

(様式 5)

2022 年 5 月 19 日
Year Month Day

学位（博士）論文要旨

(Doctoral thesis abstract)

論文提出者 (Ph.D. candidate)	工学府博士後期課程 生命工学専攻 (major) 令和元年度入学(Admission year) 学籍番号 19831701 氏名 永田 亜希子 (student ID No.) (Name)
主指導教員氏名 (Name of supervisor)	長澤 和夫
論文題目 (Title)	ビタミン D ラクトンの立体選択的合成法の開発とそのケミカルツールの創製
論文要旨（2000 字程度） <p>ビタミン D ラクトン (D_3-lactone)はビタミン D_3 の最終代謝産物のひとつであり、これまでに活性型ビタミン D_3 ($1,25D_3$)の惹起する骨吸収の促進や骨形成の抑制活性に対し、アンタゴニスト活性を示し、また血清中のカルシウム濃度を低下させることが報告されている。また C23 位、C25 位の立体化学の違いにより生理活性や核内受容体である Vitamin D receptor (VDR)への結合親和性が異なることなどが明らかになった。一方で D_3-lactone の生理活性の研究は、$1,25D_3$ との比較の観点から $1,25D_3$ の主要な生理活性である骨代謝に着目した活性評価しかなされてこなかった。D_3-lactone 自体の生理活性について興味が持たれる。そこで本研究では、D_3-lactone の骨代謝以外の生理活性を探索するため、D_3-lactone のケミカルプローブを用いたケミカルバイオロジー手法による結合標的タンパク質の同定を行った（第 3 章）。本研究で明らかにした結合タンパク質と疾患の観点から、D_3-lactone の血中濃度を測定する必要があると考え、LC-MS/MS による D_3-lactone の血中濃度測定方法を開発することを行った（第 4 章）。なおこれらの研究を行うためには、D_3-lactone の量的供給を可能とし、ラクトン骨格を有するプローブ分子の合成が必須となる。そこで D_3-lactone の化学合成手法の確立を行った（第 2 章）。D_3-lactone の化学合成法の開発では、C23 位および C25 位の立体選択的な構築法を確立する必要がある。本研究では C23 位、C25 位に関する 4 種の各異性体の立体選択的合成法の確立を行った。</p> <p>本論文は、以下の 5 章で構成されている。</p> <p>第 1 章では D_3-lactone の先行研究について述べた。まずビタミン D 由来の生理活性を発現する活性型ビタミン D_3 ($1,25D_3$)から最終代謝産物のひとつである $1,25D_3$-lactone への代謝経路について述べた。さらに、D_3-lactone の生理活性についてまとめた。最後に、本研究の目的と本論文の構成について述べた。</p> <p>第 2 章では、D_3-lactone の立体選択的な合成についてまとめた。C23, C25 位の立体選択的構築法の開発を行った。その結果、C23 位は Infokhen Lythgoe Diol を出発原料とし、合成したアルデヒドに対して $CrCl_2$ 触媒、Mn、Cobalt(II)、Phthalocyanine (CoPC)、LiCl、Cp_2ZrCl_2、</p>	

Proton Sponge (PS)、不斉リガンド(*R*)-L2 存在下、アリルブロマイドを反応させることで立体選択的にクロチル化が進行し、(23*S*)-エチルエステルを得ることができた。また不斉リガンド (*S*)-L2 を用いた場合、逆の立体選択性でクロチル化反応が進行し、(23*R*)-エチルエステルを得ることができた。C25 位の立体化学の制御は、得られたエチルエステルの還元によって得られる(23*S*)-アリルアルコールに対して、VO(acac)₂ 触媒存在下、TBHP を作用させることで立体選択的に(23*S*, 25*R*)-エポキシドを得ることができた。一方、C23 位の水酸基を TBS 基で保護した(23*S*)-アリルアルコールに対して *m*CPBA を作用させることで(23*S*, 25*S*)-エポキシドが立体選択的に得られることを見出した。得られた 4 種類のエポキシド体はそれぞれ CD 環前駆体へと誘導し、別途合成した 2 種類の A 環シントンの Pd 触媒によるカップリング反応により、25D₃-lactone と 1,25D₃-lactone の 4 種の立体異性体の全てを立体選択的に合成することができた。

第 3 章では、D₃-lactone の結合タンパク質の同定についてまとめた。まず第 2 章で構築した合成法を基盤とし、合成した C1 位にアミノ基を有する 25D₃-lactone に対して、アルキン部位とベンゾフェノンをも有する酸クロリドを反応させることで 25D₃-lactone フォトアフィニティープローブを合成した。得られた 25D₃-lactone フォトアフィニティープローブを HEK293 細胞に添加したのち、UV 照射により、D₃-lactone とその標的タンパク質とを共有結合により架橋し、導入したアルキンを介して N₃ 基を有するビオチンとのクリック反応によりビオチンを導入した。アビジンを用いて複合体を単離し、SDS-PAGE で分離し、D₃-lactone と特異的に結合するタンパク質を単離することができた。単離したタンパク質を LC/MS-MS 分析により解析したところ、脂肪酸のβ-酸化に関与する HADHA であることが分かった。さらなる解析から、D₃-lactone は、カルニチンの生合成に関与する TMLD と HADHA の結合を解離させ、カルニチンの生合成を抑制することで脂肪酸のβ-酸化を抑制していることがわかった。

