



Title	フッ化アンフォテリシンBの合成およびその分子複合体における相互作用に関する研究
Author(s)	土川, 博史
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/47686
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

フッ化アンフォテリシンB の合成および
その分子複合体における相互作用に関する研究

2006 年

学 位 論 文

土 川 博 史

化 学 専 攻

大阪大学大学院理学研究科

目次

第一章 序論

- 1-1 ポリエンマクロライド系抗生物質
- 1-2 AmB の分子構造およびイオンチャネルの推定構造
- 1-3 AmB の選択性および AmB-ステロール会合モデルの妥当性について
- 1-4 固体NMRによる原子間距離測定
- 1-5 標識化天然物を用いた REDOR の適用例
- 1-6 AmB チャネル複合体構造の解明に対するアプローチ
- 1-7 本研究の目的

参考文献

第二章 F-AmB の合成

- 2-1 緒言
- 2-2 F-AmB の逆合成
- 2-3 練習基質を用いた脱保護の検討
- 2-4 C1-C21 セグメントの調製
- 2-5 C22-C37 セグメントの合成
- 2-6 セグメントのカップリング
- 2-7 脱保護
- 2-8 F-AmB methyl ester の生物活性試験

第三章 F-AmB methylester を用いた固体NMR測定

- 3-1 緒言
- 3-2 測定
- 3-3 結果の考察

第四章 結論

参考文献

第五章 実験の部

- 5-1 F-AmB の合成
- 5-2 活性試験
- 5-3 固体 NMR 測定

謝辞

略語表

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

ODS	octadecylsilica
PCC	pyridinium chlorochromate
ppm	part per million
PPTS	pyridinium <i>p</i> -toluenesulfonate
py	pyridine
RDX	REDOR of X cluster
REDOR	Rotational-Echo Double Resonance
TASF	tris(dimethylamino)sulfoniumdifluorotrimethylsilicate
TBAF	tetrabutylammoniumfluoride
TBS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
THF	tetrahydrofuran
TLC	thin-layer chromatography
TMS	trimethylsilyl

第一章 序論

1-1 ポリエンマクロライド系抗生物質

抗生物質は細胞壁、細胞膜、細胞質、リボゾーム、核（核酸）などに作用して、その合成や機能を阻害することにより殺菌的あるいは静菌的作用をもたらす。このとき、ヒトの細胞に影響を与えることなく、選択的に細菌に作用しなければならない。つまり、細菌特有の構造を特異的に認識して毒性を示すものが抗生物質として優れていることになる。同様に、抗真菌物質として優れているのは、真菌特有の構造を認識して毒性を示すものである。しかし、真菌はヒトと同じく真核生物するために、優れた選択毒性を発揮できる生理的ターゲットが少ない。そのため、抗真菌剤の開発は抗菌剤に比べて困難が伴う。

真菌による疾患は一般に難治であることが多く、加えて近年の臓器移植や後天的免疫不全（AIDS）の増加に伴って真菌症も増加しているので、優秀な抗真菌剤の必要性が高まっている。現在使用されている抗真菌剤の系統としては、天然物およびその誘導体であるポリエン、キャンディン系や、合成品であるアゾール、ピリミジン、アリルアミン、モルフォリン系などが存在するが、なかでもポリエンマクロライド抗生物質は強力な活性と幅広い抗菌スペクトルを有する重要な化合物群である^{1,2)}。ポリエンマクロライド抗生物質は、アゾールやピリミジン系の真菌剤と異なりその作用標的が細胞膜にあるので、薬剤が細胞内に取り込まれなくても抗真菌作用を表わすことができる。そのため、薬剤の細胞膜透過性の低下や細胞外排出の促進、標的酵素のアミノ酸変異による親和性低下に起因する耐性機序が存在せず、耐性菌のできにくい性質を持っている。これらは土壌放線菌により生産されるが、1951年に最初の例であるナイスタチンが発見されて以来³⁾、数多くの類縁体が報告されており⁴⁻⁹⁾（図1）、なかでもアンフォテリシンB（AmB）、ナイスタチン、ピマリシンが重要な抗真菌薬として広く使用されている。しかし、大部分は難水溶性と強い副作用のため、医療では主として局所的な使用に限定されている。この中で全身性感染症の治療に用いられているのはアンフォテリシンB（AmB）が唯一であり、静脈注射による深在性真菌症の化学療法に欠くことのできない医薬品である¹⁰⁾。

現在市販されている AmB 製剤は数種類あるが、それらは AmB をリン脂質や界面活性剤と混合して可溶化することで親水性を向上させ、血液中の AmB 濃度を薬効量まで高めることでその作用を増強している^{11,12)}。しかし、*in vivo*における腎毒性

は依然として強く、現在も副作用の軽減が課題となっている¹³⁾。AmB の毒性軽減と水溶性向上は化学誘導からも研究が進められており、*in vitro* 実験で良好な結果を示す誘導体がいくつか報告されている¹⁴⁻¹⁷⁾。しかし、不安定なポリエンマクロライド抗生物質の化学誘導や精製は一般に困難であり、大量調製が難しいため、今のところ製剤化には至っていない。

