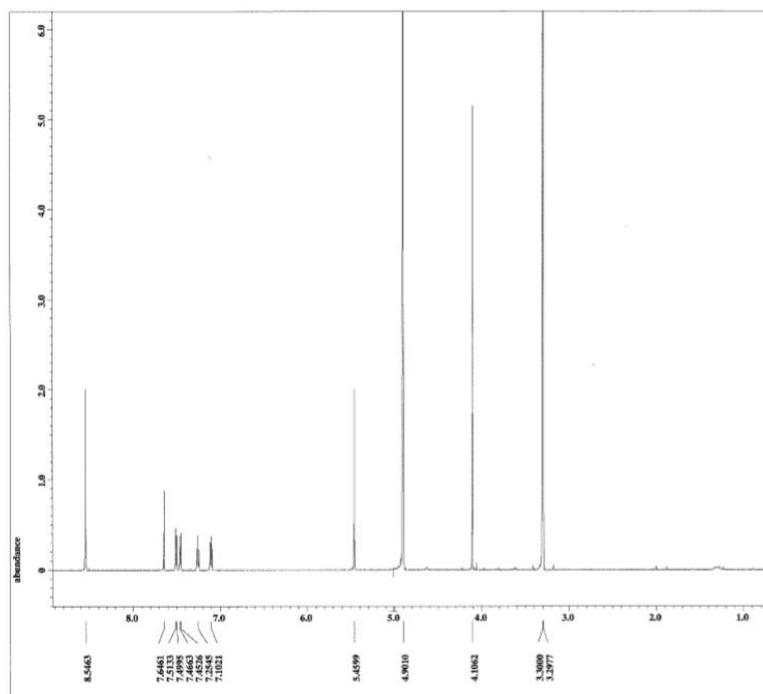
^{13}C -NMR spectrum of compound **27**. Measured in CD_3OD .



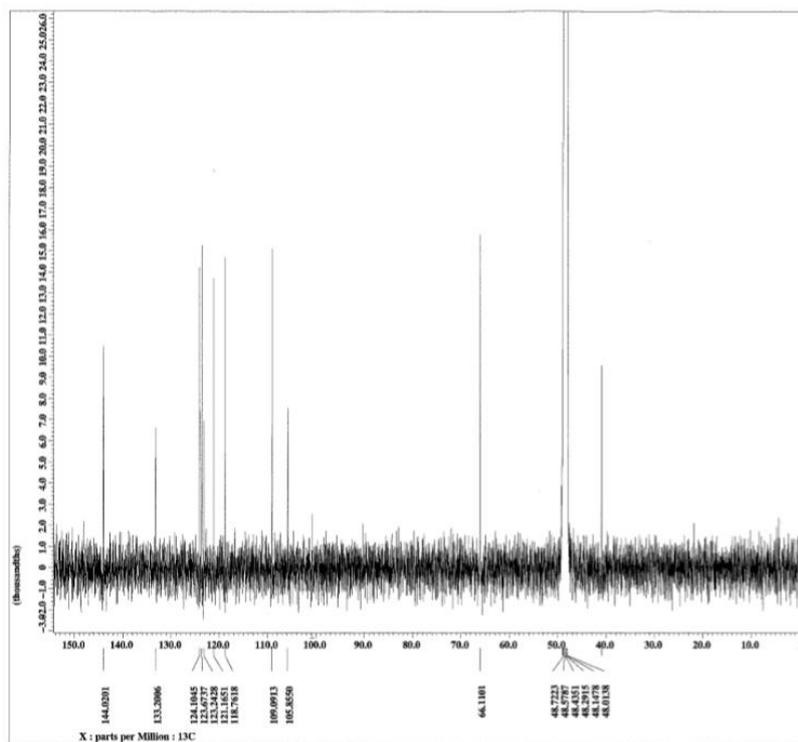
^1H -NMR spectrum of compound **28**. Measured in CD_3OD .



