

Title	液胞型ATPアーゼを特異的に阻害するバフィロマイシ ンのフッ素標識体の設計および合成				
Author(s)	柴田, 一				
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文				
Version Type	VoR				
URL	https://doi.org/10.18910/34051				
rights					
Note					

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

### 学位論文

# 液胞型 ATP アーゼを特異的に阻害する バフィロマイシンのフッ素標識体の設計 および合成

### 平成 25 年度

大阪大学大学院理学研究科化学専攻

## 生体分子化学研究室

柴田 一

目次

第1章	序論	
1-1	液胞型 ATP アーゼ	1
1-2	V-ATPase 阻害剤とバフィロマイシン	10
1-3	固体 NMR によるタンパク質-リガンド分子複合体の構造解析	24
1-4	フッ素の性質とフッ素標識化天然物の合成	28
1-5	本研究の目的	30
参考	<b>芳文献</b>	32
第2章	本論	
2-1	フッ素標識化バフィロマイシン誘導体の設計	37
2-2	デスメチル 24-F-Baf の合成	40
2-3	24-F-Baf の合成	55
2-4	フッ素標識化バフィロマイシン誘導体の生物活性評価	63
2-5	考察	68
参考	芳文献	77
第3章	結論	79
実験の音	ß	80
スペク	ヽルデータ	109
謝辞		169
付録		170

### 略語表

24-F-Baf	24,24-didesmethyl-24-F <sub>3</sub> -bafilomycin derivative
Ac	acetyl
aq	aqueous
ATP	adenosine 5'-triphosphate
Baf	bafilomycin
bCG	bovine chromaffin granule
BINOL	1,1'-bi-naphthol
Bn	benzyl
Bu	butyl
Bz	benzoyl
cOc	chicken osteoclast
COSY	correlation spectroscopy
Ср	cyclopentadienyl
CSA	camphorsulfonic acid
dba	dibenzylideneacetone
DCCD	dicyclohexyl carbodiimide
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DEAD	diethyl azodicarboxylate
DEIPS	diethylisopropylsilyl
desmethyl-24-F	F-Baf
	$6,8,24,24$ -tetrakisdesmethyl- $24$ - $F_3$ -bafilomycin derivative
DFT	density functional theory
DIAD	diisopropyl azodicarboxylate
DIBAL	diisobutylaluminium hydride
DIP-Chloride	diisopinocampheyl chloroborane
DMAP	N,N-dimethylaminopyridine
DMF	N,N-dimethylformamide
DMP	Dess-Martin periodinane
DMSO	dimethyl sulfoxide
DQF	double-quantum filtered

ee	enantiomeric excess
eq	equivalent
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiinide
ESI	electrospray ionization
Et	ethyl
HF	hydrogen fluoride
HMBC	heteronuclear multiple bond cohearence
HMQC	heteronuclear quantum cohearence
HPLC	high performance liquid chromatography
<i>i</i> -	iso
IC <sub>50</sub>	half maximal inhibitory concentration
IR	inrfared
KHMDS	potassium hexamethyldisilazide
LAH	lithium aluminium hydride
LHMDS	lithium hexamethyldisilazide
L-Selectride	lithium tri-sec-butylborohydride
<i>m</i> -	meta
Me	methyl
MOM	methoxymethyl
MMTr	monomethoxytrityl
MNBA	2-methyl-6-nitrobenzoic anhydride
MS	mass spectrum
MS4A	molecular sieves 4A
MTPA	$\alpha$ -methoxy- $\alpha$ -(trifluoromethyl)phenylaceteic acid
<i>n</i> -	normal
NCS	N-chlorosuccinimid
NHMDS	sodium hexamethyldisilazide
NMO	N-mehylmorpholine N-oxide
NMP	N-methylpyrrolidone
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear Overhauser effect
NOESY	nuclear Ovarhauser effect spectroscpoy

0-	ortho
<i>p</i> -	para
PBS	phosphate buffer saline
Ph	phenyl
PMB	<i>p</i> -methoxybenzyl
ppm	parts per million
PPTS	pyridinium <i>p</i> -toluenesulfonate
Pr	propyl
Pv	pivaloyl
Ру	pyridine
R	hydrocarbon group
REDOR	rotational echo double resonance
quant.	quantitative
rt	room temperature
t-	tertiary
TBACl	tetrabutylammonium chloride
TBAF	tetrabutylammonium fluoride
TBAI	tetrabutylammonium iodide
TBDPS	t-butyldiphenylsilyl
TBS	t-butyldimethylsilyl
TEMPO	2,2,6,6,-tetramethylpiperidine 1-oxyl
TES	triethylsilyl
Tf	trifluoromethanesulfonyl
THF	tetrahydrofuran
TIPS	triisopropylsilyl
TLC	thin layer chromatograpy
TM	transmembrane
TMS	trimethylsilyl
TOF	time of flight
TPAP	tetrapropylammonium perruthenate
Ts	<i>p</i> -toluenesulfonyl
V-ATPase	Vacuolar type ATPase

WST-8 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2Htetrazolium 第1章 序論

1-1 液胞型 ATP アーゼ

液胞型 ATP アーゼ(V-ATPase) は水素イオンを能動輸送する膜貫通型タンパク質 であり、種々の生理現象に密接に関連している。放線菌より単離されたマクロリド系 天然物バフィロマイシンは、代表的な V-ATPase 阻害剤である。ここではまず、 V-ATPase の概要について述べる。

1-1-a 発現場所と機能

真核生物の細胞内部にはオルガネラと呼ばれる膜で囲まれた小器官が存在し、リソ ソームやエンドソームなどそれぞれ分化した器官に特有の構造や機能を有している (図 1-1)。これら小器官の内腔は酸性に保たれており、タンパク質の分解やエンド サイトーシスなど多様な生理現象に重要な役割を果たしている。この酸性環境を作り 出しているのが液胞型 ATP アーゼ(V-ATPase)と呼ばれる膜タンパク質であり、濃 度勾配に逆らってプロトンの能動輸送を行っている。V-ATPase は ATP の加水分解エ ネルギーを利用して水素イオンを汲み上げるプロトンポンプであり、酵母の液胞より 発見されて以来<sup>1)</sup>、真核生物の細胞小器官の内膜系に広く発現していることが明らか となった<sup>2,3,4,5)</sup>。また V-ATPase は内膜系だけでなく、破骨細胞やがん細胞など、特定 の細胞の細胞膜にも多く発現している(図 1-2)。破骨細胞に発現する V-ATPase は、 骨との間にある吸収窩と呼ばれる空間を酸性化することで骨の無機成分ヒドロキシ アパタイトの溶解とコラーゲンの分解などに関与しており、骨粗鬆症との関連が示唆 されている。またがん細胞では、V-ATPase は細胞内の pH 低下を防ぐことによりアシ ドーシスを防ぎ、さらに細胞外環境を酸性化することでがんの増殖や転移と関連して いることが示唆されている。このため V-ATPase はこれら疾患の新たな分子標的とし ても注目を集め、精力的な研究が行われている<sup>6,7,8,9)</sup>。



図 1-1 細胞小器官の内膜系に発現する V-ATPase 黄色は中性、赤色は酸性を示す。リソソームやエンドソームでは V-ATPase の働きに より pH が 4.5-6.0 となっており、タンパク質の分解や輸送に寄与している。

Reprinted with permission from *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 94-113.<sup>3</sup> Copyright © (2002) Nature Publishing Group.



図 1-2 細胞膜に発現する V-ATPase

a) 破骨細胞では骨との間にある吸収窩を酸性化し、骨吸収に関与する。b) がん細胞 では細胞内 pH 低下を防ぐだけでなく、細胞外環境を酸性化しがんの浸潤に関与する。 Reprinted with permission from *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002, *3*, 94-113.<sup>3</sup> Copyright © (2002) Nature Publishing Group.

#### 1-1-b 構造

V-ATPase の構造は出芽酵母 Saccharomyces cerevisiae やアカパンカビ Neurospora crassa 由来の V-ATPase を用い、透過型電子顕微鏡や原子間力顕微鏡、X 線結晶構造 解析などにより解明されてきた <sup>10,11.12,13)</sup>。酵母の V-ATPase は少なくとも 14 種のサブ ユニットからなる超分子複合体で、ATP の加水分解触媒機能を担う突出部分  $V_1$  と、 プロトンチャネルを形成する膜貫通部分  $V_0$ に大別される(図 1-3、表 1-1)。 $V_1$ 部分 での ATP の加水分解により生じるエネルギーは回転力として  $V_0$ 部分に伝えられ、こ の力を利用してプロトンが能動輸送される。

 $V_1$ 部分はサブユニット A,B,C,D,E,F,G,H から構成される。サブユニット A と B は 各々3 つが交互に並んで 6 量体を形成し、ATP の加水分解を行っている。ATP 加水分 解に伴うサブユニット A のコンフォメーション変化は、回転エネルギーとして中央回 転軸であるサブユニット D と F を通して V。部分に伝えられる。残るサブユニット C,E,G,H は固定子として働いている。

V。部分はサブユニット a,c,c',c'',d,e から構成されている。サブユニット c、c'、c'' は4回膜貫通部位を有し、6つが集まってプロトンの輸送機能を担うプロテオリピド リングと呼ばれる環構造を形成する<sup>14,15)</sup>。またサブユニット a は9回膜貫通型の巨大 なサブユニットであり、親水性のN末端と疎水性のC末端を有する。C末端側は膜 を貫通してプロトンチャネルを形成し、N末端側は固定子として働いている。サブユ ニットdはV<sub>1</sub>部分からの回転力をプロテオリピドリングに伝える役割を担っている。

各サブユニットの構造は主に X 線結晶構造解析により明らかにされてはきている ものの、その情報は限られている。これは膜タンパク質である V-ATPase は、真核生 物では主にオルガネラ内膜に存在するためその大量調製が困難なこと、また精製が難 しく失活もしやすいこと、さらに 14 種を超えるサブユニットからなる超分子複合体 であるため大腸菌等を用いた大量発現も困難であることなどが原因として挙げられ る。特に膜貫通部分であるプロテオリピドリングの構造の詳細は不明であったが、 2005 年に Murata らは、グラム陽性菌である腸内連鎖球菌 *Enterococcus hirae* のナトリ ウムイオン輸送性 V 型 ATPase のプロテオリピドリング構造を X 線結晶構造解析に より解明した (図 1-4)<sup>16</sup>。これは V 型 ATPase のリング構造の詳細が初めて明らか にされた例である。



図 1-3 V-ATPase のモデル図

Reprinted with permission from *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2012**, *44*, 1422-1435.<sup>13</sup> Copyright © (2012) Elsevier.

サブユニット	分子量 (kDa)	哺乳類のアイソフォーム (組織)	サブユニットの機能
V <sub>1</sub> ドメイン A	70		ATP の加水分解部位、固定子
В	60	B1(腎臓、精巣上体) B2(普遍的)	固定子、アクチンおよび アルドラーゼ結合部位
С	40	D2(首遍功) C1(普遍的) C2a b(肺, 腎職, 精単上体)	」 「加ドリーで結合部位 固定子、アクチン結合部位
D	34		回転子
Е	33	E1(精巣) E2(普遍的)	固定子、RAVE <sup><i>a</i></sup> および アルドラーゼ結合部位
F	14		回転子
G	13	G1(普遍的), G2(神経細胞) G3(腎臓、精巣上体)	固定子、RAVE <sup>a</sup> 結合部位
н	50		固定子、NEF <sup>b</sup> 結合部位
V。ドメイン			
a	100	a1(神経細胞), a2(内皮細胞) a3(破骨細胞), a4(腎臓、精巣上体)	プロトン輸送、固定子 アルドラーゼ結合部位
d	38	d1(普遍的), d2(腎臓、精巣上体)	回転子
е	9		不明
c c'	17	哺乳 新にたなせず	プロトン輸送、回転子
c"	21	тнн <del>т</del> u <del>дд</del> г⊂ 17 1⊥ с У	プロトン輸送、回転子

表 1-1 V-ATPase を構成するサブユニットとその機能<sup>4)</sup>

<sup>a</sup> RAVE: regulator of the ATPase of vacuolar and endosomal membranes

<sup>b</sup> NEF: negative replication factor

Cytoplasm



図 1-4 腸内連鎖球菌 Enterococcus hirae のナトリウムイオン輸送性 V型 ATP アーゼ のプロテオリピドリングの結晶構造

Reprinted with permission from *Science*, **2005**, *308*, 654-659.<sup>16</sup> Copyright © (2005) The American Association for the Advancement of Science.

V-ATPase と類似した構造を有するものとして、細菌の細胞膜や真核生物のミトコ ンドリア内膜および葉緑体のチラコチド膜等に存在する F-ATPase がある (図 1-5)<sup>17)</sup>。 F-ATPase はプロトンの濃度勾配と膜電位を用いて ATP の合成を行う ATP 合成酵素 である。V-ATPase と F-ATPase の構造には類似点が多く、F-ATPase は ATP 合成を担 う  $F_1$ 部分と膜を介したイオン透過の働きを担う  $F_0$ 部分を有する。複合体構造および 機能に関する研究は、V-ATPase に比べて F-ATPase が先行しており、X 線結晶構造解 析等によりサブユニットの位置関係や機能発現に関する研究が展開されている。一方 で V-ATPase は、その存在が真核生物に限られており解析が困難であったため、 F-ATPase に比べ分子生物学・生化学的研究は遅れ、全体の構造も解かれていない。



図 1-5 F-ATPase の構造

Reprinted with permission from *Nat. Rev.* **2004**, *5*, 1-12.<sup>17</sup> Copyright © (2004) Nature Publishing Group.

1-1-c 回転分子モーターの証明

V-ATPase が ATP 駆動性の回転分子モーターとしてプロトンを輸送していることは、 2003 年に今村・横山らによる 1 分子観察により証明された(図 1-6)<sup>18)</sup>。彼らはまず、 真正細菌 *Thermus thermophilus* 由来 V-ATPase のサブユニット A をヒスチジンタグを 用いてガラス基盤に固定化した。次いでサブユニット D および F にシステイン残基を 介して可視化プローブとなるビーズを結合させた。ここに ATP を加えると回転する 様子を、顕微鏡により観察することに成功している。同様にサブユニット c にビーズ を結合させることで ATP の加水分解依存的にサブユニット c が回転する様子を観測 することに成功した<sup>19)</sup>。これらの実験から V-ATPase が ATP の加水分解エネルギーを 駆動力とするモータータンパク質であることが証明された。



図 1-6 V-ATPase が回転分子モーターであることを示した実験 ATP の添加により可視化プローブであるビーズを有するサブユニットD およびFは、 ガラス基盤に固定化されたサブユニットA に対して回転することが観測された。 Reprinted from *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 2312-2315.<sup>18</sup> Copyright © (2003) National Academy of Sciences, USA.

1-1-d プロトンの輸送メカニズム

V-ATPase のプロトン輸送メカニズムの解明は、主にアミノ酸への変異導入実験に より行われ、プロトン輸送にはサブユニット c<sup>14,20)</sup>とサブユニット a<sup>21,22)</sup>が関わってい ることが明らかにされた。サブユニット c は酸性アミノ酸であるグルタミン酸を1つ 有している(サブユニット c では E137、c'では E145、c''では E108;図1-7)。ここに 変異を導入すると V-ATPase 活性が阻害されることから、このグルタミン酸がプロト ン輸送に必須であることが示唆された<sup>23)</sup>。このグルタミン酸はサブユニット c と c' では TM4 に、c''では TM2 に存在し、脂質二重膜の中央付近に位置している<sup>14,20,23)</sup>。





Reprinted with permission from *FEBS Lett.* **2003**, *545*, 76-85.<sup>23</sup> Copyright © (2003) Elsevier.

またサブユニット a への変異導入実験から H729, H735, L739, H743, E789, R799, V803 の 7 個のアミノ酸残基が活性発現に重要であることが示唆されている(図 1-8)<sup>21,22)</sup>。特に TM7 に存在する R735 に変異を導入すると著しく活性が損なわれることから、R735 は活性発現に必須であると考えられている。詳細なプロトン輸送のメカニズムは、研究が先行している F-ATPase の機構<sup>24,25,26)</sup>を基に次のように考えられている(図 1-9)<sup>3,4,23,27)</sup>。







プロトンはサブユニット a の細胞質側の hemi-channel から膜の内部に入り、隣接し ているサブユニット c のグルタミン酸残基に結合する。その後、V<sub>1</sub>部分での ATP の 加水分解エネルギーによりプロテオリピドリングは細胞質側から見て時計回りに回 転する。疎水的な膜内部を移動したグルタミン酸は、サブユニット a が形成する内腔 側の hemi-channel に辿り着くと、ここに存在するサブユニット a のアルギニン残基と 相互作用して脱プロトン化を受ける。放出されたプロトンは hemi-channel を通って内 腔側に抜けていく。プロトンを放出したグルタミン酸は、そのまま回転が起こること で再度プロトン化され、これが繰り返される。このように ATP の加水分解により生 じたエネルギーがプロテオリピドリングを回転させ、これによりプロトンが細胞質側 から内腔側に汲みあげられる。



図 1-9 V-ATPase のプロトン輸送の推定メカニズム

ATP の加水分解により生じたエネルギーがプロテオリピドリングを回転させ、これに よりプロトンが細胞質側から内腔側に汲みあげられる。詳しくは本文参照。

Reprinted with permission from *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 917-929.<sup>4</sup> Copyright © (2007) Nature Publishing Group.

#### 1-2 V-ATPase 阻害剤とバフィロマイシン

#### 1-2-a V-ATPase 阻害剤

V-ATPase を特異的に阻害する化合物は、オルガネラや細胞での V-ATPase の発現を 確認するための貴重なツールとしてだけでなく、その器官の機能解明にも重要な役割 を果たしてきた。また V-ATPase は骨粗鬆症やがん疾患などの新たな創薬ターゲット としても注目を集めているため、阻害機構の解明研究も盛んに行われてきた。代表的 な V-ATPase 阻害剤であるバフィロマイシン<sup>28,29)</sup>は、類似した構造を有するコンカナ マイシン<sup>30,31)</sup>やハイグロリジン<sup>32,33)</sup>、ホルマミシン<sup>34,35)</sup>、エライオフィリン<sup>36,37)</sup>、マ イクロモノスポリド<sup>38)</sup>らとともに"plecomacrolides family"と呼ばれる一連のマクロリ ド系天然物に分類される(図 1-10)<sup>39)</sup>。これら化合物の構造的特徴として、2 つのジ エンを含む 16 あるいは 18 員環のマクロラクトンを有すること、ヘミアセタール構造 をとるテトラヒドロピラン環を有すること、それらが 3 炭素のリンカーで連結した構 造を有することなどが挙げられる。バフィロマイシンやコンカナマイシンは V-ATPase 特異的な阻害剤であり、IC<sub>50</sub>値が 1 nM 以下と強力な活性を有する<sup>40,41)</sup>。こ の阻害効果を指標として細胞や組織での V-ATPase の発現が調べられ、V-ATPase が多 くの器官や細胞で様々な機能を担っていることが明らかにされている。

また近年、これらのマクロリドとは異なる構造を有するサリシリハラミド<sup>42</sup>、アピ クラレン<sup>43,44)</sup>、アルカゾリド<sup>45)</sup>といった化合物が、新しいタイプの V-ATPase 阻害剤 として発見されている(図 1-11)。



図 1-10 plecomacrolide family に属するマクロリド系天然物の構造



図 1-11 種々の V-ATPase 阻害剤の構造

#### 1-2-b バフィロマイシンの単離と構造決定

バフィロマイシンは放線菌 Streptomyces griseus から単離されたマクロリド系天然物 であり、バフィロマイシン  $A_1$  (Baf)を始め、 $B_1$ ,  $C_1$ , D など数多くの類縁体が単離、 構造決定されている(図 1-12)<sup>28,29,46</sup>。バフィロマイシンは抗菌活性、抗真菌活性、 抗腫瘍活性、抗マラリア活性など幅広い生物活性を有することが報告されている <sup>29,47,48)</sup>。中でも 1988 年に Bowman らによりバフィロマイシン  $A_1$  が V-ATPase を特異 的かつ強力に阻害することが報告されて以来、多くの注目を集めている<sup>40)</sup>。バフィロ マイシン A<sub>1</sub>の平面構造は 1983 年に NMR により決定され、絶対立体配置は NMR と 分子モデリング計算により推定された後、1987 年に X 線結晶構造解析により確定さ れた<sup>28,33,49)</sup>。バフィロマイシンは酸や塩基に不安定であり、pH が 6 以下あるいは 13 以上では分解してしまうと報告されている<sup>28,29)</sup>。



図 1-12 バフィロマイシン類の構造

またバフィロマイシン A<sub>1</sub>の X 線結晶構造解析からバフィロマイシンの 17 位、19 位のヒドロキシ基およびラクトンのカルボニル酸素間には分子内水素結合が存在す ることが明らかにされ、バフィロマイシンは比較的剛直な構造を有していることが示 唆された(図 1-13)<sup>49</sup>。さらに溶液状態でのコンフォメーション解析も、プロトンの 結合定数と NOE 実験から行われている。その結果、重クロロホルム中でのコンフォ メーションは結晶状態のコンフォメーションと同じであることが示唆され、活性発現 に重要であると考えられている<sup>50</sup>。



図 1-13 バフィロマイシン A<sub>1</sub>の結晶構造<sup>49)</sup>

1-2-c バフィロマイシンの合成研究例

バフィロマイシンはその興味深い生物活性と特異な構造から有機合成化学者の興味を惹き、これまでに 5 つの全合成を含む数多くの合成研究が報告されている<sup>51)</sup>。 Evans らは、ケトンより調製した Z-エノラートとアルデヒドとをアルドール反応により連結することでβ-ヒドロキシケトンを 95:5 のジアステレオ選択性で合成し、続くシリル基の除去によりバフィロマイシン A<sub>1</sub>の初の全合成を達成した(スキーム 1-1)<sup>52)</sup>。 このアルドール反応において彼らは、数多くのモデル実験からルイス酸として PhBCl<sub>2</sub> を、またケトンが有するジオール部分の保護基として環状シリル基を用いることが高いジアステレオ選択性発現に重要であることを報告している。



スキーム 1-1 Evans らによるバフィロマイシン A1の全合成

また Toshima らは、アルケニルスタナンとヨードオレフィンを Stille カップリング により連結し、山口マクロラクトン化によりラクトン環の構築を行った(スキーム 1-2)。続いて Evans らと同様にジアステレオ選択的なアルドール反応によりエチルケ トンを連結し、シリル基を除去することでバフィロマイシン A<sub>1</sub>の全合成を達成した 53,54,55)



Roush らは、ボロン酸とヨードオレフィンを鈴木-宮浦カップリングにより連結し、 山口マクロラクトン化によりラクトンを合成した(スキーム 1-3)。続いて向山アル ドール反応によりアルデヒドを連結し、シリル基を除去することでバフィロマイシン A<sub>1</sub>の全合成を達成した<sup>56,57,58,59,60</sup>。



スキーム 1-3 Roush らによるバフィロマイシン A1 の全合成

Hanessian らは独自に開発した1,2-不斉誘導反応を鍵反応<sup>61,62</sup>としてヨウ化物および ジチアンを合成し、両者をジチアンのアルキル化反応により連結した(スキーム1-4) <sup>63)</sup>。続いて増炭を経てアルケニルスタナンへと変換し、Stille カップリングによりヨー ドオレフィンを連結した。その後山ロマクロラクトン化を行い、シリル基を除去する ことでバフィロマイシン A<sub>1</sub>の全合成を達成した。



スキーム 1-4 Hanessian らによるバフィロマイシン A1の全合成

Carreira らは独自に開発したニトリルオキシドの 1,3-双極子付加環化反応 <sup>64)</sup>を鍵反応として合成したアルデヒドに対して、亜鉛アセチニリドの付加反応により C13-C14結合を構築した(スキーム 1-5)<sup>65,66)</sup>。生じたエンインをジエンへと還元後、山口マクロラクトン化によりラクトンへと変換し、続いて向山アルドール反応によりアルデヒドを連結した。最後に脱保護することでバフィロマイシン A<sub>1</sub>の全合成を達成した。



以上のようにバフィロマイシンの全合成では、その合成戦略にある程度共通点が見られる(図 1-14)。マクロラクトン部分は主としてパラジウムを用いたクロスカップリング反応により C11-C12 結合を形成した後、マクロラクトン化反応により構築されている。また、ヘミアセタール部分は主にアルドール反応により導入されており、C17-C18 結合あるいは C20-C21 結合の形成による連結が行われている。



図 1-14 バフィロマイシン A1の全合成に用いられている主な鍵反応

1-2-d バフィロマイシンの構造活性相関研究

バフィロマイシンの活性発現に重要な部位は、天然物や天然物から合成した誘導体 を用いた構造活性相関研究からある程度明らかにされている<sup>41,67,68)</sup>。表 1-2 にニワト リの破骨細胞およびウシのクロマフィン顆粒を用いた場合のプロトン輸送の阻害効 果を示す。バフィロマイシンは3つの第2級ヒドロキシ基を有するが、21位ヒドロキ シ基が最も反応性が高い。これは、7位ヒドロキシ基は立体的に込み入った位置にあ り、また17位ヒドロキシ基は19位ヒドロキシ基およびラクトンのカルボニル酸素と ともに、水素結合形成に関与しているためである。21位ヒドロキシ基はアセチル化あ るいはベンゾエート化しても活性は大きく変化はせず、酸化しても活性が落ちないこ とから、活性発現には重要ではないことが示唆されている(表 1-2, compd 2, 3, 6)。 また 19位ヒドロキシ基はメチルアセタール化しても活性に影響しないことも報告さ れている(compd 7)。一方、7位ヒドロキシ基は酸化すると活性が約30倍低下する ことから、活性発現に重要であると考えられている(compd 11)。さらに7位と21 位を誘導化すると活性は大幅に失われる(compd 12,13,14,15)。

テトラヒドロピラン環に関しては、環構造が失われたバフィロマイシン D では活性 が一桁低下し、テトラヒドロピラン環を形成する C20-C25 炭素を有していない化合物 17 は顕著な阻害活性を示さない (compd 16,17)。さらに 23 位にエチル基を有する 24デメチルバフィロマイシンやペンタジエニル基を有するマイクロモノスポリドは、バフィロマイシンが示す生物活性を有していることも報告されている(図 1-9、1-11)<sup>38,69)</sup>。 したがって、テトラヒドロピラン環の存在自体はバフィロマイシンの活性発現に重要 であると考えられるが、環上に存在する 23 位置換基は活性に影響しないことが示唆 される。

さらにマクロラクトン骨格について、ジエン構造を一部還元すると活性が約 2000 倍低下し、全て還元すると活性が失われる(compd 18,19)。またラクトン環を開くと 活性が数百倍低下する(compd 20)。したがって、特徴的なマクロラクトン骨格は活 性発現に必須であると考えられている。

以上をまとめると、バフィロマイシンの活性発現には7位ヒドロキシ基を含む特徴 的なマクロラクトン骨格は重要である。一方、テトラヒドロピラン環も重要ではある が、その存在は不可欠というわけではなく、ある程度の官能基変換も許容されると考 えられる。しかし、構造活性相関研究は天然物からの誘導が可能な箇所に限られてい るのが現状であり、全貌が明らかになっているとは言いがたい。

# 表 1-2 バフィロマイシンの構造活性相関研究<sup>67)</sup>



Table 1-2. Inhibition of proton transport in chicken osteoclast (cOc) and bovine chromaffin granule (bCG) $^{\circ}$								
						potency	/ ratio	
						(IС <sub>50</sub> с	ompd/IC <sub>50</sub>	Baf)
	compd	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>		cOc	bCG	
	1 (Baf) <sup>a</sup>	ОН	ОН	ОН		1	1	
	2	ОН	ОН	MeCO <sub>2</sub>		2	1.4	
	3	ОН	ОН	PhCO <sub>2</sub>		4	1.6	
	4	ОН	ОН	FmocNHCH <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	60	1.2	
	5	ОН	ОН	MeO		1.3	1.2	
	6	OH	OH	=O	ľ	2	2.2	
	7	ОН	OMe	OH		1.4	1.4	
	8	ОН	OMe	MeCO <sub>2</sub>		1.3	1.8	
	9	ОН	OMe	PhCO <sub>2</sub>	ſ	42	9.1	
	10	ОН	OMe	PrO	r	4	5	
	11	=0	OH	OH		34	32	
	12	=O	OH	=O		103	112	
	13	=O	ОН	MeCO <sub>2</sub>		531	552	
	14	MeCO <sub>2</sub>	ОН	MeCO <sub>2</sub>		49	280	
	15	MeCO <sub>2</sub>	ОН	MeO	· ·	430	738	
	16	-	-	-		9	15	
	17	-	-	-		na <sup>b</sup>	na <sup>b</sup>	
	18	-	-	-	ľ	2160	2110	
	19	-	-	-		na <sup>b</sup>	na <sup>b</sup>	
	20	-	-	-		200	330	
$^{a}$ IC <sub>50</sub> of bafilomycin A <sub>1</sub> was 1-3 nM in cOc and 0.6-1.5 nM in bCG.								
	<sup>b</sup> IC <sub>50</sub> greate	r than 10 μľ	vi.					
	<sup>c</sup> Gagliardi, S. et al. J. Med. Chem 1				3.			



