

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	パラジウム触媒を用いた連続的環化反応によるジメチルグロイオシホンAの全合成研究およびスピルコスタチンAの固相合成とケミカルバイオロジー
Title(English)	
著者(和文)	飯島悠介
Author(English)	Yusuke Iijima
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第6788号, 授与年月日:2007年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:
Citation(English)	Degree:Doctor of Engineering, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第6788号, Conferred date:2007/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

## 平成 18 年度学位論文

「パラジウム触媒を用いた連続的環化反応によるジ  
メチルグロイオシホン A の全合成研究およびスピル  
コスタチン A の固相合成とケミカルバイオロジー」

東京工業大学大学院理工学研究科

応用化学専攻 土井・高橋研究室

04D08031 飯島 悠介

## 目次

### Abbreviations

第1章「序論」	1
1-1 はじめに	2
1-2 生体機能分子と有機合成	2
1-3 Target Oriented SynthesisとDiversity Oriented Synthesis	3
1-4 スピロ環骨格構築	4
1-4-1 $\pi$ -アリルパラジウム錯体の反応	4
1-4-2 $\pi$ -アリルパラジウム錯体に対するアルケン挿入反応を用いた連続的環化反応	8
1-4-3 スピロ環骨格構築法	11
1-4-4 ジメチルグロイオシホンA	14
1-4-5 ジメチルグロイオシホンAの合成例	15
1-5 コンビナトリアルケミストリーと固相合成	16
1-5-1 パラレル合成とスプリット&ミックス合成	16
1-5-2 固相担体	20
1-5-3 リンカー	22
1-5-4 固相上での合成反応	24
1-5-5 固相ペプチド合成	26
1-6 ケミカルバイオロジー	28
1-6-1 ケミカルジェネティクスとケミカルゲノミクス	28
1-6-2 ケミカルプローブ	30
1-6-3 タンパク質相互作用ネットワーク解析	31
1-7 転写制御	33
1-7-1 遺伝情報の発現と転写	33
1-7-2 ヒストン	34
1-7-3 ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC)	36
1-7-4 HDAC阻害剤	37
1-7-5 スピルコスタチンA	38
1-7-6 スピルコスタチンAの生理活性発現機構	39
1-7-7 スピルコスタチンAの合成例	40
1-8 本論文の概要	41
Reference	44

第2章 「 $\pi$ -アリルパラジウム錯体に対する分子内アルケン挿入反応を用いたジメチルグロイ オシホンAの全合成研究」	46
2-1 はじめに	47
2-2 合成計画	47
2-3 環化前駆体合成	48
2-4 環化反応	50
2-5 官能基変換	53
2-6 官能基変換(ルート2)	56
2-7 形式全合成	60
2-8 まとめ	63
Reference	64
Experimental section	65
第3章 「スピルコスタチンAの全合成とケミカルバイオロジー」	104
第1節 「スピルコスタチンAの全合成」	105
3-1-1 はじめに	106
3-1-2 合成戦略	106
3-1-3 $\beta$ -ヒドロキシ酸の合成	110
3-1-4 スタチン誘導体の合成	117
3-1-5 環化前駆体の合成	117
3-1-6 スピルコスタチンAの全合成	118
3-1-7 まとめ	121
Reference	121
Experimental section	122
第2節 「スピルコスタチンAを用いたケミカルバイオロジー」	144
3-2-1 はじめに	145
3-2-2 合成計画	145
3-2-3 ペプチドタグの合成	147
3-2-4 スピルコスタチンA誘導体の合成	149
3-2-5 ケミカルプローブの合成	149
3-2-6 活性試験とHDAC複合体の釣り上げ	151
3-2-7 まとめ	157
Reference	158
Experimental section	159

第4章 「固相合成法を用いたスピルコスタチンAの全合成および誘導体合成」	190
4-1 はじめに	191
4-2 合成計画	191
4-3 スルホンアミドリンカーを用いた合成	194
4-4 ヒドラジンリンカーを用いた合成	197
4-5 2-クロロトリチルリンカーによる合成計画	197
4-6 スピルコスタチンAの固相全合成	198
4-7 誘導体合成計画	203
4-8 誘導体合成	204
4-9 まとめ	207
Reference	208
Experimental section	209
第5章 「結論」	221

謝辞

## Abbreviations

Ac	acetyl	DNA	deoxyribonucleic acid
AIBN	2,2'-azobis(isobutyronitrile)	EDCI	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
Ala	alanine	ee	enantiomeric excess
Am	amyl(pentyl)	eq.	equivalent
aq.	Aqueous	Et	ethyl
Asp	aspartic acid	FDA	Food and Drug Administration
BINAP	2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl	Fmoc	9-fluorenylmethoxycarbonyl
Bn	benzyl	g	gram(s)
Boc	<i>t</i> -butoxycarbonyl	Gly	glycine
BOP	benzotriazole-1-yl-oxy-tri(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate	GPC	gel permeation chromatography
Bu	butyl	h	hour(s)
°C	degree of Celsius	HAT	histone acetyl transferase
CAN	ceric ammonium nitrate	HATU	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
CDI	1,1'-carbonyl-1 <i>H</i> -imidazole	HBTU	2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
COSY	2D correlated spectroscopy	HDAC	histone deacetylase
Cp	cyclopentadienyl	HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol
Cy	cyclohexyl	HMBC	heteronuclear multiple-bond correlation
Cys	cysteine	HMDS	hexamethyldisilazane
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane	HMQC	heteronuclear multiple-quantum coherence
dba	dibenzylideneacetone	HOAt	1-hydroxy-7-azabenzotriazole
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene	HOBt	1-hydroxybenzotriazole
DCC	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide	HOSu	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone	HPLC	high-performance liquid chromatography
DHP	2 <i>H</i> -dihydropyrene	HRMS	high resolution mass spectrometry
DIAD	diisopropyl azodicarboxylate	Hz	hertz
DIBAL	diisobutylaluminum hydride	Im	imidazole
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimide	IR	infrared
DMAP	dimethylaminopyridine	KHMDS	potassium hexamethyldisilazide
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide	L	liter(s)
DMSO	dimethyl sulfoxide	LDA	lithium diisopropylamide

Lys	lysine	SPPS	solid phase peptide synthesis
M	molar	<i>t</i>	tertiary
MCPBA	<i>m</i> -chloroperbenzoic acid	TBHP	<i>tert</i> -butyl hydroperoxide
Me	methyl	TBS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
min	minute(s)	TFA	trifluoroacetic acid
MNBA	2-methyl-6-nitrobenzoic anhydride	TfOH	trifluoromethanesulfonic acid
mol	mole(s)	THF	tetrahydrofuran
MPM	4-methoxybenzyl	TLC	thin layer chromatography
mRNA	messenger ribonucleic acid	TMEDA	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine
MS	mass spectrometry	TMS	trimethylsilyl
MTPA	$\alpha$ -methoxy- $\alpha$ -trifluoromethyl-phenylacetic acid	tol	tolyl
<i>n</i>	normal	TPAP	tetrapropylammonium perruthenate
N	normal	Trt	trityl
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide	Ts	tosyl
NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidone	Tyr	tyrosine
NMR	nuclear magnetic resonance	UV	ultra violet
NMO	4-methylmorpholine <i>N</i> -oxide		
NOE	nuclear overhauser effect		
Nu	nucleophile		
PEG	polyethyleneglycol		
Pfp	pentafluorophenyl		
Ph	phenyl		
Pht	phthaloyl		
ppm	parts per million		
PPTS	pyridinium <i>p</i> -toluenesulfonate		
Pr	propyl		
py	pyridine		
PyBOP	benzotriazole-1-yl-oxy- tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate		
PyBrop	bromotripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate		
quant	quantitative		
RNA	ribonucleic acid		
rt	room temperature]		

# 第 1 章

## 「序論」

## 1-1 はじめに

ヒトゲノムプロジェクトが終了し、ポストゲノム時代とよばれて久しい現在、この生物学におけるパラダイムシフトは化学、とりわけ有機合成化学の分野においても著しい革新をもたらしつつある。ポストゲノム研究の一つとして細胞内の全タンパク質（プロテオーム）の機能解明を目的とするプロテオミクスがある。これは高感度な質量分析計の開発により飛躍的に進歩してきた研究分野である。従来、生物学的な手法により行われてきたこの分野の研究は、近年ではタンパク質に対する特異的な低分子リガンドを手がかりとしてタンパク質の機能解明を目指すケミカルバイオロジーが盛んに取り入れられるようになってきた。そのためこの低分子リガンドの供給を行うべく有機合成化学の重要性はますます大きくなってきている。特異的な低分子リガンドの開発には類縁化合物を数多く合成しその中から最適なものを見つけていくというハイスループットな合成、評価が必要不可欠である。このハイスループットな合成法としてコンビナトリアルケミストリーがあり、多種類の誘導体を効率よく合成するためにはそれに適した合成戦略が必要となる。

一方で特異な生理活性を持つ天然物はそれ自身が有用なリガンドであり、直接、間接的に医薬品として使われることも少なくない。しかしながら、天然物は多くの場合天然からは微量しか得られないため詳細な活性機構の解明や、場合によってはその構造を決定するためにも有機合成による供給が必要となる。そのためには効率的な合成戦略が重要であり、特に新規な骨格を有する化合物の場合、新たな方法論の開発が重要となる。

以上述べたように現在の有機合成においては一つの標的化合物を効率よく作る従来型の合成はもちろんのこと多種類の化合物を効率よく作る多様性指向型の合成も同様に重要である。すなわち現在の有機合成化学者は一つの標的化合物を指向した合成と誘導体合成も視野に入れた合成を状況に応じて使い分ける、もしくは組み合わせることによってより効率的な合成を行う必要があると考えられる。そこで筆者は新規骨格構築法によるジメチルグロイオンホン A の全合成の検討および誘導体合成を指向した合成戦略によるスピルコスタチン A の全合成、固相合成を利用した誘導体合成さらにスピルコスタチン A をリガンドとすることで標的タンパク質の機能解明を目的としたケミカルバイオロジー研究を行ったので以下に述べる。

## 1-2 生体機能分子と有機合成

生体機能分子とは多くの場合、DNA、RNA、タンパク質といった生体高分子と相互作用することによってそれらの機能に変化をもたらすことができる化合物であり、生理活性天然物から合成医薬品まで多くのものがこの範疇に含まれる (Figure 1-1)。

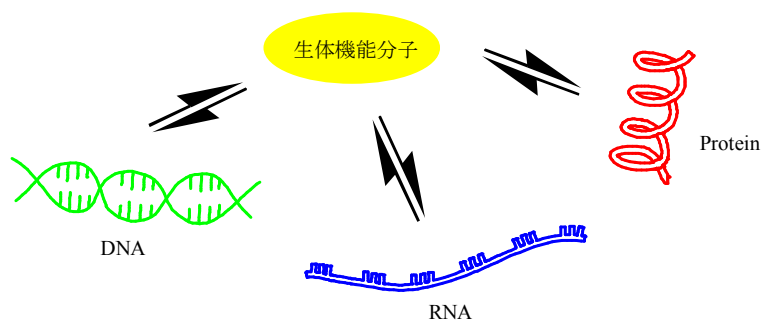


Figure 1-1

特に天然物は生物種の多様性にともない実に多種多様な化合物が報告されている。とりわけ骨格の多様性は到底人知の及ぶものではなくこれまで想像もつかなかったような新奇な骨格を有する天然物が単離、構造決定されてきた。この多様性に伴い生理活性も幅広く、そのもの自身が医薬品として応用される場合から、それ自体は毒性の問題から薬として適していなくても天然物が標的とする生体分子を明らかにすることにより、あらたな戦略による創薬研究のシーズになるなど生体機能分子としての重要性は最も高いといえる。しかし、天然物は多くの場合微量しか得られず、十分な活性試験や場合によっては完全な立体化学の決定ですら困難な場合がある。さらに必要十分量を天然から得ようとするならば膨大な時間、労力、コストがかかるのみならず生態系への影響により貴重な生物資源の枯渇にもつながりかねない。そのため有機合成による供給が重要となってくる。だが、有機合成による供給も天然物の非常に複雑な構造のため現在においてもきわめて困難と言わざるを得ない状況である。この状況を打開するためにも新たな方法論や新規反応の開発により高効率な合成を行い、その知見を積み重ねていくことが重要であると考えられる。

### 1-3 Target Oriented Synthesis と Diversity Oriented Synthesis

天然物をはじめとした標的化合物の合成を考える際、従来から行われているアプローチは合成を一段階ずつ逆にたどっていき、最終的に入手容易な化合物へと導く逆合成を考えるという手法である。反応としてはよく検討されたものから新規反応まで様々な反応を組み合わせ、効率のよい合成を目指す。特に新規な骨格を有する化合物の場合、新たな反応を開発することで新たな切り口から効率的な合成を試みることも多い。一方、近年では天然物をもとに誘導体をつくり、そこから創薬のシードを見つける、または誘導体からケミカルプローブを合成し、機能解明を行うといった天然物を全合成するだけでなくさらにそこから生物学的な応用研究が頻繁に行われるようになってきた。天然物をもとにした誘導体を合成しようとしたとき、それぞれの誘導体に対し異なる合成ルートで合成を行っていたのでは非常に効率が悪く、膨大な時間もかかる。そのため全合成を行う際から誘導体合成も視野に入れた統一的な合成ルートを考案することが重要である。この際選択すべき反応は適用範囲が広く、高収率である信頼できる反応でなければならない。特に後処理が簡

便な固相合成により複数の誘導体を合成するのであれば基質によって反応性にばらつきがあれば最終生成物の収率や純度に大きな影響を与えるであろう。場合によっては全く生成物が得られないといったことも起こりうる。このように天然物など 1 つの標的に絞って効率的な合成を目指すのか、複数の誘導体合成も視野に入れて合成するのかによって合成戦略から実際に用いるべき反応まで違いが出てくる。そのため、近年では従来型の 1 つの標的化合物に対する合成戦略を Target Oriented Synthesis、誘導体合成を視野に入れた合成戦略を Diversity Oriented Synthesis<sup>1)</sup>と称する (Figure 1-2)。

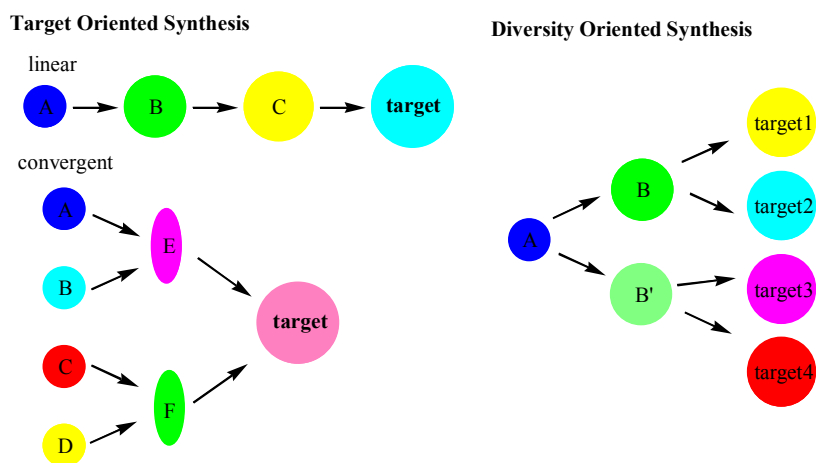


Figure 1-2

#### 1-4 スピロ環骨格構築

##### 1-4-1 $\pi$ -アリルパラジウム錯体の反応

現在、パラジウムを触媒とする有機合成反応が数多く開発され利用されている。パラジウムを触媒とする反応は接触水素化、Wacker 反応に代表される酸化、還元反応から始まり、さまざまな炭素-炭素結合形成反応が開発され、有機合成化学において高い信頼性のある反応として様々な合成に用いられている。その代表的な反応としては溝呂木 - Heck 反応、環化異性化反応のほかに、現在最も多く利用されているともいえるさまざまな有機金属反応剤とのトランスメタル化を利用したクロスカップリング反応、そしてもう 1 つ  $\pi$ -アリルパラジウム錯体に対するさまざまな求核種との反応が挙げられる。

$\pi$ -アリルパラジウム錯体はアリル位に脱離基を有する基質が 0 価のパラジウムに対し酸化的付加することによって生じる。アリル配位子には酸化的付加によって生じた  $\sigma$  結合のみで金属と結合した  $\sigma$ -アリルと、アルケンの  $\pi$  電子が配位することによって生じる  $\pi$  結合も加わりそれらが共鳴した形の  $\pi$ -アリルの 2 種類がある。パラジウムとの錯体は専ら  $\pi$ -アリル型となる (Figure 1-3)。

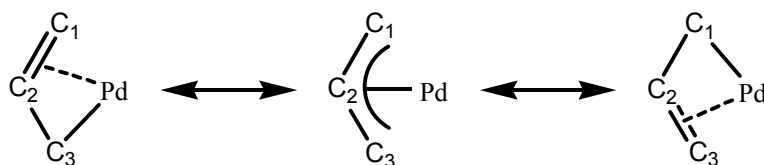


Figure 1-3

また、 $\pi$ -アリルパラジウム錯体が生成する際にアリル位に脱離基を有する基質はパラジウムに対して  $S_N2$  型に酸化付加を起こす。まず、アリル化合物の二重結合がパラジウムに対して配位し、続いてパラジウムがアリル炭素を求核攻撃する。この際、アリル炭素の立体反転を伴って  $\pi$ -アリルパラジウム錯体が生成する。そのため光学活性なアリル化合物を基質とした場合、生成する  $\pi$ -アリルパラジウム錯体も光学活性となる。しかし、 $\pi$ -アリルパラジウム錯体はラセミ化を起こしやすいため生成すると同時に反応させなければ効率よく不斉転写を行うことは難しい (Figure 1-4)<sup>2)</sup>。

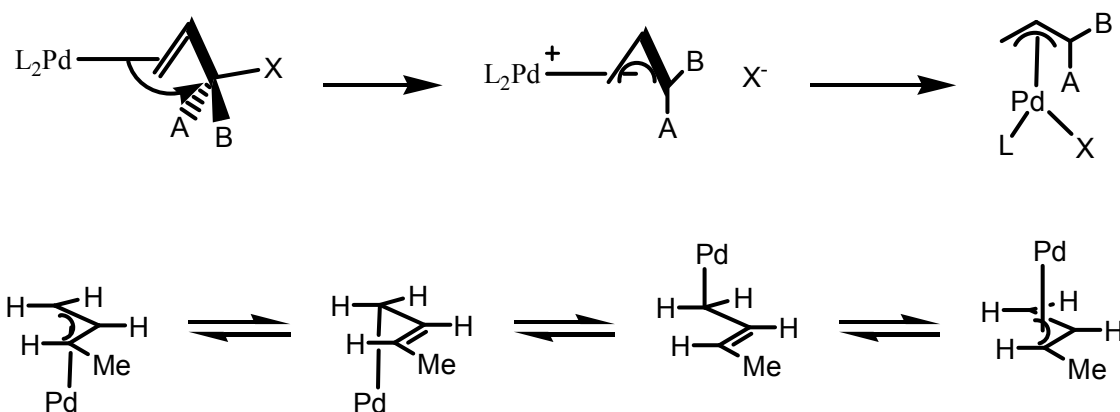


Figure 1-4

$\pi$ -アリルパラジウム錯体の反応は辻、Trost らによって各種求核剤との反応が示されたことにより精力的に研究が行われてきた。 $\pi$ -アリルパラジウム錯体に対する求核反応では基質の脱離基と求核剤に数多くの組み合わせがあり、それらの違いによって共存できる官能基も異なる。また、基質の置換基の位置や触媒の配位子を検討することにより位置および立体選択的な反応も可能となる (Figure 1-5)<sup>3)</sup>。

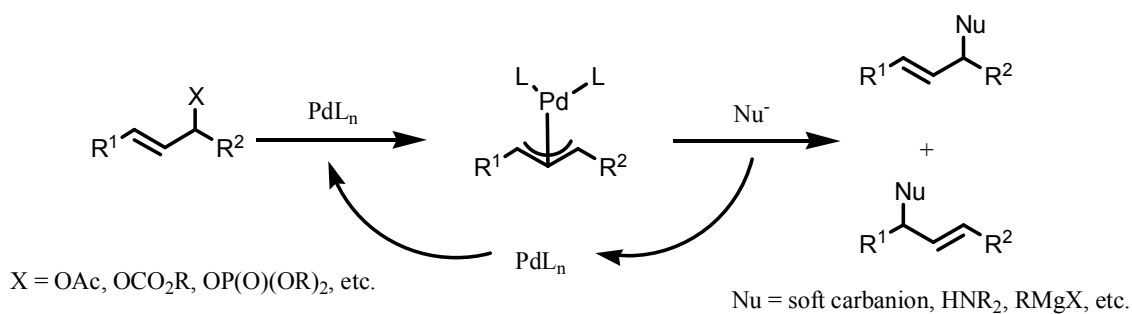


Figure 1-5

TrostらはAmphidinolide Aの全合成においてビルディングブロックの合成にアリル位のアルキル化反応を用いている。この際、不斉配位子を用いることによって光学活性な原料を用いることなくキラルビルディングブロックを構築し不斉合成を行っている (Figure1-6)<sup>4)</sup>。

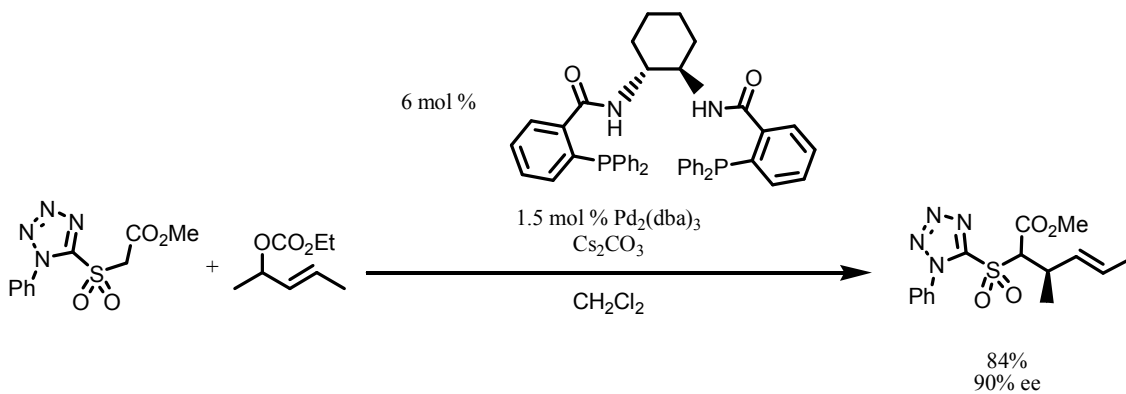


Figure 1-6

また、分子内反応とすることにより生成したπ-アリルパラジウム錯体がラセミ化を起こす前に求核攻撃を行うことが可能であり、立体選択的な反応を行うことができる。当研究室の片岡は、ジエンモノエポキシドを有する基質からπ-アリルパラジウム錯体を形成し、分子内アルキル化反応を行うことにより立体選択的な環構築に成功している (Figure 1-7)<sup>5)</sup>。

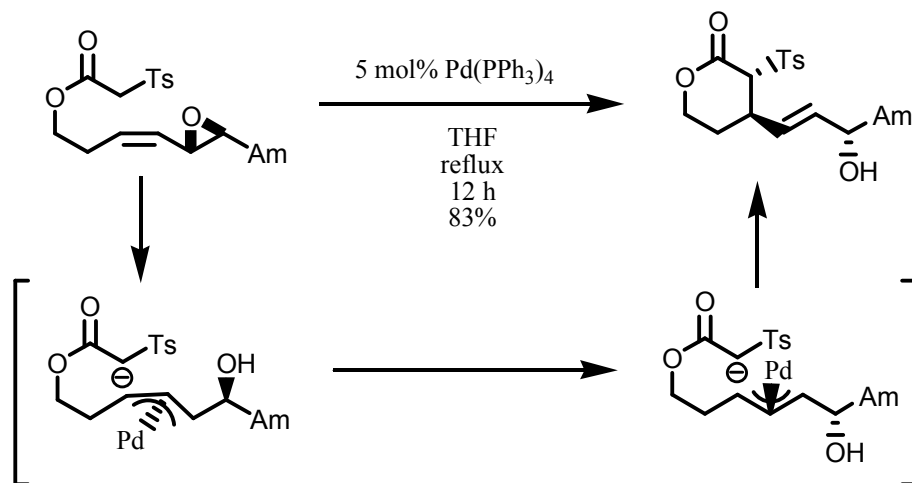


Figure 1-7

$\pi$ -アリルパラジウム錯体の重要な反応の一つとしてアルケン挿入反応がある。この反応は1971年に Hughes らによってノルボルナジエンとの分子間反応として報告された (Figure 1-8)<sup>6)</sup>。ノルボルナジエンは歪みのかかった反応性の高いジエンであるため分子間でも反応が進行したが、通常のアルケンでは挿入反応は起こらない。さらにこの反応は等量反応であるため、その後しばらくの間目立った進展は見られなかった。

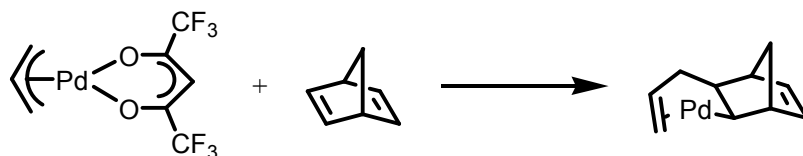


Figure 1-18

しかし、1987年に Oppolzer らによって $\pi$ -アリルパラジウム錯体に対して分子内のアルケンが挿入反応を起こすことにより環化体を与えるということが報告された<sup>17)</sup>。さらにこの反応は溶媒効果が非常に顕著で、トルエン、ジクロロメタン、DMF 中では反応はまったく進行せず、THF 中では長時間の反応で20%、メタノール中では65%、酢酸中では77%であった。多くの場合酢酸溶媒が必須であり、他の溶媒で反応が進行することは稀である (Figure 1-9, Table 1-1)<sup>8)</sup>。

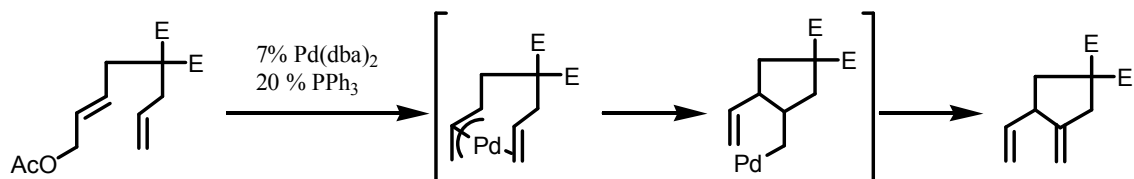


Figure 1-9

Table 1-1

Entry	E	Solvent	T [°C]	t [h]	Yield [%]
1	Ts	THF	70	2	82
2	COOMe	THF	80	40	20
3	COOMe	MeOH	80	8	65
4	COOMe	AcOH	80	1.5	77

当研究室の富樫らは光学活性なアリル化合物に対し分子内アルケン挿入反応を行うことにより、効率的に不斉転写が進行し、Storkらのプロスタグランジン合成中間体へと導くことに成功した。これは $\pi$ -アリルパラジウム錯体に対する分子内アルケン挿入反応がパラジウム側から起こることによって不斉転写が可能であることを示している (Figure 1-10, Table 1-2) 9)。

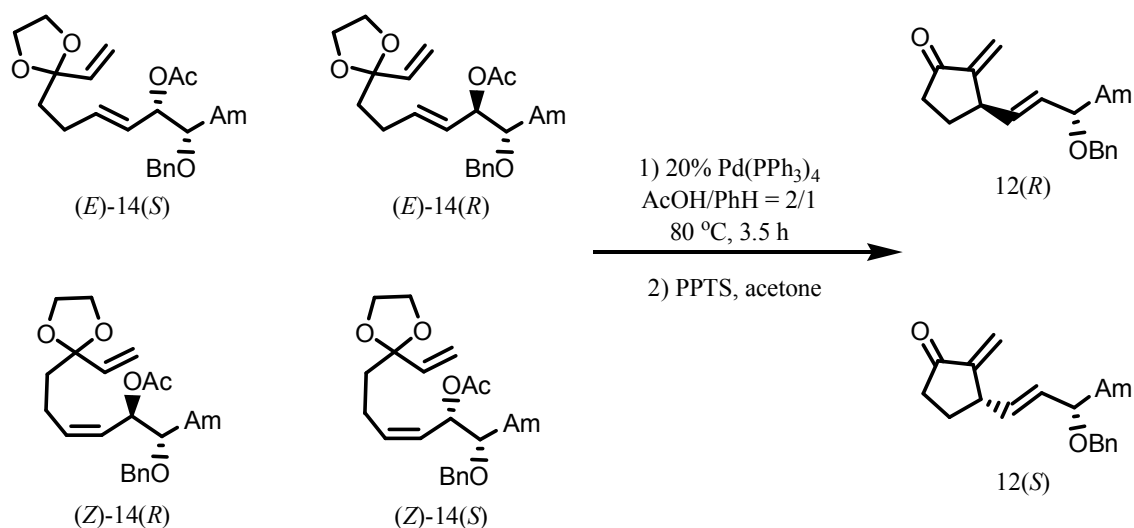


Figure 1-10

Table 1-2

Substance	Yield [%]	Major Product	Chirality Transfer [%]
(E)-14(S)	65	12(R)	95
(E)-14(R)	50	12(S)	95
(Z)-14(R)	64	12(R)	81
(Z)-14(S)	56	12(S)	84

#### 1-4-2 $\pi$ -アリルパラジウム錯体に対するアルケン挿入反応を用いた連続的環化反応

分子内で $\pi$ -アリルパラジウム錯体に対するアルケン挿入反応を行った場合、一段階目の環化反応によって生じる $\sigma$ -パラジウムを、さらに分子内に存在するアルケンやアルキン、一酸化炭素によって捕捉させることにより連続的な環化反応が可能となる。

当研究室の柳沢は分子内に複数のアルケンをもつ基質に対しパラジウム触媒を用いた

連続環化反応を行ったところ、歪みがかかっているため通常の反応では合成が非常に難しいトランスに縮環したビスクロ[3.3.0]オクタン骨格を立体選択的に構築できることを見出した (Figure 1-11) <sup>10)</sup>。

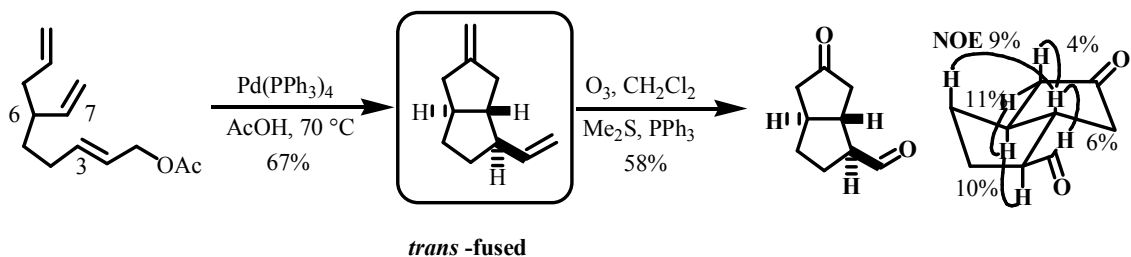


Figure 1-11

また、高崎は 7 位に置換基を導入した基質を用いることで 4 級炭素の構築を伴いつつ連続的に環化反応が進行することも見出している。この際にもトランス-ビスクロ[3.3.0]オクタン骨格を有する化合物が得られている (Figure 1-12) <sup>11)</sup>。

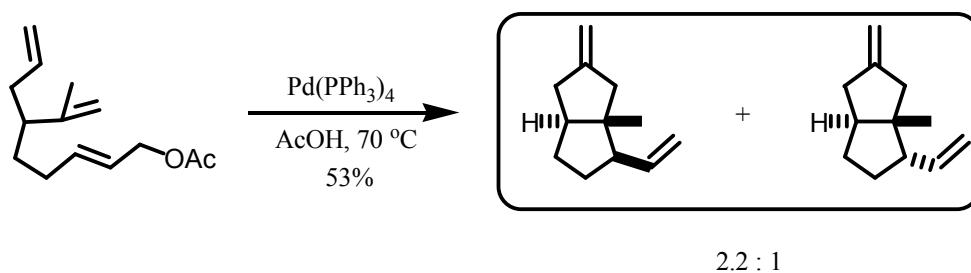


Figure 1-12

一酸化炭素雰囲気下で反応を行った場合には、一段階目の環化反応によって生じる  $\sigma$ -パラジウムに対し一酸化炭素が挿入しアシルパラジウムとなった後、求核剤と反応もしくは分子内に存在するアルケンが挿入することによって連続反応が可能である (Figure 1-13) <sup>12)</sup>。

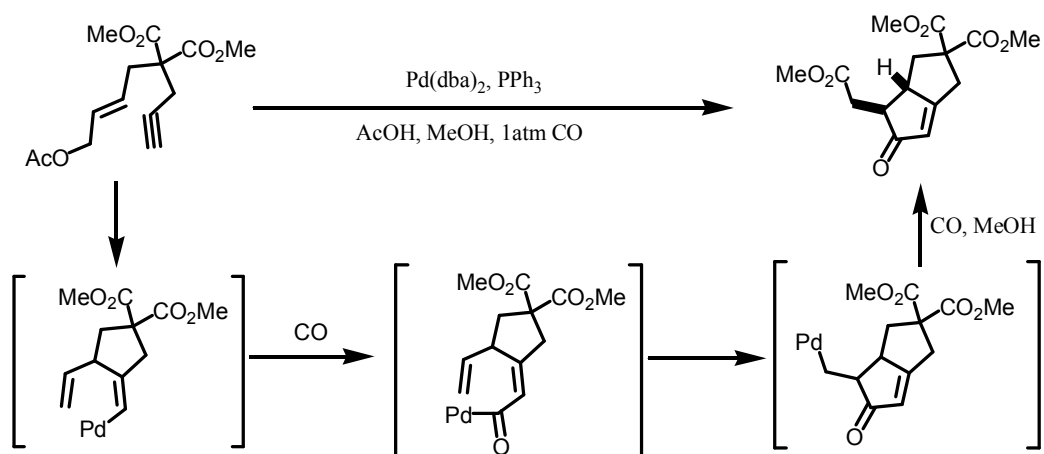


Figure 1-13

$\pi$ -アリルパラジウム錯体に対してアレンが挿入した場合には新たに $\pi$ -アリルパラジウム錯体が生じる。この新たに生じた $\pi$ -アリルパラジウム錯体に対してもさらにアルケン挿入反応や一酸化炭素挿入反応が起こる。これらを組み合わせることにより当研究室の柳沢は鎖状化合物から連続的環化反応を行うことで、最大6回の炭素-炭素結合を構築し4環性の化合物を構築することに成功した (Figure 1-14)<sup>13)</sup>。

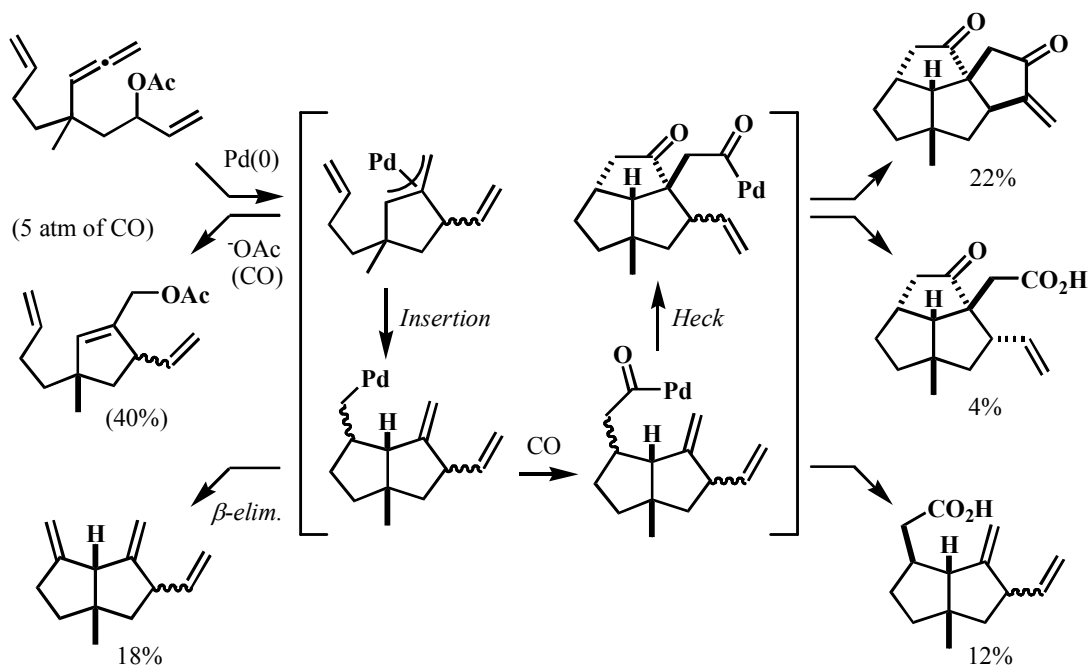


Figure 1-14

以上のように、 $\pi$ -アリルパラジウム錯体に対する分子内アルケン挿入反応は多種多様な骨格を構築しうる優れた反応である。

### 1-4-3 スピロ環骨格構築法<sup>14)</sup>

スピロ環骨格を有する化合物は2つの環が直交した形で存在することから、環上の置換基は様々な方向を向くため、特異な生理活性を持つと考えられる (Figure 1-15)。また、その構造は合成化学的にも興味深い。中でも2つの環が4級炭素で結合した炭素のみからなるスピロ環骨格の立体選択的な構築、とりわけエナンチオ選択的な構築は多くの有機合成化学者の興味を引いてきた。

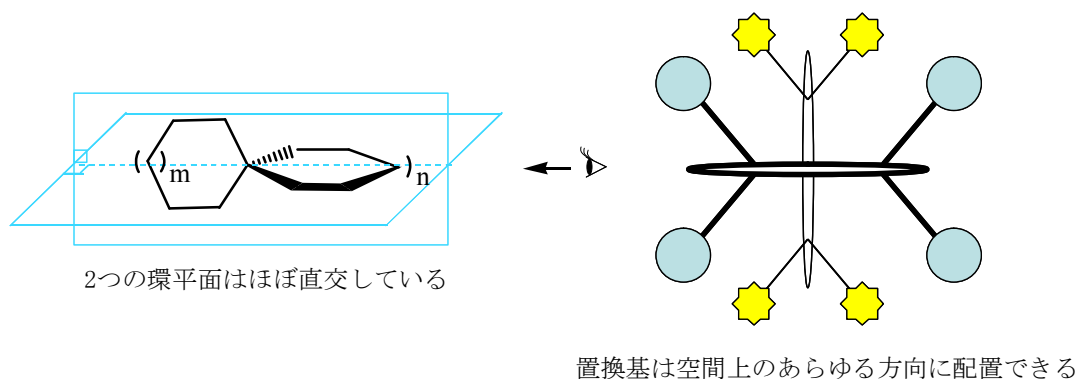


Figure 1-15

スピロ環を構築する方法としてジェミナルに置換基を持つ単環性化合物に対して、置換基の両末端を反応させることでもう1つの環を構築する方法がある (Figure 1-16)<sup>15)</sup>。

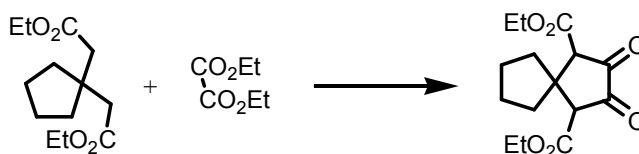


Figure 1-16

また、スピロ[4.5]デカン骨格を有する化合物の合成において、6員環化合物から Nazarov 環化反応を用いることでスピロ環骨格を構築した例などもある (Figure 1-17)<sup>16)</sup>。

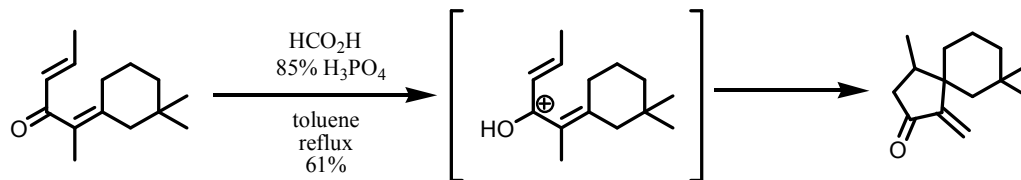


Figure 1-17

他にも Figure 1-18 に示すように様々な環化様式が考えられる<sup>14)</sup>。

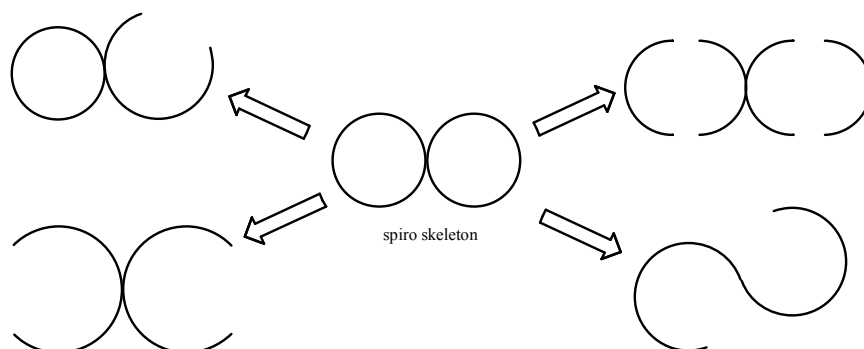


Figure 1-18

通常の有機合成反応を用いたスピロ環骨格構築法では立体選択的な環化を行うことは困難であることが多い。そのため基質としては対称性が高いものや比較的単純な化合物でなければ、ジアステレオマー混合物など多くの副生成物を含む可能性が高い。

一方で、遷移金属触媒を用いたスピロ環化反応は、遷移金属の種類や配位子を検討することにより立体選択的な環化反応を行うことができる可能性が高い。また、不斉配位子を用いることで不斉スピロ環骨格構築も可能となりうる。

溝呂木 - Heck 反応を用いた例では、不斉配位子を用いることによって不斉スピロ環構築が報告されている (Figure 1-19) <sup>17)</sup>。

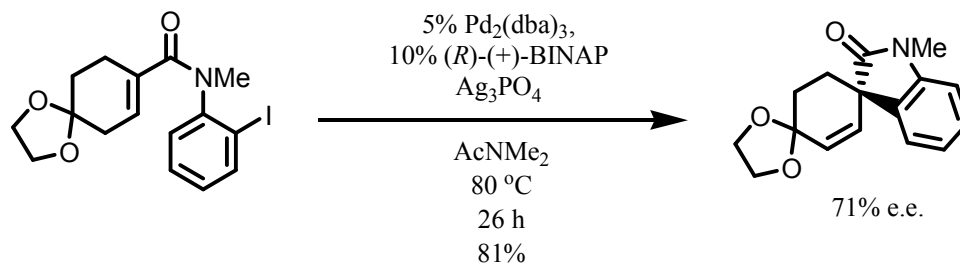


Figure 1-19

以上の例は単環性の化合物から 2 つ目の環を構築することによってスピロ環骨格を構築するものであるが、鎖状化合物から連続反応によって一挙にスピロ環骨格を構築する方法も報告されている。連続的な環化反応では鎖状化合物から一度に複雑な骨格を持つ化合物へと変換でき、さらに立体選択的な環化反応が可能であれば、一ヶ所の立体化学を基にして、複数の立体化学を制御できるなど非常に有用で強力な合成手段となりうる。

連続 Heck 反応を利用して鎖状化合物からスピロ環骨格を構築した例が Overman らによって報告されている (Figure 1-20) <sup>18)</sup>。

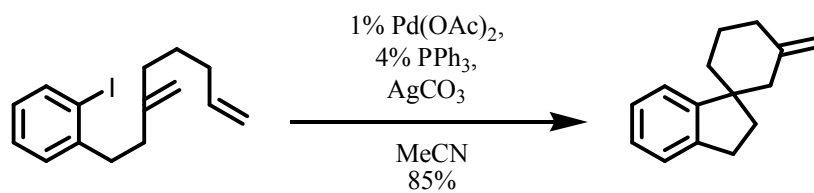


Figure 1-20

また、Trost らにより報告されたエンイン化合物の連続環化反応では、パラジウム触媒を用いた環化異性化反応、生じた  $\sigma$ -パラジウムからの連続的 Heck 反応を利用することで 2 環性から最大 7 環性のスピロ環化合物の構築に成功している (Figure 1-21)<sup>19)</sup>。

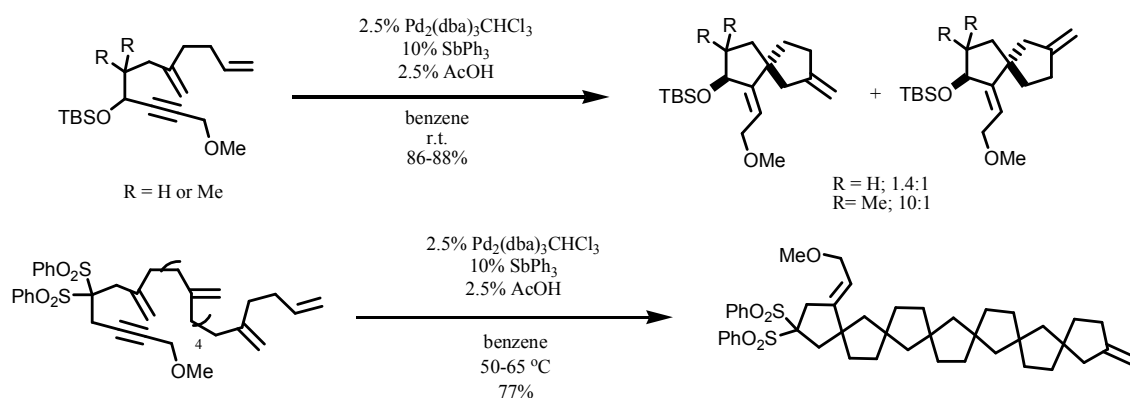


Figure 1-21

当研究室の高崎は鎖状の化合物から  $\pi$ -アリルパラジウム錯体に対する連続的な分子内アルケン挿入反応により、4 級炭素の構築を伴いつつスピロ環骨格を構築することに成功した。その際置換基 E としてエステル基を有する化合物はジアステレオマー混合物であったが、フェニルスルホニル基を有する化合物は単一のジアステレオマーとして得られている (Figure 1-22, Table 1-3)<sup>20)</sup>。

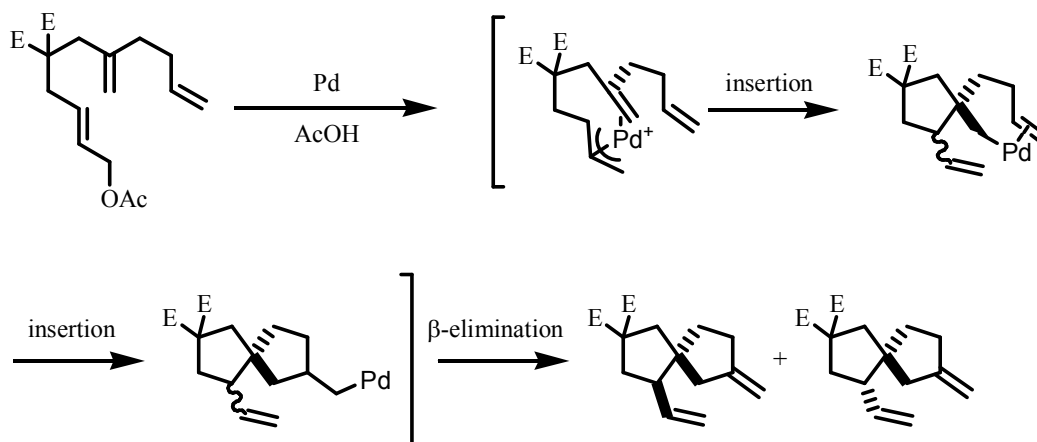


Figure 1-22

Table 1-3

E	Pd	T [°C]	t [h]	Yield [%]	d. r.
COOMe	15 mol% Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> 15 mol%	85	17	78	2.9 : 1
COOMe	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> ·CHCl <sub>3</sub> P( <i>o</i> -tol) <sub>3</sub>	85	23	68	3.2 : 1
PhSO <sub>2</sub>	5 mol% Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	90	4	83	single isomer

環化の立体選択性についてはアルケンの異性化体に対し NOE 測定を行って決定している (Figure 1-23)。

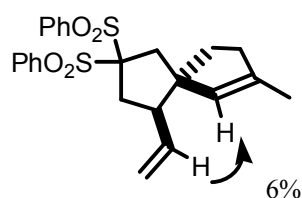
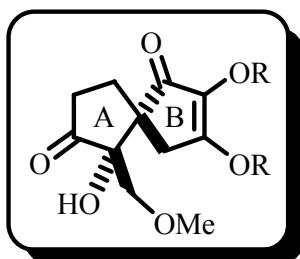


Figure 1-23

このように当研究室では $\pi$ -アリルパラジウム錯体に対する分子内アルケン挿入反応により鎖状化合物からの連続的環化反応でスピロ環骨格を構築できるという知見を得ている。本反応を利用し天然物の全合成を行うことで、その有用性を明らかにすることができると思われる。

#### 1-4-4 ジメチルグロイオシホン A

グロイオシホン A は Gerwick らによって海藻より単離、構造決定された抗菌活性を有する化合物である (Figure 1-24)<sup>21)</sup>。この化合物自身はケトエンジオール構造を有しているため酸化などに対し非常に不安定であり、エンジオール部分をジメチル化したジメチルグロイオシホン A として単離されている。また、本化合物はラセミ体として得られた。



R = H: Gloiosiphone A  
R = Me: Dimethyl Gloiosiphone A

Figure 1-24

この化合物の構造上の特徴として最も目を引くのはスピロ[4.4]ノナン骨格を有している点である。この4級炭素からなるスピロ環骨格をいかにして構築するかが、この化合物の全合成を考える際の鍵である。また、多くの酸素官能基を有しているため種々の条件に不安定であると考えられ、合成の後半における反応の選択も重要になってくる。それに付随して多くの官能基と4級炭素を有していることから中間体においてもその構造を決定することは容易ではないと考えられ、合成の途中段階において確実な構造決定が必要となる。

#### 1-4-5 ジメチルグロイオシホン A の合成例

ジメチルグロイオシホン A の全合成は現在までに3例報告されている。初めの全合成は Paquette らによって報告されたものである<sup>22)</sup>。

Paquette らの全合成における鍵反応は電子不足中心への環拡大転位反応である。スクアリン酸ジメチルに対しアセタール部位を有する5員環化合物のアニオンを付加させた後、ルイス酸によりアセタール部位にカチオンを発生させることで、環拡大を行いジメチルグロイオシホン A の基本骨格であるスピロ[4.4]ノナン骨格を構築している。得られた化合物は  $C_s$  対称性を有しているため、NMR による同定も容易となっている。その後 B 環部の余分な官能基の除去、および A 環部の官能基化を行うことでジメチルグロイオシホン A の全合成を達成している (Figure 1-25)。

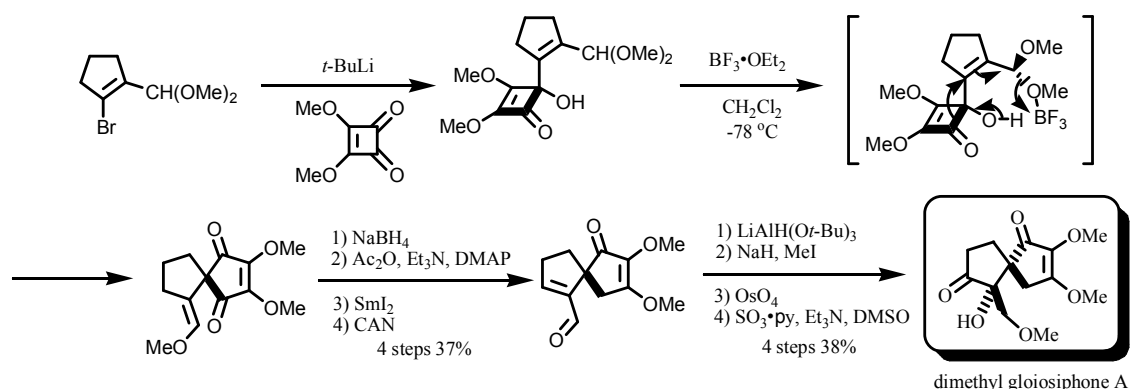


Figure 1-25

2番目の全合成は丹羽らによって達成された<sup>23)</sup>。彼らはアルキンに対する水銀を用いたカチオン環化反応を鍵反応とし、スピロ環骨格を構築した。B環の構築はエノンを経由して3連続の酸素官能基の酸化度をそろえ、その後、Paquette らの合成中間体へと導き形式全合成を行った後、全合成を達成している (Figure 1-26)。

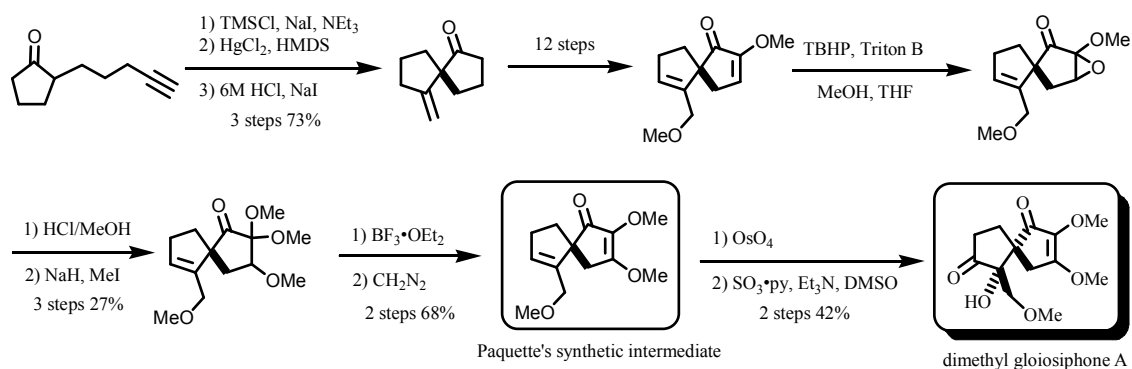


Figure 1-26

3番目の全合成は Sha らによるもので、丹羽らと同じ原料からラジカル環化反応によりスピロ環骨格を構築している。その後、順次官能基化を行っていくことで全合成を達成している (Figure 1-27)<sup>24)</sup>。

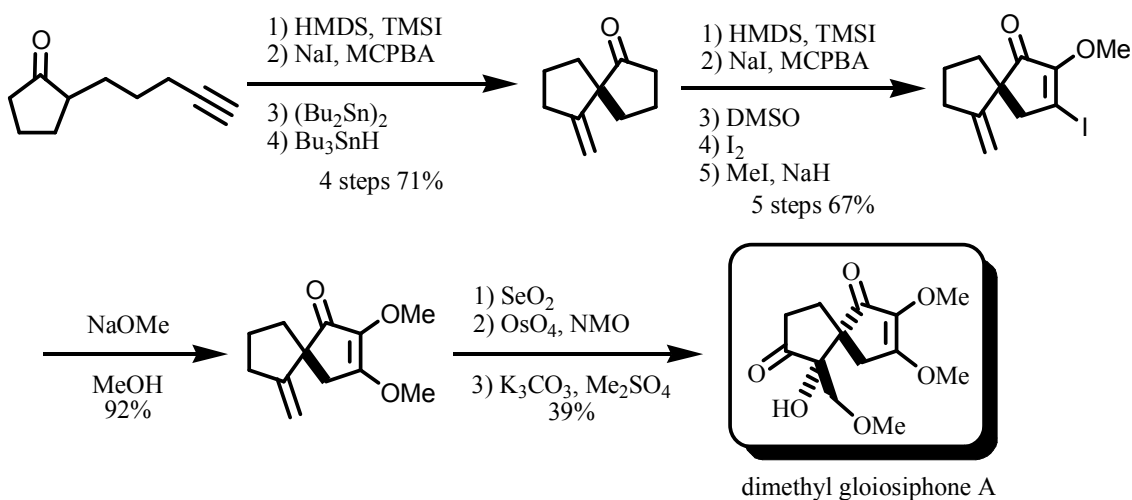


Figure 1-27

いずれの合成もスピロ環骨格の構築、その後の官能基変換に各グループ独自の工夫が見られる。

## 1-5 コンビナトリアルケミストリーと固相合成

### 1-5-1 パラレル合成とスプリット&ミックス合成<sup>25)</sup>

Diversity Oriented Synthesis を考える際にもっとも重要な概念がコンビナトリアルケミストリーである。コンビナトリアルケミストリーとは組み合わせを利用して、多くの化合物群 (ライブラリー) を効率よく合成するための概念である。また、そのために必要な技術、5法論まで含まれることもある。組み合わせを利用して化合物ライブラリーを合成すれば、反応を重ねるごとに指数関数的に化合物数が増えていくことになる。例えば 2 つのフラグ

メントを各 10 個ずつそろえると理論上 100 個の化合物群が合成可能である (Figure 1-28)。

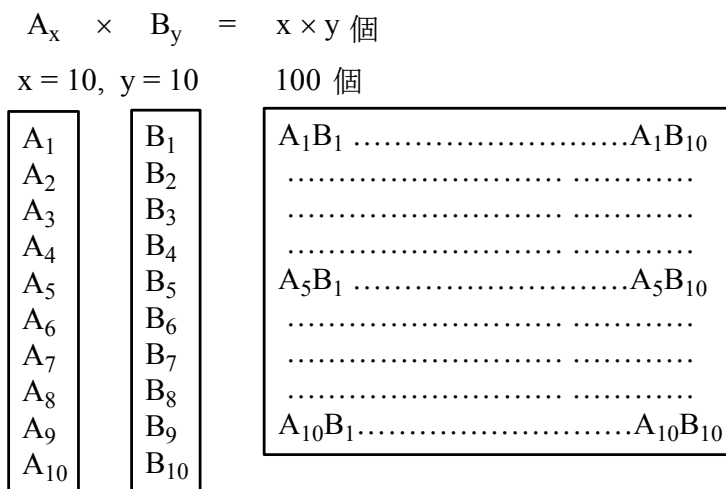


Figure 1-28

これらを従来の方法で1つ1つ合成するのは多大な労力と時間を要する。コンビナトリアルケミストリーではこのような多数の化合物を同時に扱う様々な方法が開発された。効率よく合成する方法としてはパラレル合成とスプリット&ミックス法が開発された。そして、合成を支援するため、自動合成装置やポリマー上に化合物を結合させ、高分子反応により多種類の化合物を合成する固相合成法が開発された。

液相でのパラレル合成は本質的には従来の合成と同じであるが、全ての反応容器に対する共通の操作を機械の支援により簡便に行うことができるようになった。反応を行う機械としては試薬の導入は手作業で行うが、複数の反応容器の加熱、冷却、攪拌などといった操作を同時に行える半自動合成装置から試薬の分注までコンピュータープログラムによる自動制御で行う全自動の合成装置までが開発、市販されている。当研究室の的場は試薬の分注まで行える自動パラレル合成装置 L-COS を用いて複雑な糖鎖化合物であるレイス X エピトープライブラリーの合成を報告している (Figure 1-29) <sup>26)</sup>。

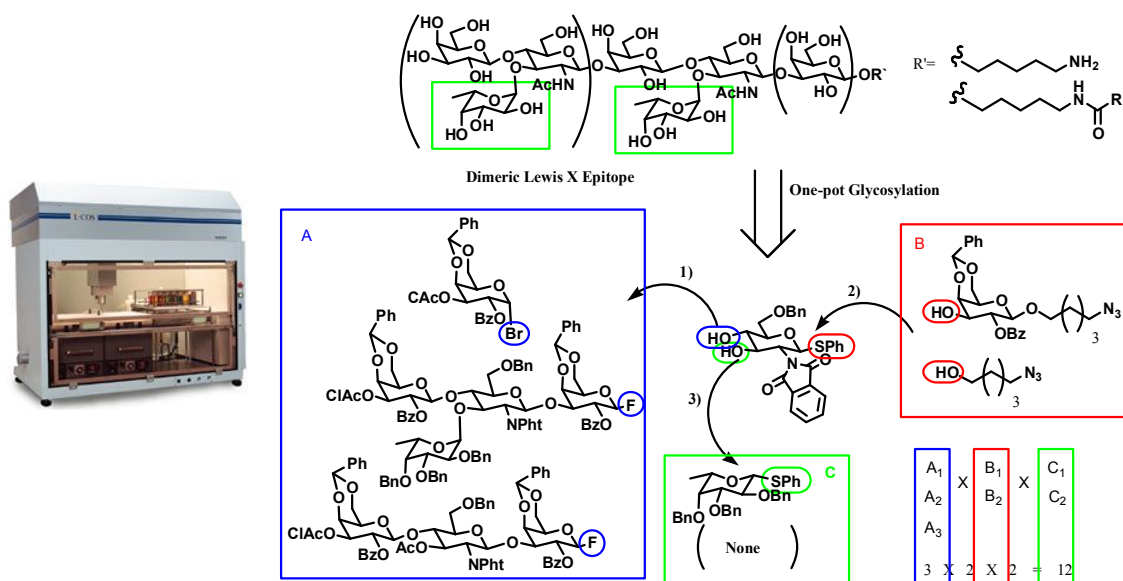


Figure 1-29

液相パラレル合成では複数の基質を同一条件で反応させるので反応条件の最適化が重要であるが、液相合成であるので通常の合成からの移行は比較的スムーズである。しかし、本手法では合成する化合物数に応じて反応容器数も増えていくので大規模なライブラリーの構築には不向きである。

スプリット&ミックス法は基質の混合、等分、反応を繰り返すことによってライブラリー合成を行う方法である。基質を反応させる試薬の数だけ均等に分割し、個別に反応を行う。その後、基質を混合し次に反応させる試薬の数に再度均等に分割、反応を繰り返すことでライブラリー合成を行う。この方法では化合物の多様性は指数関数的に増大するが、用いる反応容器は反応させる試薬の数だけあればよく、パラレル合成に比べ効率的に大規模なライブラリー合成を行うことができる。例えば3つのフラグメントを各3種類ずつ用意すれば、全部で27種類の化合物が合成できる。この際には3つの反応容器があればよい (Figure 1-30)。

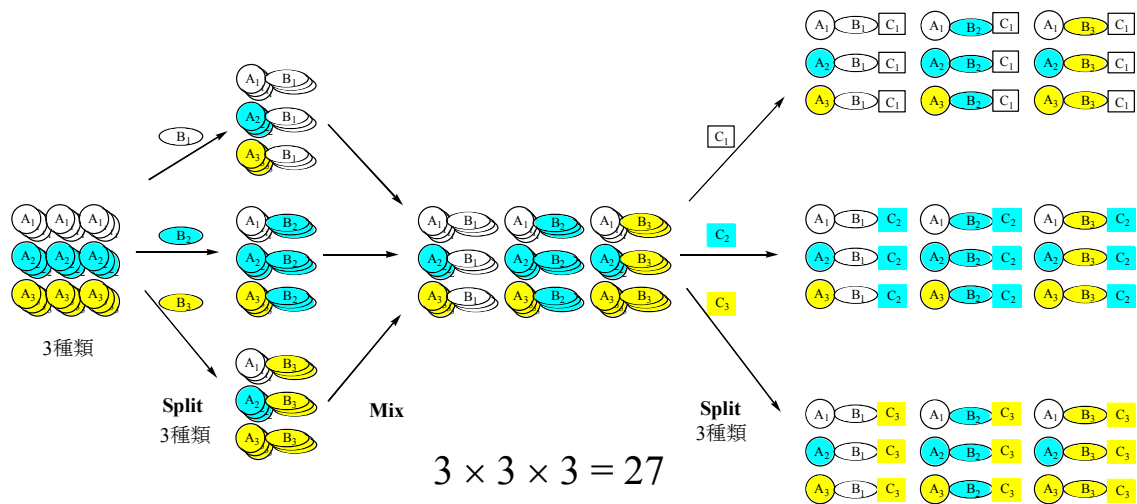


Figure 1-30

しかし、基質の混合、等分を行うため液相でこれを行うと、最終生成物は多くの化合物の混合物となるため分離が困難である。そのため、スプリット&ミックス法はもっぱら固相合成で用いられる。この際もそれぞれの固相担体に何が結合しているか区別できなければ化合物を同定することが困難になる。そこで反応の各段階で標識となる分子を導入する化学的なタグや色で区別する物理的なタグを固相担体に導入することで反応の履歴が分かるような工夫が行われている。

固相合成は化合物を不溶性のポリマーへと結合させることで化合物の取り扱いを簡便にし、合成の効率化を行うというものである。通常、基質を固相担体であるポリマーに共有結合により結合させ、必要な反応を行った後、固相担体から切り出し目的化合物を得るという方法がとられる。基質が固相へ担持された後は固体として取り扱うことができるため反応に用いた試薬、溶媒等はろ過を行うことで容易に取り除くことができる。したがって、多種類の化合物を合成する際にも取り扱いが容易であるため固相合成法は大規模なライブラリーの構築に用いることができる (Figure 1-31)。

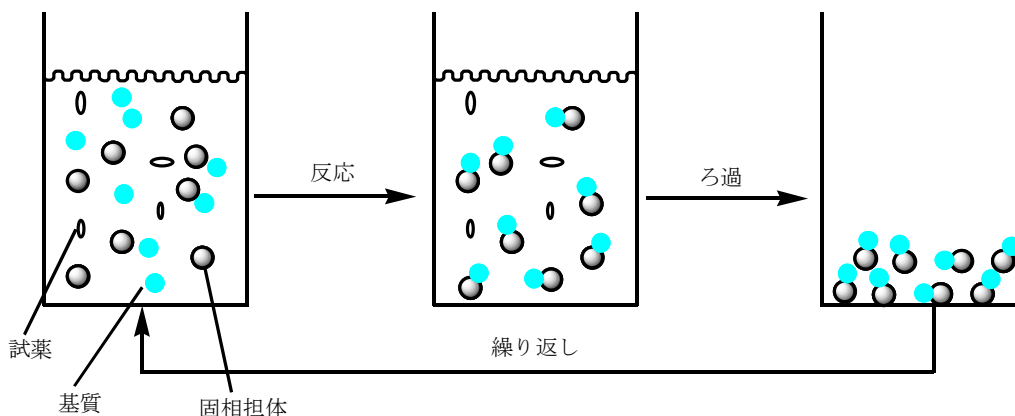
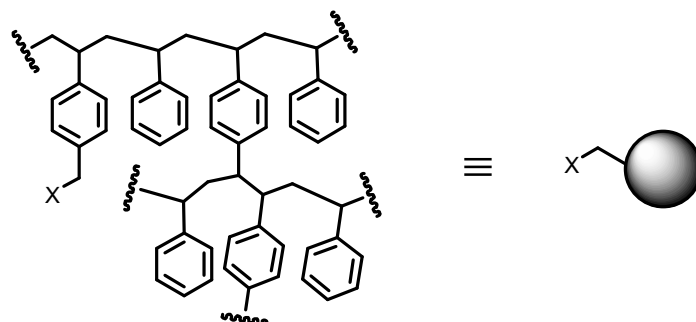


Figure 1-31

### 1-5-2 固相担体<sup>27)</sup>

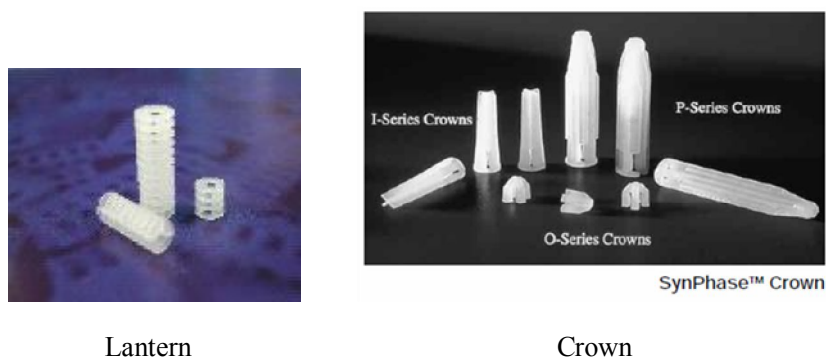
固相合成に用いられる固相担体としてもっとも一般的なものはポリスチレン樹脂である。樹脂の形状や、架橋度が異なるものが市販されているため目的に応じて使い分けられる。その中でもっとも一般的なものはレジンと呼ばれる細かい粒子状のポリスチレンビーズである。レジンを用いて反応を行うには溶媒による膨潤が重要である。溶媒が樹脂を構成しているポリスチレンの網目構造の内部まで浸透することにより反応点へ試薬が近づけるようになる。高い膨潤能を有している溶媒は塩化メチレン、DMF、THF などである。一方、メタノールや水といった高極性の溶媒は樹脂内部へ入り込むことができずこれらを反応溶媒として用いた場合、反応が完結せず低収率であることが多い。このような場合は高架橋度の樹脂を用いることで改善することができる。高架橋度の樹脂は強固な網目構造を保持しており、溶媒による影響をあまり受けることなく反応を行うことができる (Figure 1-32)。



レジンの構造および論文中での略号

Figure 1-32

レジンは非常に大規模なライブラリー合成に用いられることが多いが、細かい粒子であるため取り扱いがしばしば煩雑であり、各々を区別するために特別の工夫が必要である。この問題点を解決するために開発されたのがピンやランタンと呼ばれる固相担体である。これらはブロック上のポリマーの表面にのみ反応点を有しており、溶液に浸すことで反応を行い、その後は容易に選別することが可能である。ピンは主に 96 穴のプレートを用いたパラレル合成、ランタンはスプリット&ミックス法によく用いられる (Figure 1-33)。

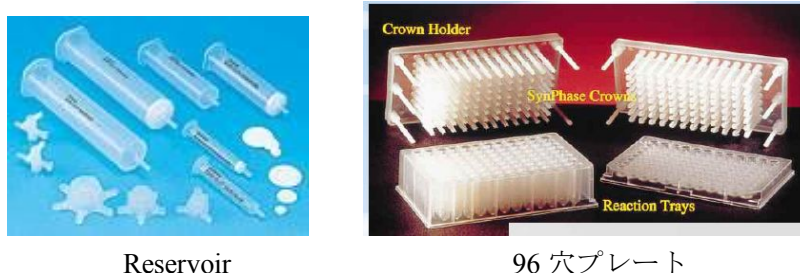


Lantern

Crown

Figure 1-33

固相担体を用いてライブラリー合成を行うためには各々を区別する必要がある。パラレル合成であれば一つの反応容器に 1 つの化合物を結合させた固相担体を導入することで容易に区別できる。レジンをを用いる場合はシリンジ型の反応容器中 (Reservoir) で反応させた後、容器の下に取り付けたコックを開くことで溶液を除去するといった手法によりレジンを直接取り扱うことなく合成が行える。ピンを用いる場合は 96 穴のプレートに反応溶液を入れ、96 本の棒の先端に取り付けたピンを溶液に浸し、反応を行うことで簡便に取り扱うことができる (Figure 1-34)。

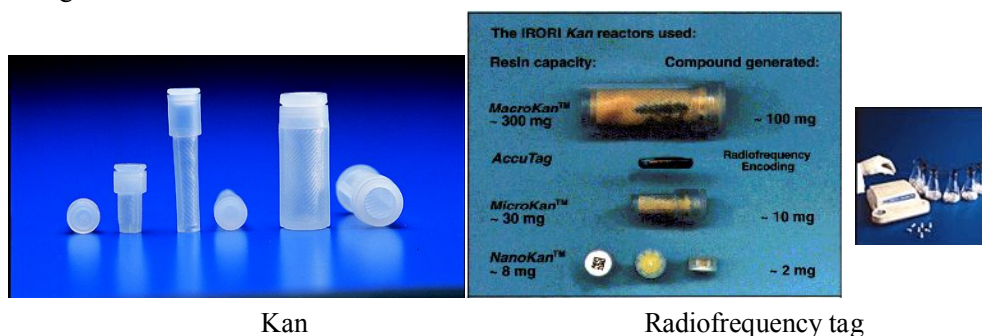


Reservoir

96 穴プレート

Figure 1-34

一方、スプリットアンドミックス法を行う場合、レジンでは各々の樹脂を区別することは非常に困難であるため特別の工夫が必要である。一つの方法としてレジンを Kan と呼ばれる容器に封入し区別する方法がある。Kan はメッシュ上のプラスチック容器でティーバックのように溶液は Kan を出入りすることができるがレジンは Kan から出てくることがない。1 つの Kan に 1 つの化合物を対応させることでレジンを一塊として取り扱うというものがある。この際 Kan 内にラジオ波 (RF) で読み書きが可能なチップを封入しておき、コンピューターにその内容を記録させておくことで、各々のレジンを区別することが可能である (Figure 1-35)。



Kan

Radiofrequency tag

各種 Kan と RF タグ

Figure 1-35

また、ランタンを使うことでより簡便にスプリットアンドミックス法で合成を行うことができる。ランタンには棒状とリング状のプラスチック製カラータグを取り付けることが可能なので、棒とリング、色の組み合わせからそれぞれのランタン上に結合している化合

物を区別することができる (Figure 1-36)。

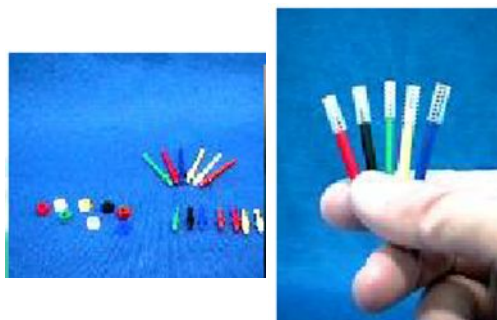


Figure 1-36

合成するライブラリーの規模、方法により適切な固相担体を選択することが効率よくライブラリー合成を行う上で重要である。

### 1-5-3 リンカー<sup>27)</sup>

リンカーとは固相担体と基質をつなぐ部分である。リンカーの化学的な性質が固相合成を行ううえで最も重要であるといえる。リンカーに求められる条件は基質を固相担体へと担持させる反応は容易に進行し、固相での合成反応の際は安定に存在し、最終段階では容易に切り出せるというものである。液相合成で言えば最終段階に除去する保護基とみなすことができる。そのため、リンカーの種類、結合位置が固相合成を効率よく行ううえで重要である。

リンカーは固相からの切り出し方、およびその化学的性質から分類できる。切り出し方で分類するならばおおよそ次の3種類に分けられる。

- 固相へ乗せる前後で官能基が変化しないもの
- 切り出し後、固相への担持へ用いた官能基がなくなるもの
- 切り出しの際に新たな官能基を導入できるもの

1番目のタイプは通常のプロtection基と同じと考えられる。2番目は固相から切り出し後は固相担体への結合位置が化合物に残らないためトレースレスリンカーとよばれる。3番目のタイプは切り出し反応により新たに多様性を持たせることができる。トレースレスリンカーなどは切り出しの際の反応条件を変えることで異なる官能基を導入することができるものもある。当研究室の井上はスルホン酸エステルのトレースレスリンカーを用い、糖の6位に様々な置換基を導入しながら、固相から切り出すことで3糖ライブラリーの合成を報告している (Figure 1-37)<sup>28)</sup>。

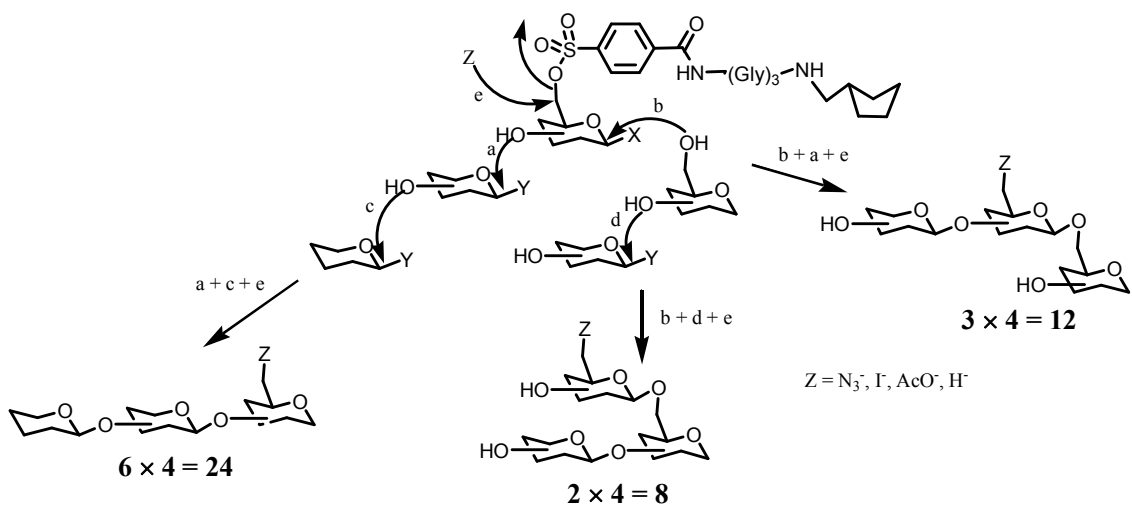


Figure 1-37

化学的性質で分類するならば、多くのものは通常のプロテクト基と同様に考えて酸性条件下切り出しを行うもの、塩基性条件下切り出しを行うものなどに分類できる。代表的なリンカーを示す (Figure 1-38)。

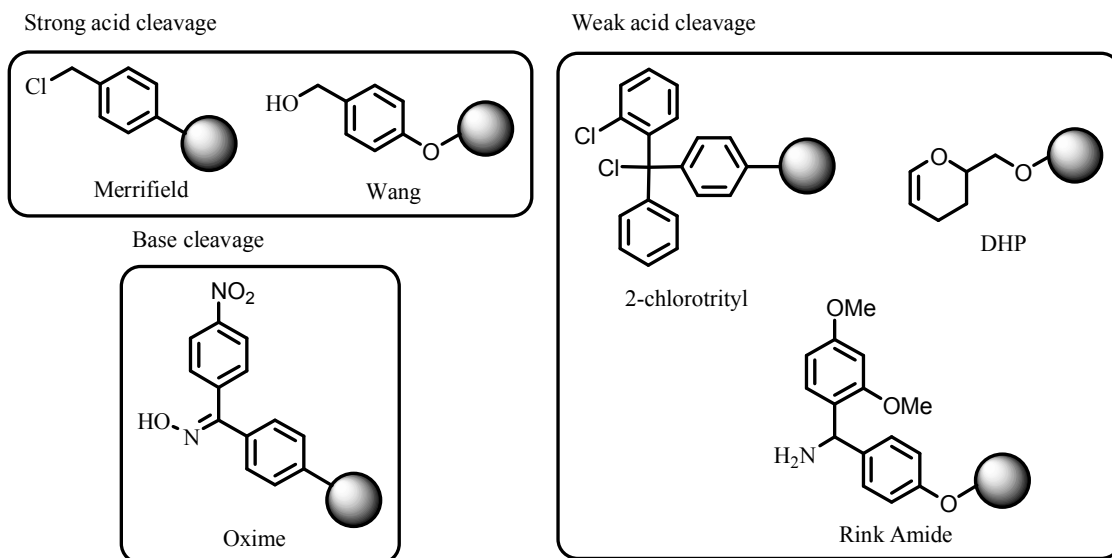
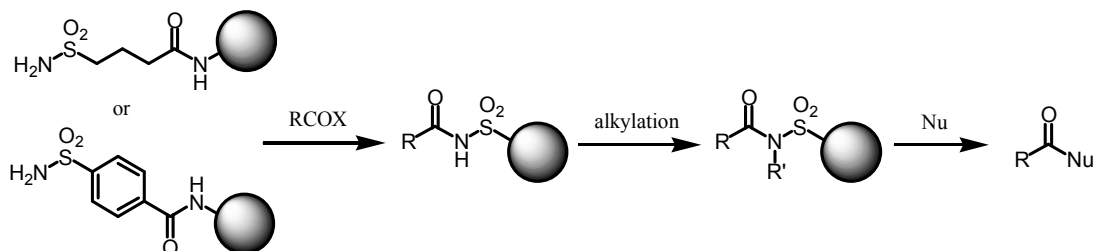


Figure 1-38

少し性質の異なるリンカーとして **Safety-catch** リンカーとよばれるものがある。このタイプのリンカーは酸にも塩基にもかなり安定であるため、固相上で多くの種類の反応を行うことができる。また、特定の条件で活性化を行うことで今度は容易に切り出しを行える。代表的なものにスルホンアミドリンカーとヒドラジンリンカーがあり、どちらもアシル化で固相への担持を行う。スルホンアミドリンカーは酸性条件には安定で、塩基性条件であっても酸性度の高い窒素上のプロトンが引き抜かれアニオンとなるので、アシル基への求

核攻撃が妨げられる。ヒドラジンリンカーでは通常のアミド結合と同程度の酸、塩基に対する安定性がある。活性化はスルホンアミドリンカーでは *N*-アルキル化、ヒドラジンリンカーでは酸化により行われる。どちらのリンカーも活性化後は活性化エステルとみなせる高い反応性を有しているため、求核剤により容易に切り出しが行える。その際、求核剤の種類を変えることで、合成の最終段階においても多様性を持たせることができる (Figure 1-39)。

#### Sulfonamide linker



#### Hydrazine linker

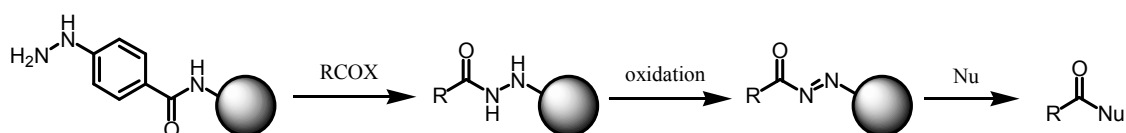


Figure 1-39

また、分子内に求核部位を有している化合物であれば、分子内環化反応による切り出しも可能である<sup>29)</sup>。Ganesan らはスルホンアミドリンカーを用いて環化切り出しによるカハラライド A の全合成を報告している (Figure 1-40)<sup>30)</sup>。

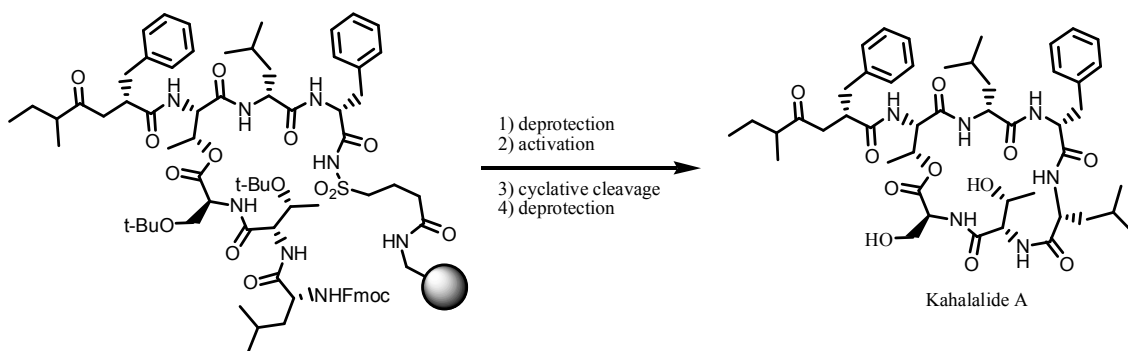


Figure 1-40

#### 1-5-4 固相上での合成反応<sup>25), 27)</sup>

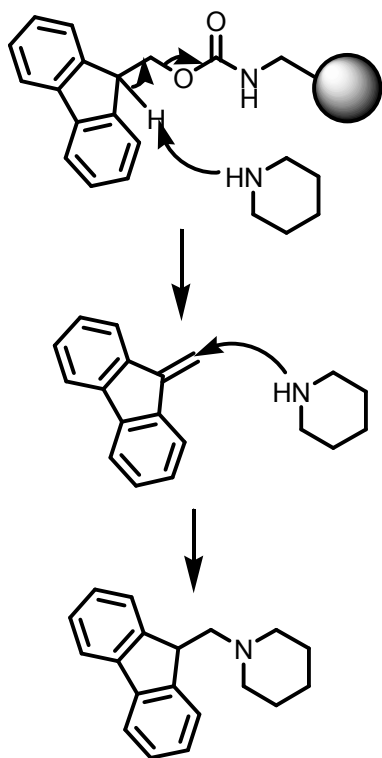
固相上での有機化学合成は Merrifield による固相ペプチド合成<sup>31)</sup>を皮切りに、現在では様々な化合物ライブラリーが固相合成により合成されている。中でもペプチド、核酸といったオリゴマーは自動合成装置により望みの配列が全自動で合成できるようになった。

固相上で反応を行う際に一般的に問題となるのは反応性の低下である。固相合成では

基質は固相担体という巨大な分子の一部とみなすことができるため、分子運動の自由度が低下し、さらに反応点が固相担体の内部にある場合、試薬の接近が妨げられるため反応性が下がる。これを改善するためには反応時間を長くするというのが一般的である。他にも溶媒を変えることで基質の会合状態を変化させる、同じ反応を 2 度繰り返すなどして転化率の向上をはかる。

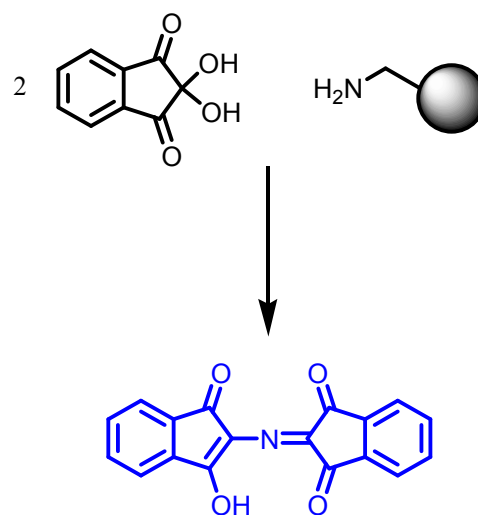
固相合成では反応のモニタリングも問題となる。固相合成では液相での TLC のように簡単に反応の進行を調べることができない。一般的には一部を固相から切り出し、分析するという手段がとられる。しかし、特定の官能基が存在する場合には固相上でモニタリングすることができる。例えば、Fmoc 基を有している化合物であれば、脱保護によって生じるジベンゾフルベン - ピペリジン付加体の吸光度から溶液中の濃度を算出し、固相上の官能基数を調べる Fmoc テストがある。Kaiser テストではニンヒドリンとアミノ基との呈色反応を利用し、固相担体上に遊離のアミノ基が存在するか調べることができる。他にも固相担体ごと IR や NMR 測定を行うこともできる (Figure 1-41)。

#### Fmoc test



吸光度測定

#### Kaiser test



濃青色に呈色

Figure 1-41

また、固相合成はそもそも液相と固相の不均一系の反応であるため、不均一系の触媒を用いた反応は適用できない。そのため液相合成では一般的な不均一系のパラジウム触媒を

用いたアルケンの水素添加やベンジル基の脱保護は、固体表面同士で反応しなければならないため固相合成では非常に難しい反応となる。

さらに固相合成を行ううえで最も注意しなければならないことは使用するリンカーに応じて反応に制約がかかるという点である。酸で切り出しを行うリンカーであれば固相での合成反応は塩基性もしくは中性のものでなければならない。さもないと反応の途中で基質が固相から脱離してしまう。液相の合成であれば途中で保護基を架け替えることも可能であるが、固相合成のリンカーは途中で付け替えることはできない。そのため合成を計画する段階から反応条件に基質、リンカーが安定であるか、そもそも固相合成に適用できる反応であるかを十分考慮しておく必要がある。

#### 1-5-5 固相ペプチド合成<sup>27)</sup>

ペプチド合成は Merrifield による固相合成法が報告されて以来、飛躍的に進歩してきた。ペプチド合成を行ううえで重要なことはアミノ基の保護基と縮合剤の選択である。アミノ基の保護基としてはカルバマート系の保護基が用いられ、特に汎用されるのは Boc 基と Fmoc 基である (Figure 1-42)。

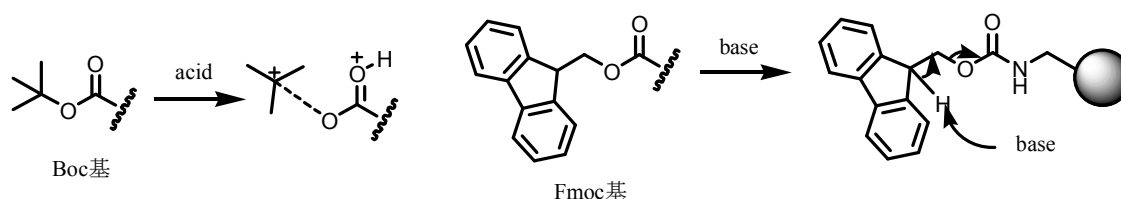
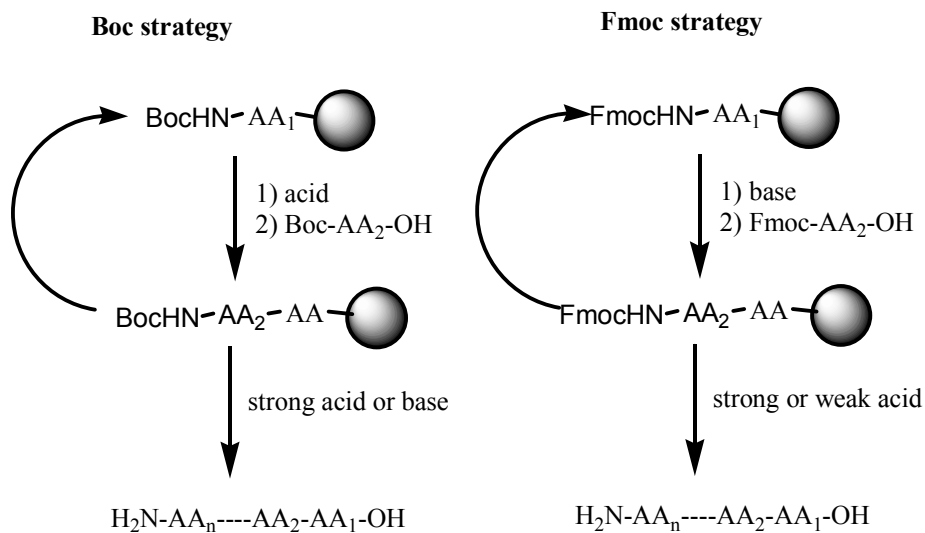