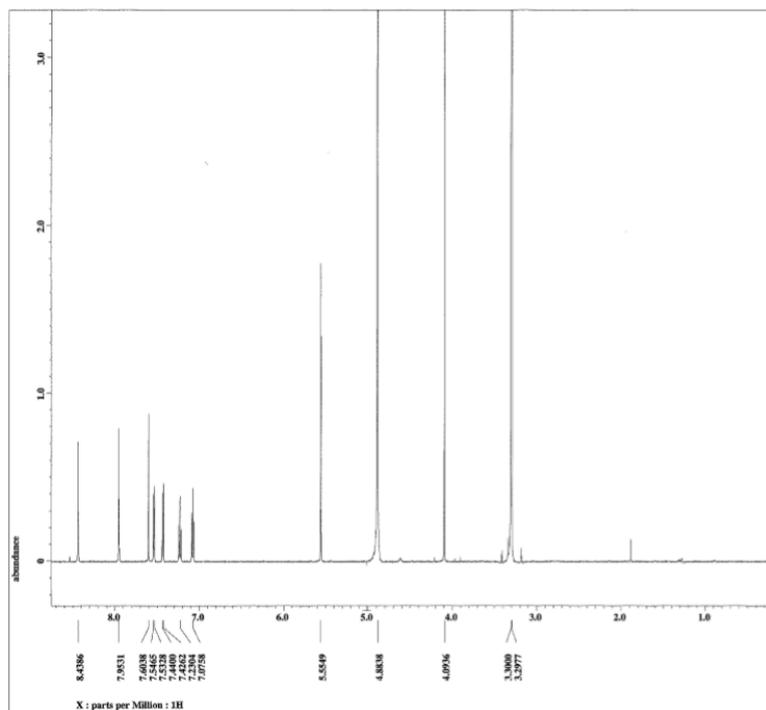
^{13}C -NMR spectrum of compound **28**. Measured in CD_3OD .



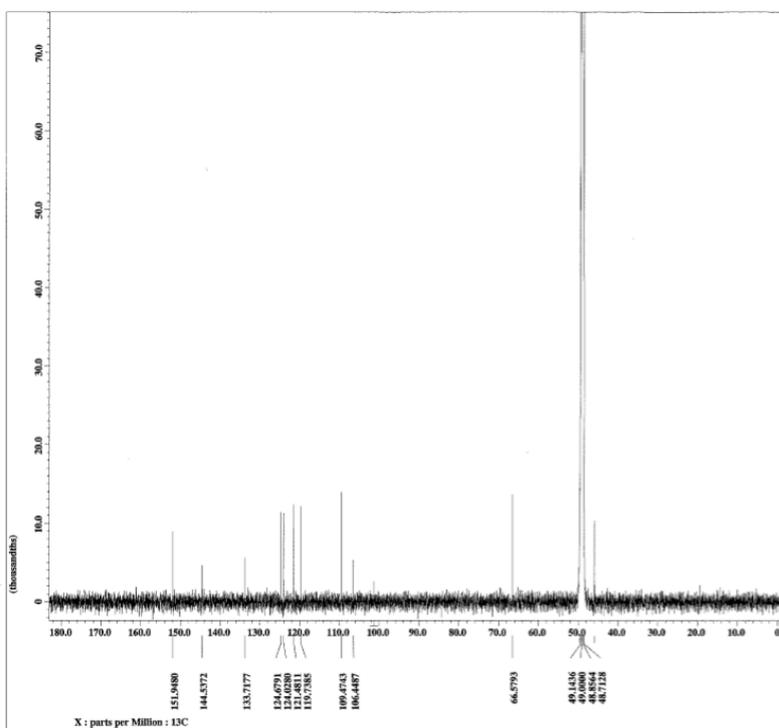
^1H -NMR spectrum of compound **29**. Measured in CD_3OD .



^{13}C -NMR spectrum of compound **29**. Measured in CD_3OD .



^1H -NMR spectrum of compound **30**. Measured in CD_3OD .



^{13}C -NMR spectrum of compound **30**. Measured in CD_3OD .