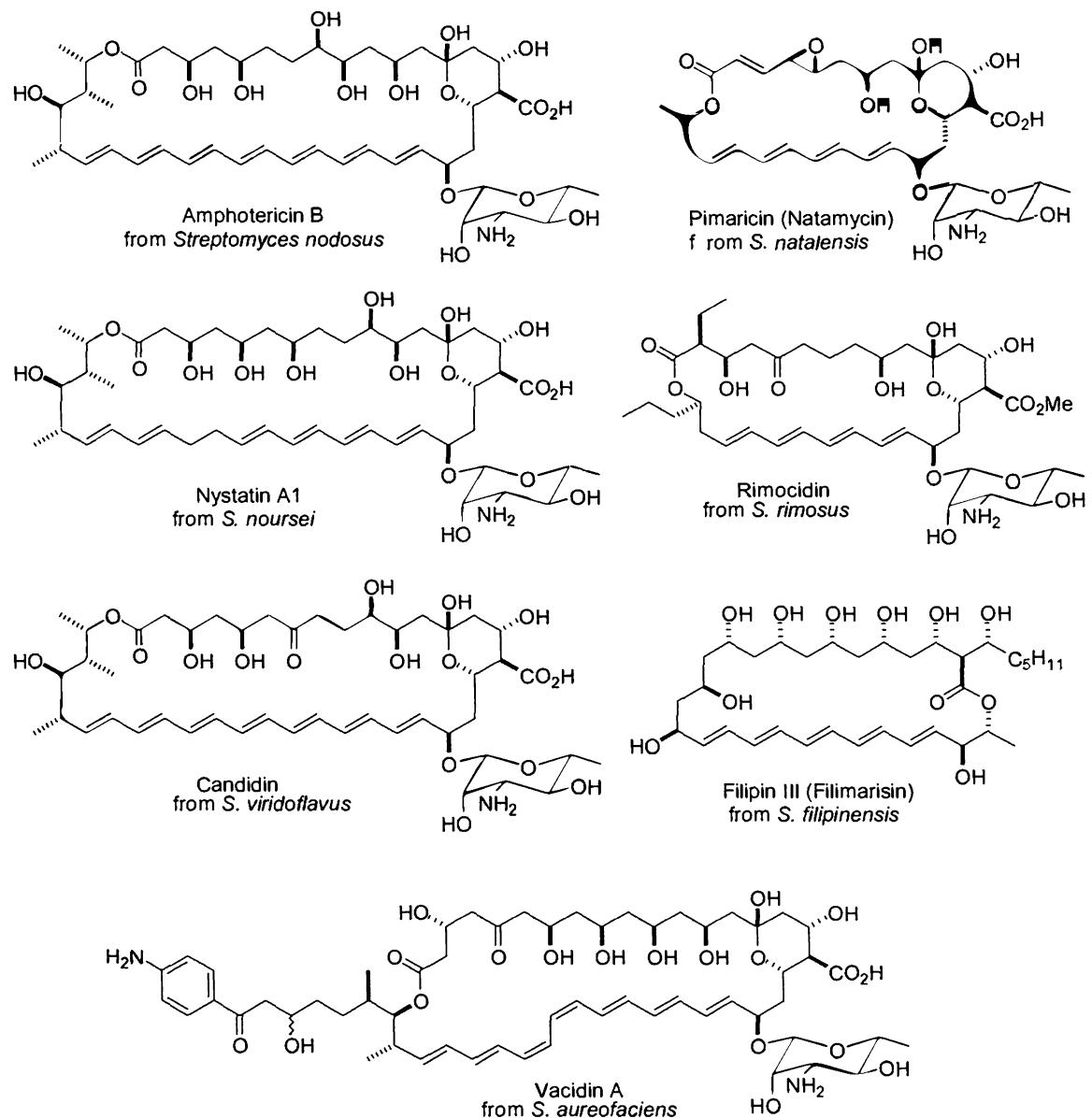


図1-1 ポリエンマクロライド抗生物質

1-2 AmB の分子構造およびイオンチャネルの推定構造

AmB は 1956 年に土壌放線菌 *Streptomyces nodosus* から単離され¹⁸⁾、その構造は 1971 年に *N*-iodoacetyl 誘導体の X 線構造解析により同定された¹⁹⁾。AmB の構造は 38 員のマクロライド環の片側に疎水的なヘプタエンを有し、反対側に親水的なポリオールが存在する、ポリエンマクロライド特有の両親媒構造である(図 1-1)。また、分子長軸方向の片側にカルボキシル基、マイコサミンが配置する両性イオン化合物でもある。

このような構造的性質に加え、膜の透過性亢進や電気抵抗の変化を引き起こす作用などから、AmB は脂質二重膜を貫通したイオン透過性チャネルまたはポアを形成することが推定されていた。各種分子サイズの異なる低分子化合物の脂質二重膜透過試験からポアサイズが見積もられ、AmB では 7~10.5 Å の大きさであることが示唆された²⁰⁾。また、イオン透過活性の薬剤濃度依存性から、4~12 分子の AmB が会合した分子複合体がイオン透過活性を担っていると推定された^{21,22)}。さらに、AmB を含むポリエンマクロライド抗生物質のステロール要求性が、生物活性試験^{23,24)}およびリポソーム実験^{25,26)}において確認されていたため、AmB のイオンチャネルは AmB-ステロールの分子複合体であると考えられ、AmB の分子構造をもとにその構造研究が行われた。

しかし、UV/CD スペクトルや電気生理学などを用いた研究が長年にわたって行われているにもかかわらず、AmB チャネル複合体構造の詳細についてはほとんどわかっていない^{27,28)}。現在までに数種のモデル構造が提唱されてきたが、その中でも、“樽板型モデル”が最もよく議論されてきた(図 1-2)。このモデル構造は 1974 年に Demel らによって提出されたもので、8 分子の AmB と 8 分子のコレステロールが環状に配列した構造を想定している²⁸⁾。複合体内では AmB は親水性のポリオール部を内側に向け、疎水性のポリエン部を外側の脂質分子に向けて配列している。また、ステロール分子は AmB 分子のポリエンと疎水性相互作用するために 2 分子の AmB にはさまれるように配列している。このモデルは AmB とステロールが自己会合によりチャネルを形成するという独特の概念であり、現在最も広く一般に受け入れられている。

