The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	標識アンフォテリシンＢの合成およびその脂質二重膜中複合体の構造解析
Author(s)	松下, 直広
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/23465
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

博甲 13169

標識アンフォテリシンBの合成および
その脂質二重膜中複合体の構造解析

2008年

学 位 論 文

松下　直広

化 学 専 攻

大阪大学大学院理学研究科

ヨ2ル 101

標識アンフォテリシンBの合成および
その脂質二重膜中複合体の構造解析

2008年

学　位　論　文

松下　直広

化　学　専　攻

大阪大学大学院理学研究科

目次

第一章　序論
1-1　ポリエン系抗真菌薬
1-2　AmB の分子構造およびイオンチャネルの推定構造
1-3　AmB のステロール選択性
1-4　固体 NMR を用いた原子間距離測定
1-5　AmB イオンチャネル複合体構造解明に向けて
1-6　本研究の目的

参考文献

第二章　28-^{19}F-AME および 25-^{13}C-AME の合成
2-1　合成計画
2-2　保護基の検討
2-3　C1-C21 セグメントの合成
2-4　C22-C37 セグメントの合成
2-5　セグメントのカップリング
2-6　脱保護
2-7　25-^{13}C-AME の合成

参考文献

第三章　28-^{19}F-AME と 25-^{13}C-AME を用いた固体ＮＭＲ測定
3-1　緒言
3-2　測定
3-3　28-^{19}F, 25-^{13}C 原子間の距離測定

参考文献

第四章　14-^{19}F-AME と $^{13}CH_3$-AME を用いた固体ＮＭＲ測定
4-1　緒言
4-2　測定
4-3　14-^{19}F, ^{13}C メチルエステル間の距離測定
4-4　AME が形成するチャネル構造
4-5　結果の考察

第五章　結論

参考文献

第六章　実験の部

謝辞

略語表

AIBN	2,2'-azobisisobutyronitrile
AmB	amphotericin B
Bz	benzoyl
COSY	correlation spectroscopy
CP-MAS	cross polarization- magic angle spinning
CSA	camphor-10-sulfonic acid
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DIBAL	diisobutylaluminiumhydride
DLPC	dilauroylphosphatidylcholine
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DMF	*N,N*-dimethylformamide
DMP	Dess-Martin periodinane
DMPC	dimyristoyl phosphatidylcholine
DMSO	dimethyl sulfoxide
DSPC	distearoylphosphatidylcholine
EE	ethoxyethyl
ESI	electrospray ionization
Fmoc-	9-fluorenylmethoxycarbonyl-
FmocOSu	9-fluorenylmethylsuccinimidylcarbonate
HEPES	*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
KHMDS	potassium hexamethyldisilazide
LHMDS	lithium hexamethyldisilazide
LUV	large unilamellar vesicles
MAS	magic angle spinning
MNBA	2-methyl-6-nitrobenzoic anhydride
MS	mass spectrometry
MS4A	molecular sieves 4A
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear Overhauser effect
ODS	octadecylsilica
PCC	pyridinium chlorochromate
ppm	part par million
PPTS	pyridinium *p*-toluenesulfonate

py	pyridine
RDX	REDOR of X cluster
REDOR	Rotational-Echo Double Resonance
TASF	tris(dimethylamino)sulfoniumdifluorotrimethylsilicate
TBAF	tetrabuthylammoniumfluoride
TBS	*tert*-butyldimethylsilyl
THF	tetrahydrofuran
TLC	thin-layer chromatography
TMS	trimethylsilyl

第一章　序論

1-1. ポリエン系抗真菌薬

真菌による感染症（真菌症）とは、真菌が宿主の皮膚や体内に侵入、定着して宿主に障害を与えている状態を指す。真菌は本来感染力が弱いため、皮膚への感染以外で健常者への感染は少ない。現在のところ、水虫以外はなじみの薄い真菌症だが，先進国では近年増加傾向にある。これは、医療の発達による老齢者の増大、悪性腫瘍患者の増大とそれに伴う抗がん剤の投与などによる生体防御機構の撹乱と免疫力の低下、カテーテル治療や臓器移植の際に用いられる免疫抑制剤による免疫力の低下、ステロイド投与などによる日和見感染としての真菌症が世界的に増加しているためである。また、AIDS もその一因となっている。

抗真菌薬は、細胞の分裂を阻害することで真菌の増殖を抑えたり、殺したりするのが基本となる。このとき優れた薬としては、ヒトの正常細胞に影響を与えることなく、”選択的に”真菌に作用しなければならない。しかしながら、真菌はヒトと同じ真核生物であり、細胞の構造や代謝系統が類似しているため真菌のみに選択毒性を示す抗真菌薬の開発は一般的に困難が伴う。現在使用されている抗真菌薬として、ポリエン系、アゾール系、ピリミジン系、アリルアミン系、モルフォリン系などが存在するが、中でもポリエン系抗生物質は強く幅広い抗真菌活性を有する重要な化合物群である。これらは、土壌放線菌により生産され、1951 年に最初の例であるナイスタチンが発見されて以来[1)]、数多くの類縁体が報告されている(図 1-1)[2-7)]。ポリエン系抗生物質は優れた抗真菌剤であるが、難水溶性と強い毒性(副作用)のため、医療では主として局所的な使用に限定されている。現在、この中で全身性感染症の治療に用いられているのはアンフォテリシン B(AmB)が唯一であり、静脈注射による深在性真菌症の治療に欠くことのできない医薬品となっている[8)]。

現在市販されている AmB 製剤は数種類あるが、それらは AmB をリン脂質や界面活性剤と混合させることで親水性を向上させ、血液中の AmB 濃度を高めることでその作用を増強している[9,10)]。しかし、*in vivo* における副作用(腎毒性)は依然として強く、問題となっている[11)]。AmB の毒性軽減と水溶性向上は化学誘導からも研究が進められており、*in vitro* 実験で良好な結果を示す誘導体もある程度報告されている[12-15)]。しかし、不安定なポリエンマクロライド抗生物質の化学誘導や精製は一般に困難であり、今のところ製剤化には至っていない。

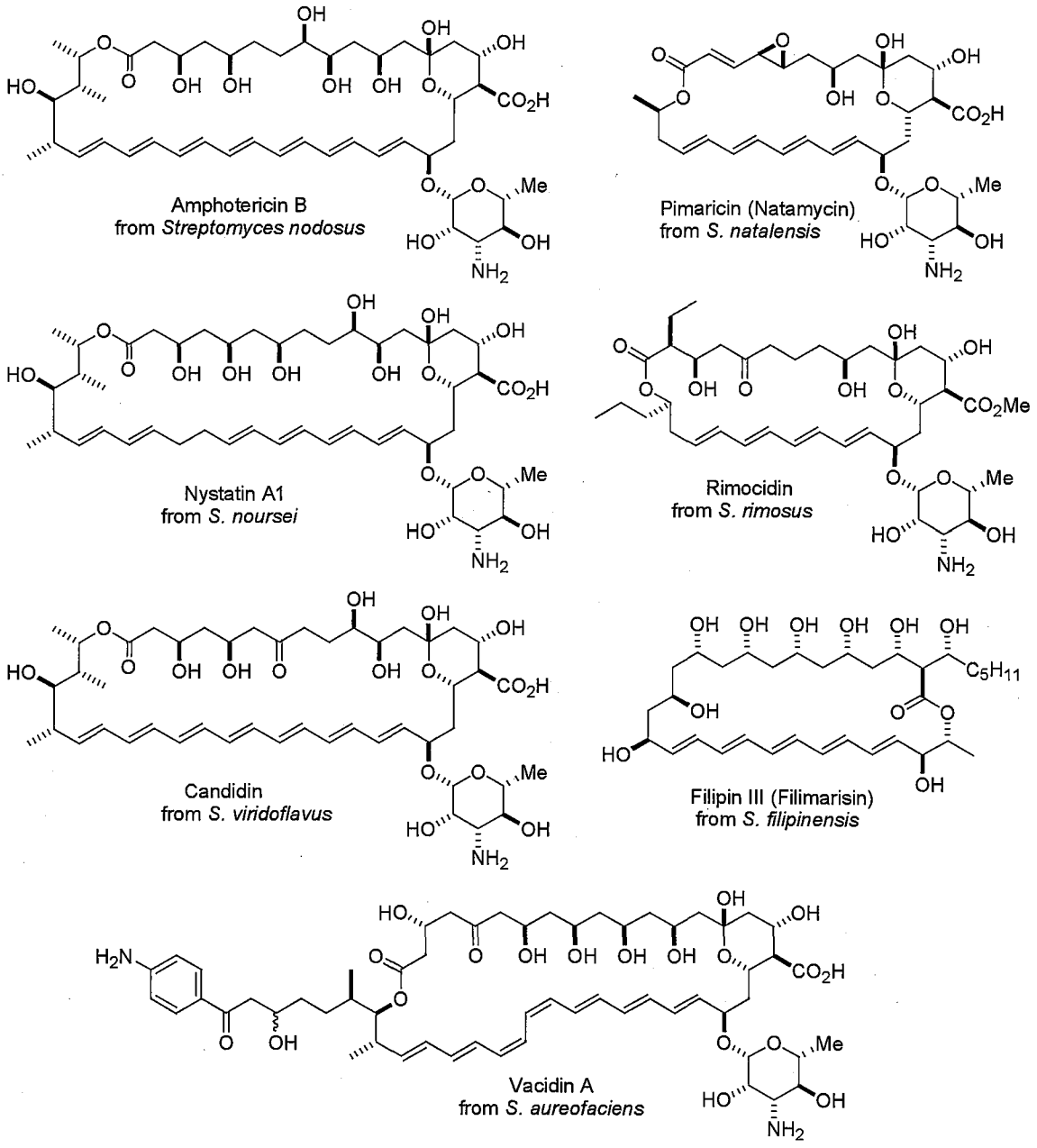


図1-1. ポリエンマクロライド抗生物質

1-2. AmB の分子構造およびイオンチャネルの推定構造

AmB は 1956 年に土壌放線菌 *Streptomyces nodosus* から単離され[16]、その構造は 1971 年に *N*-ヨードアセチル誘導体の X 線結晶構造解析により決定された[17]。AmB の構造上の特徴としては、38 員環のポリエンマクロライド化合物であること、片側に疎水的な共役ヘプタエンを有し、反対側に親水的なポリオールが存在するという両親媒構造であること、また、分子長軸方向の片側にカルボキシル基とマイコサミンを有する両性イオン化合物であることなどが挙げられる。

このような構造的特徴に加え、膜の透過性亢進を引き起こす作用もあることから、AmB は脂質二重膜を貫通したイオン透過性チャネルまたはポアを形成することが推定されており、このイオンチャネル構造として、1974 年に Demel らによって提唱された樽板モデルが広く受け入れられてきた[18](図 1-2)。このモデルでは、6～10 分子の AmB がステロールと共に会合し、親水性のポリオール部分を内側に向け、疎水性のポリエン部分を外側の脂質分子に向けて配列していると考えられている。また、AmB チャネルはグルコースより小さな分子は通すが、グルコースより大きな分子は通さないこと、グルコースは透過速度がかなり遅いことから、チャネルの内径はグルコース分子の大きさとほぼ同じ約 8 Å であると考えられている[19]。

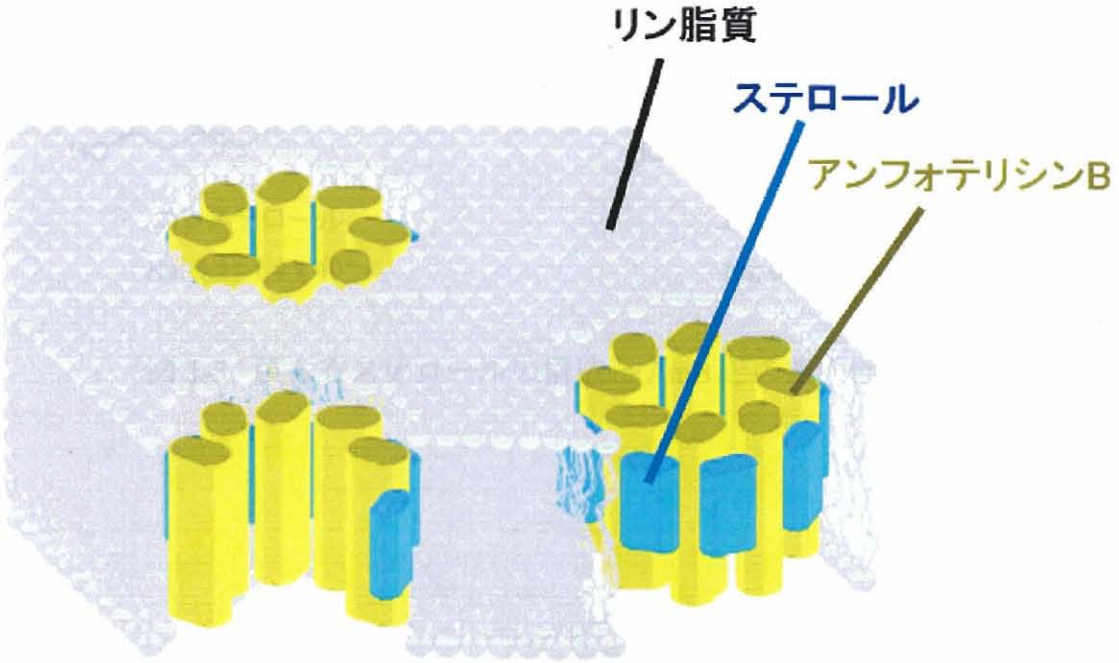


図 1-2. AmB 会合体の樽板モデル

1-3. AmB のステロール選択性

AmB は膜含有ステロールの相違によって選択毒性を発現している事から、イオン透過性のチャネル複合体を形成する時にステロールを分子認識していると考えられる。つまり、AmB はコレステロールに比べてエルゴステロールと強く相互作用し、その結果エルゴステロール含有膜中でチャネル複合体を安定化し、毒性が強く発現する。1975 年、Archer らは、エルゴステロールおよびコレステロールをそれぞれ含有した培地で育てたマイコプラズマの AmB に対する感受性の調査をしたところ、エルゴステロールを含む培地のマイコプラズマでより大きな K^+透過活性が確認された[20]。この結果は、細胞膜ステロールの差が、真菌選択性に関与していることを支持している。また、1982 年、Bittman らはステロールを 33%含有する卵黄フォスファチジルコリン(EggPC)リポソームに対する AmB の結合定数をスキャッチャードプロットにより算出したところ、コレステロール含有膜では $Ka = 5.2 \pm 1.4 \times 10^4$、エルゴステロール含有膜では $Ka = 6.9 \pm 1.1 \times 10^5$ となり、エルゴステロール含有膜のほうが 10 倍ほど大きいと報告している[21]。

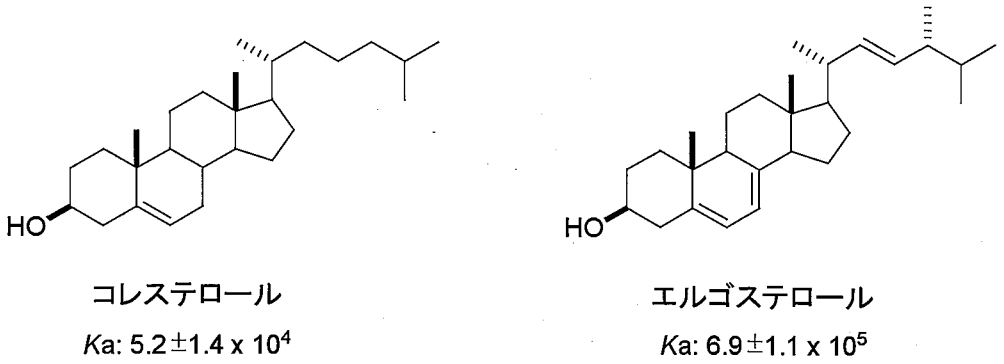


図 1-3. 膜含有ステロールの構造と AmB との親和性(*K*a)

以上の実験結果から、膜含有ステロールとしてエルゴステロールを持つ真菌細胞膜において AmB-ステロール会合体が形成されやすいため真菌に対して選択毒性を持つという解釈は現在広く支持されている。しかし、AmB-ステロール会合体形成を証明する実験的証拠は得られておらず、推測の域を出ていない。なぜなら、脂質膜中での分子複合体は生成と崩壊を繰り返すダイナミックな過程であることが多く、X 線結晶構造解析や溶液 NMR といった手法の適用が困難なためである。この複合体構造の存在を証明しようとした研究例は多いが、結果が不明瞭なものが多く、AmB とコレステロールの間に特別な相互作用が無いことを示す結果も報告されている[22,23,24]。また、ステロールを含まないリン脂質二重膜での AmB チャネル形成も数多く報告され[25-34]、リン脂質-AmB の相互作用もまたチャネル活性や選択性に重要であることが示唆されている[35]。したがって、それぞれの成分が相互作用しているということを直接的に観測できるような手法の適用が強く望まれている。

1-4. 固体NMRを用いた原子間距離測定

1-4-1. REDOR法

これまでに数多くのペプチドや蛋白質の三次元構造が、X線結晶構造解析や溶液NMRなどにより決定されてきた。X線による構造解析は、分子量が大きな蛋白質でも全体構造を解析できるのが特徴である。ただし、結晶化を行う必要があり、均一な構造を持つ単結晶が得られなければ精度よく構造を決定することはできない。一方、溶液NMRは結晶化させる必要がなく、溶液のままで立体構造を解析できるのが特徴である。しかし、溶液NMRは不溶性の蛋白質のような溶解性の低い試料に対しては適用することはできない。そのような中、固体NMRはX線や溶液NMRの適用が難しい不均一な粉末試料や不溶性蛋白質などに対し、固体状態のまま原子レベルでの構造解析が可能な方法として注目されている。

固体NMRには、溶液NMRにおいて平均化されていた磁気双極子相互作用や化学シフト異方性といった相互作用が存在するため、溶液NMRに比べて感度や分解能が低いといった問題があり、応用範囲が狭いとされていた。しかし近年、これらの問題を克服する多くの測定手法が開発され、MAS（Magic Angle Spinning）条件下での精密な原子間距離情報や、角度情報の取得が可能となった。これらの距離、角度情報を利用することで、固体状態においても、X線や溶液NMRと同様に精度の高い構造決定が可能となってきている。

REDOR法[36]（Rotational Echo DOuble Resonance）は、^{13}C核と^{15}N核のような異種核間の弱い双極子相互作用をMAS条件下で復活させ、その双極子相互作用の大きさから原子間距離を精密に測定する方法であり、ローターの周期に同期して、磁気双極子相互作用をもつ核の片方に180°パルスを照射することで双極子相互作用をリカップリングさせている(図 1-4-1)。距離測定の目安として^{13}C、^{15}N原子間距離であれば5Å程度まで、^{13}C、^{19}F原子間距離であれば、10Å程度までの距離がそれぞれ±0.05Åおよび±0.3Åの精度で測定することができる[37]。この固体高分解能NMRによる距離測定を生体物質に応用することにより、蛋白質とリガンド複合体の結合部位などの局所構造を精密に決定することが可能である。また膜中における生体物質の構造解析にも有用であり、この方法によって膜ペプチドであるグラミシジンの膜中での詳細な構造解析が行われている[38]。

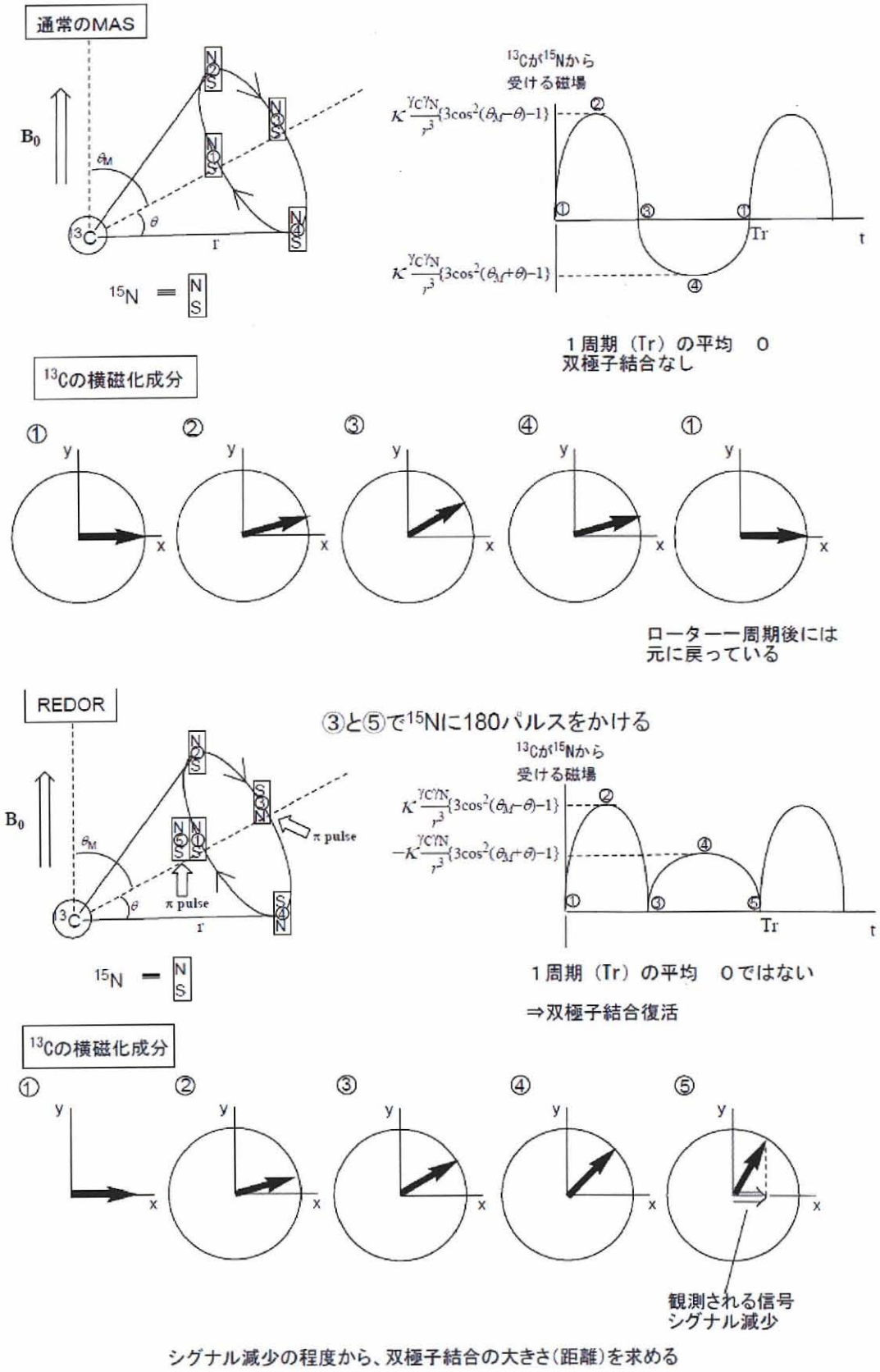


図 1-4-1. 通常の CP-MAS 法(上図)と REDOR 法(下図)

REDOR測定によく用いられる核種を表1-4-1に示す。この中でもフッ素核は、核磁気回転比がプロトンについで大きいために REDOR による長距離測定が可能である。また、フッ素はスピン 1/2 の同位体の天然存在比が 100%であるため感度が良く、かつ天然化合物にほとんど存在しないことから、バックグラウンドシグナルが非常に低いという利点も持つ。

表 1-4-1　NMR 法でよく使われる原子核 [39)]

核の種類	スピン量子数	共鳴周波数 (MHz, ^{1}Hを100.0としたとき)	天然存在比(%)	磁気回転比 $\gamma \times 10^{-4}$ (rad. $G^{-1}sec^{-1}$)	相対感度 (^{1}Hを1.00としたとき)
^{1}H	1/2	100	99.984	2.675	1.00
^{13}C	1/2	25.1	1.108	0.673	0.0159
^{15}N	1/2	10.1	0.365	-0.271	0.00104
^{17}O	5/2	13.6	0.037	-0.363	0.0291
^{19}F	1/2	94.1	100	2.517	0.833
^{31}P	1/2	40.5	100	1.083	0.0663

1-4-2. 標識化天然物を用いた REDOR の適用例

高磁場固体ＮＭＲ測定は近年、著しく発展してきており、特に REDOR はＸ線回折や溶液ＮＭＲが適用できない複雑な不均一固体の構造解析に適用されている。また、最近では長距離測定に有効なフッ素を用いることで、膜中でのペプチドの配向や会合状態を決定している報告もある。これらの測定に用いられているタンパク質等の同位体標識化は、培養や遺伝子工学的手法などにより調製可能である。しかし、非ペプチド天然物に対して、特定の位置を ^{13}C、^{15}N あるいは天然には無い ^{19}F で標識化した分子プローブを調製するには、有機合成化学的手法を用いて導入する必要がある。そのため、標識化タンパク質などに比べてその REDOR 適用例は少ない。以下にその適用例を示す。

パクリタキセル(タキソール)は 1971 年に太平洋イチイ (*Taxus brevifolia*) の樹皮から単離された物質である [40]。制癌剤として現在臨床的に用いられており、微小管を形成するチューブリンに結合し、その脱重合を阻害することが知られている [41]。

Bane らは、タキソールの ^{13}C、^{15}N、^{19}F 標識体を天然物から誘導し、チューブリンに結合した状態のコンフォメーションを $^{13}C\{^{19}F\}$および $^{15}N\{^{19}F\}$ REDOR 測定によって推定している [42]。この場合、^{19}F と ^{13}C の距離はそれぞれ 9.6Åおよび 10.4Åであると求められ、現在、距離情報から得られたタキソールのコンフォメーションをもとに、より親和性の高い誘導体の調製が検討されている（図 1-4-2）。

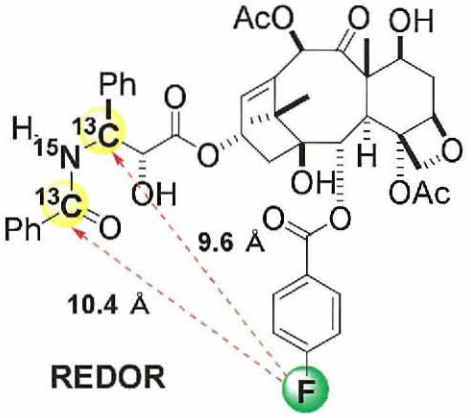


図 1-4-2. フッ素標識化タキソール

以上に示したように、REDOR 測定は標識分子の結合様式やその標的タンパクの結合位置を知るうえで有用な方法であることがわかる。ただし、そのためには活性を保持したフッ素標識化天然物を調製することが重要である。今回の例は天然物から容易に誘導可能な側鎖の一部や官能基を標識化したものであり、天然物の基本骨格からはかなり遠い位置にある。そのため、これらの誘導体を用いて実際の分子のコンフォメーションやレセプターとの正確な距離を推定することは非常に難しい。この問題を解決するには分子の基本骨格そのものを標識化する必要があると思われる。タンパク質やペプチドの系において骨格そのものに ^{13}C や ^{15}N を導入することは容易であるが、^{19}F についてはその報告例は少ない。また、非ペプチド性の天然物の骨格自体に標識を導入することは、天然物そのものの全合成に匹敵するため、現在までにほとんど報告例は無い。

1-5. AmB イオンチャネル複合体構造解明に向けて

1-5-1. 序

AmB は、生体膜中でステロールやリン脂質と相互作用してイオン透過性のチャネルを形成していると考えられているが、未だに複合体の構造や、ステロール、脂質分子の認識機構の詳細は解明されていない。複合体形成には AmB、リン脂質、ステロールの 3 成分の分子間相互作用が関与していると考えられるため、これらを同時に解析することは非常に困難である。当研究室では、REDOR 法を適用することによって、それぞれの成分の分子間相互作用を直接観測し、そこから得られた距離情報を基に、AmB チャネル複合体の全体像を明らかにすることを研究目的としている。現在、AmB-リン脂質[43]、AmB-ステロール[44]、AmB-AmB[45]の 3 つの 2 成分相互作用について研究を進めている。

AmB 分子が膜中で何らかの集合体を形成していることは確実であるため、その分子同士の距離情報を得ることは、分子の重なり方や会合数を決める上でも非常に重要である。正確な距離測定を行うには、長距離測定が可能で、かつ感度が良い $^{13}C\{^{19}F\}$ REDOR が適していると考えられる。そのためには AmB を ^{13}C および ^{19}F で標識化する必要がある。

1-5-2. 標識化 AmB の調製

まず、^{13}C 標識化 AmB については、放線菌 *Streptomyces nodosus* に、^{13}C 標識された前駆体、3-^{13}C 標識化プロピオン酸またはユニフォーム ^{13}C 標識化酢酸ナトリウムを取り込ませることで、39、40、41 位が標識化された[tri-^{13}C]AmB、および全炭素が標識化された[U-^{13}C]AmB を生合成的に調製できることが Rawlings らにより報告されている（図 1-5-1）[46]。図 1-5-1 の左図は Rawlings らによって報告されたプロピオン酸の AmB への取り込み位置を示している。このスキームに従い、位置特異的に 39、40、41 位の 3 つの炭素が標識された[tri-^{13}C]AmB を調製することができる。また、^{13}C 標識化酢酸ナトリウムの代わりとして、ユニフォームに ^{13}C 標識化されたグルコースを取り込ませると、全ての炭素が ^{13}C 標識された[U-^{13}C]AmB を調製することができ、標識率も高いことが当研究室により報告されている(図 1-5-1 右図)[47]。

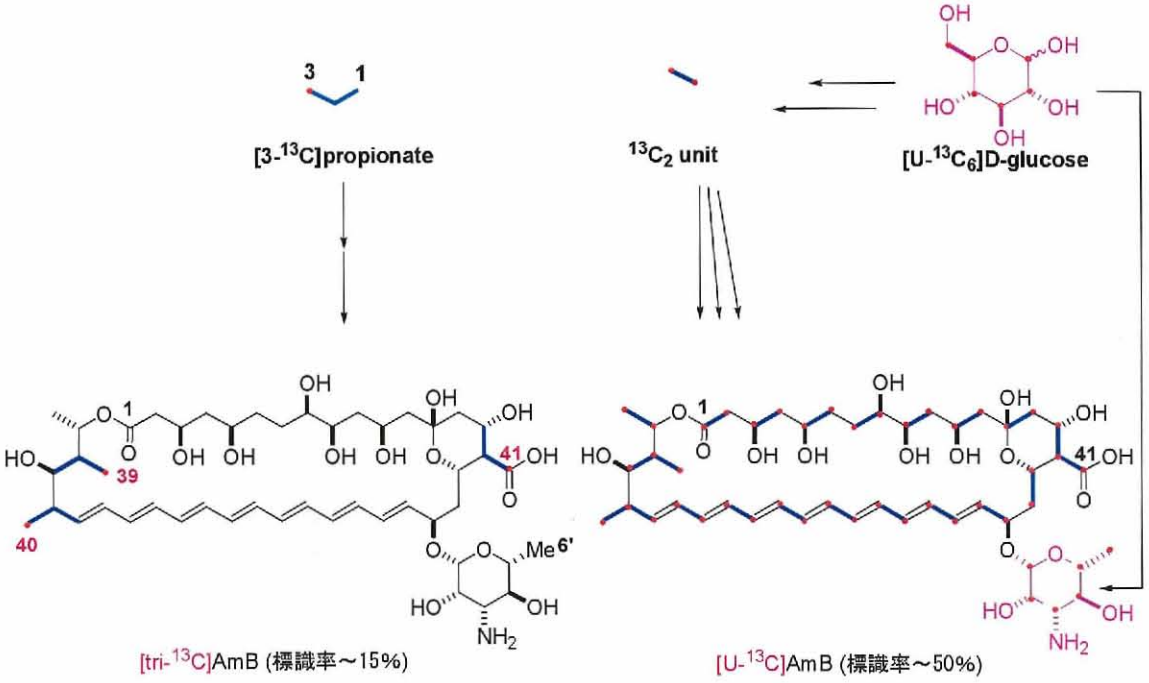


図 1-5-1. ^{13}C 標識化 AmB の生合成的調製

^{19}F 標識化 AmB については、AmB から 1 段階で *N-p*-フルオロベンジル AmB、および 5 段階で 14-^{19}F-AmB の調製に成功している（図 1-5-2）[48]。14-^{19}F-AmB については天然の AmB とほぼ同程度の活性を保持していることが確かめられている(表 1-5-1)[48]。

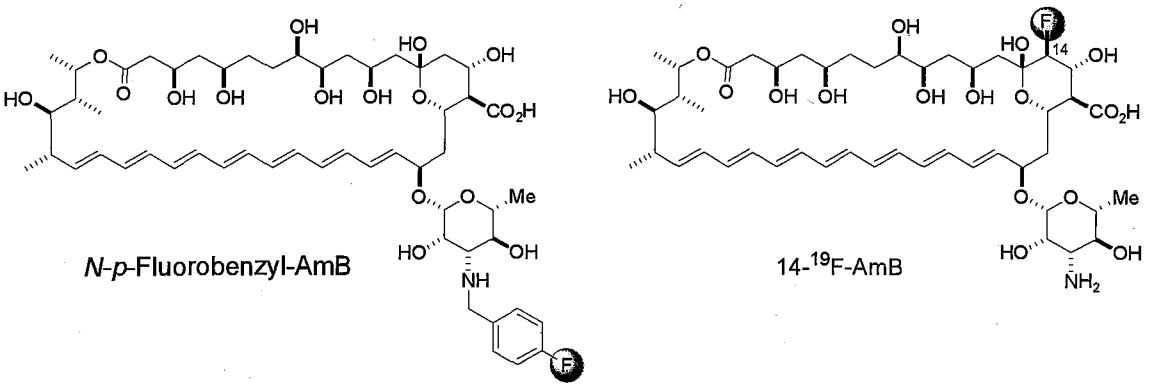


図 1-5-2. フッ素標識化 AmB の構造[48]

表 1-5-1. フッ素標識化 AmB と AmB の生物活性[48]

Compound	Hemolytic activity EC_{50} (μM)[a]	Antifungal activity (μg)[b]
AmB	1.4	10
14-^{19}F-AmB	1.3	10
N-p-Fluorobenzyl-AmB	2.6	>50

[a] Against 1% human erythrocytes.
[b] The minimal amount of samples on a paper disk that shows inhibitory zone on the culture of *Aspergillus niger.*

当研究室ではこれまでに、これらの標識体を用いた固体 NMR 測定により、AmB チャネル複合体構造の解明を目指した研究を行ってきた。以下にこれまで当研究室で行われた実験の詳細を述べる。

1-5-3. AmB-リン脂質相互作用

AmB のチャネル形成において、リン脂質も重要な役割を担うことが指摘されている。そこで当研究室では eggPC リポソームに C10 から C18 までの鎖長の異なる飽和リン脂質を添加して AmB のカリウム透過活性試験を行った [43a)]。その結果明らかな鎖長依存性がみられた(図 1-5-3、表 1-5-2)。

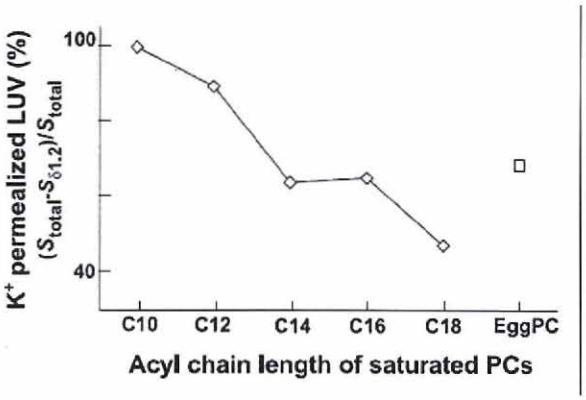


図 1-5-3. カリウム透過活性とリン脂質の鎖長 [43a)]

表 1-5-2. 脂質の炭素数と分子長 [43a)]

PC	Phase at 25 °C	Length of hydrophobic region (Å)	
		Fluid phase (f)	Gel phase (g)
POPC (C_{16}, $C_{18:1}$)	f	25.8[a]	–
DCPC ($2 \times C_{10}$)	f	15.5[b]	–
DLPC ($2 \times C_{12}$)	f	19.5[b]	27[c]
DMPC ($2 \times C_{14}$)	f	23[b]	31.5[d, e]
DPPC ($2 \times C_{16}$)	g	26[b]	36[d]
DSPC ($2 \times C_{18}$)	g	29.5[b]	40.5[c]

表 1-5-2 には、脂質の炭素数と分子長の関係を示しているが、図 1-5-3 と比較すると、添加した飽和リン脂質が形成する二重膜の疎水領域の長さが AmB 分子長(約 20Å)より短くなると活性が急激に増加していることがわかる。この結果は、eggPC 膜中で AmB が形成するカリウムイオン透過チャネルが、AmB 一分子でリン脂質二重膜を貫通した一分子貫通型であることを示唆している(図 1-5-4)。

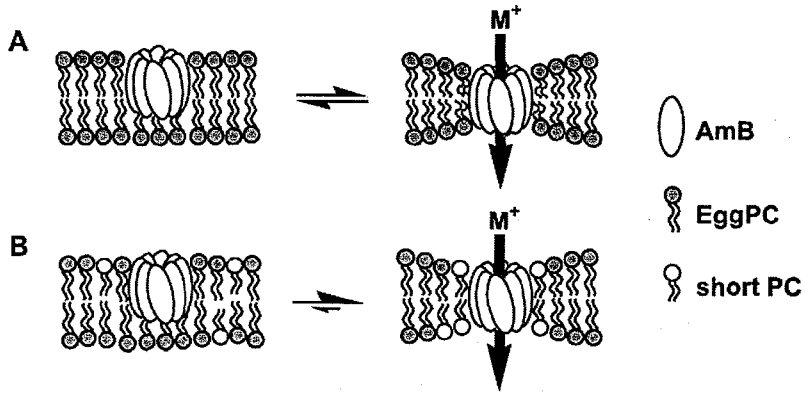


図 1-5-4. AmB イオンチャネルの模式図 [43a)]

AmB の形成するイオンチャネルの推定構造として、細胞膜を AmB 一分子で貫通したシングルレングスチャネルと二分子で貫通したダブルレングスチャネルが提案されている。前述の結果からはシングルレングスチャネル構造を支持すると考えられるが、仮説の域を出ていない。そこでこの仮説を固体 NMR 実験により証明することが試みられた [43c)]。

図 1-5-5 と図 1-5-6 では[tri-^{13}C]AmB とリン脂質を用いた ^{13}C-^{31}P REDOR 測定の結果を示している。S_0はパルス非照射スペクトルで通常の ^{13}C スペクトルに相当する。ΔS はパルス非照射スペクトル S_0からパルス照射スペクトル S を差し引いたもので、REDOR 減衰が見られる部分、すなわち ^{13}C-^{31}P 間が近い部分がピークとなって現れる。図 1-5-5 の結果より、DMPC(C_{14})二分子膜においては AmB 分子両端である 39 位、40 位、41 位に REDOR 減衰が見られており、この部分が膜表面に存在するリン原子に近いことが明らかとなった。これはシングルレングスチャネルを支持する結果となっている(図 1-5-7 a)。一方、図 1-5-3 に示したように、AmB イオンチャネル形成を阻害する DSPC(C_{18})を用いて同様の実験を行ったところ、AmB 分子のイオン性官能基を有する C41 側のみが膜表面のリン原子に近いことが明らかとなった。これは DSPC 二重膜の厚み(40.5 Å)により AmB の C39 および C40 位が反対側の膜表面に届いていないためと考えられる(図 1-5-7 b、c)。このように ^{13}C 標識化 AmB を用いた固体 NMR 測定によって、AmB の膜中での存在状態が分光学的に明らかにされた。

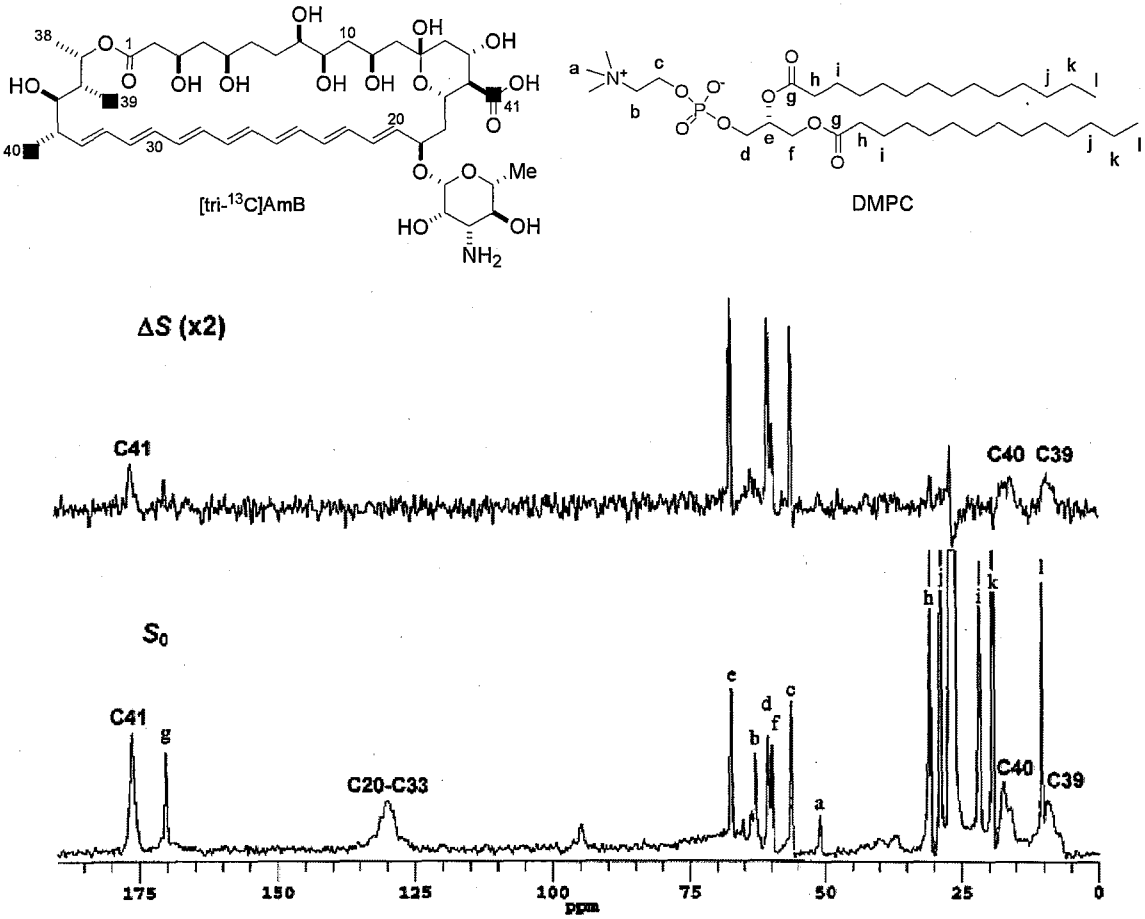


図 1-5-5. [tri-^{13}C]AmB と DMPC(C_{14})との ^{13}C-^{31}P REDOR[43c)]
S_0 = 非照射スペクトル、ΔS = REDOR 差スペクトル