引用文献

- 1) Ye, N.; Chen, H.; Wold, E.A.; Shi, P.Y.; Zhou, J. Therapeutic potential of spirooxindoles as antiviral agents. *ACS Infect. Dis.* **2016**, *2*, 382–392.
- 2) Zheng, Y.; Tice, C. M., Singh, S. B. The use of spirocyclic scaffolds in drug discovery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 3673–3682.
- 3) Yu, B.; Yu, D. Q.; Liu, H. M. Spirooxindoles: promising scaffolds for anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97*, 673–698.
- 4) Lovering, F. Escape from flatland 2: complexity and promiscuity. *Med. Chem. Comm.* **2013**, *4*, 515–519.
- 5) Rottmann, M.; McNamara, C.; Yeung, B. K.; Lee, M. C.; Zou, B. Russell, B.; Seitz, P.; Plouffe, D. M.; Dharia, N. V.; Tan, J.; Cohen, S. B.; Spencer, K. R.; Gonzalez-Paez, G. E. Lakshminarayana, S. B.; Goh, A.; Suwanarusk, R.; Jegla, T.; Schmitt, E. K.; Beck, H. P.; Brun, R.; Nosten, F.; Renia, L.; Dartois, V.; Keller, T. H.; Fidock, D. A.; Winzeler, E. A.; Diagana, T. T. Spiroindolones, a potent compound class for the treatment of malaria. *Science.* **2010**, *329*, 1175–1180.
- 6) Soupart, A.; Gross, P.; Legros, J. J.; Alfoldi, S.; Annane, D.; Heshmati, H. M.; Decaux, G. Successful longterm treatment of hyponatremia in syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion with satavaptan (SR121463B), an orally active nonpeptide vasopressin V2-receptor antagonist. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2006**, *1*, 1154–1160.
- 7) Gines, P.; Wong, F.; Watson, H.; Milutinovic, S.; del Arbol, L.R.; Olteanu, D.; Hypo, CATSI. Effects of satavaptan, a selective vasopressin V (2) receptor antagonist, on ascites and serum sodium in cirrhosis with hyponatremia: a randomized trial. *Hepatology.* **2008**, *48*, 204–213.
- 8) Ghosh, A. K.; Schiltz, G.; Perali, R. S.; Leshchenko, S.; Kay, S.; Walters, D. E.; Koh, Y.; Maeda, K.; Mitsuya, H. Design and synthesis of novel HIV-1 protease inhibitors incorporating oxyindoles as the P'2- ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1869–1873.
- 9) Hagiwara, K.; Murakami, T.; Xue, G.; Shimizu, Y.; Takeda, E.; Hashimoto, Y.; Honda, K.; Kondoh, Y.; Osada, H.; Tsunetsugu-Yokota, Y.; Aida, Y. Identification of a novel Vpr-binding compound that inhibits HIV-1 multiplication in macrophages by chemical array. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *403*, 40–45.
- 10) Zou, B.; Chan, W. L.; Ding, M.; Leong, S. Y.; Nilar, S.; Seah, P. G.; Liu, W.; Karuna, R.; Blasco, F.; Yip, A.; Chao, A.; Susila, A.; Dong, H.; Wang, Q. Y.; Xu, H. Y.; Chan, K.; Wan, K. F.; Gu, F.; Diagana, T. T.; Wagner, T.; Dix, I.; Shi, P. Y.; Smith, P. W. Lead optimization of spiropyrazolopyridones: a new and potent class of dengue virus inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 344–348.
- 11) Chen, M.; Lin, S.; Li, L.; Zhu, C.; Wang, X.; Wang, Y.; Jiang, B.; Wang, S.; Li, Y.; Jiang, J.; Shi, J. Enantiomers of an indole alkaloid containing unusual dihydrothiopyran and 1,2,4-thiadiazole rings from the root of *Isatis indigotica*. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 5668–5671.
- 12) Takasugi, M.; Monde, K.; Katsui, N.; Shirata, A. Spirobrassinin, A novel sulfur-containing phytoalexin from the Daikon *Raphanus sativus* L. var. *hortensis* (Cruciferae). *Chem. Lett.* **1987**,

1631–1632.