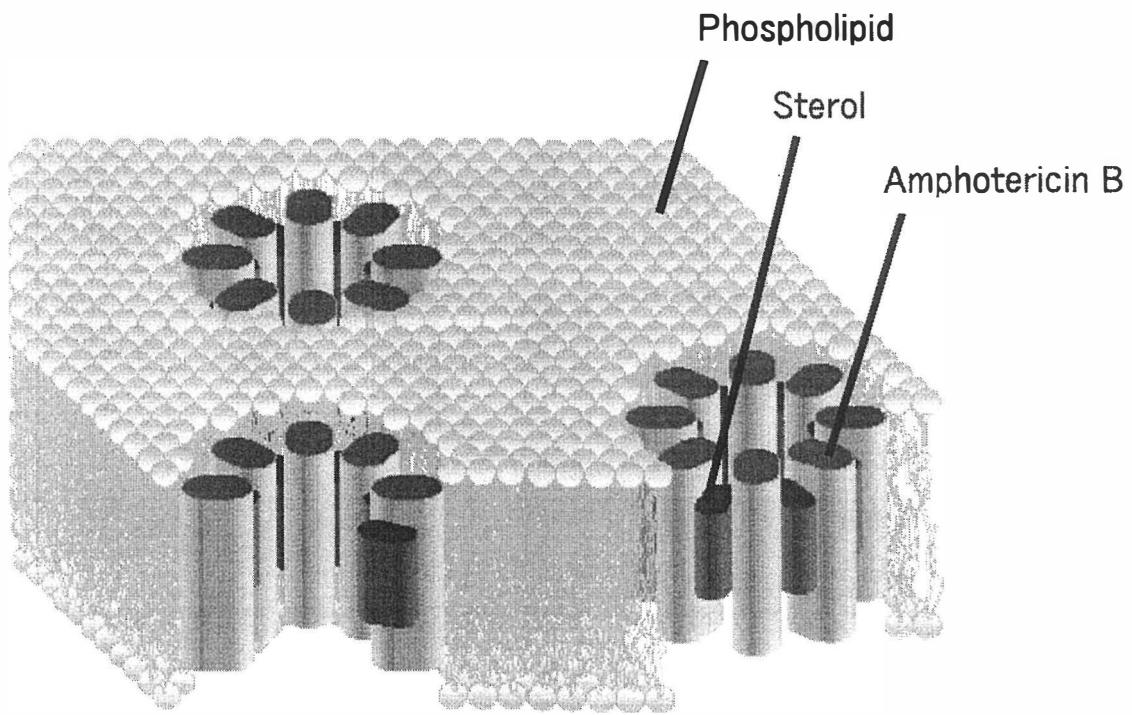


図 1-2 AmB のチャネル複合体モデル²⁸⁾

1-3 AmB の選択性および AmB-ステロール会合モデルの妥当性について

哺乳類細胞と真菌細胞はそれぞれコレステロールとエルゴステロールを有する。したがって AmB の真菌選択性は、AmB-ステロール会合モデルを前提とすると、コレステロールとエルゴステロールの間で AmB に対する親和性が異なることに起因すると推定される。つまり、AmB はコレステロールに比べてエルゴステロールと強く相互作用するため、エルゴステロール含有膜中でチャネル複合体が安定化され、選択性を発揮していると考えられる。1975 年に、両ステロールをそれぞれ含有した培地で育てたステロール要求性バクテリアの、AmB に対する感受性が Archer らにより調査され、エルゴステロールを細胞膜に取り込んだ *Mycoplasma* でより大きな K⁺透過活性が確認された²⁹⁾。この結果は、細胞膜ステロールの AmB に対する親和性の差が、真菌選択性に関与していることを支持している。また、Bittman らの報告では、ステロールを 33% 含有する卵黄フォスファチジルコリン(EPC)リポソーム

に対する結合定数は、コレステロールでは $K_a = 5.2 \pm 1.4 \times 10^4$ 、エルゴステロールでは $K_a = 6.9 \pm 1.1 \times 10^5$ であり、10 倍ほどエルゴステロールのほうが大きかった³⁰⁾ (図 1-3)。さらに Borowski らは、AmB の赤血球に対する溶血性と *Candida albicans* に対する抗真菌活性について報告しており、膜含有ステロールとしてエルゴステロールを持つ *Candida* に対してより強い毒性を持つことを報告している³¹⁾。

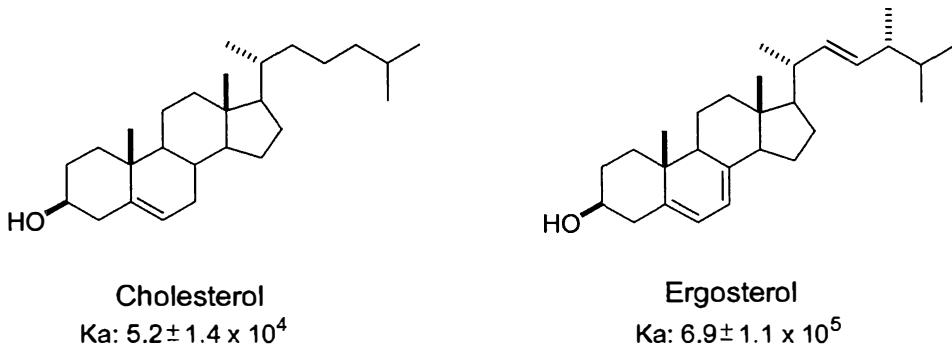


図 1-3 膜含有ステロールの構造と AmB との親和性(K_a)³⁰⁾

以上のような実験結果から、AmB-ステロール会合モデルに基づいた、ステロールの親和性の違いによるチャネル活性および選択性の解釈は広く支持されたが、AmB-ステロール会合体形成を証明する実験的証拠は得られておらず、推測の域を出ていなかった。この存在を証明しようとした研究は多いが、結果が不明瞭なものが多く、反対に AmB とコレステロールの間に特別な相互作用が無いことを示す結果も報告されている^{32,33,34)}。また、ステロールを含まないリン脂質二重膜での AmB チャネル形成も数多く報告され³⁵⁻⁴⁴⁾、リン脂質-AmB の相互作用もまたチャネル活性や選択性に重要であることが示唆されている⁴⁵⁾。本研究室においても、コレステロールが EPC 膜中で AmB チャネル形成に対して阻害的に働くという結果⁴⁶⁾や、ステロール非存在下、短鎖 PC (C_{10}, C_{12}) の添加により K^+ 透過活性が向上するという結果が得られている⁴⁷⁾。したがって、AmB チャネル複合体は AmB、ステロール、リン脂質の 3 成分が複雑に相互作用している可能性が高く、一概に AmB-ステロール会合体が形成されているとは言えない。したがって、それぞれの成分が相互作用しているということを直接的に観測できるような手法の適用が強く望まれている。