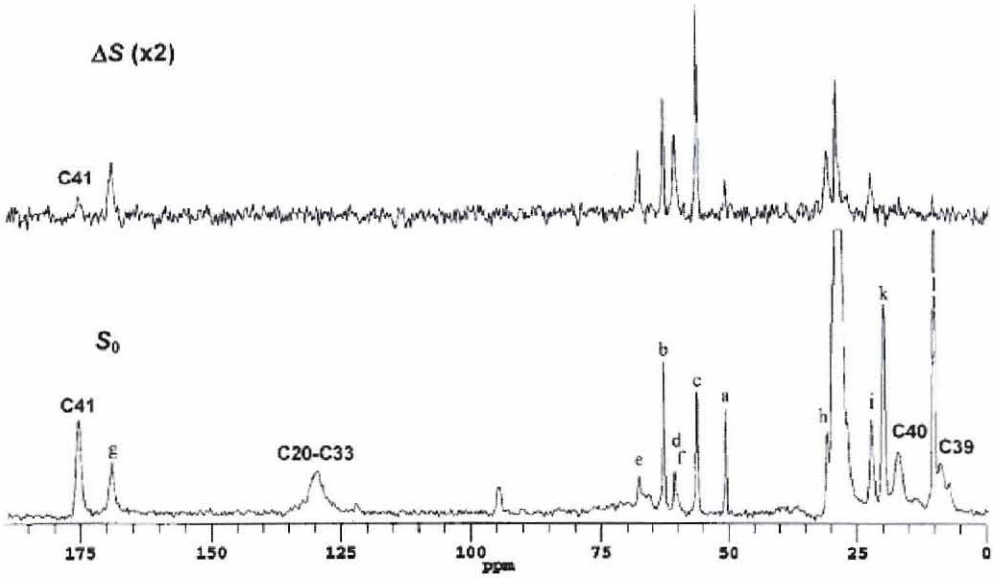


図 1-5-6. [tri-^{13}C]AmB と DSPC(C_{18})との ^{13}C-^{31}P REDOR[43c)]
S_0 = 非照射スペクトル、⊿S = REDOR 差スペクトル

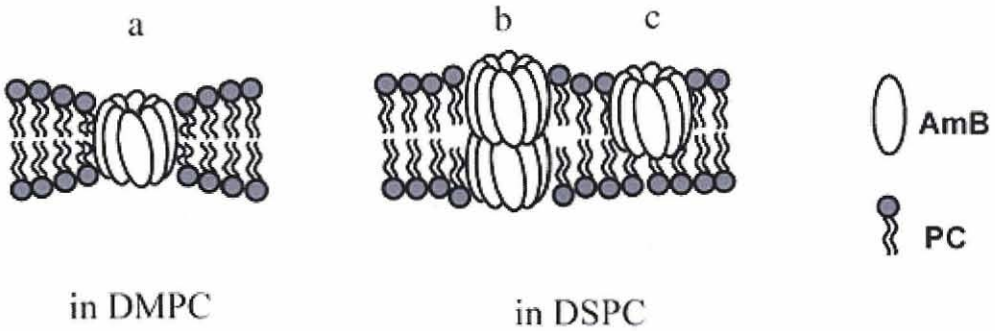


図 1-5-7. REDOR 測定により明らかにされたチャネル構造[43c)]

1-5-4.　AmB-ステロール相互作用

AmB の抗菌活性の発現に重要であるステロールは、結合状態と解離状態の平衡であると考えられるため、AmB-ステロールの連結により複合体構造が安定化すると考えられる。そこで、AmB のアミノ基とステロールのヒドロキシ基を連結した誘導体が調製された(図 1-5-8)[44a)]。

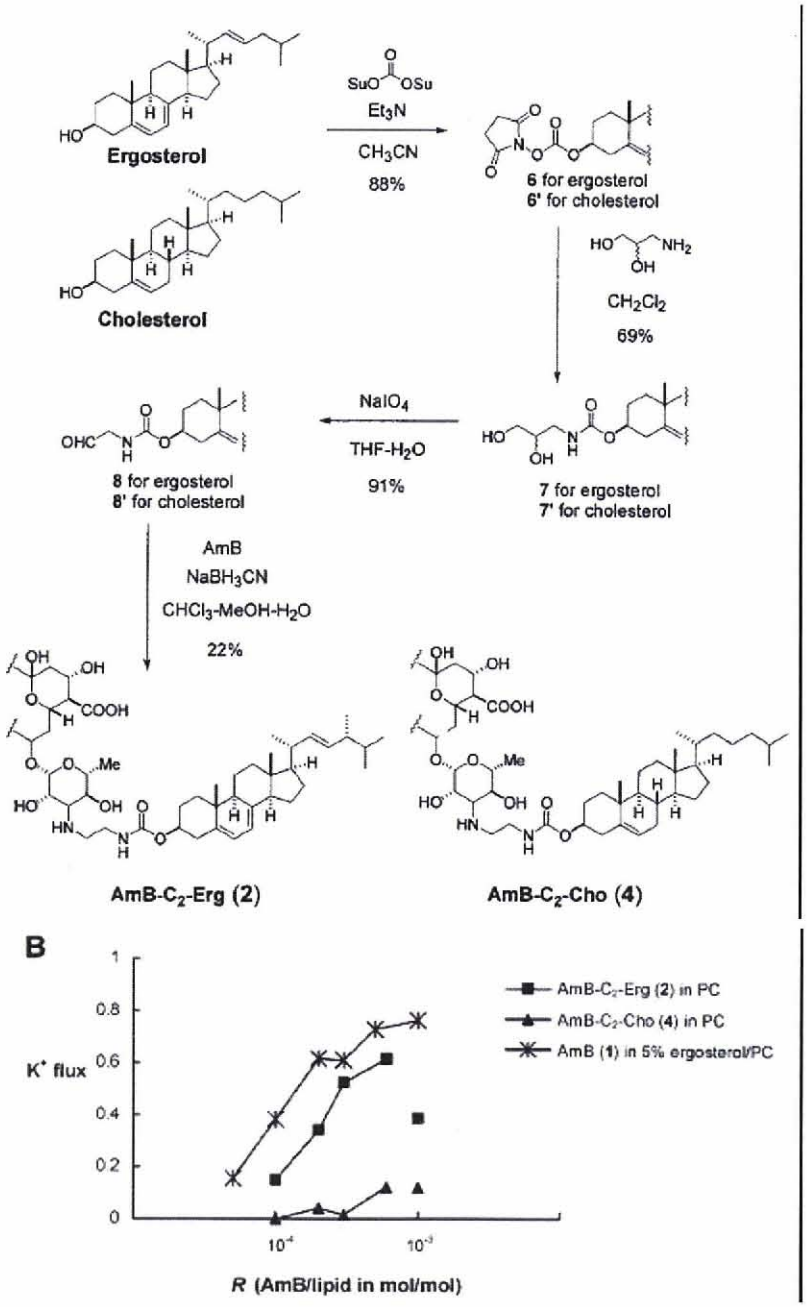


図 1-5-8. AmB-ステロール連結体の合成スキームとチャネル活性 [44a)]

図 1-5-8 から明らかなように、エルゴステロール連結体の方が、コレステロール連結体よりも強いチャネル活性を有しており、エルゴステロール連結体においてはエルゴステロール含有膜中での AmB と同程度の活性を示している。この結果は、AmB とエルゴステロールの分子認識が連結体においても再現されていることを示している。

そこで、次に AmB とステロールとの相互作用部位に関する情報を得るため、固体 NMR を用いてステロール部分と AmB 骨格との距離測定が行われた(図 1-5-9)[49]。[U-^{13}C] AmB に対して通常の REDOR 測定を行うと、双極子の展開時間に同核種間の J カップリングによる展開も起こってしまうことが問題となるため、同核種間の相互作用を抑えた RDX（REDOR of X cluster）測定法[50]が適用された（図 1-5-10）。

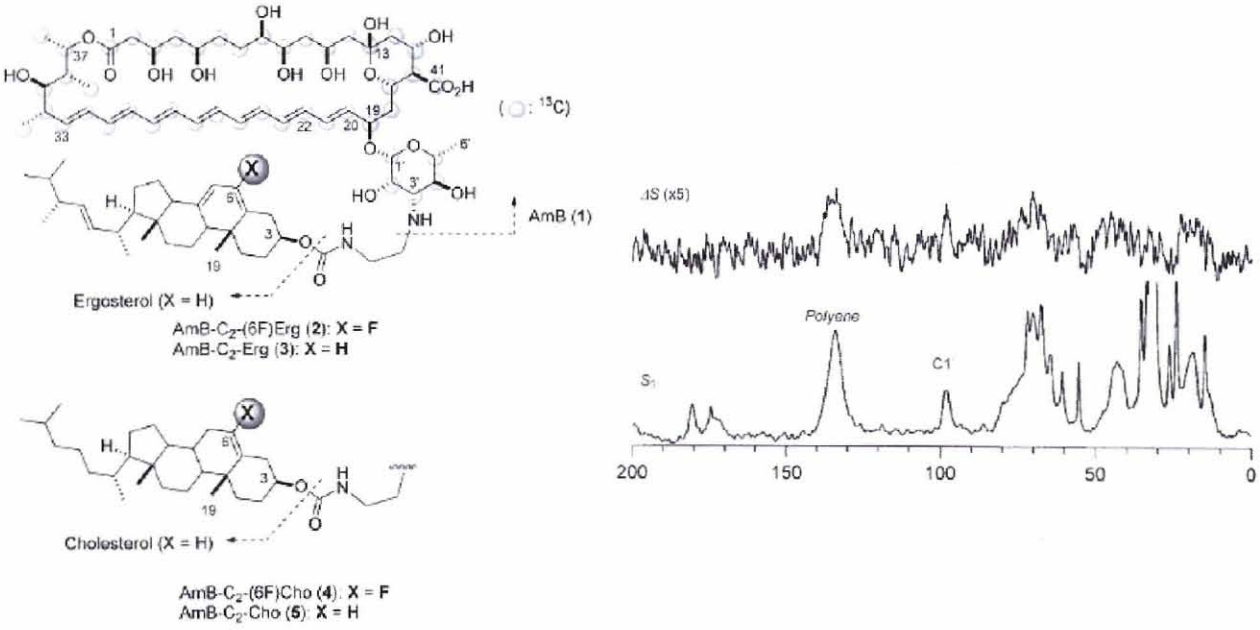


図 1-5-9. [U-^{13}C]AmB-^{19}F 標識化ステロール連結体と RDX スペクトル[49]

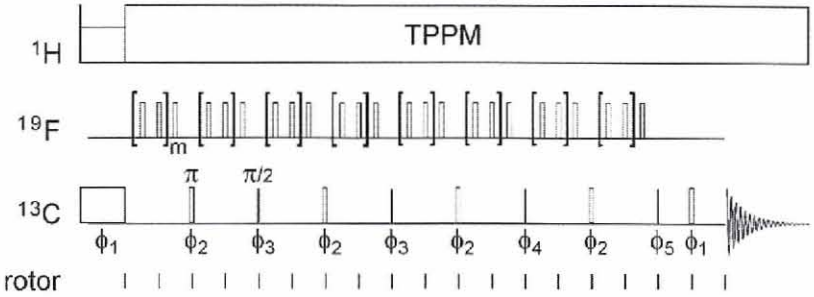


図 1-5-10　RDX のパルスシークエンス[50]

RDX スペクトルよりヘプタエン部分で 12%の減衰($\Delta S/S_0$ = 0.12　^{13}C-^{19}F 間 8.6 Å)が見られ、C1'部分でも減衰が見られた($\Delta S/S_0$ = 0.15　^{13}C-^{19}F 間 8.3 Å)。この距離情報を基に最安定配座が求められた(図 1-5-11)。また最安定配座から、ステロール分子が AmB 分子の周りを取り巻く様な形で AmB イオンチャネルを安定化させるという新たなモデルが提唱された(図 1-5-12-a)。

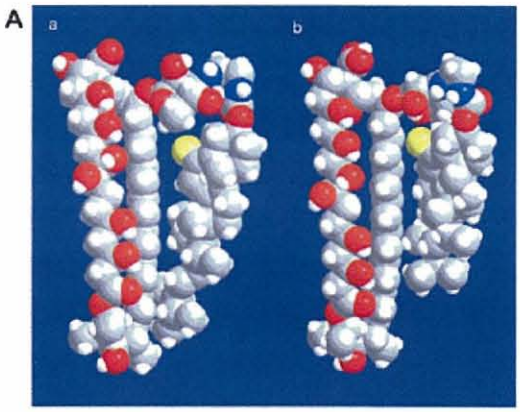


図 1-5-11. RDX の距離情報を基に計算された最安定配座 [49)]

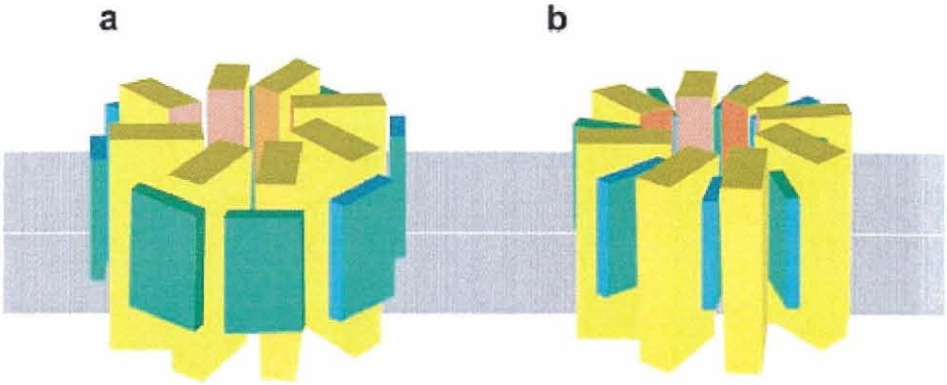


図 1-5-12. 最安定配座から求められた AmB イオンチャネルモデル図
(a: サラウンドモデル、b: 従来のモデル)[49)]

1-5-5. AmB-AmB 相互作用

前述したように、脂質膜中での AmB-AmB 相互作用を解明するためには固体 NMR の $^{13}C\{^{19}F\}$ REDOR 法を用いる事が適していると考えられる。現在までに、^{13}C 標識体として[tri-^{13}C]AmB、[U-^{13}C]AmB の二種類が固体 NMR の分子プローブとして用いられているが、^{19}F 標識体としては 14-^{19}F-AmB のみである。したがって、AmB の 14 位周辺、つまり極性基側の情報は得られるが、分子中央部分、特にポリエン部分の構造情報を得ることができない。すなわち、AmB がポリオール部分を内側に、ポリエン部分を外側に向けてチャネルを形成しているとすると、14-^{19}F-AmB を用いてもチャネルの内側の情報しか得られず、外側の情報が全く得られないことになる。したがって、AmB チャネル複合体をより詳細に解析するためには外側の情報を得ることが必要であり、そのためには分子中央部に標識原子を導入する以外に方法は無く、これは単に天然物の AmB を誘導化するだけでは不可能である。

1-5-6　標識化 AmB 誘導体の化学合成

AmB のポリエン部にフッ素あるいは ^{13}C 炭素を導入するには、化学合成による供給が最も現実的な手段である。AmB の全合成は 1987 年に Nicolaou らによって報告されている(図 1-5-13)[51]。

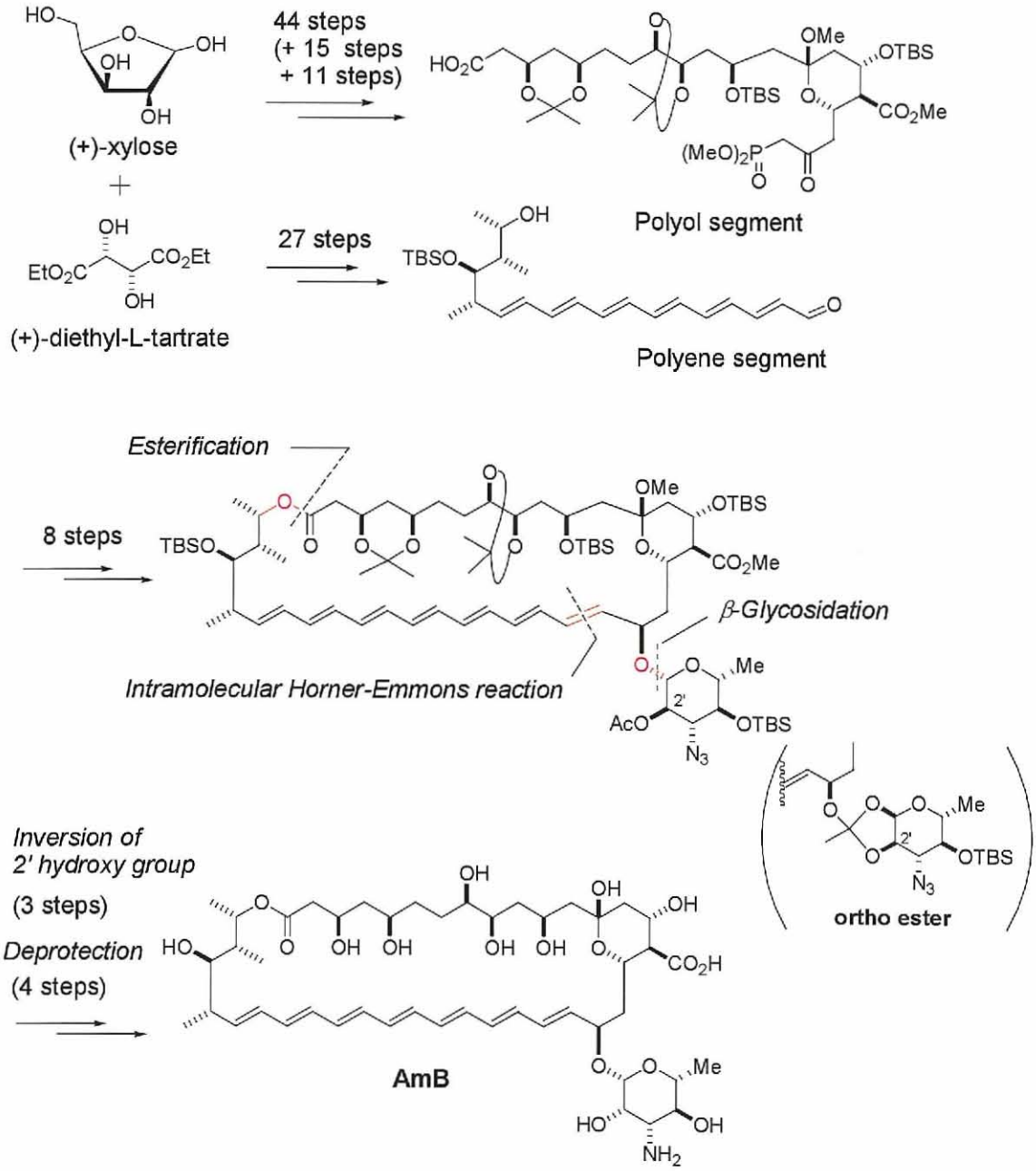


図 1-5-13. AmB の全合成

Nicolaou らはまずポリオールセグメントとポリエンセグメントをキシロースおよび酒石酸ジエチルからそれぞれ 44 段階、27 段階で合成している。続いてエステル化によりフラグメントを連結し、分子内 Horner-Emmons 反応により環化させてマクロライド環を構築後、2'位の隣接基関与を利用したβグリコシル化により糖部分を導入している。その後 2'位のヒドロキシ基を反転させ、TBS 基の除去、アジドの還元、アセトナイドおよびメチルケタールの除去を経て、最後にメチルエステルを加水分解し AmB の全合成に成功している。しかし、糖部分を導入するβ-グリコシル化、およびアセトナイドの脱保護の収率が非常に悪いことが問題として残っていた[51f]。特にグリコシル化については、導入部位がポリエン部分のアリル位のヒドロキシ基であるため、条件を強くすると基質が分解してしまい、逆に弱いと反応せず、副生成物としてオルトエステルが生成してしまうという結果が得られていた。AmB の全合成からほぼ 20 年経過してもなお、糖を有する他のポリエンマクロライド化合物の全合成がなされていないのは、このβ-グリコシル化の困難さが原因の一つであると思われる。

また、2008 年に Carreira らは、35-デオキシ AmB メチルエステルの合成に成功している(図 1-5-14)[52]。Carreira らは、まずリンゴ酸および酒石酸エステルからポリオール部分、β-ヒドロキシ酪酸エステルからポリエン部分を合成した。続いてエステル化によりフラグメントを連結し、分子内 Horner-Emmons 反応により環化させてマクロライド環を構築、その後βグリコシル化、2'位のヒドロキシ基を反転、脱保護を経て目的物を得た。しかし、やはりβ-グリコシル化(45%)、および脱保護の収率(18%)に問題が残った。

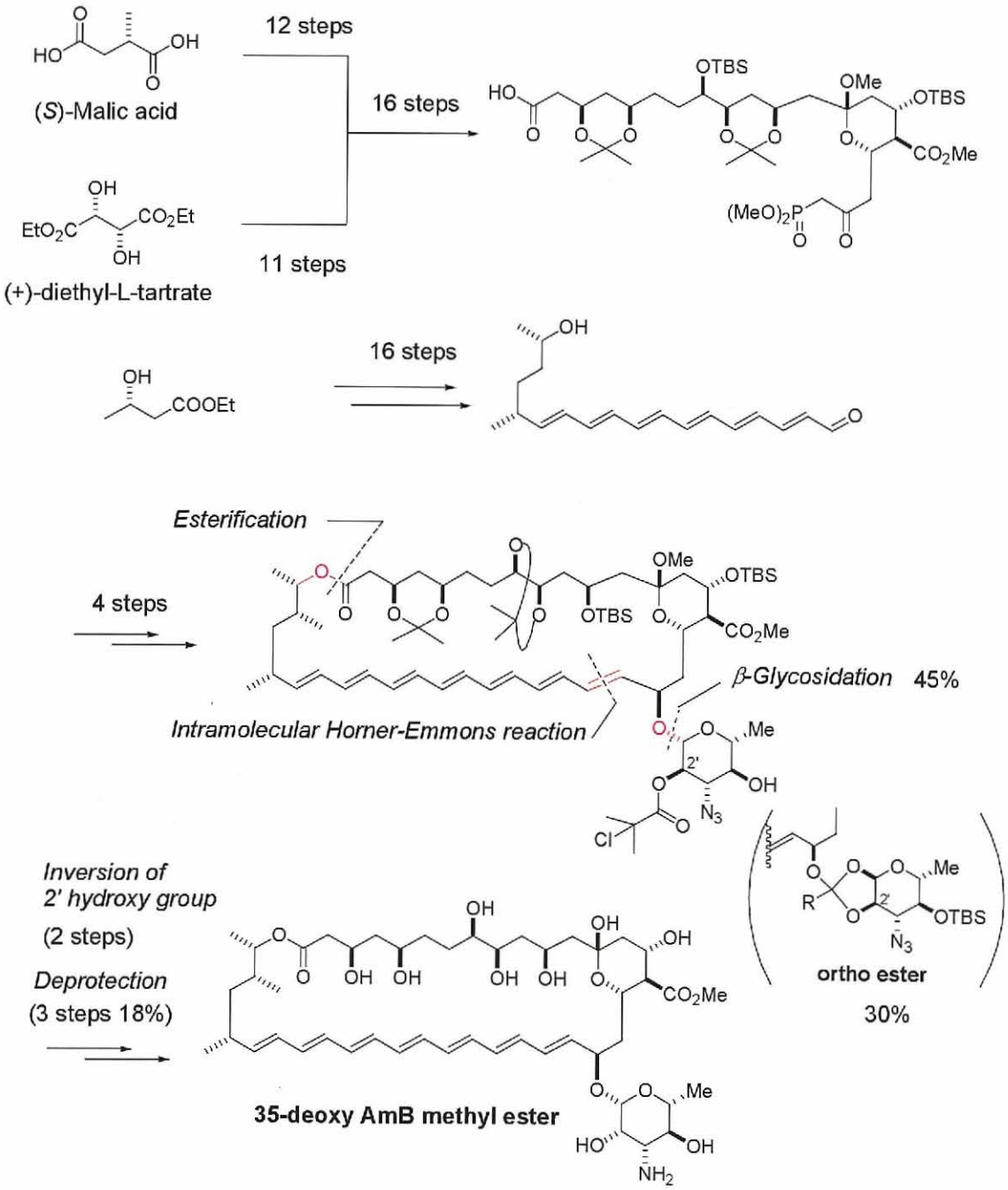


図 1-5-14. 35-デオキシ AmB メチルエステルの合成

このように、一般に構造の複雑なポリエンマクロリドの全合成は多段階を要するため、全合成によって標識化 AmB の供給を行うのは現実的ではない。また、AmB のマクロライド骨格に糖部分を導入するのは非常に困難であり、このようなステップの存在は標識体の効率的合成にとっては致命的である。そこで当研究室では、フッ素標識化 AmB の合成に対して、化学合成と天然物の分解を組み合わせた、実用的で用途の広い合成法を適用した(図 1-5-18)[53]。すなわち、標識化されたポリエン部分は化学合成により調製し、ポリオール部分に相当するセグメントは、入手容易な天然のＡｍＢからオゾン分解、高井オレフィン化を経て誘導した。これらのフラグメントを Stille カップリングにより連結した後、マクロラクトン化、脱保護を行うことで 28-^{19}F 標識化 AmB メチルエステル(28-^{19}F-AME)の効率的な合成に成功している。得られた 28-^{19}F-AME について溶血活性試験および抗カビ活性試験を行った所、AME とほぼ同等の活性を保持していることが確認され、固体 NMR において有用なプローブとなることがわかった[54]。また、得られた 28-^{19}F-AME と [U-^{13}C]AmB について REDOR 測定を行ったところ、[U-^{13}C]AmB のヘプタエン部分に REDOR 減衰が確認され、28 位のフッ素原子と距離が近いことが明らかとなった[54]。

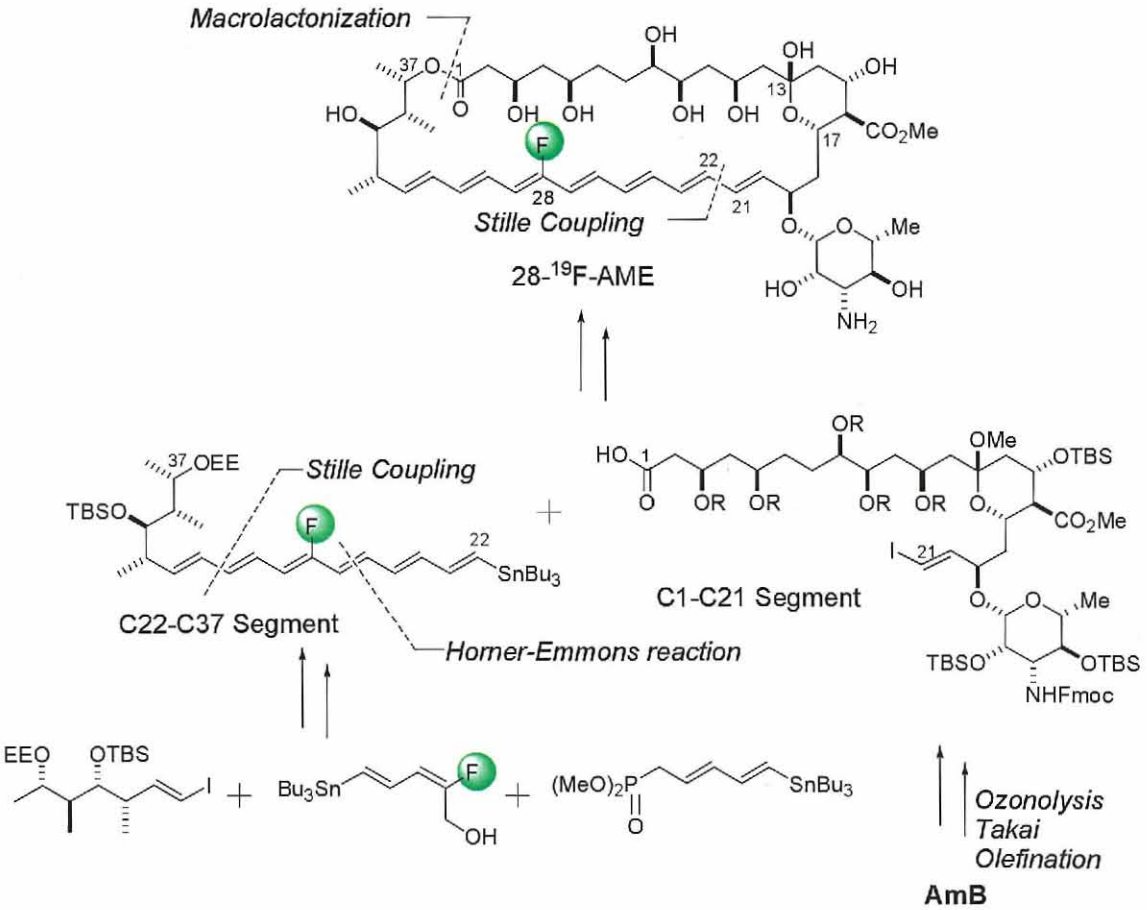
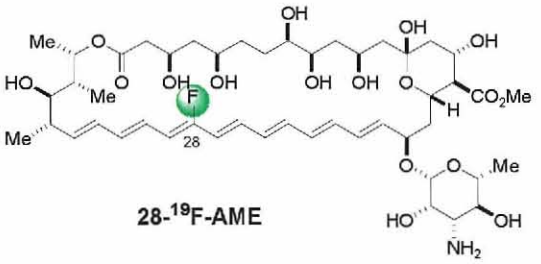


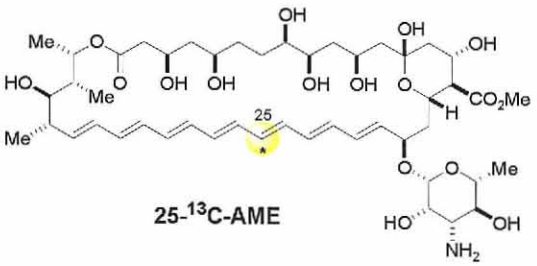
図 1-5-15. 28-^{19}F-AME の合成

1-6. 本研究の目的

前述したようにAmBはステロールと相互作用してイオン透過性チャネルを形成するが、これらの複合体の構造やステロールとの分子認識の詳細については解明されていない部分が多い。特に複合体の構造については、実験的根拠がほとんど得られていない。そこで、この複合体の構造を明らかにするため、脂質膜系の測定に有効である固体NMRを適用することを考え、その中でも10Å程度の長距離間測定が可能である^{13}C{^{19}F}REDORを用いて炭素とフッ素間の距離を見積もることにした。

当研究室では既に、放線菌 *Streptmyces nodosus* の培養により生合成的に調製された[U-^{13}C]AmB と化学合成により得られた 28-^{19}F 標識化 AME に対して^{13}C{^{19}F}REDOR測定を行っており、その結果、AmBのヘプタエン部分とフッ素の間に相関が見られた事から、互いが近い位置に存在するという事が示唆された[54]。しかしながら生合成的な方法により調製した^{13}C標識AmBでは特定の位置を100%標識することは出来ないため^{13}C{^{19}F}REDOR測定を行っても^{13}C-^{19}F間の正確な距離が求められないという問題点がある。この問題を解決するためには化学合成によって^{13}C標識化AmB誘導体を調製する必要がある。化学合成によれば特定の位置が100%標識されたAmB標識体を調製できるので、シグナルの感度が向上するとともに、^{13}C{^{19}F}REDOR測定により^{13}C-^{19}F間の距離を正確に求める事ができる。そこで本研究では、まずAmBのポリエン部分である28位を位置特異的にフッ素標識化した誘導体(28-^{19}F-AME)、また、25位を位置特異的に^{13}C標識化した誘導体(25-^{13}C-AME)の合成を行った(第二章)。次に、得られた標識体を用いてREDOR測定を行い、AmB複合体中のAmB分子同士の分子間相互作用を観測することを検討した(第三章)。この実験では、両者が位置特異的に100%標識化されているため、^{19}F-^{13}C間の正確な距離情報が得られると期待される。





参考文献

1) Hazen, E. L.; Brown, R. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1951**, *76*, 93-97.
2) Sternberg, T. H.; Wright, E. T.; Oura, M. *Antibiotics Ann.* **1956**, *1955-1956*, 566-573.
3) Struyk, A. P.; Hoette, I.; Drost, G.; Waisvisz, J. M.; van Eek, T.; Hoogerheide, J. C. *Antibiotics Ann.* **1958**, *1957-1958,* 878-885.
4) Davisson, J. W.; Tanner, F. W. Jr; Finlay, A. C.; Solomons, I. A. *Antibiot. Chemother.* **1951**, *1*, 289-290.
5) Taber, W. A.; Vining, L. C.; Waksman, S. A., *Antibiot. Chemother.* **1954**, *4*, 455-461.
6) Whitfield, G. B.; Brock, T. D.; Ammann, A.; Gottlieb, D.; Carter, H. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 4799-4801.
7) Yamaguchi, H. *et al.*, *Journal of Infection and Chemotherapy*, **2002**, *50*, 20-29.
8) Douglas, C. M. *et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* **1997**, *41*, 2471-2479.
9) Dupont, B. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, *49, suppl. S1*, 31-36.
10) Szoka, F.C.; Tang, M. *J. Liposome Res.* **1993**, *3*, 363-375.
11) Delay, G. J. Antimicrob. Chemother. **2002**, *49, suppl. S1*, 37-41.
12) Cybulska, B.; Gadomska, I.; Mazerski, J.; Borowski, J. G. E.; Cheron, M.; Bolard, J. *Acta Biochim. Polonica* **2000**, *47*, 121-131.
13) sedlak, M.; Buchta, V.; Kubicova, L.; Simunek, P.; Holcapek, M.; Kasparova, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2833-2835.
14) Hac-Wydro, K.; Dynarowicz-Latka, P.; Grzybowska, J.; Borowski, E. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *287*, 476-484.
15) Paquet, V.; Carreira, E. M. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1807-1809.
16) Sternberg, T. H.; Wright, E. T.; Oura, M. *Antibiot. Annu.*, **1956**, 566; Steinberg, B. A.; Jambar, W. P.; Suydam, L. O. *Antibiot. Annu.*, **1956**, 574; Gold, W.; Stout, H. A. ; Pagano, J. F.; Donovick, R. *Antibiot. Annu.*, **1956**, 579; Vandeputte, J.; Wachtel, J. L.; Stiller, E. T. *Antibiot. Annu.*, **1956**, 587.
17) Ganis, P.; Avitabile, G.; Mechlinski, W.; Shaffner, C. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4560-4564.
18) Kruijff, B.D.; Demel, R.A. *Biochem. Biophys. Acta.* **1974**, *339*, 57.
19) Cass, A.; Finkelstein, A.; Krespi, V. *J. Gen. Physiol.* **1970**, *56*, 100-124.
20) Archer, D. B.; Gale, E. F. *J. Gen. Microbiol.* **1975**, *90*, 187.
21) Readio, J. D.; Bittman, R. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *685*, 219-224.
22) Dufourc, E. J.; Smith, I. C. P. *Biochemistry* **1985**, *24*, 2420-2424.

23) Dufourc, E. J.; Smith, I. J. P.; Jarrell, H. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *776*, 317-329.
24) Baginski, M.; Resat, H.; McCammon, J. A. *Molecular Pharmacol.* **1997**, *52*, 560-570.
25) HsuChen, C C.; Feingold, D. S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, *51*, 972-978.
26) Van Hoogevest, P.; De kruijff, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *511*, 397-407.
27) Milhaud, J.; Hartmann, M.; Bolard, J. *Biochimie* **1989**, *71*, 49-56.
28) Whyte, B. S.; Peterson, R. P.; Hartsel, S. C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *164*, 609-614.
29) Hartsel, S. C.; Benz, S. K.; Peterson, R. P.; Whyte, B. S. *Biochemistry* **1991**, *30*, 77-82.
30) Cohen, B. E. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1108*, 49-58.
31) Wolf, B. D.; Hartsel, S. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1238*, 156-162.
32) Cohen, B. E. *Int. J. Pharm.* **1998**, *162*, 95-106.
33) Ruckwardt, T.; Scott, A.; Scott, J.; Mikulecky, P; Hartsel, S. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1372*, 283-288.
34) Cotero, B. V.; Rebolledo-Antunez, S.; Ortega-Blake, I. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1375*, 43-51.
35) Clejan, S.; Bittman, R. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 2884-2889.
36) Gullion, T.; Schaefer, J. *Adv. Magn. Reson.* **1989**, *13*, 55.
37) Holl, S. M.; Marshall, G. R.; Schaefer, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4830-4833.
38) Ulrich, A. S. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2005**, 46, 1-21.
39) 安藤喬志, 宗宮創, これならわかる NMR, **1997**
40) Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, *93*, 2325-2327.
41) Schiff, P. B.; Fant, J.; and Horwitz, S. B. *Nature*, **1979**, *277*, 665-667.
42) Li, Y.; Poliks, B.; Cegelski, L.; Poliks, M.; Gryczynski, Z.; Piszczek, G.; Jagtap, P.G.; Studelska, D.R.; Kingston, D.G.I.; Schaefer, J.; Bane, S. *Biochemistry,* **2000**, *39*, 281.
43) (a) Matsuoka, S.; Murata, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1617*, 109-115; (b) Matsuoka, S.; Matsumori, N.; Murata, M. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3882-3884; (c) Matsuoka, S.; Ikeuchi, H.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biochemistry* **2005**, *44*, 704-710.
44) (a) Matsumori, N.; Eiraku, N.; Matsuoka, S.; Oishi, T.; Murata, M.; Aoki, T.; Ide, T. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 673-679; (b) Matsuoka, S.; Murata, M. *Biochim. Biophys.*

Acta **2002**, *1564*, 429-434; (c) Matsumori, N.; Sawada, Y.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10667-10675.

45) (a) Matsumori, N.; Yamaji, N.; Matsuoka, S.; Oishi, T.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4180-4181; (b) Yamaji, N.; Matsumori, N.; Matsuoka, S.; Oishi, T.; Murata, M. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2087-2089; (c) Matsumori, N.; Masuda, R.; Murata, M. *Chem. Biodiversity* **2004**, *1*, 346-352; (d) Umegawa, Y.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *Tetrahedron Letters*, **2007**, *48*, 3393-3396.

46) McNamara, C. M.; Box, S.; Crawforth, J. M.; Hickman, B. S.; Norwood, T. J.; Rawlings, B. J. *J.Chem.Soc., Perkin Trans 1* **1998**, 83-87.

47) Matsuoka, S.; Ikeuchi, H.; Umegawa, U.; Matsumori, N.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6608–6614.

48) Matsumori, N.; Umegawa, Y.; Oishi, T.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3565–3567.

49) Kasai, Y.; Matsumori, N.; Umegawa, Y.; Matsuoka, S.; Ueno, H.; Ikeuchi, H.; Oishi, T.; Murata, M. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1178-1185.

50) Metha, A. K.; Schaefer, J. *J. Magn. Reson.* **2003,** *163,* 188-191.

51) Total synthesis of AmB, see: (a) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Chakraborty, T. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2208-2210; (b) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Chakraborty, T. K.; Ogawa, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2821-2822; (c) Nicolaou, K. C.; Chakraborty, T. K.; Ogawa, Y.; Daines, R. A.; Simpkins, N. S.; Furst, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4660-4672; (d) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Uenishi, J.; Li, W. S.; Papahatjis, D. P.; Chakraborty, T. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4672-4685; (e) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Chakraborty, T. K.; Ogawa, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4685-4696; (f) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Ogawa, Y.; Chakraborty, T. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4696-4705.

52) (a) Szpilman, A. M.; Cereghetti, D. M.; Wurtz, N. R.; Manthorpe, J. M.; Carreira, E. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4335-4338; (b) Szpilman, A. M.; Manthorpe, J. M.; Carreira, E. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4339-4342.

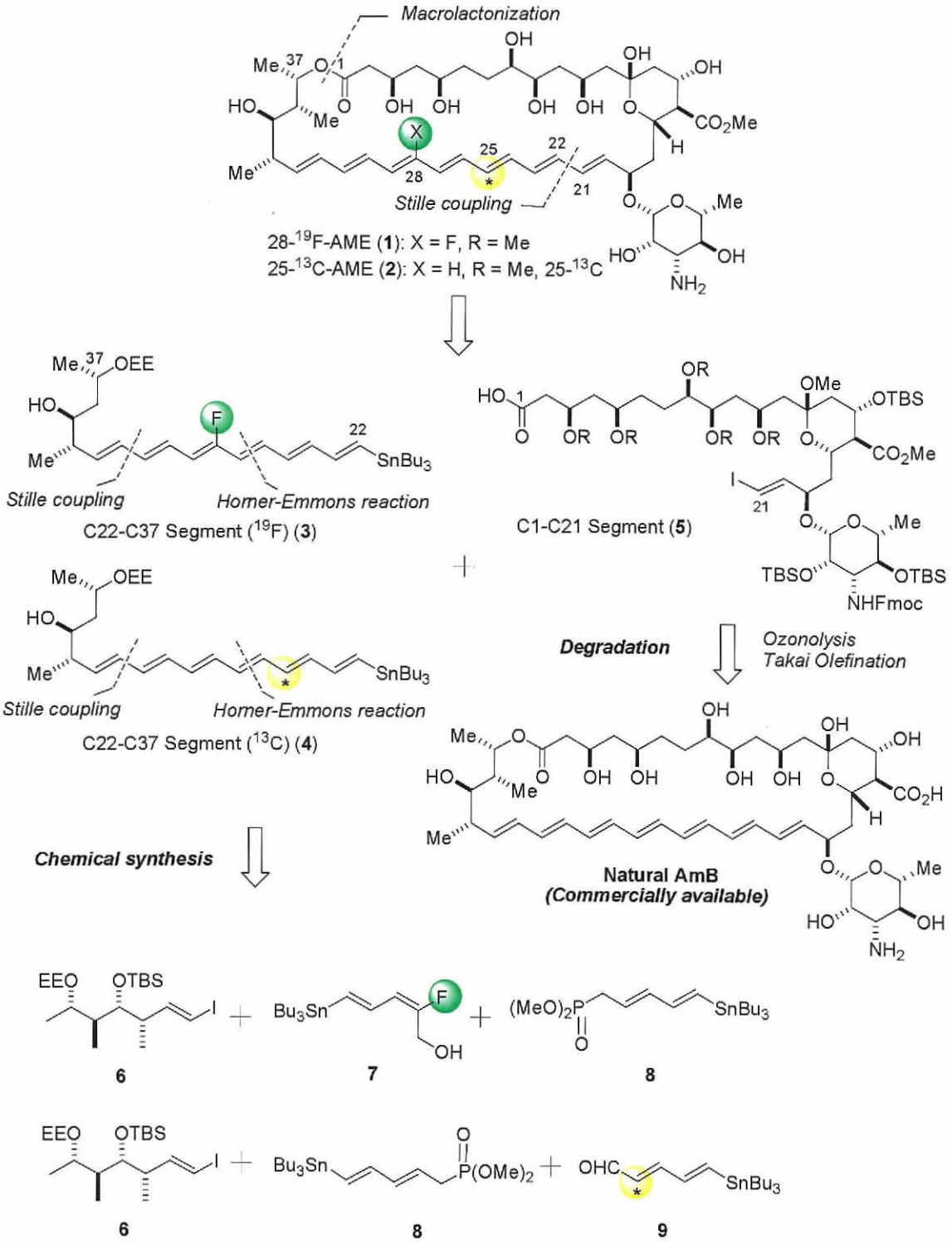
53) Tsuchikawa, H.; Matsushita, N.; Matsumori, N.; Murata M. and Oishi, T. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47,* 6187-6191.