第 4 章では、LC-MS/MS を用いた D₃-lactone の血中濃度測定についてまとめた。A 環部に重水素を導入する手法を確立し、新しい重水素標識された D₃-lactone の合成を行った。A 環への重水素導入は L-リンゴ酸を出発原料とし、4 工程で合成可能なトリオールに対して、H₂ 雰囲気下、重水中、Ru/C 触媒を作用させ、80 °C で 24 時間攪拌することで 93% 以上の高い重水素交換率で導入できることを見出した。得られたトリオール-*d*₃ は、既知の手法を用いることで途中で重水素交換率が低下することなく、D₃-lactone-*d*₃ へと誘導できることが分かった。合成した D₃-lactone-*d*₃ は非標識 D₃-lactone と同様の SRM スペクトルピークを示した。その D₃-lactone-*d*₃ を内部標準物質として用いて作成した検量線は良好な直線性を示し、その検量線を用いてヒトプール血清中の D₃-lactone を定量することができた。今回合成した新しい重水素標識体により、これまでヒト血清中の測定例の少ない D₃-lactone の精度の高い定量が可能になった。

第 5 章では本研究を総括し、今後の展望について述べた。

(英訳) ※和文要旨の場合(400 words)

Vitamin D lactone (D_3 -lactone) is one of the major metabolites of vitamin D_3 . D_3 -lactone exhibits antagonistic activity against the promotion of bone resorption and suppresses bone formation induced by active vitamin D_3 ($1,25D_3$). In addition, the difference in stereochemistry between C23 and C25 revealed that the bioactivity and the binding affinity to Vitamin D receptor (VDR) are different. Studies on the biological activities of D_3 -lactone have only focused on bone metabolism from the perspective of comparison with $1,25D_3$.

We have developed synthetic approaches for the preparation of D_3 -lactone to extensively investigate in chemical biology field.

In chapter 1, we describe the metabolic pathway from $1,25D_3$ to $1,25D_3$ -lactone. In addition, we have summarized previous studies on the biological activities of D_3 -lactone. Finally, the purpose of this study and the structure of this paper are described.

In chapter 2, we describe stereoselective synthesis of the CD-ring synthon of D_3 -lactone, involving Chromium-catalyzed crotylation using chiral ligand and $VO(acac)_2$ -mediated epoxidation. We synthesized aldehyde from vitamin D_2 , and carried out diastereoselective crotylation with ethyl bromomethylacrylate in the presence of Chiral ligand (*R*)-L2 to afford (23*S*)-ethyl ester. Reduction of (23*S*)-ethyl ester with DIBAL-H followed by epoxidation of the resulting (23*S*)-allyl alcohol utilizing $VO(acac)_2$ and TBHP gave (23*S*, 25*R*)-epoxide. On the other hand, we found that (23*S*, 25*S*)-epoxides could be obtained stereoselectively by epoxidation of *m*-CPBA on (23*S*)-allylic alcohols with the hydroxyl group at the C23 position protected by a TBS group. Finally, each of the four epoxide forms could be derived to CD-ring synthon of D_3 -lactone, and all four stereoisomers of $1,25D_3$ -lactone could be synthesized.

In chapter 3, we describe the identification of the binding protein of D_3 -lactone. We synthesized a D_3 -lactone photo affinity probe based on the synthetic method developed in Chapter 2. The obtained D_3 -lactone photo affinity probe was added to HEK293 cells, UV irradiation was used to covalently cross-link D_3 -lactone with its target protein, and then the biotin was introduced by a N_3 -alkyne click reaction. The complex was isolated using avidin and separated by SDS-PAGE to isolate the protein that specifically binds to D_3 -lactone. The isolated protein was analyzed by LC-MS/MS and found to be HADHA, which is involved in the β -oxidation of fatty acids. Further analysis showed the D_3 -lactone dissociates the binding of HADHA to TMLD and inhibits the β -oxidation of fatty acids by suppressing the biosynthesis of carnitine.

In chapter 4, we describe synthesis of deuterium-labeled D_3 -lactone for the determination of blood levels by LC-MS/MS as internal standard. We synthesized triol from L-malic acid and carried out H/D exchange reaction with D_2O in the presence of Ru/C under H_2 atmosphere. The obtained triol- d_3 could be derived to D_3 -lactone- d_3 without reducing the deuterium exchange rate on the way. We measured the concentrations of D_3 -lactone in human pooled serum by LC-MS/MS using synthesized deuterium-labeled D_3 -lactone as internal standards.

In chapter 5, we summarize this study and discusses future prospect.