



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
参考文献	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
参考文献	77
第3章 結論	79
実験の部	80
スペクトルデータ	109
謝辞	169
付録	170

略語表

24-F-Baf	24,24-didesmethyl-24-F ₃ -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
Cp	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-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	<i>N,N</i> -dimethylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -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 coherence
HMQC	heteronuclear quantum coherence
HPLC	high performance liquid chromatography
<i>i</i> -	iso
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration
IR	infrared
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	α -methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetic acid
<i>n</i> -	normal
NCS	<i>N</i> -chlorosuccinimid
NHMDS	sodium hexamethyldisilazide
NMO	<i>N</i> -methylmorpholine <i>N</i> -oxide
NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidone
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear Overhauser effect
NOESY	nuclear Overhauser effect spectroscopy

<i>o</i> -	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
Py	pyridine
R	hydrocarbon group
REDOR	rotational echo double resonance
quant.	quantitative
rt	room temperature
<i>t</i> -	tertiary
TBACl	tetrabutylammonium chloride
TBAF	tetrabutylammonium fluoride
TBAI	tetrabutylammonium iodide
TBDPS	<i>t</i> -butyldiphenylsilyl
TBS	<i>t</i> -butyldimethylsilyl
TEMPO	2,2,6,6,-tetramethylpiperidine 1-oxyl
TES	triethylsilyl
Tf	trifluoromethanesulfonyl
THF	tetrahydrofuran
TIPS	triisopropylsilyl
TLC	thin layer chromatography
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)-2H-tetrazolium

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¹⁾、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^{2,3,4,5)}。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^{6,7,8,9)}。

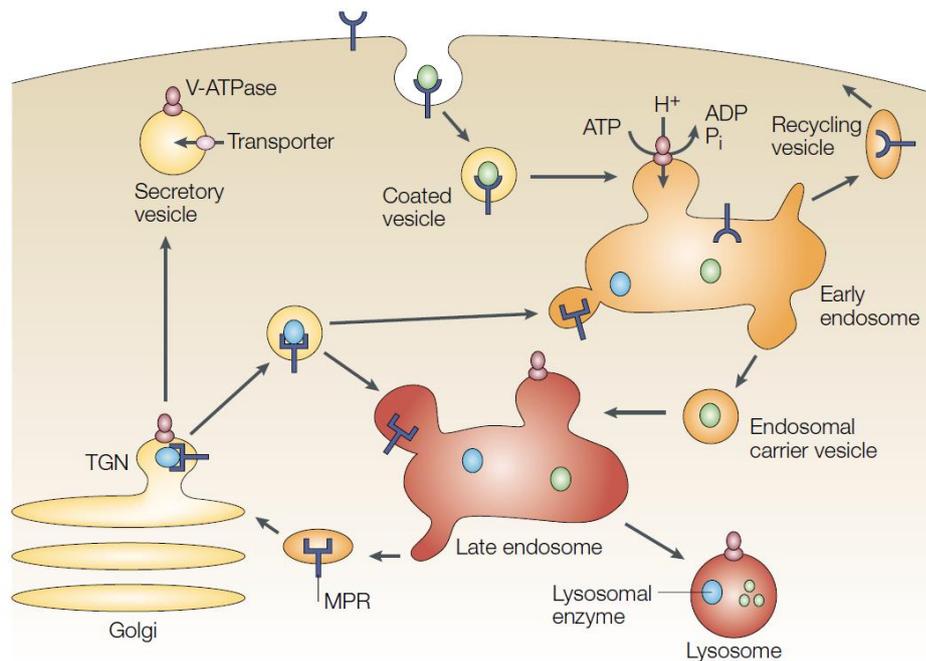


図 1-1 細胞小器官の内膜系に発現する V-ATPase

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, 94-113.³
Copyright © (2002) Nature Publishing Group.

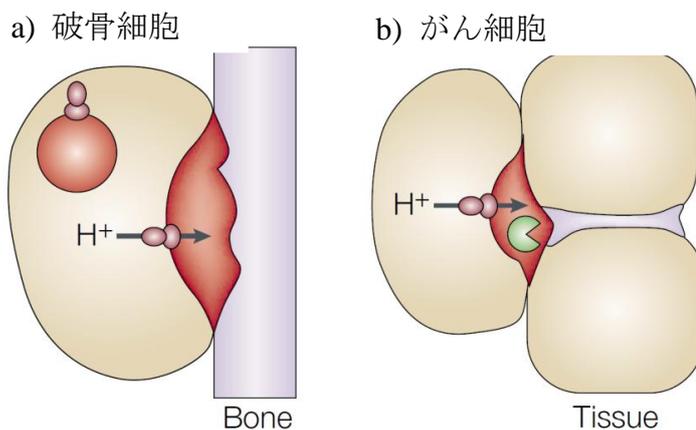


図 1-2 細胞膜に発現する V-ATPase

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, 94-113.³
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^{10,11,12,13)}。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 V₁ と、プロトンチャネルを形成する膜貫通部分 V_o に大別される (図 1-3、表 1-1)。V₁ 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_o 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。

V₁ 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_o 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_o 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^{14,15)}。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 V₁ 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)¹⁶⁾。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。

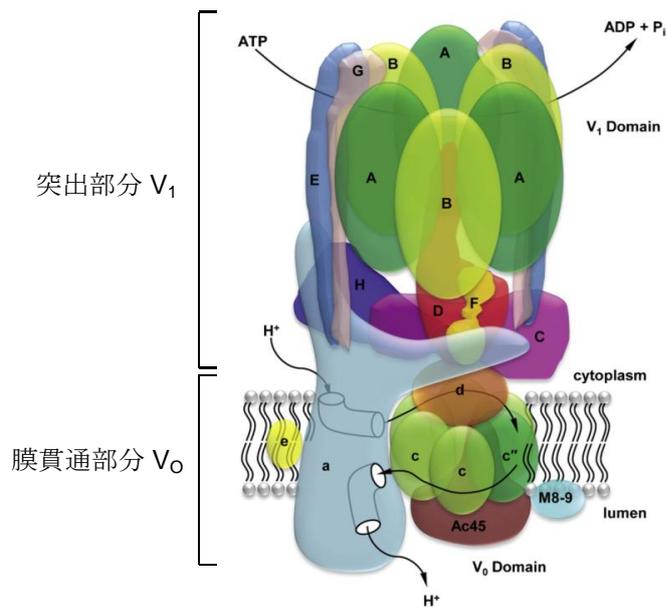


図 1-3 V-ATPase のモデル図

Reprinted with permission from *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2012**, *44*, 1422-1435.¹³
Copyright © (2012) Elsevier.

表 1-1 V-ATPase を構成するサブユニットとその機能⁴⁾

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
V₁ドメイン			
A	70		ATP の加水分解部位、固定子
B	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
C	40	C1(普遍的) C2a,b(肺、腎臓、精巣上体)	固定子、アクチン結合部位
D	34		回転子
E	33	E1(精巣) E2(普遍的)	固定子、RAVE ^a 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 ^a 結合部位
H	50		固定子、NEF ^b 結合部位
V₀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
e	9		不明
c	17		プロトン輸送、回転子
c'	17	哺乳類に存在せず	プロトン輸送、回転子
c''	21		プロトン輸送、回転子

^a RAVE: regulator of the ATPase of vacuolar and endosomal membranes

^b NEF: negative replication factor

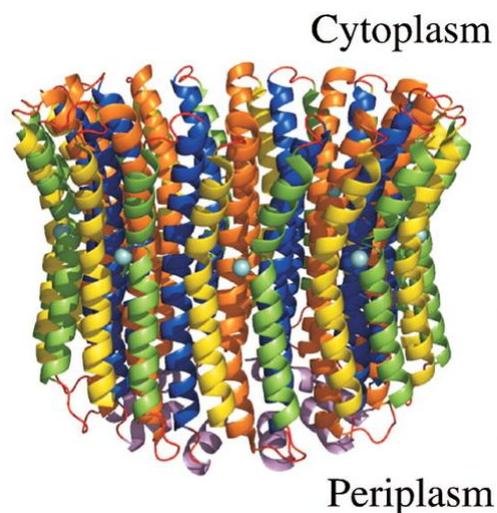


図 1-4 腸内連鎖球菌 *Enterococcus hirae* のナトリウムイオン輸送性 V 型 ATP アーゼの proteolipid ring の結晶構造

Reprinted with permission from *Science*, **2005**, 308, 654-659.¹⁶

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イド膜等に存在する F-ATPase がある (図 1-5)¹⁷⁾。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 F₁ 部分と膜を介したイオン透過の働きを担う F_o 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。

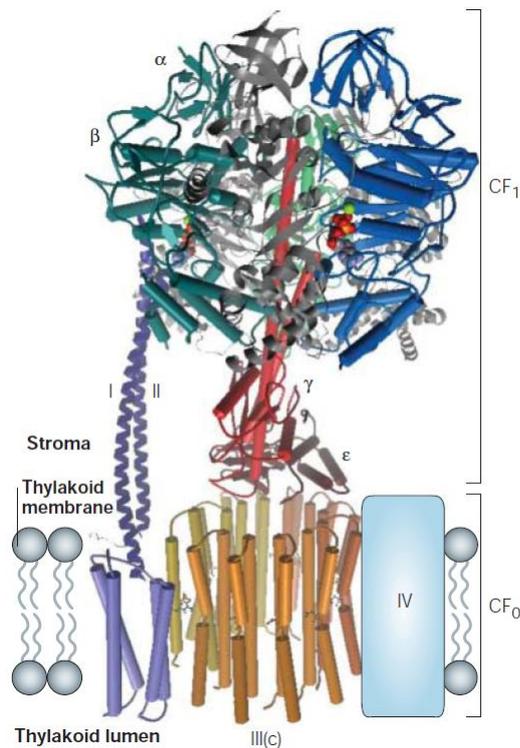


図 1-5 F-ATPase の構造

Reprinted with permission from *Nat. Rev.* **2004**, 5, 1-12.¹⁷
 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)¹⁸⁾。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¹⁹⁾。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。

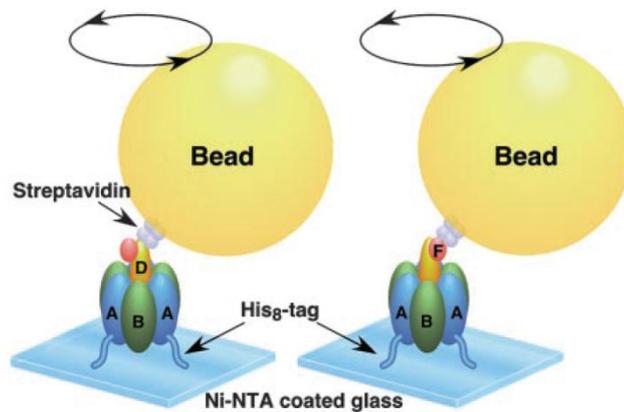


図 1-6 V-ATPase が回転分子モーターであることを示した実験

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*, 2312-2315.¹⁸
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^{14,20} とサブユニット a^{21,22} 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²³。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^{14,20,23}。

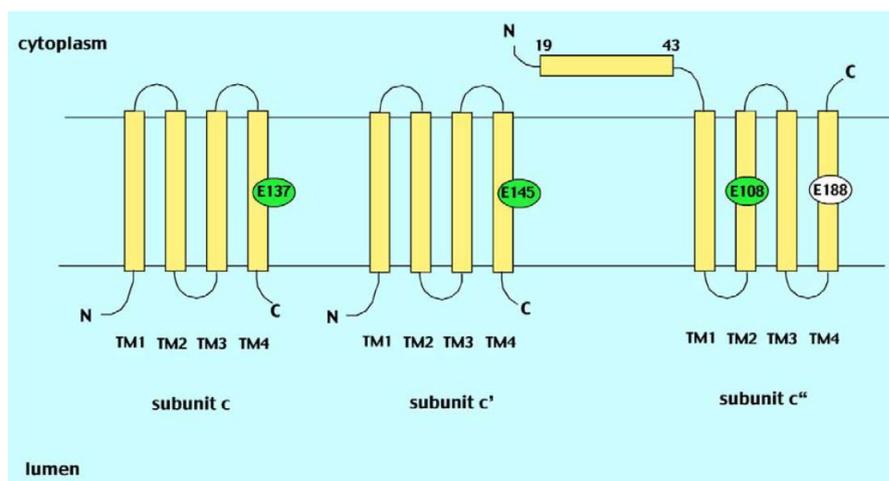


図 1-7 サブユニット c,c',c''のモデル図

Reprinted with permission from *FEBS Lett.* **2003**, 545, 76-85.²³
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)^{21,22}。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^{24,25,26}を基に次のように考えられている (図 1-9)^{3,4,23,27}。

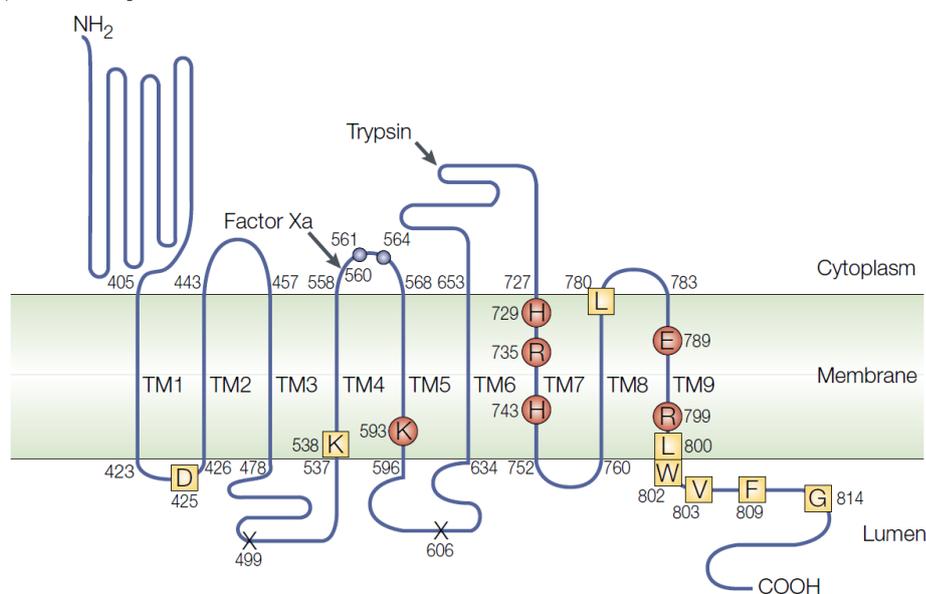


図 1-8 サブユニット a のモデル図

Reprinted with permission from *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, 3, 94-113.³
Copyright © (2002) Nature Publishing Group.

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、V₁ 部分での ATP の加水分解エネルギーによりプロテオリポ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れば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ポ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。

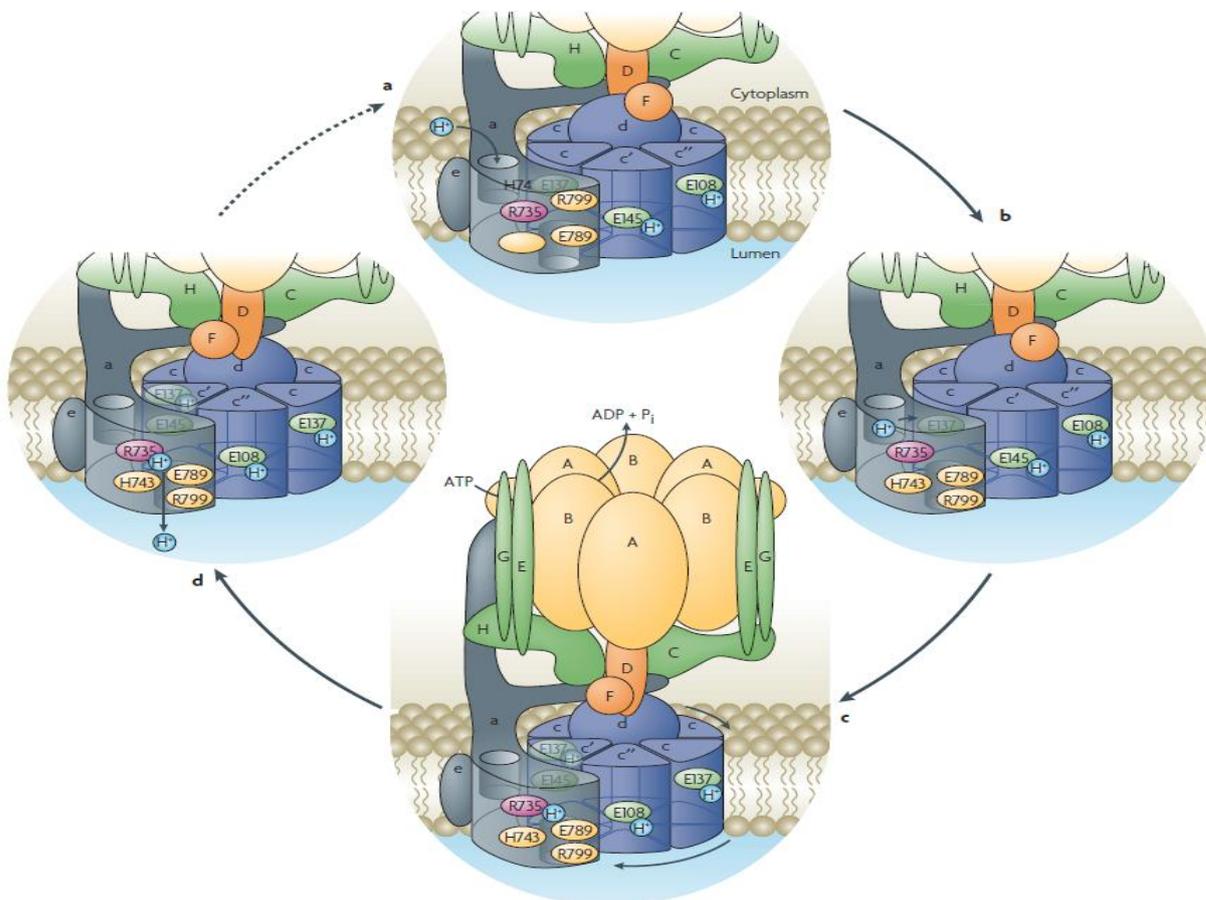


図 1-9 V-ATPase のプロトン輸送の推定メカニズム

ATP の加水分解により生じたエネルギーがプロテオリポ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, 917-929.⁴
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^{28,29)}は、類似した構造を有するコンカナマイシン^{30,31)}やハイグロリジン^{32,33)}、ホルマミシン^{34,35)}、エライオフィリン^{36,37)}、マイクロモノスポリド³⁸⁾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)³⁹⁾。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、IC₅₀ 値が 1 nM 以下と強力な活性を有する^{40,41)}。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⁴²⁾、アピクラレン^{43,44)}、アルカゾリド⁴⁵⁾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)。

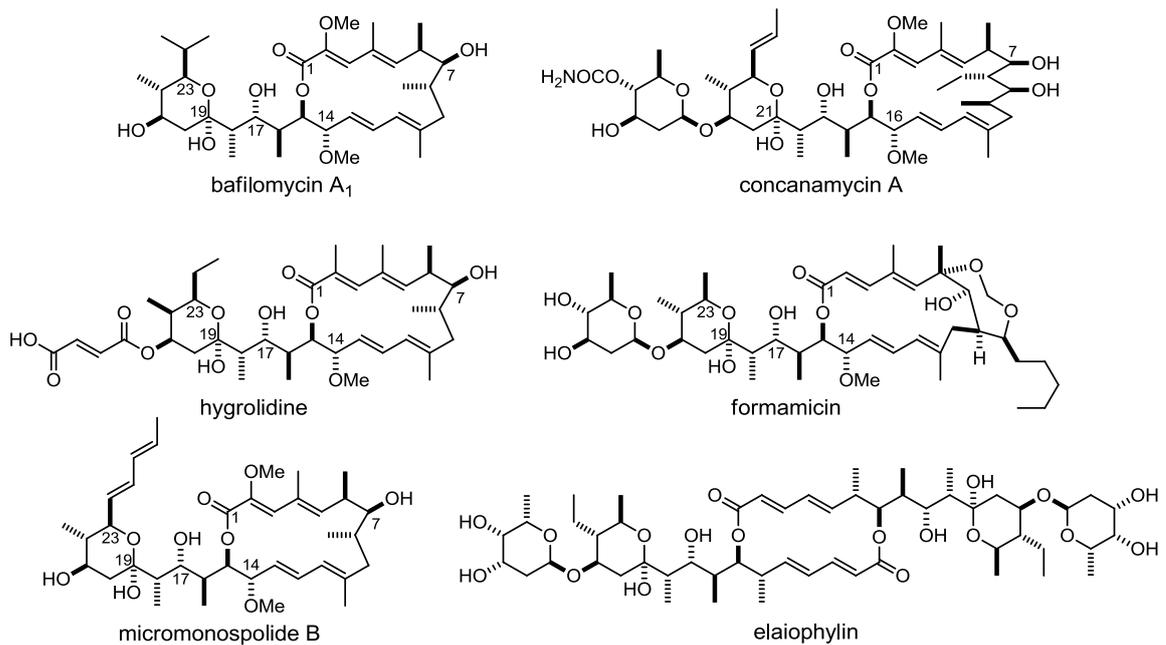


図 1-10 plecomacrolide family に属するマクロリド系天然物の構造

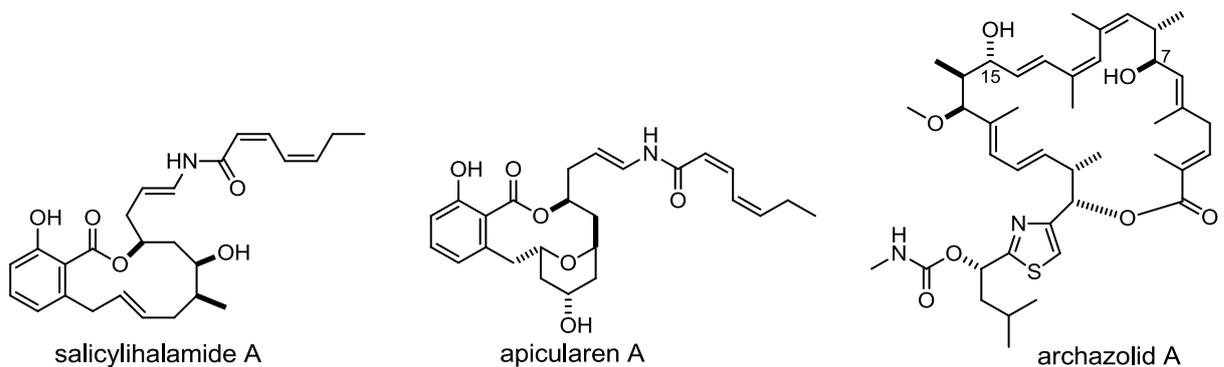


図 1-11 種々の V-ATPase 阻害剤の構造

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 A₁ (Baf) を始め、B₁, C₁, 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)^{28,29,46}。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^{29,47,48}。中でも 1988 年に Bowman らによりバフィロマイシン A₁ 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⁴⁰⁾。バフィロマイシン A₁ 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^{28,33,49)}。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^{28,29)}。

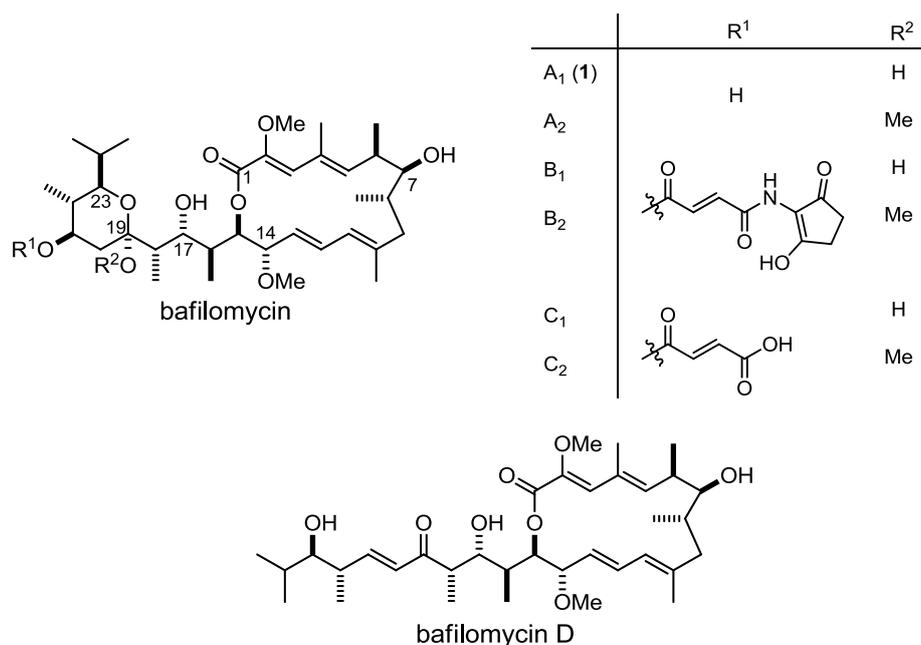


図 1-12 バフィロマイシン類の構造

またバフィロマイシン A₁ 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)⁴⁹⁾。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⁵⁰⁾。

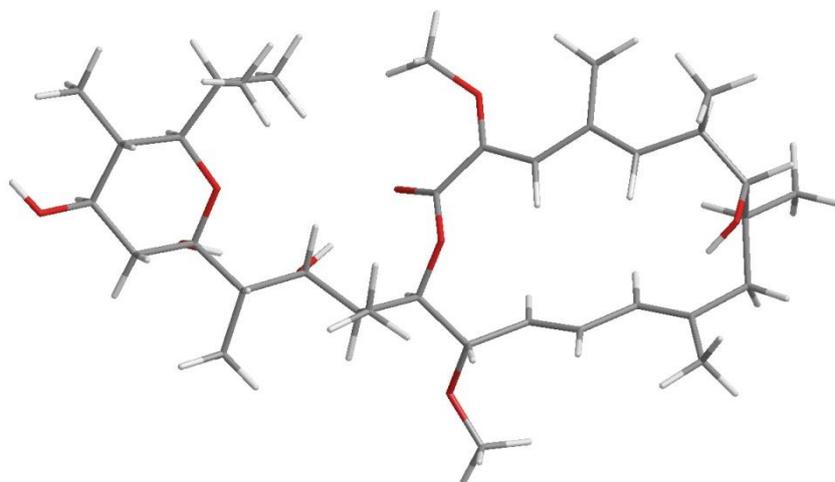
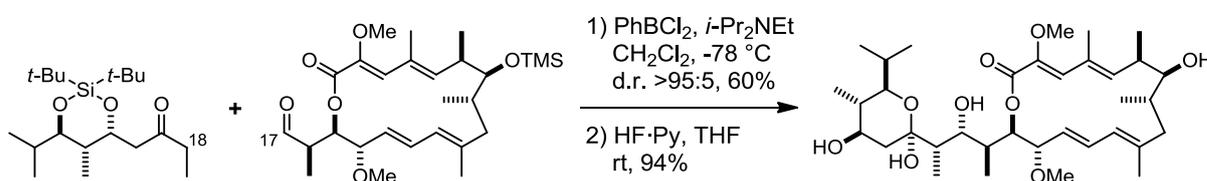


図 1-13 バフィロマイシン A₁ の結晶構造⁴⁹⁾

1-2-c バフィロマイシンの合成研究例

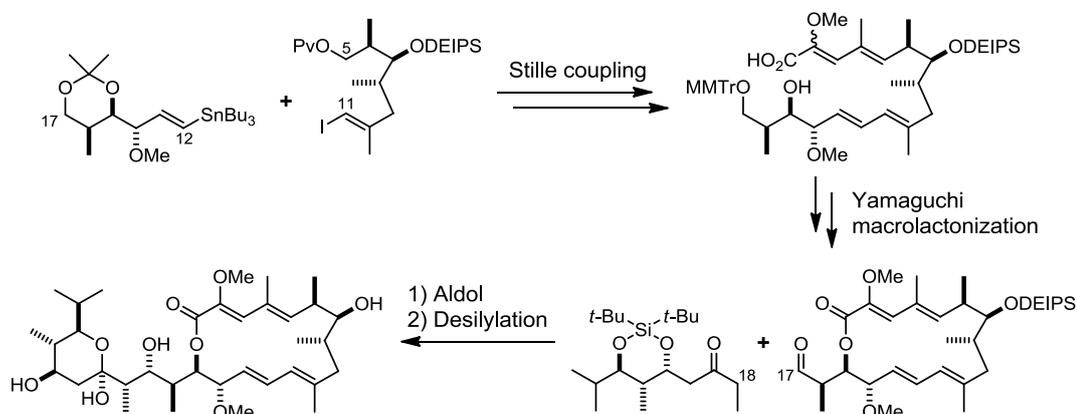
バフィロマイシンはその興味深い生物活性と特異な構造から有機合成化学者の興味を惹き、これまでに 5 つの全合成を含む数多くの合成研究が報告されている⁵¹⁾。Evans らは、ケトンより調製した Z-エノラートとアルデヒドとをアルドール反応により連結することでβ-ヒドロキシケトンを経由して 95:5 のジアステレオ選択性で合成し、続くシリル基の除去によりバフィロマイシン A₁ の初の全合成を達成した(スキーム 1-1)⁵²⁾。このアルドール反応において彼らは、数多くのモデル実験からルイス酸として PhBCl₂ を、またケトンが有するジオール部分の保護基として環状シリル基を用いることが高いジアステレ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

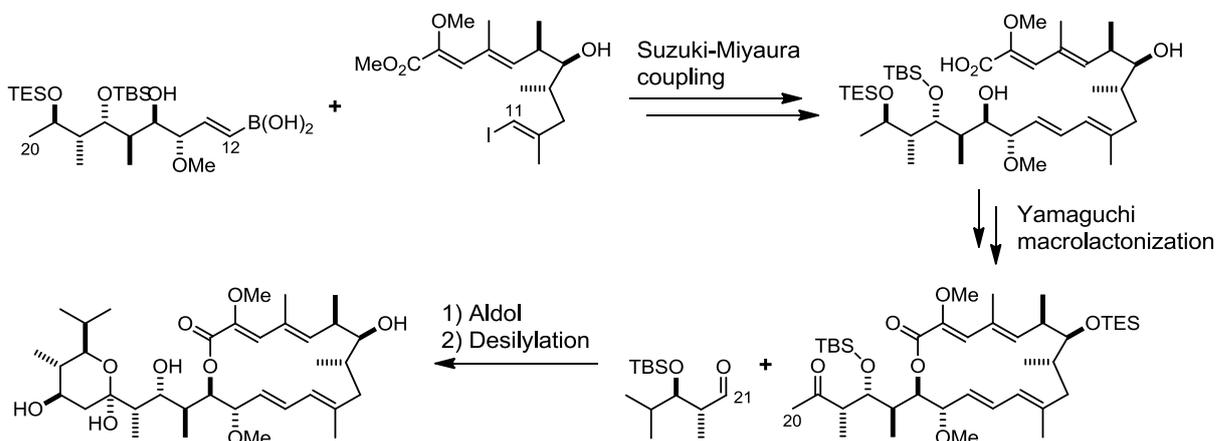
また Toshima らは、アルケニルスタナンとヨードオレフィンとを Stille カップリングにより連結し、山口マクロラクトン化によりラクトン環の構築を行った(スキーム 1-2)。続いて Evans らと同様にジアステレオ選択的なアルドール反応によりエチルケ

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 A₁ の全合成を達成した (53,54,55)。



スキーム 1-2 Toshima らによるバフィロマイシン A₁ の全合成

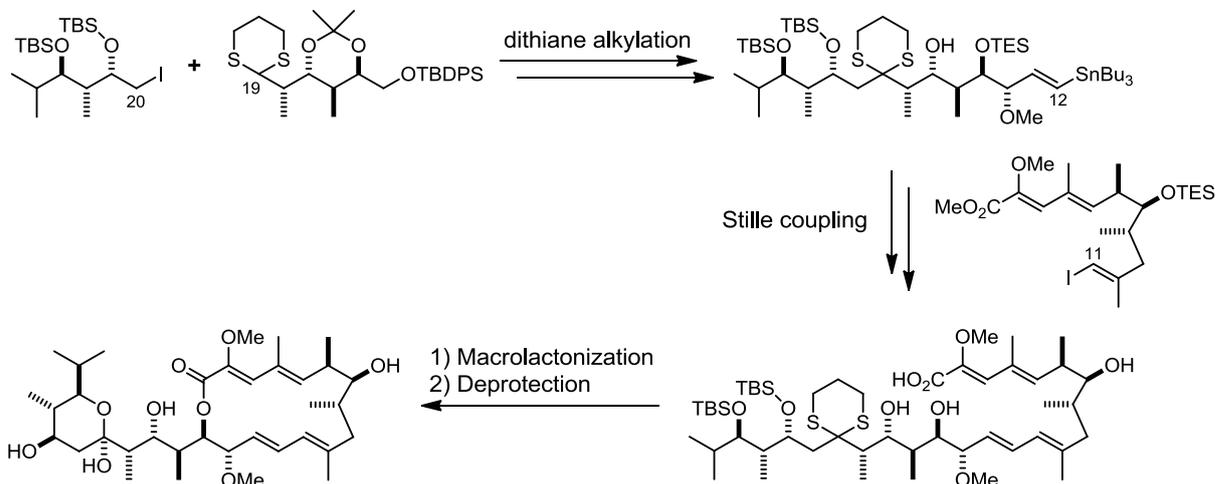
Roush らは、ボロン酸とヨードオレフィンを用いた鈴木-宮浦カップリングにより連結し、山口マクロラクトン化によりラクトンを合成した (スキーム 1-3)。続いて向山アルドール反応によりアルデヒドを連結し、シリル基を除去することでバフィロマイシン A₁ の全合成を達成した (56,57,58,59,60)。



スキーム 1-3 Roush らによるバフィロマイシン A₁ の全合成

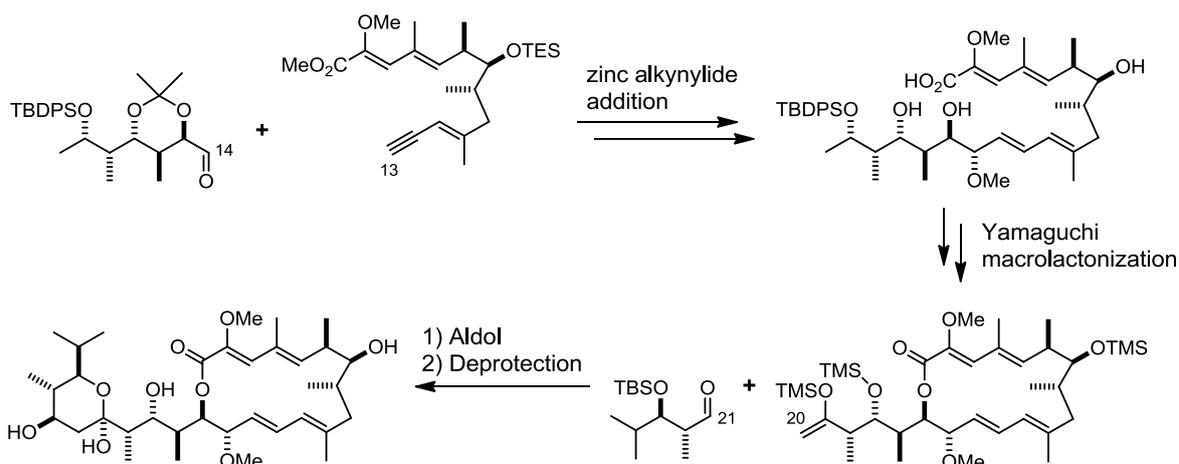
Hanessian らは独自に開発した 1,2-不斉誘導反応を鍵反応^{61,62})としてヨウ化物およびジチアンを合成し、両者をジチアンのアルキル化反応により連結した (スキーム 1-4)⁶³)。続いて増炭を経てアルケニルスタナンへと変換し、Stille カップリングによりヨ-

ドオレフィンを連結した。その後山口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 A₁ 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⁶⁴⁾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)^{65,66)}。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 A₁ の全合成を達成した。



スキーム 1-5 Carreira らによるバフィロマイシン A₁ の全合成

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。

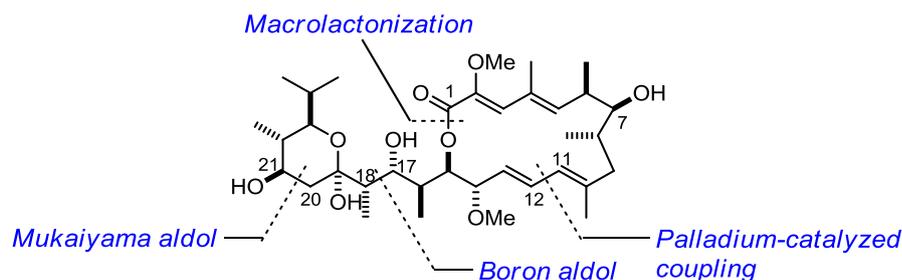


図 1-14 バフィロマイシン A₁ の全合成に用いられている主な鍵反応

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^{41,67,68})。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)^{38,69)}。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⁶⁷⁾

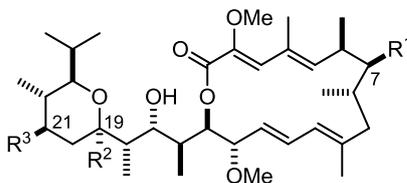


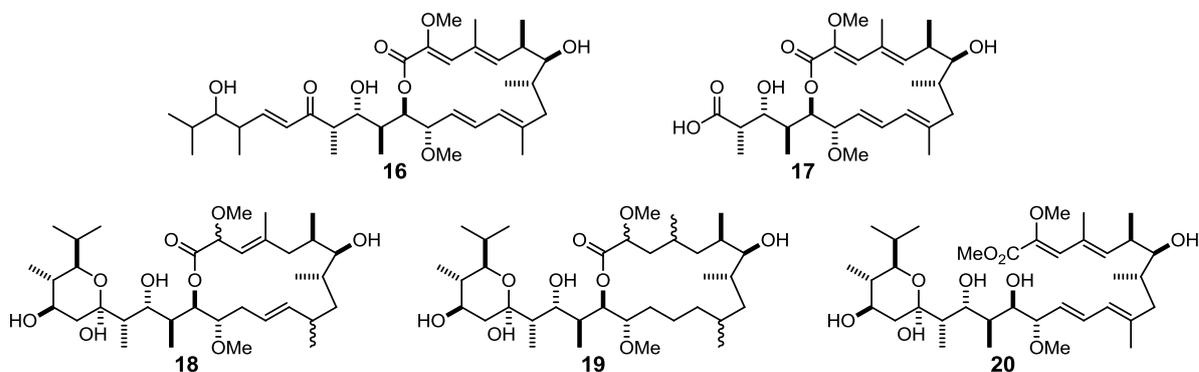
Table 1-2. Inhibition of proton transport in chicken osteoclast (cOc) and bovine chromaffin granule (bCG)^c

compd	R ¹	R ²	R ³	potency ratio (IC ₅₀ compd/IC ₅₀ Baf)	
				cOc	bCG
1 (Baf) ^a	OH	OH	OH	1	1
2	OH	OH	MeCO ₂	2	1.4
3	OH	OH	PhCO ₂	4	1.6
4	OH	OH	FmocNHCH ₂ CO ₂	60	1.2
5	OH	OH	MeO	1.3	1.2
6	OH	OH	=O	2	2.2
7	OH	OMe	OH	1.4	1.4
8	OH	OMe	MeCO ₂	1.3	1.8
9	OH	OMe	PhCO ₂	42	9.1
10	OH	OMe	PrO	4	5
11	=O	OH	OH	34	32
12	=O	OH	=O	103	112
13	=O	OH	MeCO ₂	531	552
14	MeCO ₂	OH	MeCO ₂	49	280
15	MeCO ₂	OH	MeO	430	738
16	-	-	-	9	15
17	-	-	-	na ^b	na ^b
18	-	-	-	2160	2110
19	-	-	-	na ^b	na ^b
20	-	-	-	200	330

^a IC₅₀ of bafilomycin A₁ was 1-3 nM in cOc and 0.6-1.5 nM in bCG.

^b IC₅₀ greater than 10 μM.

^c Gagliardi, S. et al. *J. Med. Chem* **1998**, *41*, 1073.