54) 土川　博史　大阪大学理学研究科化学専攻　2006 年度博士論文

第二章　28-^{19}F-AME および 25-^{13}C-AME の合成

2-1. 合成計画

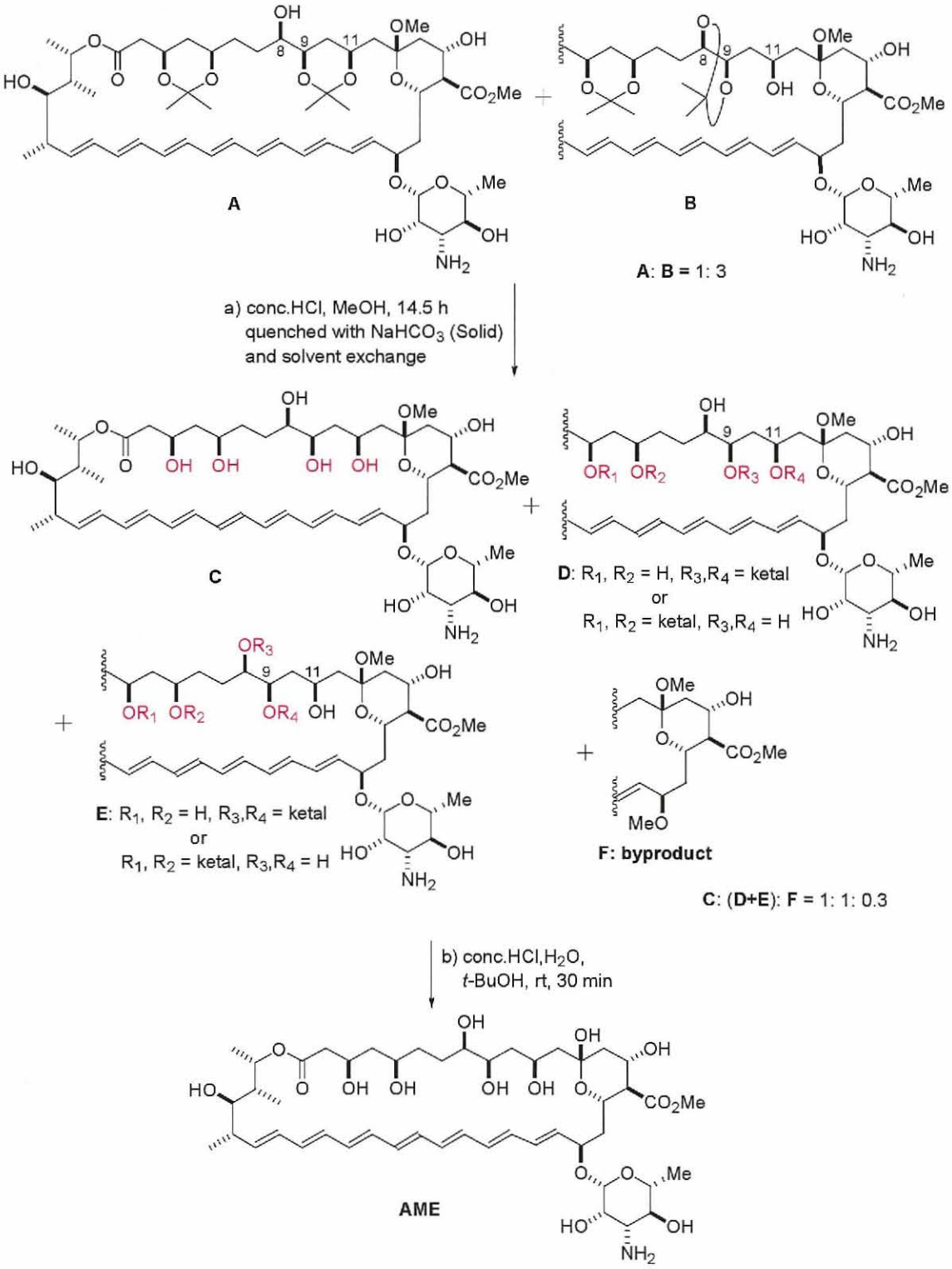
当研究室では、すでに天然物の分解と化学合成を組み合わせた標識化 AME 誘導体の実践的な合成経路の確立に成功しているので、それに従い合成計画を立てた(スキーム 2-1)[1)]。28-^{19}F-AME および 25-^{13}C-AME を合成する際の共通中間体として、ポリオール部分に相当する C1-C21 セグメント **5** を設定し、これを入手容易な天然の AmB からオゾン分解、高井オレフィン化を経て誘導することにした。一方、標識化されたオレフィン部分である C22-C37 セグメント **3** および **4** は化学合成により調製することにした。すなわち、^{19}F-標識体 **3** については、フラグメント **6**、**7**、および **8** を、^{13}C 標識体 **4** についてはフラグメント **6**、**8**、および **9** をそれぞれ Stille カップリングおよび Horner-Emmons 反応によって連結する計画である。その後、C22-C37 セグメント **3** および **4** と C1-C21 セグメント **5** を Stille カップリングにより連結し、マクロラクトン化を行うことで ^{19}F および ^{13}C 標識体をそれぞれ合成することにした。



スキーム 2-1. 標識化 AME の合成計画

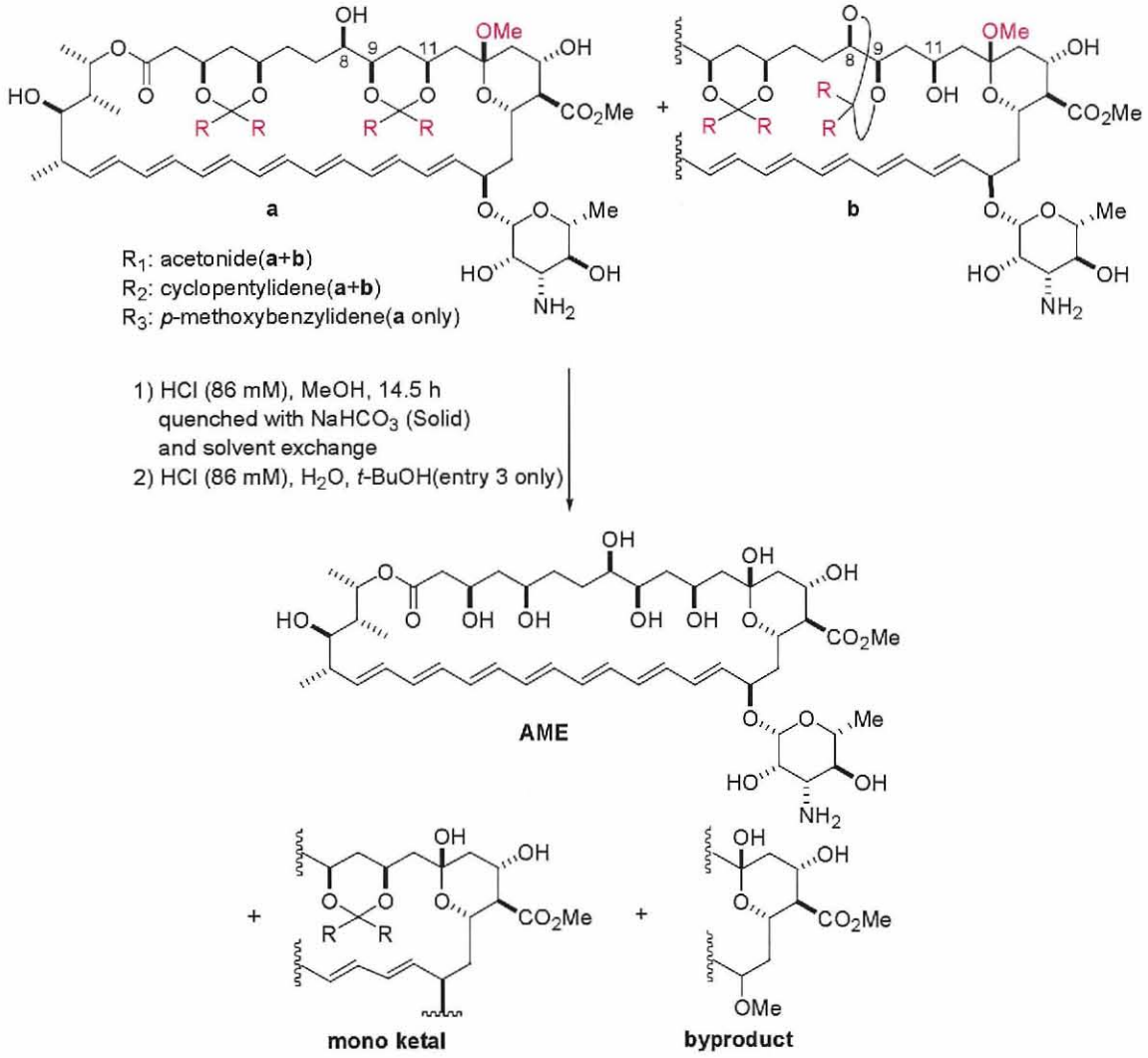
2-2. 保護基の検討

合成経路はすでに確立されているが、最終段階であるケタールの除去、中でもアセトニドの除去に問題が残されていた(スキーム 2-2-a)。天然の AmB から得られたアセトニドは、9、11 位アセトニドである **A** と 8、9 位アセトニドである **B** の混合物であり、この混合物に対して酸加水分解を行ったところ、目的物 **C**:モノアセトニド **D**、**E**:糖脱離体 **F** が 1:1:0.3 の比率で得られた。すなわち、AmB は酸に対して不安定であるため、アセトニドを酸性条件下で除去する際、反応時間を長くすると目的物 **C** の他に、糖部分が脱離した副生成物 **F** が生成すること、また、分解を抑えるために反応時間を短くするとモノアセトニド **D**、**E** が残るため目的物の収率が低下することが問題となっていた。



スキーム 2-2-a. 合成上の問題点

そこで、当研究室の土川らによって保護基の検討が行なわれた(スキーム 2-2-b、表 2-1-エントリー1、2)[2]。エントリー1 ではジオールの保護基としてアセトニドを用い(9、11 位アセトニド **a** および 8、9 位アセトニド **b** の 1:3 の混合物)、この混合物に対して酸加水分解を行ったところ、目的物である AME、モノケタール体、糖脱離体が混合物として 52%の収率で得られた。HPLC により AME:モノケタール体:糖脱離体の比率が 57:29:14 であり、モノケタール体と糖脱離体の比率がかなり高く、目的物の収率は満足するものではなかった。エントリー2 ではジオールの保護基としてシクロペンチリデンを用い(9、11 位ケタール **a** および 8、9 位ケタール **b** の 1:1 の混合物)、先程と同様の条件で酸加水分解を行ったところ、目的物である AME、モノケタール体、糖脱離体が混合物として 53%の収率で得られた。HPLC により AME:モノケタール体:糖脱離体の比率が 72:14:14 であり、アセトニドの場合と比較すると、モノケタール体の比率が減り、その分目的物の比率が向上していた。これは、シクロペンチリデンケタールの方がアセトニドよりも容易に酸加水分解されたためと解釈できる。そこで、今回新たな保護基として、シクロペンチリデンよりも容易に酸加水分解できる *p*-メトキシベンジリデンをジオールの保護基として用いた(エントリー3)。ジオールを *p*-メトキシベンジリデンで保護した場合、9、11 位が *p*-メトキシベンジリデン保護された **a** が単一物として得られ、8、9 位が *p*-メトキシベンジリデンで保護された **b** は得られないことが NMR による構造決定により明らかとなった。この化合物に対して酸加水分解を行ったところ、目的物である AME、モノケタール体、糖脱離体が混合物として 69%の収率で得られ、AME:モノケタール体:糖脱離体が 90:5:5 となり収率、目的物の比率とも大幅に改善された。よってジオールの保護基として *p*-メトキシベンジリデンを用いることにした。



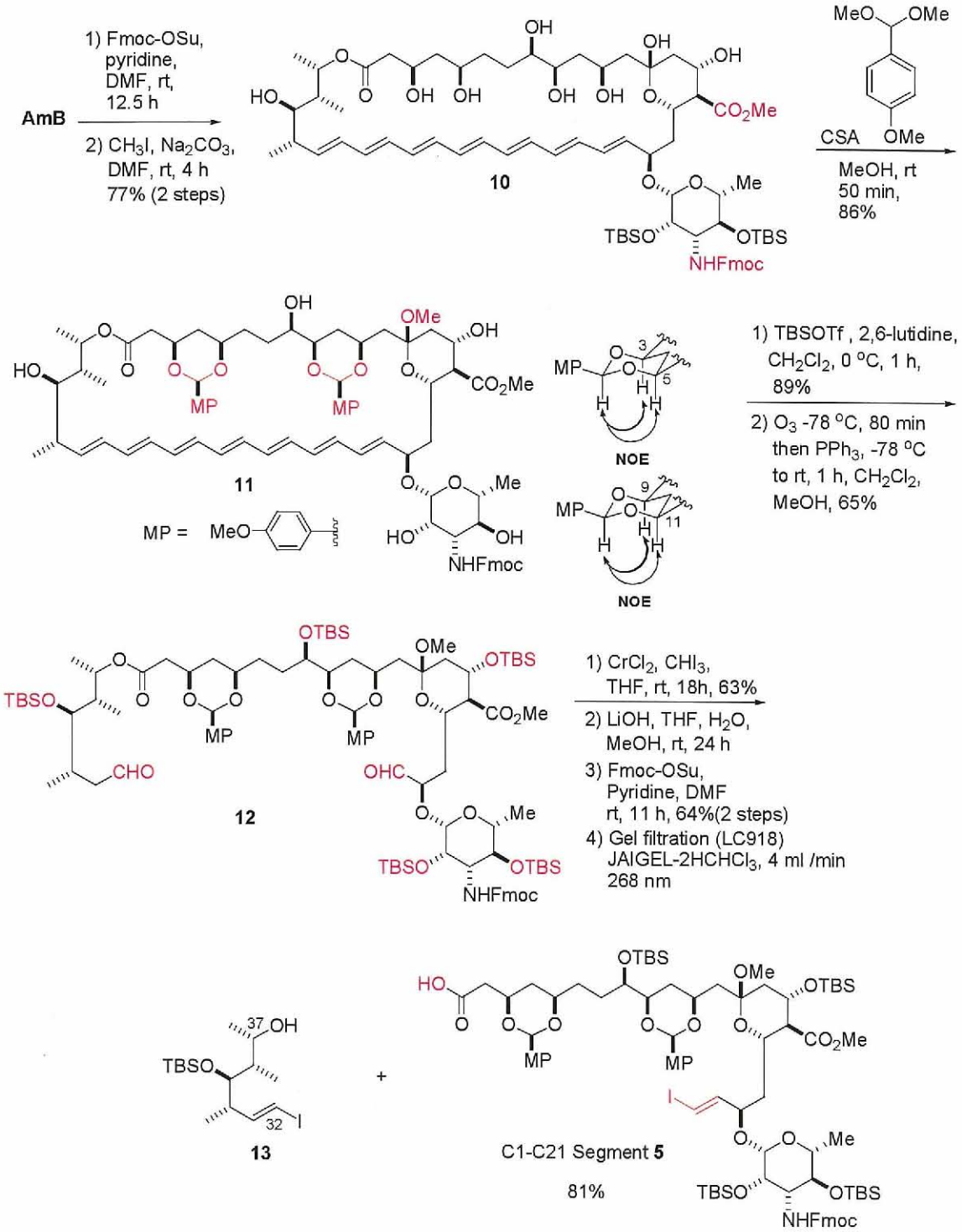
スキーム 2-2-b. 保護基の検討

表 2-1. 保護基の検討結果

entry	substrate	time / h	yield/ %	ratio				
				AME	**: monoketal**		**: byproduct**	
1	**R_1 ab**	11.2	52	57	:	29	:	14
2	**R_2 ab**	16	53	72	:	14	:	14
3	**R_3 a**	8	69	90	:	5	:	5

2-3. C1-C21 セグメントの合成

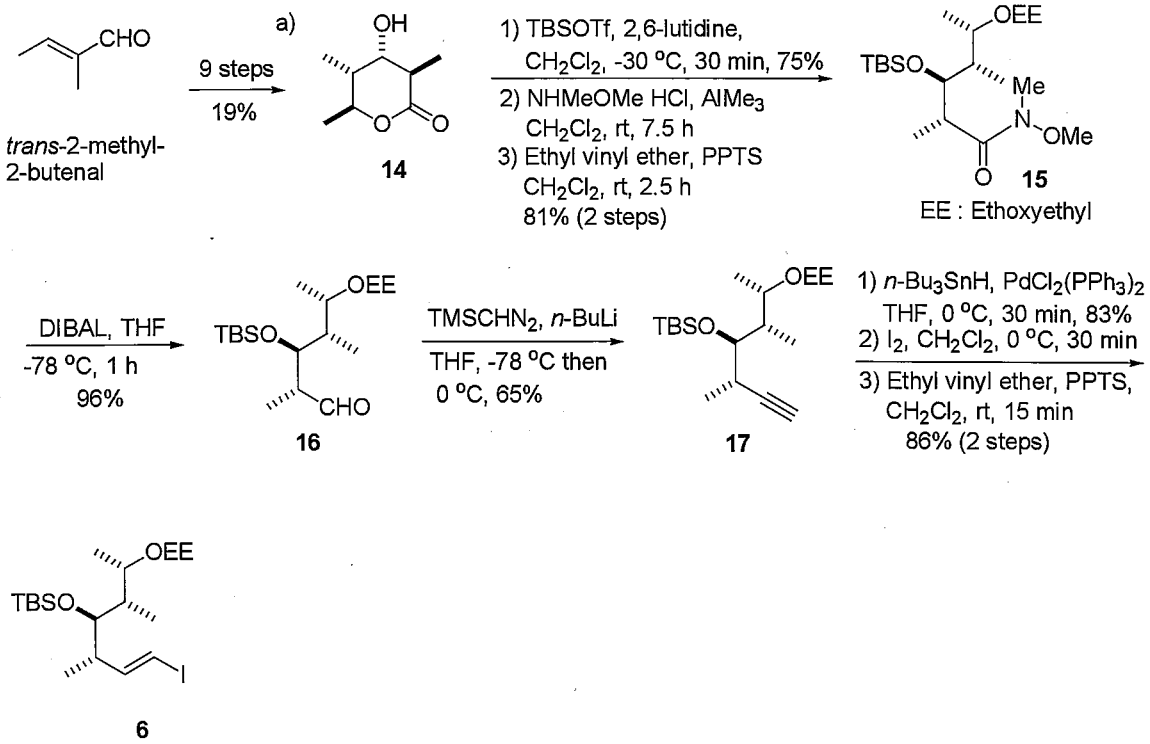
天然物から C1-C21 セグメントの調製を行った（スキーム 2-3）。ジオールの保護基としては先程の条件検討の結果を踏まえて *p*-メトキシベンジリデンを用いることにした。出発原料の AmB のアミノ基を Fmoc 基で保護し、カルボン酸をメチルエステル化して化合物 **10** を 2 段階 77%の収率で得た [3)]。続いて酸触媒下、メタノールと *p*-メトキシベンズアルデヒドジメチルアセタールを作用させ、1,3-ジオールの *p*-メトキシベンジリデンアセタール保護と 13 位のメチルケタール化を行ったところ、6 員環アセタール **11** が 86%の収率で単一の生成物として得られた。なお、NOE 実験により、*p*-メトキシフェニル基の立体がβ配向であることを確認した。残るヒドロキシ基を TBS 基で保護し、さらにヘプタエン部分を徹底的にオゾン分解し、ジアルデヒド **12** へと変換した [4)]。続いてジアルデヒドに対し、塩化クロムとヨードホルムを作用させて高井オレフィン化 [5)]を行ったところ、63%の収率でトランスのビス-(ヨードオレフィン)を得た。さらに水酸化リチウムで 1 位のエステルを選択的に加水分解したが、同時に Fmoc 基が除去されてしまったため、再びアミノ基を Fmoc で保護し、C1-C21 セグメント **5** へと変換した。C32-C37 部分に相当するアルコール **13** と **5** のシリカゲルカラムでの分離が困難であったため、最終的にゲルろ過により精製し、目的とする C1-C21 セグメント **5** を単離した。



スキーム 2-3. C1-C21 セグメントの合成

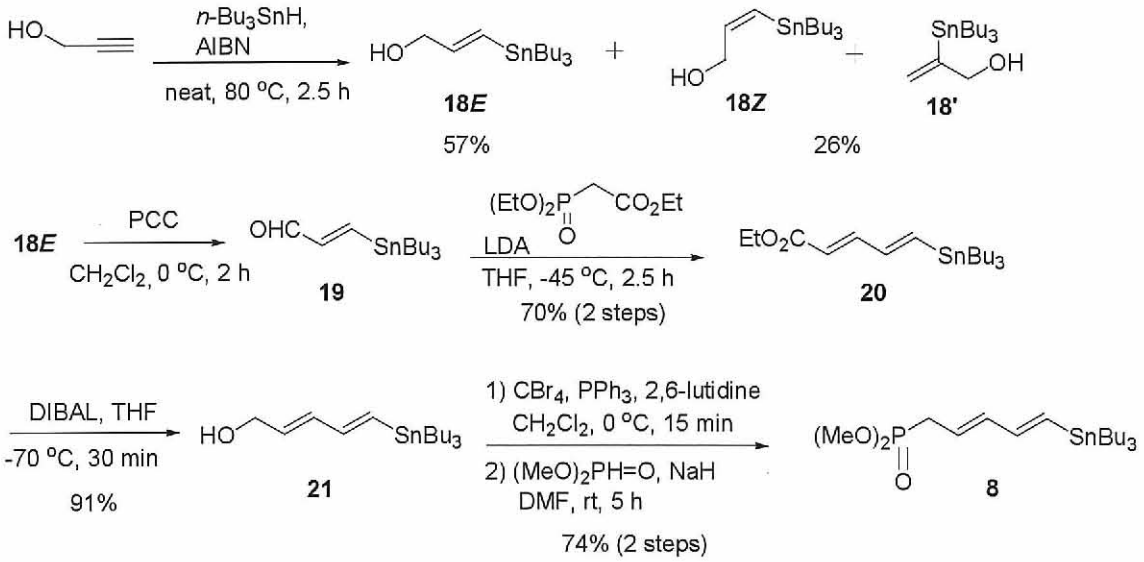
2-4. C22-C37 セグメントの合成

次にフッ素原子を含む C22-C37 セグメント **2** の合成を検討した。まずヨードオレフィン **6** の合成を行った（スキーム 2-4）。Carreira の報告に従い、市販のトランス-2-メチル-2-ブテナールから 9 段階、19%の収率でラクトン **14** を合成し[6]、ヒドロキシ基の TBS 化、さらにラクトンの開環により Weinreb アミド[7]へと変換後、生じたヒドロキシ基を EE 基で保護してアミド **15** を得た。続いて DIBAL 還元を行いアルデヒド **16** へと変換後、TMS ジアゾメタン[8]とブチルリチウムを作用させてアセチレン **17** を得た。さらにハイドロスタネーション[9]、ヨウ素化を行ったところ EE 基が外れてしまったが、再び保護することで目的とするヨードオレフィン **6** を二段階 86%と良好な収率で得ることに成功した。

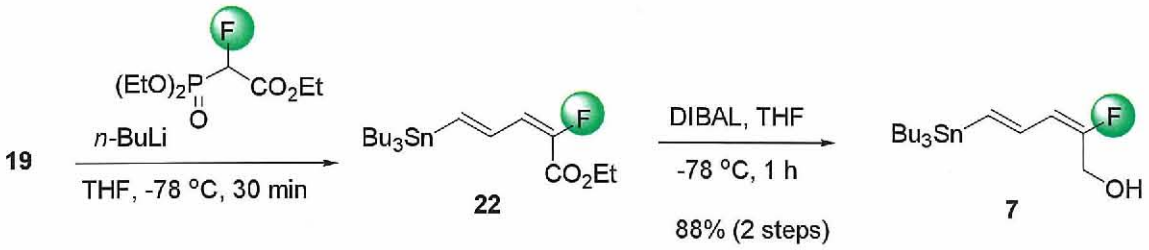


スキーム 2-4. ヨードオレフィン **6** の合成

続いてホスホン酸エステル **8** の合成を行った（スキーム 2-5）。Paquette らの報告[10]に従い、プロパルギルアルコールから 3 段階でスタナン **20** を合成し、エステルを DIBAL で還元してアルコール **21** を得た。アルコール **21** のブロモ化を四臭化炭素、トリフェニルホスフィンを用いて行ったが、この際、系の酸性化を防ぐためにルチジンを共存させたところ目的とするブロモ体が問題なく得られた。この化合物は非常に不安定でかつ揮発性であったので分液操作後、溶媒を留去し、ただちに次の反応に用いた。DMF 中、亜リン酸ジメチルと水素化ナトリウムで処理することで、ホスホン酸エステル **8** を 2 段階 74%の収率で得た。一方、フッ素標識化ビニルスズ **7** については 品田らの報告[11]に従い、アルデヒド **19** に対して、フルオロホスホン酸エステルを作用させることでフッ素が導入された *E*-ヨードオレフィン **22** を選択的に得ることができた(スキーム 2-6)。さらにエステルを DIBAL で還元してアルコール **7** へと導いた。

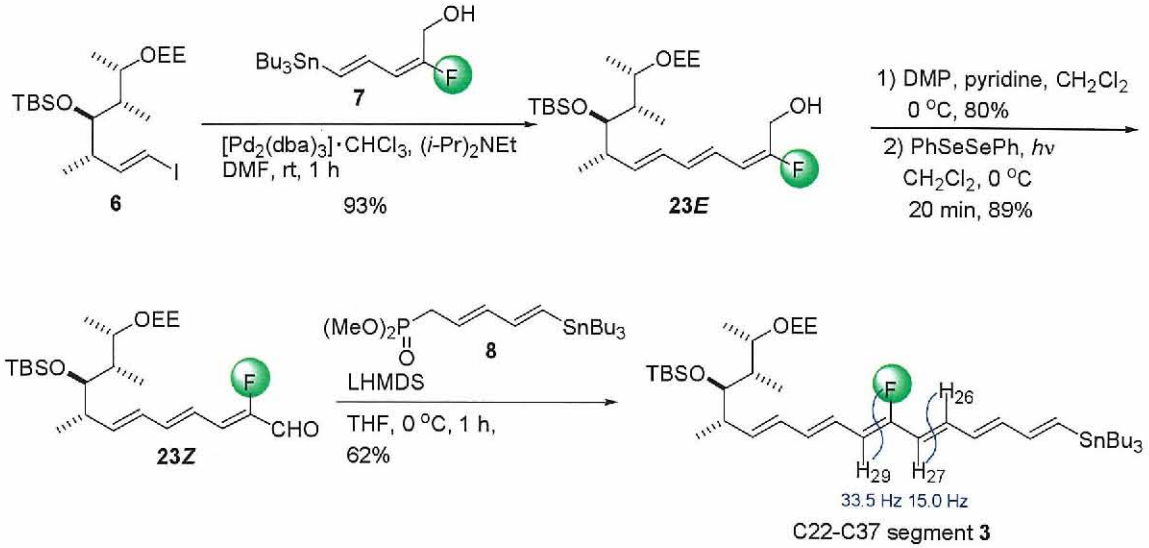


スキーム 2-5. ホスホン酸エステル **8** の合成



スキーム 2-6. フッ素標識化アルコール **7** の合成

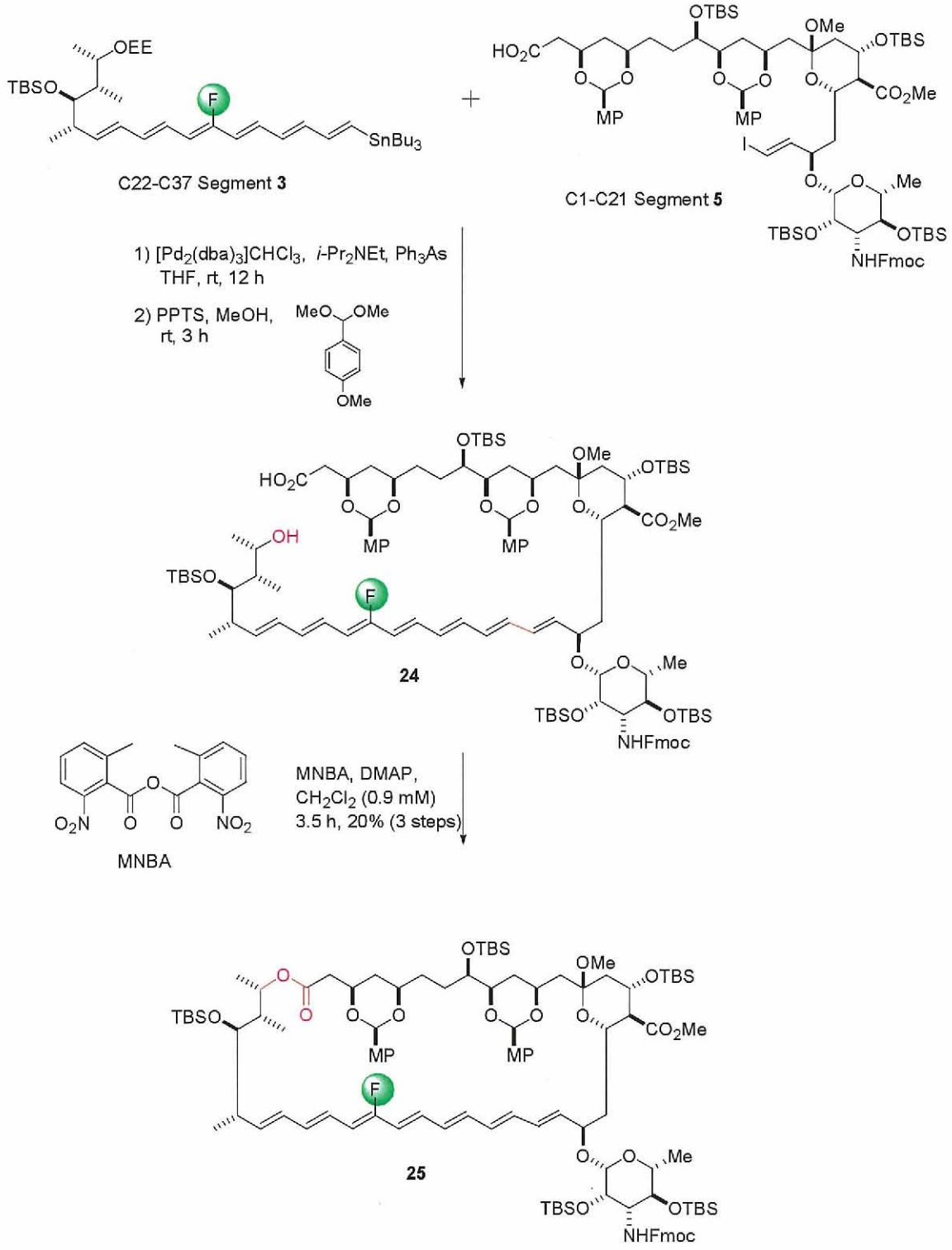
合成したフラグメントを用いてフッ素標識化 C22-C37 セグメント **3** を合成した（スキーム 2-7）。まず、ヨードオレフィン **6** とビニルスズ **7** の Stille カップリングを行ったところ、反応は速やかに進行し、アルコール **23** *E* を 93%の収率で単一生成物として与えた。その後、Dess-Martin 酸化[12]を行いアルデヒドへと変換後、光照射条件下、ジフェニルジセレニドを用いてオレフィンを異性化させることで、目的のオールトランスの立体を有する **23** *Z* を単一の生成物として得た[13]。この異性化の際、光照射により温度が上昇すると、EE 基が外れてしまう副反応が起こるので、系中の温度が上がらないよう注意して反応を行った。アルデヒド **23** *Z* に対し、ホスホン酸エステル **8** から LHMDS により発生させたアニオンを反応させたところ、62%の収率で目的のセグメント **2** が単一の異性体として得られた。この 27 位および 29 位部分の立体配置については、プロトンの結合定数よりトランスであることを確認した。また、**2** は酸に不安定であり、シリカゲルカラムで精製すると、一部スズが脱離して末端オレフィンとなってしまった。そのため、**2** の精製はフロリジルカラムおよび 1 %トリエチルアミンを含んだ溶出液を用いて行った。



スキーム 2-7. C22-C37 セグメント **3** の合成

2-5. セグメントのカップリング

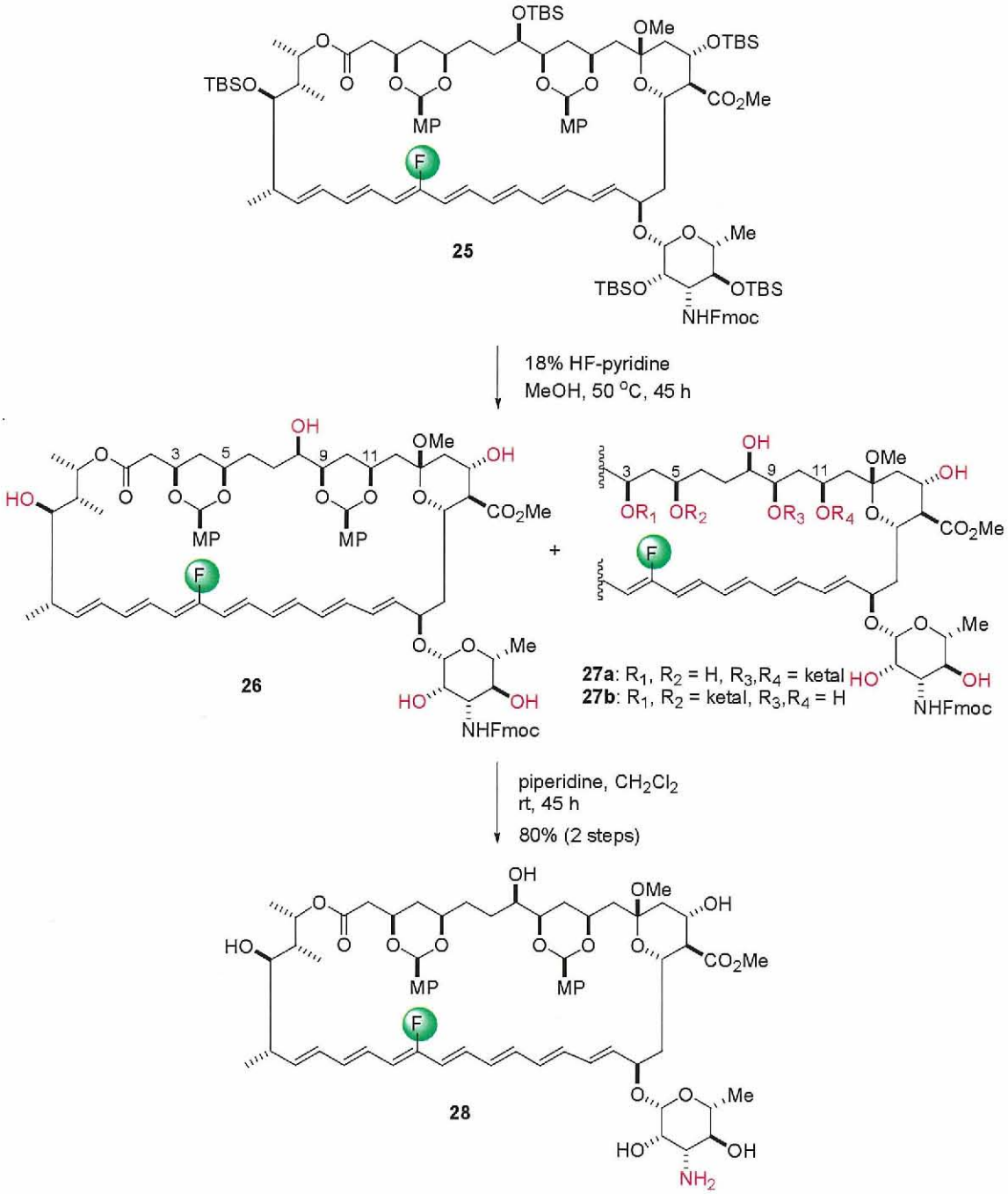
セグメント **3**、**5** の合成が完了したので、続いて両セグメントの連結を行った（スキーム 2-7）。THF 溶媒中、C1-C21 セグメント **5** に対して C22-C37 セグメント **3** を 1.2 当量用い、触媒としてトリスジベンジリデンアセトンジパラジウム、塩基としてジイソプロピルエチルアミン、配位子としてトリフェニルヒ素を共存させ、Stille カップリング [1)14)]を行ったところ、反応は速やかに進行し、目的とするカップリング体が得られた。生成物は C1-C21 セグメント **5** との分離困難な混合物であったため、分離せずに次の反応を行った。メタノール中、*p*-メトキシベンズアルデヒドジメチルアセタール共存下、PPTS で処理することで EE 基を選択的に除去し、セコ酸 **24** を得た。続いてマクロラクトン化を行った。椎名らの条件 [15)]、すなわち、ジクロロメタン中、DMAP と 2-メチル-6-ニトロ安息香酸無水物(MNBA)を作用させた所、環化は速やかに進行し、目的のマクロラクトン体 **25** を三段階 20%の収率で合成する事に成功した。



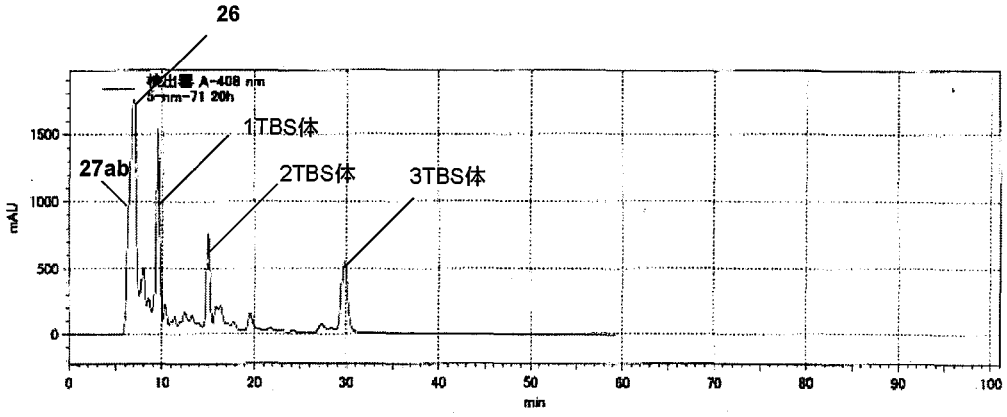
スキーム 2-8. セグメントの連結およびマクロラクトン化

2-6. 脱保護

マクロラクトン体が得られたので続いてTBS基の除去を行った(スキーム2-9)。条件としては、18%のHF-ピリジンを用いて行った[1)]。HPLCによる反応の経時変化を図2-1に示した。反応開始20時間を越えた辺りから目的物よりも高極性側に新たなピークが見られていた(図2-1-a、b)。分取してMSを測定してみたところ、MPアセタールが一つ除去された化合物**27**であることが判明した。尚、3,5位のアセタールが除去された**27a**であるのか、9,11位のアセタールが除去された**27b**であるのかは不明である。高極性側のピークが分解物では無かったため、モノTBS体由来のピークがほぼ消失するまで攪拌を続けることにし(図2-1-c)、45時間攪拌した結果、目的物である化合物**26**と化合物**27ab**が混合物として得られた。得られた化合物**26**と化合物**27ab**の混合物に対してピペリジンを作用させることでFmoc基の除去を行い化合物**28**を得た。



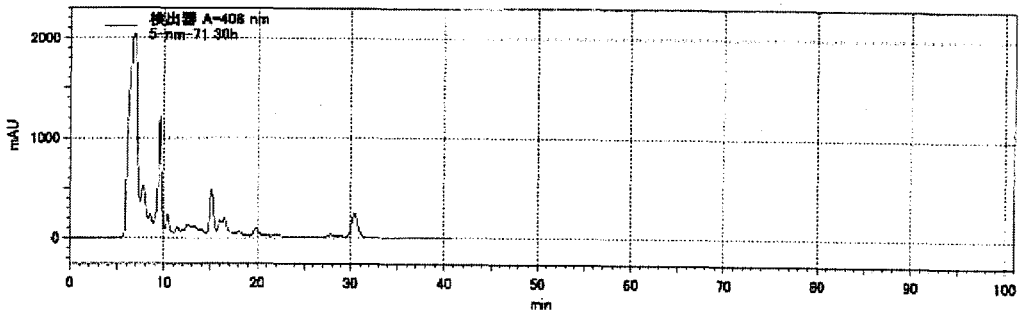
スキーム 2-9. TBS 基および Fmoc 基の除去



Q:¥matsushita¥5-nm-71¥5-nm-71 20h, 検出器 A-408 nm

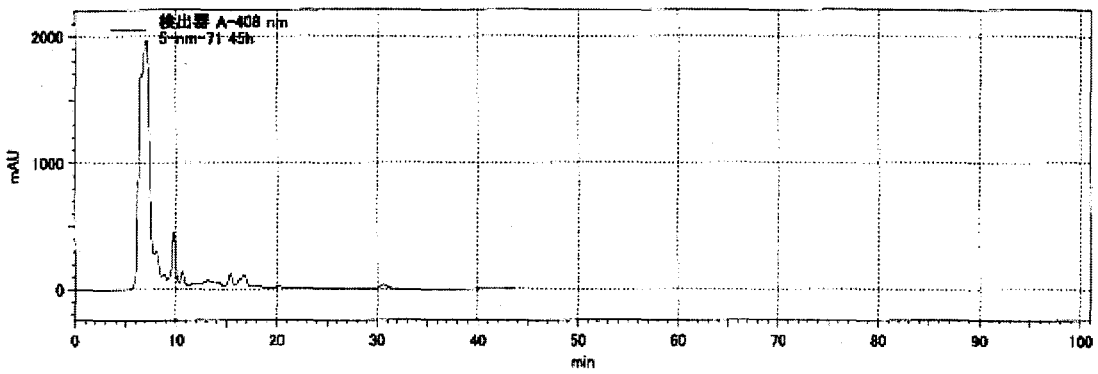
Conditions, column: 5C_{18}-ARII (10x250 mm), eluent: 100% MeOH, Flow rate: 1.0 ml /min, detection: λ = 408 nm