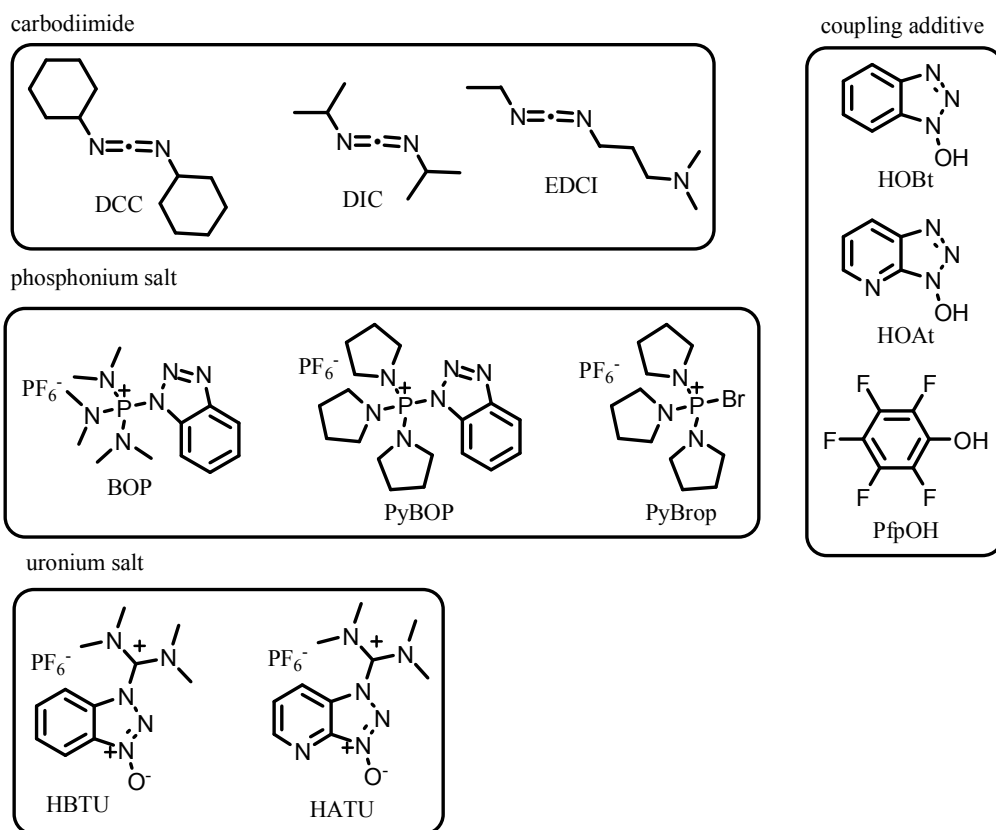
Figure 1-42

Boc 基は酸性条件下脱保護され、Fmoc 基は塩基性条件下脱保護されることから、これらは相補的な保護基である。固相合成においてもこれらの保護基はよく用いられ、Boc 保護アミノ酸を用いて縮合を行う合成法を Boc 法、Fmoc 保護体を用いる場合を Fmoc 法とよぶ。Boc 法では酸性条件下、Boc 基の脱保護を行い、次の Boc アミノ酸との縮合を行うという操作を繰り返すことでペプチドの伸長を行う。固相からの切り出しは用いるリンカーに応じて、Boc 基の脱保護条件よりも強い酸性条件もしくは塩基性条件で行われる。Fmoc 法では通常、ピペリジンのような 2 級アミンを用いて Fmoc 基の脱保護を行い、Fmoc アミノ酸との縮合を繰り返すことでペプチド鎖を伸長させる。リンカーは酸性条件で固相から切り出せるものを用い、側鎖の保護基をすべて脱保護しながら無保護のペプチドを得ることも、弱酸性で側鎖が保護されたペプチドを得ることもできる。現在では、Fmoc 法が固相ペプチド合成の主流となっている (Figure 1-43)。



**Figure 1-43**

アミノ酸を縮合する際に用いる縮合剤としてはカルボジイミド、ホスホニウム塩、ウロニウム塩が一般的である。これに縮合促進剤を組み合わせる用いることが多い。代表的な縮合剤、促進剤を示す (Figure 1-44)。



**Figure 1-44**

通常の $\alpha$ -アミノ酸であればDICとHOBtやPyBOP、HBTUなどで十分縮合が進行する。しかし、プロリンやN-メチルアミノ酸のような2級アミンに対する縮合では反応が十分に進行しない場合がある。そのような場合、縮合剤としてHATUやPyBrop、促進剤としてHOAtなどより強力な試薬が用いられる。

縮合反応では副反応が問題となることがある。アミノ酸は縮合剤、促進剤と反応し活性化エステルへ変換される。この際、縮合反応の進行が遅いとアザラクトンやジケトピペラジンが生成する可能性がある。また、システインやヒスチジンはその側鎖官能基の影響により非常にラセミ化しやすいことが知られている。これら副反応を防ぐためには保護基や試薬の組み合わせが非常に重要となる (Figure 1-45)。

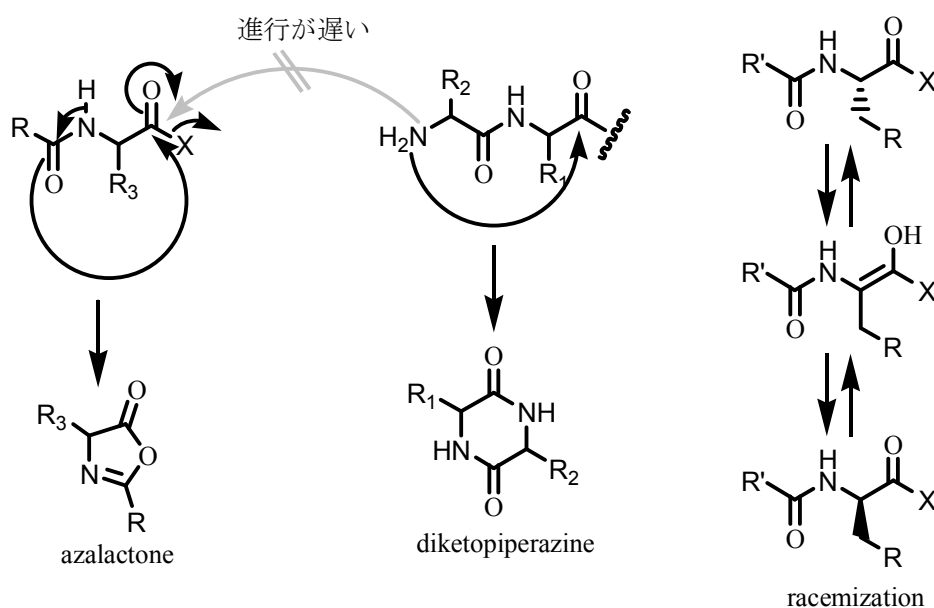


Figure 1-45

## 1-6 ケミカルバイオロジー<sup>32)</sup>

### 1-6-1 ケミカルジェネティクスとケミカルゲノミクス

ケミカルバイオロジーとは低分子化合物を道具として生体反応を制御、解析することで生命現象を明らかにしようという研究分野、概念である。生化学が生命現象を化学的に明らかにすることを目的としているのに対し、ケミカルバイオロジーでは逆に化学を出発点として生物学に帰着する。近年では様々な生物学の研究にケミカルバイオロジーの手法が用いられるようになってきており、道具として用いる低分子化合物の需要も増えてきている。研究手法は特定の生理活性天然物を道具として用いて標的タンパク質を明らかにする、特定のタンパク質に対する阻害剤を探索し、その影響を調べるなど従来の天然物化学、創薬研究の延長であるといえる。しかし、コンビナトリアルケミストリーによるライブラリー合成の効率化や、様々な分析機器、技術の発展により新たな研究分野として認識されるようになった。

ケミカルバイオロジーのなかで最も基本的な概念に **Schreiber** によって提唱されたケミカルジェネティクスがある<sup>33)</sup>。これは化学を用いて遺伝学の研究を行うというものである。遺伝学における変異を化合物を用いて引き起こす、すなわち、ある特定のタンパク質を阻害することにより、そのタンパク質をコードする遺伝子を働かなく（ノックアウト）した状態を作り出すという手法である。これはケミカルノックアウトとも呼ばれる。ケミカルノックアウトは対象とする細胞、生物になんら変異を起こす必要がないため様々な利点がある。

従来の遺伝子工学を用いたノックアウトでは遺伝子組み換えの技術を用いて調査対象となる遺伝子を働かなくさせる。しかし、もしその遺伝子が生物の発生、成長に重要な役割を担っている場合、正常な成長が妨げられる、成長する前に全て死んでしまうといったことも起こりうる。ケミカルノックアウトであれば十分成長した細胞、生物に対し、化合物を投与することでその影響を見ることができる。また、成長の途中段階で化合物を投与することで対象となる遺伝子が働く時期を判断できる。さらに異なる細胞、生物間でも同一の化合物を用いてその影響を比較することができる。このようにケミカルノックアウトは任意のタイミングで様々な細胞、生物を対象に特定の遺伝子の働きを解明できる非常に強力な手法である。

遺伝学では突然変異の原因遺伝子を特定するフォワードジェネティクスと、人為的に遺伝子に変異を起こし、その影響を調べるリバースジェネティクスがある。ケミカルジェネティクスにおいてもこれに倣い 2 通りのアプローチがある。すなわち、ある生理活性化合物の標的タンパク質を同定し、それをコードする遺伝子を明らかにするフォワードケミカルジェネティクスと、機能未知のタンパク質を阻害し、その影響を調べるリバースケミカルジェネティクスがある。

**Schreiber** らはヒストン脱アセチル化酵素<sup>1</sup> (HDAC) 阻害活性を有するトラポキシシン A の誘導体を樹脂に結合し、その樹脂を用いたアフィニティーカラムにより HDAC の単離、遺伝子の同定に成功した。これはフォワードケミカルジェネティクスの一例である (Figure 1-46)<sup>34)</sup>。

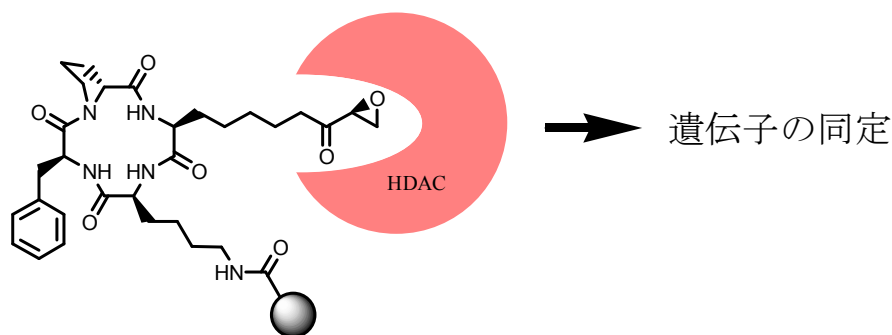


Figure 1-46

<sup>1</sup> 1-7-3 において詳述

一方のリバースケミカルジェネティクス例として吉田らによる HDAC6 の機能解明が挙げられる。HDAC は 10 種類以上が知られているが HDAC6 の特異的な阻害剤が存在しないため、彼らは全ての HDAC を阻害するトリコスタチン A と HDAC6 を阻害できないトラポキシニン A を作用させた。その結果を比較することで HDAC6 の基質が  $\alpha$ -チューブリンであることを突き止めた (Figure 1-47)<sup>35)</sup>。

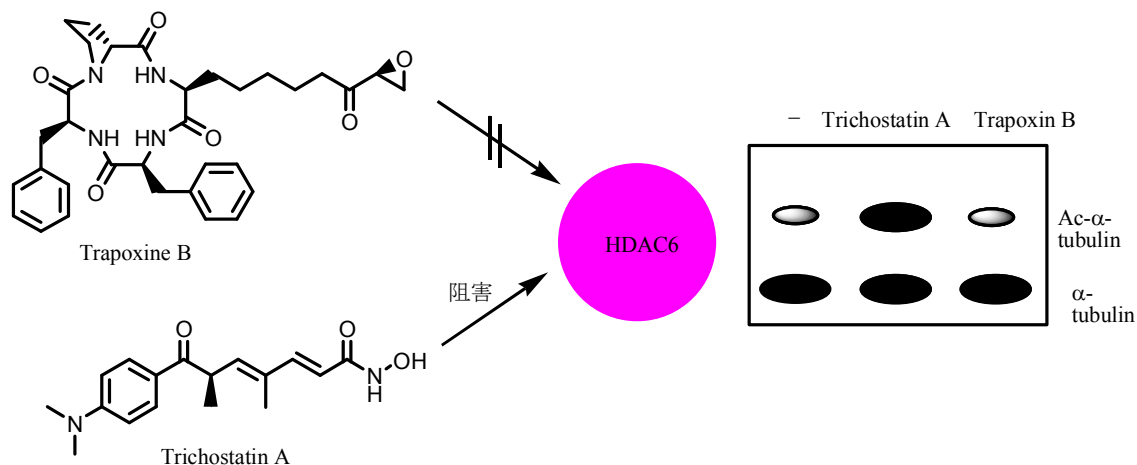


Figure 1-47

このようにケミカルジェネティクスは非常に強力な手法であるが、弱点もある。ケミカルジェネティクスはタンパク質の阻害剤があつて始めて成立する。特にリバースケミカルジェネティクスでは特異的な阻害剤の発見、開発が鍵である。しかし、現在のところ阻害剤が知られているタンパク質は 500 個程度と、ヒトにおいては 10 万個ほど存在するといわれている全タンパク質のごく一部でしかない。ケミカルジェネティクスを行いたいと考えても有効な阻害剤がほとんどないというのが現状である。

この有効な化合物が乏しい現状を打開するため、ケミカルゲノミクスという概念が提唱された。これは原理的には、全ての遺伝子産物 (タンパク質) に対する低分子リガンド (阻害剤) の取得が可能であるという考えに基づき、組織的、系統的に化合物を見出し、生命現象を解明するための道具とするというものである。これにはコンビナトリアルケミストリーによるライブラリー合成とその評価を高速で行うハイスループットスクリーニングが必要不可欠である。

### 1-6-2 ケミカルプローブ<sup>32)</sup>

ケミカルバイオロジーにおいて生命現象を探る道具として用いられる化合物はケミカルプローブとよばれる。天然物がそのまま用いられることはまれであり、多くの場合天然物をもとにした誘導体が用いられる。ケミカルプローブは単純に標的タンパク質と相互作用することが目的の場合もあれば、タンパク質との相互作用を蛍光などによって視覚的に分かるようにする可視化プローブ、標的となるタンパク質を単離、精製する、いわゆる釣り

上げ用のプローブなど目的に応じていくつかの種類がある。

可視化プローブはタンパク質と相互作用できる化合物にさらに蛍光色素などをタグ分子として結合することで、相互作用を即座に、リアルタイムで観測することができる。釣り上げ用のプローブは標的とするタンパク質と相互作用する化合物にさらに別の特異的な相互作用をするタグ分子を結合させアフィニティ精製ができるようにしたものである。よく用いられるものはビオチンとアビジンの相互作用である。ケミカルプローブとする化合物にタグ分子であるビオチンを結合する。このケミカルプローブを標的タンパク質と相互作用させ、アビジンを固定化したカラムに通す。ケミカルプローブと標的タンパク質の複合体がビオチン、アビジンの相互作用によりカラムに固定される。ケミカルプローブ - 標的タンパク質複合体を溶出させることで単離、精製することができる。可視化プローブ、釣り上げ用プローブのいずれもタグ分子をタンパク質との相互作用に影響を及ぼさない位置に適度な距離で結合させることが重要である (Figure 1-48)。

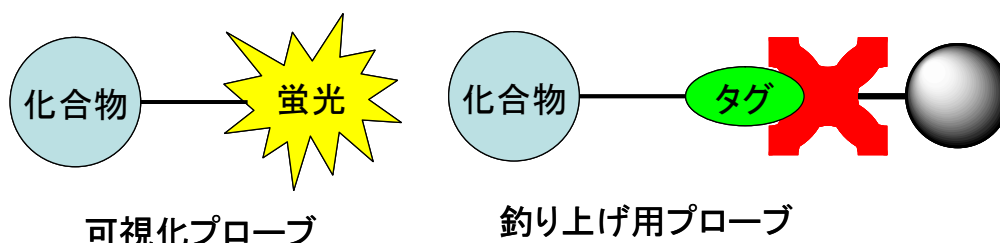


Figure 1-48

### 1-6-3 タンパク質相互作用ネットワーク解析<sup>36)</sup>

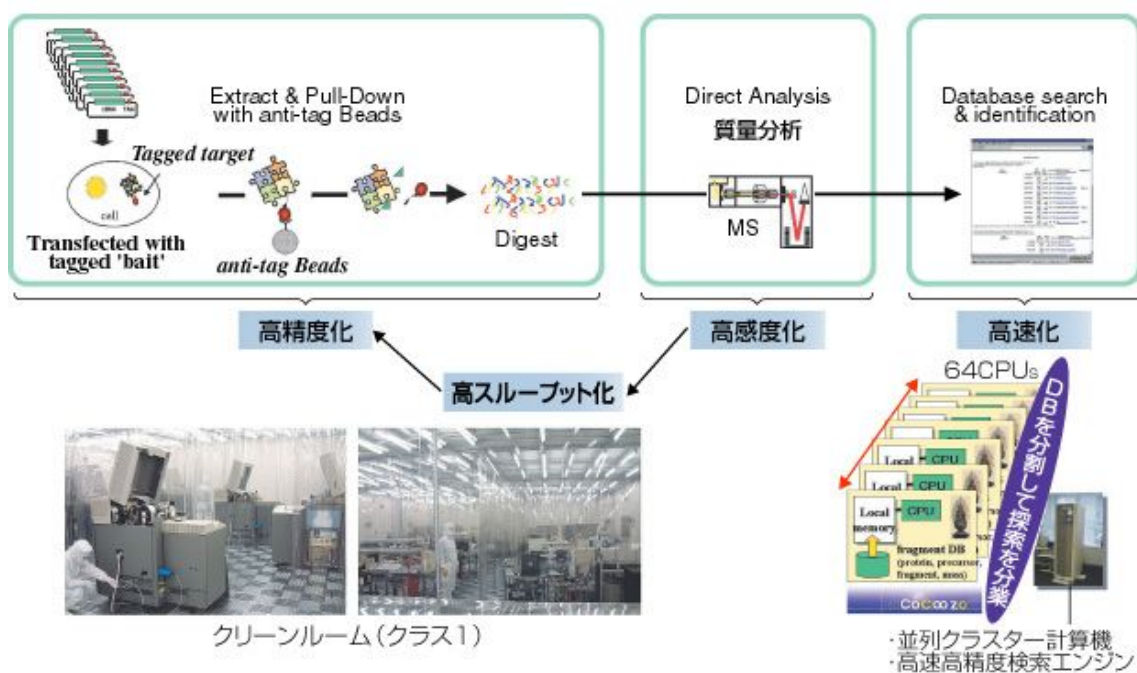
現在、遺伝子がゲノムレベルで網羅的にリストアップされているが、その機能実態であるタンパク質の役割についてはいまだ極一部が明らかになってきたに過ぎない。生体内でタンパク質は単独で働いていることはほとんどない。タンパク質同士が結合する、化学修飾を行うなどといった一連の相互作用の連続で全体として 1 つの機能を果たすシステムを構築している。そのため特定のタンパク質の機能を解明しようとする際には、そのタンパク質を含む相互作用のネットワークを解析し、その中での役割を明らかにすることがもっとも確実であるといえる。

近年、わが国では夏目らによる世界最高感度の質量分析システムと完全長ヒト cDNA プロジェクトによって得られた 3 万以上の完全長ヒト cDNA を活用した、大規模タンパク質ネットワーク解析プロジェクトが遂行された。彼らのシステムは

- タグ分子を挿入した cDNA を細胞に導入し、タンパク質を発現させる
- タグ分子を結合したタンパク質を含むタンパク質複合体をタグに対する抗体を結合したビーズにより単離する
- 複合体をタンパク質分解酵素により断片化し、LC-MS/MS によりアミノ酸配列を読み取る

- データベースと照合し、タンパク質の同定を行う

というものである。タンパク質は相互作用するもの同士が結合し、複合体を形成している。これをタグ分子を用いて釣り上げるといった手法であるが、目的とするタンパク質複合体は細胞内の全タンパク質に比べれば、極々微量である。膨大なノイズの中から必要な相互作用のみを抽出するため、彼らは極微量のサンプルで精製を行う高精度なサンプル調製法を開発した。また、一般にタンパク質は不安定で、容易に変性、吸着することで分析不可能になる。そこで彼らは極微量のサンプルを消失する前に質量分析計に導入するため、独自にナノフロー液体クロマトグラフィーを開発した。デッドボリュームゼロのマイクロスプレーカラムを開発し、サンプル溶液を質量分析計へ直接導入できるようにすることで高感度な分析を可能にした。得られた質量分析計の情報はスーパーコンピュータにより瞬時にデータベースとの照合が行われ、複合体に含まれているタンパク質が同定される。解析は空气中を漂うカビの孢子や、人間から放出されるタンパク質によるノイズを防ぐため全てクリーンルーム内で行われる (Figure 1-49)。



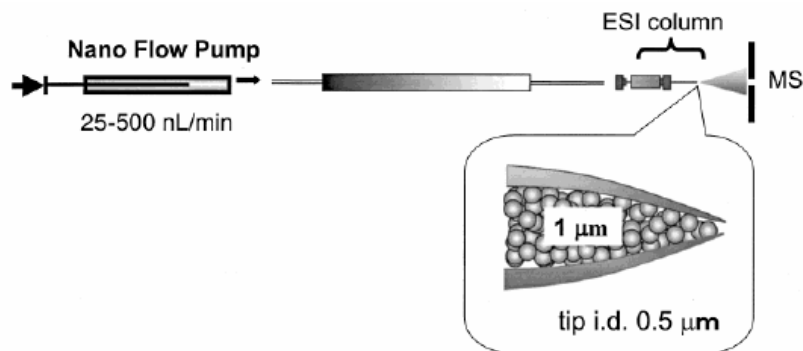


Figure 1-49

彼らはこのシステムを用いて、すでに研究され尽くしたと考えられていたタンパク質からもあらたな相互作用を発見することに成功した<sup>37)</sup>。本システムにケミカルバイオロジーの手法を適用できれば薬剤の作用機構の解明や副作用の解明につながると考えられる。

## 1-7 転写制御<sup>38)</sup>

### 1-7-1 遺伝情報の発現と転写

遺伝情報は DNA から mRNA、タンパク質というながれで発現する。大腸菌など原核生物はこの通りに遺伝子からタンパク質が作られるが、酵母以上の高等な真核生物では DNA をもとに作られる RNA が、スプライシングという配列の組み替えの工程を経て成熟した mRNA へと変換される。また、一部のウイルスは遺伝情報を RNA として保存し、宿主細胞に感染後、DNA へと変換する。しかし、この DNA、RNA、タンパク質という遺伝情報が伝達される経路は全生物に共通し、RNA が作られない限りタンパク質が合成されることはない (Figure 1-50)。

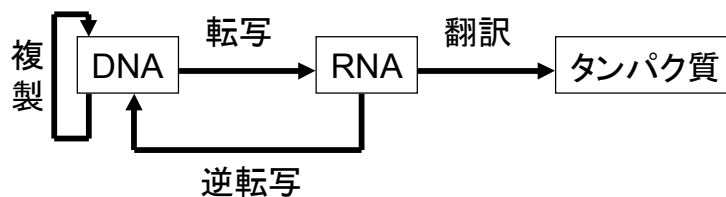


Figure 1-50

生物は多くの遺伝子を持っているが、全ての遺伝子がいつも発現しているわけではない。生物という複雑な反応系を維持するためには遺伝子が必要なときには発現し、必要のないときには沈黙するという制御機構が必要不可欠である。この制御を行う最も根本的な方法は DNA から RNA への転写の段階を制御することである。遺伝子が存在していてもその情報が mRNA へと変換されなければ遺伝子が発現することはない。

必要のない遺伝子が発現していれば、生物のシステムに異常をきたす。ヒトであればそれは病気の状態である。とくに遺伝病や生活習慣病は遺伝子が正常に発現しなくなって起こることがある。逆に言えば、遺伝子を正常に制御できればこれらの病気を治療できるともいえる。そのため遺伝子発現の根本を司る転写を制御することができれば、生命現象の仕組みを理解するのみならず、様々な疾患の有効な治療法ともなりうる。

### 1-7-2 ヒストン<sup>38), 39)</sup>

ヒストンとは全ての真核生物に存在し、DNA を核内に収納するために重要なタンパク質である。分子量 1 万程度の比較的小さなタンパク質 H2A、H2B、H3、H4 の 4 種類とその倍程度の大きさの H1 からなる。アミノ酸配列は生物種間による違いが小さく、塩基性アミノ酸であるリジン、ヒスチジンを多く含み全体として正電荷を有している (Table 1-4)。そのため負電荷を帯びた DNA と強く相互作用することができる。

Table 1-4

ヒストン	アミノ酸数	分子量	リジン数	アルギニン数	電荷
H1	224	22500	66 (29.5%)	3 (1.3%)	+58
H2A	129	13960	14 (10.9)	12 (9.3)	+15
H2B	125	13774	20 (16.0)	8 (6.4)	+19
H3	135	15273	13 (9.6)	18 (13.3)	+20
H4	102	11236	11 (10.8)	14 (13.7)	+16

ヒストンは H2A、H2B、H3、H4 各々が 2 個ずつ計 8 個のタンパク質からなるコアヒストンとよばれるオクタマーを形成する。このコアヒストンに 200 塩基対の DNA が巻きつくことでヌクレオソームとよばれる球状の構造を形成する。ヌクレオソーム間をつなぐ DNA に対しヒストン H1 が結合し、この構造が数珠上に連なることでクロマチンとよばれる DNA とヒストンの複合体が形成されている (Figure 1-51)。

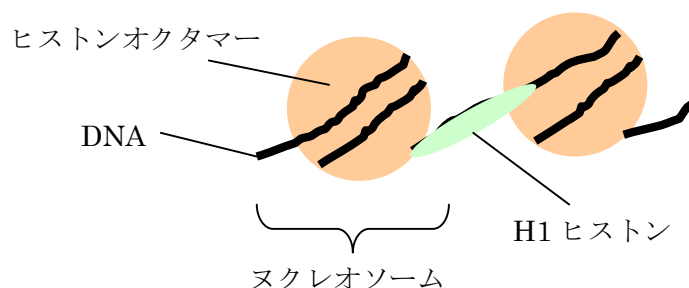


Figure 1-51

ヒストンの役割はDNAと結合しヌクレオソームを構築するだけではない。第2の重要な役割は転写を制御することで遺伝子の発現を調整しているという点である。このような制御はヒストンの特定のアミノ酸側鎖が化学修飾を受けることで行われる。8個のコアヒストン各々のN末端部分にある25アミノ酸残基は、球状のコアヒストン部分の表面上に出ておりヒストンテイルとよばれる。このヒストンテイル上のアミノ酸側鎖が化学修飾を受けることで、DNAとの相互作用に変化を及ぼす (Figure 1-52)。

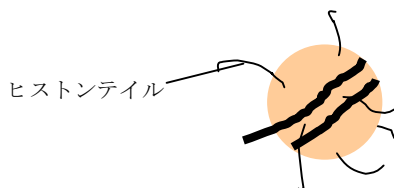


Figure 1-52

化学修飾の種類としてはリシン側鎖に対するアセチル化とメチル化、セリンやスレオニン側鎖に対するリン酸化などがある。この中でも特にアセチル化は遺伝子の発現制御に大きくかかわっている。アセチル化はヒストンアセチル化酵素 (HAT) によりリシン側鎖のアミノ基に対して行われる。アミノ基がアセチル化されることで正電荷が失われ、ヒストンテイルとDNAとの結合が弱まる。すると転写の際に働く酵素や転写因子といったタンパク質がDNAに対し結合できるようになり転写が開始される。アセチル化の程度とアセチル基の代謝は細胞によって異なるが、多くの場合その半減期は数分程度である。ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) によりアセチル基が取り除かれ、リシン側鎖が正電荷を取り戻すとヒストンテイルは再びDNAと結合することで転写に必要なタンパク質の結合を妨げ、遺伝子発現を抑制する (Figure 1-53)。

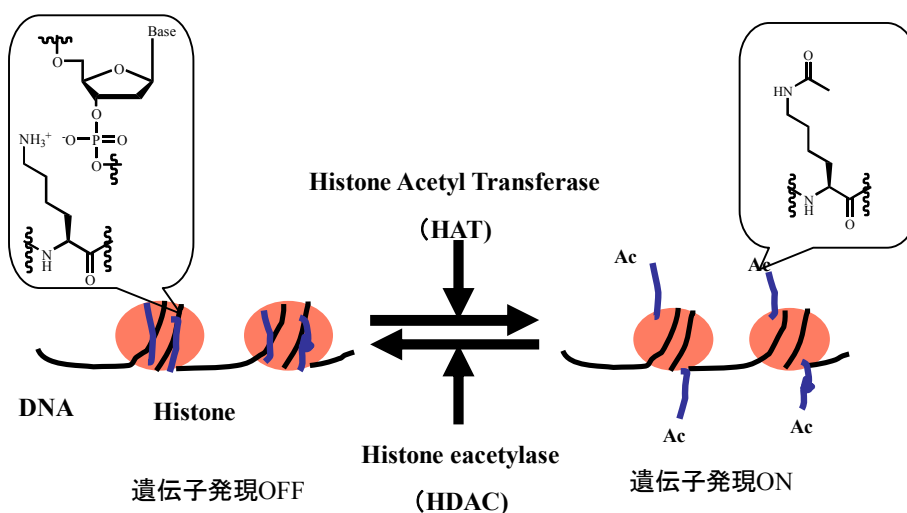


Figure 1-53

### 1-7-3 ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) <sup>38), 40)</sup>

ヒストンに対しアセチル化を行う酵素はヒストンアセチル化酵素 (HAT) とよばれ、転写因子と共同的に働くか、転写因子自身がヒストンアセチル化酵素としても働くなどし、転写を促進する作用を持つ。一方、アセチル基を除去する酵素はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) とよばれ、加水分解酵素の一種である。こちらは HAT とは逆に転写を抑制する。

HDAC は現在までに 10 種類以上が同定されており、特徴から 3 つのクラスに分類される (Figure 1-54)。

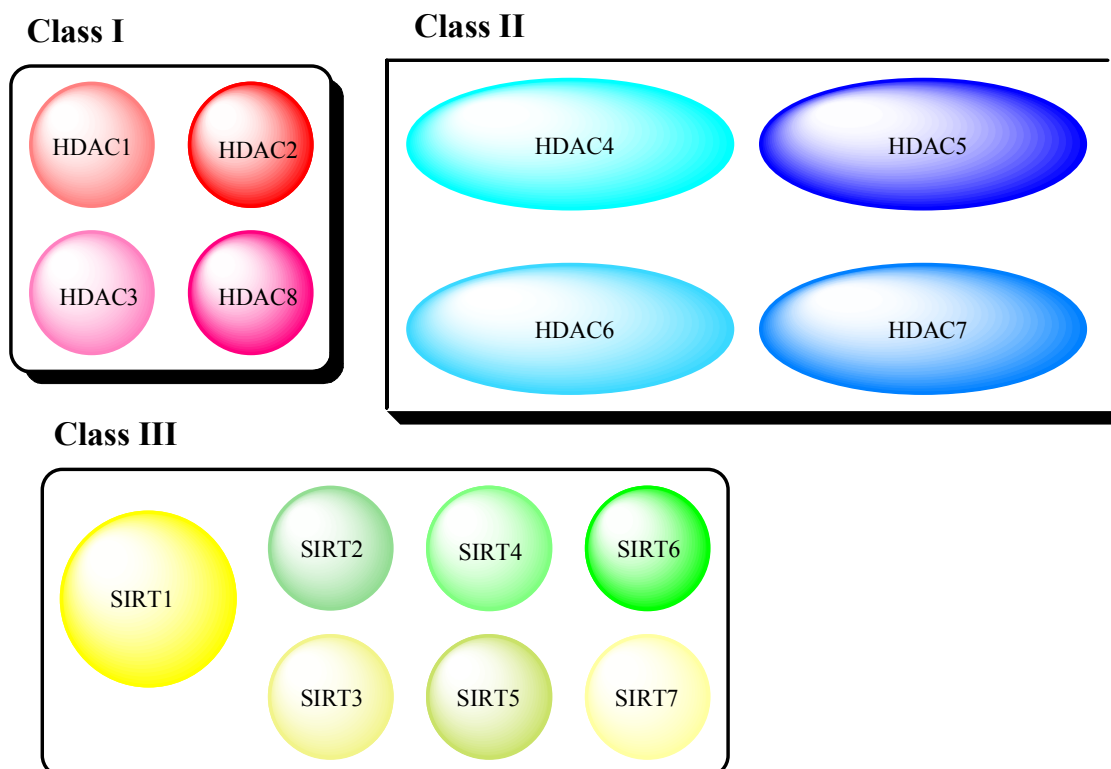


Figure 1-54

クラス I に分類されるのは HDAC1、2、3、8 である。HDAC1 と 2 は他に 2 つのタンパク質と結合した 4 つのタンパク質からなる複合体を形成し、これがさらに大きなタンパク質の複合体の 1 部となることで、特定の DNA 配列を認識し、脱アセチル化を行う (Figure 1-55)。HDAC3 ではスプライシングパターンの違いによりいくつか異なる種類があることが知られている。クラス I の HDAC は主に核内に存在している。

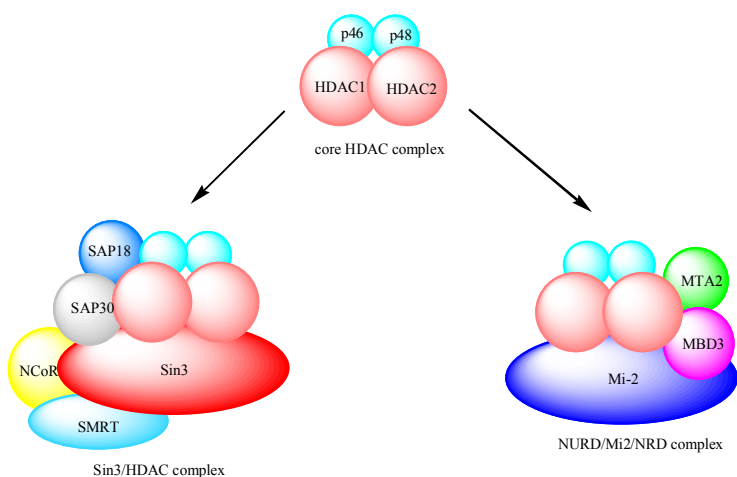


Figure 1-55

クラス II として分類されるのは HDAC4 から 7 である。クラス II はクラス I の HDAC に比べ、およそ 2 倍の大きさがある。クラス II の HDAC は核と細胞質を行き来することが知られているが、詳しい働きは分かっていないことが多い。その中で HDAC6 は  $\alpha$ -チューブリンの脱アセチル化酵素として働くことが吉田らによって明らかにされた<sup>35)</sup>。

クラス III は他のクラスの HDAC が自発的な酵素活性を有するのと異なり、NAD<sup>+</sup>に依存した HDAC 活性を示す。

このように HDAC は特徴の異なる多くの種類があるが、各々の詳しい作用機構に関しては分かっていないことが多い。

#### 1-7-4 HDAC 阻害剤<sup>41)</sup>

HDAC は転写を抑制する働きがあるため、HDAC を阻害することにより転写が活性化状態が持続することになる。近年、HDAC 阻害剤はがん細胞をアポトーシスへ導くことが報告され、新たな抗がん剤として有望視されている。代表的な HDAC 阻害剤を示す (Figure 1-56)。

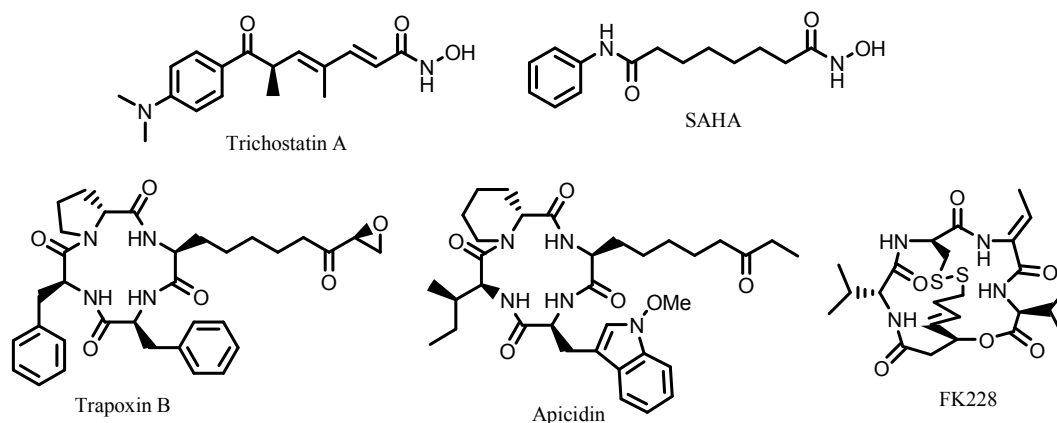


Figure 1-56

トリコスタチン A はヒドロキサム酸を有する HDAC 阻害剤で、HDAC に対する選択性はほとんどないが高い生理活性を有するため、活性試験の際の標準物質として使われることが多い。SAHA はトリコスタチン A をもとに作られた化合物で単純な構造ながら有効な HDAC 阻害剤であり、新規な分子標的の抗がん剤としてアメリカ FDA に承認された<sup>42)</sup>。

その他の HDAC 阻害剤の多くは環状ペプチド構造を有している。いずれも 4 残基から 5 残基の環状ペプチド、デプシペプチドであり長鎖のアルキル側鎖とその先端に極性官能基を有するか、分子内でジスルフィド結合による架橋構造を持っている。

HDAC はヒストンテイル上の側鎖がアセチル化されたりシンからアセチル基を取り除く加水分解酵素である。HDAC の活性中心には亜鉛が存在し、この亜鉛にアセチル基が配位し、加水分解される。HDAC 阻害剤はこのアセチル化されたりシンのミメティックとして、HDAC の活性ポケットに入り込み、亜鉛と結合することで阻害活性を示す。ジスルフィド結合を有する HDAC 阻害剤は核内でジスルフィド結合が還元され、遊離のチオールが生じる。このうち長鎖のアルキル基を有するチオールが HDAC の亜鉛と結合することで HDAC を阻害する (Figure 1-57)。

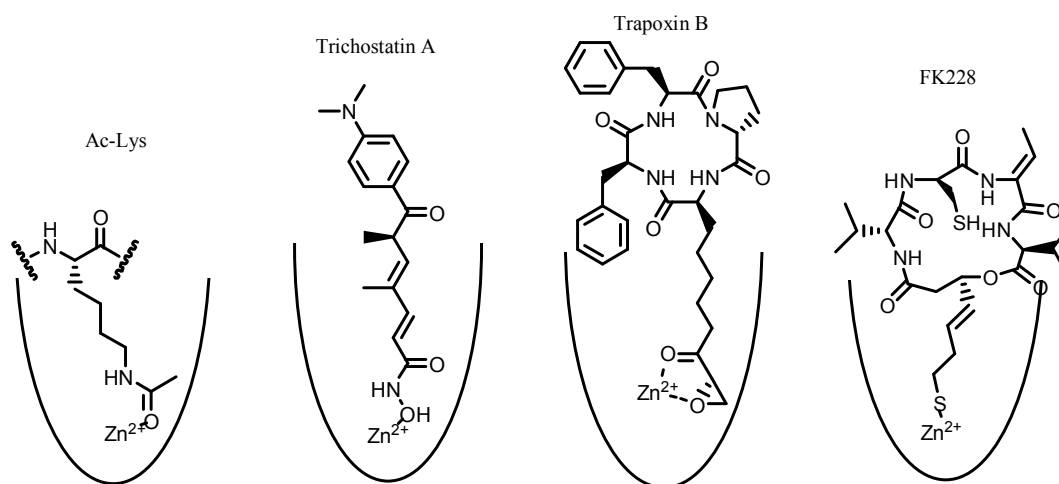


Figure 1-57

トリコスタチン A、SAHA は各々の HDAC に対する選択性が低いことが知られている。一方、環状ペプチドを有する HDAC 阻害剤はある程度の選択性を有しているため、現在、様々な研究グループにより環状ペプチドを有する選択的な HDAC 阻害剤の開発研究が行われている。

#### 1-7-5 スピルコスタチン A

スピルコスタチン A は新家、瀬戸らにより *Pseudomonas* sp. より単離・構造決定された環状デプシペプチドである<sup>43)</sup>。HDAC 阻害活性を有し細胞周期調節遺伝子の発現を誘導する (Figure 1-58)。

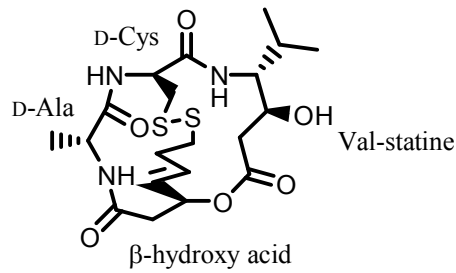


Figure 1-58

HDAC 阻害活性は  $IC_{50}$  値が 2.0 nM と既存の HDAC 阻害剤である FK228 (3.1 nM)、トリコスタチン A (5.2 nM)、SAHA (108.8 nM) より強力であった。また、既存の抗がん剤が効かなくなつたがん細胞に対しても有効であり、正常細胞には影響を与えない。本化合物は東京大学と旧山之内製薬との共同研究で発見された化合物であり、現在アステラス製薬により新薬としての開発が進められている。

構造上の特徴としては 2 環性のデブシペプチドであり、ジスルフィド結合による環と 3 つのアミド結合と 1 つのエステル結合からなる環から構成されている。構成要素は D - バリン由来のスタチン誘導体、D - システイン、D - アラニン、 $\beta$  - ヒドロキシ酸である。 $\gamma$  - アミノ酸であるスタチン誘導体を有していることが他の環状ペプチドからなる HDAC 阻害剤との大きな違いであり、合成を行う際にも通常のアミノ酸とは異なる部位の反応性が問題となる。

#### 1-7-6 スピルコスタチン A の生理活性発現機構

スピルコスタチン A の生理活性発現機構に関しては、ジスルフィド結合が還元されて生じる  $\beta$  - ヒドロキシ酸のチオール基が重要であることがわかっている。細胞内でジスルフィド結合が還元され、遊離のチオール基が生じる。このチオール基が HDAC の活性中心である亜鉛へと配位することで酵素活性を阻害する。すなわち、スピルコスタチン A はプロドラッグであり細胞内で還元されて始めて活性化化合物になると考えられる (Figure 1-59)。

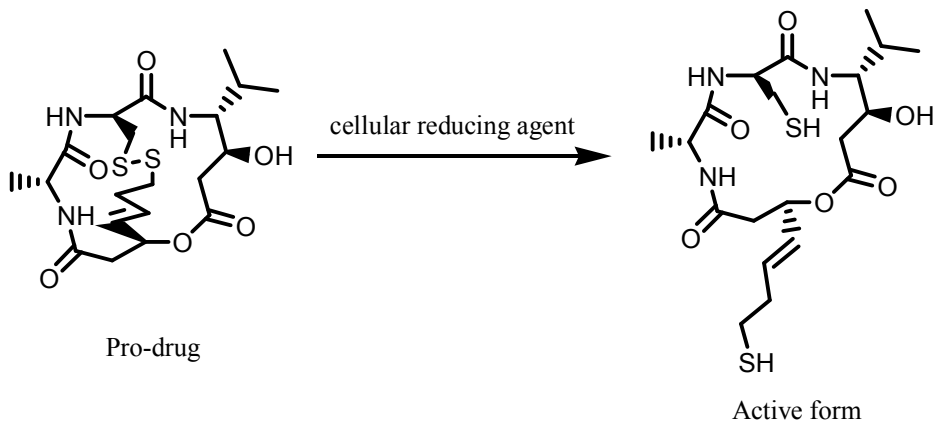


Figure 1-59

この機構は吉田、西野らによる類縁化合物 FK228 に関する研究からも支持される。FK228 もスピルコスタチン A と同様、ジスルフィド結合を有する 2 環性のデプシペプチド HDAC 阻害剤である。彼らはその還元体は弱いながらも活性を有しているが、チオールをメチル化することで活性が完全に失われることを報告している (Figure 1-60)<sup>44)</sup>。

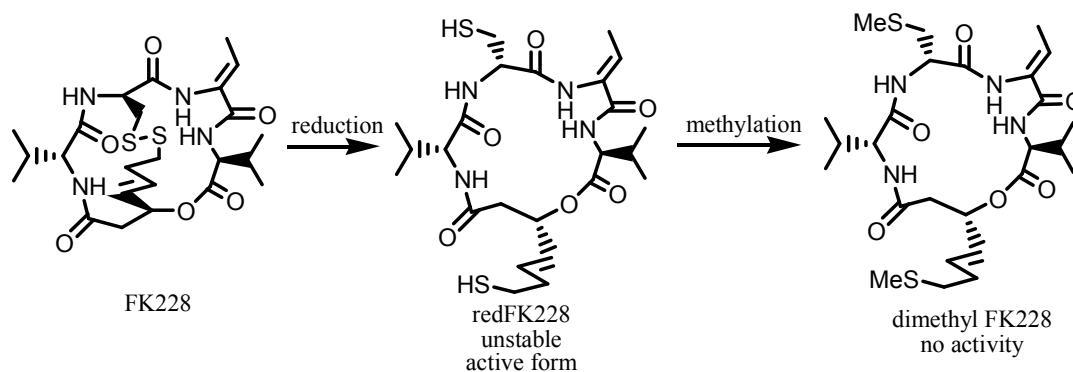


Figure 1-60

遊離のチオール基を有した化合物は様々な生体分子と結合してしまうことが考えられるので、還元体の活性が低下したと推測される。このことからスピルコスタチン A がプロドラッグとして働き、がん細胞内でジスルフィド結合が還元されることで活性を発現すると考えられ、プロドラッグとして存在することが高い活性、選択毒性を示す要因であると考えられる。

#### 1-7-7 スピルコスタチン A の合成例

スピルコスタチン A の全合成は Ganesan らによって報告されている。彼らはスタチン誘導体を C 末端とし順次縮合を行い、マクロラクトン化後、ジスルフィド結合を形成することで全合成を達成している。また、 $\beta$ -ヒドロキシ酸のエナンチオマーを導入した、*epi*-スピルコスタチン A の合成も行い、活性がほとんどないことを報告している (Figure 1-61)<sup>45)</sup>。

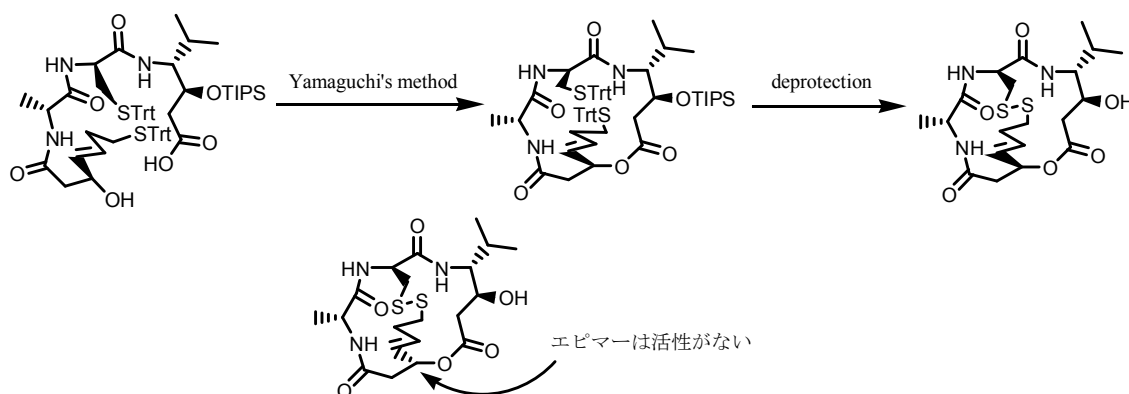


Figure 1-61

しかし、これ以外の誘導体合成は報告されておらず、FK228 といった類縁化合物に関しても誘導体合成は報告されていないため、構造活性相関に関してはほとんど未知であるといえる。

## 1-8 本論文の概要

本論文は「パラジウム触媒を用いた連続的環化反応によるジメチルグロイオシホン A の全合成研究および固相合成法を用いたスピルコスタチン A の全合成とケミカルバイオロジー」と題し、以下全 5 章から構成される。

第 1 章「序論」では、生体機能分子の合成において Target Oriented Synthesis における骨格構築反応として重要な  $\pi$ -アリルパラジウム触媒を用いた反応について述べ、Diversity Oriented Synthesis における基本技術であるコンビナトリアルケミストリーとその応用研究であるケミカルバイオロジーについて述べ、本論文の目的と意義を明らかにしている。

第 2 章「 $\pi$ -アリルパラジウム錯体に対する分子内アルケン挿入反応を用いたジメチルグロイオシホン A の全合成研究」では、当研究室で開発されたパラジウム触媒による新規スピロ環骨格構築法を用いたジメチルグロイオシホン A の Target Oriented Synthesis について述べている (Figure 1-62)。

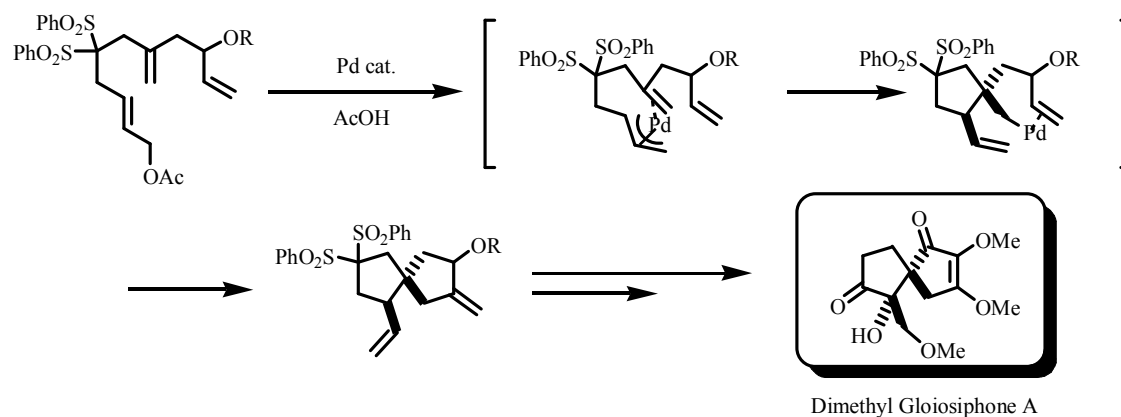


Figure 1-62

第 3 章「スピルコスタチン A の全合成とケミカルバイオロジー」では、第 1 節「スピルコスタチン A の全合成」において誘導体合成を指向したスピルコスタチン A の効率的な全合成について述べている (Figure 1-63)。

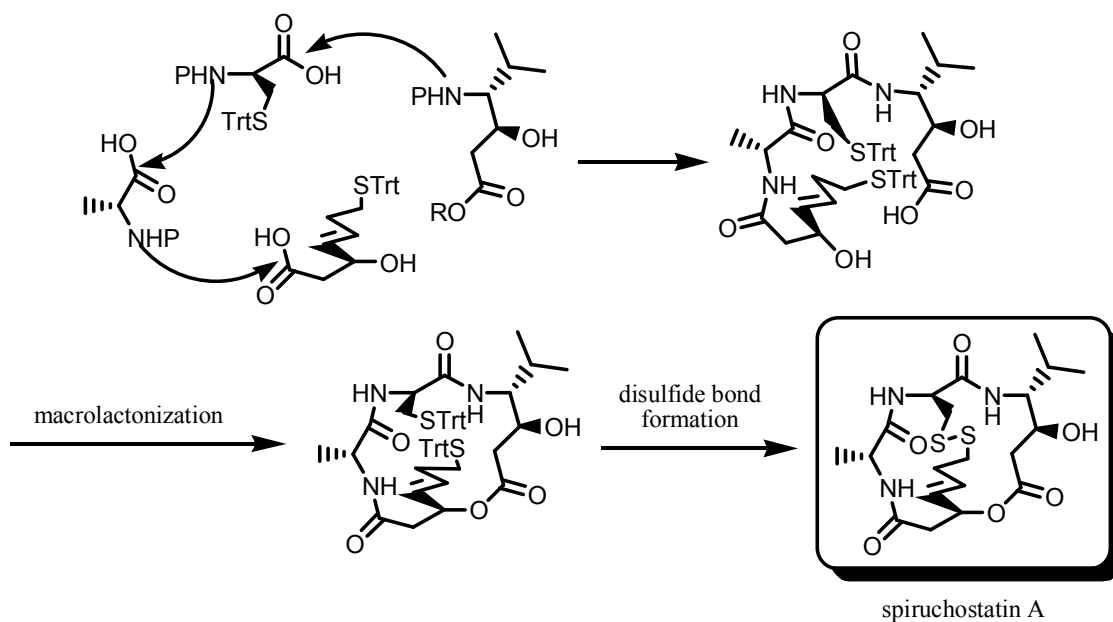


Figure 1-63

第2節「スピルコスタチン A を用いたケミカルバイオロジー」において、スピルコスタチン A にタグ分子を結合したケミカルプローブの合成とそれを用いた HDAC 複合体の釣り上げ実験について述べている (Figure 1-64)。

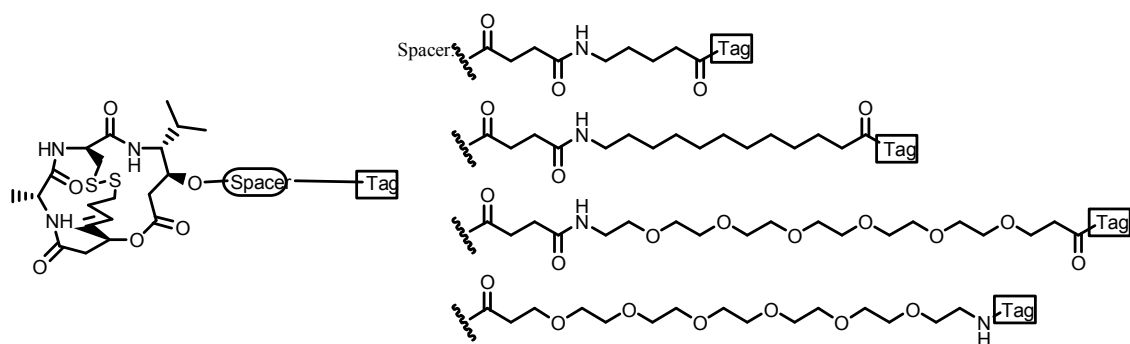
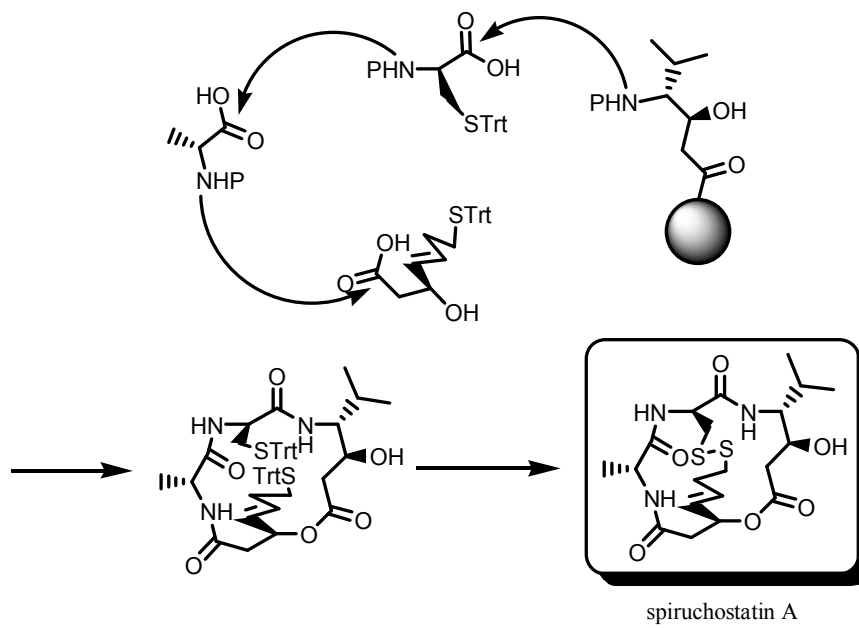


Figure 1-64

第4章「固相合成法を用いたスピルコスタチン A の全合成および誘導体合成」では、固相合成法によるスピルコスタチン A の全合成およびそこで確立された方法論を用いた誘導体合成について述べている (Figure 1-65)。



**Figure 1-65**

第5章「結論」では、本論文を総括している。

## Reference

- 1) Burke, M. D.; Berger, E. M.; Schreiber, S. L. *Science*, **2003**, *302*, 613.
- 2) 野依良治ほか編 “大学院講義有機化学 I” 東京化学同人。
- 3) 辻二郎 “遷移金属が拓く有機合成” 化学同人。
- 4) Trost, B. M.; Chisholm, J. D.; Wroblewski, S. T.; Jung, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 12420
- 5) Takahashi, T.; Kataoka, H.; Tuji, J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, *105*, 147.
- 6) Hughes, R. P.; Powell, J. *J. Organometal. Chem.*, **1971**, *30*, C45.
- 7) Oppolzer, W.; Gaudin, J.-M. *Helv. Chim. Acta*, **1987**, *70*, 1477.
- 8) Oppolzer, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1989**, *28*, 38.
- 9) Togashi, K.; Terakado, M.; Miyazawa, M.; Yamamoto, K.; Takahashi, T. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 3333.
- 10) Doi, T.; Yanagisawa, A.; Takahashi, T.; Yamamoto, K. *Synlett*, **1996**, 145.
- 11) 土井隆行, 有機合成化学協会誌, **2001**, *59*, 1190.
- 12) Oppolzer, W.; Xu, J.-Z.; Stone, C. *Helv. Chim. Acta*, **1991**, *74*, 465.
- 13) (a) Doi, T.; Yanagisawa, A.; Nakanishi, S.; Yamamoto, K.; Takahashi, T. *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 2602. (b) Doi, T.; Takasaki, M.; Nakanishi, S.; Yanagisawa, A.; Yamamoto, K.; Takahashi, T. *Bull. Chem. Soc., Jpn.*, **1998**, *71*, 2929.
- 14) Pradhan, R.; Patra, M.; Behera, A. K.; Mishra, B. K.; Behera, R. K. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 779.
- 15) 小竹無二監修 “大有機化学 6 脂環式化合物 I” 朝倉書店。
- 16) Kraft, P.; Cadalbert, R. *Synthesis*, **2002**, *15*, 2243.
- 17) Ashimori, A.; Overman, L. E. *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 4571.
- 18) (a) Abelman, M. M.; Overman, L. E. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 1636. (b) Overman, L. E. *Pure Appl. Chem.*, **1992**, *64*, 1813.
- 19) Trost, B. M.; Shi, Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 9421.
- 20) 高崎優、修士論文、東京工業大学、**1997**。
- 21) Chen, J. L.; Moghaddam, M. F.; Gerwick, W. H. *J. Nat. Prod.*, **1993**, *56*, 1205.
- 22) (a) Paquette, L. A.; Sturino, C. F.; Doussort, P. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 9456. (b) Sturino, C. F.; Doussort, P.; Paquette, L. A. *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 8913.
- 23) (a) Hashizume, Y.; Maki, S.; Ohashi, M.; Niwa, H. *Synlett*, **1998**, 1357. (b) Hashizume, Y.; Maki, S.; Ohashi, M.; Niwa, H. *Synth. Commun.*, **1999**, *29*, 1223.
- 24) (a) Sha, C.-K.; Ho, W.-Y. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1998**, 2709. (b) Sha, C.-K.; Ho, W.-Y. *J. Chin. Chem. Soc.*, **1999**, *46*, 2709.
- 25) コンビナトリアルケミストリー、コンビナトリアルケミストリー研究会編、化学同人
- 26) Tanaka, H.; Matoba, N.; Tsukamoto, H.; Takimoto, H.; Yamada, H.; Takahashi, T. *Synlett*, **2005**, 824.

- 27) Novabiochem catalog 2006/2007
- 28) Takahashi, T.; Inoue, H.; Yamamura, Y.; Doi, T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2001**, *40*, 3230.
- 29) Yang, L.; Morriello, G. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8197.
- 30) Bourel-Bonnet, L.; Rao, K. V.; Hamann, M. T.; Ganesan, A. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1330.
- 31) Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- 32) 吉田稔 蛋白質 核酸 酵素 **2005**, *50*, 1031.
- 33) Scriber, S. L. *Chem. Eng. News*, **2003**, *81*, 51.
- 34) Taunton, J.; Hassig, C. A.; Schreiber, S. L. *Science*, **1996**, *272*, 408.
- 35) Hubbert, C.; Guardiola, A.; Shao, R.; Kawaguchi, Y.; Ito, A.; Nixon, A.; Yoshida, M.; Wang, X.-F.; Yao, T.-P. *Nature*, **2002**, *417*, 455. (b) Matsuyama, A.; Shimazu, T.; Sumida, Y.; Saito, A.; Yoshimatsu, Y.; Seigneurin-Berny, D.; Osada, H.; Komatsu, Y.; Nishino, N.; Khochbin, S.; Horinouchi, S.; Yoshida, M. *The EMBO Journal*, **2002**, *21*, 6820
- 36) (a) 夏目徹 蛋白質 核酸 酵素 **2004**, *49*, 2222. (b) 夏目徹 細胞工学 **2006**, *25*, 613.
- 37) Hirano, Y.; Hendil, K. B.; Yashiroda, H.; Iemura, S.; Nagane, R.; Hioki, Y.; Natsume, T.; Tanaka, K.; Murata, S. *Nature*, **2005**, *437*, 1381.
- 38) クロマチン—エピジェネティクスの分子機構、Bryan M. Turner 著、堀越正美訳、**2005**, Springer.
- 39) クロマチン、大場義樹著、**1986**, 東京大学出版会.
- 40) Khochbin, S.; Verdel, A.; Lemercier, C.; Seigneurin-Berny, D. *Curr. Opin. Genet. Devel.*, **2001**, *11*, 162.
- 41) (a) Miller, T. A.; Witter, D. J.; Belvedere, S. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5097. (b) Esteller, M.; Villar-Garea, A. *Int. J. Cancer*, **2004**, *112*, 171.
- 42) *New current*, **2006**, *17*, 10月10日号.
- 43) Masuoka, Y.; Nagai, A.; Shin-ya, K.; Furihata, K.; Nagai, K.; Suzuki, K.; Hayakawa, Y.; Seto, H. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 41
- 44) Furumai, R.; Matsuyama, A.; Kobashi, N.; Lee, K.-H.; Nishiyama, M.; Nakajima, H.; Tanaka, A.; Komatsu, Y.; Nihino, N.; Yoshida, M.; Horinouchi, S. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4916.
- 45) Yurek-George, A.; Habens, F.; Brimmell, M.; Packham, G.; Ganesan, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1030

## 第 2 章

「 $\pi$ -アリルパラジウム錯体に対する分子内アルケン挿入反応  
を用いたジメチルグロイオシホンAの全合成研究」

## 2-1 はじめに

第1章において当研究室における過去の研究から $\pi$ -アリルパラジウム錯体に対する分子内アルケン挿入反応を利用することで様々な骨格を構築できることを述べた。その中でもスピロ環化反応は非常に新規なスピロ環骨格構築法である。本反応を利用することでまったく新しいアプローチでジメチルグロイオシホン A (**1**)の全合成を行うことができると考えた (Figure 2-1)。

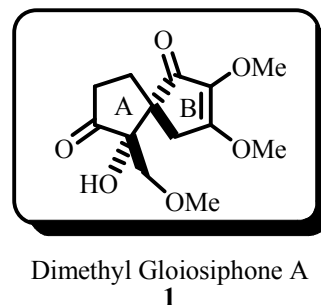


Figure 2- 1

## 2-2 合成計画

第1章で示したスピロ環化体は官能基を有していないのでそのまま全合成を行うことは困難であると考えた。そこでスピロ環化反応後の官能基変換において足がかりとなる酸素官能基を有する化合物の合成を計画した。過去の合成例より A 環部位の変換は合成の終盤でも可能であることから、B 環部位のケトエンジオール構造の構築が重要である。ケトエンジオールはヒドロキシジケトンのエノール体であるが2つのケトンのどちらがエノール化するか、またエノール化する向きによっていくつかの異性体が考えられる。しかし、メチルレダクチン酸では酸素官能基の導入の順序を変えても1つの異性体しか得られないこと、ジメチルグロイオシホン A も B 環部位の異性体は得られていないことから置換基の隣がケト形となった構造が最も安定な構造であると考えられる。すなわちケトエンジオール構造は2つのケトンと1つのヒドロキシル基を隣り合わせておけば導入の順序、並び方に関係なく、ケト-エノール互変異性により収束させることができると予想される (Figure 2- 2)。

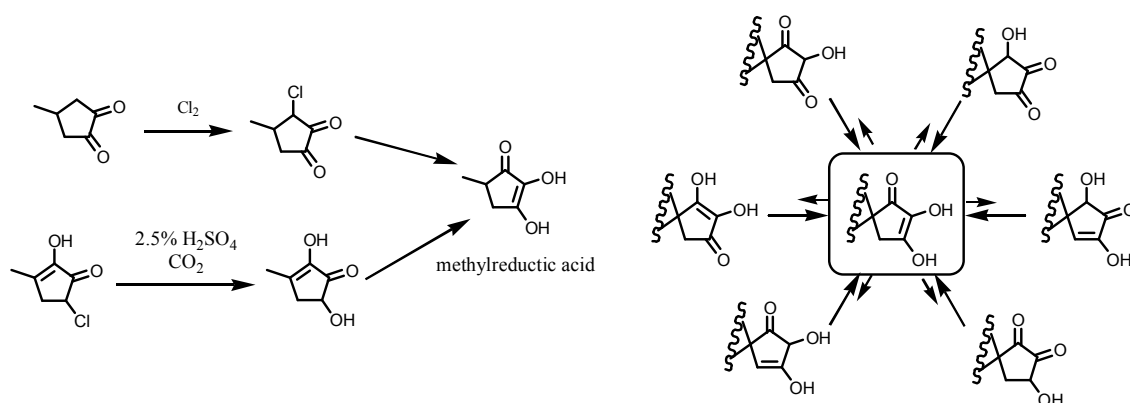


Figure 2- 2

そこで酸素官能基の導入位置として2位を選択した。2位を足がかりとすることで1位に酸素官能基を導入し、3位のエキソメチレンを酸化的に開裂することで3連続の酸素官能基

を導入し、ケト-エノール互変異性により B 環部位を構築できると考えた。2 位に酸素官能基を有するスピロ環化体 **3** は  $\pi$ -アリルパラジウム錯体に対する連続的分子内アルケン挿入反応により合成し、環化前駆体 **4** は辻-Trost 反応を 2 回行い、3 つのフラグメントをカップリングさせることにより構築することを計画した。第 1 章で示したように 2 位が官能基化されていないモデル体において、フェニルスルホニル基を用いた場合、立体選択的な環化が可能であったため、ビス(フェニルスルホニル)メタン (**6**)を用いることとした。2 位の酸素官能基はフラグメント合成の段階から導入しておく必要があるため、保護基としてはカップリング反応の際の塩基性条件にも環化反応の際の酢酸中加熱という条件にも耐えられるものでなくてはならない。しかし、環化後はどの段階でも脱保護できるものが望ましい。これらを考慮し、塩基にも酸にもある程度の安定性を示し、温和な条件下オレフィン、ケトン、ヒドロキシル基などに影響を与えることなく脱保護が可能である MPM 基を選択した (Figure 2-3)。

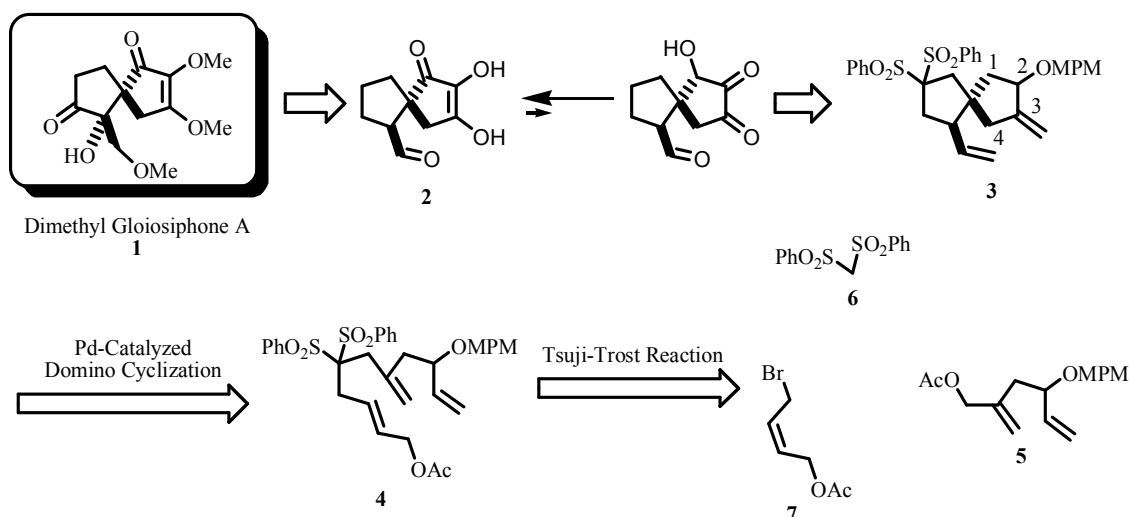


Figure 2-3

### 2-3 環化前駆体合成

まず、化合物 **5** の合成から始めることとした。化合物 **5** は 3 炭素と 4 炭素のユニットをカップリングすることで合成することとした。Morita-Baylis-Hillman 反応を用いてアクリル酸エチル (**8**) の  $\alpha$  位にヒドロキシメチル基を導入し、ブロモ化を行うことでアリルブロマイド **10** を合成した<sup>1)</sup>。これを有機亜鉛試薬へと変換し、3 炭素ユニットのアクロレインとカップリングした<sup>2)</sup>。ヨウ素を亜鉛の活性化剤として用いた場合、Wurtz カップリング体のみが得られてきたが、ジブromoエタン、TMSCl を活性化剤とすることで有機亜鉛試薬を調製することができた。有機亜鉛試薬をアクロレインに 1,2-付加させたところ、生じた水酸基がエステル基との間でラクトン化を起こした生成物 **11** が得られた。続いてラクトン **11** を水素化ジイソブチルアルミニウムを用いて還元し、ジオール **12** を収率 74% で得た。還元を一

段階で止め、ヒドロキシアルデヒドとする方法も試みたが中間体のラクトールの反応性が高いためか選択的に反応をすることが困難であった。またその後の保護基の導入もあまりうまくいかなかった。ジオール **12** の合成法としては Trost らの手法にならないメタリルアルコール (**13**) から調製したジアニオンをアクロレインへ 1,2 - 付加させる方法も検討した<sup>3)</sup>。しかし、大量のブチルリチウムを必要としスケールアップが難しいため 1 段階目の反応としては適しておらず、大量の塩基を中和した後の水相から水溶性の高い生成物を抽出することも困難であった (Figure 2-4)。

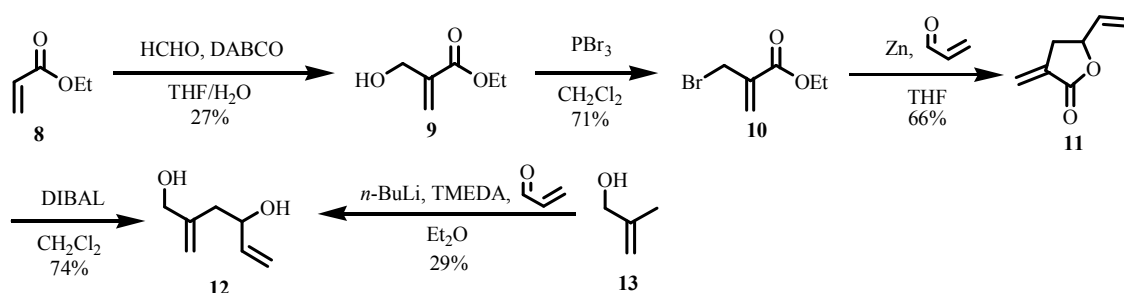


Figure 2-4

ジオール **12** の 1 級水酸基のみを選択的にアセチル化し、2 級水酸基を MPM イミデートを用いることにより酸性条件において MPM 基で保護し、化合物 **5** を 2 段階収率 55% で得た。また、**14** の MPM 基による保護について 4 - メトキシベンジルクロリドを用いて塩基性条件で反応を行ったところ、アセチル基が 1 級水酸基から 2 級水酸基へ移動し、1 級水酸基が MPM 化された化合物 **15** のみが得られた (Figure 2-5)。

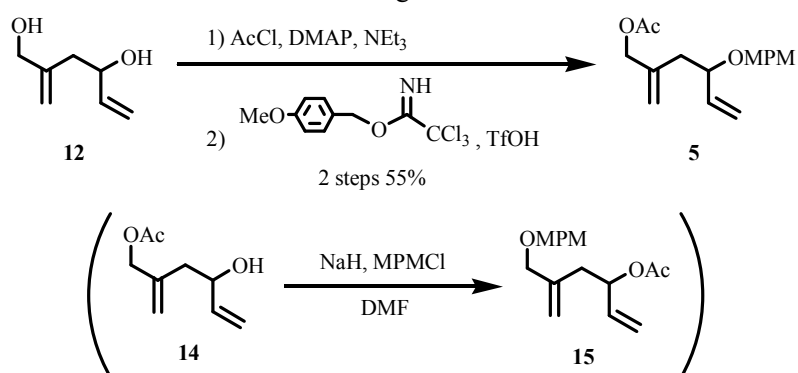


Figure 2-5

次にブロモアセテート **7** の合成を行った。*cis* - 2 - ブテン - 1,4 - ジオール (**16**) をモノアセチル化し、残った水酸基をブロモ化することでブロモアセテート **7** を 2 段階収率 36% で合成した (Figure 2-6)。

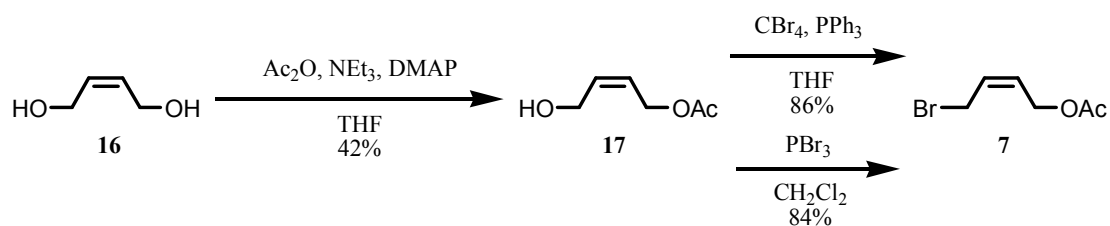
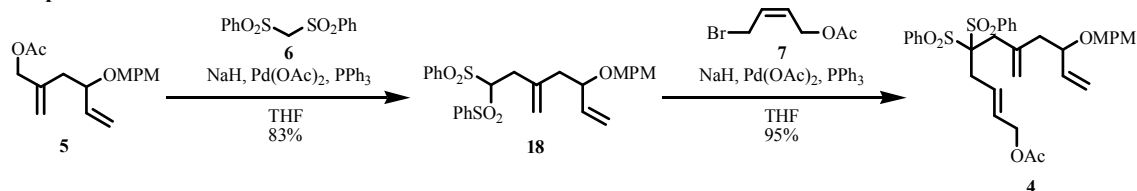


Figure 2-6

化合物 **5**、ブromoアセテート **7** が合成できたので辻 - Trost 反応によるカップリングを行った。まず、1 段階目にビス(フェニルスルホニル)メタン (**6**)から生じさせたアニオンと化合物 **5** のアリルアセテート部位から生じた  $\pi$ -アリルパラジウム錯体との反応を行った。この際、パラジウム触媒として酢酸パラジウムを用いたほうが、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  錯体を用いたときよりも高収率(83%)であることがわかった。続いて同様の条件でブromoアセテート **7** とのカップリングを行い、環化前駆体 **4** を 95%と高収率で合成することができた。この2段階のアルキル化はどちらも同じパラジウム触媒を用いる反応条件であるためワンポット反応が可能ではないかと考えた。実際に、ビス(フェニルスルホニル)メタン (**6**)の2つの活性水素を引き抜くのに十分な量の水素化ナトリウムを用い、2段階目のアルキル化において系中に存在する全てのアニオンと反応するのに十分な量のブromoアセテート **7** を加えることにより、ワンポットで環化前駆体 **4** を収率 74%で得ることができた (Figure 2-7)。

#### Stepwise



#### One-pot

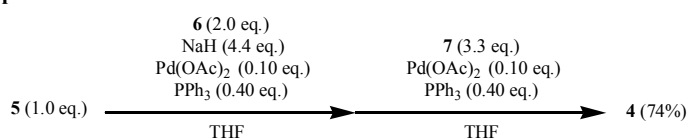


Figure 2-7

## 2-4 環化反応

環化前駆体 **4** が調製できたので、続いて環化反応の検討を行った。環化反応ではパラジウム触媒、配位子、溶媒、温度について検討を行った。 $\pi$ -アリルパラジウム錯体に対するアルケン挿入反応ではカチオン性の錯体が活性種であると考えられており、活性種には配位子が1つだけしか配位できないと考えられている。2座配位子では反応が著しく遅く、収率が低くなると報告されているため、単座のホスフィン配位子について検討することにした (Figure 2-8)<sup>4)</sup>。

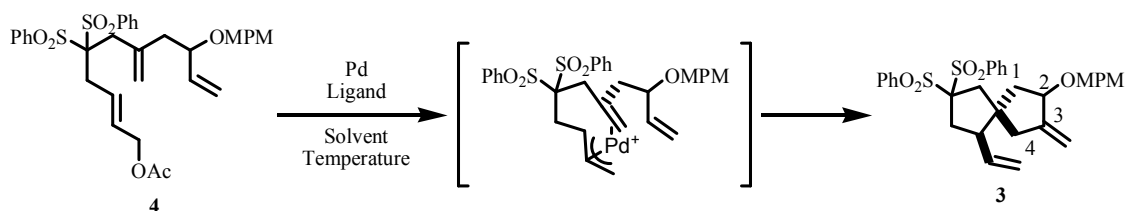


Figure 2- 8

種々検討した結果、パラジウム触媒として酢酸パラジウムを用いた場合が最も収率が高いことがわかった。これは、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウムを用いたときより反応時間も若干短くなったため2価のパラジウムを系中で還元して0価にするほうがより高活性であるためと考えられる。配位子に関してはトリフェニルホスフィン、トリシクロヘキシルホスフィン以外にトリフルリルホスフィン、トリ(*o*-トリル)ホスフィンについて検討したが、トリフェニルホスフィン以外ではあまりよい結果が得られず、溶媒に関しても酢酸溶媒以外では目的とする反応は進行しなかった。また、酢酸を触媒量にした系においても環化体は得られず、反応温度70℃以上では結果にあまり差がないことがわかった。Entry 9 に関しては後処理をせず直接濃縮後、カラムクロマトグラフィーによる精製を行った。他のものは後処理で分液操作を行ったもので、若干収率が低くなった (Table 2-1)。

Table 2-1

Entry	Pd (10 mol%)	Ligand (40 mol%)	Solvent	Temperature [°C]	Yield [%]
1	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	-	AcOH	60	44 (60 : 40)
2			AcOH	70	51
3			AcOH	80	55
4			AcOH (0.1 eq.) /THF	70	decomposed
5			THF	70	no reaction
6			CH <sub>3</sub> CN	70	decomposed
7	Pd(OAc) <sub>2</sub>	PPh <sub>3</sub>	AcOH	70	58
8		PPh <sub>3</sub>	AcOH	80	57
<b>9</b>		<b>PPh<sub>3</sub></b>	<b>AcOH</b>	<b>90</b>	<b>66 (60 : 40)</b>
10		P(2-furyl) <sub>3</sub>	AcOH	90	38
11		P( <i>o</i> -tol) <sub>3</sub>	AcOH	90	40
12	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub> ·CHCl <sub>3</sub>	PPh <sub>3</sub>	AcOH	70	42
13		PCy <sub>3</sub>	AcOH	70	no reaction

( ) 内はジアステレオマー比

環化体はジアステレオマー混合物として得られた。Entry 1, 9 について HPLC により分離を行ったところ、RI チャートの面積比からその比率はほぼ 6 : 4 であった。しかし、3つの不斉炭素のどれに起因するのかは決定できなかった。そこで2位をケトンへと変換し、不斉点を1つ除去することとした。DDQ により MPM 基の脱保護を行った際には生じた水酸基が一部ケトンまで酸化されたが過剰の試薬を用いても完全に変換することはできなかった。

た。そこで触媒量の TPAP を用い NMO を再酸化剤とすることでケトン **19** へと変換した。得られたケトン **19** は単一のジアステレオマーであり、残りの 2 つの不斉炭素は単一の立体化学を有していることが分かった。

スピロ環の相対立体化学を決定するために NOE 測定を行ったところ A 環のビニルプロトンと B 環のアリル位のプロトンとの間に NOE が観測された。この結果は 2 位に酸素官能基の無いモデル体の場合と同様であり、2 位の酸素官能基は環化の立体選択性にはほとんど影響を与えないと考えられる (Figure 2-9)。

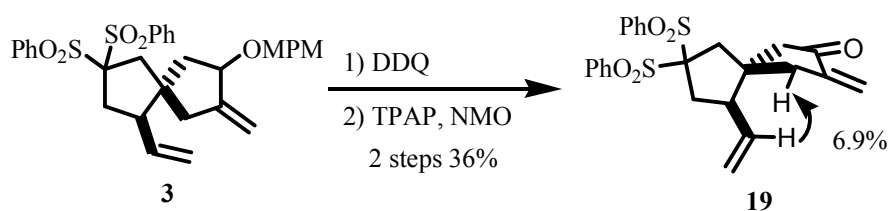
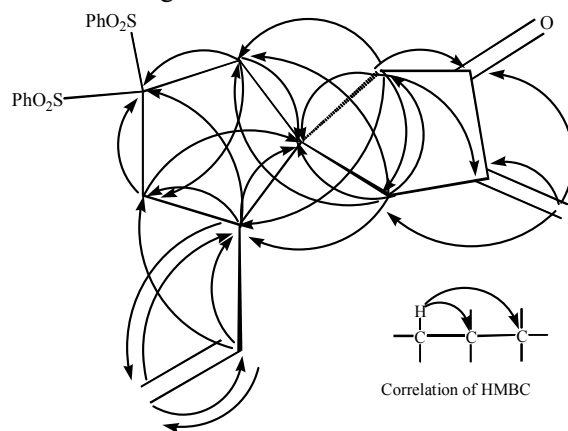


Figure 2-9

この化合物について構造を完全に決定するために COSY, HMQC, HMBC の NMR 測定を行い、全てのプロトン、カーボンの帰属、炭素骨格のつながりを見ることによりスピロ環骨格を有していることを確認した (Figure 2-10)。



化合物 **19** における HMBC の相関

Figure 2-10

以上をまとめると環化前駆体 **4** からパラジウム触媒を用いた環化反応により、スピロ環化体 **3** が収率 66% で得られた。スピロ環骨格の立体化学は 1 段階目の環化反応で全て決定されるため、 $\pi$ -アリルパラジウム錯体のシン、アンチおよび挿入するアルケンのレジオは完全に制御されている。ただし、2 位の酸素官能基からはほとんど不斉誘起がおきていない、すなわち挿入反応の際の面選択性はあまり高くないことがわかった (Figure 2-11)。

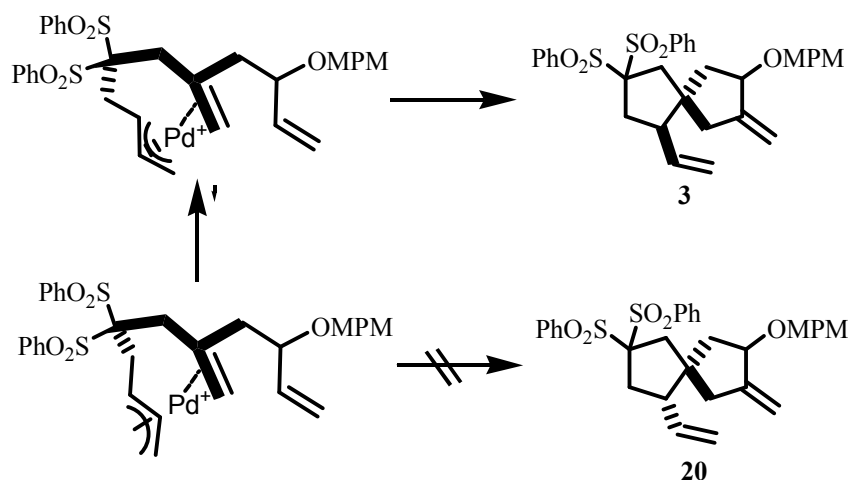


Figure 2- 11

## 2-5 官能基変換

次に環化体 **3** に対し官能基変換の検討を行った。1 位へのヒドロキシル基の導入は 2 位をケトンとした後、 $\alpha$  位を酸化することで行うこととした。フェニルスルホニル基はメタノール中金属マグネシウムにより除去する方法が報告されているが<sup>5)</sup>、塩基性の厳しい還元条件は今後の変換の中ではもっとも過酷であると考えられる。そこでこの変換を一番初めに行うことにした。**3** をメタノール中、50°C で金属マグネシウムと反応させることにより、フェニルスルホニル基を 2 つとも除去することに成功した。続いて 2 位の酸素官能基の脱保護、酸化を行った。この場合も DDQ による MPM 基の脱保護の際、水酸基が一部酸化されたが、前節と同様にして続く TPAP 酸化によりケトン **21** へと変換した。

得られたケトン **21** に対して  $\alpha$  位へヒドロキシル基の導入について、(±)-*trans*-2-(フェニルスルホニル)-3-フェニルオキサジリジン (Davis 試薬) を用いた検討を行った<sup>6)</sup>。検討の結果、ケトン **21** から調製したエノラートをオキサジリジンの溶液へ滴下していくという逆滴下により  $\alpha$ -ヒドロキシケトン **22** へ収率 78% で導くことができた。化合物は単一のジアステレオマーとして得られたが、相対立体化学の決定は行っていない。オキサジリジンをエノラートへ滴下した場合は複雑な混合物を与え、望む生成物は得られなかった。また、ケトン **21** をシリルエノールエーテル **23** とした後、過酸によりエポキシ化をすることで  $\alpha$ -ヒドロキシケトンへと導く方法について検討したが<sup>7)</sup>、複雑な混合物を与えこの場合も望む生成物は得られなかった (Figure 2- 12)。

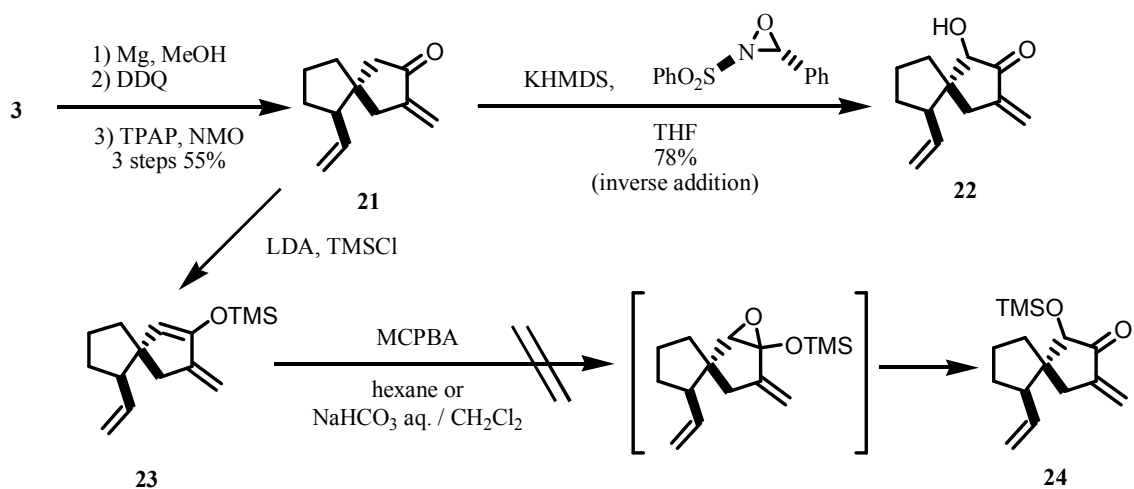


Figure 2- 12

続いて  $\alpha$ -ヒドロキシケトン **22** の2つの二重結合を酸化的に開裂させることにより、ケトエンジオール **25** への変換を検討した。まず、 $\alpha$ -ヒドロキシケトン **22** に対し塩化メチレン中、 $-78^{\circ}\text{C}$  でオゾンを経験させると、生成物は全て TLC 上で原点に留まっていた。ケトエンジオール構造はカルボキシル基と同等の酸性度をもっており、不安定な構造なので生成物を単離することなくジアゾメタン、もしくはトリメチルシリルジアゾメタンを用いて生成物のメチル化を行った。その結果、単一の生成物を微量ながら得た (Figure 2- 13)。

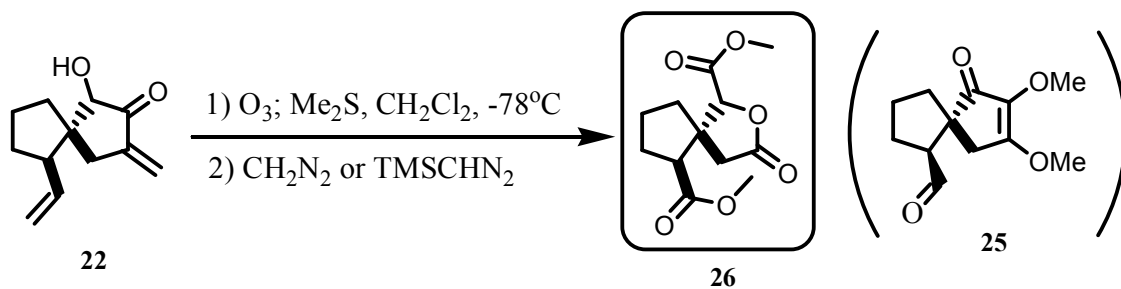
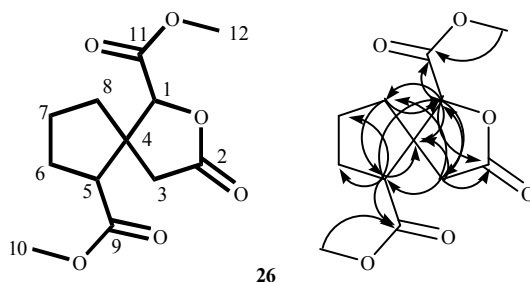


Figure 2- 13

得られた生成物に対して  $^1\text{H}$  NMR 測定を行ったところ積分値は望む化合物と一致しているものの、化学シフトが予想とは異なった。 $^{13}\text{C}$  NMR 測定においても炭素数は一致しているもののやはり化学シフトが過去の合成例等と比較してみても異なっていた。そこでこの化合物について HMQC, HMBC 測定を行い、詳細な構造解析を試みた。得られた化合物が微量であったため、HMBC において高磁場側のプロトンは良好な相関を見ることはできなかったが、帰属できたプロトン、カーボンは構造を決定するのに十分なものであった。そ

の結果、得られた化合物は望む化合物 **25** ではなく過剰に酸化されたラクトン構造を有する化合物 **26** であった (Figure 2- 14, Table 2-2)。



化合物 **26** の構造および HMBC の相関

Figure 2- 14

Table 2-2

Position	$\delta_H$ [ppm]	$\delta_C$ [ppm]
1	4.61(s, 1H)	83.2
2		174.8
3	2.98 (d, 1H, $J=16.9$ Hz), 2.77 (d, 1H, $J= 16.9$ Hz)	36.1
4		53.0
5	2.77 (m, 1H)	47.1
6 or 7	1.90-2.09 (m, 2H), 1.85-1.89 (m, 2H)	28.9, 22.2
8	1.90-2.40 (m, 1H), 1.78-1.87 (m, 1H)	39.6
9		173.6
10	3.74 (s, 3H)	51.9
11		168.8
12	3.82 (s, 3H)	52.6

このような化合物が得られた機構について、以下のように推測している。まず、オゾン酸化によって生じたオゾニド中間体が還元を受ける前に、微量に系中に存在していた水などの求核剤がカルボニル基を攻撃する<sup>8)</sup>。このとき炭素 - 炭素結合の開裂をおこしジカルボン酸が生じ、さらに何らかの理由により A 環部に生成したアルデヒドまでも過剰に酸化を受けることでトリカルボン酸が生じる。その後ラクトンを形成、残りの2つのカルボキシル基がジアゾメタンによってメチルエステル化されたことにより、ラクトン **26** が得られたと考えられる (Figure 2-15)。溶媒や反応時間を種々検討したが反応の初期段階から過剰酸化が起こっており、溶媒を変えても望む化合物は得られなかった。