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^{70,71,72,73}。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_o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_o部分に作用することが示唆された⁷⁰。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⁷²。

一方、バフィロマイシン C₁ 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⁷⁴。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^{75,76,77}、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⁷⁸。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⁷⁹ (図 1-15)。

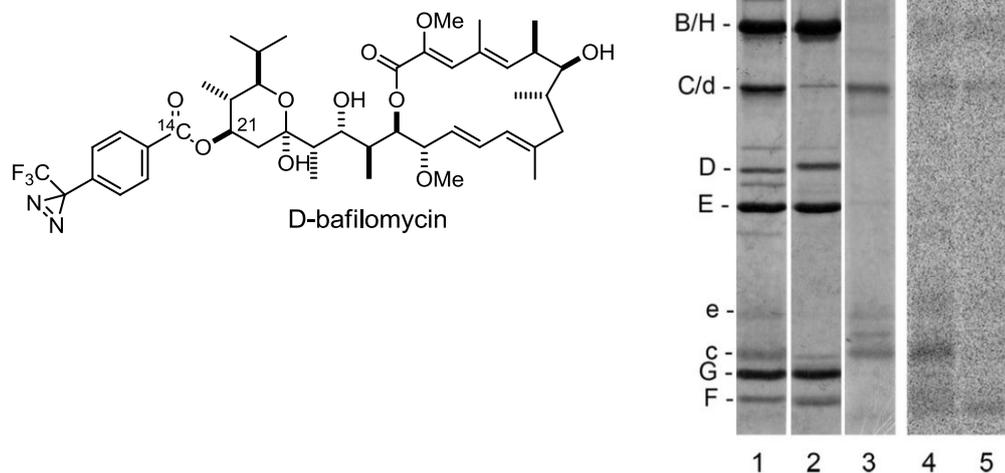


図 1-15 光親和性標識体を用いた V-ATPase の標識実験

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.; Wiczorek. The Binding Site of the V-ATPase Inhibitor Apicularen Is in the Vicinity of Those for Bafilomycin and Archazolid. *J. Biol. Chem.* 2012; 287:31866-31876.⁷⁹ © 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⁸⁰⁾。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)^{81,82)}。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⁸³⁾。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。

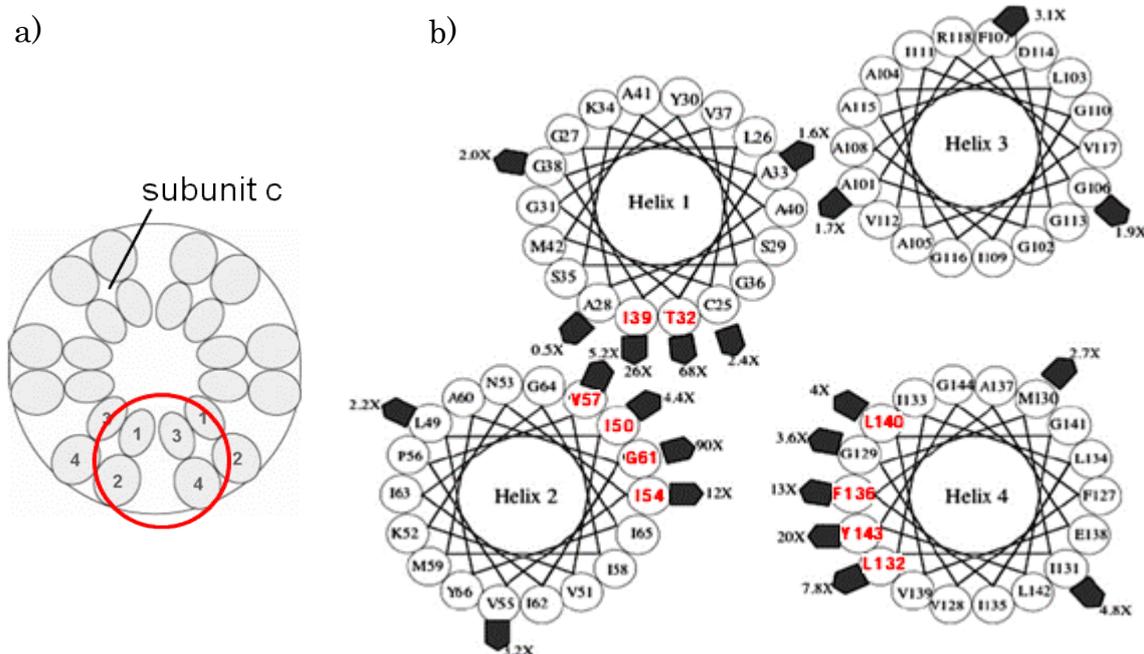


図 1-16 バフィロマイシン耐性株における変異が導入されたアミノ酸の位置

- 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つの膜貫通ヘリックスを有し、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_i 値の変化を表す。 K_i 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; 279:33131-33138.⁸¹ 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; 281:31885-31893.⁸²
 © 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⁸²⁾。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)。

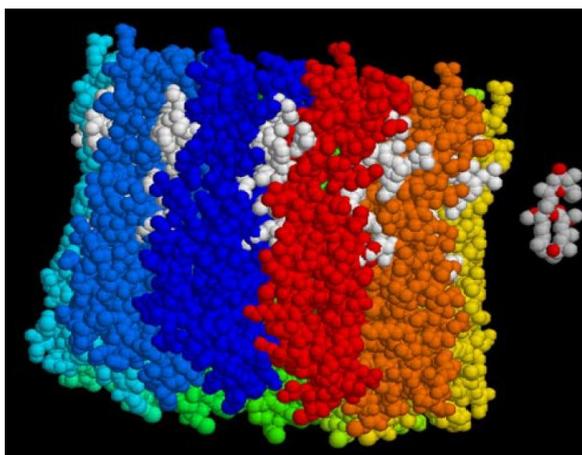


図 1-17 分子モデリング計算により推定されたバフィロマイシンの結合部位

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; 281:31885-31893.⁸²⁾ © 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

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^{84,85)}。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⁸⁶⁾。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^{87,88)}。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)⁸⁹⁾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^{90,91,92,93,94)}。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)⁹⁵⁾。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⁹⁶⁾、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⁹⁷⁾、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 ¹³C 標識した M2 タンパクの膜貫通部分を用いて ¹³C{²H} 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。

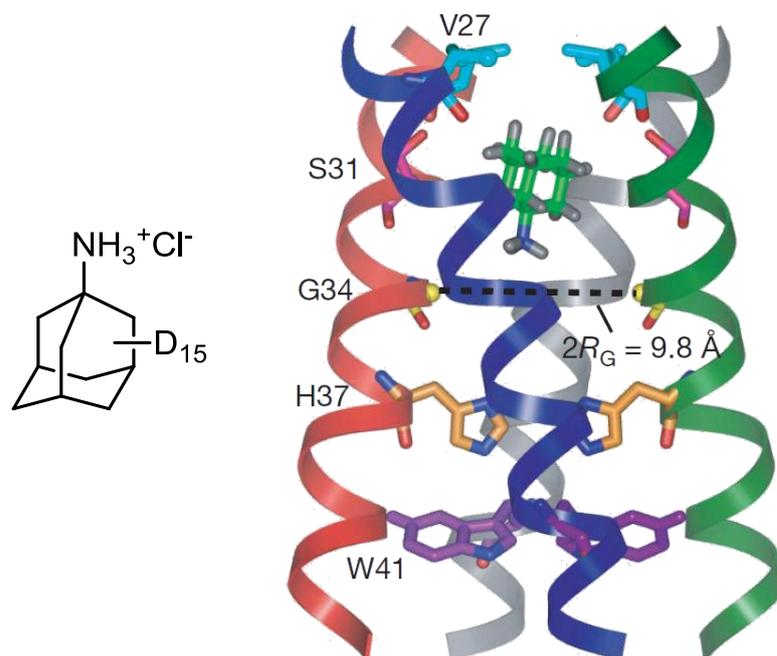


図 1-18 アマンタジンの構造および M2 タンパク質との複合体構造モデル
アマンタジンはセリン 31 に最も近いことが解明された。

Reprinted with permission from *Nature* **2010**, 463, 689-693.⁹⁵
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)^{98,99,100}。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¹⁰¹。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 ¹³C および ¹⁵N 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 ¹³C{¹⁹F} 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。

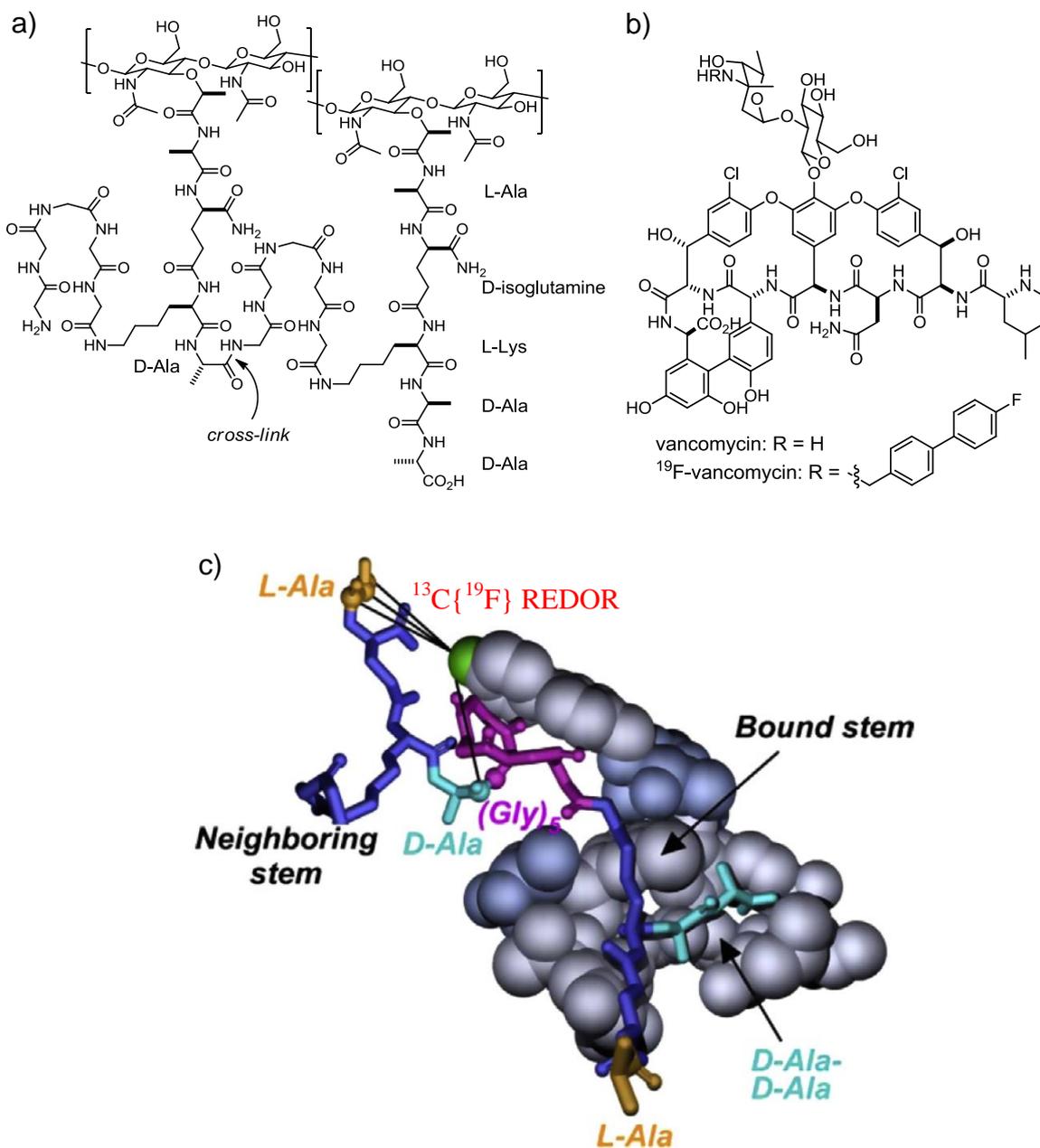


図 1-19 a) ペプチドグリカンのモデル図、b) バンコマイシンおよびフッ素標識化誘導体の構造、c) 複合体分子モデル。水色は D-Ala-D-Ala 配列、緑色はフッ素、紫はグリシンブリッジを表す。バンコマイシンのペプチド骨格が D-Ala-D-Ala を認識し、糖部分は Neighboring stem と第二の結合部位を形成することが提唱された。

Reprinted with permission from *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 5767-5775.¹⁰²
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 ^{13}C や ^{15}N は天然存在比が低く、 ^{19}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。 ^{19}F を用いる利点として、 ^{19}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。 ^{13}C - ^{19}F 原子間距離であれば 10 \AA 程度までの距離が、条件が良ければ $\pm 0.1 \text{ \AA}$ の精度で測定できる。さらに ^{19}F はスピンの $1/2$ 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、バックグラウ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 ^{19}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 $^{13}\text{C}\{^{19}\text{F}\}$ 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)¹⁰³⁾。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。

表 1-3 フッ素の主な性質¹⁰³⁾

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

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¹⁰⁴⁾。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。

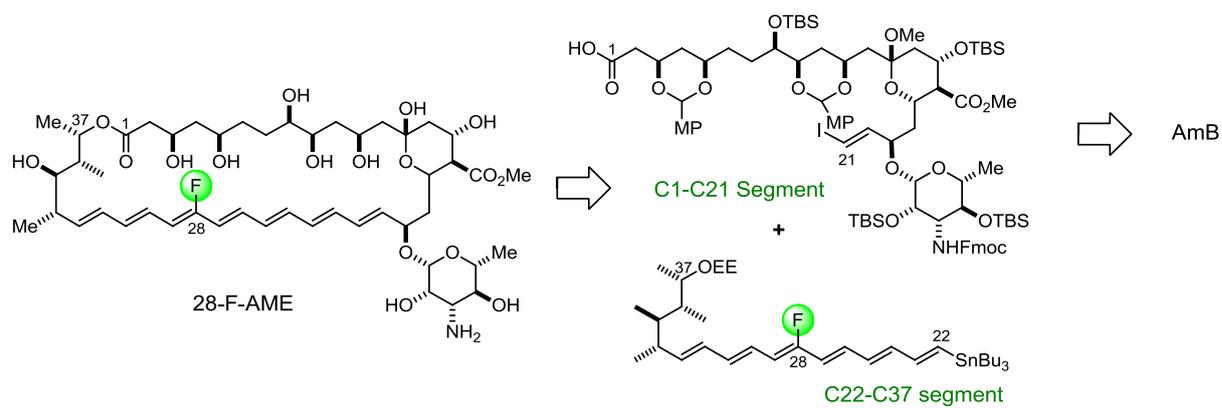


図 1-20 フッ素標識化アンフォテリシン誘導體

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を持たれてきた。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。

- (1) 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。

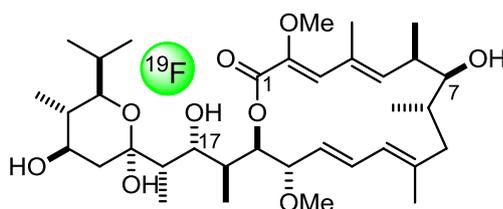


図 1-21 フッ素標識化バフィロマイシン誘導体

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 ^{13}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.; Gagliardi, S. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 2033-2048.
- 9) 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.
- 19) Yokoyama, K.; Nakano, M.; Imamura, H.; Yoshida, M.; Yamakoshi, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 24255-24258.
- 20) 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.; Zähler, H. *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 110-117
- 30) Kinashi, H.; Someno, K.; Sakaguchi, K.; Higashijima, T.; Miyazawa, T. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3861-3864.
- 31) 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.; Reichenbach, H.; Hofle, G. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 913-919.
- 45) Sasse, F.; Steinmetz, H.; Höfle, G.; Reichenbach, 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.; Belfiore, 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.; Wiczorek, H. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 40544-40548.
- 79) Qsteresch, C.; Bender, T.; Grond, S.; von Zezschwitz, P.; Kunze, B.; Jansen, R.; Huss, M.; Wiczorek, H. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 31866-31876.
- 80) Bowman, B. J.; Bowman E. J. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 3965-3972.
- 81) Bowman, E. J.; Graham, L. A.; Stevens, T. H.; Bowman, B. J. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 33131-33138.
- 82) 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 β -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 Å³と、38.9 Å³のエチル基と等価であると言われており¹⁾、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²⁾。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³⁾。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) ⁴⁾。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-F₃-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。

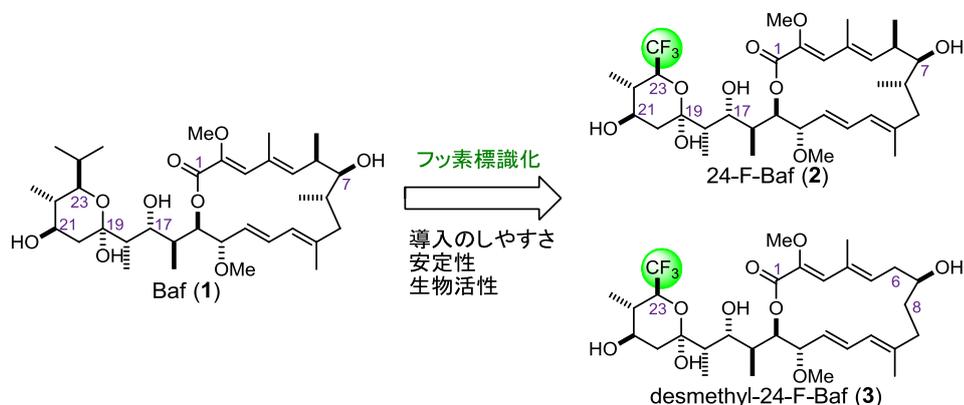


図 2-1 フッ素標識化バフィロマイシン誘導体 **2** および **3** の設計

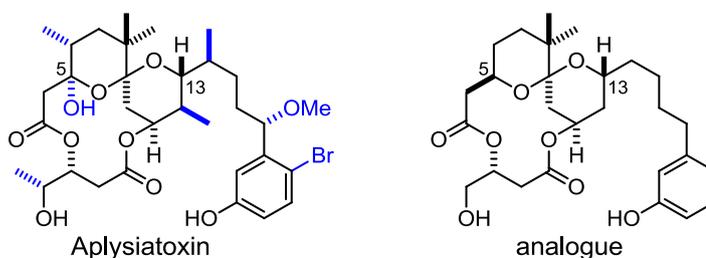
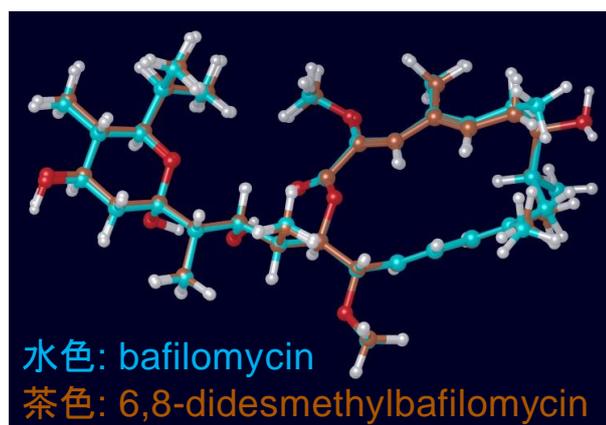


図 2-2 アプリシアトキシンとその誘導体



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。

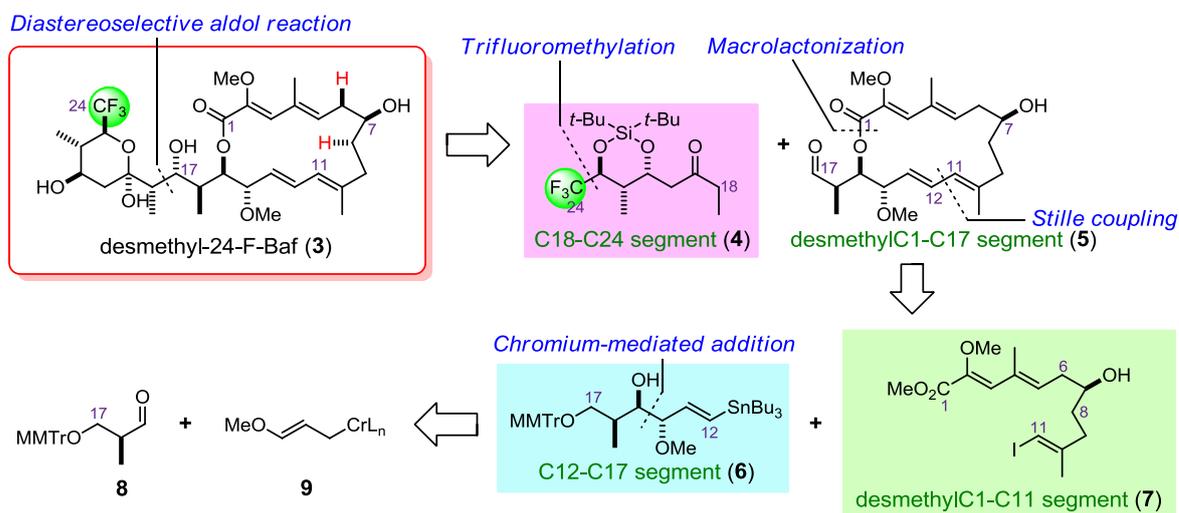
2-2 デスマチル 24-F-Baf の合成

2-2-a 逆合成解析

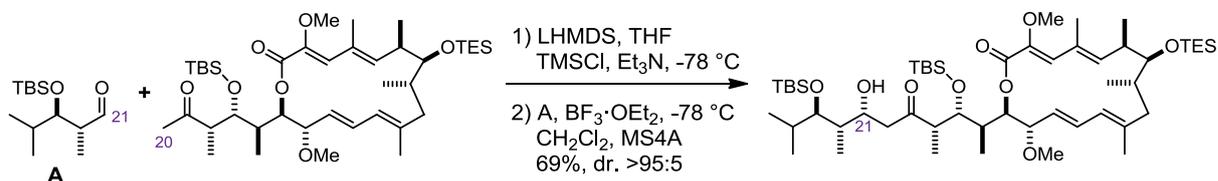
2つのフッ素標識化バフィロマイシン誘導体 **2,3** は同様の合成戦略にて合成することとし、まずはデスマチル 24-F-Baf **3** の効率的合成法を確立することにした。逆合成解析をスキーム 2-1 に示す。CF₃ セグメントは合成の終盤に導入できることが望まれるが、これまでに報告されている全合成研究例も参考にすると、先にマクロラクトン環を構築した後にアルドール反応により導入するルートが効率的であると考えられた。過去の研究において Roush ら⁵⁾は C20-C21 結合を、Evans ら⁶⁾は C17-C18 結合を立体選択的なアルドール反応により構築することでバフィロマイシンの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 CF₃ 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 CF₃ 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** とデスマチル 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、一方デスマチル C1-C17 セグメント **5** は、Toshima らの報告⁷⁾を参考にデスマチル C1-C11 セグメント **7** と C12-C17 セグメント **6**⁸⁾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。デスマチル 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⁹⁾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

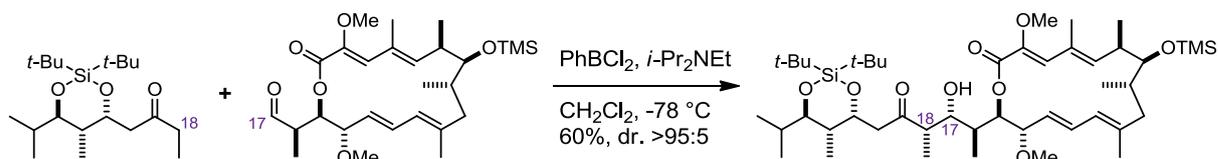
基を除去することで簡便なマクロラクトン環の構築を実現できるかという点もポイントである。これらをすべて解決することが本合成を達成する上で必要不可欠といえる。



スキーム 2-1 デスメチル 24-F-Baf の逆合成解析



スキーム 2-2 Roush らによる立体選択的アルドール反応⁵⁾

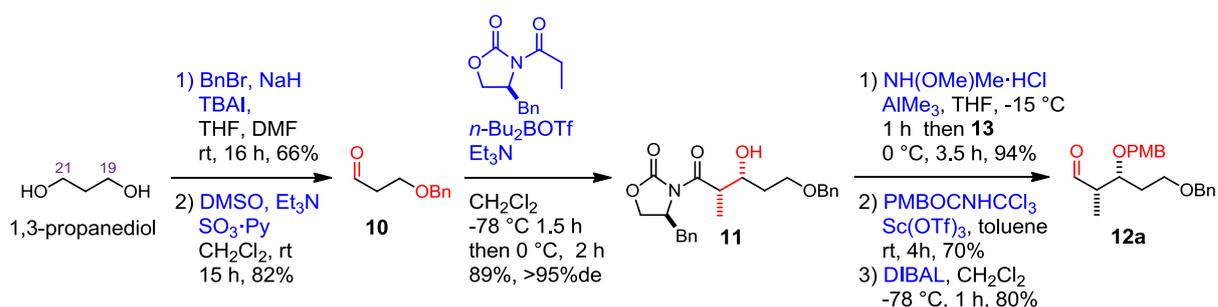


スキーム 2-3 Evans らによる立体選択的アルドール反応⁶⁾

2-2-b C18-C24 セグメントの合成

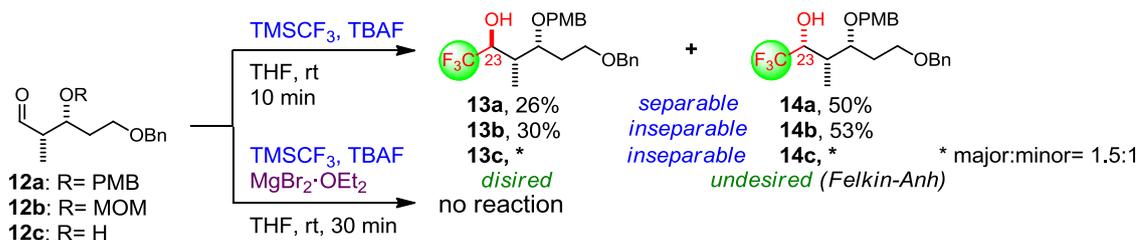
まずは C18-C24 セグメント **4** の合成を目指し、トリフルオロメチル基導入の基質となるキラルアルデヒド **12a** の調製を行った (スキーム 2-4)。Rauhala らの報告¹⁰⁾に従い、1,3-プロパンジオールの片方のヒドロキシ基をベンジル基で保護し、残るヒドロ

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¹¹⁾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¹⁰⁾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。

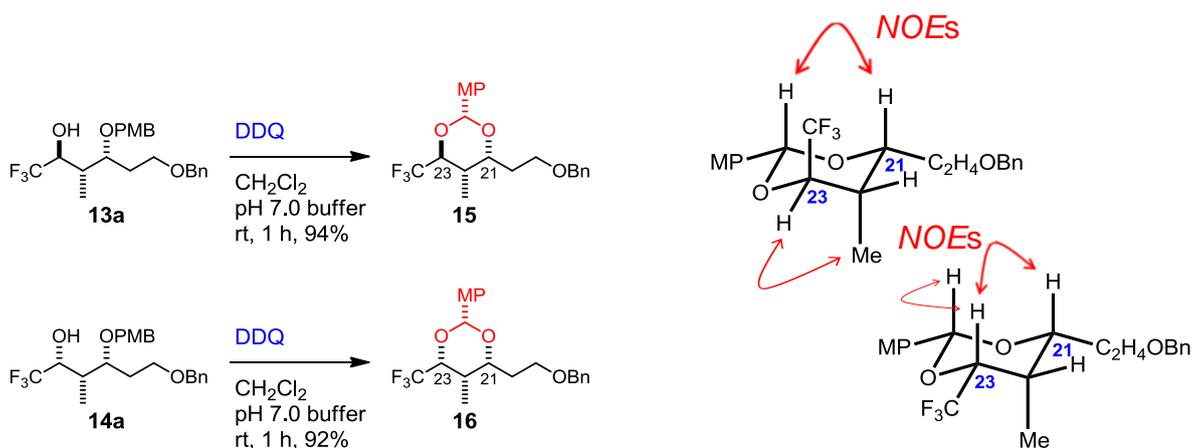


スキーム 2-4 アルデヒド **12a** の合成

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¹²⁾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¹³⁾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ロ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 2-5 トリフルオロメチル化反応の検討



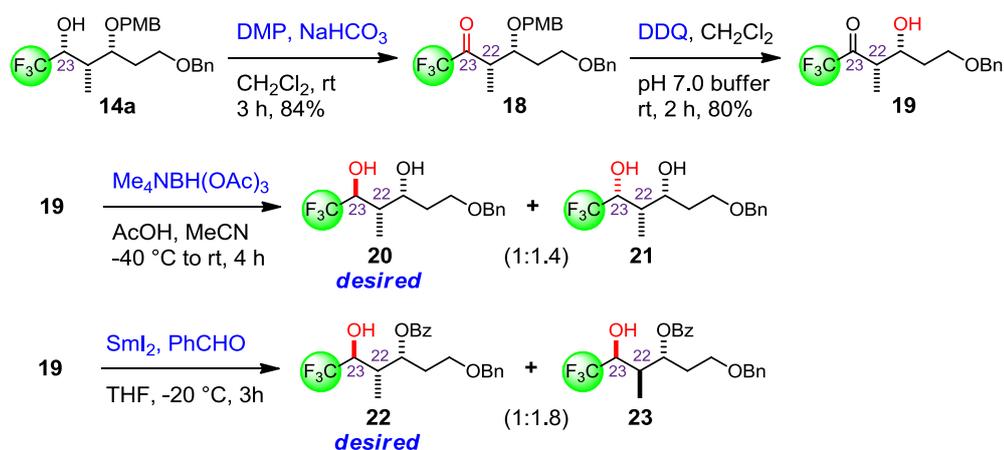
スキーム 2-6 アルコール **13a** および **14a** の立体化学の決定

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¹⁴⁾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）。続いてヨウ化サマリウムを用いたヒドリド転位反応を検討した。Evans、Tishchenko ら

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¹⁵⁾。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_3 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、フッ素に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 2-7 光延反応の検討



スキーム 2-8 *anti*-1,3-ジオール構築法の検討

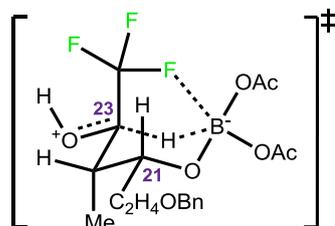
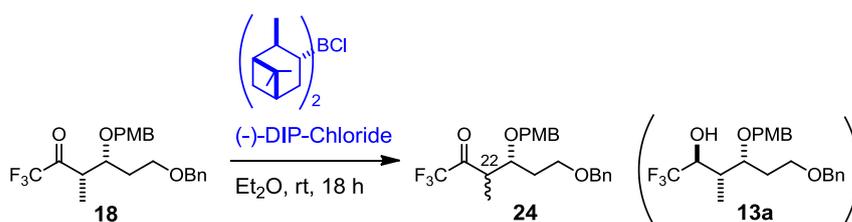


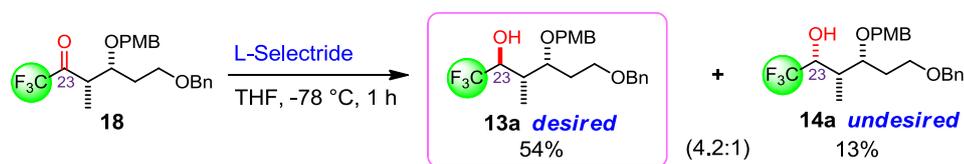
図 2-4 テトラメチルアンモニウムトリアセトキシボロヒドリドを用いた還元反応における遷移状態の推定図

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)¹⁶⁾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

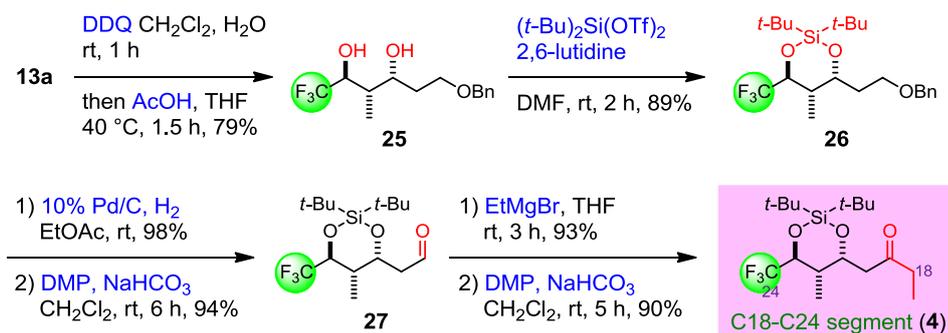
続いてケトン **18** の α 位の不斉を利用したジアステレオ選択的な還元反応を検討した (スキーム 2-10)。ケトン **18** に対して、立体障害の大きい還元剤である L-Selectride を THF 中 -78 度で作用させたところ、望む 23*S* アルコール **13a** が 4.2:1 の選択性で主生成物として得られた。この結果は Felkin-Anh モデルで予想される選択性に従うものであり、CF₃ 基による影響は顕著ではなかったと考えられる。これによりアルコール **13a** をアルデヒド **12a** から 2 段階 50% の収率で得ることに成功した。本還元反応については 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 CF₃ 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。

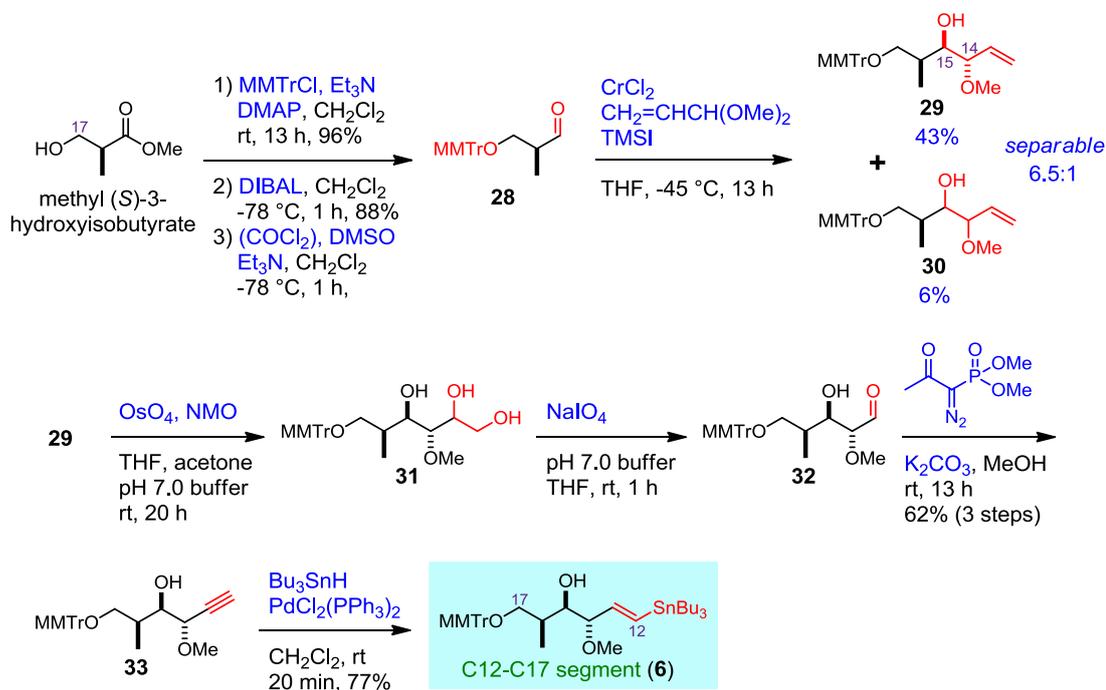


スキーム 2-11 C18-C24 セグメント 4 の合成

2-2-c C12-C17 セグメントの合成

C12-C17 セグメント 6⁷⁾の合成は Toshima らの報告⁸⁾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 MMT_r 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⁹⁾。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お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シズ化を行うことで、C12-C17 セグメント **6** を計 8 段階にて合成した。



スキーム 2-12 C12-C17 セグメント **6** の合成

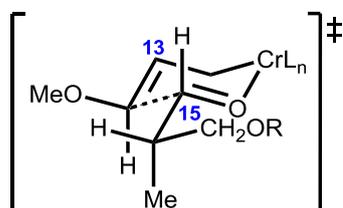
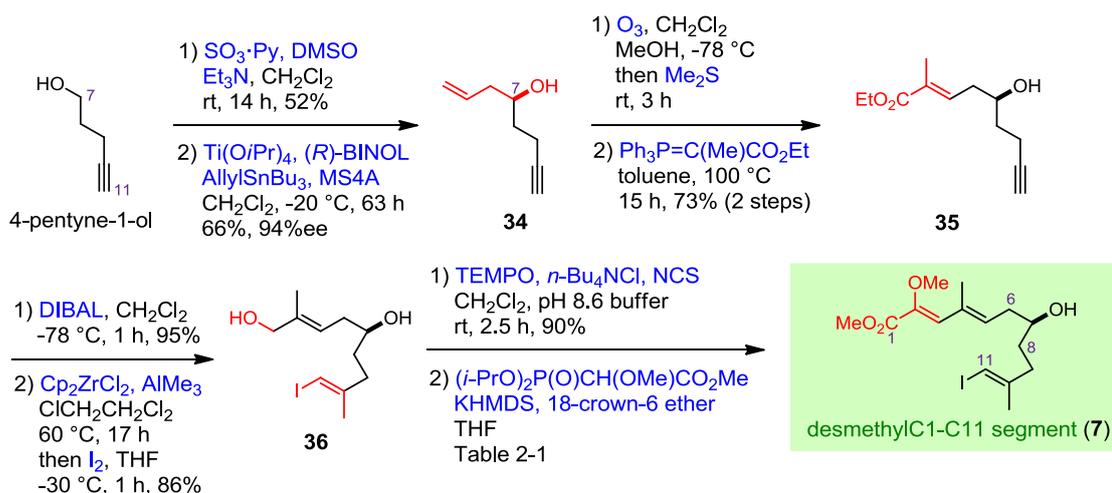


図 2-5 有機クロム試薬の求核付加反応における遷移状態の推定図

2-2-d デスマチル C1-C11 セグメントの合成

デスマチル 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-オールの水キシ基を 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 位水キシ基の構築を行った¹⁷⁾。すなわち Ti(O*i*-Pr)₄ 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**¹⁸⁾ 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

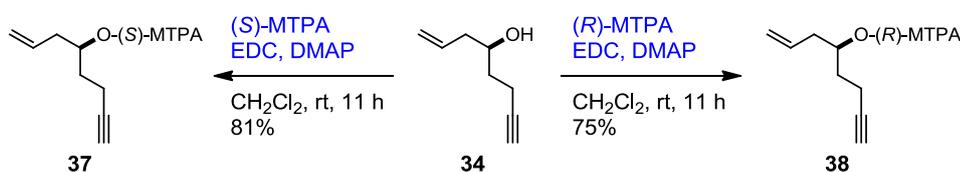
で行った (スキーム 2-14)。すなわち、アルコール **34** と MTPA を DMAP 存在下 EDC により縮合し、生じたエステルの ^1H NMR の積分値の比が 0.97:0.03 であったことから 94%ee と決定した。次にアルコール **34** の末端オレフィンをおゾン分解した後、Hanessian らの報告¹⁹⁾を参考にトルエン還流下において Wittig 反応を行い *E*-オレフィン **35** へと変換した。さらに DIBAL 還元を行った後、Negishi らの報告²⁰⁾に従いトリメチルアルミニウム存在下、ビスシクロペンタジエニルジルコニウムジクロリドを作用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²¹⁾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⁵⁾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²²⁾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

表 2-1 Horner-Wadsworth-Emmons 反応の検討

Entry	Substrate / mg	Temperature, Time	Yield		
			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

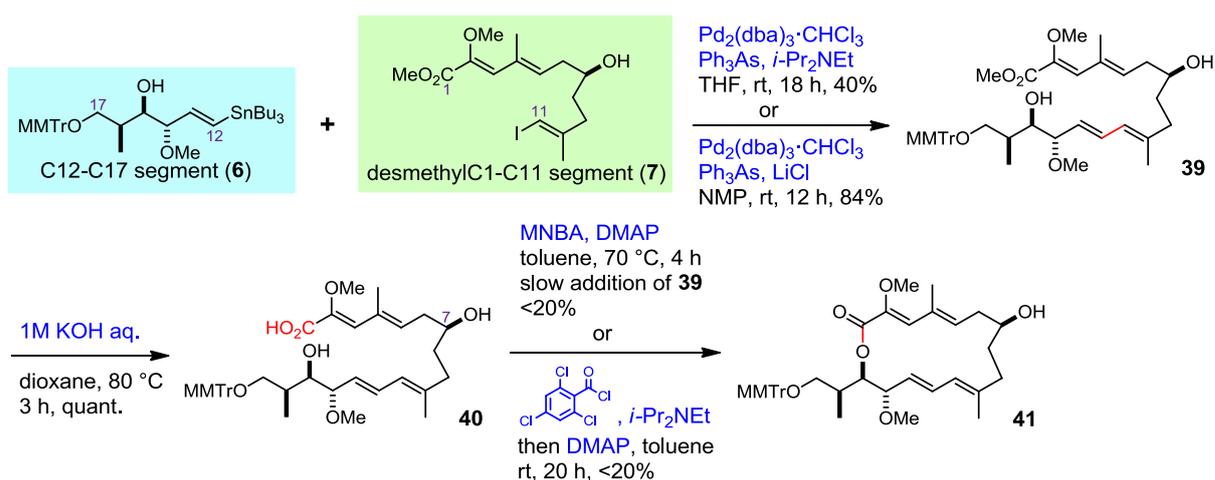


スキーム 2-14 アルコール **34** の立体化学および光学純度の決定

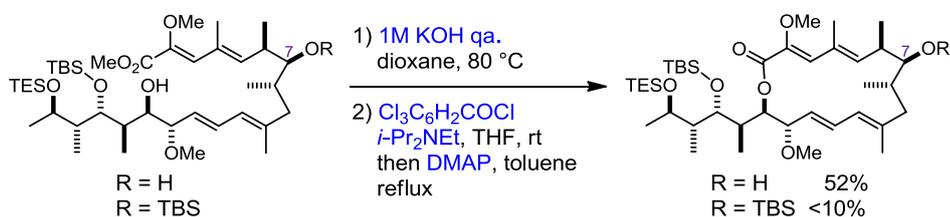
2-2-e マクロラクトン環の構築

デスマチル 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²³⁾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²⁴⁾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)^{5,25)}。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²⁶⁾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²⁵⁾を参考に改良山口法²⁷⁾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。



スキーム 2-15 マクロラクトン環構築の検討



スキーム 2-16 Roush らによるマクロラクトン化反応⁵⁾

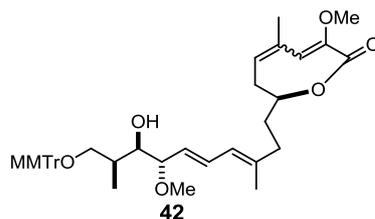
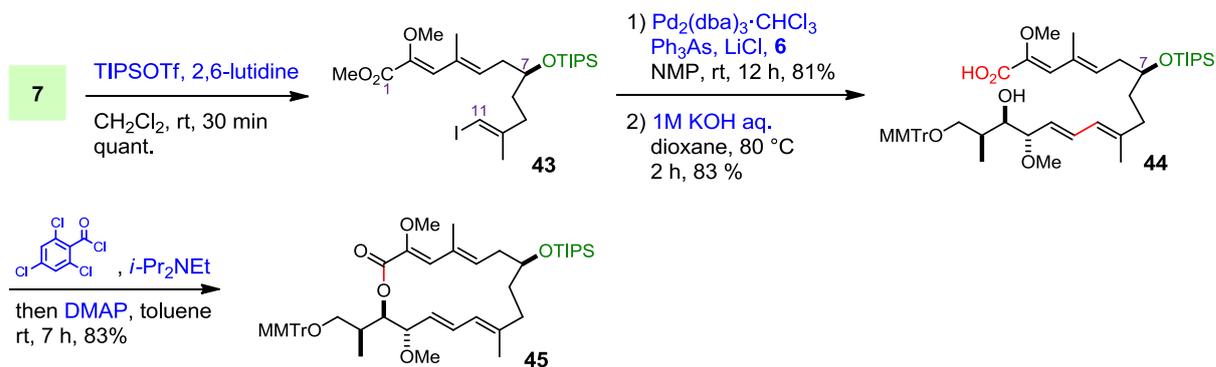


図 2-6 マクロラクトン化反応において推定される副生成物の構造

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。

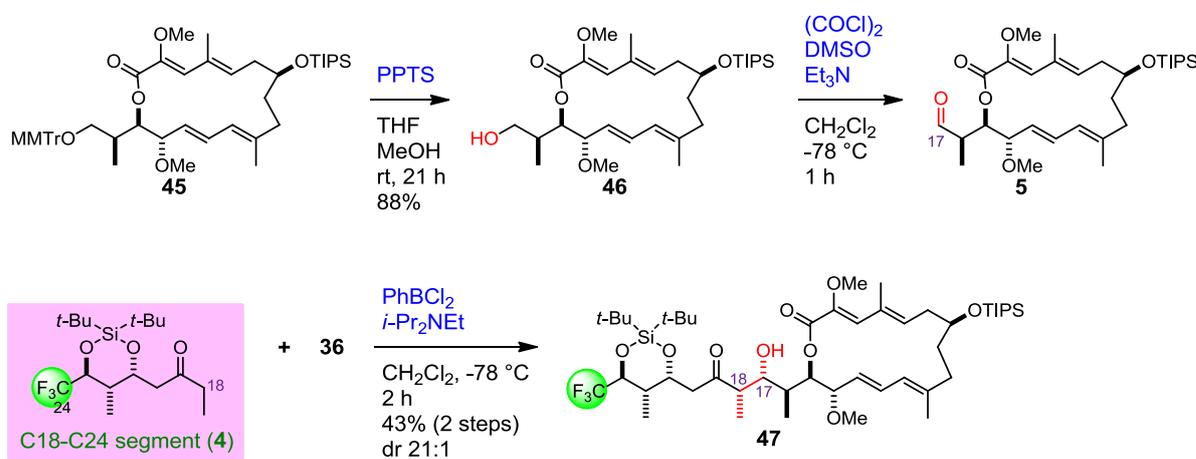


スキーム 2-17 ラクトン **45** の合成

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 試薬を用いた場合には、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

る、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⁵⁾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、 ^1H NMR の化学シフトおよび結合定数を Toshima らの報告⁷⁾および類似した構造を持つ化合物²⁸⁾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

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 $^1\text{H NMR}$ の比較

Carbon No.	47		A		B	
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, $J = 9.8, 4.0^b, 2.4$ Hz)	3.74	(1H, ddd, $J = 9.0, 3.0, 1.0^b$ Hz)
18	2.74	(1H, dq, $J = 7.0, 3.0$ Hz)	2.83	(1H, ddq, $J = 9.2^c, 7.0, 2.2$ 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)

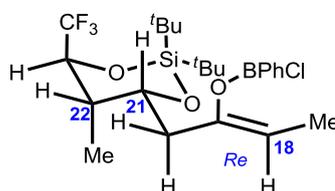
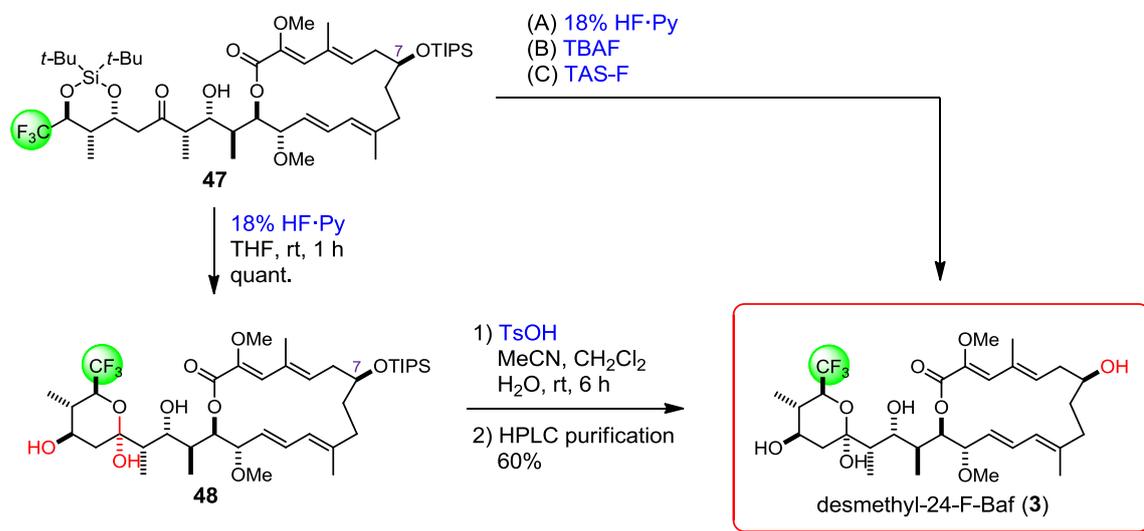


図 2-7 ボロンエノレートの推定立体配座⁶⁾

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 を用いた場合には、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²⁹⁾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 $^1\text{H NMR}$ 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

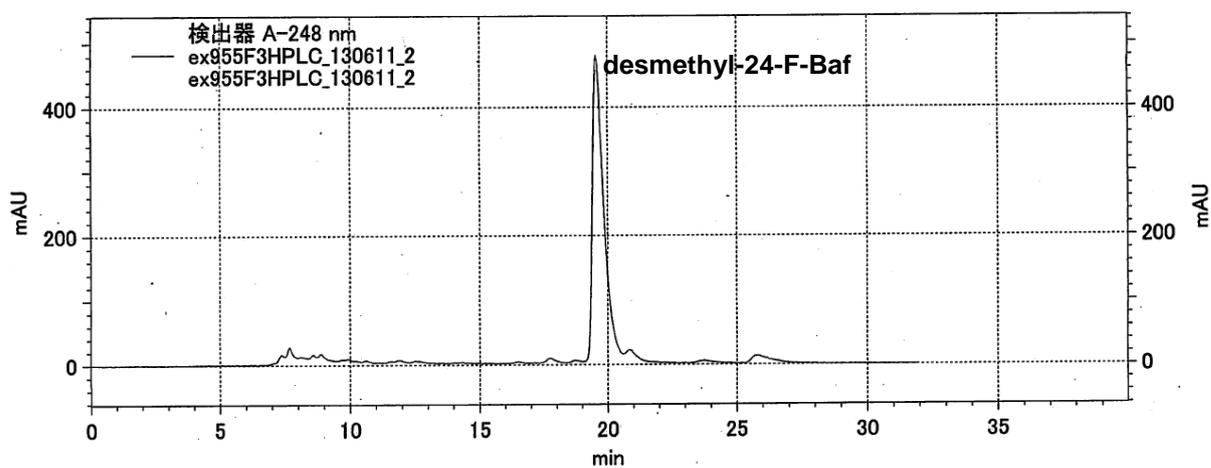
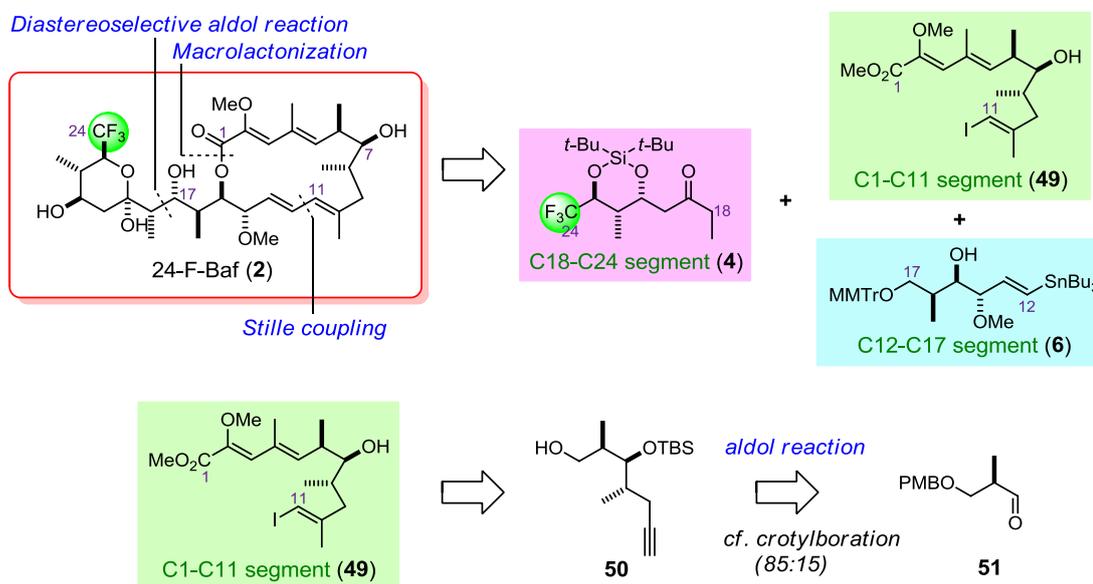