図 2-1-a. TBS 基除去 20 時間後の HPLC クロマトグラム



Q:¥matsushita¥5-nm-71¥5-nm-71 30h, 検出器 A-408 nm

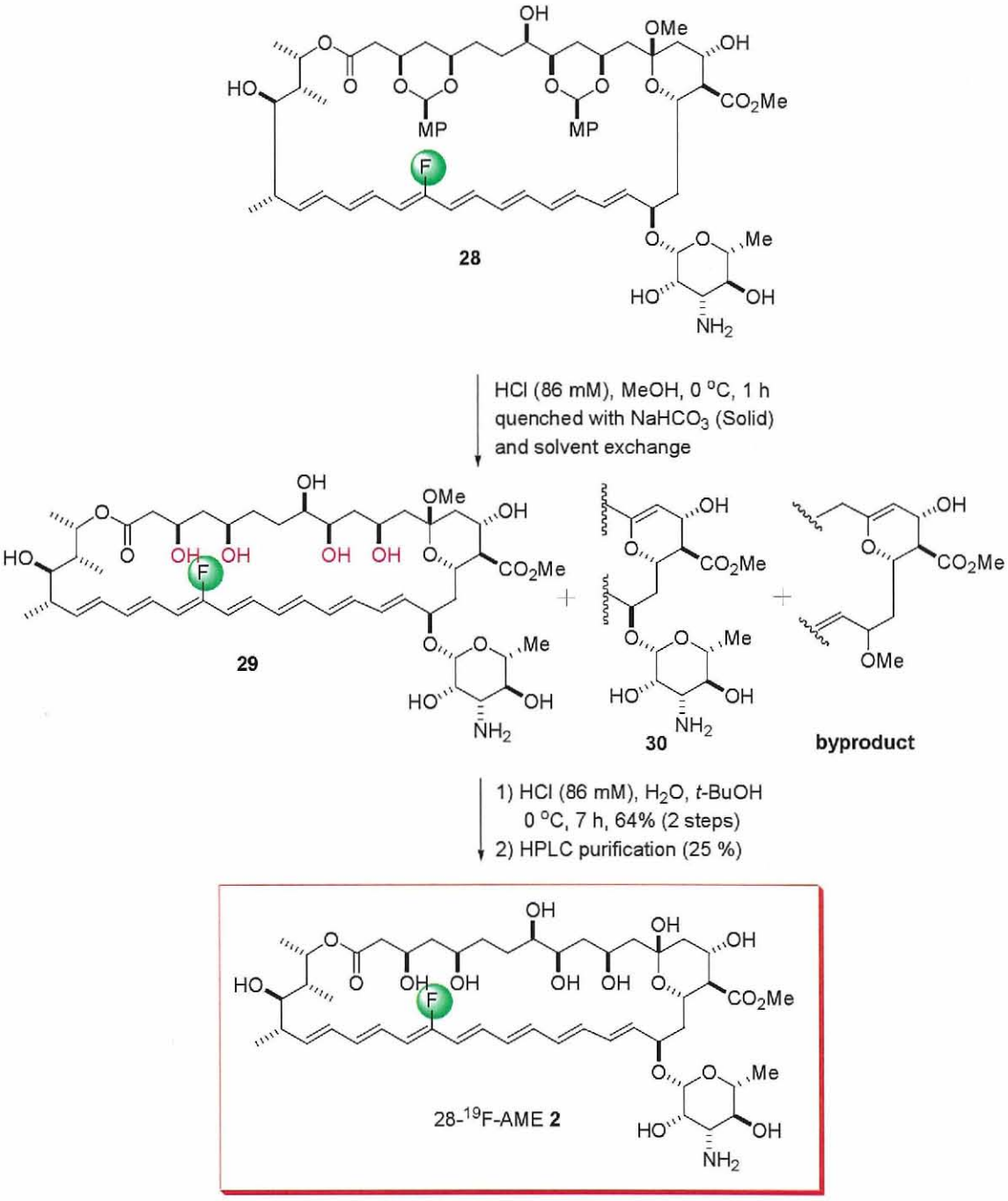
図 2-1-b. TBS 基除去 30 時間後の HPLC クロマトグラム



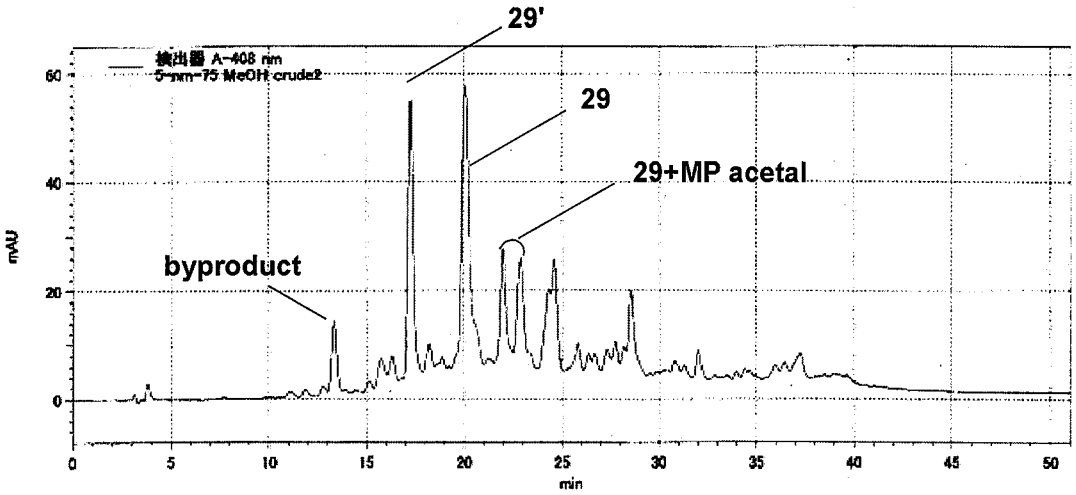
Q:¥matsushita¥5-nm-71¥5-nm-71 45h, 検出器 A-408 nm

図 2-1-c. TBS 基除去 45 時間後の HPLC クロマトグラム

最後に*p*-メトキシベンジリデンアセタールとメチルケタールの除去を行った（スキーム 2-10）。前述したように、AmB は酸に対して不安定であるため、注意深く反応を追跡する必要がある。そのため、反応の追跡には HPLC を用いることにした。まず、MeOH 中、0℃で塩酸を作用させ*p*-メトキシベンジリデンアセタールの除去を行った。反応を HPLC で追跡したところ(図 2-2-a)、複雑な混合物となっていた。それぞれのピークを分取し、MS を測定したところ、Rt = 20 min のピークが目的物である化合物 **29** であり、Rt = 17 min のピークは目的物のメチルケタール部位がグリカールになった化合物 **30** であること、Rt = 22-23 min 付近のピークは MP アセタールが一つ残っているもの、Rt = 12 min のピークは糖部分が脱離した副生成物のピークであることがわかった。続いて炭酸水素ナトリウムで反応を停止後、溶媒を水、*t*-BuOH に変えて再び塩酸で 7 時間処理すると、メチルケタールの加水分解とグリカール **30** の水和反応が同時に進行し、HPLC において目的物である 28-^{19}F-AME **2** がメインピークとして確認された(図 2-2-b)。まだグリカール **30** が残っていたが、反応時間を延ばすと糖脱離体の割合も増えていくことが考えられたため、この段階で反応を止め、ODS のオープンカラムで脱塩後(crude 64%)、HPLC 精製を行った。その結果、目的とする 28-^{19}F-AME **2** を 25%の収率で得ることに成功した。

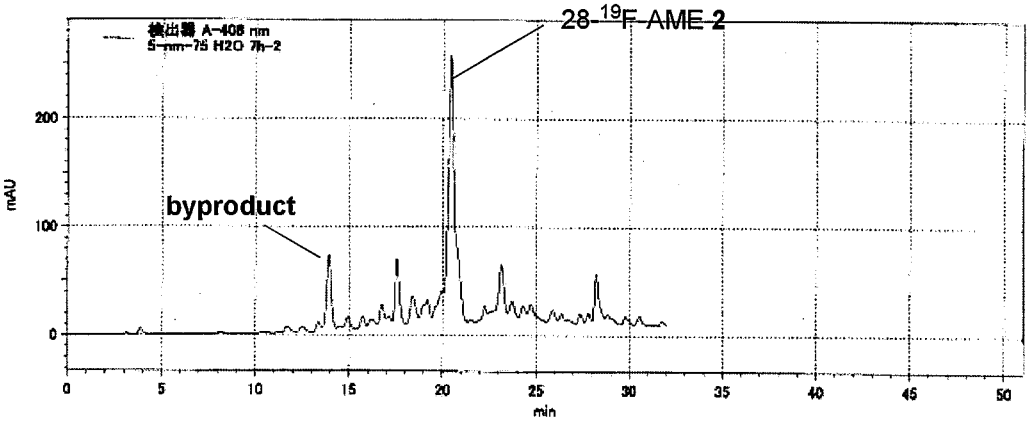


スキーム 2-10. *p*-メトキシベンジリデンアセタールおよびメチルケタールの除去



Conditions, column: $5C_{18}$-ARII (10x250 mm), eluent: 70% MeOH-30% $AcONH_4$ buffer (pH=5) to 100% MeOH in 30 min, Flow rate: 1.0 ml /min, detection: λ = 408 nm

図 2-2-a. *p*-メトキシベンジリデンアセタールの除去

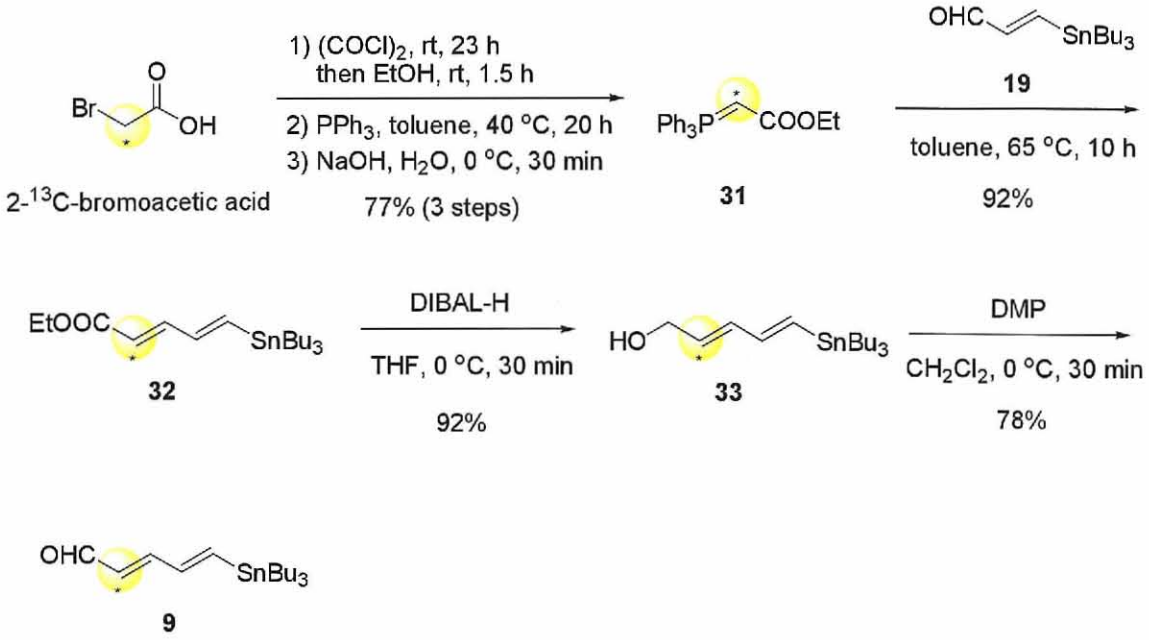


Conditions, column: $5C_{18}$-ARII (10x250 mm), eluent: 70% MeOH-30% $AcONH_4$ buffer (pH=5) to 100% MeOH in 30 min, Flow rate: 1.0 ml /min, detection: λ = 408 nm

図 2-2-b. メチルケタールの除去

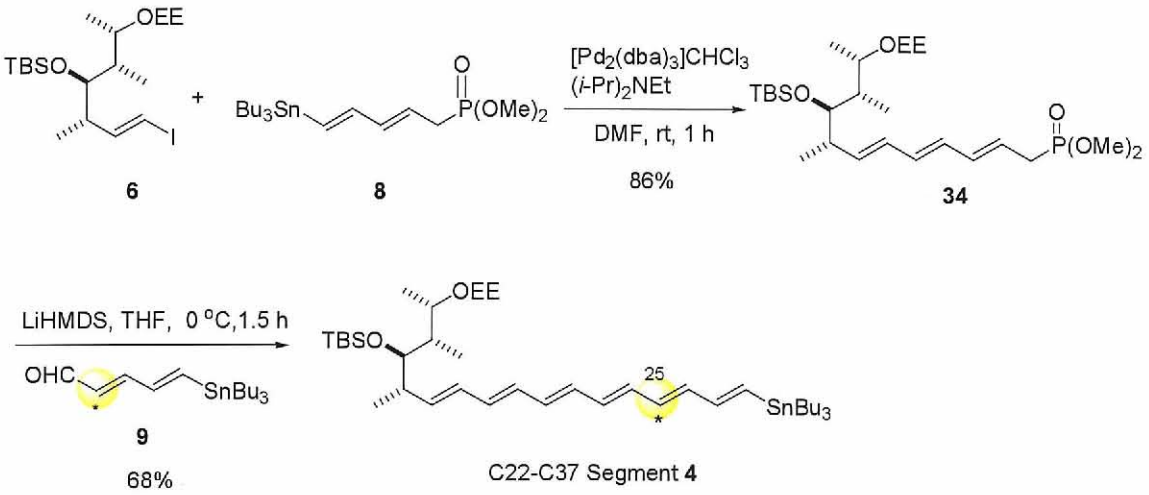
2-7. 25-^{13}C-AME の合成

28-^{19}F-AME **2** の合成が完了したので、続いて 25-^{13}C-AME の合成をスキーム 2-1 に示した合成計画に基づいて行った。C1-C21 セグメント **5** については、28-^{19}F-AME **2** を合成する際に用いたものと同じ化合物を使用し、また、C22-C37 セグメント **4** についても、前述のヨードオレフィン **6** とホスホン酸エステル **8** から誘導できるため、効率よく目的物が得ることが可能である。まず、^{13}C 標識化アルデヒド **9** の合成を行った(スキーム 2-11)。市販の 2-^{13}C-ブロモ酢酸をエチルエステルに変換後、トリフェニルホスフィンを作用させることでホスホニウム塩へと導き、続いて水酸化ナトリウムによる処理を行うことによりイリド **31** を合成した [16]。得られたイリド **31** と、前述のアルデヒド **19** を用いた Wittig 反応により、^{13}C 標識化エステル **33** を 92%の収率で合成し、DIBAL 還元によりアルコール **33**、続く DMP 酸化を経てアルデヒド **9** を合成した。



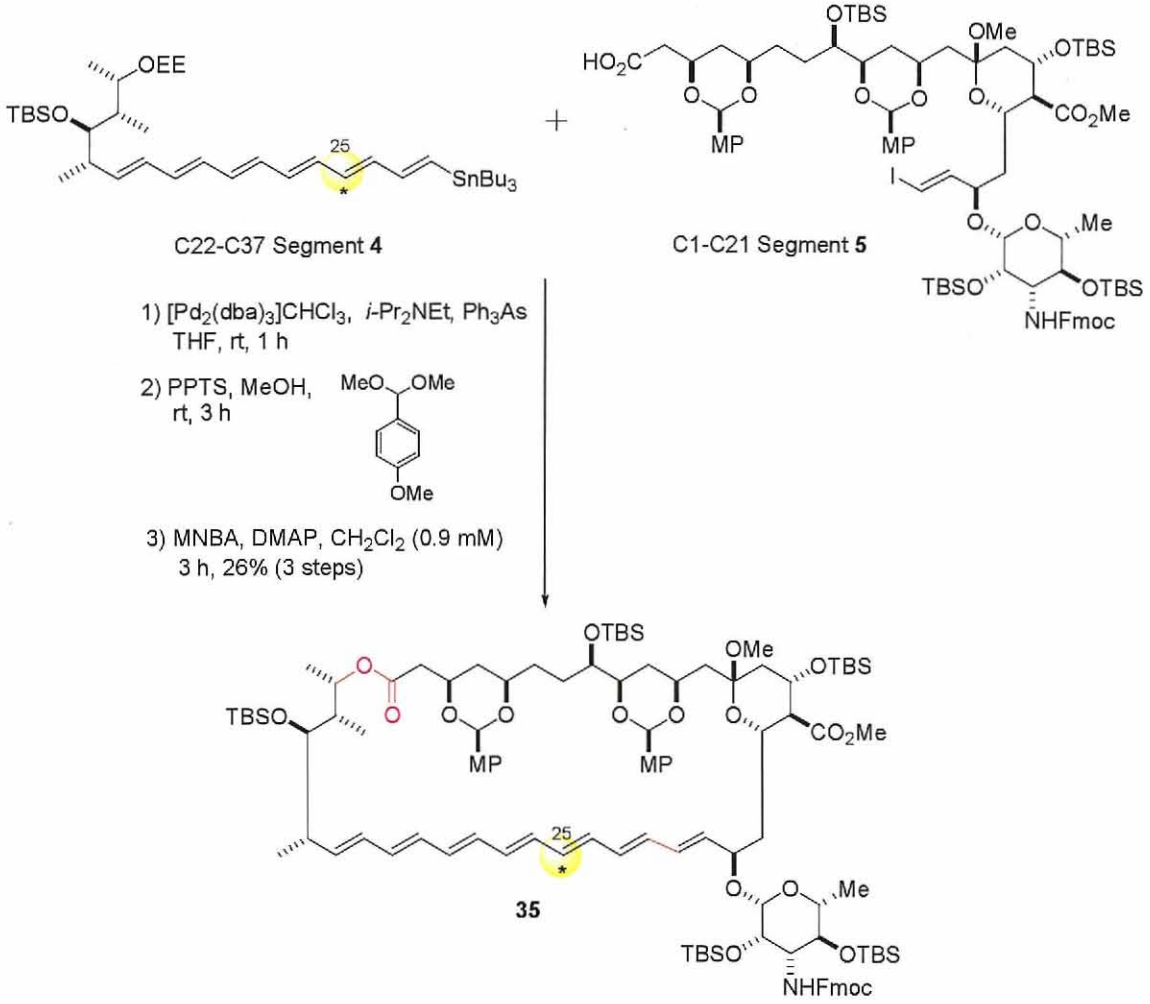
スキーム 2-11. アルデヒド **9** の合成

続いて C22-C37 セグメント **4** の合成を行った(スキーム 2-12)。前述のヨードオレフィン **6** とビニルスズ **8** を Stille カップリングにより連結し、ホスホン酸エステル **34** へと変換後、^{13}C 標識化アルデヒド **9** との Horner-Emmons 反応により C22-C37 セグメント **4** を 68%の収率で得た。



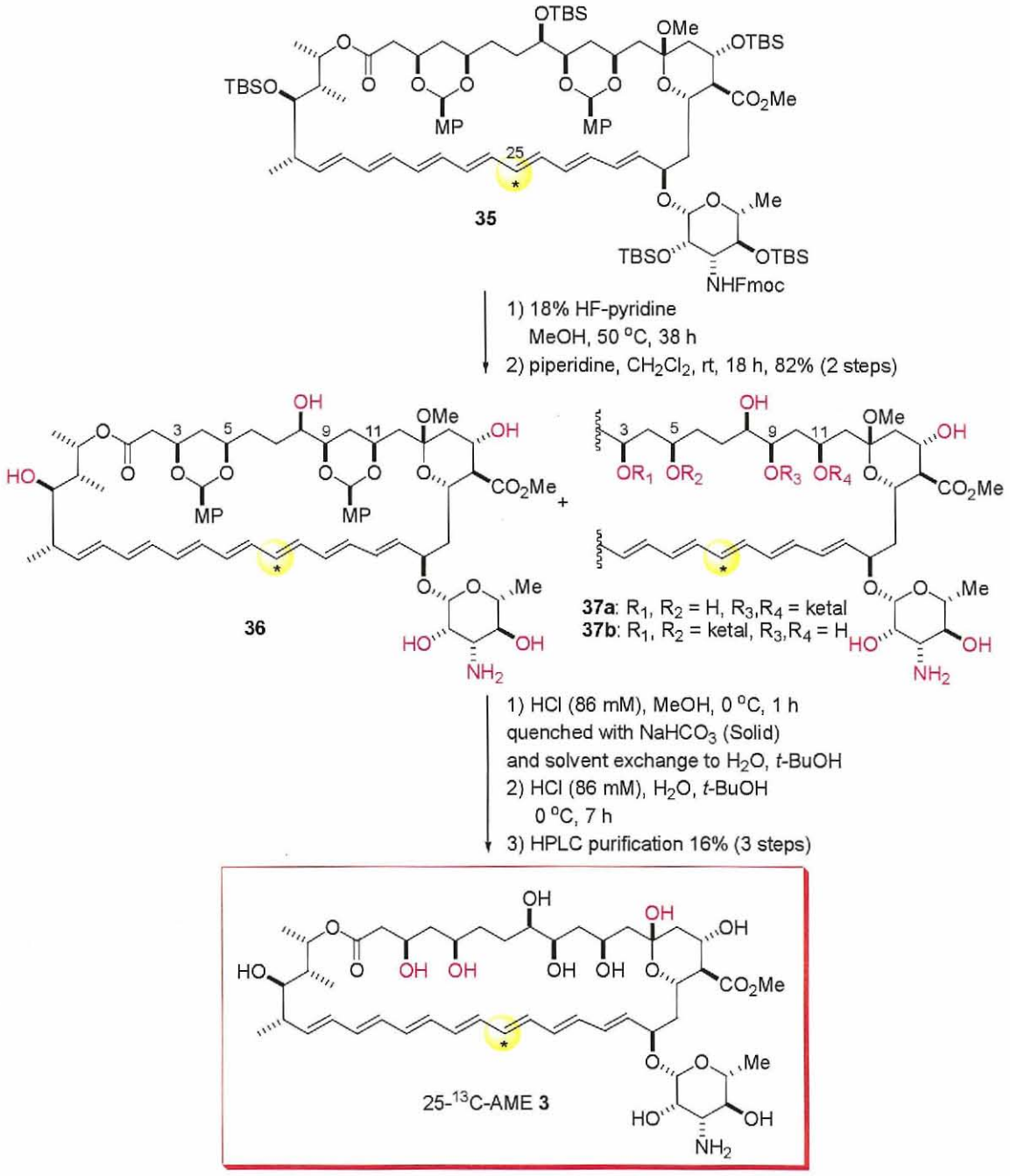
スキーム 2-12. C22-C37 セグメント **4** の合成

得られたC22-C37セグメント**4**と前述のC1-C21セグメント**5**をStilleカップリングにより連結し、PPTS作用させることでEE基の除去を行い、続く椎名法を用いたマクロラクトン化により化合物**35**を三段階26%の収率で得ることに成功した(スキーム2-13)。



スキーム2-13. セグメントの連結およびマクロラクトン化

続いて脱保護を行った(スキーム 2-14)。まず、18%HF-pyridine を作用させることで TBS 基を除去し、続いてピペリジンを用いて Fmoc 基の除去を行い化合物 **34** へと導いた。なお、この際も一部 *p*-メトキシベンジリデンアセタールが除去された化合物 **37ab** の生成が確認された。続いて MeOH 中塩酸(86 mM)を作用させることでまず *p*-メトキシベンジリデンアセタールの除去を行い、固体の炭酸水素ナトリウムでクエンチ後、溶媒を水、*t*-ブタノールに変換し、再び塩酸(86 mM)を作用させることでメチルケタールの除去を行い目的の 25-^{13}C-AME **3** を混合物として得た。最後に HPLC による精製を行い、目的の 25-^{13}C-AME **3** を三段階 16%の収率で単離することに成功した。



スキーム 2-14. 保護基の除去

参考文献

1) Tsuchikawa, H.; Matsushita, N.; Matsumori, N.; Murata M. and Oishi, T. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6187-6191.
2) 土川　博史　大阪大学理学研究科化学専攻　2006 年度博士論文
3) Rogers, B. N.; Selsted, M. E.; Rychnovsky, S. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 3177-3182.
4) Nicolaou, K. C.; Chakraborty, T. K.; Ogawa, Y.; Daines, R. A.; Simpkins, N. S.; Furst, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4660-4672.
5) Takai, K.; Nitta, K.; Utimoto, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7408-7410.
6) Tholander, J. Carreira, E. M. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 613-622.
7) Nahm, S.; Weinreb, S. M. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3815-3818.
8) (a) Colvin, E. W.; Hamill, B. J. *Chem. Commun.* **1973**, 151-152; (b) Miwa, K.; Aoyama, T.; Shioiri, T. *Synlett* **1994**, 107-108.
9) Zhang, H. X.; Guibé, F.; Balavoine, G. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 1857-1867.
10) Paquette, L. A.; Pissarnitski, D.; Barriault, L. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7389-7398.
11) Shinada, T.; Sekiya, N.; Bojkova, N.; Yoshihara, K. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 3675-3686.
12) Dess, D. B.; Martin, J. C. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155-4156.
13) shakov, E. N.; Lednev, I. K.; Alfimov, M. V. *Doklady Akademii Nauk SSSR* **1990**, *313*, 903-907.
14) (a) Sinz, C. J.; Rychnovsky, S. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3224-3227; (b) Sinz, C. J.; Rychnovsky, S. D. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 6561-6576.
15) Shiina, I.; Kubota, M.; Ibuka, R. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7535-7539.
16) Hartman, J. D.; Huang, C. C.; Butler, D. E. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1984**, *21*, 347.

第三章　28-^{19}F-AME と 25-^{13}C-AME を用いた固体ＮＭＲ測定

3-1 緒言

前述したように、当研究室ではAmBのチャネル会合体の構造解析に固体NMRを適用しており、現在までにAmB－リン脂質およびAmB－ステロール間において、分子間相互作用を観測することに成功している。AmB－リン脂質については、生合成的に調製した [tri-^{13}C]AmB を用い、DMPC または DSPC 膜中での脂質の ^{31}P と AmB の ^{13}C 間の REDOR 測定を行った。その結果、AmB が DMPC 膜でシングルレングスチャネルを形成していること、また、DSPC 膜では単分子では膜を貫通していないことが明らかになった [1a)]。さらに全炭素が標識された [U-^{13}C]AmB を用いた DLPC 膜中での RDX 実験においても、AmB がシングルレングスチャネルを形成していることが明らかにされ、リン脂質が会合体形成に深く関与していることが示された [1b)]。また、AmB とステロールに関しても、[U-^{13}C]AmB と ^{19}F 標識化ステロールの連結体を用いた REDOR 測定により、AmB とステロール間の分子間相互作用が観測されている [2)]。

このように、AmB チャネル複合体の構造を解明する上で、固体 NMR は非常に有用な方法であることが示されている。そこで、次に AmB－AmB の分子間相互作用を解析するため、前章で合成した 28-^{19}F-AME と 25-^{13}C-AME を用いて REDOR 実験を行い、ヘプタエン部分同士の分子間相互作用を観測しようと考えた。当研究室ではすでにエルゴステロール含有 DMPC 膜中において、[U-^{13}C]AmB と 14-^{19}F-AmB、または[U-^{13}C]AmB と 28-^{19}F-AME の 2 種類の系において RDX 測定が行われており、その結果、14 位のフッ素は 13 位の ^{13}C 原子から近い位置にあること [3)]、また、28 位のフッ素はヘプタエン近傍に存在することが示され [4)]、これはこれまでに推測されてきた樽板モデルと一致するものであった(図 3-1)。しかし、前述したように、[U-^{13}C] AmB を用いた RDX 測定では一度に多くの情報は得られるが、正確な距離情報は得られないといった問題点があり、^{13}C-^{19}F 間の正確な距離情報の取得には至っていない。今回合成した 25-^{13}C-AME を用いることで、[U-^{13}C] AmB の場合のように、同核種間のスピン結合相互作用を抑えた RDX 測定法を使用せずに、通常の REDOR 測定を行うことが可能となる。さらに、特定の位置が 100%標識化されているため、^{13}C-^{19}F 間の正確な距離情報の取得が期待される。

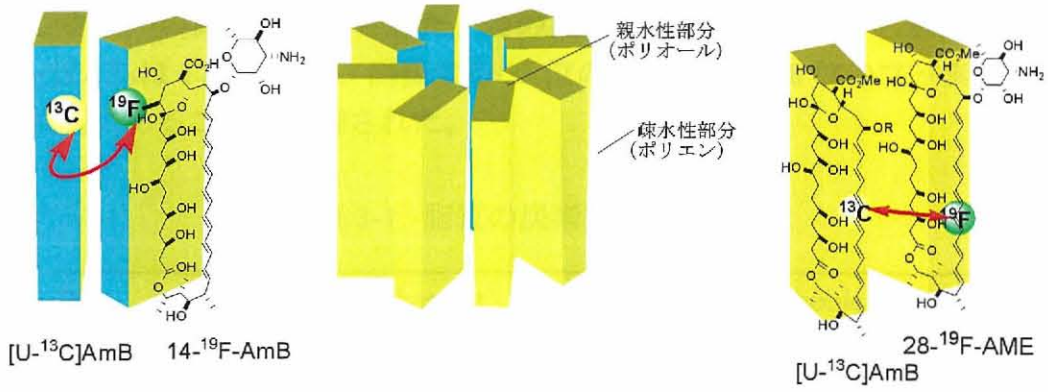


図 3-1. 樽板モデル図

3-2. 測定

3-2-a 28-^{19}F-AME、25-^{13}C-AME、エルゴステロール、POPC を用いた REDOR 測定

これまで当研究室では、AmB－AmB 間の相互作用解析を行う際に、リン脂質として DMPC を用いてきた。DMPC を用いる利点としては、AmB の分子長とほぼ同じ疎水性領域を持つため AmB との親和性が高く、チャネル構造を安定化することが挙げられる。しかし、欠点として、AmB との親和性が高いためステロール選択性が出ないこと、また、サンプル調製中にリポソームが壊れてしまうため K^+透過活性試験を行うことができないことが挙げられる。

そこで今回リン脂質として、AmB の分子長よりも少し長い疎水性領域を持つ POPC を用いた(表 3-1、図 3-2)。POPC は不飽和脂肪酸を持つため、AmB との相互作用が弱く、POPC 膜中では AmB のステロールに対する親和性の違いが確認されている [5)]。また、POPC リポソームを用いた場合、AmB の K^+透過活性試験を行うことが可能であるため、REDOR 測定の結果とチャネル活性の関連を議論することが可能となる。

サンプルはエルゴステロール(Erg)含有 POPC に、28-^{19}F-AME と 25-^{13}C-AME を混合して調製した（図 3-2)。28-^{19}F-AME / 25-^{13}C-AME / Erg/ POPC が 0.5 / 0.5 / 3 / 27 ($R = 3.3\times10^{-2}$)となるようにサンプルを調製し、REDOR 測定を行った（図 3-3)。下側のスペクトルはフッ素核にパルスを照射していないスペクトル(S_0)で、通常の CP-MAS スペクトルに相当する。上側のスペクトルは S_0 からパルス照射スペクトル(S)を引いた REDOR 差スペクトル(ΔS)になっており、REDOR 減衰が

起こったところにシグナルが現れる。図 3-3 より、AME のヘプタエン部分に有意なシグナルの減衰が観測された。この減衰の割合を積分値から算出したところ、$\Delta S / S_0$ は 17%となり、隣接する 25 位の ^{13}C 原子が 28 位のフッ素原子から近い位置にあることが示唆された。

表 3-1. 脂質の炭素数と分子長 [1c)]

PC	Phase at 25 °C	Length of hydrophobic region (Å)	
		Fluid phase (f)	Gel phase (g)
POPC (C_{16}, $C_{18:1}$)	f	25.8[a]	–
DCPC ($2 \times C_{10}$)	f	15.5[b]	–
DLPC ($2 \times C_{12}$)	f	19.5[b]	27[c]
DMPC ($2 \times C_{14}$)	f	23[b]	31.5[d, e]
DPPC ($2 \times C_{16}$)	g	26[b]	36[d]
DSPC ($2 \times C_{18}$)	g	29.5[b]	40.5[e]

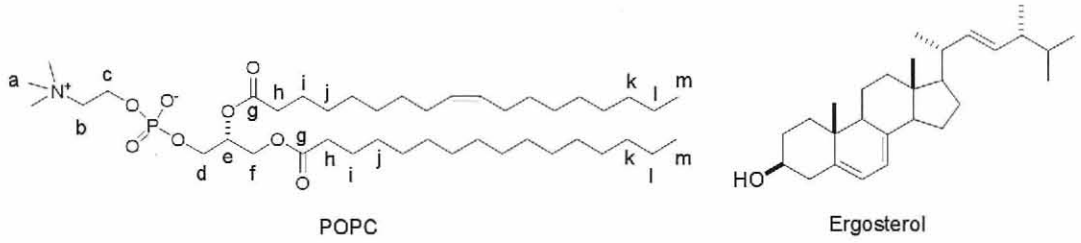


図 3-2. Erg 含有 POPC 膜での固体 NMR 測定サンプル

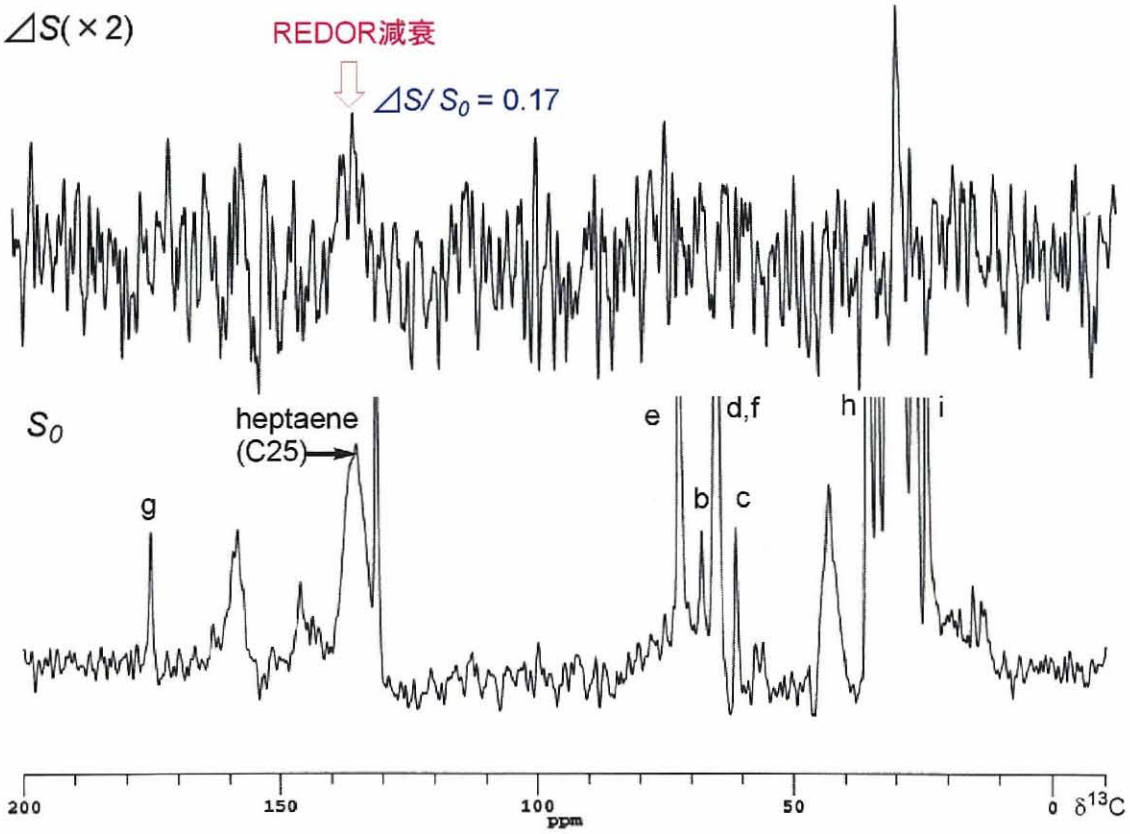


図 3-3. REDOR スペクトル（上：差スペクトル ΔS、下：非照射スペクトル S_0）
28-^{19}F-AME / 25-^{13}C-AME / Erg / POPC = 0.5 / 0.5 / 3 / 27
50% wt. in HEPES / D_2O, pH 7.0
展開時間：6.4 ms, MAS：5 kHz, 温度：30℃, 積算：81920
図中のアルファベットは POPC 由来

3-2-b　28-^{19}F-AME、25-^{13}C-AME、コレステロール、POPC を用いた REDOR 測定

次に、コレステロール(Chol)含有 POPC 膜について REDOR 測定を行った。サンプルとしては先程と同様に 28-^{19}F-AME と 25-^{13}C-AME を用いた（図 3-4）。28-^{19}F-AME / 25-^{13}C-AME / Chol/ POPC が 0.5 / 0.5 / 3 / 27 (R = 3.3×10^{-2})となるようにサンプルを調製し、REDOR 測定を行った（図 3-5）。その結果、エルゴステロール含有 POPC 膜と同様に、C25 位に有意な REDOR 減衰が確認された。この減衰の割合を算出したところ、$\Delta S / S_0$ は 20%となった。

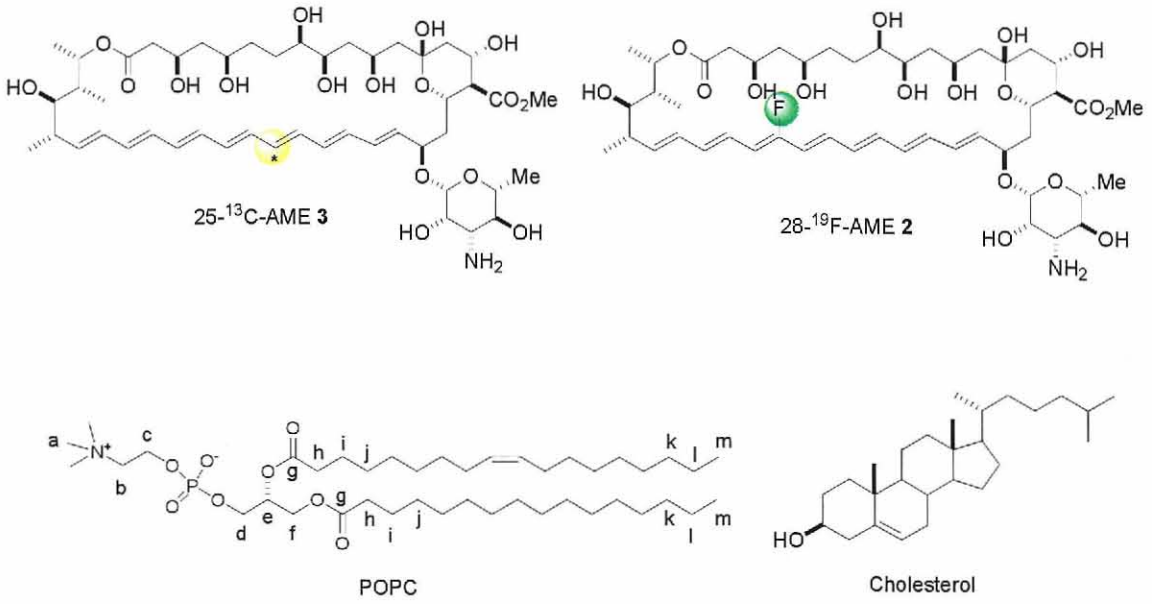


図 3-4. Chol 含有 POPC 膜での固体 NMR 測定サンプル

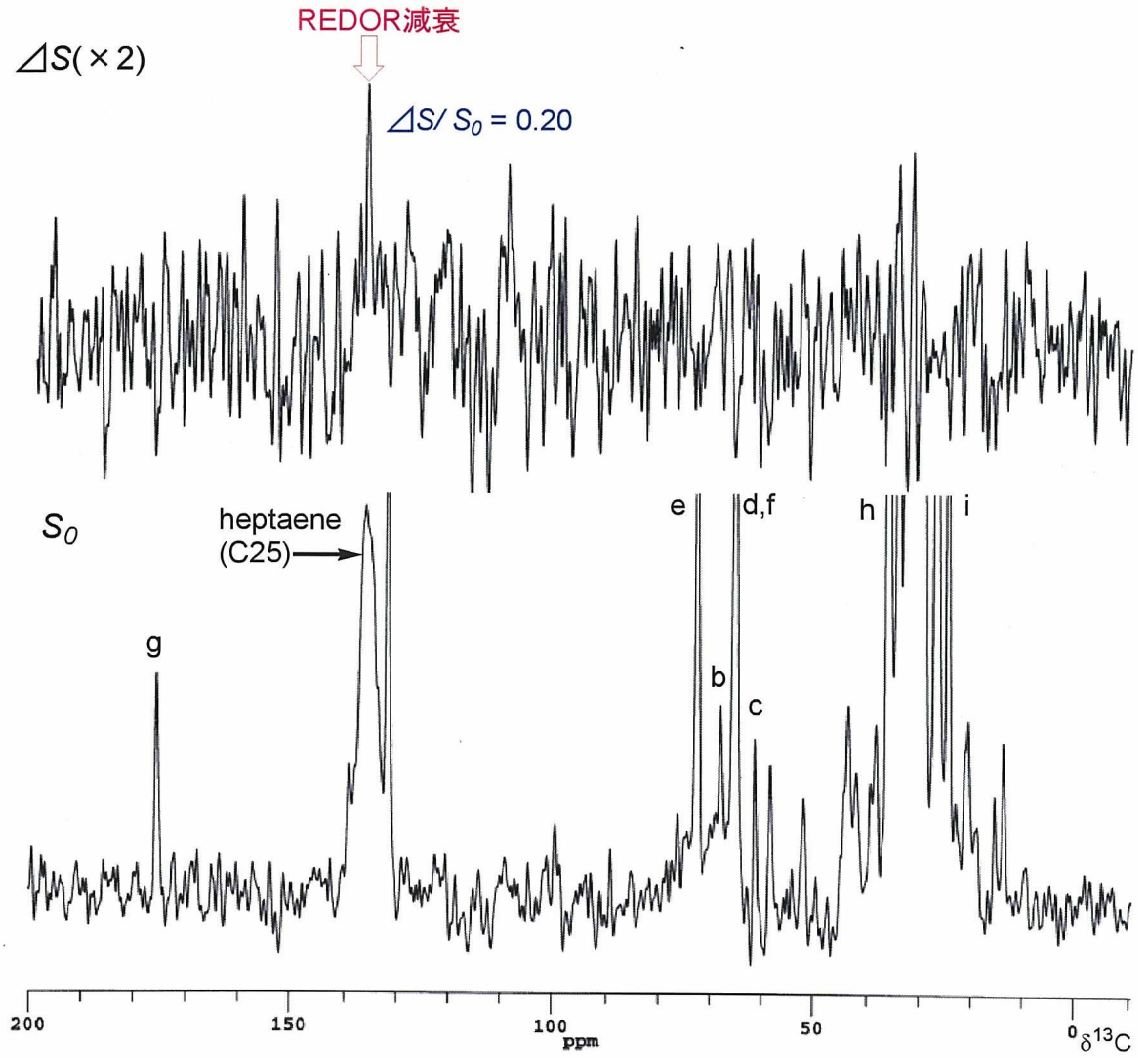
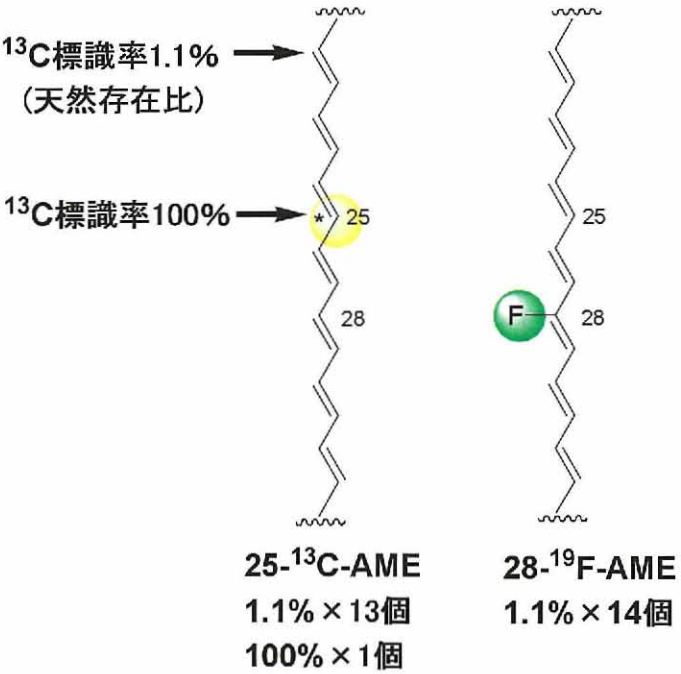


図 3-5. REDOR スペクトル（上：差スペクトル ΔS、下：非照射スペクトル S_0）
28-^{19}F-AME / 25-^{13}C-AME / Chol / POPC = 0.5 / 0.5 / 3 / 27
50% wt. in HEPES / D_2O, pH 7.0
展開時間：6.4 ms, MAS：5 kHz, 温度：30℃, 積算：81920
図中のアルファベットは POPC 由来