1-2-e バフィロマイシンの V-ATPase 阻害活性発現機構

バフィロマイシンやコンカナマイシンの結合部位や阻害機構の解明は、新たな治療 薬の開発など創薬の観点から関心が高いだけでなく、V-ATPaseの構造やプロトン輸 送機能の解明にもつながることから精力的な研究が行われてきた。

バフィロマイシンの結合部位は、ウシのクロマフィン顆粒由来の V-ATPase を用いた実験により報告された<sup>70,71,72,73)</sup>。Hanada らはバフィロマイシンにより阻害されていた V-ATPase のプロトン輸送活性が、V<sub>o</sub>部分を加えると復活することを示し、バフィロマイシンは V<sub>o</sub>部分に作用することが示唆された<sup>70)</sup>。また Zhang らは、同様にサブユニット a を加えても活性がある程度復活することを報告し、バフィロマイシンの結合部位はサブユニット a であることが示唆された<sup>72)</sup>。

ー方、バフィロマイシン  $C_1$ を用いたアフィニティークロマトグラフィーにおいて、 DCCD 存在下では V-ATPase はバフィロマイシンが固定化されたカラムに結合しない ことが報告された<sup>74)</sup>。 DCCD はサブユニット c に結合することが明らかになっている ため<sup>75,76,77)</sup>、この実験ではバフィロマイシンの結合部位は DCCD と同じサブユニッ ト c であることが示唆された。

このようにバフィロマイシンの結合部位ははっきりとせず、コンカナマイシンに関 しては報告されていなかったが、2000年代に入り光親和性標識実験およびアミノ酸へ の変異導入実験により詳細な結合部位の探索が行われた。Huss らは、コンカナマイシ ンの光親和性標識体を用いた標識実験を行い、タバコスズメガ Manduca sexta の中腸 より精製した V-ATPase のサブユニット c が特異的に標識されることを明らかにした <sup>78)</sup>。また彼らは、バフィロマイシンの 21 位に光親和性標識を導入した標識体 D-バフ ィロマイシンを用いて同様の実験を行い、サブユニット c だけでなくサブユニット a も D-バフィロマイシンにより標識されることを報告した<sup>79)</sup>(図 1-15)。



レーン4はUV照射、レーン5はUV非照射。D-バフィロマイシンによりサブユニットcとともにサブユニットaが特異的に標識された。

This research was originally published in Journal of Biological Chemistry. Qsteresch, C.; Bender, T.; Grond, S.; von Zezschwitz, P.; Kunze, B.; Jansen, R.; Huss, M.; Wieczorek. The Binding Site of the V-ATPase Inhibitor Apicularen Is in the Vicinity of Those for Bafilomycin and Archazolid. *J. Biol. Chem.* 2012; 287:31866-31876.<sup>79</sup> © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

また Bowman らはアカパンカビ Neurospora crassa のサブユニット c のアミノ酸へ変 異導入を行うことで、結合部位の探索を行った<sup>80)</sup>。彼らはランダムに変異を導入する ことによりバフィロマイシン耐性株およびコンカナマイシン耐性株を調製し、バフィ ロマイシンがサブユニット c に作用することだけでなく、変異が生じていたアミノ酸 から結合に関与しているアミノ酸を推定した。さらに任意の箇所に変異を導入するこ とにより、バフィロマイシンとの結合に重要であると考えられる 10 個のアミノ酸残 基を明らかにした(図 1-16)<sup>81,82)</sup>。これらのアミノ酸残基は、サブユニット c のヘリ ックス 1, 2, 4 上に固まって位置していた。一方、Wang らはサブユニット a への変異 導入実験により、TM7 に存在する E721, L724, N725 に変異を導入した場合に程度は弱 いながらもバフィロマイシン耐性株が生じることを明らかにし、サブユニット a も結 合部位の一部であることを報告している<sup>83)</sup>。以上をまとめると、サブユニット c がバ フィロマイシンの結合部位であり、サブユニットaも結合部位の一部を占めていると 考えられている。



- 図 1-16 バフィロマイシン耐性株における変異が導入されたアミノ酸の位置
- a) プロテオリピドリングを形成する6つのサブユニットcを細胞質側から見た配置モ デル。各サブユニットcは4つの膜貫通へリックスを有し、TM2と4が外側に位 置する。
- b) 赤丸部分を拡大し、隣接する2つのサブユニットcを helical wheel 図として示す。 黒矢印と数字は変異を導入したアミノ酸残基と変異導入による K<sub>i</sub> 値の変化を表 す。K<sub>i</sub>値の変化が大きい赤字のアミノ酸残基がバフィロマイシンとの相互作用に 重要であると考えられる。これらのアミノ酸残基はヘリックス 1,2 と隣のサブユ ニットのヘリックス4上に固まって位置している。

These researches were originally published in Journal of Biological Chemistry. Bowman, E. J.; Graham, L. A.; Stevens, T. H.; Bowman, B. J. The Bafilomycin/Concanamycin Binding Site in Subunit c of the V-ATPase from *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem.* 2004; 279:33131-33138.<sup>81</sup> and Bowman, B. J.; McCall, M. E.; Baertsch, R.; Bowman, E. J. A Model for the Preteolipid Ring and Bafilomycin/Concanamycin-binding Site in the Vacuolar ATPase of *Neurospora crassa. J. Biol. Chem.* 2006; 281:31885-31893.<sup>82</sup> © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

サブユニットcは膜貫通部位であり、その構造は解かれていない。相当する部分の 構造が唯一解かれているものとして、1-1節で述べたように腸内連鎖球菌 *Enterococcus hirae*の細胞膜に存在し、ナトリウムイオン輸送機能を有する V-ATPase のローターリ ング(K-ring)が挙げられる。そこで Bowman らはこの K-ring の結晶構造からホモロ ジーモデリングによりアカパンカビの c-ring の構造を推定し、アミノ酸変異導入実験 の結果を組み合わせることで結合部位の推定を行った<sup>82)</sup>。その結果、サブユニット c とサブユニット c の間に結合ポケットが存在することを提唱した(図 1-17)。



図 1-17 分子モデリング計算により推定されたバフィロマイシンの結合部位 カラー表示がサブユニット c、白色が変異導入実験によりバフィロマイシンとの相互 作用に重要であると考えられるアミノ酸残基、右側の灰色と赤色で表されている分子 がバフィロマイシンを表す。バフィロマイシンとの相互作用に重要であると考えられ るアミノ酸残基は、サブユニット c とサブユニット c の間に位置していることが示さ れ、結合ポケットの存在が提唱された。

This research was originally published in Journal of Biological Chemistry. Bowman, B. J.; McCall, M. E.; Baertsch, R.; Bowman, E. J. A Model for the Preteolipid Ring and Bafilomycin/Concanamycin-binding Site in the Vacuolar ATPase of *Neurospora crassa. J. Biol. Chem.* 2006; 281:31885-31893.<sup>82)</sup> © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

このようにバフィロマイシンの詳細な結合部位の探索は、主に光親和性標識実験と アミノ酸への変異導入実験により行われてきた。しかしホモロジーモデリングを利用 した結合部位の推定は、精度の点で問題が残る。また光親和性標識実験は、未知の標 的分子の同定には威力を発揮するものの、原理的にアミノ酸残基レベルまでの同定が 限度であり、詳細な結合部位の情報を得ることは難しい。一方変異導入実験では、バ フィロマイシンの V-ATPase 阻害活性が効いていない状態、すなわち相互作用がない 状態を見ているため、間接的な相互作用情報にとどまってしまう。このため、バフィ ロマイシンの詳細な結合部位や、V-ATPase とバフィロマイシンはどのような相互作 用により結合しているか、あるいは相互作用に関与している官能基など、分子レベル での結合様式は依然として不明のままである。このような阻害機構の分子基盤を解明 するためには、バフィロマイシンと V-ATPase の相互作用を直接的に観測できる手法 の適用が必要である。通常、タンパク質とリガンドの相互作用を直接的に観測する手 法としては、X線結晶構造解析や溶液 NMR による構造解析が有用な手段である。し かし V-ATPase は複雑な超分子膜タンパク質であるためこれらの手法が適用困難であ り、複合体構造の情報はほとんど得られていないのが現状である。相互作用を直接観 測し、結合様式を詳細に解明するためには、膜タンパク質などの複雑な系においても 構造解析が可能な新たな手法が求められる。 1-3 固体 NMR によるタンパク質-リガンド分子複合体の構造解析

これまでに数多くのペプチドやタンパク質の3次元構造やリガンドとの複合体構造 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<sup>84,85)</sup>。X線結晶構造解 析では、分子量の大きなタンパク質でもその構造を解析することが可能であるが、結 晶化を行う必要があり、良質な単結晶が得られなければ精度よく構造決定を行うこと ができない。一方溶液 NMR では試料を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。実際、核オーバーハウザー効果(NOE)から得た原子間距離と分 子動力学計算による構造最適化を組み合わせることで、タンパク質の立体構造が決定 されてきた<sup>86)</sup>。しかし、不溶性のタンパク質など溶解性の低い試料に対しては適用す ることが困難である。

生物がもつタンパク質の約 30%近くを占める膜タンパク質では、溶解性が低いだけ でなく、生体膜に埋め込まれた状態から構造と活性を保ったまま精製・結晶化するこ とが困難である。このため、X線結晶構造解析や溶液 NMR により構造解析を行うこ とは現在でも大きな課題となっている。このような結晶化および可溶化が困難な試料 の構造解析を行う手法として、近年固体 NMR が注目を集めている<sup>87,88)</sup>。固体 NMR では試料の状態に関わらず構造解析を行うことが可能であり、中でもその測定手法の 一つである回転エコー二重共鳴法 (Rotational Echo DOuble Resonance; REDOR)<sup>89)</sup>では、 双極子相互作用の大きさを測定することで、異種核間の距離を測定することができる。 これにより分子構造の情報を得ることが可能であるため、固体 NMR は生体分子の新 たな構造解析手法として着目され、タンパク質やリガンド複合体の構造解析に適用さ れてきている<sup>90,91,92,93,94</sup>)。以下にその適用例を2例示す。

Cady らは、インフルエンザウイルス膜に存在する M2 タンパク質の阻害剤アマンタ ジンの結合部位の探索を、固体 NMR を用いて行った(図 1-18)<sup>95)</sup>。M2 タンパク質 は 4 量体のイオンチャネルであり、(i) アマンタジンがチャネル内部に入り込むこと で水素イオンの通過を阻害する<sup>96)</sup>、あるいは(ii) チャネルの C 末端側にアマンタジン 4 分子が結合しチャネルを閉鎖した状態に保つことで阻害活性を示す<sup>97)</sup>、という異な る報告が X 線結晶構造解析および溶液 NMR 解析により行われていた。そこで彼らは、 重水素標識したアマンタジンと<sup>13</sup>C 標識した M2 タンパクの膜貫通部分を用いて <sup>13</sup>C{<sup>2</sup>H} REDOR 測定を行った。その結果、アマンタジンはセリン 31 に最も近いこと が解明され、チャネルをふさぐことで阻害活性を示していることが明らかにされた。



図 1-18 アマンタジンの構造および M2 タンパク質との複合体構造モデル アマンタジンはセリン 31 に最も近いことが解明された。

Reprinted with permission from *Nature* **2010**, *463*, 689-693.<sup>95</sup> Copyright © (2010) Nature Publishing Group.

また Cegelski らは、細菌の細胞壁合成酵素を阻害するバンコマイシンの結合部位の 探索を行った(図 1-19)<sup>98,99,100)</sup>。バンコマイシンはペプチドグリカンの D-Ala-D-Ala 配列を認識することが、モデルペプチドを用いた溶液 NMR 構造解析により報告され ていた<sup>101)</sup>。しかしペプチドグリカン-バンコマイシン複合体の構造解析は、細胞壁が 非結晶性であり、溶解性も悪いため行われていなかった。そこで詳細な構造を明らか にするため、生合成により<sup>13</sup>C および<sup>15</sup>N を導入したペプチドグリカンと、フッ素標 識化バンコマイシン誘導体を用い、長距離の測定が可能な<sup>13</sup>C{<sup>19</sup>F} REDOR 法による 距離測定が行われた。その結果、バンコマイシンは細胞壁環境を再現した系において もペプチドグリカンに直接作用していることが示され、ペプチド骨格が D-Ala-D-Ala 配列を認識し、糖部分はグリシンブリッジを介して隣接するペプチド鎖と、第二の結 合部位を形成していることが提唱された。



図 1-19 a) ペプチドグリカンのモデル図、b) バンコマイシンおよびフッ素標識化誘 導体の構造、c) 複合体分子モデル。水色は D-Ala-D-Ala 配列、緑色はフッ素、紫はグ リシンブリッジを表す。バンコマイシンのペプチド骨格が D-Ala-D-Ala を認識し、糖 部分は Neighboring stem と第二の結合部位を形成することが提唱された。

Reprinted with permission from *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 5767-5775.<sup>102</sup> Copyright © (2010) Nature Publishing Group.

このように REDOR 法は、特に不溶性タンパク質に作用するリガンドの結合位置を 解明する上で有用な手法であると考えられる。しかし NMR の測定核種である <sup>13</sup>C や <sup>15</sup>N は天然存在比が低く、<sup>19</sup>F は天然の生体分子には含まれていないため、標識核を導 入した誘導体を調製することが必要である。<sup>19</sup>F を用いる利点として、<sup>19</sup>F は核磁気回 転比がプロトンに次いで大きいため、標識核として用いることで長距離測定が可能で ある。<sup>13</sup>C-<sup>19</sup>F 原子間距離であれば 10 Å 程度までの距離が、条件が良ければ± 0.1 Å の 精度で測定できる。さらに <sup>19</sup>F はスピンが 1/2 かつ同位体の天然存在比が 100% である ため感度がよく、天然化合物にはほとんど存在しないことから、バックグランドシグ ナルが非常に低く、正確な距離情報が得られるという点でも有効である。

バンコマイシンの例では天然物から容易に誘導可能な側鎖に<sup>19</sup>F を導入しているた め、標識位置が分子骨格から離れた位置、かつ自由回転が可能な結合を3つ挟んだ位 置にある。このため、この誘導体を用いてレセプターとの正確な結合様式を解明する ことは困難であると考えられる。この問題を解決するためには、分子骨格そのものに 標識を導入することが必要である。ペプチドやタンパク質へ標識核を導入することは、 遺伝子工学的手法や無細胞タンパク質合成系などを用いることで比較的容易である。 一方、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 全合成に匹敵する誘導体の合成が必要である。また長距離測定が可能な<sup>13</sup>C{<sup>19</sup>F} REDOR 測定を行うためには、フッ素を分子骨格に導入することが必要である。しか し次節で述べるように、フッ素は化合物の活性や物性を大きく変化させてしまう恐れ があるため、活性を保持したフッ素標識体の調製が必須である。さらに REDOR 法で は測定ごとに最適な標識体を調製する必要性がある。したがってこれら合成化学的な 観点からの困難さも伴うことから、現在のところ REDOR 法の適用はペプチドやごく 一部の低分子化合物などに限られている。 1-4 フッ素の性質とフッ素標識化天然物の合成

前節で述べたように固体 NMR、特に標識核間の距離を測定する REDOR 法はタン パク質-リガンド複合体の構造解析に有用な手法である。長距離測定を行うためには 標識核としてフッ素を選択することが必要となる。しかし フッ素は電気陰性度が全 元素の中で最大であり、強い電子求引性を有するため、フッ素置換近傍の官能基の性 質や反応性を変化させることが知られている(表 1-3)<sup>103)</sup>。また C-F 結合の強い結合 エネルギーや、大きな疎水性、さらには水素結合形成能を有することもフッ素の特徴 的な性質の一つである。このことから有機化合物へのフッ素原子の導入は、その物理 的性質や安定性および生物活性に大きな影響を与える可能性がある。そのため、フッ 素置換によりもたらされる効果を的確に予想し、適切な位置にフッ素を導入した誘導 体を調製することが大変重要である。

element	bond length /pm	van der Waals radius /pm	bond energy /kJ·mol <sup>-1</sup>	electronegativity
	(CH <sub>3</sub> -X) (Bondi)		(CH <sub>3</sub> -X)	(Pauling)
Н	109	120	414	2.20
С	154	170	347	2.55
F	138	147	485	3.98
O (OH)	143	152	359	3.44
CI	179	175	339	3.16
S (SH)	182	180	271	2.58

表 1-3 フッ素の主な性質<sup>103)</sup>

当研究室の土川らは、抗真菌剤として広く用いられているアンフォテシンBのフッ 素標識化誘導体の合成を報告している<sup>104)</sup>。彼らはアンフォテリシンBのポリエン上 の28位にフッ素を有する誘導体(28-F-AME)を設計し、天然物から切り出したセグ メントとフッ素を有するセグメントを連結することで効率的な合成を達成した(図 1-20)。28-F-AME はポリエン上にフッ素を有するため安定であり、また物性および 活性も大きく変化しないことが予想された。実際、28-F-AME の生物活性は天然物と 同等であり、固体 NMR を用いた複合体構造解析に利用されている。しかしその合成 は、全 40 段階以上と多段階を要し、また測定に十分なサンプル量が必要であったこ となどから、天然物の全合成に匹敵する困難さを併せもつものであった。そのため、 適切な位置にフッ素を導入した化合物の設計と、その化合物の効率的な調製の実現が、 このような研究の重要な課題といえる。




#### 1-5 本研究の目的

V-ATPase は種々の生命現象において重要な役割を担っており、その構造や機能の 解明に興味が持たれてきた。また骨粗鬆症やがん疾患との関連から、バフィロマイシ ンに代表される V-ATPase 阻害剤も注目を集めている。これまでに阻害剤の活性およ び選択性の向上を意図した薬学的研究や、阻害機構解明を志向した生化学的研究が盛 んに行われてきたが、活性発現機構の全貌が明らかになっているとは言い難い。

バフィロマイシンによる V-ATPase 阻害機構の詳細を解明するためには、V-ATPase-バフィロマイシン複合体の構造を分子レベルで直接的に観測することが必要である。 膜タンパク質である V-ATPase との複合体は、X 線結晶構造解析や溶液 NMR の適用 が困難であるが、膜環境での構造解析が可能な固体 NMR は適用できると期待される。 しかし、そのためにはバフィロマイシンに標識を導入した誘導体の設計と、その調製 が必須となる。

そこで本研究では、活性を保持したフッ素標識化バフィロマイシン誘導体を開発す ることを研究目的とした(図1-21)。特に分子の骨格にフッ素を導入した誘導体の開 発を目指した。そのためには次の2つの課題を解決することが必要であると考えられ た。

- フッ素は化合物の物性や活性を変化させることがあることから、フッ素を導入しても活性を保持しているような適切な位置にフッ素を導入した誘導体を設計することが必要である。
- (2) 設計した誘導体を合成するためには、フッ素置換による影響をうまく制御し、誘 導体の効率的な合成を実現することが必要である。

本研究ではこれらの課題の解決を行った。



本研究により V-ATPase 阻害活性を有しているフッ素標識化バフィロマイシン誘導 体を開発できれば、フッ素原子の特性を活かした原子間距離測定法によりバフィロマ イシンと V-ATPase の結合距離を分子レベルで直接観測でき、得られる距離情報から バフィロマイシンの正確な結合位置を決定できると期待される。また REDOR 法は分 子間だけでなく、分子内にも適用することが可能である。そのため本研究成果を応用 し、フッ素に加えて<sup>13</sup>C を導入した誘導体を調製すれば、分子内距離情報の取得によ り V-ATPase 結合時のバフィロマイシンの立体配座も解明できると期待される。この ようにしてバフィロマイシンと V-ATPase の結合様式を解明できれば、阻害剤の簡略 化や配座固定誘導体の開発および特異的阻害剤の開発などへの展開も可能になると 考えられ、新規医薬品の開発にも応用できると期待される。

- 1) Ohsumi, Y.; Anraku, Y. J. Biol. Chem. 1981, 256, 2079-2082.
- 2) Stevens, T. H.; Forgac, M. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 1997, 13, 779-808.
- 3) Nishi, T.; Forgac, M. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2002, 3, 94-113.
- 4) Forgac, M. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007, 8, 917-929.
- 5) Ma, B.; Xiang, Y.; An, L. Cell. Signal. 2011, 23, 1244-1256.
- 6) Farina, C. Gagliardi, S. Drug Discovery Today 1994, 4, 163-172.
- 7) Gagliardi, S.; Rees, M.; Farina, C. Curr. Med. Chem. 1999, 6, 1197-1212.
- 8) Farina, S.; Gagliarde, S. Curr. Pharm. Des. 2002, 8, 2033-2048.
- Izumi, H.; Torigoe, T.; Ishiguchi, H.; Uramoto, H.; Yoshida, Y.; Tanabe, M.; Ise, T.; Murakami, T.; Yoshida, T.; Nomoto, M.; Kohno, K. *Cancer Treat. Rev.* 2003, 29, 541-549.
- 10) Forgac, M. J. Biol. Chem. 1999, 274, 12951-12954.
- 11) Yao, G, F.; Feng, H. T.; Cai, Y. L.; Qi, W. L.; Kong, K. M. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007, 357, 821-827.
- 12) Muench, S. P.; Trinick, J.; Harrison, M. A. Quart. Rev. Biophys. 2011, 44, 311-356.
- 13) Qin, A.; Cheng, T. S.; Pavlos, N. J.; Lin, Z.; Dai, K. R.; Zheng, M. H. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2012, 44, 1422-1435.
- 14) Hirata, R.; Granham, L. A.; Takatsuki, A.; Stevens, T. H.; Anraku, Y. J. Biol. Chem. **1997**, 272, 4795-4803.
- 15) Powell, B.; Granha, L. A.; Stevens, T. H. J. Biol. Chem. 2000, 275, 23654-23660.
- 16) Murata, T.; Yamato, I.; Kakinuma, Y.; Leslie, A. G. W.; Walker, J. E. Science 2005, 308, 654-659.
- 17) Nelson, N.; Ben-Shen, A. Nat. Rev. 2004, 5, 1-12.
- 18) Imamura, H.; Nakano, M.; Noji, H.; Muneyuki, E.; Ohkuma, S.; Yoshida, M.; Yokoyama, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, *100*, 2312-2315.
- Yokoyama, K.; Nakano, M.; Imamura, H.; Yoshida, M.; Yamakoshi, M. J. Biol. Chem.
   2003, 278, 24255-24258.
- Noumi, T.; Beltrán, C.; Nelson, H.; Nelson, N. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88, 1938-1942.
- 21) Leng, X-H.; Manolson, M. F.; Forgac, M. J. Biol. Chem. 1998, 273, 6717-6723.
- 22) Nishi-Kawasaki, S.; Nishi, T.; Forgac, M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001, 98, 12397-12402.

- 23) Nishi-Kawasaki, S.; Nishi, T.; Forgac, M. FEBS Lett. 2003, 545, 76-85.
- 24) Vik, S. B.; Anonio, B. J. J. Biol. Chem. 1994, 269, 30364-30369.
- 25) Vic, S. B.; Long, J. C.; Wada, T.; Zhang, D. Biochim. Biophys. Acta 2000, 1458, 457-466.
- 26) Junge, W.; Pänke, O.; Cherepanov, D. A.; Gumbiowski, K.; Müller, M.; Engelbrecht, S. FEBS Lett. 2001, 504, 152-160.
- 27) Grabe, M.; Wang, H.; Oster, G. Biophys. J. 2000, 78, 2798-2813.
- 28) Werner, G.; Hagenmaier, H.; Albert, K.; Kohlshorn, H.; Drautz, H.; *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5193-5196.
- 29) Werner, G.; Hagenmaier, H.; Drautz, H.; Baumgartner, A.; Zähner, H. J. Antibiot. 1984, 37, 110-117
- Kinashi, H.; Someno, K.; Sakaguchi, K.; Higashijima, T.; Miyazawa, T. *Tetrahedron Lett.* 1981, 22, 3861-3864.
- Westley, J. W.; Liu, C. M.; Sello, L. H.; Evans, R. H.; Troupe, N.; Blount, J. F.; Chiu, A. M.; Todaro, L. J.; Miller, P. A.; *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 1738-1740.
- 32) Seto, H.; Akao, H.; Furihata, K.; Otake, N. Tetrahedron Lett. 1982, 23, 2667-2670.
- 33) Corey, E. J.; Ponder, J. W. Tetrahedron Lett. 1984, 25, 4325-4328
- 34) Igarashi, M.; Nakamura, H.; Naganawa, H.; Takeuchi, T. J. Antibiot. 1997, 50, 926-927.
- 35) Igarashi, M.; Nakamura, H.; Naganawa, H.; Takeuchi, T. J. Antibiot. 1997, 50, 932-936.
- 36) Arcamone, F. M.; Bertazzoli, C.; Ghione, M.; Scotti, T. G.; G. Microbiol 1959, 7, 207-216.
- 37) Kaiser, H.; Keller-Schierlein, W. Helv. Chim. Acta 1985, 64, 407-424.
- 38) Ohta, E.; Kubota, N.; Ohta, S.; Suzuki, M.; Ogawa, T.; Yamasaki, A.; Ikegami, S. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 8463-8467.
- 39) Bindseil, K. U.; Zeeck, A. Liebigs Ann. Chem. 1994, 305-312.
- 40) Bowman, B. J.; Siebers, A.; Altendorf, K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85, 7972-7976.
- 41) Dröse, S.; Bindseil, K. U.; Bowman, E. J.; Siebers, A.; Zeeck, A.; Altendorf, K. *Biochemistry* **1993**, *32*, 3902-3906.
- 42) Erickson, K. L.; Beutler, J. A.; Cardellina, J. H.; Boyd, M. R.; *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8188-8192.