図 2-8 デスメチル 24-F-Baf の HPLC クロマトグラム
精製条件 Column, 5SL-II (φ 10×250 mm)
Flow rate, 2.0 mL/min
Mobile phase, 50% EtOAc in hexane
Detect wave length, 248 nm

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⁵⁾。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²⁹⁾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。

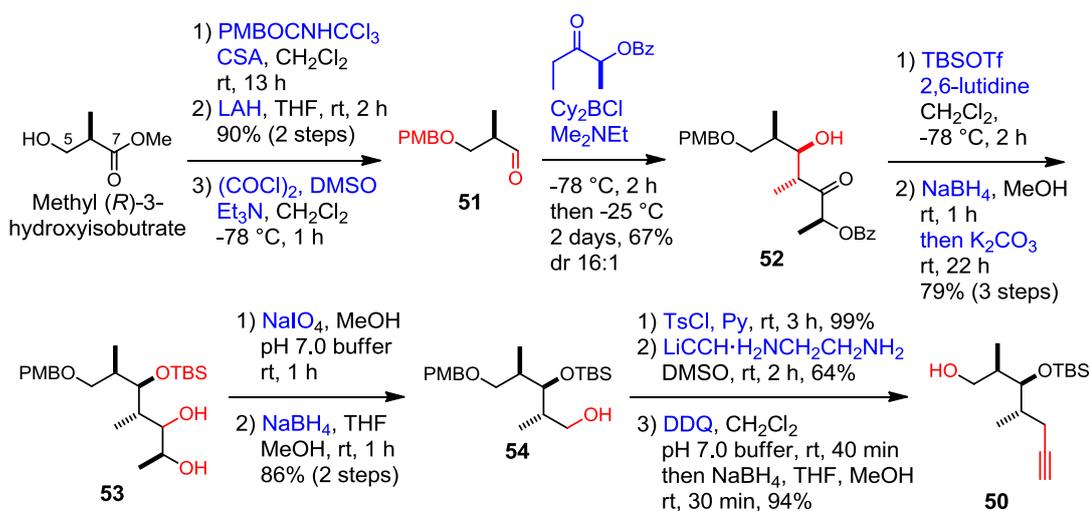


スキーム 2-20 24-F-Baf の逆合成解析

2-3-a C1-C11 セグメントの合成

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³¹⁾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³⁰⁾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**³¹⁾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⁵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

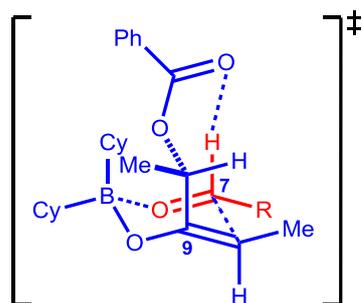
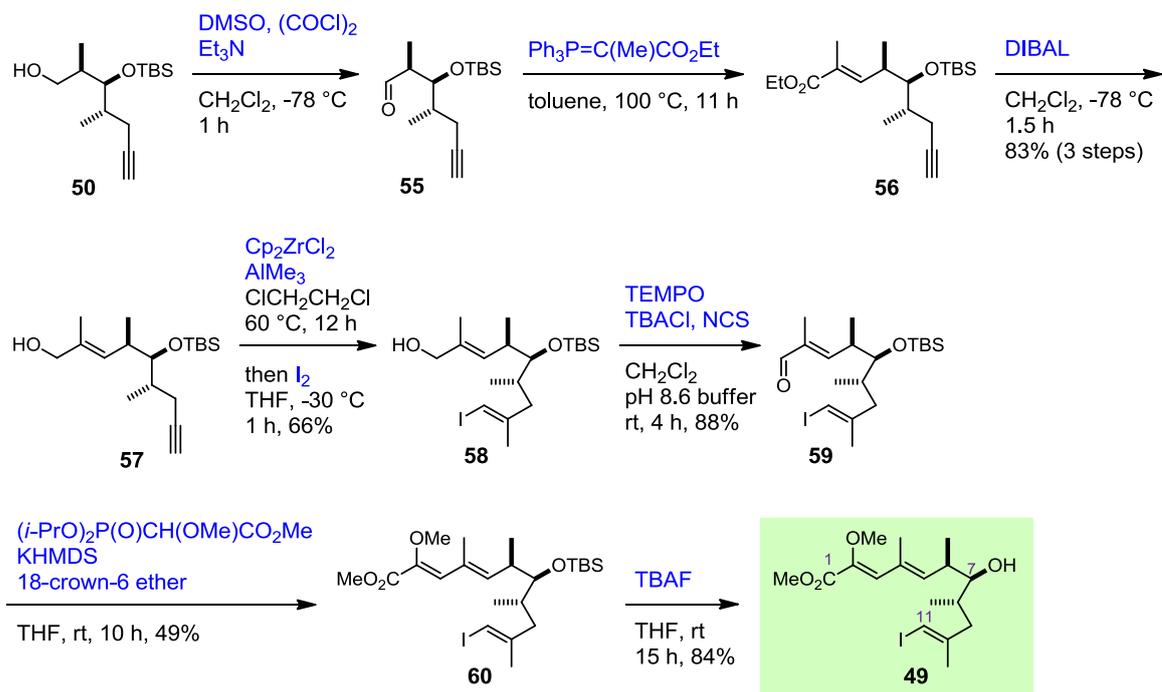


図 2-9 Paterson アルドール反応の推定遷移状態³⁰⁾

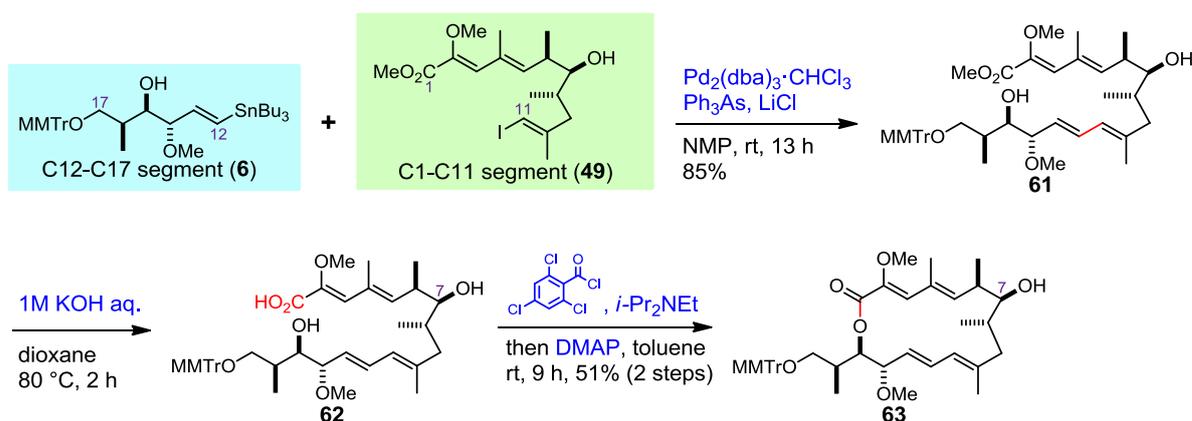
続いてデスメチル体の場合と同様、Hanessian の報告¹⁹⁾に従い C4 ユニットおよびヨードオレフィン部分の構築を行うことで C1-C11 セグメント **49** の合成を行った (スキーム 2-22)。すなわちアルコール **50** を Swern 酸化した後、トルエン還流下イリドを作用させて α,β -不飽和エステル **56** へと変換し、DIBAL 還元によりエステルを還元することで 3 段階 83% の収率でアルコール **57** を得た。次に Negishi らの報告²⁰⁾に従い、トリメチルアルミニウムおよびビスシクロペンタジエニルジルコニウムジクロリドを用いてアルキ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⁵⁾に倣いホスホネート²²⁾、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⁵⁾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

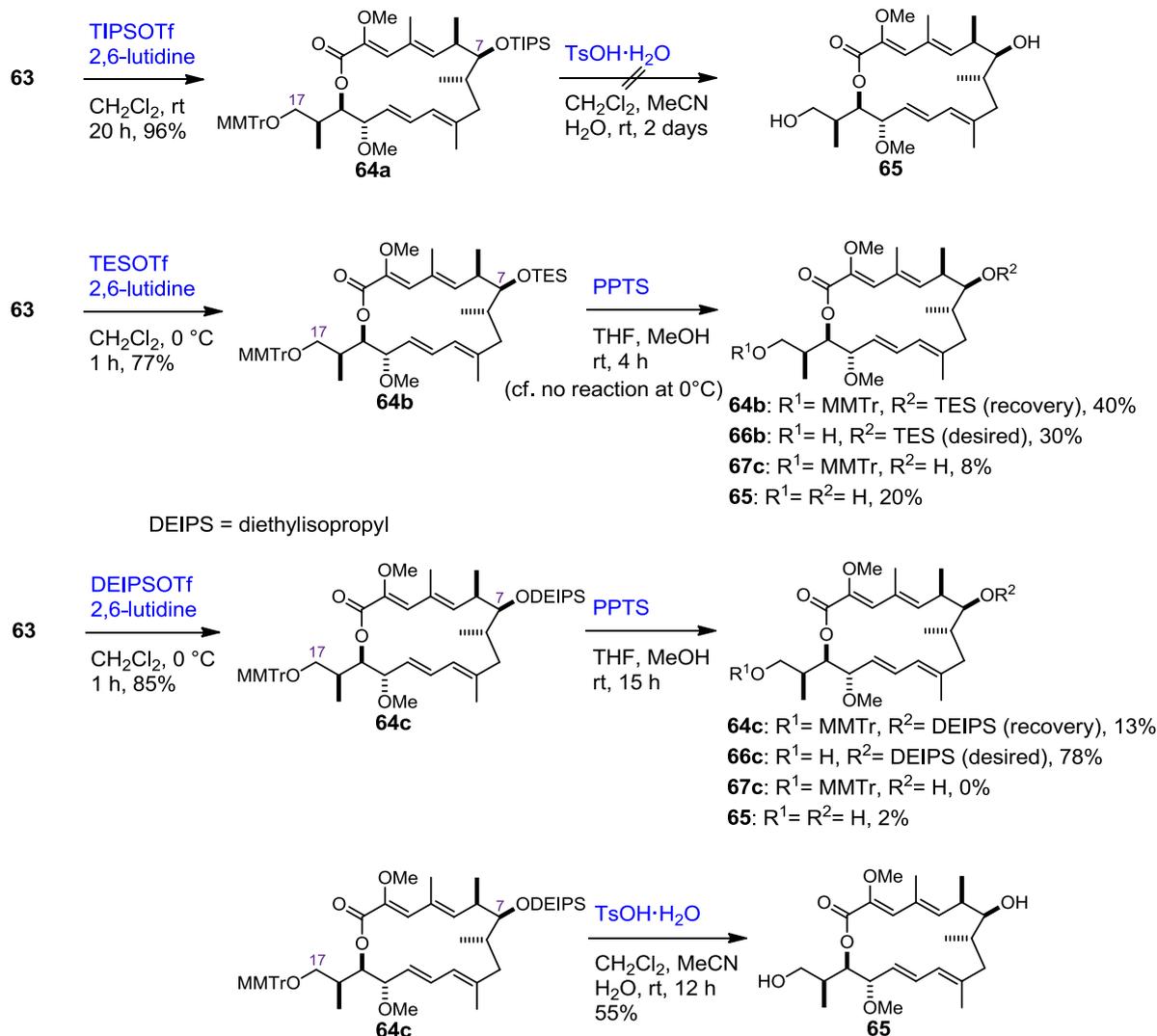
C1-C11 セグメント **49** が得られたので、次に 2-2 節で合成した C12-C17 セグメント **6** との連結を行うことでマクロラクトン環の構築を行った (スキーム 2-23)。デスマチル体の場合と同様に、Marshall らの条件²⁴⁾を参考にトリフェニルヒ素および塩化リチウム存在下、NMP 溶媒において Stille カップリングを行ったところ、反応は室温にて良好に進行し、85%の収率でジエン **61** を得た。続いて水酸化カリウムを用いてメチルエステルを加水分解し、生じたセコ酸 **62** に対して環化反応を行った。Carreira の報告²⁵⁾を参考に、ジイ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は反応は問題なく進行した^{5,25)}。



スキーム 2-23 マクロラクトン環の構築

2-3-c C18-C24 セグメントの連結と脱保護

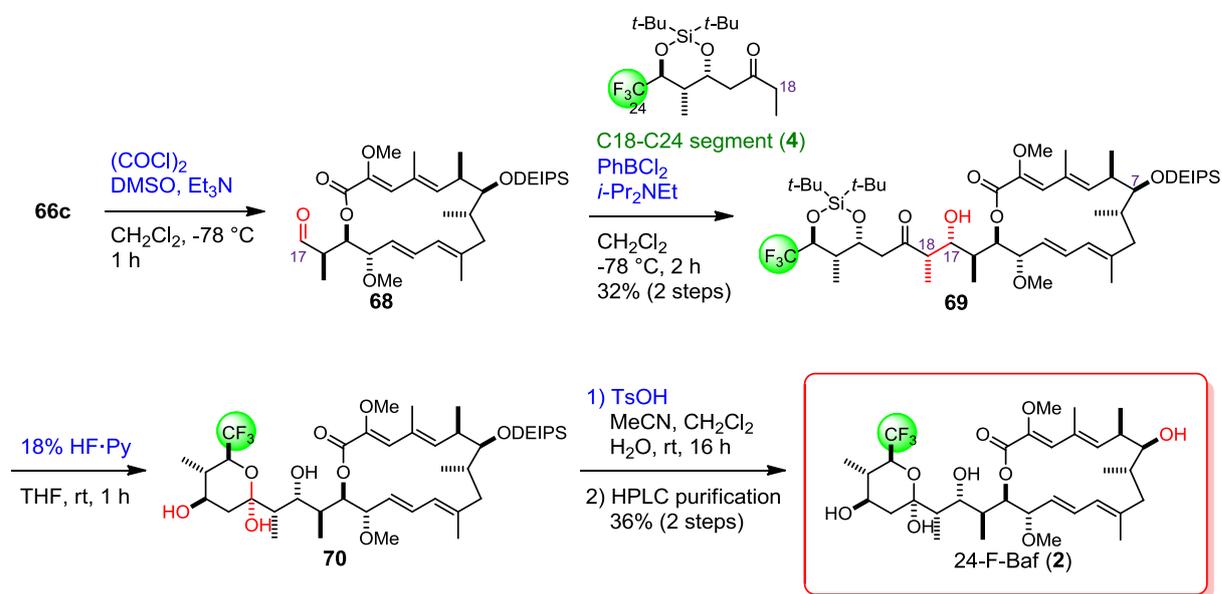
マクロラクトン環の構築が完了したので続いてフッ素を有する C18-C24 セグメント **4** との連結を検討することとし、まずは7位保護基の検討を行った(スキーム 2-24)。Toshima らは7位の保護基としてジエチルイソプロピルシリル (DEIPS) 基が鍵であると述べているが、その詳細は報告されていない⁷⁾。そこでまずはデスメチル体の合成において良好な結果を与えていた TIPS 基が7位の保護基として適当であるかを検討した。その結果、2つの不斉メチル基を有するアルコール **63** の場合、過剰量の TIPSOTf を用いる条件により収率良く保護することはできたが、デスメチル 24-F-Baf 合成の最終段階の脱保護条件であるトリ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 MMTTr 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。またトリ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。



スキーム 2-24 7位保護基の選択

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°C 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、 $^1\text{H NMR}$ の化学シフトおよび結合定数を Toshima らの報告⁷⁾および類似した構造を持つ化合物²⁸⁾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¹H 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

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 $^1\text{H NMR}$ の比較

Carbon No.	69	A	B
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 Hz)	3.81 (1H, ddd, J = 9.8, 4.0 ^b , 2.4 Hz)	3.74 (1H, ddd, J = 9.0, 3.0, 1.0 ^b Hz)
18	2.74 (1H, qd, J = 7.0, 2.5 Hz)	2.83 (1H, ddq, J = 9.2 ^c , 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 Hz)	3.30-3.19 (1H, m)

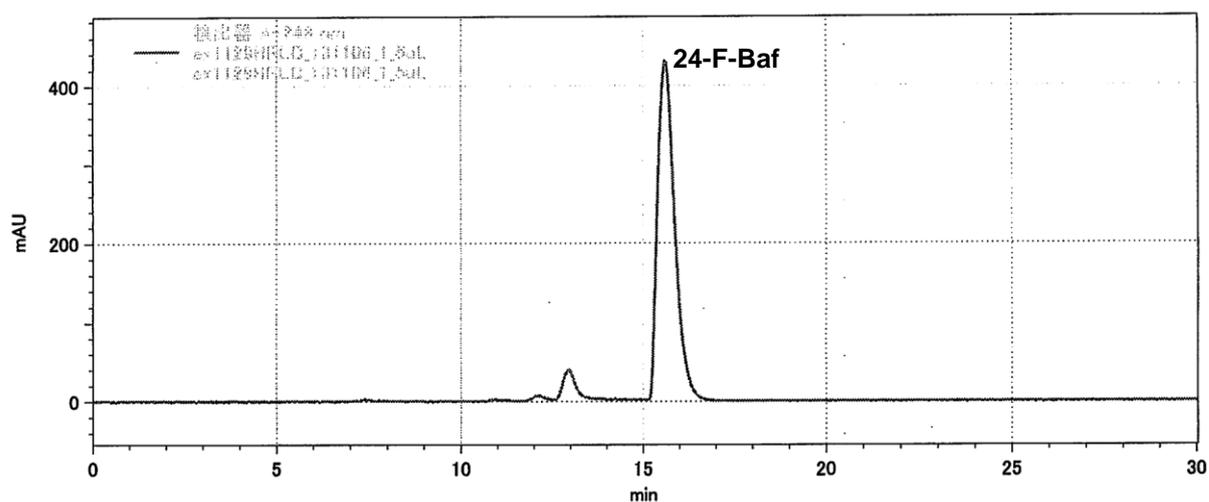


図 2-10 24-F-Baf の HPLC クロマトグラム
 精製条件 Column, 5SL-II (ϕ 10×250 mm)
 Flow rate, 2.0 mL/min
 Mobile phase, 50% EtOAc in hexane
 Detect wave length, 248 nm

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)³²⁾。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。

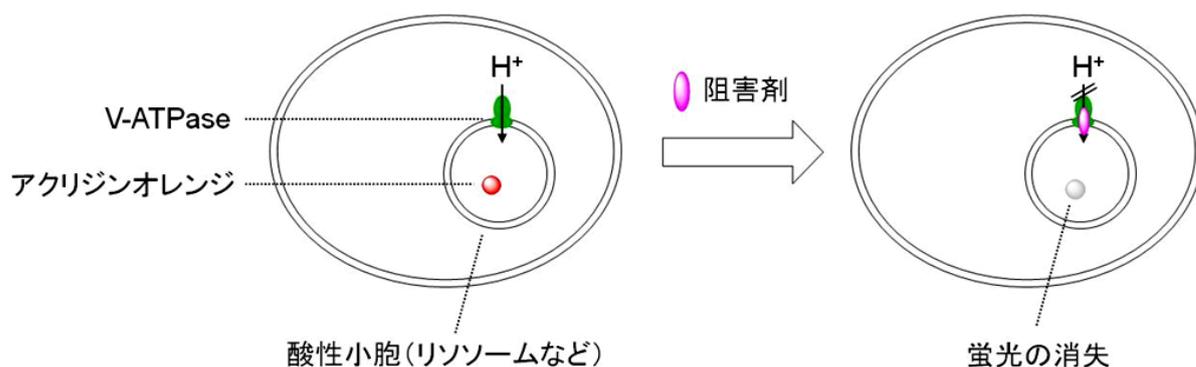


図 2-11 酸性小胞染色実験の概要

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 μ M 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。

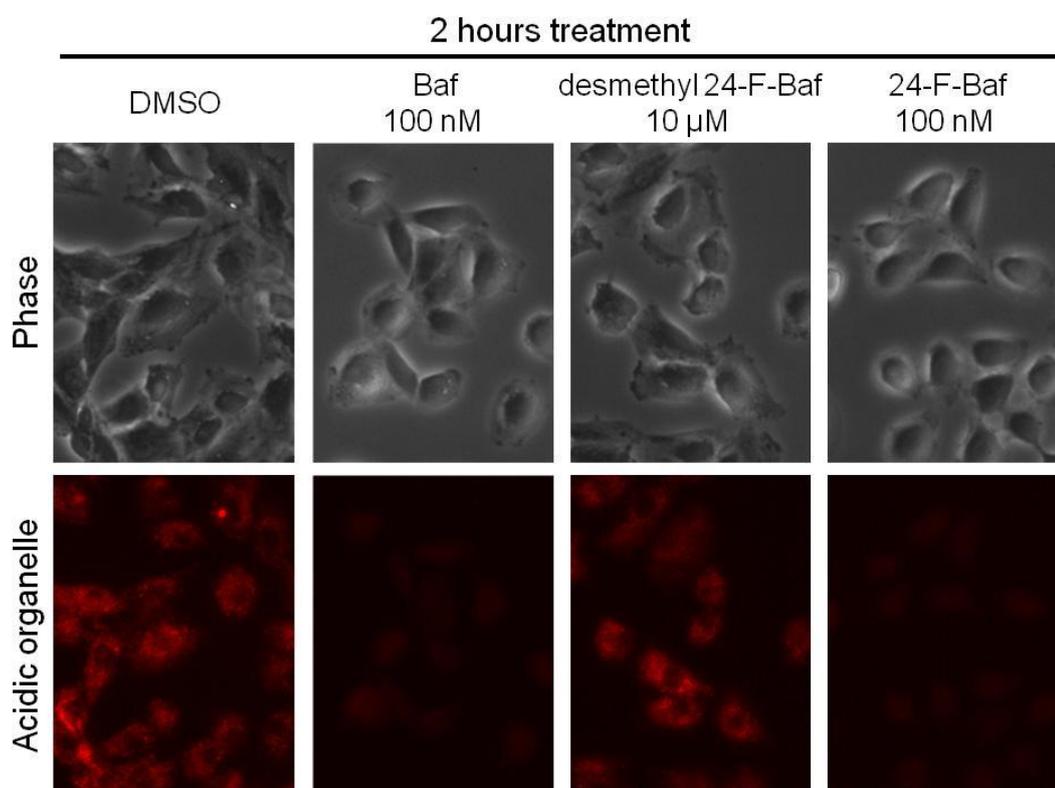


図 2-12 ラット繊維芽細胞の酸性小胞染色実験*

*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 添加時には見られず、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³³⁾。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 IC₅₀ 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、IC₅₀ 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。

表 2-4 酵母膜画分に対する V-ATPase 阻害活性試験*

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

*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³⁴⁾。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 μM 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 IC₅₀ 値を評価した。

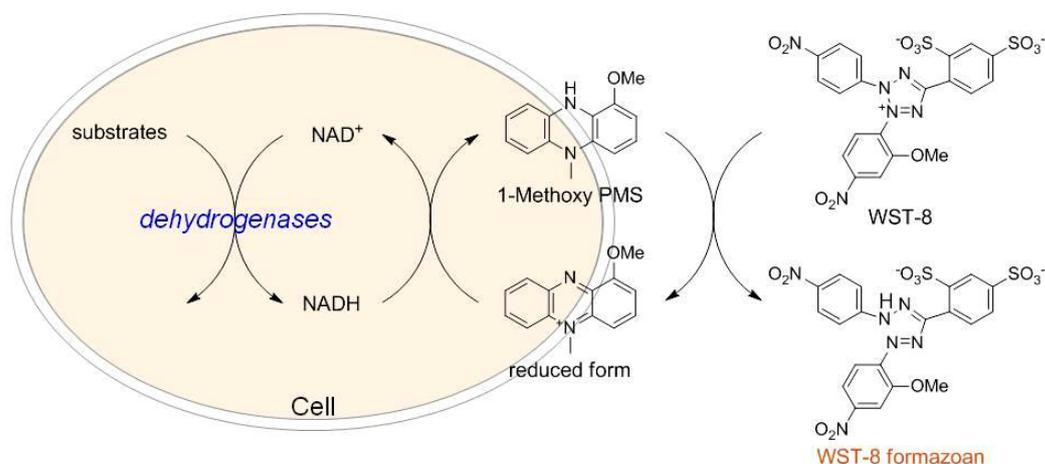


図 2-13 細胞毒性試験の概要

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 μM にかけて増殖抑制効果が見られ、 IC_{50} 値が 30 nM と強力な阻害活性を有していた。一方、デスマチル 24-F-Baf は 1 から 10 μM にかけて増殖抑制効果が見られ、 IC_{50} 値が 3 μM 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。

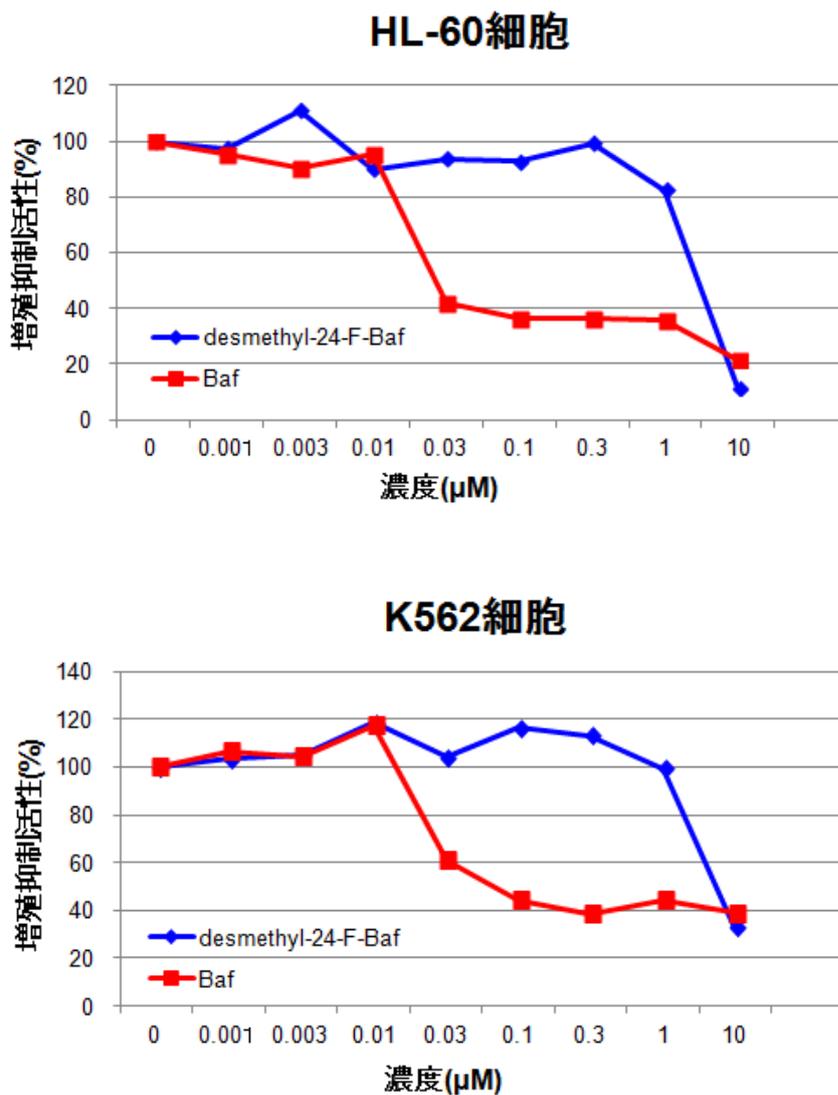


図 2-14 白血病細胞 HL-60 および K562 に対する細胞増殖抑制試験*

*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 CF₃ 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 ¹H 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、³J_{20ax,21} = 11.0 Hz, ³J_{21,22} = 11.0 Hz, ³J_{22,23} = 11.0 Hz)。さらに ¹³C 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。

表 2-5 24-F-Baf とバフィロマイシンの ^1H NMR の比較

#	^1H NMR	
	24-F-Baf	Natural ^b
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, ddq, J = 9.2, 1.0, 1.0)
6	2.56-2.49 (1H, m)	2.54 (1H, ddq, J = 9.1, 7.1, 1.9)
7	3.33-3.26 (1H, m)	3.29 (1H, dd, no J values given)
7OH	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 (1H, dd, J = 8.7, 1.4)
16	2.15 (1H, ddq, J = 10.8, 6.8, 1.4)	2.15 (1H, ddq, J = 10.8, 6.8, 1.4)
17	4.09-4.02 (1H, m)	4.13 (1H, ddd, J = 10.8, 4.1, 2.0)
17OH	4.87 (1H, d, J = 4.0)	4.66 (1H, dd, J = 4.2, 1.1)
18	1.87-1.79 (1H, m)	1.77 (1H, no multiplicity given, J = 7.0, 2.1, 1.3)
19	-	-
19OH	6.17 (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	1.31-1.20 (1H, m)	1.16 (1H, ddd, J = 12.1, 11.1, 2.2)
21	3.75 (1H, ddd, J = 11.0, 11.0, 5.0)	3.70 (1H, ddd, J = 11.2, 9.9, 4.7)
22	1.65-1.55 (1H, m)	1.33 (1H, ddq, J = 10.1, 10.1, 6.5)
23	4.04 (1H, qd, J = 11.0, 6.5)	3.49 (1H, dd, J = 10.4, 2.4)
24	-	1.88 (1H, ddq, J = 6.8, 6.8, 2.3)
25	-	0.90 (3H, d, J = 6.8)
26	1.98 (3H, s)	1.99 (3H, d, J = 1.2)
27	1.07 (3H, d, J = 7.0)	1.07 (3H, d, J = 7.1)
28	0.93 (3H, d, J = 6.0)	0.94 (3H, d, J = 6.3)
29	1.94 (3H, s)	1.94 (3H, d, J = 1.1, 1.1)
30	0.83 (3H, d, J = 7.0)	0.83 (3H, d, J = 6.9)
31	1.06 (3H, d, J = 7.0)	1.05 (3H, d, 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)

^aChemical shifts are reported in ppm relative to internal residual solvent (^1H NMR CDCl_3 , 7.26 ppm).

^bEverett *et al.* *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1989**, 1073.

表 2-6 24-F-Baf とバフィロマイシンの ^{13}C NMR の比較

#	^{13}C NMR	
	24-F-Baf	Natural ^b
1	167.4	167.3
2	141.4	141.3
3	133.2 ^c	133.7
4	133.1 ^c	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 ^c	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

^a Chemical shifts are reported in ppm relative to internal residual solvent (^{13}C NMR CDCl_3 77.0 ppm).
^b Everett *et al.* *J. Chem. Soc. Perk. Trans. 2* **1989**, 1073.
^c Not assigned

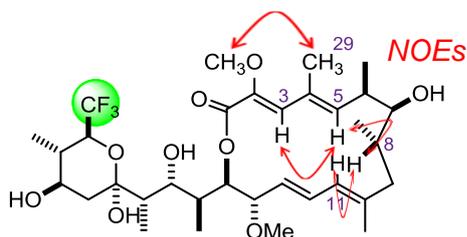


図 2-15 24-F-Baf の NOE 実験

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 ^1H および ^{13}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、 $^3J_{6,7}$ 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。

表 2-7 デスマチル 24-F-Baf と天然物の ^1H NMR の比較

#	^1H NMR		Natural ^b
	desmethyl-24-F-Baf		
1	-		-
2	-		-
3	6.41 (1H, s)		6.68 (1H, d, J = 0.8)
4	-		-
5	5.57 (1H, dd, J = 10.0, 5.0)		5.77 (1H, ddq, J = 9.2, 1.0, 1.0)
6	2.65 (1H, ddd, J = 9.0, 9.0, 3.0)		2.54 (1H, ddq, 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)
7OH	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	-		0.90 (3H, d, J = 6.8)
26	1.96 (3H, s)		1.99 (3H, d, J = 1.2)
27	-		1.07 (3H, d, J = 7.1)
28	-		0.94 (3H, d, J = 6.3)
29	1.84 (3H, s)		1.94 (3H, d, J = 1.1, 1.1)
30	0.84 (3H, d, J = 7.0)		0.83 (3H, d, J = 6.9)
31	1.06 (3H, d, J = 7.0)		1.05 (3H, d, 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 (3H, s)

^a Chemical shifts are reported in ppm relative to internal residual solvent (^1H NMR CDCl_3 7.26 ppm).

^b Everett *et al.* *J. Chem. Soc. Perk. Trans. 2* **1989**, 1073.

表 2-8 デスメチル 24-F-Baf と天然物の ^{13}C NMR の比較

#	^{13}C NMR	
	desmethyl-24-F-Baf	Natural ^b
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

^a Chemical shifts are reported in ppm relative to internal residual solvent (^1H NMR CDCl_3 77.0 ppm).
^b Everett et al. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1989**, 1073.

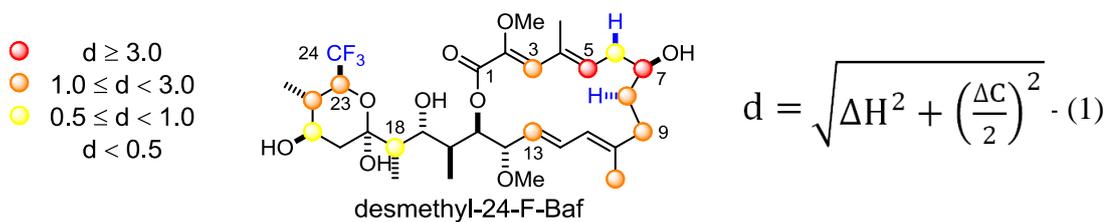


図 2-16 デスメチル 24-F-Baf と天然物の NMR データの比較

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。

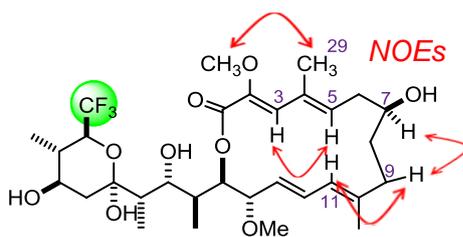
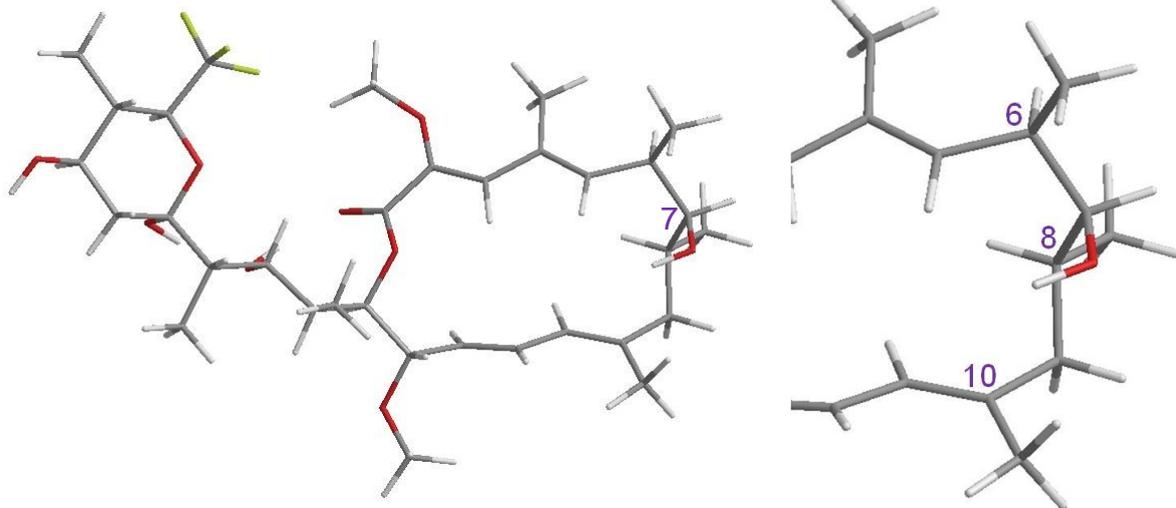


図 2-17 デスメチル 24-F-Baf の NOE 実験

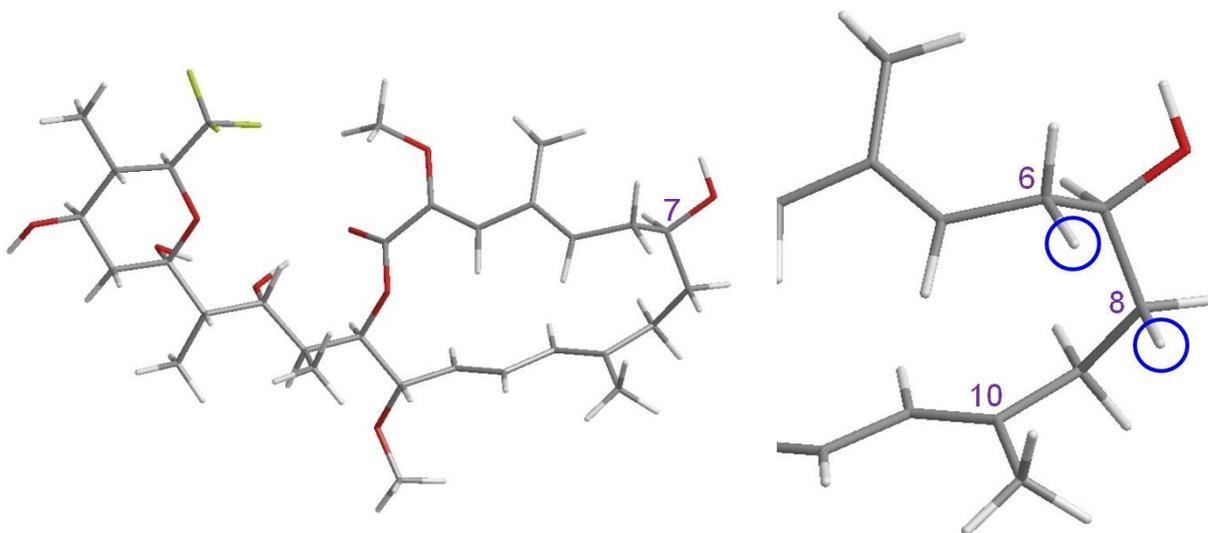
そこでより詳細な配座解析を行うために、MacroModel を用いた配座計算を行った (図 2-18)。MMFFs を力場を用いて TNCG 法により配座探索を行った後、DFT B3LYP/6-31G**を基底関数として構造最適化を行った。初期構造はバフィロマイシンの結晶構造を用い、NMR により得られた結合定数および NOE 実験により得られた距離情報を用いて制限をかけた。その結果、天然型のコンフォメーションを有する 24-F-Baf に対し、デスメチル 24-F-Baf は 6-9 位の配座が大きく異なっており、特に 8 位メチレンの立体配座が大きく変化していることが示唆された。またそれに伴い、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。

a) 24-F-Baf



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.
- 2) a) Wolf, C.; König, W. A.; Roussel, C. *Liebigs Ann.* **1995**, 781. b) Leroux, F. *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.
- 4) Nakawgawa, Y.; Yanagita, R.; Hamada, N.; Murakami, A.; Takahashi, H.; Saito, N.; Nagai, H.; Irie, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7573.
- 5) 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.
- 7) Toshima, K. Jyojima, T.; Miyamoto, N.; Katohno, M.; Nakata, M.; Matsumura, S. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 1708.
- 8) 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.; Krishnamurti, 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.
- 16) 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.
- 18) 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.; Eihorn, 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. *Tetrahedron 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.; Belfiore, 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

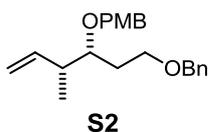
バフィロマイシンによる V-ATPase 阻害機構の詳細を解明することを最終目標に掲げ、その一つ目の重要課題である分子骨格にフッ素を導入したフッ素標識化バフィロマイシン誘導体の開発を行った。フッ素導入のしやすさ、化合物の安定性および生物活性を考慮して 24-F-Baf およびデスメチル 24-F-Baf を設計し、それらの合成法の確立を検討した。3つのセグメントを連結する収束的合成を考案し、不斉点にトリフルオロメチル基を有する 23 位の立体化学の構築、および各セグメントの効率的合成とカップリングを行うことで誘導体の合成を達成し、効率的合成法の確立に成功した。

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。

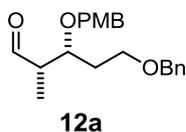
今回開発に成功した 24-F-Baf は、バフィロマイシンによる V-ATPase 阻害機構を固体 NMR を用いて分子レベルで解析するうえで、重要な分子プローブとなることが期待される。

Experimental Section

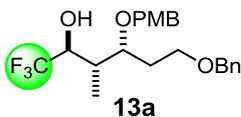
General methods for organic syntheses. All reactions sensitive to air or moisture were performed under argon atmosphere with dry glassware unless otherwise noted in particular. The dehydrated solvents, dichloromethane (CH_2Cl_2), tetrahydrofuran (THF), toluene, *N,N*-dimethylformamide (DMF) and pyridine 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 vendors, 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. ^1H - and ^{13}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 [^1H NMR, CHCl_3 (7.26); ^{13}C NMR, CDCl_3 (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**¹⁾ (4.57 g, 16.2 mmol) in toluene (108 mL) was added PMBOCNHCCl₃ (6.1 mL, 29.2 mmol) and Sc(OTf)₂ (0.80 g, 1.62 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, PMBOCNHCCl₃ (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 NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, 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); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 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).

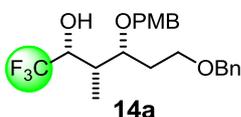


aldehyde 12a: To a solution of PMB ether **S2** (198 mg, 0.493 mmol) in THF (4.9 mL) was added DIBAL (1.04 M in hexane, 1.42 mL, 1.48 mmol) at -78 °C. After being stirred at -78 °C for 30 min, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaK-tartrate. The resulting mixture was stirred for 1 h and the aqueous layer was extracted with ether. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, 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*_f = 0.34 (hexane/EtOAc = 3/1); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 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).

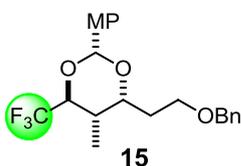


alcohol 13a: To a solution of aldehyde **12a** (326 g, 0.950 mmol) in THF (19 mL) was added TMSCF₃ (0.70 mL, 4.75 mmol) and TBAF (1.0 M in THF, 2.4 mL, 2.4 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 10 min, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NH₄Cl. The aqueous layer was extracted with ether, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, 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); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 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); ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -76.25 (d, J = 7.0 Hz).

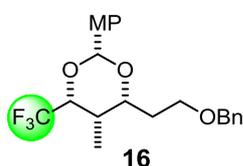


14a: R_f = 0.33 (hexane/EtOAc = 3/1); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.39-7.27 (5H, m), 7.23-7.17 (2H, m), 6.89-6.84 (2H, m), 4.52-4.37 (4H, m), 4.23-4.14 (1H, m), 3.80 (3H, s), 3.72 (1H, dt, J = 6.0, 3.0 Hz), 3.58-3.48 (1H, m), 3.27 (1H, br), 2.23-2.15 (1H, m), 2.00-1.83 (2H, m), 1.04 (3H, d, J = 7.0 Hz); ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -76.71 (J = 8.0 Hz).

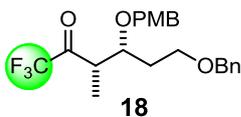


acetal 15: To a solution of alcohol **13a** (70.9 mg, 172 μmol) in CH₂Cl₂ (3.5 mL) and pH 7.0 PBS (0.7 mL) was added DDQ (137 mg, 602 μmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO₃ and Na₂SO₃. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂, and the organic layer was washed with

brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, 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); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 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); ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ -71.10 (*J* = 9.5 Hz); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 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.

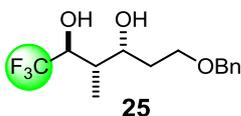


acetal 16: To a solution of alcohol **14a** (25.5 mg, 61.8 μmol) in CH₂Cl₂ (1.2 mL) and pH 7.0 PBS (0.25 mL) was added DDQ (49 mg, 216 μmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO₃ and Na₂SO₃. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, 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); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 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); ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ -74.26 (*J* = 7.0 Hz); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) 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.



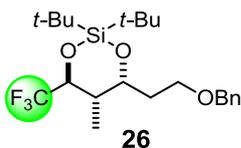
ketone 18: To a solution of alcohol **14a** (69.2 mg, 168 μmol) in CH_2Cl_2 (1.7 mL) was added NaHCO_3 (282 mg, 3.36 mmol) and DMP (0249 mg, 587 μmol) at 0 $^\circ\text{C}$. After being stirred at room temperature for 3 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO_3 and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 , and 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 = 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); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 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 μmol) in THF (0.37 mL) was added L-Selectride (1.0 M in THF, 93 μL , 92.6 μmol) at -78 $^\circ\text{C}$. 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_2SO_4 , 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 μmol , 54%) and alcohol **14a** (1.6 mg, 3.9 μmol , 13%) as colorless oils.