3-3. 28-^{19}F, 25-^{13}C 原子間の距離測定

REDOR 測定では展開時間を変化させ、$\Delta S/S_0$ の測定を行うことで双極子カップリングの値を決定することができる。双極子カップリングは距離の三乗に反比例するため、そこから距離情報の取得が可能となる[6-8]。そこで今回の系に関して、横軸に展開時間、縦軸に $\Delta S/S_0$ の値を取って理論曲線とのフィッティングを行うことにした。横軸の展開時間は 4.8 ms、6.4 ms、8.0 ms の 3 点を取り、それぞれの点について $\Delta S/S_0$ の値を算出した。今回観測されたヘプタエン部分の REDOR 減衰は、25-^{13}C-AME の標識部位(100%×1 個)、25-^{13}C-AME の非標識部位(天然存在比 1.1%×13 個)、28-^{19}F-AME のヘプタエン部位(1.1%×14 個)の 3 つの成分が合わさったものである。従って全シグナル強度は S_0 = 100×1+1.1×13+1.1×14 = 129.7 となり、その内標識部位(25 位 ^{13}C)の寄与は 100/ 129.7 となる(図 3-6)。



$\Delta S/S_0$ = 25-^{13}C-AMEの減衰分(25位の減衰分+25位以外の減衰分)
＋28-^{19}F-AMEの分子内natural^{13}Cの減衰分

図 3-6. ヘプタエン部分における非標識部位からの寄与

より正確な距離情報を取得するには、これら非標識部位からの寄与についても考慮する必要がある。そこでまず、28-^{19}F-AME におけるヘプタエンからの分子内寄与について考えることにした(図 3-7)。

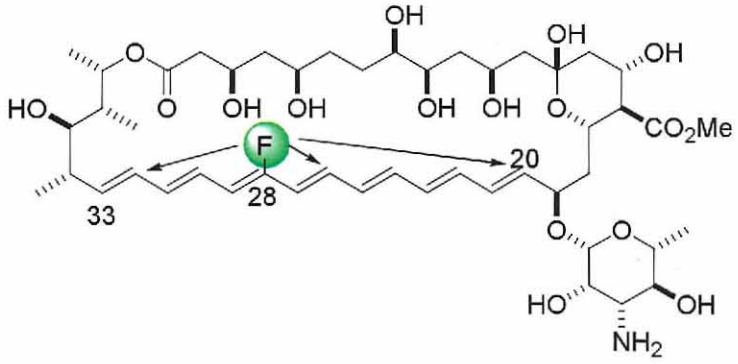


図 3-7. 28-^{19}F-AME の分子内寄与

フッ素原子とそれぞれの炭素間との距離はAmB誘導体のX線構造データを基に算出した[9]。得られた距離と対応する双極子カップリングの値を図 3-8 に示した。フッ素原子と結合している 28 位の炭素において大きな双極子カップリングの値を取ることがわかる。

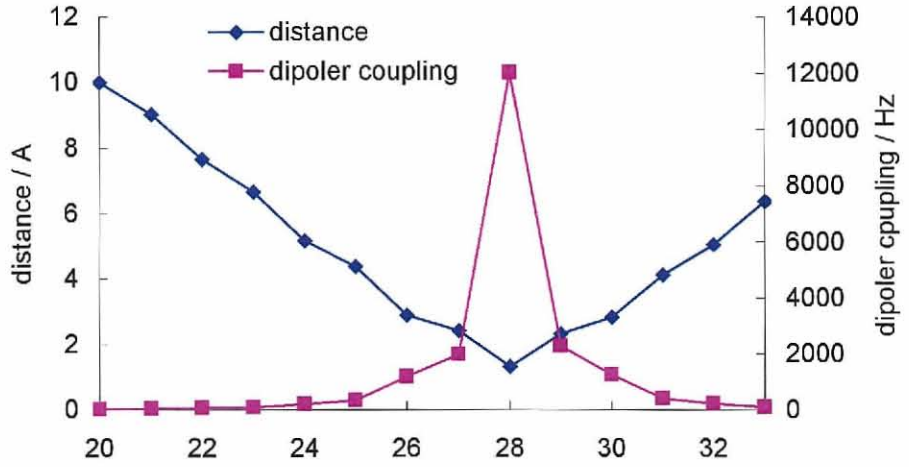
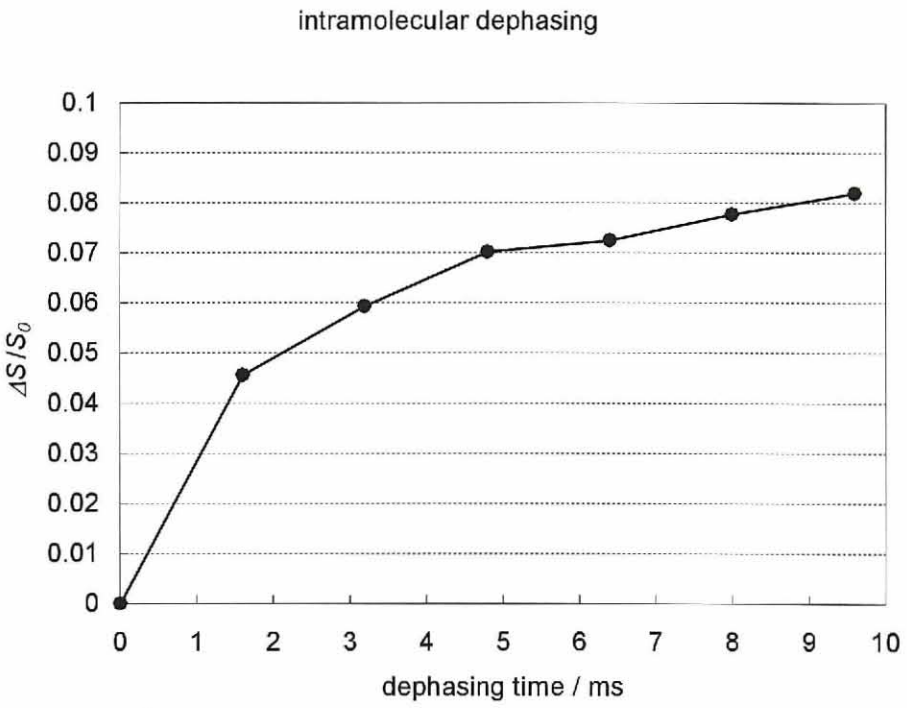


図 3-8. 28-^{19}F-AME の分子内炭素-フッ素間距離と双極子カップリング

図 3-8 の値を基に、それぞれの炭素についての REDOR 減衰曲線を計算し、その全てを足し合わせ、さらに最初に述べたヘプタエン部分の ^{13}C シグナルにおける 28-^{19}F-AME の寄与分(天然存在比 1.1%×14/ 129.7)を掛けたものを図 3-9 に示した。これが 28-^{19}F-AME の分子内 REDOR 減衰曲線となる。展開時間 6.4 ms のところを見ると$\Delta S/S_0$の値がおよそ 0.07 となっている。エルゴステロール含有 POPC 膜での展開時間 6.4 ms における REDOR 減衰の観測値は$\Delta S/S_0 = 0.17$であったので(図 3-3)、その 0.17 のうち 0.07 は 28-^{19}F-AME におけるヘプタエンからの分子内寄与であることがわかる。



$\Delta S/S_0$(0.17) = 25-^{13}C-AMEの減衰分(25位の減衰分+25位以外の減衰分)
＋28-^{19}F-AMEの分子内natural^{13}Cの減衰分(0.07)

図 3-9. 28-^{19}F-AME の分子内 REDOR 減衰曲線

次に、25-^{13}C-AME の非標識部位からの寄与を算出することにした。議論を容易にするため、25-^{13}C-AME と 28-^{19}F-AME が必ず隣り合っていること、また、ヘプタエン同士が平行かつ同じ高さに配列しているという仮定の基に計算を行った。

28-^{19}F-AME のフッ素は片側によっているため、25-^{13}C-AME の右側に 28-^{19}F-AME が隣接した場合と左側に来た場合で ^{13}C-^{19}F 間の距離が異なる(図 3-10)。近いほうの影響を主に受けるとすると、25-^{13}C-AME の右側に 28-^{19}F-AME が隣接する構造のみを議論すればよい(図 3-10 囲み部分)。

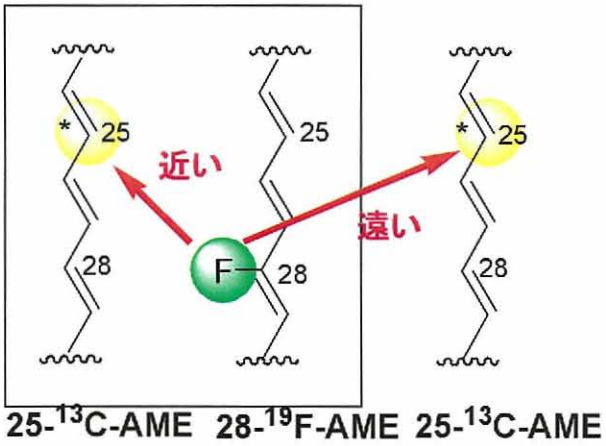


図 3-10. AME の配列と原子間距離

仮に、25^{13}C-28^{19}F の原子間距離を 7.2Å とすると、25-^{13}C-AME の非標識部位とフッ素原子間距離は図 3-11 のように計算することができ、対応する双極子カップリングの値が求まる。

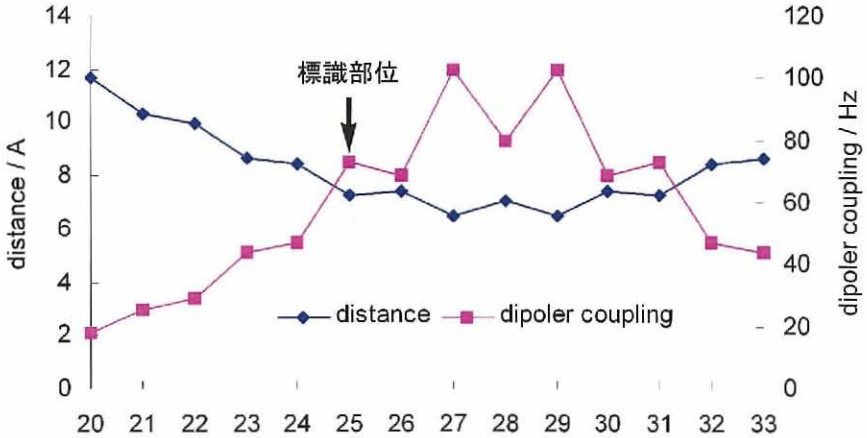


図 3-11. 25^{13}C-28^{19}F の原子間距離を 7.2Å とした時の他の炭素-フッ素間距離及び双極子カップリングの値

先程と同様に、図 3-11 の値を基にしてそれぞれの炭素についての REDOR 減衰曲線を計算し、その全てを足し合わせ、さらに最初に述べたヘプタエン部分における25-^{13}C-AMEの非標識部位の割合(天然存在比1.1%×13/ 129.7)を掛けたものを図 3-12 に示した。これが 25-^{13}C-AME の非標識部位 REDOR 減衰曲線となる。

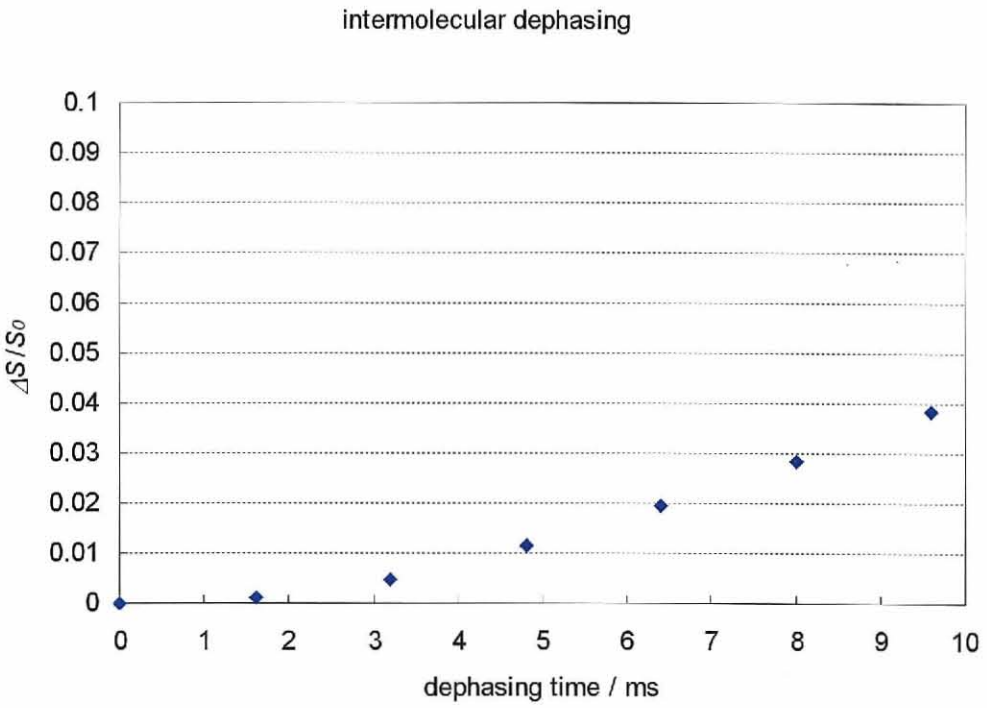


図 3-12. 25-^{13}C-AME の非標識部位 REDOR 減衰曲線

また、25-^{13}C-AME の標識部位については、先程 25^{13}C-28^{19}F の原子間距離を 7.2 Å と仮定したので、通常の REDOR 減衰曲線に 25-^{13}C-AME の標識部位の割合(100%×1/ 129.7)を掛け合わせた値となる(図 3-13)。

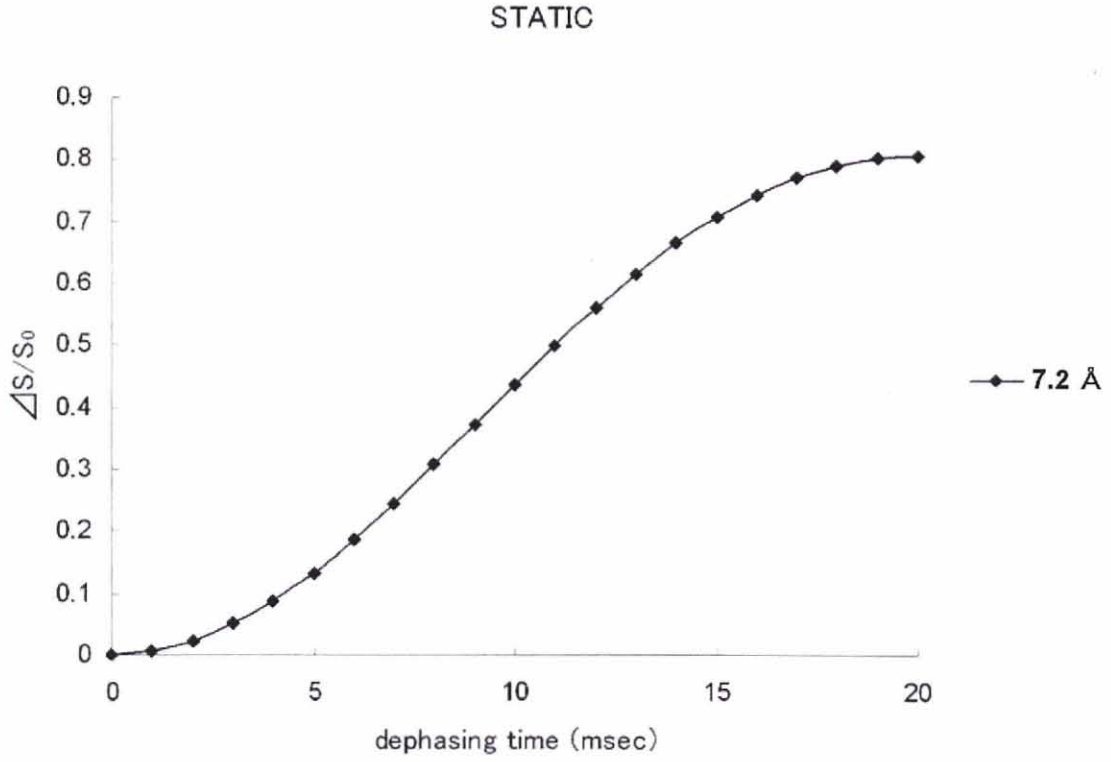


図 3-13. 25-^{13}C AME 標識部位の REDOR 減衰曲線

最後に、それぞれの場合の REDOR 減衰曲線(28-^{19}F-AME の分子内寄与・・・図 3-9、25-^{13}C-AME の非標識部位からの寄与・・・図 3-12、25-^{13}C-AME の標識部位からの寄与・・・図 3-13)を足し合わせることで、図 3-10 の囲み部分の構造の REDOR 減衰を求めることができる。それを図 3-14 に示した。これが、全ての 28-^{19}F-AME と 25-^{13}C-AME が互い違いに並んだ理想的な場合の REDOR 減衰(25-^{13}C と 28-^{19}F 間が 7.2Å である時の理論曲線)となる。

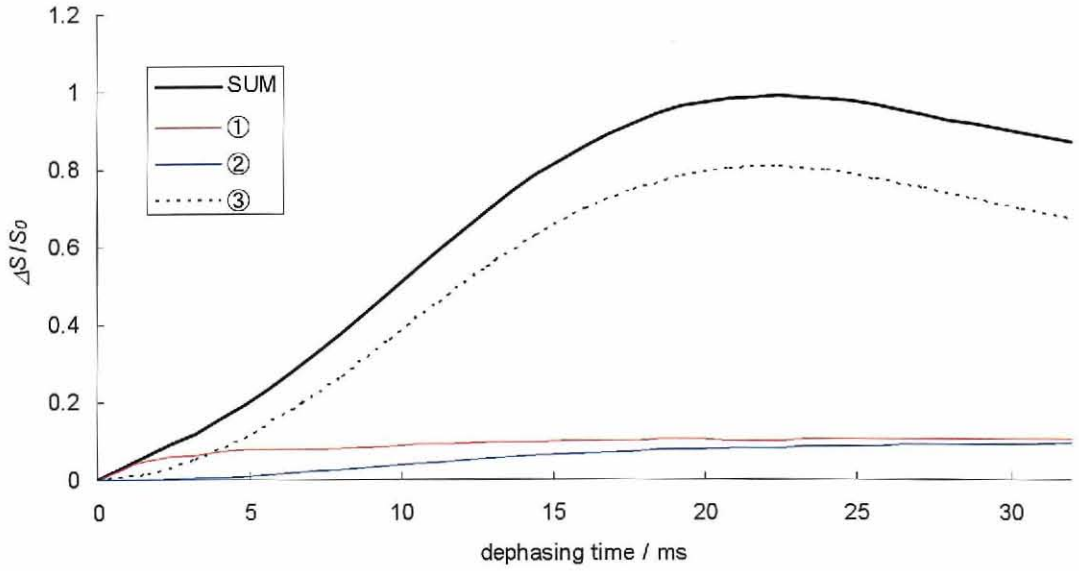


図 3-14. 全ての 28-^{19}F-AME と 25-^{13}C-AME が互いに隣り合った場合の REDOR 減衰(①・・・28-^{19}F-AME、②・・・25-^{13}C-AME の非標識部位、③・・・25-^{13}C-AME の標識部位)

しかし、実際には 28-^{19}F-AME と 25-^{13}C-AME は必ずしも隣り合わない。図 3-14 の①は 28-^{19}F-AME の分子内寄与であるため AME の配列の影響を受けないが、②と③はその影響を受ける。図 3-10 で示したように、注目している 25-^{13}C-AME の左側に 28-^{19}F-AME が来ても ^{13}C-^{19}F 間の距離が遠いため、あまり影響を受けない。よって 25-^{13}C-AME の右側にどちらの分子が来るかだけを議論すれば良いので、25-^{13}C-AME に減衰が起こる確率は 50%となる(図 3-15)。

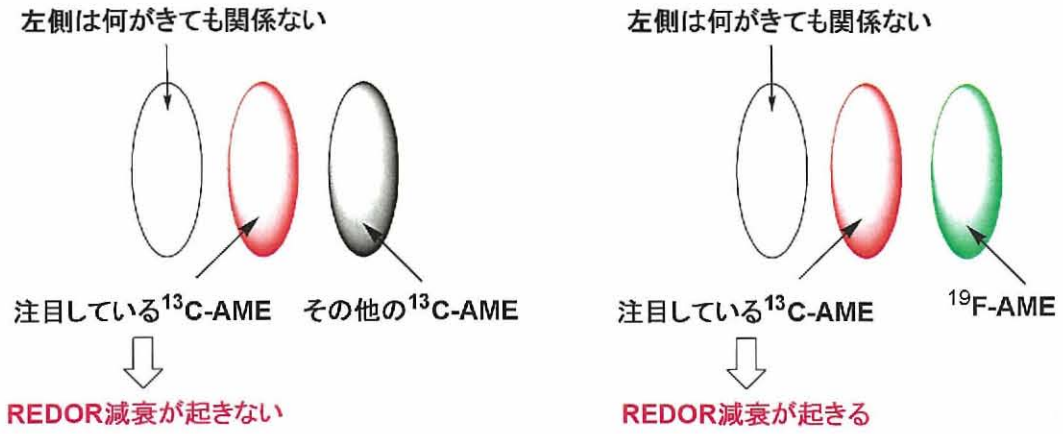


図 3-15. AME の配列と REDOR 減衰

②と③に 50%の補正をかけて足し合わせた結果を図 3-16 に示した。初めに $25^{13}C$-$28^{19}F$ の原子間距離を 7.2 Å と仮定したので、図 3-16 は 7.2Åにおける理論曲線となっている。すなわち、初めに $25^{13}C$-$28^{19}F$ の原子間距離を 7.5 Å と仮定すれば 7.5Åにおける理論曲線が得られる。

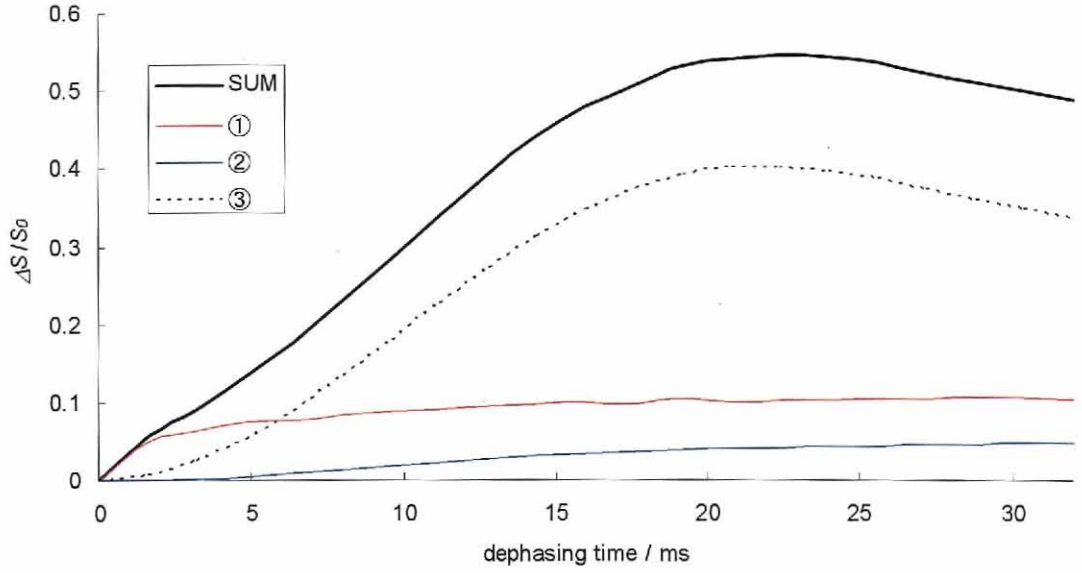


図 3-16. $25^{13}C$- AME と $28^{19}F$- AME の隣り合う確率を 50%としたときの REDOR 減衰曲線(①・・・28-^{19}F-AME、②・・・25-^{13}C-AME の非標識部位、③・・・25-^{13}C-AME の標識部位)

この方法で計算した理論曲線を REDOR の測定結果にあてはめたものを図 3-17 に示した。展開時間 4.8 ms については理論曲線には乗らなかったが、その他の 2 点についてはおおよそ理論曲線に乗っているようだった。その結果、ステロールフリーの POPC 膜では 25-^{13}C と 28-^{19}F 間の距離が 7.5Åであること、またステロール含有膜では 25-^{13}C と 28-^{19}F 間の距離が 7.2Åであることが明らかとなった。ステロールフリー膜とステロール含有膜においては ^{13}C-^{19}F 間の距離に 0.3Å程度の違いが見られたが、測定誤差(±0.3Å)の範囲内であるため、有意な差とは言えない。

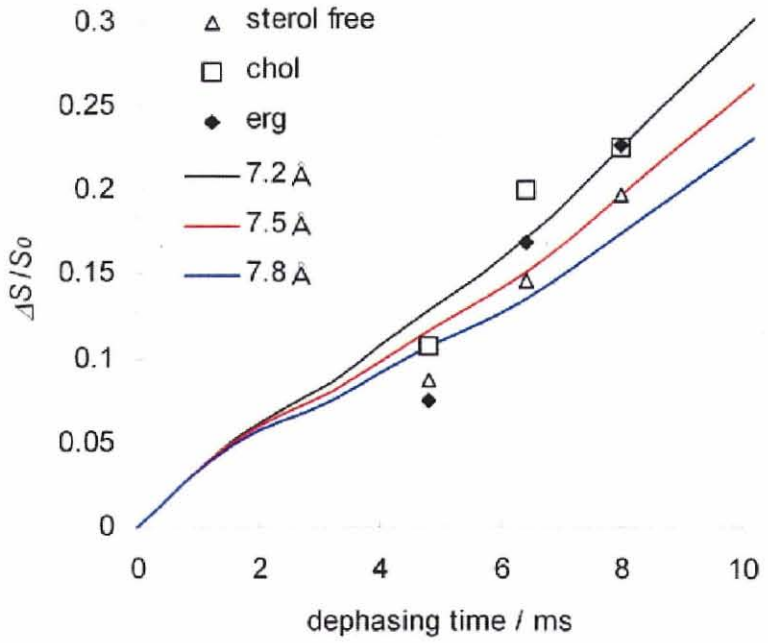


図 3-17. すべての寄与を考慮した時の理論曲線と REDOR 測定結果とのフィッティング

参考文献

1) (a) Matsuoka, S.; Ikeuchi, H.; Matsumori, N. and Murata, M. *.Biochemistry,* **2005**, *44*, 704-710; (b) Matsuoka, S.; Ikeuchi, H.; Umegawa, Y.; Matsumori, N.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6608-6614. (c) Matsuoka, S.; Murata, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1617*, 109-115.
2) Kasai, Y.; Matsumori, N.; Umegawa, Y.; Matsuoka, S.; Ueno, H.; Ikeuchi, H.; Oishi, T.; Murata, M. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1178-1185.
3) 梅川　雄一　大阪大学理学研究科化学専攻　2005 年度修士論文
4) 土川　博史　大阪大学理学研究科化学専攻　2006 年度博士論文
5) Mouri, R; Konoki, K; Matsumori, N; Oishi, T; Murata, M. *Biochemistry* **2008**, *47*, 7807–7815.
6) Gullion, T.; Schaefer, J. *Adv. Magn. Reson.* **1989**, *13*, 57-83.
7) Gullion, T.; Schaefer, J. *J. Magn. Reson.* **1989**, *81*, 196-200.
8) Mueller, K. T. *J. Magn. Reson.* **1995**, *113*, 81-93.
9) Ganis, P.; Avitabile, G.; Mechlinski, W.; Shaffner, C. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4560-4564.

第四章　14-^{19}F-AME と $^{13}CH_3$-AME を用いた固体ＮＭＲ測定

4-1. 緒言

前章では、28-^{19}F-AME **2** と 25-^{13}C-AME **3** を用いて REDOR 実験を行い、AME が形成するポアの外側(ヘプタエン部分)における分子間相互作用の観測に成功した。そこでつぎに、ポアの内側(親水性部分)についても同様の実験を行い、複合体構造の全体像の解明を試みた。標識体としては、当研究室ですでに合成法が確立されている 14-^{19}F-AME と [1]、AmB から三段階で調製可能な $^{13}CH_3$-AME を用いた。

4-2. 測定

4-2-a　14-^{19}F-AME、$^{13}CH_3$-AME、エルゴステロール、POPC を用いた REDOR 測定

リン脂質としては、前章と同様に POPC を用いる事とし、R 値も前章に合わせ、14-^{19}F-AME / $^{13}CH_3$-AME / Erg/ POPC が 0.5 / 0.5 / 3 / 27 ($R = 3.3 \times 10^{-2}$)となるようにサンプル調製を行った(図 4-1)。REDOR 測定の結果、標識部位であるメチルエステル部分に減衰が見られた(図 4-2)。この減衰の割合を算出したところ、$\Delta S / S_0$ は 10%となった。

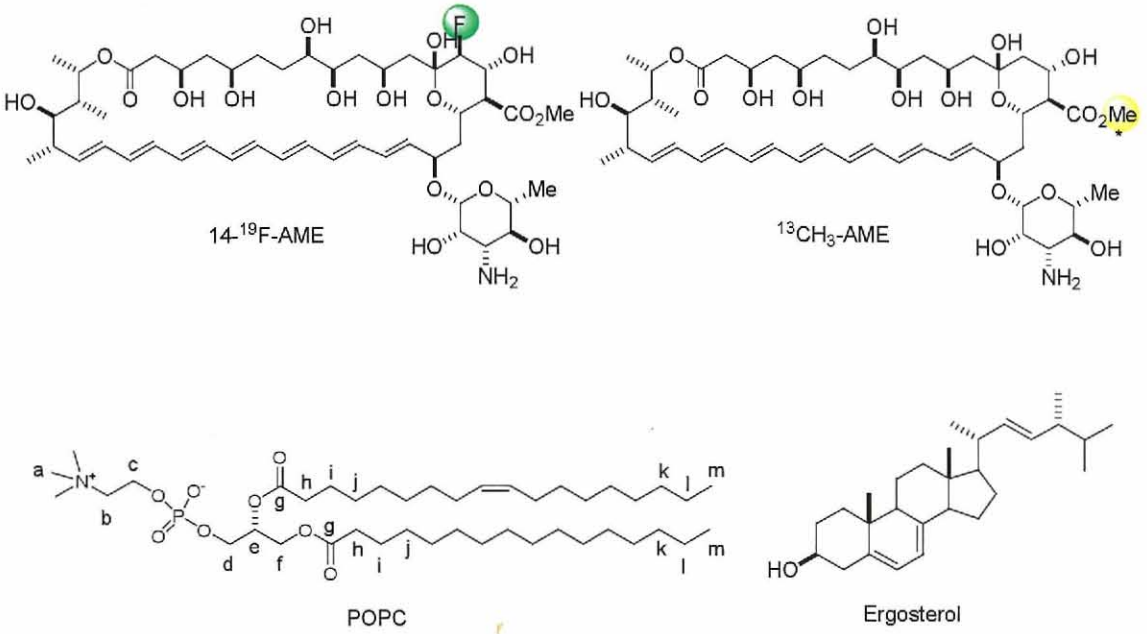


図 4-1. Erg 含有 POPC 膜での固体 NMR 測定サンプル

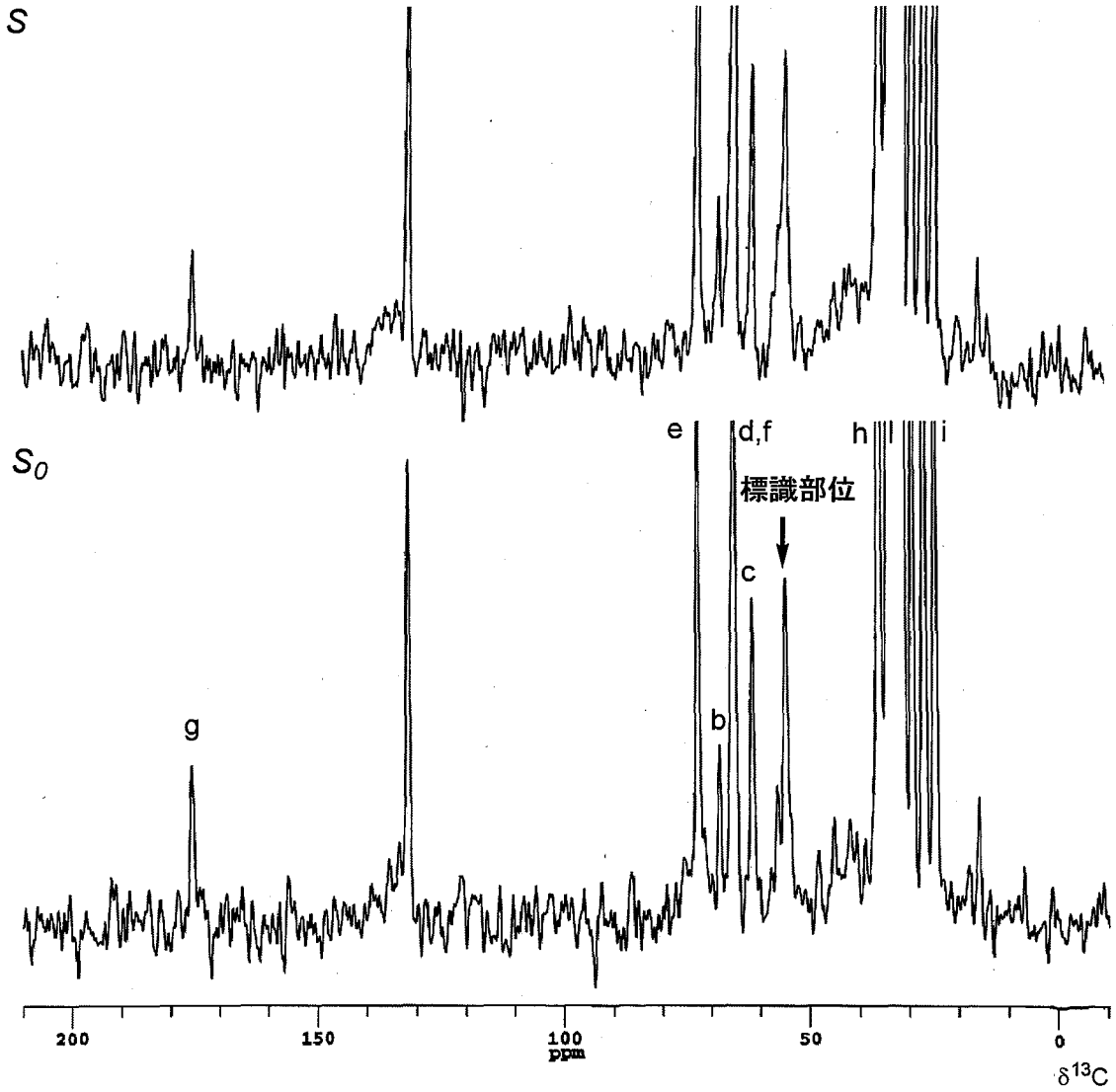


図 4-2. REDOR スペクトル（上：照射スペクトル S、下：非照射スペクトル S_0）
14-^{19}F-AME / $^{13}CH_3$-AME / Erg / POPC = 0.5 / 0.5 / 3 / 27
50% wt. in HEPES / D_2O, pH 7.0
展開時間：8.0 ms, MAS：5 kHz, 温度：30℃, 積算：19712
図中のアルファベットは POPC 由来

4-2-b　14-^{19}F-AME、$^{13}CH_3$-AME、コレステロール、POPC を用いた REDOR 測定

次に、コレステロール(Chol)含有 POPC 膜について REDOR 測定を行った。サンプルとしては先程と同様に 14-^{19}F-AME と $^{13}CH_3$-AME を用いた（図 4-3）。14-^{19}F-AME / $^{13}CH_3$-AME / Chol/ POPC が 0.5 / 0.5 / 3 / 27 ($R = 3.3\times10^{-2}$)となるようにサンプルを調製し、REDOR 測定を行った（図 4-4）。エルゴステロール含有 POPC 膜と同様に、この減衰の割合を算出したところ、$\Delta S/S_0$ は 10%となった。

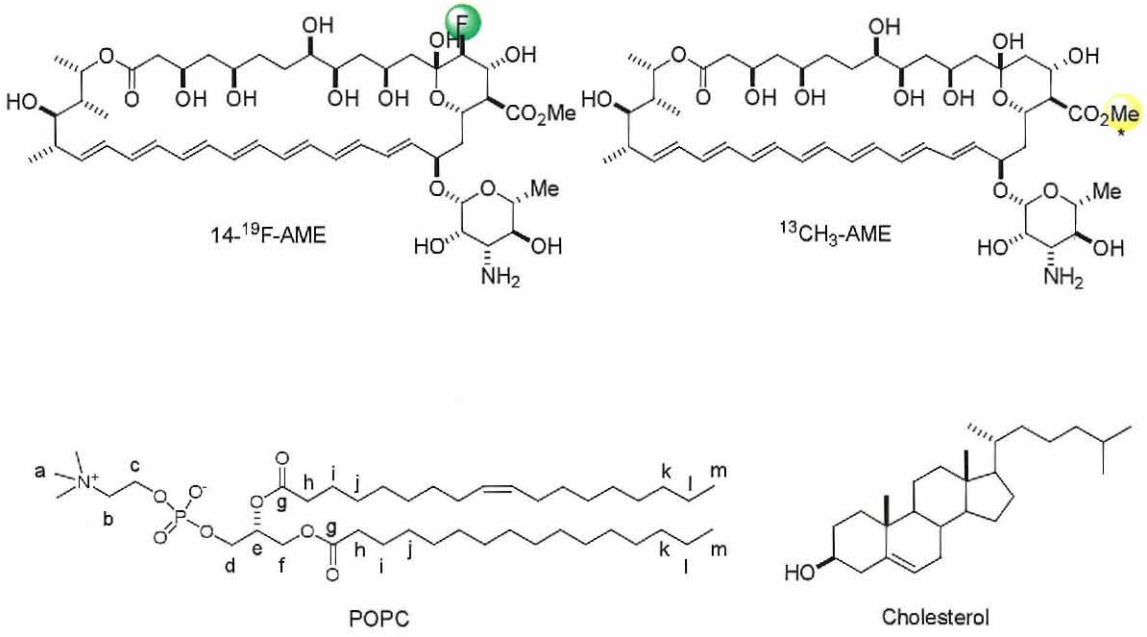


図 4-3. Chol 含有 POPC 膜での固体 NMR 測定サンプル

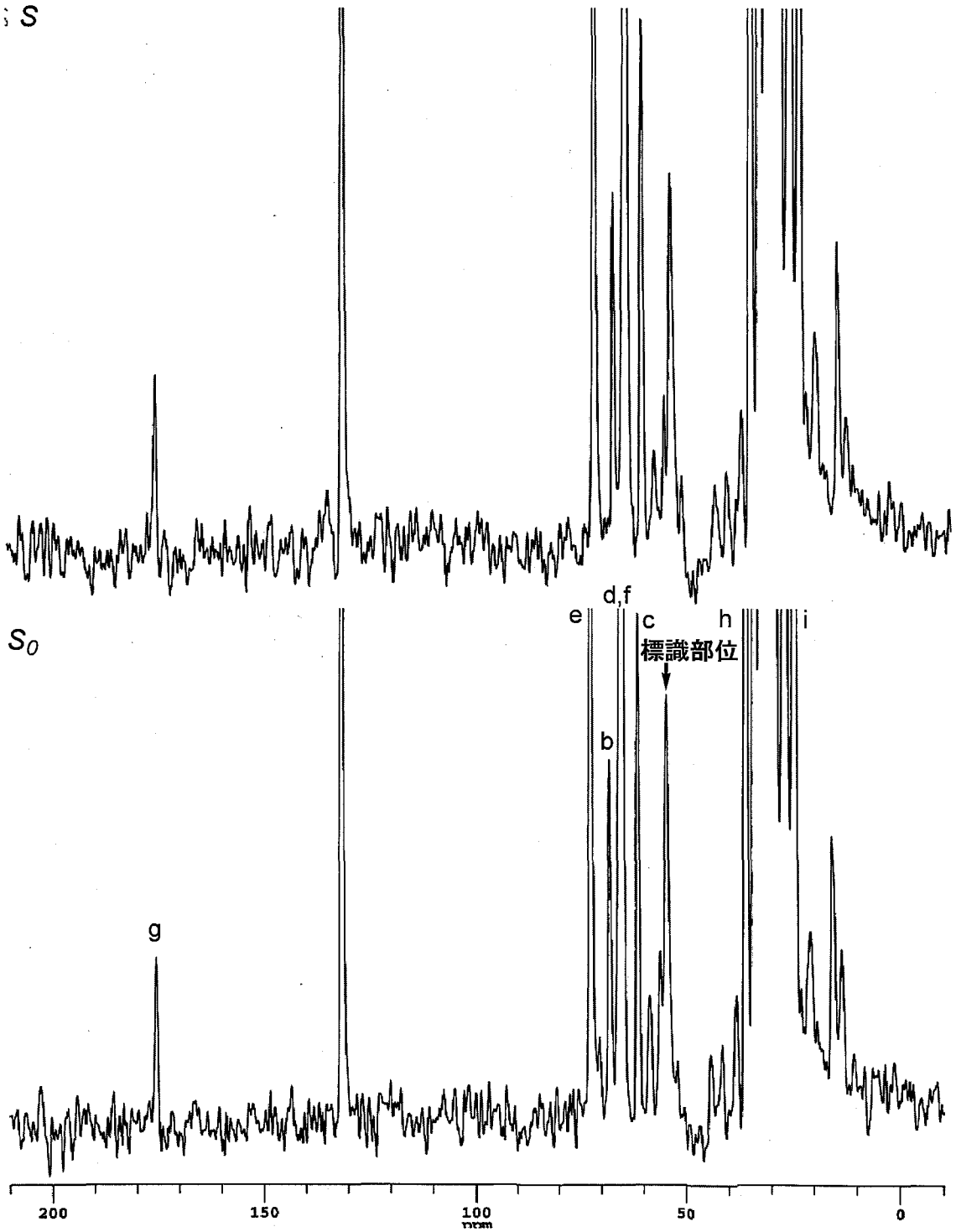
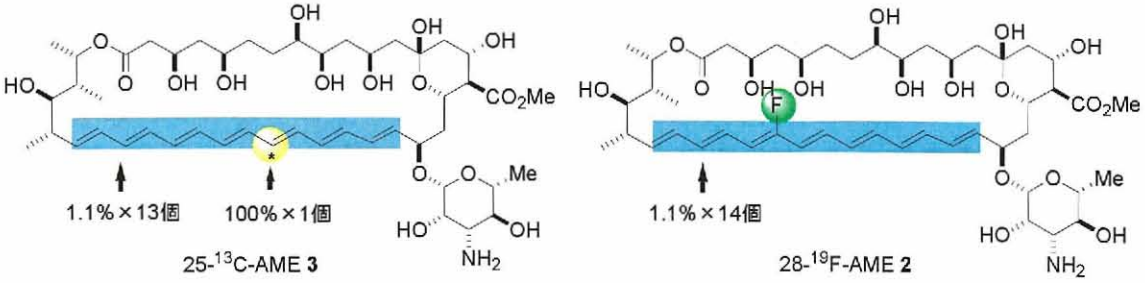


図 4-4. REDOR スペクトル（上：照射スペクトル S、下：非照射スペクトル S_0）
14-^{19}F-AME / $^{13}CH_3$-AME / Chol / POPC = 0.5 / 0.5 / 3 / 27
50% wt. in HEPES / D_2O, pH 7.0
展開時間：8.0 ms, MAS：5 kHz, 温度：30℃, 積算：22784
図中のアルファベットは POPC 由来