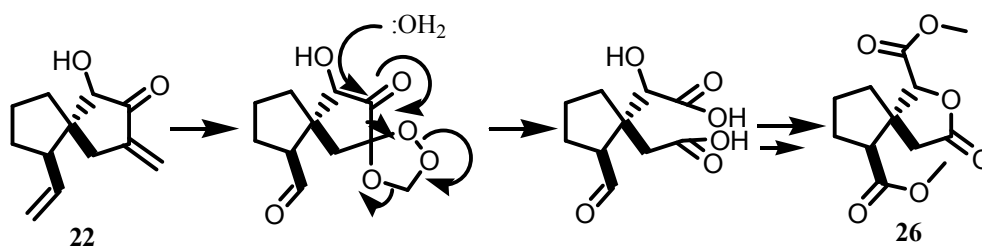


Figure 2- 15

次に、ヒドロキシル基にアセチル基を導入した基質 **27** についてオゾン酸化を行ったが、複雑な混合物を与えた。四酸化オスミウム／過ヨウ素酸ナトリウムを用いた系では過ヨウ素酸ナトリウムが生じたジケトンを経由して酸化開裂させてしまうことが考えられるので少量ずつ添加していったが、この場合にも複雑な混合物を与え、望む化合物は得られなかった (Figure 2-16)。他の代替法も有効とは考えられないため本ルートを断念した。

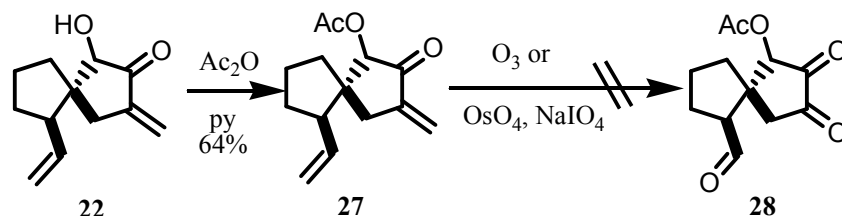


Figure 2-16

## 2-6 官能基変換 (ルート 2)

前節での検討により 2 位を酸化する前にアルケンの開裂を行っておくことが重要であるという知見を得た。また、一度に 2 つのアルケンを開裂させた場合、保護のかけ分けなどで工程数がかかるため、2 つあるアルケンのどちらか一方を選択的に反応させることとした。そこでまず、四酸化オスミウムによるジオール化においてアルケンの反応性に差が出ないか試みた。四酸化オスミウムはかさ高く立体障害の影響を受けやすいが、この影響をより大きくする目的で、通常は不斉ジヒドロキシル化に使用される AD-mix をかさ高い配位子を有した四酸化オスミウム試剤として利用できないか考えた。しかしながら、1 当量の試薬を用いても一方だけをジオール化することはできなかった。(Figure 2-17)。

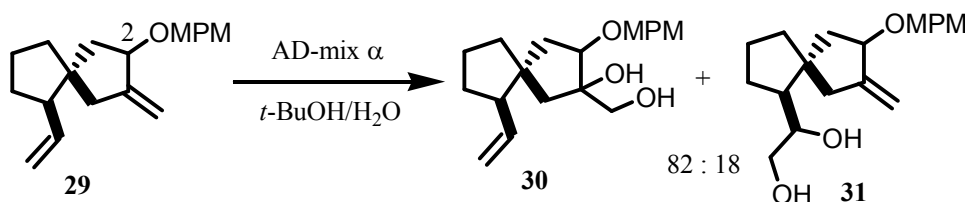


Figure 2-17

2 つのアルケンと比較すると A 環部のアルケンが 1 置換、B 環部のエキソメチレンが 2 置換であるため、エキソメチレンの方が求電子剤に対して反応性が高いと考えられる。そこで **29** に対し MCPBA によるエポキシ化を試みたところ、B 環部のエキソメチレン選択的にエポキシ化を行うことができた。得られたエポキシド **32** に対し触媒量の過ヨウ素酸と、等量の過ヨウ素酸ナトリウムを用いることでエポキシドの開環、生じたジオールの酸化開裂を行いケトン **33** へと導くことができた。続いて DDQ を用いて MPM 基の脱保護、生じた水酸基に対し三酸化硫黄ピリジン錯体を活性化剤とした DMSO による酸化を行うことでジケトン **35** へと導いた (4 段階 34%)。得られたジケトン **35** は 2 つのケトンのどちらか一

方が常にエノール化した状態で得られたため、エノールとビニル基がシン、アンチのジアステレオマー混合物 **36** となった。NMR によりその比を決定したところ、58 : 42 であった。(Figure 2- 18)。

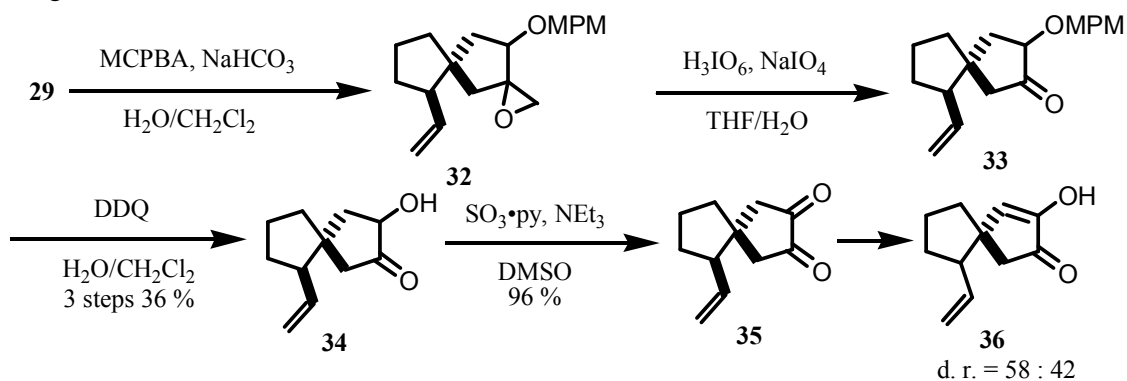


Figure 2- 18

ジケトン **36** から B 環部の官能基をそろえる方法として、丹羽らの全合成に倣い<sup>1</sup>、エノール化したケトンをもチルエーテルとし、Michael 付加的に  $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和ケトンのエポキシ化を経る方法を試みた (Figure 2- 19)<sup>9)</sup>。

ジケトン **36** に対してジアゾメタンを作用させたところ、大過剰のジアゾメタンを作用させたにもかかわらず、完全にはメチルエーテル化が進行しなかった。そこで少量のシリカゲルを添加し、ジアゾメタンを作用させることで定量的にメチルエーテル化を行うことができた。ジケトン **37** に対して TBHP もしくは過酸化水素を用いてエポキシ化を検討したが、どちらの場合も反応は進行しなかった。そこで、**37** にジメチルジオキシランを作用させたところ A 環部のアルケンのみがエポキシ化されたエポキシド **39** が収率 56% で得られた。この際、大過剰のジメチルジオキシランを作用させても B 環部のエポキシ化は進行しなかった。得られたエポキシド **39** に対し、さらに四酸化オスミウムを用いた反応も試みたが望む化合物 **40** は得られなかった (Figure 2- 20)。

1

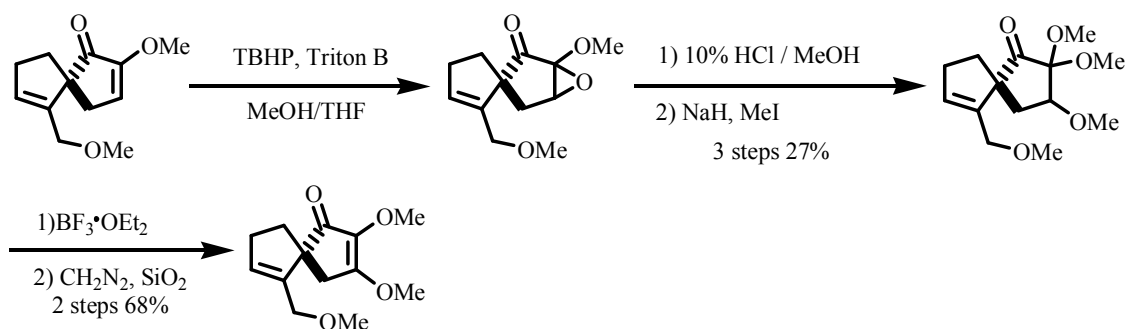


Figure 2- 19

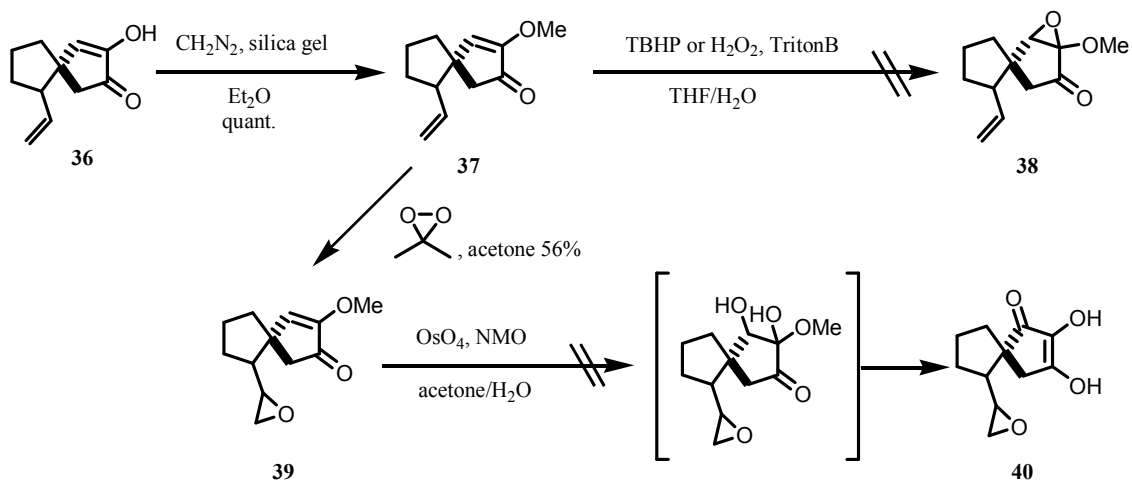


Figure 2- 20

次に、ケトンの  $\alpha$  位にヨウ素を導入し、加水分解する方法について検討した。酢酸溶媒中、ヨウ素を作用させることによりモノヨウ化物 **41** とし、水酸化ナトリウムまたは酸化銀による加水分解を試みたが反応は進行しなかった。そこでエノール部位をメチルエーテル化した **43** に対しても同様に加水分解を試みたが、反応は進行しなかった (Figure 2- 21)。

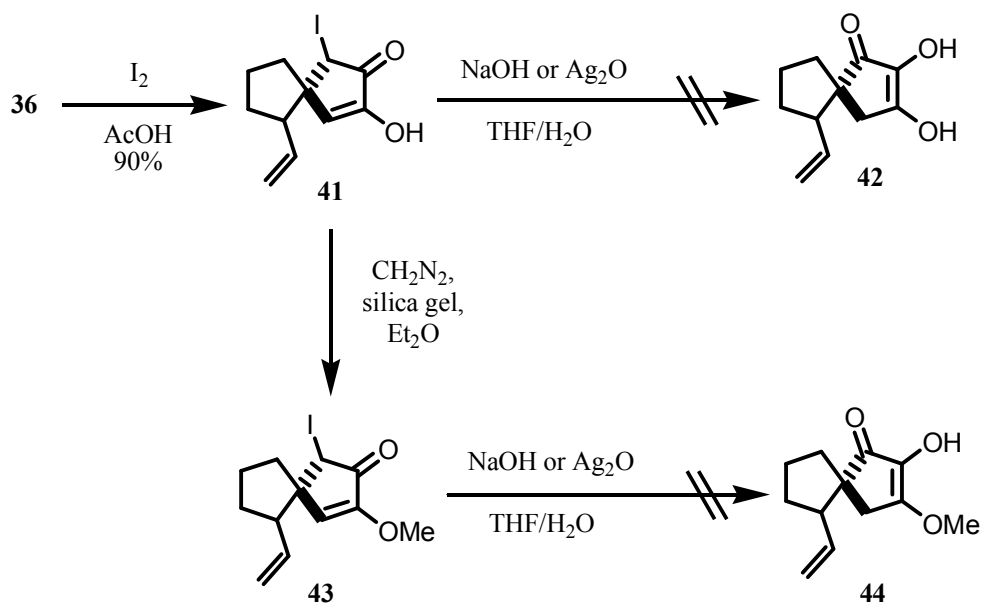


Figure 2- 21

3 番目の方法として Davis 試薬を用いてジケトン **36** に対して直接ヒドロキシル基を導入する反応を試みた。エノラートに対し Davis 試薬を作用させ、後処理を行った後、粗生成物をジアゾメタン処理しメチル化を行った。得られた化合物は極微量であったが、 $^1\text{H NMR}$  測定により 2 つのメチル基を有していることがわかった。しかし、構造を決定するには至ら

なかった。その後も何度か反応を行ったが反応に再現性が見られなかった (Figure 2- 22)。

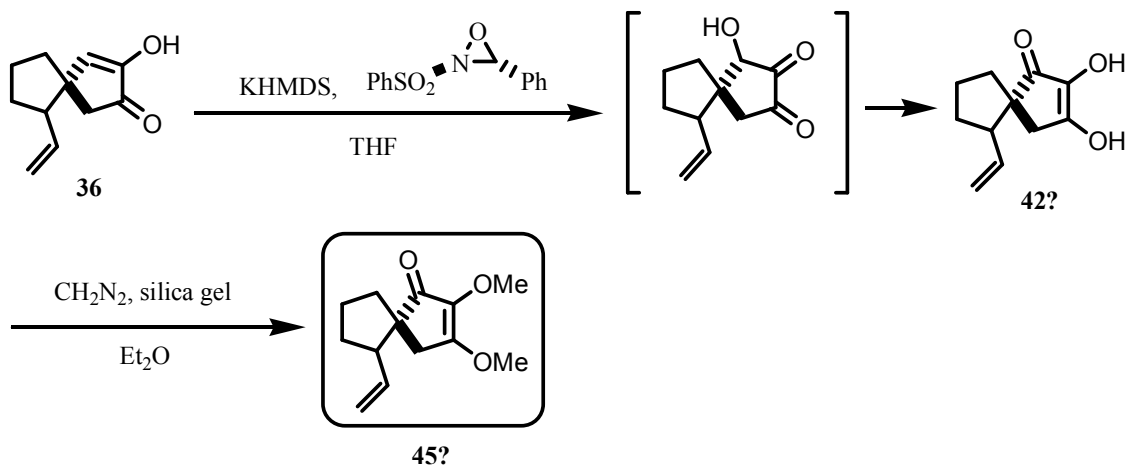


Figure 2- 22

そこでメチルエーテル **37** に対して同様にヒドロキシル基の導入を試みたところ、反応は進行し 3 連続の酸素官能基を有する **46** を収率 70% で得ることに成功した。得られた化合物 **46** は異性化およびメチルエーテル化を行うことでジメチルグロイオシホン A の B 環部を構築できると考えられる。そこでまず、酸性条件において異性化を試みたが反応は進行しなかった。次に塩基性条件において異性化を試みたところ、室温下速やかに異性化が進行しケトエンジオールのモノメチルエーテル **44** へと変換できた。続いて残りのエノール性水酸基をジアゾメタン処理によりメチル化し、ジメチルグロイオシホン A の B 環部を有する化合物 **45** を 2 段階収率 44% で合成することに成功した (Figure 2- 23)。

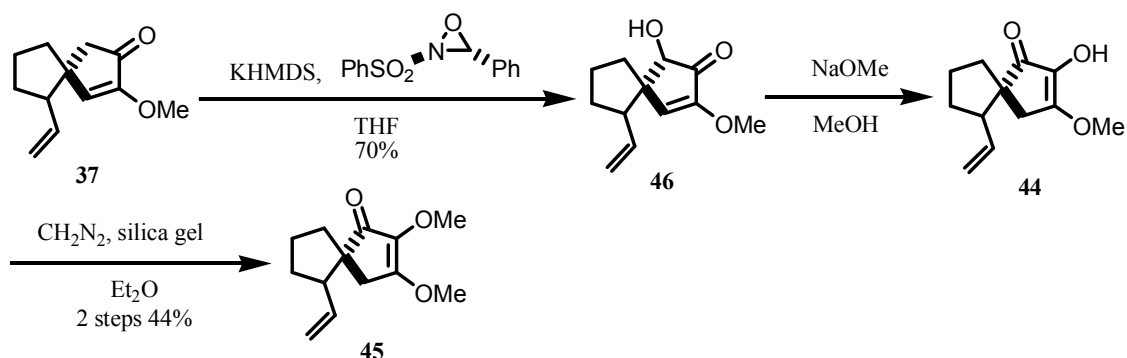
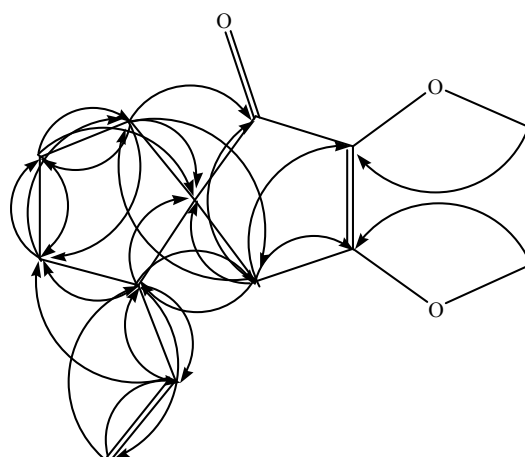


Figure 2- 23

ジメチルエーテル **45** は B 環内に一ヶ所しか水素と結合した炭素がないため、HMQC、HMBC 測定により構造を決定した。全てのプロトン、カーボンに帰属をつけ、炭素骨格のつながりを見ることで望む化合物 **45** が得られていることを確認した (Figure 2- 24)。



化合物 45 における HMBC の相関

Figure 2- 24

B 環部が構築できたので、全合成に向けて A 環部アルケンの酸化開裂を試みた。オゾン酸化では B 環がもたないと考えられるので、四酸化オスミウムによりジオールとし過ヨウ素酸ナトリウムでジオールを酸化開裂する方法を検討した。しかしながら過ヨウ素酸ナトリウムを直接四酸化オスミウムの再酸化剤とする方法、NMO を再酸化剤としてジオールとした後に酸化開裂する方法を試みたが、複雑な混合物を与え、望む生成物は確認できなかった。(Figure 2- 25)。これ以上の変換は困難であったため本ルートも断念し、再度検討することとした。

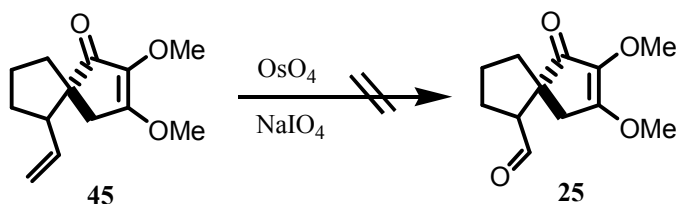


Figure 2- 25

## 2-7 形式全合成

これまでの結果より 2 つのアルケンは始めに変換しておく必要があることが分かった。また、前節で B 環部の構築法は確立できたため、ある程度 A 環部を変換した後に B 環部を構築することで全合成が達成できると考えた。そこでフェニルスルホニル基を除去した化合物 29 についてオゾン酸化によりアルケンの酸化開裂を試みた。その結果、ケトアルデヒド 47 を得ることができた。まず Paquette らの合成中間体へ導く目的で、得られたケトアルデヒド 47 に対しアルデヒド選択的な反応を行い、エナールへの変換を試みた<sup>10)</sup>。三枝法による変換を試みたが複雑な混合物を与え、望む化合物は得られなかった。次に、アルデヒドの  $\alpha$  位にフェニルセリル基の導入を試みたが、この場合も望む化合物は得られなかつ

た (Figure 2-26)。

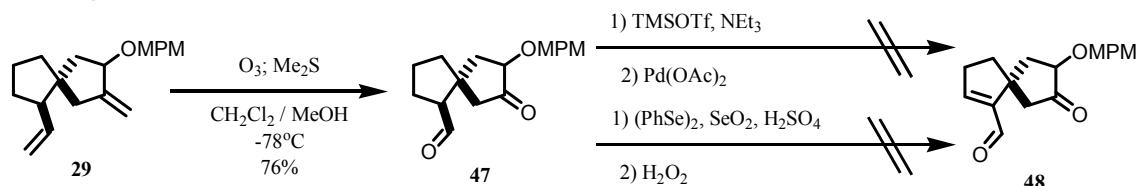


Figure 2-26

そこでアルデヒドを選択的に還元した後、 $\beta$ -脱離させることでエキソメチレンへと変換し、B環部を構築することを考えた。この場合、B環部を構築した段階でShaらの合成中間体となるため形式全合成が達成できたことになる<sup>11)</sup>。穏やかな還元剤である水素化トリ-*t*-ブトキシアルミニウムリチウムを作用させることでアルデヒドを選択的に1級アルコールとした後、トシル化を行いトシレート**50**を合成した<sup>12)</sup>。トシレート**50**に対し塩基を作用させることで $\beta$ -脱離を試みたが反応は進行しなかった。そこでトシレート**50**をフェニルセレニル基へと変換した後<sup>13)</sup>、セレノキシドへと酸化、シン脱離を起こさせる方法を試みた。フェニルセレニル化は収率良く進行したが、セレニドの酸化、脱離の際、過剰の過酸化水素を用いると脱離したセレネン酸が過酸となり、生じたエキソメチレンをエポキシ化することが観察された。脱離、エポキシ化とも0°Cにおいても進行してしまうため酸化剤の当量を調整することが重要であった。1級アルコールから直接セレニドへの変換も試みたが収率がやや低く、生成物を完全に単離することができなかつたため2段階の変換を選択した (Figure 2-27)。

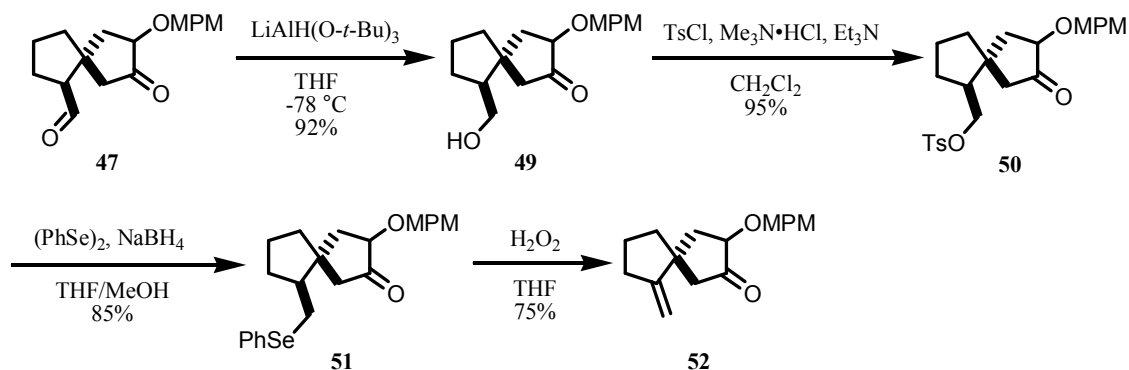


Figure 2-27

A環部を目的とするエキソメチレンへと変換することができたので、前節で確立した方法を用いてB環部の構築を行った。前節と同様の変換によりジケトン**53**へと導いた。ジケトン**53**はメソ体であり、エノール体**54**はラセミ体となるためこの段階で不斉炭素の立体化学は失われる。エノールをメチルエーテル化した後、Davis試薬を作用させることでヒドロキシル基の導入、異性化、メチルエーテル化によりB環部の構築を行い、Shaらの合成中間体**57**へと導くことに成功し、ジメチルグロイオシホンAの形式全合成を達成することがで

きた。各種スペクトルデータを比較したところ  $^1\text{H}$  NMR では全てのピークに関して 0.6 ppm 程度、 $^{13}\text{C}$  NMR では 0.1 ppm 程度の違いがあるが、これは基準ピークの設定の違いによるものと考えられ、文献値とよい一致を示していると言える<sup>11)</sup> (Figure 2-28、Table 2-3)。

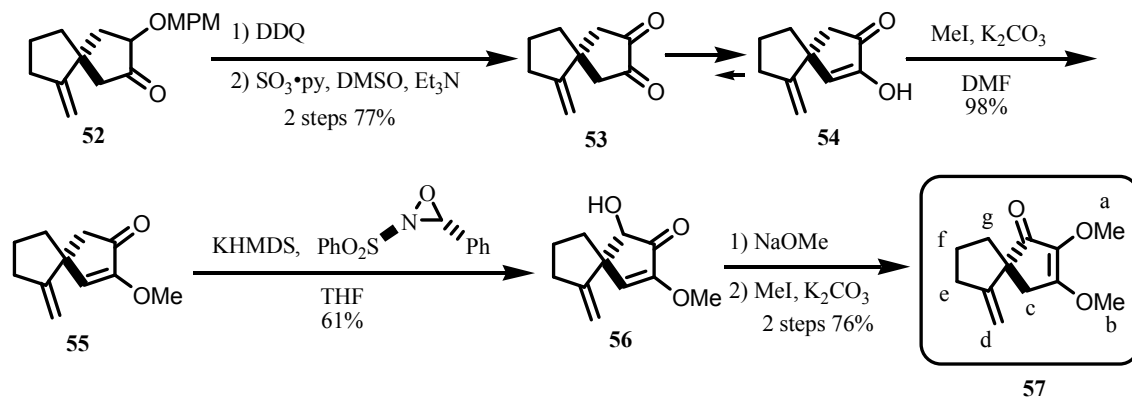


Figure 2-28

Table 2-3

$\delta_{\text{H}}$ [ppm]	実測値	文献値 <sup>11)</sup>
d	4.93 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H)	4.86 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H)
d	4.75 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H)	4.69 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H)
b	4.06 (s, 3H)	4.00 (s, 3H)
a	3.83 (s, 3H)	3.76 (s, 3H)
c	2.57 and 2.48 (AB quartet, $J = 16.9$ Hz, 2H)	2.52 and 2.42 (AB quartet, $J = 17.6$ Hz, 2H)
e	2.52-2.45 (m, 2H, e)	2.44-2.40 (m, 2H, e)
f	2.19-2.16 (m, 1H, f)	2.12-2.09 (m, 1H, f)
f	1.99-1.84 (m, 1H, f)	1.91-1.89 (m, 1H, f)
g	1.69-1.66 (m, 2H, g)	1.62-1.59 (m, 2H, g)
$\delta_{\text{C}}$ [ppm]	202.3, 170.0, 156.8, 134.3, 105.2, 59.3, 58.1, 54.5, 40.9, 38.2, 33.8, 24.1	202.2, 169.9, 156.7, 134.2, 105.1, 59.1, 57.9, 54.4, 40.8, 38.1, 33.7, 24.0
IR	2954, 1705, 1633, 1463, 1342, 1132	1703, 1630, 1460, 1431
MS	HRMS(ESI-TOF) calcd for [ $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_3 + \text{Na}$ ] <sup>+</sup> 231.0992 found 231.0991	MS(EI) calcd for [ $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_3$ ] <sup>+</sup> 208.11 found 208

中間体 **57** からは3工程でジメチルグロイオシホン A へと誘導できることが報告されている。そこでその手法により更なる変換を試みた。セレン酸化は中程度の収率で進行したが、続く四酸化オスmiumによるジオール化は低収率かつ単離、精製が困難であった。最終段階のメチル化は文献に報告されている条件ではまったく反応が進行しなかった。そこでジ

アズメタンを作用させたところ 3 級アルコールまでメチル化された化合物が得られた。これらの反応がうまく進行しない理由としては文献記載の条件に比べスケールが小さいことが原因であると考えられる。しかし、現在のところ必要十分量の供給は困難であるため **59** からの変換は保留している (Figure 2-29)。

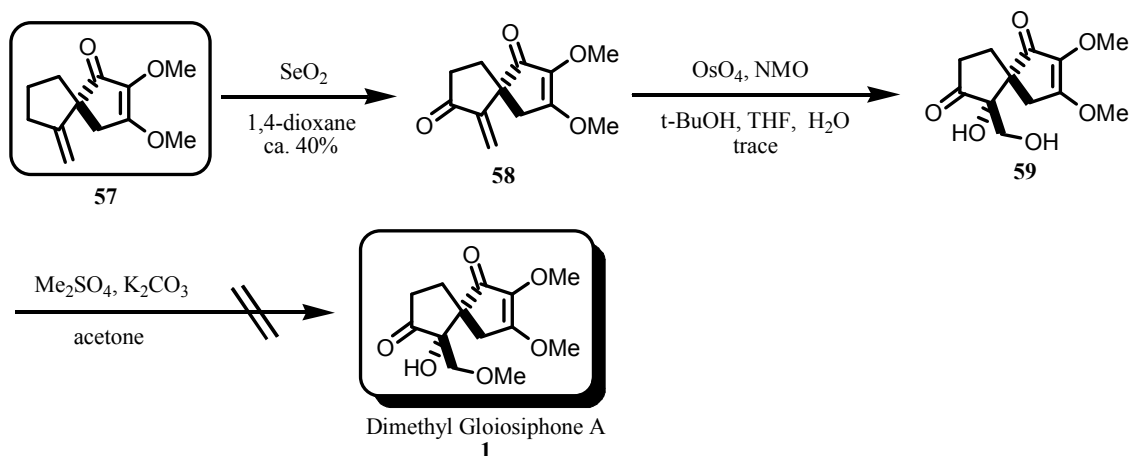


Figure 2- 29

## 2-8 まとめ

本章ではパラジウム錯体に対する分子内アルケン挿入反応によるスピロ環化反応を用いたジメチルグロイオシホン A の全合成研究について述べた。鍵反応であるスピロ環化反応では官能基変換の足がかりとなる酸素官能基を有する基質を用いたが、酸素官能基のないモデル体のときと同様の選択性で、炭素骨格に関しては立体選択的に構築することができた。

スピロ環化体からの官能基変換では  $\alpha$  位にカルボニル基を有するアルケンの酸化開裂が望む生成物を与えなかったため、アルケンをはじめに酸化開裂させるルートへと変更した。そこで選択的に B 環部のアルケンのみを酸化開裂させ、段階的に官能基変換を行っていくことによりジメチルグロイオシホン A の B 環部を有する基質を合成することに成功した。中間体の構造決定ではスピロ環骨格を有する化合物はプロトン間の相関が 4 級炭素により断ち切られており、さらに官能基化することでプロトン数自体が少なくなるため、通常の <sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR だけでは構造決定は不可能であった。そこで HMQC、HMBC 測定を行うことで全てのプロトン、カーボンに帰属をつけ炭素骨格のつながりを見ることにより構造決定を行うことができた。

その後の A 環部の変換が困難であったため、再度ルートを変更した。2つのアルケンに酸化開裂しアルデヒドをエキソメチレンとした後、B 環部を構築することで Sha らの合成中間体へと導きジメチルグロイオシホン A の形式全合成を達成した。

## Refererence

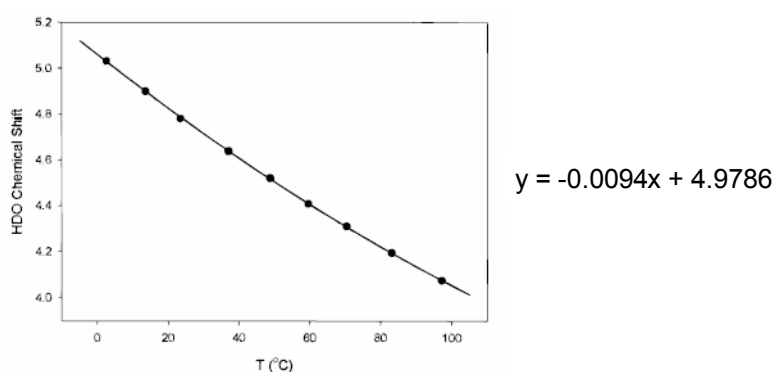
- 1) a) Villieras, J.; Rambaud, M. *Org. Synth.* **1988**, *66*, 220. b) Byun, H-S.; Reddy, K. C.; Bittman, R. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 1371.
- 2) Alami, N. E.; Belaud, C.; Villieras, J. *J. Organomet. Chem.* **1988**, *353*, 157.
- 3) Trost, B. M.; Shi, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9421.
- 4) Gómez-Bengoa, E.; Cuerva, J. M.; Echavarren, A. M.; Martorell, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 767.
- 5) Brown, A. C.; Carpino, L. A. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1749.
- 6) a) Davis, F. A.; Vishwakarma, L. C.; Billmers, J. M. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 3241. b) Vishwakarma, L. C.; Stringer, O. D.; Davis, F. A. *Org. Synth.* **1987**, *66*, 203.
- 7) Rubottom, G. M.; Gruber, J. M.; Juve, H. D. Jr.; Charleson, D. A. *Org. Synth.* **1986**, *64*, 118.
- 8) 日本化学会、”新実験科学講座 15” 丸善。
- 9) (a) Hashizume, Y.; Maki, S.; Ohashi, M.; Niwa, H. *Synlett*, **1998**, 1357. (b) Hashizume, Y.; Maki, S.; Ohashi, M.; Niwa, H. *Synth. Commun.* **1999**, *29*, 1223.
- 10) (a) Paquette, L. A.; Sturino, C. F.; Doussort, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9456. (b) Sturino, C. F.; Doussort, P.; Paquette, L. A. *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 8913.
- 11) (a) Sha, C.-K.; Ho, W.-Y. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 2709. (b) Sha, C.-K.; Ho, W.-Y. *J. Chin. Chem. Soc.* **1999**, *46*, 2709.
- 12) Yoshida, Y.; Sakakura, Y.; Aso, N.; Okada, S.; Tanabe, Y. *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 2183
- 13) Sharpless, K. B.; Lauer, R. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 2697.

## Experimental Section

### General Techniques

NMR spectra were recorded on a JEOL Model EX-270 (270 MHz for  $^1\text{H}$ , 67.8 MHz for  $^{13}\text{C}$ ), or a JEOL Model EP-400 (400 MHz for  $^1\text{H}$ , 100 MHz for  $^{13}\text{C}$ ) instrument in the indicated solvent. Chemical shifts are reported in units parts per million (ppm) relative to tetramethylsilane (0 ppm for  $^1\text{H}$ ) or solvent resonance (chloroform: 7.26 ppm for  $^1\text{H}$ , chloroform-*d*: 77.0 ppm for  $^{13}\text{C}$ , methanol: 3.30 ppm for  $^1\text{H}$ , methanol-*d*<sub>4</sub>: 49.3 ppm for  $^{13}\text{C}$ , HDO: 4.70 ppm at 30 °C for  $^1\text{H}$ , the chemical shift (ppm) of HDO depends on the temperature (°C), Figure 1) when internal standard is not indicated. Multiplicities are reported by using the following abbreviations:

s; singlet, d; doublet, t; triplet, q; quartet, m; multiplet, br; broad, *J*; coupling constants in Hertz



**Figure 1**

IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR spectrophotometer. Only the strongest and/or structurally important absorption are reported as the IR data given in  $\text{cm}^{-1}$ .

Optical rotations were measured with JASCO P-1020 Polarimeter.

All reactions were monitored by thin-layer chromatography carried out on 0.2 mm E. Merck silica gel plates (60F-254) with UV light, visualized by *p*-anisaldehyde solution or 10% ethanolic phosphomolybdic acid.

Merck silica gel was used for column chromatography.

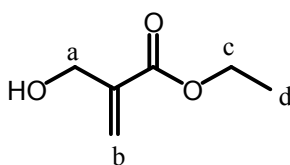
High performance liquid chromatography (HPLC) for qualitative and quantitative analyses were performed on a Nihon Seimitu Kagaku apparatus using a Senshu Pak Silica-3301-N column with a Japan Analytical Industry Model R1-3H refractive detector, or a Waters<sup>®</sup> 2695 Separation Module using a Senshu Pak Silica-3301-N column with Waters<sup>®</sup> 2996 Photodiode Array, Waters<sup>®</sup> 2414 Refractive Index Detector.

ESI-TOF Mass spectra were measured with AppliedBioSystems Mariner TK-3500 Biospectrometry Workstation mass spectrometers and Waters LCT Premier<sup>TM</sup> XE. HRMS(ESI-TOF) were calibrated with angiotensin I (SIGMA), bradykinin (SIGMA), and neurotensin (SIGMA) as an internal standard.

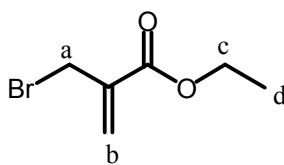
Gel permeation chromatography (GPC) for qualitative and quantitative analyses were performed on Japan Analytical Industry Model LC 905 (recycling preparative HPLC), on a Japan Analytical Industry Model RI-5 refractive index detector and on a Japan Analytical Industry Model 310 ultra violet detector with polystyrene gel column (JAIGEL-1H, 20 mm x 600 mm), using chloroform as solvent (3.5 mL/min).

Dry THF, dry hexane, dry diethyl ether, dry toluene were distilled from sodium wire contained with a catalytic amount of benzophenone. Dry dichloromethane was distilled from P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Dry pyridine, dry DMF, and dry acetonitrile were distilled from CaH<sub>2</sub>. Dry methanol and ethanol were distilled from magnesium contained with a catalytic amount of iodine.

**Ethyl 2-(hydroxymethyl)-2-propenoate (9).** To a solution of formalin (82 mL, 1.1 mol) and ethyl acrylate (**8**) (109 mL, 1.0 mol) in THF (100 mL) was added DABCO (11.3 g, 0.10 mol) and stirred at room temperature for 36 h. The reaction mixture was diluted with diethyl ether and brine. The aqueous layer was extracted with diethyl ether. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was distilled at 94 °C/4 mmHg to give ethyl 2-(hydroxymethyl)-2-propenoate (**9**) (34.5 g, 0.27 mol, 27%). <sup>1</sup>H NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.26 (s, 1H, b), 5.83 (s, 1H, b), 4.33 (brs, 2H, a), 4.25 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, c), 1.32 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, d); <sup>13</sup>C NMR (67.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.4, 139.5, 125.6, 62.7, 60.9, 14.2; IR (neat) 3428, 2985, 1715, 1640, 1307, 1270, 1178, 1157, 1058 (cm<sup>-1</sup>).

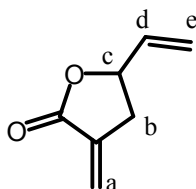


**Ethyl 2-(bromomethyl)-2-propenoate (10).** To a solution of ethyl 2-(hydroxymethyl)-2-propenoate (**9**) (35.8 g, 275 mmol) in dichloromethane (200 mL) was added PBr<sub>3</sub> (13.1 mL, 138 mmol) at 0 °C. The reaction mixture was quenched with brine. The aqueous layer was extracted with diethyl ether. The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was distilled at 89 °C/20 mmHg to give ethyl 2-(bromomethyl)-2-propenoate (**10**) (37.5 g, 194 mmol, 71%). <sup>1</sup>H NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.33 (d, 1H, *J* = 0.6 Hz, b), 5.95 (d, 1H, *J* = 0.6 Hz, b), 4.28 (q, 2H, *J* = 6.9 Hz, c), 4.19 (d, 2H, *J* = 0.6 Hz, a), 1.33 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz, d); <sup>13</sup>C NMR (67.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164.8, 137.5, 128.9, 61.3, 29.3, 14.1; IR (neat) 2983, 1724, 1330, 1187 (cm<sup>-1</sup>).



**2-Methylene-4-vinyl-4-butyrolactone (11).** To a suspension of zinc (activated with small amounts of dibromoethane, chlorotrimethylsilane) (7.85 g, 120 mmol) in THF (100 mL) was added 2-(bromomethyl)-2-propenoate (**10**) (11.6 g, 60 mmol) at 20 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, acrolein (6.0 mL, 90 mmol) was added at 0 °C dropwise. The reaction mixture was poured into 1 M HCl at 0 °C. The aqueous layer was extracted with diethyl ether. The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (17% ethyl acetate in hexane) to give 2-methylene-4-vinyl-4-butyrolactone (**11**) (4.94 g, 39.8 mmol, 66%). <sup>1</sup>H NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.25

(t, 1H,  $J = 2.6$  Hz, a), 5.83-5.95 (m, 1H, d), 5.66 (t, 1H,  $J = 2.6$  Hz, a), 5.25-5.41 (m, 2H, e), 4.97 (dd, 1H,  $J = 6.3, 7.6$  Hz, c), 3.11-3.22 (m, 1H, b), 2.66-2.77 (m, 1H, b);  $^{13}\text{C}$  NMR (67.8 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.0, 135.8, 133.9, 122.3, 117.7, 77.2, 33.7; IR (neat) 1766, 1276, 1119 ( $\text{cm}^{-1}$ ).



### 2-Methylene-5-hexene-1,4-diol (**12**).

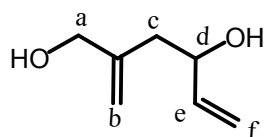
#### Route A

To a solution of 2-methylene-4-vinyl-4-butyrolactone (**11**) (13.0 g, 104 mmol) in dichloromethane (200 mL) was added DIBAL (1.0 M in toluene, 230 mL, 230 mmol) at  $-78$  °C and allowed to warm to room temperature. The reaction mixture was quenched with 10% aqueous potassium sodium tartrate solution and concentrated *in vacuo*. The mixture was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (30% ethyl acetate in hexane) to give 2-methylene-5-hexene-1,4-diol (**12**) (9.91 g, 77.3 mmol, 74%).

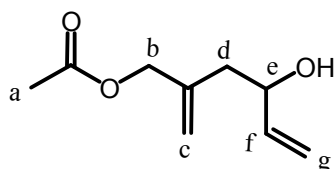
#### Route B

To a solution of TMEDA (27 mL, 0.226 mol) and *n*-butyllithium (2.44 M in hexane, 102 mL, 0.249 mol) in dry diethyl ether (300 mL) was added methallyl alcohol (**13**) (9.6 mL, 0.113 mol) at 0 °C. The reaction mixture was allowed to warm slowly to room temperature and stirred overnight. The solution was cooled to  $-78$  °C and acrolein (15.1 mL, 0.226 mol) was added dropwise. The reaction mixture was allowed to warm to 0 °C and quenched with 3 M HCl. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (30% ethyl acetate in hexane) or distilled at 114 °C/5.3 mmHg to give 2-methylene-5-hexene-1,4-diol (**12**) (4.26 g, 33.2 mmol, 29%).

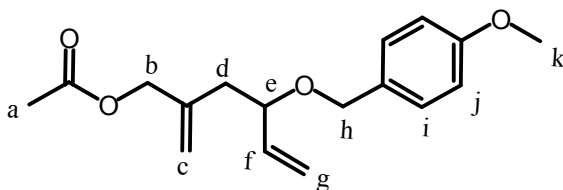
$^1\text{H}$  NMR (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.83-5.96 (m, 1H, e), 4.98-5.30 (m, 4H, b, f), 4.26 (m, 1H, d), 4.09 (s, 2H, a), 2.23-2.32 (m, 1H, c), 2.27-2.45 (m, 1H, c);  $^{13}\text{C}$  NMR (67.8 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  145.2, 140.3, 114.8, 114.7, 71.9, 66.2, 41.8; IR (neat) 3325, 2985, 2915, 1651, 1427, 1029, 922 ( $\text{cm}^{-1}$ ); HRMS(ESI-TOF) calcd for  $[\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_2 + \text{Na}]^+$  151.0735, found 151.0730.



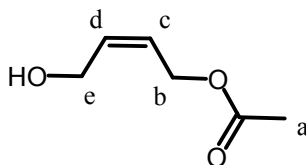
**4-Hydroxy-2-methylene-5-hexenyl acetate (14).** To a solution of 2-methylene-5-hexene-1,4-diol (**12**) (6.98 g, 54.5 mmol), DMAP (665 mg, 5.44 mmol), and triethylamine (15.1 mL, 108.8 mmol) in dichloromethane (150 mL) was added acetyl chloride (3.87 mL, 54.4 mmol) dropwise at  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . After being stirred at the same temperature, the reaction mixture was quenched with 1 M HCl at  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  solution and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (20% ethyl acetate in hexane) to give 4-hydroxy-2-methylene-5-hexenyl acetate (**14**) (6.66 g, 39.1 mmol, 72%).  $^1\text{H}$  NMR (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.82-5.95 (m, 1H, f), 5.06-5.31 (m, 4H, c, g), 4.57 (s, 2H, b), 4.28 (m, 1H, e), 2.23-2.44 (m, 2H, d);  $^{13}\text{C}$  NMR (67.8 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.6, 140.2, 140.1, 115.4, 114.7, 70.8, 66.6, 41.2, 20.7; IR (neat) 3445, 3085, 2984, 2940, 1733, 1652, 1435, 1375, 1237, 1031, 921 ( $\text{cm}^{-1}$ ); HRMS(ESI-TOF) calcd for  $[\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_3+\text{Na}]^+$  193.0841, found 193.0835.



**4-(4-Methoxybenzyloxy)-2-methylene-5-hexenyl acetate (5).** To a solution of 4-hydroxy-2-methylene-5-hexenyl acetate (**14**) (6.66 g, 39.1 mmol) and 4-methoxybenzyl 2,2,2-trichloroacetimidate (22.0 g, 78.2 mmol) in THF (120 mL) was added trifluoromethanesulfonic acid (10  $\mu\text{L}$ , 0.117 mmol) at  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . After being stirred at room temperature, the reaction mixture was quenched with 1 M HCl and stirred at room temperature. The aqueous layer was extracted with diethyl ether. The combined organic layers were washed with saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  solution and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated *in vacuo*. Addition of diethyl ether/hexane gave precipitation of trichloroacetamide. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (5% ethyl acetate in hexane) to give 4-(4-methoxybenzyloxy)-2-methylene-5-hexenyl acetate (**5**) (8.78 g, 30.2 mmol, 77%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.22-7.29 (m, 2H, i), 6.85-6.90 (m, 2H, j), 5.69-5.78 (m, 1H, f), 5.21-5.26 (m, 2H, g), 5.10 (s, 1H, c), 4.99 (s, 1H, c), 4.46-4.55 (m, 3H, b, h), 4.29 (d, 1H,  $J = 11.6$ , h), 3.89 (m, 1H, e), 3.80 (s, 3H, k), 2.39-2.45 (m, 1H, d), 2.25-2.30 (m, 1H, d), 2.07 (s, 3H, a);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.8, 159.2, 140.5, 138.4, 130.6, 129.4, 117.6, 114.9, 113.8, 79.0, 69.9, 67.1, 55.4, 39.8, 21.0; IR (neat) 1743, 1614, 1515, 1248, 1036, 822 ( $\text{cm}^{-1}$ ); HRMS(ESI-TOF) calcd for  $[\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_4+\text{Na}]^+$  313.1416, found 313.1410.



**4-Hydroxy-2-butenyl acetate (17).** To a solution of *cis*-2-butene-1,4-diol (**16**) (20.0 mL, 245 mmol), triethylamine (68.0 mL, 490 mmol), and DMAP (3.00 g, 24.5 mmol) in THF (250 mL) was added acetic anhydride (23.0 mL, 245 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature, the reaction mixture was quenched with 1 M HCl at 0 °C. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (30% ethyl acetate in hexane) to give 4-hydroxy-2-butenyl acetate (**17**) (13.3 g, 102 mmol, 42%). <sup>1</sup>H NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.81-5.90 (m, 1H, d), 5.58-5.67 (m, 1H, c), 4.67 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz, b), 4.25 (brs, 2H, e), 2.07 (s, 3H, a); <sup>13</sup>C NMR (67.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.1, 133.3, 125.4, 60.1, 58.3, 20.9; IR (neat) 3418, 1739, 1375, 1237, 1031 (cm<sup>-1</sup>).



#### 4-Bromo-2-butenyl acetate (7).

##### Route A

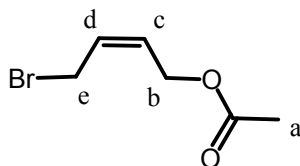
To a solution of 4-hydroxy-2-butenyl acetate (**17**) (4.82 g, 37.0 mmol) and triphenylphosphine (11.5 g, 44.0 mmol) in THF (150 mL) was added carbon tetrabromide (14.6 g, 44.0 mmol) at 0 °C. After being stirred at the same temperature for 10 min, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (10% ethyl acetate in hexane) to give 4-bromo-2-butenyl acetate (**7**) (6.17 g, 32.0 mmol, 86%).

##### Route B

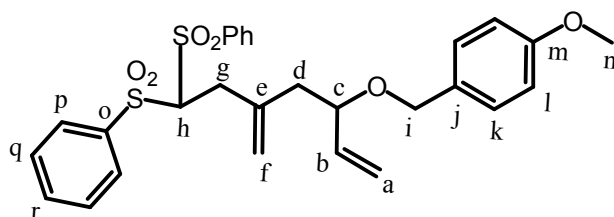
To a solution of 4-hydroxy-2-butenyl acetate (**17**) (21.8 g, 168mmol) in dichloromethane (150 mL) was added PBr<sub>3</sub> (8.0 mL, 83.8 mmol) at 0 °C. The reaction mixture was quenched with water. The aqueous layer was extracted with hexane. The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was distilled at 78 °C/6.0 mmHg to give ethyl 2-(bromomethyl)-2-propenoate (**7**) (27.3 g, 141 mmol, 84%).

<sup>1</sup>H NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.89-5.99 (m, 1H, d), 5.65-5.74 (m, 1H, c), 4.69 (dd, 2H, *J* = 6.6,

1.3 Hz, b), 4.02 (d, 2H,  $J = 8.2$  Hz, e), 2.08 (s, 3H, a);  $^{13}\text{C}$  NMR (67.8 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.6, 129.7, 128.1, 59.1, 25.6, 20.8; IR (neat) 1744, 1231, 1028, 969 ( $\text{cm}^{-1}$ ).



**5-(4-Methoxybenzyloxy)-3-methylene-1,1-di(phenylsulfonyl)-6-heptene (18).** To a suspension of sodium hydride (25 mg, 0.57 mmol, 55% washed with dry hexane) in THF (1 mL) was added bis(phenylsulfonyl)methane (**6**) (142 mg, 0.54 mmol) in THF (2 mL) at 0 °C. When gas evolution was complete, a solution of 4-(4-methoxybenzyloxy)-2-methylene-5-hexenyl acetate (**5**) (79.1 mg, 0.27 mmol), palladium acetate (6.1 mg, 0.027 mmol), and triphenylphosphine (71 mg, 0.27 mmol) in THF (4 mL) was added at room temperature and stirred at reflux for 3 h. The reaction mixture was poured into 1 M HCl at 0 °C. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  solution and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (20% ethyl acetate in hexane) to give 5-(4-methoxybenzyloxy)-3-methylene-1,1-di(phenylsulfonyl)-6-heptene (**18**) (119 mg, 0.225 mmol, 83%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.85-7.89 (m, 4H, p), 7.64-7.68 (m, 2H, r), 7.48-7.53 (m, 4H, q), 7.23-7.26 (m, 2H, k), 6.87-6.89 (m, 2H, l), 5.62-5.71 (m, 1H, b), 5.17-5.24 (dd, 2H,  $J = 17.4, 8.7$  Hz, a), 4.82-4.89 (m, 3H, f, h), 4.50 (d, 1H,  $J = 11.6$  Hz, i), 4.27 (d, 1H,  $J = 11.6$  Hz, i), 3.80-3.84 (m, 4H, c, n), 2.87-2.99 (m, 2H, g), 2.17-2.30 (m, 2H, d);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  159.2 (m), 140.2 (e), 138.13 (b), 138.07 (o), 138.01 (o'), 134.6 (r), 130.5 (j), 129.8 (k), 129.6 (p), 129.1 (q), 117.8 (a), 116.8 (f), 113.9 (l), 81.8 (h), 79.2 (c), 69.9 (i), 55.4 (n), 41.2 (d), 32.2 (g); IR (neat) 3070, 2913, 1646, 1613, 1585, 1514, 1448, 1331, 1248, 1156, 1080, 1034, 999, 930, 823, 784, 738, 687, 609, 563 ( $\text{cm}^{-1}$ ); HRMS(ESI-TOF) calcd for  $[\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_6\text{S}_2+\text{Na}]^+$  549.1381, found 549.1376.



**(E)-9-(4-Methoxybenzyloxy)-7-methylene-5,5-di(phenylsulfonyl)-2,10-undecadienyl acetate (4).**

#### Stepwise Procedure

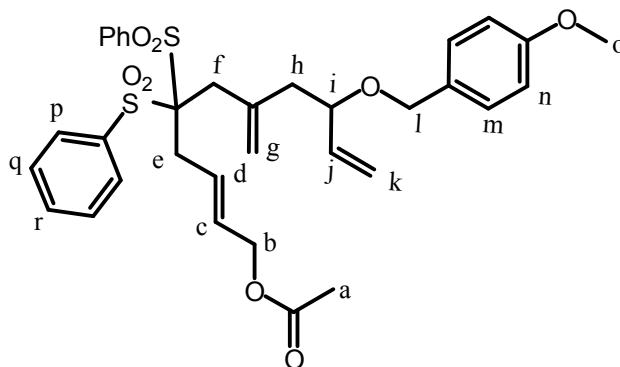
To a suspension of sodium hydride (661 mg, 15.2 mmol, 55%, washed with dry hexane) in THF

(10 mL) was added 5-(4-methoxybenzyloxy)-3-methylene-1,1-di(phenylsulfonyl)-6-heptene (**18**) (5.31 g, 10.1 mmol) in THF (10 mL) at room temperature. When gas evolution was complete, a solution of (*Z*)-4-bromo-2-butenyl acetate (**7**) (3.90 g, 20.2 mmol), palladium acetate (227 mg, 1.01 mmol), and triphenylphosphine (1.06 g, 4.04 mmol) in THF (20 mL) was added at room temperature and stirred at reflux for 1 h. The reaction mixture was poured into 1 M HCl at 0 °C. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (25% ethyl acetate in hexane) to give (*E*)-9-(4-methoxybenzyloxy)-7-methylene-5,5-di(phenylsulfonyl)-2,10-undecadienyl acetate (**4**) (6.13 g, 9.60 mmol, 95%).

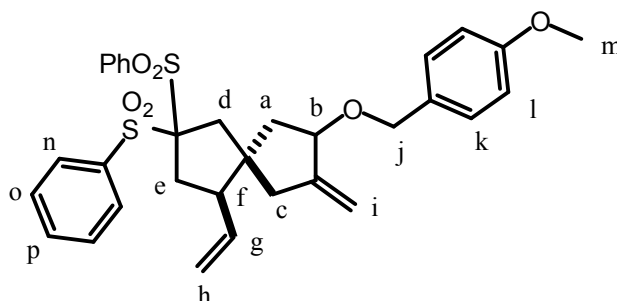
### One-pot procedure

To a suspension of sodium hydride (1.26 g, 28.9 mmol, 55%, washed with dry hexane) in THF (10 mL) was added bis(phenylsulfonyl)methane (**6**) (3.89 g, 13.1 mmol) in THF (10 mL) at 0 °C. When gas evolution was complete, a solution of 4-(4-methoxybenzyloxy)-2-methylene-5-hexenyl acetate (**5**) (1.91 g, 6.57 mmol), palladium acetate (148 mg, 0.657 mmol), and triphenylphosphine (689 mg, 2.63 mmol) in THF (20 mL) was added at room temperature and stirred at reflux for 3 h. A solution of (*Z*)-4-bromo-2-butenyl acetate (**7**) (4.19 g, 28.9 mmol), palladium acetate (148 mg, 0.657 mmol), and triphenylphosphine (689 mg, 2.63 mmol) in THF (20 mL) was added at room temperature and stirred at reflux for 1 h. The reaction mixture was poured into 1 M HCl at 0 °C. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (25% ethyl acetate in hexane) to give (*E*)-9-(4-methoxybenzyloxy)-7-methylene-5,5-di(phenylsulfonyl)-2,10-undecadienyl acetate (**4**) (3.11 g, 4.86 mmol, 74%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.96-8.00 (m, 4H, p), 7.65-7.69 (m, 2H, r), 7.49-7.54 (m, 4H, q), 7.20-7.22 (m, 2H, m), 6.86-6.88 (m, 2H, n), 5.86-5.94 (m, 1H, d), 5.65-5.73 (m, 2H, c, j), 5.17-5.21 (dd, *J* = 17.5, 10.2 Hz, k), 5.10 (s, 1H, g), 5.08 (s, 1H, g), 4.44-4.49 (m, 3H, b, l), 4.21 (d, 1H, *J* = 11.1 Hz, l), 3.80-3.88 (m, 4H, i, o), 3.12 (d, 2H, *J* = 6.3 Hz, e), 3.01 (s, 2H, f), 2.32-2.41 (m, 2H, h), 2.06 (s, 3H, a); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.8, 159.2, 138.4, 137.4, 137.3, 134.6, 131.8, 130.7, 129.4, 129.3, 128.6, 127.6, 120.7, 117.4, 113.8, 91.7, 79.6, 69.9, 64.5, 55.4, 43.9, 36.0, 33.4, 21.0; IR (neat) 1739, 1514, 1448, 1311, 1247, 1144, 1077, 725, 689, 572 (cm<sup>-1</sup>); HRMS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>34</sub>H<sub>38</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>+Na]<sup>+</sup> 661.1906, found 661.1900.



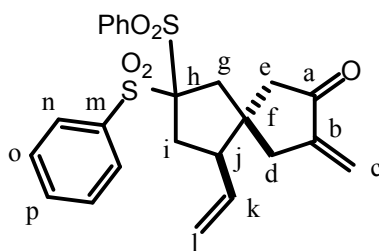
**7-(4-Methoxybenzyloxy)-8-methylene-3,3-di(phenylsulfonyl)-1-vinylspiro[4.4]nonane (3).** To a solution of (*E*)-9-(4-methoxybenzyloxy)-7-methylene-5,5-di(phenylsulfonyl)-2,10-undecadienyl acetate (**4**) (2.50 g, 3.92 mmol) in acetic acid (15 mL) was added palladium acetate (88 mg, 0.392 mmol) and triphenylphosphine (411 mg, 1.57 mmol) at room temperature. After being stirred at 90 °C for 2 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (7% ethyl acetate in toluene) to give 7-(4-methoxybenzyloxy)-8-methylene-3,3-di(phenylsulfonyl)-1-vinylspiro[4.4]nonane (**3**) (1.50 mg, 2.60 mmol, 66%, dr = 60 : 40). The diastereomers were separated by HPLC (20% ethyl acetate in hexane, 3.00 mL/min, RT = 19.5 min (minor isomer), 20.7 min (major isomer)). major isomer: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.02-8.06 (m, 4H, n), 7.69-7.72 (m, 2H, p), 7.56-7.59 (m, 4H, o), 7.19-7.22 (m, 2H, k), 6.84-6.87 (m, 2H, l), 5.57-5.66 (m, 1H, g), 4.98-5.09 (m, 4H, h, i), 4.47 (d, 1H, *J* = 11.1 Hz, j), 4.36 (d, 1H, *J* = 11.6 Hz, j), 4.09-4.13 (m, 1H, b), 3.81 (s, 3H, m), 2.77 (d, 1H, *J* = 16.4 Hz, d), 2.70 (d, 1H, *J* = 16.4 Hz, d), 2.46-2.63 (m, 5H, e, f, c), 2.26 (d, 1H, *J* = 16.9 Hz, c'), 1.90-1.95 (m, 1H, a), 1.78-1.82 (m, 1H, a); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159.0, 150.7, 137.0, 136.2, 135.3, 134.5, 134.4, 131.4, 131.3, 130.7, 129.1, 128.7, 128.6, 118.2, 113.8, 110.7, 93.0, 79.7, 69.9, 55.3, 51.9, 51.8, 45.3, 44.2, 38.5, 37.1; IR (neat) 1613, 1514, 1448, 1328, 1310, 1144, 1078 (cm<sup>-1</sup>); HRMS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>32</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>+Na]<sup>+</sup> 601.1694, found 601.1689.



**3-Methylene-7,7-di(phenylsulfonyl)-9-vinylspiro[4.4]nona-2-one (19).** To a solution of 7-(4-methoxybenzyloxy)-8-methylene-3,3-di(phenylsulfonyl)-1-vinylspiro[4.4]nonane (**3**) (685 mg, 1.18

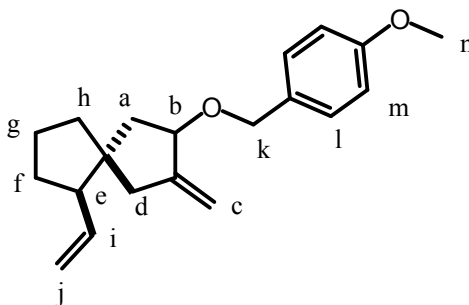
mmol) in dichloromethane (3.8 mL) and water (0.2 mL) was added DDQ (537 mg, 2.37 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature, the reaction mixture was diluted with diethyl ether and quenched with saturated aqueous NaHSO<sub>3</sub> solution and saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution. The aqueous layer was extracted with diethyl ether. The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The crude 2-hydroxy-3-methylene-7,7-di(phenylsulfonyl)-6-vinylspiro[4.4]nonane (399 mg, 0.869 mmol) was used in the next reaction without further purification.

To a solution of 2-hydroxy-3-methylene-7,7-di(phenylsulfonyl)-6-vinylspiro[4.4]nonane (399 mg, 0.869 mmol) and NMO (204 mg, 1.74 mmol) in dichloromethane (5 mL) was added TPAP (15 mg, 0.0435 mmol). After being stirred room temperature, the reaction mixture was directly subjected to silica gel chromatography (25% ethyl acetate in hexane) to give 3-methylene-7,7-di(phenylsulfonyl)-9-vinylspiro[4.4]nona-2-one (**19**) (196 mg, 0.429 mmol, 2 steps 36%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.02-8.09 (m, 4H, n), 7.73-7.76 (m, 2H, p), 7.60-7.65 (m, 4H, o), 5.99 (s, 1H, c), 5.53-5.62 (m, 1H, k), 5.34 (s, 1H, c), 5.02-5.12 (m, 2H, l), 2.53-2.82 (m, 7H, d, g, i, j), 2.39 (s, 2H, e); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 203.9 (a), 144.3 (b), 136.7 (m), 135.9 (m'), 135.0 (p), 134.9 (p'), 134.2 (k), 131.6 (n), 131.4 (n'), 129.0 (o), 128.9 (o'), 119.8 (l), 118.2 (c), 92.4 (h), 52.0 (j), 49.8 (e), 48.1 (f), 43.0 (g), 37.3 (d), 37.0 (i); IR (solid) 1727, 1638, 1447, 1309, 1143, 1075, 920, 731, 689, 552, 511, 483, 466 (cm<sup>-1</sup>).



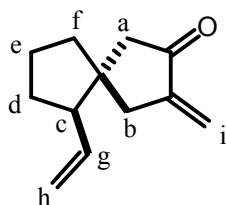
**2-(4-Methoxybenzyloxy)-3-methylene-6-vinylspiro[4.4]nonane (29).** Into dry methanol (100 mL) was placed activated magnesium turnings (washed with 0.1 M HCl, water, methanol, and diethyl ether and heated at 100°C) (1.25 g, 51.6 mmol) and stirred at 50 °C. When gas evolution was started, a solution of 7-(4-methoxybenzyloxy)-8-methylene-3,3-di(phenylsulfonyl)-1-vinylspiro[4.4]nonane (**3**) (1.20 g, 2.06 mmol) in THF (5 mL) was added at the same temperature and stirred for 3 h. The reaction mixture was quenched with 3M HCl at 0 °C. The aqueous layer was extracted with diethyl ether. The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (5% ethyl acetate in hexane) to give 2-(4-methoxybenzyloxy)-3-methylene-6-vinylspiro[4.4]nonane (**29**) (489 mg, 1.63 mmol, 79%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.25-7.28 (m, 2H, m), 6.86-6.88 (m, 2H, l), 5.72-5.78 (m, 1H, i), 4.95-5.12 (m, 4H, c, j), 4.44-4.48 (m, 2H, k), 4.16-4.24 (m, 1H, b), 3.79 (s, 3H, n), 1.25-2.36 (m, 11H, a, d, e, f, g, h); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159.1, 151.3, 139.7, 139.2, 131.1, 129.3, 115.7,

115.5, 113.8, 109.5, 109.2, 80.5, 79.7, 70.4, 70.2, 55.4, 53.3, 51.8, 51.3, 50.0, 43.3, 43.1, 40.8, 38.9, 38.2, 37.5, 30.1, 29.8, 21.8, 21.7; IR (neat) 3074, 2952, 1615, 1515 (cm<sup>-1</sup>).



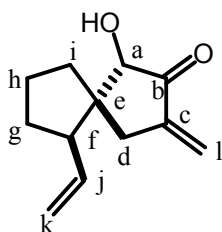
**3-Methylene-6-vinylspiro[4.4]nona-2-one (21).** To a solution of 2-(4-methoxybenzyloxy)-3-methylene-6-vinylspiro[4.4]nonane (**29**) (1.04 g, 3.49 mmol) in dichloromethane (19 mL) and water (1 mL) was added DDQ (1.19 g, 5.24 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature, the reaction mixture was diluted with diethyl ether and quenched with saturated aqueous NaHSO<sub>3</sub> solution and saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution. The aqueous layer was extracted with diethyl ether. The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The crude 2-hydroxy-3-methylene-6-vinylspiro[4.4]nonane (1.05 g, 5.88 mmol) was used in the next reaction without further purification.

To a solution of 2-hydroxy-3-methylene-6-vinylspiro[4.4]nonane (1.05 g, 5.88 mmol) and NMO (1.38 g, 11.8 mmol) in dichloromethane (20 mL) was added TPAP (207 mg, 0.588 mmol). After being stirred room temperature, the reaction mixture was directly subjected to silica gel chromatography (5% ethyl acetate in hexane) to give 3-methylene-6-vinylspiro[4.4]nona-2-one (**21**) (434 mg, 2.46 mmol, 2 steps 70%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.97 (s, 1H, i), 5.66-5.75 (m, 1H, g), 5.26 (s, 1H, i), 5.03-5.07 (m, 2H, h), 2.60 (d, 1H, *J* = 16.4 Hz, b), 2.21-2.44 (m, 4H, a, b, c), 1.48-1.95 (m, 6H, d, e, f); <sup>13</sup>C NMR (67.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 205.9, 145.0, 138.3, 117.0, 116.6, 52.1, 49.7, 47.7, 38.3, 36.5, 29.8, 21.4; IR (neat) 2956, 1730, 1643, 1404, 1260, 914 (cm<sup>-1</sup>).

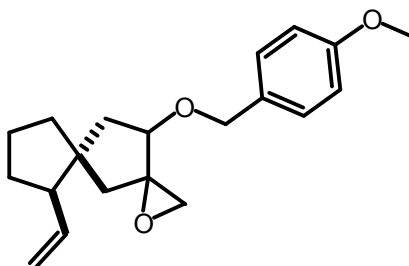


**1-Hydroxy-3-methylene-6-vinylspiro[4.4]nona-2-one (22).** To a solution of KHMDS (0.5 M in toluene, 634 μL, 0.317 mmol) in THF (1 mL) was added a solution of 3-methylene-6-vinylspiro[4.4]nona-2-one (**21**) (27.9 mg, 0.158 mmol) in THF (1 mL) at -78 °C and stirred for 1 h. To a solution of (±)-*trans*-2-(phenylsulfonyl)-3-phenyloxaziridine (124 mg, 0.474 mmol) in THF (1 mL) was

added the above enolate solution via cannula at  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . After being stirred at the same temperature for 1h, the reaction mixture was quenched with 1 M HCl at  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  solution and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (15% ethyl acetate in hexane) to give 1-hydroxy-3-methylene-6-vinylspiro[4.4]nona-2-one (**22**) (23.7 mg, 0.123 mmol, 78%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.13 (s, 1H, l), 5.70-5.79 (m, 1H, j), 5.37 (s, 1H, l), 5.11-5.15 (dd, 2H,  $J = 15.5, 11.1$  Hz, k), 4.09 (s, 1H, a), 2.59-2.66 (m, 1H, f), 2.26-2.43 (m, 2H, d), 1.91-1.96 (m, 1H, g), 1.53-1.79 (m, 4H, g, h, i), 1.11-1.16 (m, 1H, i);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  205.2 (b), 140.6 (c), 138.1 (j), 120.1 (l), 117.5 (k), 79.0 (a), 52.2 (e), 48.4 (f), 32.4 (d), 30.4 (g), 28.7 (i), 22.0 (h).

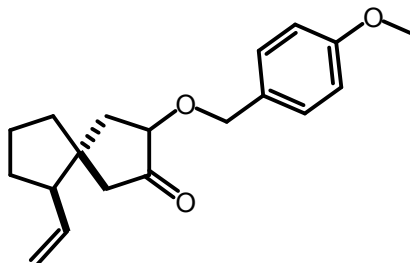


**11-(4-Methoxybenzyloxy)-6-vinyl-1-oxadispiro[2.1.4.2]undecane (32).** To a solution of 2-(4-methoxybenzyloxy)-3-methylene-6-vinylspiro[4.4]nonane (**29**) (151.8 mg, 0.509 mmol) in dichloromethane (1.5 mL) and saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  solution (3 mL) was added a solution of *m*-chloroperbenzoic acid (105 mg, 0.610 mmol) in dichloromethane (1.5 mL) dropwise at  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  and stirred for 2 h. The reaction mixture was diluted with diethyl ether. The aqueous layer was extracted with diethyl ether. The combined organic layers were washed with saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  solution and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated *in vacuo*. The crude 11-(4-methoxybenzyloxy)-6-vinyl-1-oxadispiro[2.1.4.2]undecane (**32**) (147 mg, 0.468mmol) was used in the next reaction without further purification.

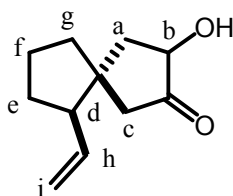


**3-(4-Methoxybenzyloxy)-6-vinylspiro[4.4]nona-2-one (33).** To a solution of 11-(4-methoxybenzyloxy)-6-vinyl-1-oxadispiro[2.1.4.2]undecane (**32**) (147 mg, 0.468mmol) in THF (1 mL) and water (3 mL) was added periodic acid dihydrate (11 mg, 0.0468 mmol) and sodium periodate (100 mg, 0.468 mmol) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 3 h, the

reaction mixture was quenched with saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  solution. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated *in vacuo*. The crude 3-(4-methoxybenzyloxy)-6-vinylspiro[4.4]nona-2-one (**33**) (159.1mg, 0.530 mmol) was used in the next reaction without further purification.

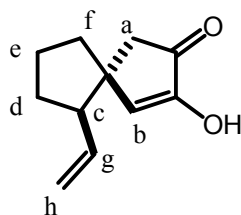


**3-Hydroxy-6-vinylspiro[4.4]nona-2-one (34).** To a solution of 3-(4-methoxybenzyloxy)-6-vinylspiro[4.4]nona-2-one (**33**) (159.1mg, 0.530 mmol) in dichloromethane (2.85 mL) and water (0.15 mL) was added DDQ (180 mg, 0.794 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature, the reaction mixture was diluted with diethyl ether and quenched with saturated aqueous  $\text{NaHSO}_3$  solution and saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  solution. The aqueous layer was extracted with diethyl ether. The combined organic layers were washed with saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  solution and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (20% ethyl acetate in hexane) to give 3-hydroxy-6-vinylspiro[4.4]nona-2-one (**34**) (32.7 mg, 0.181 mmol, 3 steps 36%, diastereomer mixture).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.61-5.72 (m, 1H, h), 5.02-5.13 (m, 2H, i), 4.19-4.29 (m, 1H, b), 1.44-2.48 (m, 11H, a, c, d, e, f, g); IR (neat) 3428, 3077, 2955, 1748, 1638, 1454, 1401, 1258, 1094, 914 ( $\text{cm}^{-1}$ ).

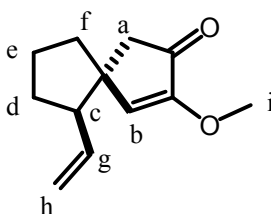


**2-Hydroxy-6-vinylspiro[4.4]non-1-en-3-one (36).** To a solution of 3-hydroxy-6-vinylspiro[4.4]nona-2-one (**34**) (22.8 mg, 0.126 mmol) and triethylamine (87  $\mu\text{L}$ , 0.630) in DMSO (1 mL) was added sulfur trioxide pyridine complex (60 mg, 0.379 mmol) in one portion at room temperature. After being stirred at the same temperature for 10 min, the reaction mixture was quenched with 1 M HCl at 0 °C. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (15% ethyl acetate in hexane) to give 2-hydroxy-6-vinylspiro[4.4]non-1-2-one (**36**) (21.6 mg, 0.121 mmol, 96%, diastereomer mixture).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.44 and 6.31 (s, 1H, a),

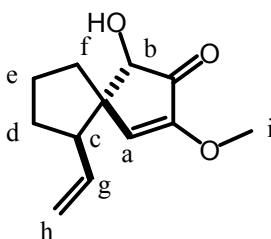
5.54-5.67 (m, 1H, g), 4.98-5.08 (m, 2H, h), 2.33-2.51 (m, 2H, b, c), 1.55-2.02 (m, 7H, b', d, e, f); IR (neat) 3347, 2957, 2874, 1699, 1651, 1626, 1394, 1199, 1112, 915 (cm<sup>-1</sup>).



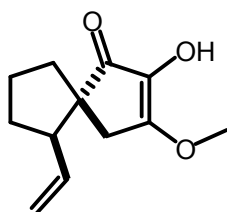
**2-Methoxy-6-vinylspiro[4.4]non-1-en-2-one (37).** 2-Hydroxy-6-vinylspiro[4.4]non-1-en-2-one (**36**) (39.8 mg, 0.233 mmol) was diluted with diethyl ether and added a small amount of silica gel. The mixture was treated with excess diazomethane in diethyl ether. The solution was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (15% ethyl acetate in hexane) to give 2-methoxy-6-vinylspiro[4.4]non-1-en-2-one (**37**) (44.2 mg, 0.233 mmol, quant., diastereomer mixture). <sup>1</sup>H NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.23 and 6.12 (s, 1H, a), 5.50-5.69 (m, 1H, g), 4.98-5.09 (m, 2H, h), 3.73 and 3.71 (s, 3H, i), 2.31-2.49 (m, 2H, b, c), 1.58-2.02 (m, 7H, b', d, e, f); IR (neat) 2956, 2873, 1719, 1625, 1125 (cm<sup>-1</sup>).



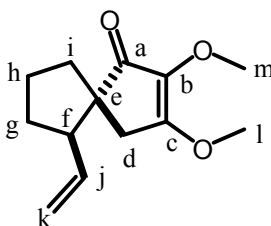
**4-Hydroxy-2-methoxy-6-vinylspiro[4.4]non-1-en-2-one (46).** To a solution of KHMDS (0.5 M in toluene, 669 μL, 0.334 mmol) in THF (0.5 mL) was added a solution of 2-methoxy-6-vinylspiro[4.4]non-1-en-2-one (**37**) (44.2 mg, 0.223 mmol) in THF (0.5 mL) at -78 °C and stirred 1 h. To the reaction mixture was added a solution of (±)-*trans*-2-(phenylsulfonyl)-3-phenyloxaziridine (175 mg, 0.669 mmol) in THF (0.5 mL) at -78 °C and allowed to warm to room temperature slowly. The reaction mixture was quenched with 1 M HCl at 0 °C. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (20% ethyl acetate in hexane) to give 4-hydroxy-2-methoxy-6-vinylspiro[4.4]non-1-en-2-one (**46**) (32.4 mg, 0.156 mmol, 70%, diastereomer mixture). major isomer: <sup>1</sup>H NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.14 (s, 1H, a), 5.74-5.87 (m, 1H, g), 5.07-5.14 (m, 2H, h), 4.00 (s, 1H, b), 3.73 (s, 3H, i), 2.46-2.56 (m, 1H, c), 1.57-2.01 (m, 6H, d, e, f); <sup>13</sup>C NMR (67.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 202.3, 154.1, 136.9, 132.1, 117.1, 74.5, 56.8, 54.5, 52.4, 34.4, 30.0, 22.1; IR (neat) 3445, 2958, 1716, 1621, 1454, 1355, 1069 (cm<sup>-1</sup>).



**2-Hydroxy-3-methoxy-6-vinylspiro[4.4]non-2-en-1-one (44).** To a solution of 4-hydroxy-2-methoxy-6-vinylspiro[4.4]non-1-en-2-one (**46**) (32.4 mg, 0.156 mmol) in THF (0.5 mL) and methanol (0.5 mL) was added sodium methoxide (8.4 mg, 0.156 mmol). After being stirred for 1 h at room temperature, the reaction mixture was quenched with 1 M HCl at 0 °C. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The crude 2-hydroxy-3-methoxy-6-vinylspiro[4.4]non-2-en-1-one (**44**) was used in the next reaction without further purification.

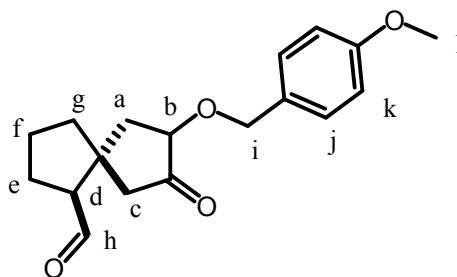


**2,3-Dimethoxy-6-vinylspiro[4.4]non-2-en-1-one (45).** The crude 2-hydroxy-3-methoxy-6-vinylspiro[4.4]non-2-en-1-one (**44**) was diluted with diethyl ether and treated with excess diazomethane in diethyl ether. The solution was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (15% ethyl acetate in hexane) to give 2,3-dimethoxy-6-vinylspiro[4.4]non-2-en-1-one (**45**) (major isomer 9.6 mg, minor isomer 5.7 mg, total 0.0688 mmol, 2 steps 44%). major isomer: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.64-5.73 (m, 1H, j), 4.94-5.06 (m, 2H, k), 4.02 (s, 3H, l), 3.77 (s, 3H, m), 2.34-2.48 (m, 3H, d, f), 1.64-2.06 (m, 6H, g, h, i); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 203.9 (a), 169.3 (c), 137.9 (j), 134.5 (b), 115.9 (k), 59.6 (m), 58.1 (l), 55.8 (f), 54.1 (e), 36.9 (d), 36.5 (i), 31.5 (g), 23.4 (h); IR (neat) 2957, 1738, 1633, 1462, 1342, 1259, 1102, 801 (cm<sup>-1</sup>).

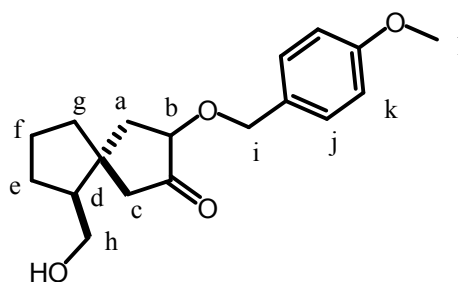


**3-(4-Methoxybenzyloxy)-6-formylspiro[4.4]nona-2-one (47).** Ozone was bubbled through a

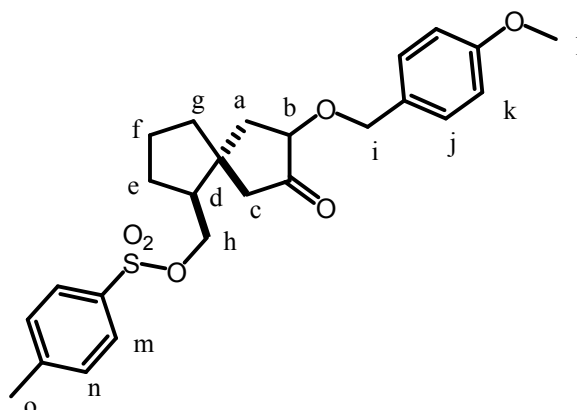
solution of 2-(4-methoxybenzyloxy)-3-methylene-6-vinylspiro[4.4]nonane (**29**) (230 mg, 0.770 mmol) in dichloromethane (2 mL) and methanol (2 mL) at  $-78^{\circ}\text{C}$ . The solution was purged of excess ozone by bubbling nitrogen through it, and the ozonide was reduced by addition of dimethyl sulfide (225  $\mu\text{L}$ , 3.08 mmol) at  $-78^{\circ}\text{C}$ . The reaction mixture was allowed to warm to room temperature slowly and diluted with diethyl ether. The organic layer was washed with 1 M HCl and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (20% ethyl acetate in hexane) to give 3-(4-methoxybenzyloxy)-6-formylspiro[4.4]nona-2-one (**47**) (177 mg, 0.586 mmol, 76%, diastereomer mixture).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.73 and 9.67 (s, 1H, h), 7.27-7.31 (m, 2H, j), 6.87-6.90 (m, 2H, k), 4.79-4.82 (m, 1H, i), 4.56-4.62 (m, 1H, i), 3.90-3.95 (m, 1H, b), 3.811 and 3.809 (s, 3H, l), 2.54-2.68 (m, 1H, d), 2.42-2.49 (m, 1H, c), 1.60-2.31 (m, 9H, a, c, e, f, g); IR (neat) 2957, 2873, 2838, 2729, 1747, 1714, 1613, 1586, 1515, 1463, 1455, 1399, 1303, 1248, 1174, 1112, 1034, 821, 757 ( $\text{cm}^{-1}$ )



**3-(4-Methoxybenzyloxy)-6-hydroxymethylspiro[4.4]nona-2-one (49).** To a solution of 3-(4-methoxybenzyloxy)-6-formylspiro[4.4]nona-2-one (**47**) (1.80 g, 5.95 mmol) in THF (25 mL) was added  $\text{LiAl}(\text{O}t\text{-Bu})_3\text{H}$  (0.5 M in diglyme, 13.1 mL, 6.55 mmol) at  $-78^{\circ}\text{C}$ . The reaction mixture was quenched with 10% aqueous potassium sodium tartrate solution at  $-78^{\circ}\text{C}$ . The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (30% ethyl acetate in hexane) to give 3-(4-methoxybenzyloxy)-6-hydroxymethylspiro[4.4]nona-2-one (**49**) (1.67 g, 5.50 mmol, 92%, diastereomer mixture). major isomer  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.30-7.27 (m, 2H, j), 6.88 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, k), 4.78 (d,  $J = 11.1$  Hz, 1H, i), 4.61 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1H, i), 3.91 (dd,  $J = 9.2, 8.7$  Hz, 1H, b), 3.80 (s, 3H, l), 3.68 (dd,  $J = 10.6, 6.8$  Hz 1H, h), 3.59 (dd,  $J = 10.6, 6.3$  Hz 1H, h), 2.43 (d,  $J = 17.8$  Hz, 1H, c), 2.18-1.87 (m, 5H, a, c, d, f), 1.69-1.57 (m, 4H, e, f, g), 1.37-1.32 (m, 1H, e);  $^{13}\text{C}$  NMR (67.8 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  216.2, 159.4, 129.7, 129.6, 113.8, 78.9, 72.0, 63.7, 55.3, 49.5, 44.1, 43.5, 41.5, 40.5, 27.7, 22.0; IR (neat) 3463, 2951, 1744, 1612, 1586, 1513, 1466, 1399, 1302, 1248, 1174, 1034, 822, 754, 518 ( $\text{cm}^{-1}$ ); HRMS (ESI-TOF) calcd for  $[\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_4+\text{Na}]^+$  327.1567, found 327.1564.

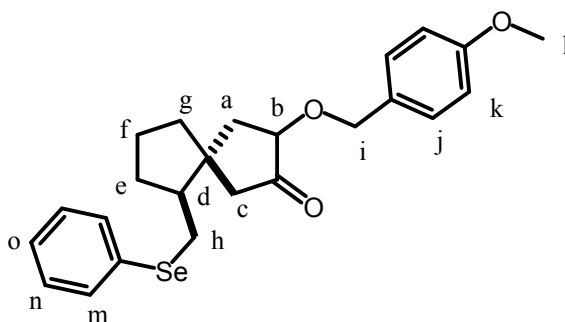


**3-(4-Methoxybenzyloxy)-6-(*p*-toluenesulfonyloxymethyl)spiro[4.4]nonan-2-one (50).** To a solution of 3-(4-methoxybenzyloxy)-6-(hydroxymethyl)spiro[4.4]nonan-2-one (**49**) (175 mg, 0.569 mmol), trimethylamine hydrochloride (5 mg, 0.0569 mmol), and triethylamine (0.16 mL, 1.14 mmol) in dichloromethane (3 mL) was added *p*-toluenesulfonyl chloride (163 mg, 0.853 mmol) at 0 °C. After being stirred at the same temperature for 30 min, the reaction mixture was quenched with 1 M HCl. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (15% ethyl acetate in hexane) to give 3-(4-methoxybenzyloxy)-6-(*p*-toluenesulfonyloxymethyl)spiro[4.4]nonan-2-one (**50**) (247 mg, 0.539 mmol, 95%, diastereomer mixture). major isomer: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.76 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, m), 7.36-7.26 (m, 4H, j, n), 6.87 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, k), 4.75 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, i), 4.58 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, i), 4.01-3.80 (m, 6H, b, h, l), 2.44 (s, 3H, o), 2.23-1.24 (m, 11H, a, c, d, e, f, g); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 215.0, 159.4, 145.0, 132.7, 130.0, 129.6, 127.9, 113.9, 78.6, 72.0, 70.7, 55.3, 46.1, 44.0, 43.3, 41.3, 39.7, 27.6, 21.8, 21.6; IR (neat) 2957, 1749, 1613, 1598, 1515, 1464, 1361, 1249, 1176, 1097, 955, 817, 667, 555 (cm<sup>-1</sup>). HRMS (ESI-TOF) calcd for [C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>O<sub>6</sub>S+Na]<sup>+</sup> 481.1655, found 481.1656.

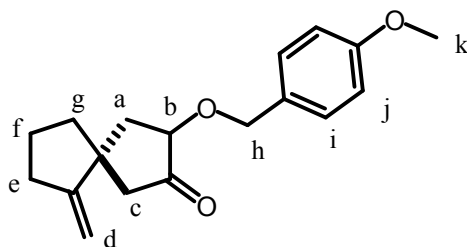


**3-(4-Methoxybenzyloxy)-6-phenylselenenylmethylspiro[4.4]nonan-2-one (51).** To a solution of diphenyl diselenide (27 mg, 0.0876 mmol) in THF (1 mL) and methanol (1 mL) was added sodium borohydride (6.6 mg, 0.175 mmol) at 0 °C. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 30 min. A solution of 3-(4-methoxybenzyloxy)-6-

(*p*-toluenesulfonyloxymethyl)spiro[4.4]nonan-2-one (**50**) (57.4 mg, 0.125 mmol) in THF (1 mL) was added and stirred at reflux. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate and washed with water, brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (20% ethyl acetate in hexane) to give 3-(4-methoxybenzyloxy)-6-(phenylselenenylmethyl)-spiro[4.4]nonan-2-one (**51**) (47 mg, 0.106 mmol, 85%, diastereomer mixture). <sup>1</sup>H NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.31-8.27 (m, 1H, o), 7.54-7.26 (m, 6H, j, m, n), 6.90-6.85 (m, 2H, k), 4.86-4.57 (m, 2H, i), 4.02-3.82 (m, 1H, b), 3.80 and 3.79 (s, 3H, l), 3.13-3.08 (m, 0.5H, h), 2.94-2.88 (m, 0.5H, h), 2.64-2.53 (m, 1H, h), 2.45-1.45 (m, 11H, a, c, d, e, f, g); IR (neat) 2953, 1752, 1611, 1578, 1512, 1477, 1247, 1033, 819, 736, 692, 670, 551, 463 (cm<sup>-1</sup>).

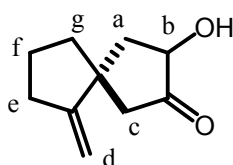


**3-(4-Methoxybenzyloxy)-6-methylenespiro[4.4]nona-2-one (52).** To a solution of 3-(4-methoxybenzyloxy)-6-(phenylselenenylmethyl)spiro[4.4]nona-2-one (**51**) (390 mg, 0.879 mmol) in THF (5 mL) was added hydrogen peroxide (107 μL, 1.06 mmol) at 0 °C. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 1 h. The reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (20% ethyl acetate in hexane) to give 3-(4-methoxybenzyloxy)-6-methylenespiro[4.4]nonan-2-one (**52**) (190 mg, 0.663 mmol, 75%, diastereomer mixture). <sup>1</sup>H NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.32-7.26 (m, 2H, i), 6.91-6.84 (m, 2H, j), 4.99-4.77 (m, 3H, d, h), 4.66-4.55 (m, 1H, h), 4.08-3.94 (m, 1H, b), 3.80 (s, 3H, k), 2.49-2.18 (m, 4H, c, e), 2.04-1.56 (m, 6H, a, f, g); IR (neat) 3070, 2956, 1748, 1651, 1613, 1586, 1515, 1465, 1398, 1302, 1248, 1174, 1112, 1036, 881, 821 (cm<sup>-1</sup>).

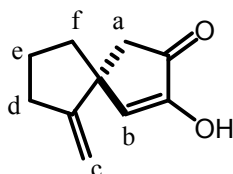


**3-Hydroxy-6-methylenespiro[4.4]nona-2-one.** To a solution of 3-(4-methoxybenzyloxy)-6-methylenespiro[4.4]nonan-2-one (**52**) (215 mg, 0.751 mmol) in dichloromethane (3.3 mL) and water

(0.18 mL) was added DDQ (256 mg, 1.13 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature, the reaction mixture was diluted with diethyl ether and quenched with saturated aqueous NaHSO<sub>3</sub> solution and saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution. The aqueous layer was extracted with diethyl ether. The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (20% ethyl acetate in hexane) to give 3-hydroxy-6-methylenespiro[4.4]nonan-2-one (100 mg, 0.602 mmol, 80%, diastereomer mixture). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.00 (m, 1H, d), 4.90 (m, 1H, d), 4.26 (t, *J* = 10.2 Hz, 1H, b), 2.67-2.24 (m, 4H, c, e), 1.89-1.57 (m, 6H, a, f, g); IR (neat) 3416, 3071, 2956, 2870, 1748, 1651, 1450, 1434, 1399, 1098, 882 (cm<sup>-1</sup>).

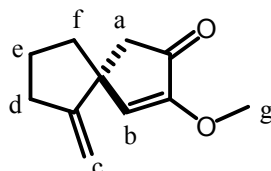


**2-Hydroxy-6-methylenespiro[4.4]non-1-en-3-one (54).** To a solution of 3-hydroxy-6-vinylspiro[4.4]nona-2-one (22.8 mg, 0.126 mmol) and triethylamine (87 μL, 0.630) in DMSO (1 mL) was added sulfur trioxide pyridine complex (60 mg, 0.379 mmol) in one portion at room temperature. After being stirred at the same temperature for 10 min, the reaction mixture was quenched with 1 M HCl at 0 °C. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (15% ethyl acetate in hexane) to give 2-hydroxy-6-methylenespiro[4.4]non-1-en-3-one (**54**) (21.6 mg, 0.121 mmol, 96%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.30 (s, 1H, b), 5.60 (s, 1H, OH), 4.89 (t, *J* = 1.9, 1H, c), 4.76 (t, *J* = 2.4, 1H, c), 2.58-2.35 (m, 4H, a, d), 1.89-1.69 (m, 4H, e, f); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 204.1, 157.4, 151.1, 136.1, 106.1, 49.3, 48.8, 40.7, 32.2, 23.4; IR (neat) 3344, 2955, 2871, 1702, 1655, 1625, 1401, 1256, 1201, 1108, 887 (cm<sup>-1</sup>); HRMS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>+Na]<sup>+</sup> 187.0730, found 187.0725.

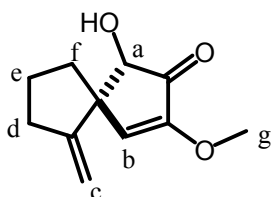


**2-Methoxy-6-methylenespiro[4.4]non-1-en-3-one (55).** To a solution of 2-hydroxy-6-methylenespiro[4.4]non-1-en-3-one (**54**) (23 mg, 0.139 mmol) in DMF (0.7 mL) was added potassium carbonate (23 mg, 0.167 mmol) and methyl iodide (13 μL, 0.209 mmol) at room temperature. After being stirred for 2 h, reaction mixture was quenched with 1 M HCl at 0 °C. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and

concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (20% ethyl acetate in hexane) to give 2-methoxy-6-methylenespiro[4.4]non-1-en-3-one (**55**) (24.3 mg, 0.136 mmol, 98%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.13 (s, 1H, b), 4.89 (s, 1H, c), 4.76 (s, 1H, c), 3.75 (s, 3H, g), 2.58-2.34 (m, 4H, a, d), 1.85-1.69 (m, 4H, e, f); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 202.2, 157.9, 155.7, 133.3, 105.8, 57.0, 49.7, 49.0, 41.1, 32.1, 23.3; IR (neat) 3071, 2955, 1720, 1650, 1625, 1453, 1405, 1347, 1290, 1221, 1121, 986, 885 (cm<sup>-1</sup>); HRMS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>+Na]<sup>+</sup> 201.0886, found 201.0884.