- 43) Kunze, B.; Jansen, R.; Sasse, F.; Hofle, G.; Reichenbach, H. J. Antibiot. 1988, 51, 1075-1080.
- 44) Jansen, R.; Kunze, B.; Reichaenbach, H.; Hofle, G. Eur. J. Org. Chem. 2000, 913-919.
- 45) Sasse, F. Steinmetz, H.; Höfle, G.; Reichaenbach, H. J. Antibiot. 2003, 56, 520-525.
- 46) Kretschmer, A.; Dorgerloh, M.; Deeg, M.; Hagenmaier, H. Agric. Biol. Chem. 1985, 49, 2509-2511.
- 47) Carr, G.; Williams, D. E.; Díaz-Marrero, A. R.; Patrick, B. O.; Bottriell, H.; Balgi, A. D.;
   Donohue, E.; Roberge, M.; Andersen, R. J. J. Nat. Prod. 2010, 73, 422-427.
- 48) Schalkwyk, D. A.; Chan, X. W. A. Misiano, P.; Gagliardi, S.; Farina, C.; Saliba, K. J. Biochem. Pharmacol. 2010, 79, 1291-1299.
- 49) Baker, G. H.; Brown, P. J.; Dorgan, R. J. J.; Everett, J. R.; Ley, S. V.; Slawin A. M. Z.;
  Williams, D. J. *Tetrahedron Lett.* 1987, 28, 5565-5568.
- 50) Baker, G. H.; Brown, P. J.; Dorgan, R. J. J. J. Chem. Soc. Perkin Trans. II 1989, 1073-1079.
- 51) Dai, W. M.; Guan, Y. C.; Jin, J. Curr. Med. Chem. 2005, 12, 1947-1993.
- 52) Evans, D. A.; Calter, M. A. Tetrahedron Lett. 1993, 34, 6871-6874.
- 53) Toshima, K. Jyojima, T. Yamaguchi, H.; Murase, H.; Yoshida, T.; Matsumura, S.; Nakata, M. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1069-1072.
- 54) Toshima, K.; Yamaguchi, H.; Jyojima, T.; Noguchi, Y.; Nakata, M.; Matsumura, S. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1073-1076.
- 55) Toshima, K. Jyojima, T.; Yamaguchi, H.; Noguchi, Y.; Yoshida, T.; Murase, H.; Nakata, M.; Matsumura, S. J. Org. Chem. 1997, 62, 3271-3284.
- 56) Roush, W. R.; Bannister, T. D. Tetrahedron Lett. 1992, 33, 3587-3590.
- 57) Roush, W. R.; Bannister, T. D. Wendt, M. D. Tetrahedron Lett. 1993, 34, 8387-8390.
- 58) Scheidt, K. A.; Tasaka, A.; Bannister, T. D.; Wendt, M. D.; Roush, W. R. Angew, Chem. Int. Ed. 1999, 38, 1652-1655.
- 59) Scheidt, K. A.; Bannister, T. D.; Tasaka, A.; Wendt, M. D.; Savall, B. M.; Fegley, G. J.; Roush, W. R. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 6981-6990.
- 60) Roush, W. R.; Bannister, T. D.; Wendt, M. D.; Jablonowski, J. A.; Scheidt, K. A. J. Org. Chem. 2002, 67, 4275-4283.
- 61) Hanessian, S.; Sumi, K. Synthesis 1991, 1083-1089.
- 62) Hanessian, S.; Gai, Y.; Wang, W. Tetrahedron Lett. 1996, 37, 7473-7476.

- 63) Hanessian, S.; Ma, J.; Wang, W. J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 10200-10206.
- 64) Bode, J. W.; Fraefel, N.; Muri, D.; Carreira, E. M. Angew, Chem. Int. Ed. 2001, 40, 2082-2085.
- 65) Kleinbeck, F.; Carreira, E. M. Angew, Chem. Int. Ed. 2009, 48, 578-581.
- 66) Kleinbeck, F.; Fettes, G. J.; Fader, L. D.; Carreira, E. M. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 3598-3610.
- 67) Gagliardi, S.; Gatti, P. A.; Belflore, P. Zocchetti, A.; Clarke, G. D.; Farina, C. J. Med. Chem. **1998**, 41, 1883-1893.
- 68) Gagliardi, S.; Rees, M.; Farina, C. Curr. Med. Chem. 1999, 6, 1197-1212.
- 69) Li, J.; Lu, C.; Shen, Y. J. Antibiot. 2010, 63, 595-599.
- 70) Hanada, H.; Moriyama, Y.; Maeda, M.; Futai, M. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990, 170, 873-877
- 71) Crider, B. P.; Xie, X.; Stone, D. K. J. Biol. Chem. 1994, 269, 17379-17381.
- 72) Zhang, J.; Feng, Y.; Forgac, M. J. Biol. Chem. 1994, 269, 23518-23523.
- 73) Mattsson, J. P.; Keeling, D. J. Biochim. Biophys. Acta 1996, 1280, 98-106.
- 74) Rautiala, T.; Koskinen, A. M. P.; Väänänen, H. K. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993, 194, 50-56.
- 75) Arai, H.; Berne, M.; Forgac, M. J. Biol. Chem. 1987, 262, 1100611011.
- 76) Noumi, T.; Beltrán, C; Nelson, H.; Nelson, N. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88, 1938-1942.
- 77) Mizutani, K.; Yamamoto, M.; Suzuki, K.; Yamato, I.; Kakinuma, Y.; Shirouzu, M.; Walker, J. E.; Yokoyama, S.; Iwata, S.; Murata, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 13474-13479.
- 78) Huss, M.; Ingenhorst, G.; König, S.; Gaßel, M.; Dröse, S.; Zeeck, A.; Altendorf, K.; Wieczorek, H. J. Biol. Chem. 2002, 277, 40544-40548.
- 79) Qsteresch, C.; Bender, T.; Grond, S.; von Zezschwitz, P.; Kunze, B.; Jansen, R.; Huss, M.; Wieczorek, H. J. Biol. Chem. 2012, 287, 31866-31876.
- 80) Bowman, B. J.; Bowman E. J. J. Biol. Chem. 2002, 277, 3965-3972.
- Bowman, E. J.; Graham, L. A.; Stevens, T. H.; Bowman, B. J. J. Biol. Chem. 2004, 279, 33131-33138.
- Bowman, B. J.; McCall, M. E.; Baertsch, R.; Bowman, E. J. J. Biol. Chem. 2006, 281, 31885-31893.

- 83) Wang, Y.; Inoue, T.; Forgac, M. J. Biol. Chem. 2005, 280, 40481-40488.
- 84) Raman, P.; Cherezov, V.; Caffrey, M. Cell Mol. Life Sci. 2006, 63, 36-51.
- 85) Opella, S. J.; Marassi, F. M. Chem. Rev. 2004, 104, 3587-3606.
- 86) Ni, F. Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 1994, 26, 517-606.
- 87) Duer, M. J. "Introduction to Solid-State NMR" Blackwell Publishing Ltd. 2004.
- 88) Schmidt-Rohr, K.; Spiess, H. W. "Multidimensional Solid-State NMR and polymers" *Academic Press Ltd.* **1994**.
- 89) a) Gullion, T.; Schaefer, J. J. Magn. Reson. 1989, 81, 196-200. b) Gullion, T.; Schaefer, J. Adv. Magn. Reson. 1989, 13, 57-83.
- 90) Watts, A. Nat. Rev. Drug Discovery 2005, 4, 555-568.
- 91) Tapaneeyakorn, S.; Goddard, A. D.; Oates, J.; Willis, C. L.; Watts, A.; *Biochim. Biophys, Acta* **2011**, *1808*, 1462-1475.
- 92) Grage, S. L.; Watts, A. Annu. Rep. NMR Spectrosc. 2006, 60, 191-228.
- 93) Toke, O.; Cegelski, L.; Schaefer, J. Biochim. Biophys. Acta 2006, 1758, 1314-1329.
- 94) Toke, O.; Cegelski, L. Solid-State NMR Studies of Biopolymers 2010, 473-490.
- 95) Cady, S. D.; S-Rohr, K.; Wang, J.; Soto, C. S.; DeGrado, W. F.; Hong, M. Nature 2010, 463, 689-693.
- 96) Stouffer, A. L.; Acharya, R.; Salom, D.; Levine, A. S.; Costanzo, L. D.; Soto, C. S.; Tereshko, V.; Nanda, V.; Stayrook, S.; DeGrado, W. F. *Nature* **2008**, *451*, 596-599.
- 97) Schnell, J. R.; Chou, J. J. Nature 2008, 451, 591-595.
- 98) Kim, S. J.; Cegelski, L.; Studelska, D. R.; O'Connor, R. D.; Mehta, A. K.; Schaefer, J. *Biochemistry* 2002, 41, 6967-6977.
- 99) Mehta, A. K.; Cegelski, L.; O'Connor, R. D.; Schaefer, J. J. Magn. Reson. 2003, 163, 182-187.
- 100) Cegelski, L.; Steuber, D.; Mehta, A. K.; Kulp, D. W.; Axelsen, P. H.; Schaefer, J. J. Mol. Biol. 2006, 357, 1253-1262.
- 101) Barna, J. C.; Williams, D. H. Annu. Rev. Microbiol. 1984, 38, 339-357.
- 102) Cegelski, L Bioorg. Med. Chem. Lett. 2013, 23, 5767-5775.
- 103) Smart, B. E. J. Fluorine Chem. 2001, 109, 3.
- 104) Tsuchikawa, H.; Matsushita, N. Matsumori, N.; Murata, M.; Oishi, T. *Tetrahedron Lett.*2006, 47, 6187-6191.

## 第2章 本論

2-1 フッ素標識化バフィロマイシン誘導体の設計

まずはバフィロマイシンにフッ素を導入した誘導体の設計を行った。第1章で述べ たように、フッ素は化合物の性質を大きく変化させる可能性があるため、適切な位置 に適切な様式でフッ素を導入することが重要である。また、誘導体は V-ATPase に対 してバフィロマイシンと同じ位置に同じ立体配座で結合することが望まれるが、バフ ィロマイシンに匹敵する親和性を保持していればフッ素標識部分以外にも構造改変 することは可能である。そこで誘導体の設計にあたっては、(i) 導入のしやすさ、(ii) 導 入した化合物の安定性、(iii) 生物活性の3点を考慮した。まず導入のしやすさを考慮 すると、ヒドロキシ基をフッ素で置換するのがよいと考えた。しかし1-2節で述べた ように7位ヒドロキシ基は活性発現に重要であり、17位ヒドロキシ基はバフィロマイ シンの特徴的な水素結合に関与しているため、適切ではないと考えられた。また 21 位ヒドロキシ基は、フッ素を導入するとB-フルオロケトン等価体となるため、安定性 に問題があることが懸念された。よって、これらヒドロキシ基へのフッ素導入を断念 した。次に、活性への影響が比較的小さいと考えられるテトラヒドロピラン環の 23 位に着目した。23位は、イソプロピル基の部分にエチル基やペンタジエニル基を有す る類縁体がバフィロマイシンとほぼ同等の活性を有していることから、この位置にフ ッ素を導入しても活性は変化しないと考えた。さらに導入のしやすさを考慮してトリ フルオロメチル基として導入することにし、24,24-ジデスメチル-24-F3-バフィロマイ シン(24-F-Baf, 2)をフッ素標識化バフィロマイシン誘導体として設計した(図 2-1)。 バフィロマイシンのイソプロピル基をトリフルオロメチル基に置換することは、導

入のしやすさだけでなくその立体的要因も理由のひとつである。トリフルオロメチル 基はファンデルワールス体積の比較では 39.8 Å<sup>3</sup> と、38.9 Å<sup>3</sup>のエチル基と等価である と言われており<sup>1)</sup>、また回転障壁エネルギーの比較ではイソプロピル基と立体的に等 価であると報告されている<sup>2)</sup>。そのため、23 位にトリフルオロメチル基を導入しても 活性に与える影響はほとんどないと考え、このように設計した。

しかし、バフィロマイシンにフッ素を導入した化合物の合成は報告例がなく、また 分子の骨格にフッ素を有する化合物の合成は、天然物の全合成に匹敵するほどの困難 さが予想された<sup>3)</sup>。そこで合成の効率化を図るため、合成を煩雑化する一因である不 斉メチル基の除去を検討した。Irie らはプロテインキナーゼ C の活性化剤であるアプ リシアトキシンの不斉メチル基等を除去することで、簡便に合成が可能な誘導体の開 発に成功している(図 2-2)<sup>4)</sup>。そこでこれに倣い、バフィロマイシンの6位および8 位の不斉メチル基を除去した誘導体 6,8,24,24-テトラデスメチル-24-F<sub>3</sub>-バフィロマイ シン(デスメチル 24-F-Baf, 3)を設計し、こちらも合成することにした(図 2-1)。 これは、MacroModelを用いた最安定配座の計算結果から、2つの不斉メチル基を除去 しても分子全体としての立体配座がほぼ変わらず、安定配座が類似していれば活性は 変化しないと予想したためであり、より簡便に合成可能なフッ素標識化バフィロマイ シン誘導体となることを期待して設計した(図 2-3)。

また、誘導体2と3の生物活性を比較することで、合成化学的手法による構造活性 相関という観点からも新たな知見が得られることを期待した。すなわち、バフィロマ イシンの活性発現にはマクロリド環部分が重要であるとは言われているものの、実際 に影響が厳密に調べられているのは7位ヒドロキシ基のみである。そこで誘導体2と 3を比較することで、これまで議論されていない6位および8位のメチル基が活性に 与える影響を明らかにできると考えた。









力場: MMFFs アルゴリズム: TNCG 溶媒: 真空中

図 2-3 MacroModel による最安定配座解析

6位および8位のメチル基を除去した6,8-ジデスメチルバフィロマイシンは、天然物 とほぼ同様の立体配座を有していることが示唆された。

### 2-2 デスメチル 24-F-Baf の合成

## 2-2-a 逆合成解析

2 つのフッ素標識化バフィロマイシン誘導体 2.3 は同様の合成戦略にて合成するこ ととし、まずはデスメチル 24-F-Baf 3 の効率的合成法を確立することにした。逆合成 解析をスキーム 2-1 に示す。CF3 セグメントは合成の終盤に導入できることが望まれ るが、これまでに報告されている全合成研究例も参考にすると、先にマクロラクトン 環を構築した後にアルドール反応により導入するルートが効率的であると考えられ た。過去の研究において Roush ら<sup>5)</sup>は C20-C21 結合を、Evans ら<sup>6</sup>は C17-C18 結合を 立体選択的なアルドール反応により構築することでバフィロマイシンの全合成を達 成している(スキーム 2-2, 2-3)。前者のルートはアルデヒドのα位メチル基だけでな くβ位ヒドロキシ基が立体選択性に大きく影響するため、このルートでの CF<sub>3</sub> セグメ ントの導入は、γ位のトリフルオロメチル基が立体選択性に影響を与える可能性が懸 念された。一方後者のルートでは、環状シリル基が立体選択性発現に重要であるため、 フッ素が選択性に与える影響は少ないと考えた。そこで今回、C17-C18 結合を構築す ることで CF<sub>3</sub> セグメントを導入することにした。すなわち誘導体 3 は、Evans らの報 告するジアステレオ選択的なアルドール反応により、フッ素を有する C18-C24 セグメ ント4とデスメチル C1-C17 セグメント5を連結することで合成できると考えた。 C18-C24 セグメント4は、不斉点を有するトリフルオロメチル基を求核付加反応によ り構築することとし、一方デスメチル C1-C17 セグメント **5** は、Toshima らの報告<sup>7)</sup> を参考にデスメチル C1-C11 セグメント7と C12-C17 セグメント 6<sup>8)</sup>を Stille カップリ ングにより連結した後、環化させることで合成できると考えた。デスメチル C1-C11 セグメント7は2つの不斉メチル基を除去したことで簡便な合成が可能であると期待 した。また C12-C17 セグメント 6 はキラルアルデヒド 8 に対して、Takai らの報告<sup>9</sup> する有機金属試薬の求核付加反応により anti-1.2-ジオール構造を構築することで合成 できると考えた。

本合成のポイントは、まず不斉点にトリフルオロメチル基を有する C18-C24 セグメ ントを如何に構築するかという点である。さらにフッ素導入後の反応においてフッ素 による影響を考慮しながら合成を行う必要がある点も挙げられる。特に C1-C17 セグ メントとのアルドール反応においては、Evans らの手法を用いてもフッ素により立体 選択性が影響を受ける可能性が考えられるため、重要な課題といえる。また、メチル 基を除去することで簡便なマクロラクトン環の構築を実現できるかという点もポイントである。これらをすべて解決することが本合成を達成する上で必要不可欠といえる。



スキーム 2-1 デスメチル 24-F-Baf の逆合成解析



スキーム 2-3 Evans らによる立体選択的アルドール反応<sup>の</sup>

2-2-b C18-C24 セグメントの合成

まずは C18-C24 セグメント 4 の合成を目指し、トリフルオロメチル基導入の基質と なるキラルアルデヒド 12a の調製を行った(スキーム 2-4)。Rauhala らの報告<sup>10)</sup>に従 い、1,3-プロパンジオールの片方のヒドロキシ基をベンジル基で保護し、残るヒドロ キシ基を Parikh-Doering 酸化することによりアルデヒド 10 を得た。これに対して別途 調製したイミドとの Evans アルドール反応<sup>11)</sup>を行ったところ、望む *syn*-β-ヒドロキシ ケトン 11 が 95:5 以上の高いジアステレオ選択性で得られた。続いてトリメチルアル ミニウム存在下アミン塩酸塩で処理することで文献既知の Weinreb アミド<sup>10)</sup>へと変換 し、2 級アルコールを酸性条件下 PMB エーテルへと導いた後、DIBAL 還元によりア ルデヒド 12a を得た。



スキーム 2-4 アルデヒド 12a の合成

得られたアルデヒド 12a を用いてトリフルオロメチル化反応の検討を行った。キラ ル触媒を用いた不斉トリフルオロメチル化反応<sup>12)</sup>は報告されてはいるものの、触媒の 調製が煩雑であり不斉収率も高くないことから、ここでは基質制御によるジアステレ オ選択的な反応を検討した (スキーム 2-5)。すなわちアルデヒド 12a に対して、TBAF 存在下トリフルオロメチルトリメチルシラン<sup>13)</sup>を作用させたところ、反応は速やかに 進行したものの、望まない 23R アルコール 14a が主生成物として 50%の収率で得られ、 望む 23S アルコール 13a は 26%の収率で得られた。両者はシリカゲルカラムにて容易 に分離可能であった。生じた立体化学は、DDQ を用いて両者を環状アセタールへと 誘導後、NOE により決定した(スキーム 2-6)。ジアステレオ選択性を改善するため にβ位ヒドロキシ基を MOM 基で保護した 12b や保護基を除去したアルコール 12c を 用いての検討も行ったが、選択性の向上は見られたかった。また臭化マグネシウム存 在下、キレーションコントールによる立体選択性の制御も試みたが、反応は全く進行 しなかった。



スキーム 2-6 アルコール 13a および 14a の立体化学の決定

そこで主生成物として得られた 23R アルコール 14a の 23 位を立体反転させること で、望む 23S アルコール 13a への変換を試みた。まず光延反応による立体反転を検討 したが、DIAD、p-ニトロ安息香酸、トリフェニルホスフィンの条件下では反応は全 く進行しなかった(スキーム 2-7)。これは 23 位ヒドロキシ基周辺の立体障害が大き いためと考えられる。そこで次にヒドロキシ基を酸化した後、立体選択的還元により 23S アルコール 13a を得ることにした(スキーム 2-8)。すなわちアルコール 14a を Dess-Martin 酸化した後、DDQ を用いて PMB 基を除去することでβ-ヒドロキシケトン 19 を調製し、β位ヒドロキシ基を利用した anti-1,3-ジオール構築法の検討を行った。 しかし還元剤としてテトラメチルアンモニウムトリアセトキシボロヒドリド<sup>14)</sup>を用 いた条件では、予想に反し望まない syn-ジオール 21 が主生成物として、23S ジオール 20:23R ジオール 21= 1:1.4 の選択性で得られた。この予想外の選択性は、6 員環遷移状 態においてトリフルオロメチル基がアキシアル位を占める立体配座が、フッ素が試薬 のホウ素に配位することで安定化されるため生じていると考えられた(図 2-4)。続 はベンズアルデヒド存在下、β-ヒドロキシケトンに対してヨウ化サマリウムを作用さ せることで分子内ヒドリド転位反応により *anti*-1,3-ジオール構造を構築できることを 報告している<sup>15)</sup>。そこでβ-ヒドロキシケトン 19 に対して本反応を行ったところ、期 待通り高い 1,3-*anti* 選択性は発現したが、望むアルコール 22 とともに 22 位がエピメ リ化したアルコール 23 が副生する結果となった。これは CF<sub>3</sub> 基が高い電子求引性を 有するため、サマリウムがケトンを活性化した際に 22 位の脱プロトン化も促進され エピメリ化が進行したものと考えられる。以上の結果によりβ-位ヒドロキシ基を利用 した方法論は、フッ素のよる立体選択性への影響が大きく見られたことから断念した。



スキーム 2-8 anti-1,3-ジオール構築法の検討



図 2-4 テトラメチルアンモニウムトリアセトキシボロヒドリドを用いた還元反応に おける遷移状態の推定図

次に先ほど得ていたケトン 18 に対し、キラルな還元剤を用いた不斉還元を検討した(スキーム 2-9)。還元剤として(-)-B-クロロジイソピノカンフェイルボラン((-)-DIP-Chloride)<sup>16)</sup>を用いたところ、目的とするアルコール 13a は得られず、さらに原料がエピメリ化したケトン 24 が回収される結果となった。これはトリフルオロメチルケトンのα位水素はかなり酸性度が高くなっており(pKa~15)、ボラン試薬によりケトンを活性化した際に異性化したためと考えられる。



スキーム 2-9 (-)-B-クロロジイソピノカンフェイルボランを用いた還元反応の検討

続いてケトン 18 のα位の不斉を利用したジアステレオ選択的な還元反応を検討した(スキーム 2-10)。ケトン 18 に対して、立体障害の大きい還元剤である L-Selectrideを THF 中-78 度で作用させたところ、望む 23S アルコール 13a が 4.2:1 の選択性で主生成物として得られた。この結果は Felkin-Anh モデルで予想される選択性に従うものであり、CF<sub>3</sub> 基による影響は顕著ではなかったと考えられる。これによりアルコール13a をアルデヒド 12a から 2 段階 50%の収率で得ることに成功した。本還元反応については L-Selectride 以外の還元剤は試しておらず条件の最適化を行っていない。



スキーム 2-10 L-Selectride を用いた還元反応

得られたアルコール 13a を用いて C18-C24 セグメントの合成を行った(スキーム 2-11)。まずアルコール 13a の PMB 基を DDQ を用いて除去しようとしたところ、*p*-メトキシベンジリデンアセタールが生じたため、ワンポットで酢酸処理することでア セタールを除去しジオール 25 を得た。これを環状シリルエーテルで保護しシリレン 26 へと誘導した後、エチルケトン部分の構築を行った。すなわち、シリレン 26 の 1 級ベンジルエーテルを水素添加反応により除去し、生じたアルコールを Dess-Martin 酸化することでアルデヒド 27 へと変換した。さらにエチル Grignard 試薬を作用させ、 生じたアルコールを再度 Dess-Martin 酸化することで C18-C24 セグメント 4 を得るこ とに成功した。以上示すように CF<sub>3</sub> 基に起因する特異な反応の問題点を克服すること で、フッ素セグメント 4 の合成を達成した。



スキーム 2-11 C18-C24 セグメント 4 の合成

## 2-2-c C12-C17 セグメントの合成

C12-C17 セグメント 6<sup>7</sup>の合成は Toshima らの報告<sup>8</sup>を改良して行った(スキーム 2-12)。まず市販の(S)-3-ヒドロキシイソ酪酸メチルのヒドロキシ基を MMTr 基で保 護し、エステルを DIBAL 還元した後、Swern 酸化によりアルデヒド 28 を得た。これ に対して、Takai らが報告するアリル化反応を行った<sup>9)</sup>。すなわち-78度において TMSI 存在下、塩化クロムとアクロレインジメチルアセタールより調製したγ-メトキシアリ ルクロム試薬に対しアルデヒド 28 を作用させ、これを-45度で 13 時間反応させた。 その結果、望む anti-1,2-ジオール構造を有するホモアリルアルコール 29 を約 6.5:1 の ジアステレオ選択性で得た。副生したジアステレオマーはシリカゲルカラムにて分離 可能であった。本選択性は系内で生じる反応性の高い *E*-クロム種が環状の遷移状態を 取ることで発現していると考えられる(図 2-5)。続いてアルコール 29 の末端オレフ ィンをオスミウム酸化によりジオール 31 へと変換した後、過ヨウ素酸ナトリウムを 用いて酸化的開裂を行うことでアルデヒド 32 を得た。このアルデヒドはシリカゲル カラムにて容易に分解したため、精製を行わず Ohira-Bestmann 試薬を作用させたとこ ろ、アルキン 33 が 3 段階 62%の収率で得られた。最後にパラジウム触媒存在下、水 素化トリブチルスズを用いたヒドロスズ化を行うことで、C12-C17 セグメント6を計 8段階にて合成した。



図 2-5 有機クロム試薬の求核付加反応における遷移状態の推定図

## 2-2-d デスメチル C1-C11 セグメントの合成

デスメチル C1-C11 セグメント 7 は、2 つの不斉メチル基を除去したことを活かし 簡便な合成法を考案した(スキーム 2-13)。まず 4-ペンチン-1-オールのヒドロキシ 基を Parikh-Doering 酸化した後、BINOL を用いた不斉アリル化反応により唯一の不斉 点である 7 位ヒドロキシ基の構築を行った<sup>17)</sup>。すなわち Ti(O*i*-Pr)<sub>4</sub> および(*R*)-BINOL 存在下、-20 度においてアリルトリブチルスズを作用させたところ、反応は高エナン チオ選択的に進行し、ホモアリルアルコール 34<sup>18)</sup>を収率 66%、94%ee で得た。生じた アルコールの立体化学および光学純度の決定は、Mosher エステルへと変換すること

で行った (スキーム 2-14)。すなわち、アルコール 34 と MTPA を DMAP 存在下 EDC により縮合し、生じたエステルの<sup>1</sup>H NMR の積分値の比が 0.97:0.03 であったことか ら 94%ee と決定した。次にアルコール 34 の末端オレフィンをオゾン分解した後、 Hanessian らの報告<sup>19)</sup>を参考にトルエン還流下において Wittig 反応を行い E-オレフィ ン **35** へと変換した。さらに DIBAL 還元を行った後、Negishi らの報告<sup>20)</sup>に従いトリ メチルアルミニウム存在下、ビスシクロペンタジエニルジルコニウムジクロリドを作 用させアルキン部分のメチルジルコニウム化を行い、これをヨウ素処理することでヨ ードオレフィン 36 を 86%の収率で得た。続いてテトラブチルアンモニウムクロリド 存在下、TEMPO および N-クロロスクシンイミドを作用させ、1 級アルコールを選択 的に酸化<sup>21)</sup>しアルデヒドへと変換した。得られたアルデヒドに対して、Roushらの報 告<sup>5)</sup>を参考に KHMDS および 18-クラウン-6 エーテル存在下、別途調製したホスホネ ート<sup>22)</sup>との Horner-Wadsworth-Emmons 反応を検討した(表 2-1)。エントリー1 では Roush らの報告に従い室温で反応を行ったところ、望むジエン7は収率30%で得られ、 望まないジエン 7E が 4%副生する結果となった。収率および立体選択性を向上させる ため、エントリー2では反応温度を-15度にしたところ、75%の収率でジエン7が得 られた。さらに温度を下げ-30 度および-50 度で反応を行ったところ、Z 選択性は 良好であったが、長時間反応させても原料が完全には消費されず収率は 56%および 58%となった。以上の結果からエントリー2の条件を採用し、8段階でのデスメチル C1-C11 セグメント7の合成法の確立に成功した。