4-3. 14-^{19}F, ^{13}C メチルエステル間の距離測定

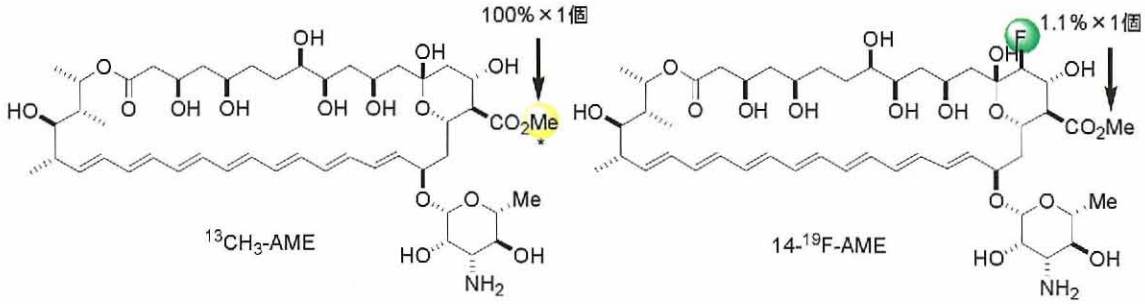
前章と同様に、横軸に展開時間、縦軸に$\Delta S/S_0$の値を取って理論曲線とのフィッティングを行うことにした[2-4]。横軸の展開時間は 4.8 ms、6.4 ms、8.0 ms の 3 点を取り、それぞれの点について$\Delta S/S_0$の値を算出した。前章では標識部位と非標識部位の^{13}C ピークが 130 ppm 付近にまとめて観測されていたため非標識部位からの寄与を考慮する必要があったが、今回の系では標識部位の^{13}C ピークが 55 ppm 付近に単独で観測されているため、フッ素標識体のメチルエステルからの分子内寄与(1.1/ 101.1)は無視してさしつかえない(図 4-5)。



ヘプタエン部分の^{13}Cシグナルが130 ppm付近にまとめて観測される

⇩

非標識部位からの^{13}Cシグナルの寄与についても考慮する必要がある



メチルエステル部分の^{13}Cシグナルは55 ppm付近に単独に観測される

⇩

非標識部位からの寄与については考慮する必要がない

図 4-5. REDOR 測定に用いたサンプルと非標識部位からの^{13}C シグナル寄与の違い

ここで考えなければならない寄与として、AME の配列からの寄与が挙げられる。14-^{19}F-AME と $^{13}CH_3$-AME が隣り合う確率は 50%であるので、$\Delta S/S_0$ の値に 50%の補正をかける必要がある。また、AME が head-to-head 構造を取っているか、head-to-tail 構造を取っているかも考慮する必要がある(図 4-6) 。AME が head-to-tail 構造を取っている時は、標識位置同士の距離が遠くなるため REDOR 減衰は起こらず、AME が head-to-head 構造を取っている時のみ REDOR 減衰が起こる。AME が head-to-head 構造を取る確率は単純に考えると 50%である。しかし、AmB が形成するイオンチャネルには整流性があることが確認されており[5)]、そこから、イオンチャネルを形成している AmB はすべて head-to-head 構造であると推察することができる。AME が AmB と同様のイオンチャネルを形成していると仮定すると、AME が形成するイオンチャネルもすべて head-to-head 構造を取っていると考えられる。よって今回の系においては AME の配列からの寄与は 14-^{19}F-AME と $^{13}CH_3$-AME が隣り合う確率(50%)のみであるとして理論値とのフィッティングを行った(図 4-7)。その結果、標識原子間の距離はおよそ 8.0 Å であることがわかった。

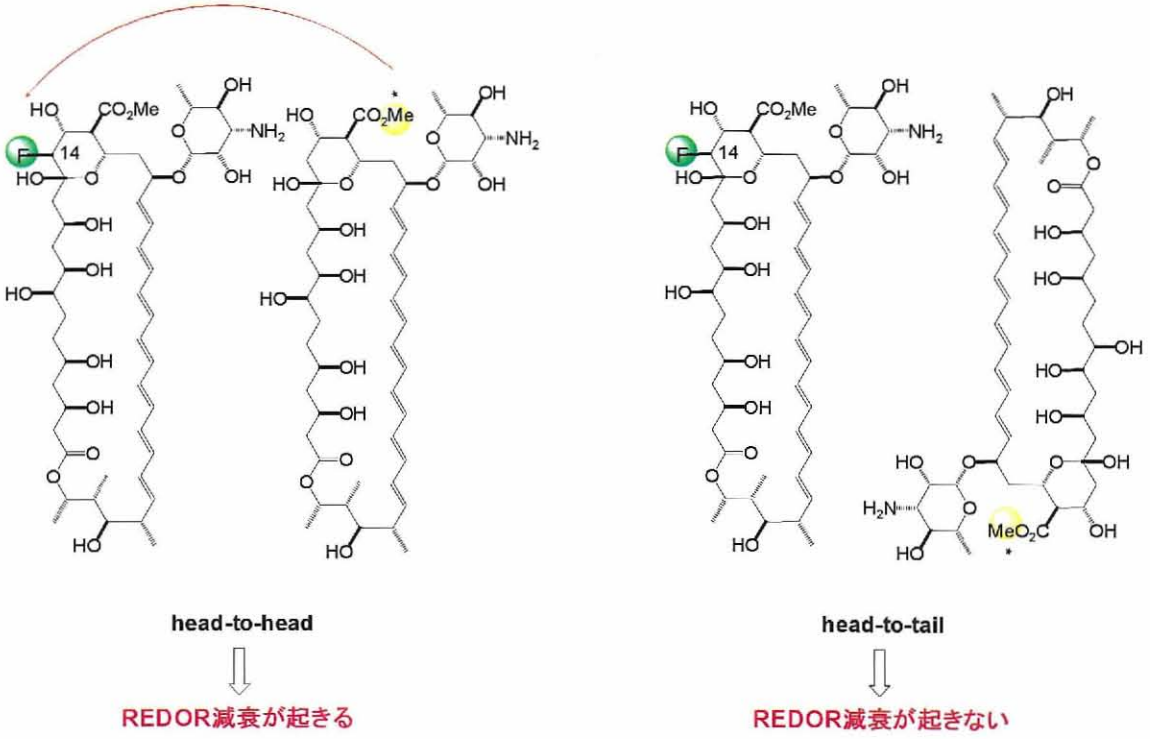


図 4-6. AME の配列と REDOR 減衰

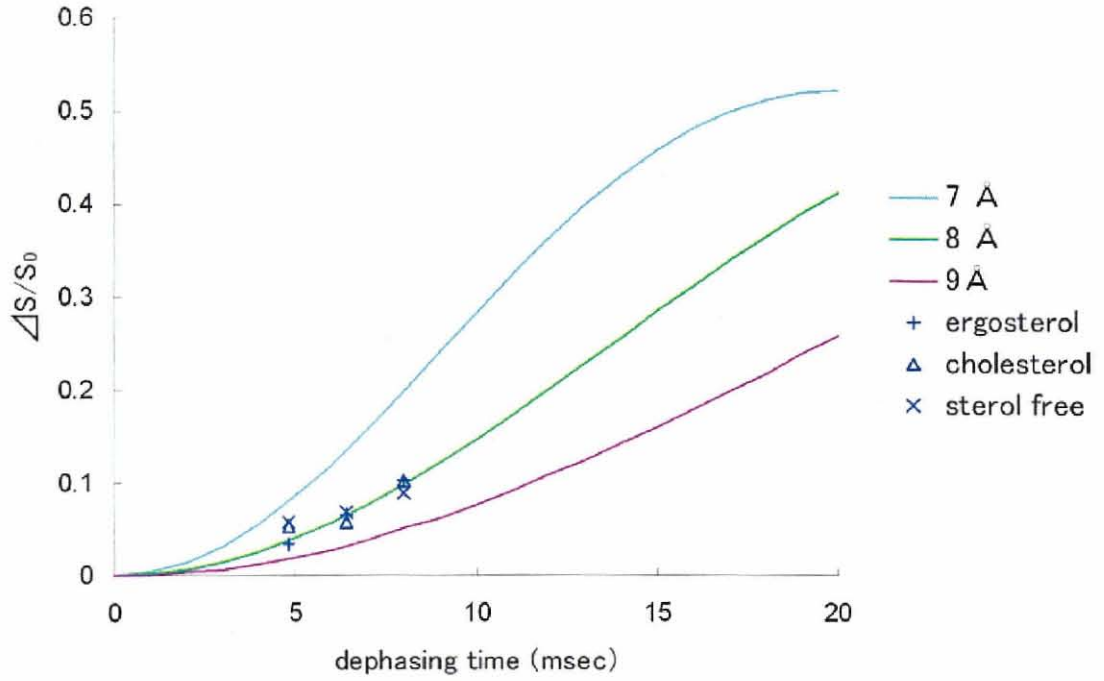


図 4-7. head-to-head 構造を取っている確率を 50%とした時の理論曲線と REDOR 減衰とのフィッティング

4-4. AME が形成するチャネル構造

前章において、チャネルの外側であるヘプタエン部位の距離測定に成功し、本章において、チャネルの内側であるポリオール部位の距離測定に成功した。チャネルを形成している AME の隣同士が平行かつ同じ高さに配列していると仮定すると、REDOR 測定により得られた二点間の距離情報より、立体構造のモデリングが可能となる。モデリングには Chem3D を用い、AME の結晶構造は X 線により得られたデータを用いた(図 4-8)[6]。また、メチルエステル部分の配座については、マクロモデルによる計算を行い、そこから得られた最安定配座を用いた。この図より、隣接する AME のポリオール部分間の距離はポリエン部分間の距離より短いことがわかり、これはこれまで提唱されていた樽板モデルに一致した結果となった。

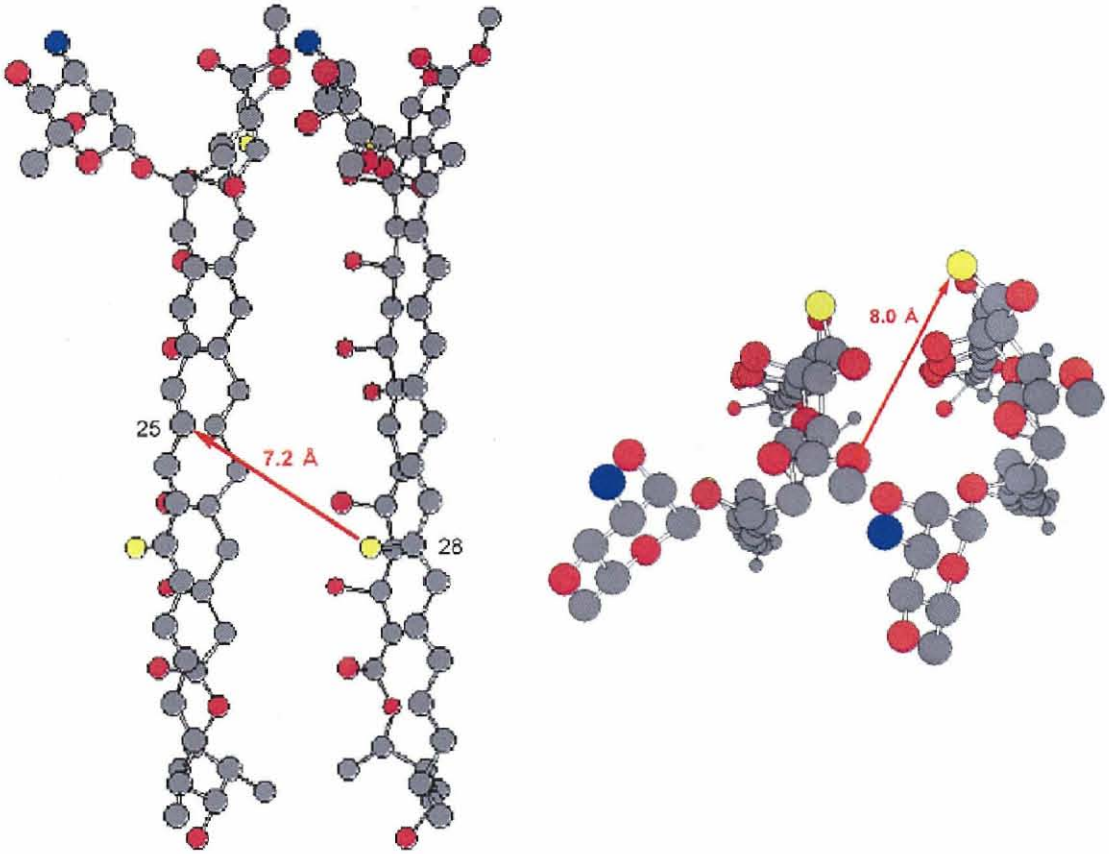


図 4-8. REDOR 測定により得られた距離情報を基にした AME 二分子間の立体配座(●・・・炭素原子、●・・・酸素原子、●・・・窒素原子、●・・・フッ素原子) 左図・・・AME 二分子を横から見た図　右図・・・上から見た図

さらに AME 分子同士の角度がおよそ 45 度となり、この角度で AME 分子を重ねていくと、八量体構造を取り(図 4-9)、この八量体チャネルにおける 14-^{19}F 間の距離は 9.6Å となった。そこからフッ素の共有結合半径(0.71Å)の 2 倍の値を差し引くとチャネルの内径が求まり、その値は 8.2Å となった。序論でも述べたように、AmB チャネルの内径はグルコース分子の大きさとほぼ同じ約 8Å であると考えられており [7]、これは今回の REDOR 測定の結果と一致した。よって AME が八量体構造でチャネル複合体を形成し、さらにチャネルの内径が約 8Å である今回のモデルは妥当と考えられる。

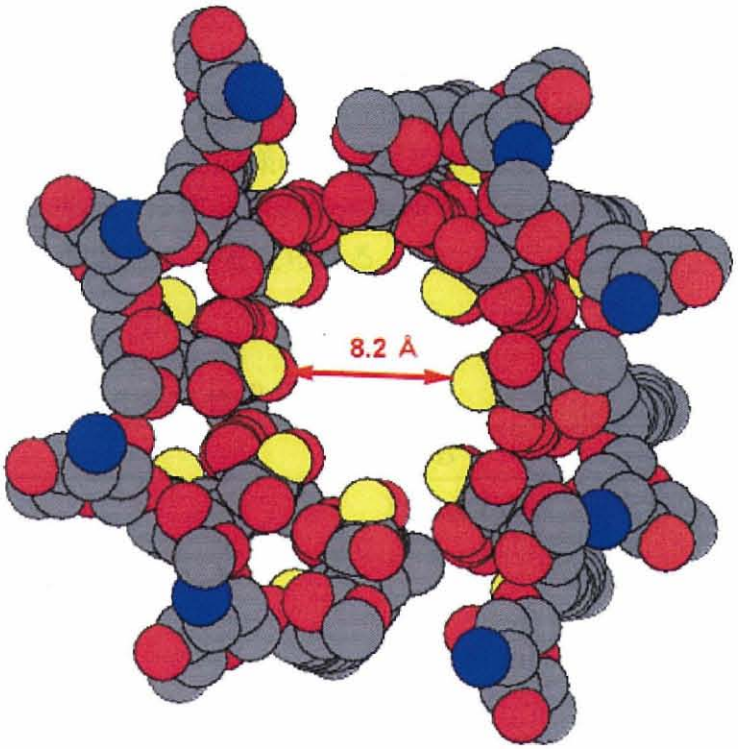


図 4-9. REDOR 測定により得られた距離情報を基にした AME チャネル構造(空間充填モデル)

4-5. 結果の考察

4-5-1. AME の生物活性について

AmB はそのカルボキシ基をメチルエステル化しても生物活性（表 4-1）やチャネル活性(図 4-10)がそれほど変化しないことが知られている[8]。また、近年 Burke らにより、AmB のカルボン酸部分や糖部分についての構造活性相関研究が行われており(図 4-11)[9]、AmB の糖部分が除去された化合物である **38**、**39** については抗真菌活性が失われているが、カルボン酸部分をメチル基に変換した化合物 **40** は抗真菌活性を保っていることがわかる。これはつまり、AmB の糖部分は生物活性に重要であるが、カルボン酸部分は生物活性にはあまり影響しないことを意味している。したがって、AmB のカルボン酸をメチルエステル化した AME においても、AmB と同様のチャネルを形成していると考えられ、固体 NMR による AmB チャネル複合体の構造解析のプローブとして、AmB ではなく AME を使用しても問題ないと考えられる。

表 4-1. AmB と AME の生物活性[8]

	AmB	AME
溶血活性 (human erythrocytes, EC_{50})	1.7 μg / ml	4.8 μg / ml
抗真菌活性 (*Candida albicans*, IC_{50})	0.03 μg / ml	0.05 μg / ml

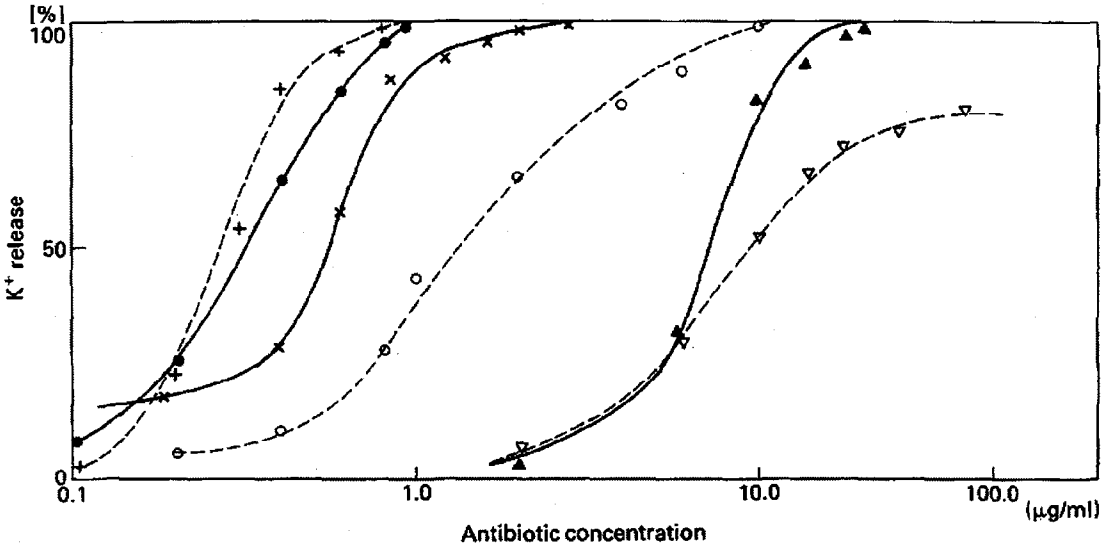


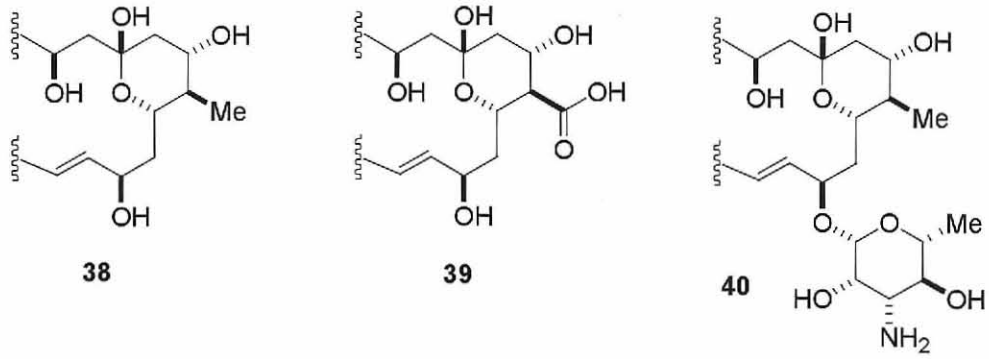
図 4-10. 種々の AmB 誘導体とチャネル活性 [8)]

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に対する AmB 誘導体の K^+流出活性

×・・・AmB、＋・・・AME、●・・・*N,N,N*-trimethyl-AME、

○・・・Amphotericin B 3-(*N',N'*-dimethylamino) propyl amide、

▲・・・*N*-acetyl-AmB、▽・・・*N*-acetyl-AME



	AmB	38	39	40
A. Disc Diffusion				
S. cerevesiae				
B. MIC (μM)				
S. cerevesiae	2	>10	>10	1
C. albicans	1	>10	>10	1

図 4-11. 種々の AmB 誘導体とその抗真菌活性 [9)]

A) ディスク拡散法による出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の薬剤感受性 (40 μg/ disc)

B) ブイヨン培地希釈法による最小発育阻止濃度(MIC 値)の測定

4-5-2. リポソームに対する結合能と膜への取り込まれ方についての考察

AME は、AmB と同等のチャネル活性を持っているが、今回行った POPC 膜中での REDOR 測定の結果を見ると、ステロールフリー膜、コレステロール含有膜、エルゴステロール含有膜において明確な差が見られなかった。すなわち、AME においてステロール選択性は失われていることが推測される。

1982 年、Bittman らはステロールを 33%含有する卵黄フォスファチジルコリン(EggPC)リポソームに対する AmB の結合定数を算出したところ、コレステロール含有膜では $Ka= 5.2\pm1.4\times10^4$、エルゴステロール含有膜では $Ka= 6.9\pm1.1\times10^5$ となり、エルゴステロール含有膜のほうが 10 倍ほど大きいと報告している[10)]。同じ文献中において、EggPC リポソームに対する AME の結合定数も算出されており、コレステロール含有膜では $Ka= 6.4\pm1.8\times10^5$、エルゴステロール含有膜では $Ka= 9.8\pm0.4\times10^5$ となり、AmB と比較すると、リポソームに対する結合能は上がっているが、ステロール選択性はかなり下がっているという結果となっていた。

AmB は秩序の高い脂質膜に分配されやすいことが知られており、液晶相(L_d 相)のリポソームよりもゲル相(S_0 相)のリポソームに高い分配を示すことが報告されている[11)]。また、ステロールはリン脂質二重膜の秩序を L_d 相ではより高く、S_0 相ではより低く変化させる[12)]。今回 REDOR 実験に用いた POPC は室温で L_d 相であり、ステロールは膜の秩序を高める方向に働く。AmB はリポソームに対する結合能が低いために、より秩序が高いリポソームに結合する傾向がある。その結果、選択毒性を発現すると考えることができる。一方、AME では、リポソームに対する結合能が元から高いため、リポソームの秩序を認識すること無く分配できる。そのため、結果としてステロール選択性が低くなっていると考えられる。また、AmB が膜表面に分配されると、そこから膜中に取り込まれてチャネル複合体を形成する分子と、再び膜の外に抜けていく分子が平衡して存在しており、ステロールフリーのリポソームでは平衡は膜の外に抜けていく方に偏る(図 4-12a)[13)]。一方、エルゴステロール含有リポソームでは、AmB とエルゴステロールが相互作用することにより、イオンチャネル複合体が安定化されるため、平衡はチャネル複合体の形成に偏る(図 4-12c)。すなわち、AmB は、膜に分配される際にもステロール選択性を発現し、膜に分配されてからイオンチャネル複合体を形成する際にもステロール選択性を発現しており、結果として、エルゴステロール含有膜において選択毒性を発現すると考えられる。一方、AME では、REDOR 実験においてステロールの有無や種類で標識原子間の距離に有意な差が見られなかったことから、AME はイオンチャネル複合体が膜中において安定に存在しており、そのチャネル複合体には、ステロールは関与していない

と考えられる。すなわち、AME においては、膜に分配される際にもステロール選択性が見られず、イオンチャネル複合体を形成する際にもステロール選択性が見られないと言える。これらの事をまとめると、以下のようになる。

1. AmB または AME が脂質膜中でイオンチャネル複合体を形成する際には、水中から膜への分配、膜への分配からチャネル複合体の形成という 2 つの平衡から成り立っている。
2. AmB では、エルゴステロール含有膜のみ平衡がチャネル複合体の形成に偏っているが、AME では、ステロールの有無や種類によらず、平衡がチャネル複合体に偏っており、膜中で安定に存在している。

AME を分子プローブとして用いた場合、チャネル複合体形成時にステロールは関与していないことから、チャネル複合体形成時にステロールが関与しているとされる AmB-エルゴステロールの複合体(図 4-12c 右)についての議論はできないと考えられる。しかし、AmB-コレステロールの系(図 4-12b 右)や、ステロールフリーの系(図 4-12a 右)おいては、チャネル複合体形成時にステロールが関与しておらず、AME と同様のチャネル複合体を形成していると考えられるため、AME を分子プローブとして用いることができる。

次に、リポソーム内での AmB と AMB の会合状態について議論する。

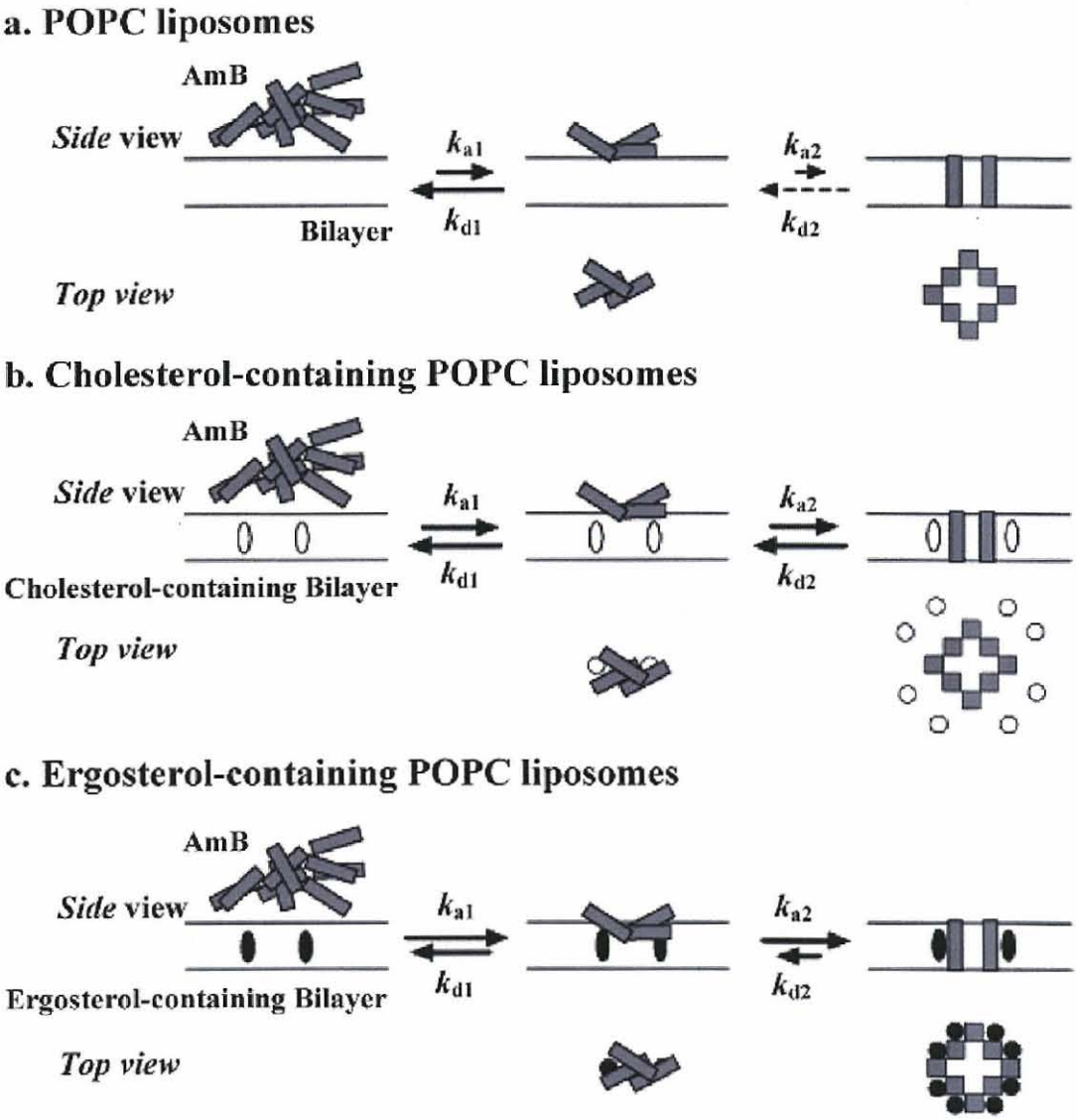


図 4-12. AmB が形成するイオンチャネルにおけるステロールの役割 [13)]
a) ステロールフリー膜、b) コレステロール含有膜、c) エルゴステロール含有膜

4-5-3. リポソーム中における AmB と AME の会合状態

当研究室では POPC リポソーム中での AmB または AME の UV スペクトルを測定している(図 4-13、4-14)。UV スペクトルは AmB 分子の会合状態依存的に変化することが知られており、AmB の会合状態を調べるパラメータとなっている [14)]。すなわち、AmB がモノマーの状態でリポソーム外に存在していると 409 nm、385 nm、365 nm にヘプタエン特有の吸収を示す。しかし、リポソーム内に取り込まれ、周囲が疎水的な環境になると、極大吸収波長がわずかに長波長側にシフトする。また、AmB 分子間のヘプタエン同士の距離が非常に近づくと(4.6 Å以内)、330 nm-340 nm にかけて吸収極大が現れる [14-16)]。この吸収帯は、AmB チャネル会合体が集合してリン脂質から相分離した大きな集合体に由来するものと考えられており、チャネルを形成しないとされている。

図 4-13 では POPC リポソーム中での AmB の UV スペクトルを示しているが、ステロールフリー、エルゴステロール、コレステロール含有膜でそれぞれ顕著な差が見られることがわかる。ステロールフリー膜においては 409 nm に見られるモノマー由来の極大吸収波長が長波長シフトしていないことから、AmB は膜に入っていないと推測される。コレステロール含有膜においては、膜に入っていない AmB と膜中で大きな会合体を形成している AmB が混在していると考えられる。エルゴステロール含有膜では、大きな会合体由来の吸収波長が長波長シフトしていることから、大きな会合体を形成しているヘプタエン間の距離が離れたこと、また、モノマー由来の吸収波長が長波長シフトしているので膜に取り込まれたことが考えられる。すなわち、エルゴステロール含有膜において AmB が膜中に取り込まれやすくなっており、これがイオンチャネル複合体形成におけるステロール選択性の発現につながっていると推察される。

一方、図 4-14 では POPC リポソーム中での AME の UV スペクトルを示している。図 4-13 と見比べると明らかなように、ステロールの種類や有無に関わらず、極大吸収波長が 411-412 nm となっていることから、すべての AME 分子が膜中に取り込まれている。また、330-340 nm の吸収がほとんど現れていないことから、ヘプタエンの距離が 4.6Å以上の状態で存在していることがわかる。これらのことから、やはり AME は AmB よりも脂質膜に取り込まれやすいことが示唆された。さらに、膜に取り込まれた後も大きな会合体を形成しないことから、AME を用いた REDOR 測定においては、チャネル複合体形成時の ^{19}F-^{13}C 間を選択的に観測できていると期待できる。また、前述したように POPC リポソームを用いた場合、AmB と AME の K^+透過活性試験を行うことが可能である。K^+透過活性試験の結果、やはり AmB ではステロール選択性が見られ、AME では選択性が見られなかった。だが、AME においてステロールの有無、種類にか

わらずチャネル活性は確認された。したがって、AmB が形成するチャネル複合体の構造解明のためのプローブとして AME を用いても問題ないと考えられる。

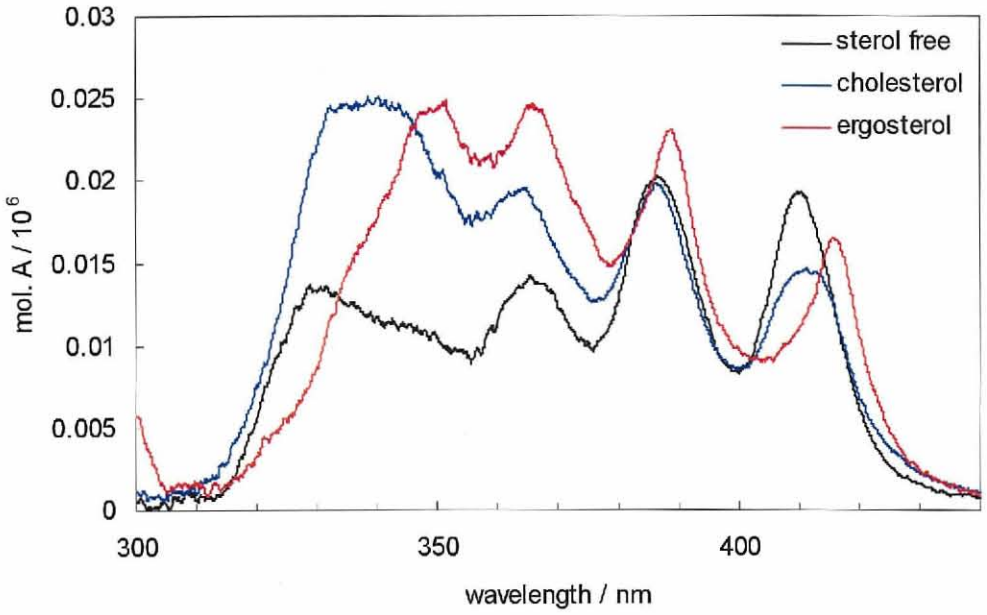


図 4-10. POPC リポソーム中における AmB の UV スペクトル
(R = AmB/ lipid = 10^{-2}、AmB 濃度 1.67 μM)

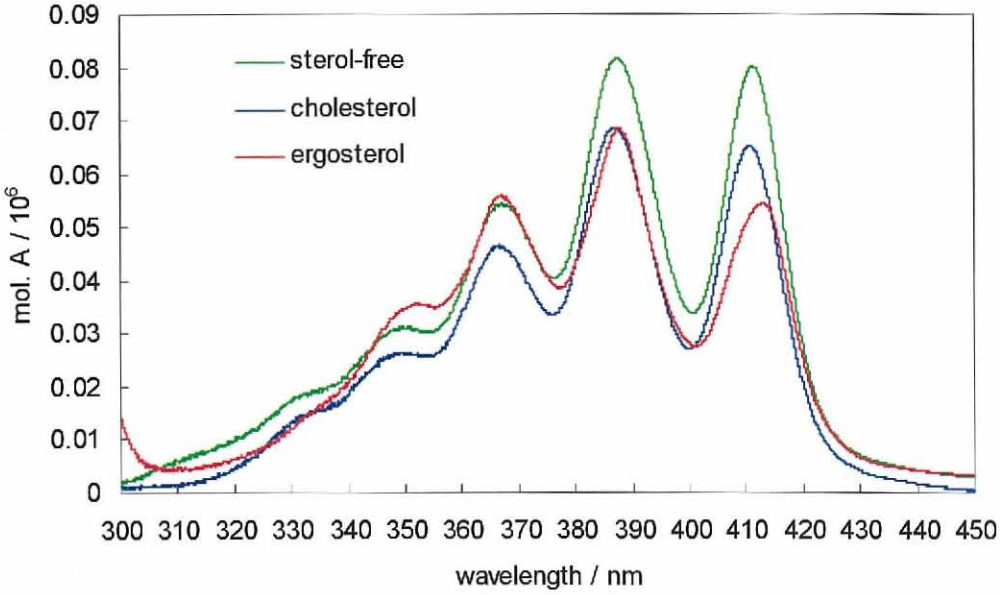


図 4-11. POPC リポソーム中における AME の UV スペクトル
(R = AmB/ lipid = 10^{-2}、AmB 濃度 1.67 μM)

4-5-4. 考察のまとめ

REDOR 測定、UV スペクトル、K^+透過活性試験の結果から AME にステロール選択性は見られなかったため、AME を用いて AmB のステロール選択性を解明することは困難であると考えられる。しかし、AME はステロールの有無に関わらずチャネル複合体を形成しており、チャネル複合体形成時にステロールが関与していない AmB-コレステロールの系や、AmB-ステロールフリーの系おいては AME を分子プローブとして用いることができる。

コレステロールは脂質膜中への AmB の取り込みは促進するが、取り込まれた AmB によるイオンチャネルの形成は阻害するという結果が当研究室において確認されている [16)]。つまり、コレステロール含有膜中におけるイオンチャネル形成にステロールは関与しておらず、ステロールフリーの状態でチャネルを形成することを示唆している。よって、AME でのステロールフリー膜におけるイオンチャネルは、AmB のコレステロール含有膜におけるイオンチャネルを再現していると推察される。また、AME を用いると脂質膜に取り込まれやすくなり、さらにチャネル不活性である大きな会合体を形成しないことからイオンチャネル複合体の構造を選択的に見ている可能性が高いと期待される。

今回の REDOR 測定結果から、ステロール含有 POPC 膜中で、AME の 25-^{13}C と 28-^{19}F 間の距離が 7.2Å であることが確かめられた(第三章)。また、14-^{19}F と $^{13}CH_3$ 間の距離が 8.0Å であることが確かめられ(第四章)、これらの距離情報を基にチャネル複合体の構造解析を行ったところ、これまでに提唱されてきた樽板モデルと一致する結果となった。今回 ^{13}C-^{19}F 間の距離測定に用いた標識体はどちらも 100%標識化されているので正確な距離情報であると考えられる。先程も述べたように、この AME が形成している樽板モデルは、AmB のコレステロール含有膜におけるイオンチャネルをある程度再現していると期待される。

第五章　結論

天然のアンフォテリシンBを分解して調製したC1-C21セグメントと、化学合成したフッ素標識化または^{13}C標識化C22-C37セグメントをStilleカップリングにより連結し、さらにマクロラクトン化を行うことで、28位にフッ素原子が、25位に^{13}C原子が導入されたアンフォテリシンBメチルエステルの合成に成功した。天然物からの分解と化学合成を組み合わせた新しい分子プローブ合成法は、全合成よりも効率的であり、天然物の誘導化のみでは得られない化合物、すなわち、位置特異的に100%の標識率でラベルされた誘導体を調製することに適している。今後、この方法論を用いて、多くの誘導体が調製されることが期待される。

調製した28位フッ化アンフォテリシンBメチルエステルと25位^{13}C標識化アンフォテリシンBメチルエステルを用いた固体NMR測定により、AmB分子同士のヘプタエン間距離を直接観測することができた。また、14位フッ化アンフォテリシンBメチルエステルと$^{13}CH_3$標識化アンフォテリシンBメチルエステルを用いた固体NMR測定も同様に行い、ポリオール間距離も観測することに成功した。得られた二点間の距離情報を基に、チャネル複合体の構造解析を行った結果、AMEは八量体でチャネルを形成しており、そのチャネルの内径は8.2Åであった。チャネル活性試験、UVスペクトルの結果からこの距離はコレステロール含有膜中でのAmB－イオンチャネル複合体形成時の距離を反映しており、この距離情報はAmBイオンチャネル複合体の構造解明へ向けての大きな一歩であると期待される。

参考文献

1) Matsumori, N.; Umegawa, Y.; Oishi, T.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3565–3567.
2) Gullion, T.; Schaefer, J. *Adv. Magn. Reson.* **1989**, *13*, 57-83.
3) Gullion, T.; Schaefer, J. *J. Magn. Reson.* **1989**, *81*, 196-200.
4) Mueller, K. T. *J. Magn. Reson.* **1995**, *113*, 81-93.
5) Asandei, A.; Luchian, T. *Colloids Surf., B* **2008**, *67*, 99-106.
6) Ganis, P.; Avitabile, G.; Mechlinski, W.; Shaffner, C. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4560-4564.
7) Cass, A.; Finkelstein, A.; Krespi, V. *J. Gen. Physiol.* **1970**, *56*, 100-124.
8) Chéron, M.; Cybulska, B.; Mazerski, J.; Grzybowska, J.; Czerwiński, A.; Borowski, E. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 827-836.
9) Palacios, D. S.; Anderson, T. M.; Burke, M. D. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 13804–13805.
10) Readio, J. D.; Bittman, R. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *685*, 219-224.
11) Bolard, J.; Vertut-Croquin, A.; Cybulska, B. E.; Gary-Bobo, C. M. *Biochim. Biophys. Acta.* **1981,** *647*, 241-248.
12) Hubbell, W. L.; McConnell, H. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 314.
13) Mouri, R.; Konoki, K.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. *BioChemistry* **2008**, *47*, 7807–7815.
14) Fujii, G.; Chang, J. E.; Coley, T.; Steere, B. *Biochemistry* **1997**, *36*, 4959-4968.
15) Erunst, C.; Tang, M. *Biopolymers*, **1981**, *20,* 1575-1588.
16) Gruszecki, W. I.; Gagos, M.; Hrec, M. *J. Photochem. Photobio. B* **2003**, *69*, 49-57.
17) Matsuoka, S.; Murata, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1564*, 429-434.