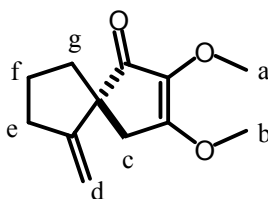
**1-Hydroxy-3-methoxy-6-methylenespiro[4.4]non-3-en-2-one (56).** To a solution of KHMDS (0.5 M in toluene, 1.56 mL, 0.779 mmol) in THF (0.5 mL) was added a solution of 3-methoxy-6-methylenespiro[4.4]non-3-en-2-one (**55**) (92.5 mg, 0.519 mmol) in THF (1 mL) at -78 °C and stirred 1 h. To the reaction mixture was added a solution of (±)-*trans*-2-(phenylsulfonyl)-3-phenyloxaziridine (272 mg, 1.04 mmol) in THF (1 mL) at -78 °C. The mixture was gradually allowed to warm to room temperature. The reaction mixture was quenched with 1 M HCl at 0 °C. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (20% ethyl acetate in hexane) to give 1-hydroxy-3-methoxy-6-methylenespiro[4.4]non-3-en-2-one (**56**) (61.2 mg, 0.315 mmol, 61%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.10 (s, 1H, b), 5.07 (1H, c), 4.83 (t, *J* = 2.4, 1H, c), 4.09 (s, 1H, a), 3.74 (s, 3H, g), 2.89 (brs, 1H, OH), 2.59-2.40 (m, 2H, d), 2.13-2.07 (m, 1H, e), 1.91-1.59 (m, 3H, e, f); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 202.3, 170.0, 156.8, 134.3, 105.2, 59.3, 58.1, 54.5, 40.9, 38.2, 33.8, 24.1; IR (neat) 3430, 2957, 1722, 1620, 1453, 1354, 1081, 1066 (cm<sup>-1</sup>); HRMS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>+Na]<sup>+</sup> 217.0835, found 217.0835.



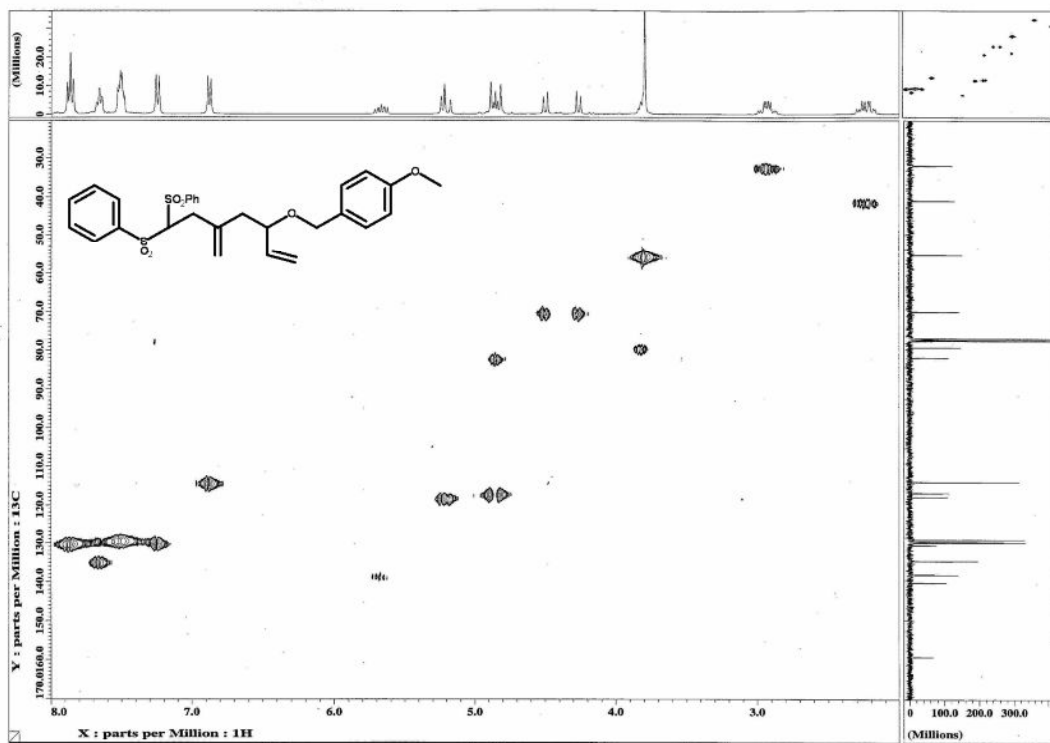
**2,3-Dimethoxy-6-methylenespiro[4.4]non-2-en-1-one (57).** To a solution of 4-hydroxy-2-methoxy-6-methylenespiro[4.4]non-1-en-2-one (**56**) (32.4 mg, 0.156 mmol) in THF (0.5 mL) and methanol (0.5 mL) was added sodium methoxide (8.4 mg, 0.156 mmol). After being stirred for 1 h at room temperature, the reaction mixture was quenched with 1 M HCl at 0 °C. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>,

and concentrated *in vacuo*. The crude 2-hydroxy-3-methoxy-6-methylenespiro[4.4]non-2-en-1-one was used in the next reaction without further purification.

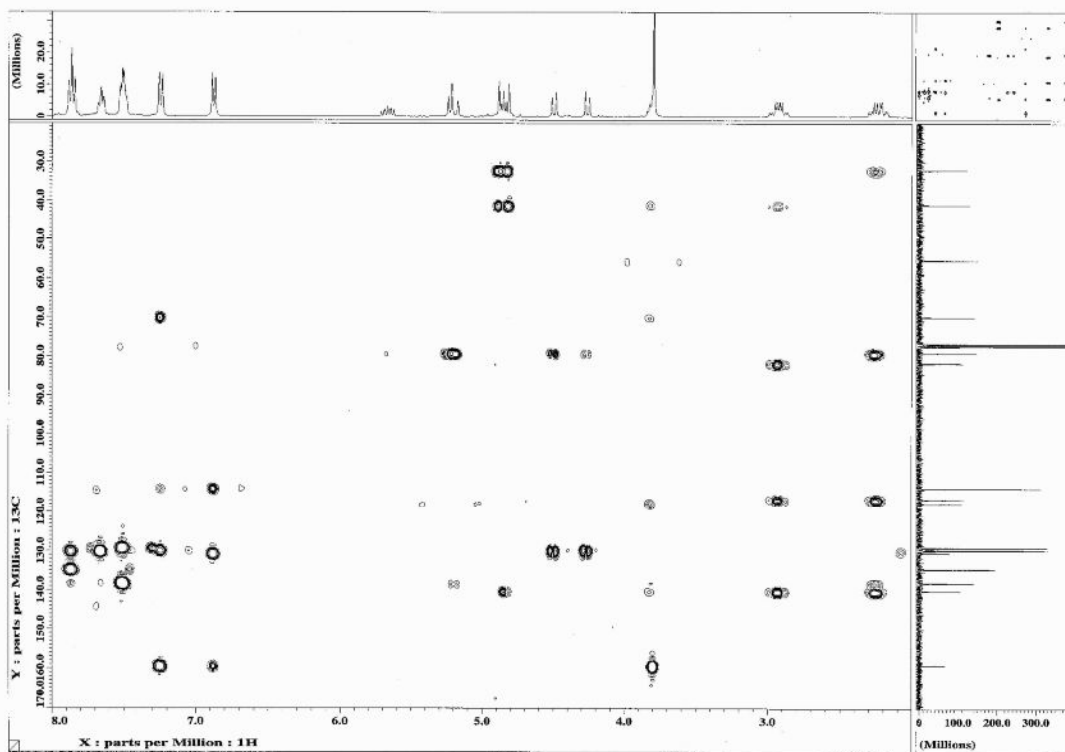
The crude 2-hydroxy-3-methoxy-6-methylenespiro[4.4]non-2-en-1-one was diluted with diethyl ether and treated with excess diazomethane in diethyl ether. The solution was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (15% ethyl acetate in hexane) to give 2,3-dimethoxy-6-methylenespiro[4.4]non-2-en-1-one (**57**) (11.7 mg, 0.0562 mmol, 2 steps 76%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.93 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, d), 4.75 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, d), 4.06 (s, 3H, b), 3.83 (s, 3H, a), 2.60-2.45 (m, 4H, c, e), 2.19-2.16 (m, 1H, f), 1.99-1.84 (m, 1H, f), 1.69-1.66 (m, 2H, g); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 202.3, 170.0, 156.8, 134.3, 105.2, 59.3, 58.1, 54.5, 40.9, 38.2, 33.8, 24.1; IR (neat) 2954, 1705, 1633, 1463, 1342, 1132 (cm<sup>-1</sup>); HRMS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>+Na]<sup>+</sup> 231.0992, found 231.0991. [lit.<sup>a</sup> <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.86 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 4.69 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 2.52 and 2.42 (AB quartet, *J* = 17.6 Hz, 2H), 2.44-2.40 (m, 2H), 2.12-2.09 (m, 1H), 1.91-1.89 (m, 1H), 1.62-1.59 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 202.2, 169.9, 156.7, 134.2, 105.1, 59.1, 57.9, 54.4, 40.8, 38.1, 33.7, 24.0; IR (neat) 1703, 1630, 1460, 1431 (cm<sup>-1</sup>); MS(EI) calcd for [C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 208.11, found 208.]



<sup>a</sup> Sha, C.-K.; Ho, W.-Y. *J. Chin. Chem. Soc.* **1999**, *46*, 2709.



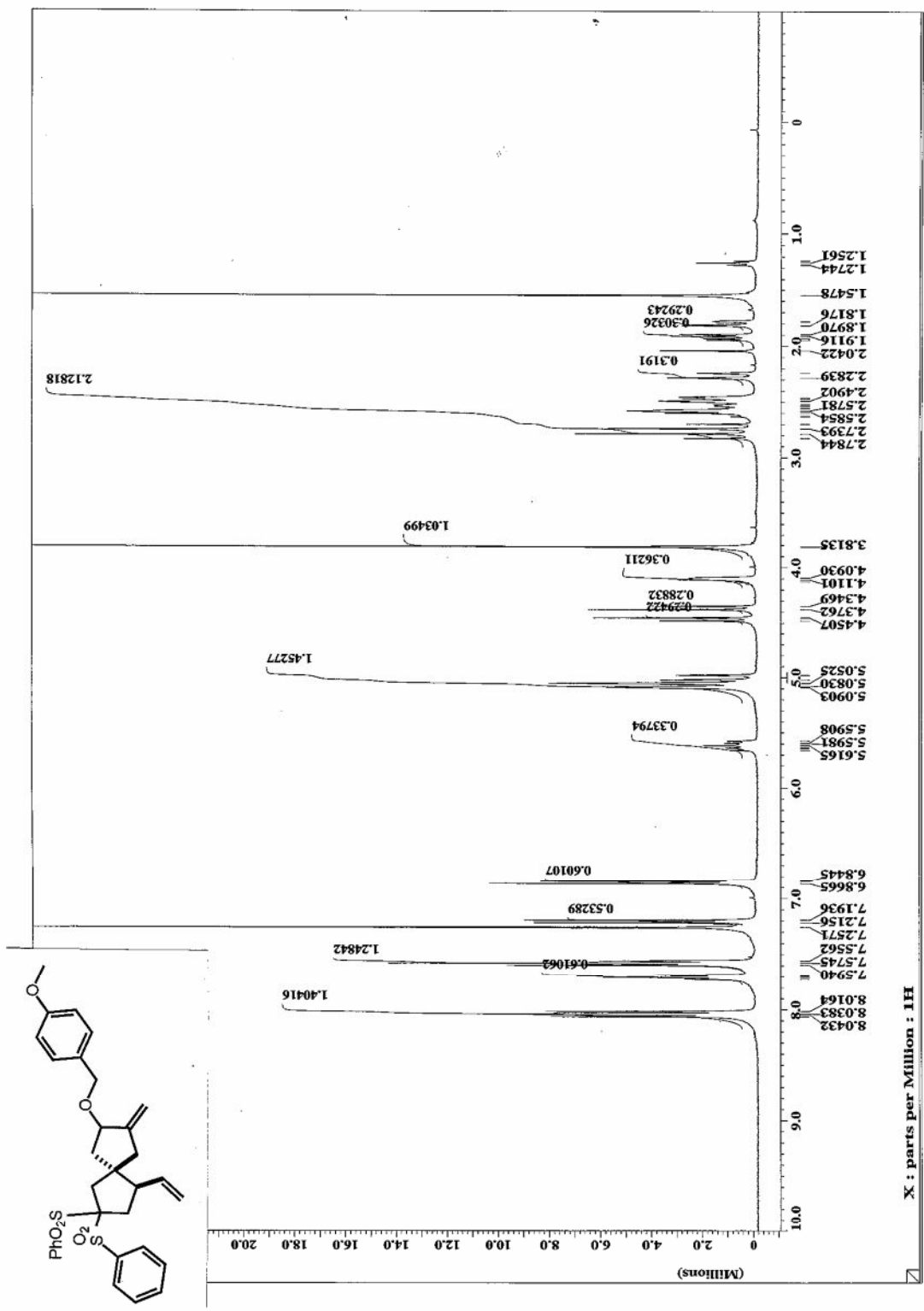
HMQC



HMBC







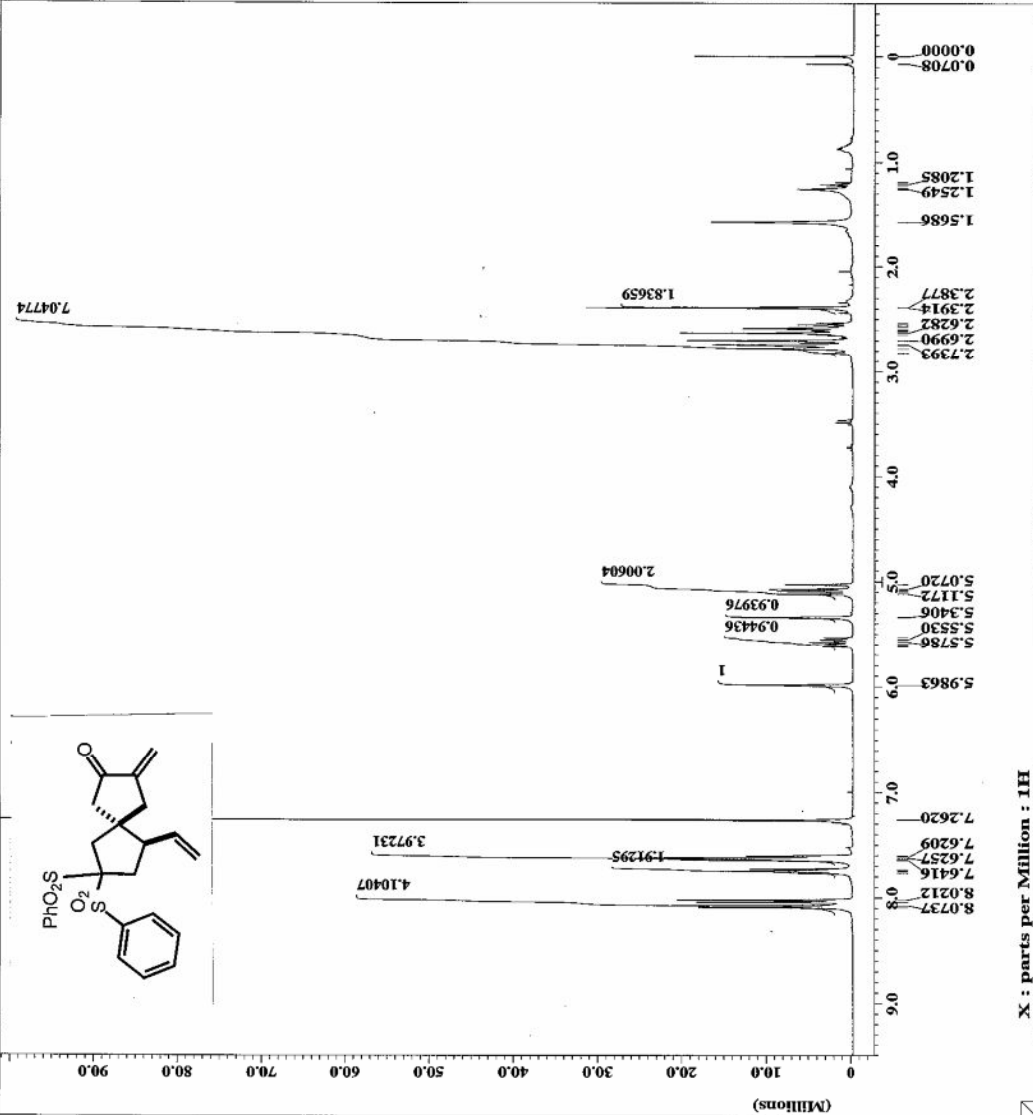




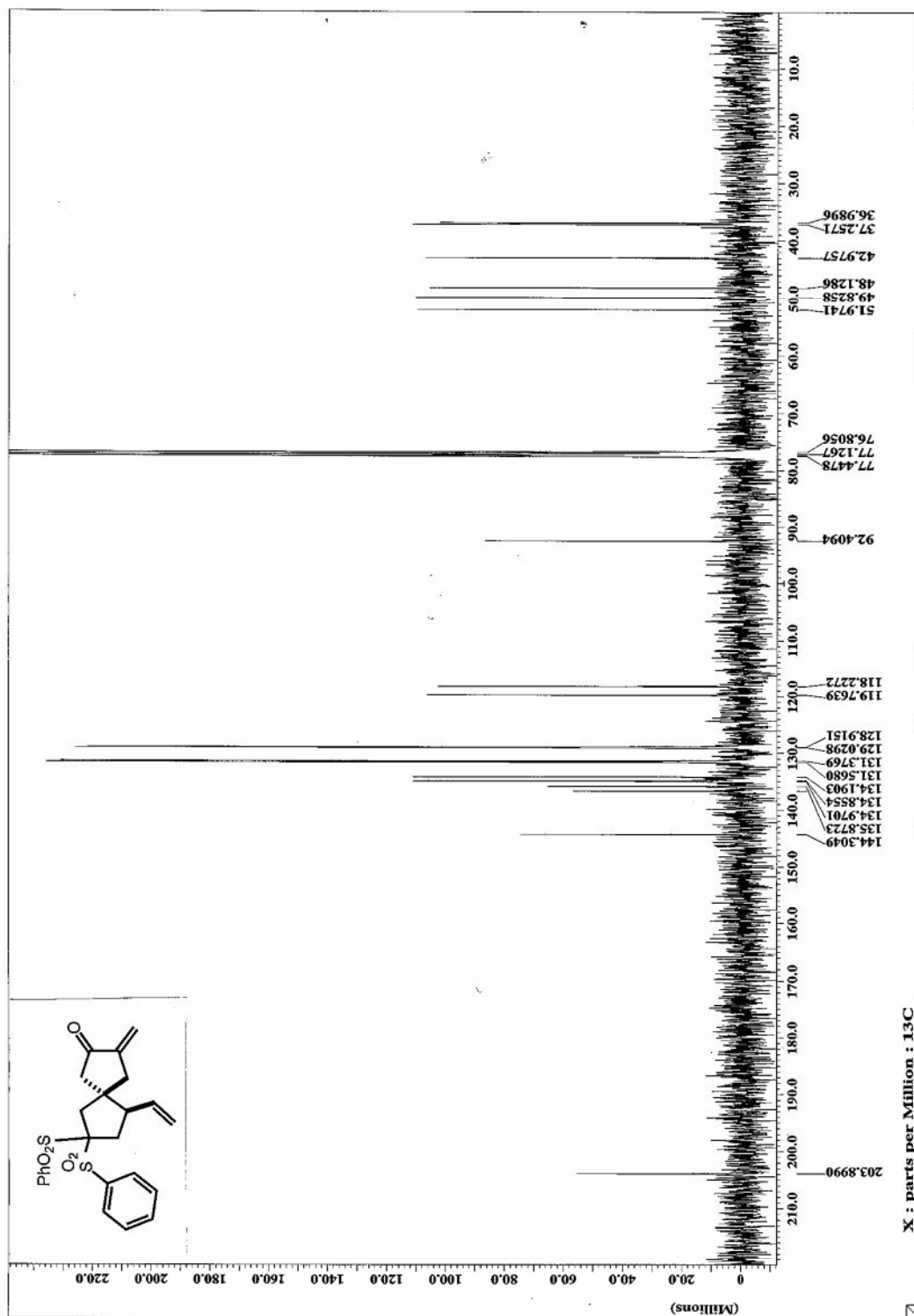
```

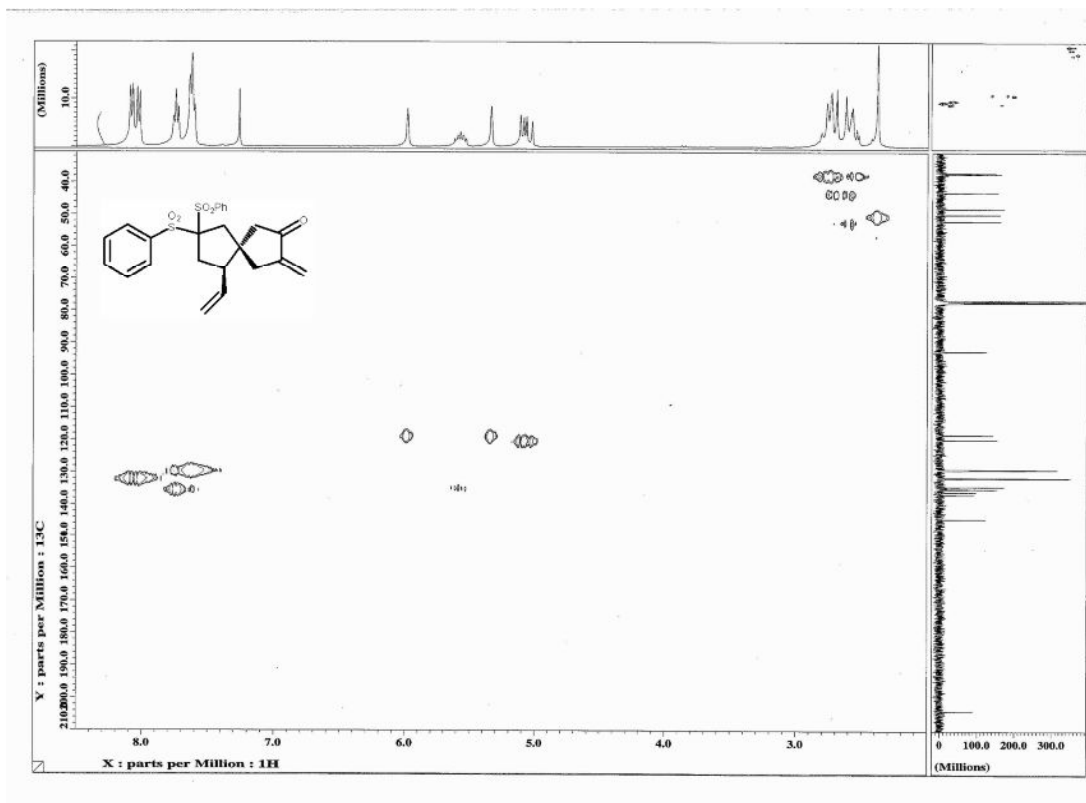
----- ACQUISITION PARAMETERS -----
File Name      = iijima-ketone.3
Author         =
Sample ID      = Single Pulse Experiment
Creation Date  = 14-MAR-2003 22:32:53
Revision Date  = 14-MAR-2003 23:22:57
Spec Site     = ECP400SL

Spec Type     = DELTA_NMR
Data Format    = 1D_COMPLEX
Dimensions    = X
Dim Title     =
Dim Size      = 16384
Actu1_start   = 14-MAR-2003 22:31:04
Actu1_end     = 14-MAR-2003 22:32:51
Digital Filter = FALSE
Experiment    = single_pulse.emp
Pulse Program = zgpg30
Fid Length    = 3.298736[F]
Fid Resol     = 3.95882819[MHz]
Fid FWHM      = 194
Irr_code      = VALZE
Irr_pwr       = 50 [us]
Irr_width     = 14-MAR-2003 22:32:52
Iterations    = 1 [us]
Obs_width     = 14.12
Proba_id      = 19
Recvr_gain    = 4 [s]
Relaxation_delay =
Solvent       = CHLOROFORM-D
Spin_get      = 15 [Hz]
Spin_lock_90  = 52 [us]
Spin_lock_atn = 25 [dB]
Temp_get      = 23.7 [C]
X_acq_duration = 2.0622992 [s]
X_angle       = 45 [deg]
X_domain      = 1H
X_freq        = 395.88252601 [MHz]
X_offset      = 5 [ppm]
X_pascans     = 16384
X_pulse       = 6 [us]
X_resolution  = 0.48325539 [Hz]
X_sweep       = 7.91765637 [kHz]
Tr190         = 10 [us]
Tr1_width     = 1 [us]
Qua90         = 10 [us]
Qua_noise     = 1 [us]
Qua_width     = 1 [us]
  
```

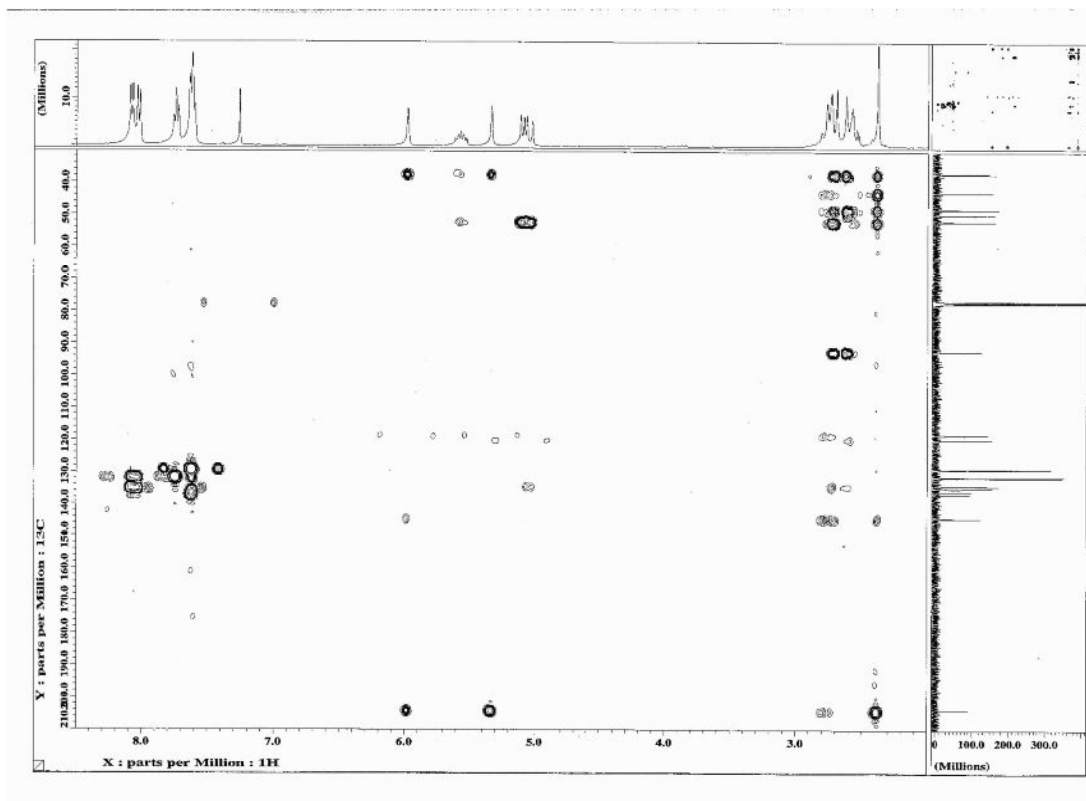


X : parts per Million : 1H

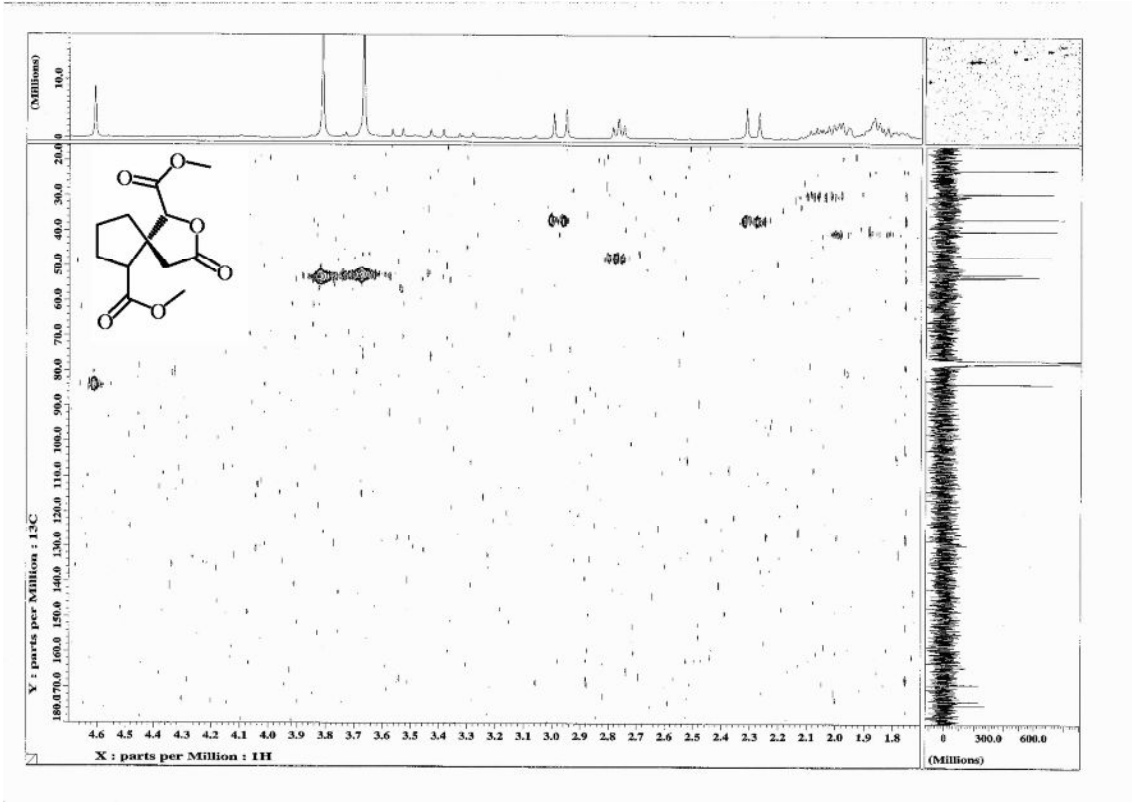




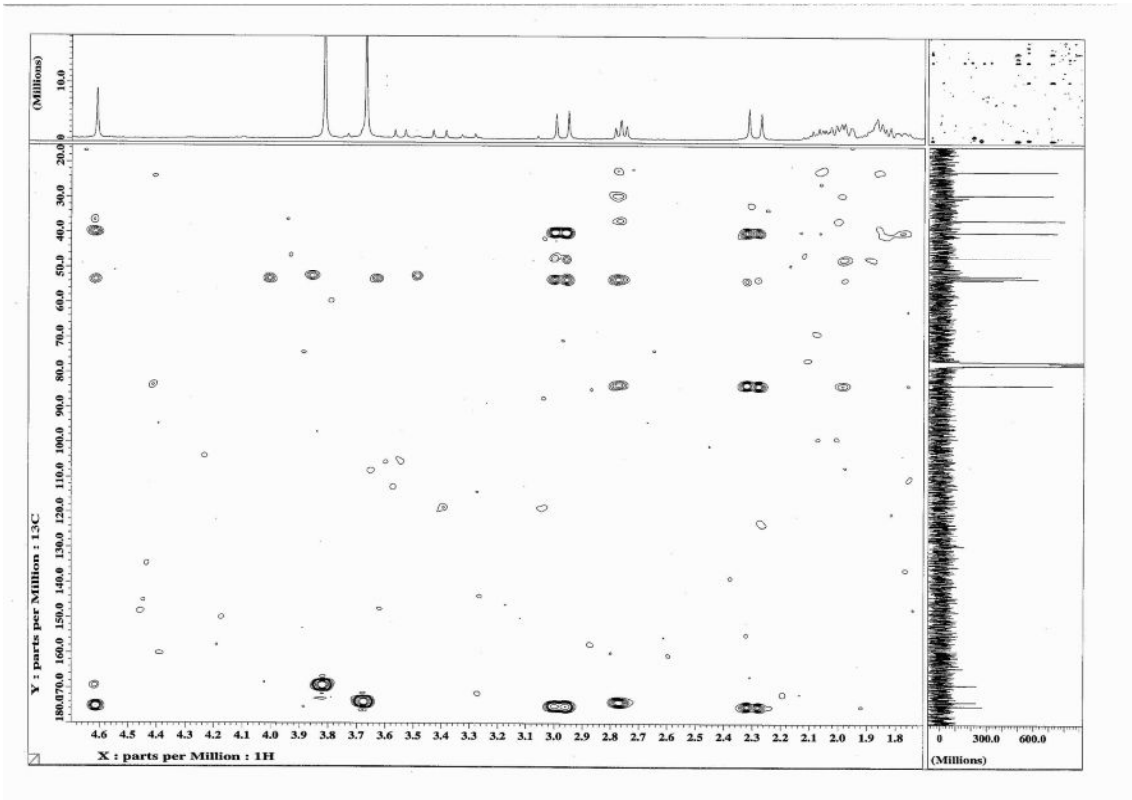
HMQC



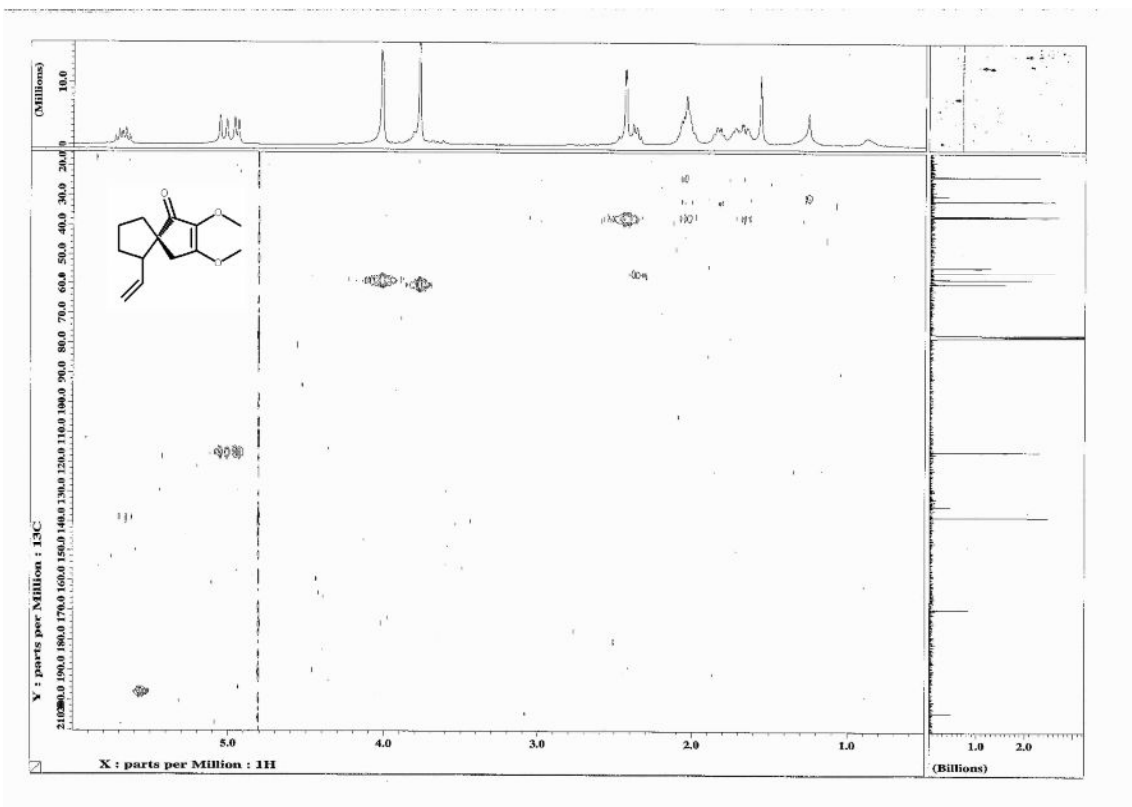
HMBC



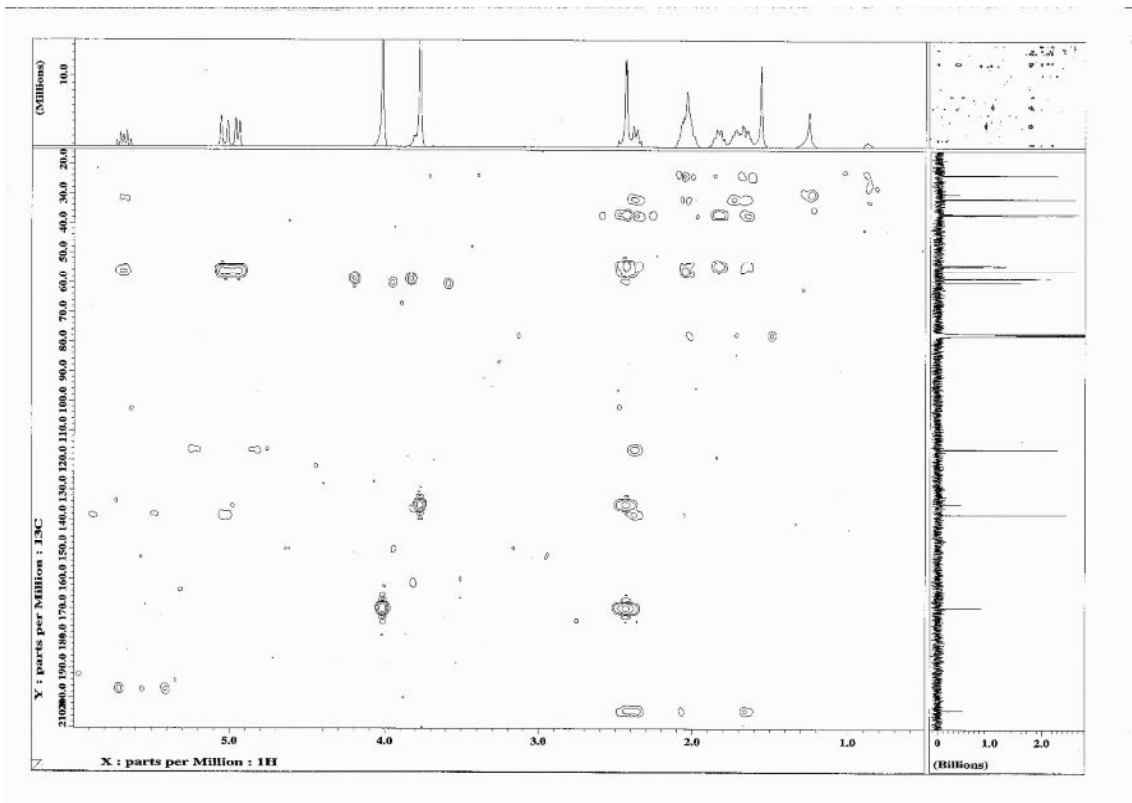
HMQC



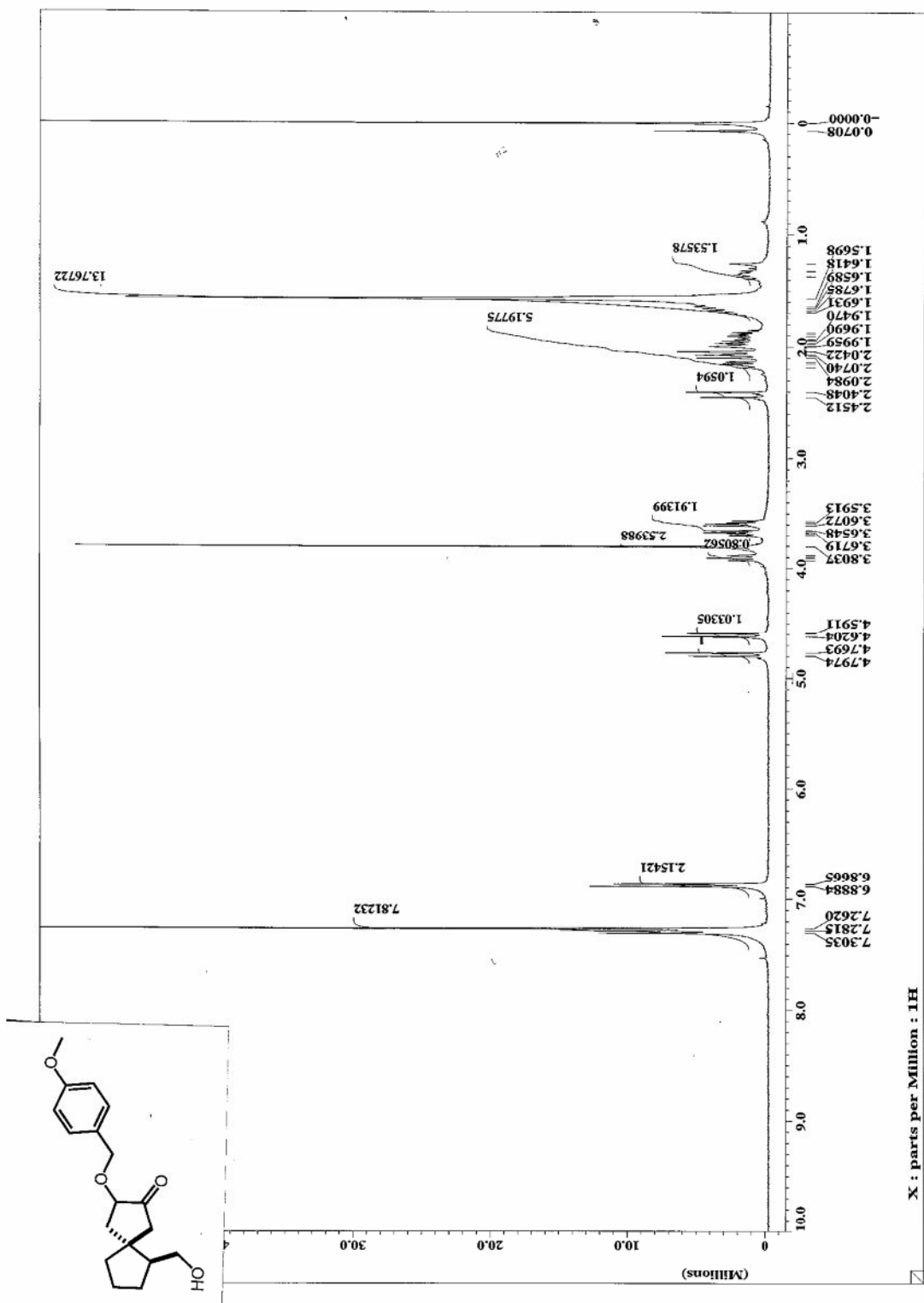
HMBC



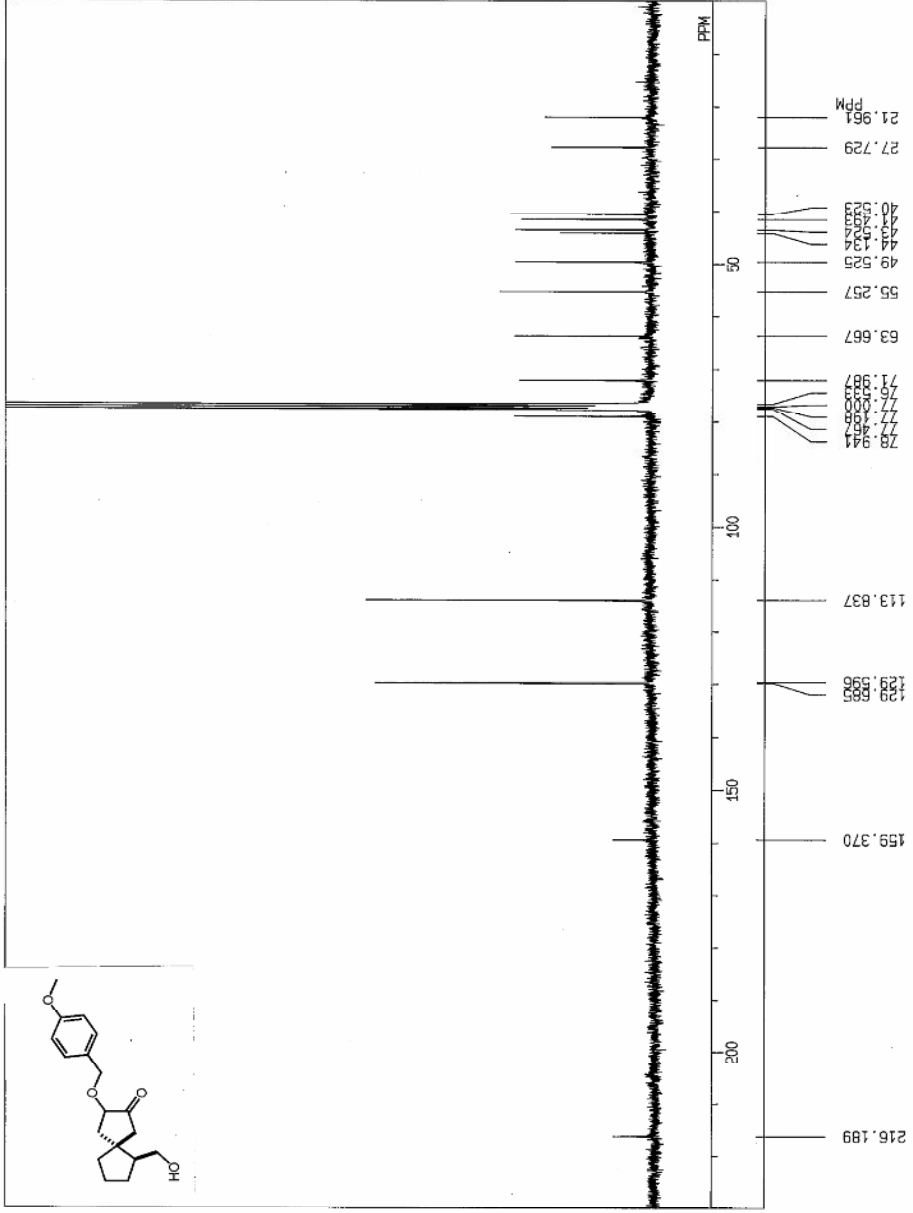
HMQC

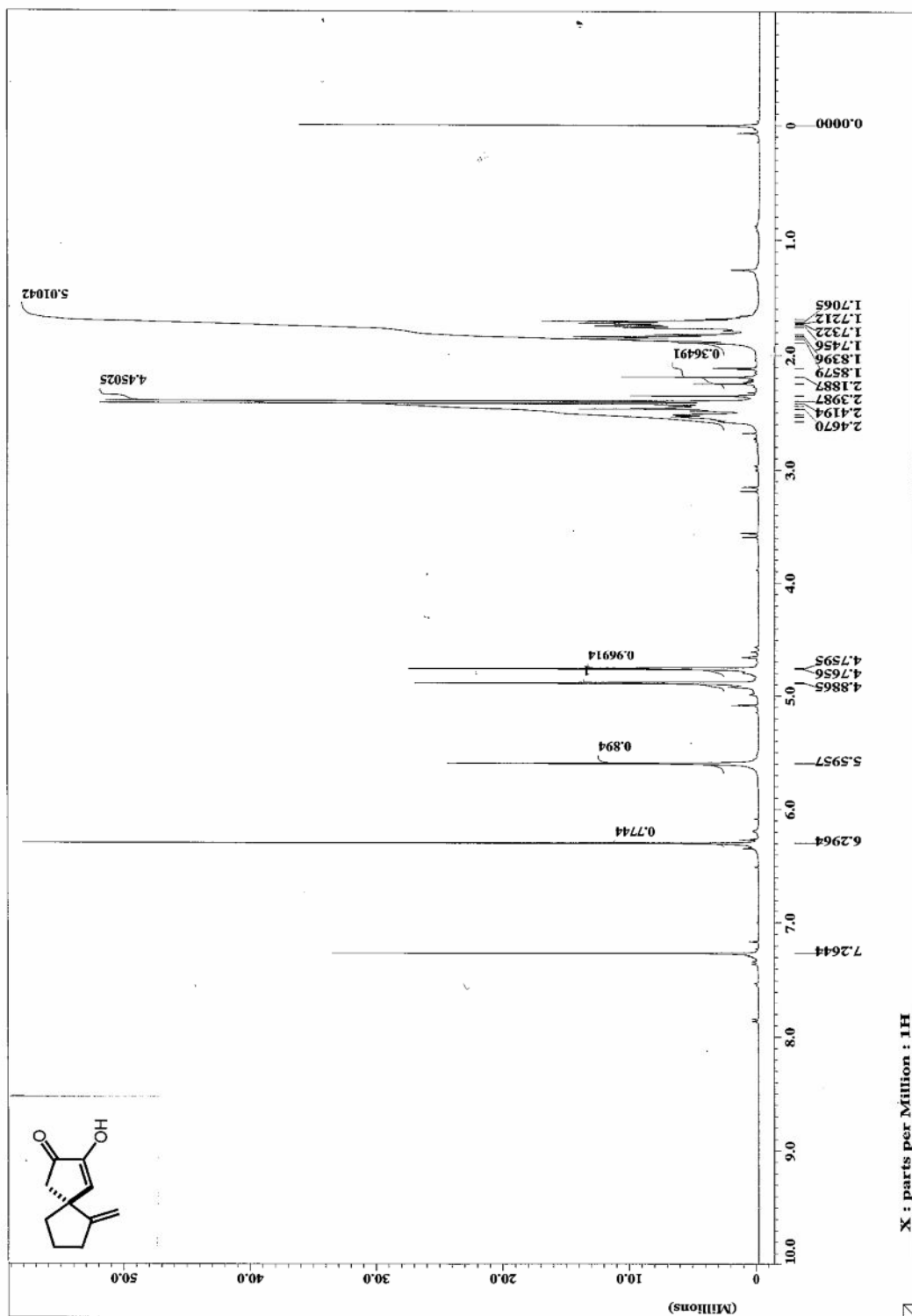


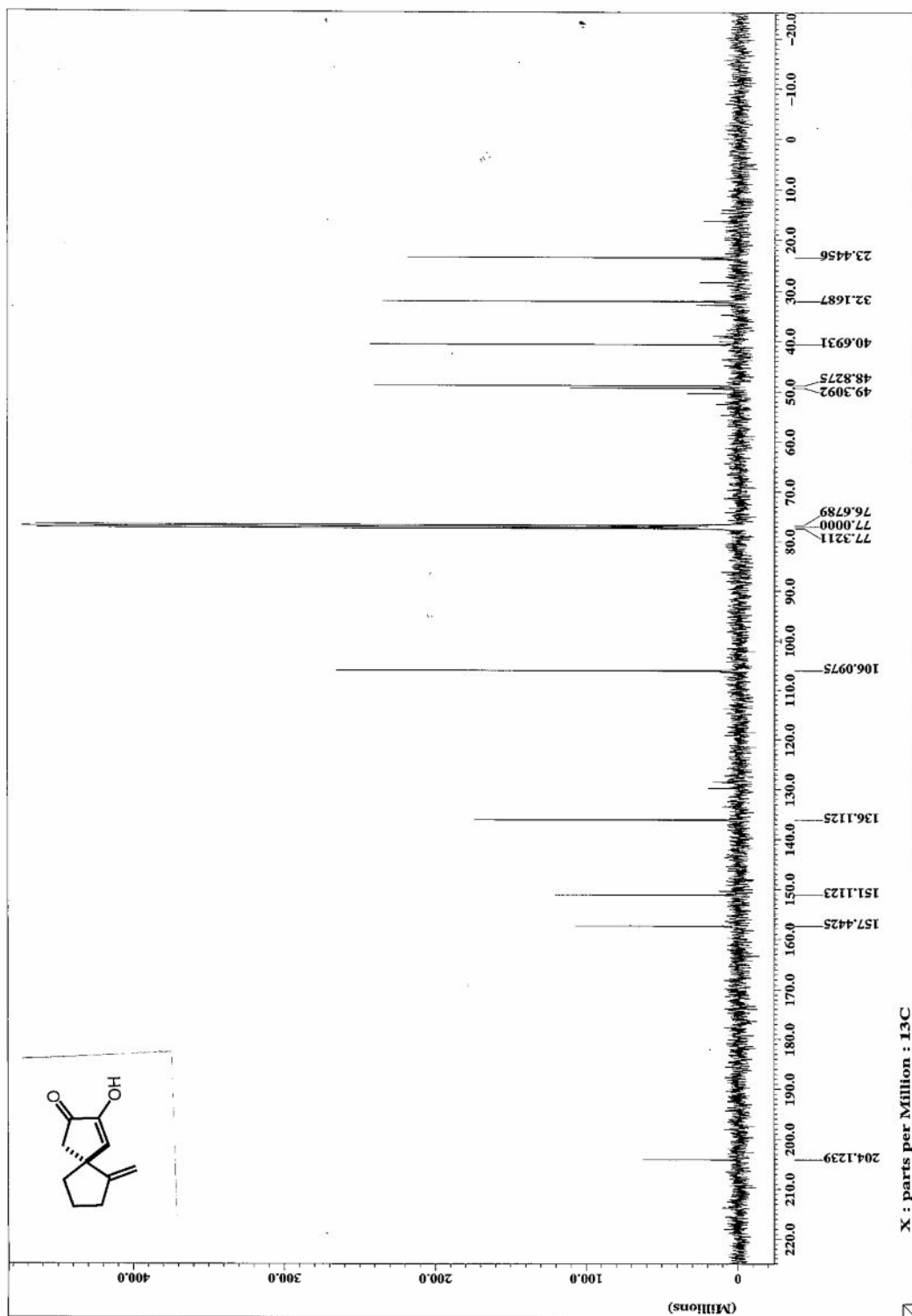
HMBC

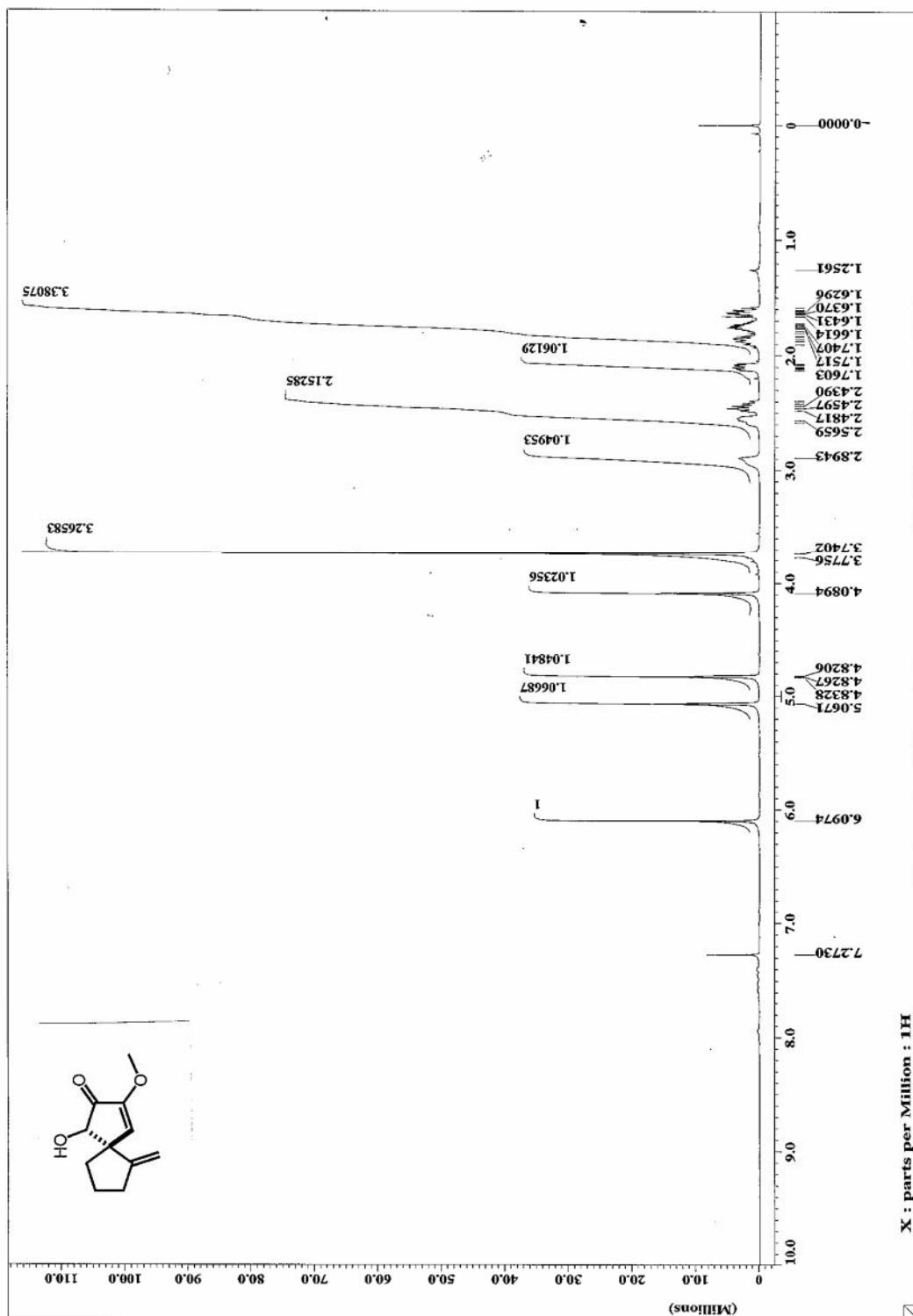


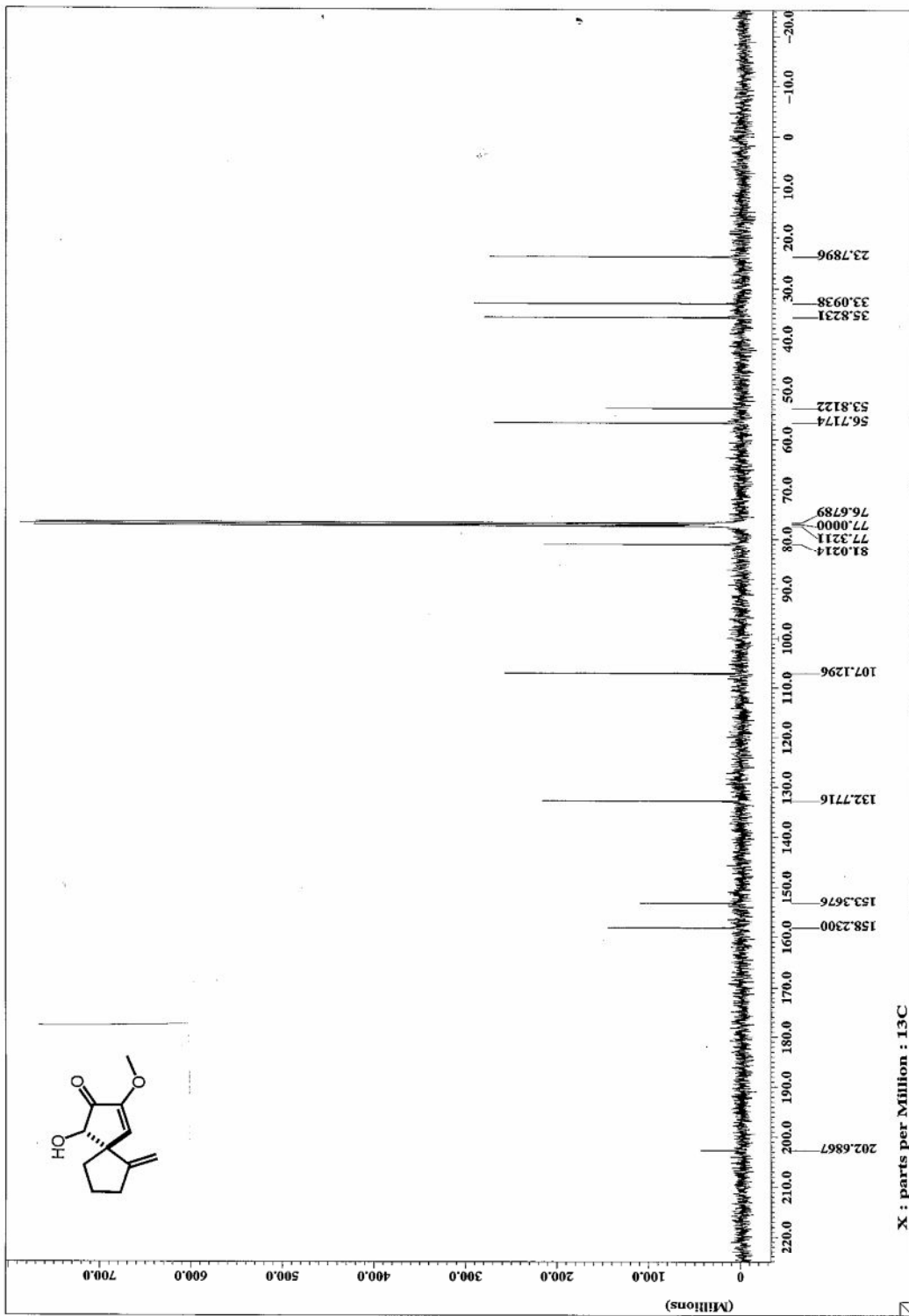
14-NOV-96 13:36:00  
 OFILE MUR0518  
 OBNUC 13C  
 EXMOD BCM  
 OFR 67.80 MHz  
 OBSET 135.00 kHz  
 OBFIN 5200.0 Hz  
 POINT 32768  
 FREQU 20000.0 Hz  
 SCANS 12488  
 ACQTW 0.819 sec  
 PD 2.481 sec  
 PM1 5.1 us  
 IPNUC 1H  
 CTEMP 28.6 c  
 SLVNT CDCL3  
 EXREF 77.00 ppm  
 BF 1.22 Hz  
 RGAIN 24  
 OPERATOR :

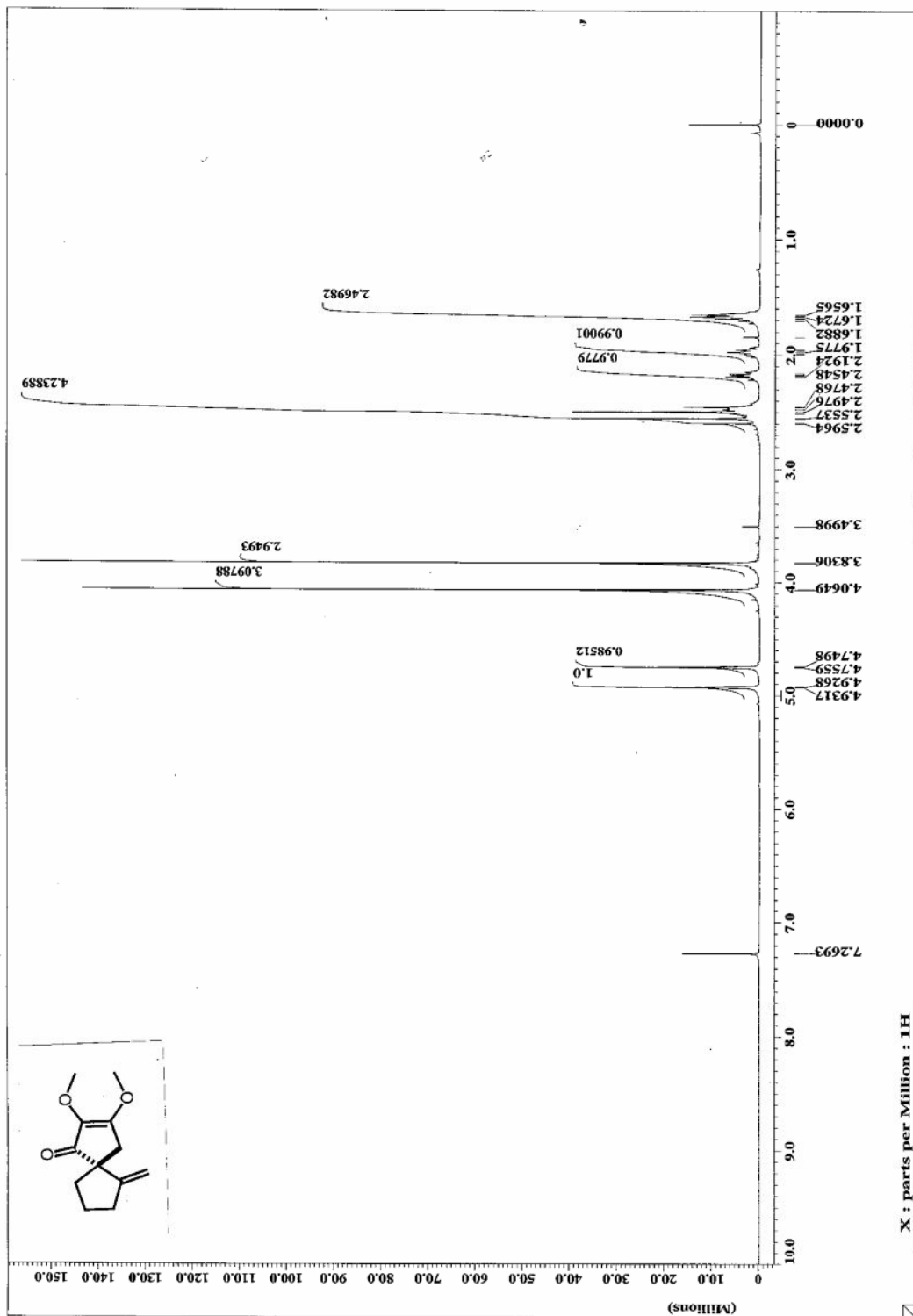


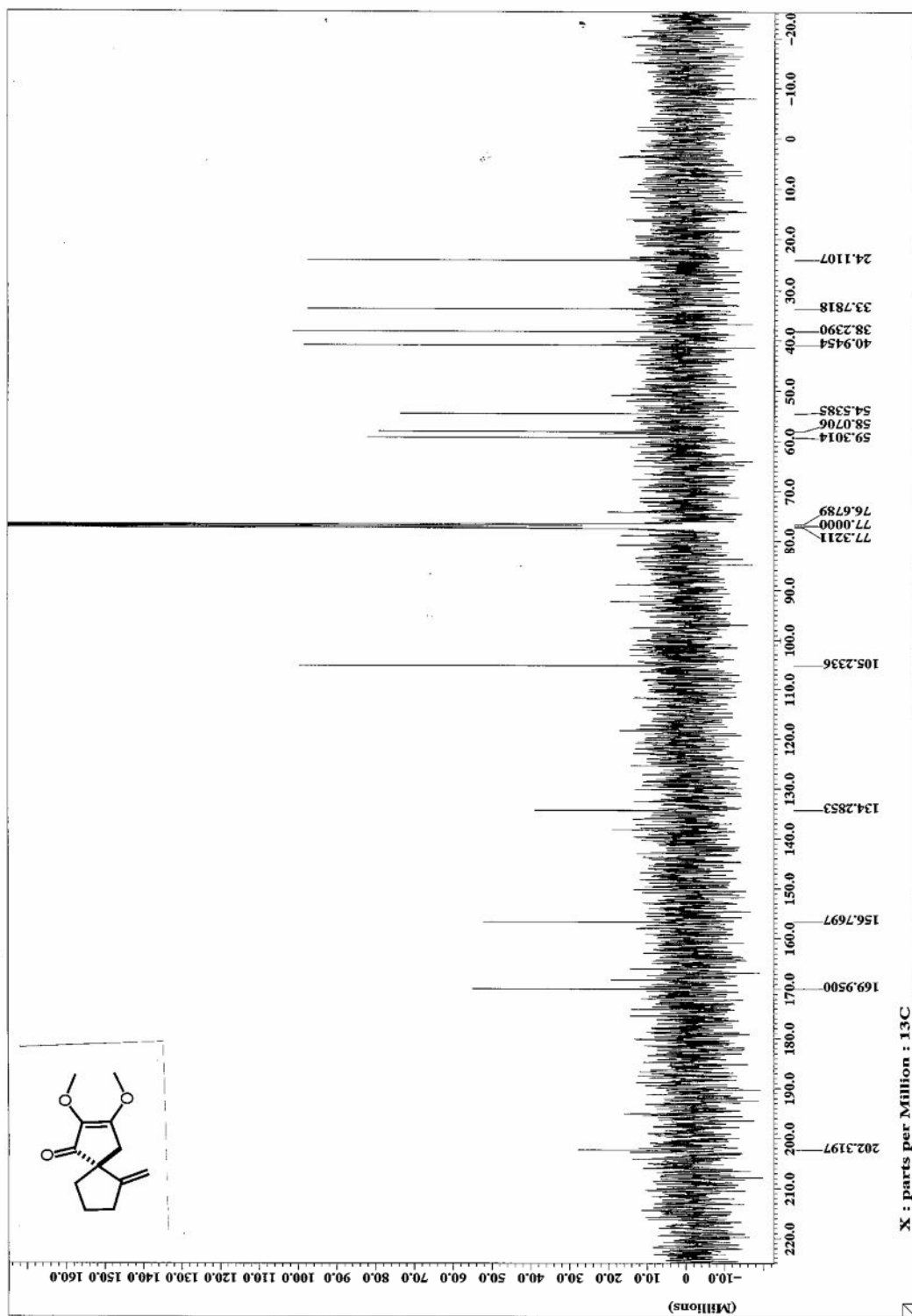












## 第 3 章

「スピルコスタチン A の全合成と  
ケミカルバイオロジー」

## 第 1 節

「スピルコスタチン A の全合成」

### 3-1-1 はじめに

HDAC 阻害剤は近年がんを初めとした様々な疾病に対し治療効果があると期待されている化合物である。すでにアメリカ FDA から承認され、まもなく新たな分子標的抗がん剤として登場しようとしているものもある。ヒトの HDAC は 10 種類以上が知られているが現在知られている HDAC 阻害剤について天然物、合成品ともに十分な選択性を有しているものは知られていない。そこで筆者は天然物である HDAC 阻害剤スピルコスタチン A (1) (Figure 3-1-1) をもとにした誘導体ライブラリーより、高い選択性を有する HDAC 阻害剤を開発することを目的とし、ライブラリー合成を指向した効率的なスピルコスタチン A の全合成を液相にて行った。

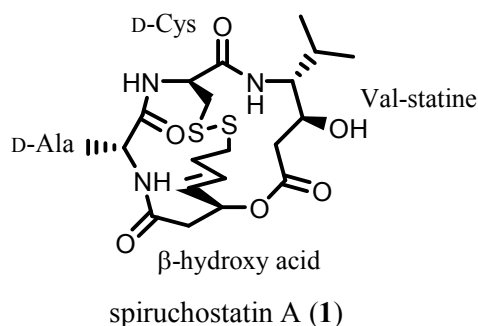


Figure 3-1-1

### 3-1-2 合成戦略

スピルコスタチン A の全合成を考える際、 $\gamma$ -アミノ- $\beta$ -ヒドロキシ酸（以下、スタチン誘導体）をどの段階で導入するかが重要となる。スタチン誘導体は $\gamma$ -アミノ酸であるために、アミノ基が遊離の状態ではカルボキシル基をエステルとして保護しておいた場合、容易にラクタム化を起こすという問題がある (Figure 3-1-2)。

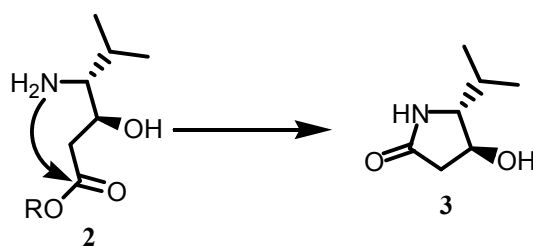


Figure 3-1-2

このことは当然環状化合物における合成上の問題点である環化位置をどこにするかということにも大きな影響を及ぼす。スピルコスタチン A は環状デブシペプチドであるため環化法としてアミド化あるいは、エステル化を用いることが考えられる。アミド化はエステル化に比べ早い反応であるため、ラクトン化よりもラクタム化による方が環を構築しやすいと考えられる。一方で、ラクトン化はラクタム化よりも反応は遅いものの環化前駆体がヒドロキシカルボン酸であるため、ラクタム化の前駆体である高極性のアミノカルボン酸

に比べ精製、取り扱いが容易であるという利点がある。また、スピルコスタチン A はジスルフィド結合によるもう 1 つの環を有している。この環を合成のどの段階で構築するかも重要である。すなわち主鎖の環化を行った後でジスルフィド結合を構築するのか(ルート A)、先にジスルフィド結合による環を構築した後、主鎖を環化させるのか(ルート B) の 2 通りが考えられる。いずれの場合も環が 1 つ構築されることである程度コンフォメーションが規制されるため、2 つ目の環化反応に大きな影響を与えると考えられる (Figure 3-1-3)。

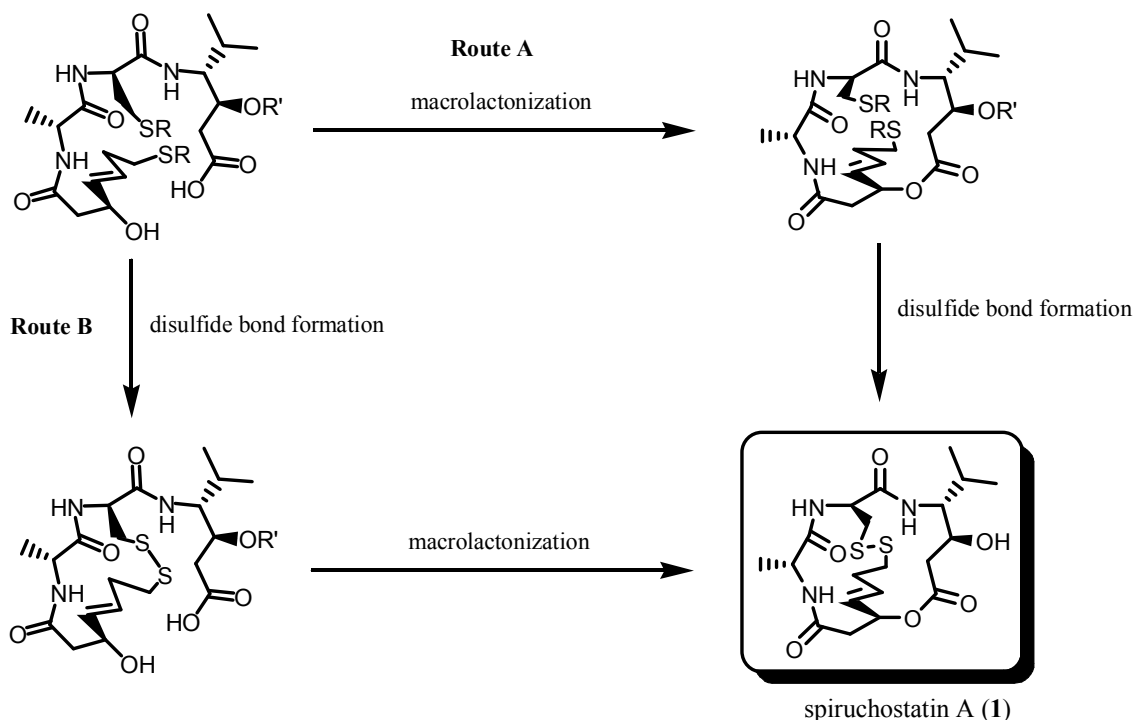


Figure 3-1-3

さらに保護基の選択も重要である。スピルコスタチン A を合成するにはカルボキシル基、アミノ基、ヒドロキシル基、チオール基の保護基はそれぞれが独立にはずし分けられるすなわちオルソゴナルでなければならない。以上の問題点を考慮してスピルコスタチン A の合成戦略を立案した。

まず、スタチン誘導体であるが  $\gamma$ -ラクタム化を防ぐ方法として有効であると考えられるのが、アミノ基を酸性条件下脱保護可能な Boc 基で保護し、塩酸塩などの塩の形で脱保護し、次の縮合反応において反応系中で中和するというものである。この方法により望まない  $\gamma$ -ラクタム化を抑制することができると考えられる (Figure 3-1-4)。

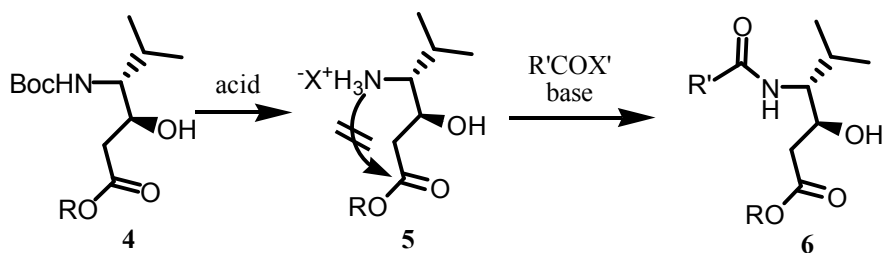


Figure 3-1-4

スタチン誘導体のアミノ基を Boc 基で保護することにより環化位置、その他の保護基の選択もかなり制約がかかることになる。通常、チオール基の保護基として後にジスルフィド結合を構築する場合にはトリチル基がよく用いられる。トリチル基はヨウ素処理により容易に脱保護、ジスルフィド形成を行うことができる (Figure 3-1-5)。

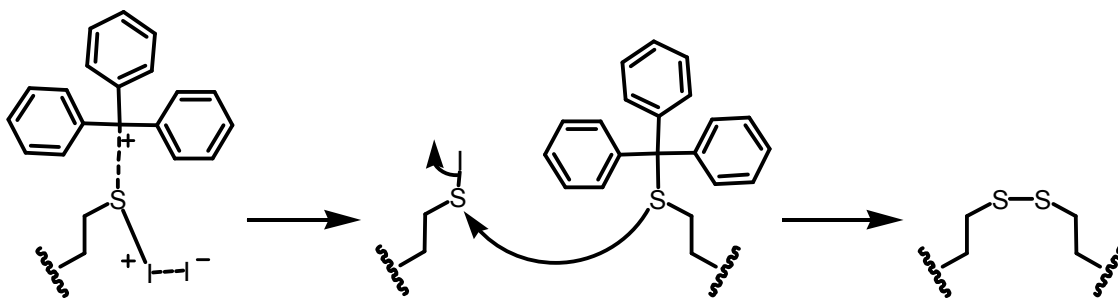


Figure 3-1-5

しかし、トリチル基は酸に対して不安定であるため、トリチル基を有するフラグメントを縮合した後に酸処理を行うことはできない。本合成戦略においてはシステインとβ-ヒドロキシ酸のチオールの保護基としてトリチル基を想定しているため、これらのフラグメントを縮合後は酸処理ができないことになる。

そこでスタチン誘導体とβ-ヒドロキシ酸との間を環化点とすることで、C末端のスタチン誘導体に対して初めに酸性条件下脱保護を行い、順次縮合をしていくこととした。システインとアラニンのアミノ基の保護基としては弱塩基性条件で脱保護可能な Fmoc 基が有効であると考えられる。そして本合成戦略においてもっとも重要となるのがスタチン誘導体のカルボキシル基の保護基の選択である。この保護基に求められる条件は、Boc 基の脱保護条件である酸と Fmoc 基を除去する際の弱塩基性に対して安定でありかつ、脱保護の際には酸、酸化剤に対し不安定なトリチルチオール基に影響を与えてはならない。また、強塩基性ではエピ化やヒドロキシル基の脱離の恐れがあり、さらに分子内にアルケンを有しているので接触水素還元も用いることはできない (Figure 3-1-6)。

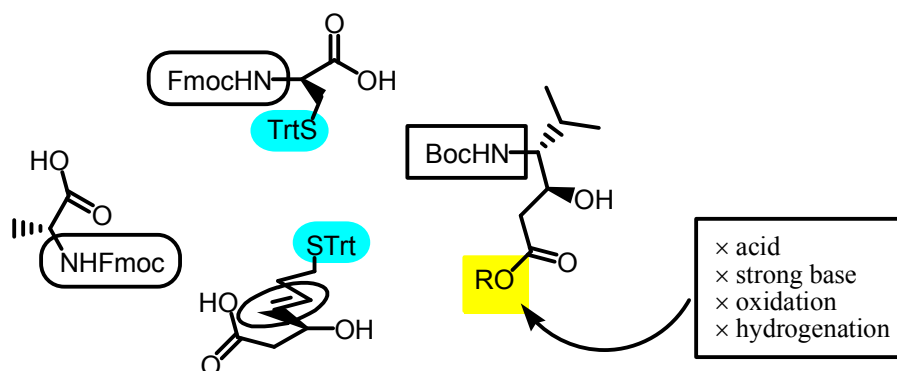


Figure 3-1-6

これら多くの制限に対し有効である保護基を吟味した結果、筆者はアリル基を選択した。アリル基はパラジウム触媒存在下、弱塩基性で脱保護可能でありトリチル基やアルケンに対し影響を与えないと期待でき、Boc基、Fmoc基の脱保護条件には安定であると考えられる。残る官能基としてヒドロキシル基があるが主鎖を伸ばしていく際の縮合反応は全てアミド化であるのでヒドロキシル基が遊離の状態であっても選択的に進行すると考えられる。環化反応においてもスタチン誘導体のヒドロキシル基が反応した場合に生じるのは $\beta$ -ラクタムであり、そもそも起こりにくい反応である上、生成したとしてもマクロラクトン化の条件では再開裂すると考えられるので、遊離のままでも問題が無いと考えた。

以上をまとめると本合成戦略はカルボキシル基をアリル基で保護したスタチン誘導体 **8** に対し、Boc法でシステイン残基 **9** を縮合、続くアラニン残基 **10** と $\beta$ -ヒドロキシ酸 **11** はFmoc法で縮合した後、環化を行うというものである。環化反応は反応性を調べるため先にジスルフィド結合を形成した後ラクトン化を行う方法と、先にラクトン化を行った後ジスルフィド結合を形成する方法の両方を検討することにした。原料となるスタチン誘導体は入手容易なバリニン誘導体 **12** より、 $\beta$ -ヒドロキシ酸 **11** は酢酸誘導体とアルデヒド **13** の不斉アルドール反応により合成することとした (Figure 3-1-7)。

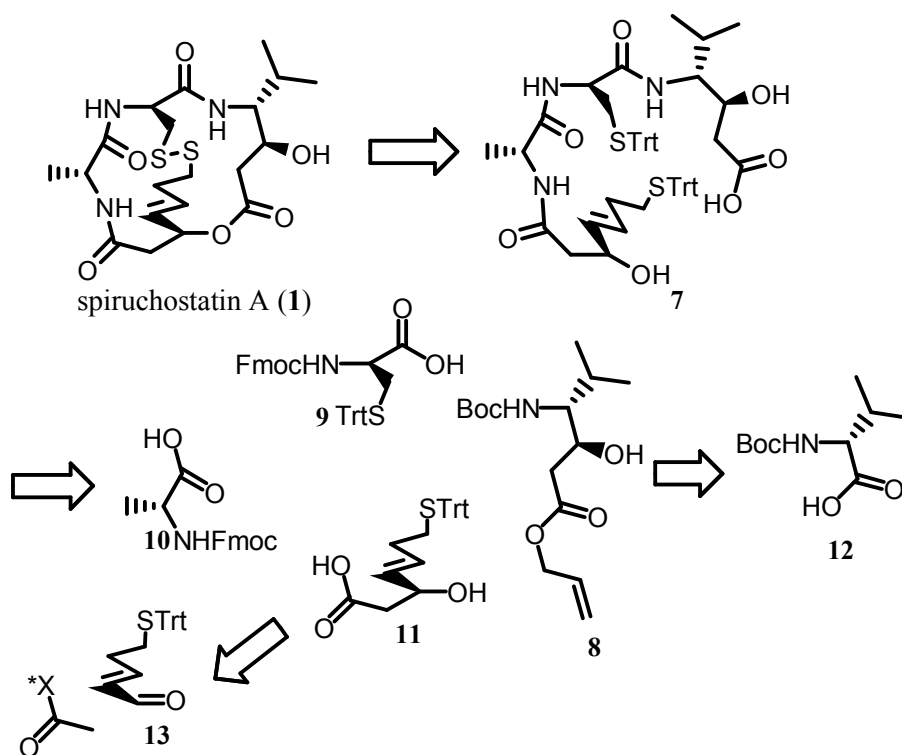


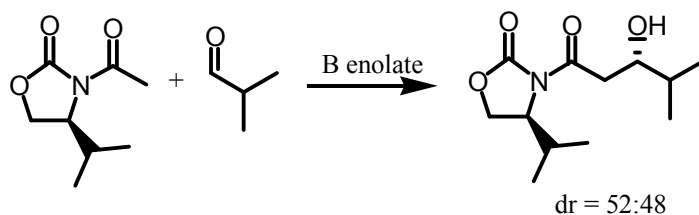
Figure 3-1-7

Ganesan らも同じ環化点での全合成を報告しているが<sup>1)</sup>、本ルートはより短工程であり、スタチン誘導体を固相担体に担持することで後に述べる固相合成によるライブラリー構築に対しても適用可能であると考えられる。

### 3-1-3 $\beta$ -ヒドロキシ酸の合成

スピルコスタチン A に含まれている  $\beta$ -ヒドロキシ酸 **11** は他の天然物にも含まれているため、数例の合成例が報告されている。いずれの合成例においても酢酸誘導体に対するアルドール反応で合成を行っているが、一般的にこの反応は立体選択性が低いと報告されている<sup>1)</sup>。そのため酢酸誘導体に対し高い選択性のアルドール反応は現在でも開発研究が行われている。過去の合成例においても様々な手法により高立体選択的なアルドール反応を行い、 $\beta$ -ヒドロキシ酸 **11** の合成を行っている<sup>2)</sup>。

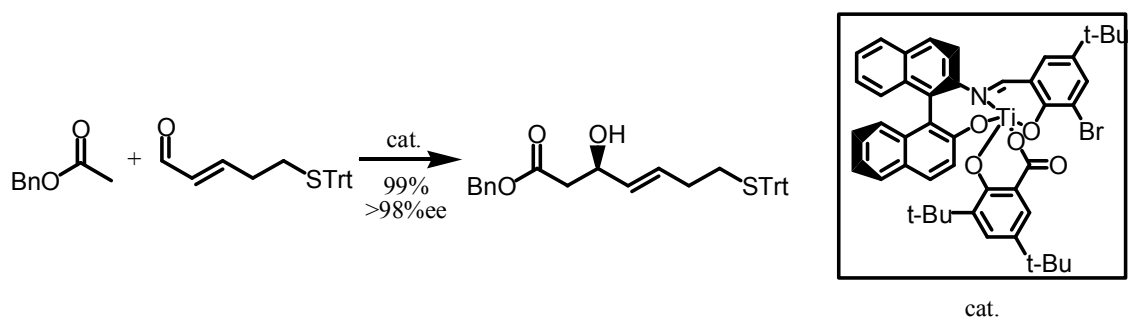
<sup>1)</sup> Evans らはボランエノラートをを用いた反応は立体選択性が低いことを報告している<sup>2)</sup>。



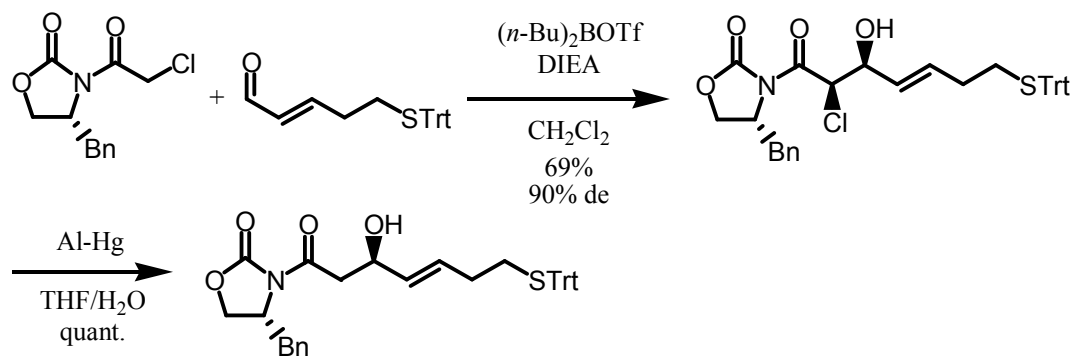
一般に、不斉反応によって得られた生成物を合成に使う際には純粋に片方のエナンチオマーのみが必要となる。不斉触媒による場合、十分な不斉収率であれば問題ないが選択性が不十分な場合エナンチオマーの分離は困難である。Simon らの例では十分な不斉収率が出ているが、触媒を合成するために多工程が必要である<sup>3)</sup>。ケトンの不斉還元も考えられるが、隣に二重結合を有しているため十分信頼できる方法はまだ確立されていない。

一方で、不斉補助子を用いる方法は得られた化合物がジアステレオマーとなるので選択性が多少低くても分離が可能であれば純粋な化合物を得ることができる。今回のように十分な選択性が出る保証が無い場合には特に有効である。しかし、それでもジアステレオマーの分離が困難な場合は純粋な化合物を得ることが難しくなる。そこで筆者は Seebach らによって開発された不斉補助子 **14** に着目した<sup>5)</sup>。この不斉補助子は2つのフェニル基を有したオキサゾリジノンであり、フェニル基の効果により高い結晶性を有している。この性質

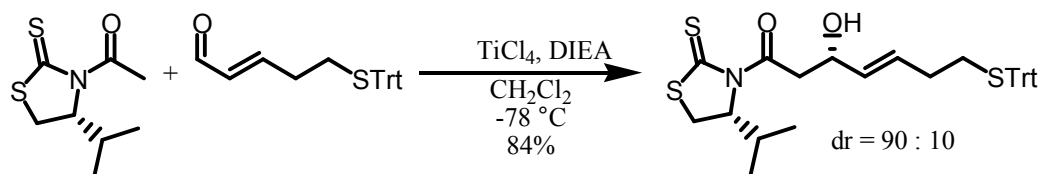
<sup>2)</sup> Simon らは Carreira らによって開発された不斉触媒を用いて高収率、高エナンチオ選択性で合成を行っている<sup>3)</sup>。



Janda らはクロロアセチル誘導体に対してアルドール反応を行うことで高い立体選択性で反応を行った後、クロロ基を除去するという方法をとっている<sup>4)</sup>。



Ganesan らは Nagao らによって開発された不斉補助子を用いることで高い立体選択性で合成を行っている<sup>1)</sup>。



を利用し X 線結晶構造解析による絶対立体化学の決定にも使われているが、アルドール生成物の再結晶によるジアステレオマー分離も可能であると報告されている。また、フェニル基が環内のカルボニル基を求核剤の攻撃から守っているため、不斉補助子自体が非常に安定であるため加水分解の際にしばしば問題となる不斉補助子の分解も抑制され、回収、再利用も容易であることから大量に合成する際にも有用である (Figure 3-1-8)。