1-4 固体NMRによる原子間距離測定

最近、固体高分解能 NMR を用いて、分子中の特定の原子間距離を精密に測定することが可能になってきた。1 つの分子に対していくつかの原子間の情報が得られると、この情報から分子の立体構造や分子間の相互作用を解明することが可能になってくる。実際、溶液 NMR では NOE 効果から得られる原子間距離を基にして、分子量 3 万程度までの蛋白質の立体構造決定が可能になっている。固体状態では、原子の位置が固定されているため、溶液では分子運動によって平均化されていた磁気双極子相互作用や化学シフト異方性が観測可能である。このため固体 NMR は溶液 NMR に比べて分解能が低く、二次元 NMR 法を用いても、多くの構造情報を同時に測定することは困難である。その反面、固体 NMR において直接磁気双極子相互作用を観測することで、原子間距離を高い精度で測定でき、分子間に位置するより遠い原子間距離の測定も可能である。固体 NMR によって原子間距離を測るためにマジック角回転 (MAS) において消去されていた磁気双極子相互作用を復活させて観測する必要がある。この方法は、同種原子間距離を測る場合と異種原子間距離を測る場合で異なる。同種原子間距離を測る方法で、現在最もよく使われている方法は回転共鳴法 (Rotational Resonance) である。この方法では、化学シフト値の異なる 2 つの同種核 (例えば ^{13}C 核) の共鳴周波数の差に等しいか、その整数倍の周波数でローターを回転させる。このことにより、同種核間磁気双極子相互作用が復活し、縦磁化の交換速度が速くなる。この交換速度の増加の程度から原子間距離を決定する方法である。一方、異種原子間距離を決定する方法としては、回転エコー二重共鳴法 (REDOR, Rotational Echo Double Resonance) (図 1-4) がよく使われる⁴⁸⁾。この方法は、ローターの周期に同期して、 180° パルスを磁気双極子結合をもつ核の片方に照射する。このパルスの影響で回転エコーの再結像が妨げられた結果シグナル強度が減衰するが、この程度から異種核間磁気双極子相互作用の大きさを見積もることが可能となり、原子間距離の情報が得られる。

NMR 測定によく用いられる核種を表 1-1 に示す。なかでもフッ素核は、核磁気回転比がプロトンについて大きいために REDOR による長距離測定が可能である。 ^{13}C - ^{19}F の原子間距離であれば、12 Å 程度までの距離が ± 0.3 Å の精度で測定できる⁴⁹⁾。また、フッ素はスピン 1/2 の同位体の天然存在比が 100% であるため感度が良く、かつ天然化合物に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いという利点も持つ⁵⁰⁾。そのため、フッ素原子を用いた NMR 測定は、タンパ

ク質の構造解析によく適用されている⁵¹⁻⁵³⁾。

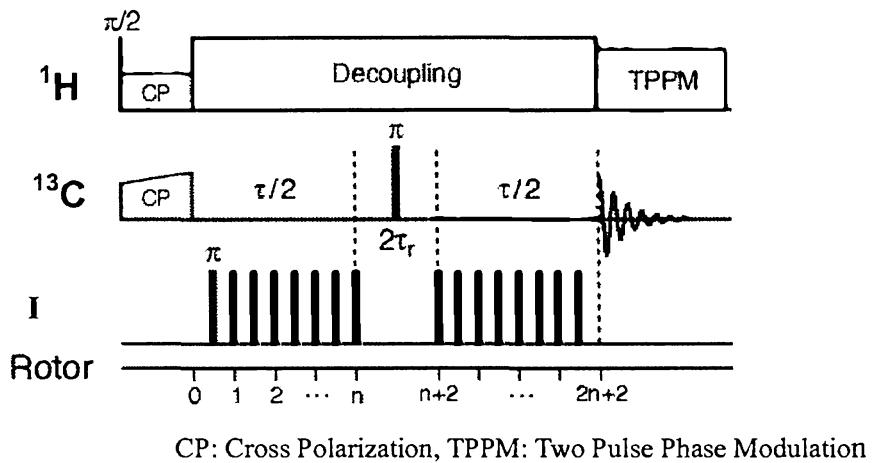


図 1-4 REDOR のパルスシークエンス

表 1-1 NMR 法でよく使われる原子核⁵⁴⁾

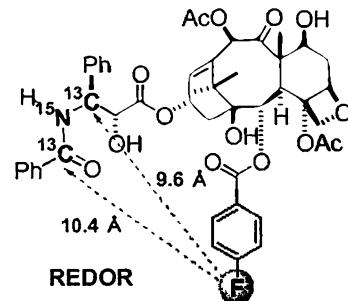
核の種類	スピン 量子数	共鳴周波数 (MHz, ¹ H を 100.0 としたとき)	天然 存在比 (%)	磁気回転比 $\gamma \times 10^{-4}$ (rad/Ts)
¹ H	1/2	100.0	99.984	2.675
¹³ C	1/2	25.1	1.108	0.673
¹⁵ N	1/2	10.1	0.365	-0.271
¹⁹ F	1/2	94.1	100	2.517
²³ Na	3/2	26.5	100	0.707
³¹ P	1/2	40.5	100	1.083