第六章　実験の部

一般的事項

試薬および溶媒

反応は特に記載のない限りアルゴン雰囲気下で行い、溶媒は市販のものを活性化させたモレキュラシーブス 4 Å (solid)で乾燥させたものを用いた。その他の試薬は、特に記載しない限り、市販のものをそのまま用いた。

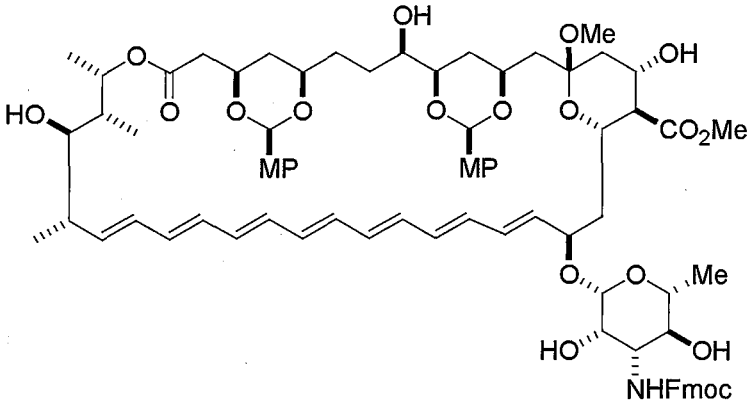
クロマトグラフィー

薄層クロマトグラフィーは、Merck Kieselgel 60F-254 plates (0.25 mm)を用いた。シリカゲルカラムクロマトグラフィーには、Merck Silica gel 60 (40 ~ 60 μm)および関東化学 Silica gel 60 N (100 ~ 210 μm)を用いた。フロリジールは和光純薬 Florisil®(75 ～ 150 μm)を用いた。

機器分析法

NMR スペクトルは、JEOL 社製 GSX-500 (^{1}H NMR: 500 MHz, ^{13}C{^{1}H} NMR: 125.7 Hz)を用いて測定した。NMR 測定溶媒として $CDCl_3$ または DMSO-d_6 を用いた。質量分析には、サーモクェスト社製 LCQ DECA を用いた。赤外吸収スペクトルは、JASCO 社製の FT/IR-300E を用い、測定法は、液膜法、もしくは KBr 法により測定した。HPLC は、島津製作所製の SCL-10Avp, SPD-M10Avp, LC-10Avp, DGS-12A からなる装置を使用し、カラムは、ナカライテスク製の COSMOSIL 5C_{18}-MS-α を使用した。可視紫外分光光度計は島津製作所製の UV-2500PC を使用した。ボルテクスミキサーは Scientific Industries VOLTEX-2GENIE を用い、超音波洗浄器はヤマト社製 BRANSON 1510 を使用した。

^{1}H NMR の化学シフトは、溶媒のシグナルを内部基準 ($CHCl_3$: δ 7.24)としたときの値 (δ ppm)で示した。^{13}C NMR の化学シフトは、溶媒のシグナルを内部基準 ($CDCl_3$: δ 77.0)としたときの値 (δ ppm)で示した。



$C_{80}H_{99}NO_{21}$
Exact Mass: 1409.67
Mol. Wt.: 1410.64

p-メトキシベンジリデンアセタール **11**

Note No.: 4-NM-20

トルエン共沸により乾燥させた *N*-Fmoc-AmB methyl ester **10** (2.7 g, 2.33 mmol) をメタノール (62 ml) と *p*-メトキシベンズアルデヒドジメチルアセタール (7.3 ml) に溶かし、CSA (58 mg, 0.23 mmol) を加え、室温で 50 分間攪拌した。反応溶液を 0 °C に冷却して飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1: 20 メタノール/クロロホルム) で精製し、*p*-メトキシベンジリデンアセタール体 **11**(2.8 g, 86%)を黄色固体として得た。

Yellow solid

R_f = 0.54 (silica, chloroform/methanol = 10/1)

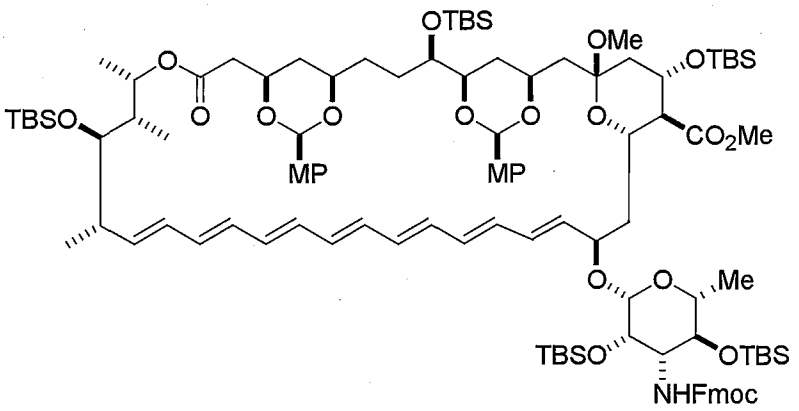
$[\alpha]_D^{25.5}$ +93.9 (*c* 0.08, $CHCl_3$)

^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$) δ 7.75 (2H, d, *J* = 7.5 Hz, Fmoc), 7.58 (2H, m, Fmoc), 7.29-7.39 (6H, m, Fmoc, MP), 7.31 (2H, t, *J* = 7.5Hz, Fmoc), 6.86-6.84 (4H, m, MP), 6.19-6.26 (12H, m, H21-H32), 5.79 (1H, dd, *J* = 15.0, 5.5Hz, H20), 5.65 (1H, d, *J* = 8.0Hz, H1'), 5.44 (1H, s, 3,5-MP acetal), 5.42 (1H, dd, *J* = 14.5, 10.0 Hz, H33), 5.42 (1H, s, 9,11-MP acetal), 5.21 (1H, m, H37), 4.57 (1H, m, H19), 4.52 (1H, m, NH), 4.42 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, Fmoc), 4.21 (1H, t, *J* = 7.0 Hz, Fmoc), 4.13-4.18 (1H, m, H3, H15), 3.88 (1H, m, H17), 3.79-3.83 (2H, m, H8, H11), 3.78 (3H, s, MeO), 3.75 (3H, s, MeO), 3.72 (3H, s, COOMe), 3.60-3.68 (3H, m, H9, H5, H2'), 3.21-3.45 (4H, m, H4', H5', H35, H3'), 3.00 (3H, s, MeO), 2.64 (0.5H, dd, *J* = 14.5, 6.0Hz, H2a), 2.39 (1H, m, H34), 2.27-2.34 (2H, m, H2b, H16), 1.91-1.98 (1H, m, H18), 1.77-1.82 (2H, m, H18, H36), 1.70 (1H, m, H7), 1.48 (1H, m, H6), 1.33-1.39 (2H, m, H14, H10), 1.31 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, H6'), 1.18 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, 38Me), 1.10 (3H, d, *J* = 7.0Hz, 40Me), 0.99 (3H, d, *J* = 7.0Hz, 39Me); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 173.0, 171.2, 169.3, 159.9, 159.8, 158.1, 143.7, 141.3, 135.8, 134.0, 133.3, 133.1, 133.0, 132.8, 132.6, 132.4, 132.1, 131.9,

130.9, 130.5, 127.8, 127.4, 127.2, 127.1, 125.0, 120.0, 113.6, 113.5, 100.6, 100.3, 100.0, 97.2, 80.0, 78.3, 76.0, 75.1, 73.5, 73.2, 72.6, 72.1, 70.1, 69.8, 67.3, 66.9, 66.3, 60.4, 56.5, 55.5, 55.3, 52.2, 51.1, 48.2, 47.1, 42.3, 41.7, 40.9, 40.7, 37.0, 36.5, 32.7, 32.6, 28.1, 21.0, 18.3, 17.6, 17.1, 14.2, 11.4.

IR (neat) ν 3442, 3011, 2937, 2879, 2838, 1717, 1615, 1517, 1450, 14371374, 1342, 1303, 1249, 1171, 1070, 1030, 1009, 913, 828, 757, 666 cm^{-1}

MS (ESI) *m/z* calcd for $C_{80}H_{99}NO_{21}$ ($M+Na^+$) 1432, found 1432.



$C_{110}H_{169}NO_{21}Si_5$
Exact Mass: 1980.10335
Mol. Wt.: 1981.94046

5TBS エーテル

Note No.: 5-NM-27

トルエン共沸により乾燥させた*p*-メトキシベンジリデンアセタール **11** (2.7 g, 1.91 mmol) をジクロロメタン(65 ml)に溶かし、2,6-ルチジン (2.7 ml, 22.88 mmol) と TBSOTf (3.7 ml, 16.21 mmol)を加え、0 °C で 1 時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、エーテルで抽出した。有機層を 0.25M の塩酸 (100 ml x3)、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:10 酢酸エチル/ヘキサン) で精製し、5TBS エーテルを得た (3.35 g, 89%)。

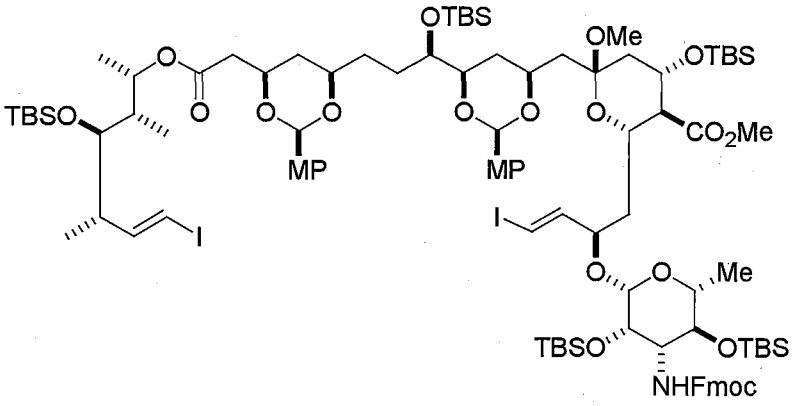
Yellow amorphous solid

R_f = 0.37 (silica gel, hexane/AcOEt=5/1)

$[\alpha]_D^{25.5}$ +53.4 (*c* 0.12, $CHCl_3$)

^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$) δ 7.73 (2H, d, *J* = 7.0 Hz, Fmoc), 7.56 (2H, m, Fmoc), 7.37-7.32 (6H, m, Fmoc, MP), 7.27 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, Fmoc), 6.80 (4H, dd, *J* = 20.5, 8.5 Hz, MP), 6.22-6.01 (12H, m, H21-32), 5.73 (1H, dd, *J* = 14.5, 7.0 Hz, H20), 5.54 (1H, dd, *J* = 15.0, 9.0 Hz, 33H), 5.43 (1H, s, 3,5-MP acetal), 5.37 (1H, s, 9,11-MP acetal), 4.88-4.87 (2H, m), 4.35-4.32 (2H, m), 4.16 (2H, m), 3.81(1H, m), 3.76(6H, s, OMe), 3.66 (3H, s, COOMe), 3.60 (2H, m), 3.33 (1H, t, *J* = 9.5 Hz), 3.23(1H, m),

2.99(3H, s, COOMe), 2.59 (1H, dd, J = 17.5, 7.5 Hz, H16), 2.33(2H, t, J = 10.5 Hz, H2), 2.24-2.18 (2H, m), 1.85-1.46 (5H, m), 1.21 (3H, d, J = 6.5 Hz, H6'), 1.18 (3H, d, J = 6.5 Hz, 38Me), 0.97 (3H, d, J = 6.5 Hz, 40Me), 0.91-0.73 (m, TBS), 0.08--1.67 (30H, m, TBS); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 173.0, 171.1, 169.7, 159.7, 159.6, 155.6, 144.0, 143.9, 141.3, 135.8, 133.6, 133.5, 133.3, 133.1, 132.7, 132.5, 132.2, 132.0, 131.8, 131.3, 131.2, 130.4, 130.0, 127.6, 127.3, 127.0, 119.9, 113.4, 113.2, 100.5, 100.1, 99.9, 98.1, 80.2, 75.7, 75.3, 74.0, 73.4, 72.4, 72.3, 72.2, 67.9, 66.9, 66.7, 60.3, 57.2, 55.8, 55.2, 51.7, 47.9, 47.1, 43.1, 42.4, 40.6, 37.1, 36.3, 32.2, 31.8, 27.0, 26.0, 25.7, 25.5, 21.0, 18.8, 18.3, 18.2, 17.9, 17.8, 17.7, 14.2, -3.6, -4.0, -4.2, -4.3, -4.4, -4.6, -5.3, -5.4.
IR (neat) ν 3457, 2953, 2930, 2886, 2857, 1734, 1700, 1607, 1517, 1472, 1464, 1388, 1303, 1253, 1170, 1078, 939, 837, 777, 740, 668 cm^{-1}
MS (ESI) *m/z* calcd for $C_{110}H_{169}NO_{21}Si_5$ ($M+H^+$) 1981, found 1981.



$C_{100}H_{159}I_2NO_{21}Si_5$
Exact Mass: 2103.83405
Mol. Wt.: 2105.56300

ビス-(ヨードオレフィン)
Note No.: 5-NM-28

5-TBS エーテル（3.3 g, 1.17 mmol）をジクロロメタン（333 ml）とメタノール（22 ml）に溶かし、-78 °C でオゾンを 80 分間バブリングした。その後、酸素を 10 分バブリングし、トリフェニルホスフィン（8.7 g, 33.30 mmol）を加えた後、1 時間かけて室温まで昇温した。溶媒を減圧留去し、残渣をそのままシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:10-1:3 酢酸エチル/ヘキサン) で精製し、ジアルデヒド（2.0 g, 65%）を無色無定形固体として得た。これをトルエン共沸により乾燥させ、すぐに次の反応に用いた。スターラーバー入りの 100 ml ナス型フラスコに、グローブボックス内で秤量した塩化クロム(II) (3.2 g, 25.84 mmol) を移し、減圧下 10 分間ヒートガンで乾燥させた。アルゴン雰囲気下室温に戻し、直前にベンゾフェノンケチルで蒸留した THF（50 ml）を加えて 0 °C に冷却した。この溶液に対し、ヨードホルム（1.7 g, 4.31 mmol）とジアルデヒド（2.0 g, 1.08 mmol）の THF（50 ml）溶液を加え、0 °C で 10 分、その後室温で 18 時間攪拌した。0 °C

に冷却して飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止し、エーテルで抽出した。有機層を飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:0-1:3 酢酸エチル/ヘキサン) で精製し、ビス-(ヨードオレフィン) (1.4 g, 63%) を無色無定形固体として得た。

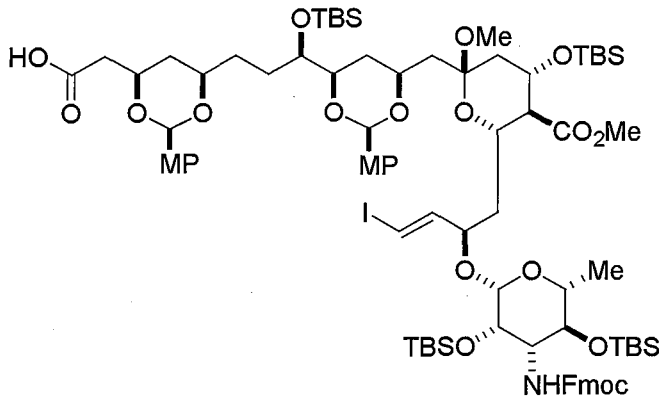
Colorless amorphous

R_f = 0.42(silica gel, hexane/AcOEt=4/1)

$[\alpha]_D^{26.4}$–3.6° (*c* 0.14, $CHCl_3$)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.73 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, Fmoc), 7.56 (2H, m, Fmoc), 7.38-7.33 (6H, m, Fmoc, MP), 7.29 (2H, t, *J* = 8.0 Hz, Fmoc), 6.81 (4H, dd, *J* = 19.5, 8.5 Hz, MP), 6.61 (1H, d, *J* = 14.5 Hz, H20), 6.50-6.43 (1H, m), 6.32 (1H, d, *J* = 14.5 Hz, H21), 6.00 (1H, d, *J* = 14.5 Hz, H32), 5.06 (1H, dq, *J* = 6.0 Hz, H37), 4.80 (1H, d, *J* = 10.0 Hz, NH), 5.48 (1H, s, 3,5-MP acetal), 5.44 (1H, s, 9,11-MP acetal), 5.09 (1H, t, *J* = 6.5 Hz), 4.80 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 4.44-4.40 (2H, m), 4.34-4.14 (4H, m), 3.79(3H, s), 3.76(6H, s, OMe), 3.64 (3H, s), 3.48-3.44 (2H, m), 3.33 (1H, t, *J* = 9.5 Hz), 3.23(1H, m), 3.04 (3H, s), 2.59 (1H, m), 2.33 (2H, t, *J* = 10.5 Hz, H2), 2.24-2.18 (2H, m), 1.22 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H6'), 1.19 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, 38Me), 1.12 (3H, d, *J* = 5.5 Hz), 0.94 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, 40Me), 0.89-0.74 (m, TBS), 0.05—0.13 (30H, m, TBS);

IR (film) ν 2952, 2933, 2886, 2857, 1734, 1617, 1517, 1472, 1374, 1251, 1107, 1079, 1036, 837, 776 cm^{-1}.



$C_{85}H_{130}INO_{20}Si_4$
Exact Mass: 1723.73
Mol. Wt.: 1725.18

C1-C21 セグメント **5**

Note No.: 5-NM-29

ジヨードオレフィン体 (1.4 g, 0.65 mmol) を THF (107 ml)、水 (54 ml)、メタノール (36 ml) の混合溶媒に溶かし、水酸化リチウム 1 水和物 (2.8 g, 65.88 mmol) を加えて室温で 24 時間攪拌した。0 °C に冷却して飽和塩化アンモニウム水溶液

で反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより粗精製し、そのまま次の反応に用いた。残渣をトルエン共沸により脱水した後、DMF（29 ml）に溶かし、ピリジン（2.3 ml, 29.04 mmol）および9-フルオレニルメチルスクシンイミジルカーボネート（2.8 g, 8.21 mmol）を加えて室温で11時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液で反応を停止し、エーテルで抽出した。有機層を 0.25M の塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:5-1:1 酢酸エチル/ヘキサン) で精製し、C1-C21 セグメント **5** を副生成物との混合物として得た。これを HPLC 用クロロホルム（1.5 ml）に溶かし、LC918 を用いたゲルろ過（JAIGEL-2H, $CHCl_3$, 4 ml /min, 268 nm, 0.3 ml ずつインジェクト）により精製し、C1-C21 セグメント **5**（571 mg, 81% 二段階）を白色固体として得た。

White solid

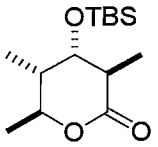
R_f = 0.28 (silica gel, ethyl acetate/hexane = 1/1)

$[\alpha]_D^{24}$ +1.7 (*c* 0.57, $CHCl_3$)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.74 (2H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.55 (2H, t, *J* = 7.0 Hz), 7.39-7.33 (6H, m), 7.29 (2H, t, *J* = 7.5 Hz), 6.82 (4H, dd, *J* = 27.0, 8.5 Hz), 6.47 (1H, dd, *J* = 15.0, 8.0 Hz), 6.32 (1H, d, *J* = 14.5 Hz), 5.50 (1H, s), 5.44 (1H, s), 4.81 (1H, d, *J* = 10.0 Hz), 4.55 (0.5H, d, *J* = 7.5 Hz), 4.50 (1H, d, *J* = 6.5 Hz), 4.42 (0.5H, d, *J* = 7.5 Hz), 4.35-4.32 (2H, m), 4.26-4.16 (4H, m), 4.04 (1H, d, 6.0 Hz), 3.77 (3H, s), 3.76 (3H, s), 3.81-3.73 (2H, m), 3.64 (3H, s), 3.61-3.57 (3H, m), 3.29 (1H, t, *J* = 8.5 Hz), 3.21 (1H, m), 3.05 (3H, s), 2.73 (1H, dd, *J* = 16.0, 7.0 Hz), 2.57 (1H, dd, *J* = 11.0, 5.5 Hz), 2.23-2.16 (2H, m), 1.95 (1H, d, *J* = 15.0Hz), 1.81-1.70 (4H, m), 1.57 (2H, m), 1.49 (2H, m), 1.21 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 0.86 (9H, s), 0.85 (9H, s), 0.80 (9H, s), 0.74 (9H, s), 0.03-0.00 (6H, m), -0.08--0.13 (12H, m); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 173.5, 173.1, 172.7, 155.6, 155.4, 146.0, 143.7, 141.2, 127.5, 126.9, 124.7, 119.8, 118.1, 110.7, 110.3, 100.6, 100.4, 99.3, 99.2, 80.7, 79.4, 79.2, 79.1, 78.9, 78.8, 74.2, 73.9, 72.3, 72.2, 72.1, 70.4, 69.8, 67.4, 67.3, 66.8, 66.7, 66.4, 66.3, 57.4, 57.1, 51.6, 48.0, 47.8, 47.1, 42.9, 42.4, 41.8, 40.8, 40.5, 40.3, 38.9, 37.5, 36.3, 32.4, 32.0, 31.6, 31.3, 29.7, 27.7, 27.5, 26.0, 25.6, 24.8, 24.4, 23.4, 22.8, 22.4, 18.8, 18.4, 18.3, 18.0, 17.7, -3.6, -3.8, -4.1, -4.5, -5.0, -5.2.

IR (film) ν 3401, 2957, 2926, 2871, 2853, 1653, 1558, 1506, 1457, 1419, 1376, 1340, 1292, 1180, 1072, 999, 959, 864, 660, 598 cm^{-1}

HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd for $C_{85}H_{130}INO_{20}Si_4Na$ [M+Na$^+$] 1746.7200, found: 1746.7130.



$C_{14}H_{28}O_3Si$
Exact Mass: 272.18
Mol. Wt.: 272.46

TBS エーテル **15**

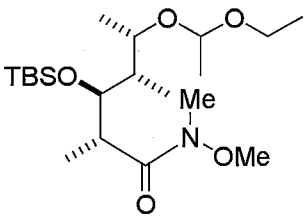
Note No.: 4-NM-30

アルコール **14**(2.1 g, 13.15 mmol)をジクロロメタン(87 ml)に溶かし、-40 °C に冷却した。そこに 2,6-Lutidine(2.8 ml, 23.61 mmol)と TBSOTf (3.6 ml, 15.76 mmol)を滴下し、30 分間攪拌した。その後、イオン交換水を加えて反応を停止し、ジクロロメタンで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1:10 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、TBS エーテル (2.6 g, 74%)を白色固体として得た。

White solid

R_f = 0.40 (silica gel, 1:4 ethyl acetate/hexane)

^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$) δ 4.44 (1H, dq, J =10.0, 6.0 Hz, H37), 3.62 (1H, dd, J =3.0, 2.0 Hz, H35), 2.62 (1H, qd, J =8.0, 3.0 Hz, H34), 1.79 (1H, dqd, J =9.5, 7.0, 2.0 Hz, H36), 1.33 (3H, d, J =6.0 Hz, H38), 1.25 (3H, d, J =7.5 Hz, H40), 0.96 (3H, d, J =7.0 Hz, H39), 0.86 (9H, s, *t*-Bu-Si), 0.03 (6H, s, Me-Si); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 174.2, 74.2, 44.1, 36.1, 25.7, 19.8, 17.9, 16.5, 13.9, -4.5, -4.9.



$C_{20}H_{43}NO_5Si$
Exact Mass: 405.29
Mol. Wt.: 405.64

Weinreb アミド **15**

Note No.: 4-NM-31

NHMeOMe・HCl (2,8 g, 29.07 mmol) をジクロロメタン (60 ml) に溶かして 0 °C に冷却し、1.0 M $AlMe_3$ (30.04 ml)を加えて 10 分間攪拌した。その後 TBS 体 (2.6 g, 9.69 mmol)のジクロロメタン溶液 (40 ml) を滴下し、室温で 7.5 時間攪拌した。0 °C に冷却した後、飽和酒石酸ナトリウムカリウム水溶液を加えて反応を停止し、

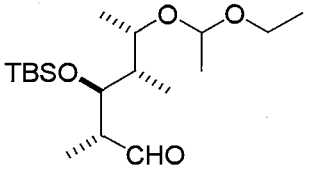
ジクロロメタンで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去し、残渣を続けて次の反応に用いた。残渣をジクロロメタン(97 ml)に溶かし、そこにエチルビニルエーテル(9.3 ml, 96.89 mmol) と PPTS (609 mg, 2.42 mmol) を加え、室温で 2.5 時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、ジクロロメタンで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1:5 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、Weinreb アミド **15** (3.2 g, 81% for 2 steps) を無色無定形固体として得た。

Colorless amorphous solid

R_f = 0.60 (silica gel, 1:1-ethyl acetate/hexane)

^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$) δ 4.67 (0.5H, q, J =5.0 Hz, EE), 4.64 (0.5H, q, J =5.0 Hz, EE), 3.95-3.91 (1H, m, H37), 3.68 (3H, s, N-OMe), 3.15 (3H, s, N-Me), 3.05 (0.5H, dq, J =7.0, 5.0 Hz, H34), 1.91 (0.5H, qd, J =7.0, 2Hz, H36), 1.74 (0.5H, qd, J =7.0, 2.0 Hz, H36), 1.25 (3H, d, J =5.0 Hz, EE), 1.15 (1.5H, t, J =7.0 Hz, H38), 1.10 (1.5H, t, J =7.0 Hz, H38), 1.09 (1.5H, d, J =6.0 Hz, H40), 1.03 (1.5H, d, J =6Hz, H40), 0.89 (9H, s, *t*-Bu-Si), 0.83 (1.5H, d, J =3Hz, H39), 0.81 (1.5H, d, J =3Hz, H39), 0.00 (6H, s, Me-Si);

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 129.0, 128.2, 99.8, 98.6, 74.1, 71.5, 61.2, 60.1, 60.9, 59.6, 43.1, 42.7, 39.3, 26.1, 21.2, 20.7, 18.4, 15.3, 15.2, -3.8, -4.1.



$C_{18}H_{38}O_4Si$
Exact Mass: 346.25
Mol. Wt.: 346.58

アルデヒド **16**

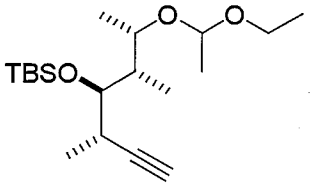
Note No.: 4-NM-33

Weinreb アミド **15** (3.2 g, 7.82 mmol)を THF (65 ml) に溶かし、-78 °C に冷却した。そこに 1.0 M DIBAL (17.3 ml) を滴下し、1 時間攪拌した。飽和酒石酸ナトリウムカリウム水溶液を加えて反応を停止し、ジエチルエーテルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1:7 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、アルデヒド **16** (2.6 g, 96%) を無色無定形固体として得た。

Colorless amorphous solid

R_f = 0.50 (silica gel, 1:5-ethyl acetate/hexane)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 9.70 (1H, s, CHO), 4.65 (0.5H, q, J =5.0 Hz, EE), 4.64 (0.5H, q, J =5,0 Hz, EE), 4.24 (0.5H, dd, J =5 Hz, 2.5 Hz, H37), 4.24 (0.5H, dd, J =5.0 Hz, 2.5 Hz, H37), 3.86 (0.5H, dd, J =7.0, 7.0 Hz, H35), 3.85 (0.5H, dd, J =7.0, 7.0 Hz, H35), 3.57 (1H, dq, J =7.0, 3.0 Hz, EE), 3.43 (1H, dq, J =7.0, 3.0 Hz, EE), 2.53 (0.5H, qd, J =7.0, 2.5 Hz, H34), 2.46 (0.5H, qd, J =7.0, 2.5 Hz, H34), 1.95 (0.5H, qd, J =7.0, 2.0 Hz, H36), 1.88 (0.5H, qd, J =7.0, 2.0 Hz, H36), 1.21 (1.5H, d, J =5.0 Hz, EE), 1.21 (1.5H, d, J =5.0 Hz, EE), 1.12 (1.5H, t, J =7.0 Hz, EE), 1.10 (1.5H, t, J =7.0 Hz, EE), 1.08 (1.5H, s, H40), 1.07 (1.5H, s, H40), 1.05 (1.5H, d, J =6.0 Hz, H38), 1.02 (1.5H, d, J =6.0 Hz, H38), 0.89 (9H, s, *t*-Bu-Si), 0.81 (1.5H, d, J =7.0 Hz, H39), 0.80 (4.5H, s, *t*-Bu-Si), 0.79 (4.5H, s, *t*-Bu-Si), 0.78 (1.5H, d, J =7.0 Hz, H39), 0.04 (6H, s, Me-Si); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 205.5, 205.2, 99.1, 98.1, 72.8, 71.9, 71.4, 61.0, 60.0, 49.9, 49.5, 43.3, 42.4, 25.9, 25.9, 20.9, 20.7, 18.3, 18.2, 16.2, 15.6, 15.3, 10.8, 10.4, 7.6, 7.5, -4.1, -4.3.



$C_{19}H_{38}O_3Si$
Exact Mass: 342.26
Mol. Wt.: 342.59

アセチレン **17**

Note No.: 4-NM-34

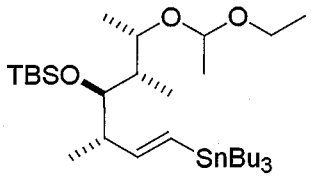
THF (60 ml) を-78 °C に冷却し、そこに 2.0 M $TMSCHN_2$(6.1 ml, 12.26 mmol)と 1.6 M *n*-BuLi(6.8 ml, 10.82 mmol)を滴下し、30 分間攪拌した。そこにアルデヒド **16** (2.5 g, 7.21 mmol) の THF 溶液 (15 ml) を加え、45 分間攪拌した。その後 0℃にして 1.5 時間攪拌後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止し、ジエチルエーテルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1:20 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、アセチレン **17** (1.6 g, 65 %) を無色無定形固体として得た。

Colorless amorphous solid

R_f = 0.50 (silica gel, 1:9-ethyl acetate/hexane)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 4.72 (0.5H, q, J = 5.0 Hz, EE), 4.69 (0.5H, q, J = 5.0 Hz,

EE), 4.09-4.03 (1H, m, H37), 3.68-3.58 (2H, m, H35, EE), 3.47-3.43 (1H, m, EE), 2.68-2.64 (1H, m, H34), 2.04 (0.5H, d, J = 8.0 Hz, H32), 2.03 (0.5H, d, J = 8.0 Hz, H32), 1.95 (0.5H, qd, J = 6.0, 2.0 Hz, H36), 1.88 (0.5H, qd, J = 6.0, 2.0 Hz, H36), 1.20 (1.5H, d, J =5.0 Hz, EE), 1.20 (1.5H, d, J = 5.0 Hz,EE), 1.10 (1.5H, t, J = 7.0 Hz, EE), 1.07 (1.5H, t, J = 7.0 Hz, EE), 1.03 (1.5H, d, J = 6.0 Hz, H38), 0.95 (1.5H, d, J = 6.0 Hz, H38), 0.86-0.74 (15H, m, H40, H39, *t*-Bu-Si), 0.11 (3H, s, Me-Si), 0.08 (3H, s, Me-Si); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 99.4, 98.2, 88.2, 88.1, 76.5, 76.4, 73.6, 71.6, 70.0, 69.8, 60.8, 60.0, 42.6, 42.5, 29.6, 26.1, 21.1, 20.9, 18.4, 18.4, 17.1, 16.4, 15.9, 15.7, 15.4, 15.3, 10.7, 10.6, -3.8, -4.2.



$C_{31}H_{66}O_3SiSn$
Exact Mass: 632.38
Mol. Wt.: 633.65

ビニルスズ

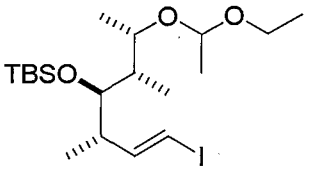
Note No.: 4-NM-35

アセチレン **17** (1.5 g, 4.38 mmol) を THF (73 ml) に溶かし、0 °C に冷却した。そこに $PdCl_2(PPh_3)_2$(154 mg, 0.22 mmol)と *n*-Bu_3SnH(3.5 ml, 13.14 mmol)を加え、30 分攪拌した。その後溶媒を減圧留去し、残渣をそのままシリカゲルカラムクロマトグラフィー(0:1-1:10 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、ビニルスズ (2.3 g, 83%)を無色無定形固体として得た。

Colorless amorphous solid

R_f = 0.40 (silica gel, 1:20-ethyl acetate/hexane)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 6.09-5.99 (1H, m, H33), 5.93-5.87 (1H, m, H33), 4.65 (0.5H, q, J = 5.0 Hz, EE), 4.63 (0.5H, q, J = 5.0 Hz, EE), 3.97-3.92 (1H, m, H37), 3.66-3.40 (3H, m, H35, EE), 2.39-2.38 (1H, m, H34), 1.94 (0.5H, qd, J = 6.0, 2.0 Hz, H36), 1.84 (0.5H, qd, J = 6.0, 2.0 Hz, H36), 1.28-0.78 (21H, m), 0.07 (3H, s, Me-Si), 0.02 (3H, s, Me-Si); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 153.3, 153.2, 126.3, 126.2, 99.1, 98.4, 77.7, 77.6, 73.3, 71.5, 60.9, 60.1, 44.7, 44.4, 42.3, 42.1, 29.1, 27.3, 26.2, 21.1, 21.0, 18.4, 16.4, 15.4, 15.3, 14.3, 13.7, 10.7, 10.5, 9.4, -3.5, -3.6, -4.0.



$C_{19}H_{39}IO_3Si$
Exact Mass: 470.17
Mol. Wt.: 470.50

ヨードオレフィン **6**

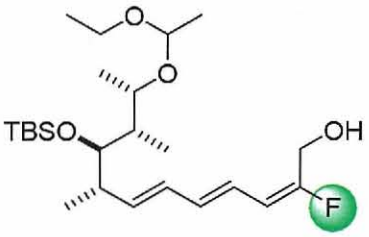
Note No.: 2-NM-43

I_2 (336 mg, 1.32 mmol)を CH_2Cl_2 (20 ml) に溶かし、0°C に冷却した。そこにビニルスズ(645 mg, 1.02 mmol)のジクロロメタン溶液(5 ml)を滴下し、30 分間攪拌した。飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液と飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、ジクロロメタンで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで粗精製後、ジクロロメタン(22 ml) に溶かし、エチルビニルエーテル(0.77 ml, 8.04 mmol)と PPTS(61 mg, 0.24 mmol)を加え、室温で 15 分間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、ジエチルエーテルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1:20 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、ヨードオレフィン **6**(407 mg, 85% for 2 steps) を無色無定形固体として得た。

Colorless amorphous solid

R_f = 0.40 (silica gel, 1:10-ethyl acetate/hexane)

^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$) δ 6.55 (0.5H, dd, J = 14.5, 7.5 Hz, H33), 6.52 (0.5H, dd, J = 14.5, 7.5 Hz, H33), 6.00 (0.5H, d, J = 14.0 Hz, H32), 5.99 (0.5H, d, J = 14 Hz, H32), 4.64 (0.5H, q, J = 5.0 Hz, EE), 4.64 (0.5H, q, J = 5.0 Hz, EE), 3.90-3.88 (1H, m, H37), 3.60 (1H, dq, J = 15.0, 7.5 Hz, EE), 3.50 (0.5H, dd, J = 8.0, 3.0 Hz, H35), 3.46 (0.5H, dd, J = 8.0, 3.0 Hz, H35), 3.43 (1H, dq, J = 15.0, 7.5 Hz, EE), 2.43-2.39 (1H, m, H34), 1.90 (0.5H, qd, J = 7.0, 2.0 Hz, H36), 1.82 (0.5H, qd, J = 7.0, 2.0 Hz, H36), 1.26 (1.5H, d, J = 5.0 Hz, EE), 1.26 (1.5H, d, J = 5.0 Hz, EE), 1.18 (1.5H, t, J = 7.0 Hz, EE), 1.18 (1.5H, t, J = 7.0 Hz, EE), 1.06 (1.5H, d, J = 6.5 Hz, H38), 1.00 (1.5H, d, J = 6.5 Hz, H38), 0.98 (1.5H, s, H40), 0.97 (1.5H, s, H40), 0.89 (9H, s, *t*-Bu-Si), 0.82 (1.5H, d, J = 7.0 Hz, H39), 0.80 (1.5H, d, J = 7.0 Hz, H39), 0.04 (6H, s, Me-Si); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 150.9, 150.7, 99.0, 98.3, 76.6, 76.4, 75.0, 75.0, 72.7, 71.3, 61.1, 60.1, 43.7, 43.5, 42.7, 42.0, 26.1, 26.1, 21.0, 20.9, 18.4, 16.3, 15.4, 13.0, 12.8, 10.5, 10.3, -3.8, -3.9.



$C_{24}H_{45}FO_4Si$
Exact Mass: 444.31
Mol. Wt.: 444.70

フッ化オレフィン **23*E***

Note No.: 5-NM-45

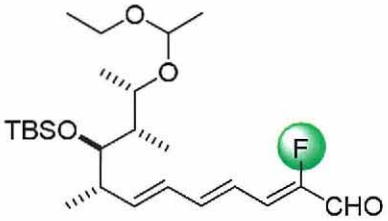
ヨードオレフィン **6** (280 mg, 0.60 mmol) とビニルスズ **5** (280 mg, 0.72 mmol)を DMF（12 ml）に溶かし、そこへ(i-Pr)$_2$NEt (0.52 ml, 2.98 mmol)と[Pd$_2$(dba)$_3$]・CHCl$_3$（18.5 mg, 0.018 mmol）の DMF（1 ml）溶液を加え、室温で 1 時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、エーテルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:8 酢酸エチル/ヘキサン, 1%トリエチルアミン)で精製し、アルコール **23*E***（246 mg, 93%）を無色無定形固体として得た。

Colorless amorphous solid

R_f = 0.19 (silica gel, hexane/AcOEt=5/1)

^{1}H NMR (500 MHz, CDCl$_3$) δ 6.17 (1H, dd, J = 15.0, 10.5 Hz, H31), 5.99-6.13 (2H, m, H30, 32), 5.90 (1H, dd, J = 18.5, 11.0 Hz, H29), 5.77 (0.5H, dd, J = 15.0, 7.5 Hz, H33), 5.73 (0.5H, dd, J = 15.0, 7.5 Hz, H33), 4.64 (1H, m, EE), 4.38-4.30 (2H, m, H27), 3.94-3.89 (1H, m, H37), 3.66-3.55 (1H, m, EE), 3.48-3.37 (2H, m, H35, EE), 2.43 (1H, m, H34), 1.92 (0.5H, m, H36), 1.83 (0.5H, m, H36), 1.17 (3H, t, J = 7.0 Hz, EE), 1.06 (1.5H, d, J = 6.5 Hz, H38), 0.99 (4.5H, d, J = 6.5 Hz, H38, 40), 0.83 (1.5H, d, J = 7.0 Hz, H39), 0.80 (1.5H, d, J = 7.0 Hz, H39).

MS (ESI) m/z calcd for $C_{24}H_{45}FO_4Si$ (M+Na$^+$) 467, found 467.



$C_{24}H_{43}FO_4Si$
Exact Mass: 442.29
Mol. Wt.: 442.68

アルデヒド **23*Z***

Note No.: 5-NM-50,51

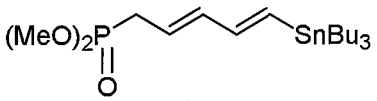
フッ化オレフィン **23*E*** (240 mg, 0.56 mmol) をジクロロメタン(37 ml)に溶かし、ピリジン(0.36 ml, 4.41 mmol)を加え0度に冷却した。そこにDess-Martin 試薬(467 mg, 1.10 mmol) を加えて室温で 20 分攪拌した。チオ硫酸ナトリウム水溶液と飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、エーテルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をフロリジルカラムクロマトグラフィー (100-200 mesh, 1:10 酢酸エチル/ヘキサン) で精製し、アルデヒド体 (194 mg, 80%, *E* 体が主生成物) を無色無定形固体として得た。これをジクロロメタン (15 ml) に溶かし、タングステンランプによる光照射条件下、ジフェニルジセレニド (13.7 mg, 0.044 mmol) を作用させて 0 °C で 20 分攪拌した。チオ硫酸ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、エーテルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をフロリジルカラムクロマトグラフィー (100-200 mesh, 1:10 酢酸エチル/ヘキサン) で精製し、アルデヒド **23*Z*** (172 mg, 89%) を無色無定形固体として得た。

Colorless amorphous solid

R_f = 0.31 (silica gel, hexane/AcOEt=5/1)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 9.20 (1H, d, *J* = 18.0 Hz, CHO), 6.62 (1H, dd, *J* = 15.0, 11.0 Hz, H31), 6.53 (0.5H, dd, *J* = 15.0, 11.0 Hz, H30), 6.52 (0.5H, dd, *J* = 15.0, 11.0 Hz, H30), 6.39 (1H, dd, *J* = 30.0, 11.0 Hz, H29), 6.19 (1H, dd, *J* = 15.0, 11.0 Hz, H32), 6.11 (0.5H, dd, *J* = 15.0, 7.0 Hz, H33), 6.07 (0.5H, dd, *J* = 15.0, 7.0 Hz, H33), 4.65 (1H, m, EE), 3.90 (1H, m, H37), 3.63-3.38 (3H, m, EE, H35), 2.53 (1H, m, H34), 1.92 (0.5H, m, H36), 1.85 (0.5H, m, H36), 1.27-1.24 (3H, m, EE), 1.20-1.15 (3H, m, EE), 1.07 (1.5H, d, *J* = 6.5 Hz, H38), 1.04 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H40), 1.01 (1.5H, d, *J* = 6.5 Hz, H38), 0.85 (1.5H, d, *J* = 7.0 Hz, H39), 0.83 (1.5H, d, *J* = 7.0 Hz, H39).

MS (ESI) m/z calcd for $C_{24}H_{43}FO_4Si$ ($M+Na^+$) 465, found 465.



$C_{19}H_{39}O_3PSn$
Exact Mass: 466.17
Mol. Wt.: 465.19

ホスホン酸エステル **8**

Note No.: 5-NM-35,36

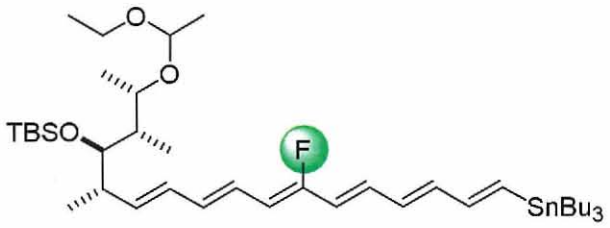
アルコール **21**(1.2 g, 3.32 mmol)をジクロロメタン(233ml)に溶かし 0 °C で攪拌した。そこに 2,6-lutidine(0.19 ml, 1.67 mmol)と CBr_4 (1.3 g, 3.99 mmol)、さらに PPh_4 (1.3 g, 4.99 mmol)のジクロロメタン溶液(5 ml)を加え 15 分攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、ヘキサンで抽出した。有機層をチオ硫酸ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をろ過し、濃縮することでブロモ体を得た。

60% NaH(665 mg, 16.62 mmol)に DMF(33 ml)を加え 0 °C で攪拌した。そこに亜リン酸ジメチル(1.5 ml, 16.62 mmol)を滴下し、10 分攪拌した。そこに先程のプロモ体を滴下し、室温で 5 時間攪拌した。水を加えて反応を停止し、エーテルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー(1:10 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、ホスホン酸エステル **8** (1.1 g, 2 steps 74%)を無色無定形固体として得た。

Colorless oil

R_f = 0.20 (silica gel, 1:1-ethyl acetate/hexane)

^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$) δ 6.48 (1H, dd, J = 19.0, 10.0 Hz, H30), 6.18 (1H, dd, J = 19 .0, 2.5 Hz, H31), 6.18-6.12 (1H, m, H29), 5.56 (1H, ddd, J = 15.0, 7.5, 7.5 Hz, H28), 3.74 (3H, s, OMe), 3.72 (3H, s, OMe), 2.63 (2H, ddd, J = 22.0, 7.5, 1.0 Hz, H27), 1.50-1.45 (6H, m, n-Bu_3Sn), 1.31-1.23 (6H, m, n-Bu_3Sn), 0.89-0.85 (15H, m, n-Bu_3Sn);
^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 145.7, 138.4, 134.1, 120.3, 52.6, 28.9, 27.1, 13.5, 9.3.



$C_{41}H_{75}FO_3SiSn$
Exact Mass: 780.45
Mol. Wt.: 781.83

C22-C37 Segment **3**

Note No.: 5-NM-8

トルエン共沸により脱水したホスホン酸エステル **8** (293 mg, 0.63 mmol) をベンゾフェノンケチルで脱水した THF（12 ml）に溶かし、0 °C に冷却後、1.06 M LHMDS（0.56 ml, 0.59 mmol）を加えて 10 分攪拌した。続いてトルエン共沸により脱水したアルデヒド **23*Z***（93 mg, 0.21 mmol）の THF（3 ml）溶液を滴下後、遮光下 0 度で 1 時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止し、エーテルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をフロリジルカラムクロマトグラフィー (100-200 mesh, 1:20 酢酸エチル/ヘキサン, 1%トリエチルアミン) で精製し、C22-C37 セグメント **3**（102 mg, 62%）を黄色無定形固体として得た。

Yellow amorphous solid

R_f = 0.36 (silica gel, hexane/AcOEt=10/1)

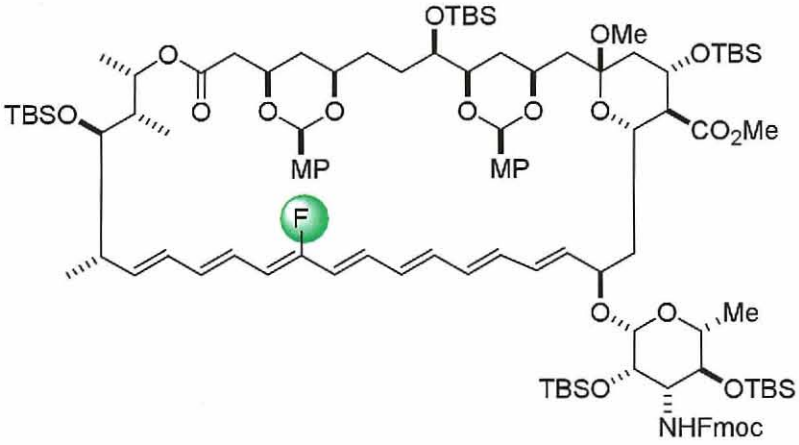
$[\alpha]_D^{31}$ −16.7° (*c* 0.52, $CHCl_3$)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 6.58 (1H, dd, *J* = 19.0, 10.0 Hz, H23), 6.53 (1H, dd, *J* = 15.0, 11.0 Hz, H26), 6.45 (0.5H, dd, *J* = 14.5, 11.0 Hz, H30), 6.44 (0.5H, dd, *J* = 14.5, 11.0 Hz, H30), 6.37 (1H, d, *J* = 19.0 Hz, H22), 6.29 (1H, dd, *J* = 14.5, 10.0 Hz, H24), 6.19 (2H, dd, *J* = 14.5, 11.0 Hz, H25, H31), 6.10 (1H, dd, *J* = 15.0, 11.0 Hz, H32), 5.95 (1H, dd, *J* = 27.0, 15.0 Hz, H27), 5.79 (0.5H, dd, *J* = 15.0, 7.5 Hz, H33), 5.75 (0.5H, dd, *J* = 15.0, 7.5 Hz, H33), 5.49 (1H, dd, *J* = 33.0, 11.0 Hz, H29), 4.66-4.61 (1H, m, EE), 3.92 (1H, m, H37), 3.65-3.38 (1H, m, EE), 3.52-3.38 (2H, m, H35, EE), 2.45 (1H, m, H34), 1.93 (0.5H, m, H36), 1.84 (0.5H, m, H36), 1.53-1.15 (18H, m, EE, SnCH_2 CH_2), 1.07 (1.5H, d, *J* = 7.0 Hz, H38), 1.00 (4.5H, d, *J* = 7.0 Hz, H38, H40), 0.96-0.85 (24H, m, Si-*t*-*Bu*, $Sn(CH_2)_2CH_2CH_3$), 0.84 (1.5H, d, *J* = 7.0 Hz, H39), 0.82 (1.5H, d, *J* = 7.0 Hz, H39), 0.01 (6H, m, SiMe_2); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 156.4 (d, $^1J_{CF}$ = 259 Hz), 146.5, 140.4, 140.2, 137.6, 137.5, 133.2, 133.1, 130.6, 129.8, 129.6, 123.2, 111.8, 98.9, 98.3, 72.9, 71.5, 61.0, 60.1, 42.6, 42.0, 40.3, 29.2, 27.4, 26.3, 21.2, 21.0, 18.5, 16.4, 15.5,

14.2, 14.1, 13.8, 10.7, 10.5, 9.7, -3.5, -3.8.