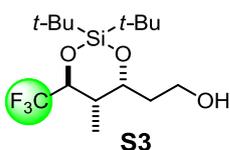


diol 25: To a solution of alcohol **13a** (60.3 mg, 146 μmol) in CH_2Cl_2 (3.0 mL) and H_2O (1.0 mL) was added DDQ (116 mg, 512 μmol) at 0 $^\circ\text{C}$. After being stirred at room temperature for 1 h, AcOH (1.0 mL) was added. The resulting mixture was stirred at 40 $^\circ\text{C}$ for 2 h and quenched with saturated aqueous NaHCO_3 and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 , and 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 = 10/1 to 3/1) afforded diol **25** (33.8 mg, 116 μmol , 79%) as

a colorless oil: $R_f = 0.39$ (hexane/EtOAc = 2/1); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 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); $^{19}\text{F NMR}$ (376 MHz, CDCl_3) δ -76.22 ($J = 8.0$ Hz).

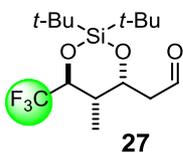


silyl ether 26: To a solution of alcohol **25** (58.9 mg, 201 μmol) in DMF (1.0 mL) was added 2,6-lutidine (94 μL , 805 μmol) and $t\text{-Bu}_2\text{Si}(\text{OTf})_2$ (99 μL , 302 μmol) at 0 $^\circ\text{C}$. After being stirred at room temperature for 2 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO_3 . The aqueous layer was extracted with ether, and 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 = 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); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) 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); $^{19}\text{F NMR}$ (470 MHz, CDCl_3) δ -77.82 ($J = 7.0$ Hz).

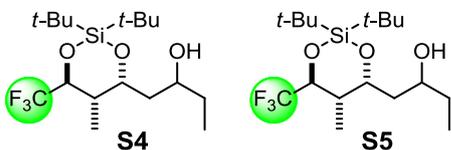


alcohol S3: To a solution of silyl ether **26** (63.3 mg, 146 μmol) in EtOAc (0.7 mL) was added 10% Pd/C (23.3 mg, 22 μmol). The resulting mixture was purged with hydrogen and stirred at room temperature for 10 h. After being filtered through Celite, the filtrate was concentrated under reduced pressure. 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); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 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_3) δ -78.28 (J = 9.0 Hz).



aldehyde 27: To a solution of alcohol **S3** (49.0 mg, 143 μmol) in CH_2Cl_2 (1.4 mL) was added NaHCO_3 (180 mg, 2.14 mmol) and DMP (182 mg, 429 μmol) at 0 $^\circ\text{C}$. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO_3 and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 , and 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 = 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); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 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); ^{19}F NMR (471 MHz, CDCl_3) δ -7.60 (J = 7.0 Hz).



alcohol S4 and S5: To a solution of aldehyde **27** (45.7 mg, 134 μmol) in THF (0.67 mL) was added EtMgBr (1.0 M in THF, 0.67 mL, 670 μmol) at 0 $^\circ\text{C}$. After being stirred at room temperature for 3 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NH_4Cl . The aqueous layer was extracted with ether, and 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 = 20/1 to 5/1) afforded alcohol **S4** (15.8 mg, 46.7 μmol , 35%) and alcohol **S5** (28.1 mg, 77.4 μmol , 58%) as colorless oils.

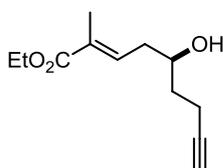
S4: R_f = 0.57 (hexane/EtOAc = 3/1); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.54-4.47 (1H, m), 4.14 (1H, double quint. J = 6.5, 2.0 Hz), 3.87-3.79 (1H, m), 3.76 (3H, s), 2.25-2.18 (1H, m), 1.74-1.63 (1H, m), 1.60-1.44 (4H, m), 1.10 (3H, dd, J = 7.0, 1.0 Hz), 1.07 (9H, s), 1.06 (9H, s), 0.96 (3H, t, J = 7.5 Hz); ^{19}F NMR (471 MHz, CDCl_3) δ -79.04 (J = 7.5 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_3\text{F}_3\text{NaSi}$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 393.2043, found: 393.2048.

S5: $R_f = 0.50$ (hexane/EtOAc = 3/1); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 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); $^{19}\text{F NMR}$ (471 MHz, CDCl_3) δ -77.58 ($J = 7.0$ Hz).



C18-C24 segment (**4**)

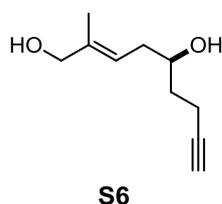
ketone 4: To a solution of alcohol **S4** and **S5** (46.0 mg, 124.1 μmol) in CH_2Cl_2 (2.4 mL) was added NaHCO_3 (156 mg, 1.86 mmol) and DMP (158 mg, 372 μmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 9 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO_3 and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 , and 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 10/1) afforded diol **4** (41.4 mg, 112 μmol , 90%) as a colorless oil: $R_f = 0.70$ (hexane/EtOAc = 3/1); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) 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); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) 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; $^{19}\text{F NMR}$ (470 MHz, CDCl_3) δ -78.15 ($J = 7.5$ Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{F}_3\text{O}_3\text{SiNa}$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 391.1887, found: 391.1890.



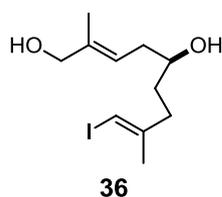
35

ester 35: To a solution of known alcohol **34**²⁾ (109 mg, 874 μmol) in CH_2Cl_2 (2.0 mL) and MeOH (2.0 mL) was bubbled O_3 gas at -78 °C for 5 min, then O_2 gas was bubbled for 10 min. SMe_2 (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 $\text{Ph}_3\text{PC}(\text{Me})\text{CO}_2\text{Et}$ (1.58 g, 4.37 mmol). After being stirred at 100 °C for 4 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NH_4Cl . The aqueous layer was extracted with ether, and 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 = 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); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 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 $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_3\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 233.1148, found: 233.1152.

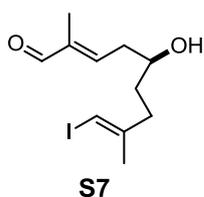


diol S6: To a solution of ester **35** (1.61 g, 8.19 mmol) in CH_2Cl_2 (82 mL) was added DIBAL (1.04 M in hexane, 31.5 mL, 32.8 mmol) at -78 °C. After being stirred at -78 °C for 15 min and at 0 °C for 15 min, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaK-tartrate. The resultant mixture was stirred for 2 h and aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 . 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 = 2/1 to 1/2) afforded diol **S6** (1.31 g, 7.81 mmol, 95%) as a colorless oil: R_f = 0.15 (hexane/EtOAc = 1/1); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 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).

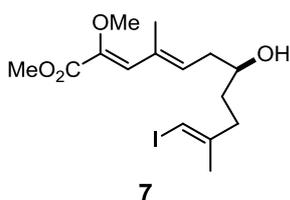


iodoolefine 36: To a solution of Cp_2ZrCl_2 (6.78 g, 23.2 mmol) in $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ (155 mL) was added AlMe_3 (2.0 M in toluene, 34.8 mL, 69.6 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 30 min, diol **S6** (1.30 g, 7.73 mmol) in $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ (26 mL) was added. The

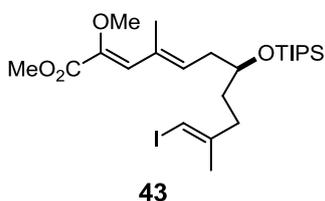
resultant mixture was stirred at 60 °C for 8 h, then cooled to -30 °C. A solution of iodine (19.6 g, 154.6 mmol) in THF (154 mL) was added and the resulting mixture was stirred at 0 °C for 1 h. The reaction mixture was carefully quenched with saturated aqueous K₂CO₃ and filtered through Celite. The filtrate was extracted with ether, and the organic layer was washed with saturated aqueous Na₂S₂O₃ and brine, then dried over anhydrous Na₂SO₄, 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); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 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 C₁₁H₁₉O₂INa [M+Na⁺] 333.0322, found: 333.0325.



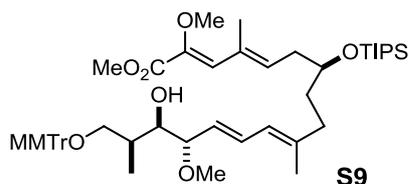
aldehyde S7: To a solution of diol **36** (1.15 g, 3.71 mmol) in CH₂Cl₂ (37 mL) and pH8.6 buffer (37 mL) was added TEMPO (58 mg, 0.370 mmol), TBACl (103 mg, 0.370 mmol) and NCS (742 mg, 5.56 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 2 h, TEMPO (29 mg, 0.185 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 1 h, then quenched with saturated aqueous NaHCO₃ and Na₂S₂O₃. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, 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); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 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).



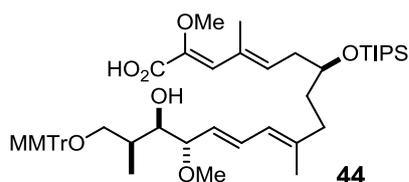
ester 7: To a solution of a known phosphate **S8**³⁾ (48.0 mg, 161 μ mol) in THF (1.6 mL) was added 18-crown-6 ether (42.6 mg, 161 μ mol) and KHMDS (0.5 M in THF, 292 μ L, 146 μ mol) at 0 °C. After being stirred at 0 °C for 30 min, a solution of aldehyde **S7** (15.6 mg, 50.6 μ mol) in THF (0.3 mL) was added at -15 °C. The resulting mixture was stirred at -15 °C for 5 h and quenched with saturated aqueous NH_4Cl . The aqueous layer was extracted with ether, and 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 = 7/1 to 2/1) afforded ester **7** (13.8 mg, 35.0 μ mol, 69%) as a colorless oil: R_f = 0.58 (hexane/EtOAc = 1/1); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 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), 1.84 (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_2Cl_2 (100 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_3 . The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 , and 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 = 100/1 to 10/1) afforded silyl ether **43** (545 mg, 0.990 mmol, quant.) as a colorless oil: R_f = 0.64 (hexane/EtOAc = 3/1); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 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).

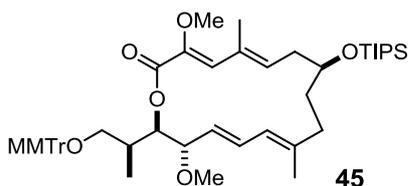


diene S9: To a solution of iodoolefine **43** (209 mg, 380 μmol) and alkenylstannane **6** (274 mg, 380 μmol) in NMP (4.5 mL) was added LiCl (64 mg, 1.52 mmol), Ph_3As (349 mg, 1.14 mmol) and $\text{Pd}_2(\text{dba})_3 \cdot \text{CHCl}_3$ (98 mg, 95 μmol) in NMP (7.6 mL). After being stirred at room temperature for 12 h, the reaction mixture was quenched with H_2O . The aqueous layer was extracted with ether, and 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 containing 10% K_2CO_3 (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); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 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).

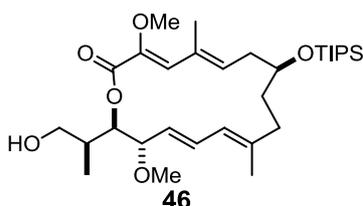


seco acid 44: To a solution of diene **S9** (262 mg, 306 μmol) in dioxane (10.2 mL) was added 1M KOH (4.6 mL, 4.60 mmol). After being stirred at 80 $^\circ\text{C}$ for 2 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NH_4Cl . The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 , and the organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 , 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); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 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).

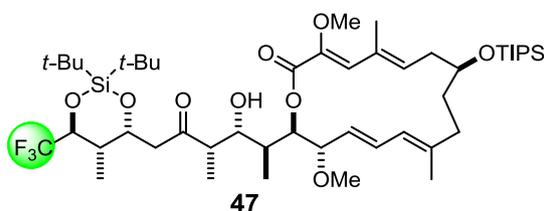


lactone 45: To a solution of seco acid **44** (185 mg, 220 μmol) in toluene (13.0 mL) was added *i*-Pr₂NEt (0.76 mL, 4.40 mmol) and 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride (0.34 mL, 2.20 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 3 h, the reaction mixture was diluted with toluene (130 mL). A 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 NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with ether, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, 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 μmol , 83%) as a colorless amorphous material: $R_f = 0.65$ (hexane/EtOAc = 3/1); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 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

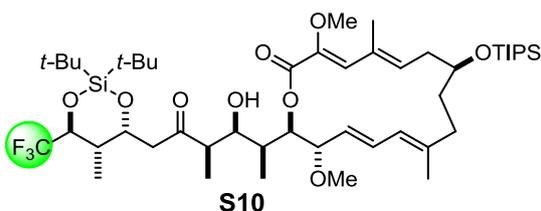
for 21 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with ether, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 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); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 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).



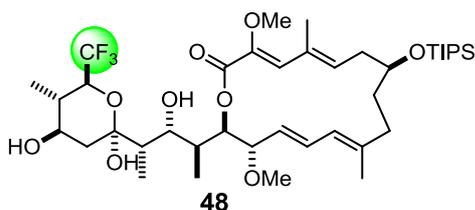
β-hydroxyketone 47: To a solution of oxalyl chloride (22 μL, 254 μmol) in CH₂Cl₂ (0.5 mL) at -78 °C was added dimethyl sulfoxide (28 μL, 382 μmol). After the reaction mixture was stirred at -78 °C for 30 min, a solution of alcohol **46** (35.0 mg, 63.5 μmol) in CH₂Cl₂ (0.25 mL) was added. The resultant 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 NH₄Cl. The aqueous layer was extracted with ether, the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, 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 CH₂Cl₂ (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 CH₂Cl₂ (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 Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column

chromatography (hexane/EtOAc = 50/1 to 5/1) afforded β -hydroxyalcohol **47** (25.0 mg, 27.2 μ mol, 43% over 2 steps) and **S10** (1.2 mg, 1.26 μ mol, 2% over 2 steps) as colorless amorphous materials.

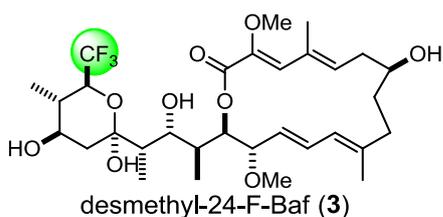
47: R_f = 0.45 (hexane/EtOAc = 3/1); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 6.50 (1H, dd, J = 15.0, 11.0 Hz), 6.43 (1H, s), 5.82 (1H, d, J = 11.0 Hz), 5.61 (1H, dd, J = 10.0, 6.0 Hz), 5.26 (1H, dd, J = 15.0, 9.0 Hz), 5.03 (1H, d, J = 9.0 Hz), 4.83-4.77 (1H, m), 4.14-4.03 (1H, m), 3.86-3.74 (2H, m), 3.65-3.55 (1H, 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); ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -78.74 (d, J = 7.0 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{83}\text{F}_3\text{O}_9\text{Si}_2\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 939.5420, found: 939.5433.



S10: R_f = 0.37 (hexane/EtOAc = 3/1); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 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); ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -78.64 (d, J = 7.5 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{83}\text{F}_3\text{O}_9\text{Si}_2\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 939.5420, found: 939.5439.

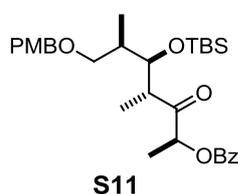


hemiacetal 48: To a solution of alcohol **47** (38.9 mg, 42.5 μmol) in THF (4.3 mL) was added 18% HF \cdot Py (42.9 μL , 425 μmol) at 0 $^{\circ}\text{C}$. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was poured into saturated aqueous NaHCO_3 . The aqueous layer was extracted 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 = 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); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 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); ^{19}F NMR (470 MHz, CDCl_3) δ -73.36 (d, J = 6.0 Hz).



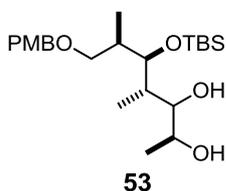
desmethyl-24-F-Baf (3): To a solution of hemiacetal **48** (33.0 mg, 42.5 μmol) in CH_2Cl_2 (0.63 mL), MeCN (3.1 mL), H_2O (0.79 mL) was added TsOH \cdot H_2O (123 mg, 650 μmol) at 0 $^{\circ}\text{C}$. After being stirred at room temperature for 3 h, TsOH \cdot H_2O (123 mg, 650 μmol) was added. The resulting mixture was stirred for 3 h and quenched with saturated aqueous NaHCO_3 . The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 , the organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 , 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

10×250 mm, eluent: hexane/EtOAc = 1/1, flow rate: 2.0 mL/min, t_R = 19.6 min) to afford demethyl-24-F-Baf **3** (15.8 mg, 25.4 μ mol, 60% over 2 steps) as a white solid: $[\alpha]_D^{23} +92.6$ (c 0.0343, CHCl₃); R_f = 0.27 (hexane/EtOAc = 1/1); IR (film) 3413, 2918, 2850, 2363, 2339, 1641, 1631, 1219, 1102, 772 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 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, 5.0 Hz), 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); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 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 = 30 Hz), 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; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ -73.36 (J = 7.0 Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for C₃₁H₄₇F₃O₉Na [M+Na⁺] 643.3064, found: 643.3070.

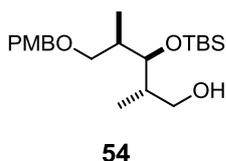


silyl ether S11: To a solution of known hydroxylketone **52**⁴⁾ (778 mg, 1.88 mmol) in CH₂Cl₂ (19 mL) was added 2,6-lutidine (0.97 mL, 8.46 μ mol) and TBSOTf (1.3 mL, 5.64 mmol) at -78 °C. After being stirred at -78 °C for 3 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, 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 μ mol, 90%) as a colorless oil: R_f = 0.72 (hexane/EtOAc = 2/1); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 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).

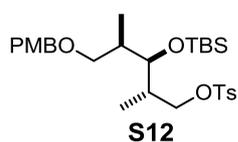


diol 53: To a solution of silyl ether **S11** (893 mg, 1.69 μ mol) in MeOH (8.5 mL) was added NaBH₄ (128 mg, 3.38 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, K₂CO₃ (934 mg, 6.76 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 20 h, and then quenched with saturated aqueous pH 7.0 phosphate buffer. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, 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); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 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).

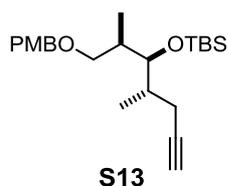


alcohol 54: To a solution of diol **53** (647 mg, 1.52 mmol) in MeOH (24 mL) and pH 7.0 phosphate buffer (8.0 mL) was added NaIO₄ (1.95 g, 9.12 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO₃ and Na₂S₂O₃. The aqueous layer was extracted with ether, and the organic layer was washed with saturated aqueous Na₂S₂O₃ and brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, 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 NaBH₄ (115 mg, 3.04 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction

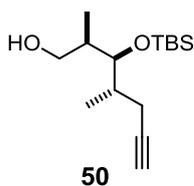
mixture was quenched with saturated aqueous NH_4Cl . The aqueous layer was extracted with ether, and the organic layer was washed with saturated aqueous $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ and brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica 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); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 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_2O . The aqueous layer was extracted with ether, and 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 = 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); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 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).

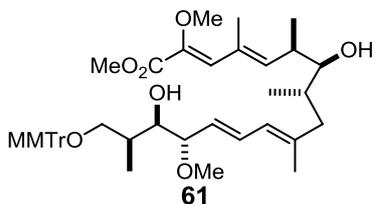


alkyne S13: To a solution of tosylate **S12** (275 mg, 0.511 mmol) in DMSO (2.6 mL) was added $\text{LiCCH}\cdot\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ (236 mg, 2.56 μmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 2 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NH_4Cl . The aqueous layer was extracted with ether, and 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 7/1) afforded alkyne **S13** (129 mg, 0.330 μmol , 64%) as a colorless amorphous material: $R_f = 0.67$ (hexane/EtOAc = 3/1); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 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).

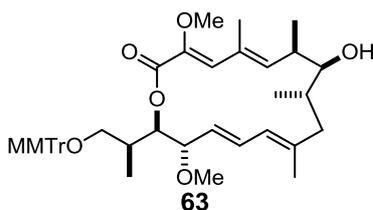


alcohol 50: To a solution of alkyne **S13** (5.81 g, 14.9 mmol) in CH_2Cl_2 (250 mL) and pH7.0 phosphate buffer (50 mL) was added DDQ (11.8 g, 52.2 mmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO_3 and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 , and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. To the residue in THF (75 mL) and MeOH (75 mL) was added NaBH_4 (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_4Cl . The aqueous layer was extracted with ether, and 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 = 20/1 to 3/1) afforded alcohol **50**⁵ (3.80 g, 14.0 mmol, 94%) as a colorless oil. The : $R_f = 0.45$ (hexane/EtOAc = 3/1); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 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.⁵

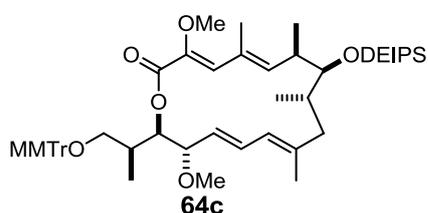


diene 61: To a solution of iodoolefine **49** (564 mg, 1.34 mmol) and alkenylstannane **6** (967 mg, 1.34 mmol) in NMP (17 mL) was added LiCl (227 mg, 5.35 mmol), Ph₃As (1.23 g, 4.01 mmol) and Pd₂(dba)₃·CHCl₃ (341 mg, 0.33 mmol) in NMP (29 mL). After being stirred at room temperature for 13 h, the reaction mixture was quenched with H₂O. The aqueous layer was extracted with ether, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography containing 10% K₂CO₃ (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); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 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).



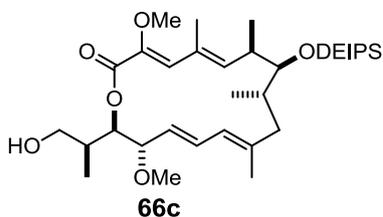
lactone 63: To a solution of diene **61** (831 mg, 1.14 mmol) in dioxane (38 mL) was added 1M KOH (17 mL, 17 mmol). After being stirred at 80 °C for 2 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NH₄Cl. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂, and the organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, 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*-Pr₂NEt (164 μ L, 0.954 mmol) and 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride (75 μ 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 NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with ether, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, 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); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 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).

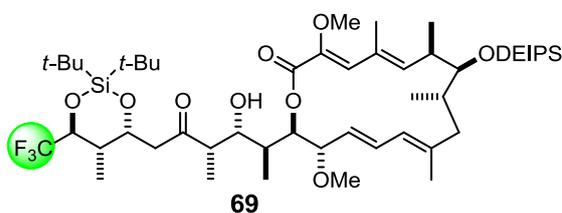


silyl ether 64c: To a solution of lactone **63** (60.1 mg, 86.5 μmol) in CH₂Cl₂ (0.9 mL) was added 2,6-lutidine (113 μL, 973 μmol) and DEIPSOTf (94 μL, 389 μmol) at 0 °C. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, 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); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 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), 3.88-3.84 (1H, m), 3.79 (3H, s), 3.66 (3H, s), 3.63 (1H, br), 3.22 (3H, s), 3.16 (1H, dd, *J* = 9.5, 5.5 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).



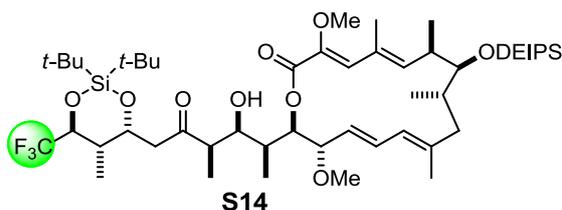
alcohol 66c: To a solution of silyl ether **64c** (60.5 mg, 73.5 μmol) in THF (1.3 mL) and MeOH (1.3 mL) was added PPTS (27.7 mg, 110 μmol) at 0 $^{\circ}\text{C}$. After being stirred at room temperature for 15 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO_3 . The aqueous layer was extracted with ether, and 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 = 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); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 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, m), 1.68 (3H, s), 1.10-0.99 (19H, m), 0.90 (3H, d, J = 7.0 Hz), 0.76-0.65 (4H, m).



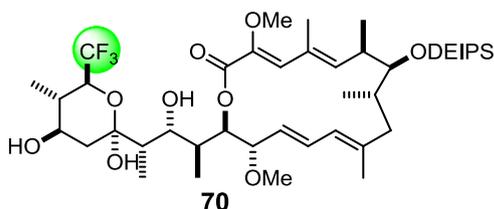
β -hydroxyketone 69: To a solution of oxalyl chloride (29 μL , 328 μmol) in CH_2Cl_2 (0.65 mL) at -78 $^{\circ}\text{C}$ was added dimethyl sulfoxide (35 μL , 493 μmol). After the reaction mixture was stirred at -78 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min, a solution of alcohol **66c** (18.1 mg, 32.8 μmol) in CH_2Cl_2 (0.25 mL) was added. The resultant mixture was stirred at -78 $^{\circ}\text{C}$ for 60 min, then triethylamine (137 μL , 987 μmol) was added. The reaction mixture was stirred at -78 $^{\circ}\text{C}$ for

15 min, then at 0 °C for 15 min, then quenched with saturated aqueous NH₄Cl. The aqueous layer was extracted with ether, the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, 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 CH₂Cl₂ (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 CH₂Cl₂ (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 Na₂SO₄, 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); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 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); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 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; ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ -78.71 (d, *J* = 7.0 Hz); HRMS (ESI-TOF) *m/z*. calcd for C₄₈H₈₃F₃O₉Si₂Na [M+Na⁺] 939.5420, found: 939.5431.

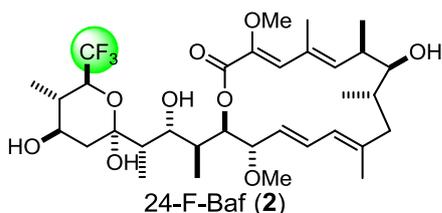


S14: $R_f = 0.23$ (hexane/EtOAc = 3/1); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.62 (1H, s), 6.45 (1H, dd, $J = 15.0, 11.0$ Hz), 5.89 (1H, d, $J = 10.5$ Hz), 5.82 (1H, d, $J = 9.5$ Hz), 5.32 (1H, dd, $J = 15.0, 7.0$ Hz), 4.93 (1H, dd, $J = 5.0, 3.0$ Hz), 4.89 (1H, dt, $J = 10.5, 3.5$ Hz), 4.11 (1H, quint, $J = 7.0$ 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); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) 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; $^{19}\text{F NMR}$ (470 MHz, CDCl_3) 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 \cdot Py (10.3 μL , 102 μmol) at 0 $^\circ\text{C}$. After being stirred at room temperature for 1 h, the reaction mixture was poured into saturated aqueous NaHCO_3 . 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 = 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); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) 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, $J = 3.0$ Hz), 4.08-4.00 (2H, m), 3.93 (1H, d, $J = 7.0$ 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, $J = 7.0$ Hz), 1.09-0.98 (16H, m), 0.85 (1H, d, $J = 7.0$ Hz), 0.77-0.66 (4H, m); ^{19}F NMR (470 MHz, CDCl_3) δ -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_2Cl_2 (38 μL), MeCN (380 μL), H_2O (95 μL) was added TsOH $\cdot\text{H}_2\text{O}$ (14.6 mg, 76.8 μmol) at 0 $^\circ\text{C}$. After being stirred at room temperature for 4 h, TsOH $\cdot\text{H}_2\text{O}$ (7.3 mg, 38.4 μmol) was added. The resulting mixture was stirred for 12 h and quenched with saturated aqueous NaHCO_3 . The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 , the organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 , 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_3); $R_f = 0.38$ (hexane/EtOAc = 1/1); IR (film) 3404, 2959, 2924, 2850, 1685, 1461, 1259, 1099, 799 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 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); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 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; ^{19}F NMR (470 MHz, CDCl_3) δ -73.36 (d, $J = 7.0$ Hz); HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{51}\text{F}_3\text{O}_9\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 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 examined⁶⁾. 3Y1 cells were treated with 100 nM Baf or 24-F-Baf for 2 hours, and stained with 5 μ 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 yeast⁷⁾. 135 μ L of the reaction mixture contained 5 μ g of vacuolar membrane vesicles, 5 mM MgCl₂, 10 mM NH₄Cl, 5 mM NaN₃, 0.1 mM Na₃VO₄ 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 μ L of 5 mM of Na₂ATP. Activity assays were run for 60 min at 37 °C. 150 μ L of 0.6 M perchloric acid was added to stop the reaction and the liberated inorganic phosphate was measured by the method of Ohnishi⁸⁾.

Growth inhibition assay against leukemia cells

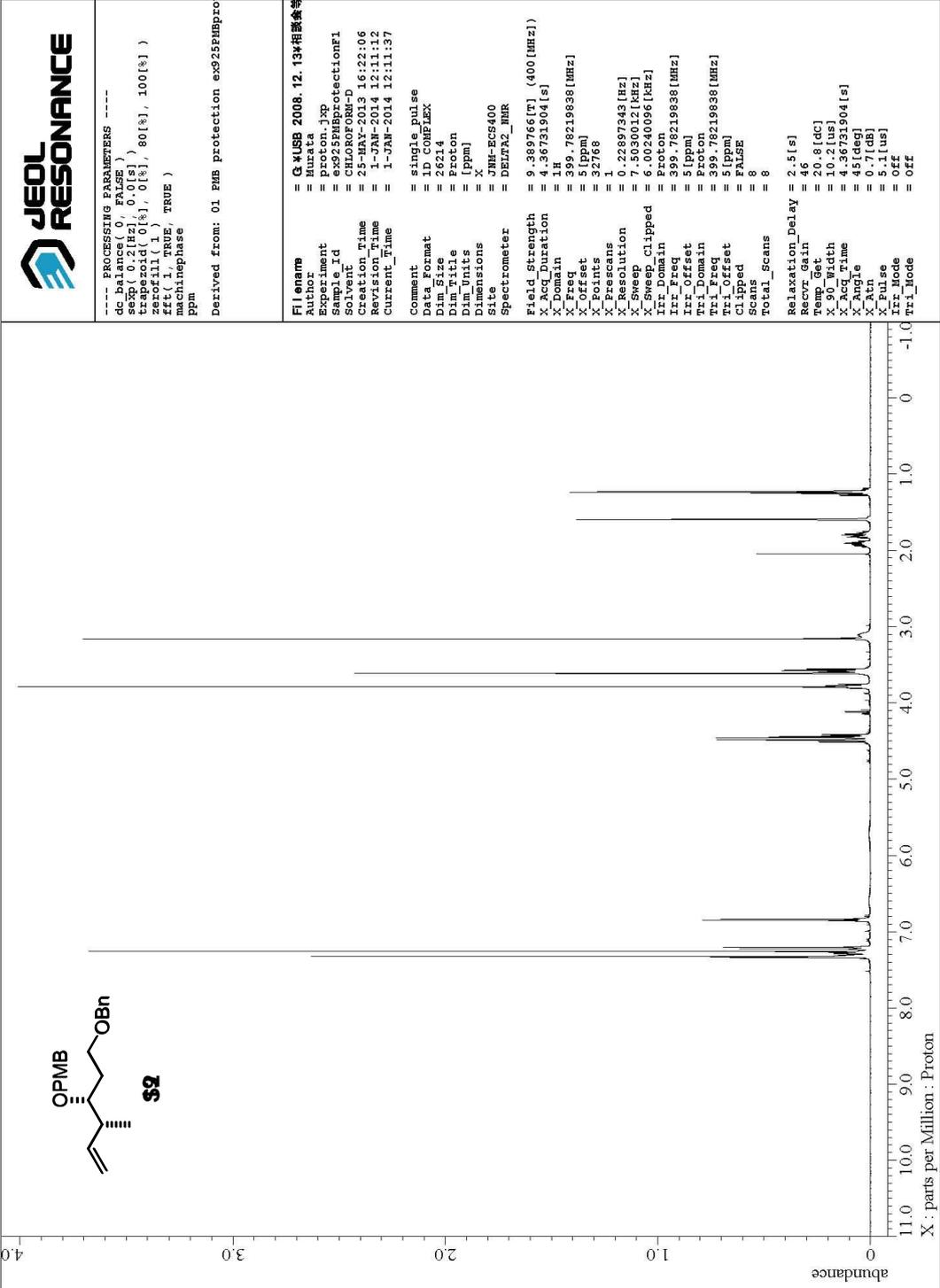
Serial dilutions (0.001-10 μ M) of inhibitors were incubated with leukemia cell lines HL-60 and K562 at 37 °C in 5% CO₂/95% air with a CO₂ incubator. After incubated for 48 h, proliferation was assessed using the Cell Counting Kit-8 (Dojindo).

***Ab initio* calculation**

X-ray crystal structure of bafilomycin¹⁰⁾ 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 ³J_{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.
- 2) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.



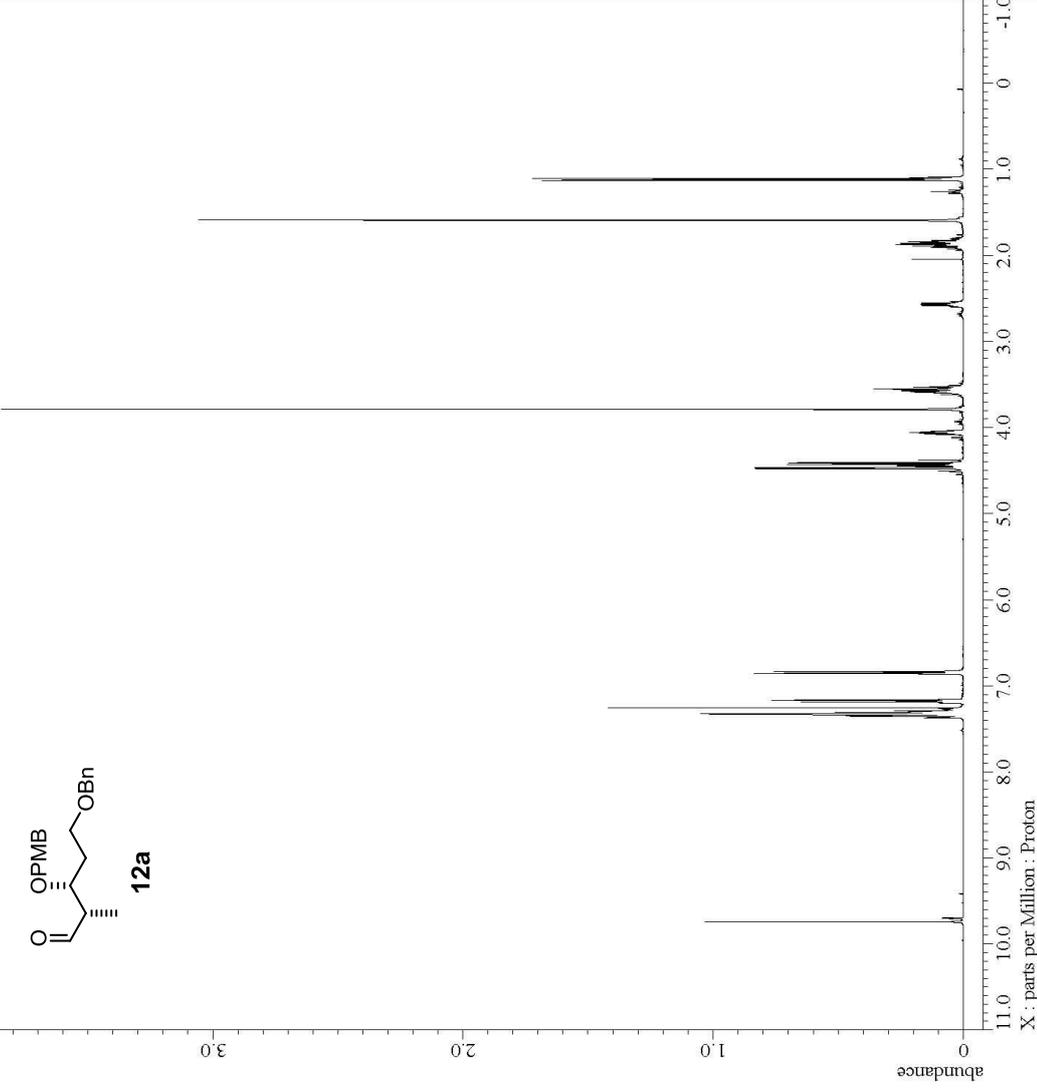
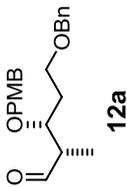


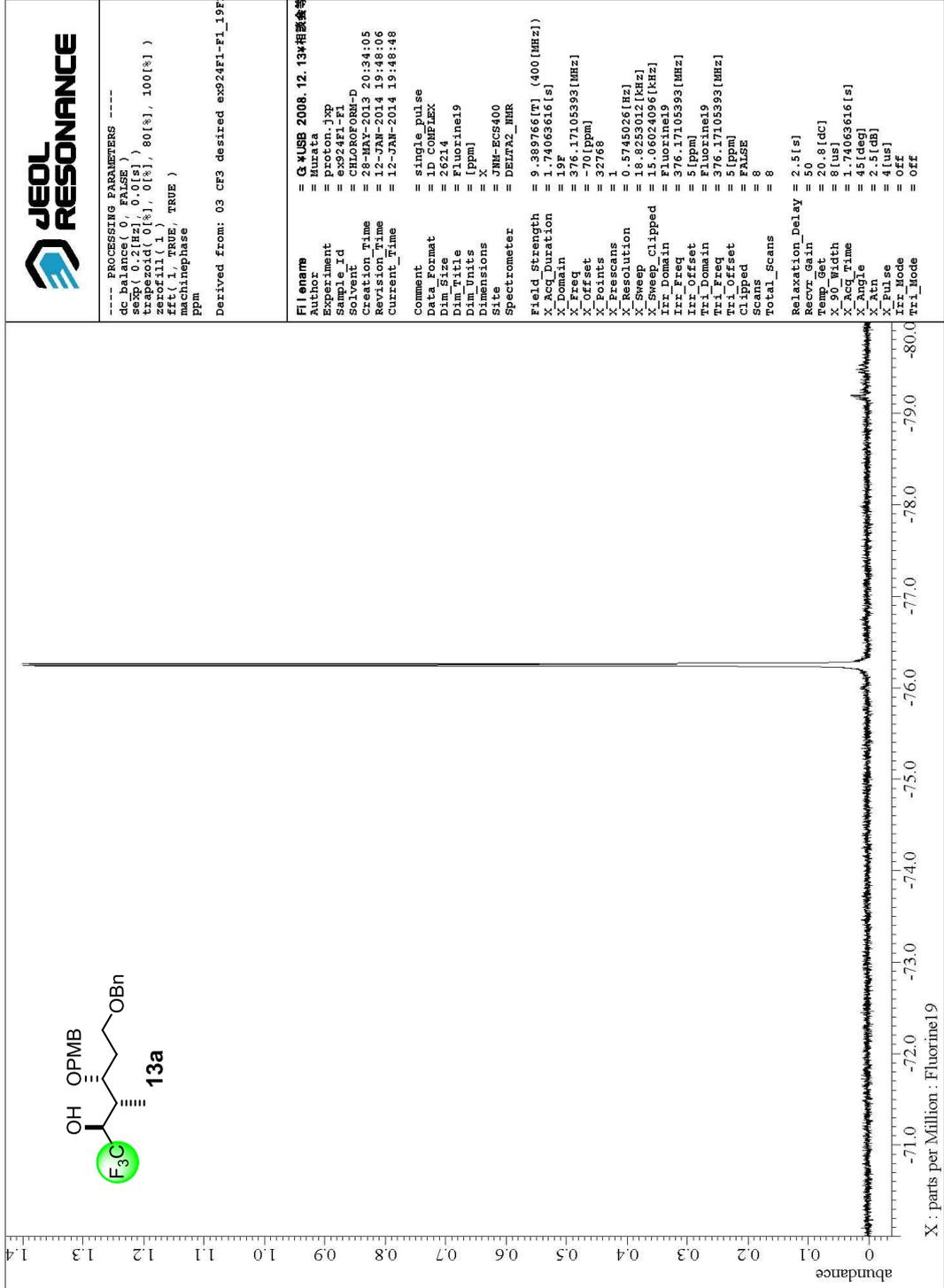
---- PROCESSING PARAMETERS ----
dc_balance(0, FALSE)
temp_offset(0.0[°C])
zerofill(1)
fft(1, TRUE, TRUE)
machinephase
ppm

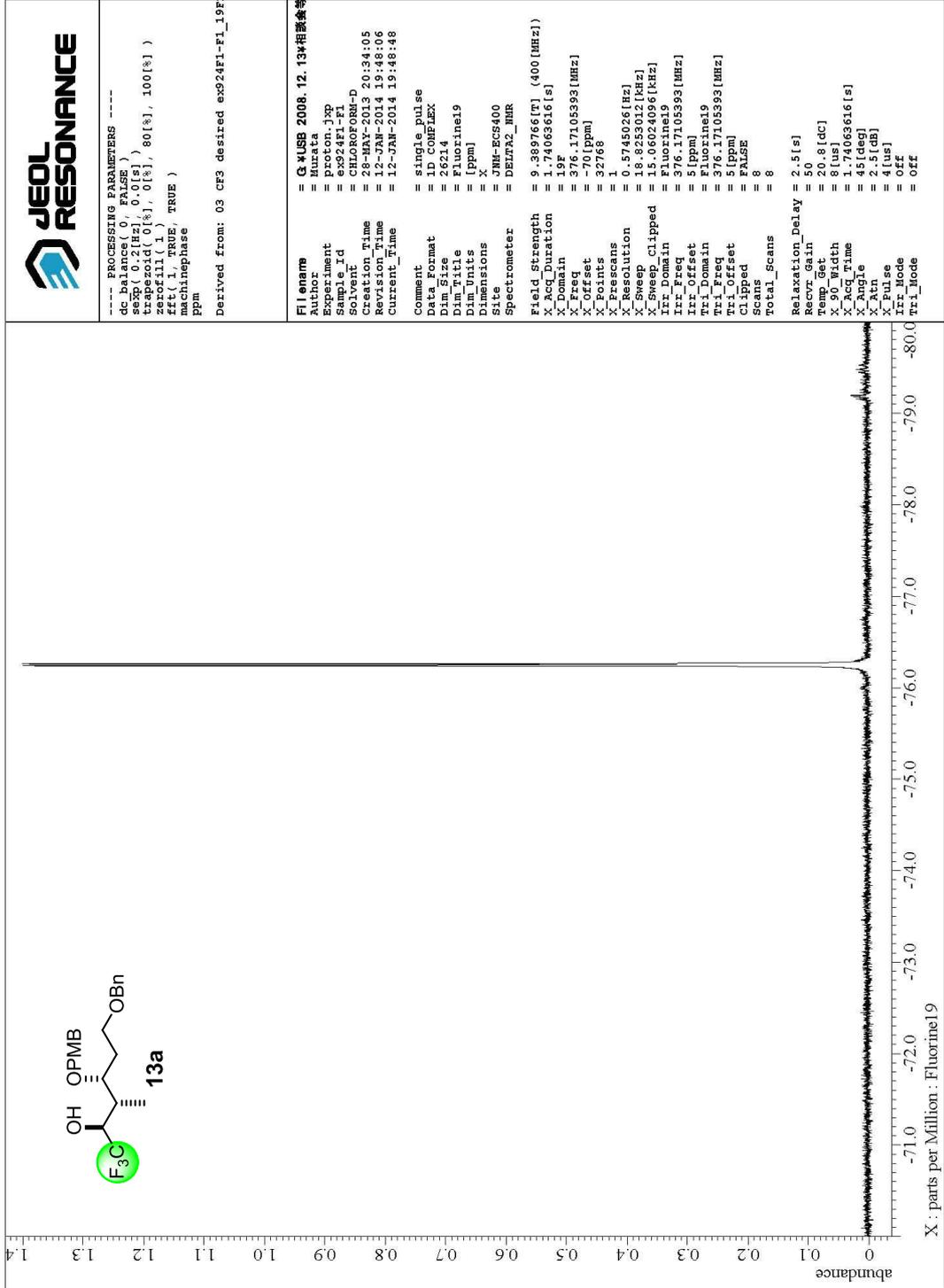
Derived from: 02_DIBAL_ex918F1_proton-1-1.j

File name = G:\USB 2008_12_13*相模倉等
Author = Murata
Experiment = proton.jsp
Sample Id = ex918F1
Solvent = CHLOROFORM-D
Creation Time = 22-MAY-2013 12:57:19
Revision Time = 12-JAN-2014 19:43:46
Current Time = 12-JAN-2014 19:44:31
Comment = single pulse
Data format = 1DHFLEX
Data size = 26214
Data title = Proton
Data units = [ppm]
Dimensions = X
Site = JNM-ECS400
Spectrometer = DELTA2_NMR

Field strength = 9.389766[T] (400 [MHz])
X_acq_duration = 4.36731904 [s]
X_domain = 1H
X_freq = 399.78219838 [MHz]
X_offset = 32768
X_prescans = 1
X_resolution = 0.22897343 [Hz]
X_sweep = 7.5030012 [kHz]
X_sweep_clipped = 6.00240096 [kHz]
Irr_domain = Proton
Irr_freq = 399.78219838 [MHz]
Irr_offset = 5 [ppm]
Tri_domain = Proton
Tri_freq = 399.78219838 [MHz]
Tri_offset = 5 [ppm]
Clipped = FALSE
Scans = 8
Total_scans = 8
Relaxation_Delay = 2.5 [s]
Recvr_gain = 44
Temp_Get = 20 [°C]
X_90_Width = 10.2 [us]
X_acq_time = 4.36731904 [s]
X_angle = 45 [deg]
X_atn = 0.7 [dB]
X_pulse = 5.1 [us]
Irr_Mode = Off
Tri_Mode = Off









```

---- PROCESSING PARAMETERS ----
dc_bbalance( 0, FALSE )
temp( 0.0 [K], 0.0 [s] )
zerofill( 1, 0 [s], 80 [s], 100 [s] )
fft( 1, TRUE, TRUE )
machinephase
ppm
  