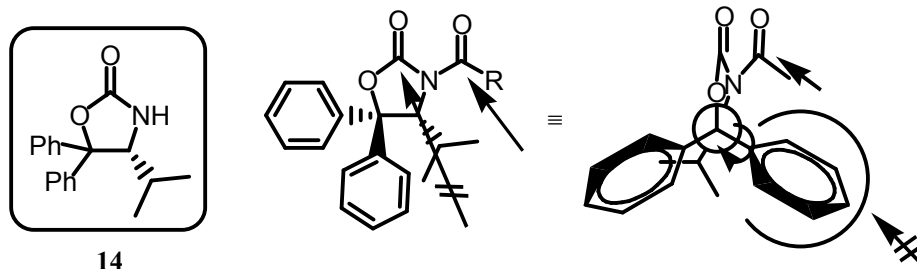


Figure 3-1-8

まずアルドール反応の原料となるアルデヒド **13** の合成を行った。アクロレイン(**15**)に対しトリチルチオールをマイケル付加させた後、触媒量の DMAP を用いてマロン酸モノエチルエステルとの Knoevenagel 縮合を行った<sup>6)</sup>。この反応では熱力学的に安定な生成物が生じるのでアルケンはトランス体が得られるが、 $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和エステル **16** と  $\beta$ 、 $\gamma$ -不飽和エステル **17** の混合物として得られた。反応時間を長くしてもこれらの比率は変化しなかった。しかし、アルデヒドに変換することで  $\beta$ 、 $\gamma$ -不飽和体も  $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和体へと異性化できるとの報告があったため<sup>3)</sup>、そのまま合成を進めることとした。エステルを水素化ジイソブチルアルミニウムによりアルコールへと還元した後、Swern 酸化によりアルデヒド **13** へと導いた。得られたアルデヒド **13** は  $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和体のみであった。別法として安定イリドを用いた Wittig 反応による合成も試みたが、大量の副生成物が生じるため精製の際のロスが大きく、原料と生成物の分離も困難であった (Figure 3-1-9)。

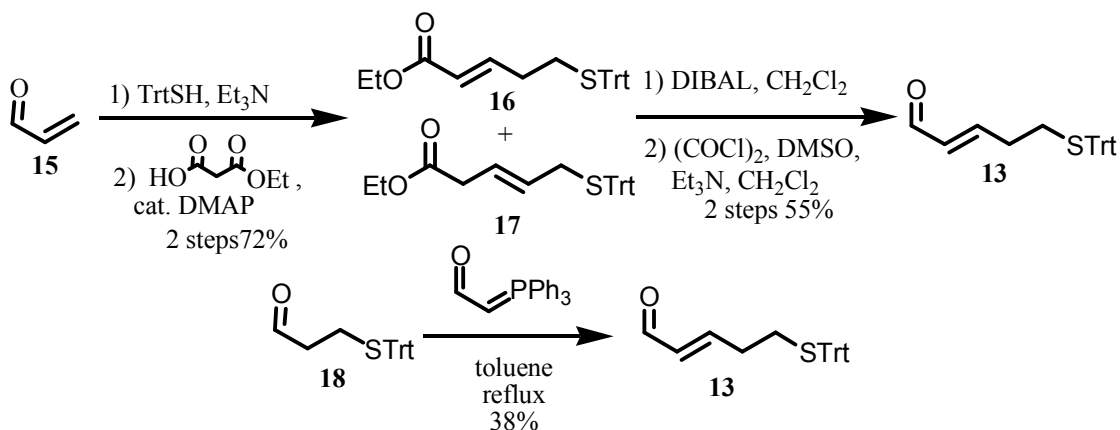


Figure 3-1-9

次に文献記載の方法に従い不斉補助子の合成を行った<sup>5b)</sup>。遷移状態を考えると D 体由来の不斉補助子を用いた場合、オキサゾリジノン、アセチル基、アルデヒドの 3 つのカルボニル基が全て同じ側に向いた 6 員環いす形遷移状態モデルで反応が進行した場合、望む立体化学の生成物が得られる。一方、ボランエノラートの場合は逆の立体化学が誘起されると考えられるので、L 体由来の不斉補助子が必要になる (Figure 3-1-10)。

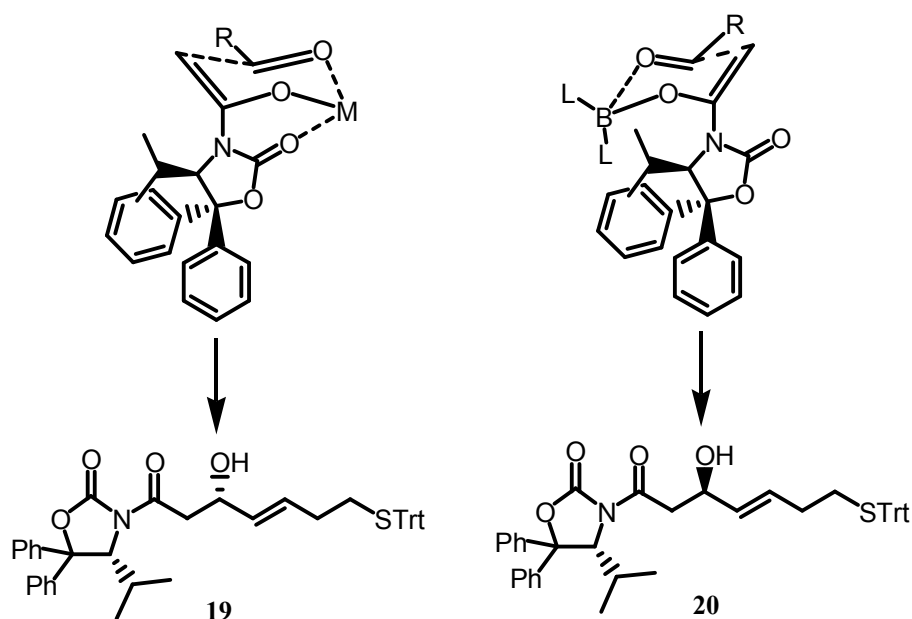


Figure 3-1-10

そこで両エナンチオマーを合成し検討することとした。Boc-D-バリン **12** をメチルエステル化した後、フェニルマグネシウムブロミドを作用させることでフェニル基を 2 つ導入した 3 級アルコールとし、この 3 級アルコールの Boc 基に対する分子内環化反応によりオキサゾリジノン **14** を構築した。さらにアセチル化を行うことでアルドール反応に必要な両フラグメントを得た (Figure 3-1-11)。L 体についても同様のスキームで調製した。

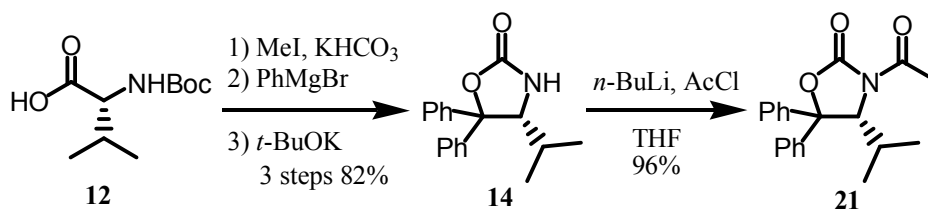


Figure 3-1-11

アルドール反応においてはアセテートに対し *n*-ブチルリチウムを作用させることでエノラートを調製し、種々の金属塩を加えることで金属交換を起こし、収率、選択性について検討した。何も添加物を加えないリチウムエノラートとの反応ではアルデヒドと混合後

すぐに反応を止めた場合、収率は 89%と高収率であったが、ジアステレオマー比は 77 : 23 と中程度であった。反応時間を 1 時間程度と長くした場合も収率、ジアステレオマー選択性ともにあまり変化しなかった。次にクロロトリイソプロポキシチタンを添加剤として加えたところ、収率は向上したものの、ジアステレオマー選択性はリチウムの場合と同程度であった (Figure 3-1-12)。

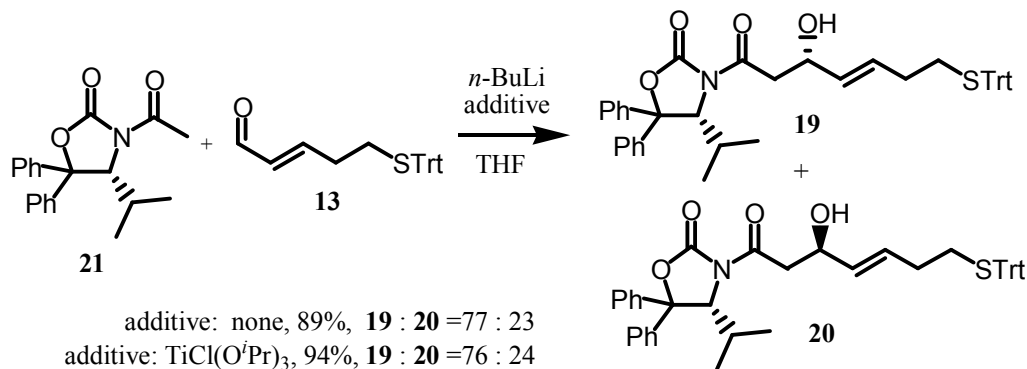


Figure 3-1-12

L 体由来の不斉補助子を用いジブチルボランエノラートとし、アルドール反応を検討したが、立体選択性はほとんど発現しなかった (Figure 3-1-13)。

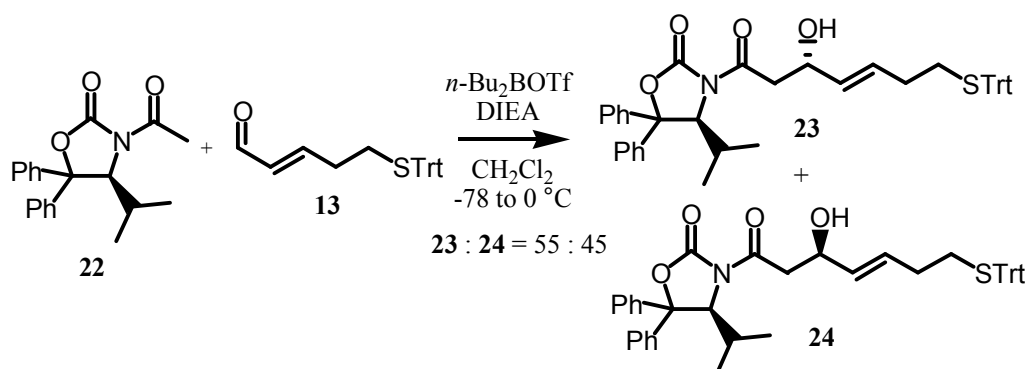


Figure 3-1-13

生成物の絶対立体化学の決定は L 体由来の不斉補助子を用い、リチウムエノラートとして反応させて得られた主生成物をメチルエステル化した後、改良 Mosher 法により行った<sup>7)</sup>。(R)体、(S)体両方の MTPA エステルを合成し、両者の <sup>1</sup>H NMR のケミカルシフトの差  $\Delta\delta$  を計算したところ、正負の値が MTPA を境に分かれていることから **25** に対し改良 Mosher 法が適用可能であることが分かった。その結果決定された立体化学は遷移状態モデルから予想されるものと同であることを確認した (Figure 3-1-14)。

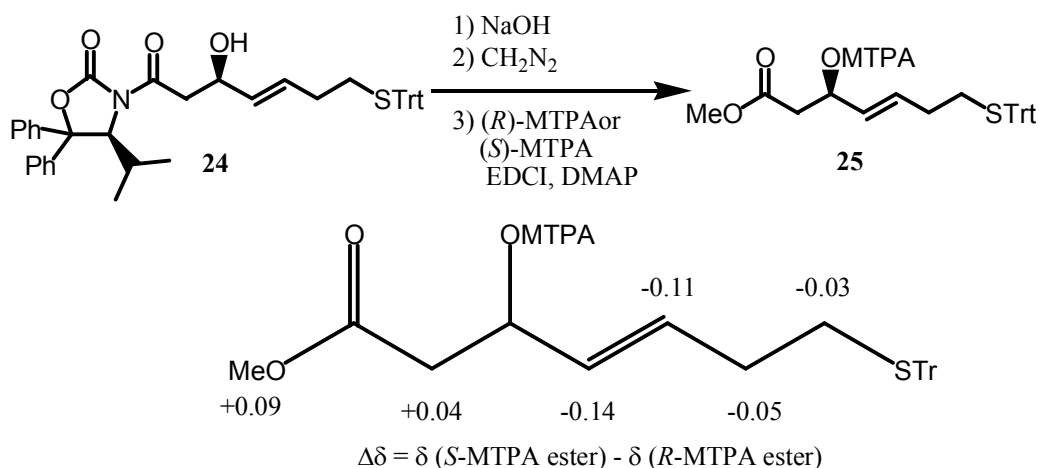


Figure 3-1-14

汎用される金属塩では満足のいく立体選択性が得られなかったため再度考察を行った。本アルドール反応は D 体由来の不斉補助子を用いた際、オキサゾリジノン、アセチル基、アルデヒドの 3 つのカルボニル基が全て同じ側に向いた 6 員環いす形遷移状態モデルで反応が進行すると、望む立体化学の生成物が得られる。そのためには 3 つのカルボニル酸素と強く配位し、配座を固定することができる金属塩を添加することが有効と考えられる (Figure 3-1-15)。

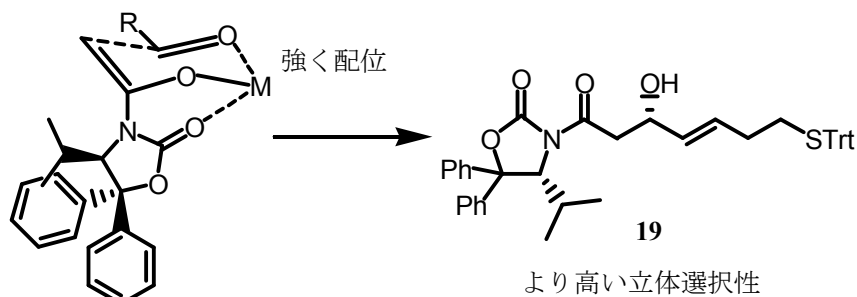


Figure 3-1-15

そこでチタンと同族でより酸素との親和性が高いと考えられ、かさ高い配位子を有しているジルコノセンジクロリドを加えた。すると、ジアステレオマー比 93 : 7 と酢酸誘導体の直接的なアルドール反応としては非常に高い選択性を発現させることに成功した。しかし、収率は 55%と中程度であった。次に酸素との高い配位能を有する金属としてランタノイド金属であるサマリウムに着目し、プロモ酢酸誘導体 **26** に対するヨウ化サマリウム(II)を用いた Reformatsky 反応を検討した<sup>8)</sup>。だが、この場合も収率は中程度で選択性はリチウムやチタンに比べれば高いがジルコノセンジクロリドを越えるものではなかった。また、ヨウ化サマリウム(II)は希薄な溶液としてしか得られず、酸素に対して非常に不安定であるため大量合成は困難であった。

そこでジルコノセンジクロリドを添加した系で、反応時間、反応温度、更なる添加剤を種々検討したが収率は頭打ちとなった。いずれの条件においてもアルデヒドが完全に消費されていないことから、エノラートを過剰量反応させることとした。すると 2.5 当量用いた場合、収率 93% と高収率でアルドール生成物を得ることができた。残念ながら選択性は 85 : 15 と低下したが、 $\beta$ -ヒドロキシ酸 **11** を十分量供給するためこの条件で合成を行うこととした (Figure 3-1-16, Table 3-1-1)。また、得られたアルドール生成物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分離は可能であったが、結晶化しなかったため再結晶による精製はできなかった。

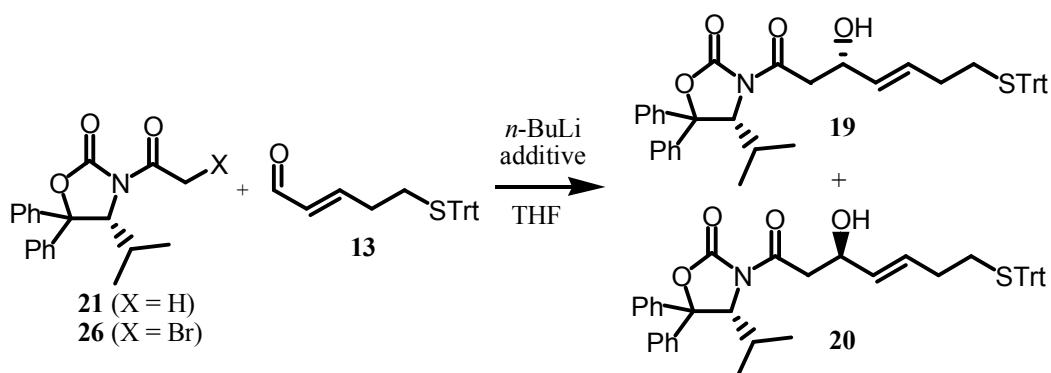


Figure 3-1-16

Table 3-1-1

Substrate	condition	Temperature [°C]	Yield [%]	Ratio ( <b>19</b> : <b>20</b> )
<b>21</b>	<i>n</i> -BuLi, Cp <sub>2</sub> ZrCl <sub>2</sub>	-78 to 0	55	93 : 7
<b>26</b>	SmI <sub>2</sub>	-78	57	87 : 13
<b>21 (2.5 eq.)</b>	<i>n</i> -BuLi, Cp <sub>2</sub> ZrCl <sub>2</sub>	-78 to 0	<b>95</b>	<b>85 : 15</b>

アルドール生成物を水酸化ナトリウム水溶液により加水分解することで  $\beta$ -ヒドロキシ酸 **11** を得た。加水分解の際に副反応は観察されず、不斉補助基は不溶となり析出したので、ろ過により簡便に回収でき、メタノールで洗浄するだけで再利用が可能であった (Figure 3-1-17)。

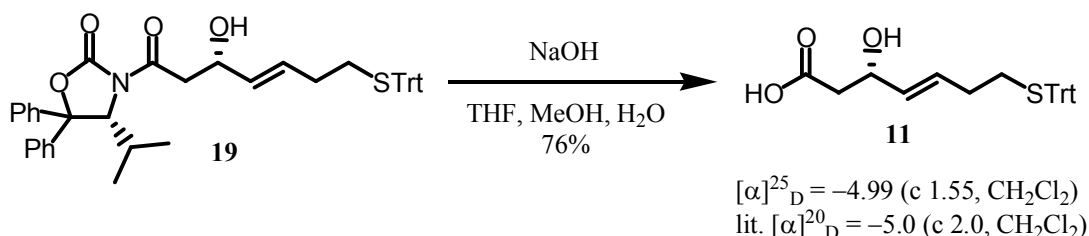


Figure 3-1-17

### 3-1-4 スタチン誘導体の合成

スタチン誘導体は入手容易な Boc-D-バリン **12** から合成した。Boc-D-バリン **12** に対し、CDI を作用させることで酸イミダゾリドとした後、マロン酸モノエステルマグネシウム塩を作用させることでほぼ中性条件下、 $\beta$ -ケトエステル **27** へと変換した<sup>9)</sup>。続くケトンの還元では水素化ホウ素ナトリウムを作用させた場合ジアステレオマー混合物が得られた (dr = 83 : 17、LC により決定)。そこで水素化ホウ素カリウムに変えたところほぼ望む生成物のみが得られた。エステルを加水分解した後、再結晶を行うことで純粋なスタチン誘導体 **29** を合成することができた (Figure 3-1-18)。

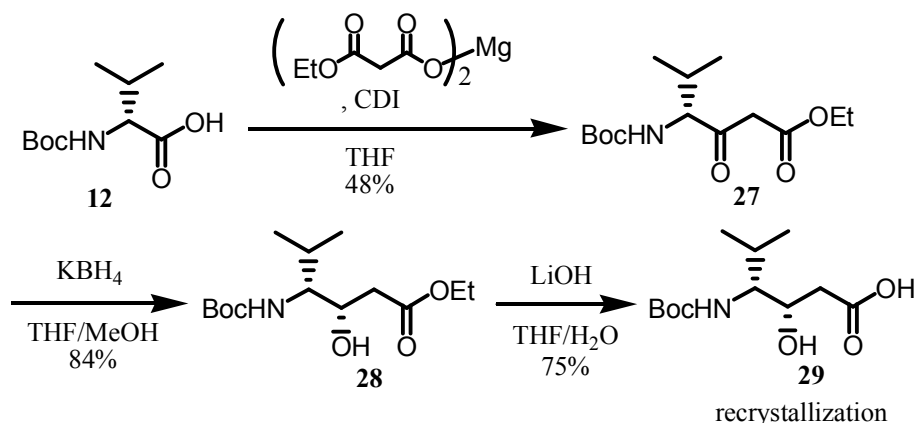


Figure 3-1-18

### 3-1-5 環化前駆体の合成

必要なフラグメントを調製できたので環化前駆体を合成するべく縮合を行った。スタチン誘導体 **29** をアシルエステルとした後、酸性条件下 Boc 基の脱保護を行い塩酸塩とし、システイン誘導体 **9** との縮合を行った。システインは縮合反応において非常にラセミ化しやすいことが知られている。ラセミ化は活性化エステルとなった状態で塩基が存在すると起こりやすい。実際、この反応においても試薬を入れる順序を変えるだけでラセミ化の割合は大きく異なった。系中にシステイン誘導体 **9** と縮合剤、HOBt を加えておき、あらかじめ活性化エステルができるような状態にしておき、最後に塩基を入れて塩酸塩を中和し反応を開始させた場合、生成物はほぼ 1 対 1 のジアステレオマー混合物であった。すなわちこの条件ではシステイン誘導体は完全にラセミ化していたことになる。次にシステイン誘導体 **9**、HOBt、アミン塩酸塩を加えておき、そこに塩基を加えて中和した後、 $\gamma$ -ラクタム化を防ぐためすぐに縮合剤を加えるという手法をとったところラセミ化はほとんど観察されなかった。またラクタムの生成も確認されなかった (Figure 3-1-19)。

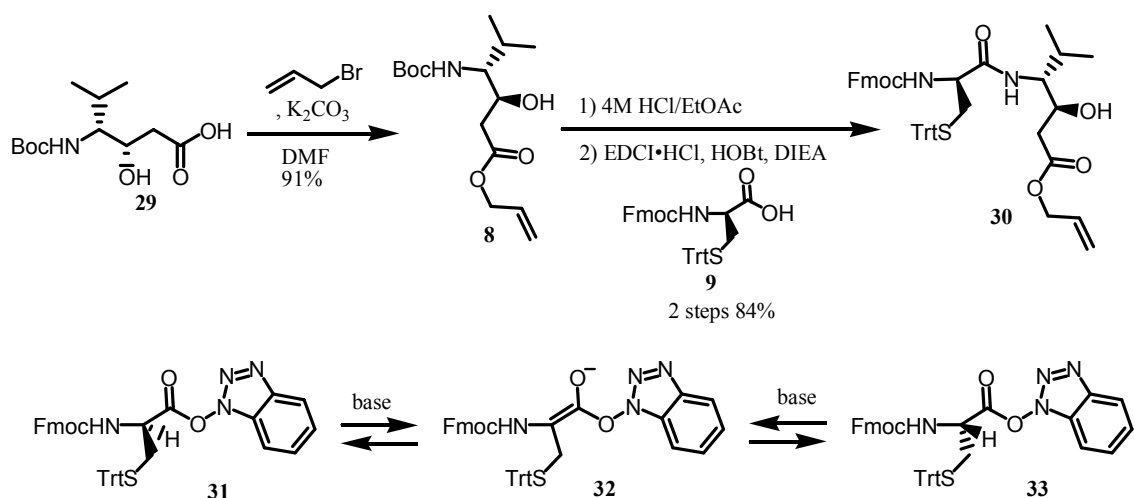


Figure 3-1-19

システイン残基の Fmoc 基をジエチルアミンを作用させて脱保護した後、アラニン誘導体 **10** と縮合し、続いて Fmoc 基の脱保護、 $\beta$ -ヒドロキシ酸 **11** との縮合を行うことで 4 残基ペプチド **35** を合成した。さらにアリル基をパラジウム触媒存在下モルホリンを作用させることで除去し、セコ酸 **7** を合成した。縮合、アリル基の脱保護の際に副反応は起きず、合成戦略が有効であったことを立証できた (Figure 3-1-20)。

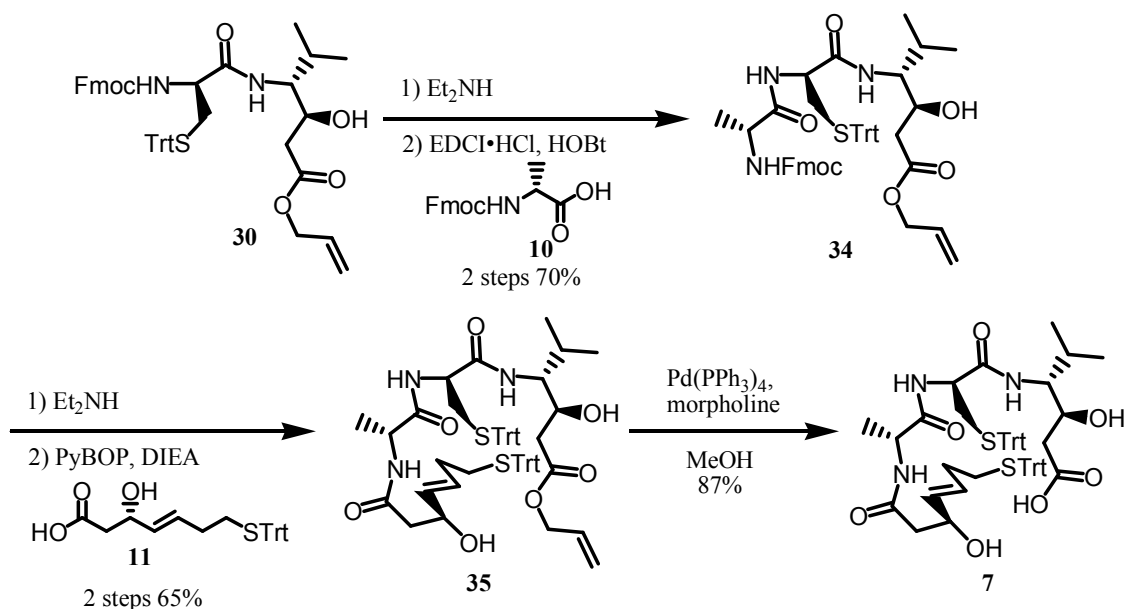


Figure 3-1-20

### 3-1-6 スピルコスタチン A の全合成

セコ酸 **7** ができたので次に大環状の構築を行った。まず、マクロラクトン化の検討を行った。マクロラクトン化は分子間反応を避けるため高希釈条件下行われることが多く、高

い反応性を有する試薬が必要とされる。近年、椎名らによって効率的なマクロラクトン化反応剤が開発されているので<sup>10)</sup>、その方法を試みた。基質濃度を 1 mM とし、MNBA、DMAP の溶液に対し、基質の溶液を滴下することで反応を行った。すると室温下、高収率で環化体を合成することができた。反応も早く、滴下終了時に反応はほとんど完結していた。水を使った後処理を行った場合に比べ、濃縮後、直接シリカゲルクロマトグラフィーにより精製を行った方が高収率であった。従来からよく用いられている山口法と比べても前駆体の精製や加熱の必要もなく高収率であった<sup>11)</sup>。アミド化で用いられる HATU を用いた場合、環化生成物は得られなかった。さらに倍の濃度すなわち溶媒量を半分に減らしたところ、基質を完全に溶解させるため DMF の添加が必要であったが、ほぼ遜色ない収率で環化体が得られた (Figure 3-1-21、Table 3-1-2)。

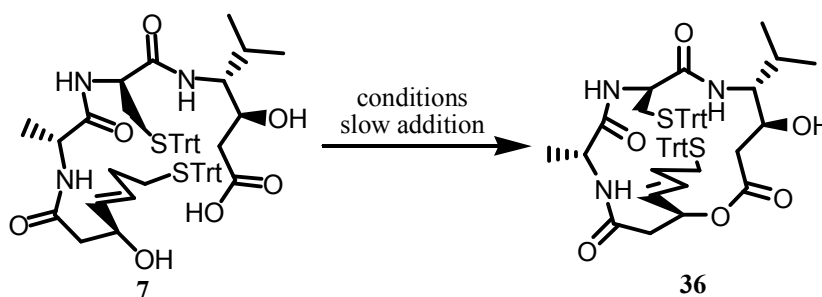


Figure 3-1-21

Table 3-1-2

Condition	solvent	Temperature [°C]	Yield [%]
<b>MNBA, DMAP</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mM)</b>	<b>r.t.</b>	<b>89</b>
MNBA, DMAP	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1 mM)	r.t.	62*
2,4,6-trichlorobenzoyl chloride, DMAP	toluene(1 mM)	80	40
HATU, HOAt, DIEA	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1 mM)	r.t.	decomposed
MNBA, DMAP	10% DMF/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (2 mM)	r.t.	82

\* Aqueous workup

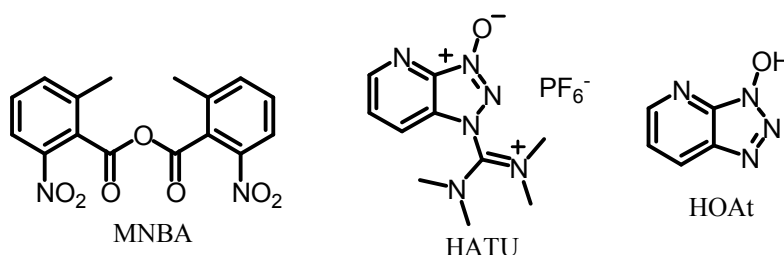


Figure 3-1-22

最後のジスルフィド結合はメタノール、ジクロロメタン混合溶媒においてヨウ素を作用

させることで速やかに形成され、スピルコスタチンAの全合成を達成することができた<sup>12)</sup>。  
 各種スペクトルデータは文献値とよい一致を示した (Figure 3-1-23)<sup>13)</sup>。

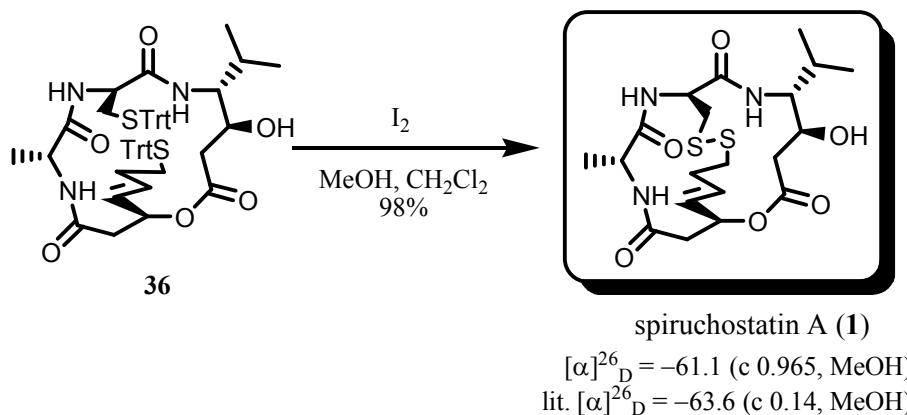


Figure 3-1-23

さらに、ジスルフィド結合形成とマクロラクトン化の順序を入れ替えた検討も行った。セコ酸 **7** は **7** のヨウ素処理により容易に得られたが、高極性のため単離が困難であった。マクロラクトン化は椎名法を検討したが、溶解度が低く DMF の添加が必須であった。何度か反応を行ったもののマクロラクトン化は進行しなかった。このことから **7** は環化に不利なコンフォメーションをとっていると考えられる (Figure 3-1-24)。

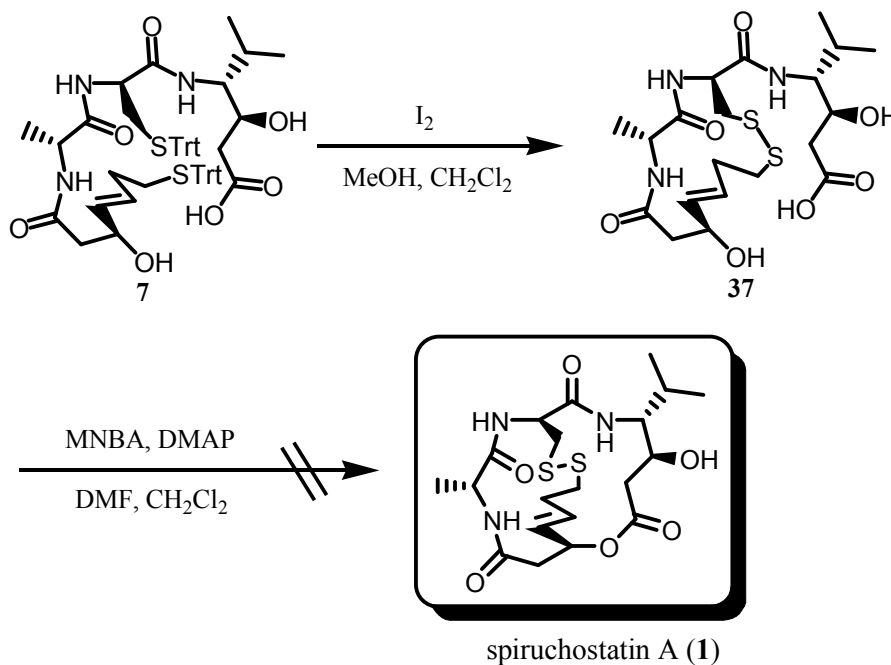


Figure 3- 1-24

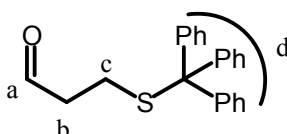
### 3-1-7 まとめ

本節ではスピルコスタチン A の液相での全合成について述べた。β - ヒドロキシ酸は Seebach らによって開発された不斉補助子を用いた不斉アルドール反応によって合成した。その際ジルコノセンジクロリドを添加し、エノラートの当量を調整することで高収率、高立体選択性でアルドール生成物を得ることに成功した。その後、スタチン誘導体を C 末端とし順次縮合を行っていくことでスピルコスタチン A のセコ酸誘導体を合成した。その際 C 末端の保護基として他の保護基とオルソゴナルなアリル基を選択することで副反応を起こすことなく合成することができた。環化反応は椎名法により高収率で行うことができた。最後にジスルフィド結合を形成することでスピルコスタチン A の全合成を達成した。ジスルフィド結合とマクロラクトン化の順序を入れ替えた場合、マクロラクトン化は進行しなかった。今後の固相合成によるライブラリー合成ではシステイン部位を変えた化合物も合成する予定であり、必ずしもジスルフィド結合による架橋が必要ではない。そのため固相上で縮合し、本手法と同様にマクロラクトン化を行った後、必要であれば脱保護、ジスルフィド結合形成という方法でライブラリー合成に適用できると期待できる。

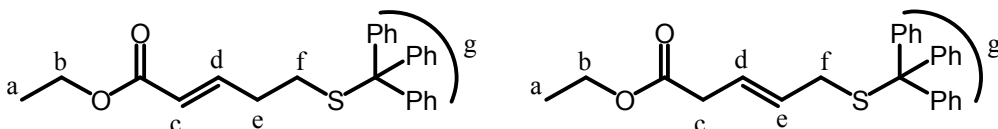
### Reference

- 1) Yurek-George, A.; Habens, F.; Brimmell, M.; Packham, G.; Ganesan, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1030
- 2) Evans, D. A.; Bartroli, J.; Shih, T. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2127
- 3) Li, K. W.; Wu, J.; Xing, W.; Simon, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7237
- 4) Chen, Y.; Gambs, C.; Abe, Y.; Wentworth, P. Jr.; Janda, K. D. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8902
- 5) (a) Hintermann, T.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta.* **1998**, *81*, 2093. (b) Brenner, M.; Vecchia, L. L.; Leutert, T.; Seebach, D. *Org. Synth.* **2003**, *80*, 57
- 6) List, B.; Doehring, A.; Fonseca, M. T. H.; Job, A.; Torres, R. R. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 476
- 7) (a) Dale, J. A.; Mosher, H. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512. (b) Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092.
- 8) Fukuzawa, S.; Matsuzawa, H.; Yoshimitsu, S. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1702
- 9) Brooks, D. W.; Lu, L. D. L.; Masamune, S. *Angew. Chem.* **1979**, *91*, 76
- 10) Shiina, I.; Kubota, M.; Ibuka, R. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7535
- 11) Inanaga, J.; Hirata, K.; Saeki, H.; Katsuki, T.; Yamaguchi, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, *52*, 1989
- 12) Doi, T.; Iijima, Y.; Ganesan, A.; Shin-ya, K.; Takahashi, T. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 1177.
- 13) Masuoka, Y.; Nagai, A.; Shin-ya, K.; Furihata, K.; Nagai, K.; Suzuki, K.; Hayakawa, Y.; Seto, H. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 41

**3-Tritylthiopropanal (18).** To a solution of tritylthiol (25 g, 90.4 mmol) and triethylamine (19 mL, 136 mmol) in dichloromethane (150 mL) was added acrolein (**15**) (9.1 mL, 136 mmol). After being stirred at room temperature for 30 min, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was recrystallized from hexane/diethyl ether to give 3-tritylthiopropanal (**18**) (25.3g, 76.0 mmol, 84%) as white solid. <sup>1</sup>H NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.56 (s, 1H, a), 7.44-7.19 (m, 15H, d), 2.50-2.37 (m, 4H, b, c); <sup>13</sup>C NMR (67.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 200.2, 144.5, 129.5, 127.9, 126.7, 66.9, 42.6, 24.4; IR (solid) 3065, 2968, 2935, 2889, 2840, 2742, 1960, 1728, 1687, 1594, 1490, 1445, 1386, 1346, 1321, 1036, 1008, 935, 886, 851, 744, 699, 677, 663, 621, 521, 507, 492 (cm<sup>-1</sup>).

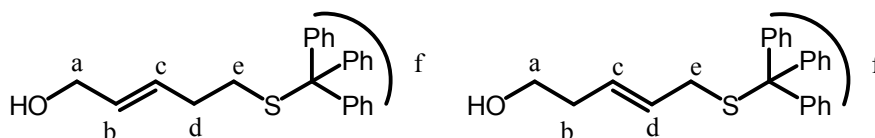


**Ethyl 5-tritylthio-2-pentenatate (16).** To a solution of monoethyl malonate (2.3 g, 17.4 mmol) and DMAP (177 mg, 1.45 mmol) in DMF (70 mL) was added 3-tritylthiopropanal (**18**) (4.8 g, 14.5 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred at 100 °C for 2 h. The reaction mixture was poured into 1 M HCl at 0 °C. The aqueous layer was extracted with diethyl ether. The combined organic layers were washed with water, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (5% ethyl acetate in hexane) to give ethyl 5-tritylthio-2-pentenatate (**16**) (5.0 g, 12.4 mmol, 86%) as a mixture with β,γ-unsaturated ester **17**. This mixture was used in the next reaction without further purification. α,β-unsaturated ester **16**: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.42-7.19 (m, 15H, g), 6.76 (dt, *J* = 15.5, 6.8 Hz, 1H, d), 5.69 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, c), 4.15 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H, b), 2.28 (dd, *J* = 8.2, 6.8 Hz, 2H, f), 2.17 (dt, *J* = 7.3, 6.8 Hz, 2H, e), 1.26 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, a); β,γ-unsaturated ester **17**: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.42-7.19 (m, 15H, g), 5.57 (dt, *J* = 15.4, 6.8 Hz, 1H, e), 5.44 (dt, *J* = 15.5, 7.3 Hz, 1H, d), 4.10 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, b), 2.96 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, f), 2.80 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, c), 1.24 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, a); IR (neat) 3057, 3030, 2980, 2929, 1720, 1655, 1595, 1489, 1444, 1368, 1270, 1182, 1143, 1082, 1034, 968, 851, 743, 700, 676, 622, 506 (cm<sup>-1</sup>).



**5-Tritylthio-2-penten-1-ol.** To a solution of ethyl 5-tritylthio-2-pentenatate (**16**) (560 mg, 1.39 mmol) in dichloromethane (7 mL) was added DIBAL (1.0 M in toluene, 3.1 mL, 3.06 mmol) at -78 °C and allowed to warm to room temperature. The reaction mixture was quenched with 10% aqueous

potassium sodium tartrate solution. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with 1 M HCl, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (30% ethyl acetate in hexane) to give 5-tritylthio-2-penten-1-ol (422 mg, 1.17 mmol, 84%) as a mixture with  $\beta,\gamma$ -unsaturated ester. This mixture was used in the next reaction without further purification. Allyl alcohol: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.42-7.18 (m, 15H, f), 5.55-5.43 (m, 2H, b, c), 4.03 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H, a), 2.22 (m, 2H, e), 2.09 (m, 2H, d); Homoallyl alcohol: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.42-7.18 (m, 15H, f), 5.55-5.43 (m, 2H, c, d), 3.58 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, a), 2.79 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H, e), 2.22 (m, 2H, b); IR (neat) 3368, 3056, 3029, 2925, 1955, 1595, 1489, 1444, 1319, 1218, 1184, 1157, 1083, 1034, 1002, 969, 885, 851, 743, 700, 676, 622, 506 (cm<sup>-1</sup>)



### 5-Tritylthio-2-pentenal (**13**).

#### Route A

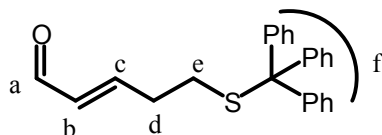
To a solution of oxalyl chloride (545  $\mu$ L, 6.39 mmol) in dichloromethane (15 mL) was added DMSO (910  $\mu$ L, 12.8 mmol) dropwise at  $-78$  °C. After being stirred at the same temperature for 30 min, a solution of 5-tritylthio-2-penten-1-ol (1.92 g, 5.33 mmol) in dichloromethane (10 mL) was added dropwise at  $-78$  °C and stirred at the same temperature for an additional 30 min. triethylamine (1.77 mL, 12.8 mmol) was added at  $-78$  °C and allowed to warm to  $-30$  °C. After being stirred for 3 h, the reaction mixture was quenched with 1 M HCl at 0 °C. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (5% ethyl acetate in hexane) and recrystallized from ethyl acetate/hexane to give 5-tritylthio-2-pentenal (**13**) (1.24 g, 3.45 mmol, 65%).

#### Route B

To a solution of 3-tritylthio-2-propanal (**18**) (5.80 g, 17.4 mmol) in toluene (50 mL) was added triphenylphosphoranylidene acetaldehyde (5.31 g, 17.4 mmol) and stirred at reflux for 5 h. The reaction mixture was concentrated *in vacuo*. Addition of ethyl acetate/hexane gave precipitation of triphenylphosphineoxide. The mixture was filtered and filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (5% ethyl acetate in hexane) and recrystallized from ethyl acetate/hexane to give 5-tritylthio-2-pentenal (**13**) (2.38 g, 6.64 mmol, 38%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.43 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, a), 7.43-7.20 (m, 15H, f), 6.63 (dt, *J* = 15.4,

6.3 Hz, 1H, c), 5.98 (dd,  $J = 15.4, 7.7$  Hz, 1H, b), 2.37-2.29 (m, 4H, d, e);  $^{13}\text{C}$  NMR (67.8 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  193.7, 155.7, 144.6, 133.6, 129.5, 128.0, 127.7, 126.8, 67.0, 31.7, 30.0; IR (solid) 3062, 2931, 2830, 2755, 1964, 1686, 1634, 1592, 1486, 1440, 1396, 1317, 1246, 1208, 1181, 1154, 1112, 1081, 1035, 984, 959, 886, 840, 814, 763, 741, 699, 672, 628, 617, 571, 519, 507, 477, 458 ( $\text{cm}^{-1}$ ).

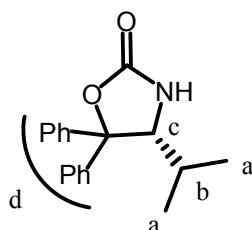


**(R)-4-Isopropyl-5,5-diphenyl-2-oxazolidinone (14).** To a solution of *N*-Boc-D-valine (**12**) (28.4 g, 131 mmol) and potassium hydrogencarbonate (26.2 g, 262 mmol) in DMF (150 mL) was added methyl iodide (12.2 mL, 196 mmol) at room temperature. After being stirred at the same temperature, the reaction mixture was quenched with water. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate and hexane. The combined organic layers were washed with water, 10 % aqueous  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  solution and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated *in vacuo*. The crude *N*-Boc-D-valine methyl ester was used in next reaction without further purification.

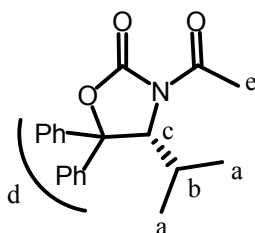
To a suspension of magnesium (8.31 g, 342 mmol) in THF (50 mL) was added bromobenzene (4 mL) at room temperature. After reaction was initiated, a solution of bromobenzene (32 mL, total 342 mmol) in THF (150 mL) was added at such a rate that gentle refluxing is maintained. After the addition was completed, the reaction mixture was stirred at reflux for 1 h. the reaction mixture was cooled to 0 °C and added a solution of *N*-Boc-D-valine methyl ester (crude 22.6 g) in THF (100 mL) at the same temperature. After the addition was completed, the reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 15 h. The reaction mixture was poured into saturated aqueous ammonium chloride solution. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated *in vacuo*. The crude *tert*-butyl (*R*)-[1-(hydroxydiphenylmethyl)-2-methylpropyl]carbamate was used in next reaction without further purification.

To a solution of *tert*-butyl (*R*)-[1-(hydroxydiphenylmethyl)-2-methylpropyl]carbamate (crude 26.9 g) in THF (300 mL) was added potassium *tert*-butoxide (10.2 g, 90.9 mmol) at 0 °C in one portion. A few minutes after a white solid was begun to precipitate. After being stirred at the same temperature for 2 h, the reaction mixture was poured into saturated aqueous ammonium chloride solution. The white solids were collected and washed with water. Methanol was added to the solids and suspension was stirred at reflux for 1 h. The mixture was allowed to cool to 0 °C and white solids were collected and washed with methanol and dried *in vacuo* to give (*R*)-4-isopropyl-5,5-diphenyl-2-oxazolidinone (**14**) (19.6 g, 64.4 mmol, 25% in 3 steps).  $^1\text{H}$  NMR (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.56-7.22 (m, 10H, d), 6.60 (brs, 1H, NH), 4.36 (d,  $J = 3.6$  Hz, 1H, c), 1.85 (m, 1H, b), 0.90 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, a), 0.69 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, a);  $^{13}\text{C}$  NMR

(67.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  158.7, 143.9, 139.2, 128.5, 128.2, 128.1, 127.7, 126.3, 125.7, 89.3, 65.8, 29.6, 20.8, 15.6; IR (solid) 3288, 2962, 1747, 1491, 1451, 1375, 1316, 1221, 1127, 1103, 1039, 1003, 944, 901, 849, 807, 767, 708, 640, 551, 524, 475 (cm<sup>-1</sup>); [ $\alpha$ ]<sup>24.4</sup><sub>D</sub> = +244.6 (c 0.510, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), [lit.<sup>a</sup> (enantiomer) [ $\alpha$ ]<sup>rt</sup><sub>D</sub> = -244 (c 0.61, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)].



**(R)-N-Acetyl-4-isopropyl-5,5-diphenyl-2-oxazolidinone (21).** To a suspension of (*R*)-4-isopropyl-5,5-diphenyl-2-oxazolidinone (**14**) (5.0 g, 17.8 mmol) in THF (30 mL) was added *n*-BuLi (1.6 M in hexane, 12.5 mL, 19.5 mmol) at 0 °C. After being stirred at the same temperature for 30 min, acetyl chloride (1.5 mL, 21.4 mmol) was added and stirred for 1 h. The reaction mixture was poured into saturated aqueous ammonium chloride solution. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was recrystallized ethyl acetate/hexane to give (*R*)-N-acetyl-4-isopropyl-5,5-diphenyl-2-oxazolidinone (**21**) (5.53 g, 17.1 mmol, 96%). <sup>1</sup>H NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.49-7.26 (m, 10H, d), 5.37 (d, *J* = 3.6 Hz, c), 2.43 (s, 3H, e), 1.97 (m, 1H, c), 0.88 (d, *J* = 6.9 Hz, a), 0.76 (d, *J* = 6.9 Hz, a); <sup>13</sup>C NMR (67.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170.0, 153.2, 142.3, 138.1, 128.9, 128.6, 128.4, 127.9, 125.9, 125.6, 89.3, 64.4, 29.9, 23.4, 21.7, 16.4; IR (solid) 2975, 1767, 1715, 1600, 1494, 1465, 1450, 1365, 1323, 1268, 1219, 1159, 1126, 1090, 1044, 994, 953, 928, 905, 846, 817, 772, 708, 693, 664, 645, 625, 614, 591, 561, 527, 476 (cm<sup>-1</sup>); [ $\alpha$ ]<sup>26.1</sup><sub>D</sub> = +241.69 (c 1.165, CHCl<sub>3</sub>).



**(E)-S-3-Hydroxy-1-[(R)-4-isopropyl-5,5-diphenyl-2-oxazolidinone-3-yl]-7-tritylthiohept-4-en-1-one (19).**

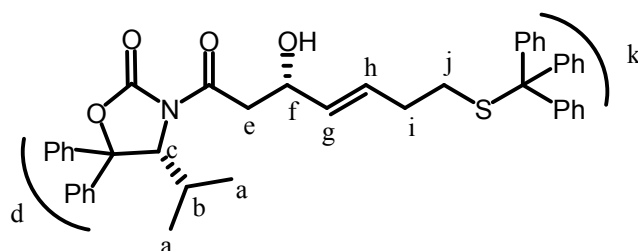
**Li enolate:** To a solution of (*R*)-N-acetyl-4-isopropyl-5,5-diphenyl-2-oxazolidinone (**21**) (100 mg, 0.309 mmol) in THF (0.5 mL) was added *n*-BuLi (1.6 M in hexane, 218  $\mu$ L, 0.340 mmol) at -78 °C. After

<sup>a</sup> Brenner, M.; Vecchia, L. L.; Leutert, T.; Seebach, D. *Org. Synth.* **2003**, *80*, 57.

being stirred at the same temperature for 30 min, a solution of 5-tritylthio-2-pentenal (**13**) (122 mg, 0.340 mmol) in THF (1 mL) was added. After being stirred for 30 s, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous ammonium chloride solution at  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  solution and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (30% ethyl acetate in hexane) to give (*E*)-(*S*)-3-hydroxy-1-[(*R*)-4-isopropyl-5,5-diphenyl-2-oxazolidinone-3-yl]-7-tritylthiohept-4-en-1-one (**19**) (181 mg, 0.266 mmol, 86%, dr = 78 : 22 determined by  $^1\text{H}$  NMR).

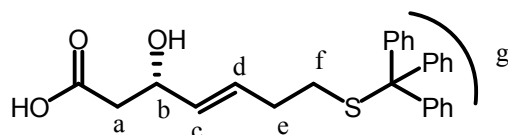
**Zr enolate:** To a solution of (*R*)-*N*-acetyl-4-isopropyl-5,5-diphenyl-2-oxazolidinone (**21**) (226 mg, 0.697 mmol) in THF (1.5 mL) was added *n*-BuLi (1.6 M in hexane, 453  $\mu\text{L}$ , 0.725 mmol) at  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . After being stirred for 30 min at the same temperature, a zirconocene dichloride solution in THF (7 mL) was added and stirred for another 30 min. The reaction mixture was allowed to warm to  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  and added a solution of 5-tritylthio-2-pentenal (**13**) (100 mg, 0.279 mmol) in THF (1.5 mL) at the same temperature. After being stirred for 1 h at the same temperature, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous ammonium chloride solution. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  solution and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (30% ethyl acetate in hexane) to give (*E*)-(*S*)-3-hydroxy-1-[(*R*)-4-isopropyl-5,5-diphenyl-2-oxazolidinone-3-yl]-7-tritylthiohept-4-en-1-one (**19**) (177.6 mg, 0.260 mmol, 93% dr = 85 : 15 determined by  $^1\text{H}$  NMR).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.45-7.15 (m, 25H, d, k), 5.49 (dt,  $J = 15.0, 6.8$  Hz, 1H, h), 5.37 (m, 2H, c, g), 4.47 (m, 1H, f), 3.15 (dd,  $J = 16.9, 2.9$  Hz, 1H, e), 2.82 (dd,  $J = 16.9, 8.2$  Hz, 1H, e), 2.17 (dd,  $J = 7.7, 7.3$  Hz, 2H, j), 2.00 (m, 3H, b, i), 0.87 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, a), 0.74 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, a);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.6, 152.8, 144.8, 142.0, 137.9, 131.7, 129.9, 129.5, 128.8, 128.6, 128.3, 128.1, 127.9, 127.7, 126.4, 125.7, 125.4, 89.4, 68.4, 66.4, 64.4, 42.2, 31.3, 29.8, 21.7, 16.2; IR (neat) 3509, 3060, 3030, 2965, 2927, 2853, 1785, 1699, 1596, 1493, 1466, 1449, 1367, 1319, 1211, 1176, 1094, 1035, 1002, 986, 845, 701, 667, 617, 506 ( $\text{cm}^{-1}$ );  $[\alpha]_{\text{D}}^{25.8} = +85.4$  (c 0.805,  $\text{CHCl}_3$ ).

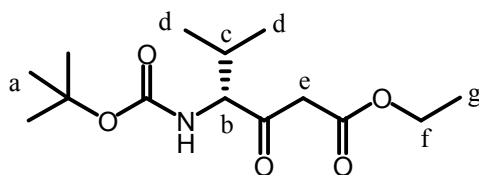


**(*E*)-(*S*)-3-Hydroxy-7-tritylthio-4-heptenoic acid (**11**).** To a solution of (*E*)-(*S*)-3-hydroxy-1-[(*R*)-4-isopropyl-5,5-diphenyl-2-oxazolidinone-3-yl]-7-tritylthiohept-4-en-1-one (**19**) (590 mg, 0.866

mmol) in THF (1.5 mL) and methanol (1.5 mL) was added 1 M aqueous sodium hydroxide solution (1.73 mL, 1.73 mmol) at 0 °C. After being stirred for 1 h, reaction mixture was filtered and washed with 1 M aqueous sodium hydroxide solution and methanol. The filtrate was quenched 3 M HCl at 0 °C. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was recrystallized from ethyl acetate/hexane to give (*E*)-(*S*)-3-hydroxy-7-tritylthio-4-heptenoic acid (**11**) (275.8 mg, 0.659 mmol, 76%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.41-7.19 (m, 15H, g), 5.59 (ddd, *J* = 15.5, 6.8, 6.3 Hz, 1H, d), 5.42 (dd, *J* = 15.5, 6.3 Hz, 1H, c), 4.45 (m, 1H, b), 2.55 (m, 2H, a), 2.21 (m, 2H, f), 2.09 (m, 2H, e); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 176.5, 144.9, 131.6, 130.7, 129.6, 127.9, 126.6, 68.5, 66.6, 41.1, 31.4, 31.3; IR (neat) 3417, 3056, 3030, 2925, 1713, 1595, 1489, 1444, 1280, 1183, 1101, 1083, 1034, 1002, 972, 743, 700, 676, 621, 506 (cm<sup>-1</sup>); [α]<sub>D</sub><sup>24.6</sup> = -4.99 (c 1.55, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) [lit.<sup>b</sup> [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -5.0 (c 2.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)]; HRMS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>26</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub>S+Na]<sup>+</sup> 441.1500, found 441.1495.

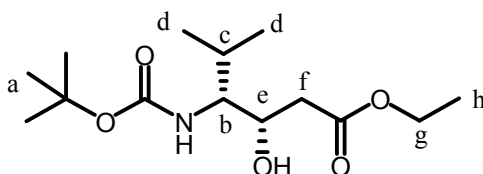


**Ethyl (*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-keto-5-methylhexanoate (27).** To a solution of *N*-Boc-D-valine (**12**) (7.68 g, 35.3 mmol) in THF (100 mL) was added CDI (6.90 g, 42.4 mmol). After being stirred at room temperature for 1 h, magnesium ethyl malonate (12.1 g, 42.4 mmol) was added and stirred for 12 h. The reaction mixture was poured into saturated aqueous ammonium chloride solution. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (15% ethyl acetate in hexane) to give ethyl (*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-keto-5-methylhexanoate (**27**) (4.90 g, 17.0 mmol, 48%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.07 (d, *J* = 8.7 Hz, NH), 4.34 (m, 1H, b), 4.20 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, f), 3.54 (s, 2H, e), 2.24 (m, 1H, c), 1.45 (s, 9H, a), 1.28 (m, 3H, g), 1.03-0.82 (m, 6H, d); <sup>13</sup>C NMR (67.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 202.1, 166.6, 155.8, 79.8, 64.3, 61.4, 47.0, 29.4, 28.2, 19.7, 16.6, 14.0; IR (neat) 3363, 2976, 2935, 2877, 1719, 1655, 1500, 1392, 1368, 1313, 1247, 1164, 1095, 1033, 964, 928, 871, 807, 758, 594, 488, 477, 471, 459 (cm<sup>-1</sup>); [α]<sub>D</sub><sup>26.4</sup> = -16.8 (c 2.71, CHCl<sub>3</sub>).

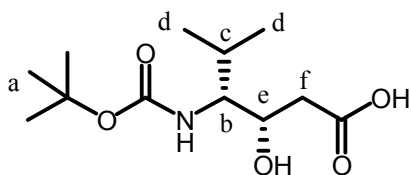


<sup>b</sup> Li, K. W.; Wu, J.; Xing, W.; Simon, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7237.

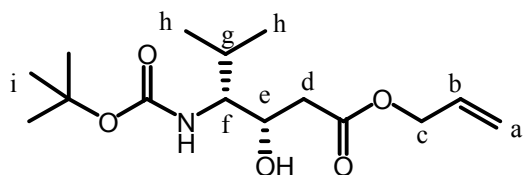
**Ethyl (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoate (28).** To a solution of (*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-keto-5-methylhexanoate (**27**) (4.90 g, 17.0 mmol) in methanol (100 mL) was added potassium borohydride (3.2 g, 59.6 mmol) at  $-78$  °C. The reaction mixture was allowed to warm to 0 °C slowly. The reaction mixture was quenched with acetic acid at 0 °C and concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with ethyl acetate and water. The organic layer was washed with 1 M HCl, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (20% ethyl acetate in hexane) to give ethyl (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoate (**28**) (4.12 g, 14.2 mmol, 84%, diastereomer mixture). Major isomer: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.47 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H, NH), 4.17 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, g), 3.93 (m, 1H, e), 3.38 (s, 1H, OH), 2.75-2.46 (m, 2H, f), 2.14 (m, 1H, c), 1.44 (s, 9H, a), 1.28 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, h), 0.94 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, d), 0.88 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, d); <sup>13</sup>C NMR (67.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.2, 156.3, 79.4, 69.1, 60.7, 58.7, 38.4, 28.3, 27.4, 20.1, 16.1, 14.1; IR (neat) 3370, 2966, 2875, 1693, 1522, 1466, 1368, 1249, 1171, 1068, 1039, 985, 868, 784, 755, 605, 463 (cm<sup>-1</sup>); [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> =  $-10.3$  (c 1.12, CHCl<sub>3</sub>, 25.8 °C). C3 epimer: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.90 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H, NH), 4.26 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, b), 4.17 (q, *J* = 7.3, 2H, g), 3.38 (s, 1H, OH), 3.15 (m, 1H, e), 2.58-2.42 (m, 2H, f), 1.44 (s, 9H, a), 1.28 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, h), 0.97 (dd, *J* = 6.8, 6.7 Hz, 6H, d); <sup>13</sup>C NMR (67.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.5, 156.4, 79.0, 67.0, 60.8, 59.6, 39.1, 30.3, 28.3, 19.7, 19.5, 14.1; IR (neat) 3448, 2977, 1718, 1691, 1508, 1368, 1247, 1174, 1023 (cm<sup>-1</sup>); [α]<sub>D</sub><sup>24.8</sup> =  $+48.2$  (c 0.565, CHCl<sub>3</sub>).



**(3*S*,4*R*)-4-*tert*-Butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (29).** To a solution of ethyl (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoate (**28**) (4.12 g, 14.2 mmol) in THF (30 mL) was added lithium hydroxide mono hydrate (896 mg, 21.3 mmol) in water (30 mL) at 0 °C. After being stirred at room temperature, the reaction mixture was quenched with 1 M HCl at 0 °C. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was recrystallized from ethyl acetate/hexane to give (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (**29**) (2.8 g, 10.7 mmol, 75%). <sup>1</sup>H NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.52 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, NH), 3.98 (m, 1H, b), 3.54 (m, 1H, e), 2.64-2.46 (m, 2H, f), 2.05 (m, 1H, c), 1.45 (s, 9H, a), 0.96 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, d), 0.91 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, d); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 176.4, 156.8, 80.1, 69.1, 59.0, 37.8, 28.2, 27.6, 19.9, 16.5; IR (neat) 3220, 2960, 2674, 1689, 1509, 1428, 1390, 1365, 1298, 1248, 1171, 1065, 982, 886, 773, 746, 631, 557, 476 (cm<sup>-1</sup>); [α]<sub>D</sub><sup>25.8</sup> =  $-9.02$  (c 0.530, CHCl<sub>3</sub>).

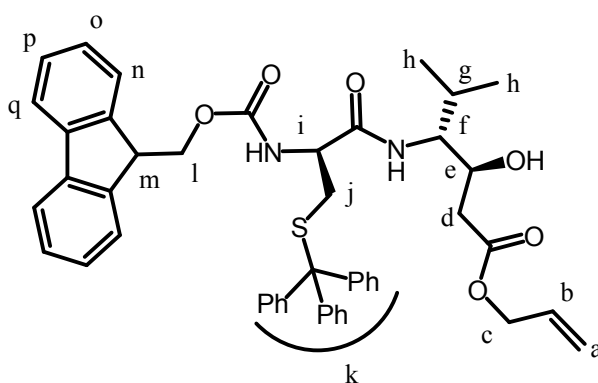


**Allyl (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoate (8).** To a solution of (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (**29**) (6.80 g, 26.0 mmol) in DMF was added potassium carbonate (2.16 g, 15.6 mmol) and allyl bromide (3.3 mL, 39.0 mmol). After being stirred at room temperature for 3 h, the reaction mixture was poured into 1 M HCl at 0 °C. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (20% ethyl acetate in hexane) to give allyl (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoate (**8**) (7.13 g, 23.6 mmol, 91%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.87 (m, 1H, b), 5.28 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H, a), 5.20 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H, a), 4.57 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, c), 4.48 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, NH), 3.91 (brs, 1H, f), 3.49 (m, 1H, e), 3.40 (brs, 1H, OH), 2.61-2.43 (m, 2H, d), 2.10 (m, 1H, g), 1.39 (s, 9H, i), 0.89 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, h), 0.83 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, h); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.7, 156.3, 131.8, 118.4, 79.4, 69.1, 65.3, 58.8, 38.5, 28.2, 27.4, 20.0, 16.1; IR (neat) 3374, 2964, 1719, 1693, 1524, 1367, 1251, 1172, 987 (cm<sup>-1</sup>); [α]<sup>25.2</sup><sub>D</sub> = -6.10 (c 1.21, CHCl<sub>3</sub>).



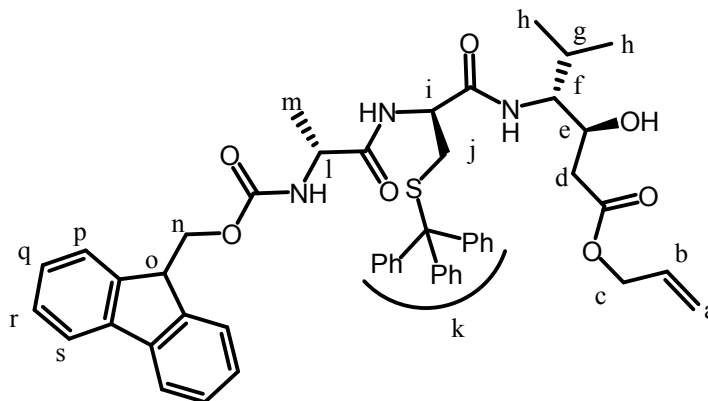
**Allyl (3*S*,4*R*)-4-[(*S*)-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-tritylthiopropionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoate (30).** Allyl (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoate (**8**) (50.3 mg, 0.167 mmol) was treated with HCl (4 M in ethyl acetate, 1 mL) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, the solution was concentrated *in vacuo*. The crude amine was dissolved in DMF (1 mL) and added Fmoc-D-Cys(Trt)-OH (**9**) (117 mg, 0.200 mmol), HOBt (34 mg, 0.250 mmol), DIEA (116 μL, 0.668 mmol) and EDCI·HCl (48 mg, 0.250 mmol) at 0 °C. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 1 h. The reaction mixture was quenched with saturated aqueous ammonium chloride solution. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with 1 M HCl, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (25% ethyl acetate in hexane) to give allyl (3*S*,4*R*)-4-[(*S*)-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-tritylthiopropionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoate (**30**) (107.5 mg, 0.140 mmol, 84%). <sup>1</sup>H NMR

(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.74 (m, 2H, q), 7.54 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H, n), 7.43-7.18 (m, 19H, k, o, p), 5.83 (m, 2H, b, NH), 5.27 (d,  $J = 17.4$  Hz, 1H, a), 5.19 (d,  $J = 10.2$  Hz, 1H, a), 4.94 (m, 1H, NH), 4.54 (brs, 2H, c), 4.40 (m, 2H, l), 4.17 (m, 1H, m), 3.88 (m, 1H, e), 3.78 (m, 1H, f), 3.70 (m, 1H, i), 3.27 (brs, 1H, OH), 2.65 (d,  $J = 6.8$  Hz, 2H, j), 2.54 (d,  $J = 16.4$  Hz, 1H, d), 2.40 (dd,  $J = 16.4, 9.2$  Hz, 1H, d), 2.08 (m, 1H, g), 0.81 (m, 6H, h); <sup>13</sup>C NMR (67.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  172.4, 170.7, 155.8, 144.1, 143.4, 143.3, 141.0, 131.6, 129.2, 127.8, 127.5, 126.8, 126.6, 124.7, 119.7, 118.1, 68.4, 67.0, 66.8, 65.1, 57.3, 53.9, 46.7, 38.3, 33.2, 27.1, 19.9, 16.0; IR (neat) 3315, 3061, 3010, 2961, 2928, 1718, 1664, 1595, 1528, 1464, 1448, 1370, 1318, 1260, 1179, 1116, 1033, 988, 935, 856, 803, 740, 702, 676, 665, 621, 505, 477, 470, 464, 454 (cm<sup>-1</sup>);  $[\alpha]_{\text{D}}^{24.4} = +1.67$  (c 0.555, CHCl<sub>3</sub>).



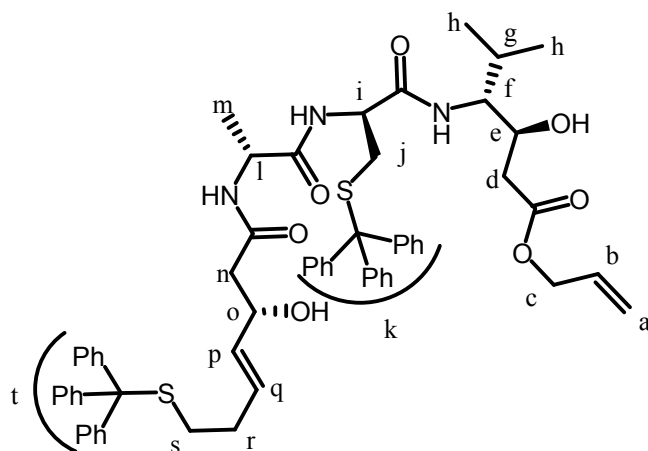
**Allyl (3*S*,4*R*)-4-[(*S*)-2-[(*R*)-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)propionylamino]-3-tritylthiopropionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoate (34).** To a solution of allyl (3*S*,4*R*)-4-[(*S*)-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-tritylthiopropionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoate (**30**) (107.5 mg, 0.140 mmol) in dichloromethane (7 mL) was added diethylamine (7 mL). After being stirred at room temperature for 3 h, the solvent was removed. The crude amine was diluted with chloroform and toluene and concentrated *in vacuo*. To a solution of crude amine in DMF (1 mL) was added Fmoc-D-Ala-OH (**10**) (52 mg, 0.168 mmol), HOBt (28 mg, 0.210 mmol), EDCl·HCl (40 mg, 0.210 mmol) and stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was quenched with saturated aqueous ammonium chloride solution. The aqueous layer was extracted with chloroform. The organic layer was washed with 1 M HCl, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (30% ethyl acetate in hexane) to give allyl (3*S*,4*R*)-4-[(*S*)-2-[(*R*)-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-propionylamino]-3-tritylthiopropionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoate (**34**) (82.1 mg, 0.0977 mmol, 70%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.76 (d,  $J = 7.7$  Hz, 2H, s), 7.51 (m, 2H, p), 7.42-7.12 (m, 19H, k, q, r), 6.20 (m, 2H, NH), 5.87 (m, 1H, b), 5.30 (d,  $J = 18.3$  Hz, 1H, a), 5.20 (d,  $J = 10.6$  Hz, 1H, a), 5.08 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, NH), 4.57 (d,  $J = 4.3$  Hz, 2H, c), 4.37 (m, 2H, n), 4.15-3.99 (m, 4H, e, i, l, o), 3.84 (m, 1H, f), 2.94 (m, 1H, j), 2.60-2.39 (m, 3H, j, d), 2.12 (m, 1H, g), 1.27 (m, 3H, m), 0.89 (m, 6H, h); <sup>13</sup>C NMR (67.8 MHz,

CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  172.7, 172.2, 170.3, 156.0, 144.2, 143.7, 143.4, 141.20, 141.17, 131.8, 129.3, 128.0, 127.7, 127.0, 126.8, 124.9, 119.9, 118.2, 68.8, 67.1, 67.0, 65.2, 57.7, 52.5, 50.7, 46.9, 38.3, 32.9, 29.4, 20.1, 18.5, 16.5; IR (solid) 3300, 3059, 2963, 1702, 1646, 1534, 1447, 1220, 1175, 1113, 1077, 932, 876, 772, 740, 699, 675, 622, 543, 506 (cm<sup>-1</sup>);  $[\alpha]^{16.2}_D = +1.554$  (c 1.915, CHCl<sub>3</sub>).

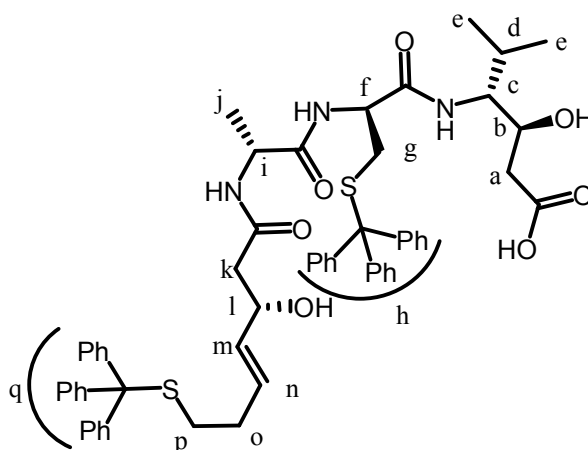


**Allyl (3*S*,4*R*)-4-[(*S*)-2-[(*R*)-2-[(*E*)-(*S*)-3-hydroxy-7-tritylthio-4-heptenoylamino]propionylamino]-3-tritylthiopropionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoate (35).** To a solution of allyl (3*S*,4*R*)-4-[(*S*)-2-[(*R*)-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-propionylamino]-3-tritylthiopropionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoate (**34**) (138.7 mg, 0.165 mmol) in acetonitrile (16.5 mL) was added diethylamine (826  $\mu$ L). After being stirred at room temperature for 3 h, the solvent was removed. The crude amine was diluted with chloroform and toluene and concentrated *in vacuo*. To a solution of crude amine in dichloromethane (4.1 mL) and acetonitrile (4.1 mL) was added (*E*)-(*S*)-3-hydroxy-7-tritylthio-4-heptenoic acid (**11**) (76 mg, 0.182 mmol), DIEA (87  $\mu$ L, 0.496 mmol), and PyBOP (129 mg, 0.248 mmol). After being stirred at room temperature for 3 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous ammonium chloride solution. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (2% methanol in chloroform) to give allyl (3*S*,4*R*)-4-[(*S*)-2-[(*R*)-2-[(*E*)-(*S*)-3-hydroxy-7-tritylthio-4-heptenoylamino]propionylamino]-3-tritylthiopropionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoate (**35**) (109.4 mg, 0.107 mmol, 65%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.42-7.16 (m, 30H, k, t), 7.00 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, NH), 6.16 (m, 2H, NH), 5.85 (m, 1H, b), 5.42 (m, 1H, q), 5.34-5.18 (m, 3H, a, p), 4.56 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, c), 4.35-4.25 (m, 2H, l, o), 4.13-4.00 (m, 2H, e, i), 3.80 (m, 1H, f), 2.71 (dd, *J* = 12.6, 7.3 Hz, 1H, j), 2.58 (d, *J* = 14.5 Hz, 1H, d), 2.48-2.40 (m, 2H, d, j), 2.30 (dd, *J* = 13.0, 2.4 Hz, 1H, n), 2.22-2.12 (m, 3H, n, s), 2.09-2.04 (m, 3H, g, r), 1.33 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H, m), 0.87 (d, *J* = 10.6 Hz, 6H, h); <sup>13</sup>C NMR (67.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  172.7, 172.2, 171.8, 170.6, 144.8, 144.2, 132.4, 131.9, 130.2, 129.5, 129.4, 128.1, 127.9, 126.9, 126.6, 118.3, 69.7, 68.7, 66.9, 66.6, 65.3, 58.0, 52.7, 49.9, 43.8, 38.1, 33.0, 31.3, 31.2, 27.7, 20.1, 17.5, 16.9; IR (solid) 3275, 3084, 3061, 3029, 2972, 2956, 2930, 1733, 1689, 1679, 1654, 1619, 1531, 1489, 1444, 1392, 1369, 1345, 1319,

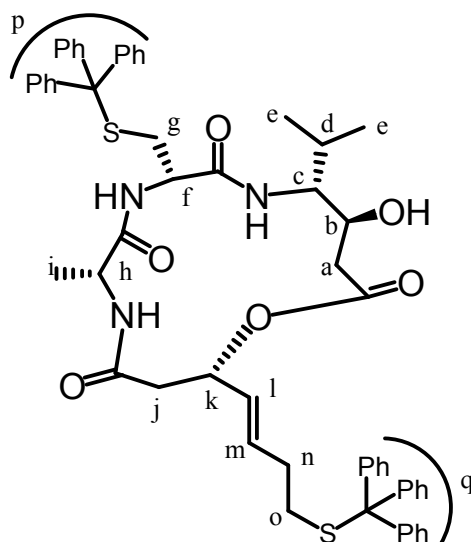
1295, 1220, 1183, 1167, 1119, 1076, 1034, 1001, 988, 931, 886, 865, 772, 700, 675, 622, 505, 487, 456 (cm<sup>-1</sup>); [ $\alpha$ ]<sup>26.5</sup><sub>D</sub> = +18.8 (c 0.41, MeOH).



**(3*S*,4*R*)-4-[(*S*)-2-[(*R*)-2-[(*E*)-(*S*)-3-Hydroxy-7-tritylthio-4-heptenoylamino]propionylamino]-3-tritylthiopropionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (7).** To a solution of allyl (3*S*,4*R*)-4-[(*S*)-2-[(*R*)-2-[(*E*)-(*S*)-3-hydroxy-7-tritylthio-4-heptenoylamino]propionylamino]-3-tritylthiopropionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoate (**35**) (34 mg, 0.0333 mmol) in methanol (1 mL) was added morpholine (6  $\mu$ L, 0.0666 mmol) and tetrakis(triphenyl)phosphinepalladium (3.8 mg, 0.00333 mmol). After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (5% methanol in chloroform) to give (3*S*,4*R*)-4-[(*S*)-2-[(*R*)-2-[(*E*)-(*S*)-3-hydroxy-7-tritylthio-4-heptenoylamino]propionylamino]-3-tritylthiopropionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (**7**) (28.2 mg, 0.0288 mmol, 87%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.42-7.16 (m, 30H, h, q), 6.48 (m, 2H, NH), 5.37 (m, 2H, m, n), 4.33 (m, 1H, l), 4.26 (m, 1H, i), 4.11 (m, 1H, f), 4.05 (m, 1H, b), 3.79 (m, 1H, c), 2.77 (m, 1H, g), 2.56-2.05 (m, 10H, a, d, g, k, o, p), 1.36 (brs, 3H, j), 0.90 (m, 6H, e); <sup>13</sup>C NMR (67.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  174.5, 172.9, 172.3, 171.1, 144.8, 144.1, 132.1, 130.7, 129.6, 129.3, 128.2, 127.9, 127.3, 127.0, 126.7, 69.9, 68.8, 67.0, 66.7, 58.7, 53.3, 50.4, 43.8, 37.4, 32.8, 31.3, 29.7, 27.8, 20.1, 17.5, 17.4; IR (neat) 3280, 3058, 2926, 1711, 1638, 1535, 1490, 1440, 1183, 1034, 751, 700, 622 (cm<sup>-1</sup>); [ $\alpha$ ]<sup>20.2</sup><sub>D</sub> = -21.9 (c 0.295, CHCl<sub>3</sub>); HRMS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>58</sub>H<sub>63</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup> 978.4186, found 978.4199.



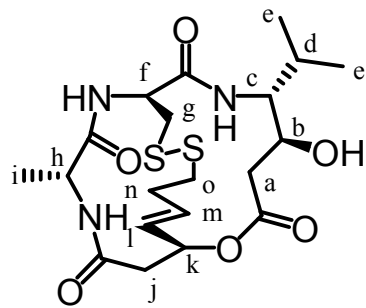
**(2*S*,6*R*,9*S*,12*R*,13*S*)-12-Isopropyl-13-hydroxy-6-methyl-2-[(*E*)-4-tritylthiomethyl-2-butenyl]-9-tritylthiomethyl-1-oxa-5,8,11-triaza-cyclopentadecane-4,7,11,15-tetraone (36).** To a solution of MNBA (10 mg, 0.0281 mmol) and DMAP (7 mg, 0.0562 mmol) in dichloromethane (5 mL) was added (3*S*,4*R*)-4-[(*S*)-2-[(*R*)-2-[(*E*)-(*S*)-3-hydroxy-7-tritylthio-4-heptenoylamino]propionylamino]-3-tritylthiopropionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (**7**) (22.9 mg, 0.0234 mmol) in dichloromethane (20 mL) dropwise slowly. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (2% methanol in chloroform) to give (2*S*,6*R*,9*S*,12*R*,13*S*)-12-isopropyl-13-hydroxy-6-methyl-2-[(*E*)-4-tritylthiomethyl-2-butenyl]-9-tritylthiomethyl-1-oxa-5,8,11-triaza-cyclopentadecane-4,7,11,15-tetraone (**36**) (20.1 mg, 0.0209 mmol, 89%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.42-7.19 (m, 30H, p, q), 5.65-5.58 (m, 2H, k, m), 5.31 (dd, *J* = 15.5, 6.8 Hz, 1H, l), 4.23 (m, 2H, f, h), 3.74 (brs, 1H, c), 3.17 (m, 1H, b), 2.61-2.40 (m, 6H, a, j, g), 2.18 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, o), 2.04 (m, 3H, d, n), 1.34 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H, i), 0.90 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, e), 0.84 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, e); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.5, 171.6, 170.7, 170.0, 144.8, 144.4, 137.3, 136.0, 132.6, 129.8, 129.5, 128.0, 127.8, 126.9, 126.8, 126.6, 121.7, 71.1, 68.1, 66.8, 66.6, 60.2, 49.7, 41.3, 37.3, 31.7, 31.3, 31.1, 28.6, 20.3, 19.3, 19.1, 18.0; IR (neat) 3289, 3059, 3017, 2963, 2929, 1728, 1666, 1542, 1490, 1445, 1371, 1217, 1182, 1035, 1001, 752, 701, 667, 622, 506 (cm<sup>-1</sup>); [α]<sub>D</sub><sup>24.0</sup> = -20.8 (c 0.605, CHCl<sub>3</sub>); HRMS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>58</sub>H<sub>61</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup> 960.4080, found 960.4084

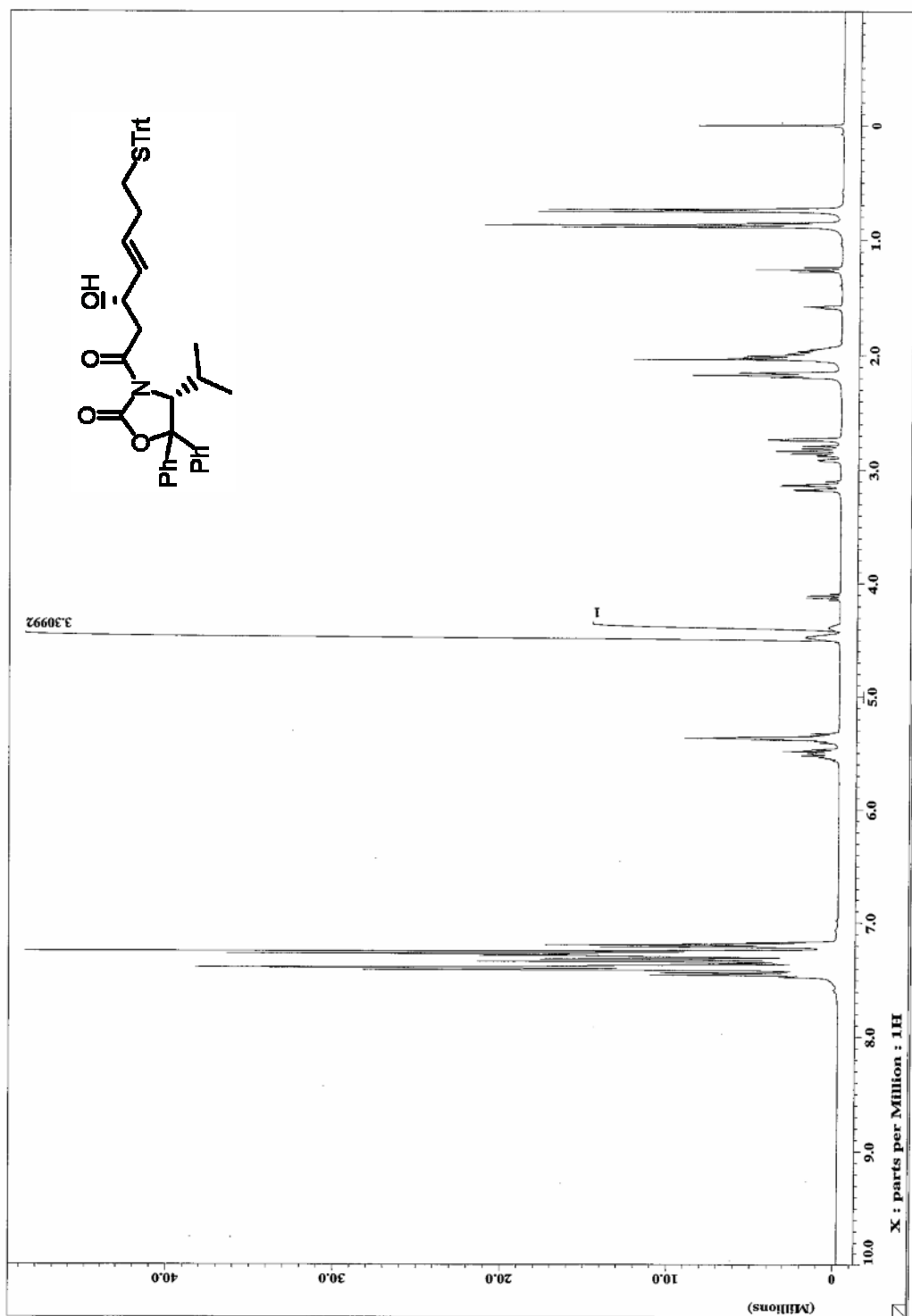


**Spiruchostatin A (1).** To a solution of iodine (106 mg, 0.417 mmol) in dichloromethane (108 mL) and methanol (12 mL) was added (2*S*,6*R*,9*S*,12*R*,13*S*)-12-isopropyl-13-hydroxy-6-methyl-2-[(*E*)-4-tritylthiomethyl-2-butenyl]-9-tritylthiomethyl-1-oxa-5,8,11-triaza-cyclopentadecane-4,7,11,15-tetraone (**36**) (40 mg, 0.0417 mmol) in dichloromethane (36 mL) and methanol (4 mL) at room temperature dropwise. After being stirred at room temperature for 30 min, the reaction mixture was quenched with 10% aqueous Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> solution. The solvent was removed and diluted with dichloromethane. The aqueous layer was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (1% methanol in chloroform) to give spiruchostatin A (**1**) (19.3 mg, 0.0389 mmol, 98%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz CDCl<sub>3</sub>) δ 7.39 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, NH), 6.72 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, NH), 6.39 (m, 1H, m), 5.93 (brs, 1H, NH), 5.66 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, l), 5.50 (brs, 1H, k), 4.92 (dt, *J* = 9.2, 3.8 Hz, 1H, f), 4.57 (m, 1H, b), 4.27 (dq, *J* = 7.3, 3.9 Hz, 1H, h), 3.37 (m, 2H, j, o), 3.23 (m, 1H, g), 3.15 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, g), 2.77-2.69 (m, 5H, a, c, n, o), 2.57 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H, j), 2.50-2.35 (m, 2H, d, n), 1.51 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H, i), 1.03 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, e), 0.93 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, e); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz CDCl<sub>3</sub>) δ 172.1, 171.2, 171.1, 169.3, 132.7, 129.6, 71.1, 68.7, 62.5, 56.1, 52.3, 40.9 × 2, 39.7, 39.3, 32.6, 29.9, 20.5, 19.8, 16.3; IR (neat) 3328, 2964, 2933, 1730, 1661, 1543, 1432, 1370, 1274, 1162, 1043, 985, 754, 666, 565 (cm<sup>-1</sup>); [α]<sup>24.6</sup><sub>D</sub> = -61.1 (c 0.965, MeOH) [lit.<sup>c</sup> [α]<sup>26</sup><sub>D</sub> = -63.6 (c 0.14, MeOH), lit.<sup>d</sup> [α]<sup>26</sup><sub>D</sub> = -61.1 (c 0.14, MeOH)]; HRMS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>20</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>+Na]<sup>+</sup> 496.1552, found 496.1547.

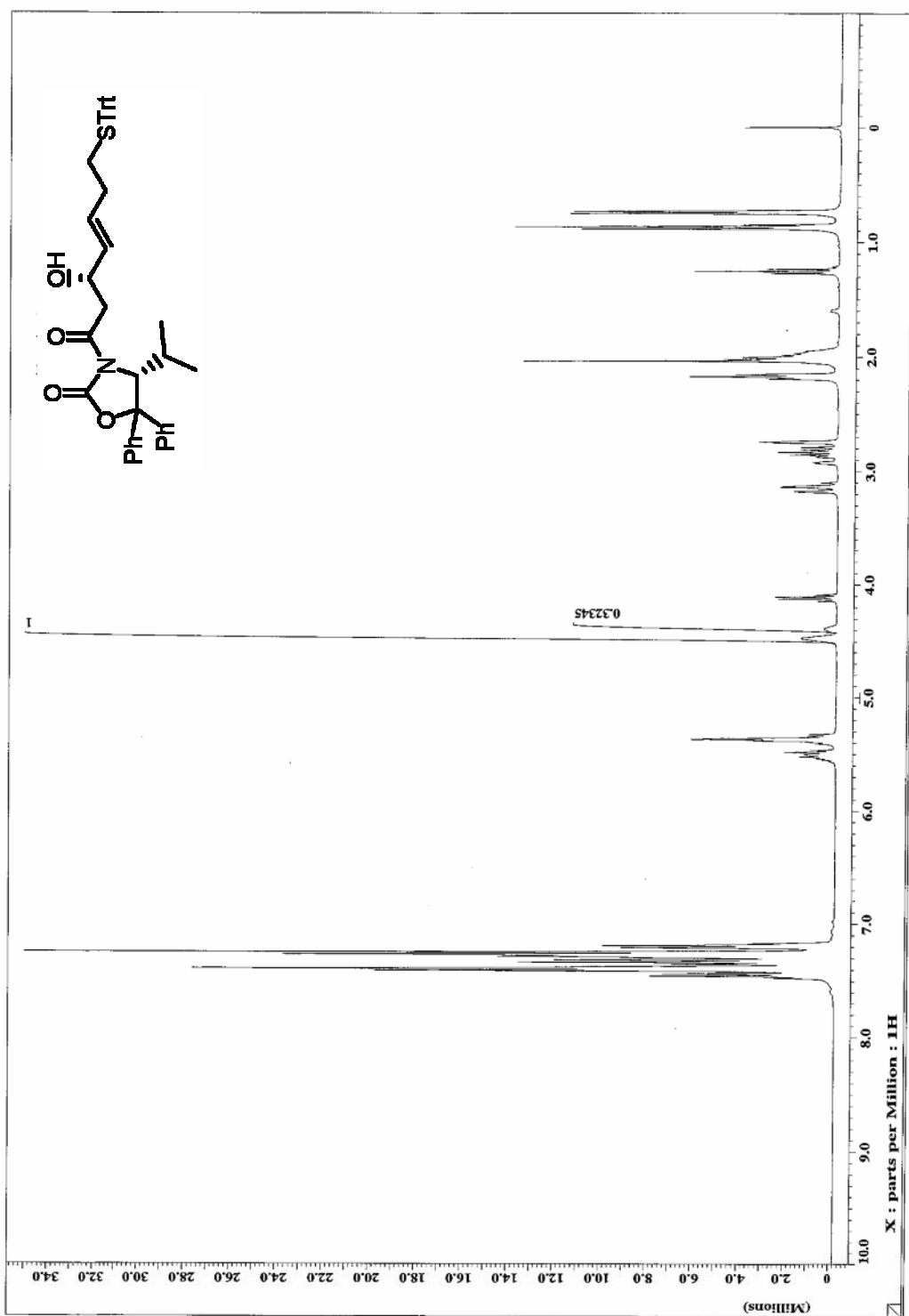
<sup>c</sup> Masuoka, Y.; Nagai, A.; Shin-ya, K.; Furihata, K.; Nagai, K.; Suzuki, K.; Hayakawa, Y.; Seto, H. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 41.

<sup>d</sup> Yurek-George, A.; Habens, F.; Brimmell, M.; Packham, G.; Ganesan, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1030.