- 13) Pilátová, M.; Šarišský, M.; Kutschy, P.; Miroššay, A.; Mezencev, R.; Čurillová, Z.; Suchý, M.; Monde, K.; Mirossay, L.; Mojžiš, J. Cruciferous phytoalexins: antiproliferative effects in T-Jurkat leukemic cells. *Leuk. Res.* **2015**, *29*, 415–421.
- 14) Kristofíková, Z.; Gazova, Z.; Sipošova, K.; Bartos, A.; Ricny, J.; Kotoučova, J.; Sirova, J.; Ripova, D. Effects of ferrofluid and phytoalexin spiobrassinin on thioflavin-t-based fluorescence in cerebrospinal fluid of the elderly and multiple sclerosis patients. *Neurochem. Res.* **2014**, *39*, 1502–1510.
- 15) Mezencev, R.; Galizzi, M.; Kutschy, P.; Docampo, R. *Trypanosoma cruzi*: antiproliferative effect of indole phytoalexins on intracellular amastigotes *in vitro*. *Exp. Parasitol.* **2009**, *122*, 66–69.
- 16) Pedras, M. S. C.; Sarwar, M. G.; Suchy, M.; Adio, A. M. The phytoalexins from cauliflower, caulilexins A, B and C: Isolation, structure determination, syntheses and antifungal activity. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1503–1509.
- 17) Monde, K.; Osawa, S.; Harada, N.; Takasugi, M.; Suchy, M.; Kutschy, P.; Dzurilla, M.; Balentova, E. Synthesis and absolute stereochemistry of cruciferous phytoalexine, (–)-spiobrassinin. *Chem. Lett.* **2000**, 886–88.
- 18) Suchy, M.; Kutschy, P.; Monde, K.; Goto, H.; Harada, N.; Takasugi, M.; Dzurilla, M.; Balentová, E. Synthesis, absolute configuration, and enantiomeric enrichment of a cruciferous oxindole phytoalexin, (S)-(–)-spiobrassinin, and its oxazoline analog. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3940–3947.
- 19) Kutschy, P.; Suchý, M.; Monde, K.; Harada, N.; Marušková, R.; Čurillová, Z.; Dzurilla, M.; Miklošová, M.; Mezencev, R.; Mojžiš, J. Spirocyclization strategy toward indole phytoalexins. The first synthesis of (±)-1-methoxyspiobrassinin, (±)-1-methoxyspiobrassinol, and (±)-1-methoxyspiobrassinol methyl ether. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 9489–9492.
- 20) Budovská, M.; Tischlerová, V.; Mojžiš, J.; Harvanová, M.; Kozlov, O.; Gondová, T.; Tomášková, N. 2'-Aminoanalogues of the cruciferous phytoalexins spiobrassinin, 1-methoxyspiobrassinin and 1-methoxyspiobrassinol methyl ether: synthesis and anticancer properties. *Tetrahedron* **2017**, *73*, 6356–6371.
- 21) Zhu, G.; Bao, G.; Li, Y.; Sun, W.; Li, J.; Hong, L.; Wang, R. Efficient catalytic kinetic of spiro-epoxyoxindoles with concomitant asymmetric friedel-crafts alkylation of indoles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 5332–5335.
- 22) Zhang, Y.; Li, Z.J.; Xu, H.S.; Zhang, Y.; Wang, W. Organic asymmetric henry reaction of isatins: highly enantioselective synthesis of 3-hydroxy-2-oxindoles. *RSC Adv.* **2011**, *1*, 389–392.
- 23) Liu, L.; Zhang, S.; Xue, F.; Lou, G.; Zhang, H.; Ma, S.; Duan, W.; Wang, W. Catalytic enantioselective henry reactions of isatins: application in the concise synthesis of (S)-(–)-spiobrassinin. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 7791–7795.
- 24) Cochi, A.; Métro T. X.; Gomez Pardo D.; Cossy, J. Enantioselective synthesis of SSR 241586 by using an organo-catalyzed Henry reaction. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3693–3695.
- 25) Pedras, M. S. C.; Montaut, S.; Suchy, M. Phytoalexins from the crucifer rutabaga: structures,