スキーム 2-13 デスメチル C1-C11 セグメント7の合成

Entry	Substrate / ma	Tomporaturo, Timo	Yield			
	oubstrate / mg		7	7E	SM	
1	15.0	rt, 4 h	30%	4%	0%	
2	14.0	-15 °C, 3 h	70%	tr	0%	
3	14.2	-30 °C, 4 h	56%	0%	tr	
4	22.7	-50 °C, 14 h	58%	0%	tr	

表 2-1 Horner-Wadsworth-Emmons 反応の検討



スキーム 2-14 アルコール 34 の立体化学および光学純度の決定

# 2-2-e マクロラクトン環の構築

デスメチル C1-C11 セグメント7および C12-C17 セグメント6の調製が完了したの で、次に両者を連結することによりマクロラクトン環の構築を行った(スキーム 2-15)。 まず Tsuchikawa らの報告<sup>23)</sup>を参考に THF 溶媒においてトリフェニルヒ素およびジイ ソプロピルエチルアミン存在下、Stille カップリングを行ったところ、反応は室温に て進行したが望むジエン 39 は 40%程度しか得られず、アルケニルスタナン6 および ヨードオレフィン7がホモカップリングしたものがそれぞれ10%および30%生じる結 果となった。これらの副生成物はトランスメタル化を促進することで防ぐことができ ると考え、塩化リチウムを加えることにした。すなわち、Marshall らの報告<sup>24)</sup>に従い、 トリフェニルヒ素および塩化リチウム存在下、NMP 溶媒において Stille カップリング を行ったところ、反応は室温にて良好に進行し84%の収率でジエン39を得た。続い て水酸化カリウムを用いてエステルを加水分解することでセコ酸40へと変換し、こ れに対して環化反応の検討を行った。Roush らおよび Carreira らはマクロラクトン化 反応において、7位ヒドロキシ基を保護していると環化反応が進行しにくいことを報 告している(スキーム 2-16)<sup>5,25)</sup>。これは 7 位の保護によりセコ酸が環化に有利なコ ンフォメーションを取りづらくなったためであると推測できる。そこで7位ヒドロキ シ基を保護せずに環化反応を検討することとした。まず椎名らの報告<sup>26)</sup>を参考に

MNBA と DMAP の高希釈条件化、70 度においてセコ酸 40 を徐々に滴下したところ、 望むラクトン 41 は複雑な混合物として 20%程度の収率でしか得られなかった。そこ で Carreira らの報告<sup>25)</sup>を参考に改良山口法<sup>27)</sup>での検討を行った。すなわち、セコ酸 40 に対しジイソプロピルエチルアミン存在下 2,4,6-トリクロロベンゾイルクロリドを 作用させ、生じた混合酸無水物を高希釈した後、DMAP による処理を行った。しかし、 この場合も望むラクトン 41 は混合物として 20%程度の収率でしか得られなかった。 副生成物を精査したところ、オレフィンの *E,Z* 異性化が進行したものや、7 位ヒドロ キシ基から1位への環化が進行したものなどが生じていることが示唆された(図 2-6)。 これらの副生成物は、共存する塩基により 6 位の脱プロトン化が進行し、オレフィン の異性化、続く環化が起こることで生成したものと考えられ、7 位ヒドロキシ基周辺 の立体障害の小ささが大きな原因であると推測された。





図 2-6 マクロラクトン化反応において推定される副生成物の構造

そこで、これらの副反応は7位ヒドロキシ基を嵩高い保護基で保護することで抑制 できると考え、7位ヒドロキシ基を TIPS 基で保護したセコ酸 44 の調製を行った(ス キーム 2-17)。すなわち、ヨードオレフィン7のヒドロキシ基を TIPS 基で保護し、 先ほどと同様に Stille カップリング、続く加水分解によりセコ酸 44 を 3 段階 67%にて 調製した。これに対して再度山口条件での環化反応を検討したところ、反応は期待通 り良好に進行し、副生成物は全く与えず、望むラクトン 45 を 83%の収率で得ること に成功した。



### 2-2-f C18-C24 セグメントの連結

ラクトン 45 が得られたので、続いて C18-C24 セグメント 4 との連結を行った(ス キーム 2-18)。まずラクトン 45 を PPTS で処理したところ、一部 7 位ヒドロキシ基 の脱保護が進行したものの 88%の収率で望むアルコール 46 が得られた。続いて生じ たアルコールの酸化反応を検討した。酸化剤として Dess Martin 試薬や TPAP 試薬を 用いた場合では、生じたアルデヒドのα位のエピメリ化や、後処理の際に一部が分解 してしまうなどの問題が生じた。そこでより低温で進行する Swern 酸化を行ったとこ

ろ、そのような問題は見られずアルデヒド5を得た。生じたアルデヒド5はシリカゲ ルカラムにて一部分解したため精製は行わず、続いてジアステレオ選択的なアルドー ル反応を行った。すなわち Evans らの報告<sup>5)</sup>を参考に、ケトン4に対してジイソプロ ピルエチルアミン存在下、ジクロロフェニルボランを作用させて調製したエノレート にアルデヒド5を加え-78度で2時間反応させたところ、約21:1の選択性でヒドロ キシケトン 47 を得た。新たに生じた 17 位および 18 位の立体化学は、<sup>1</sup>H NMR の化 学シフトおよび結合定数を Toshima らの報告<sup>7)</sup>および類似した構造を持つ化合物<sup>28)</sup> と比較することで決定した(表 2-2)。すなわち、アルドール反応の主生成物の16位 から20位の化学シフトおよび結合定数は、Toshimaらが報告するヒドロキシケトンA と18位を除いて一致した。18位のデータにはやや不確かさが残っていたため、類似 した構造を有する化合物 B との比較も行った。その結果、18 位の化学シフトおよび 結合定数は良い一致を示したことから、アルドール反応にて生じたヒドロキシケトン は望みの立体化学を有していると決定するに至った。この選択性は Evans らが報告す るように、環状シリル基および 22 位メチル基により Z-ボロンエノレートの安定配座 が図 2-7 に示すようになり、その後立体障害の小さい Re 面からアルデヒドとの反応 が進行したためと考えられる。



スキーム 2-18 C18-C24 セグメントの連結

$\begin{array}{c} \begin{array}{c} & & & \\ & & & & \\ & & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & & & \\ & & $									OMe OH 0 18 17 0 Me 0 Me 0 H 0 H 0 H 0 H 0 H 0 H 0 H 0 H 0 H 0	
- nuorinated	пуагохук	etone deriv	auve 47		<i>i-</i> Fi-fiyun	JXyKelone			-	_
O a la se Nia	47									
Carbon No.	47				A				В	
16	2.14	(1H, ddq, J	/ = 10.0, 7.	5, 1.5 Hz)	1.98	(1H, m)			2.00-1.86	(1H, m)
17	3.80	(1H, dd, J	= 10.0, 3.0	Hz)	3.81	(1H, ddd, J	= 9.8, 4.0 <sup>b</sup>	, 2.4 Hz)	3.74	(1H, ddd, J = 9.0, 3.0, 1.0 <sup>b</sup> Hz)
18	2.74	(1H, qd, <i>J</i>	= 7.0, 3.0 H	Hz)	2.83	(1H, ddq, J	= 9.2 <sup>c</sup> , 7.0	, 2.2 Hz)	2.73	(1H, dq, J = 7.0, 3.0 Hz)
20a	2.89	(1H, dd, J	= 15.5, 9.5	Hz)	2.80	(1H, dd, J :	= 15.4, 10.0	Hz)	3.30-3.19	(1H, m)
20b	2.43	(1H, dd, J	= 15.5, 3.0	Hz)	2.45	(1H, dd, J :	= 15.4, 3.6	Hz)	3.30-3.19	(1H, m)

表 2-2 アルドール生成物と類似の構造を有する化合物との<sup>1</sup>H NMR の比較



図 2-7 ボロンエノレートの推定立体配座 6)

## 2-2-g 脱保護

続いてヒドロキシケトン 47 が有する 2 つのシリル基の除去を検討した(スキーム 2-19)。まずヒドロキシケトン 47 に対して 18% HF Py あるいは TBAF を作用させた ところ、環状シリル基は室温にて 1 時間ほどで容易に除去されるのに対し、7 位 TIPS 基は長時間反応させても除去されなかった。また TAS-F を用いた場合では、過剰量の 試薬を用いることで望む脱保護体の生成が一部確認できたものの、分解物が多く生じ る結果となった。そこで 2-2-f において PPTS 程度の弱い酸でも 7 位 TIPS 基の除去が 一部見られたことを考慮し、次に酸性条件での脱保護を検討することにした。すなわ ち、まずヒドロキシケトン 47 に対して 18% HF Py を作用させ、シリレン基を定量的 に除去してトリオール 48 へと変換した。これに対してアセトニトリル、ジクロロメ タン、水の混合溶媒中トシル酸<sup>29)</sup>を 6 時間作用させたところ、反応は良好に進行し 7 位 TIPS 基を除去することができた。最後に図 2-8 に示す条件にて HPLC 精製を行い、保持時間 19.4 分のピークを分取することで、2 段階収率 60%でデスメチル 24-F-Baf (3) の合成に成功した。精製後の定量は、正確に測りとった DMF を加えて<sup>1</sup>H NMR を測 定し、プロトンの積分値の比より 15.8 mg と決定した。これにより分子骨格にフッ素

を有するバフィロマイシン誘導体の初の合成を達成するとともに、収束的かつ簡便な 合成法の確立に成功した(最長直線工程17段階、全収率1.7%、平均収率79%)。



スキーム 2-19 シリル基除去の検討



### 2-3 24-F-Baf の合成

デスメチル 24-F-Baf (3)の合成法を確立できたので、続いてこれを応用し 24-F-Baf (2)の合成を検討した。2-1 節で述べたように、6 位と 8 位にメチル基を有する 24-F-Baf は、デスメチル体と同様の戦略にて合成可能である。すなわち、2 つの不斉メチル基 を有する C1-C11 セグメント 49 と C12-C17 セグメント 6 を Stille カップリングおよ びマクロラクトン化により連結し、フッ素を有する C18-C24 セグメント 4 を導入する ことで 24-F-Baf を合成できると考えた(スキーム 2-20)。3 つのセグメントのうち新 たに合成する必要があるのは C1-C11 セグメント 49 のみであるため、まずはその合成 から検討することにした。

天然物の全合成研究において Roush らは、アルキン 50 を中間体としてヨードオレ フィン 49 の合成を報告している <sup>5)</sup>。彼らはアルキン 50 の 2 つの不斉点をアルデヒド 51 に対するクロチル化反応により構築しているが、その際の選択性は 85:15 である。 そこで本合成では、より高いジアステレオ選択性が期待できる Paterson アルドール反 応<sup>29)</sup>を用いてアルキン 50 を調製し、C1-C11 セグメント 49 の合成を検討することと した。



スキーム 2-20 24-F-Baf の逆合成解析

まずアルキン 50 の合成を行った(スキーム 2-21)。Paterson らの報告<sup>31)</sup>に従い、 市販の(*R*)-3-ヒドロキシイソ酪酸メチルのアルコールを PMB エーテルとして保護し た後、エステルを水素化リチウムアルミニウムで還元し、続いて Swern 酸化によりア ルデヒド 51 を得た。これに対して Paterson らが報告する *anti* 選択的なアルドール反 応<sup>30)</sup>を行った。すなわち、別途調製したケトンに対し-78 度でジメチルエチルアミ ン存在下、クロロジシクロヘキシルボランを作用させ *E*-エノレートを調製した後、ア ルデヒド 51 を加え 2 日間反応させることで、望むβ-ヒドロキシケトン 52<sup>31)</sup>を 16:1 の ジアステレオ選択性で 67%の収率で得た。本選択性はケトンに存在するベンゾイル基 がアルデヒド水素と水素結合を形成し、アルデヒドの *Si* 面での反応が優先することで 発現していると考えられる(図 2-9)。

生じた 2 級アルコールを TBS 基で保護した後、水素化ホウ素ナトリウムによりケトンを還元し、さらにワンポットで炭酸カリウムを作用させベンゾイル基を除去することでジオール 53 を 3 段階収率 79%で得た。次に過ヨウ素酸ナトリウムを用いて酸化的開裂を行い、生じたアルデヒドを水素化ホウ素ナトリウムで還元することでアルコール 54 へと変換した。さらに 1 級アルコールをトシル化した後、リチウムアセチリドを付加させることでアルキンを導入し、DDQ により PMB 基を除去することでアルコール 50 を得た。本化合物の構造は、Roush らが別途クロチル化反応を鍵反応として合成した同一化合物<sup>5</sup>と、NMR を比較することにより決定した。



スキーム 2-21 アルキン 50 の合成



図 2-9 Paterson アルドール反応の推定遷移状態<sup>30)</sup>

続いてデスメチル体の場合と同様、Hanessian の報告<sup>19)</sup>に従い C4 ユニットおよびヨ ードオレフィン部分の構築を行うことで C1-C11 セグメント 49 の合成を行った (スキ ーム 2-22) 。すなわちアルコール 50 を Swern 酸化した後、トルエン還流下イリドを 作用させてα,β-不飽和エステル 56 へと変換し、DIBAL 還元によりエステルを還元す ることで 3 段階 83%の収率でアルコール 57 を得た。次に Negishi らの報告<sup>20)</sup>に従い、 トリメチルアルミニウムおよびビスシクロペンタジエニルジルコニウムジクロリド を用いてアルキン部分のメチルジルコニウム化を行い、これをヨウ素処理することで ヨードオレフィン 58 を 66%の収率で得た。さらに TEMPO 酸化によりアルデヒド 59 へと変換した後、Roush らの報告する条件<sup>5)</sup>に倣いホスホネート<sup>22)</sup>、KHMDS および 18 クラウン-6-エーテルを用いて Horner-Wadsworth-Emmons 反応を行うことでα-メト キシα,β-不飽和エステル構造を構築した。7 位 TBS 基は、この後の環化反応において 立体障害になることが Roush らにより報告<sup>5)</sup>されているため、最後に TBAF で処理す ることで C1-C11 セグメント 49 を 19 段階にて合成した。



スキーム 2-22 C1-C11 セグメント 49 の合成

# 2-3-b マクロラクトン環の構築

C1-C11 セグメント 49 が得られたので、次に 2-2 節で合成した C12-C17 セグメント 6 との連結を行うことでマクロラクトン環の構築を行った(スキーム 2-23)。デスメ チル体の場合と同様に、Marshall らの条件<sup>24)</sup>を参考にトリフェニルヒ素および塩化リ チウム存在下、NMP 溶媒において Stille カップリングを行ったところ、反応は室温に て良好に進行し、85%の収率でジエン 61 を得た。続いて水酸化カリウムを用いてメ チルエステルを加水分解し、生じたセコ酸 62 に対して環化反応を行った。Carreira の 報告<sup>25)</sup>を参考に、ジイソプロピルエチルアミン存在下 2,4,6-トリクロロベンゾイルク ロリドにより混合酸無水物を形成させ、続いて高希釈条件にて DMAP を作用させた ところ、望むラクトン 63 が 2 段階 51%の収率で得られた。ここでは、過去の報告の とおり、7 位のヒドロキシ基は無保護の状態で反応は問題なく進行した<sup>5,25)</sup>。



2-3-c C18-C24 セグメントの連結と脱保護

マクロラクトン環の構築が完了したので続いてフッ素を有する C18-C24 セグメン ト4との連結を検討することとし、まずは7位保護基の検討を行った(スキーム2-24)。 Toshima らは7位の保護基としてジエチルイソプロピルシリル(DEIPS) 基が鍵であ ると述べているが、その詳細は報告されていない<sup>7)</sup>。そこでまずはデスメチル体の合 成において良好な結果を与えていた TIPS 基が 7 位の保護基として適当であるかを検 討した。その結果、2 つの不斉メチル基を有するアルコール 63 の場合、過剰量の TIPSOTf を用いる条件により収率良く保護することはできたが、デスメチル 24-F-Baf 合成の最終段階の脱保護条件であるトシル酸では全く除去することができないこと が判明した。そこで次によりかさの小さい保護基として TES 基を選択した。この場合 では保護反応は速やかに進行したが、続く PPTS による1級 MMTr エーテル基の除去 を行ったところ、7位 TES 基も同時に除去されてしまうという問題が生じた。反応温 度の検討を行ったが、MMTr 基の選択的除去は困難であったため、TES 基も7位の保 護基として不適であると判断した。以上の結果を踏まえ、次に TIPS 基よりかさが小 さく、TES 基よりも大きい保護基として Toshima らが報告する DEIPS 基を7位の保 護基として選択した。すなわちアルコール 63 に対して 2.6-ルチジン存在下、DEPISOTf を作用させシリルエーテル 64c を 85%の収率で得た。これに対して PPTS を作用させ たところ、わずかにジオール 65 の生成は見られたものの、MMTr 基が選択的に除去 されたアルコール 66cを 78%の収率で得ることができた。またトシル酸条件での脱保 護を検討したところ、室温 12 時間で反応が問題なく進行することも確認できた。以 上の結果から、7位ヒドロキシ基の保護基として DEIPS 基が最適であると判断した。



続いて得られたアルコール 66c を Swern 酸化によりアルデヒド68 へと変換した後、 C18-C24 セグメント 4 の連結を行った(スキーム 2-25)。Evans らの条件を参考に、 ケトン 4 に対してジイソプロピルエチルアミン存在下、ジクロロフェニルボランを作 用させて調製したエノレートとアルデヒドとを-78 度で 2 時間反応させたところ、約 20:1 の選択性でヒドロキシケトン 69 を 2 段階 32%の収率で得ることに成功した。新 たに生じた 17 位および 18 位の立体化学は、先の化合物 47 の場合と同様、<sup>1</sup>H NMR の化学シフトおよび結合定数を Toshima らの報告<sup>7)</sup>および類似した構造を持つ化合物 <sup>28)</sup>と比較することで、望みの立体化学を有していると決定した(表 2-3)。 次に2つのシリル基の除去を行った。すなわちまず18%HF·Pyを用いてシリレンを 除去し、続いてトシル酸で処理することで7位ヒドロキシ基の脱保護を行った。その 結果反応は問題なく進行し、最後に図 2-10 に示す条件で HPLC 精製を行い、保持時 間15.8分のピークを分取することで2段階36%の収率で24-F-Baf の合成を達成した。 得られた24-F-Baf (2)の定量は、正確に測りとった DMF を加えて<sup>1</sup>H NMR を測定し、 プロトンの積分値の比より1.21 mg と決定した。以上の結果より、デスメチル 24-F-Baf で確立した方法論と同一の戦略で、24-F-Baf を合成することに成功した(最長直線工 程 28 段階、全収率0.16%、平均収率79%)。



スキーム 2-25 24-F-Baf の合成

$f_{3}O + f_{17} + f_{0}O + f$								он о 18 17 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0		
									_	
Carbon No.	69				Α				В	
16	2.00	(1H, ddq, J	= 9.0, 7.0,	2.0 Hz)	1.98	(1H, m)			2.00-1.86	(1H, m)
17	3.78	(1H, dd, J =	= 9.0, 2.5 H	z)	3.81	(1H, ddd, J	= 9.8, 4.0 <sup>b</sup>	, 2.4 Hz)	3.74	(1H, ddd, J = 9.0, 3.0, 1.0 <sup>b</sup> Hz)
18	2.74	(1H, qd, J =	= 7.0, 2.5 H	z)	2.83	(1H, ddq, J	= 9.2 <sup>c</sup> , 7.0	, 2.2 Hz)	2.73	(1H, dq, J = 7.0, 3.0 Hz)
20a	2.87	(1H, dd, J =	= 15.5, 9.5	Hz)	2.80	(1H, dd, J =	= 15.4, 10.0	Hz)	3.30-3.19	(1H, m)
20b	2.40	(1H, dd, J =	= 15.5, 3.0	Hz)	2.45	(1H, dd, J =	= 15.4, 3.6 l	Hz)	3.30-3.19	(1H, m)

表 2-3 アルドール生成物と類似の構造を有する化合物との<sup>1</sup>H NMR の比較



Mobile phase, 50% EtOAc in hexane Detect wave length, 248 nm 2-4 フッ素標識化バフィロマイシン誘導体の生物活性評価

バフィロマイシンは第1章で述べたように、V-ATPase 阻害活性以外にも抗真菌活性、抗菌活性、抗カビ活性など幅広い生物活性を有することが知られている。ここでは V-ATPase 阻害活性および細胞増殖抑制活性を天然物であるバフィロマイシンと比較することで、合成したデスメチル 24-F-Baf および 24-F-Baf の生物活性を評価した。

## 2-4-a 酸性小胞染色実験

細胞内に存在する酸性小胞は V-ATPase の働きにより酸性に保たれている。そこで 酸性条件にて蛍光を発するアクリジンオレンジを用いた染色実験により、細胞におけ る V-ATPase 阻害の有無を評価した(図 2-11)<sup>32)</sup>。本試験は筑波大学生命環境科学研 究科臼井健郎准教授により実施された。アクリジンオレンジは内膜を透過可能な塩基 性色素であり、酸性条件化で赤色の蛍光を発する。この色素は酸性環境下のオルガネ ラに取り込まれるとプロトン化されオルガネラから外に出られなくなるため、リソソ ームやエンドソームなどの酸性小胞を染色することができる。したがって V-ATPase が機能している場合は赤色の蛍光が小さなドットとして観測され、その機能の阻害は 蛍光の消失により観測される。



図 2-11 酸性小胞染色実験の概要

ラット繊維芽細胞に対して、バフィロマイシンおよび合成したデスメチル 24-F-Baf と 24-F-Baf を投与し 2 時間インキュベートした後、アクリジンオレンジを加えて酸性 小胞を染色したときの様子を図 2-12 に示す。ネガティブコントロールの DMSO の場 合では赤色の小さなドットが見られ、V-ATPase が機能している様子が観測された。 これに対して 100 nM のバフィロマイシンあるいは 100 nM の 24-F-Baf 添加時には蛍 光の消失が観測された。したがって細胞内において V-ATPase が阻害されている様子 が観測された。一方 10 µM のデスメチル 24-F-Baf 添加時には、赤色の小さなドット が見られたことから V-ATPase が阻害されていないことが確認された。これらの結果 より 24-F-Baf は高い V-ATPase 阻害活性を有していることが示唆された一方で、デス メチル 24-F-Baf は阻害活性が大幅に低下していることが示唆された。



図 2-12 ラット繊維芽細胞の酸性小胞染色実験\*

\*筑波大学生命環境科学研究科臼井健郎准教授提供

DMSO では酸性小胞が小さなドットとして観測されるのに対し、100 nM の Baf ある いは 24-F-Baf 添加時では見られず、細胞内において V-ATPase が阻害されている。一 方デスメチル 24-F-Baf では、小さなドットが見られることから V-ATPase は阻害され ていない。
## 2-4-b In vitro V-ATPase 阻害活性試験

続いて V-ATPase 阻害活性を定量的に調べるために、酵母由来の膜画分に対する阻 害活性を評価した<sup>33)</sup>。本試験も筑波大学生命環境科学研究科臼井健郎准教授により実 施された。V-ATPase は ATP の加水分解エネルギーを駆動力としているため、阻害活 性は ATP が ADP に分解される際に生じる無機リン酸を定量することで見積もること ができる。実験は以下のように行われた。酵母膜画分は培養した酵母の細胞壁を溶解 させた後、遠心分離および密度勾配遠心法により調製した。これに対して、阻害剤を 加え 10 分間インキュベートした後、ATP を加え 60 分間インキュベートした。その後 過塩素酸を加え反応を停止させ、マラカイトグリーンおよびモリブデン酸を添加した。 マラカイトグリーンはモリブデン存在下、無機リン酸と緑色の複合体を形成するため、 650 nm における吸光度を測定することで無機リン酸の定量を行った。加える阻害剤の 濃度を 10, 3, 1 nM と変化させたときの V-ATPase 活性を、 DMSO を 100 としたときの コントロール%として表 2-4 に示す。ここから IC50 値を産出したところ、24-F-Baf は IC<sub>50</sub> 値が 2.5 nM と天然物の 2.3 nM と同等の V-ATPase 阻害活性を有していることが 明らかとなった。一方デスメチル 24-F-Baf は、10 μM においても V-ATPase を 30%程 度しか阻害せず、IC<sub>50</sub>値は 10 μM 以下と 4 桁以上阻害活性が低下していることが確認 された。

以上の生物活性試験から、24-F-Baf は天然物と同等の強力な V-ATPase 阻害活性を 有しており、フッ素標識化バフィロマイシン誘導体として有用なものを合成すること に成功した。一方デスメチル 24-F-Baf は顕著な V-ATPase 阻害活性を有しておらず、 フッ素標識化バフィロマイシン誘導体としては用いることができないことが判明し た。またこれらの結果から、6 位および 8 位のメチル基がバフィロマイシンの活性発 現に重要であることが示唆された。

	conc (nM)	control%	IC <sub>50</sub> (nM)
Baf	10	20.1	2.3
	3	42.7	
	1	67.5	
desmethyl 24-F-Ba	f 10000	73.8	>10000
24-F-Baf	10	5.1	2.5
	3	40.0	
	1	86.1	

表 2-4 酵母膜画分に対する V-ATPase 阻害活性試験\*

\*筑波大学生命環境科学研究科臼井健郎准教授提供

#### 2-4-c 白血病細胞に対する細胞増殖抑制試験

V-ATPase 阻害活性が大幅に低下していたデスメチル 24-F-Baf の生物活性をさらに 評価するために、白血病細胞 HL-60 および K562 に対する細胞増殖抑制試験を行った <sup>34)</sup>。本試験は株式会社ケー・エー・シーにより実施された。生存細胞では脱水素酵素 により NADH が産生されるため、色素 WST-8 を 1-Methoxy PMS とともに加えると、 その還元能により WST-8 は Methoxy PMS を介してホルマザンに還元される(図2-13)。 生じた還元体は蛍光を発するためその強度を測定することで、生細胞数を測定するこ とができる。実験は以下のように行われた。まず前培養した各細胞を 96 well マイク ロプレートに播種し、24 時間後に 0.001-10  $\mu$ M の計 8 濃度の阻害剤をインキュベート した。48 時間後、WST-8 を添加し、各種細胞に対する阻害剤の細胞増殖抑制効果を 確認し、各細胞に対する IC<sub>50</sub> 値を評価した。



図 2-13 細胞毒性試験の概要

結果を図 2-14 に示す。天然物では、両細胞において 0.01 から 0.03  $\mu$ M にかけて増 殖抑制効果が見られ、IC<sub>50</sub> 値が 30 nM と強力な阻害活性を有していた。一方、デスメ チル 24-F-Baf は 1 から 10  $\mu$ M にかけて増殖抑制効果が見られ、IC<sub>50</sub> 値が 3  $\mu$ M と活性 が 2 桁落ちる結果となった。しかし、依然としてサブマイクロモーラーのオーダーで 細胞増殖抑制活性を有していることが確認された。



図 2-14 白血病細胞 HL-60 および K562 に対する細胞増殖抑制試験\* \*株式会社ケー・エー・シー提供

### 2-5 考察

前節の結果より、24-F-Baf は天然物と同等の V-ATPase 阻害活性を有することが明 らかとなった。一方で、デスメチル 24-F-Baf は天然物と比較して V-ATPase 阻害活性 は約 10000 倍、細胞毒性では約 100 倍低下するという知見を得た。そこで本活性試験 結果とその構造について以下に考察するとともに、V-ATPase との相互作用に与える 影響についても考察した。