1-5 標識化天然物を用いた REDOR の適用例

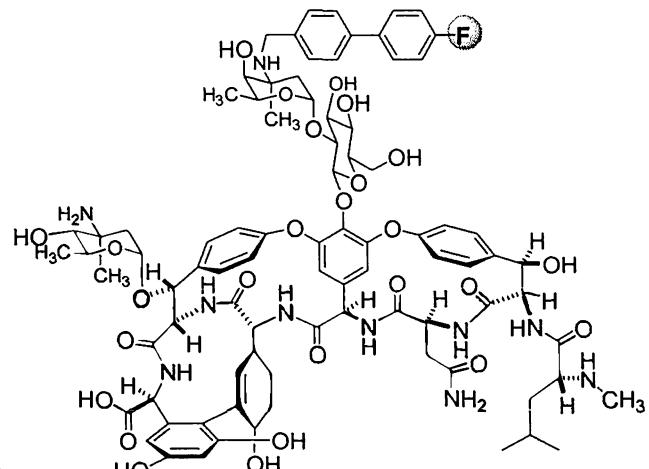
高磁場固体NMR測定は近年、著しく発展しており、特にREDORはアミロイドplaques⁵⁵⁾や膜タンパクヘリックス^{56,57)}、くもの糸⁵⁸⁾といった、X線回折や溶液NMRが適用できない複雑な不均一固体の構造解析に適用されている。また、最近では長距離測定に有効なフッ素を用いることで、膜中でのペプチドの配向や会合状態を決定している報告もある^{59,60)}。これらの測定に用いられているタンパク質等の同位体標識化は、培養や遺伝子工学的手法などにより調製可能である。しかし、非ペプチド天然物に対して、特定の位置を¹³C、¹⁵Nあるいは天然には無い¹⁹Fで標識化した分子プローブを調製するには、有機合成化学的手法を用いて導入する必要がある。そのため、標識化タンパク質などに比べてそのREDOR適用例は少ない。以下にその適用例を示す。

タキソールは制癌剤として現在臨床的に用いられており、微小管を形成するチューブリンに結合し、その脱重合を阻害することが知られている⁶¹⁾。Baneらは、タキソール(Paclitaxel)の¹³C、¹⁵N、¹⁹F標識体を天然物から誘導し、チューブリンに結合した状態のコンフォメーションを¹³C{¹⁹F}および¹⁵N{¹⁹F}REDOR測定によって推定している⁶²⁾。この場合、¹⁹Fと¹³Cの距離はそれぞれ9.6Åおよび10.4Åであると求められ、現在、距離情報から得られたタキソールのコンフォメーションをもとに、より親和性の高い誘導体の調製が検討されている(図1-5)。

次に、バンコマイシンはメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の特効薬として知られており、D-Ala-D-Alaを特異的に認識して細菌の細胞壁の生合成を阻害して活性を発現する^{63,64)}。



フッ素標識化タキソール (Paclitaxel)



フッ素標識化バンコマイシン (LY329332)

図 1-5

Schaefer らは、L-[ε - ^{15}N]Lys、[1- ^{13}C]Gly、および D-[1- ^{13}C]Ala の存在下に *Staphylococcus aureus* を培養し、天然物より誘導した ^{19}F 標識化バンコマイシン (LY329332)が細胞壁のどの部分に結合しているのかを REDOR 測定により推定している⁶⁵⁾ (図 1-5)。さらに、異なる部位が修飾された数種類のフッ素誘導体を用い、同様に REDOR 測定を行うことでそれぞれの誘導体とペプチドグリカンとの結合様式の違いを推定した⁶⁶⁾。これらの結果とそれぞれの活性の違いを比較することで、細胞壁における結合部位を特定し、さらには現在問題になっているバンコマイシン耐性菌 (VRE) にも有効な誘導体の調製を目指している。

上記の 2 例は、孤立した一対一の 2 スピン系での REDOR 適用例であるが、1 対多スピン系では、双極子の展開時間に同核種間の J カップリングによる展開も起こってしまい、通常の REDOR は適用できない。しかし、最近では同核種間の相互作用を抑えた RDX (REDOR of X cluster) 測定法が開発され、マルチスピン系での構造解析も可能となつた⁶⁷⁾。このため、合成的に調製可能な全炭素標識体を用いて REDOR 測定を行うことで、一度に多くの構造情報を得ることも可能となり、その適用例が増加している。

以上示すように、REDOR 測定は標識分子の結合様式やその標的タンパクの結合位置を知るうえで有用な方法であることがわかる。ただし、そのためには活性を保持したフッ素標識化天然物を調製することが重要である。今回の 2 例はいずれも天然物から容易に誘導可能な側鎖の一部や官能基を標識化したものであり、天然物の基本骨格からはかなり遠い位置にある。そのため、これらの誘導体を用いて実際の分子のコンフォメーションやレセプターとの正確な距離を推定することは非常に難しい。この問題を解決するには分子の基本骨格そのものを標識化する必要があると思われる。タンパク質やペプチドの系において骨格そのものに ^{13}C や ^{15}N を導入することは容易であるが、 ^{19}F についてはその報告例は無い。また、非ペプチド性の天然物の骨格自体に標識を導入することは、天然物そのものの全合成に匹敵するため、現在までにほとんど報告例は無い。

1-6 AmB チャネル複合体構造の解明に対するアプローチ

AmB は前述したように、生体膜中でステロールやリン脂質と相互作用してイオン透過性のチャネルを形成していると考えられているが、未だに複合体の様子や、ステロール、脂質分子の認識機構の詳細は解明されていない。複合体形成には AmB、リン脂質、ステロールの 3 成分の分子間相互作用が関与していると考えられるため、これらを同時に解析することは非常に困難である。そこで当研究室では、REDOR 法の適用によって、それぞれの成分の分子間相互作用を直接観測して距離情報を得て、AmB チャネル複合体の全体像を明らかにすることを目的に研究を進めている。現在、AmB-AmB⁶⁸⁾、AmB-リン脂質⁶⁹⁾、AmB-ステロール⁷⁰⁾の 3 つの 2 成分相互作用について研究を進めているが、本論文では特に AmB 分子同士の相互作用解析に焦点を絞って検討を行った。