- syntheses, biosyntheses and antifungal activity. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4471–4476.
- 26) Pedras M. S. C., Montaut, S. The biosynthesis of crucifer phytoalexins: Unprecedented incorporation of a 1-methoxyindolyl precursor. *Chem. Commun.* **2004**, 452–453.
- 27) Pedras, M. S. C.; Okinyo, D. P. O. Remarkable incorporation of the first sulfur containing indole derivative: another piece in the puzzle of crucifer phytoalexins. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 51–54.
- 28) Pedras, M. S. C.; Okinyo, D. P. O., Thoms, K.; Adio, A. M. The Biosynthetic pathway of crucifer phytoalexins and phytoanticipins: de novo incorporation of deuterated tryptophans and quasi-natural compounds. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1129–1138.
- 29) Monde, K.; Takasugi, M. Biosynthesis of cruciferous phytoalexins: the involvement of a molecular rearrangement in the biosynthesis of brassinin. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 1582–1583.
- 30) Monde, K.; Takasugi, M.; Ohnishi, T. Biosynthesis of cruciferous phytoalexins. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6650–6657.
- 31) Klein, A. P.; Sattely, E. S. Two cytochromes P450 catalyze *S*-heterocyclizations in cabbage phytoalexin biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 837–839.
- 32) Klein, A. P.; Sattely, E. S. Biosynthesis of cabbage phytoalexins from indole glucosinolate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 1910–1915.
- 33) Calgaro-Kozina, A.; Vuu K. M.; Keasling J. D.; Loqué, D.; Sattely, E. S.; Shih, P. M. Engineering Plant Synthetic Pathways for the biosynthesis of novel antifungals. *ACS Cent. Sci.* **2020**, *6*, 1394–1400.
- 34) Monde, K.; Harada, N.; Takasugi, M.; Kutschy, P.; Suchy, M.; Dzurilla, M. Enantiomeric excess of a cruciferous phytoalexin, spirobrassinin, and its enantiomeric enrichment in an achiral HPLC system. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1312–1314.
- 35) Pedras, M. S. C.; M, Hossain.; M. G. Sarwar.; S, Montaut. Determination of the enantiomeric purity of the phytoalexins spirobrassinins by ¹H-NMR using chiral solvation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5469–5471.
- 36) Uniprot. <https://www.uniprot.org>
- 37) Kutschy, P.; Dzurilla, M.; Takasugi, M.; Torok, M.; Achbergerova, I.; Homzova, R.; Racova, M. New synthesis of indole phytoalexins and related compounds. *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 3549–3566.
- 38) Budovská, M. A novel palladium-catalyzed cyclization of indole phytoalexin brassinin and its 1-substituted derivatives. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 5575–5582.
- 39) Pedras, M. S. C.; Suchy, M.; Ahiahonu, P. W. K. Unprecedented chemical structure and biomimetic synthesis of erucalexin, a phytoalexin from the wild crucifer *Erucastrum gallicum*. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 691–701.
- 40) Zhong, X.; Chen, N.; Xu, J. A concise synthesis of cyclobrassinin and its analogues via a thiyl radical aromatic substitution. *New J. Chem.* **2018**, *42*, 13549–13557.
- 41) Shigeto, J.; Tsutsumi, Y. Roles of plant peroxidases in cell wall formation and modification. *木材学会誌* **2016**, *62*, *4*, 91–100.