2-5-a バフィロマイシンと 24-F-Baf の比較

23 位に CF<sub>3</sub> 基を導入した 24-F-Baf は、V-ATPase 阻害活性を保持していた。したが って過去の知見と同様、23 位置換基は活性には大きく影響しないと考えられる。実際 に天然物と<sup>1</sup>H NMR の比較をしてみると、24-F-Baf は天然物と同一のマクロラクトン 骨格を有するため、マクロラクトン部分の化学シフトおよび結合定数はほぼ同様であ り、テトラヒドロピラン環もいす型配座をとっていることが確認できた(表 2-5、 <sup>3</sup> $J_{20ax,21} = 11.0$  Hz, <sup>3</sup> $J_{21,22} = 11.0$  Hz, <sup>3</sup> $J_{22,23} = 11.0$  Hz) 。さらに <sup>13</sup>C NMR もよい一致が見 られた(表 2-6)。また NOE 実験により H3/H5 および H29/C2OMe に相関がみられ、 C3-C4 結合は s-*trans* 配座をとっていることが確認できた(図 2-15)。加えて H5/H8、 H8/H11 にも相関がみられ、これらは天然物と一致した。したがってバフィロマイシ ンの活性発現に重要である特徴的なコンフォメーションは変化しておらず、強力な V-ATPase 阻害活性を示したと考えられる。

		<sup>1</sup> H NMF	2	
#	24-F-Baf		Natural <sup>b</sup>	
1	-		-	
2	-		-	
3	6.63	(1H. s)	6.68	(1H. d. J = 0.8)
4	-		-	
5	5.75	(1H. d. J = 9.0)	5.77	(1H. ddg, J = 9.2, 1.0, 1.0)
6	2.56-2.49	(1H, m)	2.54	(1H, ddg, J = 9.1, 7.1, 1.9)
7	3.33-3.26	(1H, m)	3.29	(1H, dd, no J values given)
70H	ND		1.62	(no other information given)
8	1.95-1.86	(1H, m))	1.90	(no other information given)
9a	2.18-2.10	(1H, m)	2.13	(1H, no multiplicity given, $J = 14.0$ )
9b	2.00-1.92	(1H, m)	1.95	(1H. no multiplicity given, $J = 14.0, 11.5$ )
10	-		-	
11	5.81	(1H. d. J =10.5)	5.81	(1H. d. J =10.7)
12	6.51	(1H, dd, J = 15.0, 10.5)	6.51	(1H, dd, J = 15.0, 10.7)
13	5.15	(1H, dd, J = 15.5, 9.0)	5.16	(1H, dd, J = 15.0, 9.4)
14	3.90	(1H, dd, J = 9.5, 9.5)	3.89	(1H, dd, J = 9.0, 9.0)
15	4.94	(1H, dd, J = 9.0, 1.0)	4.95	(11, dd, J = 8.7, 1.4)
16	2.15	(1H, ddg, J = 10.8, 6.8, 1.4)	2.15	(11, dd, J = 10.8, 6.8, 1.4)
17	4.09-4.02	(1H, m)	4.13	(11, ddd, J = 10.8, 4.1, 2.0)
170H	4.87	(1H, d, J = 4.0)	4.66	(1H, dd, J = 42, 1, 1)
18	1.87-1.79	(1H, m)	1.77	(111, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100,
19	-	(,)	-	
190H	6.17	(1H, d, J = 2.0)	5.54	(1H, d, J = 2, 1)
20eg	2.34	(1H dd J = 120.50)	2.30	(11, 0, 0, 0) (11, 11, 11, 11, 11, 11, 11, 11, 11, 11
20ax	1.31-1.20	(1H, m)	1.16	(11, dd, J = 12, 1, 11, 1, 2, 2)
21	3.75	(1H ddd J = 110 110 50)	3 70	(11, ddd, l = 112, 99, 47)
22	1 65-1 55	(1H m)	1.33	(1H, ddd, l = 10.1, 10.1, 6.5)
23	4 04	(1H  ad  I = 11.0.65)	3 49	(1H, ddq, 0 = 10.4, 2.4)
24	-	(11, 44, 0 – 11.0, 0.0)	1.88	(1H, ddg, l = 68, 68, 23)
25	-		0.90	(3H d . 1 = 6.8)
26	1 98	(3H_s)	1 99	(3H, d, l = 1.2)
20	1.00	(3H, d, l = 7.0)	1.00	(3H, d, l = 7.1)
28	0.93	(3H, d, l = 6.0)	0.94	(3H, d, l = 6.3)
20	1 9/	(3H s)	1 9/	(3H d l = 1.1, 1.1)
30	0.83	(3H, d) = 7.0	0.83	(3H, d, J = 6.9)
21	1.00	(3H, d, 5 = 7.0)	1.05	(31, 0, 0 = 0.3)
31	1.00	$(3\Pi, 0, J = 7.0)$	1.05	$(3\Pi, U, J = 7.3)$
32	1.12	(3H, d, J = 6.5)	0.94	(3H, d, J = 6.5)
33	-		0.77	(3H, d, J = 6.8)
2-OMe	3.63	(3H, s)	3.64	(3H, s)
14-OMe	3.25	(3H, s)	3.25	(3H, s)
Chemical shifts	are reported in	ppm relative to internal residua	I solvent ( <sup>1</sup> H N	$MR CDCI_3 7.26 ppm$ ).
Everett et al. J.	Chem. Soc. Per	rk. Trans. 2 <b>1989</b> , 1073.		

表 2-5 24-F-Baf とバフィロマイシンの<sup>1</sup>H NMR の比較

- 69 -

	<sup>13</sup> C NMR			
#	24-F-Baf	Natural <sup>b</sup>		
1	167.4	167.3		
2	141.4	141.3		
3	133.2 <sup>c</sup>	133.7		
4	133.1 <sup>°</sup>	132.8		
5	142.6	143.3		
6	36.7	36.8		
7	81.2	80.8		
8	40.2	40.2		
9	41.3	41.3		
10	143.3	143.4		
11	125.3	125.0		
12	133.2 <sup>°</sup>	133.2		
13	127.1	126.8		
14	81.9	82.3		
15	76.5	76.8		
16	37.1	37.2		
17	70.4	70.6		
18	41.0	42.1		
19	100.6	99.0		
20	42.9	43.5		
21	69.7	70.7		
22	38.8	40.9		
23	71.9	75.9		
24	ND	27.9		
25	-	21.2		
26	14.0	14.0		
27	17.2	17.3		
28	21.7	21.7		
29	20.2	20.2		
30	9.6	9.8		
31	7.0	7.1		
32	11.9	12.2		
33	-	14.3		
2-OMe	59.6	60.0		
14-OMe	55.5	55.5		
<sup>a</sup> Chemical shifts are reported in ppm relative to internal				
residual solvent (13C NMR CDCl3 77.0 ppm).				
<sup>b</sup> Everett et al. J. Chem. Soc. Perk. Trans. 2 <b>1989</b> 1073				

# 表 2-6 24-F-Baf とバフィロマイシンの <sup>13</sup>C NMR の比較

<sup>b</sup> Everett *et al. J. Chem. Soc. Perk. Trans.* 2 **1989**, 1073. <sup>c</sup> Not assigned



図 2-15 24-F-Baf の NOE 実験

2-5-b バフィロマイシンとデスメチル 24-F-Baf の比較

6 位および 8 位のメチル基を除去したデスメチル 24-F-Baf の V-ATPase 阻害活性は 大きく低下した。これは、これら2つのメチル基が活性発現に重要であることを示唆 する初めての結果であるといえる。そこでバフィロマイシンとデスメチル 24-F-Baf のNMRを比較することで、大きな構造の変化があるかを確認した(表 2-7,2-8)。そ の結果、デスメチル体の<sup>1</sup>H および<sup>13</sup>C NMR は、メチル基を除去した 6.8 位周辺だけ でなく、3 位や13 位など広範囲において化学シフトが変化していることが確認された。 この変化を、式(1)を用いてヒートマップとして表したものを図 2-16 に示す。赤色や 橙色で示した化学シフトが大きく変化している箇所が、広い範囲にわたって分布して いることが判明した。これはメチル基の除去により、バフィロマイシンのコンフォメ ーションが変化していることを示唆するものであり、1-5 位に相当するジエノエート 部分の平面構造や、7位ヒドロキシ基の向き、あるいはマクロラクトン環全体のコン フォメーションが変化していることなどが考えられた。これらの変化により、バフィ ロマイシンの活性発現に重要である特徴的なコンフォメーションをとることができ なくなった結果、顕著な V-ATPase 阻害活性を示さなくなったと考えられる。これら の変化をより詳細に考察するために、NMR により得られた結合定数、および NOE 実 験により得られた距離情報を用いてデスメチル 24-F-Baf の配座解析を行った(図 2-17)。その結果、デスメチル 24-F-Baf においても H3/H5 および H29/C2OMe に NOE 相関がみられ、C3-C4 結合は s-trans 配座をとっていることが確認できた。しかし天然 物や 24-F-Baf とは異なり、H7/H9 および H9/H11 にも NOE 相関がみられた。また結 合定数においても、<sup>3</sup>*J*<sub>67</sub>が9.0 Hz と大きく分裂しているなどの違いがみられた。した がってデスメチル 24-F-Baf は、24-F-Baf や天然物とは異なったコンフォメーションを 有していることが明らかとなった。

		<sup>1</sup> H NMR			
#	desmethyl	-24-F-Baf	Natural <sup>b</sup>		
1	-		-		
2	-				
3	6.41	(1H, s)	6.68	(1H, d, J = 0.8)	
4	-	(, 0)	-		
5	5.57	(1H, dd, J = 10.0, 5.0)	5.77	(1H, ddg, J = 9.2, 1.0, 1.0)	
6	2.65	(1H, ddd, J =9.0, 9.0, 3.0)	2.54	(1H, ddg, J = 9.1, 7.1, 1.9)	
	2.13-2.07	(1H, m)	-		
7	3.55-3.48	(1H, m)	3.29	(1H, dd, no J values given)	
70H	ND		1.62	(no other information given)	
8	1.96-1.91	(2H, m)	1.90	(no other information given)	
9a	2.52-2.43	(1H, m)	2.13	(1H, no multiplicity given, J = 14.0)	
9b	2.15-2.08	(1H, m)	1.95	(1H, no multiplicity given, J = 14.0, 11.5	)
10	-		-		
11	5.82	(1H, d, J = 10.5)	5.81	(1H, d, J =10.7)	
12	6.53	(1H, dd, J = 15.0, 11.0)	6.51	(1H, dd, J = 15.0, 10.7)	
13	5.24	(1H, dd, J = 15.0, 9.5)	5.16	(1H, dd, J = 15.0, 9.4)	
14	3.90	(1H, dd, J = 9.0, 9.0)	3.89	(1H, dd, J = 9.0, 9.0)	
15	4.91	(1H, dd, J = 9.0, 1.5)	4.95	(1H, dd, J = 8.7, 1.4)	
16	2.24-2.16	(1H, 12.0, 6.5, 6.5)	2.15	(1H, ddq, J = 10.8, 6.8, 1.4)	
17	4.10-4.04	(1H, m)	4.13	(1H, ddd, J = 10.8, 4.1, 2.0)	
17OH	4.83	(1H, dd, J = 4.0, 1.0)	4.66	(1H, dd, J = 4.2, 1.1)	
18	1.84-1.82	(1H, m)	1.77	(1H, no multiplicity given, J = 7.0, 2.1, 1	.3)
19	-		-		
19OH	6.13	(1H, d, J =2.0)	5.54	(1H, d, J = 2.1)	
20eq	2.34	(1H, dd, J = 12.0, 5.0)	2.30	(1H, dd, J = 11.9, 4.8)	
20ax	1.26-1.23	(1H, m)	1.16	(1H, ddd, J = 12.1, 11.1, 2.2)	
21	3.79-3.69	(1H, 10.0, 10.0, 5.0)	3.70	(1H, ddd, J = 11.2, 9.9, 4.7)	
22	1.64-1.55	(1H, M)	1.33	(1H, ddq, J = 10.1, 10.1, 6.5)	
23	4.09-3.99	(1H, M)	3.49	(1H, dd, J = 10.4, 2.4)	
24	-		1.88	(1H, ddq, J = 6.8, 6.8, 2.3)	
25	-	(011 -)	0.90	(3H, d, J = 6.8)	
26	1.96	(3H, S)	1.99	(3H, 0, J = 1.2)	
27			1.07	(3H, 0, J = 7.1)	
28	- 1 0/	(24 a)	0.94	$(3\Pi, 0, J = 0.3)$	
29	1.04		1.94	(3H, d, J = 1.1, 1.1)	
30	0.84	$(3\Pi, 0, J = 7.0)$	0.83	(3H, d, J = 6.9)	
31	1.06	(3H, 0, J = 7.0)	1.05	(3H, 0, J = 7.3)	
32	1.12	(3H, d, J = 5.5)	0.94	(3H, d, J = 6.5)	
33	-		0.77	(3H, d, J = 6.8)	
2-OMe	3.60	(3H, s)	3.64	(3H, s)	
14-OMe	3.27	(3H, s)	3.25	<u>(</u> 3H, s)	
<sup>a</sup> Chemical shifts are reported in ppm relative to internal residual solvent ( <sup>1</sup> H NMR CDCl <sub>3</sub> 7.26 ppm).					
<sup>b</sup> Everett et al, J. Chem, Soc, Perk, Trans, 2 <b>1989</b> , 1073.					

# 表 2-7 デスメチル 24-F-Baf と天然物の<sup>1</sup>H NMR の比較

	<sup>13</sup> C NMR			
#	desmethyl-24-F-Baf	Natural <sup>b</sup>		
1	167.2	167.3		
2	142.1	141.3		
3	131.7	133.7		
4	133.4	132.8		
5	135.4	143.3		
6	38.2	36.8		
7	74.5	80.8		
8	36.5	40.2		
9	37.4	41.3		
10	140.9	143.4		
11	125.5	125.0		
12	133.0	133.2		
13	129.0	126.8		
14	81.8	82.3		
15	76.1	76.8		
16	36.6	37.2		
17	70.3	70.6		
18	41.0	42.1		
19	100.6	99.0		
20	42.8	43.5		
21	69.6	70.7		
22	38.8	40.9		
23	71.9	75.9		
24	125.0	27.9		
25	-	21.2		
26	14.0	14.0		
27	-	17.3		
28	-	21.7		
29	16.3	20.2		
30	9.4	9.8		
31	7.0	7.1		
32	11.9	12.2		
33	-	14.3		
2-OMe	59.3	60.0		
14-OMe	56.0	55.5		
<sup>a</sup> Chemical shifts are reported in ppm relative to internal				
residual solvent (				

# 表 2-8 デスメチル 24-F-Baf と天然物の<sup>13</sup>C NMR の比較

<sup>b</sup>Everett et al. J. Chem. Soc. Perk. Trans. 2 **1989**, 1073.



図 2-16 デスメチル 24-F-Baf と天然物の NMR データの比較 式(1)により化学シフトの変化 d を計算し、値が大きく変化した箇所を赤、橙、黄の順 で示した。



図 2-17 デスメチル 24-F-Bafの NOE 実験

そこでより詳細な配座解析を行うために、MacroModel を用いた配座計算を行った (図 2-18)。MMFFs を力場に用いて TNCG 法により配座探索を行った後、DFT B3LYP/6-31G\*\*を基底関数として構造最適化を行った。初期構造はバフィロマイシン の結晶構造を用い、NMR により得られた結合定数および NOE 実験により得られた距 離情報を用いて制限をかけた。その結果、天然型のコンフォメーションを有する 24-F-Baf に対し、デスメチル 24-F-Baf は 6-9 位の配座が大きく異なっており、特に 8 位メチレンの立体配座が大きく変化していることが示唆された。またそれに伴い、7 位ヒドロキシ基の向きも変化していることが明らかとなった。これらの違いにより異 なったコンフォメーションをとる結果、デスメチル 24-F-Baf は顕著な V-ATPase 阻害 活性を示さなかったと推察される。この結果を 2-1 節で示した配座計算の結果と比較 すると、7 位ヒドロキシ基の向きの変化は予想の範囲内であった。しかし 8 位の大き な構造変化は予想外のものであり、今回合成したデスメチル 24-F-Baf の NMR データ を用いて制限をかけることで初めて明らかとなった構造といえる。以上のことから、 7 位ヒドロキシ基の向き、あるいは 8 位メチレンの立体配座の大きな変化が、活性発 現に大きな影響を与えたと推察される。

天然物がデスメチル体の配座をとらないのは、6位および8位メチル基と10位メチ ル基との間で立体反発が生じるためであると考えられる。特に8位メチル基は6位と 10位メチル基との間に位置するため、立体反発への寄与が大きい。したがって、6位 メチル基とともに特に8位メチル基は、バフィロマイシンの特徴的なコンフォメーシ ョンを形成する上で重要な役割を担っていることが示唆される。





b) デスメチル 24-F-Baf



力場: MMFFs アルゴリズム: TNCG 溶媒: 真空中

図 2-18 MacroModel により計算した a)24-F-Baf および b)デスメチル 24-F-Baf の立体 配座

24-F-Baf は青丸の位置にメチル基が存在するため、立体反発によりデスメチル 24-F-Baf の立体配座をとることができない。

## 2-5-c V-ATPase との相互作用を含めた考察

バフィロマイシンは、第一章で述べたように過去の研究から V-ATPase のサブユニ ットcともう一つのサブユニットcの間にマクロラクトン側から結合し、またサブユ ニットaとも相互作用していると考えられている。今回デスメチル 24-F-Baf が顕著な 阻害活性を示さなかったことを考えると、バフィロマイシンは厳密な分子認識で V-ATPase と相互作用していると考えられる。特に C6-C9 のコンフォメーションの変 化が活性に大きく影響したことを考慮すると、サブユニットaとcをともに認識して 作用するというよりは、サブユニットc上の結合部位と強固に相互作用している可能 性が高いと推察される。これは過去に提唱されている結合ポケットの存在と矛盾しな い結果であるといえる。

さらにデスメチル 24-F-Baf は、V-ATPase 阻害活性は示さなかったものの細胞増殖 抑制活性は有していた。この抑制活性は V-ATPase 阻害ではなく異なる機構により発 現していることが考えられるため、別の作用標的が存在することが示唆される。過去 の研究において、バフィロマイシンは様々な生物活性を有すると報告されているが、 V-ATPase 以外に作用すると報告されているものはない。したがって今回の結果は、 バフィロマイシンに新たな作用標的が存在する可能性を示唆する結果といえる。

- 1) Leroux, F. ChemBioChem 2004, 5, 644-649.
- a) Wolf, C.; König, W. A.; Roussel, C. Liebigs Ann. 1995, 781. b) Leroux, F. C Chem. Bio. Chem. 2004, 5, 644.
- 3)機能解明を指向した標識化天然物の合成、大石 徹、村田道雄 化学工業 2004, 8, 604-609.
- Nakawgawa, Y.; Yanagita, R.; Hamada, N.; Murakami, A.; Takahashi, H.; Saito, N.; Nagai, H.; Irie, K. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 7573.
- Scheidt, K. A.; Bannister, T. D.; Tasaka, A.; Wendt, M. D.; Savall, B. M.; Fegley, G. J.; Roush, W. R. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 6981-6990.
- 6) Evans, D. A.; Calter, M. A. Tetrahedron Lett. 1993, 34, 6871-6874.
- Toshima, K. Jyojima, T.; Miyamoto, N.; Katohno, M.; Nakata, M.; Matsumura, S. J. Org. Chem. 2001, 66, 1708.
- Toshima, K. Jyojima, T. Yamaguchi, H.; Noguchi, Y.; Yoshida, T.; Murase, H.; Nakata, M.; Matsumura, S. J. Org. Chem. 1997, 62, 3271-3284.
- 9) Takai, K.; Nitta, K.; Utimoto, K. Tetrahedron Lett. 1988, 29, 5263.
- 10) Rauhala, V.; Nevalainen, A. M.; Koskinen, A. M. P. Tetrahedron 2004, 60, 9199.
- 11) Evans, D. A.; Vogel, E.; Nelson, J. V. J. Am. Chem. Soc. 1979, 101, 6120.
- 12) Shibata, N.; Mizuta, S.; Kawai, H. Tetrahedron Asymmetry 2008, 19, 2633-2644.
- 13) Prakash, S. G. K.; Krishmnamurti, R.; Olah, G. A. J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 393-395.
- 14) Evans, D. A.; Chapman, K. T.; Carreira, E. M. J. Am. Chem. Soc. 1988, 110, 3560.
- 15) Evans, D. A.; Hoveda, A. H. J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 6447.
- Ramachandran, P. V.; Teodorovic, A. V.; Brown, H. C. *Tetrahedron*, **1993**, 49, 1725-1738.
- 17) Keck, G. E.; Tarbet, K. H.; Geraci, L. S. J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 8467.
- Codesido, E. M.; Cid, M. M.; Castedo, L.; Mouriño, A.; Granja, J. R. *Tetrahedron Lett.* 2000, *41*, 5861-5864.
- 19) Hanessian, S.; Ma, J.; Wang, W. J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 10200-10206.
- 20) Negishi, E.; Van Horn, D. E.; Yoshida, T. J. Am. Chem. Soc. 1985, 107, 6639.
- 21) Einhorn, J.; Eihnorn, C.; Ratajczak, F.; Pierre, J-L. J. Org. Chem. 1996, 61, 7552-7554.
- 22) Paterson, I.; Mcleod, M. D. Tetrahedron Lett. 1997, 38, 4183.
- 23) Tsuchikawa, H.; Matsushita, N.; Matusmori, N.; Murata, M.; Oishi, T. *Tetrahedlon Lett.*2006, 47, 6187.

- 24) Marshall, J. A.; Adams, N. D. J. Org. Chem. 2002, 67, 733.
- 25) Kleinbeck, F.; Fettes, G. J.; Fader, L. D.; Carreira, E. M. Chem. Eur. J. 2012, 18, 3598-3610.
- 26) Shiina, I.; Kubota, M.; Ibuka, R. Tetrahedron Lett. 2002, 43, 7535-7539.
- 27) a) Inanaga, J.; Hirata, K.; Saeki, H.; Katsuki, T.; Yamaguchi, M. *Chem. Bull. Jpn.* 1979, 52, 1989. b) Hikota, M.; Sakurai, Y.; Horita, K.; Yonemitsu, O. *Tetrahedron Lett.* 1990, 31, 6367-6370.
- 28) Gagliardi, S.; Gatti, P. A.; Belflore, P.; Zocchetti, A.; Clarke, G. D.; Farina, C. J. Med. Chem. **1998**, 41, 1883.
- 29) Paterson, I.; Doughty, V. A. S.; Mcleod, M. D.; Trieselmann, T. *Tetrahedron* 2011, 67, 10119.
- 30) Paterson, I.; Mcleod, M. D. Tetrahedron Lett. 1997, 38, 4183.
- 31) Paterson, I.; Blakey, S. B.; Cowden, C. J. Tetrahedron Lett. 2002, 43, 6005.
- 32) a) Geisow, M. J.; Beaven, G. H.; Hart, P. D.; Young, M. R. *Exp. Cell. Res.* 1980, 126, 159. b) Yoshimori, T.; Yamamoto, A.; Moriyama, Y.; Futai, M.; Tashiro, Y. J. Biol. Chem. 1991, 266, 17707.
- 33) Kazami, S.; Muroi, M.; Kawatani, M.; Kubota, T.; Usui, T.; Kobayashi, J.; Osada, H. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2006, 70, 1364-1370.
- 34) Balan, D.; Burns, C. J.; Fisk, N. G.; Hügel, H.; Huang, D. C. S.; Segal, D.; White, C.; Wagler, J.; Rizzacasa, M. A. Org. Biomol. Chem. 2012, 10, 8147.

## 第三章 結論

バフィロマイシンによる V-ATPase 阻害機構の詳細を解明することを最終目標に掲 げ、その一つ目の重要課題である分子骨格にフッ素を導入したフッ素標識化バフィロ マイシン誘導体の開発を行った。フッ素導入のしやすさ、化合物の安定性および生物 活性を考慮して 24-F-Baf およびデスメチル 24-F-Baf を設計し、それらの合成法の確 立を検討した。3 つのセグメントを連結する収束的合成を考案し、不斉点にトリフル オロメチル基を有する 23 位の立体化学の構築、および各セグメントの効率的合成と カップリングを行うことで誘導体の合成を達成し、効率的合成法の確立に成功した。

合成した誘導体の生物活性を評価したところ、24-F-Baf は期待通り天然物と同等の 高い阻害活性を有していることが明らかとなった。これによりフッ素標識化バフィロ マイシン誘導体の開発を達成するとともに、フッ素標識を施したバフィロマイシン誘 導体を初めて得ることに成功した。一方、デスメチル 24-F-Baf は予想に反し顕著な V-ATPase 阻害活性を示さず、フッ素誘導体としては適さないことが明らかとなった。 また両者の活性を比較することにより、6位および8位メチル基がバフィロマイシン の活性発現に大きく寄与することが示唆され、コンフォメーションの違いにより活性 が変化していることが示唆された。

今回開発に成功した 24-F-Baf は、バフィロマイシンによる V-ATPase 阻害機構を固体 NMR を用いて分子レベルで解析するうえで、重要な分子プローブとなることが期待される。

#### **Experimental Section**

General methods for organic syntheses. All reactions sensitive to air or moisture were performed under argon atmosphere with dry glassware unless otherwise noted in particular. The dehydrated solvents, dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), tetrahydrofuran (THF), toluene, *N*,*N*-dimethylformamide (DMF) and pyridine were purchased from Kanto Chemical Co. Inc. or Wako Pure Chemical Industries Ltd., and was used without further dehydration. Dimethylsulfoxide (DMSO), 1,2-dichloroethane, N-methylpyrrolidone (NMP), 2,6-lutidine and benzylbromide were distilled before using. Lithium chloride (LiCl) and molecular sieves (MS4A) were preactivated by heating in vacuo. All other chemicals were obtained from local venders, and used as supplied unless otherwise stated. Thin-layer chromatography (TLC) of E. Merck silica gel 60 F254 pre-coated plates (0.25-mm thickness) was used for the reaction analyses. For column chromatography, Kanto silica gel 60N (spherical, neutral, 100-210 µm), Kanto silica gel 60N (irregular, neutral, 63-200 µm) or Merck silica gel 60 (40-63 µm, for flash chromatography) were used. Optical rotations were recorded on a JASCO P-1010 polarimeter. IR spectra were recorded on a JASCO FT-IR-300E Fourier transform infrared spectrometer. <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectra were recorded on a JEOL JNM-ECS400, JEOL JNM-ECA500 and Agilent Inova-600 spectrometers. Chemical shifts are reported in ppm from tetramethylsilane (TMS) with reference to internal residual solvent [<sup>1</sup>H NMR, CHCl<sub>3</sub> (7.26); <sup>13</sup>C NMR, CDCl<sub>3</sub> (77.0)]. The following abbreviations are used to designate the multiplicities: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet. High resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific) mass spectrometer.