IR (film) ν 2927, 2856, 1684, 1583, 1460, 1377, 1327, 1254, 1105, 1076, 1057, 1003, 958, 835, 773, 669 cm^{-1}.

MS (ESI) m/z calcd for $C_{41}H_{75}FO_3SiSn$ ($M+Na^+$) 803, found 803.



$C_{110}H_{168}FNO_{21}Si_5$
Exact Mass: 1998.09
Mol. Wt.: 1999.93

マクロラクトン **27**

Note No.: 5-NM-64,65,67

トルエン共沸により脱水した C1-C21 セグメント **5** (183 mg, 0.11 mmol) と、ジイソプロピルエチルアミン（0.98 ml, 5.62 mmol）を THF（5 ml）に溶かし、そこへ、トルエン共沸により脱水した C22-C37 セグメント **3** （100 mg, 0.13 mmol）の THF（5 ml）溶液を加えた。これに対し、グローブボックス内で秤量したトリスジベンジリデンアセトンジパラジウム（33 mg, 0.032 mmol）とトリフェニルヒ素（97 mg, 0.32 mmol）の THF（5 ml）を加え、遮光下室温で 12 時間攪拌した。THF を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:5 酢酸エチル/ヘキサン、1%トリエチルアミン) で粗精製し、カップリング生成物(223 mg, impure)を得た。

得られたカップリング生成物(223 mg)をメタノール（11 ml）と *p*-メトキシベンズアルデヒドジメチルアセタール(5.3 ml)に溶かし、PPTS (320 mg, 1.27 mmol) を加えて遮光下室温で 3 時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止し、エーテルで抽出した。無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:30 メタノール/クロロホルム)で粗精製し、セコ酸（182 mg, impure）を黄色無定形固体として得た。

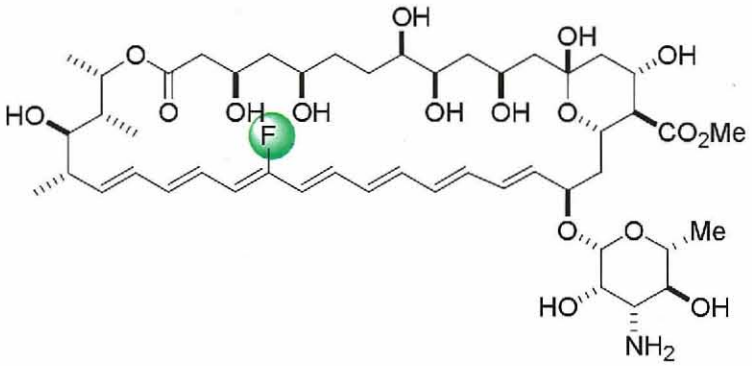
セコ酸（182 mg）をジクロロメタン（80 ml）に溶かし、そこにグローブボックス内で秤量した 2-メチル-6-ニトロ安息香酸無水物（141 mg, 0.41 mmol）と DMAP（100 mg, 0.82 mmol）のジクロロメタン（10 ml）溶液を 20 分かけて滴下した。室

温で 3.5 時間攪拌後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止し、エーテルで抽出した。無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:5 酢酸エチル/ヘキサン、0:1-1:20 メタノール/クロロホルム) で精製し、マクロラクトン **27**（41 mg, 20% for 3 steps）を黄色無定形固体として得た。

R_f = 0.40 (silica gel, hexane/AcOEt=5/1)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.73 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.56 (2H, m), 7.37 (2H, t, J = 7.5 Hz), 7.32-7.26 (4H, m), 6.79 (2H, dd, J = 20.5, 8.5 Hz), 6.54 (1H, dd, J = 14.5, 11.5 Hz), 6.45 (1H, dd, J = 14.0, 11.5 Hz), 6.34 (1H, dd, J = 14.5, 9.5 Hz), 6.22-6.04 (6H, m), 5.87 (1H, dd, J = 22.0, 15.0 Hz), 5.76 (1H, dd, J = 15.5, 6.5 Hz), 5.60 (1H, dd, J = 14.0, 9.0 Hz), 5.50 (1H, m), 5.44 (1H, s), 5.42-5.41 (1H, m), 5.36 (1H, s), 4.87 (1H, d, J = 10.0 Hz), 4.89-4.82 (1H, m), 4.48-4.38 (2H, m), 4.34-4.31 (2H, m), 4.21-4.16 (2H, m), 3.78 (3H, s), 3.75 (3H, s), 3.66 (3H, s), 3.68-3.53 (4H, m), 3.34-3.27 (1H, m), 3.24-3.21 (1H, m), 2.99 (3H, s), 2.59 (1H, dd, J = 11.5, 6.5 Hz), 2.37-2.29 (2H, m), 2.23-2.17 (2H, m), 1.21 (3H, d, J = 6.5 Hz), 1.18 (3H, d, J = 6.5 Hz), 0.98 (3H, d, J = 7.0 Hz), 0.91-0.73(45H, m), 0.08—0.17 (30H, m).

MS (MALDI) m/z calcd for $C_{110}H_{168}FNO_{21}Si_5$ ($M+Na^+$) 2021, found 2021.



$C_{48}H_{74}FNO_{17}$
Exact Mass: 955.49
Mol. Wt.: 956.10

28-^{19}F AME **2**

Note No.: 5-NM-75

テフロンチューブにマクロラクトン **27**（25 mg, 0.013 mmol）を移し、メタノール（0.6 ml）を加えた。室温で 18% HF-ピリジン（0.5 ml）を滴下し、その後 50 度に昇温して 40 時間攪拌した。反応溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液中に滴下して反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を 0.25M の塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:20 メタノール/クロロホルム) で粗精製し、TBS 脱保護ペンタオール体（15 mg, 82% impure）を黄色

無定形固体として得た。

TBS 脱保護ペンタオール体（15 mg）をジクロロメタン（2.2 ml）に溶かし、ピペリジン（52 μl, 0.53 mmol）を加えて室温で 45 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（1:20-1:0 メタノール/クロロホルム）で粗精製し、Fmoc 脱保護体（19 mg, impure）を黄色固体として得た。

Fmoc 脱保護体（19 mg）をメタノール（0.6 ml）に溶かし 0 °C に冷却後、濃塩酸（64 μl, 0.77 mmol）を滴下し、0 °C で 1 時間攪拌した。炭酸水素ナトリウム（77 mg）を加えて反応を停止し、pH が 7 付近になったことを確認し溶媒を減圧留去した。得られた残渣を *t*-ブタノール(480 μl)とミリ Q 水（120 μl）に溶かし、そこへ濃塩酸(64 μl)を加え、0 °C で 7 時間攪拌した。炭酸水素ナトリウムと水を加えて反応を停止し、反応水溶液をそのまま ODS のオープンカラム（H_2O-MeOH）にチャージして粗精製することで 28-^{19}F AME **2**（8.2 mg, 64%）を黄色固体として得た。粗精製物を HPLC を用いて再精製し、最終的に純粋な 28-^{19}F AME **2**（2.1 mg, 25%）を黄色固体として得た。

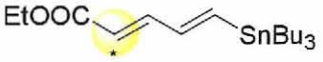
Yellow solid

R_f = 0.10 (silica gel, $CHCl_3$/MeOH=5/1)

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 6.56 (1H, dd, J = 14.5, 12.0 Hz), 6.56 (1H, dd, J = 15.5, 11.0 Hz), 6.43 (1H, dd, J = 15.0, 10.5 Hz), 6.34 (1H, dd, J = 14.5, 11.0 Hz), 6.33 (1H, dd, J = 15.0, 11.0 Hz), 6.29 (1H, dd, J = 15.0, 12.0 Hz), 6.23 (1H, dd, J = 15.0, 10.5 Hz), 6.17 (1H, dd, J = 28.0, 15.5 Hz), 6.12 (1H, dd, J = 15.5, 10.5 Hz), 6.12 (1H, dd, J = 15.5, 10.5 Hz), 5.96 (1H, dd, J = 15.5, 9.0 Hz), 5.75 (1H, dd, J = 34.0, 11.0 Hz), 5.51 (1H, dd, J = 15.5, 9.5 Hz), 5.18 (1H, m, H37), 4.37 (1H, m), 4.25 (1H, s), 4.23 (2H, m), 4.05 (1H, m), 4.03 (1H, m), 3.62 (3H, s), 3.59 (1H, m), 3.51 (1H, s), 3.46 (1H, m), 3.12 (1H, m), 3.11 (1H, m), 3.05 (1H, m), 2.86 (1H, m), 2.29 (2H, m), 2.20-2.14 (2H, m), 2.08 (1H, m), 1.90 (1H, dd, J = 12.0, 5.0 Hz), 1.87 (1H, dd, J = 16.0, 5.5 Hz), 1.71 (1H, m), 1.55 (1H, m), 1.57-1.45 (4H, m), 1.40-1.26 (6H, m), 1.15 (3H, d, J = 6.0 Hz), 1.13 (1H, m), 1.12 (3H, d, J = 6.5 Hz), 1.04 (3H, d, J = 6.5 Hz), 0.91 (3H, d, J = 7.0 Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6) δ 172.8, 170.2, 156.2 (d, $^1J_{CF}$ = 252 Hz), 137.2, 137.1, 136.7, 136.1, 136.0, 134.5, 132.5, 131.4, 131.0, 130.7, 129.8, 128.7, 123.1, 121.7, 97.4, 97.2, 96.7, 73.8, 73.4, 73.1, 73.0, 70.0, 69.8, 69.3, 69.1, 67.2, 66.6, 65.9, 64.6, 56.8, 56.5, 45.9, 44.5, 44.1, 42.4, 42.3, 41.1, 36.8, 34.9, 29.0, 18.5, 18.0, 17.1, 12.0.

MS (ESI) *m/z* calcd for $C_{48}H_{74}FNO_{17}$ ($M+Na^+$) 978, found 978.



$C_{18}{}^{13}CH_{36}O_2Sn$
Exact Mass: 417.18
Mol. Wt.: 416.19

エステル **30**

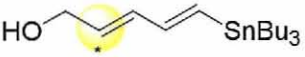
Note No.: 3-NM-25

アルデヒド **19** (402 mg, 1.17 mmol)をトルエン(23 ml)に溶かし室温で攪拌した。そこに ^{13}C 標識化イリド(407 mg, 1.17 mmol)を加え 65 °C で 4 時間攪拌した。さらにイリド(80 mg, 0.23 mmol)を 2 回に分けて加え、さらに 6 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣をカラムクロマトグラフィー(1:10 酢酸エチル/ヘキサン)で精製を行い、エステル **30** (447 mg, 92%)を無色無定形固体として得た。

Colorless oil

R_f=0.50 (silica gel, 1:10-ethyl acetate/hexane)

^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$) δ 7.15 (1H, ddd, J = 15.5, 10.5, 2.0 Hz, H24), 6.77 (1H, d, J = 19.0 Hz, H22), 6.61 (1H, ddd, J = 18.5, 10.5, 3.5 Hz, H23), 5.76 (1H, dd, J = 162.0, 15.0 Hz, H25), 4.16 (2H, q, J = 6.0 Hz, COOEt), 1.53-1.38 (6H, m, n-Bu_3Sn), 1.32-1.23 (9H, m), 0.94-0.83 (15H, m, n-Bu_3Sn); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 167.5, 146.5, 145.9, 144.2, 119.9, 60.1, 29.0, 27.2, 14.2, 13.6, 9.5.



$C_{16}{}^{13}CH_{34}OSn$
Exact Mass: 375.17
Mol. Wt.: 374.15

アルコール **31**

Note No.: 3-NM-26

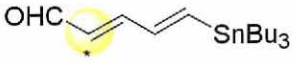
エステル **30** (345 mg, 0.83 mmol)を THF(10 ml)に溶かし-78 °C で攪拌した。そこに 0.94 M DIBAL 溶液(2.6 ml, 2.49 mmol)を加え 30 分攪拌した。飽和酒石酸ナトリウムカリウム水溶液を加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー(1:10-1:5 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、アルコール **31**(293 mg, 94%)を無色無定形固体として得た。

Colorless oil

R_f=0.20 (silica gel, 1:10-ethyl acetate/hexane)

^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$) δ 6.51 (1H, ddd, J = 18.5, 10.0, 4.0 Hz, H23), 6.23 (1H, d, J = 19.0 Hz, H22), 6.20 (1H, dd, J = 15.5, 10.0, 3.5 Hz, H24), 5.76 (1H, tdd, J = 153.0,

14.5, 6.0 Hz, H25), 4.16 (2H, d, J = 4.5 Hz, H26), 1.54-1.39 (6H, m, n-Bu_3Sn), 1.32-1.25 (6H, m, n-Bu_3Sn), 0.91-0.85 (15H, m, n-Bu_3Sn); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 145.9, 134.8, 134.3, 130.7, 63.4, 29.1, 27.2, 13.7, 9.4.



$C_{16}{}^{13}CH_{32}OSn$
Exact Mass: 373.15
Mol. Wt.: 372.14

アルデヒド **9**

Note No.: 3-NM-28

アルコール **31** (65 mg, 0.17 mmol)をジクロロメタン(3.4 ml)に溶かし 0 °C で攪拌した。そこに DMP(111 mg, 0.26 mmol)を加え、30 分間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、ジエチルエーテルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー(1:20 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、アルデヒド **9** (51 mg, 78%)を無色無定形固体として得た。

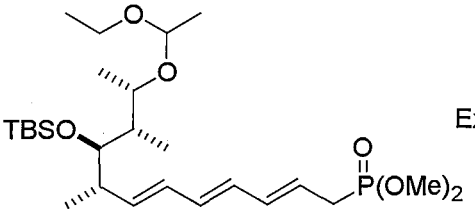
Colorless oil

R_f=0.40 (silica gel, 1:9-ethyl acetate/hexane)

$[\alpha]_D^{26}$ +0.31 (c 0.60, $CHCl_3$)

^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 9.54 (1H, dd, J = 26.0, 8.0 Hz, H26), 7.00 (1H, d, J = 18.0 Hz, H22), 6.97 (1H, dd, J = 15.0, 10.0 Hz, H24), 6.78 (1H, ddd, J = 18.0, 10.5, 3.5 Hz, H23), 6.05 (1H, ddd, J = 160.5, 15.0, 8.0 Hz, H25), 1.52-1.45 (6H, m, n-Bu_3Sn), 1.34-1.27 (6H, m, n-Bu_3Sn), 0.97-0.86 (15H, m, n-Bu_3Sn); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 194.6, 194.2, 153.8, 153.3, 144.2, 132.8, 129.9, 29.0, 27.2, 13.6, 9.7.

IR (neat) ν 2956, 2926, 2871, 2851, 2718, 1634, 1598, 1541, 1464, 1418, 1376, 1340, 1291, 1248, 1176, 1113, 1081, 1012, 990, 960, 875, 749, 673, 597 cm^{-1}.



$C_{26}H_{51}O_6PSi$
Exact Mass: 518.32
Mol. Wt.: 518.74

ホスホン酸エステル **32**

Note No.: 6-NM-39

ヨードオレフィン **6** (500 mg, 1.06 mmol)とホスホン酸エステル **8** (643 mg, 1.38 mmol)を DMF(18 ml)に溶かし、室温で攪拌した。そこへ(i-Pr)$_2$NEt (0.93 ml, 5.32 mmol)と[$Pd_2(dba)_3$]・$CHCl_3$ (33 mg, 0.032 mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー(1:1 酢酸エチル/ヘキサン、1%トリエチルアミン)で精製し、ホスホン酸エステル **32**(470 mg, 77%)を黄色無定形固体として得た。

Yellow oil

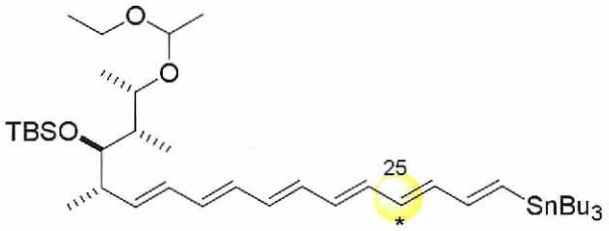
R_f=0.14 (silica gel, 1:1-ethyl acetate/hexane)

$[\alpha]_D^{25}$ -18.2 (c 1.15, $CHCl_3$)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 6.17 (1H, dd, J = 14.5, 4.0 Hz, H31), 6.13-6.09 (2H, m, H30, H32), 6.00 (1H, d, J = 15.5, 8.0 Hz, H29), 5.74 (1H, ddd, J = 18.0, 15.5, 7.0 Hz, H28), 5.57 (1H, ddd, J = 14.5, 7.5, 2.5 Hz, H33), 4.67 (1H, quint, J = 5.0 Hz, EE), 3.91 (1H, m, H37), 3.74 (3H, s, OMe), 3.72 (3H, s, OMe), 3.61-3.56 (1H, m, EE), 3.49-3.34 (2H, m, EE), 2.65 (2H, dd, J = 17.5, 7.5 Hz, H27), 2.43 (1H, m, H34), 1.94-1.90 (0.5H, m, H36), 1.85-1.81(0.5H, m, H36), 1.17 (3H, t, J = 7.0 Hz, EE), 1.06 (1.5H, d, J = 6.0 Hz, H38), 0.99 (4.5H, d, J = 6.5 Hz, H38, H40), 0.90-0.88 (12H, m, TBS), 0.82 (3H, dd, J = 11.0, 7.0 Hz, H39), –0.01(3H, s, TBS), –0.01(3H, s, TBS); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 140.1, 139.9, 135.5, 135.4, 133.1, 133.0, 130.0, 129.9, 129.2, 98.9, 98.3, 77.7, 77.6, 72.9, 71.5, 60.9, 60.0, 52.8, 42.5, 41.9, 40.1, 30.4, 29.3, 26.1, 21.1, 21.0, 18.4, 16.2, 15.3, 14.1, 14.0, 13.7, 10.6, 10.4, 9.5, -3.7, -3.9.

IR (neat) ν 3401, 2957, 2926, 2871, 2853, 1653, 1558, 1506, 1457, 1419, 1376, 1340, 1292, 1180, 1072, 999, 959, 864, 660, 598 cm^{-1}.

HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $C_{26}H_{51}O_6PSiNa$ [M+Na$^+$] 541.3085, found: 541.3091.



$C_{40}{}^{13}CH_{76}O_3SiSn$
Exact Mass: 765.46
Mol. Wt.: 764.83

C22-C37 セグメント **4**

Note No.: 3-NM-61

トルエン共沸により脱水したホスホン酸エステル**32** (498 mg, 0.96 mmol) をベンゾフェノンケチルで脱水した THF（20 ml）に溶かし、0 °C に冷却後、1.06 M LHMDS（0.91 ml, 0.96 mmol）を加えて 15 分攪拌した。続いてトルエン共沸により脱水したアルデヒド **9**（199 mg, 0.54 mmol）の THF（10 ml）溶液を滴下後、0 度で 1.5 時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止し、ジエチルエーテルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー (1:9 酢酸エチル/ヘキサン, 1%トリエチルアミン) で精製し、C22-C37 セグメント **4**（265 mg, 68%）を黄色無定形固体として得た。

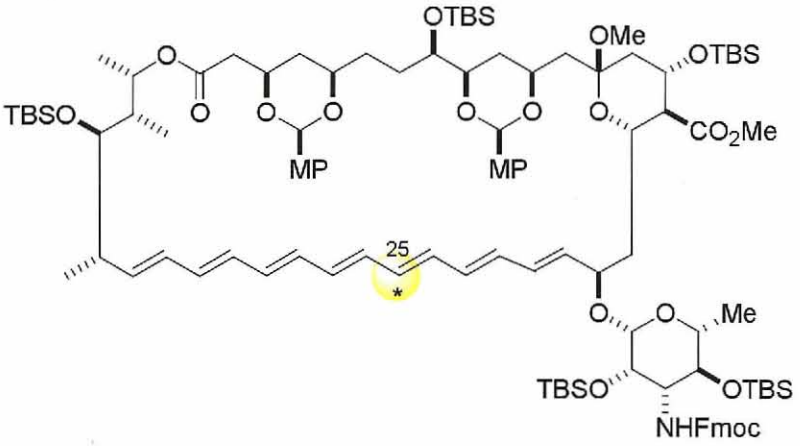
Yellow oil

R_f = 0.42 (silica gel, ethyl acetate/hexane=1/9)

$[\alpha]_D^{25}$ -16.2 (*c* 0.22, $CHCl_3$)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 6.57 (1H, ddd, *J* = 17.5, 10.0, 4.5 Hz, H23), 6.33-6.18 (9H, m), 6.05 (1H, dd, *J* = 14.0, 10.0 Hz, H32), 5.75 (1H, ddd, *J* = 19.5, 15.0, 7.0 Hz, H33), 4.64 (1H, quint, *J* = 5.5 Hz, EE), 3.92 (1H, m, H37), 3.65-3.55 (1H, m, EE), 3.50-3.39 (2H, m, H35, EE), 2.44 (1H, m, H34), 1.93 (0.5H, m, H36), 1.84 (0.5H, m, H36), 1.15-1.53 (18H, m, EE, *n*-Bu_3Sn), 1.07 (1.5H, d, *J* = 7.0 Hz, H38), 1.00 (4.5H, d, *J* = 7.0 Hz, H38, H40), 0.85-0.96 (24H, m, TBS, *n*-Bu_3Sn), 0.84 (1.5H, d, *J* = 7.0 Hz, H39), 0.82 (1.5H, d, *J* = 7.0 Hz, H39), 0.00 (6H, m, TBS); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 146.9, 135.4, 134.5, 133.7, 132.0, 131.9, 131.2, 130.0, 128.3, 128.2, 127.0, 122.8, 119.9, 98.9, 98.3, 72.9, 71.5, 60.9, 60.1, 42.5, 41.9, 40.2, 29.1, 27.3, 26.2, 21.0, 18.4, 16.2, 15.3, 13.9, 13.7, 10.6, 10.4, 9.6, 9.4, -3.6, -3.9.

IR (neat) ν 2926, 2851, 1654, 1553, 1459, 1377, 1327, 1290, 1254, 1105, 1073, 1057, 1003, 959, 835, 669, 598 cm^{-1}.



$C_{109}{}^{13}CH_{169}NO_{21}Si_5$
Exact Mass: 1981.11
Mol. Wt.: 1982.93

マクロラクトン **33**

Note No.: 6-NM-43

トルエン共沸により脱水した C1-C21 セグメント **5** (257 mg, 0.15 mmol) と、ジイソプロピルエチルアミン（0.52 ml, 0.30 mmol）を THF（5 ml）に溶かし、そこへ、トルエン共沸により脱水した C22-C37 セグメント **4** （263 mg, 0.30 mmol）の THF（5 ml）溶液を加えた。これに対し、グローブボックス内で秤量したトリスジベンジリデンアセトンジパラジウム（46 mg, 0.045 mmol）とトリフェニルヒ素（136 mg, 0.45 mmol）の THF（5 ml）を加え、遮光下室温で 1 時間攪拌した。THF を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:10 酢酸エチル/ヘキサン、1%トリエチルアミン) で粗精製し、カップリング生成物(462 mg, impure)を得た。

得られたカップリング生成物(0.15 mmol)をメタノール（15 ml）と *p*-メトキシベンズアルデヒドジメチルアセタール（3 ml）に溶かし、PPTS（449 mg, 1.79 mmol）を加えて遮光下室温で 3 時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止し、エーテルで抽出した。無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:100-1:10 メタノール/クロロホルム)で粗精製し、セコ酸（310 mg, impure）を黄色無定形固体として得た。

セコ酸（310 mg, impure）をジクロロメタン（150 ml）に溶かし、そこにグローブボックス内で秤量した 2-メチル-6-ニトロ安息香酸無水物（256 mg, 0.75 mmol）と DMAP（182 mg, 1.49 mmol）のジクロロメタン（10 ml）溶液を 1 時間かけて滴下した。室温で 2 時間攪拌後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止し、エーテルで抽出した。無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:5 酢酸エチル/ヘキサン、0:1-1:20 メタノール/クロロホルム) で精製し、マクロラクトン **33** (75 mg, 25% for 3 steps) を黄色無定形固体として得た。

Yellow amorphous solid

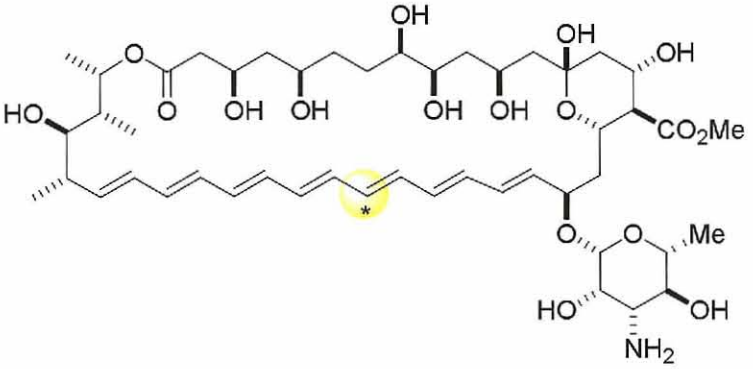
R_f = 0.38 (silica gel, hexane/AcOEt=5/1)

$[\alpha]_D^{26}$ +60.1 (*c* 2.28, $CHCl_3$)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.74 (2H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.56 (2H, d, *J* = 7.5, 4.0 Hz, Fmoc), 7.40-7.32 (6H, m), 7.27 (2H, t, *J* = 7.5 Hz), 6.82 (4H, dd, *J* = 20.5, 8.5 Hz), 6.23-5.99 (12H, m), 5.73 (1H, dd, *J* = 15.0, 7.0 Hz), 5.54 (1H, dd, *J* = 9.5, 7.5 Hz), 5.43 (1H, s), 5.36 (1H, s), 4.87 (1H, m), 4.49-4.41 (2H, m), 4.35-4.32 (2H, m), 4.19-4.14 (2H, m), 3.76 (6H, s), 3.66 (3H, s), 3.62-3.58 (2H, m), 3.34-3.28 (1H, m), 3.24-3.20 (1H, m), 2.99 (3H, s), 2.59 (1H, dd, *J* = 18.0, 7.0 Hz), 2.33 (1H, t, *J* = 10.0 Hz), 2.23-2.18 (2H, m), 1.23 (3H, d, *J* = 6.5 Hz), 1.18 (3H, d, *J* = 6.5 Hz), 0.97 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.90-0.73 (45H, m), 0.01--0.18 (30H, m); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 173.0, 169.7, 159.7, 159.6, 155.6, 144.0, 141.4, 135.7, 134.2, 133.9, 132.2, 130.2,127.6, 127.3, 127.0, 124.9, 119.9, 113.5, 113.3, 100.5, 100.2, 99.9, 98.1, 80.2, 75.8, 75.3, 74.0, 73.5, 72.4, 72.3, 67.9, 66.9, 66.7, 57.2, 55.8, 51.8, 47.9, 47.2, 43.1, 42.5, 40.7, 37.1, 36.3, 32.2, 31.8, 31.6, 26.1, 26.0, 25.7, 25.5, 22.6, 18.8, 18.4, 18.3, 18.0, 17.7, 14.1, -3.5, -3.9, -4.0, -4.2, -4.3, -4.4, -4.6, -4.8, -5.3, -5.4.

IR (film) ν 2952, 2929, 2886, 2857, 1734, 1653, 1617, 1539, 1517, 1507, 1473, 1374, 1251, 1110, 1079, 1037, 1005, 838, 778, 740, 681 cm^{-1}.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd for $C_{109}{}^{13}CH_{169}NO_{21}Si_5Na$ [M+Na$^+$] 2004.0959, found: 2004.0925.



$C_{47}{}^{13}CH_{75}NO_{17}$
Exact Mass: 938.51
Mol. Wt.: 939.10

25-^{13}C AME **3**

Note No.: 6-NM-50,66

テフロンチューブにマクロラクトン **33**（45 mg, 0.023 mmol）を移し、メタノール（1.1 ml）を加えた。室温で 18% HF-ピリジン（0.9 ml）を滴下し、その後 50 度に昇温して 38 時間攪拌した。反応溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液中に滴下して反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を 0.25M の塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減

圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:20 メタノール/クロロホルム) で粗精製し、TBS 脱保護ペンタオール体（26 mg, 82% impure）を黄色無定形固体として得た。

TBS 脱保護ペンタオール体（26 mg）をジクロロメタン（3.1 ml）に溶かし、ピペリジン (74 μl, 0.75 mmol) を加えて室温で 18 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:10-1:0 メタノール/クロロホルム) で粗精製し、Fmoc 脱保護体（26 mg, impure）を黄色固体として得た。

Fmoc 脱保護体（26 mg）をメタノール（0.8 ml）に溶かし 0 度に冷却後、濃塩酸（78 μl, 0.94 mmol）を滴下し、0 度で 1 時間攪拌した。炭酸水素ナトリウム（94 mg）を加えて反応を停止し、pH が 7 付近になったことを確認し溶媒を減圧留去した。得られた残渣を *t*-ブタノール(640 μl)とミリ Q 水（160 μl）に溶かし、そこへ濃塩酸(78 μl)を加え、0 度で 7 時間攪拌した。炭酸水素ナトリウムと水を加えて反応を停止し、反応水溶液をそのまま ODS のオープンカラム（H_2O-MeOH）にチャージして粗精製することで 25-^{13}C AME **3**（23 mg, impure）を黄色固体として得た。粗精製物を HPLC を用いて再精製し、最終的に純粋な 25-^{13}C AME **3**（2.4 mg, 14% for 5 steps）を黄色固体として得た。

Yellow solid

R_f = 0.10 (silica gel, $CHCl_3$/MeOH=5/1)

$[\alpha]_D^{26}$ +269.6 (*c* 0.02, MeOH)

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 6.49-6.12 (12H, m), 6.01 (1H, dd, *J* = 15.0, 8.5 Hz), 5.39-5.34 (2H, m), 4.49-4.41 (2H, m), 4.40-4.35 (1H, m), 4.23-4.15 (2H, m), 3.97 (1H, s), 3.74 (3H, s), 3.65-3.30 (3H, m), 3.34-3.28 (1H, m), 3.20-3.16 (2H, m), 3.06-3.05 (1H, m), 2.41-2.35 (1H, m), 2.23-2.17 (2H, m), 2.02 (1H, dd, *J* = 13.5, 5.5 Hz), 1.79-1.34 (15H, m), 1.28 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 1.19 (3H, d, *J* = 6.5 Hz), 1.11 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.00 (3H, d, *J* = 7.0 Hz).

IR (neat) ν 3393, 2924, 2851, 1733, 1577, 1559, 1418, 1339, 1318, 1125, 1041, 1008, 956, 852, 581 cm^{-1}.

HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd for $C_{47}{}^{13}CH_{76}NO_{17}$ [M+H$^+$] 939.5141, found: 939.5149.

固体 NMR 測定

28-^{19}F-AME **2**、25-^{13}C-AME **3**、エルゴステロール、POPC を用いた測定

10 ml ナシ型フラスコに 28-^{19}F-AME **2** (0.5 mg, 0.53 μmol) と 25-^{13}C-AME **3** (0.5 mg, 0.53 μmol)、エルゴステロール (1.27 mg, 3.20 μmol)、POPC (21.9 mg, 28.78 μmol) をとり、MeOH 1 ml と $CHCl_3$ 1 ml の混合溶媒に溶かした後、溶媒を留去し、フラスコの壁に薄膜を形成させた。真空下で終夜 (16 時間) 乾燥させ、完全に溶媒を除いた。アルゴン置換した後、10 mM HEPES 緩衝液 24.2 μl とミリ Q 水 1 ml を加え、voltex で水和させた。この時フラスコの壁についている膜は超音波を用いて落とした。凍結融解、voltex を 5 回繰り返し、完全に水和させた後、1.5 ml のエッペンチューブに移しかえ、凍結乾燥を終夜 (16 時間) 行った。パウダー状になったサンプルに D_2O 24.2 μl を加え、遠心操作、凍結融解、voltex、を繰り返し行い、完全に再水和を行いペースト状にした。水和サンプルを遠心分離機を用いてガラスインサートに移し変え、ボンドで密閉した。ガラスインサートを固体 NMR 測定用のローターにつめ、測定を行った。

28-^{19}F-AME **2**、25-^{13}C-AME **3**、コレステロール、POPC を用いた測定

10 ml ナシ型フラスコに 28-^{19}F-AME **2** (0.5 mg, 0.53 μmol) と 25-^{13}C-AME **3** (0.5 mg, 0.53 μmol)、コレステロール (1.24 mg, 3.20 μmol)、POPC (21.9 mg, 28.78 μmol) をとり、MeOH 1 ml と $CHCl_3$ 1 ml の混合溶媒に溶かした後、溶媒を留去し、フラスコの壁に薄膜を形成させた。真空下で終夜 (20 時間) 乾燥させ、完全に溶媒を除いた。アルゴン置換した後、10 mM HEPES 緩衝液 24.2 μl とミリ Q 水 1 ml を加え、voltex で水和させた。この時フラスコの壁についている膜は超音波を用いて落とした。凍結融解、voltex を 5 回繰り返し、完全に水和させた後、1.5 ml のエッペンチューブに移しかえ、凍結乾燥を終夜 (17 時間) 行った。パウダー状になったサンプルに D_2O 24.2 μl を加え、遠心操作、凍結融解、voltex、を繰り返し行い、完全に再水和を行いペースト状にした。水和サンプルを遠心分離機を用いてガラスインサートに移し変え、ボンドで密閉した。ガラスインサートを固体 NMR 測定用のローターにつめ、測定を行った。

28-^{19}F-AME **2**、25-^{13}C-AME **3**、POPC を用いた測定

10 ml ナシ型フラスコに 28-^{19}F-AME **2** (0.5 mg, 0.53 μmol) と 25-^{13}C-AME **3** (0.5 mg, 0.53 μmol)、POPC (21.9 mg, 28.78 μmol) をとり、MeOH 1 ml と $CHCl_3$ 1 ml の混合溶媒に溶かした後、溶媒を留去し、フラスコの壁に薄膜を形成させた。真空下で終夜 (18 時間) 乾燥させ、完全に溶媒を除いた。アルゴン置換した後、10 mM HEPES 緩衝液 24.2 μl とミリ Q 水 1 ml を加え、voltex で水和させ

た。この時フラスコの壁についている膜は超音波を用いて落とした。凍結融解、voltex を 5 回繰り返し、完全に水和させた後、1.5 ml のエッペンチューブに移しかえ、凍結乾燥を終夜(19 時間)行った。パウダー状になったサンプルに D_2O 24.2 μl を加え、遠心操作、凍結融解、voltex、を繰り返し行い、完全に再水和を行いペースト状にした。水和サンプルを遠心分離機を用いてガラスインサートに移し変え、ボンドで密閉した。ガラスインサートを固体 NMR 測定用のローターにつめ、測定を行った。

14-^{19}F-AME 、$^{13}CH_3$-AME 、エルゴステロール、POPC を用いた測定

10 ml ナシ型フラスコに 14-^{19}F-AME (0.5 mg, 0.53 μmol) と $^{13}CH_3$-AME (0.5 mg, 0.53 μmol)、エルゴステロール (1.27 mg, 3.20 μmol)、POPC (21.9 mg, 28.78 μmol) をとり、MeOH 1 ml と $CHCl_3$ 1 ml の混合溶媒に溶かした後、溶媒を留去し、フラスコの壁に薄膜を形成させた。真空下で終夜 (16 時間) 乾燥させ、完全に溶媒を除いた。アルゴン置換した後、10 mM HEPES 緩衝液 24.2 μl とミリ Q 水 1 ml を加え、voltex で水和させた。この時フラスコの壁についている膜は超音波を用いて落とした。凍結融解、voltex を 5 回繰り返し、完全に水和させた後、1.5 ml のエッペンチューブに移しかえ、凍結乾燥を終夜 (16 時間) 行った。パウダー状になったサンプルに D_2O 24.2 μl を加え、遠心操作、凍結融解、voltex、を繰り返し行い、完全に再水和を行いペースト状にした。水和サンプルを遠心分離機を用いてガラスインサートに移し変え、ボンドで密閉した。ガラスインサートを固体 NMR 測定用のローターにつめ、測定を行った。

14-^{19}F-AME 、$^{13}CH_3$-AME 、コレステロール、POPC を用いた測定

10 ml ナシ型フラスコに 14-^{19}F-AME (0.5 mg, 0.53 μmol) と $^{13}CH_3$-AME (0.5 mg, 0.53 μmol)、コレステロール (1.24 mg, 3.20 μmol)、POPC (21.9 mg, 28.78 μmol) をとり、MeOH 1 ml と $CHCl_3$ 1 ml の混合溶媒に溶かした後、溶媒を留去し、フラスコの壁に薄膜を形成させた。真空下で終夜 (20 時間) 乾燥させ、完全に溶媒を除いた。アルゴン置換した後、10 mM HEPES 緩衝液 24.2 μl とミリ Q 水 1 ml を加え、voltex で水和させた。この時フラスコの壁についている膜は超音波を用いて落とした。凍結融解、voltex を 5 回繰り返し、完全に水和させた後、1.5 ml のエッペンチューブに移しかえ、凍結乾燥を終夜 (17 時間) 行った。パウダー状になったサンプルに D_2O 24.2 μl を加え、遠心操作、凍結融解、voltex、を繰り返し行い、完全に再水和を行いペースト状にした。水和サンプルを遠心分離機を用いてガラスインサートに移し変え、ボンドで密閉した。ガラスインサートを固体 NMR 測定用のローターにつめ、測定を行った。

14-^{19}F-AME 、$^{13}CH_3$-AME 、POPC を用いた測定

10 ml ナシ型フラスコに 14-^{19}F-AME （0.5 mg, 0.53 μmol）と $^{13}CH_3$-AME （0.5 mg, 0.53 μmol）、POPC（21.9 mg, 28.78 μmol）をとり、MeOH 1 ml と $CHCl_3$ 1 ml の混合溶媒に溶かした後、溶媒を留去し、フラスコの壁に薄膜を形成させた。真空下で終夜（18 時間）乾燥させ、完全に溶媒を除いた。アルゴン置換した後、10 mM HEPES 緩衝液 24.2 μl とミリ Q 水 1 ml を加え、voltex で水和させた。この時フラスコの壁についている膜は超音波を用いて落とした。凍結融解、voltex を 5 回繰り返し、完全に水和させた後、1.5 ml のエッペンチューブに移しかえ、凍結乾燥を終夜（19 時間）行った。パウダー状になったサンプルに D_2O 24.2 μl を加え、遠心操作、凍結融解、voltex、を繰り返し行い、完全に再水和を行いペースト状にした。水和サンプルを遠心分離機を用いてガラスインサートに移し変え、ボンドで密閉した。ガラスインサートを固体 NMR 測定用のローターにつめ、測定を行った。

測定条件

MAS frequency	5 kHz
temperature	30℃
spectral width	30 kHz
^{1}H π/2 pulse width	3.5 μs
^{13}C π pulse width	8 μs
^{19}F π pulse width	12 μs
CP contact time	1.5 ms
^{19}F phase cycling	xy-8
^{13}C phase cycling	$\phi_1(x, y, x, y)_4$, $\phi_2(x, y, -x, -y)_4$ $\phi_3(x, y, -x, -y, -x, -y, x, y)_2$ $\phi_4(-x, -y, x, y, x, y, -x, -y)_2$ $\phi_5(x, y, -x, -y, -x, -y, x, y, -x, -y, x, y, x, y, -x, -y)$

UV スペクトルの測定

AmB の DMSO 溶液から 15 nmol を試験管に移し、真空ポンプで溶媒を除去した。その後、メタノール/クロロホルムに溶解させ、ステロール(150 nmol)と POPC(1.35 μmol)のクロロホルム溶液を加えた。エバポレータで溶媒を除去し、脂質フィルムを形成させた。真空ポンプで終夜乾燥後、8%スクロース溶液 1 ml を加え、voltex、超音波をかけて脂質を水和させた。分散液を 4 回凍結融解させることで MLV を形成させた。最後に分散液 170 μl に対し、1360 μl の 8%スクロース溶液を加えて希釈し、UV スペクトルを測定した。また、AmB を含まないリポソームを同様に調製し、バックグランドとして、AmB 含有リポソームの UV スペクトルデータから差し引いた。

謝辞

本研究は大阪大学大学院理学研究科化学専攻村田研究室で行われたものであり、研究生活の様々な面で御懇篤なる御指導、御助言を賜りました村田道雄教授に深く感謝致します。本研究を遂行するにあたり、直接の実験指導から常日頃より適切且つ丁寧な御助言及び多大な御助力を賜りました大石徹准教授に心から感謝致します。また、数々の適切な指導や有益な御助言、御討論いただきました松森信明助教に深く感謝致します。
研究のみならず日常生活においても様々な御助言をくださいました松岡 茂博士、葛西祐介博士、丸吉京介博士、鳥飼浩平博士、土川博史博士、渡部浩史博士、杉本賀規氏、同期の梅川雄一氏、毛利良太氏、および、生体分子化学研究室の皆さんに深く感謝致します。
最後に、経済的、精神的に支えてくださいました両親に深く感謝致します。

付録

公表論文

Synthesis of 25-^{13}C-Amphotericin B Methyl Ester: A Molecular Probe for Solid-state NMR Measurements. Matsushita, N., Matsuo, Y., Tsuchikawa, H., Matsumori, N., Murata M. and Oishi, T. *Chem. Lett.* **2009**, *38,* 114-115.

参考論文

Synthesis of 28-^{19}F-amphotericin B methyl ester. Tsuchikawa, H., Matsushita, N., Matsumori, N., Murata M. and Oishi, T. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47,* 6187-6191.