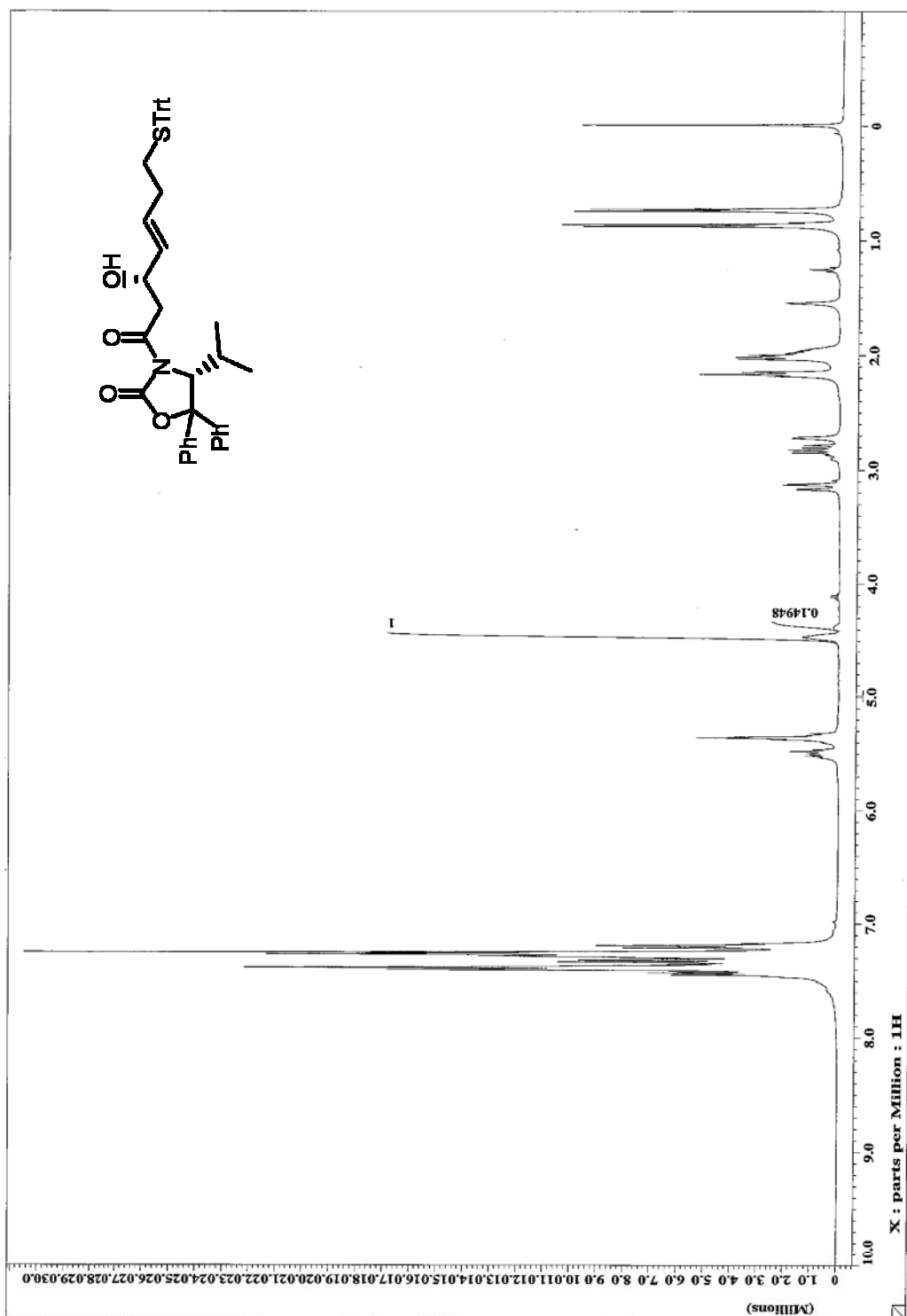




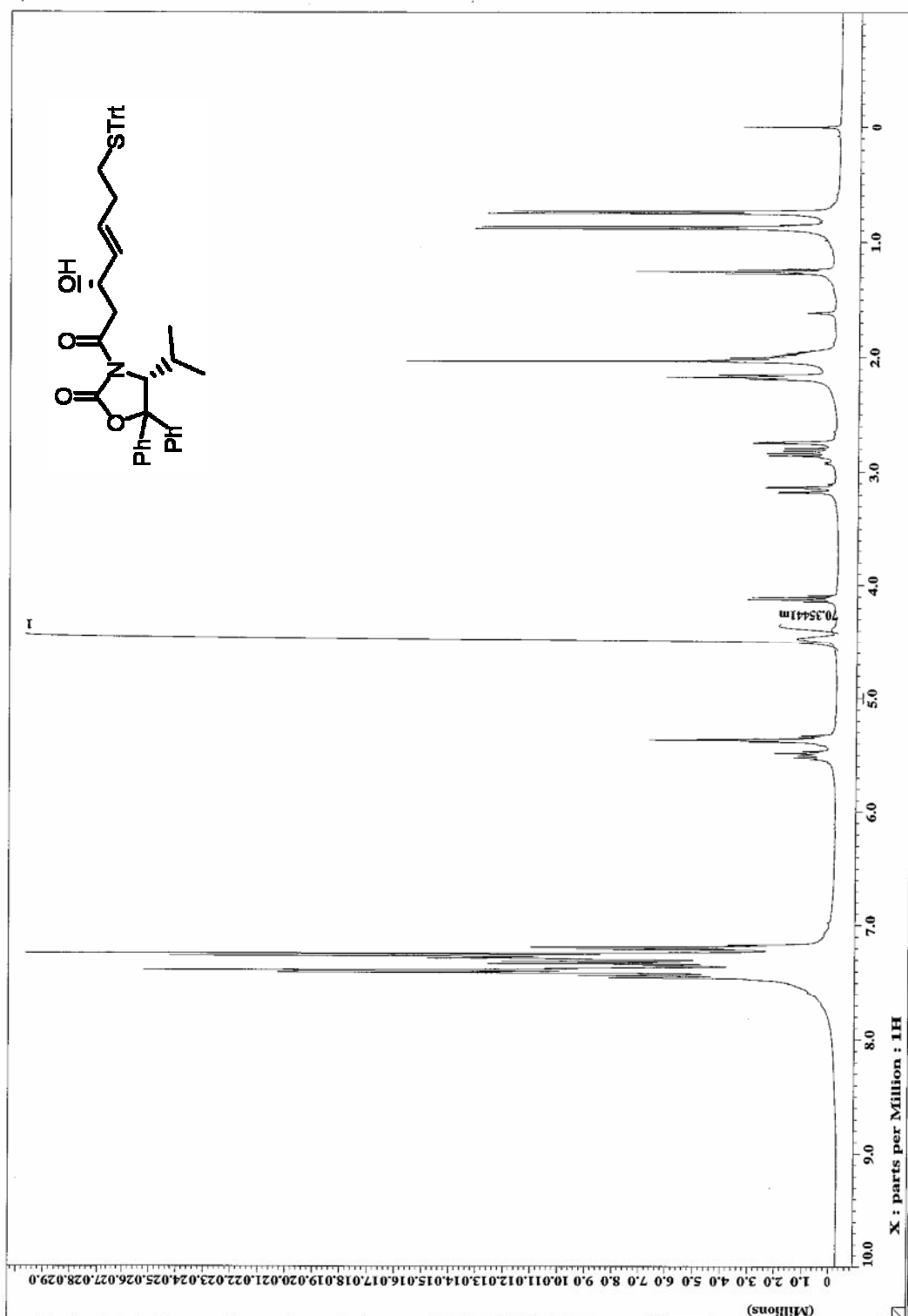
Aldol (Li enolate)



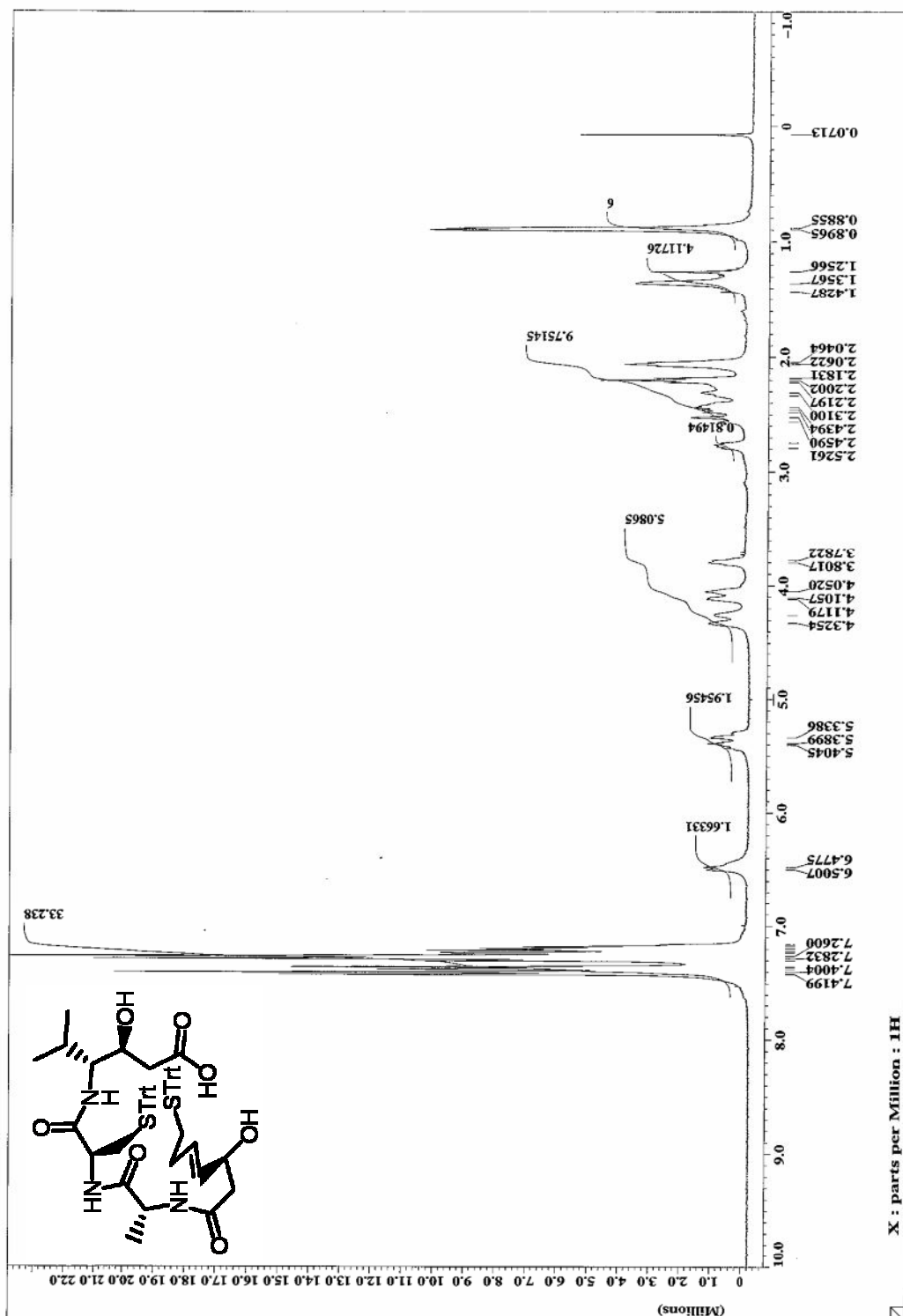
Aldol (Ti enolate)



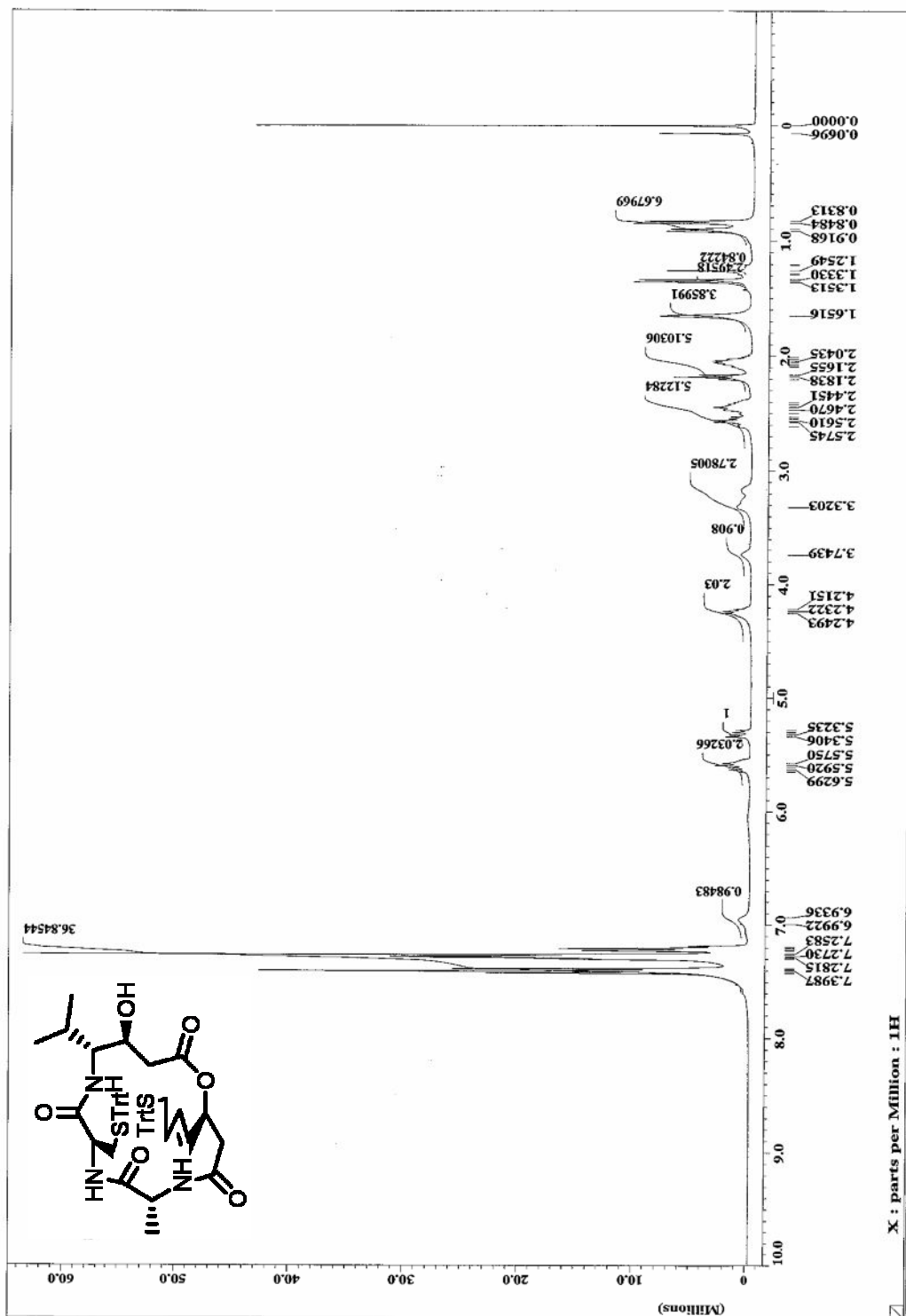
Aldol (Sm enolate)



Aldol (Zr enolate)



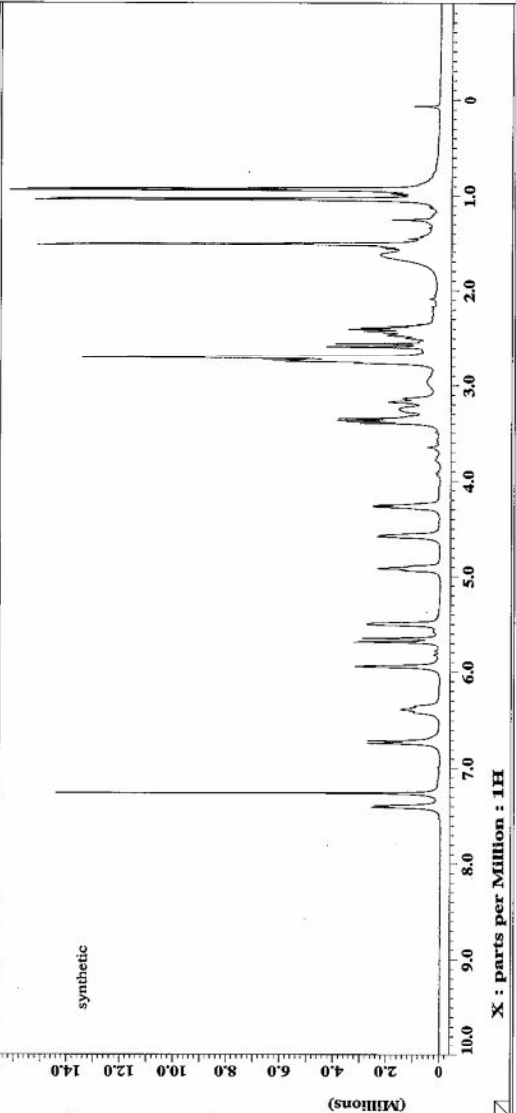
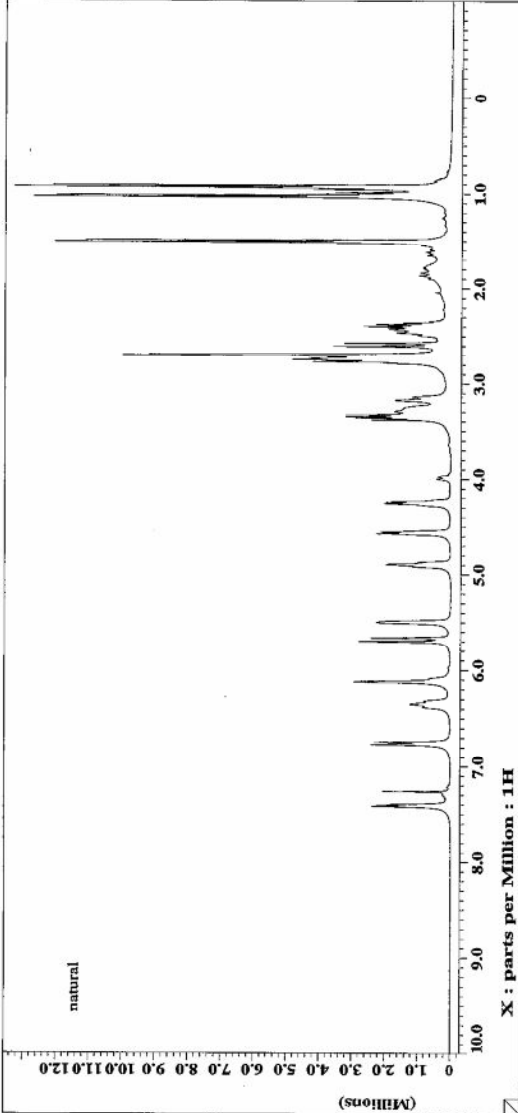
Seco acid 7



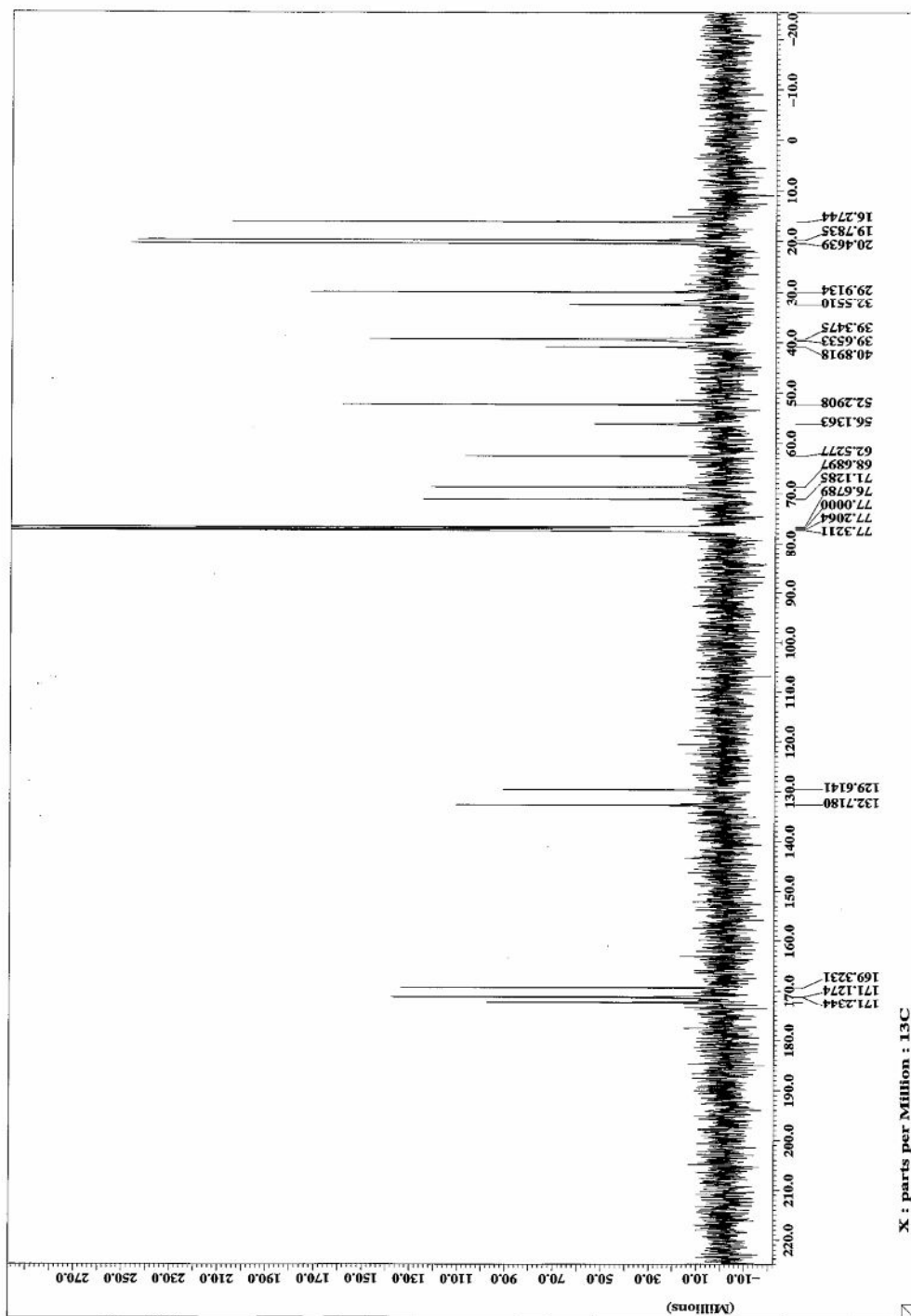
Macrolactone 36



----- ACQUISITION PARAMETERS -----  
File Name     - l1jima-051018-epi.ruc  
Author       - S8853432  
Sample ID     - Single Pulse Experim  
Content       - 18-OCT-2005 23:39:25  
Creation Date  
Revision Date   - 17-NOV-2005 12:13:55  
Spec Site      - ECP400SL  
Spec Type      - DELTA\_RMR  
Data Format     - ID COMPLEX  
Resolution     - 1H  
Dim Title      - 16384  
Dim Size       - [ppm]  
Dim Units      - 18-OCT-2005 23:37:36  
Actual\_start\_time  
Delay\_start    - 1[s]  
Delay\_end      - 1[s]  
End time       - 18-OCT-2005 23:39:23  
Experiment     - single\_pulse\_wsp  
Field\_strength   - 9.2581736[T]  
Filter\_mode     - BUTTERWORTH  
Filter\_width    - 3.95882817[MHz]  
Irr\_poise      - VALTZ  
Irr\_poise      - 60[us]  
Irr\_width      - 0  
Iterations     - 18-OCT-2005 23:39:24  
Local\_time     - WAUGH  
Obs\_poise      - 2692  
Probe\_id       - 17  
Recvr\_gain     - 17  
Relaxation\_delay   - 4[s]  
Scans          - 1.6  
Solvent        - CHLOROFORM-D  
Spin\_lock      - 1[us]  
Spin\_lock\_90   - 25[us]  
Spin\_lock\_attn   - 25[dB]  
Temp\_get       - 24.5[degC]  
X90            - 13.4[us]  
X\_acq\_duration   - 2.059292[s]  
X\_center        - 0[deg]  
X\_domain        - 18  
X\_freq          - 395.88252601[MHz]  
X\_offset        - 5[ppm]  
X\_points        - 1.6384  
X\_prescans      - 1  
X\_resolution    - 1.7[us]  
X\_sweep         - 0.48325539[Hz]  
Tri90          - 7.91765637[MHz]  
Tri90          - 10[us]  
Valtz          - VALTZ  
Valtz          - 1[us]  
Valtz          - 1[us]  
Valtz          - 1[us]  
Valtz          - 1[us]  
Valtz          - 1[us]  
Valtz          - 1[us]



Spiruchostatin A



Spiruchostatin A ( $^{13}\text{C}$ )

## 第 2 節

「スピルコスタチン A を用いた  
ケミカルバイオロジー」

### 3-2-1 はじめに

スピルコスタチン A の標的タンパク質である HDAC は細胞内では複数のタンパク質と複合体を形成することで活性化し、染色体上の特定領域に対し酵素活性を示す<sup>1)</sup>。このタンパク質複合体を壊すことなく細胞系中から取り出し、分析することができれば HDAC が働く際、すなわち DNA から RNA への転写を抑制する際に働くタンパク質を全て網羅的に同定することができるかと期待される。夏目らは自ら開発した超高感度のダイレクトナノフロー LC-MS システムを用いることで、様々なタンパク質複合体の解析を行える大規模タンパク質相互作用ネットワーク解析システムを開発した。本システムは標的となるタンパク質の 1 つにタグ分子を導入しておき、そのタグ分子の性質を利用し複合体を精製、複合体を酵素によりフラグメントに分解した後、質量分析により解析、データベースによる照合を行うことで構成タンパク質の同定を行うというものである。この場合、細胞にタグ分子を有したタンパク質を発現させる必要がある (Figure 3-2-1)<sup>2)</sup>。

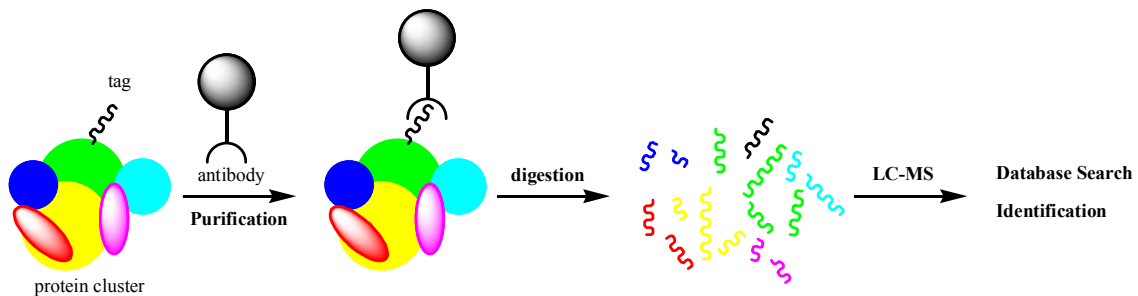


Figure 3- 2-1

これに対し、特定のタンパク質と特異的に結合することができる小分子にタグ分子を導入したケミカルプローブを用い、小分子をもとにしてタンパク質複合体を釣り上げるケミカルバイオロジーの手法を適用することができれば、もとの細胞を改変することなく、任意のタイミングで解析ができるため細胞種の違いによらず解析ができるだけでなく、細胞周期による変化も調べることができると考えられる。そこで筆者は合成したスピルコスタチン A に対し、タグ分子を導入することでケミカルプローブを合成し、HDAC 複合体の釣り上げ実験を行った。

### 3-2-2 合成計画

タグ分子を導入しケミカルプローブを合成するにはタグ分子の結合位置が重要になる。すなわち、タグ分子を導入することによって活性が失われてしまえば、ケミカルプローブとして機能しない。そのためタグ分子は活性に関与しない位置に導入しなければならない。また、そのための足がかりとなる官能基も必要である。

スピルコスタチン A はスタチン誘導体部に遊離のヒドロキシル基を有している。このヒドロキシル基が活性に関与しているかについての知見は得られていないが、まず、この位

置にタグ分子を導入しケミカルプローブとして機能するかどうかを調べることとした (Figure 3-2-2)。

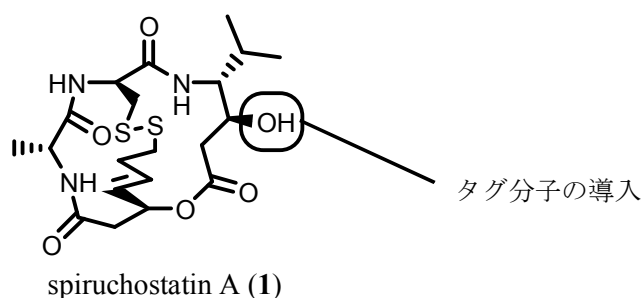


Figure 3-2-2

今回用いるタグ分子としては夏目のタンパク質ネットワーク解析においても使われているペプチドタグを用いることとした (Figure 3-2-3)<sup>3)</sup>。このペプチドタグは融合タンパク質をつくる場合は通常 N 末端に結合させて用いているが、C 末端に結合させても抗体により認識される。そのため両方の向き、すなわちペプチドタグの N 末端側にスピルコスタチン A を結合させたケミカルプローブと、C 末側に結合したケミカルプローブを合成し、違いがあるかどうかを調べることとした。

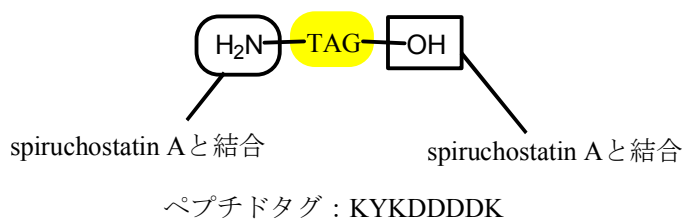


Figure 3-2-3

このケミカルプローブは HDAC 複合体と結合した状態でもペプチドタグに対する抗体による精製が行えなければならない。そのためペプチドタグとスピルコスタチン A の間にはある程度の長さのスペーサーが必要になると考えられる。スペーサーはスピルコスタチン A とペプチドタグという大きな分子同士をつなぐことになるため反応性の低下が見込まれる。大きな分子同士を結合する反応はいくつか開発されているが、今回はアミド化を用いることとした。用いるスペーサーとしては PEG アミノ酸スペーサー、12 - アミノドデカン酸スペーサー、5 - アミノペンタン酸スペーサーを選択し、スペーサーの長さや物性により差が出るかどうかを調べることとした。

アミド化で結合させるためには、ペプチドタグの側鎖は全て保護しておかなければならない。しかし、極性官能基を保護しておくことで、精製が順相系で行えるため取り扱いが容易になると期待される。幸い、スピルコスタチン A は酸に対してかなり安定であるという知見を得ているためタグ分子を導入した後も酸性条件であれば脱保護を行うことができ

ると考えられる。そこでペプチドタグの側鎖の保護基は全て酸性条件下脱保護可能な Boc 基、*t*-ブチルエステル、*t*-ブチルエーテルとした。

以上、まとめると今回合成するケミカルプローブはスピルコスタチン A の遊離のヒドロキシル基を足がかりとし、スペーサーを介してペプチドタグを結合したものである。そして、ペプチドタグとの結合位置を末端アミノ基とした Type A と、末端カルボン酸とした Type B の合成を行う。Type A では PEG スペーサー、12 - アミノドデカン酸スペーサー、5 - アミノペンタン酸スペーサーを導入し、PEG スペーサーのものに関してはペプチドタグ末端のカルボン酸を遊離のものとしてメチルエステルのもを 2 種類を合成する。Type B は PEG スペーサーのもののみを合成する。これにより、PEG スペーサーを有するケミカルプローブは末端官能基の違う 3 種類を合成することでケミカルプローブとしての有効性を調べ、Type A に関してスペーサーの長さおよび化学的性質の違いによる影響を調べる (Figure 3-2-4)。

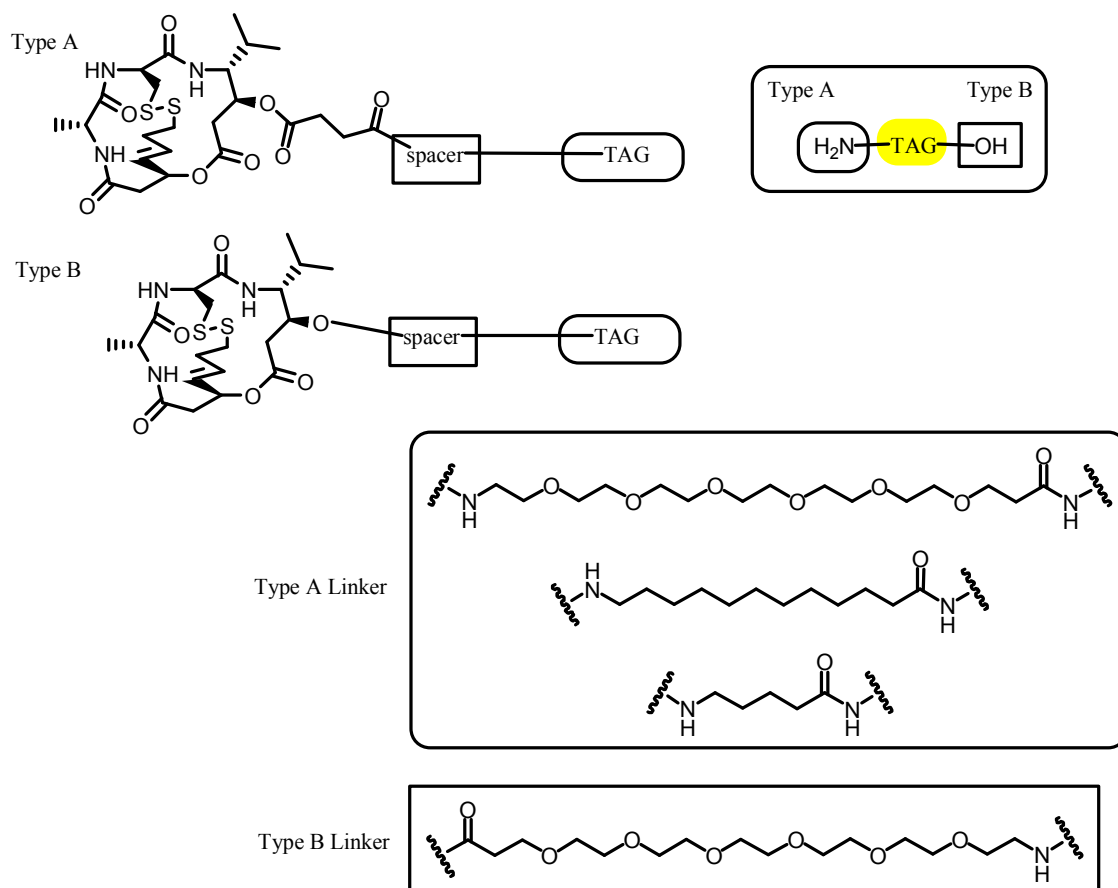


Figure 3-2-4

### 3-2-3 ペプチドタグの合成

まず、ペプチドタグの合成を行った。合成は 2 - クロロトリチルリンカーを有するポリスチレンレジンを用い、固相 Fmoc 法により行った。

2 - クロロトリチルレジン (2) に対し、1 残基目のリシン保護体を結合させた後、順次、

Fmoc 基の脱保護、アミノ酸の縮合を行うことで固相上にペプチドタグ保護体 **4** を合成した (Figure 3-2-5)。

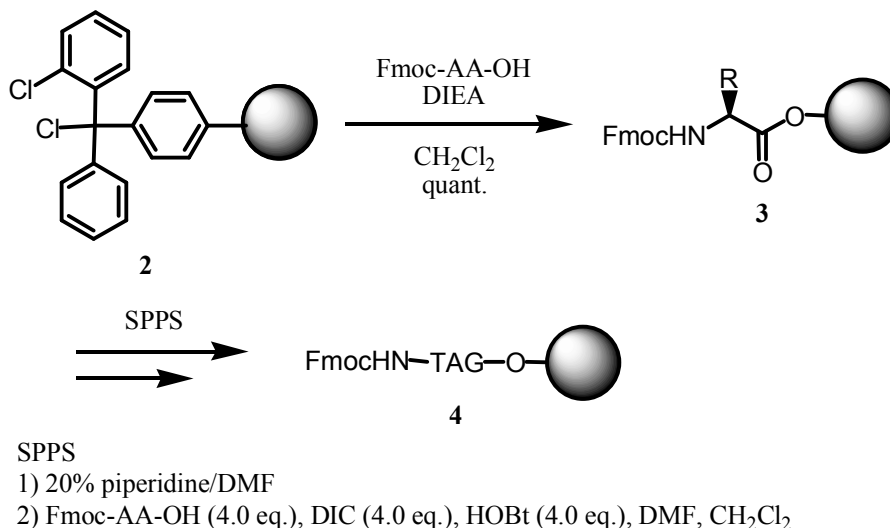


Figure 3-2-5

ペプチドタグの C 末端側で結合させる Type B を合成する場合、N 末端の保護基は酸性条件で脱保護できるように Boc 基へと変換する必要があるので、保護基のかけかえを行い、固相から切り出すことでペプチドタグ保護体 **5** を合成した (Figure 3-28)。

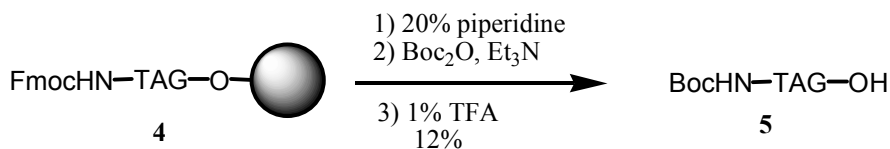


Figure 3-2-6

次にペプチドタグの N 末端側へスペーサーの導入を行った。Fmoc 基を脱保護後、それぞれのスペーサーを 24 時間縮合することで導入し、固相から切り出した。得られた粗ペプチド保護体は直ちに末端カルボン酸の保護を行った。PEG スペーサーのものに関しては、メチルエステル化したものと *t*-ブチルエステル化<sup>4)</sup>したものを合成した。これらは側鎖の脱保護後、それぞれメチルエステルと遊離カルボン酸の状態になる。その他のスペーサーについては合成が容易なメチルエステル体を合成した。得られた保護ペプチドは順相系でのカラム精製の後、GPC による精製を行うことでスペーサーが導入されなかった未反応の保護ペプチドとの分離を行った (Figure 3-2-7)。

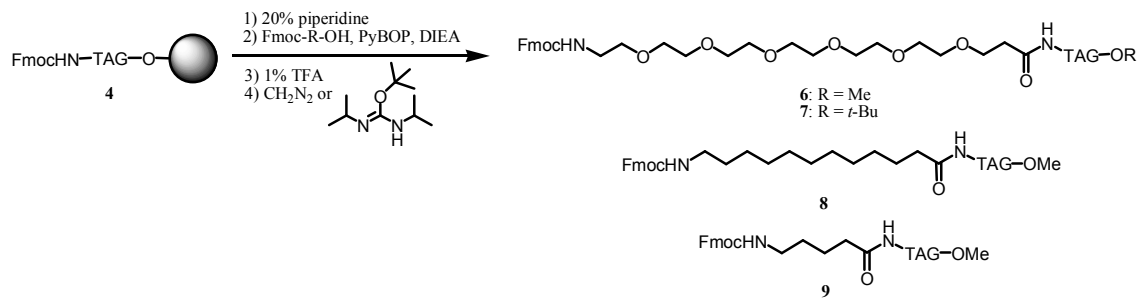


Figure 3-2-7

### 3-2-4 スピルコスタチン A 誘導体の合成

スピルコスタチン A はそのままではアミド化によるタグ分子の導入を行うことができないため、Type A に関して遊離のヒドロキシル基に対しコハク酸を縮合し、遊離のカルボン酸を有する分子へと変換した。スピルコスタチン A (1) に対し無水コハク酸と DMAP を作用させることでコハク酸結合体 10 を合成した。また、Type B ではスピルコスタチン A の遊離のヒドロキシル基に対し末端のアミノ基が Boc 基で保護された PEG スペーサーを椎名法により導入した (Figure 3-2-8) <sup>5)</sup>。

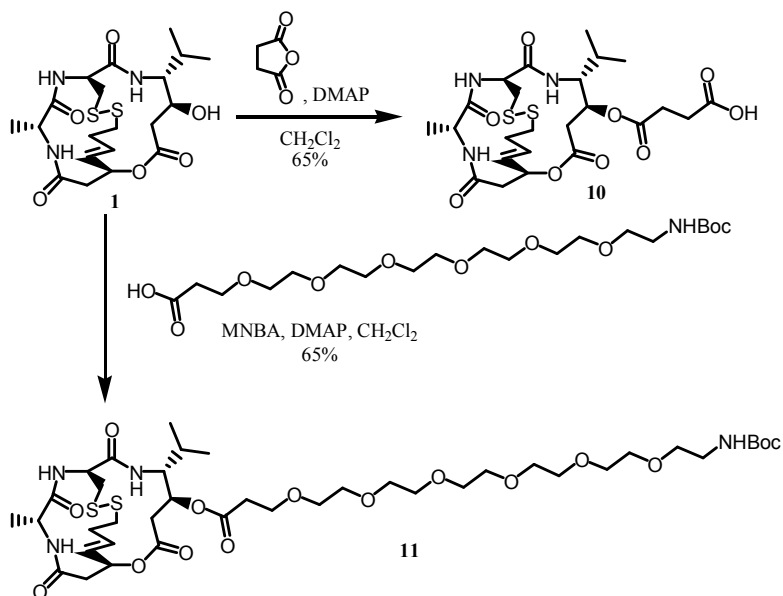


Figure 3-2-8

### 3-2-5 ケミカルプローブの合成

ケミカルプローブの合成はまず PEG スペーサーのものを合成した。PEG スペーサーを有するペプチドタグ保護体 6、7 に対し、ジエチルアミンを作用させることで Fmoc 基を脱保護した。この際濃縮だけではジエチルアミンを取り除くことが困難であった。ジエチルアミンが残存すると次のカルボン酸との縮合においてジエチルアミドが生成した。そのため、

逆相の簡易カラムを通すことによりジエチルアミンを取り除く必要があった。

次にスピルコスタチン A のコハク酸結合体 **10** を HATU を用いて縮合した。得られたケミカルプローブの保護体は順相系での精製の後、逆相の簡易カラムを通すことで過剰な試薬などと分離した後、GPC により未反応のペプチドタグ保護体と分離することで単離することができた。最後に 90%TFA 水混合溶液で処理することで全ての保護基を除去し、ケミカルプローブ **12**、**13** を合成した (Figure 3-2-9)。

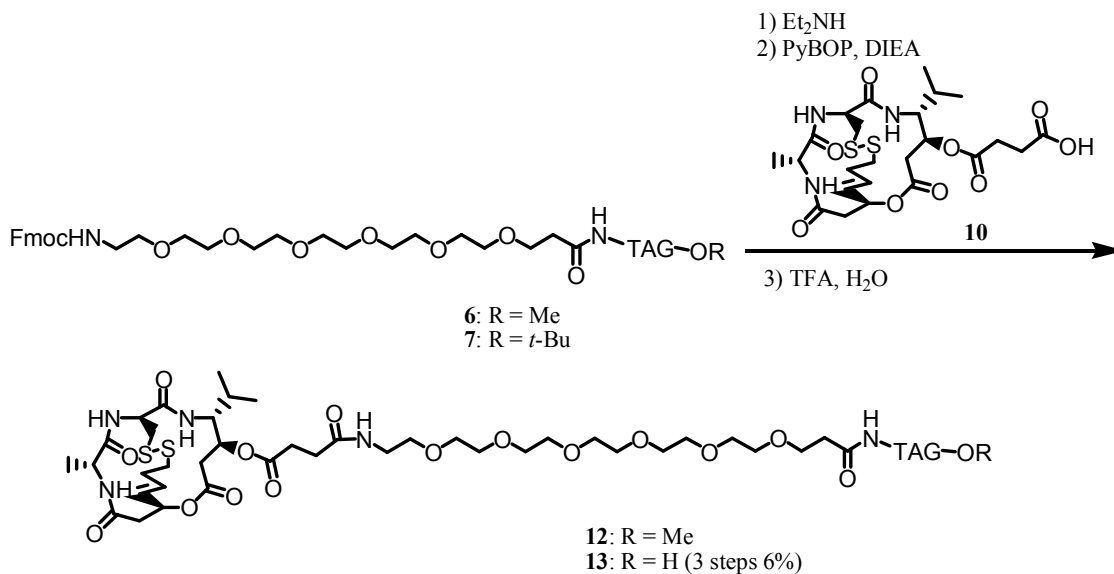


Figure 3-2-9

次に Type B のケミカルプローブを合成した。PEG スペーサー末端の Boc 基を酸性条件下脱保護した後、カルボン酸遊離のペプチドタグ **5** とアミド化を行った。逆相の簡易カラム、GPC による精製を行った後、90%TFA 水混合溶液で処理することで全ての保護基を脱保護し、ケミカルプローブ **14** を合成した (Figure 3-2-10)。

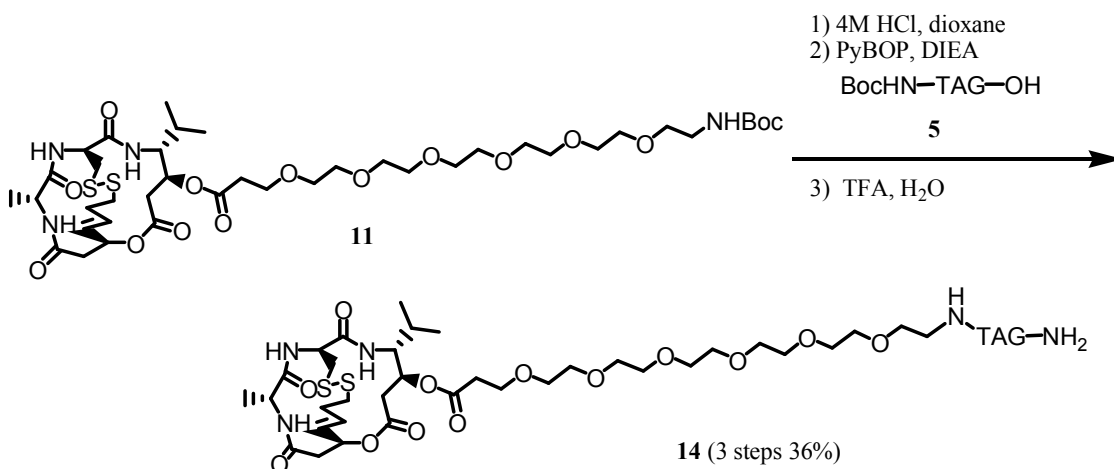


Figure 3-2-10

他のスペーサーを有するケミカルプローブも同様にスペーサーを導入したペプチドタグ保護体と縮合した後、順相系、逆相系、GPCによる精製、脱保護を行うことで合成した (Figure 3-2-11)。

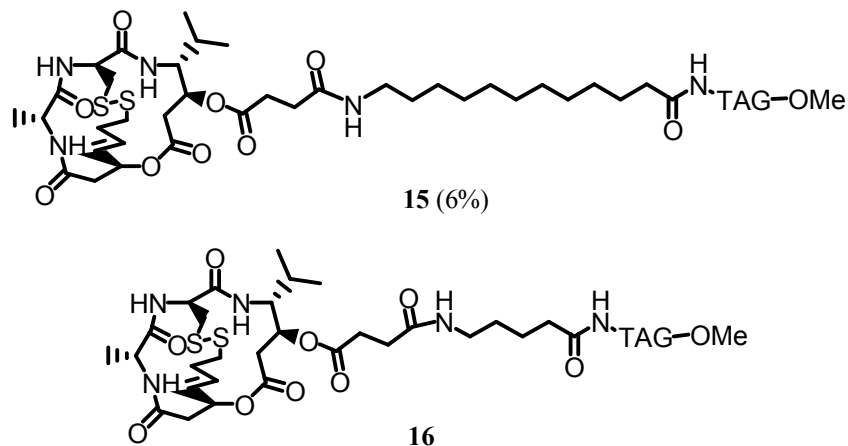


Figure 3-2-11

### 3-2-6 活性試験と HDAC 複合体の釣り上げ

以上のように合成したケミカルプローブを用い HDAC 複合体の釣り上げ実験を行った。まず、それに先立ち合成したスピルコスタチン A (**1**)とコハク酸を導入した誘導体 **10** の生理活性試験を行った。生理活性試験はルシフェラーゼアッセイにより行われた。これはルシフェラーゼの DNA を細胞に導入し、発現したルシフェラーゼの活性を測定する方法である。HDAC 阻害剤を投与することでルシフェラーゼの遺伝子発現が活性化され、過剰に生産されたルシフェラーゼの相対的な活性を見ることで、HDAC 阻害剤の強さを測定している (Figure 3-34)。

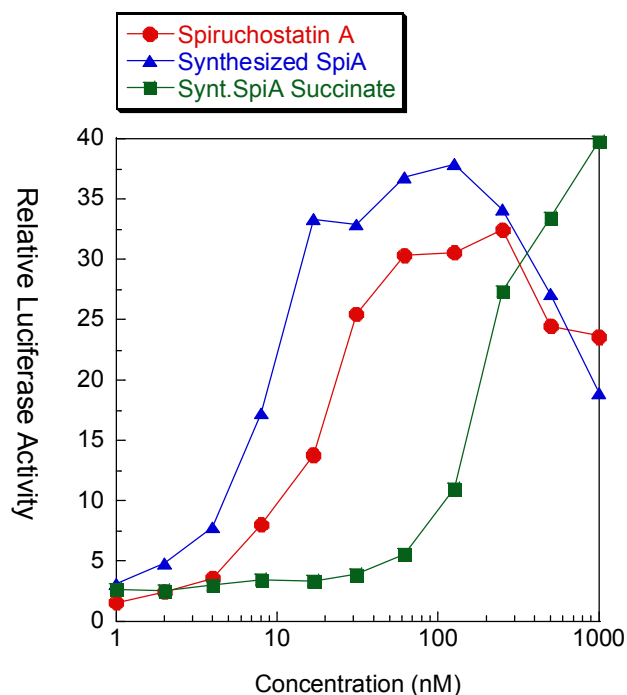


Figure 3-2-12

合成体 (Synthesized SpiA) のスピルコスタチン A の活性は天然体とよい一致を示した。コハク酸結合体 **10** (Synt.SpiA Succinate) の生理活性は **1** に比べ 10 分の 1 となったが、これは遊離カルボン酸を有するために生じる負電荷の影響で、HDAC との相互作用が弱くなっていると判断した。実際に合成したケミカルプローブを用いて HDAC 複合体の釣り上げ実験を行った。

実際の実験操作は夏目、新家らのグループにより行われた。まず Type A の PEG スペーサーで末端がメチルエステルであるケミカルプローブ **12** を用いて釣り上げ実験を行った。1 サンプルにつき 4 回の測定を行った結果、HDAC 複合体として実に 21 個のタンパク質からなるクラスターを釣り上げることに成功した。これは低分子ケミカルプローブを用いてタンパク質クラスターを釣り上げた、世界で初めての例である。今回釣り上がったタンパク質は HDAC1,2 を中心としたクラスターを構成するもので、非常によく研究された分野であるため全て既知のものであった。だが、この成果はこれまでタンパク質 - タンパク質間のネットワーク解析に用いられていた夏目ら手法が、低分子プローブを用いたタンパク質クラスターの解析に有効であることを証明した結果である (Figure 3-2-13、Table 3-2-1)。

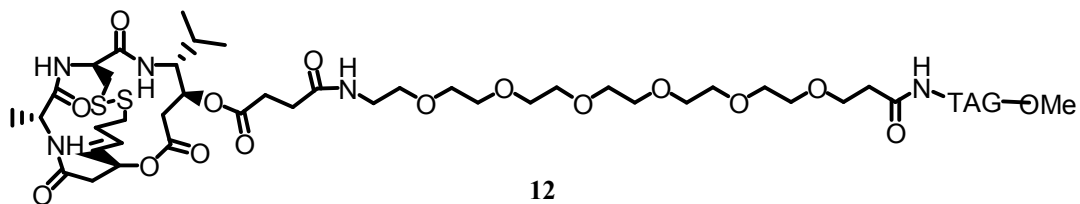


Figure 3-2-13

Table 3-2-1

化合物 12 における釣り上げ結果

Gene_Symbol	No.	Prot.Name	判定	説明
AOF2	4: ALL	amine oxidase (flavin containing) domain 2	1	HDAC 含有複合体の構成因子。HDAC1, 2 と結合。LSD1 <sup>6)</sup>
CHD4	4: ALL	chromodomain helicase DNA binding protein 4	1	クロマチンリモデリング因子 Mi-2β。HDAC1, 2 と結合。 <sup>7)</sup>
EEF2	4: ALL	eukaryotic translation elongation factor 2	3	elongation factor。p53 との結合は報告ある。 <sup>8)</sup>
GATAD2B	3	GATA zinc finger domain containing 2B	2	methyl CpG binding protein1 complex 直接の相互作用は無い <sup>9)</sup>
HDAC1	4: ALL	histone deacetylase 1	-	
HDAC2	4: ALL	histone deacetylase 2	-	
HDAC2 HDAC1	4: ALL	histone deacetylase; 2 or 1	-	
HDAC8	4: ALL	histone deacetylase 8	-	
HIST1H1E HIST1H1C HIST1H1D	3	histone 1; H1e or H1c or H1d	2	リンカーヒストン。アポトーシスに関与? ノックアウトにより H4K12 のアセチル化レベルの低下 <sup>10)</sup>
HMG20A	4: ALL	high-mobility group 20A	2	転写制御因子
KIAA0182	4: ALL	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4	1	SUPT6H(酵母 SPT6 ホモログ)、HDAC2 と結合、クロマチン構造制御因子(機能不明) <sup>9)</sup>
MIER1	4: ALL	mesoderm induction early response 1 homolog (Xenopus laevis)	1	転写抑制因子。Sp1, HDAC1 と直接結合。SANTドメイン (DNA 結合ドメイン) を含有する。 <sup>11)</sup>

MTA2	4: ALL	metastasis associated 1 family, member 2	1	核酸代謝、HDAC1,2,SIN3Aと結合、SANT/ZNF-GATAドメイン <sup>12)</sup>
MTA2 MTA3	3	metastasis associated 1 family, member; 2 or 3	1	核酸代謝、HDAC1,2,Methyl CpG binding domain protein 3と結合、SANT/ZNF-GATA/BAHドメイン <sup>13)</sup>
PRDX1	4: ALL	peroxiredoxin 1	3	主に細胞質、核にもいる。ペルオキシダーゼ、
RBBP4	4: ALL	retinoblastoma binding protein 4	1	核局在、転写制御因子、HDAC1・HDAC2・HDAC3と結合
RBBP4 RBBP7	4: ALL	retinoblastoma binding protein; 4 or 7	1	核局在、転写制御因子、HDAC1・HDAC2と結合
RCOR1	4: ALL	REST corepressor 1	1	REST corepressor, HDAC1, 2 complex の構成因子 <sup>14)</sup>
RCOR1 RCOR3	4: ALL	REST corepressor; 1 or 3	1	REST corepressor, HDAC1, 2 complex の構成因子 <sup>14)</sup>
RCOR3 RCOR1	4: ALL	REST corepressor; 3 or 1	1	REST corepressor, HDAC1, 2 complex の構成因子 <sup>14)</sup>
TBL1XR1	4: ALL	transducin (beta)-like 1X-linked receptor 1	1	HDAC3-SMRT-N-CoR complex の構成因子 <sup>15)</sup>

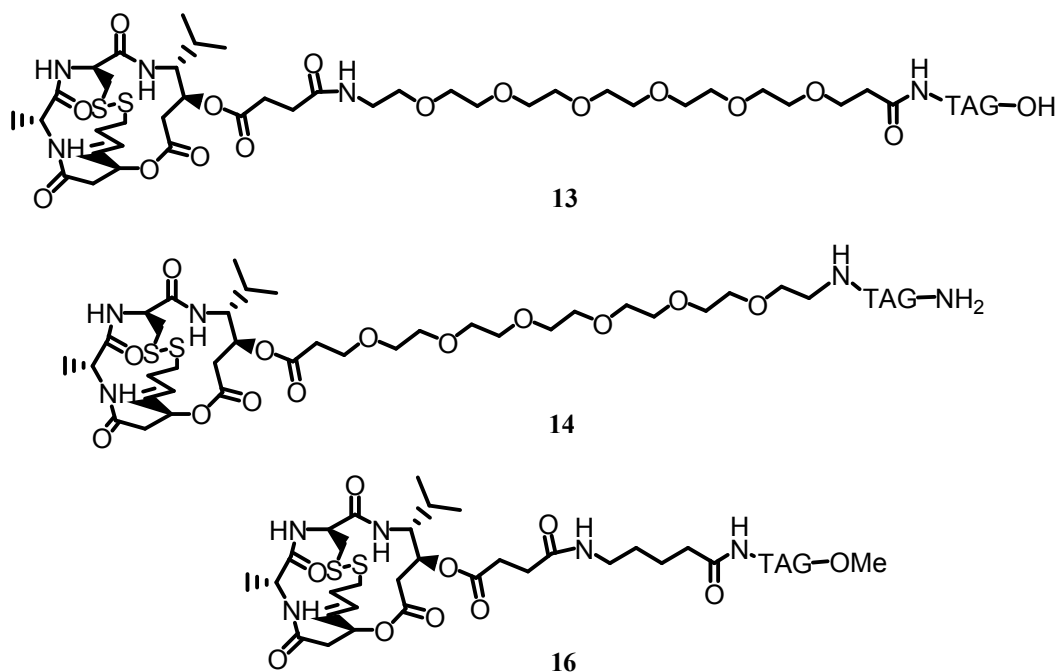
Total Hit preys: 21

#### 判定基準

No. 測定回数

1. HDACと直接関与する報告がある。
2. HDACと関与する可能性は十分ある。
3. HDACと関与するかどうかは不明。
4. HDACと関与する可能性はほとんど無い。

PEG スペーサーでペプチドタグの末端がカルボン酸の **13**、Type B の **14**、スペーサーが異なる **16** についても同様の実験を行った。釣り上がったタンパク質の数に多少の差はあるものの全て HDAC を含むタンパク質クラスターを釣り上げることができた (Figure 3-2-14、Table3-2-2、Table3-2-3、Table3-2-4)。



**Figure 3-2-14**

**Table 3-2-2**

化合物 13 における釣り上げ結果

Gene_Symbol	No.	Prot.Name
AOF2	4: ALL!!	amine oxidase (flavin containing) domain 2
HDAC1	4: ALL!!	histone deacetylase 1
HDAC2	4: ALL!!	histone deacetylase 2
HDAC2 HDAC1	4: ALL!!	histone deacetylase; 2 or 1
HDAC8	4: ALL!!	histone deacetylase 8
HMG20A	4: ALL!!	high-mobility group 20A
KIAA0182	4: ALL!!	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4
MIER1	4: ALL!!	mesoderm induction early response 1 homolog (Xenopus laevis)
RBBP4 RBBP7	4: ALL!!	retinoblastoma binding protein; 4 or 7
RCOR1	4: ALL!!	REST corepressor 1
RCOR1 RCOR3	4: ALL!!	REST corepressor; 1 or 3
RCOR3	4: ALL!!	REST corepressor 3
RCOR3 RCOR1	4: ALL!!	REST corepressor; 3 or 1
TBL1XR1 TBL1X TBL1Y	3	transducin (beta) -like; 1X-linked receptor 1 or 1X-linked or 1Y-linked
Total Hit preys:	14	

**Table 3-2-3**

化合物 14 における釣り上げ結果

Gene_Symbol	No.	Prot.Name
AOF2	4: ALL!!	amine oxidase (flavin containing) domain 2
CHD3 CHD4 CHD5	4: ALL!!	chromodomain helicase DNA binding protein; 3 or 4 or 5
CHD4	4: ALL!!	chromodomain helicase DNA binding protein 4
GATAD2B	3	GATA zinc finger domain containing 2B
HDAC1	4: ALL!!	histone deacetylase 1
HDAC2	4: ALL!!	histone deacetylase 2
HDAC2 HDAC1	4: ALL!!	histone deacetylase; 2 or 1
HDAC8	4: ALL!!	histone deacetylase 8
HMG20A	4: ALL!!	high-mobility group 20A
HMG20B	3	high-mobility group 20B
KIAA0182	4: ALL!!	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4
MTA2	4: ALL!!	metastasis associated 1 family, member 2
PAICS	3	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase,
RBBP4 RBBP7	4: ALL!!	retinoblastoma binding protein; 4 or 7
RCOR1	4: ALL!!	REST corepressor 1
RCOR1 RCOR3	4: ALL!!	REST corepressor; 1 or 3
RCOR3	4: ALL!!	REST corepressor 3
RCOR3 RCOR1	4: ALL!!	REST corepressor; 3 or 1
Total Hit preys:	18	

**Table 3-2-4**

化合物 16 における釣り上げ結果

Gene_Symbol	No.	Prot.Name
AOF2	4: ALL!!	amine oxidase (flavin containing) domain 2
HDAC1	4: ALL!!	histone deacetylase 1
HDAC2	4: ALL!!	histone deacetylase 2
HDAC2 HDAC1	4: ALL!!	histone deacetylase; 2 or 1
HDAC8	4: ALL!!	histone deacetylase 8
MIER1	4: ALL!!	mesoderm induction early response 1 homolog (Xenopus laevis)
PAICS	4: ALL!!	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase,
RCOR1	4: ALL!!	REST corepressor 1

RCOR1 RCOR3	4: ALL!!	REST corepressor; 1 or 3
RCOR3	4: ALL!!	REST corepressor 3
RCOR3 RCOR1	4: ALL!!	REST corepressor; 3 or 1
TBL1XR1	4: ALL!!	transducin (beta)-like 1X-linked receptor 1
TBL1XR1 TBL1X TB L1Y	3	transducin (beta) -like; 1X-linked receptor 1 or 1X-linked or 1Y-linked
Total Hit preys:	13	

この実験系は定性的な結果しか見ることができないため、スペーサーやペプチドタグの末端の官能基によって釣り上げ効率に差があるかについては調べることができない。しかし、ごく微量であってもタンパク質クラスターが釣り上げられれば解析が可能であるため、用いる分子に応じて導入しやすい形でペプチドタグを結合させることでケミカルプローブとして利用できると思われる。

今後、ライブラリー合成により選択的な HDAC 阻害剤が合成できれば、その分子にペプチドタグを結合し、ケミカルプローブとすることで他の HDAC を含むタンパク質複合体を釣り上げ、新たなタンパク質相互作用ネットワーク解析が行えると期待できる。また、毒性が出た場合でも、その原因となるタンパク質複合体を釣り上げることができれば副作用の機構も明らかにできると考えられる。さらに、本手法は他の生体機能分子にも応用可能であると考えられるので、今後、様々な分子をケミカルプローブとすることでタンパク質相互作用ネットワーク解析の重要な手法になると期待できる。

### 3-2-7 まとめ

スピルコスタチン A の遊離のヒドロキシル基に対しスペーサーを介してペプチドタグを結合させることでケミカルプローブの合成を行った。このケミカルプローブを用いて HDAC 複合体の釣り上げ実験を行ったところ、21 種類のタンパク質から構成されるクラスターを釣り上げることができ、世界で初めて低分子プローブを用いてタンパク質クラスターの解析に成功した。スペーサーの長さや種類、ペプチドタグの末端の官能基の影響はほとんど見られずペプチドタグを導入しやすい向きで結合することでプローブ化が可能であることが分かった。今後、誘導体をプローブ化することで新たなタンパク質ネットワークの解析が行えるのではないかと期待できる。

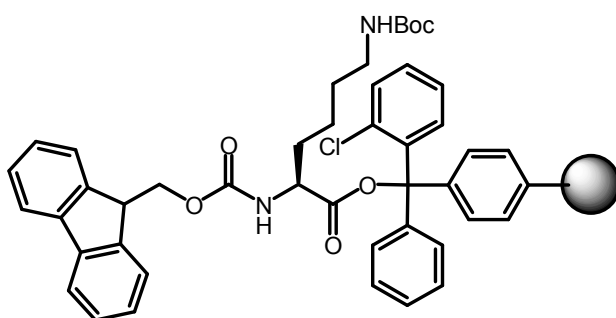
## Reference

- 1) クロマチン—エピジェネティクスの分子機構、Bryan M. Turner 著、堀越正美訳、Springer.
- 2) 夏目徹、細胞工学、**2006**, 25, 613.
- 3) Einhauer, A.; Jungbauer, A. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2001**, 49, 455.
- 4) Burk, R. M.; Berger, G. D.; Bugianesi, R. L.; Girotra, N. N.; Parsons, W. H.; Ponpipom, M. M. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 975.
- 5) Shiina, I.; Kubota, M.; Ibuka, R. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 7535.
- 6) Hakimi, M.-A.; Dong, Y.; Lane, W. S.; Speicher, D. W.; Shiekhattar, R. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 7234
- 7) Zhang, Y.; LeRoy, G.; Seelig, H.-P.; Lane, W. S.; Reinberg, D. *Cell* **1998**, 95, 279.
- 8) Yin, X.; Fontoura, B. M. A.; Morimoto, T.; Carroll, R. B. *J. Cell. Physiol.* **2003**, 196, 474.
- 9) Feng, Q.; Cao, R.; Xia, L.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Zhang, Y. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, 22, 536.
- 10) (a) Konishi, A.; Shimizu, S.; Hirota, J.; Takao, T.; Fan, Y.; Matsuoka, Y.; Zhang, L.; Yoneda, Y.; Fujii, Y.; Skoultchi, A. I.; Tsujimoto, Y. *Cell* **2003**, 114, 673. (b) Fan, Y.; Nikitina, T.; Zhao, J.; Fleury, T. J.; Bhattacharyya, R.; Bouhassira, E. E.; Stein, A.; Woodcock, C. L.; Skoultchi, A. I. *Cell* **2005**, 123, 1199.
- 11) Ding, Z.; Gillespie, L. L.; Paterno, G. D. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, 23, 250.
- 12) Humphrey, G. W.; Wang, Y.; Russanova, V. R.; Hirai, T.; Qin, J.; Nakatani, Y.; Howard, B. H. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 6817.
- 13) Yao, Y.-L.; Yang, W.-M. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 42560.
- 14) Hakimi, M.-A.; Bochar, D. A.; Chenoweth, J.; Lane, W. S.; Mandel, G.; Shiekhattar, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2002**, 99, 7420.
- 15) Yoon, H.-G.; Chan, D. W.; Huang, Z.-Q.; Li, J.; Fondell, J. D.; Qin, J.; Wong, J. *EMBO J.* **2003**, 22, 1336.

**Protected-FLAG-peptide (Fmoc-Asp(OtBu)-Tyr(OtBu)-Lys(Boc)-Asp(OtBu)-Asp(OtBu)-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-) on solid support (4).**

**Loading**

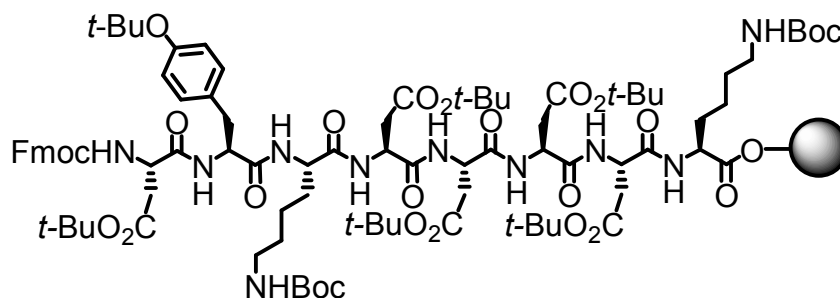
To a suspension of 2-chloro-trytylchloride resin (2) (1 g, 1.25 mmol/g, 1.25 mmol) in dichloromethane (9 mL) in a 20mL syringe-shaped vessel (Varian Reservoir) was added acetyl chloride (1 mL) at room temperature. After being shaken for 3 h, the resin was filtered and washed with dry dichloromethane. To the resin was added Fmoc-Lys(Boc)-OH (2.34 g, 5.0 mmol) and DIEA (1.7 mL, 10 mmol) in dichloromethane (10 mL) at room temperature and the mixture was shaken for 12 h. The resin was filtered and washed with dichloromethane  $\times 3$ , methanol  $\times 3$  and dichloromethane  $\times 3$  and dried under reduced pressure to give Fmoc-Lys(Boc)-Trt(2-Cl) resin (3).



**Elongation of peptide**

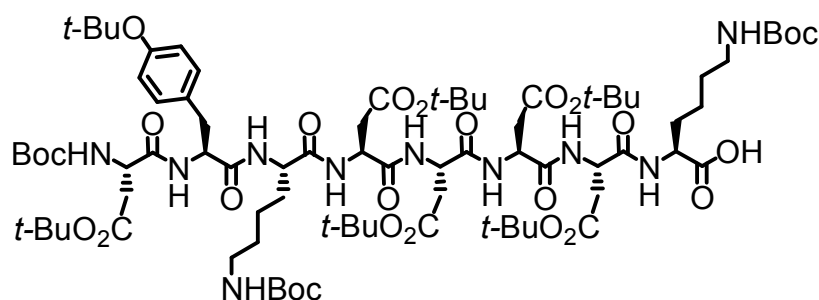
To a Fmoc-Lys(Boc)-Trt(2-Cl) resin (3) was added piperidine (20% solution in DMF, 10 mL) and shaken for 10 min  $\times 3$ . The resin was filtered and washed with DMF  $\times 5$ , dichloromethane  $\times 5$  and DMF  $\times 5$ . To the resin was added a solution of Fmoc-AA-OH (5.0 mmol), DIC (774  $\mu\text{L}$ , 5.0 mmol) and HOBt (677 mg, 5.0 mmol) in DMF (2 mL) and dichloromethane (8 mL) which was stirred for 5 min before addition. After being shaken for 24 h, the resin was filtered and washed with DMF  $\times 3$ , dichloromethane  $\times 3$ .

This procedure was repeated seven times in order of Fmoc-Asp(OtBu)-OH (2.06 g), Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH (2.34 g), Fmoc-Tyr(OtBu)-OH (2.30 g) and Fmoc-Asp(OtBu)-OH to give protected FLAG peptide attached resin (4) (1.97 g).

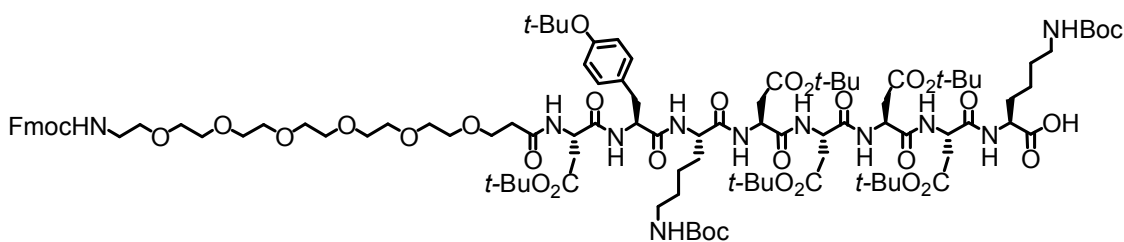


**Boc-FLAG(*t*Bu)-OH (5).** To a protected FLAG peptide attached resin (**4**) (100 mg) in a 3mL syringe-shaped vessel (Varian Reservoir) was added piperidine (20% solution in DMF, 10 mL) and the mixture was shaken for 10 min  $\times$  3. The resin was filtered and washed with DMF  $\times$  5, dichloromethane  $\times$  5 and DMF  $\times$  5. To the resin was added a solution of Boc<sub>2</sub>O (109 mg, 0.50 mmol) and triethylamine (69  $\mu$ L, 0.50 mmol) in dichloromethane (1 mL). After being shaken for 24 h, the resin was filtered and washed with DMF  $\times$  3, dichloromethane  $\times$  3.

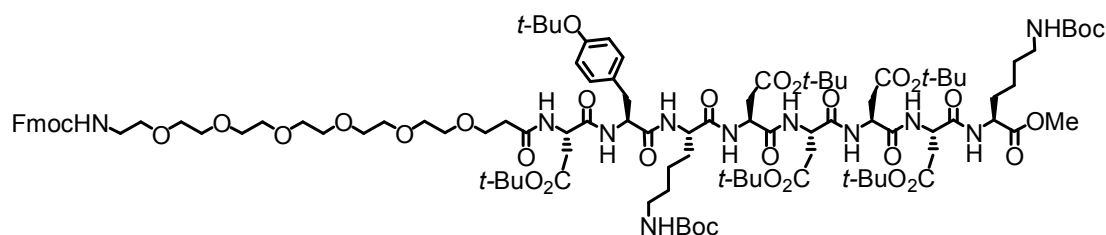
To the resin was added TFA (1% in dichloromethane, 1 mL) and shaken for 2 min. The resin was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The cleavage reaction was repeated five times. The residue was purified by solid phase extraction (VARIAN BOND ELUT<sup>®</sup> C18, eluting with 50% methanol in water to 100% methanol) to give Boc-FLAG(*t*Bu)-OH (**5**) (24.5 mg, 0.0148 mmol). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) see spectrum 1; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) see spectrum 2; IR (neat) 3326, 3006, 2979, 2934, 2870, 2481, 1811, 1728, 1661, 1530, 1508, 1479, 1455, 1415, 1393, 1368, 1254, 1160, 1042, 1018, 954, 924, 898, 847, 757, 666, 567, 523, 476, 464 (cm<sup>-1</sup>); [ $\alpha$ ]<sup>21.8</sup><sub>D</sub> = -28.9 (*c* 1.23, CHCl<sub>3</sub>); MS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>80</sub>H<sub>132</sub>N<sub>10</sub>O<sub>26</sub>+2H]<sup>2+</sup> 825.47, found 825.47.



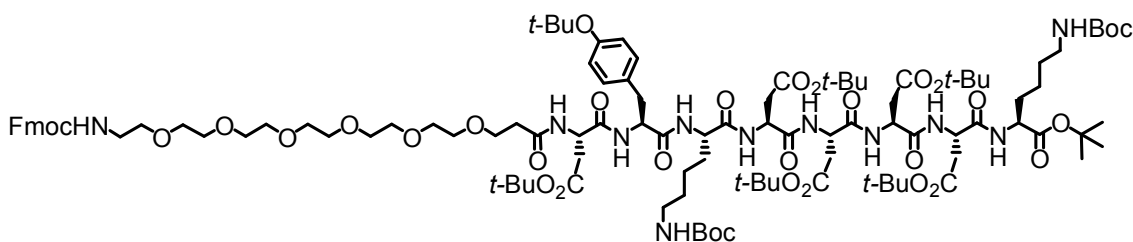
**21-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-4,7,10,13,16,19-hexaoxahenicosanoyl-FLAG(*t*Bu)-OH (Fmoc-PEG-FLAG(*t*Bu)-OH).** To a protected FLAG peptide attached resin (200 mg) in a 6mL syringe-shaped vessel (Varian Reservoir) was added piperidine (20% solution in DMF, 10 mL) and the mixture was shaken for 10 min  $\times$  3. The resin was filtered and washed with DMF  $\times$  5, dichloromethane  $\times$  5 and DMF  $\times$  5. To the resin was added a solution of 21-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-4,7,10,13,16,19-hexaoxahenicosanoic acid (144 mg, 0.50 mmol), DIEA (262  $\mu$ L, 1.5 mmol) and PyBOP (520 mg, mmol) in dichloromethane (2 mL). After being shaken for 24 h, the resin was filtered and washed with dichloromethane  $\times$  5. To the resin was added TFA (1% in dichloromethane, 1 mL) and shaken for 2 min. The resin was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The cleavage reaction was repeated five times. The crude Fmoc-PEG-FLAG(*t*Bu)-OH (129.8 mg) was used without further purification.



**21-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-4,7,10,13,16,19-hexaoxahenicosanoyl-FLAG(*t*Bu)-OMe (Fmoc-PEG-FLAG(*t*Bu)-OMe) (6).** The crude Fmoc-PEG-FLAG(*t*Bu)-OH (27.2 mg, 0.0129 mmol) was diluted with small amount of chloroform and treated with excess amount of diazomethane and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (2% methanol in chloroform) and GPC to give Fmoc-PEG-FLAG(*t*Bu)-OMe (**6**) (12.8 mg, 0.00603 mmol, 47%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) see spectrum 3; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) see spectrum 4; IR (neat) 3284, 2978, 2932, 1731, 1631, 1532, 1453, 1392, 1367, 1251, 1157, 899, 847, 750, 677 (cm<sup>-1</sup>); [α]<sup>22.6</sup><sub>D</sub> = -16.7 (*c* 0.640, CHCl<sub>3</sub>); MS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>106</sub>H<sub>165</sub>N<sub>11</sub>O<sub>33</sub>+2H]<sup>2+</sup> 1061.09, found 1061.13.

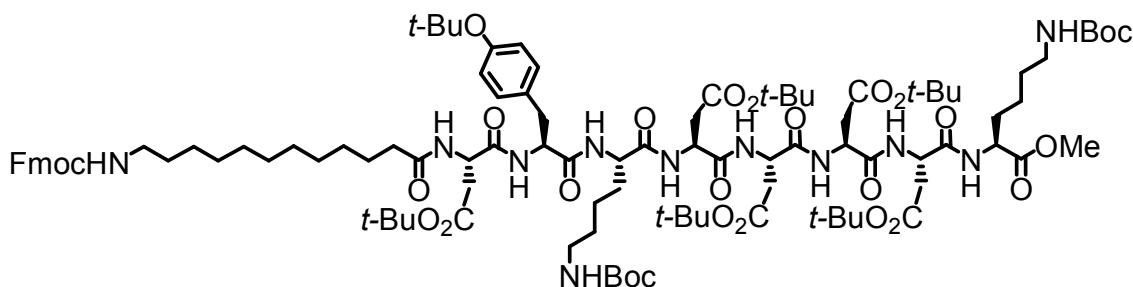


**21-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-4,7,10,13,16,19-hexaoxahenicosanoyl-FLAG(*t*Bu)-*Ot*Bu (Fmoc-PEG-FLAG(*t*Bu)-*Ot*Bu) (7).** The crude Fmoc-PEG-FLAG(*t*Bu)-OH (28.9 mg, 0.0137 mmol) was diluted with dichloromethane (1 mL) and added *O*-*tert*-butyl-*N,N'*-diisopropylisourea (104 μL, 0.434 mmol). After being stirred for 24 h, the reaction mixture was filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (2% methanol in chloroform) and GPC to give Fmoc-PEG-FLAG(*t*Bu)-*Ot*Bu (**7**) (27.9 mg, 0.0132 mmol, 96%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) see spectrum 5; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) see spectrum 6; IR (neat) 3289, 2979, 2933, 2871, 1846, 1794, 1731, 1661, 1631, 1539, 1478, 1457, 1393, 1368, 1252, 1159, 1040, 953, 924, 898, 847, 758, 666, 622, 562 (cm<sup>-1</sup>); [α]<sup>24.0</sup><sub>D</sub> = -19.9 (*c* 1.27, CHCl<sub>3</sub>); MS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>109</sub>H<sub>171</sub>N<sub>11</sub>O<sub>33</sub>+Na]<sup>+</sup> 2185.19, found 2185.84.



**12-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)dodecanoyl-FLAG(*t*Bu)-OMe (Fmoc-C12-FLAG(*t*Bu)-OMe) (8).** To a protected FLAG peptide attached resin (**4**) (200 mg) in a 6mL syringe-shaped vessel (Varian Reservoir) was added piperidine (20% solution in DMF, 10 mL) and the mixture was shaken for 10 min  $\times$  3. The resin was filtered and washed with DMF  $\times$  5, dichloromethane  $\times$  5 and DMF  $\times$  5. To the resin was added a solution of 12-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino) dodecanoic acid (438 mg, 1.0 mmol), DIEA (262  $\mu$ L, 1.5 mmol) and PyBOP (520 mg, 1.0 mmol) in dichloromethane (2 mL) and DMF (2 mL). After being shaken for 24 h, the resin was filtered and washed with dichloromethane  $\times$  5.

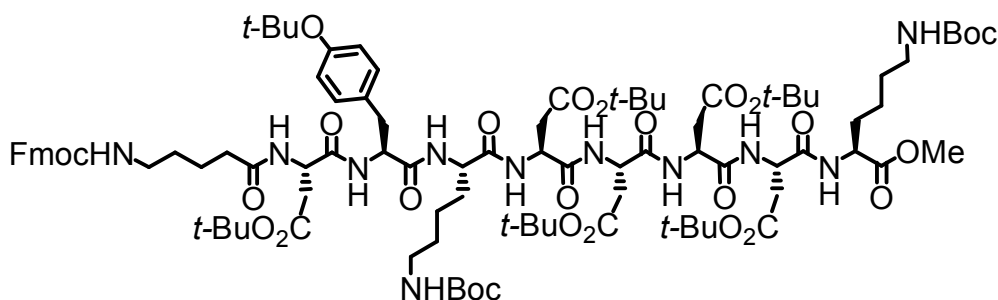
To the resin was added TFA (1% in dichloromethane, 2 mL) and shaken for 2 min. The resin was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The cleavage reaction was repeated five times. The residue was diluted with small amount of chloroform and treated with excess amount of diazomethane and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (2% methanol in chloroform) and GPC to give Fmoc-C12-FLAG(*t*Bu)-OMe (**8**) (16.4 mg, 0.00827 mmol).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) see spectrum 7;  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) see spectrum 8; IR (neat) 3310, 2978, 2931, 2859, 1729, 1656, 1534, 1453, 1392, 1367, 1251, 1159, 898, 846, 758, 667, 606, 566, 523, 479, 462 ( $\text{cm}^{-1}$ );  $[\alpha]_{\text{D}}^{24.7} = -26.2$  ( $c$  1.03,  $\text{CHCl}_3$ ); MS(ESI-TOF) calcd for  $[\text{C}_{103}\text{H}_{159}\text{N}_{11}\text{O}_{27}+2\text{H}]^{2+}$  992.08, found 992.18.



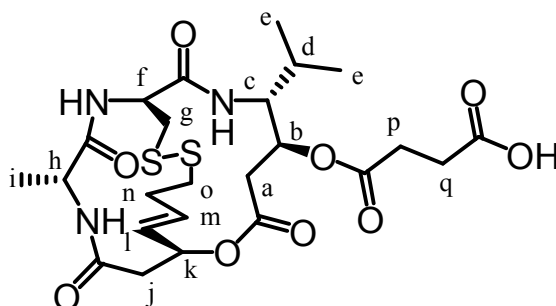
**5-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)pentanoyl-FLAG(*t*Bu)-OMe (Fmoc-C5-FLAG(*t*Bu)-OMe) (9).** To a protected FLAG peptide attached resin (**4**) (200 mg, 0.25 mmol) in a 6mL syringe-shaped vessel (Varian Reservoir) was added piperidine (20% solution in DMF, 10 mL) and the mixture was shaken for 10 min  $\times$  3. The resin was filtered and washed with DMF  $\times$  5, dichloromethane  $\times$  5 and DMF  $\times$  5. To the resin was added a solution of 5-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino) pentanoic acid (339 mg, 1.0 mmol), DIEA (262  $\mu$ L, 1.5 mmol) and PyBOP (520 mg, 1.0 mmol) in dichloromethane (2 mL) and DMF (2 mL). After being shaken for 24 h, the resin was filtered and washed with dichloromethane  $\times$  5.

To the resin was added TFA (1% in dichloromethane, 2 mL) and shaken for 2 min. The resin was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The cleavage reaction was repeated five times. The residue was diluted with chloroform and treated with excess amount of diazomethane and concentrated *in*

*vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (2% methanol in chloroform) and GPC to give Fmoc-C5-FLAG(*t*Bu)-OMe (**9**) (51 mg, 0.0271 mmol). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) see spectrum 9; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) see spectrum 10; IR (neat) 3290, 2978, 2934, 1730, 1657, 1533, 1453, 1393, 1367, 1252, 1158, 897, 847, 758, 666 (cm<sup>-1</sup>); [α]<sup>21.7</sup><sub>D</sub> = -29.4 (*c* 1.38, CHCl<sub>3</sub>); MS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>96</sub>H<sub>145</sub>N<sub>11</sub>O<sub>27</sub>+H]<sup>+</sup> 1885.04, found 1885.33.

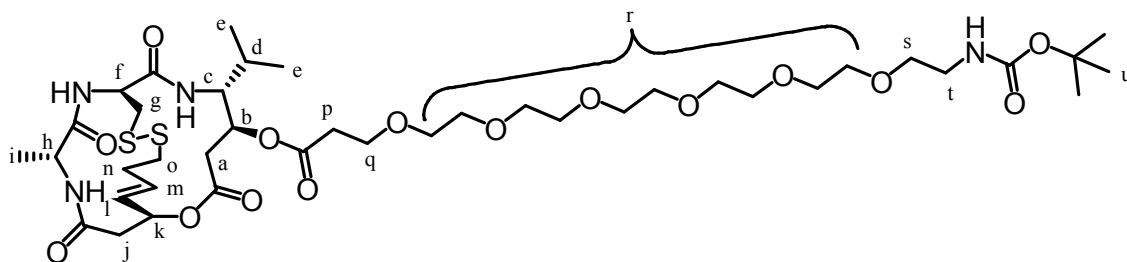


***O*-succinated-spiruchostatin A (10)**. To a solution of spiruchostatin A (**1**) (28 mg, 0.0564 mmol) in dichloromethane (1 mL) was added DMAP (10 mg, 0.0847 mmol) and succinic anhydride (8.5 mg, 0.0847 mmol) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 24 h, the reaction mixture was quenched with water and stirred for 1 h. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by solid phase extraction (VARIAN BOND ELUT<sup>®</sup> C18, eluting with 30% methanol in water) to give *O*-succinated-spiruchostatin A (**10**) (22 mg, 0.0383 mmol, 65%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.97 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, *NH*), 7.01 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, *NH*), 6.02 (m, 1H, m), 5.92 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, l), 5.64 (m, 1H, b), 5.57 (brs, 1H, k), 4.74 (m, 1H, f), 4.10 (m, 1H, h), 3.50-2.98 (m, 4H, g, j, and o), 2.79-2.57 (m, 10H, a, c, j, n, o, p, and q), 2.28-2.23 (m, 2H, d and n), 1.47 (d, *J* = 7.7 Hz, 3H, i), 0.91 (dd, *J* = 6.3 Hz, 6H, e); <sup>13</sup>C NMR (67.8 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 175.9, 174.9, 174.2, 171.9, 171.8, 171.2, 133.6, 132.9, 73.1, 72.6, 61.5, 61.4, 57.9, 54.6, 43.5, 42.0, 38.6, 34.1, 31.7, 31.4, 30.6, 21.5, 20.9, 16.8; IR (neat) 3748, 3316, 2930, 1737, 1656, 1536, 1432, 1265, 1157, 753, 667 (cm<sup>-1</sup>); [α]<sup>21.1</sup><sub>D</sub> = -12.6 (*c* 1.37, MeOH); HRMS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>24</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>+Na]<sup>+</sup> 596.1712, found 596.1707.

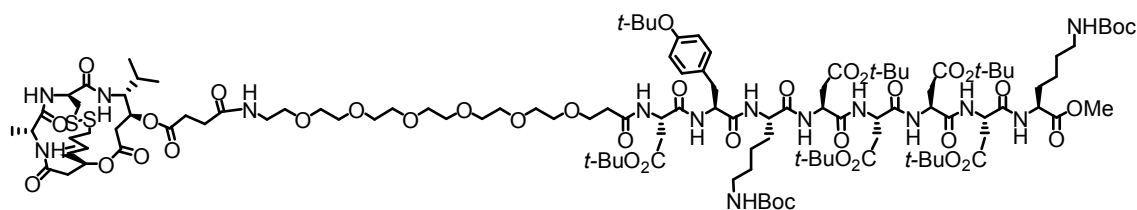


***O*-(21-*t*-Butoxycarbonylamino-4,7,10,13,16,19-hexaoxahenicosanoyl)spiruchostatin A (11)**. To a solution of spiruchostatin A (**1**) (8.2 mg, 0.0165 mmol) in dichloromethane (1 mL) was added

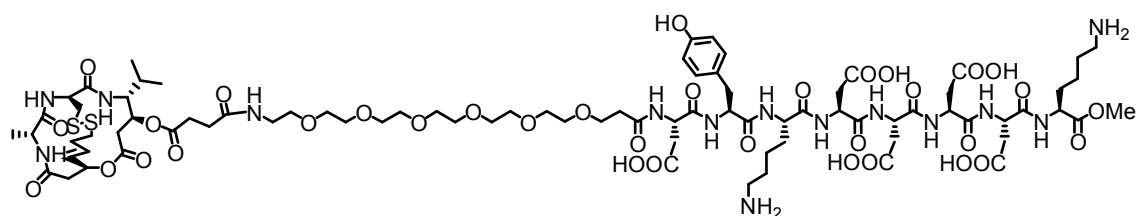
21-*tert*-butoxycarbonylamino-4,7,10,13,16,19-hexaoxaheneicosanoic acid (7.5 mg, 0.0165 mmol), DMAP (4.8 mg, 0.0396 mmol) and MNBA (6.8 mg, 0.0198 mmol) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 24 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (5% methanol in chloroform) and solid phase extraction (VARIAN BOND ELUT<sup>®</sup> C18, eluting with 50% methanol in water) to give *O*-(21-*tert*-butoxycarbonylamino-4,7,10,13,16,19-hexaoxaheneicosanoyl)spiruchostatin A (**11**) (9.7 mg, 0.0107 mmol, 65%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.42 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, *NH*), 6.67 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, *NH*), 6.16 (m, 2H, *NH*), 5.66 (m, 2H, b and m), 5.52 (brs, 1H, l), 5.04 (brs, 1H, k), 4.88 (m, 1H, f), 4.20 (m, 1H, h), 3.71 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, q), 3.59-3.55 (m, 20H, r), 3.47 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, s), 3.24 (m, 2H, t), 3.23-2.96 (m, 5H, g, j, and o), 2.77 (dd, *J* = 14.5, 4.4 Hz, 1H, c), 2.65-2.56 (m, 6H, a, j, n, and p), 2.54 (m, 1H, n), 2.16 (m, 1H, d), 1.45 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, i), 1.37 (s, 9H, u), 0.84 (m, 6H, e); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171.2, 171.0, 170.7, 169.1, 168.8, 156.1, 133.0, 129.1, 70.5, 70.4, 70.3, 69.8, 66.4, 59.4, 54.3, 52.3, 40.8, 40.4, 36.7, 35.4, 33.5, 29.8, 28.4, 20.2, 19.3, 16.6; IR (neat) 3382, 3325, 3006, 2961, 2922, 2875, 1740, 1685, 1658, 1535, 1454, 1433, 1366, 1273, 1162, 1107, 1037, 997, 952, 862, 803, 755, 667, 595, 552, 512 (cm<sup>-1</sup>); [α]<sub>D</sub><sup>25.3</sup> = -8.59 (*c* 0.20, CHCl<sub>3</sub>); HRMS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>40</sub>H<sub>68</sub>N<sub>4</sub>O<sub>15</sub>S<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup> 909.4201, found 909.4221.



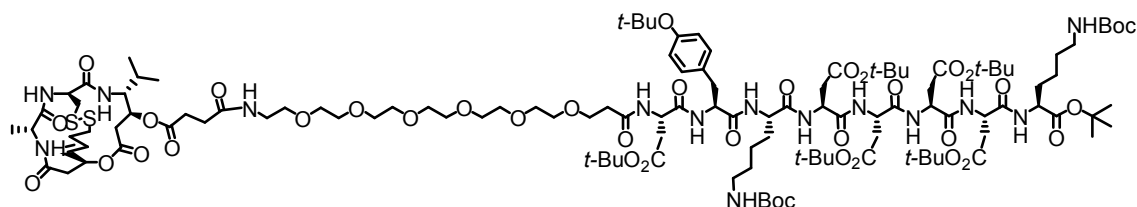
**Spiruchostatin A-PEG-FLAG(*t*Bu)-OMe.** To a solution of Fmoc-PEG-FLAG(*t*Bu)-OMe (**6**) (20.7 mg, 0.00976 mmol) in dichloromethane (1 mL) was added diethylamine (1 mL) and stirred for 12 h. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* and purified by solid phase extraction (VARIAN BOND ELUT<sup>®</sup> C18, eluting with 100% water to 100% methanol). The residue was added a solution of *O*-succinated-spiruchostatin A (**10**) (6.0 mg, 0.00976 mmol), HATU (19 mg, 0.0488 mmol), HOAt (6.6 mg, 0.0488 mmol), and DIEA (17 μL, 0.0976 mmol) in DMF (0.5 mL) and dichloromethane (0.5 mL). After being stirred for 24 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (2% methanol in chloroform) and solid phase extraction (VARIAN BOND ELUT<sup>®</sup> C18, eluting with 50% methanol in water to 100% methanol) to give spiruchostatin A-PEG-FLAG(*t*Bu)-OMe (5.0 mg). HRMS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>115</sub>H<sub>189</sub>N<sub>14</sub>O<sub>39</sub>S<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup> 2454.2678, found 2454.2681.



**Spiruchostatin A-PEG-FLAG-OMe (12).** To a spiruchostatin A-PEG-FLAG(*t*Bu)-OMe (5.0 mg, 0.00204 mmol) was added TFA (0.9 mL) and water (0.1 mL). After being stirred for 1 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by solid phase extraction (VARIAN BOND ELUT<sup>®</sup> C18, eluting with 100% water to 50% methanol in water) and reverse phase HPLC to give spiruchostatin A-PEG-FLAG-OMe (**12**) (ca. 1 mg). MS(ESI-TOF) calcd for  $[C_{81}H_{124}N_{14}O_{35}S_2+2H]^{2+}$  959.40, found 959.36.