AmB 分子が膜中で何らかの集合体を形成していることは確実であるため、その分子同士の距離情報を得ることは、分子の重なり方や会合数を決める上でも非常に重要である。正確な距離測定を行うには、やはり前述したように長距離測定が可能で、かつ感度が良い $^{13}\text{C}\{\text{F}^{\prime}\}$ REDOR が適していると考えられる。そのためには AmB を ^{13}C および ^{19}F で標識化する必要がある。まず、 ^{13}C 標識化 AmB については、放線菌 *Streptomyces nodosus* に、 ^{13}C 標識された前駆体、3- ^{13}C 標識化プロピオニ酸またはユニフォーム ^{13}C 標識化グルコース、を取り込ませることで、39、40、41 位が標識化された[$\text{Tri-}^{13}\text{C}$]AmB⁷¹⁾、および全炭素が標識化された[U- ^{13}C]AmB を生合成的に調製することに成功している（図 1-6）⁷²⁾。

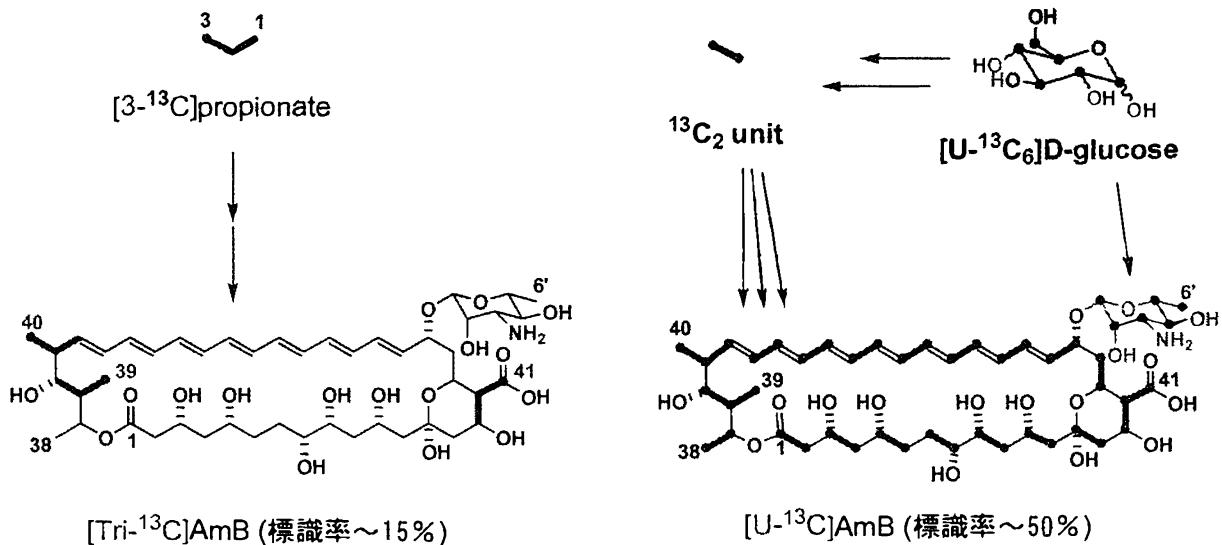


図 1-6 ^{13}C 標識化 AmB の生合成的調製

左側のスキームは Rawlings らによって報告されたプロピオン酸の AmB への取り込み位置を示している。このスキームに従い、3 位のメチル基が ^{13}C 標識されたプロピオン酸塩を取り込ませることで、位置特異的に 39,40,41 位の 3 つの炭素が標識された $\text{Tri-}^{13}\text{C}$ -AmB を調製した。次にグルコースを AmB 生産菌に取り込ませた場合、このグルコースは直接 AmB のマイコサミン部分に導入されることが知られている。また、グルコースは解糖系にのってアセチル CoA のような C2unit になって取り込まれ、AmB のアグリコン部分を形成していくと考えられる。そこで、ユニフォームに ^{13}C 標識化されたグルコースを取り込ませ、全ての炭素が ^{13}C 標識された $\text{U-}^{13}\text{C}$ -AmB を調製した。

一方、 ^{19}F 標識化 AmB については生合成的に調製することは不可能であり、合成化学的に誘導する必要がある。現在のところ、AmB から 1 段階で *N-p*-フルオロベンジル AmB、および 5 段階で 14-F-AmB の調製に成功している（図 1-7）⁷³⁾。14-F-AmB については AmB とほぼ同程度の活性を保持しており、かつ AmB の骨格にフッ素が導入されているため、固体 NMR の分子プローブとして有望である⁷³⁾。

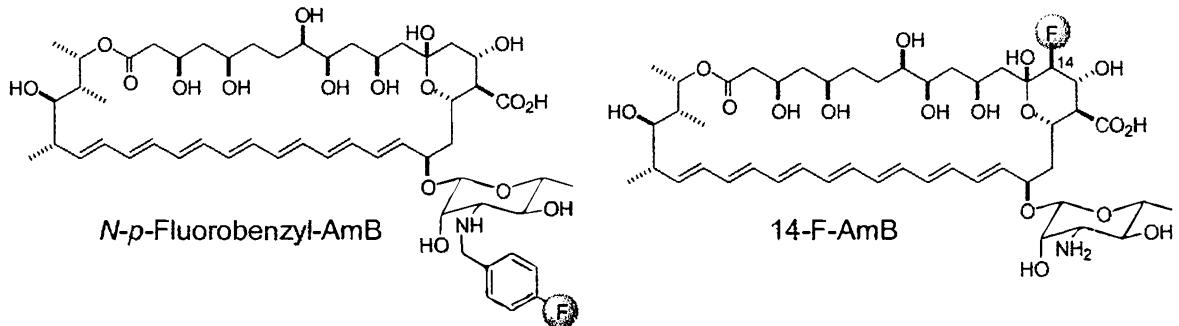


図1-7

しかしながら、膜中で AmB の会合体は平衡混合物であり、単に ^{13}C -AmB と ^{19}F -AmB を混合し、REDOR 測定を行つただけでは、会合体を選択的に観測できない可能性がある。また、 ^{19}F -AmB と ^{13}C -AmB が必ずしも隣り合わないといった問題も予想される。そこで当研究室では、リンカーで AmB 分子同士を連結することで、この 2 つの問題を解決できると考えた。すなわち、 ^{19}F -AmB と ^{13}C -AmB を連結することにより、会合体を安定化させられるだけでなく、 ^{19}F -AmB と ^{13}C -AmB を必ず隣り合わせることができ、より精度の高い距離情報が得られると期待される(図 1-8)。現在までに、AmB のアミノ基同士を連結した *N,N*-ダイマーや、アミノ基とカルボキシル基を連結した *C,N*-ダイマーの調製に成功し、これらが AmB と同等以上の活性を保持していることを見出している(図 1-9)^{68,72}。