**PMB ether S2**: To a solution of known Weinreb amide **S1**<sup>1)</sup> (4.57 g, 16.2 mmol) in toluene (108 mL) was added PMBOCNHCCl<sub>3</sub> (6.1 mL, 29.2 mmol) and Sc(OTf)<sub>2</sub> (0.80 g, 1.62 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, PMBOCNHCCl<sub>3</sub> (1.6 mL, 7.70 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 2 h and filtered through Hirsch funnel, then quenched with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 5/1 to 1/2) afforded PMB ether **S2** (4.55 g, 11.3 mmol, 70%) as a colorless oil:  $R_f = 0.39$  (hexane/EtOAc = 1/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.35-7.19 (9H, m), 6.86-6.82 (2H, m), 4.52-4.40 (4H, m), 3.82-3.76 (1H, m), 3.78 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.60-3.54 (1H, m, H3), 3.19-3.05 (1H, m), 3.16 (3H, s), 1.98-1.88 (1H, m), 1.84-1.75 (1H, m), 1.23 (3H, d, *J* = 7.0 Hz).



aldehyde 12a: To a solution of PMB ether S2 (198 mg, 0.493 mmol) in THF (4.9 mL) was added DIBAL (1.04 M in hexane, 1.42 mL, 1.48 mmol) at -78 °C. After being stirred at -78 °C for 30 min, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaK-tartrate. The resulting mixture was stirred for 1 h and the aqueous layer was extracted with ether. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 5/1) afforded aldehyde 12a (136 mg, 0.396 mmol, 80%) as a colorless oil: R<sub>f</sub> = 0.34 (hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.75-9.73 (1H, m), 7.38-7.26 (5H, m), 7.21-7.15 (2H, m), 6.88-6.82 (2H, m), 4.51-4.38 (4H, m), 4.06 (1H, dt, *J* = 8.0, 4.0 Hz), 3.79 (3H, s), 3.62-3.50 (1H, m), 2.61-2.52(1H, m), 1.95-1.78 (1H, m), 1.12 (3H, d, *J* = 7.0 Hz).



**alcohol 13a**: To a solution of aldehyde **12a** (326 g, 0.950 mmol) in THF (19 mL) was added TMSCF<sub>3</sub> (0.70 mL, 4.75 mmol) and TBAF (1.0 M in THF, 2.4 mL, 2.4 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 10 min, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl. The aqueous layer was extracted with ether, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 20/1 to 5/1) afforded alcohol **13a** (103 mg, 0.249 mmol, 26%) and **14a** (195 mg, 0.472 mmol, 50%) as colorless oils.

**13a**:  $R_f = 0.40$  (hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.39-7.28 (5H, m), 7.22-7.17(2H, m), 6.88-6.83(2H, m), 4.75 (1H, d, J = 5.0 Hz), 4.51-4.41 (4H, m), 4.00-3.86 (2H, m), 3.79 (3H, s), 3.56-3.49 (1H, m), 2.24 (ddt, J = 7.0, 7.0, 3.0 Hz), 2.03-1.94 (1H, m), 1.91-1.80 (1H, m), 1.05 (3H, d, J = 7.0 Hz); <sup>19</sup>F NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -76.25 (d, J = 7.0 Hz).



**14a**:  $R_f = 0.33$  (hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.39-7.27 (5H, m), 7.23-7.17 (2H, m), 6.89-6.84 (2H, m), 4.52-4.37 (4H, m), 4.23-4.14 (1H, m), 3.80 (3H, s), 3.72 (1H, dt, J = 6.0, 3.0 Hz), 3.58-3.48 (1H, m), 3.27 (1H, br), 2.23-2.15 (1H, m), 2.00-1.83 (2H, m), 1..04 (3H, d, J = 7.0 Hz); <sup>19</sup>F NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -76.71 (J = 8.0 Hz).



acetal 15: To a solution of alcohol 13a (70.9 mg, 172  $\mu$ mol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3.5 mL) and pH 7.0 PBS (0.7 mL) was added DDQ (137 mg, 602  $\mu$ mol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>.The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and the organic layer was washed with

brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 20/1 to 3/1) afforded acetal **15** (66.5 mg, 162 µmol, 94%) as a colorless oil:  $R_f = 0.71$  (hexane/EtOAc = 2/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.40-7.37 (2H, m), 7.36-7.26 (5H, m), 6.91-6.88 (2H, m), 5.85 (1H, s), 4.53 (1H, d, *J* = 12.0 Hz), 4.90 (1H, d, *J* = 12.0 Hz), 4.43-4.38 (1H, m), 4.10 (1H, dt, *J* = 5.0, 5.0 Hz), 3.81 (3H, s), 3.63-3.54 (1H, m), 2.10-1.88 (2H, m), 1.78-1.71 (1H, m), 1.29 (3H, d, *J* = 7.0 Hz); <sup>19</sup>F NMR (470 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -71.10 (*J* = 9.5 Hz); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  160.18, 138.34, 130.55, 128.35, 127.60, 127.42, 125.41 (q, *J* = 286 Hz), 113.65, 97.83, 76.79 (q, *J* = 30 Hz), 73.00, 72.11, 66.04, 55.24, 32.90, 29.18, 13.10.



acetal 16: To a solution of alcohol 14a (25.5 mg, 61.8 μmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.2 mL) and pH 7.0 PBS (0.25 mL) was added DDQ (49 mg, 216 μmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>.The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 20/1 to 5/1) afforded acetal 16 (23.3 mg, 56.8 μmol, 92%) as a colorless oil:  $R_f$  = 0.72 (hexane/EtOAc = 2/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.43-7.27 (7H, m), 6.92-6.88 (2H, m), 5.34 (1H, s), 4.54 (1H, d, *J* = 12.0 Hz), 4.50 (1H, d, *J* = 12.0 Hz), 4.31 (1H, qd, *J* = 7.0, 2.5 Hz), 4.15-4.10 (1H, m), 3.81 (3H, s), 3.68-3.61 (1H, m), 3.60-3.55 (1H, m), 2.02-1.93 (1H, m), 1.88-1.82 (1H, m), 1.81-1.73 (1H, m), 1.13 (1H, d, *J* = 6.5 Hz); <sup>19</sup>F NMR (470 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -74.26 (*J* = 7.0 Hz); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 160.24, 138.32, 129.97, 128.41, 128.36, 127.68, 127.60, 127.53, 127.37, 127.28, 113.67, 113.58, 101.93, 78.69 (q, *J* = 31 Hz), 77.08, 73.05, 65.94, 55.29, 32.69, 31.48, 6.37.



**ketone 18**: To a solution of alcohol **14a** (69.2 mg, 168 µmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.7 mL) was added NaHCO<sub>3</sub> (282 mg, 3.36 mmol) and DMP (0249 mg, 587 µmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 3 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 30/1 to 7/1) afforded ketone **18** (58.4 mg, 142 µmol, 85%) as a colorless oil:  $R_f = 0.48$  (hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.37-7.28 (5H, m), 7.19-7.15 (2H, m), 6.88-6.82 (2H, m), 4.50-4.37 (2H, m), 3.95 (1H, ddd, *J* = 7.0, 7.0, 7.0 Hz), 3.79 (3H, s), 3.52 (2H, t, *J* = 7.5 Hz), 3.30 (1H, qd, *J* = 8.0, 8.0 Hz), 1.8 (1H, dt, *J* = 7.5, 7.5 Hz), 1.24 (3H, d, *J* = 7.0 Hz).

**alcohol 13a**: To a solution of ketone **18** (12.3 mg, 30.0  $\mu$ mol) in THF (0.37 mL) was added L-Selectride (1.0 M in THF, 93  $\mu$ L, 92.6  $\mu$ mol) at -78 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was quenched with MeOH. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 20/1 to 5/1) afforded alcohol **13a** (6.7 mg, 16.2  $\mu$ mol, 54%) and alcohol **14a** (1.6 mg, 3.9  $\mu$ mol, 13%) as colorless oils.



**diol 25**: To a solution of alcohol **13a** (60.3 mg, 146  $\mu$ mol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3.0 mL) and H<sub>2</sub>O (1.0 mL) was added DDQ (116 mg, 512  $\mu$ mol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, AcOH (1.0 mL) was added. The resulting mixture was stirred at 40 °C for 2 h and quenched with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 10/1 to 3/1) afforded diol **25** (33.8 mg, 116  $\mu$ mol, 79%) as

a colorless oil:  $R_f = 0.39$  (hexane/EtOAc = 2/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.40-7.28 (5H, m), 4.86 (1H, d, J = 7.0 Hz), 4.56 (1H, d, J = 12.0 Hz), 4.52 (1H, d, J = 12.0 Hz), 4.32 (1H, d, J = 10.0 Hz), 3.96-3.86 (1H, m), 3.85 (1H, s), 3.81-3.76 (1H, m), 3.72-3.65 (1H, m), 2.08-1.96 (1H, m), 1.58-1.51 (1H, m), 1.20 (3H, d, J = 7.5 Hz); <sup>19</sup>F NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -76.22 (J = 8.0 Hz).



silyl ether 26: To a solution of alcohol 25 (58.9 mg, 201 μmol) in DMF (1.0 mL) was added 2,6-lutidine (94 μL, 805 μmol) and *t*-Bu<sub>2</sub>Si(OTf)<sub>2</sub> (99 μL, 302 μmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 2 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The aqueous layer was extracted with ether, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 100/1 to 10/1) afforded silyl ether 26 (77.5 mg, 179 μmol, 89%) as a colorless oil:  $R_f = 0.85$  (hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.36-7.25 (5H, m), 4.55 (1H, d, *J* = 12.0 Hz), 4.52 (1H, d, *J* = 12.0 Hz), 4.31-4.26 (1H, m), 4.12 (1H, qd, *J* = 7.0, 7.0 Hz), 3.69 (1H, dd, *J* = 7.5, 5.0 Hz), 2.38-2.30 (1H, m), 1.84-1.70 (2H, m), 1.03 (9H, s), 1.00-0.97 (3H, m), 0.99 (9H, s); <sup>19</sup>F NMR (470 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -77.82 (*J* = 7.0 Hz).



**alcohol S3**: To a solution of silyl ether **26** (63.3 mg, 146 µmol) in EtOAc (0.7 mL) was added 10% Pd/C (23.3 mg, 22 µmol). The resulting mixture was purged with hydrogen and stirred at room temperature for 10 h. After being filtered through Celite, the filtrate was concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 7/1 to 3/1) afforded alcohol **S3** (49.0 mg, 143 µmol, 98%) as a colorless oil:  $R_f = 0.40$  (hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  4.39 (1H, ddd, *J* = 11.0, 4.5, 2.5 Hz), 4.17-4.09 (1H, m), 3.93-3.85 (1H, m), 2.31 (1H, ddq, *J* = 7.0, 7.0, 4.5 Hz), 2.24 (1H, t, *J* = 5.0)

Hz), 1.88-1.78 (1H, m), 1.68-1.60 (1H, m), 1.05 (9H, s), 1.04 (9H, s), 1.06-1.03 (3H, m);  $^{19}$ F NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -78.28 (*J* = 9.0 Hz).



aldehyde 27: To a solution of alcohol S3 (49.0 mg, 143 µmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.4 mL) was added NaHCO<sub>3</sub> (180 mg, 2.14 mmol) and DMP (182 mg, 429 µmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 10/1 to 3/1) afforded aldehyde 27 (45.7 mg, 134 µmol, 94%) as a colorless oil:  $R_f$  = 0.53 (hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.83 (1H, dd, *J* = 3.5, 1.0 Hz), 4.79-4.73 (1H, m), 4.10 (1H, quin. *J* = 7.0 Hz), 2.64 (1H, ddd, *J* = 15.5, 11.0, 3.5 Hz), 2.46-2.38 (1H, m), 1.03-0.95 (3H, m), 1.02 (9H, s), 0.99 (9H, s); <sup>19</sup>F NMR (471 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -7.60 (*J* = 7.0 Hz).



alcohol S4 and S5: To a solution of aldehyde 27 (45.7 mg, 134  $\mu$ mol) in THF (0.67 mL) was added EtMgBr (1.0 M in THF, 0.67 mL, 670  $\mu$ mol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 3 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl. The aqueous layer was extracted with ether, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 20/1 to 5/1) afforded alcohol S4 (15.8 mg, 46.7  $\mu$ mol, 35%) and alcohol S5 (28.1 mg, 77.4 mmol, 58%) as colorless oils.

**S4**:  $R_f = 0.57$  (hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.54-4.47 (1H, m), 4.14 (1H, double quint. J = 6.5, 2.0 Hz), 3.87-3.79 (1H, m), 3.76 (3H, s), 2.25-2.18 (1H, m), 1.74-1.63 (1H, m), 1.60-1.44 (4H, m), 1.10 (3H, dd, J = 7.0, 1.0 Hz), 1.07 (9H, s), 1.06 (9H, s), 0.96 (3H, t, J = 7.5 Hz); <sup>19</sup>F NMR (471 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -79.04 (J = 7.5 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>O<sub>3</sub>F<sub>3</sub>NaSi [M+Na<sup>+</sup>] 393.2043, found: 393.2048.

**S5**:  $R_f = 0.50$  (hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  4.46-4.38 (1H, m), 4.12 (1H, quint., J = 7.5 Hz), 3.95-3.87 (1H, m), 2.44-2.33 (1H, m), 1.70-1.62 (1H, m), 1.58-1.49 (2H, m), 1.47-1.39 (1H, m), 1.04 (9H, s), 1.02 (9H, s), 0.98 (3H, J = 7.0 Hz); <sup>19</sup>F NMR (471 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -77.58 (J = 7.0 Hz).



**ketone 4**: To a solution of alcohol **S4** and **S5** (46.0 mg, 124.1 μmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.4 mL) was added NaHCO<sub>3</sub> (156 mg, 1.86 mmol) and DMP (158 mg, 372 μmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 9 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 50/1 to 10/1) afforded diol **4** (41.4 mg, 112 µmol, 90%) as a colorless oil:  $R_f$  = 0.70 (hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.73 (1H, dt, *J* = 10.0, 4.0 Hz), 4.10 (1H, quin, *J* = 7.0 Hz), 2.72 (1H, dd, *J* = 15.0, 10.0 Hz), 2.53 (1H, q, *J* =7.5 Hz), 2.40-2.31 (2H, m), 1.07 (3H, t, *J* = 7.5 Hz), 1.03-0.99 (21H, m); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 209.11, 124.77 (q, *J* = 282 Hz), 74.22 (q, *J* = 31.2 Hz), 71.12, 45.50, 36.79, 36.06, 27,19, 27.12, 21.40, 21.19, 13.36, 7.50; <sup>19</sup>F NMR (470 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -78.15 (*J* = 7.5 Hz); HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd for C<sub>17</sub>H<sub>31</sub>F<sub>3</sub>O<sub>3</sub>SiNa [M+Na<sup>+</sup>] 391.1887, found: 391.1890.



ester 35: To a solution of known alcohol  $34^{20}$  (109 mg, 874 µmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.0 mL) and MeOH (2.0 mL) was bubbled O<sub>3</sub> gas at -78 °C for 5 min, then O<sub>2</sub> gas was bubbled for 10 min. SMe<sub>2</sub> (294 µL, 4.02 mmol) was added and the resultant mixture was stirred at room temperature for 2 h, subsequently concentrated under reduced pressure. The crude product was used without further purification. To a solution of the crude aldehyde in toluene (8.7 mL)

was added Ph<sub>3</sub>PC(Me)CO<sub>2</sub>Et (1.58 g, 4.37 mmol). After being stirred at 100 °C for 4 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl. The aqueous layer was extracted with ether, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 20/1 to 5/1) afforded ester **35** (134 mg, 637 µmol, 73% over 2 steps) as a colorless oil:  $R_f = 0.68$  (hexane/EtOAc = 1/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.81 (1H, qt, J = 7.5, 1.5 Hz), 4.20 (2H, q, J = 7.0 Hz), 3.98-3.91 (1H, m), 2.41-2.34 (4H, m), 1.86 (3H, d, J = 1.5 Hz), 1.78-1.64 (2H, m), 1.30 (3H, t, J = 7.0 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>Na [M+Na<sup>+</sup>] 233.1148, found: 233.1152.



diol S6: To a solution of ester 35 (1.61 g, 8.19 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (82 mL) was added DIBAL (1.04 M in hexane, 31.5 mL, 32.8 mmol) at -78 °C. After being stirred at -78 °C for 15 min and at 0 °C for 15 min, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaK-tartrate. The resultant mixture was stirred for 2 h and aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 2/1 to 1/2) afforded diol S6 (1.31 g, 7.81 mmol, 95%) as a colorless oil: R<sub>f</sub> = 0.15 (hexane/EtOAc = 1/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.49 (1H, qt, *J* = 7.5, 1.5 Hz), 4.04 (2H, br), 3.86-3.78 (1H, m), 2.35 (2H, dt, *J* = 7.0, 2.5 Hz), 2.25 (2H, t, *J* = 6.5 Hz), 1.98 (1H, t, *J* = 3.0 Hz), 1.77-1.61 (2H, m), 1.69 (3H, s).



iodoolefine 36: To a solution of  $Cp_2ZrCl_2$  (6.78 g, 23.2 mmol) in  $ClCH_2CH_2Cl$  (155 mL) was added AlMe<sub>3</sub> (2.0 M in toluene, 34.8 mL, 69.6 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 30 min, diol S6 (1.30 g, 7.73 mmol) in  $ClCH_2CH_2Cl$  (26 mL) was added. The

resultant mixture was stirred at 60 °C for 8 h, then cooled to -30 °C. A solution of iodine (19.6 g, 154.6 mmol) in THF (154 mL) was added and the resulting mixture was stirred at 0 °C for 1 h. The reaction mixture was carefully quenched with saturated aqueous  $K_2CO_3$  and filtered through Celite. The filtrate was extracted with ether, and the organic layer was washed with saturated aqueous  $Na_2S_2O_3$  and brine, then dried over anhydrous  $Na_2SO_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 20/1 to 3/1) afforded iodoolefine **36** (2.06 g, 6.63 mmol, 86%) as a colorless oil:  $R_f = 0.39$  (hexane/EtOAc = 1/2); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.93 (1H, s), 5.47 (1H, t, *J* = 7.5 Hz), 4.05 (2H, br), 3.67-3.58 (1H, m), 2.43-2.20 (4H, m), 1.85 (3H, s), 1.69 (3H, s), 1.65-1.53 (2H, m); HRMS (ESI-TOF) *m*/*z* calcd for  $C_{11}H_{19}O_2INa$  [M+Na<sup>+</sup>] 333.0322, found: 333.0325.



aldehyde S7: To a solution of diol 36 (1.15 g, 3.71 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (37 mL) and pH8.6 buffer (37 mL) was added TEMPO (58 mg, 0.370 mmol), TBACl (103 mg, 0.370 mmol) and NCS (742 mg, 5.56 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 2 h, TEMPO (29 mg, 0.185 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 1 h, then quenched with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 10/1 to 1/1) afforded aldehyde **S7** (1.03 mg, 3.32 mmol, 90%) as a colorless oil:  $R_f = 0.54$  (hexane/EtOAc = 1/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.44 (1H, s), 6.59 (1H, qt, J = 7.0, 1.5 Hz), 5.96 (1H, q, J = 1.0 Hz), 3.86-3.77 (1H, m), 2.54 (2H, t, J = 7.0 Hz), 2.45-2.28 (2H, m), 1.85 (3H, s), 1.77 (3H, s), 1.69-1.60 (2H, m).



ester 7: To a solution of a known phosphate **S8**<sup>3)</sup> (48.0 mg, 161 μmol) in THF (1.6 mL) was added 18-crown-6 ether (42.6 mg, 161 μmol) and KHMDS(0.5 M in THF, 292 μL, 146 μmol) at 0 °C. After being stirred at 0 °C for 30 min, a solution of aldehyde **S7** (15.6 mg, 50.6 μmol) in THF (0.3 mL) was added at -15 °C. The resulting mixture was stirred at -15 °C for 5 h and quenched with saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl. The aqueous layer was extracted with ether, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 7/1 to 2/1) afforded ester **7** (13.8 mg, 35.0 μmol, 69%) as a colorless oil:  $R_f = 0.58$  (hexane/EtOAc = 1/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.61 (1H, s), 5.93 (1H, q, *J* = 1.0 Hz), 5.84 (1H, t, *J* = 7.5 Hz), 3.79 (3H, s), 3.72-3.62 (1H, m), 3.66 (3H, s), 2.44-2.25 (4H, m), 1.99 (3H, d, *J* = 1.0 Hz), 1.69-1.50 (2H, m).



silyl ether 43: To a solution of ester 7 (390 mg, 0.990 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (00 mL) was added 2,6-lutidine (0.52 mL, 4.45 mmol) and TIPSOTf (0.80 mL, 2.97 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 100/1 to 10/1) afforded silyl ether 43 (545 mg, 0.990 mmol, quant.) as a colorless oil: R<sub>f</sub> = 0.64 (hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.60 (1H, s), 5.87 (1H, q, *J* = 1.0 Hz), 5.84 (1H, t, *J* = 7.0 Hz), 3.80 (3H, s), 3.67-3.65 (1H, m), 3.66 (3H, s), 2..43-2.33 (2H, m), 2.30-2.21 (2H, m), 1.98 (3H, s), 1.82 (3H, s), 1.64-1.55 (2H, m), 1.07-1.04 (21H, m).



diene S9: To a solution of iodoolefine 43 (209 mg, 380 µmol) and alkenylstannane 6 (274 mg, 380 µmol) in NMP (4.5 mL) was added LiCl (64 mg, 1.52 mmol), Ph<sub>3</sub>As (349 mg, 1.14 mmol) and Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>·CHCl<sub>3</sub> (98 mg, 95 µmol) in NMP (7.6 mL). After being stirred at room temperature for 12 h, the reaction mixture was quenched with H<sub>2</sub>O. The aqueous layer was extracted with ether, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography containing 10% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (hexane/EtOAc = 50/1 to 3/1) afforded diene S9 (262 mg, 306 µmol, 81%) as a red amorphous material:  $R_f = 0.41$  (hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.45-7.41 (4H, m), 7.34-7.26 (6H, m), 7.23-7.19 (2H, m), 6.84-6.81 (2H, m), 6.61 (1H, s), 6.22 (1H, dd, *J* = 15.0, 11.0 Hz), 5.86 (1H, t, *J* = 7.0 Hz), 5.82 (1H, d, *J* = 11.0 Hz), 5.43 (1H, dd, *J* = 15.0, 9.0 Hz), 3.94-3.90 (1H, m), 3.80-3.76 (4H, m), 3.79 (3H, s), 3.65 (3H, s), 3.37 (1H, dd, *J* = 9.0, 6.0 Hz), 3.22 (1H, d, *J* = 9.0, 4.5 Hz), 3.20 (3H, s), 3.02 (1H, d, *J* = 9.5, 4.5 Hz), 2.55 (1H, d, *J* = 2.5 Hz), 2.41-2.36 (2H, m), 2.12-2.03 (1H, m), 1.99-1.93 (1H, m), 1.98 (3H, s), 1.71 (3H, s), 1.68-1.53 (1H, m), 1.15 (3H, d, *J* = 6.5 Hz), 1.06 (21H, s).



**seco acid 44**: To a solution of diene **S9** (262 mg, 306 µmol) in dioxane (10.2 mL) was added 1M KOH (4.6 mL, 4.60 mmol). After being stirred at 80 °C for 2 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl. The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and the organic layer was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 2/1 to 1/3) afforded seco acid **44** (210 mg, 256 µmol, 84%) as a colorless amorphous material:  $R_f = 0.33$  (hexane/EtOAc = 1/3); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ 7.46-7.18 (12H, m), 6.85-6.80 (2H, m), 6.72 (1H, s), 6.21 (1H, dd, *J* = 15.0, 11.0 Hz), 5.91 (1H, t, *J* = 6.5 Hz), 5.82 (1H, d, *J* = 11.0

Hz), 5.44 (1H, d, *J* = 15.0, 9.0 Hz), 3.97-3.90 (1H, m), 3.81-3.76 (1H, m), 3.79 (3H, s), 3.67 (3H, s), 3.37 (1H, dd, *J* = 11.0, 7.5 Hz), 3.26-3.18 (1H, m), 3.20 (3H, s), 3.04-2.98 (1H, m), 2.42-2.37 (2H, m), 2.12-2.04 (1H, m), 1.99 (3H, s), 1.99-1.91 (1H, m), 1.71(3H, s), 1.64-1.54 (1H, m), 1.16 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.06 (21H, s).



lactone 45: To a solution of seco acid 44 (185 mg, 220 µmol) in toluene (13.0 mL) was added *i*-Pr<sub>2</sub>NEt (0.76 mL, 4.40 mmol) and 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride (0.34 mL, 2.20 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 3 h, the reaction mixture was diluted with toluene (130 mL). A solution of DMAP (349 mg, 2.86 mmol) in toluene (13 mL) was added and the resultant mixture was stirred for 12 h, then quenched with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The aqueous layer was extracted with ether and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 50/1 to 5/1) afforded lactone 45 (150.5 mg, 183  $\mu$ mol, 83%) as a colorless amorphous material:  $R_f = 0.65$  (hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.48-7.43 (4H, m), 7.36-7.31 (2H, m), 7.30-7.24 (4H, m), 7.22-7.17 (2H, m), 6.83-6.79 (2H, m), 6.42-6.34 (1H, dd, J = 15.0, 11.0 Hz) 6.36 (1H, s), 5.80 (1H, d, J = 11.0 Hz), 5.57 (1H, t, J = 8.0 Hz), 5.29 (1H, dd, J = 15.0, 7.5, Hz), 5.00 (1H, dd, J = 7.0, 4.5 Hz), 3.79 (1H, t, J = 7.5 Hz), 3.78 (3H, s), 3.73-3.66 (1H, m), 3.47 (3H, s), 3.17 (3H, s), 3.14 (1H, dd, J = 9.0, 7.0 Hz), 3.00 (1H, dd, J = 9.0, 6.5 Hz), 2.59-2.51 (1H, m), 2.50-2.43 (1H, m), 2.38-2.27 (1H, m), 2.25-2.14 (1H, m), 2.02-1.95 (1H, m), 1.92 (3H, s), 1.86-1.74 (1H, m), 1.69 (3H, s), 1.07 (21H, s), 1.04 (3H, d, *J* = 7.0 Hz).



**alcohol 46**: To a solution of lactone **45** (89.7 mg, 109 µmol) in THF (2.2 mL) and MeOH (2.2 mL) was added PPTS (32.6 mg, 109 µmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature

for 21 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The aqueous layer was extracted with ether, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 50/1 to 1/2) afforded alcohol **46** (53.1 mg, 96.4 µmol, 88%) as a colorless amorphous material:  $R_f = 0.46$  (hexane/EtOAc = 2/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.51 (1H, dd, *J* = 15.0, 11.0 Hz), 6.42 (1H, s), 5.84 (1H, d, *J* = 11.0 Hz), 5.60 (1H, dd, *J* = 10.5, 5.5 Hz), 5.27 (1H, dd, *J* = 15.0, 9.0 Hz), 4.91 (1H, dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz), 3.87 (1H, t, *J* = 9.0 Hz), 3.63 (3H, s), 3.63-3.53 (1H, m), 3.39-3.30 (1H, m), 3.28 (3H, s), 2.68-2.60 (1H, m), 2.53-2.43 (1H, m), 2.30-2.22 (1H, m), 2.18-2.00 (2H, m), 1.98-1.88 (1H, m), 1.94 (3H, s), 1.82 (3H, s), 1.67-1.59 (1H, m), 1.06 (21H, s), 0.89 (3H, d, *J* = 7.0 Hz).



 $\beta$ -hydroxyketone 47: To a solution of oxalyl chloride (22 µL, 254 µmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.5 mL) at -78 °C was added dimethyl sulfoxide (28 µL, 382 µmol). After the reaction mixture was stirred at -78 °C for 30 min, a solution of alcohol 46 (35.0 mg, 63.5 µmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.25 mL) was added. The resultant mixture was stirred at -78 °C for 60 min, then triethylamine (106 µL, 762 µmol) was added. The reaction mixture was stirred at -78 °C for 15 min and at 0 °C for 15 min, then quenched with saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl. The aqueous layer was extracted with ether, the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure to afford crude aldehyde 5 which was used in the next reaction without further purification. To a solution of ketone 4 (46.8 mg, 127 μmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.3 mL) at -78 °C was added dichlorophenylborane (50 μL, 381 μmol) and diisopropylethylamine (82 µL, 476 µmol). After being stirred at -78 °C for 30 min and at 0 °C for 30 min, the resultant mixture was recooled to -78 °C. A solution of above crude aldehyde 5 in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.35 mL) was added to the reaction mixture. After being stirred at -78 °C for 3 h, the reaction mixture was quenched with pH 7.0 phosphate buffer. The aqueous layer was extracted with ether, the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous  $Na_2SO_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 50/1 to 5/1) afforded  $\beta$ -hydroxyalcohol **47** (25.0 mg, 27.2  $\mu$ mol, 43% over 2 steps) and **S10** (1.2 mg, 1.26  $\mu$ mol, 2% over 2 steps) as colorless amorphous materials.