```

Derived from: 03 CF3 undesired ex917f2_prot

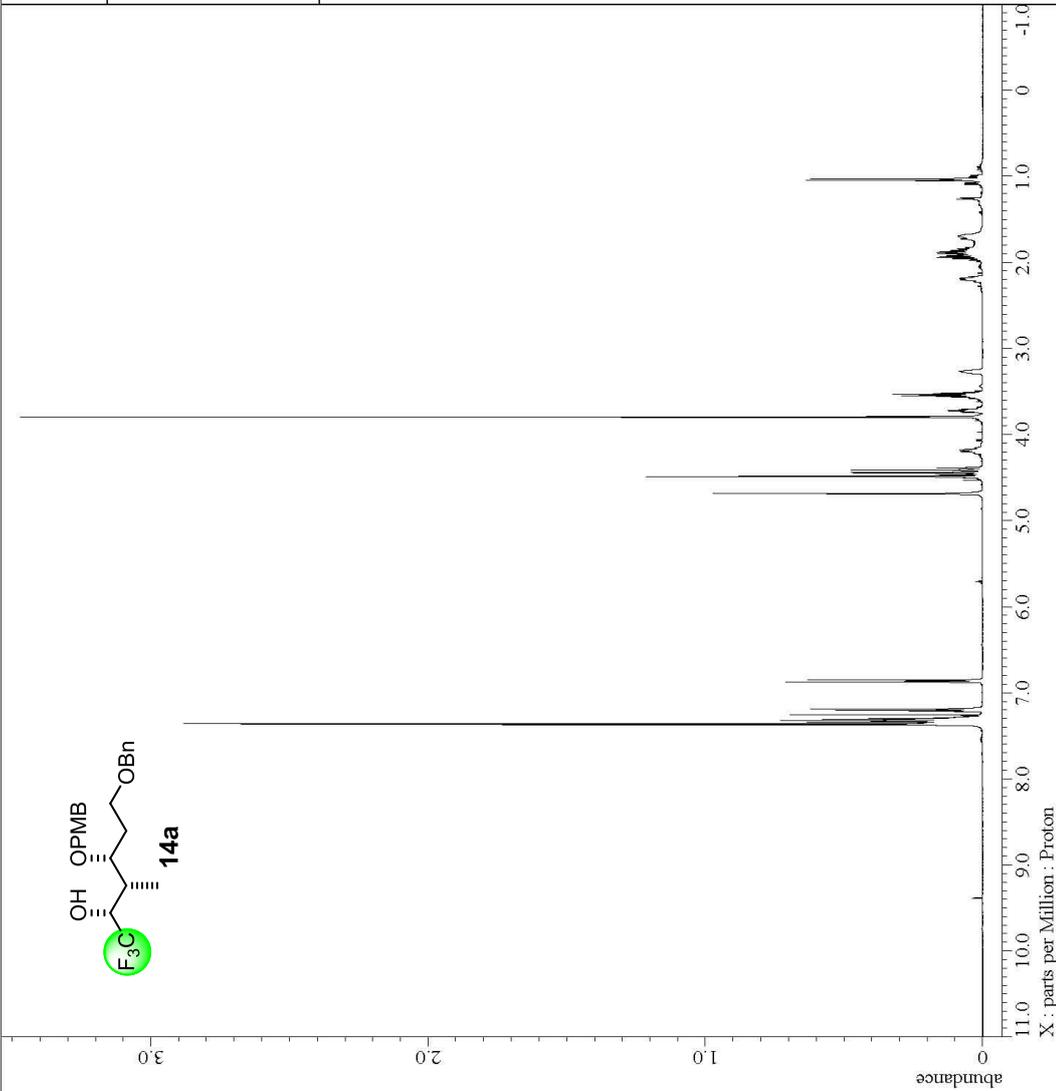
```

File name      = G:\USB 2008.12.13*相模倉等
Author         = Murata
Experiment     = proton.jsp
Sample Id      = ex917f2
Solvent        = CHLOROFORM-D
Creation Time  = 21-MAY-2013 21:02:31
Revision Time  = 12-JAN-2014 19:49:13
Current Time   = 12-JAN-2014 19:49:25

Comment       = single pulse
Data format    = 1
Pulse program  = 1
D1           = 26214
D11          = Proton
D12          = [ppm]
Dimensions    = X
Site          = JNM-ECS400
Spectrometer  = DELTA2_NMR
  
```

```

Field Strength = 9.389766 [T] (400 [MHz])
X_Acq_Duration = 4.36731904 [s]
X_Domain       = 1 H
X_Freq         = 399.78219838 [MHz]
X_Offset       = 31768
X_P1           = 32768
X_P2           = 1
X_P3           = 1
X_P4           = 1
X_P5           = 1
X_P6           = 1
X_P7           = 1
X_P8           = 1
X_P9           = 1
X_P10          = 1
X_P11          = 1
X_P12          = 1
X_P13          = 1
X_P14          = 1
X_P15          = 1
X_P16          = 1
X_P17          = 1
X_P18          = 1
X_P19          = 1
X_P20          = 1
X_P21          = 1
X_P22          = 1
X_P23          = 1
X_P24          = 1
X_P25          = 1
X_P26          = 1
X_P27          = 1
X_P28          = 1
X_P29          = 1
X_P30          = 1
X_P31          = 1
X_P32          = 1
X_P33          = 1
X_P34          = 1
X_P35          = 1
X_P36          = 1
X_P37          = 1
X_P38          = 1
X_P39          = 1
X_P40          = 1
X_P41          = 1
X_P42          = 1
X_P43          = 1
X_P44          = 1
X_P45          = 1
X_P46          = 1
X_P47          = 1
X_P48          = 1
X_P49          = 1
X_P50          = 1
X_P51          = 1
X_P52          = 1
X_P53          = 1
X_P54          = 1
X_P55          = 1
X_P56          = 1
X_P57          = 1
X_P58          = 1
X_P59          = 1
X_P60          = 1
X_P61          = 1
X_P62          = 1
X_P63          = 1
X_P64          = 1
X_P65          = 1
X_P66          = 1
X_P67          = 1
X_P68          = 1
X_P69          = 1
X_P70          = 1
X_P71          = 1
X_P72          = 1
X_P73          = 1
X_P74          = 1
X_P75          = 1
X_P76          = 1
X_P77          = 1
X_P78          = 1
X_P79          = 1
X_P80          = 1
X_P81          = 1
X_P82          = 1
X_P83          = 1
X_P84          = 1
X_P85          = 1
X_P86          = 1
X_P87          = 1
X_P88          = 1
X_P89          = 1
X_P90          = 1
X_P91          = 1
X_P92          = 1
X_P93          = 1
X_P94          = 1
X_P95          = 1
X_P96          = 1
X_P97          = 1
X_P98          = 1
X_P99          = 1
X_P100         = 1
  
```

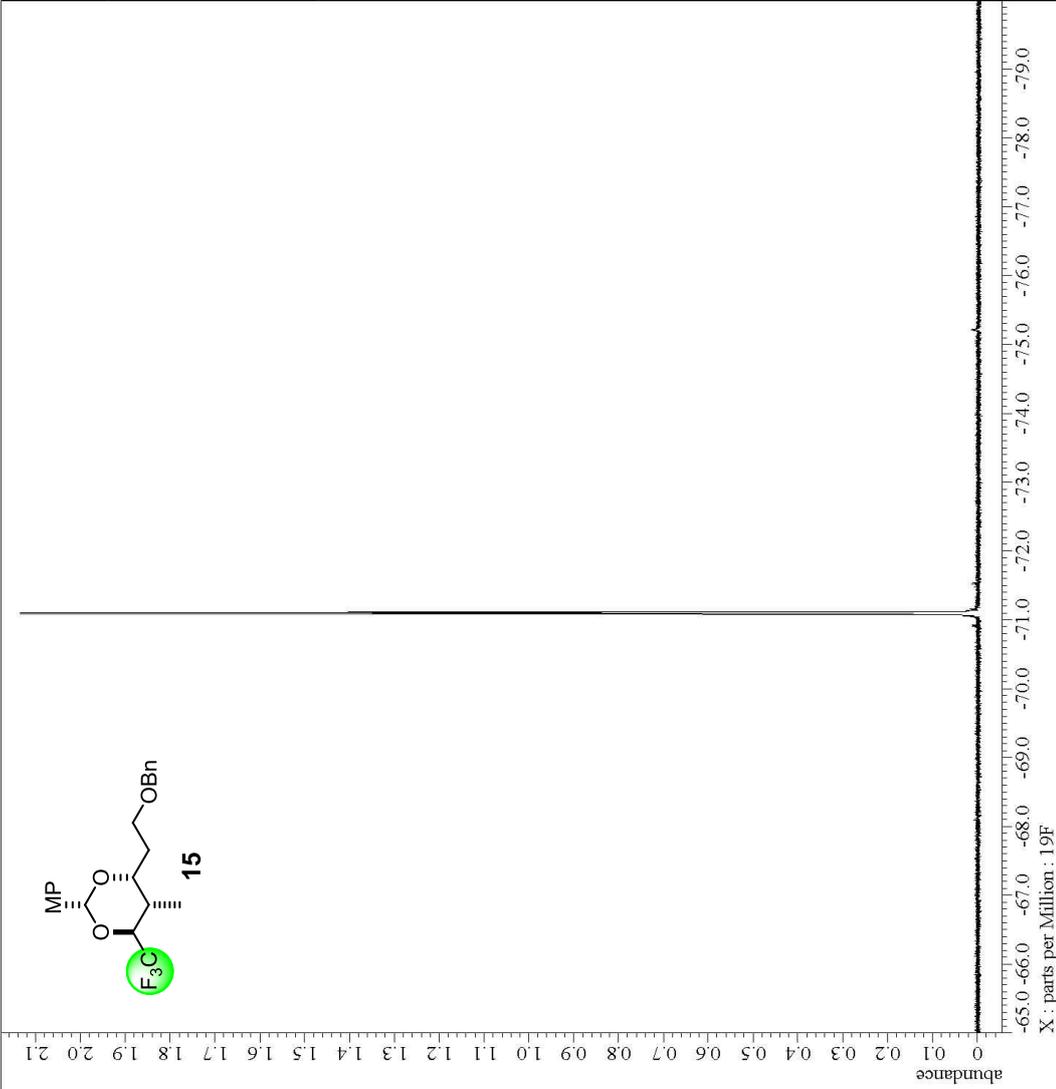
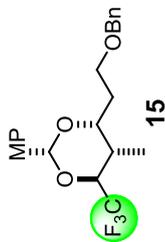




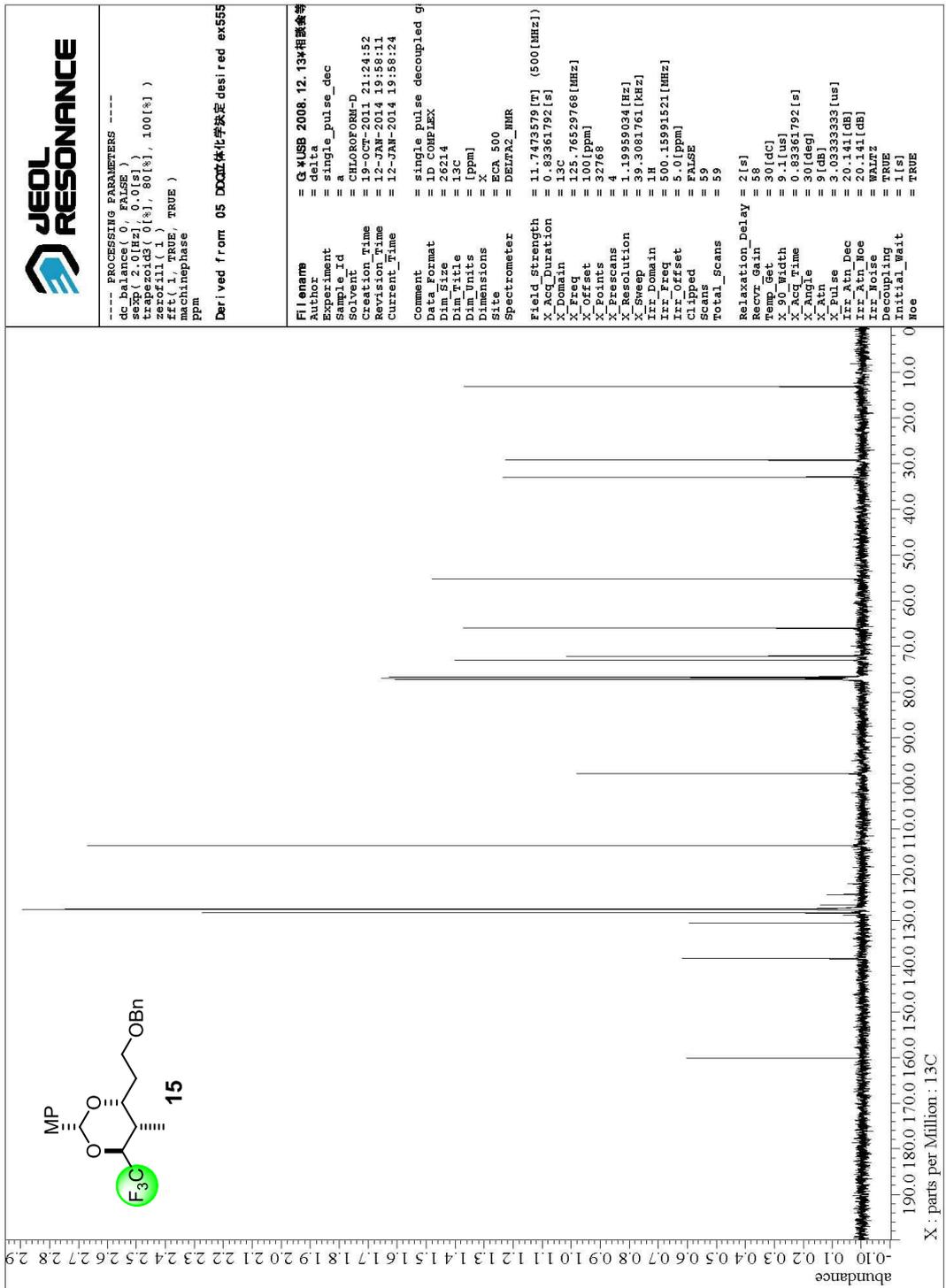
---- PROCESSING PARAMETERS ----
dc_balance(0, FALSE)
temp(0.0 Hz, 0.00)
temp_der(0.0 Hz, 0.00)
zerofill(1)
fft(1, TRUE, TRUE)
machinephase
ppm

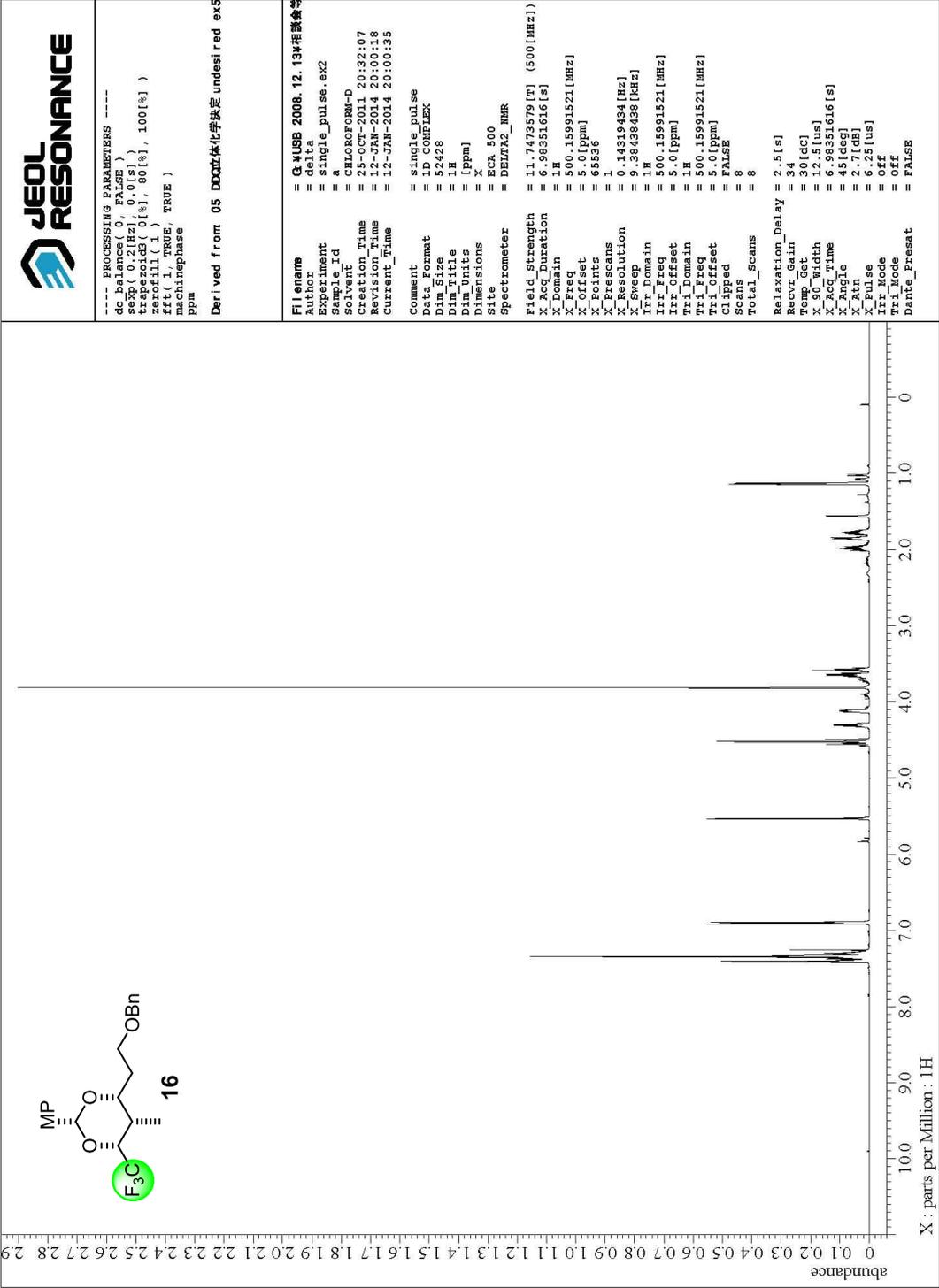
Derived from 05 DDCX液体化学决定 desired ex555

File name = G:\USB 2008.12.13\相融含等
Author = delta
Experiment = single_pulse.ex2
Sample Id = a
Solvent = CHLOROFORM-D
Creation Time = 19-OCT-2011 12:49:44
Revision Time = 12-JAN-2014 19:57:04
Current Time = 12-JAN-2014 19:57:11
Comment = single pulse
Data format = 19F, 1H, 13C
Data size = 52428
Data size = 19F
Dim title = [ppm]
Dim units = X
Dimensions = X
Site = ECA 500
Spectrometer = DELTA2_HHR
Field strength = 11.7473579 [T] (500 [MHz])
X_acq_duration = 2.7787264 [s]
X_domain = 19F
X_freq = 470.62046084 [MHz]
X_offset = 65590 [ppm]
X_prescans = 1
X_resolution = 0.3598771 [Hz]
X_sweep = 23.58490566 [kHz]
Irr_domain = 19F
Irr_freq = 470.62046084 [MHz]
Irr_offset = 5 [ppm]
Tri_domain = 19F
Tri_freq = 470.62046084 [MHz]
Tri_offset = 5 [ppm]
Clipped = FALSE
Scans = 8
Total_scans = 8
Relaxation_Delay = 2.5 [s]
Recvr_gain = 56
Temp_Get = 30 [dC]
X_90_Width = 13.3 [us]
X_acq_Time = 2.7787264 [s]
X_Angle = 45 [deg]
X_Atn = 2.7 [dB]
X_Pulse = 6.65 [us]
Tri_Mode = Off
Dante_Preset = FALSE



X: parts per Million : 19F





```

---- PROCESSING PARAMETERS ----
dc Balance( 0, FALSE )
temp 0.0[Hz]
temp 0.0[Hz]
zerofill( 1 )
fft( 1, TRUE, TRUE )
machinephase
ppm

```

Derived from 05 DDCX体化学决定 undesired ex5

```

File name      = G:\USB 2008.12.13*相模奈等
Author         = delta
Experiment     = single_pulse.ex2
Sample Id     = a
Solvent       = CHLOROFORM-D
Creation Time  = 25-OCT-2011 20:32:07
Revision Time  = 12-JAN-2014 20:00:18
Current Time   = 12-JAN-2014 20:00:35

Comment       = single pulse
Dirname       = 12MPLEX
Dim Size      = 52428
Dim Title     = 1H
Dim Units     = [ppm]
Dimensions    = X
Site          = ECA 500
Spectrometer  = DELTA2_HMR

Field Strength = 11.7473579 [T] (500[MHz])
X_Acq_Duration = 1H
X_Domain       = 1H
X_Freq         = 500.15991521[MHz]
X_Offset       = 65550
X_Prescans    = 1
X_Resolution   = 0.14319434[Hz]
X_Sweep        = 9.38438438[KHz]
Irr_Domain    = 1H
Irr_Freq      = 500.15991521[MHz]
Irr_Offset    = 5.0[ppm]
Tri_Domain    = 1H
Tri_Freq      = 500.15991521[MHz]
Tri_Offset    = 5.0[ppm]
Clipped       = FALSE
Scans         = 6
Total_Scans   = 8
Relaxation_Delay = 2.5[s]
Recvr_Gain    = 34
Temp_Get      = 30[degC]
X_90_Width    = 12.5[us]
X_Acq_Time    = 6.98351616[s]
X_Angle       = 45[deg]
X_Atn         = 2.7[dB]
X_Pulse       = 6.25[us]
Irr_Mode      = Off
Tri_Mode      = Off
Dante_Preset  = FALSE

```

```

---- PROCESSING PARAMETERS ----
dc_balance( 0, FALSE )
temp( 0.0 Hz, 0.00 )
temp_coef( 0.0000000000000000 )
zerofill( 1 )
fft( 1, TRUE, TRUE )
machinephase
ppm
  
```

Derived from 05 DDCX液体化学决定 undesired ex5

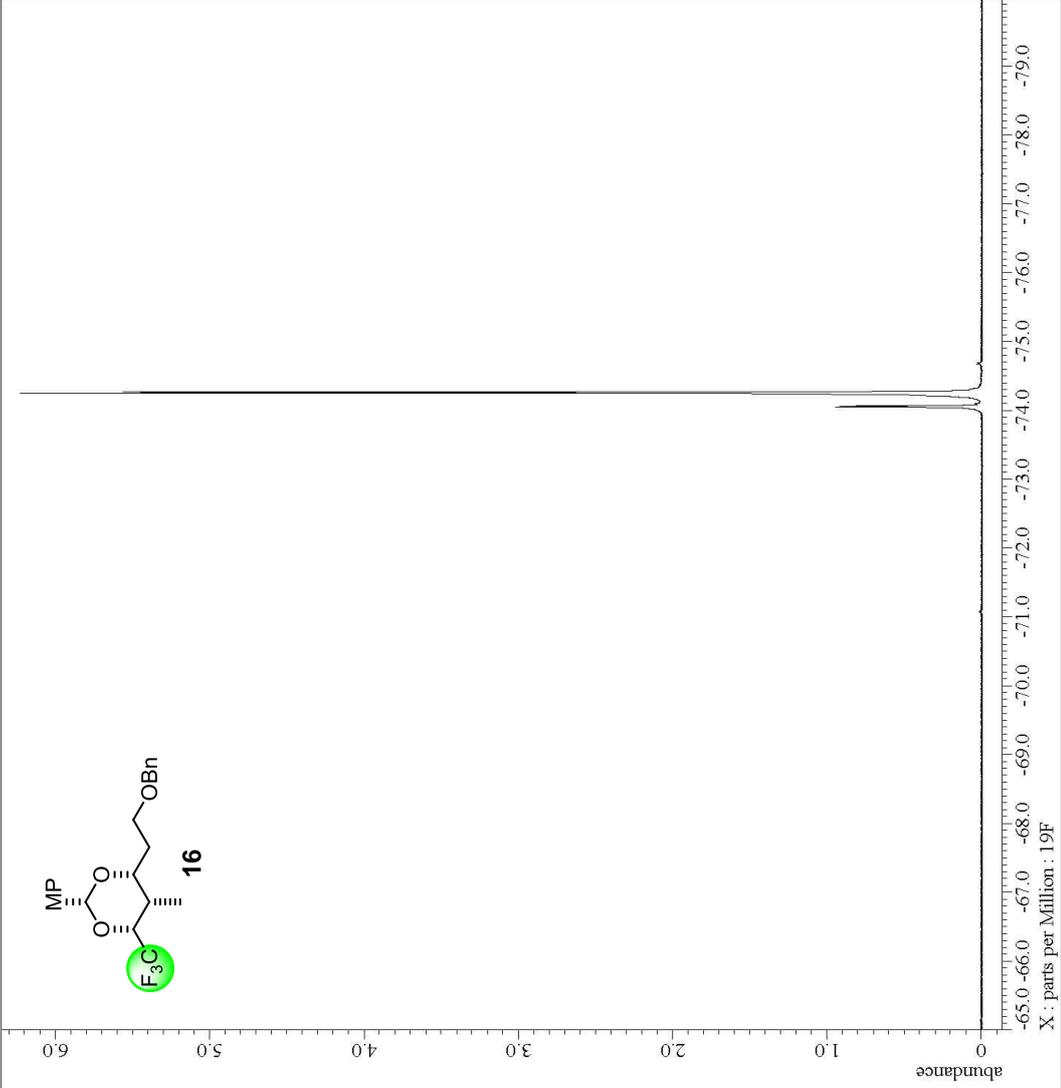
```

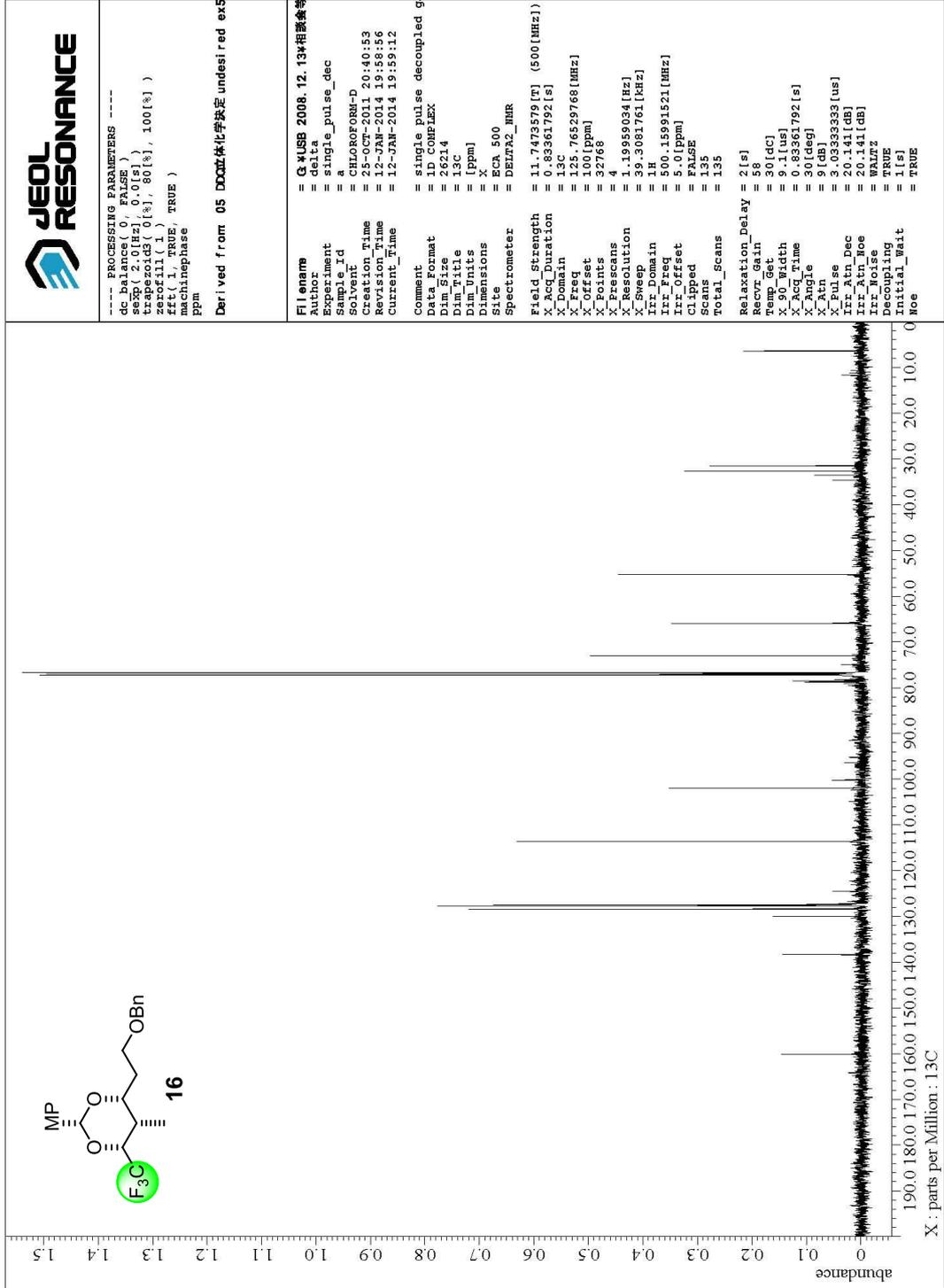
File name      = G:\USB 2008.12.13*相融含等
Author         = delta
Experiment     = single_pulse.ex2
Sample Id      = a
Solvent        = CHLOROFORM-D
Creation Time  = 26-OCT-2011 07:13:42
Revision Time  = 12-JAN-2014 19:59:25
Current Time   = 12-JAN-2014 19:59:46

Comment       = single pulse
Dirname       = 1\MP\FEX
Dim Size      = 52428
Dim Title     = 19F
Dim Units     = [ppm]
Dimensions    = X
Site          = ECA 500
Spectrometer  = DELTA2_HMR
  
```

```

Field Strength = 11.7473579 [T] (500 [MHz])
X_Acq_Duration = 2.7787264 [s]
X_Domain       = 19F
X_Freq         = 470.62046084 [MHz]
X_Offset       = 0.00000000 [ppm]
X_P1          = 65590
X_P2          = 1
X_P3          = 1
X_P4          = 1
X_P5          = 1
X_P6          = 1
X_P7          = 1
X_P8          = 1
X_P9          = 1
X_P10         = 1
X_P11         = 1
X_P12         = 1
X_P13         = 1
X_P14         = 1
X_P15         = 1
X_P16         = 1
X_P17         = 1
X_P18         = 1
X_P19         = 1
X_P20         = 1
X_P21         = 1
X_P22         = 1
X_P23         = 1
X_P24         = 1
X_P25         = 1
X_P26         = 1
X_P27         = 1
X_P28         = 1
X_P29         = 1
X_P30         = 1
X_P31         = 1
X_P32         = 1
X_P33         = 1
X_P34         = 1
X_P35         = 1
X_P36         = 1
X_P37         = 1
X_P38         = 1
X_P39         = 1
X_P40         = 1
X_P41         = 1
X_P42         = 1
X_P43         = 1
X_P44         = 1
X_P45         = 1
X_P46         = 1
X_P47         = 1
X_P48         = 1
X_P49         = 1
X_P50         = 1
X_P51         = 1
X_P52         = 1
X_P53         = 1
X_P54         = 1
X_P55         = 1
X_P56         = 1
X_P57         = 1
X_P58         = 1
X_P59         = 1
X_P60         = 1
X_P61         = 1
X_P62         = 1
X_P63         = 1
X_P64         = 1
X_P65         = 1
X_P66         = 1
X_P67         = 1
X_P68         = 1
X_P69         = 1
X_P70         = 1
X_P71         = 1
X_P72         = 1
X_P73         = 1
X_P74         = 1
X_P75         = 1
X_P76         = 1
X_P77         = 1
X_P78         = 1
X_P79         = 1
X_P80         = 1
X_P81         = 1
X_P82         = 1
X_P83         = 1
X_P84         = 1
X_P85         = 1
X_P86         = 1
X_P87         = 1
X_P88         = 1
X_P89         = 1
X_P90         = 1
X_P91         = 1
X_P92         = 1
X_P93         = 1
X_P94         = 1
X_P95         = 1
X_P96         = 1
X_P97         = 1
X_P98         = 1
X_P99         = 1
X_P100        = 1
  
```



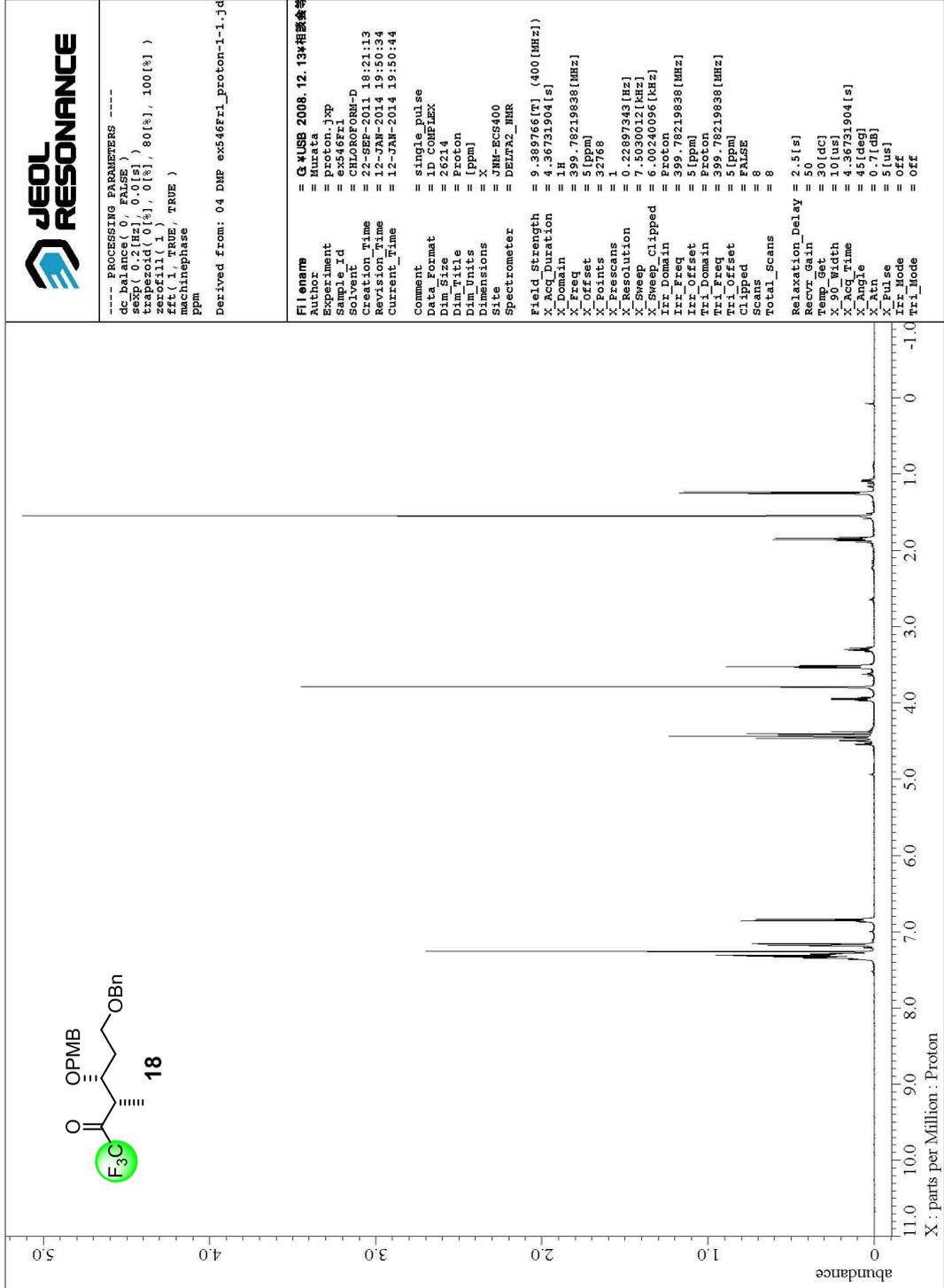


---- PROCESSING PARAMETERS ----
 dc_balance(0, FALSE)
 freq(125.76529768 [MHz])
 zerofill(1) ([s], 60 [s], 100 [s])
 fft(1, TRUE, TRUE)
 machinephase
 ppm

Derived from 05 DDCX 砷体化学决定 undesired ex5

File name = G:\USB 2008.12.13*相族含等
Author = delta
Experiment = single_pulse_dec
Sample Id = a
Solvent = CHLOROFORM-D
Creation Time = 25-OCT-2011 20:40:53
Revision Time = 12-JAN-2014 19:58:56
Current Time = 12-JAN-2014 19:59:12
Comment = single pulse decoupled g
Dir Name = 13CMPLEX
Dir Size = 26214
Dim Title = 13c
Dim Units = [ppm]
Dimensions = X
Site = ECA 500
Spectrometer = DELTA2_HMR

Field Strength = 11.7473579 [T] (500 [MHz])
X_Acq Duration = 0.83361792 [s]
X_Domain = 13C
X_Freq = 125.76529768 [MHz]
X_Offset = 32769 [ppm]
X_P1 = 4
X_P1scans = 4
X_Resolution = 1.19959034 [Hz]
X_Sweep = 39.3081761 [kHz]
Irr Domain = 1H
Irr Freq = 500.15991521 [MHz]
Irr_Offset = 5.0 [ppm]
Clipped = FALSE
Scans = 135
Total Scans = 135
Relaxation_Delay = 2 [s]
Recv Gain = 30 [dB]
X_90_Width = 9.1 [us]
X_Acq Time = 0.83361792 [s]
X_Angle = 30 [deg]
X_Atn = 9 [dB]
X_Pulse = 3.03333333 [us]
Irr_Atn Dec = 20.141 [dB]
Irr_Atn Noe = 20.141 [dB]
Irr Noise = WALTZ
Decoupling = TRUE
Initial_Wait = 1 [s]
Noe = TRUE





```

---- PROCESSING PARAMETERS ----
dc balance( 0, FALSE )
temp 0.2 [M], 0.0 [S]
zerofill( 1 )
fft( 1, TRUE, TRUE )
machinephase
ppm

```

Derived from: 06 AcOH ex935F1_proton-1-1.jd

```

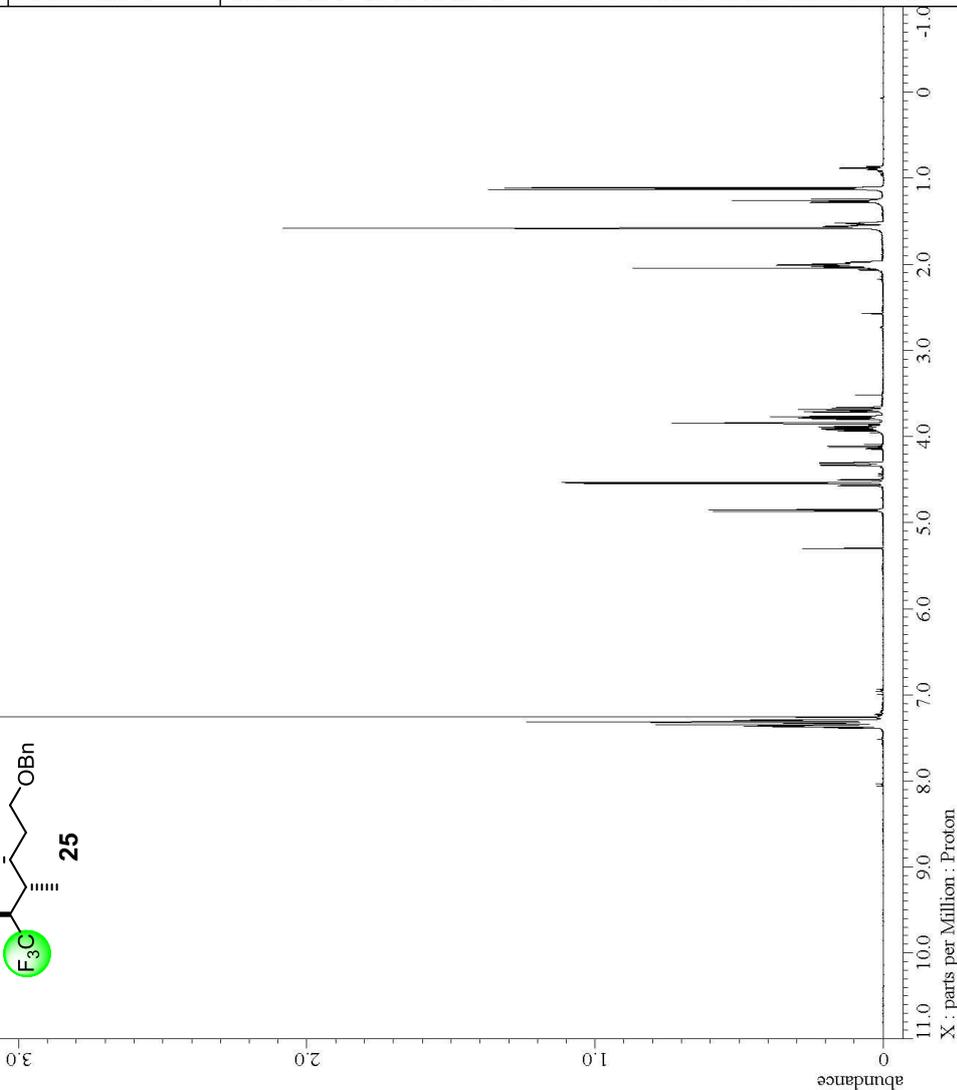
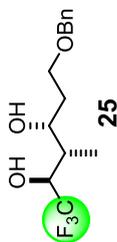
File name = G:\USB 2008.12.13*相模倉
Author = Murata
Experiment = proton.jsp
Sample Id = ex935F1
Solvent = CHLOROFORM-D
Creation Time = 29-MAY-2013 18:15:20
Revision Time = 12-JAN-2014 20:01:04
Current Time = 12-JAN-2014 20:01:18
Comment = single pulse
Data format = 1
P1 = 1.00 [M], 0.00 [S]
P2 = 262.14
Dim Size = Proton
Dim Title = [ppm]
Dim Units = X
Dimensions = X
Site = JNM-ECS400
Spectrometer = DELTA2_NMR

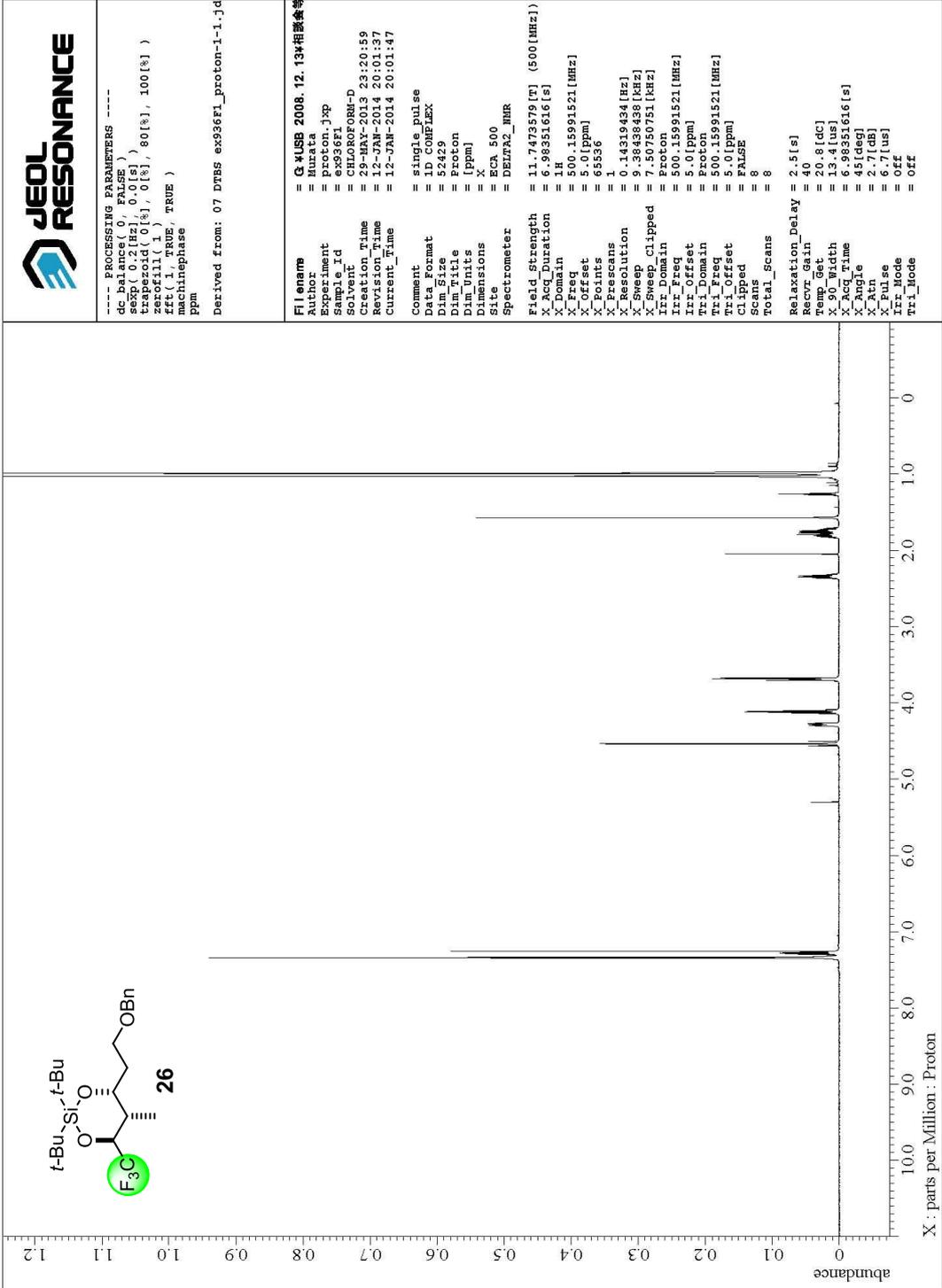
```