- 42) Ling, K. Q.; Sayre, L. M. Horseradish peroxidase-mediated aerobic and anaerobic oxidations of 3-alkylindoles. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3543–3551.
- 43) Bones, A. M.; Rossiter, J. T. The myrosinase-glucosinolate system, its organization and biochemistry. *Physiol. Plant.* **1996**, *97*, 194–208.
- 44) Bones, A. M.; Rossiter, J. T. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1053–1067.
- 45) Agerbirk, N.; Olsen, C. E.; Sorensen, H.; Initial and final products, nitriles, and ascorbigens produced in myrosinase-catalyzed hydrolysis of indole glucosinolates. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1563–1571.
- 46) Hanley, A. B.; Parsley, K. R. Identification of 1-methoxyindolyl-3-methyl isothiocyanate as an indole glucosinolate breakdown product. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 769–771.
- 47) Hanley, A. B.; Parsley, K. R.; Lewis, J. A.; Fenwick, G. R. Chemistry of indole glucosinolates: intermediacy of indol-3-ylmethyl isothiocyanates in the enzymic hydrolysis of indole glucosinolates. *J. Chem. Soc., Perkin Transl.* **1990**, *8*, 2273–2276.
- 48) Wagner, A. E.; Huebbe, P.; Konishi, T.; Rahman, M. M.; Nakahara, M.; Matsugo, S.; Rimbach, G. Free radical scavenging and antioxidant activity of ascorbigen versus ascorbic acid: studies in vitro and in cultured human keratinocytes. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 11694–11699.
- 49) Kesinger, N. G.; Stevens, J. F. Covalent interaction of ascorbic acid with natural products. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1930–1939.
- 50) Barknowits, G.; Engst, W.; Schmidt, S.; Bernau, M.; Monien, B. H.; Kramer, M.; Florian, S.; Glatt, H. Identification and quantification of protein adducts formed by metabolites of 1-methoxy-3-indolylmethyl glucosinolate in vitro and in mouse models. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, *27*, 188–199.
- 51) Sumiya, T.; Ishigaki, M.; Oh, K. Synthesis of imidazole and indole hybrid molecules and antifungal activity against rice blast. *Int. J. Chem. Eng. Appl.* **2017**, *8*, 233–236.
- 52) Cross, P. E.; Dickinson, R. P.; Parry, M. J.; Randall, M. J. 3-(1-Imidazolylmethyl) indoles: potent and selective inhibitors of human blood platelet thromboxane synthetase. *Agents and Actions* **1981**, *11*, 274–280.
- 53) Baláž, M.; Kudličková, Z.; Vilková, M.; Imrich, J.; Balážová, L.; Daneu, N. Mechanochemical synthesis and isomerization of *N*-substituted indole-3-carboxaldehyde oximes. *Molecules* **2019**, *24*, 3347–3365.
- 54) Vo, Q. V.; Trenerry, C.; Rochfort, S.; Wadeson, J.; Leyton, C.; Hughes, A. B. Synthesis and anti-inflammatory activity of indole glucosinolates. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 856–864.
- 55) Kumar, A.; Sharma, S.; Maurya, R. A. A novel multi-component reaction of indole, formaldehyde, and tertiary aromatic amines. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 5937–5940.
- 56) Somei, M. 1-Hydroxyindoles. *Heterocycles* **1999**, *50*, 1157–1211.
- 57) Fréchar, A.; Fabre, N.; Péan, C.; Montaut, S.; Fauvel, M. T.; Rollin, P.; Fourasté, I. Novel indole-type glucosinolates from woad (*Isatis tinctoria* L.). *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 9015–9017.
- 58) Montaut, S.; Bleeker, R. S.; C. Jacques. Phytochemical constituents of *Cardamine diphylla*. *Can. J. Chem.* **2010**, *88*, 50–55.

- 59) Elliott, M. C.; Stowe, B. B. Distribution and variation of indole glucosinolates in Woad (*Isatis tinctoria* L.). *Plant. Physiol* **1971**, *48*, 498–503.
- 60) Mohn, T.; Cutting, B.; Ernst, B.; Hamburger, M. Extraction and analysis of intact glucosinolates- A validated pressurized liquid extraction/liquid chromatography-mass spectrometry protocol for *Isatis tinctoria*, and qualitative analysis of other cruciferous plants. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1166*, 142–151.
- 61) Pedras, M. S. C.; Sarma-Mamillapalle, V. K. The cruciferous phytoalexins rapalexin A, brassalexin A and erucalexin: Chemistry and metabolism in *Leptosphaeria maculans*. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3991–3996.