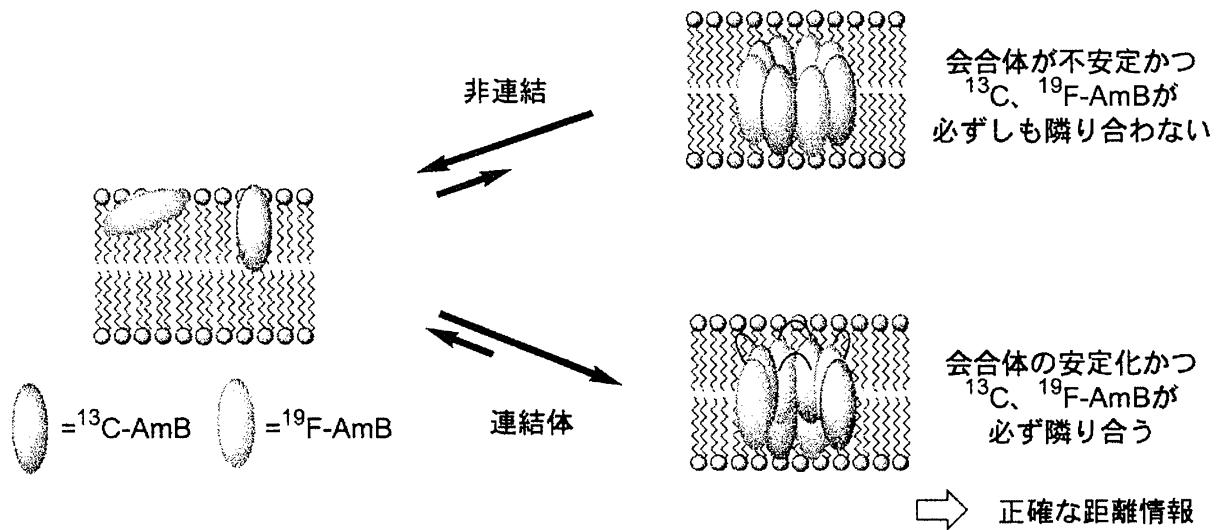


図 1-8 標識体の連結による正確な距離情報の取得

¹³C-AmB と ¹⁹F-AmB を単に混ぜただけでは観測したい会合体が不安定であることや、¹³CAmB と ¹⁹FAmB が必ずしも隣り合わないという問題がある。しかし、これら標識体を連結することで、会合体の安定化と共に、標識体同士を隣り合わせ、正確な距離情報を得ることが可能となる。

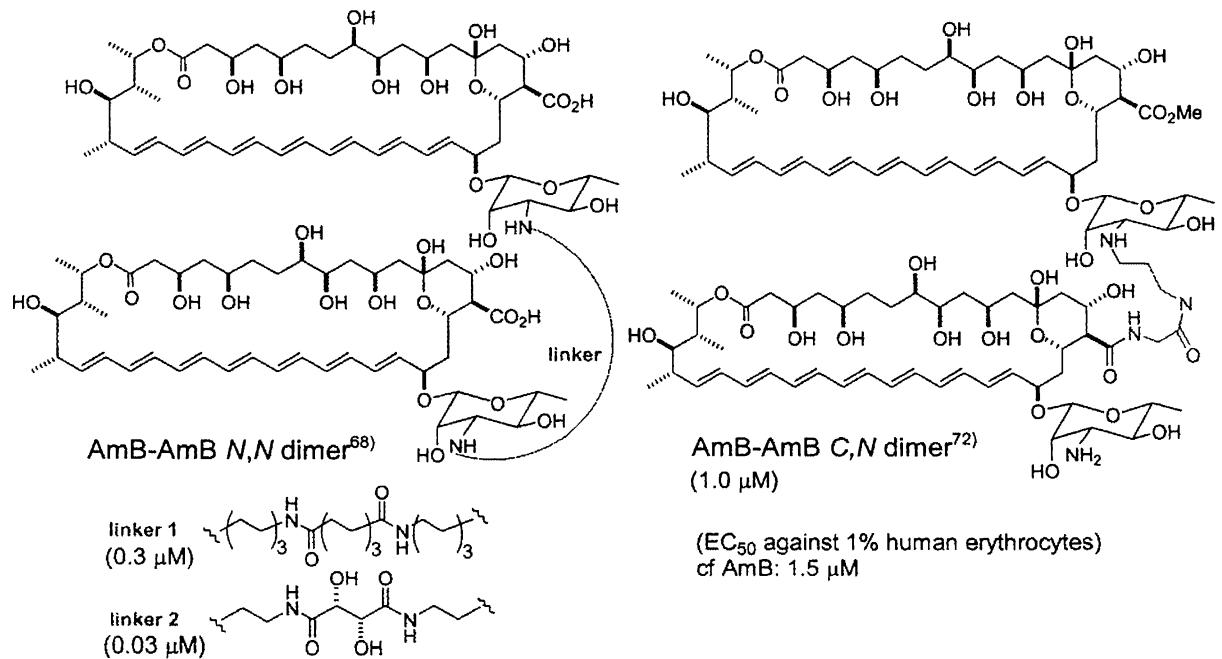


図 1-9 AmB-AmBN,N ダイマーと C,N ダイマーの構造

AmB-AmBN,N ダイマーおよび AmB-AmBC,N ダイマーとも AmB と同等以上の溶血活性が見られた。これは、AmB を連結することでチャネルが安定化されたためであると考えられる。