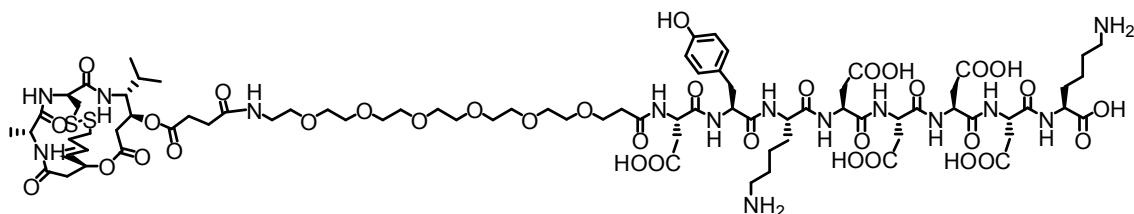


**Spiruchostatin A-PEG-FLAG(*t*Bu)-OtBu.** To a solution of Fmoc-PEG-FLAG(*t*Bu)-OtBu (**7**) (20.5 mg, 0.00966 mmol) in dichloromethane (1 mL) was added diethylamine (1 mL) and stirred for 12 h. The reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was added a solution of *O*-succinated-spiruchostatin A (**10**) (5.5 mg, 0.00966 mmol), PyBOP (10 mg, 0.0193 mmol), and DIEA (7  $\mu$ L, 0.0386 mmol) in DMF (0.5 mL) and dichloromethane (0.5 mL). After being stirred for 24 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (2% methanol in chloroform) and solid phase extraction (VARIAN BOND ELUT<sup>®</sup> C18, eluting with 50% methanol in water to 100% methanol) to give spiruchostatin A-PEG-FLAG(*t*Bu)-OtBu (9 mg, 0.00360 mmol, 37%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) see spectrum 17; MS(ESI-TOF) calcd for  $[C_{118}H_{194}N_{14}O_{39}S_2+H]^+$  2496.31, found 2496.30.

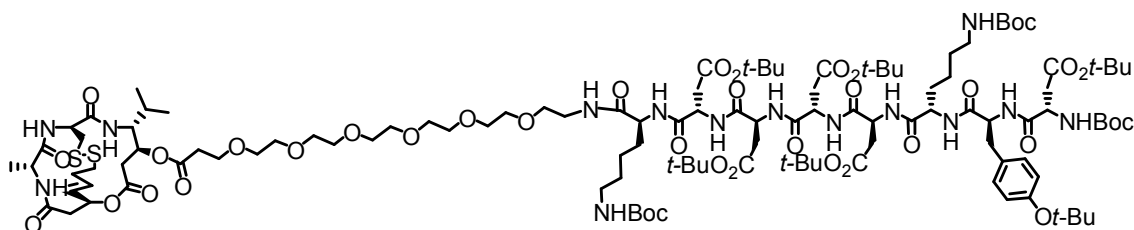


**Spiruchostatin A-PEG-FLAG-OH (13).** To a spiruchostatin A-PEG-FLAG(*t*Bu)-OtBu (9 mg, 0.00360 mmol) was added TFA (0.9 mL) and water (0.1 mL). After being stirred for 1 h, the reaction

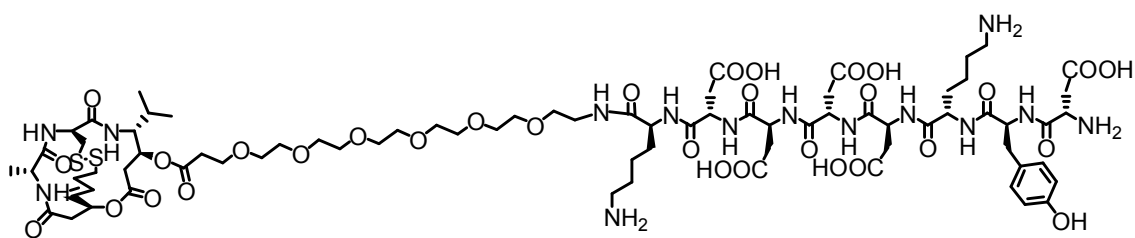
mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by solid phase extraction (VARIAN BOND ELUT<sup>®</sup> C18, eluting with 100% water to 50% methanol in water) and reverse phase HPLC to give spiruchostatin A-PEG-FLAG-OH (**13**) (1.0 mg, 0.000525 mmol, 15%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) see spectrum 14, 15; MS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>80</sub>H<sub>122</sub>N<sub>14</sub>O<sub>35</sub>S<sub>2</sub>+2H]<sup>2+</sup> 952.39, found 952.99.



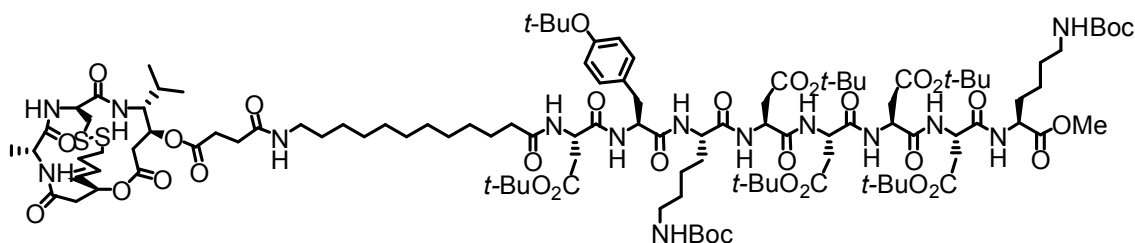
**Spiruchostatin A-PEG-FLAG(*t*Bu)-NHBoc.** To a *O*-(21-*tert*-Butoxycarbonylamino-4,7,10,13,16,19-hexaoxaheneicosanoyl)spiruchostatin A (**11**) (9.7 mg, 0.0107 mmol) was added HCl (4 M in ethyl acetate, 1 mL) and stirred for 1 h. The reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was added a solution of Boc-FLAG(*t*Bu)-OH (**5**) (18 mg, 0.0107 mmol), PyBOP (8 mg, 0.0161 mmol), and DIEA (3.7  $\mu$ L, 0.0214 mmol) in dichloromethane (1 mL). After being stirred for 24 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (2% methanol in chloroform) and solid phase extraction (VARIAN BOND ELUT<sup>®</sup> C18, eluting with 50% methanol in water to 100% methanol) and GPC to give spiruchostatin A-PEG-FLAG(*t*Bu)-NHBoc (10 mg, 0.0408 mmol, 38%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) see spectrum 16; MS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>115</sub>H<sub>190</sub>N<sub>14</sub>O<sub>38</sub>S<sub>2</sub>+2H]<sup>2+</sup> 1220.64, found 1220.64



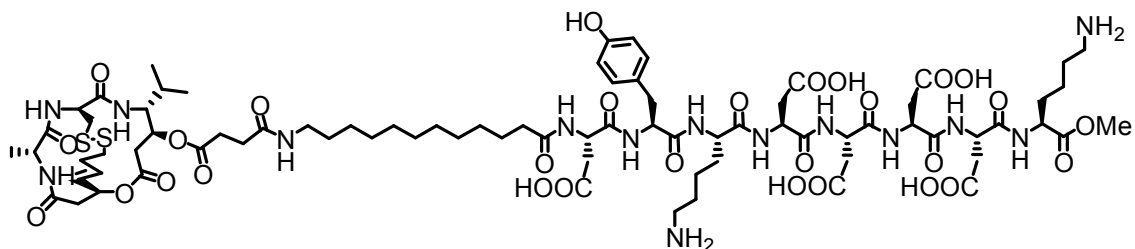
**Spiruchostatin A-PEG-FLAG-NH<sub>2</sub> (14).** To a spiruchostatin A-PEG-FLAG(*t*Bu)-NHBoc (10 mg, 0.00410 mmol) was added water (100  $\mu$ L) and TFA (900  $\mu$ L) and stirred for 1 h. The reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by solid phase extraction (VARIAN BOND ELUT<sup>®</sup> C18, eluting with 100% water to 30% methanol in water) to give spiruchostatin A-PEG-FLAG-NH<sub>2</sub> (**14**) (7 mg, 0.00388 mmol, 95%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) see spectrum 17, 18; MS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>76</sub>H<sub>118</sub>N<sub>14</sub>O<sub>32</sub>S<sub>2</sub>+3H]<sup>3+</sup> 601.92, found 601.88.



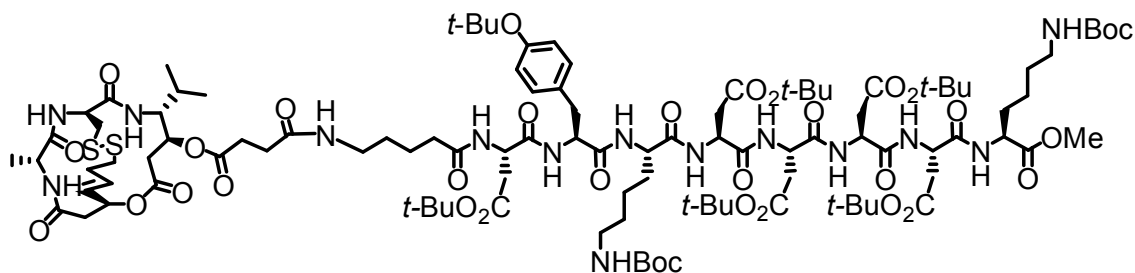
**Spiruchostatin A-C12-FLAG(*t*Bu)-OMe.** To a solution of Fmoc-C12-FLAG(*t*Bu)-OMe (**8**) (15.2 mg, 0.00766 mmol) in dichloromethane (1 mL) was added diethylamine (1 mL) and stirred for 12 h. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* and purified by solid phase extraction (VARIAN BOND ELUT<sup>®</sup> C18, eluting with 100% water to 100% methanol). The residue was added a solution of *O*-succinated-spiruchostatin A (**10**) (4.4 mg, 0.00766 mmol), HATU (5.8 mg, 0.0153 mmol), and DIEA (5  $\mu$ L, 0.0306 mmol) in DMF (0.5 mL) and dichloromethane (0.5 mL). After being stirred for 24 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (2% methanol in chloroform) and solid phase extraction (VARIAN BOND ELUT<sup>®</sup> C18, eluting with 50% methanol in water to 100% methanol) and GPC to give spiruchostatin A-C12-FLAG(*t*Bu)-OMe (2.9 mg, 0.00125 mmol, 16%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) see spectrum 19; IR (neat) 3315, 2929, 1735, 1655, 1535, 1367, 1255, 1158, 846, 756 (cm<sup>-1</sup>); [ $\alpha$ ]<sup>24.4</sup><sub>D</sub> = -28.4 (*c* 0.145, CHCl<sub>3</sub>); MS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>112</sub>H<sub>182</sub>N<sub>14</sub>O<sub>33</sub>S<sub>2</sub>+2H]<sup>2+</sup> 1158.63, found 1158.75.



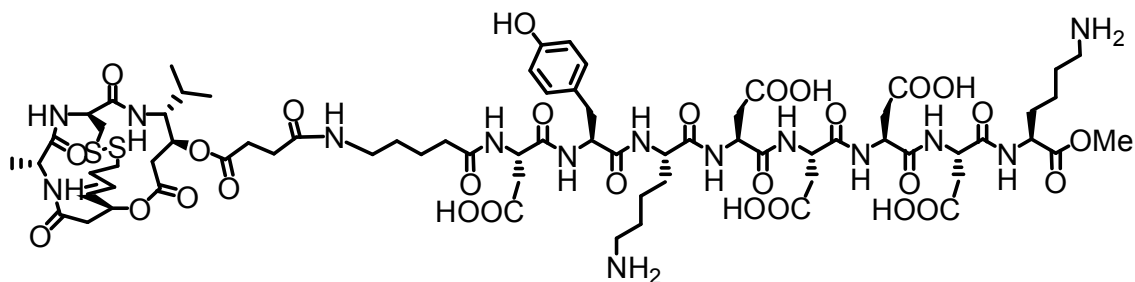
**Spiruchostatin A-C12-FLAG-OMe (15).** To a spiruchostatin A-C12-FLAG(*t*Bu)-OMe (2.9 mg, 0.00125 mmol) was added TFA (0.9 mL) and water (0.1 mL). After being stirred for 1 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by solid phase extraction (VARIAN BOND ELUT<sup>®</sup> C18, eluting with 100% water to 50% methanol in water) to give spiruchostatin A-C12-FLAG-OMe (**15**) (0.9 mg, 0.000506 mmol, 40%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) see spectrum 20, 21; MS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>78</sub>H<sub>118</sub>N<sub>14</sub>O<sub>29</sub>S<sub>2</sub>+2H]<sup>2+</sup> 890.39, found 890.43.

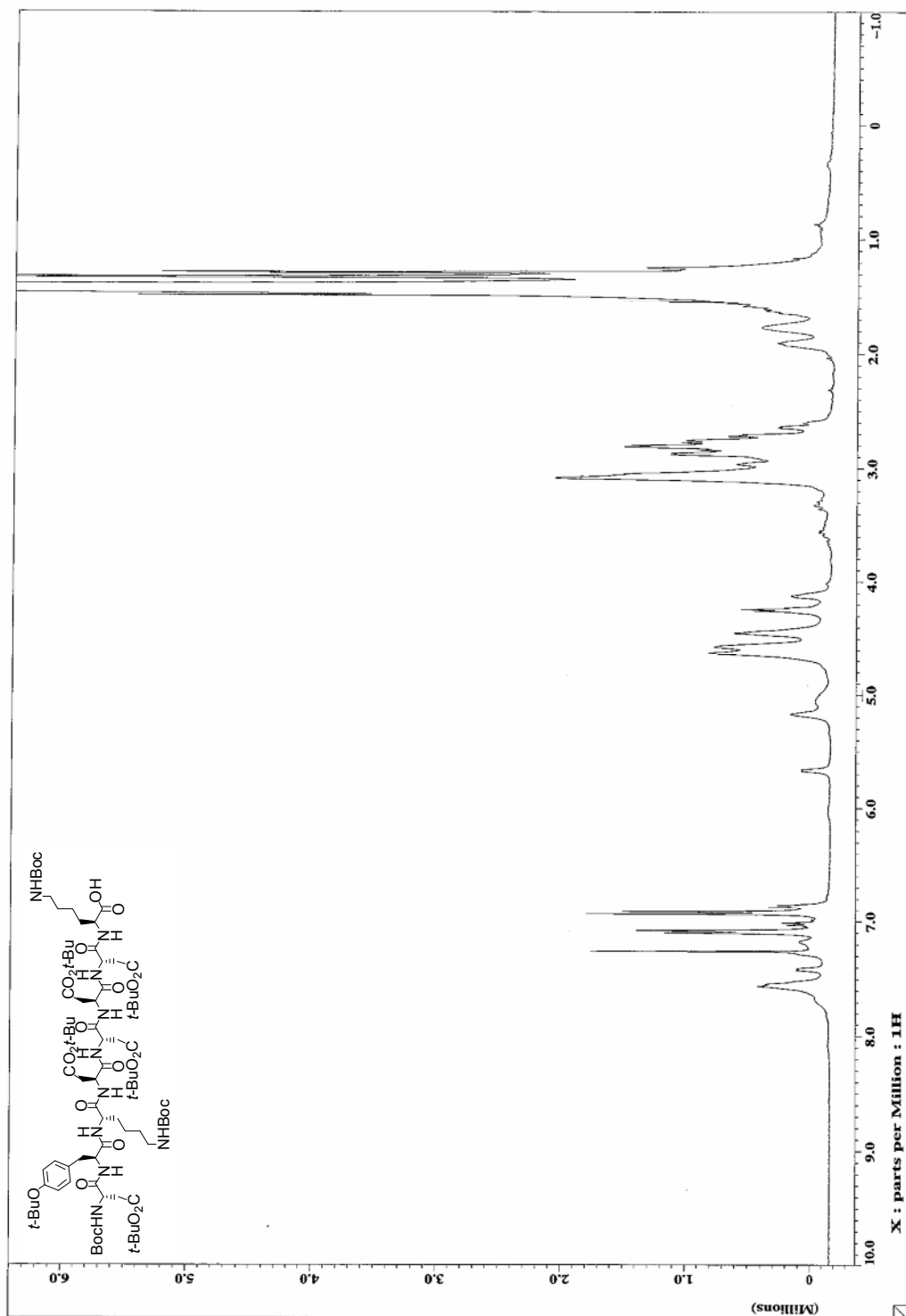


**Spiruchostatin A-C5-FLAG(*t*Bu)-OMe.** To a solution of Fmoc-C5-FLAG(*t*Bu)-OMe (**9**) (5.9 mg, 0.00313 mmol) in dichloromethane (1 mL) was added diethylamine (1 mL) and stirred for 12 h. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* and purified by solid phase extraction (VARIAN BOND ELUT<sup>®</sup> C18, eluting with 100% water to 100% methanol). The residue was added a solution of *O*-succinated-spiruchostatin A (**10**) (1.8 mg, 0.00313 mmol), PyBOP (16 mg, 0.0313 mmol), HOAt (4.3 mg, 0.0313 mmol), and DIEA (11  $\mu$ l, 0.0626 mmol) in DMF (0.5 mL) and dichloromethane (0.5 mL). After being stirred for 24 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (2% methanol in chloroform) and solid phase extraction (VARIAN BOND ELUT<sup>®</sup> C18, eluting with 50% methanol in water to 100% methanol) to give spiruchostatin A-C5-FLAG(*t*Bu)-OMe (5.0 mg). MS(ESI-TOF) calcd for  $[\text{C}_{105}\text{H}_{168}\text{N}_{14}\text{O}_{33}\text{S}_2+2\text{H}]^{2+}$  1109.57, found 1109.57.



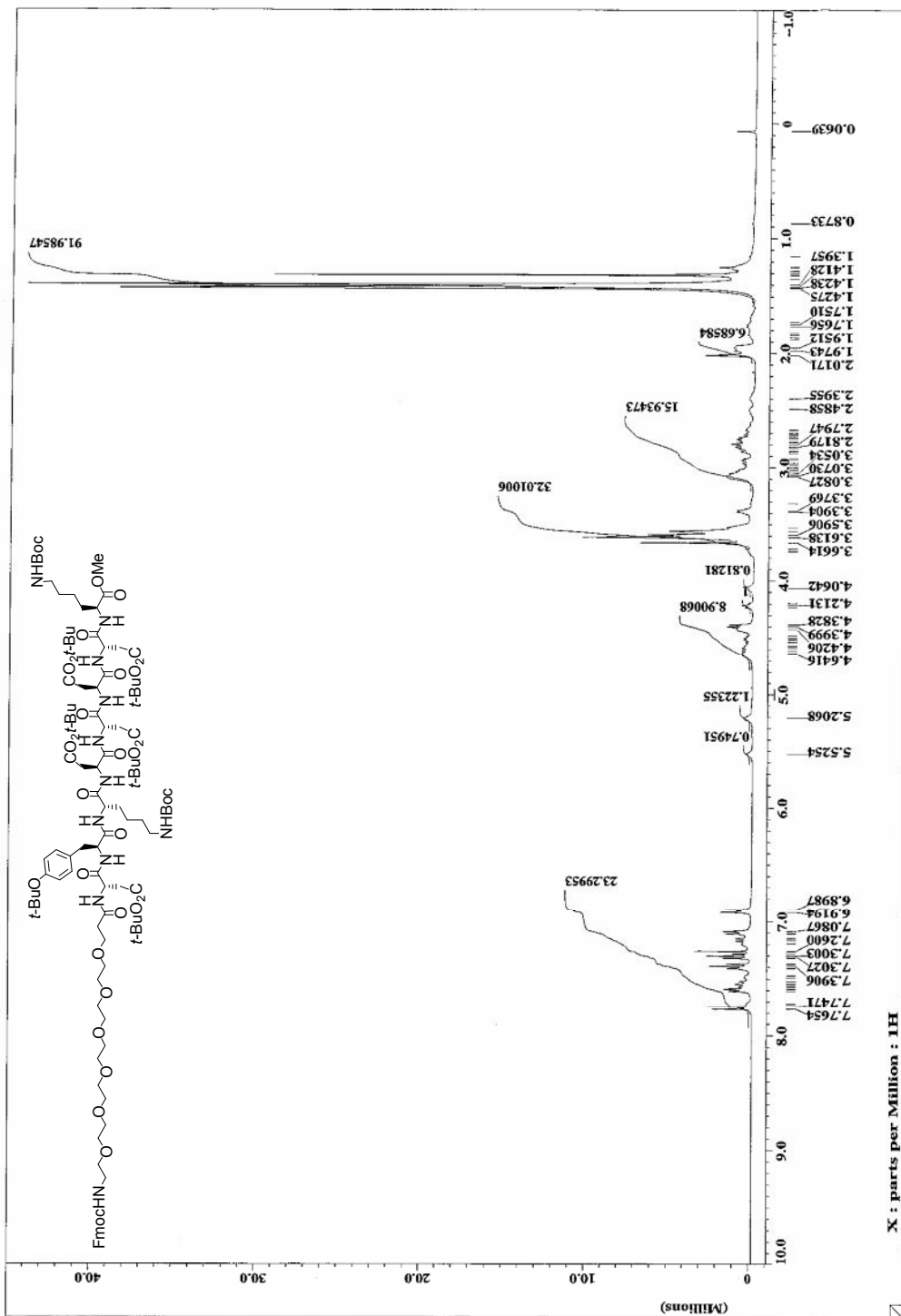
**Spiruchostatin A-C5-FLAG-OMe (16).** To a spiruchostatin A-C5-FLAG(*t*Bu)-OMe (5.0 mg) was added TFA (0.9 mL) and water (0.1 mL). After being stirred for 1 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by solid phase extraction (VARIAN BOND ELUT<sup>®</sup> C18, eluting with 100% water to 50% methanol in water) and HPLC to give spiruchostatin A-C5-FLAG-OMe (**16**) (ca. 1mg). MS(ESI-TOF) calcd for  $[\text{C}_{71}\text{H}_{104}\text{N}_{14}\text{O}_{29}\text{S}_2+2\text{H}]^{2+}$  841.33, found 841.31.





Spectrum 1 (Boc-FLAG(*t*Bu)-OH)



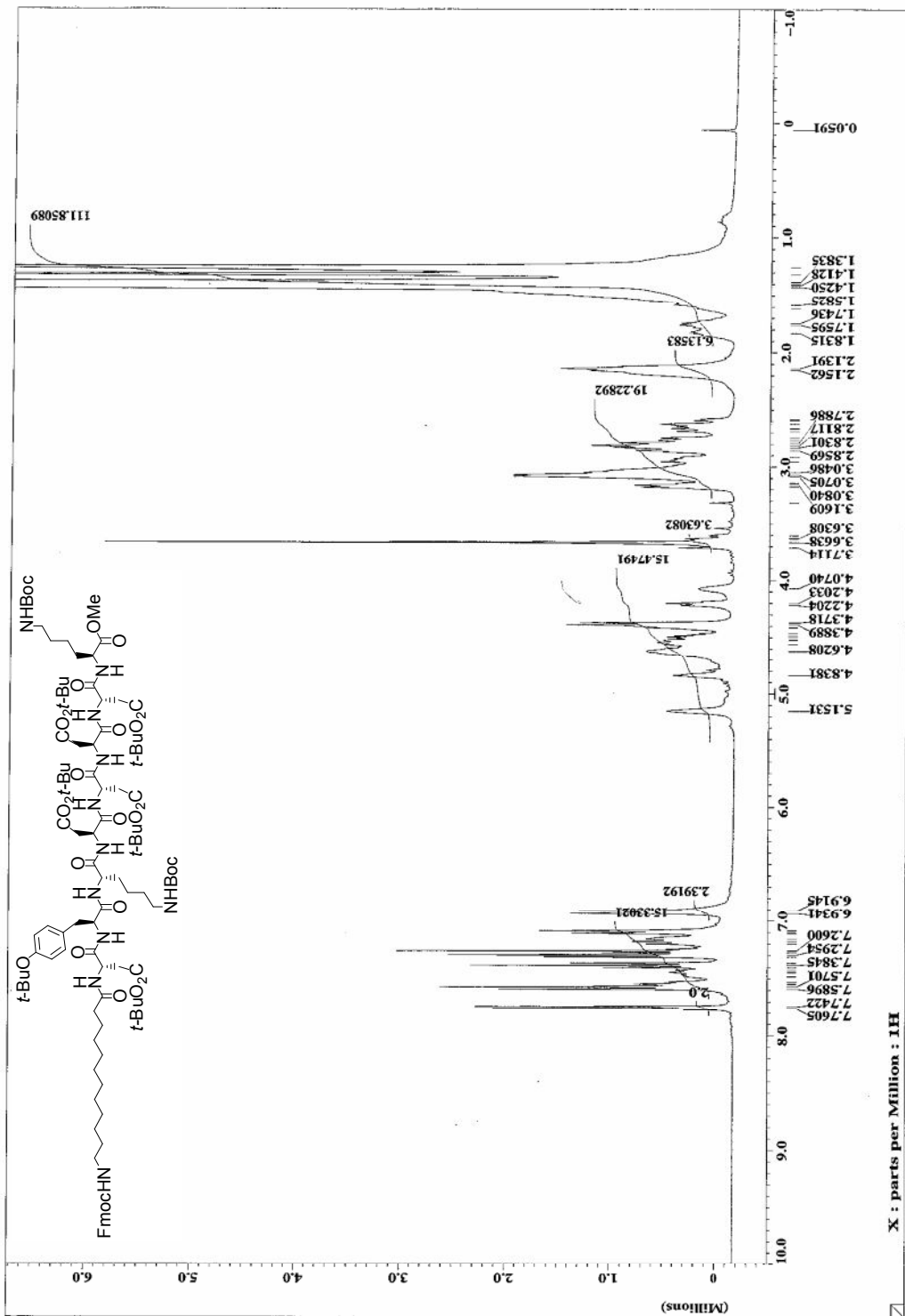


Spectrum 3 (Fmoc-PEG-FLAG(tBu)-OM)

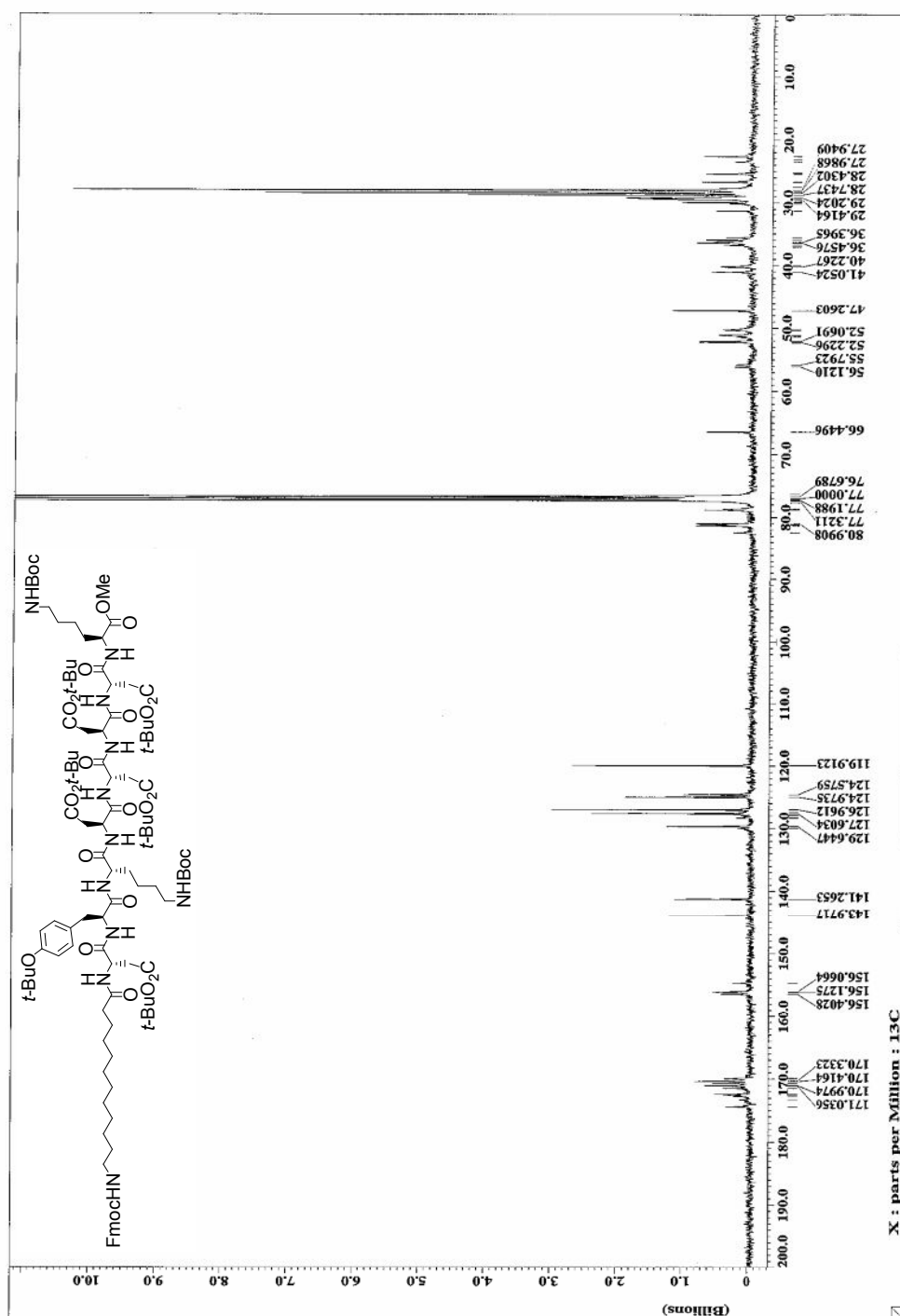








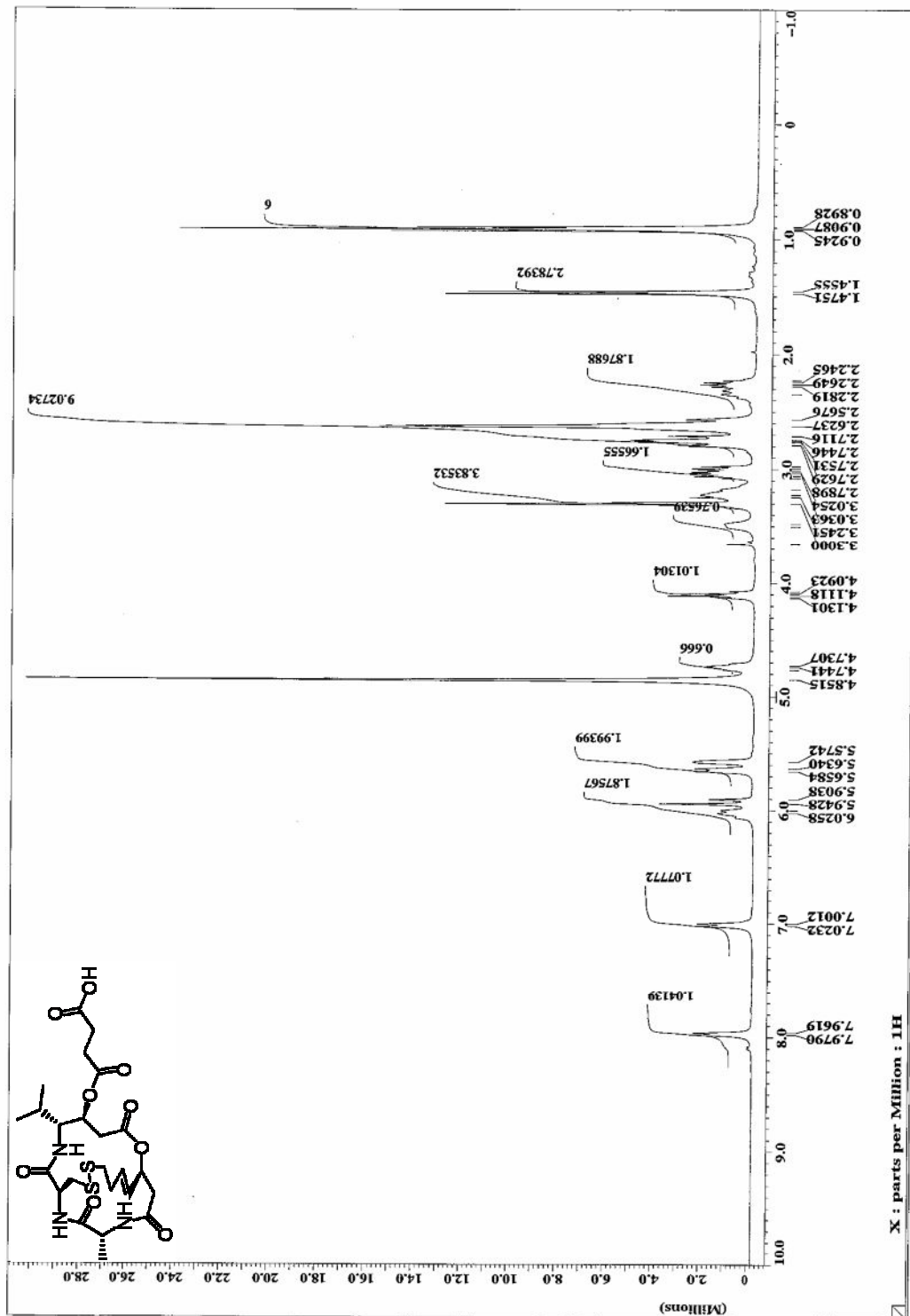
Spectrum 7 (Fmoc-C12-FLAG(tBu)-OMe)



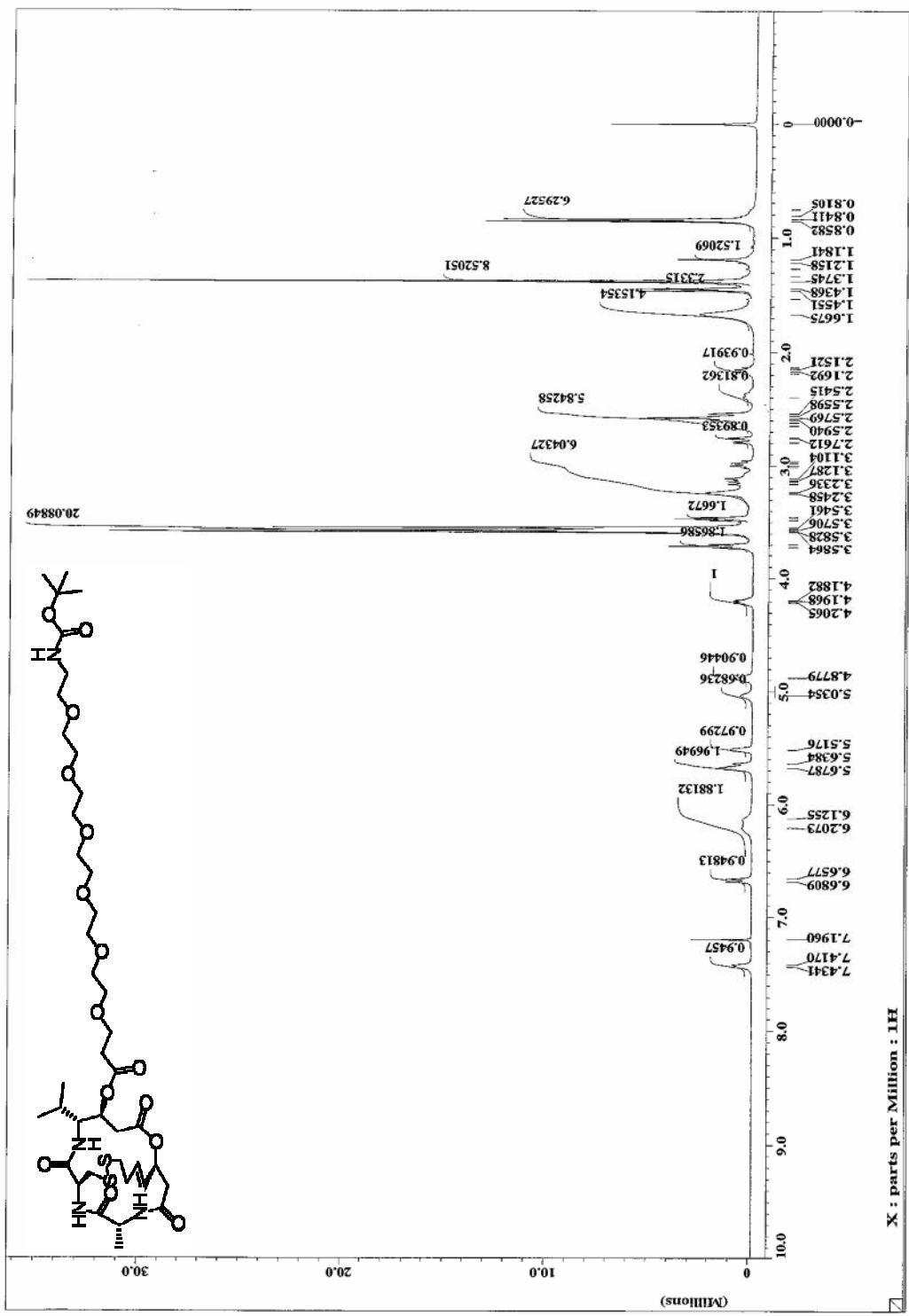
Spectrum 8 (Fmoc-C12-FLAG(tBu)-OMe)



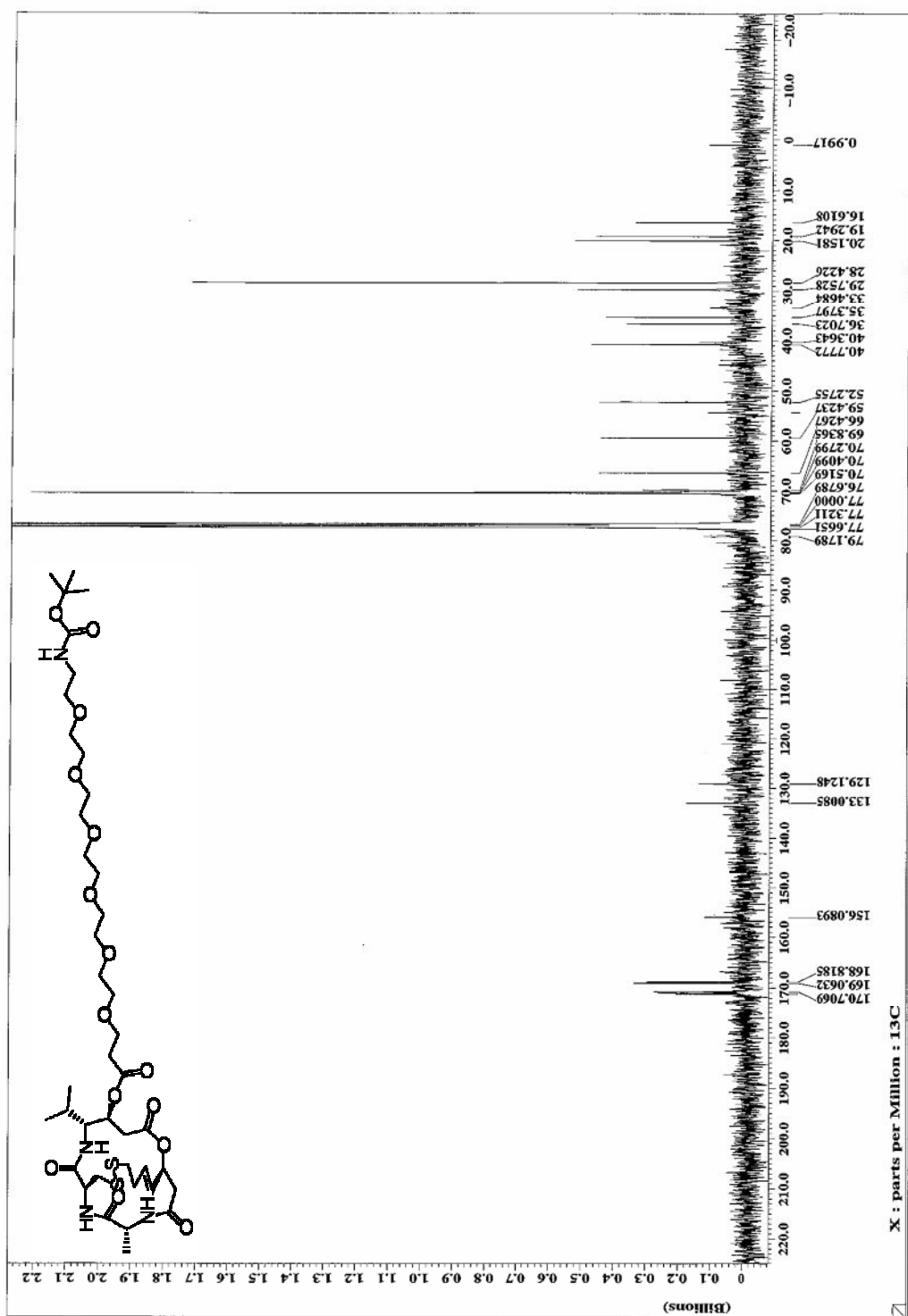




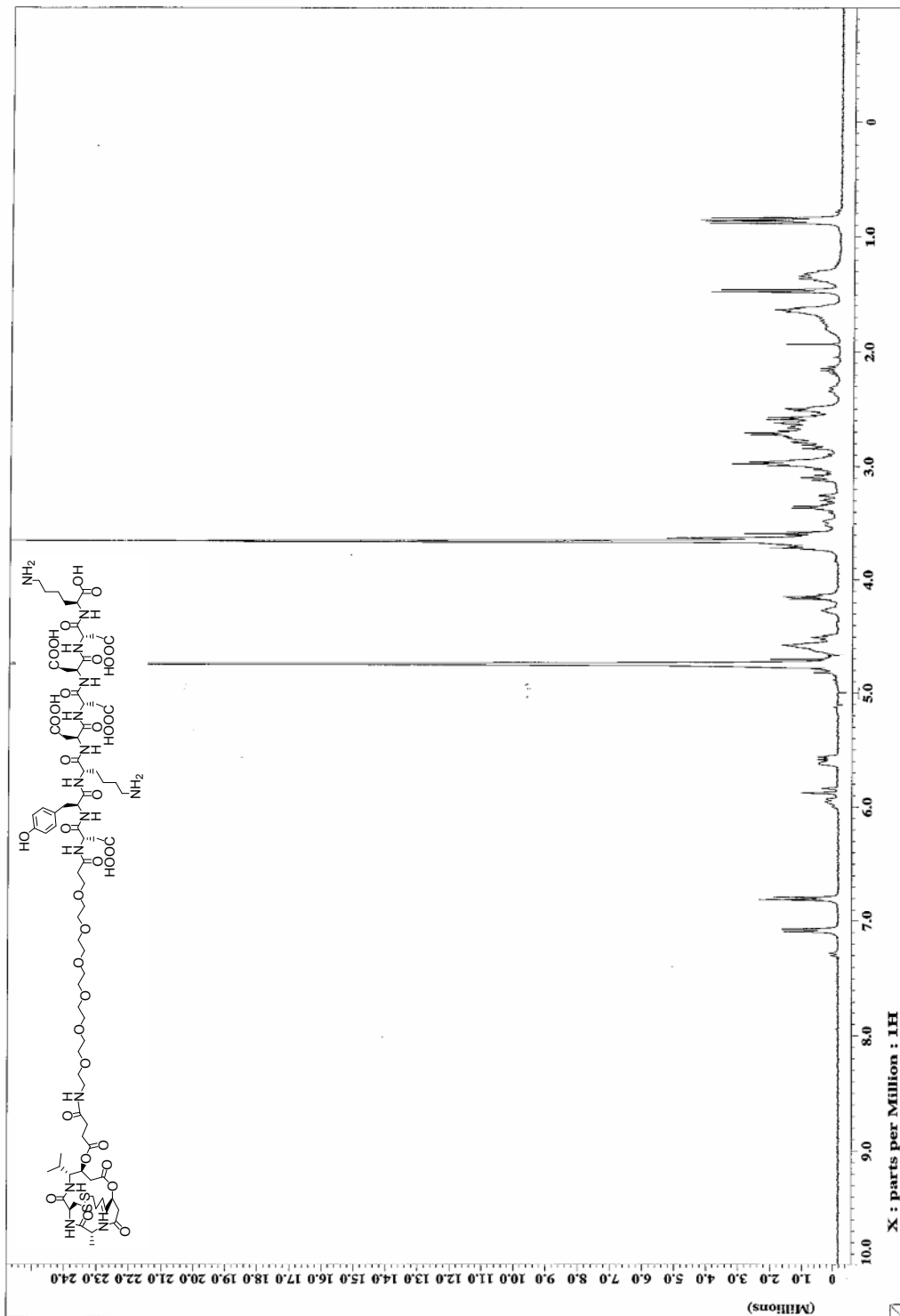
Spectrum 11 (*O*-succinated-spiruchostatin A)



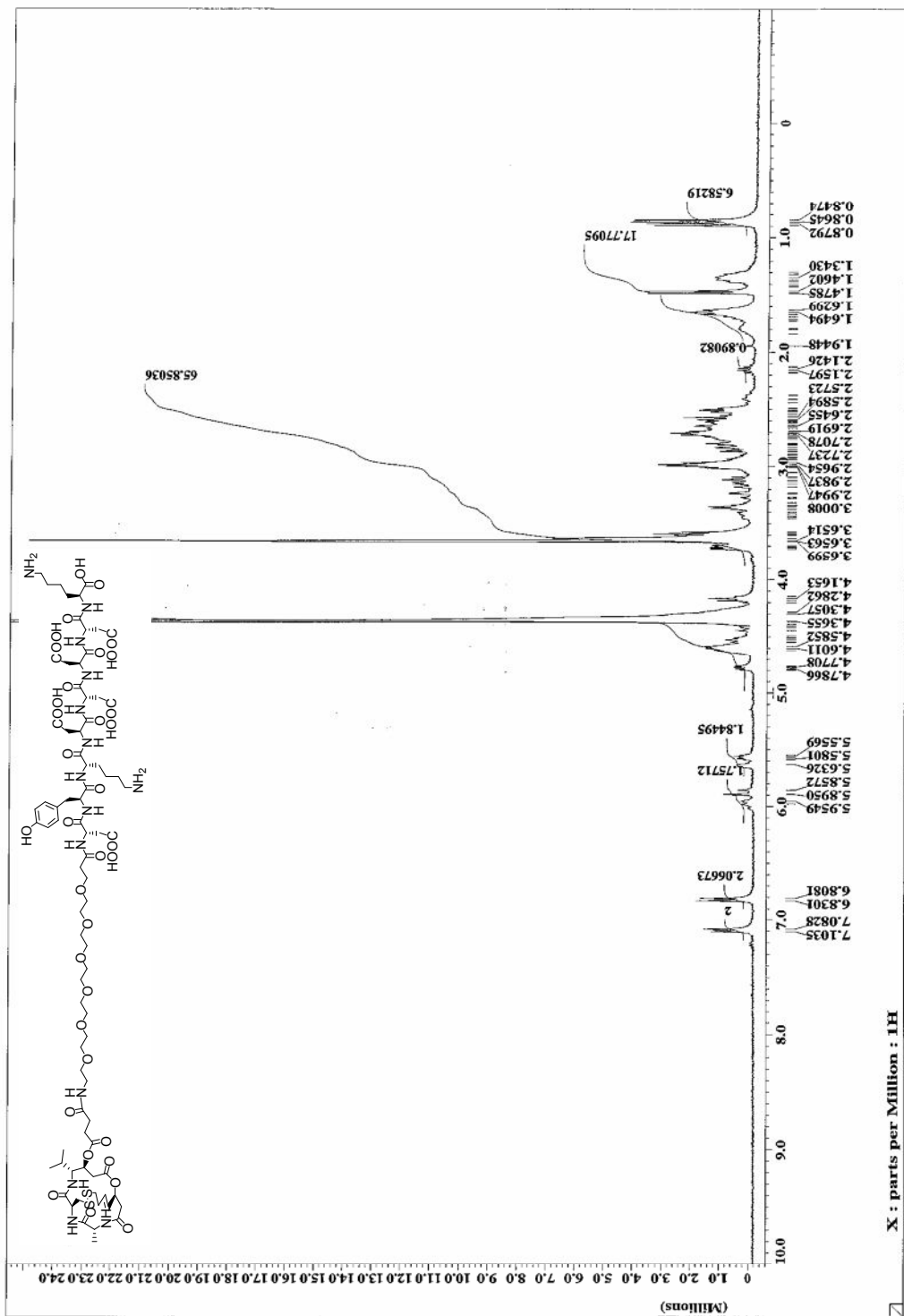
Spectrum 12 (Spirucho-PEG-NHBoc)



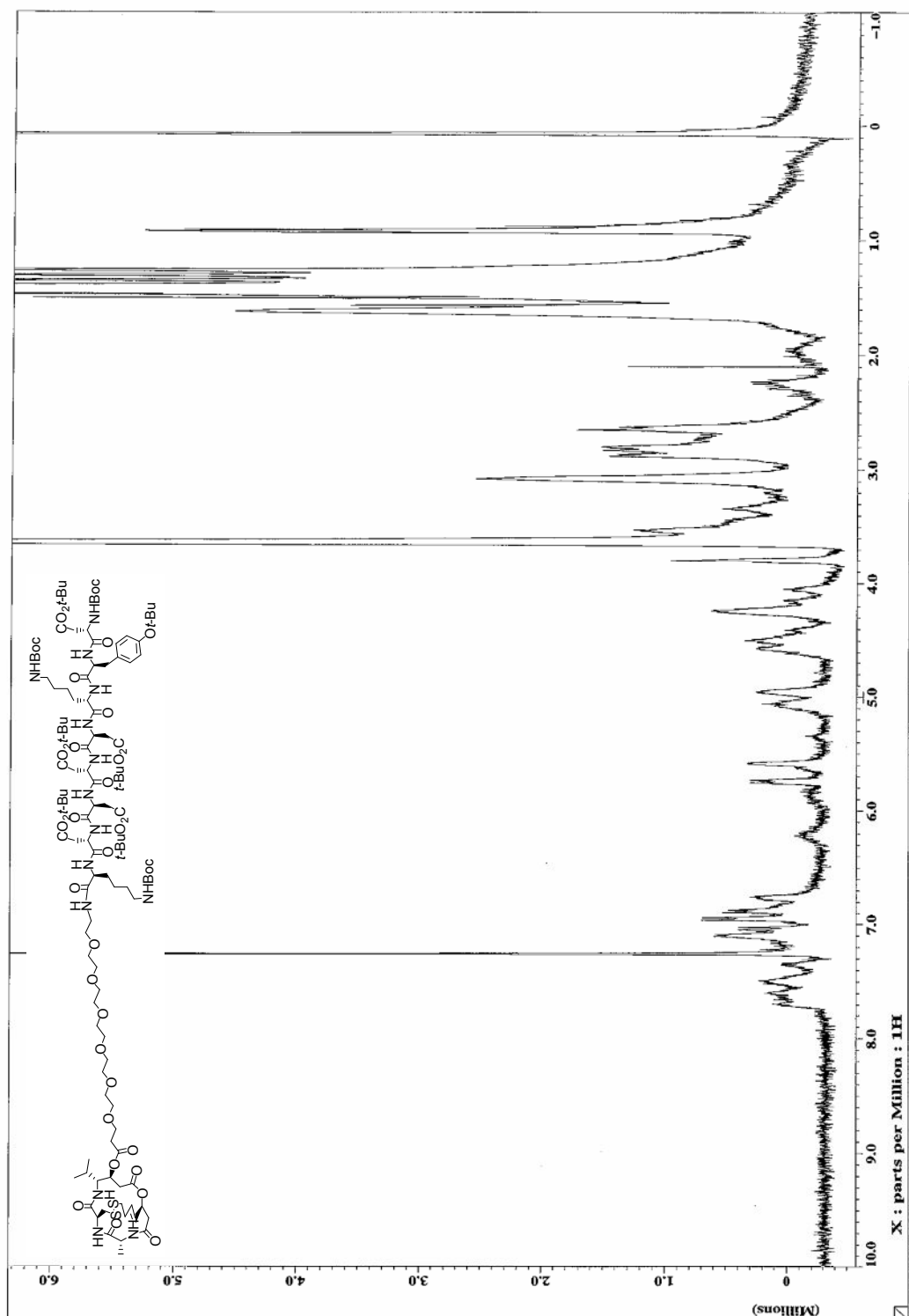
Spectrum 13 (Spirucho-PEG-NHBoc)



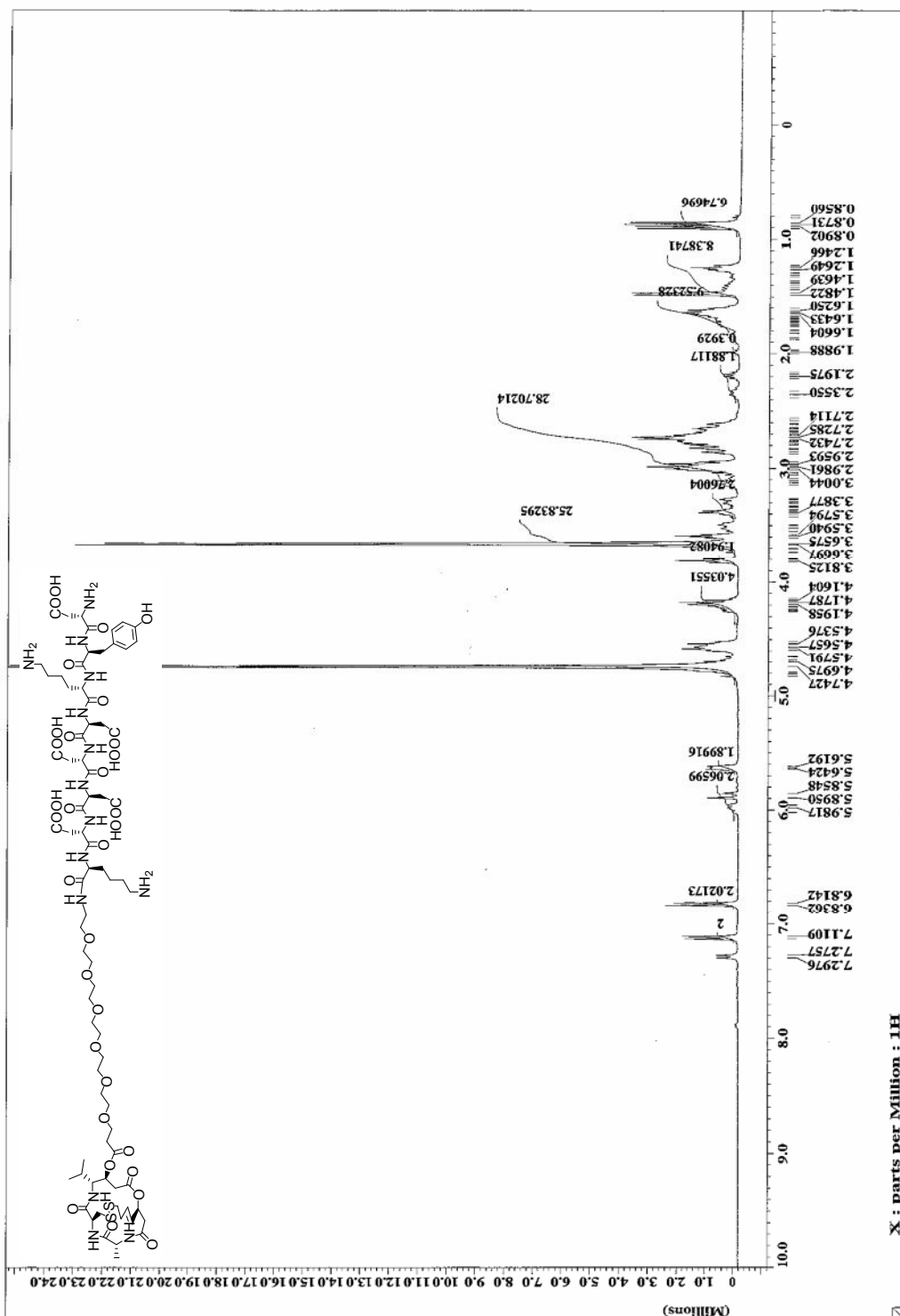
Spectrum 14 (Spirucho-PEG-FLAG-OH 30 °C)



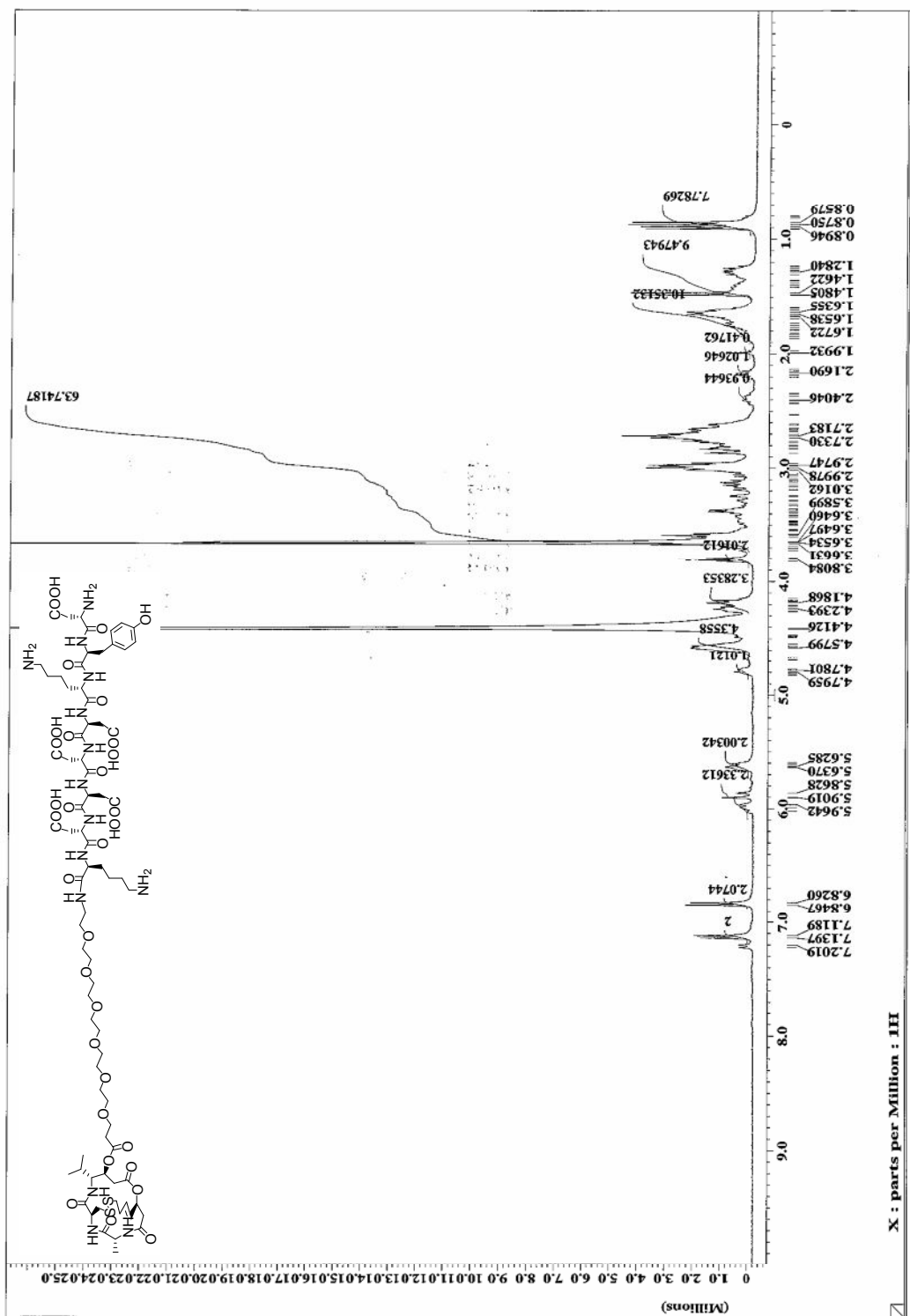
Spectrum 15 (Spirucho-PEG-FLAG-OH 65 °C)



Spectrum 16 (Spirucho-PEG-FLAG(tBu)-NH-Boc)

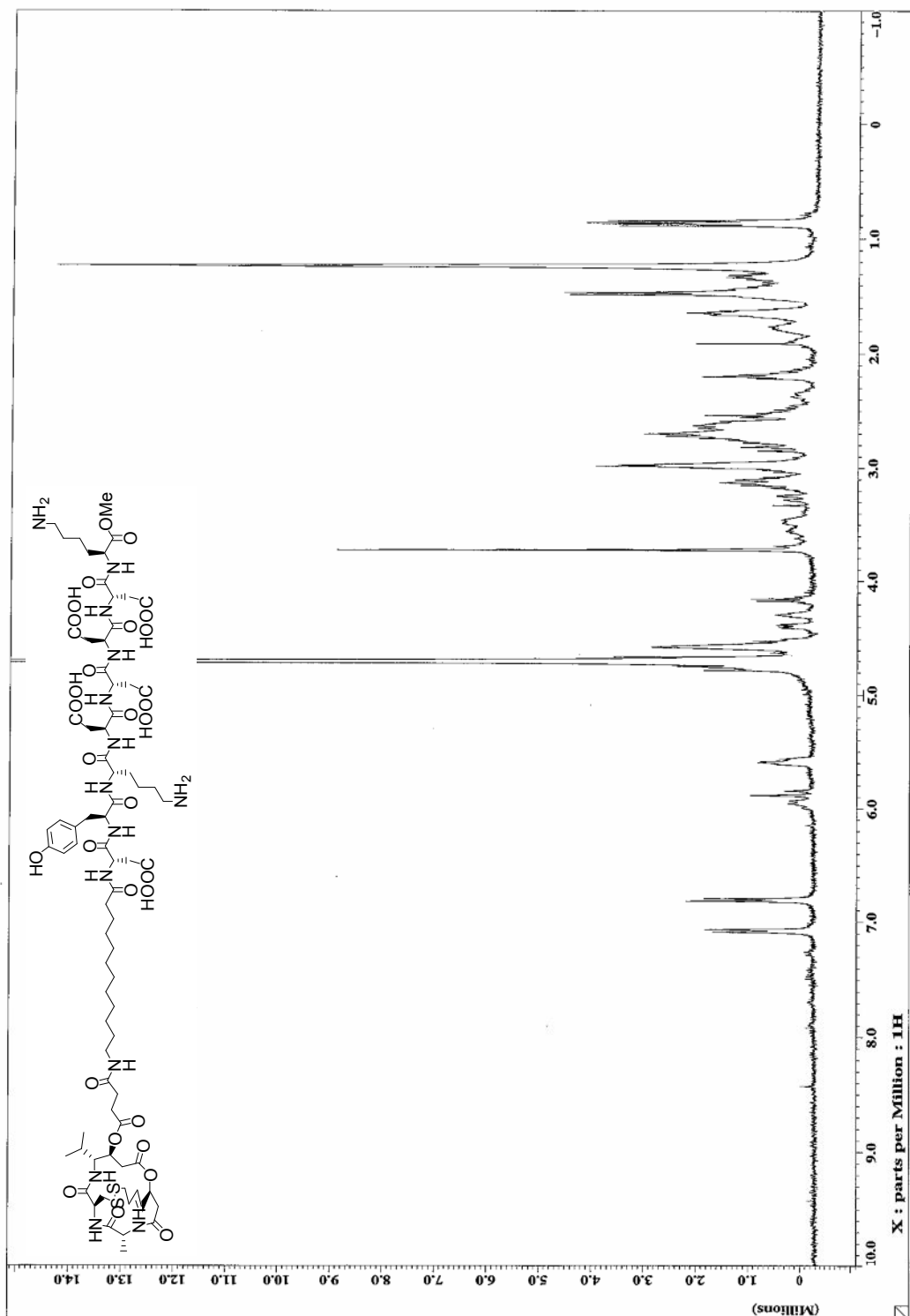


Spectrum 17 (Spirucho-PEG-FLAG-NH<sub>2</sub>, 30 °C)

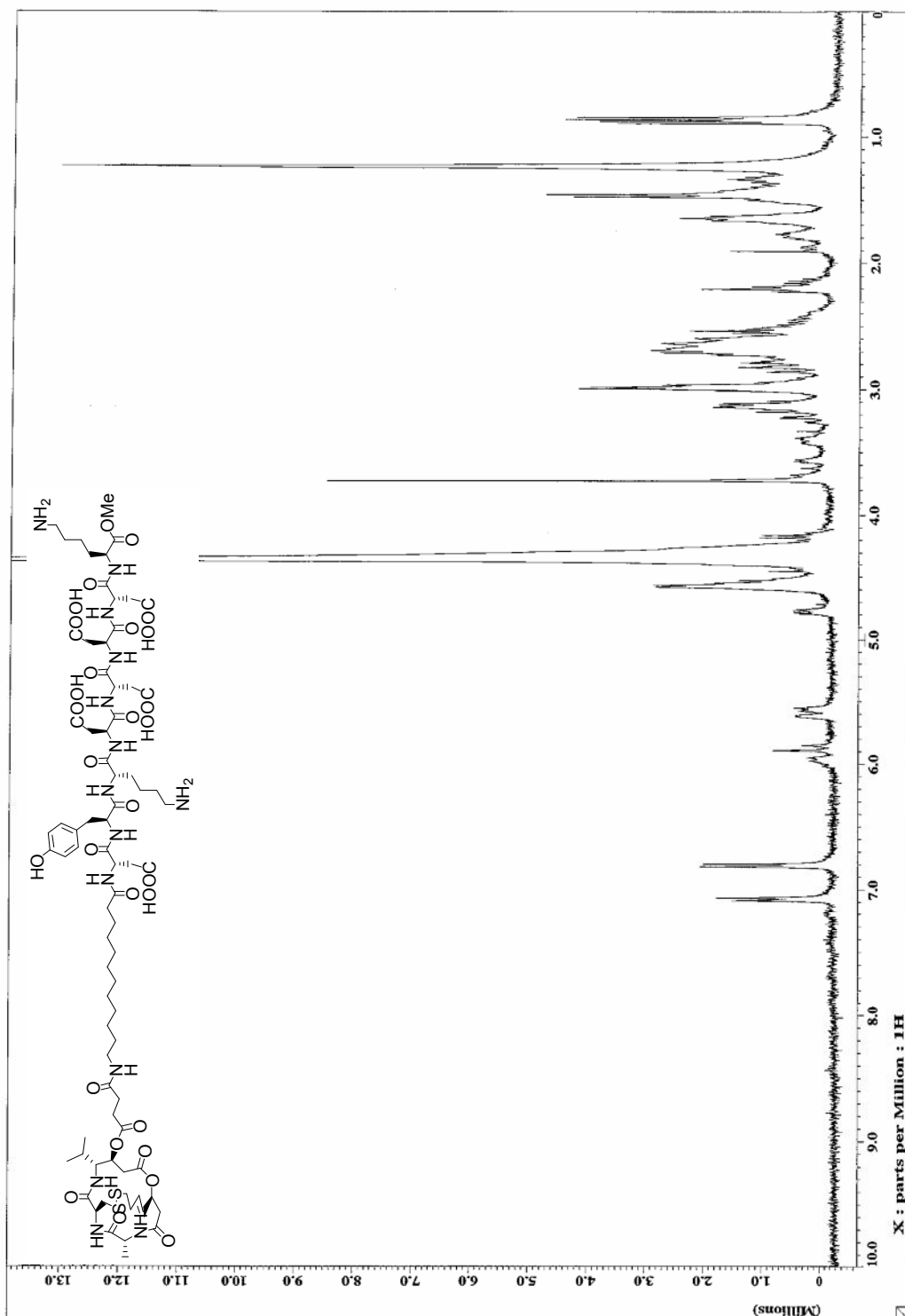


Spectrum 18 (Spirucho-PEG-FLAG-NH<sub>2</sub> 60 °C)





Spectrum 20 (Spirucho-C12-FLAG-OMe 30 °C)



Spectrum 21 (Spirucho-C12-FLAG-OMe 65 °C)

## 第 4 章

# 「固相合成法を用いたスピルコスタチン A の 全合成および誘導体合成」

#### 4-1 はじめに

第3章において液相でのスピルコスタチン A の全合成を達成した。本章ではスピルコスタチンライブラリー合成に向け、まずスピルコスタチン A の固相合成による全合成を行い、その後、数種類の誘導体を合成することで確立した合成ルートがライブラリー合成にも適用可能であるか検討した。

#### 4-2 合成計画

液相での全合成はスタチン誘導体と  $\beta$ -ヒドロキシ酸との間を環化位置とし、マクロラクトン化、ジスルフィド結合形成を行うことで達成した (Figure 4-1)<sup>1)</sup>。

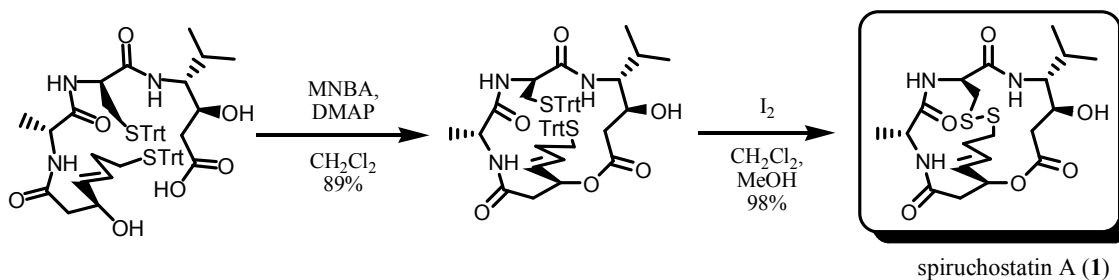


Figure 4-1

固相合成によるライブラリー合成を考えた場合、多種類の化合物を効率よく合成するためには、液相での反応を行うことなく固相から切り出すと同時に最終生成物が得られる合成ルートが理想的である。スピルコスタチン A の固相合成を考えるなら、固相上でマクロラクトン化、ジスルフィド結合形成をすることができれば液相での反応を一切行うことなく全合成が達成できる。スタチン誘導体のヒドロキシル基やシステインのチオール基を固相へ担持すればそのような合成も考えられるが、液相合成以上の工程数が見込まれるうえ、スタチン誘導体やシステイン部位を変えた誘導体を合成する際には適用できない可能性がある。そのためスタチン誘導体のカルボン酸で固相へ担持させる合成ルートを選んだ (Figure 4-2)。

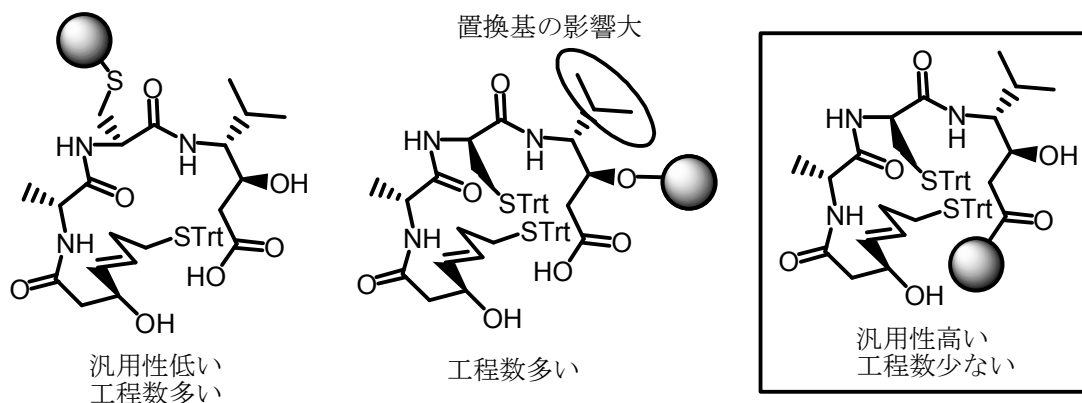


Figure 4-2

第 3 章においてジスルフィド結合形成を先に行った場合、マクロラクトン化が進行しなかったことから、固相合成を用いても最後のジスルフィド結合形成は液相で行わなければならない。だが、ライブラリー合成ではシステイン部位も変えた、分子内でジスルフィド結合による架橋構造を有さない化合物も合成する予定であるのでこのことは必ずしも重要ではない。したがって、マクロラクトン化により環化しながら切り出しを行う合成ルートが望ましい (Figure 4-3)。

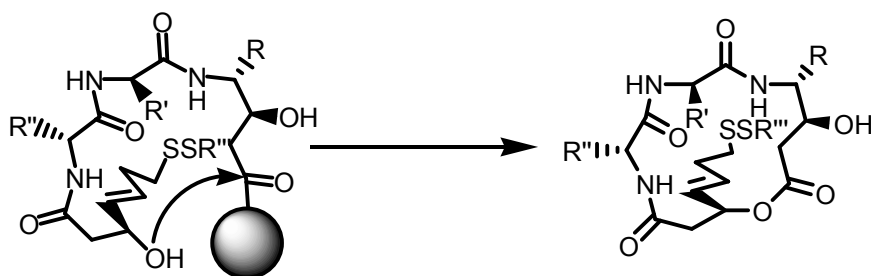


Figure 4-3

固相合成を行ううえでもう一つ重要な点がある。液相の全合成ではスタチン誘導体のラクタム化を抑えるため、アミノ基の保護基として酸性条件下脱保護する Boc 基を選択した。一方、その他のアミノ酸は酸性条件に不安定なトリチル基に影響を与えないよう、弱塩基性条件下脱保護する Fmoc 保護体を用いた。通常、固相ペプチド合成ではアミノ酸の Boc 保護体を用い、酸による脱保護した後、縮合を繰り返す Boc 法による合成と、Fmoc 保護体を用い、塩基性条件下脱保護した後、縮合を行う Fmoc 法による合成のどちらかがとられる。Boc 法では最終生成物は一般的に塩基性条件下固相から切り出しを行う。一方、Fmoc 法では酸性条件において固相からの切り出しを行う。つまり、Boc 法と Fmoc 法では脱保護と切り出しの条件が逆の関係にあるので、これらに用いられるリンカーでは Boc 保護体と Fmoc 保護体両方を扱うような合成ルートは適用できない。すなわち、スピルコスタチン A の固相合成においては、Fmoc 法のリンカーでは最初の Boc 基の脱保護ができず、Boc 法のリンカーではシステイン残基の Fmoc 基の脱保護ができない。よって、通常のペプチド合成に用いられるリンカーは使用できない (Figure 4-4)。

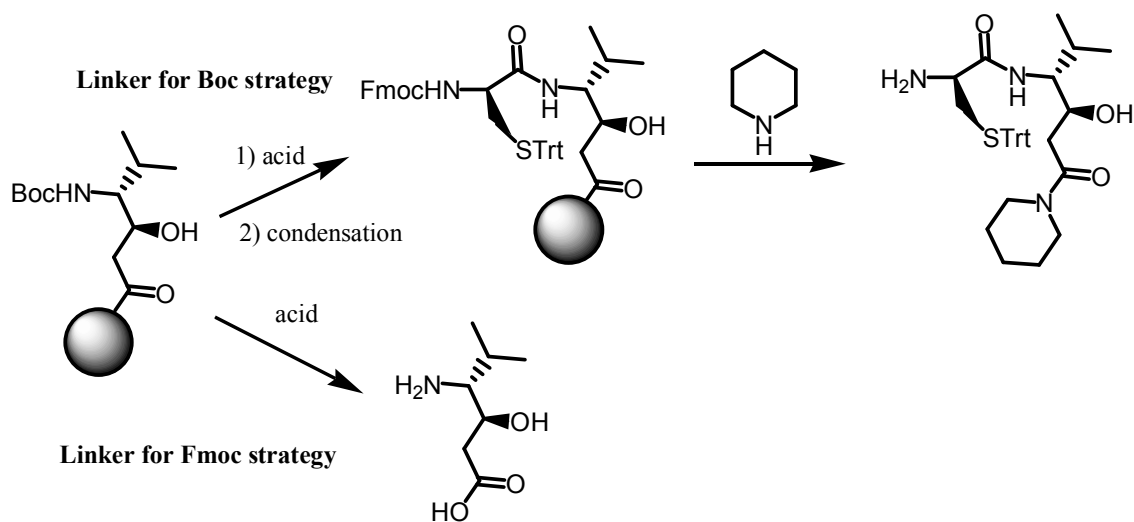
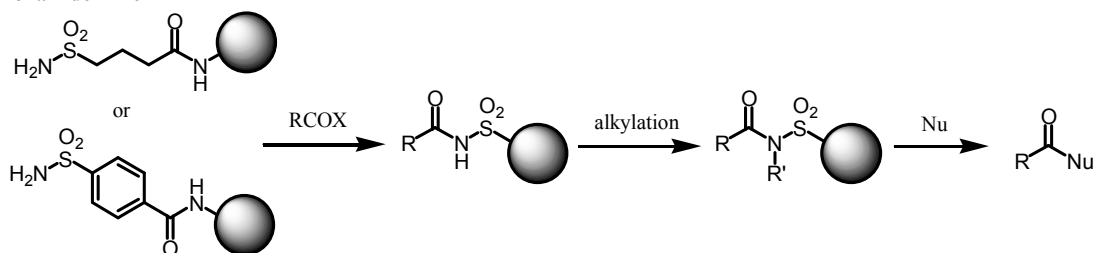


Figure 4-4

酸、塩基どちらの条件でも安定であるためにはかなり強固な結合で基質を固相へ担持しなければならない。しかし、固相から切り出す際にはできるだけ温和な条件で行えることが望ましい。この相反する性質をあわせ持ったリンカーとして **Safty-catch** リンカーがある。**Safty-catch** リンカーは通常は様々な反応条件において安定であるが、活性化を行うことで容易に切り出しを行えるようになる。代表的なものとしてスルホンアミドリンカーとヒドラジンリンカーがあり、どちらも活性化することによってアシル基が求核剤と反応しやすくなり、アミド化やエステル化によって固相から切り出せるようになる<sup>2)</sup>。そのため、分子内に求核部位があれば分子内環化反応による環化切り出しも可能である (Figure 4-5)<sup>3)</sup>。

**Sulfonamide linker**



**Hydrazine linker**

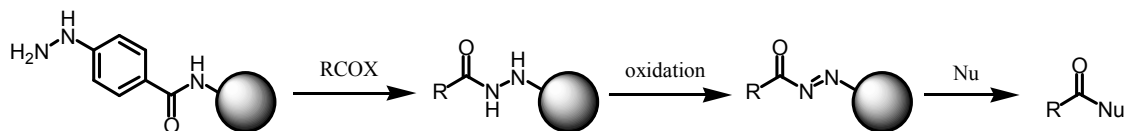


Figure 4-5

したがって、スピルコスタチン A の固相全合成には理想的なリンカーであるといえる。そこで **Safty-catch** リンカーを用いたスピルコスタチン A の固相全合成を計画した。

**Safty-catch** リンカーを介してスタチン誘導体を固相へと担持し、**Boc** 法によりシステイン

誘導体と縮合する。残りの2残基はFmoc法で縮合を行った後、リンカーの活性化、環化切り出しによりマクロラク톤を得る。最後に液相でジスルフィド結合形成を行いスピルコスタチンAの全合成を達成するという合成ルートで行うことにした (Figure 4-6)。

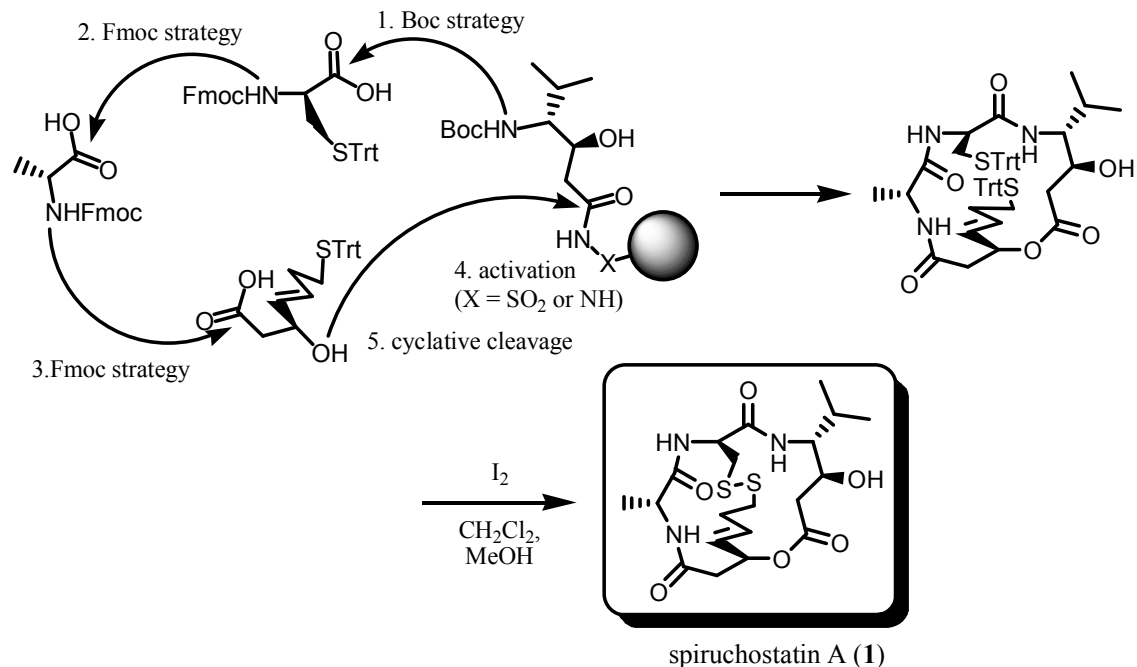


Figure 4-6

#### 4-3 スルホンアミドリリンカーを用いた合成

まず、**Safety-catch** リンカーとして最も一般的なスルホンアミドリリンカーについて検討した。スルホンアミドリリンカーはアルキルタイプとアリールタイプがあるがより担持反応の行いやすいアルキルタイプ **2** を用いることにした<sup>4)</sup>。担持反応はスルホンアミドに対するイミド化であるため、通常のアミド化に比べかなり強い反応条件が必要である。そこで、様々な縮合条件でスタチン誘導体 **3** の固相への担持を検討した。反応が終了したかどうかは **Kaiser** テストにより調べることができるとの報告があったが<sup>2b)</sup>、発色が悪く判断が困難であったため全て切り出しを行って担持されているか確認した。種々の条件で固相への担持を行った後、ヨードアセトニトリルを用いて活性化、*n*-プロピルアミンを用いて切り出し、分析を行った (Figure 4-7、Table 4-1)。

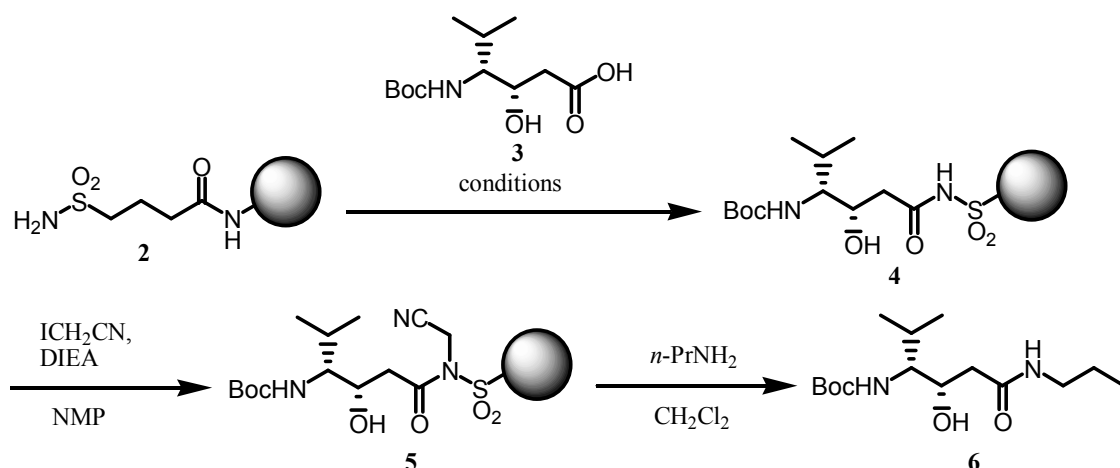


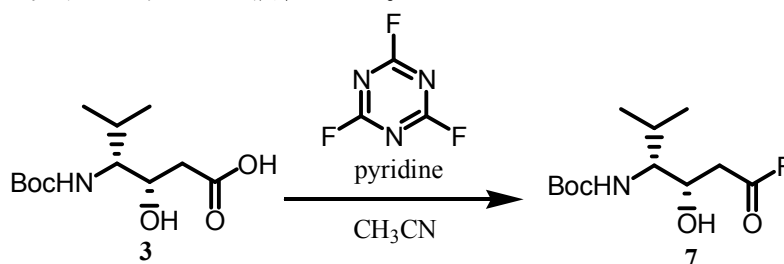
Figure 4-7

Table 4-1

Conditions	Reaction time [h]	Yield [%]
DIC, <i>N</i> -MeIm	24	< 5
PyBOP, DIEA	8 + 8	ca. 30
Acid fluoride <b>7</b>	3 + 9	ca. 10
PyBrop, DIEA	4 + 8	< 5

種々条件検討を行ったがいずれの切り出し条件でも目的物の収率は低かった。また、PyBOP もしくは酸フッ化物 **7**<sup>1</sup>を用いた場合、副生成物としてヒドロキシル基がエステル化された 2 量体 **9** が得られた。2 量体 **9** が得られた理由については、担持反応の段階で固相へ担持された基質のヒドロキシル基に対し、さらにエステル化が進行した、もしくは、切り出し反応の段階で固相から切り出されたアミド **6** が求核攻撃したことが考えられる。(Figure 4-8)。

<sup>1</sup> 酸フッ化物は以下のようにして調製した<sup>5)</sup>。



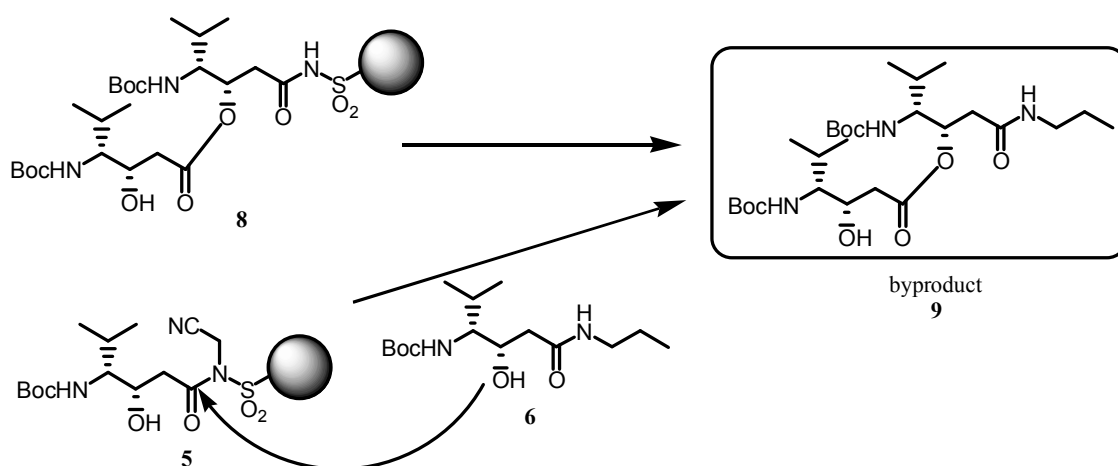


Figure 4-8

スルホンイミドの活性化が不十分であり、切り出し反応の収率が低い可能性もあるため、異なる活性化条件としてペンタフルオロベンジルアルコールを用いた光延反応によるアルキル化も検討したが収率に大きな差はなかった (Figure 4-9) <sup>6)</sup>。

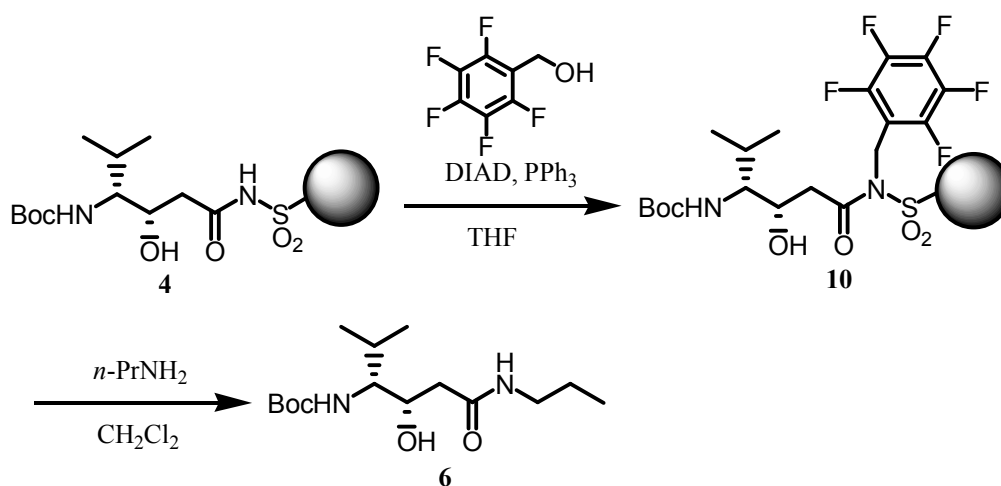


Figure 4-9

通常の  $\alpha$ -アミノ酸を用いた場合は担持、切り出しとも問題なく高収率で行えたため、スタチン誘導体の反応性が低く、固相への担持がほとんど進行していないことが問題であると考えられる。その原因の1つとしてヒドロキシル基が遊離であることが考えられる。しかし、もしこの部位に保護をかけるならば、Boc基、Fmoc基の脱保護時には安定で、かつ固相から切り出す前に容易に脱保護できる保護基でなければならない。このような条件を満たす適当な保護基がなく、また、工程数も増えることから別のリンカーを検討することとした。

#### 4-4 ヒドラジンリンカーを用いた合成

次にヒドラジンリンカーを検討した。こちらは最初の担持が通常のアミド化とほぼ変わらないため容易にスタチン誘導体 **3** を固相へ担持することができた。また、この段階での切り出し反応も問題なく進行した (Figure 4-10)。

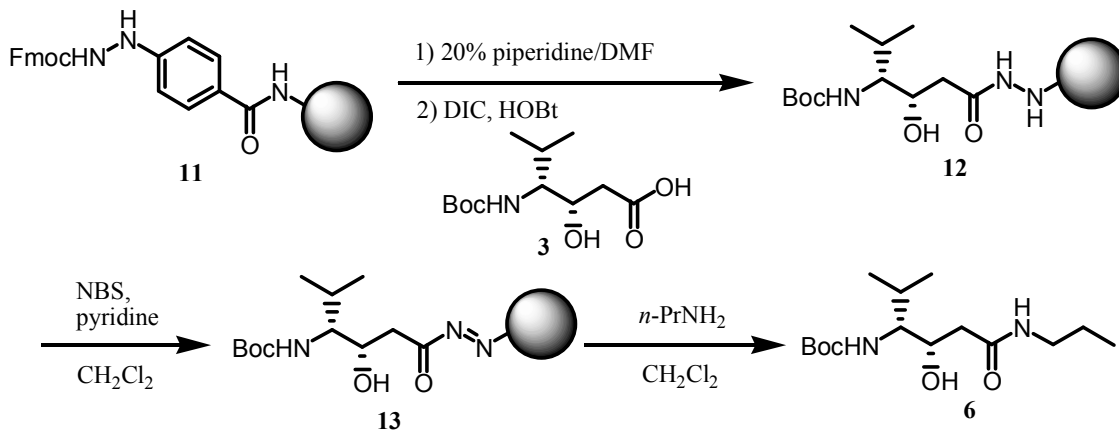


Figure 4-10

しかし、ヒドラジンリンカーは酸化反応により活性化を行うため、次のシステイン誘導体が活性化条件に耐えられるかが問題である。そこでシステイン誘導体を固相へと担持し、活性化、切り出しを行って見たところ複雑な混合物を与えた。実際に、固相上で 4 残基まで縮合を行い、切り出しを行ったが望む環化体 **17** を得ることはできなかった (Figure 4-11)。