**47**:  $R_f = 0.45$  (hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.50 (1H, dd, J = 15.0, 11.0 Hz), 6.43 (1H, s), 5.82 (1H, d, J = 11.0 Hz), 5.61 (1H, dd, J = 10.0, 6.0 Hz), 5.26(1H, dd, J = 15.0, 9.0 Hz), 5.03 (1H, d, J = 9.0 Hz), 4.83-4.77 (1H, m), 4.14-4.03 (1H, m), 3.86-3.74 (2H, m), 3.65-3.55 (1H, m), 3.62 (3H, s), 3.25 (3H, s), 2.89 (1H, dd, J = 15.5, 10.0 Hz), 2.78-2.70 (1H, m), 2.69-2.59 (1H, m), 2.53-2.39 (2H, m), 2.33-2.24 (1H, m), 2.20-2.10 (2H, m), 2.09-1.99 (1H, m), 1.99-1.85 (1H, m), 1.95 (3H, s), 1.81 (3H, s), 1.18 (3H, d, J = 6.5 Hz), 1.10-0.98 (21H, m), 0.93 (3H, d, J = 7.0 Hz); <sup>19</sup>F NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -78.74 (d, J = 7.0 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for C<sub>48</sub>H<sub>83</sub>F<sub>3</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>2</sub>Na [M+Na<sup>+</sup>] 939.5420, found: 939.5433.



**S10**:  $R_f = 0.37$  (hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.48 (1H, dd, J = 15.0, 11.0 Hz), 6.38 (1H, s), 5.80 (1H, d, J = 11.0 Hz), 5.57 (1H, t, J = 9.5 Hz), 5.21 (1H, dd, J = 15.0, 9.5 Hz), 4.93-4.87 (1H, m), 4.76-4.71 (1H, m), 4.11 (1H, dq, J = 7.0, 7.0 Hz), 3.93-3.87 (1H, m), 3.79 (1H, t, J = 9.0 Hz), 3.64-3.58 (1H, m), 3.59 (3H, s), 3.37-3.30 (1H, m), 3.27 (3H, s), 2.91 (1H, dd, J = 15.0, 10.0 Hz), 2.87 (1H, s), 2.67-2.58 (1H, m), 2.53-2.45 (2H, m), 2.35-2.26 (2H, m), 2.20-2.08 (2H, m), 2.04-1.82 (1H, m), 1.94 (3H, s), 1.80 (3H, s), 1.16 (3H, d, J = 6.5 Hz), 1.10-0.97 (24H, m); <sup>19</sup>F NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -78.64 (d, J = 7.5 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for C<sub>48</sub>H<sub>83</sub>F<sub>3</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>2</sub>Na [M+Na<sup>+</sup>] 939.5420, found: 939.5439.



hemiacetal 48: To a solution of alcohol 47 (38.9 mg, 42.5 μmol) in THF (4.3 mL) was added 18% HF·Py (42.9 μL, 425 μmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was poured into saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The aqueous layer was extracted with ether, the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 7/1 to 2/1) afforded hemiacetal 48 (33.0 mg, 42.5 μmol, quant.) as a white solid:  $R_f = 0.59$  (hexane/EtOAc = 1/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.53 (1H, dd, *J* = 15.0, 11.0 Hz), 6.40 (1H, s), 5.82 (1H, d, *J* = 11.0 Hz), 5.59 (1H, dd, *J* = 10.5, 5.0 Hz), 5.23 (1H, dd, *J* = 15.0, 9.5 Hz), 4.91 (1H, dd, *J* = 9.0, 1.0 Hz), 4.85 (1H, d, *J* = 3.5 Hz), 4.09-3.98 (2H, m), 3.89 (1H, t, *J* = 9.0 Hz), 3.75 (1H, ddd, *J* = 15.0, 11.0, 4.0 Hz), 3.61-3.54 (1H, m), 3.59 (3H, s), 3.26 (3H, s), 2.70-2.60 (1H, m), 2.52-2.41 (1H, m), 2.33 (1H, dd, *J* = 12.0, 4.5 Hz), 2.23-2.20 (3H, m), 2.00-1.90 (1H, m), 1.95 (3H, s), 1.84 (3H, s), 1.66-1.55 (1H, m), 1.11 (3H, d, *J* = 6.5 Hz), 1.09-1.03 (24H, m), 0.84 (3H, d, *J* = 7.0 Hz); <sup>19</sup>F NMR (470 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -73.36 (d, *J* = 6.0 Hz).



**desmethyl-24-F-Baf (3)**: To a solution of hemiacetal **48** (33.0 mg, 42.5  $\mu$ mol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.63 mL), MeCN (3.1 mL), H<sub>2</sub>O (0.79 mL) was added TsOH·H<sub>2</sub>O (123 mg, 650  $\mu$ mol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 3 h, TsOH·H<sub>2</sub>O (123 mg, 650  $\mu$ mol) was added. The resulting mixture was stirred for 3 h and quenched with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, the organic layer was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 3/1 to 1/2), then by HPLC (COSMOSIL 5SL-II

 $10 \times 250$  mm, eluent: hexane/EtOAc = 1/1, flow rate: 2.0 mL/min, t<sub>R</sub> = 19.6 min) to afford demethyl-24-F-Baf **3** (15.8 mg, 25.4  $\mu$ mol, 60% over 2 steps) as a white solid:  $[\alpha]_D^{23}$  +92.6 (c 0.0343, CHCl<sub>3</sub>);  $R_f = 0.27$  (hexane/EtOAc = 1/1); IR (film) 3413, 2918, 2850, 2363, 2339, 1641, 1631, 1219, 1102, 772 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.53 (1H, dd, J = 15.0, 11.0 Hz), 6.41 (1H, s), 6.13 (1H, d, J = 2.0 Hz), 5.82 (1H, d, J = 10.5 Hz), 5.57 (1H, dd, J = 10.0, 5.0 Hz), 5.24 (1H, dd, J = 15.0, 9.5 Hz), 4.91 (1H, dd, J = 9.0, 1.5 Hz), 4.83 (1H, dd, J = 4.0, 1.0 Hz), 4.10-3.99 (2H, m), 3.90 (1H, t, J = 9.0 Hz), 3.79-3.69 (1H, ddd, J = 10.0, 10.0, 5.0Hz), 3.60 (3H, s), 3.55-3.48 (1H, m), 3.27 (3H, s), 2.65 (1H, ddd, J = 9.0, 9.0, 3.0 Hz), 2.52-2.43 (1H, m), 2.34 (1H, dd, J = 12.0, 5.0 Hz), 2.20 (1H, ddq, J = 12.0, 6.5, 6.5 Hz), 2.15-2.08 (1H, m), 1.96 (3H, s), 1.96-1.91 (1H, m), 1.84 (3H, s), 1.84-1.82 (1H, m), 1.64-1.55 (1H, m), 1.26-1.23 (1H, m), 1.12 (3H, d, *J* = 5.5 Hz), 1.06 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.84 (3H, d, *J* = 7.0 Hz); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  167.20, 142.17, 140.96, 135.35, 133.39, 133.03, 131.62, 129.04, 125.48, 125.0 (q, J = 279 Hz), 100.66, 81.91, 76.09, 74.50, 71.95 (q, J = 30Hz,), 70.35, 69.59, 59.26, 55.96, 42.84, 41.09, 38.80, 38.24, 37.38, 36.62, 36.50, 16.34, 14.00, 11.92, 9.46, 6.97; <sup>19</sup>F NMR (470 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -73.36 (J = 7.0 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/zcalcd for  $C_{31}H_{47}F_3O_9Na$  [M+Na<sup>+</sup>] 643.3064, found: 643.3070.



silyl ether S11: To a solution of known hydroxylketone 52<sup>4)</sup> (778 mg, 1.88 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (19 mL) was added 2,6-lutidine (0.97 mL, 8.46 µmol) and TBSOTf (1.3 mL, 5.64 mmol) at -78 °C. After being stirred at -78 °C for 3 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 1/0 to 10/1) afforded silyl ether S11 (893 mg, 1.69 µmol, 90%) as a colorless oil: R<sub>f</sub> = 0.72 (hexane/EtOAc = 2/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.08-8.04 (2H, m), 7.60-7.55 (1H, m), 7.47-7.42 (2H, m), 7.23-7.19 (2H, m), 6.96-6.92 (2H, m), 5.45 (1H, q, *J* = 7.0 Hz, 4.37 (2H, s), 4.03 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.0 Hz), 3.80 (3H, s), 3.56 (1H, dd, *J* = 9.0, 6.0, Hz), 3.26-3.16 (2H, m),

2.10-2.02 (1H, m), 1.50 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.11 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, 0.98 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.82 (9H, s), 0.05 (3H, s), -0.07 (3H, s).



diol 53: To a solution of silyl ether S11 (893 mg, 1.69 µmol) in MeOH (8.5 mL) was added NaBH<sub>4</sub> (128 mg, 3.38 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (934 mg, 6.76 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 20 h, and then quenched with saturated aqueous pH 7.0 phosphate buffer. The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 5/1 to 1/1) afforded diol 53 (647 mg, 1.52 mmol, 90%) as a colorless oil:  $R_f = 0.30$  (hexane/EtOAc = 2/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.26-7.23 (2H, m), 6.89-6.85 (2H, m), 4.40 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.76 (1H, t, *J* = 4.5 Hz), 3.63 (1H, dt, *J* = 9.0, 3.0 Hz), 3.49 (1H, d, *J* = 1.0 Hz), 3.46 (1H, dd, *J* = 9.5, 6.5 Hz), 3.27 (1H, dd, *J* = 9.5, 6.5 Hz), 2.56 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz), 2.12-2.06 (1H, m), 1.79-1.72 (1H, m), 1.14 (3H, d, *J* = 6.5 Hz), 0.98 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.91 (9H, s), 0.82 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.12 (3H, s), 0.09 (3H, s).



**alcohol 54**: To a solution of diol **53** (647 mg, 1.52 mmol) in MeOH (24 mL) and pH 7.0 phosphate buffer (8.0 mL) was added NaIO<sub>4</sub> (1.95 g, 9.12 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The aqueous layer was extracted with ether, and the organic layer was washed with saturated aqueous Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was used without further purification. To a solution of above crude aldehyde in THF (8.0 mL) and MeOH (8.0 mL) was added NaBH<sub>4</sub> (115 mg, 3.04 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction

mixture was quenched with saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl. The aqueous layer was extracted with ether, and the organic layer was washed with saturated aqueous Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 20/1 to 5/1) afforded alcohol **54** (500 mg, 1.31 mmol, 86% over 2 steps) as a colorless oil:  $R_f = 0.37$  (hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.26-7.23 (2H, m), 6.89-6.86 (2H, m), 4.43 (1H, d, *J* = 11.5 Hz), 4.39 (1H d, *J* = 11.5 Hz), 3.81 (3H, s), 3.70 (1H, dd, *J* = 10.5, 5.0 Hz), 3.66 (1H, d, *J* = 4.0 Hz), 3.57 (1H, dd, *J* = 11.0, 6.0 Hz), 3.47 (1H, dd, *J* = 9.0, 6.0 Hz), 3.29 (1H, dd, *J* = 9.0, 7.0 Hz), 2.11-2.02 (1H, m), 1.91-1.82 (1H, m), 0.98 (1H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.97 (1H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.90 (9H, s), 0.11 (3H, s), 0.78 (3H, s).



tosylate S12: To a solution of alcohol 54 (500 mg, 1.30 mmol) in pyridine (6.5 mL) was added TsCl (744 mg, 3.90 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 3 h, the reaction mixture was quenched with H<sub>2</sub>O. The aqueous layer was extracted with ether, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 20/1 to 5/1) afforded tosylate S12 (691 mg, 1.29 µmol, 99%) as a colorless oil:  $R_f = 0.46$  (hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.79-7.75 (2H, m), 7.33-7.30 (2H, m), 7.23-7.20 (2H, m), 6.89-6.85 (2H, m), 4.39 (1H, d, *J* = 11.5 Hz), 4.34 (1H, d, *J* = 11.5 Hz), 4.18-4.09 (1H, m), 3.81 (3H, s), 3.81-3.76 (1H, m), 3.52 (1H, t, *J* = 4.5 Hz), 3.40 (1H, dd, *J* = 9.0, 5.5 Hz), 3.21 (1H, dd, *J* = 9.5, 6.5 Hz), 2.44 (3H, s), 2.06-1.98 (1H, m), 1.96-1.85 (1H, m), 0.90 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.88 (3H, d, *J* = 7.5 Hz), 0.79 (9H, s), -0.01 (3H, s), -0.04 (3H, s).



**alkyne S13**: To a solution of tosylate **S12** (275 mg, 0.511 mmol) in DMSO (2.6 mL) was added LiCCH·H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (236 mg, 2.56 µmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 2 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl. The aqueous layer was extracted with ether, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 50/1 to 7/1) afforded alkyne **S13** (129 mg, 0.330 µmol, 64%) as a colorless amorphous material:  $R_f = 0.67$  (hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.27-7.22 (2H, m), 6.89-6.85 (2H, m), 4.41 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.55-3.50 (2H, m), 3.25 (1H, dd, J = 9.0, 7.5 Hz), 2.30 (1H, dd, J = 4.5, 3.0 Hz), 2.12-2.06 (1H, m), 2.03 (1H, s), 1.95 (1H, t, J = 3.0 Hz), 1.91-1.80 (1H, m), 1.03 (3H, d, J = 7.0 Hz), 0.98 (3H, d, J = 7.0 Hz), 0.87 (9H, s), 0.06 (3H, s), 0.04 (3H, s).



**alcohol 50**: To a solution of alkyne **S13** (5.81 g, 14.9 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (250 mL) and pH7.0 phosphate buffer (50 mL) was added DDQ (11.8 g, 52.2 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. To the residue in THF (75 mL) and MeOH (75 mL) was added NaBH<sub>4</sub> (1.41 g, 37.3 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 30 min, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl. The aqueous layer was extracted with ether, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 20/1 to 3/1) afforded alcohol **50**<sup>5</sup> (3.80 g, 14.0 mmol, 94%) as a colorless oil. The : R<sub>f</sub> = 0.45 (hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.70-3.63 (2H, m), 3.60 (1H, dd, *J* = 11.0, 6.0 Hz), 2.31 (1H, ddd, *J* = 20.0, 5.5, 3.0 Hz), 2.14 (1H, ddd, *J* = 20.0, 10.5, 3.0 Hz), 1.98 (1H, t, *J* = 2.5 Hz), 1.96-1.92 (1H, m), 1.90-1.84 (1H, m), 1.05 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.03 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.92 (9H, s), 0.13 (3H, s), 0.12 (3H, s).

The spectral properties of alcohol **50** are identical with those of reported compound.<sup>5</sup>



**diene 61**: To a solution of iodoolefine **49** (564 mg, 1.34 mmol) and alkenylstannane **6** (967 mg, 1.34 mmol) in NMP (17 mL) was added LiCl (227 mg, 5.35 mmol), Ph<sub>3</sub>As (1.23 g, 4.01 mmol) and Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>·CHCl<sub>3</sub> (341 mg, 0.33 mmol) in NMP (29 mL). After being stirred at room temperature for 13 h, the reaction mixture was quenched with H<sub>2</sub>O. The aqueous layer was extracted with ether, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography containing 10% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (hexane/EtOAc = 5/1 to 1/2) afforded diene **61** (831 mg, 1.14 mmol, 85%) as a red amorphous material:  $R_f = 0.26$  (hexane/EtOAc = 2/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.46-7.40 (4H, m), 7.34-7.25 (6H, m), 7.23-7.18 (2H, m), 6.85-6.80 (2H, m), 6.63 (1H, s), 6.25 (1H, dd, *J* = 15.5, 10.5 Hz), 5.87 (1H, d, *J* = 11.0 Hz), 5.81 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 5.44 (1H, dd, *J* = 15.0, 9.0 Hz), 3.82-3.75 (1H, m), 3.79 (6H, s), 3.66 (3H, s), 3.41-3.35 (1H, m), 3.28-3.20 (1H, m), 3.20 (3H, s), 3.07-3.01 (1H, m), 2.80-2.69 (1H, m), 2.56 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 2.42-2.35 (1H, m), 2.00 (3H, s), 1.90-1.65 (2H, m), 1.72 (3H, s), 1.15 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.02 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.80 (3H, d, *J* = 6.5 Hz).



**lactone 63**: To a solution of diene **61** (831 mg, 1.14 mmol) in dioxane (38 mL) was added 1M KOH (17 mL, 17 mmol). After being stirred at 80 °C for 2 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl. The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and the organic layer was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was used in the next step without further purification. To a solution of crude seco acid **62** (25.6 mg) in toluene (2.8 mL) was added *i*-Pr<sub>2</sub>NEt (164  $\mu$ L, 0.954 mmol) and 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride (75  $\mu$ L, 0.477 mmol) at 0 °C. After being stirred at room
temperature for 3 h, the reaction mixture was diluted with toluene (28 mL). A solution of DMAP (76 mg, 0.620 mmol) in toluene (2.8 mL) was added and the resultant mixture was stirred for 9 h, then quenched with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The aqueous layer was extracted with ether, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 10/1 to 1/1) afforded lactone **63** (12.9 mg, 18.5 µmol, 51%) as a colorless amorphous material:  $R_f = 0.60$  (hexane/EtOAc = 2/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.48-7.44 (4H, m), 7.35-7.32 (2H, m), 7.31-7.15 (6H, m), 6.84-6.81 (2H, m), 6.60 (1H, s), 6.39 (1H, dd, *J* = 15.0, 11.0 Hz), 5.84 (1H, d, *J* = 11.0 Hz), 5.76 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 5.24 (1H, dd, *J* = 15.0, 7.0 Hz), 5.00 (1H, t, *J* = 5.5 Hz), 3.82-3.78 (1H, m), 3.78 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.40-3.37 (1H, m), 3.18 (1H, dd, *J* = 9.5, 5.5 Hz), 3.15 (3H, s), 3.1 (1H, dd, *J* = 9.5, 6.5 Hz), 2.53-2.45 (1H, m), 2.36 (1H, br), 2.21-2.13 (2H, m), 2.03-1.98 (1H, m), 1.95 (3H, d, *J* = 1.0 Hz), 1.92-1.83 (1H, m), 1.74 (3H, s), 1.07 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.05 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.98 (3H, d, *J* = 7.0 Hz).



**silyl ether 64c**: To a solution of lactone **63** (60.1 mg, 86.5 μmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.9 mL) was added 2,6-lutidine (113 μL, 973 μmol) and DEIPSOTf (94 μL, 389 μmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 20/1 to 3/1) afforded silyl ether **64c** (60.5 mg, 73.5 μmol, 85%) as a colorless amorphous material:  $R_f = 0.69$  (hexane/EtOAc = 2/1); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.49-7.44 (4H, m), 7.36-7.19 (8H, m), 6.86-6.81 (2H, m), 6.70 (1H, s), 6.44 (1H, ddd, J = 15.5, 11.0, 1.0 Hz), 5.95 (1H, d, J = 9.0 Hz), 5.90 (1H, d, J = 11.5 Hz), 5.40 (1H, dd, J = 15.5, 4.0 Hz), 5.26 (1H, dd, J = 8.5, 1.5 Hz), 3.07 (1H, dd, J = 9.5, 5.0 Hz), 2.61 (1H, dd, J = 14.5, 9.5 Hz), 2.45-2.36 (1H, m),

2.06-1.98 (1H, m), 1.93 (3H, s), 1.76-1.60 (2H, m), 1.54 (3H, s), 1.13-1.08 (22H, m), 0.77-0.65 (4H, m).



**alcohol 66c**: To a solution of silyl ether **64c** (60.5 mg, 73.5 µmol) in THF (1.3 mL) and MeOH (1.3 mL) was added PPTS (27.7 mg, 110 µmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 15 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The aqueous layer was extracted with ether, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 20/1 to 3/1) afforded alcohol **66c** (31.5 mg, 57.2 µmol, 78%) as a colorless amorphous material:  $R_f = 0.33$  (hexane/EtOAc = 2/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.67 (1H, d, *J* = 0.5 Hz), 6.47 (1H, dd, *J* = 15.5, 11.0 Hz), 5.92 (1H, d, *J* = 11.0 Hz), 5.88 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 1H, 5.39 (1H, dd, *J* = 15.5, 6.5 Hz), 5.10 (1H, dd, *J* = 4.5, 4.0 Hz), 3.95 (1H, t, *J* = 5.5 Hz), 3.67 (3H, s), 3.61 (1H, t, *J* = 3.0 Hz), 3.57-3.50 (1H, m), 3.40-3.33 (1H, m), 3.29 (3H, s), 3.04 (1H, br), 2.52-2.43 (2H, m), 2.18-2.10 (1H, m), 1.94 (3H, s), 1.79-1.72 (2H, ), 1.68 (3H, s), 1.10-0.99 (19H, m), 0.90 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.76-0.65 (4H, m).



**β-hydroxyketone 69**: To a solution of oxalyl chloride (29 μL, 328 μmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.65 mL) at -78 °C was added dimethyl sulfoxide (35 μL, 493 μmol). After the reaction mixture was stirred at -78 °C for 30 min, a solution of alcohol **66c** (18.1 mg, 32.8 μmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.25 mL) was added. The resultant mixture was stirred at -78 °C for 60 min, then triethylamine (137 μL, 987 μmol) was added. The reaction mixture was stirred at -78 °C for

15 min, then at 0 °C for 15 min, then quenched with saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl. The aqueous layer was extracted with ether, the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure to afford crude aldehyde **68** which was used in the next reaction without further purification. To a solution of ketone **4** (36.3 mg, 98.6 µmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.95 mL) at -78 °C was added dichlorophenylborane (51 µL, 394 µmol) and diisopropylethylamine (85 µL, 493 µmol). After being stirred at -78 °C for 30 min and at 0 °C for 30 min, the mixture was recooled to -78 °C. A solution of above crude aldehyde **68** in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.30 mL) was added to the reaction mixture. After being stirred at -78 °C for 3 h, the reaction mixture was quenched with pH 7.0 phosphate buffer. The aqueous layer was extracted with ether, the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 50/1 to 3/1) afforded β-hydroxyalcohol **69** (9.5 mg, 10.4 µmol, 32% over 2 steps) and **S14** (0.5 mg, 0.52 µmol, 2% over 2 steps) as colorless amorphous materials.

**69**:  $R_f = 0.33$  (hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.68 (1H, s), 6.46 (1H, dd, J = 15.0, 10.5 Hz), 5.91 (1H, d, J = 11.5 Hz), 5.89 (1H, d, J = 10.0 Hz), 5.39 (1H, dd, J = 15.5, 6.5 Hz), 5.23 (1H, dd, J = 4.5, 2.5 Hz), 4.79 (1H, dt, J = 9.5, 3.5 Hz), 4.08 (1H, quint, J = 6.5 Hz), 3.92 (1H, dd, J = 5.5, 5.5 Hz), 3.78 (1H, dd, J = 9.0, 2.5 Hz), 3.66 (3H, s), 3.61 (1H, t, J = 2.5 Hz), 3.27 (3H, s), 2.87 (1H, dd, J = 15.5, 9.5, Hz), 2.74 (1H, qd, J = 7.0, 2.5 Hz), 2.53-2.43 (2H, m), 2.40 (1H, dd, J = 15.5, 3.0 Hz), 2.33-2.25 (1H, m), 2.00 (1H, ddq, J = 9.0, 7.0, 2.0 Hz), 1.94 (3H, s), 1.80-1.73 (2H, m), 1.68 (3H, s), 1.17 (3H, d, J = 7.0 Hz), 1.11-0.98 (40H, m), 0.92 (3H, d, J = 7.0 Hz), 0.78-0.65 (4H, m); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  211.13, 165.71, 143.89, 141.19, 141.09, 133.42, 131.53, 130.80, 125.49, 124.71, 83.37, 80.87, 76.06, 75.23 (q, J = 30.0 Hz), 71.88, 70.54, 67.96, 60.05, 56.20, 48.92, 43.98, 41.50, 40.10, 38.70, 37.68, 35.82, 29.70, 27.39, 27.18, 25.60, 24.74, 21.47, 21.44, 18.35, 17.87, 17.79, 17.74, 13.64, 13.61, 13.52, 10.88, 8.17, 7.45, 7.35, 4.81, 4.28; <sup>19</sup>F NMR (470 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -78.71 (d, J = 7.0 Hz); HRMS (ESI-TOF) *m*/*z* calcd for C<sub>48</sub>H<sub>83</sub>F<sub>3</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>2</sub>Na [M+Na<sup>+</sup>] 939.5420, found: 939.5431.



**S14**:  $R_f = 0.23$  (hexane/EtOAc = 3/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.62 (1H, s), 6.45 (1H, dd, J = 15.0, 11.0 Hz), 5.89 (1H, d, J = 10.5 Hz), 5.82 (1H, d, J = 9.5 Hz), 5.32 (1H, dd, J = 15.0, 7.0 Hz), 4.93 (1H, dd, J = 5.0, 3.0 Hz), 4.89 (1H, dt, J = 10.5, 3.5 Hz), 4.11 (1H, quint, J = 7.0 Hz), 3.89-3.84 (2H, m), 3.64 (3H, s), 3.60 (1H, t, J = 3.0 Hz), 3.33 (1H, qt, J = 7.0, 4.0 Hz), 3.28 (3H, s), 2.87 (1H, dd, J = 15.5, 10.0 Hz), 2.74 (1H, d, J = 3.5 Hz), 2.55-2.47 (1H, m), 2.49 (1H, dd, J = 15.5, 3.0 Hz), 2.39 (1H, dd, J = 15.5, 9.5 Hz), 2.34-2.27 (1H, m), 2.06-1.97 (1H, m), 1.93 (3H, s), 1.81-1.75 (2H, m), 1.72 (3H, s), 1.17 (3H, d, J = 7.0 Hz), 1.10-0.98 (43H, m), 0.78-0.65 (4H, m); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 212.85, 164.90, 143.88, 141.33, 133.02, 131.87, 130.83, 128.80, 125.51, 124.61, 76.55, 74.82 (q, J = 31.0 Hz), 71.82, 70.49, 65.83, 59.91, 56.22, 47.91, 45.38, 41.19, 39.81, 38.49, 37.68, 35.84, 29.70, 27.23, 27.18, 24.51, 21.52, 21.44, 18.33, 18.02, 17.81, 17.76, 15.26, 13.63, 13.61, 10.34, 10.05, 7.45, 7.35, 4.77, 4.27; <sup>19</sup>F NMR (470 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -78.58 (d, J = 7.0 Hz).



hemiacetal **70**: To a solution of alcohol **69** (4.7 mg, 5.1 μmol) in THF (0.3 mL) was added 18% HF·Py (10.3 μL, 102 μmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was poured into saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The aqueous layer was extracted with ether, the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 7/1 to 2/1) afforded hemiacetal **70** (4.0 mg, 5.1 μmol, quant.) as a white solid:  $R_f = 0.50$  (hexane/EtOAc = 1/1); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.59 (1H, s), 6.46 (1H, dd, *J* = 15.0, 10.5 Hz), 6.14 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 5.89 (1H, d, *J* = 10.5 Hz), 5.79 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 5.30 (1H, dd, *J* = 15.0, 8.0 Hz), 5.04 (1H, dd, *J* = 6.5, 1.5 Hz), 4.87

 $(1H, d, J = 3.0 \text{ Hz}), 4.08-4.00 (2H, m), 3.93 (1H, d, J = 7.0 \text{ Hz}), 1H, 3.75 (1H, m), 3.61(1H, s), 3.26 (3H, s), 2.58-2.51 (1H, m), 2.41-2.31 (2H, m), 2.14-2.08 (1H, m), 1.94 (3H, s), 1.84-1.72 (2H, m), 1.76 (3H, s), 1.11 (3H, d, J = 7.0 \text{ Hz}), 1.09-0.98 (16H, m), 0.85 (1H, d, J = 7.0 \text{ Hz}), 0.77-0.66 (4H, m); <sup>19</sup>F NMR (470 MHz, CDCl<sub>3</sub>) <math>\delta$  -73.33 (d, J = 7.0 Hz).