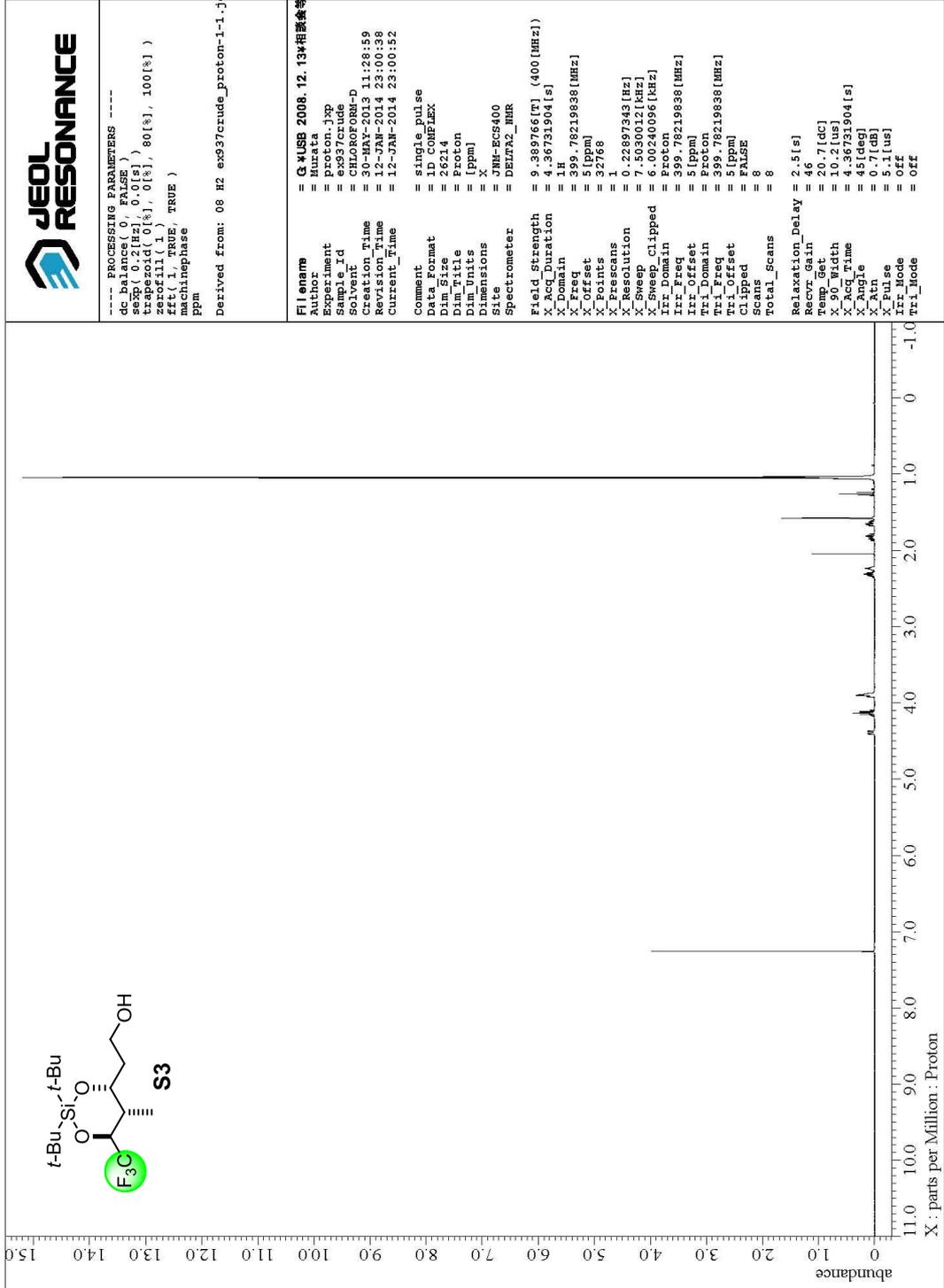
```

Field Strength = 9.389766 [T] (400 [MHz])
X_Acq_Duration = 4.36731904 [s]
X_Domain = 1 H
X_Freq = 399.78219838 [MHz]
X_Offset = 32768
X_P1 = 1.00 [M], 0.00 [S]
X_P2 = 262.14
X_P3 = 32768
X_P3_scans = 1
X_Resolution = 0.22897343 [Hz]
X_Sweep = 7.5030012 [kHz]
X_Sweep_Clippped = 6.00240096 [kHz]
Irr_Domain = Proton
Irr_Freq = 399.78219838 [MHz]
Irr_Offset = 5 [ppm]
Tri_Domain = Proton
Tri_Freq = 399.78219838 [MHz]
Tri_Offset = 5 [ppm]
Clipped = FALSE
Scans = 8
Total_Scans = 8
Relaxation_Delay = 2.5 [s]
Recvr_Gain = 46
Temp_Get = 20.8 [dC]
X_90_Width = 10.2 [us]
X_Acq_Time = 4.36731904 [s]
X_Angle = 45 [deg]
X_Attn = 0.7 [dB]
X_Pulse = 5.1 [us]
Irr_Mode = Off
Tri_Mode = Off

```









```

---- PROCESSING PARAMETERS ----
gc_balance( 0, FALSE )
f2p0 0.000000 [Hz], 0.000000 [s]
zerofill( 1 )
fft( 1, TRUE, TRUE )
machinephase
ppm
  
```

Derived from: 09 DMF ex589f1-2.jdf

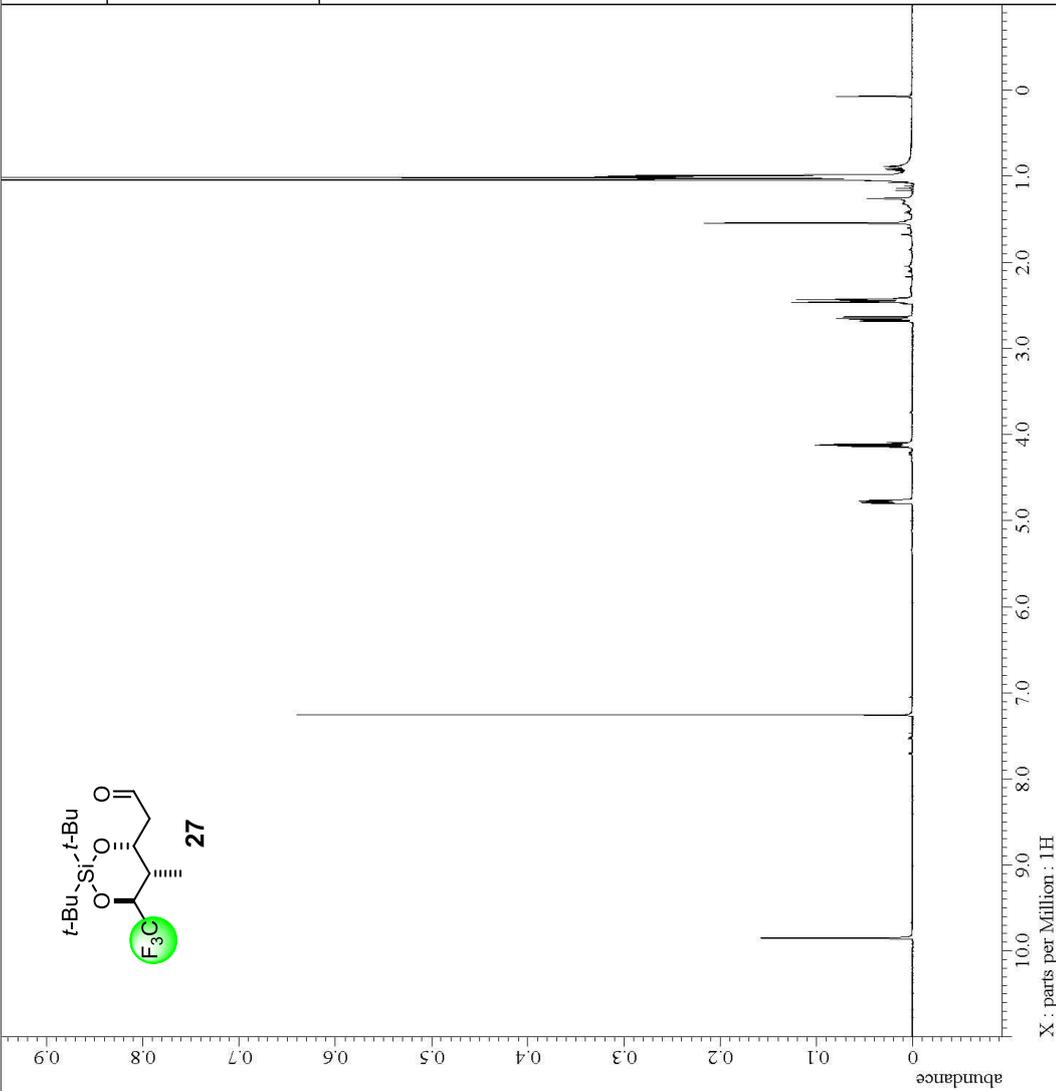
```

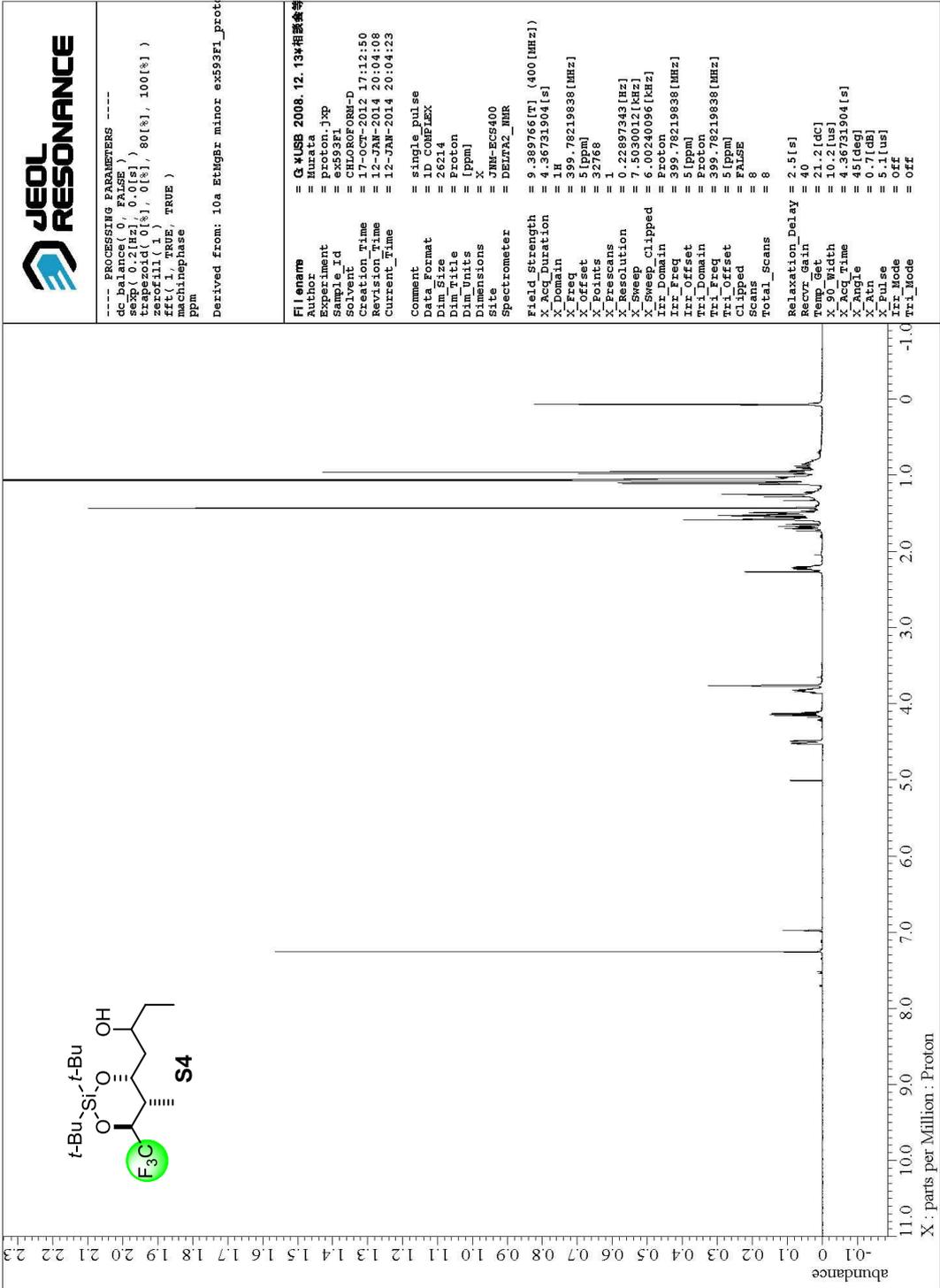
File name      = G:\USB 2008.12.13*相模倉等
Author         = delta
Experiment     = single_pulse.ex2
Sample Id     = a
Solvent       = CHLOROFORM-D
Creation Time  = 14-DEC-2011 16:25:38
Revision Time = 12-JAN-2014 20:02:32
Current Time  = 12-JAN-2014 20:02:44

Comment       = single pulse
Data format   = 1, DMF1EX
Dim Size      = 52428
Dim Title     = 1H
Dim Units     = [ppm]
Dimensions    = X
Site          = ECA 500
Spectrometer = DELTA2_MMR
  
```

```

Field Strength = 11.7473779 [T] (500 [MHz])
X_Acq_Duration = 6.98351616 [s]
X_Domain       = 1H
X_Freq         = 500.15991521 [MHz]
X_Offset       = 65559
X_P1           = 1
X_P2           = 1
X_P3           = 1
X_P4           = 1
X_P5           = 1
X_P6           = 1
X_P7           = 1
X_P8           = 1
X_P9           = 1
X_P10          = 1
X_P11          = 1
X_P12          = 1
X_P13          = 1
X_P14          = 1
X_P15          = 1
X_P16          = 1
X_P17          = 1
X_P18          = 1
X_P19          = 1
X_P20          = 1
X_P21          = 1
X_P22          = 1
X_P23          = 1
X_P24          = 1
X_P25          = 1
X_P26          = 1
X_P27          = 1
X_P28          = 1
X_P29          = 1
X_P30          = 1
X_P31          = 1
X_P32          = 1
X_P33          = 1
X_P34          = 1
X_P35          = 1
X_P36          = 1
X_P37          = 1
X_P38          = 1
X_P39          = 1
X_P40          = 1
X_P41          = 1
X_P42          = 1
X_P43          = 1
X_P44          = 1
X_P45          = 1
X_P46          = 1
X_P47          = 1
X_P48          = 1
X_P49          = 1
X_P50          = 1
X_P51          = 1
X_P52          = 1
X_P53          = 1
X_P54          = 1
X_P55          = 1
X_P56          = 1
X_P57          = 1
X_P58          = 1
X_P59          = 1
X_P60          = 1
X_P61          = 1
X_P62          = 1
X_P63          = 1
X_P64          = 1
X_P65          = 1
X_P66          = 1
X_P67          = 1
X_P68          = 1
X_P69          = 1
X_P70          = 1
X_P71          = 1
X_P72          = 1
X_P73          = 1
X_P74          = 1
X_P75          = 1
X_P76          = 1
X_P77          = 1
X_P78          = 1
X_P79          = 1
X_P80          = 1
X_P81          = 1
X_P82          = 1
X_P83          = 1
X_P84          = 1
X_P85          = 1
X_P86          = 1
X_P87          = 1
X_P88          = 1
X_P89          = 1
X_P90          = 1
X_P91          = 1
X_P92          = 1
X_P93          = 1
X_P94          = 1
X_P95          = 1
X_P96          = 1
X_P97          = 1
X_P98          = 1
X_P99          = 1
X_P100         = 1
  
```







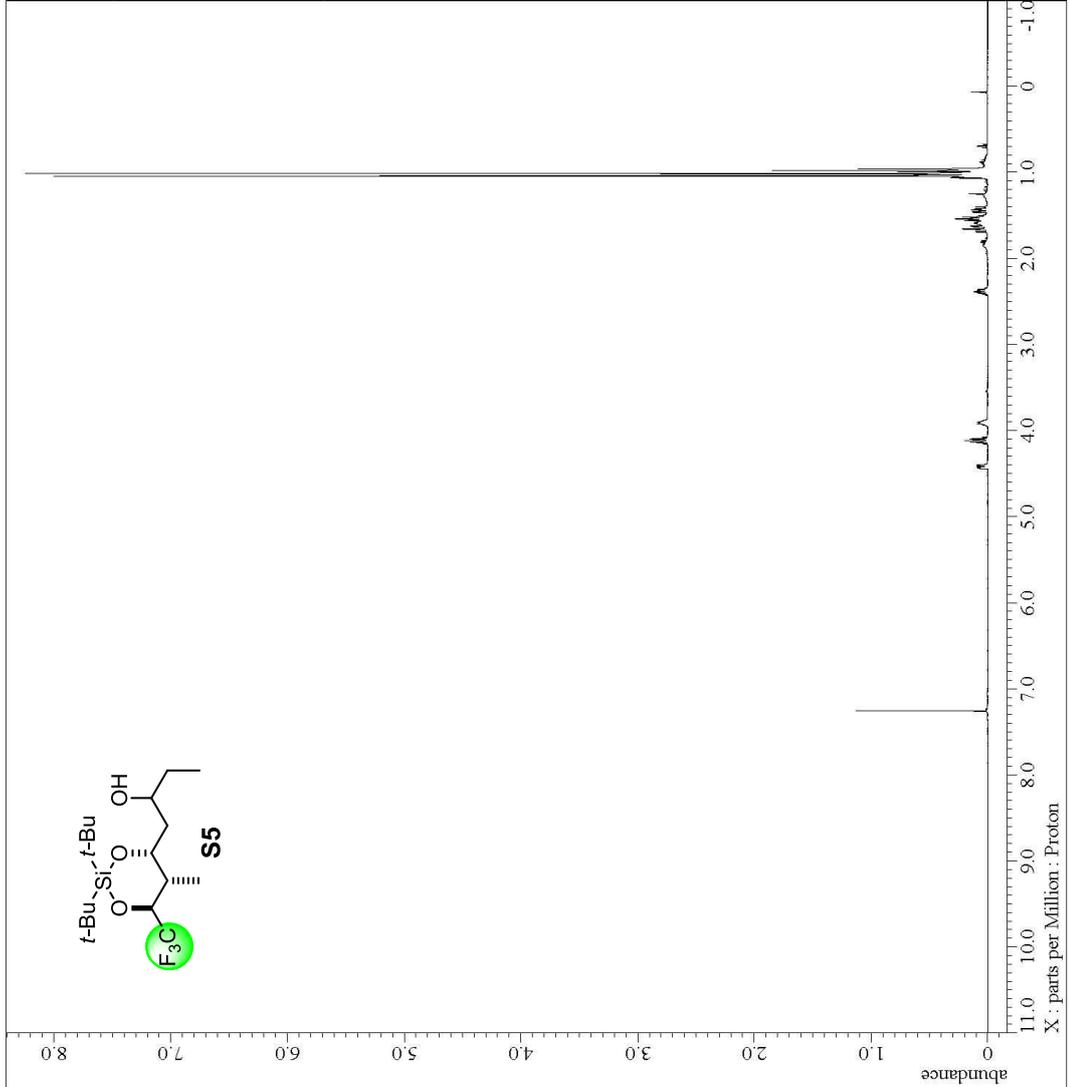
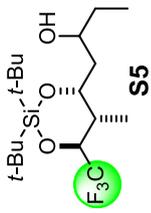
---- PROCESSING PARAMETERS ----
dc_balance(0, FALSE)
temp(0.0 [K])
zero(0.0 [Hz])
zerofill(1)
fft(1, TRUE, TRUE)
machinephase
ppm

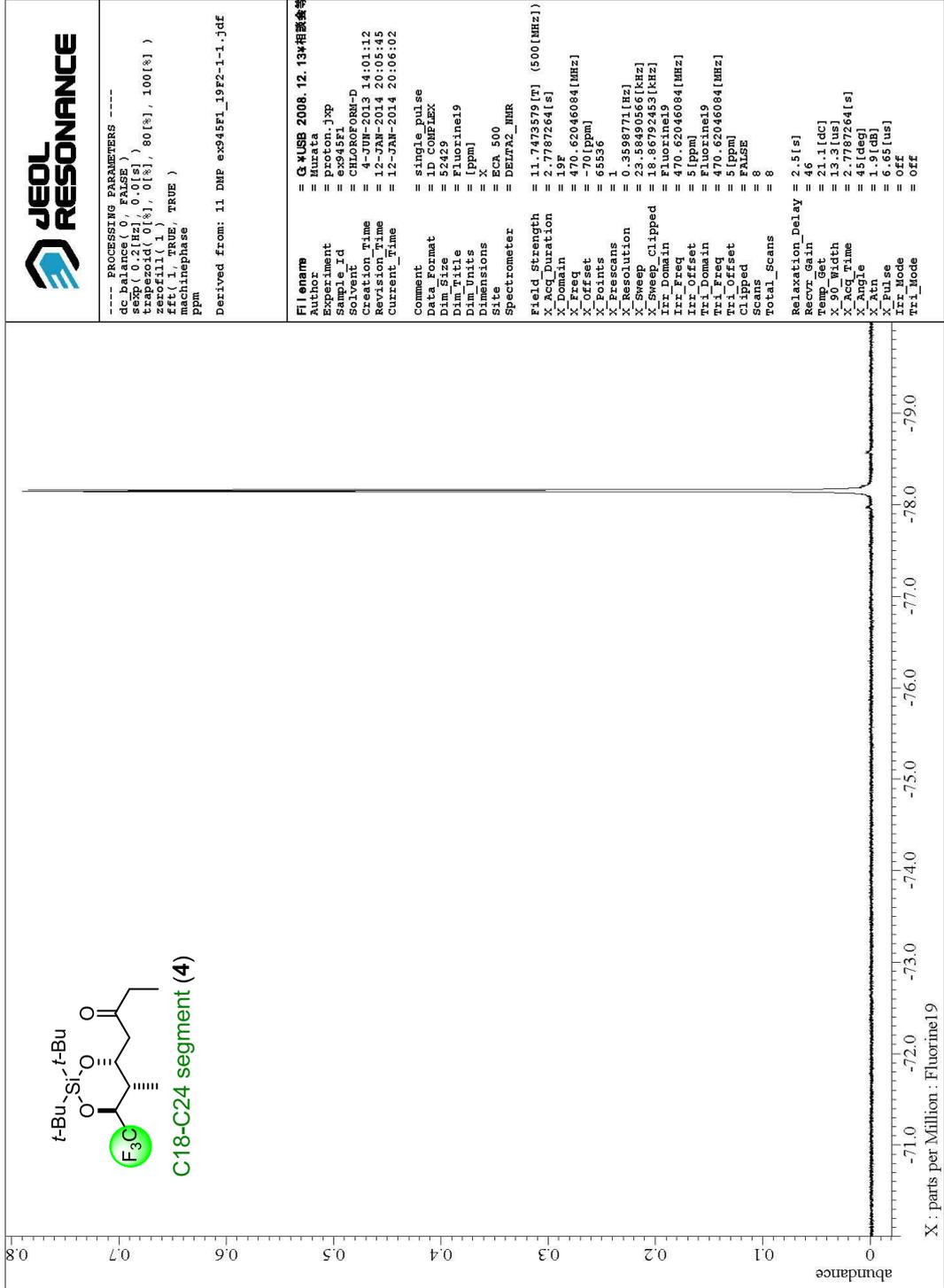
Derived from: 10b EtMgBr major ex593f2_prot

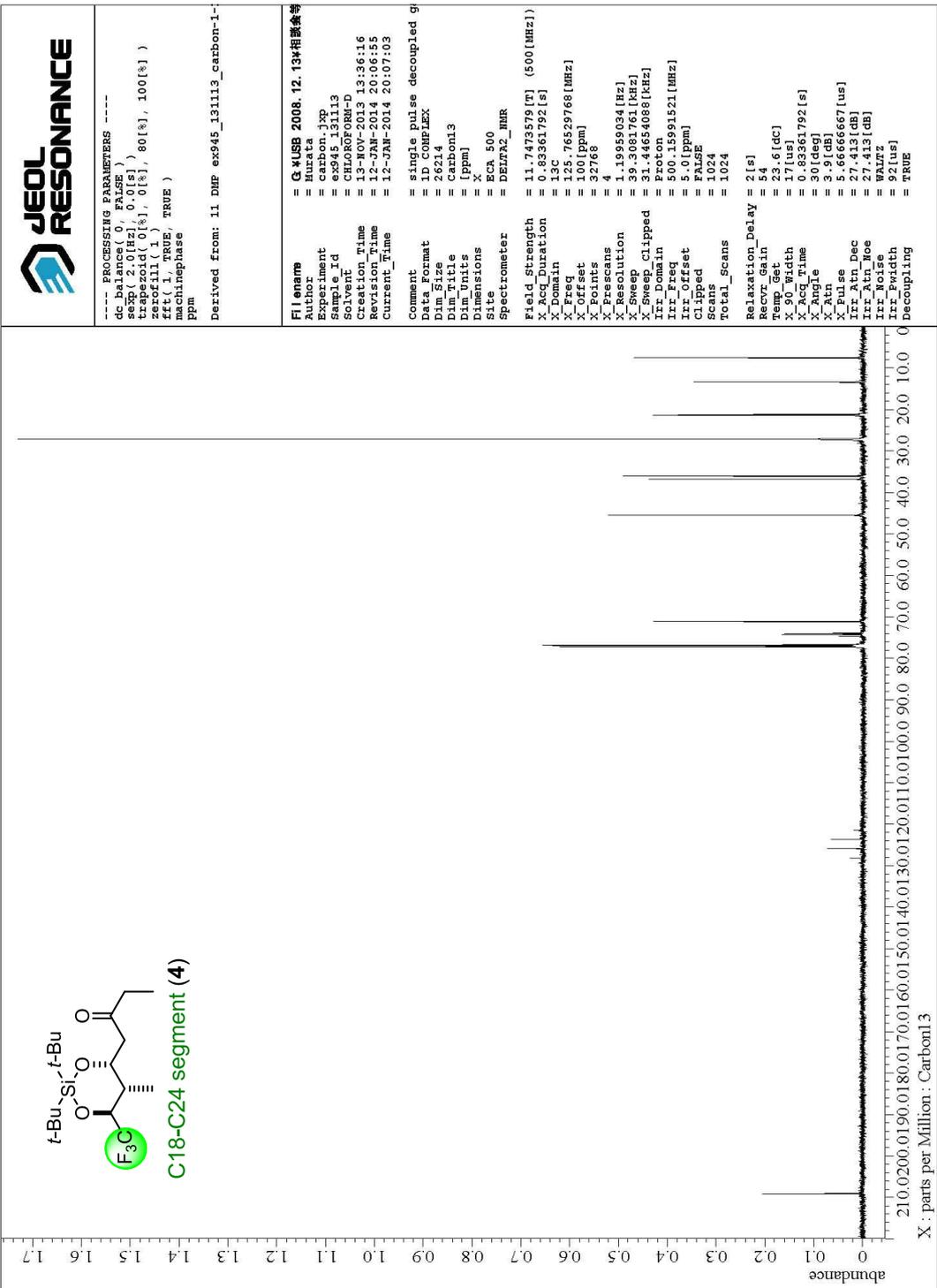
File name = G:\USB 2008_12_13*相模倉等
Author = Murata
Experiment = proton.jpg
Sample Id = ex593f2
Solvent = CHLOROFORM-D
Creation Time = 17-OCT-2012 17:19:40
Revision Time = 12-JAN-2014 20:04:45
Current Time = 12-JAN-2014 20:04:59
Comment = single pulse
Data format = 1
Date Acq = 2014
Dir Size = Proton
Dir Title = [ppm]
Dir Units = X
Dimensions = X
Site = JNM-ECS400
Spectrometer = DELTA2_NMR

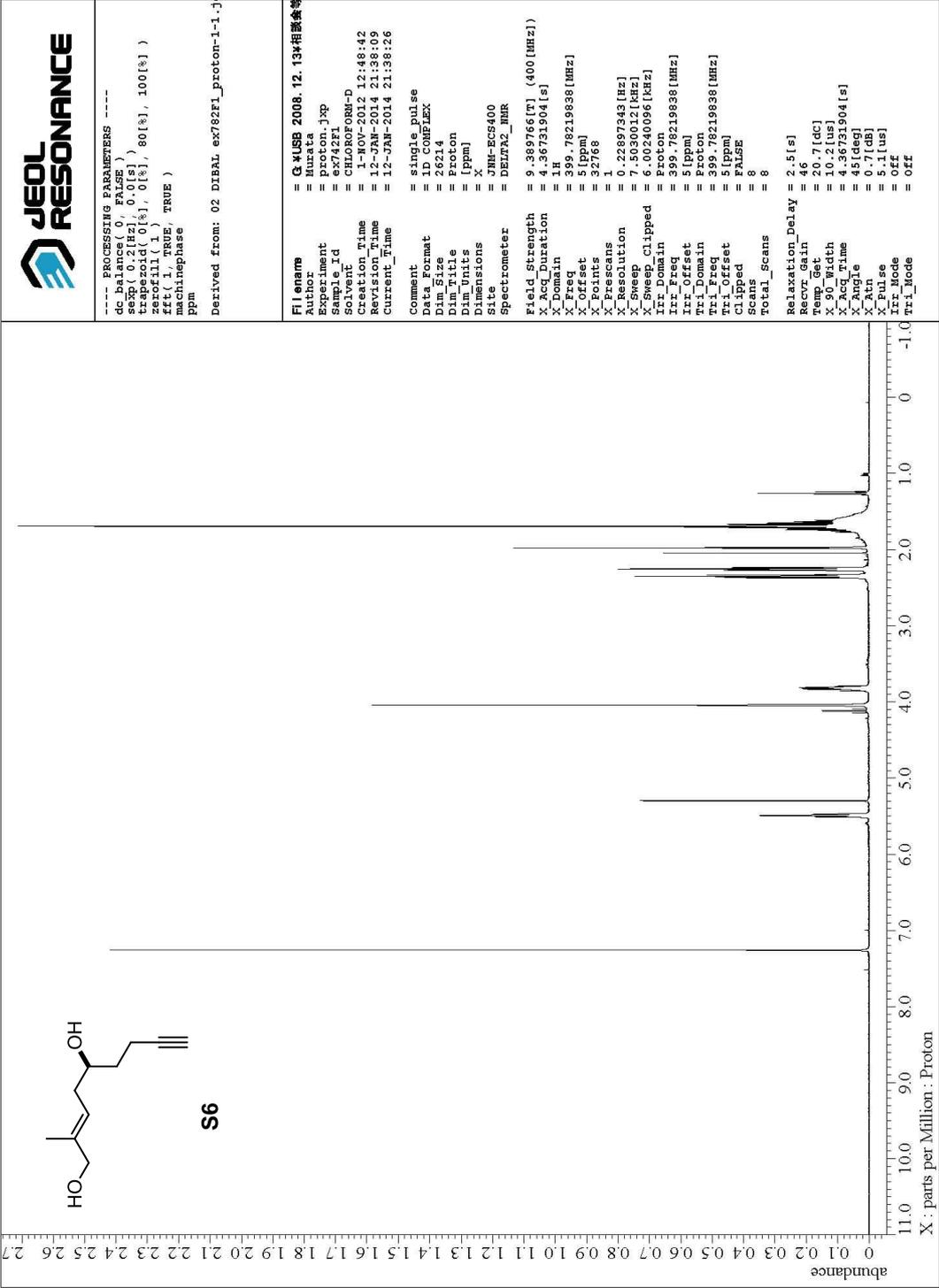
Field Strength = 9.389766 [T] (400 [MHz])
X_Acq_Duration = 4.36731904 [s]
X_Domain = 1H
X_Freq = 599.78219838 [MHz]
X_Offset = 32768
X_P1 = 1
X_P2 = 1
X_P3 = 1
X_P4 = 1
X_P5 = 1
X_P6 = 1
X_P7 = 1
X_P8 = 1
X_P9 = 1
X_P10 = 1
X_P11 = 1
X_P12 = 1
X_P13 = 1
X_P14 = 1
X_P15 = 1
X_P16 = 1
X_P17 = 1
X_P18 = 1
X_P19 = 1
X_P20 = 1
X_P21 = 1
X_P22 = 1
X_P23 = 1
X_P24 = 1
X_P25 = 1
X_P26 = 1
X_P27 = 1
X_P28 = 1
X_P29 = 1
X_P30 = 1
X_P31 = 1
X_P32 = 1
X_P33 = 1
X_P34 = 1
X_P35 = 1
X_P36 = 1
X_P37 = 1
X_P38 = 1
X_P39 = 1
X_P40 = 1
X_P41 = 1
X_P42 = 1
X_P43 = 1
X_P44 = 1
X_P45 = 1
X_P46 = 1
X_P47 = 1
X_P48 = 1
X_P49 = 1
X_P50 = 1
X_P51 = 1
X_P52 = 1
X_P53 = 1
X_P54 = 1
X_P55 = 1
X_P56 = 1
X_P57 = 1
X_P58 = 1
X_P59 = 1
X_P60 = 1
X_P61 = 1
X_P62 = 1
X_P63 = 1
X_P64 = 1
X_P65 = 1
X_P66 = 1
X_P67 = 1
X_P68 = 1
X_P69 = 1
X_P70 = 1
X_P71 = 1
X_P72 = 1
X_P73 = 1
X_P74 = 1
X_P75 = 1
X_P76 = 1
X_P77 = 1
X_P78 = 1
X_P79 = 1
X_P80 = 1
X_P81 = 1
X_P82 = 1
X_P83 = 1
X_P84 = 1
X_P85 = 1
X_P86 = 1
X_P87 = 1
X_P88 = 1
X_P89 = 1
X_P90 = 1
X_P91 = 1
X_P92 = 1
X_P93 = 1
X_P94 = 1
X_P95 = 1
X_P96 = 1
X_P97 = 1
X_P98 = 1
X_P99 = 1
X_P100 = 1

Relaxation_Delay = 2.5 [s]
Recvr_Gain = 40
Temp_Get = 21 [C]
X_90_Width = 10.2 [us]
X_Acq_Time = 4.36731904 [s]
X_Angle = 45 [deg]
X_Atn = 0.7 [dB]
X_Pulse = 5.1 [us]
X_Mode = off
X_Tri_Mode = off









```

---- PROCESSING PARAMETERS ----
dc_balance( 0, FALSE )
temp( 0.0 [Hz], 0.0 [s] )
zero( 0.0 [Hz], 0.0 [s] )
zerofill( 1 )
fft( 1, TRUE, TRUE )
machinephase
ppm
Derived from: 02.DIBAL.ex782F1.proton-1-1.j

```

```

File name      = G:\USB 2008.12.13*相模倉等
Author         = Murata
Experiment     = proton.jsp
Sample Id      = ex742F1
Solvent        = CHLOROFORM-D
Creation Time  = 1-NOV-2012 12:48:42
Revision Time  = 12-JAN-2014 21:38:09
Current Time   = 12-JAN-2014 21:38:26

Comment       = single pulse
Data format   = 1DHFLEX
Data size     = 26214
Data title    = Proton
Data units    = [ppm]
Dimensions    = X
Site          = JNM-ECS400
Spectrometer  = DELTA2_NMR

Field Strength = 9.389766 [T] (400 [MHz])
X_Acq_Duration = 4.36731904 [s]
X_Domain       = 1H
X_Freq         = 599.78219838 [MHz]
X_Offset       = 37769
X_P1           = 32768
X_P2           = 1
X_P3           = 1
X_Resolution   = 0.22897343 [Hz]
X_Sweep        = 7.5030012 [kHz]
X_Sweep Clipped = 6.00240096 [kHz]
Irr_Domain     = Proton
Irr_Freq       = 399.78219838 [MHz]
Irr_Offset     = 5 [ppm]
Tri_Domain     = Proton
Tri_Freq       = 399.78219838 [MHz]
Tri_Offset     = 5 [ppm]
Clipped        = FALSE
Scans          = 8
Total_Scans    = 8
Relaxation_Delay = 2.5 [s]
Recvr_Gain     = 46
Temp_Get       = 20.7 [dC]
X_90_Width     = 10.2 [us]
X_Acq_Time     = 4.36731904 [s]
X_Angle        = 45 [deg]
X_Attn         = 0.7 [dB]
X_Pulse        = 5.1 [us]
Irr_Mode       = Off
Tri_Mode       = Off

```

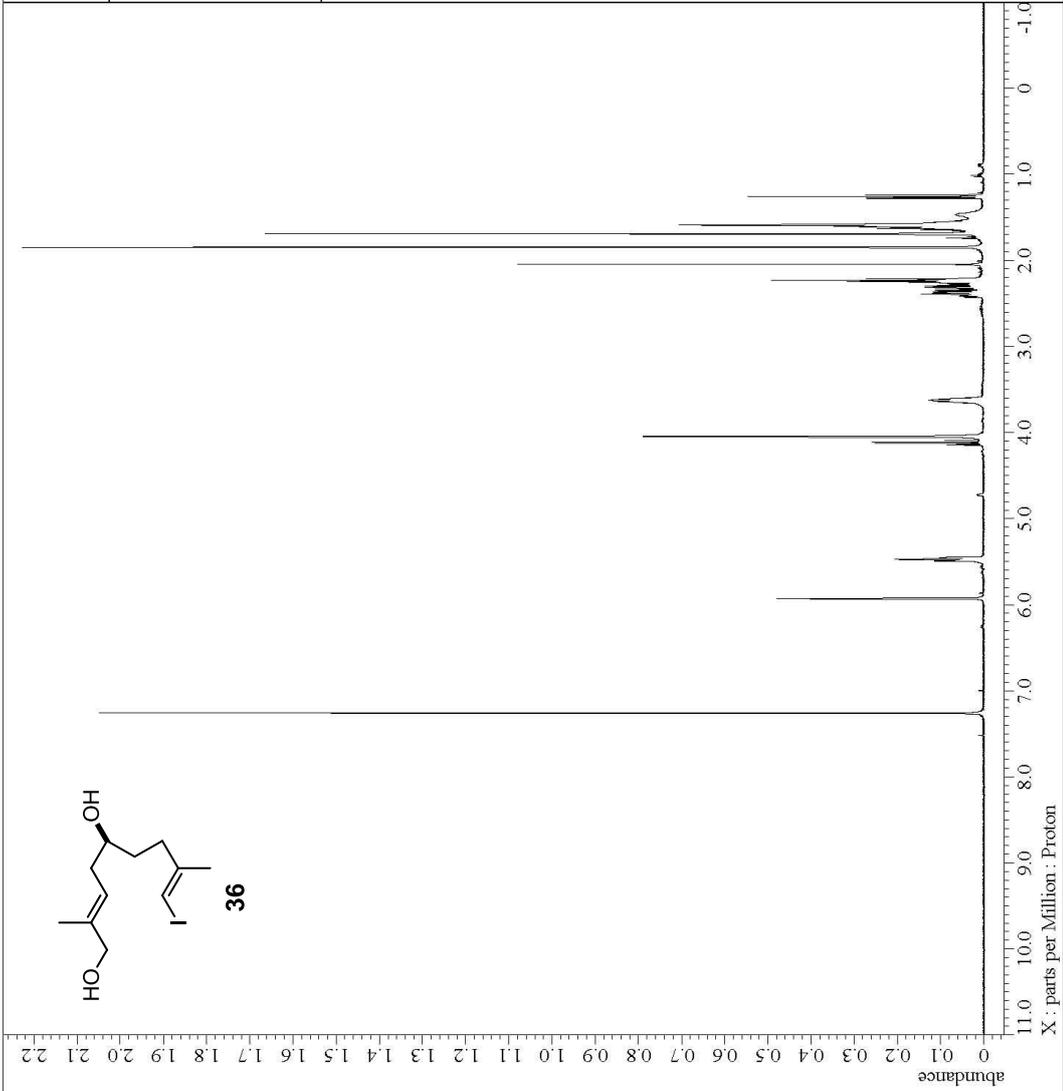
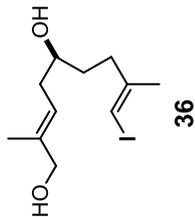


---- PROCESSING PARAMETERS ----
dc_bbalance(0, FALSE)
temp_0(100, 0.0[s])
temp_0(100, 0.0[s])
zerofill(1)
fft(1, TRUE, TRUE)
machinephase
ppm

Derived from: 03 Cp2zrc12 ex783F2_proton-1--

File name = G:\USB 2008.12.13*相模倉等
Author = EBAYO
Experiment = proton.jsp
Sample Id = ex783F2
Solvent = CHLOROFORM-D
Creation Time = 2-NOV-2012 15:35:35
Revision Time = 12-JAN-2014 21:38:41
Current Time = 12-JAN-2014 21:39:00
Comment = single pulse
Data format = 1
Data size = 26214
Dim Size = Proton
Dim Units = [ppm]
Dimensions = X
Site = JNM-ECS400
Spectrometer = DELTA2_MHR

Field Strength = 9.389766[T] (400 [MHz])
X_Acq_Duration = 4.36731904 [s]
X_Domain = 1H
X_Freq = 399.78219838 [MHz]
X_Offset = 32768
X_Prescans = 1
X_Resolution = 0.22897343 [Hz]
X_Sweep = 7.5030012 [kHz]
X_Sweep_Clippped = 6.00240096 [kHz]
Irr_Domain = Proton
Irr_Freq = 399.78219838 [MHz]
Irr_Offset = 5 [ppm]
Tri_Domain = Proton
Tri_Freq = 399.78219838 [MHz]
Tri_Offset = 5 [ppm]
Clipped = FALSE
Scans = 8
Total_Scans = 8
Relaxation_Delay = 2.5 [s]
Recvr_Gain = 48
Temp_Get = 20.1 [dC]
X_90_Width = 10.2 [us]
X_Acq_Time = 4.36731904 [s]
X_Angle = 45 [deg]
X_Atn = 0.7 [dB]
X_Pulse = 5.1 [us]
Irr_Mode = Off
Tri_Mode = Off

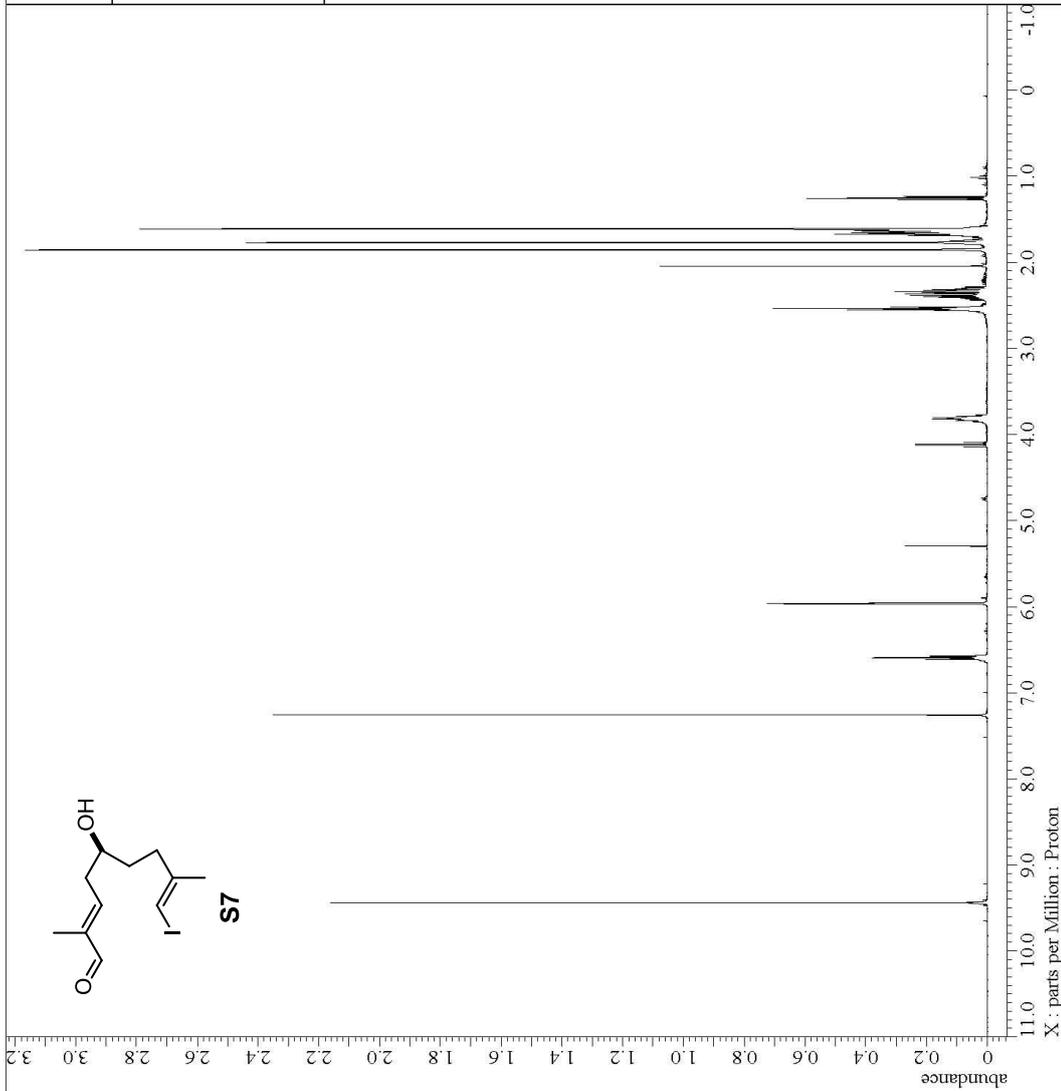
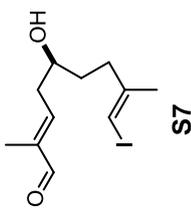