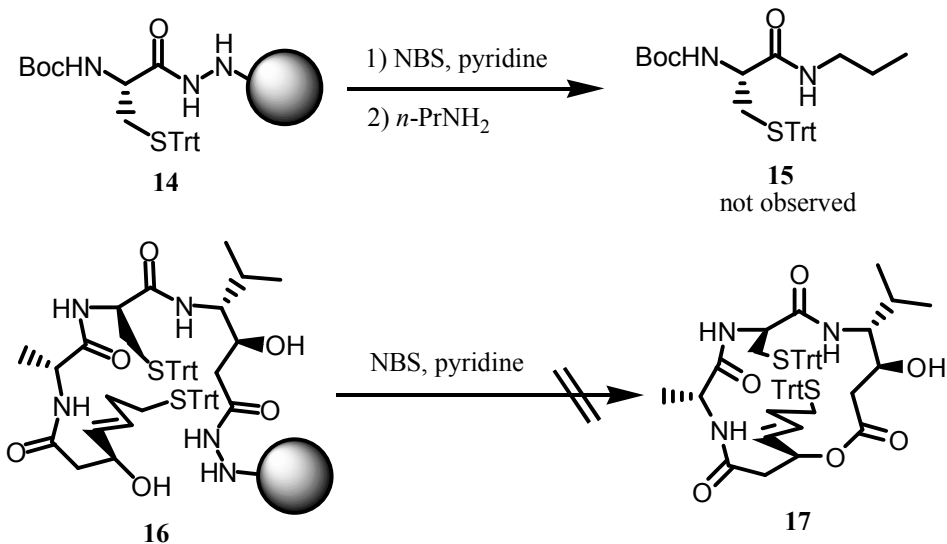
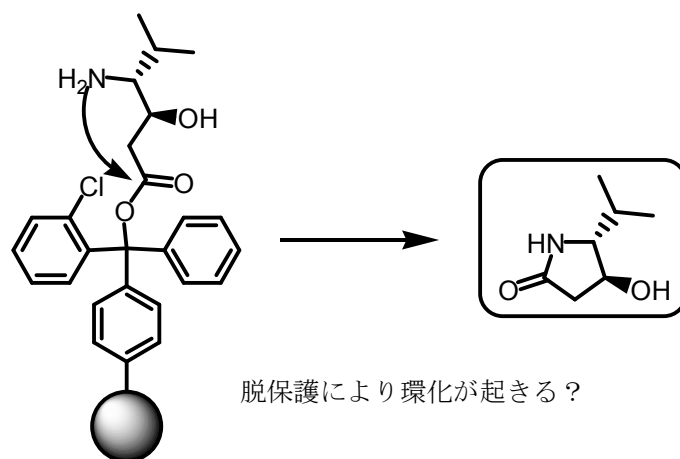


Figure 4-11

#### 4-5 2-クロロトリチルリンカーによる合成計画

Safty-catch リンカーを用いた合成ができなかったため、スタチン誘導体として Fmoc 保護

体を用い、Fmoc 法による合成を検討した。リンカーは Fmoc 法で汎用される 2-クロトリチルリンカーを選択した。2-クロトリチルリンカーは塩基性には安定で、温和な酸性条件下、切り出しが行える。さらに、非常にかさ高いためペプチドを伸長していく段階でジケトピペラジンの生成による固相からの脱離が抑えられる。今回の合成においてはスタチン誘導体のアミノ基が遊離になった際のラクタム化が抑えられるかどうかが一番の問題である (Figure 4-12)。



**Figure 4-12**

また、環化反応による切り出しはできないため、マクロラクトン化、ジスルフィド結合の形成は液相で行うことになる。

#### 4-6 スピルコスタチン A の固相全合成

スタチン誘導体の保護基を Boc 基から Fmoc 基へとかけかえた後、2-クロトリチルクロライドレジン **19** へと担持を行った。担持反応はレジンの重量増加、および切り出した化合物の重量からほぼ定量的に進行していることを確認した (Figure 4-13)。

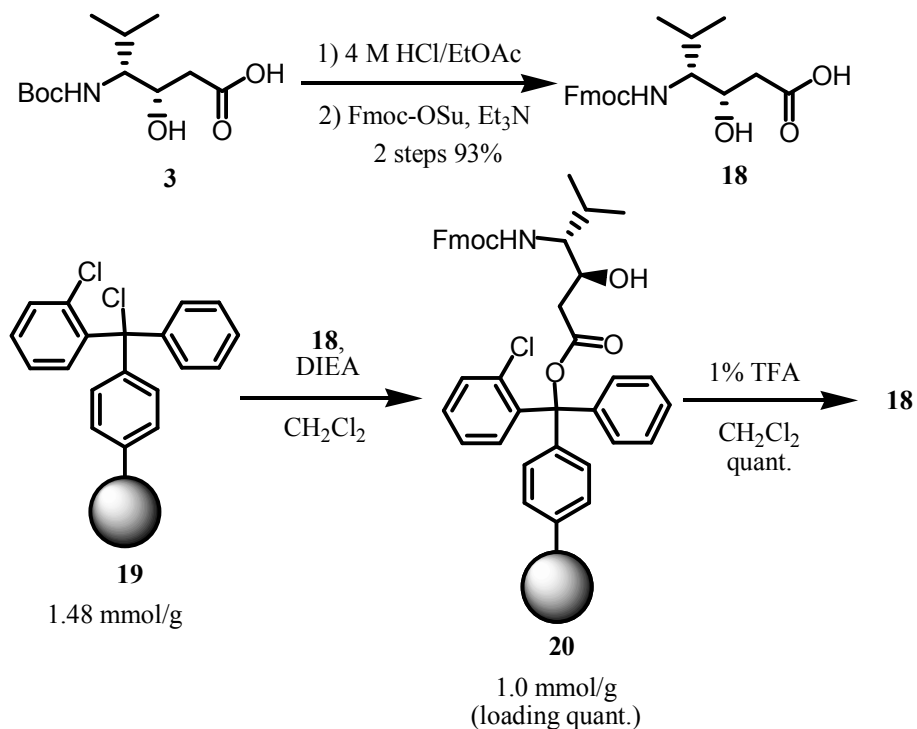


Figure 4-13

次に Fmoc 基を脱保護するため 20%ピペリジン DMF 溶液を作用させたが、驚くべきことに Fmoc 基が全く脱保護されなかった。通常の  $\alpha$ -アミノ酸であれば数分でもかなりの割合が脱保護されるが、長時間作用させても完全に無反応であった。そこでより強力である 2% DBU、2%ピペリジン DMF 溶液を用いたところ一部ではあるが脱保護できることが分かった<sup>7)</sup>。さらに詳細に検討した結果、レジンにジクロロメタンにより十分に膨潤させることが重要であることがわかった。ジクロロメタンによりレジンを膨潤させ、DBU 溶液による脱保護、再度ジクロロメタンによる洗浄と膨潤を 5 回繰り返すことで Fmoc 基をほぼ完全に脱保護できることが分かった。また、この際スタチン誘導体のラクタム化による固相担体からの脱離は観察されなかった (Figure 4-14)。

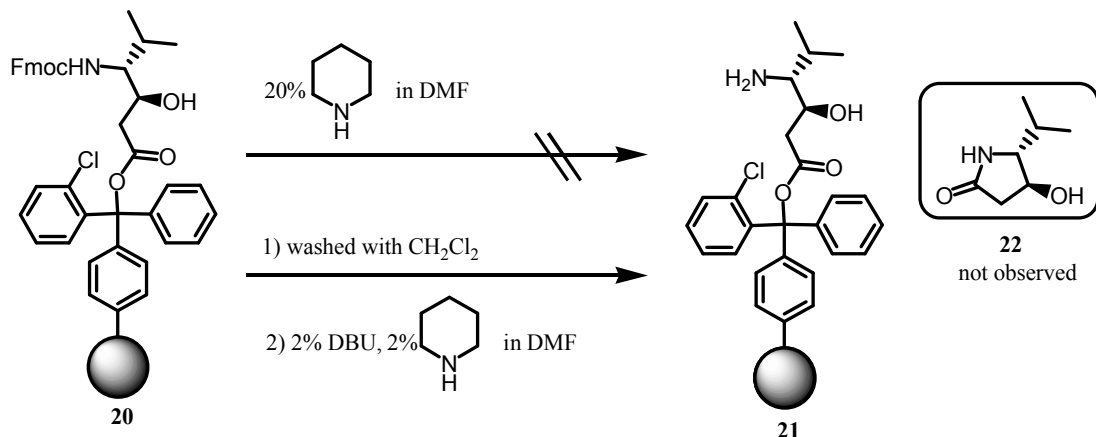


Figure 4-14

Fmoc 基の脱保護が困難である理由については何の知見もないが、ジクロロメタンによる膨潤が重要であることから、疎水性相互作用などにより会合状態をとっているのではないかと考えられる。

次にシステイン保護体の縮合を行ったところ、システインのラセミ化が起こった。システインは活性化エステルの状態で容易にラセミ化するため液相合成においても注意が必要であった。固相合成では反応時間が液相に比べて長いことにより注意が必要である。そこで縮合条件の最適化を行った。種々の条件でシステイン保護体を縮合後、Fmoc 基の脱保護、切り出しを行い、LC-MS による分析を行った。この際、逆相の LC による解析を行うため Fmoc 基を脱保護し、親水性を高める必要があった。脱保護は DBU 溶液により、1 分間の処理を 3 回という短時間で、エピ化を起こすことなく行えた。切り出しには通常 1%TFA ジクロロメタン溶液が用いられるが、*S*-トリチル基のように酸性条件に不安定な保護基は脱保護されてしまう恐れがある。そこで、より温和な酸性条件で切り出しが行える 30%HFIP ジクロロメタン溶液を用いた<sup>8)</sup> (Figure 4-15、Table 4-2)。

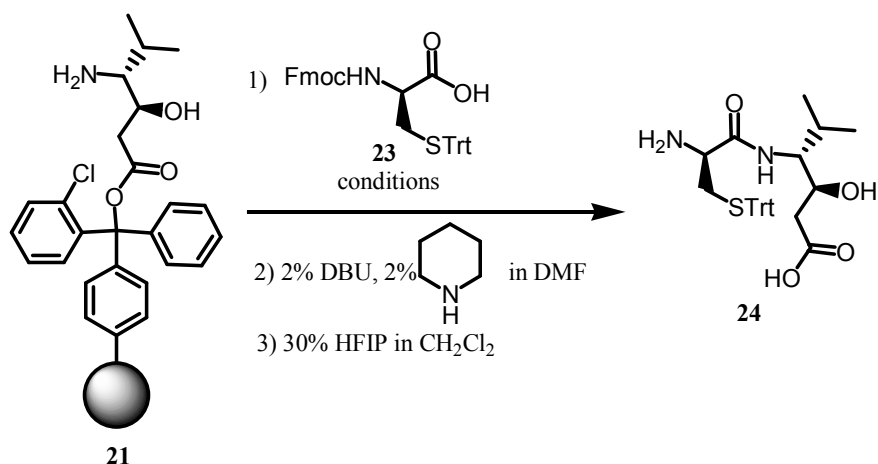


Figure 4-15

Table 4-2

Substrate (4.0 eq.)	Reagent (4.0 eq.)	Solvent	dr ( <b>24</b> : epimer)
<b>21</b>	DIC, HOBT (pre-activation)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : DMF = 1 : 1	> 95 : 5
<b>21</b>	PyBOP, HOBT	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : DMF = 4 : 1	87 : 13
Pfp ester <b>23</b>	HOBT	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	65 : 35
<b>21</b>	DIC, HOBT	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : DMF = 4 : 1	77 : 23

種々の縮合条件を検討した結果、縮合剤として DIC、添加剤として HOBT を加え、ジクロロメタン、DMF 1 対 1 の溶媒で 5 分間、まず基質を反応させて活性化エステルを形成させた後、縮合を行うことでラセミ化をほぼ完全に抑制できることが分かった<sup>9)</sup>。縮合剤が同じでも溶媒の比率が異なり、前もって活性化を行わなかった場合、かなりの割合でラセミ化が起こった。ペンタフルオロフェニルエステル **25**<sup>10)</sup>を用いた場合はラセミ化が起こらないと報告されているが、基質を調製する段階でかなりのラセミ化が起きていたため **24** はジアステレオマー混合物として得られた (Figure 4-16)。

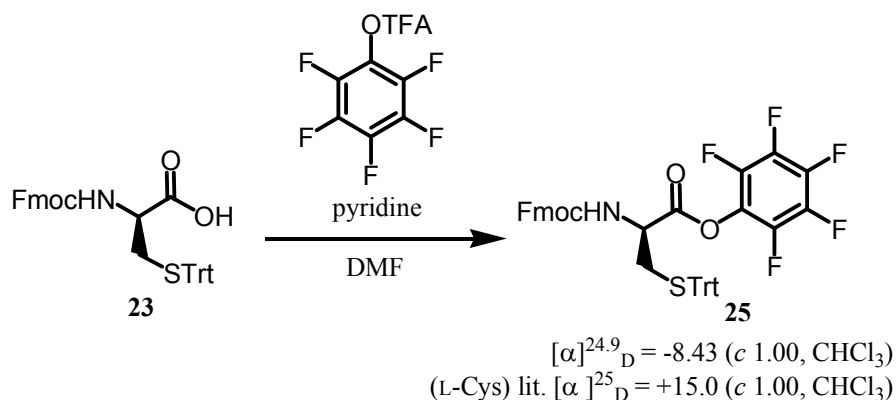


Figure 4-16

アラニン保護体 **25** は DBU 溶液による Fmoc 基の脱保護後、システインの縮合で最もよい結果を与えた条件で縮合を行った。続く、β-ヒドロキシ酸 **27** との縮合は Fmoc 基を脱保護した後、PyBOP を用いて行い、固相上にセコ酸を合成することに成功した (Figure 4-17)。

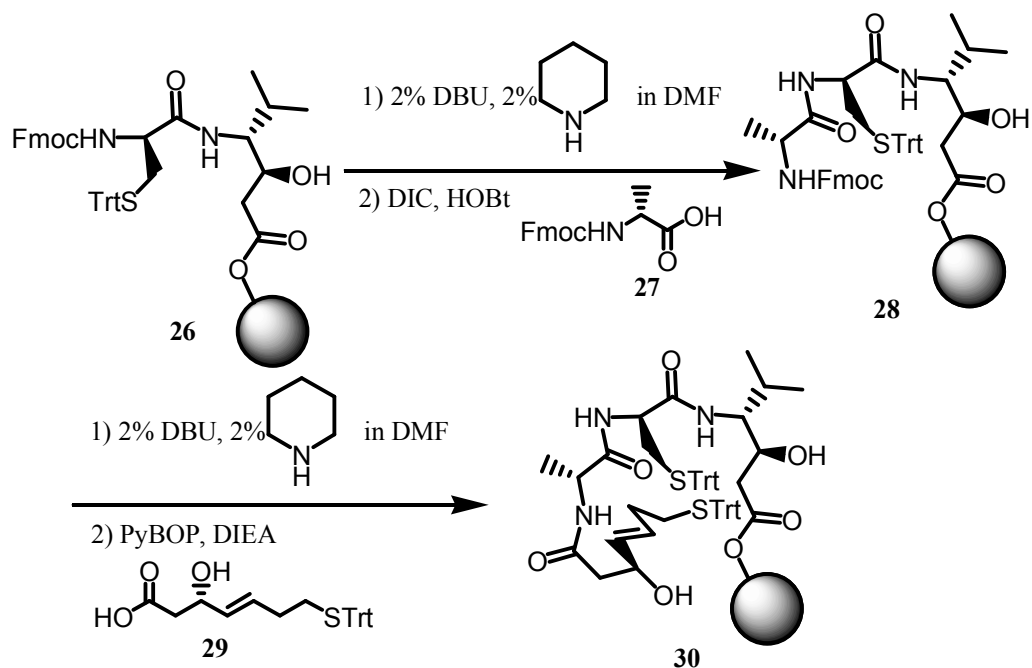


Figure 4-17

固相から切り出された粗生成物は高純度であり、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行った後の単離収率は、固相への担持量から計算し 56%であった。マクロラクトン化、ジスルフィド結合形成は液相での全合成と同じ反応条件で問題なく進行し、スピルコスタチン A の固相全合成を達成することができた (Figure 4-18)。

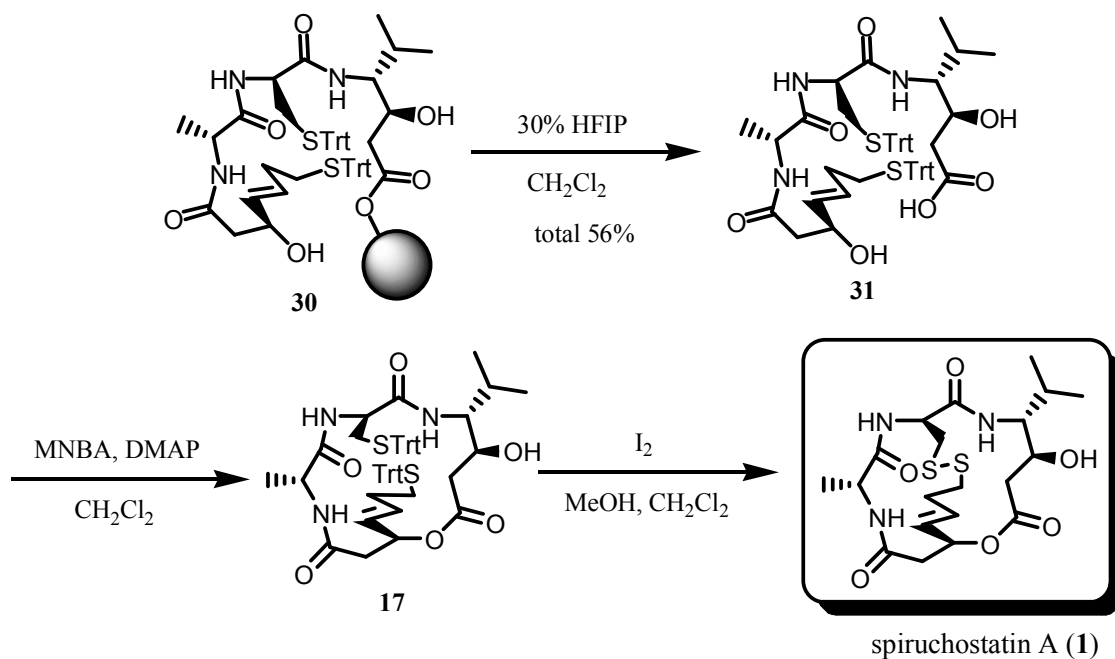


Figure 4-18

#### 4-7 誘導体合成計画

固相合成によるスピルコスタチン A の全合成が達成できたので、ライブラリー合成に向け、まず、少数の誘導体を合成することで本合成ルートが適用可能か確かめることにした。合成する誘導体は今後のライブラリー合成を考慮し、システイン部分も変えた架橋構造を有さないものとした。そこで、スタチン誘導体は固定し、ジスルフィド結合による架橋構造がなくなっても活性があるかを調べるためシステインをアラニンに変えた誘導体、かさ高い置換基を有するロイシンに変えた誘導体を合成することとした。3 残基目はアラニンのままのもの、他の天然物の HDAC 阻害剤に多く見られるフェニルアラニンとしたものを合成することとした。アミノ酸の立体化学は環化の際の反応性、活性に重要であると考えられる。今回はスピルコスタチン A と同じ、全て D-アミノ酸を用い反応性、活性を比較することとした。よって、2 残基目、3 残基目それぞれ 2 種類ずつの計 4 種類を合成し、活性の有無、および反応性、物性についても調べることにした。4 残基目はジスルフィド結合による架橋構造がなくなるためチオール基を非対称ジスルフィドで保護することとした。ヒドロキシル基の立体化学は天然体と同一のものを用いることとした<sup>2</sup> (Figure 4-19)。

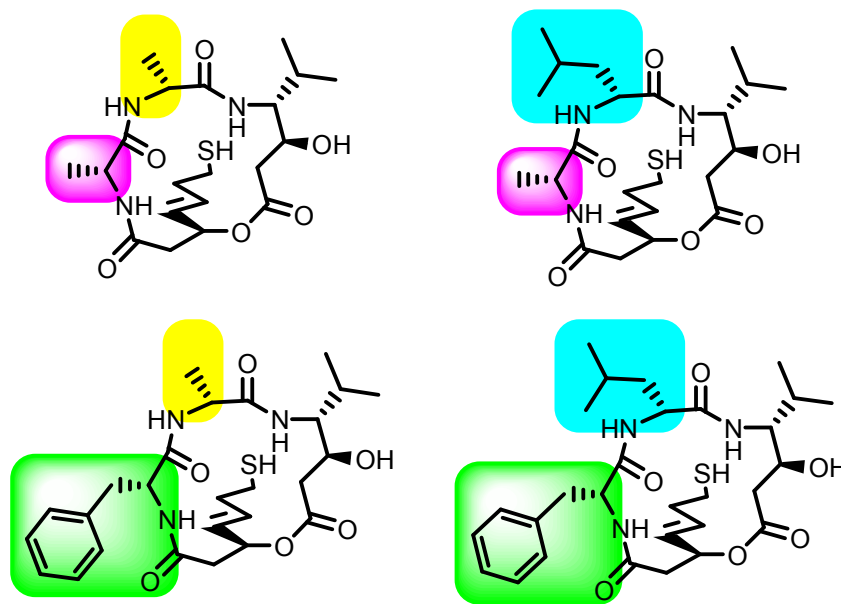
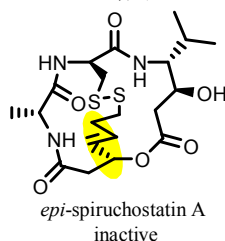


Figure 4-19

<sup>2</sup> Ganesan らは  $\beta$ -ヒドロキシ酸のヒドロキシル基の立体化学が逆の *epi*-スピルコスタチン A を合成し、生理活性がほとんどないことを報告している<sup>11)</sup>。



#### 4-8 誘導体合成

まず、4 残基目の  $\beta$  - ヒドロキシ酸の非対称ジスルフィド保護体を合成した。トリチル保護体 **29** に対し、硝酸銀と、2,2' - ジピリジルジスルフィドを作用させ、1 段階でピリジルジスルフィド保護体 **32** へと変換することができた<sup>12)</sup>。トリチル基を脱保護した後、メチルジスルフィド体 **35** への変換も試みた。しかし、一段階目にトリチル基を脱保護した際、チオールが酸化され、2 量化した化合物 **34** が得られた。2 量体 **34** と目的物 **33** との分離が困難であり、混合物のまま種々条件を検討したがメチルジスルフィド体 **35** は低収率でしか得られなかった。One-pot 反応、一段階での変換も試みたがいずれの条件も低収率であった (Figure 4-20)。

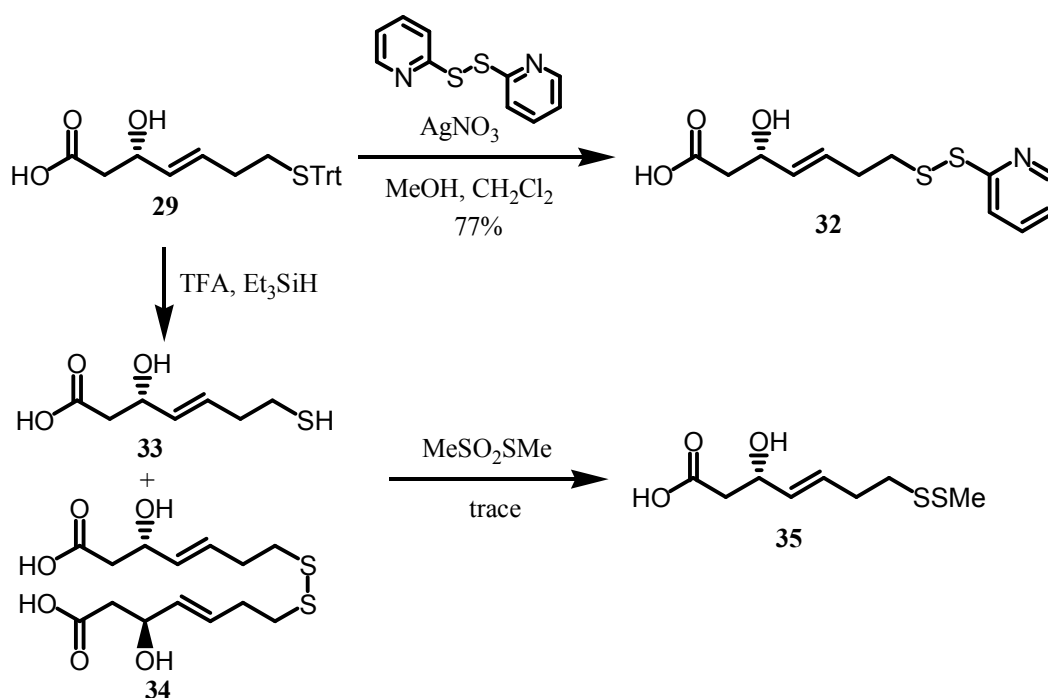


Figure 4-20

合成した  $\beta$  - ヒドロキシ酸のピリジルジスルフィド保護体 **32** を用いて誘導体合成を行った。今回は合成する誘導体の数が少ないためパラレル合成を行った。スタチン誘導体を担持したレジン **20** を 4 つのシリンジ型の反応容器に分け、それぞれについて Fmoc 基の脱保護を行った。そのうちの 2 つに対し、アラニン保護体 **27** を縮合し、残りの 2 つにロイシン保護体 **36** を縮合した。Fmoc 基の脱保護を行った後、2 残基目にアラニンを縮合した 2 つの反応容器の一方にアラニン、もう一方にフェニルアラニンを縮合した。同様にロイシンを縮合したのも一方にアラニン、もう一方にフェニルアラニンを縮合した。Fmoc 基を脱保護し、今度は全ての反応容器に対し  $\beta$  - ヒドロキシ酸のピリジルジスルフィド保護体 **32** を加え、縮合することで固相上に 4 種類のセコ酸 **44** から **47** を合成した (Figure 4-21)。

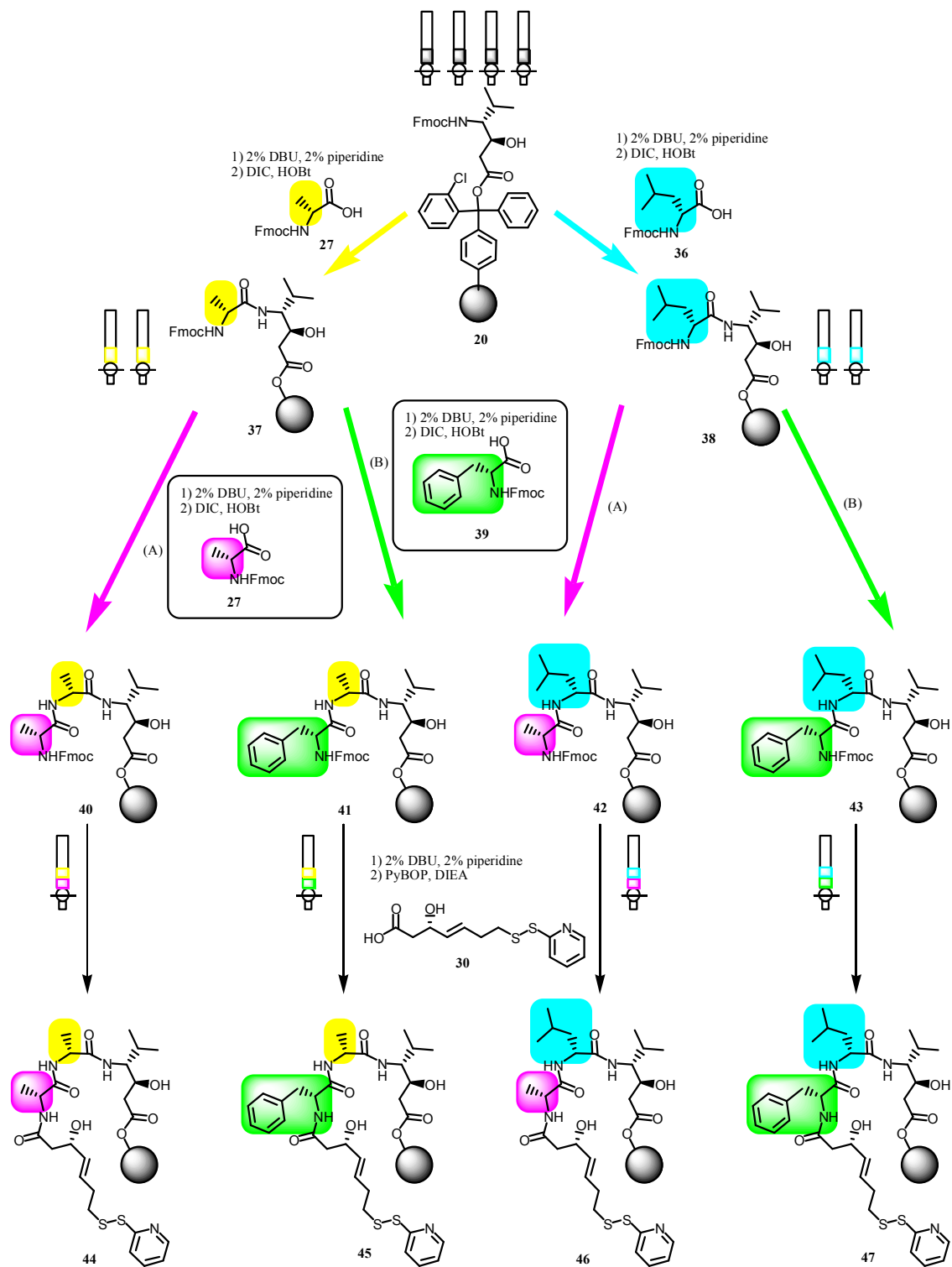


Figure 4-21

2残基目、3残基目にアラニンを縮合した誘導體44を固相から切り出しセコ酸48を得た。マクロラクトン化はセコ酸48の極性が高く、ジクロロメタンに対する溶解性が低いため

DMF を添加した溶媒で、椎名法により行った<sup>13)</sup>。室温では反応はほとんど進行しなかったが、40°Cへ加熱することである程度環化が進行した。しかし、長時間反応を行うと環化体からヒドロキシル基が脱離した化合物 **50** が LC-MS により確認された (Figure 4-22)。

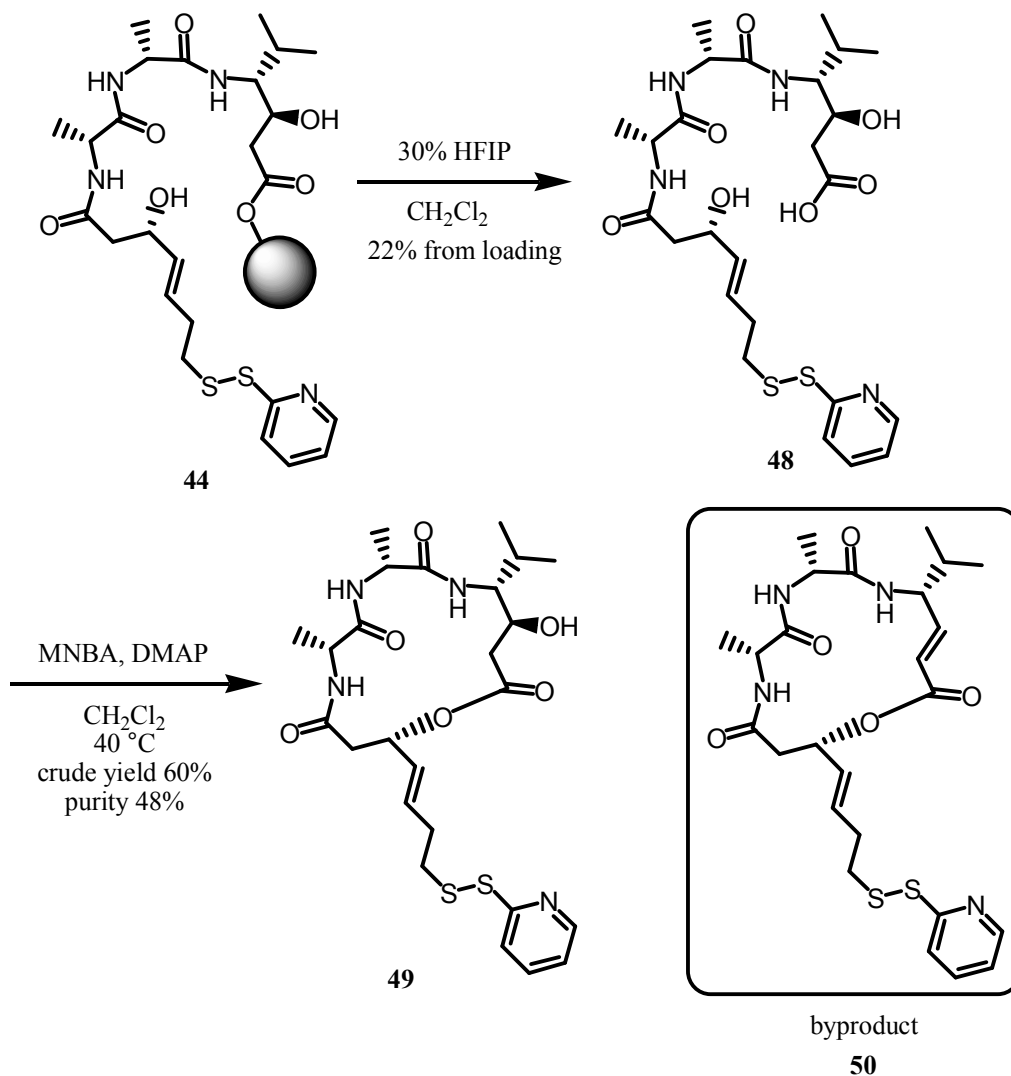


Figure 4-22

その他の誘導体についても切り出しを行い、MS により精製を確認した (Figure 4-23)。

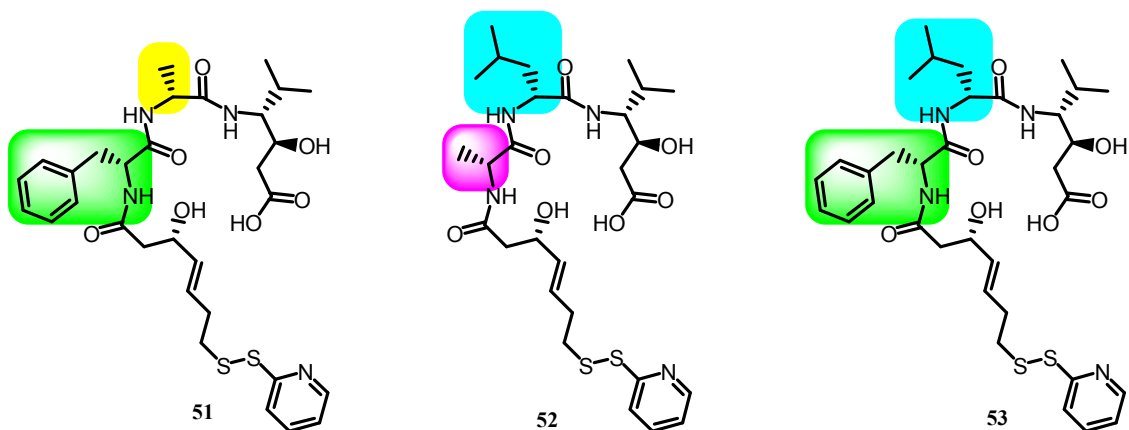


Figure 4-23

現在環化反応の最適化を行っており、他の誘導体についても順次環化反応を行う予定である。

今後のライブラリー合成の指針として、スタチン誘導体部位はアルキル側鎖のよりかさ高いスピルコスタチン B の方が高活性であることから様々な側鎖を検討する余地があると考えられる。また、第 3 章 2 節においてヒドロキシル基に大きなタグ分子を導入しても釣り上げが行えたことから、この位置は活性に大きな影響を及ぼさないと考えられる。その他のアミノ酸に関しては側鎖、立体化学の種々異なるものを導入し、構造活性相関を調べる必要があると考えられる。

また、ライブラリーの中から HDAC に対する選択性が高いもの、毒性を有するものなど異なる活性を有するものが合成できた場合、ケミカルプローブとし、タンパク質相互作用ネットワーク解析を行うことで新たな相互作用を解明できると期待できる。

#### 4-9 まとめ

本章ではスピルコスタチン A の固相合成による全合成および誘導体合成について述べた。Safty-catch リンカーを用いた環化切り出しによる全合成を試みたが、成功しなかった。そこで 2-クロロトリチルリンカーを用い、Fmoc 法により固相でセコ酸を合成し、切り出し後、マクロラクトン化、ジスルフィド結合形成を行うことで固相合成による全合成を達成した。本合成ルートを用いて 4 種類の誘導体合成を行った。環化反応の反応条件を最適化する必要があるが、本合成ルートにより誘導体を合成できることが示せた。今後、さらに大規模なライブラリー合成へも適用できると期待できる。

## Reference

- 1) Doi, T.; Iijima, Y.; Ganesan, A.; Shin-ya, K.; Takahashi, T. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 1177.
- 2) (a) Kenner, G. W.; McDermott, J. R.; Sheppard, R. C. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1971**, 636.  
(b) Backes, B. J.; Ellman, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11171. (c) Millington, C. R.; Quarrel, R.; Lowe, G. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7201.
- 3) Yang, L.; Morriello, G. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8197.
- 4) Backes, B. J.; Ellman, J. A. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2322.
- 5) Ingenito, R.; Dreznjak, D.; Guffler, S.; Wenschuh, H. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1187.
- 6) Willoughby, C. A.; Hutchins, S. M.; Rosauer, K. G.; Dhar, M. J.; Chapman, K. T.; Chicchi, G. G.; Sadowski, S.; Weinberg, D. H.; Patel, S.; Malkowitz, L.; Di Salvo, J.; Pacholok, S. G.; Cheng, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 93
- 7) Wade, J. D.; Bedford, J.; Sheppard, R. C.; Tregear, G. W. *Pep. Res.* **1991**, *4*, 194.
- 8) Ramasamy, K. S.; Amador, R. B.; Habib, Q.; Rong, F.; Han, X.; Li, D. Y.; Huang, J.; Hong, Z.; An, H. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2005**, *24*, 1947.
- 9) Han, Y.; Albericio, F.; Barany, G. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4307.
- 10) Green, M.; Berman, J. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 5851.
- 11) Yurek-George, A.; Habens, F.; Brimmell, M.; Packham, G.; Ganesan, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1030
- 12) Hamm, M. L.; Piccirilli, J. A. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5700.
- 13) Shiina, I.; Kubota, M.; Ibuka, R. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7535.

**Loading of (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (3) to 4-sulfamylbutyryl resin (2).**

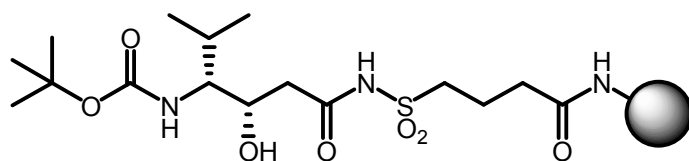
**DIC, *N*-methylimidazole:** To a 4-sulfamylbutyryl resin (2) (200 mg, 0.90 mmol/g, 0.180 mmol) in a 3 mL syringe-shaped vessel (Varian Reservoir) was added dichloromethane (2 mL) and the mixture was shaken for 1 h and filtered. To the resin was added a solution of (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (3) (188 mg, 0.72 mmol), *N*-methylimidazole (57  $\mu$ L, 0.72 mmol), and DIC (111  $\mu$ L, 0.72 mmol) in DMF (0.4 mL) and dichloromethane (1.6 mL). After being shaken for 36 h, the resin was filtered and washed with DMF  $\times$  3, methanol  $\times$  3 and dichloromethane  $\times$  3 to give (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid attached resin (4).

**Acid fluoride:** To a solution of (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (3) (200 mg, 0.765 mmol) in acetonitrile (4 mL) was added pyridine (62  $\mu$ L, 0.765 mmol) and cyanuric fluoride (41 mg, 0.306 mmol) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 1 h, the reaction mixture was quenched with ice water. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The crude acid fluoride (7) (205 mg) was used without further purification.

To a 4-sulfamylbutyryl resin (2) (200 mg, 0.90 mmol/g, 0.180 mmol) in a 3 mL syringe-shaped vessel (Varian Reservoir) was added dichloromethane (2 mL) and the mixture was shaken for 1 h and filtered. To the resin was added a solution of the crude acid fluoride (205 mg) in dichloromethane (1 mL) and DMAP (88 mg, 0.72 mmol). After being shaken for 3 h, the resin was filtered and washed with methanol  $\times$  3 and dichloromethane  $\times$  3 to give (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid attached resin (4).

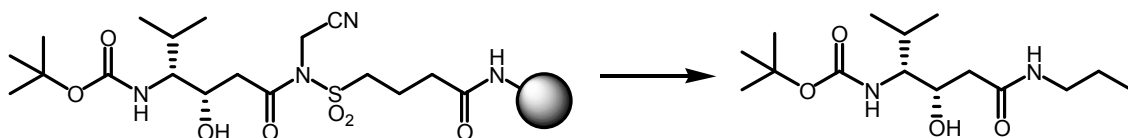
**PyBOP, DIEA:** To a 4-sulfamylbutyryl resin (2) (100 mg, 0.90 mmol/g, 0.090 mmol) in a 3 mL syringe-shaped vessel (Varian Reservoir) was added (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (3) (94 mg, 0.36 mmol), DIEA (126  $\mu$ L, 0.72 mmol), and chloroform (1 mL). To the mixture was added PyBOP (187 mg, 0.36 mmol) at -20 °C. After being shaken at the same temperature for 8 h, the resin was filtered and washed with dichloromethane  $\times$  3, DMF  $\times$  3, dichloromethane  $\times$  3, and methanol  $\times$  3 to give (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid attached resin (4).

**PyBrop, DIEA:** To a 4-sulfamylbutyryl resin (2) (50 mg, 0.90 mmol/g, 0.045 mmol) in a 3 mL syringe-shaped vessel (Varian Reservoir) was added dichloromethane (1 mL) and the mixture was shaken for 1 h and filtered. To the resin was added a solution of (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (3) (47 mg, 0.18 mmol), DIEA (63  $\mu$ L, 0.36 mmol), and PyBrop (84 mg, 0.18 mmol) in dichloromethane (0.5 mL). After being shaken for 3 h, the resin was filtered and washed with DMF  $\times$  3, methanol  $\times$  3 and dichloromethane  $\times$  3. This procedure was repeated twice to give (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid attached resin (4).

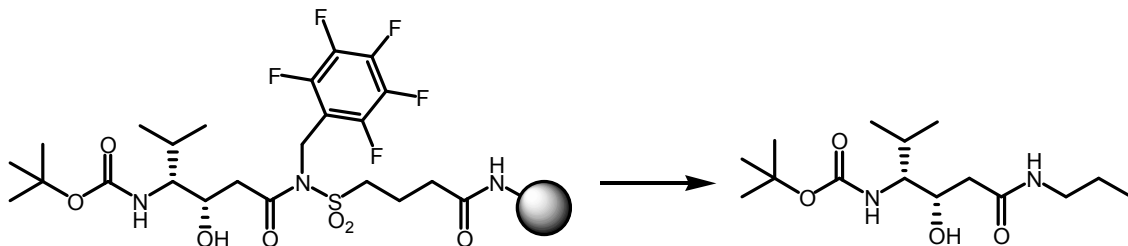


#### Activation and cleavage from 4-sulfamylbutyryl resin (4).

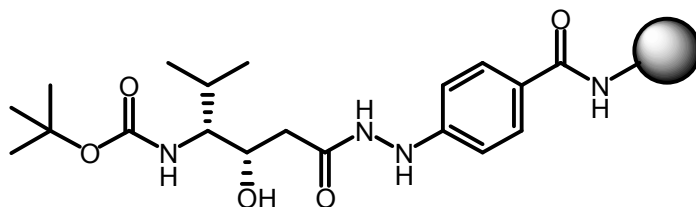
**Activation by iodoacetonitrile:** To a (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid attached resin (4) (0.180 mmol) in a 3 mL syringe-shaped vessel (Varian Reservoir) was added dichloromethane (1 mL) and the mixture was shaken for 1 h, filtered, and washed with NMP  $\times$  3. To the resin was added NMP (2 mL), DIEA (157  $\mu$ L, 0.90 mmol), and iodoacetonitrile (filtered through a plug of basic alumina, 65  $\mu$ L, 0.90 mmol) and the mixture was shaken for 18 h. The resin was filtered and washed with NMP  $\times$  3 and methanol  $\times$  5. To the resin was added dichloromethane (2 mL) and *n*-propylamine (200  $\mu$ L) and the mixture was shaken for 12 h. The resin was filtered and washed with dichloromethane  $\times$  3 and methanol  $\times$  5. The filtrate was concentrated *in vacuo* and the crude (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methyl-*N*'-propylhexanoylamide (6) was analyzed by LC-MS.



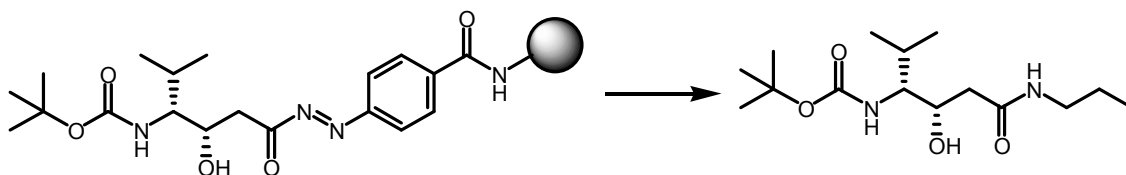
**Activation by pentafluorobenzylalcohol:** To a (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid attached resin (4) (0.090 mmol) in a 3 mL syringe-shaped vessel (Varian Reservoir) was added THF (1 mL) and the mixture was shaken for 1 h and filtered. To the resin was added triphenylphosphine (94 mg, 0.36 mmol), a solution of pentafluorobenzylalcohol (71 mg, 0.36 mmol) in THF (1 mL), and DIAD (71  $\mu$ L, 0.36 mmol) and shaken for 18 h. The resin was filtered and washed with THF  $\times$  3 and dichloromethane  $\times$  3. To the resin was added dichloromethane (2 mL) and *n*-propylamine (200  $\mu$ L) and the mixture was shaken for 12 h. The resin was filtered and washed with dichloromethane  $\times$  3 and methanol  $\times$  5. The filtrate was concentrated *in vacuo* and the crude (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methyl-*N*'-propylhexanoylamide (6) was analyzed by LC-MS.



**Loading of (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (3) to hydrazinobenzoyl resin.** To a Fmoc-hydrazinobenzoyl resin (**11**) (100 mg, 0.56 mmol/g, 0.056 mmol) in a 3 mL syringe-shaped vessel (Varian Reservoir) was added 20% piperidine in DMF (1 mL) and the mixture was shaken for 5 min  $\times$  3. The resin was filtered and washed with DMF  $\times$  3 and dichloromethane  $\times$  3. To the resin was added a solution of (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (**3**) (59 mg, 0.224 mmol), HOBt (30 mg, 0.224 mmol), and DIC (35  $\mu$ L, 0.224 mmol) in dichloromethane (1 mL) and the mixture was shaken for 12 h. The resin was filtered and washed with dichloromethane  $\times$  5 to give (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid attached hydrazinobenzoyl resin (**12**).

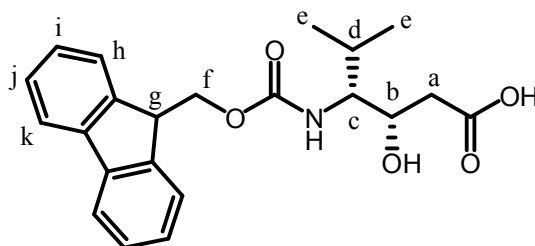


**Activation and cleavage from hydrazinobenzoyl resin (12).** To a (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid attached hydrazinobenzoyl resin (**12**) (0.056 mmol) in a 3 mL syringe-shaped vessel (Varian Reservoir) was added dichloromethane (1 mL), pyridine (45  $\mu$ L, 0.56 mmol), and NBS (25 mg, 0.14 mmol) and the mixture was shaken for 10 min. The resin was filtered and washed with dichloromethane  $\times$  3. To the resin was added dichloromethane (1 mL) and *n*-propylamine (200  $\mu$ L) and the mixture was shaken for 12 h. The resin was filtered, washed with dichloromethane  $\times$  3, and the filtrate was concentrated *in vacuo* to give crude (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methyl-*N*'-propylhexanoylamide (**6**) (19 mg).

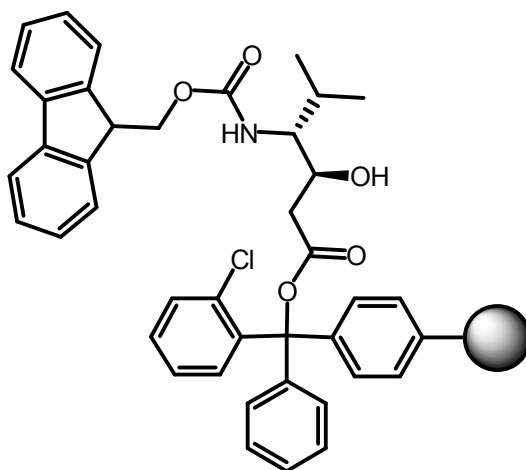


**(3*S*,4*R*)-4-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (18).** To a (3*S*,4*R*)-4-*tert*-butoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (**3**) (2.00 g, 7.65 mmol) was added HCl (4 M in ethyl acetate, 20 mL). After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The crude amine was dissolved in water (15 mL) and added triethylamine (2.3 mL, 16.8 mmol) and a solution of Fmoc-OSu (2.80 g, 8.42 mmol) in dimethoxyethane (15 mL) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 24 h, the reaction mixture was quenched with 1 M HCl at 0 °C. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined

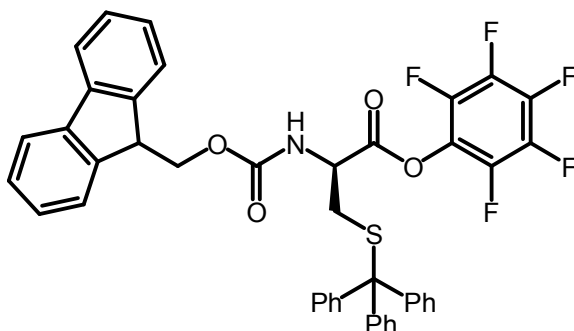
organic layers were washed with brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated *in vacuo*. The residue was recrystallized from ethyl acetate/hexane to give (3*S*,4*R*)-4-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (**18**) (2.74 g, 7.14 mmol, 93%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.76 (d,  $J = 7.7$  Hz, 2H, k), 7.58 (d,  $J = 6.8$  Hz, 2H, h), 7.42-7.22 (m, 4H, i and j), 4.63-4.47 (m, 3H, f and *NH*), 4.20 (m, 1H, g), 3.96 (brs, 1H, b), 3.57 (brs, 1H, c), 2.53-2.38 (m, 2H, a), 2.04 (m, 1H, d), 0.92 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, e), 0.88 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, e);  $^{13}\text{C}$  NMR (67.8 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176.4, 157.3, 143.6, 141.4, 127.7, 127.1, 124.9, 120.0, 88.1, 69.0, 66.6, 59.6, 47.4, 27.6, 20.1, 16.5; IR (neat) 3341, 2173, 2047, 1993, 1941, 1689, 1527, 1464, 1242, 1003, 759, 735 ( $\text{cm}^{-1}$ );  $[\alpha]_{\text{D}}^{18.5} = -8.89$  ( $c$  0.665,  $\text{CHCl}_3$ ).



**Loading of (3*S*,4*R*)-4-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid to 2-chlorotrityl resin (**20**).** To a suspension of 2-chlorotritylchloride resin (250 mg, 1.48 mmol/g, 0.37 mmol) in dichloromethane (3 mL) in a 6 mL syringe-shaped vessel (Varian Reservoir) was added acetyl chloride (0.3 mL) at room temperature. After being shaken for 3 h, the resin was filtered and washed with dry dichloromethane  $\times$  5. To the resin was added (3*S*,4*R*)-4-9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (**18**) (567 mg, 1.48 mmol) and DIEA (517  $\mu\text{L}$ , 2.96 mmol) in dichloromethane (3 mL) at room temperature and the mixture was shaken for 24 h. The resin was filtered and washed with dichloromethane  $\times$  3, methanol  $\times$  3 and dichloromethane  $\times$  3 and dried under reduced pressure to give (3*S*,4*R*)-4-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid attached 2-chlorotrityl resin (**20**) (373.5 mg, quant., 1.0 mmol/g based on resin weight).



**Pentafluorophenyl (S)-2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-(tritylthio)propionate (25).** To a solution of Fmoc-D-Cys(Trt)-OH (**23**) (300 mg, 0.49 mmol) in DMF (1 mL) was added pyridine (47  $\mu$ L, 0.59 mmol) and pentafluorophenyl trifluoroacetate (93  $\mu$ L, 0.54 mmol) at room temperature. After being stirred at the same temperature for 1 h, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate. The organic layer was washed with 0.1 M HCl, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution, brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The crude pentafluorophenyl (S)-2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-(tritylthio)propionate (**25**) was used without further purification.  $[\alpha]_D^{24.9} = -8.43$  (*c* 1.00, CHCl<sub>3</sub>) [(enantiomer) lit.<sup>a</sup>  $[\alpha]_D^{25} = +15.0$  (*c* 1.00, CHCl<sub>3</sub>)].



**(3S,4R)-4-[(S)-2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-(tritylthio)propionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid attached 2-chlorotrytyl resin (26).**

**DIC, HOBt:** To a (3S,4R)-4-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid attached 2-chlorotrytyl resin (**20**) (50 mg, 0.050 mmol) in a 3 mL syringe-shaped vessel (Varian Reservoir) was added dichloromethane (1 mL) and the mixture was shaken for 1 h and filtered. To this resin was added 2% DBU and 2% piperidine in DMF (1 mL). After being shaken for 10 min, the resin was washed with dichloromethane  $\times$  5. This deprotection procedure was repeated five times. The resin was washed with dichloromethane  $\times$  5 and DMF  $\times$  5.

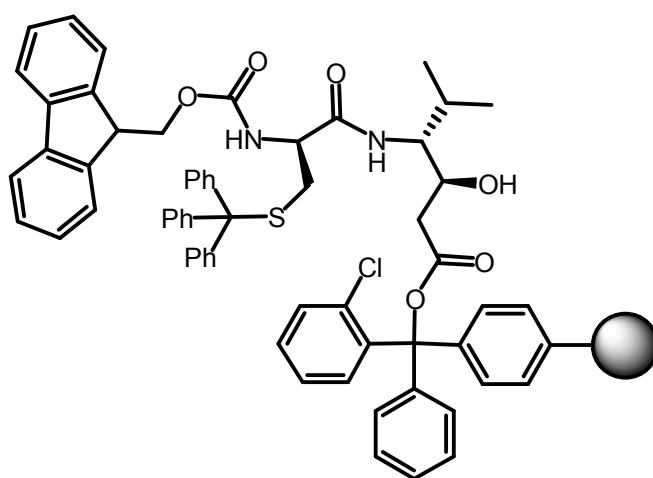
To a solution of Fmoc-D-Cys(Trt)-OH (**23**) (122 mg, 0.20 mmol) and HOBt (27 mg, 0.20 mmol) in dichloromethane (0.5 mL) and DMF (0.5 mL) was added DIC (31  $\mu$ L, 0.20 mmol) and the mixture was stirred for 5 min. This solution was added to the resin and the mixture was shaken for 2 h. The resin was filtered and washed with DMF  $\times$  3 and dichloromethane  $\times$  3 to give (3S,4R)-4-[(S)-2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-(tritylthio)propionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid attached 2-chlorotrytyl resin (**26**).

**Pfp ester, DMAP:** To a (3S,4R)-4-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid attached 2-chlorotrytyl resin (**20**) (50 mg, 0.050 mmol) in a MicroKans<sup>TM</sup> was added

<sup>a</sup> Green, M.; Berman, J. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 5851.

dichloromethane (4 mL) and the mixture was shaken for 1 h and filtered. To this resin was added 2% DBU and 2% piperidine in DMF (4 mL). After being shaken for 10 min, the resin was washed with dichloromethane  $\times 5$ . This deprotection procedure was repeated five times. The resin was washed with dichloromethane  $\times 5$  and DMF  $\times 5$ .

To the resin was added a solution of the crude pentafluorophenyl (*S*)-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-(tritylthio)propionate (**25**) (150 mg) in dichloromethane (4 mL) and HOBt (27 mg, 0.20 mmol) and the mixture was shaken for 24 h. The resin was filtered and washed with DMF  $\times 3$ , dichloromethane  $\times 3$  and methanol  $\times 3$  to give (3*S*,4*R*)-4-[(*S*)-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-(tritylthio)propionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid attached 2-chlorotrityl resin (**26**).

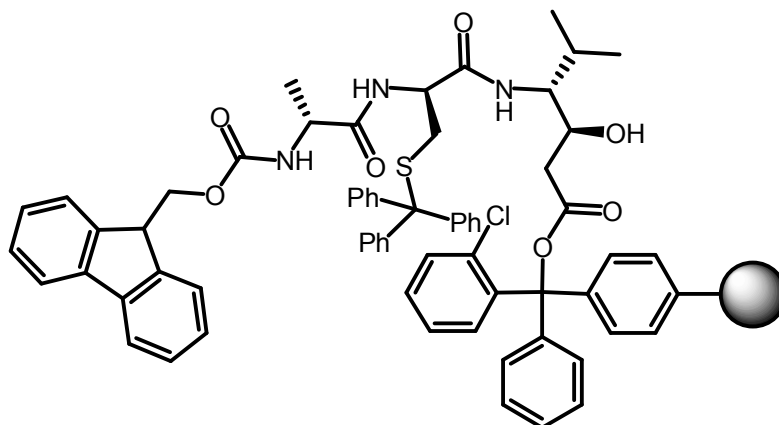


**Analysis of racemization (general procedure).** To a small amount of (3*S*,4*R*)-4-[(*S*)-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-(tritylthio)propionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid attached 2-chlorotrityl resin (**26**) (approximately 5 mg) was added 2% DBU and 2% piperidine in DMF (0.5 mL) and the mixture was shaken for 1 min  $\times 3$ . The resin was washed with DMF  $\times 3$  and dichloromethane  $\times 5$ . To the resin was added 30% HFIP in dichloromethane (1 mL) and the mixture was shaken for 30 min. The resin was filtered and washed with dichloromethane  $\times 5$ . The filtrate was concentrated *in vacuo* and the crude peptide was analyzed by LC-MS.

**(3*S*,4*R*)-4-[(*S*)-2-[(*R*)-2-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)propionylamino]-3-(tritylthio)propionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid attached 2-chlorotrityl resin (**28**).** To a (3*S*,4*R*)-4-[(*S*)-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-(tritylthio)propionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid attached 2-chlorotrityl resin (**26**) (0.050 mmol) in a 3 mL syringe-shaped vessel (Varian Reservoir) was added 2% DBU and 2% piperidine in DMF (1 mL) and the mixture was shaken for 1 min  $\times 3$ . The resin was washed with DMF  $\times 5$  and dichloromethane  $\times 5$ .

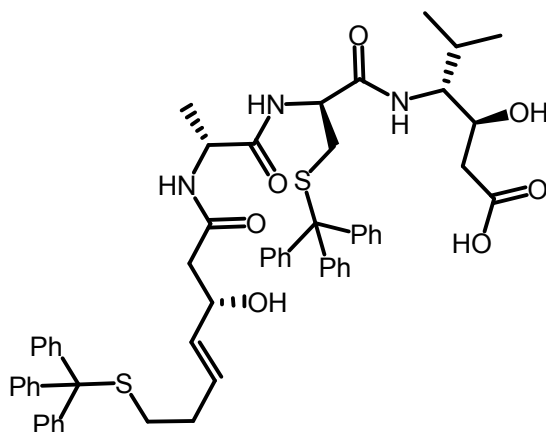
To a solution of Fmoc-D-Ala-OH (**27**) (69 mg, 0.20 mmol) and HOBt (27 mg, 0.20 mmol) in

dichloromethane (0.5 mL) and DMF (0.5 mL) was added DIC (31  $\mu$ L, 0.20 mmol) and stirred for 5 min. This solution was added to the resin and the mixture was shaken for 2 h. The resin was filtered and washed with DMF  $\times$  3 and dichloromethane  $\times$  3 to give (3*S*,4*R*)-4-[(*S*)-2-[(*R*)-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)propionylamino]-3-(tritylthio)propionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid attached 2-chlorotrityl resin (**28**).

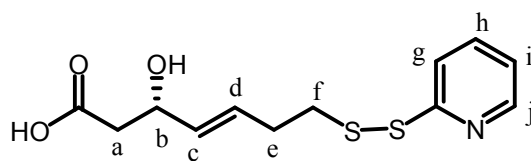


(3*S*,4*R*)-4-[(*S*)-2-[(*R*)-2-[(*E*)-(*S*)-3-Hydroxy-7-tritylthio-4-heptenoylamino]propionylamino]-3-(tritylthio)propionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (**31**). To a (3*S*,4*R*)-4-[(*S*)-2-[(*R*)-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)propionylamino]-3-(tritylthio)propionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid attached 2-chlorotrityl resin (**28**) (0.05 mmol) was added 2% DBU and 2% piperidine in DMF (1 mL) and the mixture was shaken for 1 min  $\times$  3. The resin was washed with DMF  $\times$  5 and dichloromethane  $\times$  5.

To the resin was added a solution of (*E*)-(*S*)-3-hydroxy-7-(tritylthio)-4-heptenoic acid (**29**) (84 mg, 0.20 mmol), DIEA (35  $\mu$ L, 0.20 mmol) and PyBOP (104 mg, 0.20 mmol) in dichloromethane (1 mL) and the mixture was shaken for 24 h. The resin was filtered and washed with dichloromethane  $\times$  3, methanol  $\times$  3, dichloromethane  $\times$  3. The resin was added 30% HFIP in dichloromethane (1 mL) and the mixture was shaken for 30 min. The resin was filtered and washed with dichloromethane  $\times$  5. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel (5% methanol in chloroform) to give (3*S*,4*R*)-4-[(*S*)-2-[(*R*)-2-[(*E*)-(*S*)-3-hydroxy-7-(tritylthio)-4-heptenoylamino]propionylamino]-3-(tritylthio)propionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (**31**) (27.2 mg, 0.0278 mmol, 56%). Spectral data were identical to that described in chapter 3.



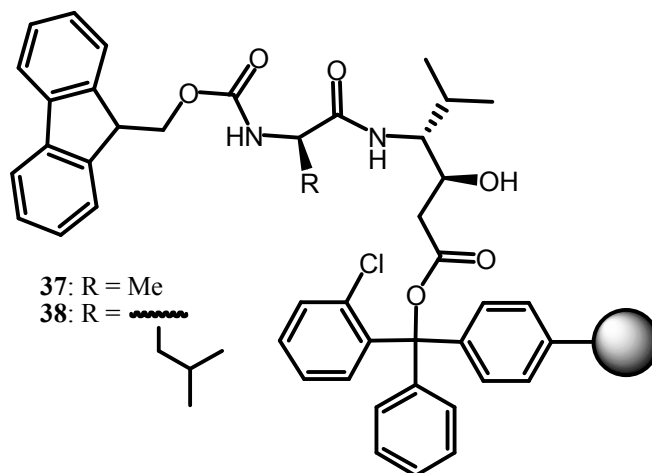
**(E)-(S)-3-Hydroxy-7-(2-pyridiylthio)-4-heptenoic acid (32).** To a solution of (E)-(S)-3-hydroxy-7-tritylthio-4-heptenoic acid (**29**) (200 mg, 0.478 mmol) in methanol (4 mL) and dichloromethane (8 mL) was added Aldrithiol-2<sup>TM</sup> (2,2'-dipyridyl disulfide) (211 mg, 0.956 mmol) and silver nitrate (122 mg, 0.717 mmol). After being stirred at room temperature for 24 h, the reaction mixture was filtered on celite. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by solid phase extraction (VARIAN BOND ELUT<sup>®</sup> C18, eluting with 20% methanol to 50% methanol in water) to give (E)-(S)-3-hydroxy-7-(2-pyridiylthio)-4-heptenoic acid (**32**) (105 mg, 0.367 mmol, 77%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.47 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, j), 7.74-7.65 (m, 2H, g, h), 7.12 (m, 1H, i), 5.76 (ddd, *J* = 15.5, 6.7, 6.3 Hz, 1H, d), 5.59 (dd, *J* = 15.5, 5.3 Hz, 1H, c), 4.53 (brs, 1H, b), 2.84 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, f), 2.60 (brs, 2H, a), 2.48-2.43 (m, 2H, e); <sup>13</sup>C NMR (67.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 176.2, 160.2, 149.2, 137.4, 132.7, 129.3, 120.9, 120.1, 68.5, 41.2, 38.0, 31.6; IR (neat) 3700-3000 (br), 2923, 1715, 1579, 1448, 1418, 1276, 1120, 971, 762 (cm<sup>-1</sup>); [α]<sub>D</sub><sup>24.8</sup> = -2.23 (*c* 1.00, CHCl<sub>3</sub>).



**General procedure for coupling with 2<sup>nd</sup> amino acid to (3*S*,4*R*)-4-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid attached 2-chlorotrityl resin (**37** and **38**).** To a (3*S*,4*R*)-4-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid attached 2-chlorotrityl resin (**20**) (50 mg, 0.050 mmol) was added dichloromethane (1 mL) and the mixture was shaken for 1 h and filtered. To this resin was added 2% DBU and 2% piperidine in DMF (1 mL) and the mixture was shaken for 10 min and washed with dichloromethane × 5. This deprotection procedure was repeated five times. The resin was washed with dichloromethane × 5 and DMF × 5.

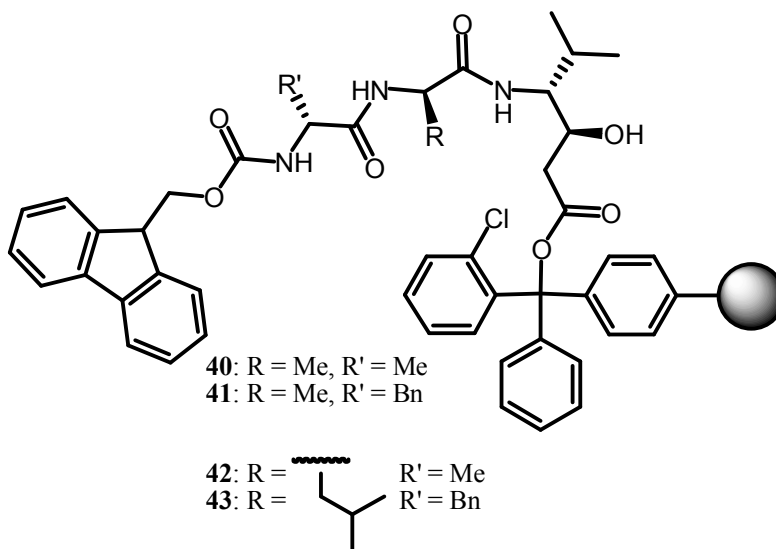
To a solution of Fmoc-D-AA-OH (**27** or **36**) (0.20 mmol) and HOBt (27 mg, 0.20 mmol) in

dichloromethane (0.5 mL) and DMF (0.5 mL) was added DIC (31  $\mu$ L, 0.20 mmol) and stirred for 5 min. This solution was added to the resin and the mixture was shaken for 2 h. The resin was filtered and washed with DMF  $\times$  3 and dichloromethane  $\times$  3 to give dipeptide attached 2-chlorotrityl resin (**37** or **38**).



**General procedure for coupling with 3<sup>rd</sup> amino acid (40 to 43).** To a dipeptide attached 2-chlorotrityl resin (**37** or **38**) (50 mg) was added 2% DBU and 2% piperidine in DMF (1 mL) and the mixture was shaken for 1 min  $\times$  3. The resin was washed with DMF  $\times$  5 and dichloromethane  $\times$  5.

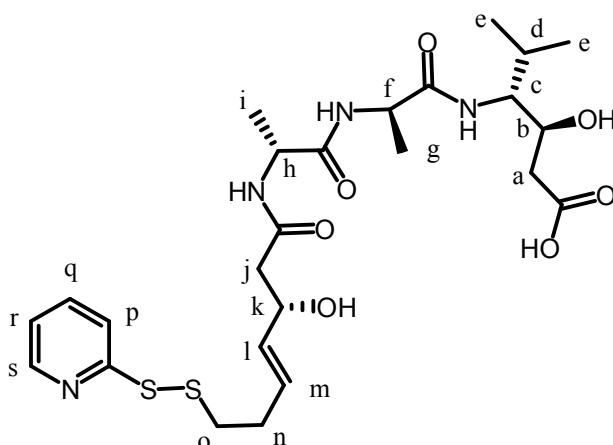
To a solution of Fmoc-D-AA-OH (**27** or **39**) (0.20 mmol) and HOBt (27 mg, 0.20 mmol) in dichloromethane (0.5 mL) and DMF (0.5 mL) was added DIC (31  $\mu$ L, 0.20 mmol) and stirred for 5 min. This solution was added to the resin and the mixture was shaken for 2 h. The resin was filtered and washed with DMF  $\times$  3 and dichloromethane  $\times$  3 to give tripeptide acid attached 2-chlorotrityl resin (**40**, **41**, **42**, **43**).



**General procedure for coupling with  $\beta$ -hydroxy acid and cleavage from solid support (48, 51, 52, 53).** To a tripeptide attached 2-chlorotrityl resin (**40**) (0.040 mmol) was added 2% DBU and 2% piperidine in DMF (1 mL) and the mixture was shaken for 1 min  $\times$  3. The resin was washed with DMF  $\times$  5 and dichloromethane  $\times$  5.

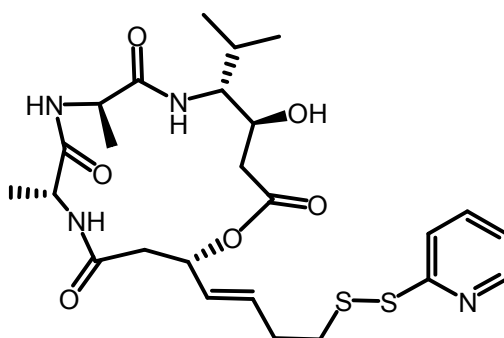
To the resin was added a solution of (*E*)-(*S*)-3-hydroxy-7-(2-pyridyldithio)-4-heptenoic acid (**32**) (34 mg, 0.12 mmol), DIEA (31  $\mu$ L, 0.18 mmol) and PyBOP (62 mg, 0.11 mmol) in dichloromethane (0.5 mL) and DMF (0.5 mL) and the mixture was shaken for 24 h. The resin was filtered and washed with DMF  $\times$  3, dichloromethane  $\times$  3, methanol  $\times$  3, dichloromethane  $\times$  3. To the resin was added 30% HFIP in dichloromethane (1 mL) and the mixture was shaken for 30 min. The resin was filtered and washed with dichloromethane  $\times$  5. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by solid phase extraction (VARIAN BOND ELUT<sup>®</sup> C18, eluting with 20% methanol to 50% methanol in water) to give seco acid (**48, 51, 52, 53**)

**(3*S*,4*R*)-4-[(*R*)-2-[(*R*)-2-[(*E*)-(*S*)-3-Hydroxy-7-(2-pyridyldithio)-4-heptenoylamino]propionylamino]propionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (**48**).** (5.1 mg, 0.00894 mmol, 22%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.39 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, s), 7.86-7.78 (m, 2H, p, q), 7.29 -7.20 (m, 2H, r, NH), 5.71 (dt, *J* = 15.5, 5.8 Hz, 1H, m), 5.58 (dd, *J* = 15.5, 6.8 Hz, 1H, l), 4.46 (m, 1H, k), 4.25 (m, 2H, f, h), 4.07 (m, 1H, c), 3.76 (m, 1H, b), 2.86 (m, 2H, o), 2.58-2.16 (m, 7H, a, d, j, n), 1.34 (m, 6H, g, i), 0.92 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, e), 0.88 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, e); <sup>13</sup>C NMR (67.8 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  175.8, 175.3, 174.3, 161.9, 150.6, 139.5, 130.3, 122.6, 121.5, 71.2, 69.7, 59.7, 51.5, 51.3, 45.1, 40.8, 39.5, 32.8, 29.4, 21.0, 18.1, 17.7, 17.0; IR (neat) 3294, 2927, 1721, 1655, 1542, 1448, 1418, 1260, 1178, 1119, 1045, 972, 800, 751, 719, 668, 483 (cm<sup>-1</sup>); [ $\alpha$ ]<sup>22.7</sup><sub>D</sub> = +4.25 (*c* 0.255, MeOH); MS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup> 571.22 found 571.23.

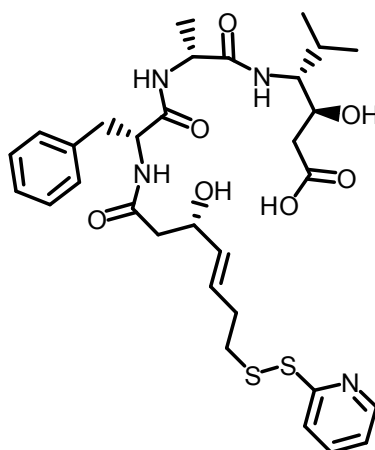


**(2*S*,6*R*,9*R*,12*R*,13*S*)-12-Isopropyl-13-hydroxy-6,9-dimethyl-2-[(*E*)-4-(2-pyridyldithio)-1-butenyl]-1-oxa-5,8,11-triaza-cyclopentadecane-4,7,11,15-tetraone (**49**).** To a solution of MNBA (31

mg, 0.0902 mmol) and DMAP (22 mg, 0.180 mmol) in dichloromethane (1 mL) was added (3*S*,4*R*)-4-[(*R*)-2-[(*R*)-2-[(*E*)-(3-hydroxy-7-(2-pyridyldithio)-4-heptenoylamino]propionylamino]propionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (**48**) (10.3 mg, 0.0180 mmol) in DMF (1.8 mL) and dichloromethane (16.2 mL) dropwise slowly. After being stirred at room temperature for 24 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by solid phase extraction (VARIAN BOND ELUT<sup>®</sup> C18, eluting with 20% methanol to 50% methanol in water) to give (2*S*,6*R*,9*R*,12*R*,13*S*)-12-isopropyl-13-hydroxy-6,9-dimethyl-2-[(*E*)-4-(2-pyridyldithio)-1-butenyl]-1-oxa-5,8,11-triaza-cyclopentadecane-4,7,11,15-tetraone (**49**) (6.0 mg, 0.0109 mmol, 60%, purity 48%). HRMS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup> 553.2155 found 553.2153.

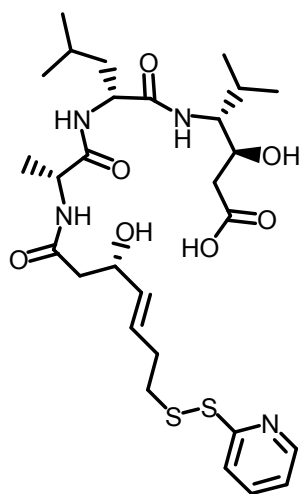


(3*S*,4*R*)-4-[(*R*)-2-[(*R*)-2-[(*E*)-(3-Hydroxy-7-(2-pyridyldithio)-4-heptenoylamino]-3-phenylpropionylamino]propionylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (**51**). MS(ESI-TOF) calcd for [C<sub>31</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup> 647.26 found 647.12.



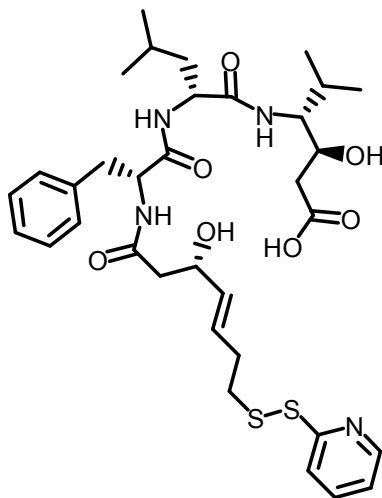
(3*S*,4*R*)-4-[(*R*)-2-[(*R*)-2-[(*E*)-(3-Hydroxy-7-(2-pyridyldithio)-4-heptenoylamino]propionylamino]-4-methylpentanoylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (**52**). MS(ESI-TOF)

calcd for  $[C_{28}H_{44}N_4O_7S_2+H]^+$  613.27 found 613.15.



**(3*S*,4*R*)-4-[(*R*)-2-[(*R*)-2-[(*E*)-(*S*)-3-Hydroxy-7-(2-pyridyldithio)-4-heptenoylamino]-3-phenylpropionylamino]-4-methylpentanoylamino]-3-hydroxy-5-methylhexanoic acid (53).**

MS(ESI-TOF) calcd for  $[C_{34}H_{48}N_4O_7S_2+H]^+$  689.30 found 689.17



## 第 5 章

### 「結論」

本論文は「パラジウム触媒を用いた連続的環化反応によるジメチルグロイオシホン A の全合成研究および固相合成法を用いたスピルコスタチン A の全合成とケミカルバイオロジー」と題し、ジメチルグロイオシホン A の全合成研究およびスピルコスタチン A の液相、固相全合成、誘導体合成、スピルコスタチン A をケミカルプローブとした HDAC 複合体の釣り上げに関してかかれたものである。

第 1 章「序論」では、生体機能分子の合成において Target Oriented Synthesis における骨格構築反応として重要な  $\pi$ -アリルパラジウム触媒を用いた反応について述べ、Diversity Oriented Synthesis における基本技術であるコンビナトリアルケミストリーとその応用研究であるケミカルバイオロジーについて述べ、本論文の目的と意義を明らかにした。

第 2 章「 $\pi$ -アリルパラジウム錯体に対する分子内アルケン挿入反応を用いたジメチルグロイオシホン A の全合成研究」では、当研究室で開発されたパラジウム触媒による新規スピロ環骨格構築法を用いたジメチルグロイオシホン A の Target Oriented Synthesis について述べた。

2 度の辻 - Trost 反応により鎖状の環化前駆体を合成した後、パラジウム触媒を用いた連続環化反応により一挙にスピロ環骨格を構築することに成功した。その後の官能基変換は変換の順序を種々検討した結果、アルケンをオゾン開裂した後、アルデヒドをエキソメチレンへと変換し、B 環部を構築することで Sha らによって報告された合成中間体へと導くことで形式全合成を達成した (Figure 5-1)。

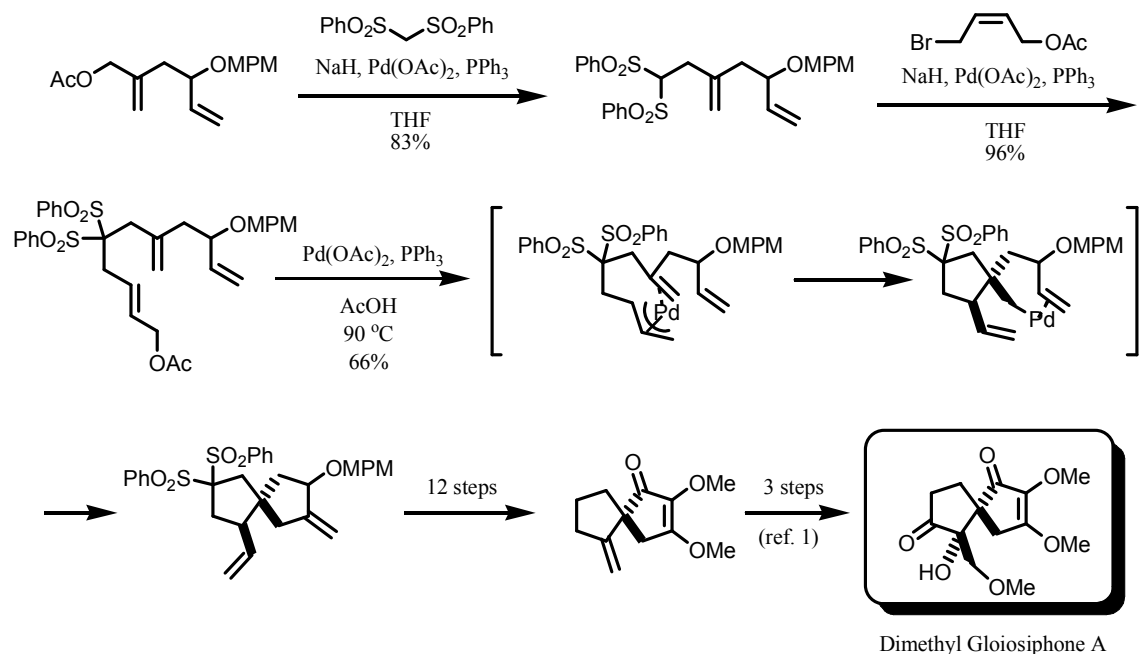


Figure 5-1

第3章「スピルコスタチン A の全合成とケミカルバイオロジー」では、第1節「スピルコスタチン A の全合成」において誘導体合成を指向したスピルコスタチン A の効率的な全合成について述べた。

スピルコスタチン A の全合成では  $\beta$  - ヒドロキシ酸を Seebach の不斉補助子を用いた不斉アルドール反応により合成した。その際添加剤としてジルコノセンジクロリドを加え、ジルコニウムエノラートとして反応させることで、高収率、高ジアステレオ選択性でアルドール体を合成することに成功した。

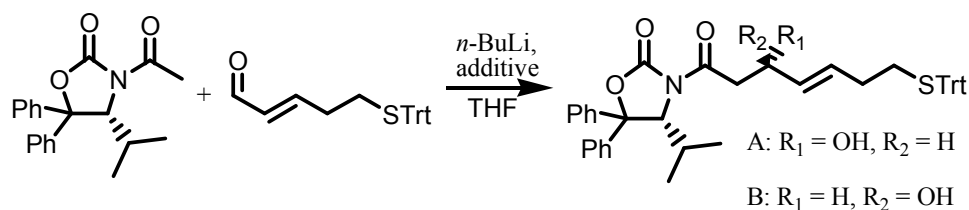


Figure 5-2

Table 5-1

Auxiliary [eq.]	Additive	Temp. [°C]	Yield [%]	Ratio (A : B)
2.5	Cp <sub>2</sub> ZrCl <sub>2</sub> (2.7 eq.)	-78 to 0	95	85 : 15
1.0	-	-78	89	77 : 23
1.0	TiCl(O <i>i</i> -Pr) <sub>3</sub> (3.0 eq.)	-78 to -40	94	76 : 24
1.0	Cp <sub>2</sub> ZrCl <sub>2</sub> (1.2 eq.)	-78 to 0	55	93 : 7
1.0	ZrCl <sub>4</sub> (1.2 eq.)	-78 to 0	63	73 : 27

スタチン誘導体と  $\beta$  - ヒドロキシ酸との間を環化位置とし、スタチン誘導体を C 末端とし、合成を行った。その際、スタチン誘導体のカルボン酸の保護基の選択は困難であった。しかし、種々の条件を考慮し、アリルエステルとすることで副反応を起こすことなくセコ酸の合成に成功した。環化反応は椎名法により高収率で進行し、最後にジスルフィド結合を形成することでスピルコスタチン A の全合成を達成した。

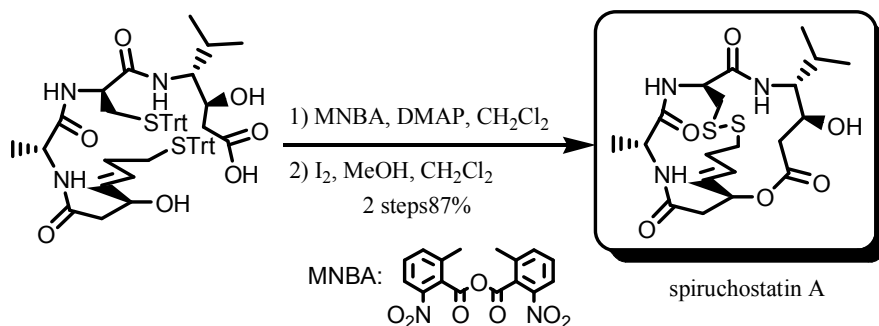


Figure 5-3

第2節「スピルコスタチン A を用いたケミカルバイオロジー」において、スピルコスタチン A にタグ分子を結合したケミカルプローブの合成とそれを用いた HDAC 複合体の釣り上げ実験について述べた。

スピルコスタチン A の遊離のヒドロキシル基に対し、スペーサーを介してペプチドタグを結合させたケミカルプローブを合成した。これを用いて標的タンパク質である HDAC を含むタンパク質複合体の釣り上げを行った。その結果、HDAC を含む 21 種類のタンパク質からなる複合体の釣り上げに成功した。スペーサーを変えたものやペプチドタグの向きを変えたものでも同様に複合体を釣り上げることができた。

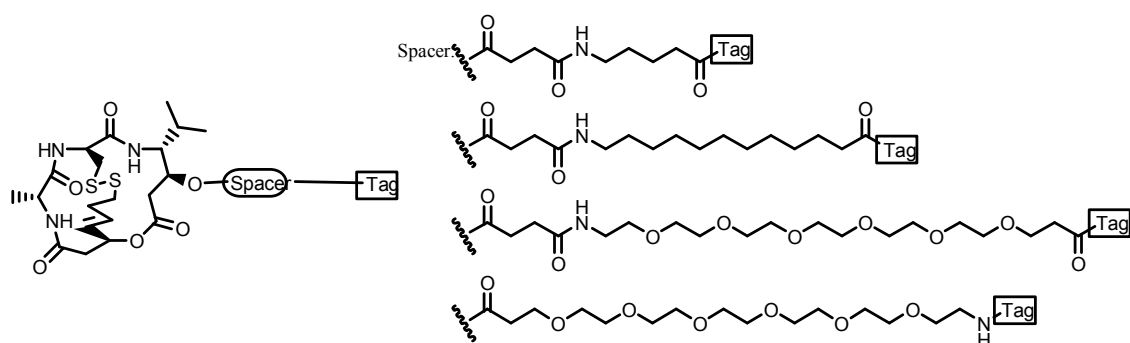


Figure 5-4

第4章「固相合成法を用いたスピルコスタチン A の全合成および誘導体合成」では、固相合成法によるスピルコスタチン A の全合成およびそこで確立された方法論を用いた誘導体合成について述べた。

スタチン誘導体を Safty-catch リンカーへ担持させることで環化切り出しによるスピルコスタチン A の固相全合成を計画した。しかし、2 種類のリンカーを検討したが、全合成にはいたらなかった。そこで 2-クロロトリチルリンカーを用いた Fmoc 法による合成を試みた。1 残基目の Fmoc 基の除去は汎用される条件では全く反応が進行しなかったが、試薬を変えることで完全に除去できる条件を見出した。また、その際懸念された基質の固相担体からの脱離は観察されなかった。2 残基目のシステインの縮合の際にはラセミ化が問題となったが、条件検討の結果、最小化することに成功した。3 残基目、4 残基目の縮合は液相合成の際と同様に進行し、固相上でセコ酸を合成することに成功した。切り出したセコ酸は高純度で、それ以降の環化反応は液相合成の際の条件で問題なく進行し、固相合成によるスピルコスタチン A の全合成を達成した (Figure 5-5)。

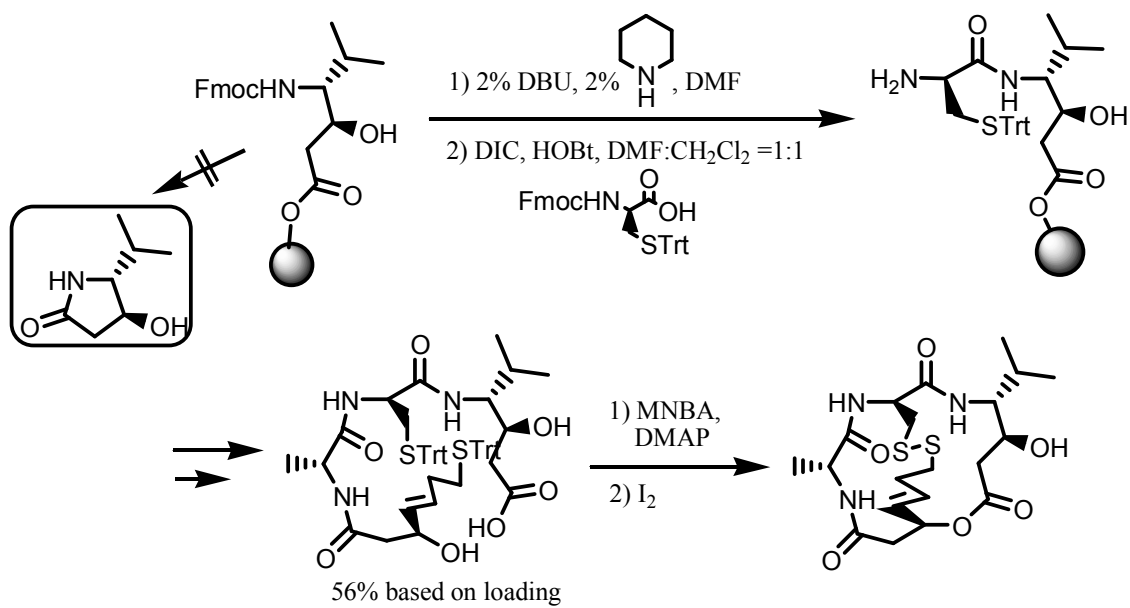


Figure 5-5

また、本合成手法により 4 種類の誘導体合成を検討した (Figure 5-6)。

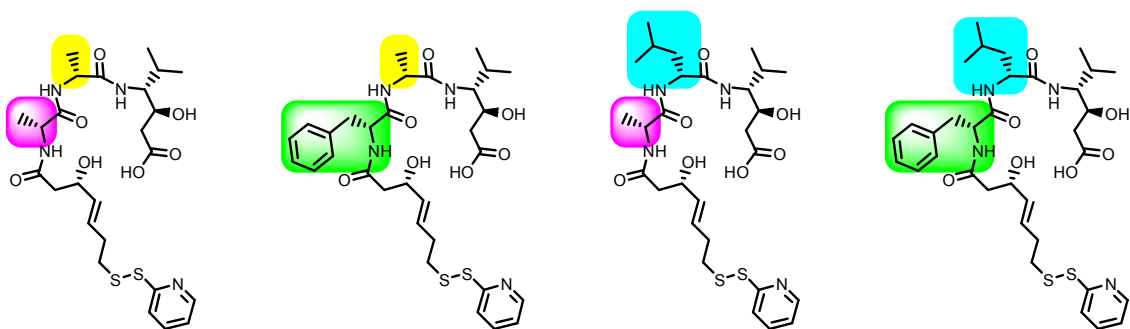


Figure 5-6

第 5 章「結論」では、本論文を総括した。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始御指導御鞭撻いただきました高橋孝志教授に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、常に的確な御助言と御指導をいただきました土井隆行助教授に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、常に御助言と激励をいただきました田中浩士助手に深く感謝いたします。

いつも気持ちよく実験を行えるようにおとり計らいくださいました伊達迪子助手、北村千恵子さん、田能村有香さんに心から感謝いたします。

スピルコスタチン A に関する研究において貴重な天然物サンプルを提供していただき、また、お忙しい中、生理活性試験を行っていただきました産業技術総合研究所の新家一男博士、千々和修平氏に感謝いたします。

スピルコスタチン A に関する研究において多くの御助言をいただき、さらに 1 ヶ月もの間イギリスでの留学の機会を与えてくださいましたサウサンプトン大学の A.Ganesan 博士に感謝いたします。

基本的な実験操作から合成化学者としての考え方を教えてくださいました、島津さやか氏、土黒一郎博士、吉田将人博士をはじめとする高橋・土井研究室の先輩方に感謝いたします。

1 年間、私の至らない指導についてきてくれた田中義一氏に感謝いたします。

学部時代よりお互いに切磋琢磨してきた、石田匡祐氏、岩田由紀氏、上岡正児氏、金原篤氏に感謝いたします。

研究室に入って以来、同期としてともに勉学、研究に励んだ安藤吉勇氏、小西まどか氏、関口尊文氏、堀川大介氏、宗像麻未氏に感謝いたします。

一緒に研究を行った高橋・土井研究室の先輩、同期、後輩の皆様に感謝いたします。

最後に、何不自由なく研究室生活をおくらせて頂き、常に温かく見守ってくれた両親に心から感謝いたします。