24-F-Baf (2): To a solution of hemiacetal 70 (4.0 mg, 5.1 µmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (38 µL), MeCN (380 µL), H<sub>2</sub>O (95 µL) was added TsOH·H<sub>2</sub>O (14.6 mg, 76.8 µmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 4 h, TsOH·H<sub>2</sub>O (7.3 mg, 38.4 µmol) was added. The resulting mixture was stirred for 12 h and quenched with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, the organic layer was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 5/1 to 1/2), then by HPLC (COSMOSIL 5SL-II  $10 \times 250$  mm, eluent: hexane/EtOAc = 1/1, flow rate: 2.0 mL/min,  $t_R = 15.7$  min) to afford 24-F-Baf 2 (1.2 mg, 1.87 µmol, 36% over 2 steps) as a white solid:  $[\alpha]_D^{22}$  +10.3 (c 0.0318, CHCl<sub>3</sub>);  $R_f = 0.38$ (hexane/EtOAc = 1/1); IR (film) 3404, 2959, 2924, 2850, 1685, 1461, 1259, 1099, 799 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.63 (1H, s), 6.51 (1H, d, J = 15.0, 10.5 Hz), 6.17 (1H, d, J = 2.0 Hz), 5.81 (1H, d, J = 10.5 Hz), 5.75 (1H, d, J = 9.0 Hz), 5.15 (1H, dd, J = 15.5, 9.0 Hz), 4.94 (1H, dd, J = 9.0, 1.0 Hz), 4.87 (1H, d, J = 4.0 Hz), 4.09-4.02 (1H, m), 4.04 (1H, qd, J = 11.0, 6.5 Hz), 3.90 (1H, dd, J = 9.5, 9.5 Hz), 3.75 (1H, ddd, J = 11.0, 11.0, 5.0 Hz), 3.63 (3H, s), 3.33-3.26 (1H, m), 3.25 (3H, s), 2.56-2.49 (1H, m), 2.34 (1H, dd, J = 12.0, 5.0 Hz), 2.18-2.10 (2H, m), 2.00-1.79 (3H, m), 1.98 (3H, s), 1.94 (3H, s), 1.65-1.55 (1H, m), 1.31-1.20 (1H, m), 1.12 (3H, d, *J* = 6.5 Hz), 1.07 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.06 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 0.93 (3H, d, J = 6.0 Hz), 0.83 (3H, d, J = 7.0 Hz); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  167.36, 143.26, 142.55, 141.40, 133.22, 133.18, 133.12, 127.06, 125.26, 100.63, 81.94, 81.20, 76.53, 71.92 (q, J = 30.0 Hz), 70.39, 69.69, 59.62, 55.51, 42.86, 41.30, 41.02, 40.17, 38.85, 37.09, 36.69, 21.69, 20.18, 17.19, 14.02, 11.94, 9.56, 7.00; <sup>19</sup>F NMR (470 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -73.36 (d, J = 7.0 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for C<sub>33</sub>H<sub>51</sub>F<sub>3</sub>O<sub>9</sub>Na [M+Na<sup>+</sup>] 671.3377, found: 671.3385.

# **Biological evaluation**

## The effect on Acridine orange stain of 3Y1 cells

The effect of 24-F-Baf on the acidification of intracellular acidic organelle by V-ATPase in rat 3Y1 fibroblasts was examined<sup>6)</sup>. 3Y1 cells were treated with 100 nM Baf or 24-F-Baf for 2 hours, and stained with 5  $\mu$ M acridine orange for 15 min. In contrast to the case of DMSO (control), the treatment with 100 nM of 24-F-Baf caused complete disappearance of red fluorescence of acridine orange stain as well as that of 100 nM Baf A.

# Yeast V-ATPase inhibition

V-ATPase inhibition activity of 24-F-Baf (**2**) was assayed against V-ATPases obtained from purified vacuole membrane of budding yeast<sup>7)</sup>. 135  $\mu$ L of the reaction mixture contained 5  $\mu$ g of vacuolar membrane vesicles, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NH<sub>4</sub>Cl, 5 mM NaN<sub>3</sub>, 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and 25 mM Mes-Tris (pH 6.9) was incubated with or without inhibitors as DMSO solution at the indicated concentration for 10 min on ice. Then, the reaction was started by adding 15  $\mu$ L of 5 mM of Na<sub>2</sub>ATP. Activity assays were run for 60 min at 37 °C. 150  $\mu$ L of 0.6 M perchloric acid was added to stop the reaction and the liberated inorganic phosphate was measured by the method of Ohnishi<sup>8)</sup>.

#### Growth inhibition assay against leukemia cells

Serial dilutions (0.001-10  $\mu$ M) of inhibitors were incubated with leukemia cell lines HL-60 and K562 at 37 °C in 5% CO2/95% air with a CO2 incubator. After incubated for 48 h, proliferation was assessed using the Cell Counting Kit-8 (Dojindo).

# Ab initio calculation

X-ray crystal structure of bafilomycin<sup>10)</sup> was used as the starting structure for conformational analysis of 24-F-Baf and desmethyl-24-F-Baf. The most stable structure was built by the molecular mechanics simulation using a 7000 steps of Monte Carlo conformation search and TNCG energy minimization with MMFFs (MacroModel 9.3). One dihedral angle restraint from  ${}^{3}J_{H,H}$  coupling constants and two distance restraints from hydrogen bond were included into the simulation for 24-F-Baf. Four dihedral angles restraint and four distance restraints

from NOESY spectrum were included for desmethyl-24-F-Baf. The resulting minimum structure was submitted to further *ab initio* geometry optimization by DFT B3LYP with 6-31G\*\* basis set without any restriction to provide the fully optimized conformation.

- 1) Rauhala, V.; Nevalainen, M.; Koskinen, A. M. P. Tetrahedron 2004, 60, 9199.
- Codesido, E. M.; Cid, M. M.; Castedo, L.; Mouriño, A.; Granja, J. R. *Tetrahedron Lett.* 2000, 41, 5861-5864.
- 3) Paterson, I.; McLeod, M. D. Tetrahedron Lett. 1997, 38, 4183.
- 4) Paterson, I.; Blakey, S. B.; Cowden, C. J Tetrahedron Lett. 2002, 43, 6005.
- cheidt, K. A.; Bannister, T. D.; Tasaka, A.; Wendt, M. D.; Savall, B. M.; Fegley, G. J.; Roush, W. R. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 6981-6990.
- Kazami, S.; Muroi, M.; Kawatani, M.; Kubota, T.; Usui, T.; Kobayashi, J.; Osada, H. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2006, 70, 1364-1370.
- 7) Uchida, E.; Ohsumi, Y.; Anraku, Y. J. Biol. Chem., 1985, 260, 1090.
- 8) Ohnishi, T.; Gall, R. S.; Mayer, M. L. Anal. Biochem., 1975, 69, 261.
- Balan, D.; Burns, C. J.; Fisk, N. G.; Hügel, H.; Huang, D. C. S.; Segal, D.; White, C.; Wagler, J.; Rizzacasa, M. A. Org. Biomol. Chem. 2012, 10, 8147.
- Baker, G. H.; Brown, P. J.; Dorgan, R. J. J.; Everett, J. R.; Ley, S. V.; Slawin A. M. Z.;
  Williams, D. J. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 5565-5568.
























































































































本研究を行うにあたって、合成した化合物の生物活性を評価して頂きました筑波大学生命環境科学研究科臼井健郎准教授に深く感謝致します。

本研究は大阪大学大学院理学研究科化学専攻生体分子化学研究室において行われ たものであり、御篤なる御指導、御鞭撻下さいました村田道雄教授に深く感謝致しま す。

本論文を作成するにあたり、副査として多くの御助言を頂きました本学理学研究科化学専攻深瀬浩一教授、本学産業科学研究所加藤信雄教授に深く感謝致します。

研究を進めるにあたり、有意義な御助言を頂き、御指導および御鞭撻下さいました 松森信明准教授に深く感謝致します。

研究を行うにあたり、適切かつ丁寧な御助言またお心配りを頂きました花島慎弥講 師に深く感謝致します。

直接の実験指導から研究の進め方など、細やかな御指導、御討論頂きました土川博 史助教に深く感謝致します。

合成した化合物の生物活性評価、特に細胞増殖抑制活性試験について御指導頂き、 また研究生活においても有意義な御助言を頂きました ERATO 村田脂質活性構造プロ ジェクト佐藤文憲研究推進主任に深く感謝致します。

日々の研究を進めるにあたり多大なる御指導、御助言いただきました山口敏幸博士、 中川泰男修士、脇坂智広修士、野村拓人修士、林翔修士、安川佳史学士、林達学士に 深く感謝致します。

有意義な研究生活を支えて下さいました本研究室の皆様に深く感謝致します。

最後に、経済的、精神的に支えていただきました家族に深く感謝致します。

## 付録

## 公表論文

Design and Synthesis of 24-Fluorinated Bafilomycin analogue as an NMR Probe with Potent Inhibitory Activity to Vacuolar-Type ATPase. Shibata, H.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Murata, M.; Usui, T. *Chem. Lett. in press.* 

## 参考論文

Second-generation synthesis of endogenous sperm-activating and attracting factor (SAAF) isolated from the ascidian *Ciona intestinalis*. Oishi, T.; Ootou, K.; Shibata, H.; Murata, M. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2600-2602.

A Novel Sperm-Activating and Attracting Factor from the Ascidian Ascidia sydneiensis. Matsumori, N.; Hiradate, Y.; Shibata, H.; Oishi, T.; Shimma, S.; Toyoda, M.; Hayasi, F.; Yoshida, M.; Murata, M.; Morisawa, M. Org. Lett. **2013**, *15*, 294-297.

## Design and Synthesis of 24-Fluorinated Bafilomycin Analogue as an NMR Probe with Potent Inhibitory Activity to Vacuolar-Type ATPase

Hajime Shibata<sup>1,2</sup>, Hiroshi Tsuchikawa<sup>1</sup>, Nobuaki Matsumori<sup>1</sup>, Michio Murata<sup>1,2\*</sup> and Takeo Usui<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Science, Osaka University, 1-1 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-0043

<sup>2</sup>ERATO, Lipid Active Structure Project, Japan Science and Technology Agency, 1-1 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-0043

<sup>3</sup>Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572

E-mail: <murata@chem.sci.osaka-u.ac.jp

A fluorine-labeled bafilomycin analogue was designed and convergently synthesized from three segments via Stille coupling, macrolactonization and diastereoselective aldol reaction. The V-ATPase inhibitory activity of the analogue was comparable to that of the natural product, indicating its utility as a potential molecular probe for investigating the

inhibition mechanism of bafilomycin by NMR.

Vacuolar-type ATPase (V-ATPase) is a ubiquitous proton pump that occurs in the endomembrane systems of all eukaryotic cells and in the plasma membranes of diverse animal cells.<sup>1</sup> This protein family has various functions including the regulation of intracellular or intraorganellar pH and the facilitation of transport processes across the membrane. In recent years, it has become more evident that the malfunction of V-ATPase is correlated with an increasing number of age-related diseases such as osteoporosis, renal tubular acidosis and cancer. Therefore, the inhibitors of V-ATPase play a pivotal role in understanding the molecular pathology of these diseases and in developing their moleculartargeting drugs. Since bafilomycin  $A_1$  (Baf, 1) (Figure 1) was first isolated in 1983 from Streptomyces griseus sp. sulphurus.<sup>2</sup> the antibiotic has long been regarded as a representative V-ATPase inhibitor.<sup>3</sup> The potent and specific activity of Baf has accelerated mechanism-of-action studies, resulting in the elucidation of its putative binding site to be the transmembrane V<sub>o</sub> domain of V-ATPase.<sup>4</sup> However, the precise location of the binding site remains unclear. The largest problem lies in the structural analysis of such a complicated membrane-bound system. We aimed to solve this problem using solid-state NMR techniques, especially REDOR<sup>5</sup> known as a powerful tool for interatomic distance measurements. For solid-state NMR measurements, labeled compounds with NMR-sensitive nucleus are essential; among several elements and isotopes, <sup>19</sup>F is often regarded as the most appropriate nucleus, despite its higher perturbations in biology, because of its characteristic properties such as a nuclear spin of 1/2, high gyromagnetic ratio, and low background signals in biological samples.<sup>6</sup> We have demonstrated that REDOR provides important evidence for elucidating the structure of channel complex of <sup>19</sup>F-labeled amphotericin B in lipid bilayers.<sup>7</sup> In this study we designed and synthesized a novel <sup>19</sup>F-labeled Baf analogue that had potent inhibitory activity to V-ATPase and could be used for



investigating the molecular interactions between Baf and the protein.

Figure 1. Structure of bafilomycin and its fluorinated analogue

As a target molecule, 24,24-didesmethyl-24- $F_3$ -Baf (24- $F_3$ -Baf, 2), where the isopropyl unit of 1 was replaced by a trifluoromethyl group, was designed in consideration of the following points. (i) To minimize perturbations on bioactivity brought by fluorine substitution, the tetrahydropyran (THP) portion was selected based upon previous structure-activity relationship studies.<sup>8</sup> (ii) Fluorine substitution for hydroxy groups in the THP ring was avoided because the destabilization of products was expected. (iii) A CF<sub>3</sub> group would be facile to be introduced and equivalently replace the *i*-Pr group in terms of the bulkiness.<sup>9</sup>

The efficient synthesis of **2** was planned by using the diastereoselective aldol reaction of a novel CF<sub>3</sub>-labeled C18-C24 segment **3** and the known C1-C17 macrocyclic core,<sup>10b</sup> which could be constructed via Stille coupling and macrolactonization from C1-C11 segment **4** and C12-C17 segment **5** by following the previous synthetic studies of **1**.<sup>10</sup>

Synthesis of **3** commenced with PMB protection of the known Wienreb amide **6** prepared from 1,3-propanediol in 4 steps,<sup>11</sup> followed by DIBAL reduction to afford **7** (Scheme 1). Next, diastereoselective trifluoromethylation was attempted by the exposure of the aldehyde **7** with TMSCF<sub>3</sub> in the presence of TBAF, which resulted in formation of undesired 23*R* epimer **8** as a major product. Since the chelation-controlled conditions using the  $\beta$ -hydroxy group of **7** was not successful, we attempted to invert the C23 configuration of **8**. After several trials,<sup>12</sup> Dess-Martin oxidation of **8** followed by



treatment with L-Selectride was found to give the desired epimer **9** preferentially in 4.2:1 ratio.<sup>13</sup>

Scheme 1. Synthesis of the C18-C24 segment **3**. Reagents and conditions: a) PMBOCNHCCl<sub>3</sub>, Sc(OTf)<sub>3</sub>, toluene, rt, 70%; b) DIBAL, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C, 80%; c) TMSCF<sub>3</sub>, TBAF, THF, rt, 49% for **8**, 27% for **9**; d) Dess-Martin periodinane, NaHCO<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 92%; e) L-Selectride, THF, -78 °C, 68% for **9**, 16% for **8**; f) DDQ, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, rt, then AcOH, THF, 40 °C, 79%; g) (*t*-Bu)<sub>2</sub>Si(OTf)<sub>2</sub>, 2,6-lutidine, DMF, rt, 89%; h) Pd/C, H<sub>2</sub>, EtOAc, rt, 98%; i) Dess-Martin Periodinane, NaHCO<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 94%; j) EtMgBr, THF, rt, 93%; k) Dess-Martin Periodinane, NaHCO<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 94%; j) EtMgPr, THF, rt, 90%.

After removal of the PMB group, the resulting diol was protected as a cyclic silyl ether to furnish **10**. Hydrogenolysis of the benzyl group followed by Dess-Martin oxidation afforded an aldehyde, which was then treated with Grignard reagent and the producing alcohol was oxidized to give **3** in

80% yield for 4 steps.

Next, preparation of the C1-C11 segment 4 was carried out via carbon elongations from the known hydroxyketone  $11^{14}$  as shown in scheme 2. Enantiopure alcohol 11 was silvlated with TBSOTf and 2,6-lutidine, and the reduction of 9-ketone followed by one-pot treatment with K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> furnished the diol. Then oxidative cleavage and NaBH<sub>4</sub> reduction resulted in the formation of 12. Then, the primary alcohol 12 was converted to alkyne  $13^{15}$  via tosylation, addition of lithium acetylide and removal of the PMB group. Then the resultant alcohol 13 was converted to 4, chiefly following Marshall's report;<sup>10f,16</sup> after three carbon elongation of the allylic alcohol moiety in 3 steps, the formation of the vinyl iodide was performed under the Negishi's conditions<sup>17</sup> to produce 14. The TEMPO oxidation of the allylic alcohol to aldehyde and the subsequent Horner-Wadsworth-Emmons reaction proceeded in a Z-selective manner, which was followed by removal of the TBS group to afford the C1-C11 segment 4 successfully.

Next, the coupling reaction between **4** and separately prepared C12-C17 segment **5**<sup>18</sup> and construction of the macrocyclic structure were performed following the previous protocol.<sup>10</sup> The Stille coupling of segments **4** and **5** under the conditions reported by Marshall *et al.*<sup>10f</sup> efficiently gave the *E*,*E* diene product in 80% yield. Then, saponification of methyl ester<sup>10b</sup> afforded the corresponding seco acid and the following macrolactonization was examined under Yamaguchi conditions<sup>10e,19</sup> to furnish the desired macrolactone **15** in moderate yield.

Since macrolactone **15** was successfully obtained, connection with **3** by diastereoselective aldol reaction established by Evans *et al.*<sup>10a</sup> was next attempted. First, the secondary alcohol of **15** was protected as a diethylisopropylsilyl ether, which was necessary for the following reactions.<sup>10b</sup> The deprotection of the primary



Scheme 2. Synthesis of fluorinated bafilomycin derivative **2**. Reagents and conditions: a) TBSOTf, 2,6-lutidine, -78 °C; b) NaBH<sub>4</sub>, THF, MeOH, rt, then K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, rt, 79% (2 steps) c) NaIO<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, pH 7.0 buffer, rt; d) NaBH<sub>4</sub>, THF, MeOH, rt, 91% (2 steps); e) TsCl, Py, rt, 99%; f) LiCCH·H<sub>2</sub>NNH<sub>2</sub>, DMSO, rt, 64%; g) DDQ, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, pH 7.0 buffer, 94%, h) (COCl)<sub>2</sub>, DMSO, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C; i) Ph<sub>3</sub>P=C(Me)CO<sub>2</sub>Et, toluene, 100 °C; j) DIBAL, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C, 83% (3 steps); k) Cp<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub>, AlMe<sub>3</sub>, ClCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl, 60 °C then I<sub>2</sub>, THF, -30 °C, 66%; l) TEMPO, TBACl, NCS, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, pH 8.6 buffer, rt, 88%; m) (*i*-PrO)<sub>2</sub>P(O)CH(OMe)CO<sub>2</sub>Me, KHMDS, 18-crown-6 ether, THF, rt, 49%; n) TBAF, THF, rt, 84%; o) Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>·CHCl<sub>3</sub>, Ph<sub>3</sub>As, LiCl, NMP, rt, 85%; p) KOH, dioxane, 80 °C; q) 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride, *i*-Pr<sub>2</sub>NEt, toluene, rt, then diluted with toluene, DMAP, rt, 51% (2 steps); r) DEIPSOTf, 2,6-lutidine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C, 85%; s) PPTS, THF, MeOH, rt, 78%; t) (COCl)<sub>2</sub>, DMSO, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C; u) PhBCl<sub>2</sub>, *i*-Pr<sub>2</sub>NEt, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C, 32% (2 steps), v) 18% HF·Py, THF, rt; w) TsOH·H<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeCN, H<sub>2</sub>O, rt, then HPLC purification, 36% (2 steps).
alcohol with PPTS followed by Swern oxidation provided **16**, which was treated with **3** under the reported conditions.<sup>10a,10b</sup> As a result, the diastereoselective aldol reaction proceeded smoothly to afford the desired  $\beta$ -hydroxyketone **17** in 32 % yield for 2 steps with 20:1 diastereomer ratio.<sup>20</sup> This result clearly revealed that the CF<sub>3</sub> moiety had no adverse effect on the high stereoselectivity reported in the syntheses of **1**.<sup>10a,10b</sup> Finally, stepwise removal of silyl groups was achieved using HF·Py, followed by TsOH·H<sub>2</sub>O, to afford 24-F-Baf **2** in 36% yield after HPLC purification.

The V-ATPase inhibitory activity of 24-F-Baf 2 was evaluated by two methods (See Supporting Information for details).<sup>21,22</sup> First, the effect on the acidification of intracellular acidic organelles by V-ATPase in rat 3Y1 fibroblasts was examined. Treatment with 100 nM of 2 caused the complete disappearance of red fluorescence in acridine orange staining, indicating that 2 strongly inhibited V-ATPase in the cells. Next, to evaluate the inhibition of V-ATPase directly and quantitatively, we tested the effect of 2 on V-ATPases obtained from the purified vacuole membrane of budding yeast by measuring the liberated inorganic phosphate from ATP. The V-ATPase activity was inhibited by 2 in a dose-dependent manner and its IC50 value (2.5 nM) was comparable with that of natural bafilomycin 1 (2.3 nM). These results demonstrated that our rational design led to the preparation of the first fluorine-labeled analogue of bafilomycin with potent ATPase inhibitory activity.

In summary, the fluorine-labeled Baf analogue (24-F-Baf, **2**) was properly designed and convergently synthesized from three key segments. 24-F-Baf (**2**) was shown to possess potent V-ATPase inhibition activity comparable with that of **1** and expected to be a potential molecular probe for elucidating the inhibition mechanism of bafilomycin using solid-state NMR and other spectroscopic techniques.

Acknowledgments: We thank Dr. N. Inazumi (Osaka University) for his help in NMR measurements. This work was supported in part by Grants for Excellent Graduate Schools, MEXT, Japan. H.S. expresses his special thanks for the supports from Global COE Programs of Osaka University.

References and Notes

- a) M. Forgac, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 917. b)
   B. Ma, Y. Xiang, L. An, *Cell. Signal.* **2011**, *23*, 1244.
- a) G. Werner, H. Hagenmaier, K. Albert, H. Kohlshorn, H. Drautz, *Tetrahedron Lett.* 1983, 24, 5193. b) G. Werner, H. Hagenmaier, H. Drautz, A. Baumgartner, H. Zähner, *J. Antibiot.* 1984, 37, 110.
- 3 B. J. Bowman, A. Siebers, K. Altendorf, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 7972.
- a) M. Huss, G. Ingenhorst, S. König, M. Gaßel, S. Dröse, A. Zeeck, K. Altendorf, H. Wieczorek, J. Biol. Chem. 2002, 277, 40544. b) B. J. Bowman, M. E. McCall, R. Baertsch, E. J. Bowman, J. Biol. Chem. 2006, 281, 31885.
- 5 Gullion, T.; Schaefer, J. J. Magn. Reson. 1989, 81, 196.
- a) A. Watts, Nat. Rev. Drug. Discovery 2005, 4, 555. b)
  A. S. Ulrich, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 2005, 46, 1. c) J. X. Yu, V. D. Kodibagkar, W. Cui, R. P. Mason, Current Med. Chem. 2005, 12, 819. d) C. Dalvit, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 2007, 51, 243.

- 7 a) Y. Umegawa, Y. Nakagawa, K. Tahara, H. Tsuchikawa, N. Matsumori, T. Oishi, M. Murata, *Biochemistry* 2012, 51, 83. b) Y. Umegawa, N. Matsumori, T. Oishi, M. Murata, *Biochemistry* 2008, 47, 13463.
- a) S. Dröse, K. U. Bindseil, E. J. Bowman, A. Siebers, A. Zeeck, K. Altendorf, *Biochemistry* 1993, *32*, 3902. b) S. Gagliardi, P. A. Gatti, P. Belflore, A. Zocchetti, G. D. Clarke, C. Farina, *J. Med. Chem.* 1998, *41*, 1883.
- a) C. Wolf, W. A. König, C. Roussel, *Liebigs Ann.* 1995, 781. b) F. Leroux, *Chem. Bio. Chem.* 2004, *5*, 644.
- a) D. A. Evans, M. A. Calter, *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 6871. b) K. Toshima, T. Jyojima, H. Yamaguchi, Y. Noguchi, T. Toshida, H. Murase, M. Nakata, S. Matsumura, J. Org. Chem. 1997, 62, 3271. c) K. A. Scheidt, T. D. Bannister, A. Tasaka, M. D. Wendt, B. M. Savall, G. J. Fegley, W. R. Roush, J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 6981. d) S. Hanessian, J. Ma, W. J. Wang, J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 10200. e) F. Kleinbeck, G. J. Fettes, L. D. Fader, E. M. Carreira, Chem. Eur. J. 2012, 18, 3598. f) J. A. Marshall, N. D. Adams, J. Org. Chem. 2002, 67, 733. g) E. Quéron, R. Lett, Tetahedron Lett. 2004, 45, 4539. h) J. S. Yadav, B. Reddy, G. Sabitha, Tetrahedron 2008, 64, 1971. and references therein.
- 11 V. Rauhala, M. Nevalainen, A. M. P. Koskinen, *Tetrahedron* 2004, 60, 9199.
- 12 Inversion of the secondary alcohol of **8** by Mitsunobu condition did not proceed due to the large steric hinderance. 1,3-*Anti*-selective reductions of **18** derived from **8** led to the low diastereoselectivity or the epimerization at the C22 position bacause of the undesired chelation of a  $CF_3$  group to the reagent and/or its high electron-withdrawing property.



- 13 The C23 configuration of **9** was determined by the NOE experiments of its benzylideneacetal derivative. See Supporting Information for details.
- 14 I. Paterson, S. B. Blakey, C. J. Cowden, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6005.
- 15 Another preparation of the alcohol **13** was reported. See reference 10c, 10f
- Roush and co-workers have also reported the synthesis of C1-C11 segment 4 from alkyne 13 via allylic alcohol 14. See reference 10c
- 17 E. Negishi, D. E. Van Horn, T. Yoshida, J. Am. Chem. Soc. **1985**, 107, 6639.
- 18 K. Toshima, T. Jyojima, N. Miyamoto, M. Katohno, M. Nakata, S. Matsumura, J. Org. Chem. 2001, 66, 1708.
- 19 J. Inanaga, K. Hirata, H. Saeki, T. Katsuki, M. Yamaguchi, *Chem. Bull. Jpn.* **1979**, *52*, 1989.
- 20 The stereochemistry of the major product **17** was determined by analogy with the known derivatives in ref 8b, 10b, See Supporting Information for details.
- S. Kazami, M. Muroi, M. Kawatani, T. Kubota, T. Usui, J. Kobayashi, H. Osada, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2006, 70, 1364.
- 22 Supporting Information is available electronically on the CSJ-Journal Web site, http://www.csj. jp/journals/chem-lett/index.heml.