---- PROCESSING PARAMETERS ----
dc_balance(0, FALSE)
temp_offset(0.0 [s])
temp_offset(0.0 [s])
zerofill(1, 0 [s], 80 [s], 100 [s])
fft(1, TRUE, TRUE)
machinephase
ppm
Derived from: 04 TEMPO ex976F1_proton-1-1.j

File name = G:\USB 2008.12.13*相模倉等
Author = Murata
Experiment = proton.jsp
Sample Id = ex976F1
Solvent = CHLOROFORM-D
Creation Time = 8-JUL-2013 17:39:40
Revision Time = 12-JAN-2014 21:39:17
Current Time = 12-JAN-2014 21:39:30
Comment = single pulse
Data format = 1DMPLEX
Data size = 26214
Data title = Proton
Data units = [ppm]
Dimensions = X
Site = JNM-ECS400
Spectrometer = DELTA2_NMR

Field strength = 9.389766 [T] (400 [MHz])
X_acq_duration = 4.36731904 [s]
X_domain = 1H
X_freq = 599.78219838 [MHz]
X_offset = 32768
X_prescans = 1
X_resolution = 0.22897343 [Hz]
X_sweep = 7.5030012 [kHz]
X_sweep_clipped = 6.00240096 [kHz]
Irr_domain = Proton
Irr_freq = 399.78219838 [MHz]
Irr_offset = 5 [ppm]
Tri_domain = Proton
Tri_freq = 399.78219838 [MHz]
Tri_offset = 5 [ppm]
Clipped = FALSE
Scans = 8
Total_scans = 8
Relaxation_Delay = 2.5 [s]
Recvr_gain = 44
Temp_Get = 21.2 [dC]
X_90_Width = 10.2 [us]
X_acq_time = 4.36731904 [s]
X_angle = 45 [deg]
X_atn = 0.7 [dB]
X_pulse = 5.1 [us]
Irr_Mode = Off
Tri_Mode = Off





```

---- PROCESSING PARAMETERS ----
dc Balance( 0, FALSE )
temp 0.0[Hz] 0.0[s]
zero(1.0) 0.0[s]
zerofill( 1 )
fft( 1, TRUE, TRUE )
machinephase
ppm
  
```

Derived from: 06 TIPS ex80052_130526_proton

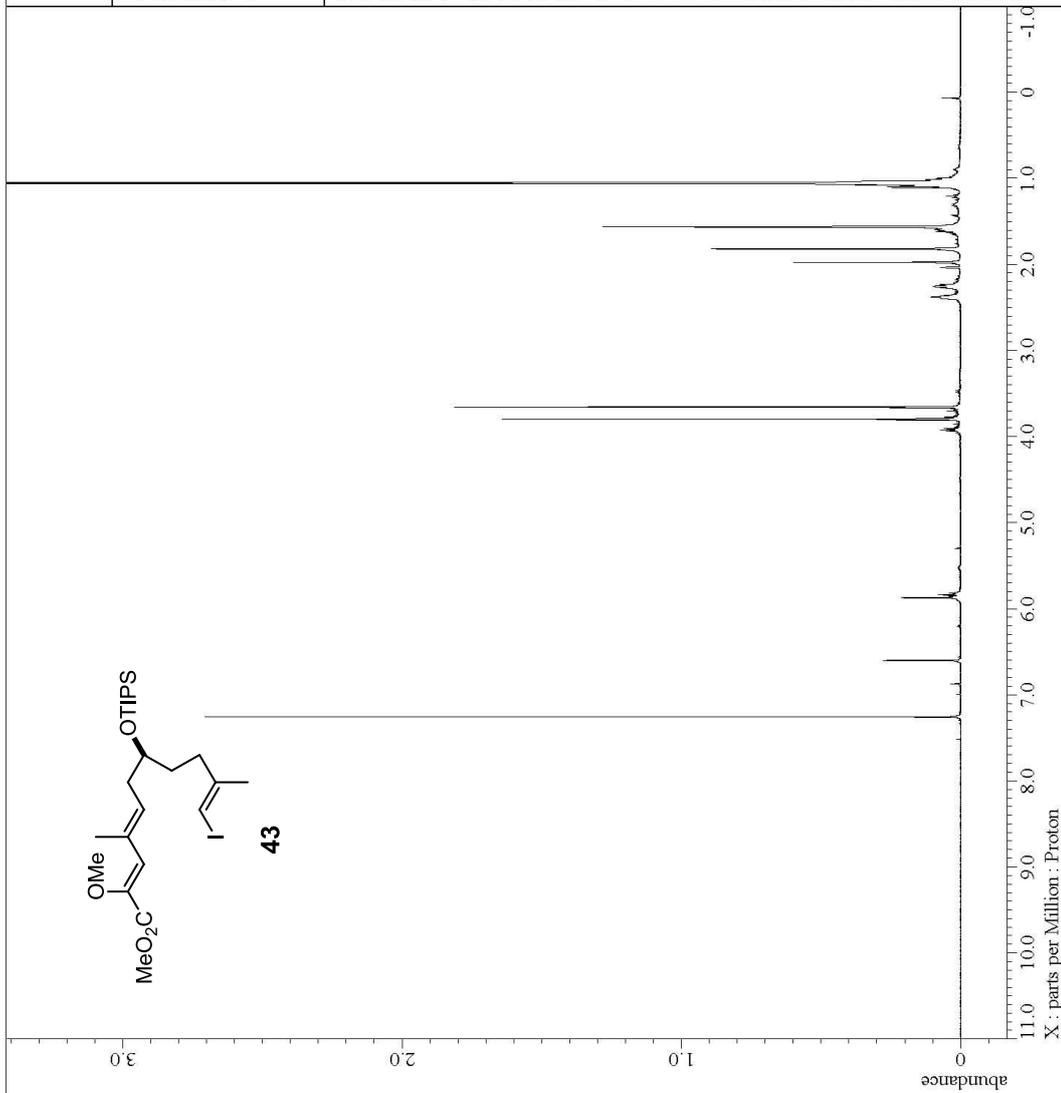
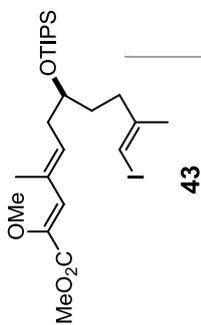
```

File name      = G:\USB 2008.12.13*相取集等
Author         = Murata
Experiment     = proton.jsp
Sample Id      = ex80052_130526
Solvent        = CHLOROFORM-D
Creation Time  = 26-MAY-2013 20:05:22
Revision Time  = 12-JAN-2014 21:40:23
Current Time   = 12-JAN-2014 21:40:35

Comment        = single pulse
Dirname        = 1
Datafile       = 130526.F2
Dim Size       = 26214
Dim Title      = Proton
Dim Units      = [ppm]
Dimensions     = X
Site           = JNM-ECS400
Spectrometer   = DELTA2_NMR
  
```

```

Field Strength = 9.389766[T] (400[MHz])
X_Acq_Duration = 4.36731904[s]
X_Domain       = 1H
X_Freq         = 399.78219838[MHz]
X_Offset       = 37760
X_P1           = 32768
X_P2           = 1
X_P3           = 1
X_Resolution   = 0.22897343[Hz]
X_Sweep        = 7.50300121[kHz]
X_Sweep_Clip   = 6.00240096[kHz]
Irr_Domain     = Proton
Irr_Freq       = 399.78219838[MHz]
Irr_Offset     = 5[ppm]
Tri_Domain     = Proton
Tri_Freq       = 399.78219838[MHz]
Tri_Offset     = 5[ppm]
Clipped        = FALSE
Scans          = 8
Total_Scans    = 8
Relaxation_Delay = 2.5[s]
Recvr_Gain     = 46
Temp_Get       = 20.9[dc]
X_90_Width     = 10.2[us]
X_Acq_Time     = 4.36731904[s]
X_Angle        = 45[deg]
X_Atn          = 0.7[db]
X_Pulse        = 5.1[us]
Irr_Mode       = Off
Tri_Mode       = Off
  
```





```

---- PROCESSING PARAMETERS ----
dc_balance( 0, FALSE )
temp( 0.0 [K], 0.0 [s] )
zero( 0.0 [K], 0.0 [s] )
zerofill( 1 )
fft( 1, TRUE, TRUE )
machinephase
ppm
Derived from: 01 Stille ex1024f2_protocor-1-1
  
```

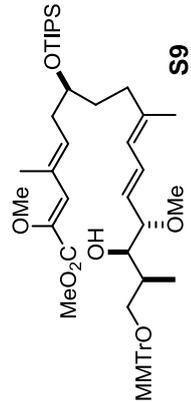
```

File name = G:\USB 2008.12.13*相取集等
Author = Murata
Experiment = proton.jsp
Sample Id = ex1024f2
Solvent = CHLOROFORM-D
Creation Time = 28-AUG-2013 15:20:06
Revision Time = 12-JAN-2014 21:42:52
Current Time = 12-JAN-2014 21:43:05

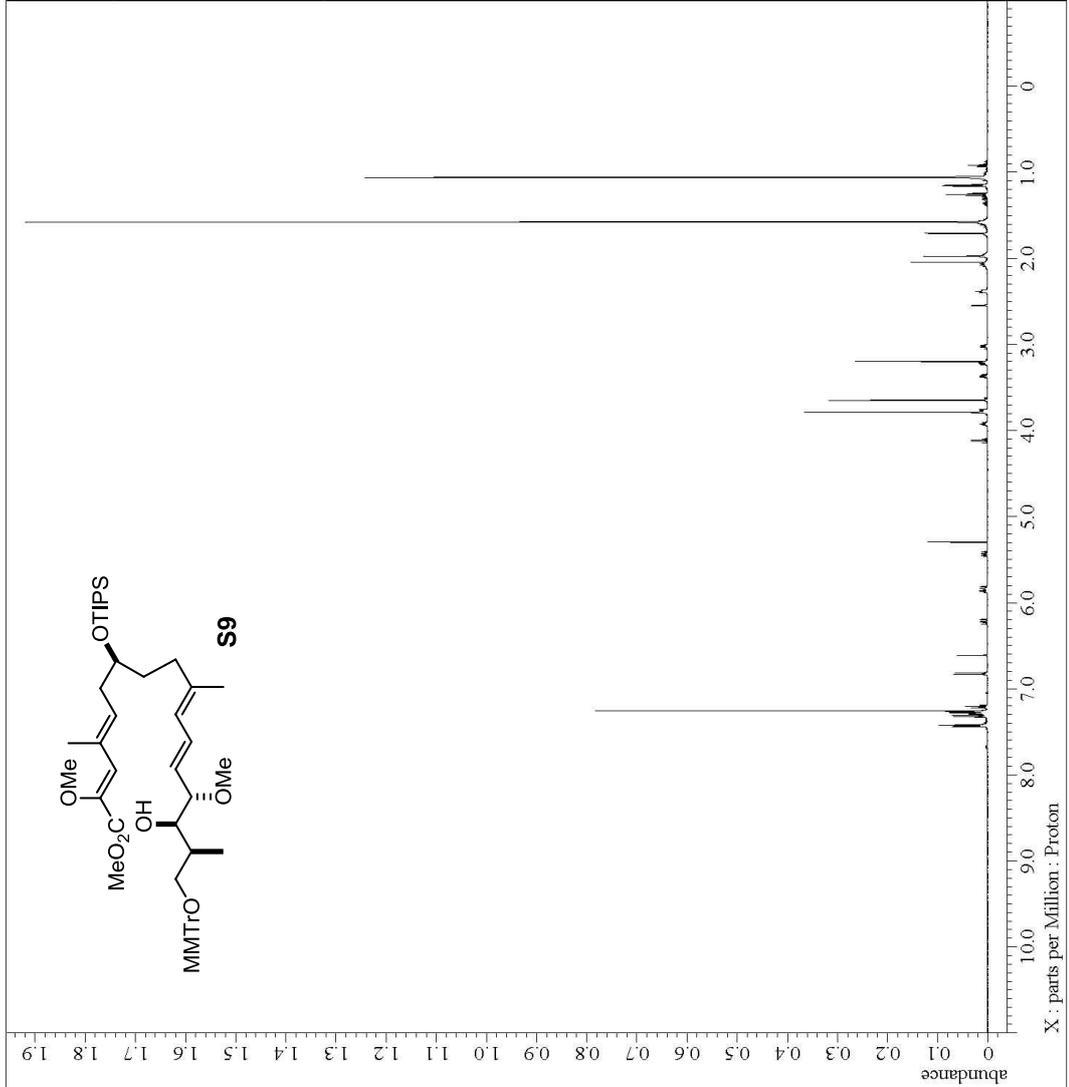
Comment = single pulse
Data format = 1
Pulse program = 1DPRFLEX
Dir Size = 52429
Dir Title = Proton
Dim Units = [ppm]
Dimensions = X
Site = ECA 500
Spectrometer = DELTA2_MMR
  
```

```

Field Strength = 11.7473579 [T] (500 [MHz])
X_Acq_Duration = 6.98351616 [s]
X_Domain = 1H
X_Freq = 500.15991521 [MHz]
X_Offset = 65550
X_P1 = 0.00000000 [ppm]
X_P2 = 0.00000000 [ppm]
X_P3 = 0.00000000 [ppm]
X_P4 = 0.00000000 [ppm]
X_P5 = 0.00000000 [ppm]
X_P6 = 0.00000000 [ppm]
X_P7 = 0.00000000 [ppm]
X_P8 = 0.00000000 [ppm]
X_P9 = 0.00000000 [ppm]
X_P10 = 0.00000000 [ppm]
X_P11 = 0.00000000 [ppm]
X_P12 = 0.00000000 [ppm]
X_P13 = 0.00000000 [ppm]
X_P14 = 0.00000000 [ppm]
X_P15 = 0.00000000 [ppm]
X_P16 = 0.00000000 [ppm]
X_P17 = 0.00000000 [ppm]
X_P18 = 0.00000000 [ppm]
X_P19 = 0.00000000 [ppm]
X_P20 = 0.00000000 [ppm]
X_P21 = 0.00000000 [ppm]
X_P22 = 0.00000000 [ppm]
X_P23 = 0.00000000 [ppm]
X_P24 = 0.00000000 [ppm]
X_P25 = 0.00000000 [ppm]
X_P26 = 0.00000000 [ppm]
X_P27 = 0.00000000 [ppm]
X_P28 = 0.00000000 [ppm]
X_P29 = 0.00000000 [ppm]
X_P30 = 0.00000000 [ppm]
X_P31 = 0.00000000 [ppm]
X_P32 = 0.00000000 [ppm]
X_P33 = 0.00000000 [ppm]
X_P34 = 0.00000000 [ppm]
X_P35 = 0.00000000 [ppm]
X_P36 = 0.00000000 [ppm]
X_P37 = 0.00000000 [ppm]
X_P38 = 0.00000000 [ppm]
X_P39 = 0.00000000 [ppm]
X_P40 = 0.00000000 [ppm]
X_P41 = 0.00000000 [ppm]
X_P42 = 0.00000000 [ppm]
X_P43 = 0.00000000 [ppm]
X_P44 = 0.00000000 [ppm]
X_P45 = 0.00000000 [ppm]
X_P46 = 0.00000000 [ppm]
X_P47 = 0.00000000 [ppm]
X_P48 = 0.00000000 [ppm]
X_P49 = 0.00000000 [ppm]
X_P50 = 0.00000000 [ppm]
X_P51 = 0.00000000 [ppm]
X_P52 = 0.00000000 [ppm]
X_P53 = 0.00000000 [ppm]
X_P54 = 0.00000000 [ppm]
X_P55 = 0.00000000 [ppm]
X_P56 = 0.00000000 [ppm]
X_P57 = 0.00000000 [ppm]
X_P58 = 0.00000000 [ppm]
X_P59 = 0.00000000 [ppm]
X_P60 = 0.00000000 [ppm]
X_P61 = 0.00000000 [ppm]
X_P62 = 0.00000000 [ppm]
X_P63 = 0.00000000 [ppm]
X_P64 = 0.00000000 [ppm]
X_P65 = 0.00000000 [ppm]
X_P66 = 0.00000000 [ppm]
X_P67 = 0.00000000 [ppm]
X_P68 = 0.00000000 [ppm]
X_P69 = 0.00000000 [ppm]
X_P70 = 0.00000000 [ppm]
X_P71 = 0.00000000 [ppm]
X_P72 = 0.00000000 [ppm]
X_P73 = 0.00000000 [ppm]
X_P74 = 0.00000000 [ppm]
X_P75 = 0.00000000 [ppm]
X_P76 = 0.00000000 [ppm]
X_P77 = 0.00000000 [ppm]
X_P78 = 0.00000000 [ppm]
X_P79 = 0.00000000 [ppm]
X_P80 = 0.00000000 [ppm]
X_P81 = 0.00000000 [ppm]
X_P82 = 0.00000000 [ppm]
X_P83 = 0.00000000 [ppm]
X_P84 = 0.00000000 [ppm]
X_P85 = 0.00000000 [ppm]
X_P86 = 0.00000000 [ppm]
X_P87 = 0.00000000 [ppm]
X_P88 = 0.00000000 [ppm]
X_P89 = 0.00000000 [ppm]
X_P90 = 0.00000000 [ppm]
X_P91 = 0.00000000 [ppm]
X_P92 = 0.00000000 [ppm]
X_P93 = 0.00000000 [ppm]
X_P94 = 0.00000000 [ppm]
X_P95 = 0.00000000 [ppm]
X_P96 = 0.00000000 [ppm]
X_P97 = 0.00000000 [ppm]
X_P98 = 0.00000000 [ppm]
X_P99 = 0.00000000 [ppm]
X_P100 = 0.00000000 [ppm]
  
```



S9





```

---- PROCESSING PARAMETERS ----
dc balance( 0, FALSE )
exp 022[0] / 0.0[8]
f2 399.78219838[MHz]
zerofill( 1 )
fft( 1, TRUE, TRUE )
machinephase
ppm
  
```

Derived from: 02 KON ex1025F1_proton-1-1.jd

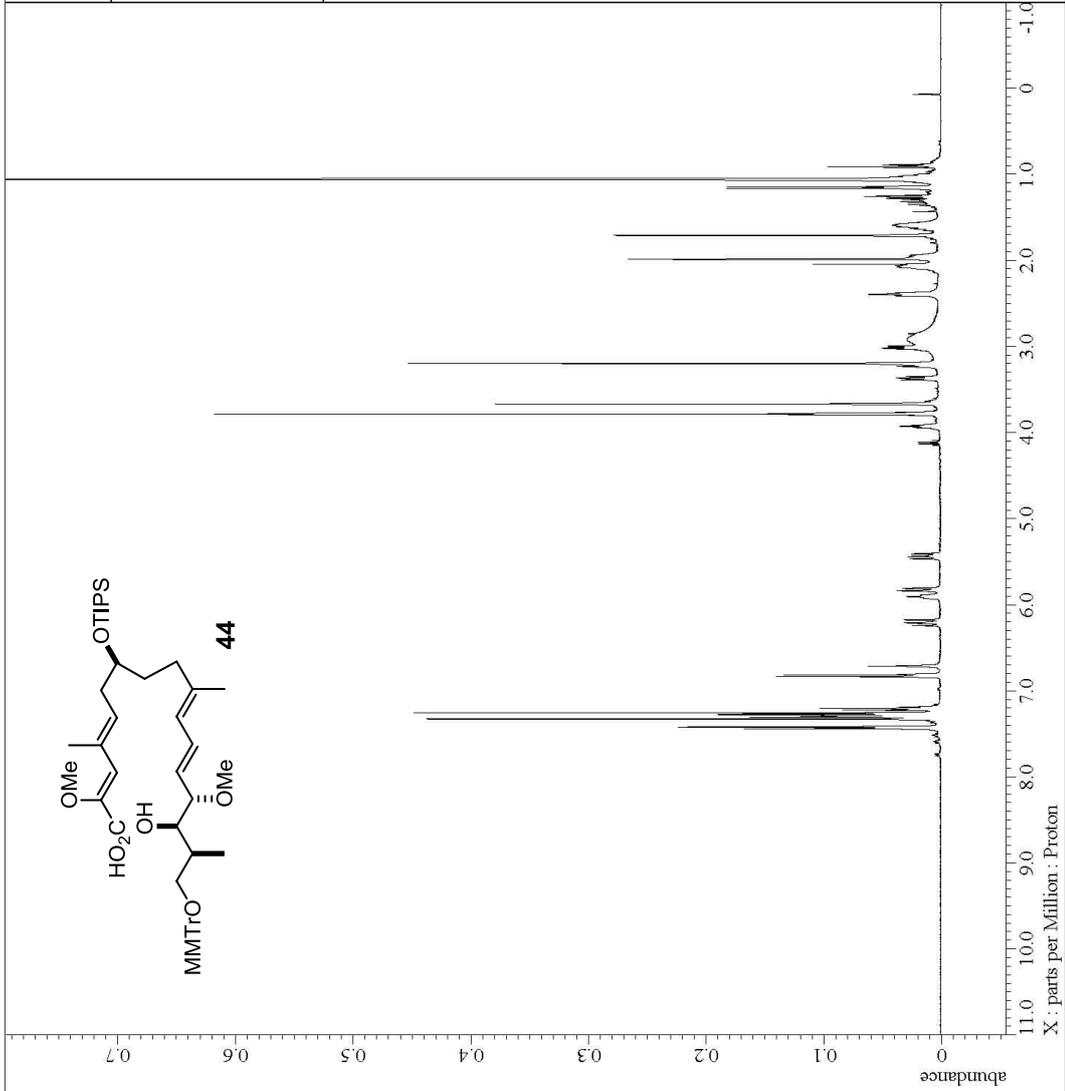
```

File name = G:\USB 2008.12.13*相取集等
Author = Fukase
Experiment = proton.jsp
Sample Id = ex1025F1
Solvent = CHLOROFORM-D
Creation Time = 29-AUG-2013 13:33:15
Revision Time = 12-JAN-2014 21:43:26
Current Time = 12-JAN-2014 21:43:39

Comment = single pulse
Data format = 1
Date_IMEX = 26214
Dir Size = Proton
Dir Title = [ppm]
Dir Units = X
Dimensions = X
Site = JNM-ECS400
Spectrometer = DELTA2_NMR
  
```

```

Field Strength = 9.389766[T] (400[MHz])
X_Acq_Duration = 4.36731904[s]
X_Domain = 1H
X_Freq = 399.78219838[MHz]
X_Offset = 37760
X_P1 = 32768
X_P2 = 1
X_P3 = 1
X_P4 = 1
X_P5 = 1
X_P6 = 1
X_P7 = 1
X_P8 = 1
X_P9 = 1
X_P10 = 1
X_P11 = 1
X_P12 = 1
X_P13 = 1
X_P14 = 1
X_P15 = 1
X_P16 = 1
X_P17 = 1
X_P18 = 1
X_P19 = 1
X_P20 = 1
X_P21 = 1
X_P22 = 1
X_P23 = 1
X_P24 = 1
X_P25 = 1
X_P26 = 1
X_P27 = 1
X_P28 = 1
X_P29 = 1
X_P30 = 1
X_P31 = 1
X_P32 = 1
X_P33 = 1
X_P34 = 1
X_P35 = 1
X_P36 = 1
X_P37 = 1
X_P38 = 1
X_P39 = 1
X_P40 = 1
X_P41 = 1
X_P42 = 1
X_P43 = 1
X_P44 = 1
X_P45 = 1
X_P46 = 1
X_P47 = 1
X_P48 = 1
X_P49 = 1
X_P50 = 1
X_P51 = 1
X_P52 = 1
X_P53 = 1
X_P54 = 1
X_P55 = 1
X_P56 = 1
X_P57 = 1
X_P58 = 1
X_P59 = 1
X_P60 = 1
X_P61 = 1
X_P62 = 1
X_P63 = 1
X_P64 = 1
X_P65 = 1
X_P66 = 1
X_P67 = 1
X_P68 = 1
X_P69 = 1
X_P70 = 1
X_P71 = 1
X_P72 = 1
X_P73 = 1
X_P74 = 1
X_P75 = 1
X_P76 = 1
X_P77 = 1
X_P78 = 1
X_P79 = 1
X_P80 = 1
X_P81 = 1
X_P82 = 1
X_P83 = 1
X_P84 = 1
X_P85 = 1
X_P86 = 1
X_P87 = 1
X_P88 = 1
X_P89 = 1
X_P90 = 1
X_P91 = 1
X_P92 = 1
X_P93 = 1
X_P94 = 1
X_P95 = 1
X_P96 = 1
X_P97 = 1
X_P98 = 1
X_P99 = 1
X_P100 = 1
  
```



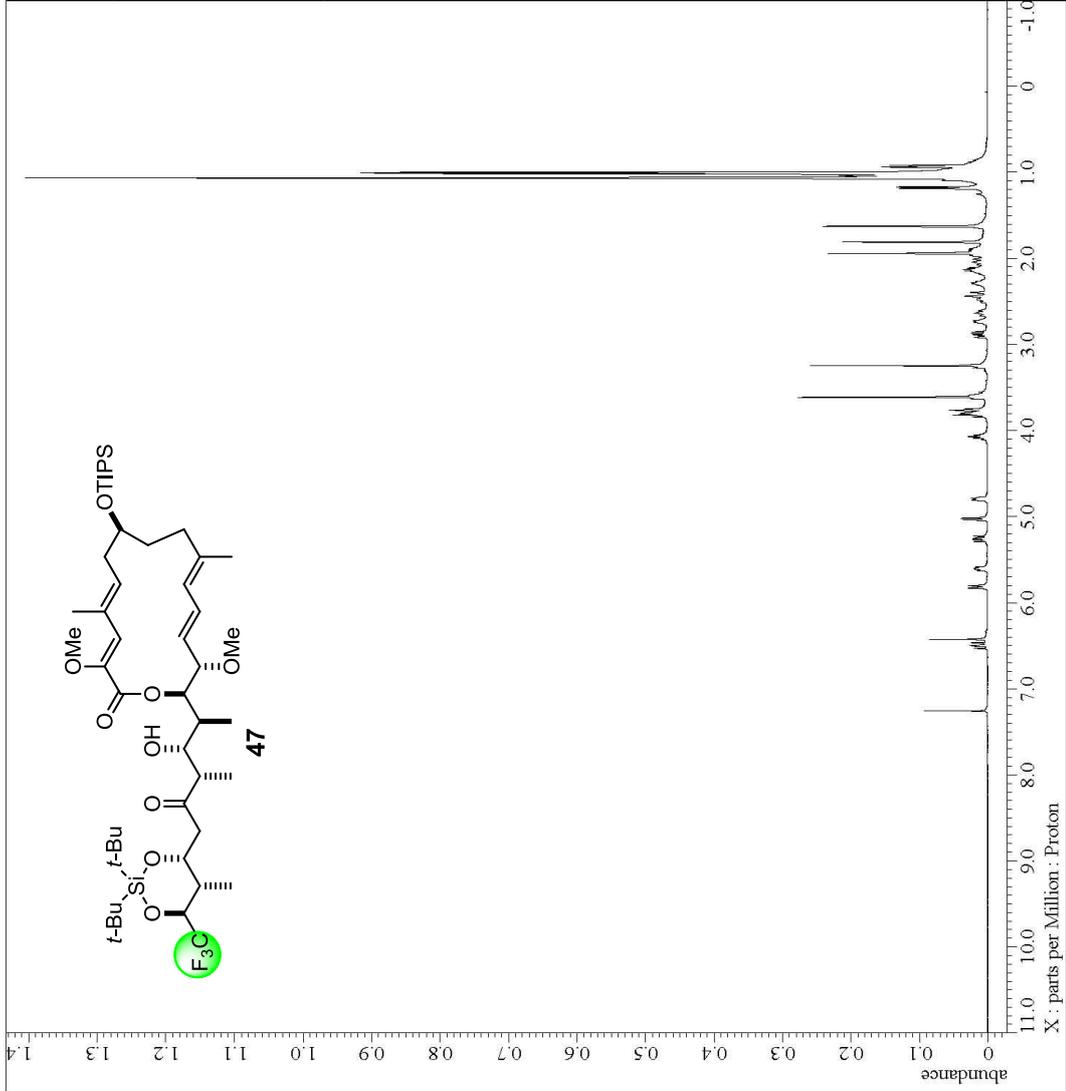
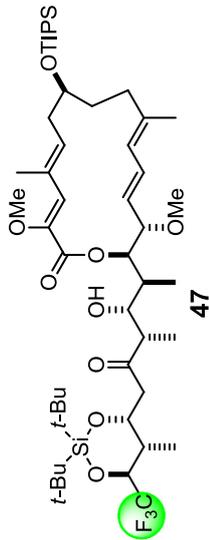


---- PROCESSING PARAMETERS ----
dc_balance(0, FALSE)
temp(0.0, 0.0[°C])
zero(0.0, 0.0[Hz])
zerofill(1)
fft(1, TRUE, TRUE)
machinephase
ppm

Derived from: 05 PhBCL2 major exi043f2_prot

File name = G:\USB 2008.12.13*相取集等
Author = Murata
Experiment = proton.jsp
Sample Id = exi043f2
Solvent = CHLOROFORM-D
Creation Time = 4-SEP-2013 22:45:08
Revision Time = 15-JAN-2014 19:17:39
Current Time = 15-JAN-2014 19:17:51
Comment = single pulse
Data format = 1D FID
Data size = 26214
Data title = Proton
Data units = [ppm]
Dimensions = X
Site = JNM-ECS400
Spectrometer = DELTA2_NMR

Field strength = 9.389766[T] (400 [MHz])
X_Acq_Duration = 4.36731904 [s]
X_Domain = 1H
X_Freq = 399.78219838 [MHz]
X_Offset = 32768
X_Prescans = 1
X_Resolution = 0.22897343 [Hz]
X_Sweep = 7.5030012 [kHz]
X_Sweep_Clippped = 6.00240096 [kHz]
Irr_Domain = Proton
Irr_Freq = 399.78219838 [MHz]
Irr_Offset = 5 [ppm]
Tri_Domain = Proton
Tri_Freq = 399.78219838 [MHz]
Tri_Offset = 5 [ppm]
Clipped = FALSE
Scans = 8
Total_Scans = 8
Relaxation_Delay = 2.5 [s]
Recvr_Gain = 30
Temp_Get = 21.2 [°C]
X_90_Width = 12 [us]
X_Acq_Time = 4.36731904 [s]
X_Angle = 45 [deg]
X_Atn = 1 [dB]
X_Pulse = 6 [us]
Irr_Mode = Off
Tri_Mode = Off

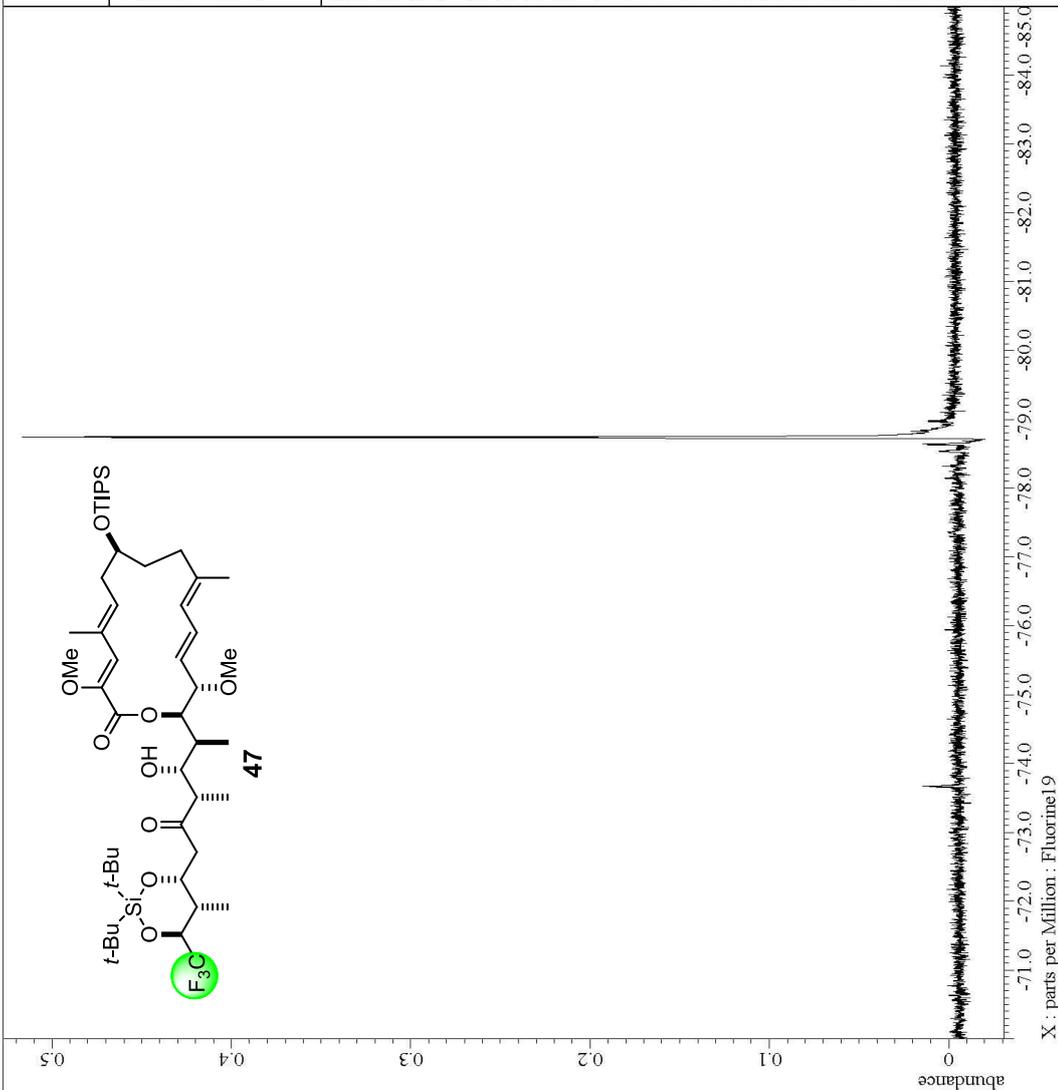
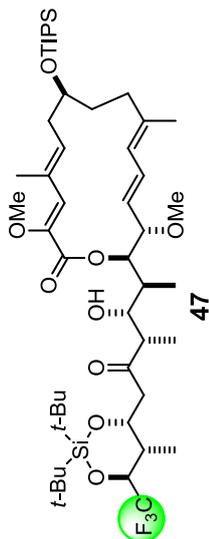




----- PROCESSING PARAMETERS -----
dc_balance(0, FALSE)
sexp(0.2[Hz], 0.0[s])
trapezoid(0[%], 0[%], 80[%], 100[%])
zerofill(1)
fft(1, TRUE, TRUE)
machinephase
ppm
Derived from: 05 PhBCL2 major ex946F2_proto

File name = G:\USB 2008.12.13*相模倉等
Author = Murata
Experiment = proton.jsp
Sample Id = ex946F2
Solvent = CHLOROFORM-D
Creation Time = 5-JUN-2013 16:23:24
Revision Time = 12-JAN-2014 21:47:35
Current Time = 12-JAN-2014 21:47:57
Comment = single pulse
Data format = 131MPLX
Data size = 13167
Data title = Fluorinel9
Data units = [ppm]
Dimensions = X
Site = ECA 500
Spectrometer = DELTA2_MMR

Field strength = 11.7473579 [T] (500 [MHz])
X_acq_duration = 0.6946816 [s]
X_domain = 19f
X_freq = 470.62046084 [MHz]
X_offset = -16894
X_prescans = 1
X_resolution = 1.4395084 [Hz]
X_sweep = 23.58490566 [kHz]
X_sweep_clipped = 18.86792453 [kHz]
Irr_domain = Fluorinel9
Irr_freq = 470.62046084 [MHz]
Irr_offset = 5 [ppm]
Tri_domain = Fluorinel9
Tri_freq = 470.62046084 [MHz]
Tri_offset = 5 [ppm]
Clipped = FALSE
Scans = 8
Total_scans = 8
Relaxation_Delay = 2.5 [s]
Recvr_gain = 46
Temp_Get = 20.8 [dC]
X_90_Width = 13.3 [us]
X_acq_time = 0.6946816 [s]
X_angle = 45 [deg]
X_atn = 1.9 [dB]
X_pulse = 6.65 [us]
Irr_Mode = Off
Tri_Mode = Off





```

---- PROCESSING PARAMETERS ----
dc_balance( 0, FALSE )
h1pc( 0.000000 [s], 0.0 [s] )
h2pc( 0.000000 [s], 0.0 [s] )
zero( 0.000000 [s], 0.0 [s], 80 [s], 100 [s] )
zerofill( 1 )
fft( 1, TRUE, TRUE )
machinephase
ppm
  
```

Derived from: 05 PBC12 minor ex1043f3_prot

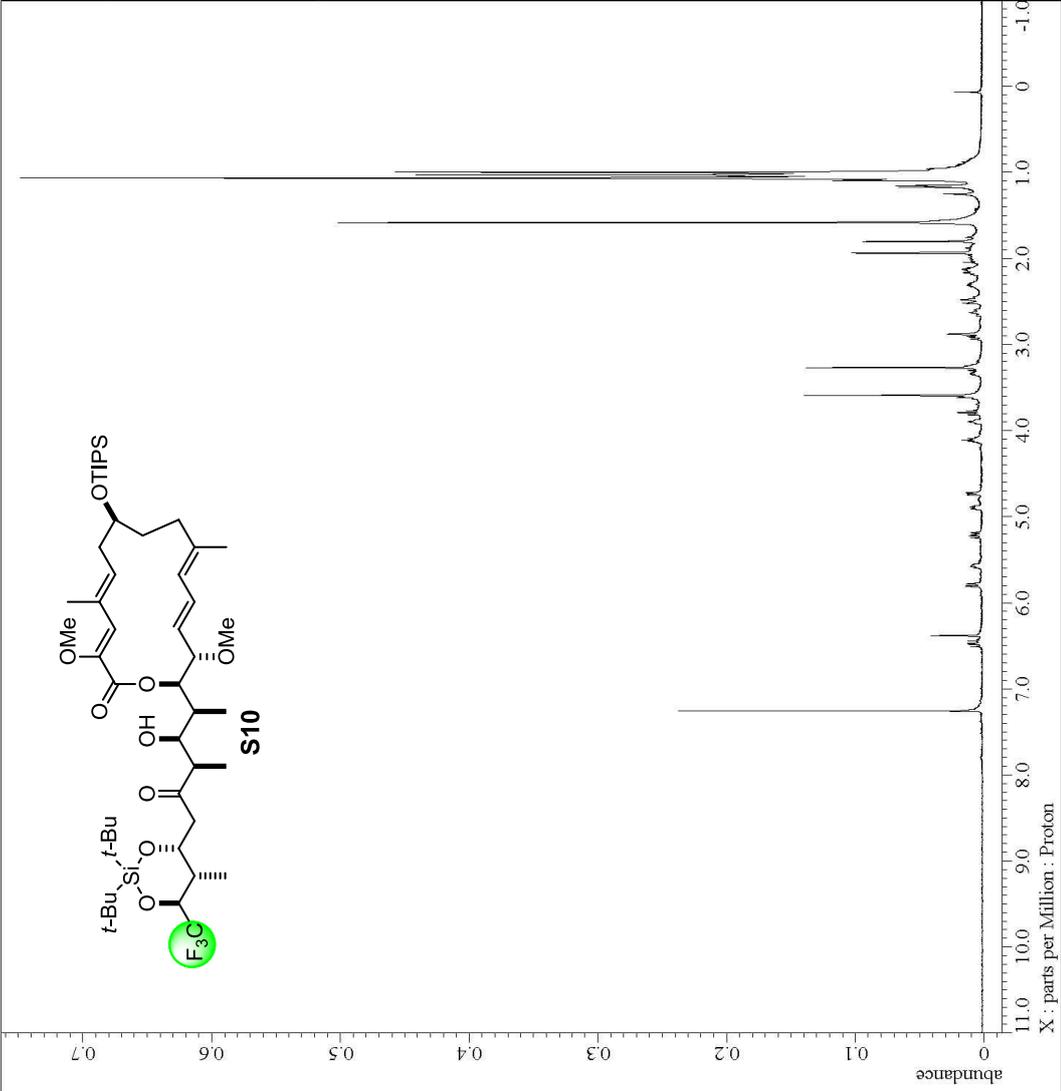
File name = G_MUSB_2008_12_13*相誘合等

```

Author = Murata
Experiment = proton_1xp
Sample Id = ex1043f3
Solvent = CHLOROFORM-D
Creation Time = 4-SEP-2013 22:51:28
Revision Time = 12-JAN-2014 21:48:24
Current Time = 12-JAN-2014 21:48:39
Comment = single_pulse
          1D
          CDF Exp
Dim Size = 26214
Dim Title = Proton
Dim Units = [ppm]
Dimensions = X
Site = JNM-EGS400
Spectrometer = DELTA2_MHR
  
```

```

Field Strength = 9.389766 [T] (400 [MHZ])
X_Acq_Duration = 4.36731904 [s]
X_Domain = 1H
X_Freq = 399.78219838 [MHZ]
X_Gamma = 100.6261815 [ppm]
X_P1 = 2.768
X_P2 = 1
X_P3 = 1
X_P4 = 1
X_P5 = 1
X_P6 = 1
X_P7 = 1
X_P8 = 1
X_P9 = 1
X_P10 = 1
X_P11 = 1
X_P12 = 1
X_P13 = 1
X_P14 = 1
X_P15 = 1
X_P16 = 1
X_P17 = 1
X_P18 = 1
X_P19 = 1
X_P20 = 1
X_P21 = 1
X_P22 = 1
X_P23 = 1
X_P24 = 1
X_P25 = 1
X_P26 = 1
X_P27 = 1
X_P28 = 1
X_P29 = 1
X_P30 = 1
X_P31 = 1
X_P32 = 1
X_P33 = 1
X_P34 = 1
X_P35 = 1
X_P36 = 1
X_P37 = 1
X_P38 = 1
X_P39 = 1
X_P40 = 1
X_P41 = 1
X_P42 = 1
X_P43 = 1
X_P44 = 1
X_P45 = 1
X_P46 = 1
X_P47 = 1
X_P48 = 1
X_P49 = 1
X_P50 = 1
X_P51 = 1
X_P52 = 1
X_P53 = 1
X_P54 = 1
X_P55 = 1
X_P56 = 1
X_P57 = 1
X_P58 = 1
X_P59 = 1
X_P60 = 1
X_P61 = 1
X_P62 = 1
X_P63 = 1
X_P64 = 1
X_P65 = 1
X_P66 = 1
X_P67 = 1
X_P68 = 1
X_P69 = 1
X_P70 = 1
X_P71 = 1
X_P72 = 1
X_P73 = 1
X_P74 = 1
X_P75 = 1
X_P76 = 1
X_P77 = 1
X_P78 = 1
X_P79 = 1
X_P80 = 1
X_P81 = 1
X_P82 = 1
X_P83 = 1
X_P84 = 1
X_P85 = 1
X_P86 = 1
X_P87 = 1
X_P88 = 1
X_P89 = 1
X_P90 = 1
X_P91 = 1
X_P92 = 1
X_P93 = 1
X_P94 = 1
X_P95 = 1
X_P96 = 1
X_P97 = 1
X_P98 = 1
X_P99 = 1
X_P100 = 1
  
```



X : parts per Million : Proton



```

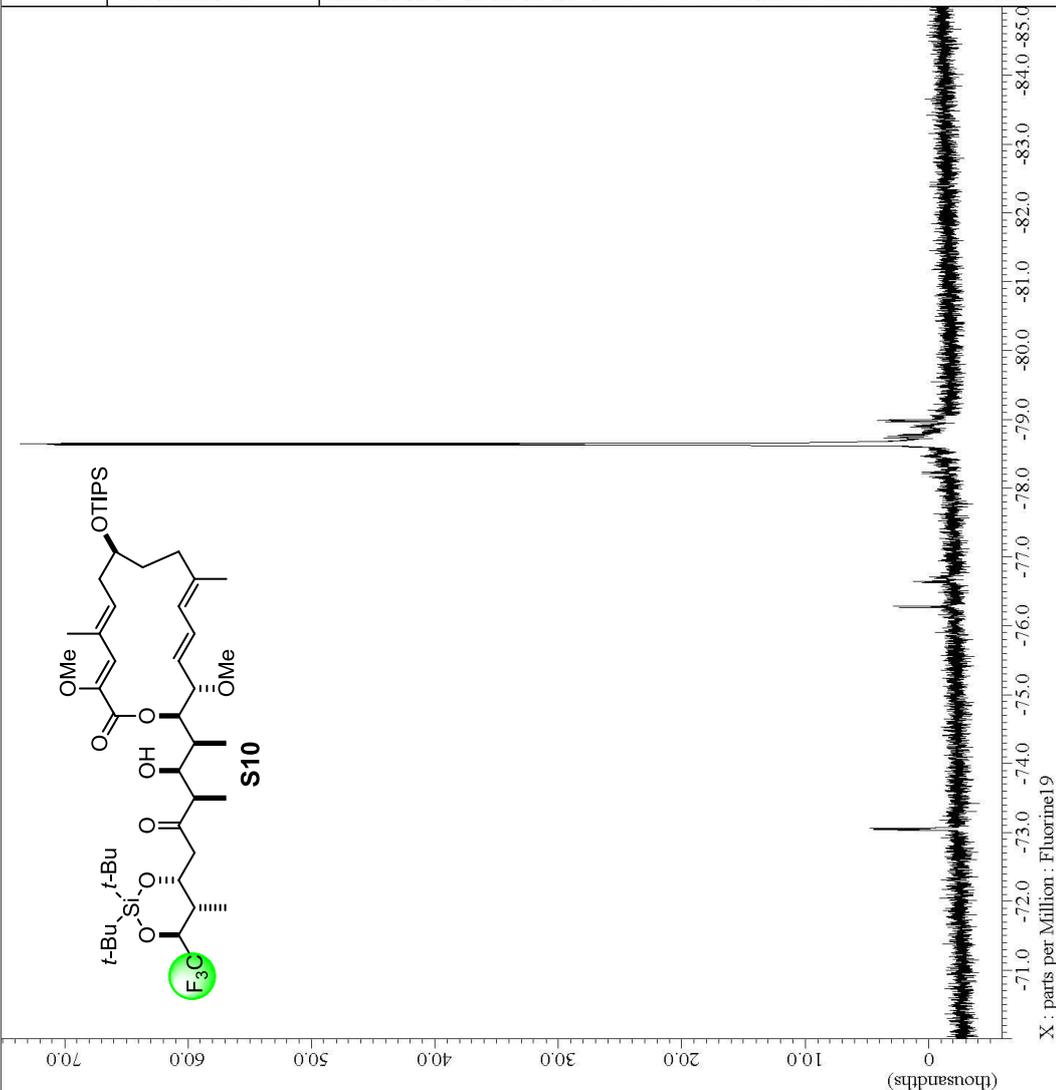
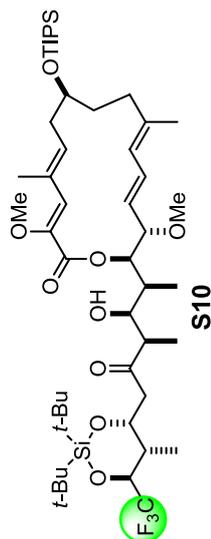
---- PROCESSING PARAMETERS ----
dc Balance( 0, FALSE )
temp 0.2[Hz], 0.0[s]
zero 0.2[Hz], 0.0[s]
zerofill( 1 )
fft( 1, TRUE, TRUE )
machinephase
ppm
Derived from: 05 PhBCL2 minor ex1043F3_19F2
  
```

```

File name = G:\USB 2008.12.13*相取集等
Author = Murata
Experiment = proton.jsp
Sample Id = ex1043F3
Solvent = CHLOROFORM-D
Creation Time = 4-SEP-2013 23:23:46
Revision Time = 12-JAN-2014 21:50:31
Current Time = 12-JAN-2014 21:50:36
Comment = single pulse
Data format = 1D F2/EX
Data Size = 26214
Data Title = Fluorinel9
Data Units = [ppm]
Dimensions = X
Site = JNM-ECS400
Spectrometer = DELTA2_MMR
  
```

```

Field Strength = 9.389766[T], (400 [MHz])
X_Acq_Duration = 1.74063616 [s]
X_Domain = 19f
X_Freq = 376.17105393 [MHz]
X_Offset = 32789 [ppm]
X_P1 = 1
X_P2 = 1
X_P3 = 1
X_P4 = 1
X_P5 = 1
X_P6 = 1
X_P7 = 1
X_P8 = 1
X_P9 = 1
X_P10 = 1
X_P11 = 1
X_P12 = 1
X_P13 = 1
X_P14 = 1
X_P15 = 1
X_P16 = 1
X_P17 = 1
X_P18 = 1
X_P19 = 1
X_P20 = 1
X_P21 = 1
X_P22 = 1
X_P23 = 1
X_P24 = 1
X_P25 = 1
X_P26 = 1
X_P27 = 1
X_P28 = 1
X_P29 = 1
X_P30 = 1
X_P31 = 1
X_P32 = 1
X_P33 = 1
X_P34 = 1
X_P35 = 1
X_P36 = 1
X_P37 = 1
X_P38 = 1
X_P39 = 1
X_P40 = 1
X_P41 = 1
X_P42 = 1
X_P43 = 1
X_P44 = 1
X_P45 = 1
X_P46 = 1
X_P47 = 1
X_P48 = 1
X_P49 = 1
X_P50 = 1
X_P51 = 1
X_P52 = 1
X_P53 = 1
X_P54 = 1
X_P55 = 1
X_P56 = 1
X_P57 = 1
X_P58 = 1
X_P59 = 1
X_P60 = 1
X_P61 = 1
X_P62 = 1
X_P63 = 1
X_P64 = 1
X_P65 = 1
X_P66 = 1
X_P67 = 1
X_P68 = 1
X_P69 = 1
X_P70 = 1
X_P71 = 1
X_P72 = 1
X_P73 = 1
X_P74 = 1
X_P75 = 1
X_P76 = 1
X_P77 = 1
X_P78 = 1
X_P79 = 1
X_P80 = 1
X_P81 = 1
X_P82 = 1
X_P83 = 1
X_P84 = 1
X_P85 = 1
X_P86 = 1
X_P87 = 1
X_P88 = 1
X_P89 = 1
X_P90 = 1
X_P91 = 1
X_P92 = 1
X_P93 = 1
X_P94 = 1
X_P95 = 1
X_P96 = 1
X_P97 = 1
X_P98 = 1
X_P99 = 1
X_P100 = 1
  
```





```

---- PROCESSING PARAMETERS ----
dc_balance( 0, FALSE )
temp 0.0[Hz], 0.0[s]
zerofill( 1, 0[Hz], 80[Hz], 100[Hz] )
fft( 1, TRUE, TRUE )
machinephase
ppm
  
```

Derived from: 07_TsOH_ex1045HPLC2-F2_proton

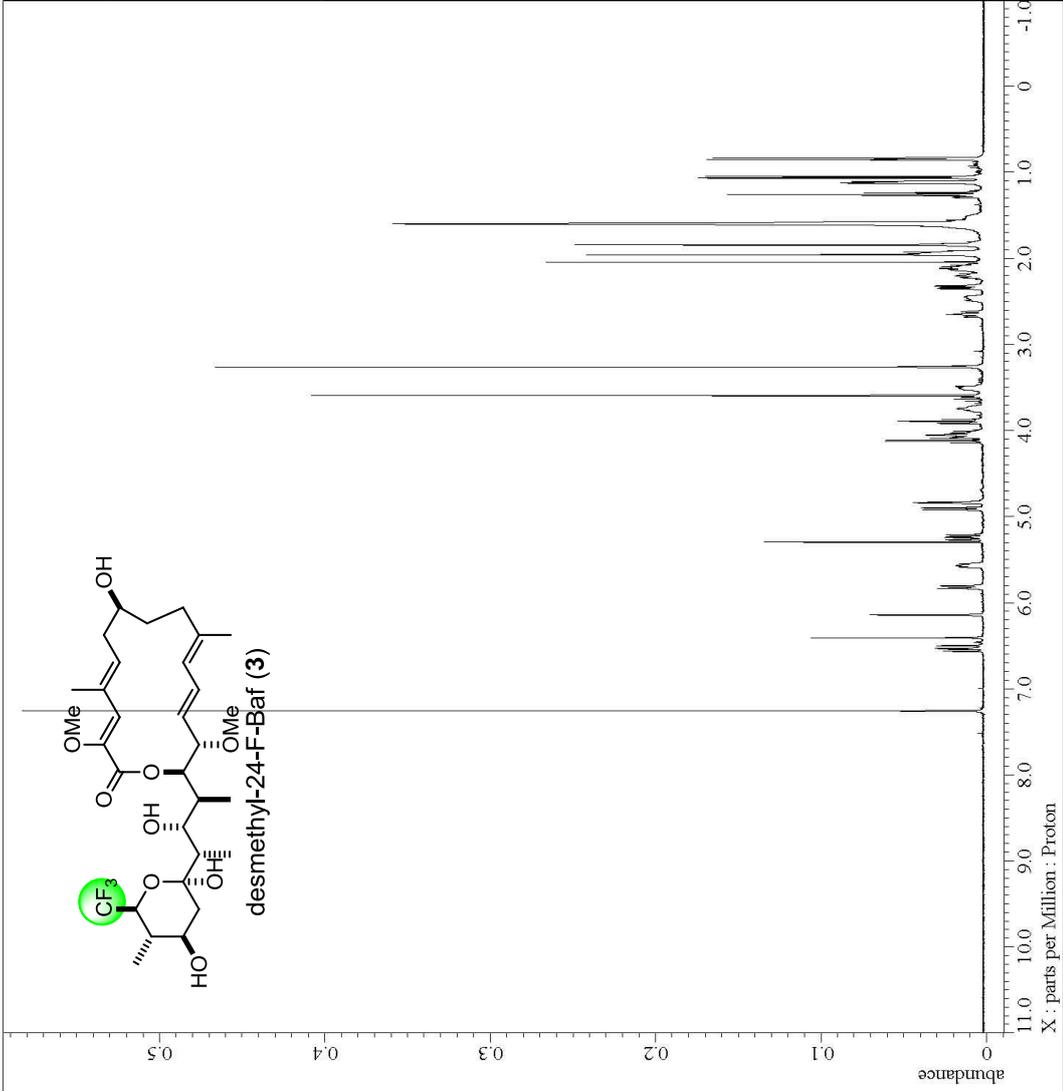
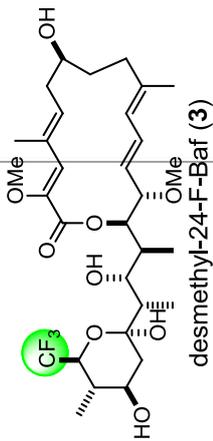
```

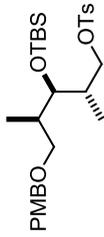
File name = G:\USB 2008.12.13*相模島等
Author = Murata
Experiment = proton.jsp
Sample Id = ex1045HPLC2-F2
Solvent = CHLOROFORM-D
Creation Time = 12-SEP-2013 23:08:57
Revision Time = 12-JAN-2014 21:52:12
Current Time = 12-JAN-2014 21:52:25

Comment = single pulse
Data format = 1DMPLEX
Dim Size = 26214
Dim Title = Proton
Dim Units = [ppm]
Dimensions = X
Site = JNM-ECS400
Spectrometer = DELTA2_MMR
  
```

```

Field Strength = 9.389766[T] (400 [MHz])
X_Acq_Duration = 4.36731904 [s]
X_Domain = 1H
X_Freq = 399.78219838 [MHz]
X_Offset = 32768
X_Prescans = 1
X_Resolution = 0.22897343 [Hz]
X_Sweep = 7.5030012 [kHz]
X_Sweep_Clippped = 6.00240096 [kHz]
Irr_Domain = Proton
Irr_Freq = 399.78219838 [MHz]
Irr_Offset = 5 [ppm]
Tri_Domain = Proton
Tri_Freq = 399.78219838 [MHz]
Tri_Offset = 5 [ppm]
Clipped = FALSE
Scans = 8
Total_Scans = 8
Relaxation_Delay = 2.5 [s]
Recvr_Gain = 36
Temp_Get = 21.2 [dC]
X_90_Width = 12 [us]
X_Acq_Time = 4.36731904 [s]
X_Angle = 45 [deg]
X_Atn = 1 [dB]
X_Pulse = 6 [us]
Irr_Mode = Off
Tri_Mode = Off
  
```



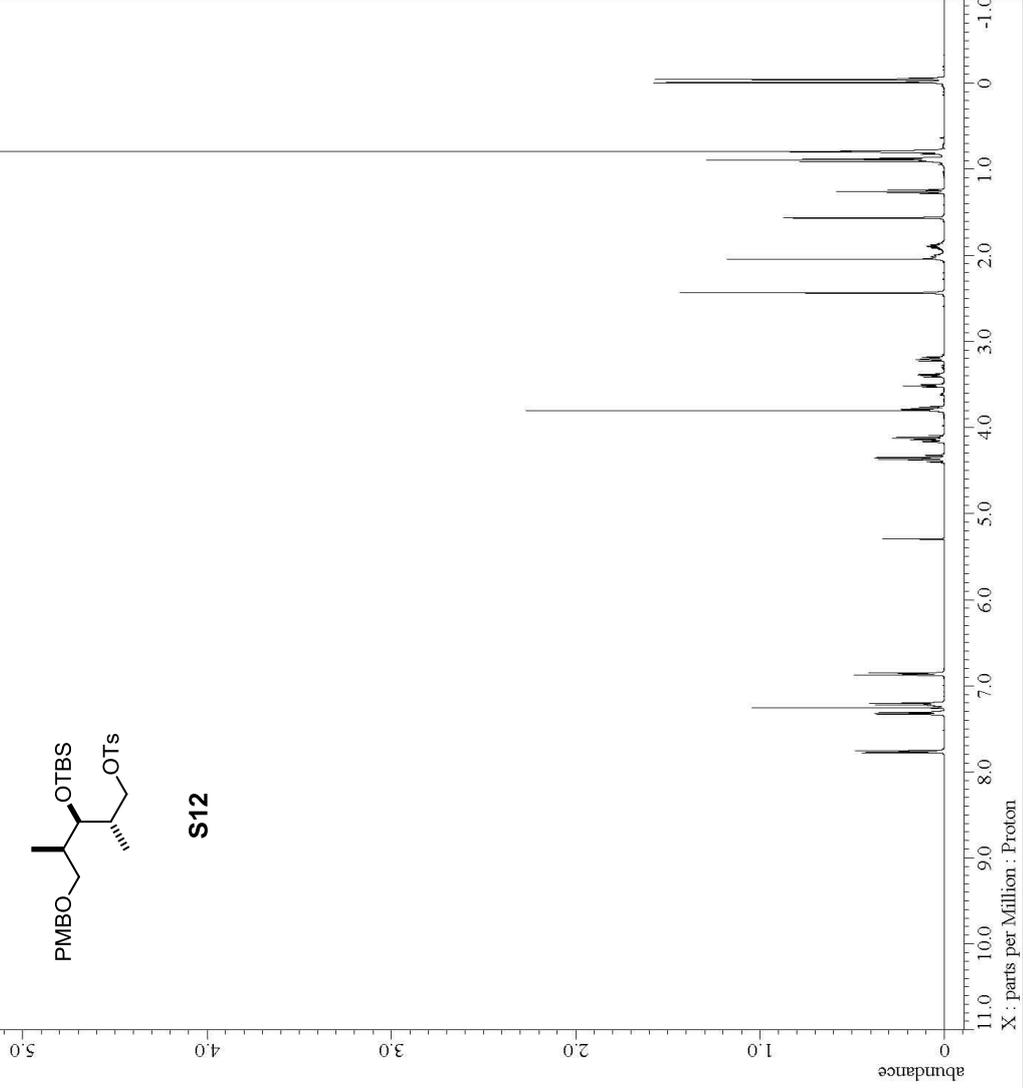


S12

---- PROCESSING PARAMETERS ----
dc_balance(0, FALSE)
temp(0.0, 0.0[°C])
zerofill(1, 0[bits], 80[bits], 100[bits])
fft(1, TRUE, TRUE)
machinephase
ppm
Derived from: 04 Tsc1 ex1063F1_proton-1-1.j

File name = G:\USB 2008.12.13*相模倉
Author = Murata
Experiment = proton.jsp
Sample Id = ex1063F1
Solvent = CHLOROFORM-D
Creation Time = 13-OCT-2013 20:32:58
Revision Time = 12-JAN-2014 22:00:20
Current Time = 12-JAN-2014 22:00:40
Comment = single pulse
Data format = 1, 4096, 16K
Data size = 26214
Data title = Proton
Data units = [ppm]
Dimensions = X
Site = JNM-ECS400
Spectrometer = DELTA2_NMR

Field strength = 9.389766[T] (400 [MHz])
X_acq_duration = 4.36731904 [s]
X_domain = 1H
X_freq = 399.78219838 [MHz]
X_offset = 32768
X_prescans = 1
X_resolution = 0.22897343 [Hz]
X_sweep = 7.5030012 [kHz]
X_sweep_clipped = 6.00240096 [kHz]
Irr_domain = Proton
Irr_freq = 399.78219838 [MHz]
Irr_offset = 5 [ppm]
Tri_domain = Proton
Tri_freq = 399.78219838 [MHz]
Tri_offset = 5 [ppm]
Scans = FALSE
Total_scans = 8
Relaxation_Delay = 2.5 [s]
Recvr_gain = 42
Temp_Get = 21.3 [°C]
X_90_Width = 10.2 [µs]
X_acq_time = 4.36731904 [s]
X_angle = 45 [deg]
X_atn = 0.7 [dB]
X_pulse = 5.1 [µs]
Irr_Mode = Off
Tri_Mode = Off





```

---- PROCESSING PARAMETERS ----
gc_balance( 0, FALSE )
hscp 0.2[Hz], 0.0[Hz]
hscp0 0.2[Hz], 0.0[Hz]
zerofill( 1 )
fft( 1, TRUE, TRUE )
machinephase
ppm
  
```

Derived from: 06 DDQ ex1079F1_proton-1-1.jd

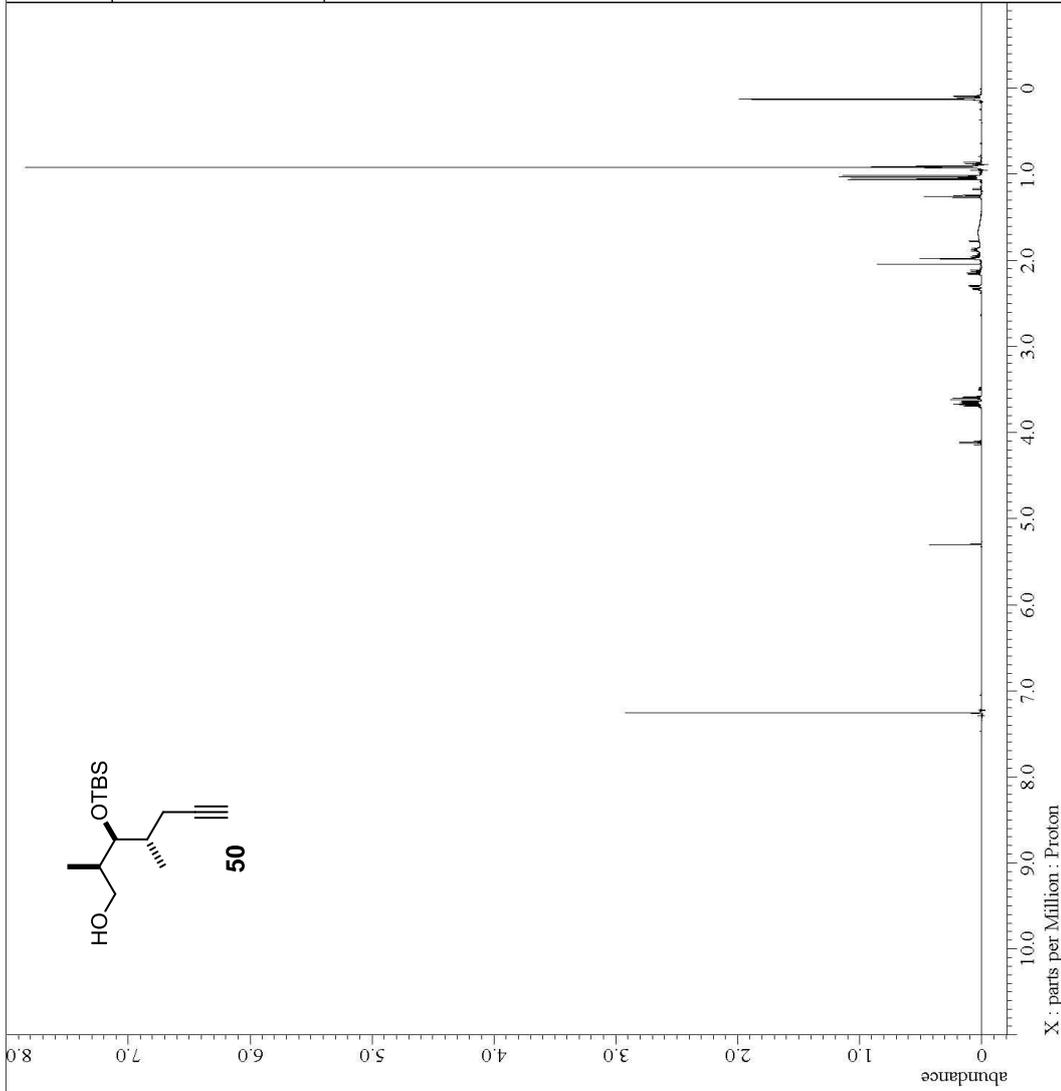
```

File name = G:\USB 2008.12.13*相取集等
Author = Murata
Experiment = proton.jsp
Sample Id = ex1079F1
Solvent = CHLOROFORM-D
Creation Time = 16-OCT-2013 20:13:53
Revision Time = 12-JAN-2014 22:01:38
Current Time = 12-JAN-2014 22:01:54

Comment = single pulse
Data format = 1
Pulse program = 1DHFLEX
Date_ = 52429
Date_ = Proton
Dim Title = [ppm]
Dim Units = X
Dimensions = X
Site = ECA 500
Spectrometer = DELTA2_MMR
  
```

```

Field Strength = 11.7473579 [T] (500[Mhz])
X_Acq_Duration = 6.98351616 [s]
X_Domain = 1H
X_Freq = 500.15991521 [Mhz]
X_Offset = 65590
X_P1 = 1
X_P2 = 1
X_P3 = 1
X_P4 = 1
X_P5 = 1
X_P6 = 1
X_P7 = 1
X_P8 = 1
X_P9 = 1
X_P10 = 1
X_P11 = 1
X_P12 = 1
X_P13 = 1
X_P14 = 1
X_P15 = 1
X_P16 = 1
X_P17 = 1
X_P18 = 1
X_P19 = 1
X_P20 = 1
X_P21 = 1
X_P22 = 1
X_P23 = 1
X_P24 = 1
X_P25 = 1
X_P26 = 1
X_P27 = 1
X_P28 = 1
X_P29 = 1
X_P30 = 1
X_P31 = 1
X_P32 = 1
X_P33 = 1
X_P34 = 1
X_P35 = 1
X_P36 = 1
X_P37 = 1
X_P38 = 1
X_P39 = 1
X_P40 = 1
X_P41 = 1
X_P42 = 1
X_P43 = 1
X_P44 = 1
X_P45 = 1
X_P46 = 1
X_P47 = 1
X_P48 = 1
X_P49 = 1
X_P50 = 1
X_P51 = 1
X_P52 = 1
X_P53 = 1
X_P54 = 1
X_P55 = 1
X_P56 = 1
X_P57 = 1
X_P58 = 1
X_P59 = 1
X_P60 = 1
X_P61 = 1
X_P62 = 1
X_P63 = 1
X_P64 = 1
X_P65 = 1
X_P66 = 1
X_P67 = 1
X_P68 = 1
X_P69 = 1
X_P70 = 1
X_P71 = 1
X_P72 = 1
X_P73 = 1
X_P74 = 1
X_P75 = 1
X_P76 = 1
X_P77 = 1
X_P78 = 1
X_P79 = 1
X_P80 = 1
X_P81 = 1
X_P82 = 1
X_P83 = 1
X_P84 = 1
X_P85 = 1
X_P86 = 1
X_P87 = 1
X_P88 = 1
X_P89 = 1
X_P90 = 1
X_P91 = 1
X_P92 = 1
X_P93 = 1
X_P94 = 1
X_P95 = 1
X_P96 = 1
X_P97 = 1
X_P98 = 1
X_P99 = 1
X_P100 = 1
  
```





```

---- PROCESSING PARAMETERS ----
dc_bbalance( 0, FALSE )
temp( 0.0[Hz], 0.0[s] )
zerofill( 1, 0[Hz], 0[Hz], 80[Hz], 100[Hz] )
fft( 1, TRUE, TRUE )
machinephase
ppm
  
```

Derived from: 05 PFTS ex1123F2_proton-1-1.j

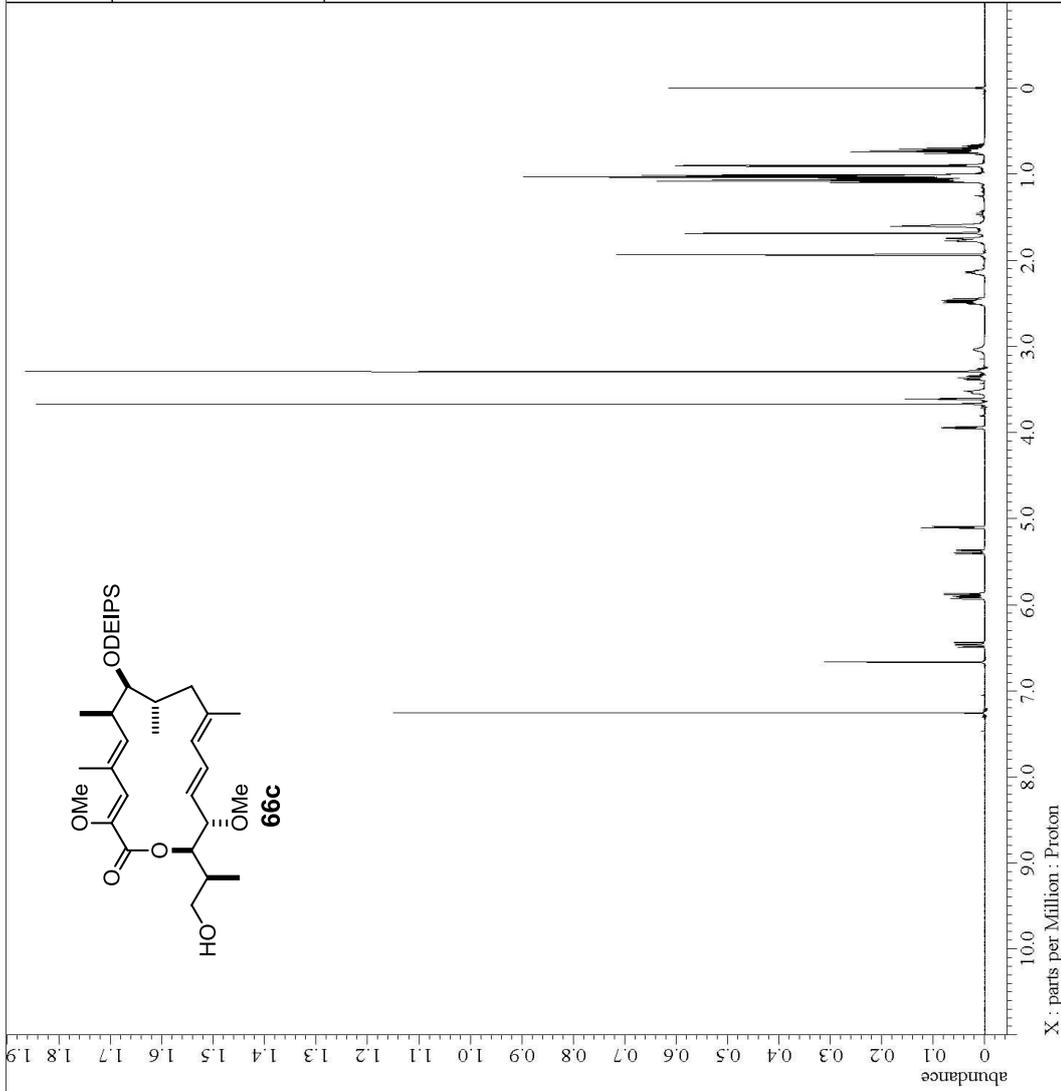
```

File name      = G:\USB 2008.12.13*相模倉等
Author         = Murata
Experiment     = proton.jsp
Sample Id      = ex1123F2
Solvent        = CHLOROFORM-D
Creation Time  = 3-NOV-2013 22:59:01
Revision Time  = 12-JAN-2014 22:07:33
Current Time   = 12-JAN-2014 22:07:46

Comment       = single pulse
Data format   = 1
Pulse prog     = 1
D1           = 524.99
D11          = Proton
D12          = [ppm]
Dimensions    = X
Site          = ECA 500
Spectrometer  = DELTA2_MMR
  
```

```

Field Strength = 11.7473579 [T] (500 [MHz])
X_Acq_Duration = 6.98351616 [s]
X_Domain       = 1H
X_Freq         = 500.15991521 [MHz]
X_Offset       = 655.9
X_P1           = 1
X_P2           = 1
X_P3          = 0.14319434 [Hz]
X_Resolution   = 9.38438438 [kHz]
X_Sweep        = 7.50750751 [kHz]
X_Sweep Clipped
Irr_Domain     = Proton
Irr_Freq      = 500.15991521 [MHz]
Irr_Offset    = 5.0 [ppm]
Tri_Domain    = Proton
Tri_Freq      = 500.15991521 [MHz]
Tri_Offset    = 5.0 [ppm]
Clipped       = FALSE
Scans         = 8
Total_Scans   = 8
Relaxation_Delay = 2.5 [s]
Recvr_Gain    = 42
Temp_Get      = 23.5 [dC]
X_90_Width    = 6 [us]
X_Acq_Time    = 6.98351616 [s]
X_Angle       = 45 [deg]
X_Attn        = 3.7 [dB]
X_Pulse       = 3 [us]
Irr_Mode      = Off
Tri_Mode      = Off
  
```



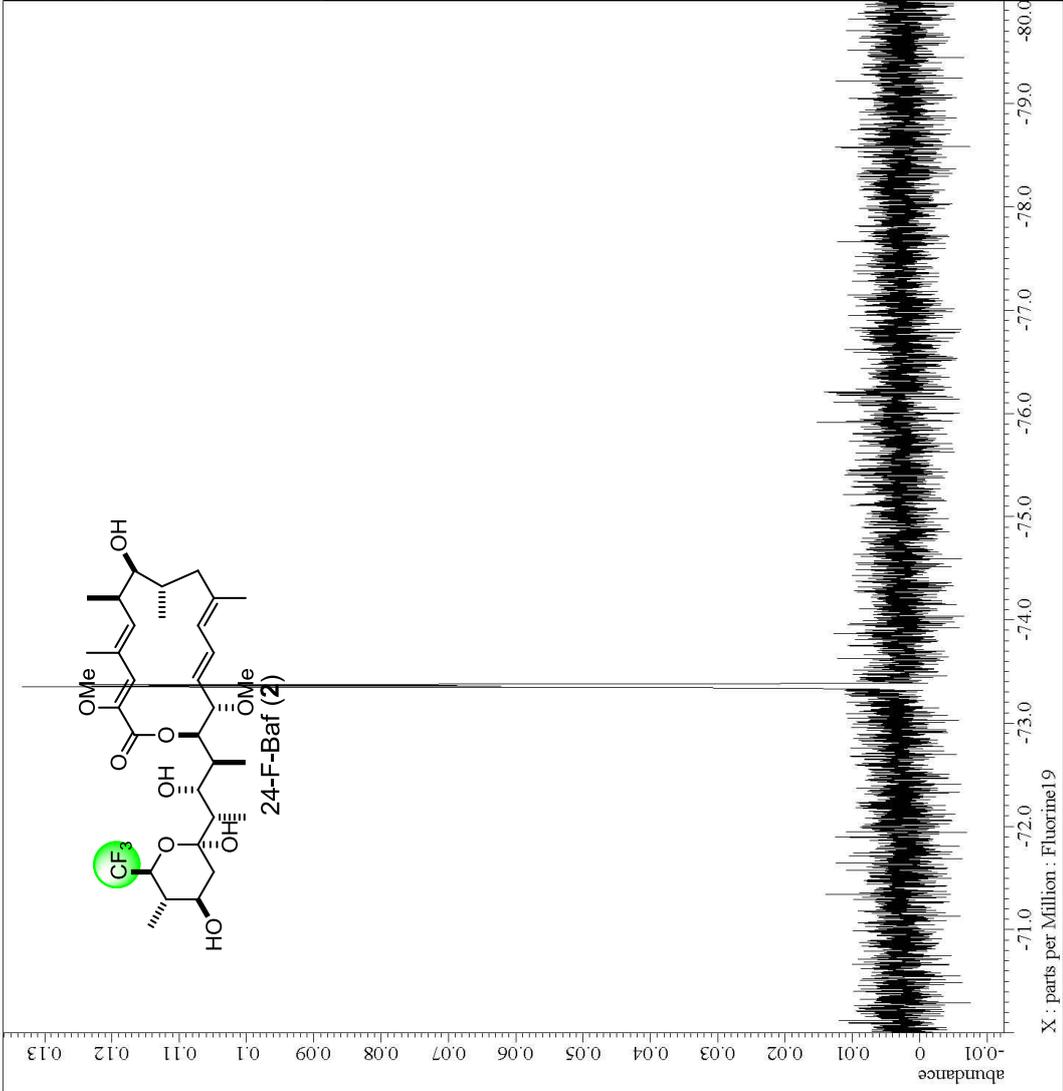
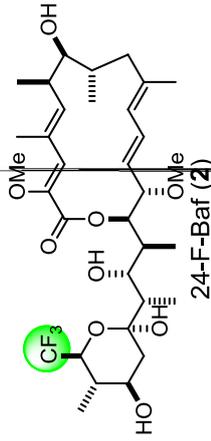


---- PROCESSING PARAMETERS ----
dc_balance(0, FALSE)
temp(0.0, 0.0 [s])
zero(0.0, 0.0 [s])
zerofill(1)
fft(1, TRUE, TRUE)
machinephase
ppm

Derived from 08 TsCH 19F 取切直cex1129_1311

File name = G:\USB 2008.12.13*相取集等
Author = Murata
Experiment = proton.jpg
Sample Id = ex1129_131212
Solvent = CHLOROFORM-D
Creation Time = 12-DEC-2013 16:22:06
Revision Time = 12-JAN-2014 22:13:52
Current Time = 12-JAN-2014 22:14:15
Comment = single pulse
Dim Comment = 1
Dim Size = 26214
Dim Title = Fluorinel9
Dim Units = [ppm]
Dimensions = X
Site = JNM-ECS400
Spectrometer = DELTA2_NMR

Field Strength = 9.389766 [T] (400 [MHz])
X_Acq_Duration = 1.74063616 [s]
X_Domain = 19f
X_Freq = 376.17105393 [MHz]
X_Offset = 32789
X_Prescans = 1
X_Resolution = 0.5745026 [Hz]
X_Sweep = 18.8253012 [kHz]
X_Sweep_Clippped = 15.06024096 [kHz]
Irr_Domain = Fluorinel9
Irr_Freq = 376.17105393 [MHz]
Irr_Offset = 5 [ppm]
Tri_Domain = Fluorinel9
Tri_Freq = 376.17105393 [MHz]
Tri_Offset = 5 [ppm]
Clipped = FALSE
Scans = 8
Total_Scans = 8
Relaxation_Delay = 2.5 [s]
Recvr_Gain = 50
Temp_Get = 19.4 [dc]
X_90_Width = 8 [us]
X_Acq_Time = 1.74063616 [s]
X_Angle = 45 [deg]
X_Atn = 2.5 [dB]
X_Pulse = Off
Irr_Mode = Off
Tri_Mode = Off



X: parts per Million : Fluorine19

謝辞

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^{1,2}, Hiroshi Tsuchikawa¹, Nobuaki Matsumori¹, Michio Murata^{1,2*} and Takeo Usui³

¹Graduate School of Science, Osaka University, 1-1 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-0043

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

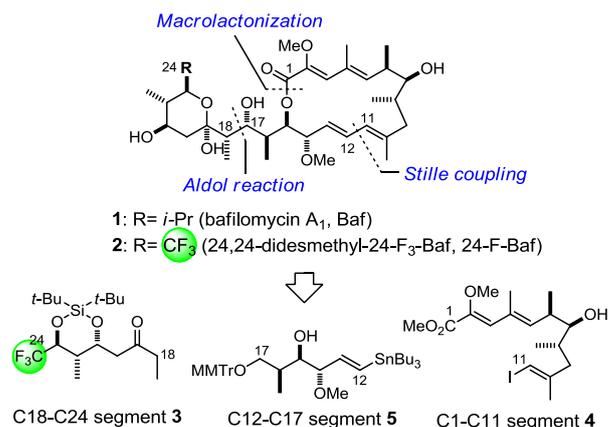
³Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572

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.¹ 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 molecular-targeting drugs. Since bafilomycin A₁ (Baf, **1**) (Figure 1) was first isolated in 1983 from *Streptomyces griseus* sp. *sulphurus*,² the antibiotic has long been regarded as a representative V-ATPase inhibitor.³ 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_o domain of V-ATPase.⁴ 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 REDOR⁵ 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, ¹⁹F 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.⁶ We have demonstrated that REDOR provides important evidence for elucidating the structure of channel complex of ¹⁹F-labeled amphotericin B in lipid bilayers.⁷ In this study we designed and synthesized a novel ¹⁹F-labeled Baf analogue that had potent inhibitory activity to V-ATPase and could be used for



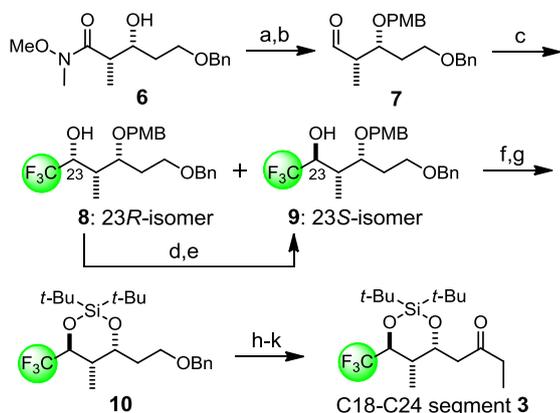
investigating the molecular interactions between Baf and the protein.

Figure 1. Structure of bafilomycin and its fluorinated analogue

As a target molecule, 24,24-didesmethyl-24-F₃-Baf (24-F-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.⁸ (ii) Fluorine substitution for hydroxy groups in the THP ring was avoided because the destabilization of products was expected. (iii) A CF₃ group would be facile to be introduced and equivalently replace the *i*-Pr group in terms of the bulkiness.⁹

The efficient synthesis of **2** was planned by using the diastereoselective aldol reaction of a novel CF₃-labeled C18-C24 segment **3** and the known C1-C17 macrocyclic core,^{10b} 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**.¹⁰

Synthesis of **3** commenced with PMB protection of the known Wienreb amide **6** prepared from 1,3-propanediol in 4 steps,¹¹ followed by DIBAL reduction to afford **7** (Scheme 1). Next, diastereoselective trifluoromethylation was attempted by the exposure of the aldehyde **7** with TMSCF₃ 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 β-hydroxy group of **7** was not successful, we attempted to invert the C23 configuration of **8**. After several trials,¹² 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.¹³

Scheme 1. Synthesis of the C18-C24 segment **3**. Reagents and conditions: a) PMBOCNHCl₃, Sc(OTf)₃, toluene, rt, 70%; b) DIBAL, CH₂Cl₂, -78 °C, 80%; c) TMSCF₃, TBAF, THF, rt, 49% for **8**, 27% for **9**; d) Dess-Martin periodinane, NaHCO₃, CH₂Cl₂, rt, 92%; e) L-Selectride, THF, -78 °C, 68% for **9**, 16% for **8**; f) DDQ, CH₂Cl₂, H₂O, rt, then AcOH, THF, 40 °C, 79%; g) (*t*-Bu)₂Si(OTf)₂, 2,6-lutidine, DMF, rt, 89%; h) Pd/C, H₂, EtOAc, rt, 98%; i) Dess-Martin Periodinane, NaHCO₃, CH₂Cl₂, rt, 94%; j) EtMgBr, THF, rt, 93%; k) Dess-Martin Periodinane, NaHCO₃, CH₂Cl₂, rt, 90%.

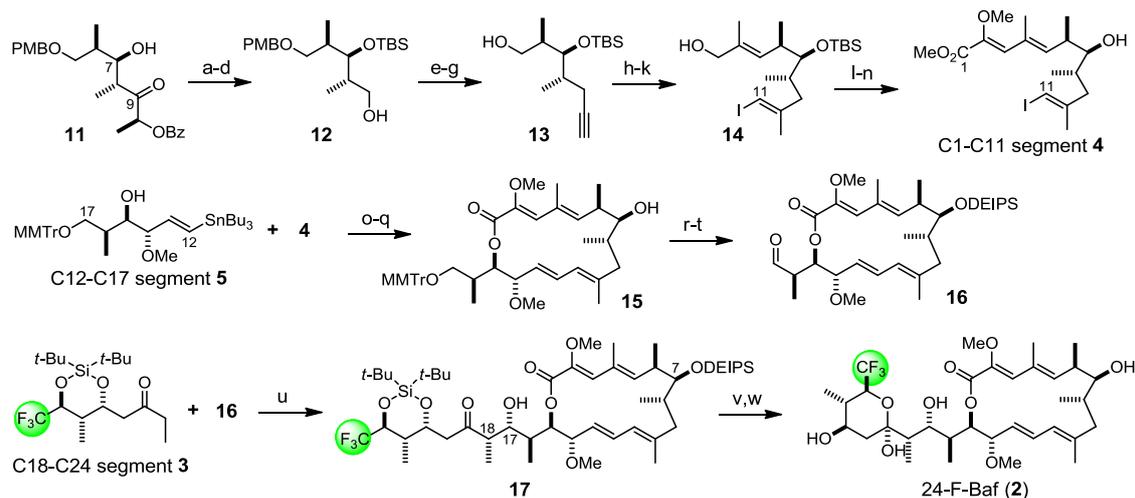
After removal of the PMB group, the resulting diol was protected as a cyclic silyl ether to furnish **10**. Hydrogenolysis of the benzyl group followed by Dess-Martin oxidation afforded an aldehyde, which was then treated with Grignard reagent and the producing alcohol was oxidized to give **3** in

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 silylated with TBSOTf and 2,6-lutidine, and the reduction of 9-ketone followed by one-pot treatment with K₂CO₃ furnished the diol. Then oxidative cleavage and NaBH₄ reduction resulted in the formation of **12**. Then, the primary alcohol **12** was converted to alkyne **13** 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,^{10f,16} after three carbon elongation of the allylic alcohol moiety in 3 steps, the formation of the vinyl iodide was performed under the Negishi's conditions¹⁷ 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**¹⁸ and construction of the macrocyclic structure were performed following the previous protocol.¹⁰ The Stille coupling of segments **4** and **5** under the conditions reported by Marshall *et al.*^{10f} efficiently gave the *E,E* diene product in 80% yield. Then, saponification of methyl ester^{10b} afforded the corresponding seco acid and the following macrolactonization was examined under Yamaguchi conditions^{10e,19} 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.*^{10a} was next attempted. First, the secondary alcohol of **15** was protected as a diethylisopropylsilyl ether, which was necessary for the following reactions.^{10b} The deprotection of the primary



Scheme 2. Synthesis of fluorinated bafilomycin derivative **2**. Reagents and conditions: a) TBSOTf, 2,6-lutidine, -78 °C; b) NaBH₄, THF, MeOH, rt, then K₂CO₃, rt, 79% (2 steps); c) NaIO₄, CH₂Cl₂, pH 7.0 buffer, rt; d) NaBH₄, THF, MeOH, rt, 91% (2 steps); e) TsCl, Py, rt, 99%; f) LiCCH·H₂NNH₂, DMSO, rt, 64%; g) DDQ, CH₂Cl₂, pH 7.0 buffer, 94%; h) (COCl)₂, DMSO, Et₃N, CH₂Cl₂, -78 °C; i) Ph₃P=C(Me)CO₂Et, toluene, 100 °C; j) DIBAL, CH₂Cl₂, -78 °C, 83% (3 steps); k) Cp₂ZrCl₂, AlMe₃, ClCH₂CH₂Cl, 60 °C then I₂, THF, -30 °C, 66%; l) TEMPO, TBACl, NCS, CH₂Cl₂, pH 8.6 buffer, rt, 88%; m) (*i*-PrO)₂P(O)CH(OMe)CO₂Me, KHMDS, 18-crown-6 ether, THF, rt, 49%; n) TBAF, THF, rt, 84%; o) Pd₂(dba)₃·CHCl₃, Ph₃As, LiCl, NMP, rt, 85%; p) KOH, dioxane, 80 °C; q) 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride, *i*-Pr₂NEt, toluene, rt, then diluted with toluene, DMAP, rt, 51% (2 steps); r) DEIPSOTf, 2,6-lutidine, CH₂Cl₂, 0 °C, 85%; s) PPTS, THF, MeOH, rt, 78%; t) (COCl)₂, DMSO, Et₃N, CH₂Cl₂, -78 °C; u) PhBCl₂, *i*-Pr₂NEt, CH₂Cl₂, -78 °C, 32% (2 steps); v) 18% HF·Py, THF, rt; w) TsOH·H₂O, CH₂Cl₂, MeCN, H₂O, 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.^{10a,10b} As a result, the diastereoselective aldol reaction proceeded smoothly to afford the desired β -hydroxyketone **17** in 32 % yield for 2 steps with 20:1 diastereomer ratio.²⁰ This result clearly revealed that the CF₃ moiety had no adverse effect on the high stereoselectivity reported in the syntheses of **1**.^{10a,10b} Finally, stepwise removal of silyl groups was achieved using HF·Py, followed by TsOH·H₂O, to afford 24-F-Baf **2** in 36% yield after HPLC purification.

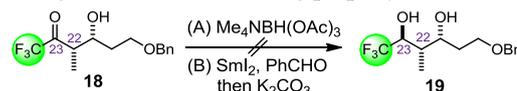
The V-ATPase inhibitory activity of 24-F-Baf **2** was evaluated by two methods (See Supporting Information for details).^{21,22} First, the effect on the acidification of intracellular acidic organelles by V-ATPase in rat 3Y1 fibroblasts was examined. Treatment with 100 nM of **2** caused the complete 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

- 1 a) M. Forgac, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 917. b) B. Ma, Y. Xiang, L. An, *Cell. Signal.* **2011**, *23*, 1244.
- 2 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.
- 4 a) M. Huss, G. Ingenhorst, S. König, M. Gabel, S. Dröse, A. Zeeck, K. Altendorf, H. Wiczorek, *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.
- 6 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.
- 8 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. Belfiore, A. Zocchetti, G. D. Clarke, C. Farina, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1883.
- 9 a) C. Wolf, W. A. König, C. Roussel, *Liebigs Ann.* **1995**, 781. b) F. Leroux, *Chem. Bio. Chem.* **2004**, *5*, 644.
- 10 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, *Tetrahedron 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 because of the undesired chelation of a CF₃ 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
- 16 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.
- 21 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/chemlett/index.html>.