AmB チャネル複合体構造解明に向けた次の段階として、標識 AmB の連結体を調製し、実際に REDOR 測定を行う必要がある。当研究室において、固体 NMR のプローブとして現在使用可能なフッ素標識体は 14-F-AmB のみであるので、14-F-AmB と [U-¹³C]AmB の連結体、および 14-F-AmB と [tri-¹³C]AmB の連結体という組み合わせが可能である（図 1-10）。前者では [U-¹³C]AmB の性質上、正確な距離情報は得ることはできないが、フッ素と多くの ¹³C との相対的な位置関係を知ることができ、一度に大量の情報を得ることができる。また、後者を用いると正確な原子間距離が測定できると考えられる。したがって、これらの連結体から AmB チャネル複合体について有用な距離情報が得られると期待でき、現在、これらの調製が検討されている。

しかし、このような連結体では、AmB の 14 位周辺、つまり極性基側の情報は得られるが、分子中央部分、特にポリエン部分の構造情報を得ることができない。すなわち、AmB がポリオール部分を内側に、ポリエン部分を外側に向けてチャネルを形成しているとすると、14-F-AmB を用いてもチャネルの内側の情報しか得られず、外側の情報が全く得られないことになる。したがって、AmB チャネル複合体をより詳細に解析するためには外側の情報を得ることが必要であり、そのためには分子中央部にフッ素原子を導入する以外に方法は無く、これは単に天然物の AmB を誘導化するだけでは不可能である。

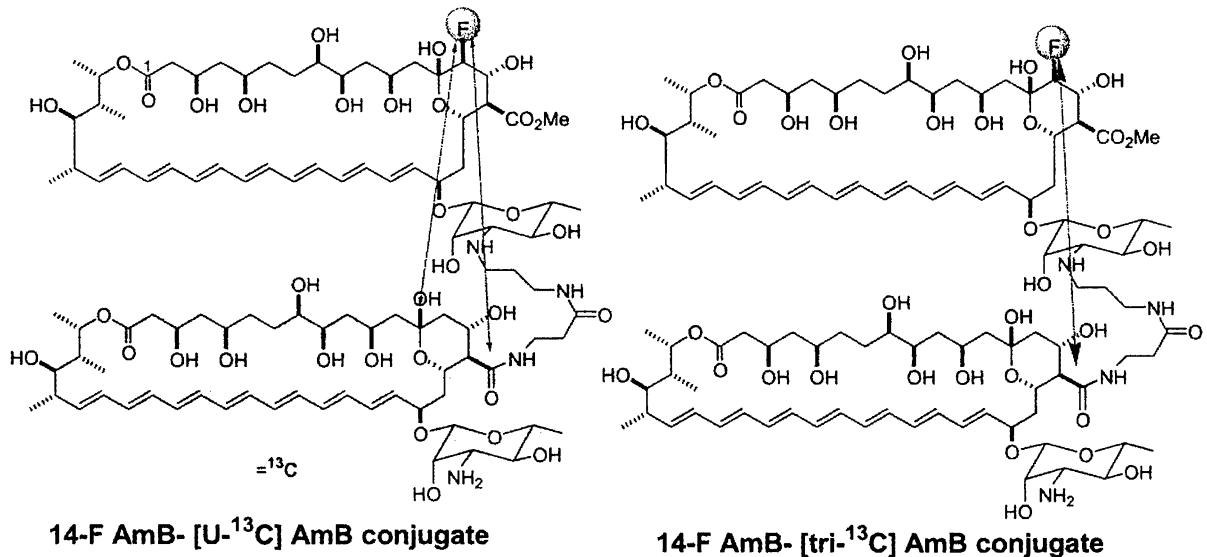


図1-10

1-7 本研究の目的

そこで本研究では、まず AmB のポリエン部分である 28 位を位置特異的にフッ素標識化した誘導体（28-F-AmB, 図 1-11）を調製することを検討した（第二章）。フッ素の導入位置としては、もっとも合成しやすくかつヘプタエンの中央部に位置するという理由で 28 位を選択した。この標識体が調製できれば、 $[\text{U}-^{13}\text{C}] \text{AmB}$ との REDOR 測定により分子中央部の分子間相互作用が観測できると考えられる。また、同様のストラテジーによってヘプタエン部分に位置特異的に ^{13}C を導入できるため、合成の方法論が確立できれば、 $25\text{-}^{13}\text{C}\text{-AmB}$ の調製も可能となる。加えて、位置特異的に標識化した AmB 同士の REDOR 測定により、AmB 分子間のより正確な距離情報の取得も可能となり、複合体の構造解明に向けて大きな前進になる。さらに AmB のポリエン部分はステロールと相互作用していることが古くから提唱されているので、このフッ素標識体が合成できれば、 ^{13}C -標識化エルゴステロールとの REDOR 測定にも利用でき、AmB の構造研究が飛躍的に進むことも期待できる。

また、合成した 28F-AmB methyl ester を用いて、[U-¹³C] AmB および[U-¹³C] AmB methyl ester との RDX-REDOR 測定を行い、AmB 複合体中の AmB 分子同士の分子間相互作用を観測することを検討した（第三章）。[U-¹³C] 標識体を用いた実験では前述したように正確な距離情報を得ることは難しいが、¹⁹F 近傍の ¹³C のシグナルがすべて観測されるので、AmB 分子同士のおおよその位置関係を知ることができる。また、今後、位置特異的標識体を用いた正確な距離測定を行う上で、その標識位置の妥当性や方法の有用性を確認するという意味でも、重要な実験であると考えられる。

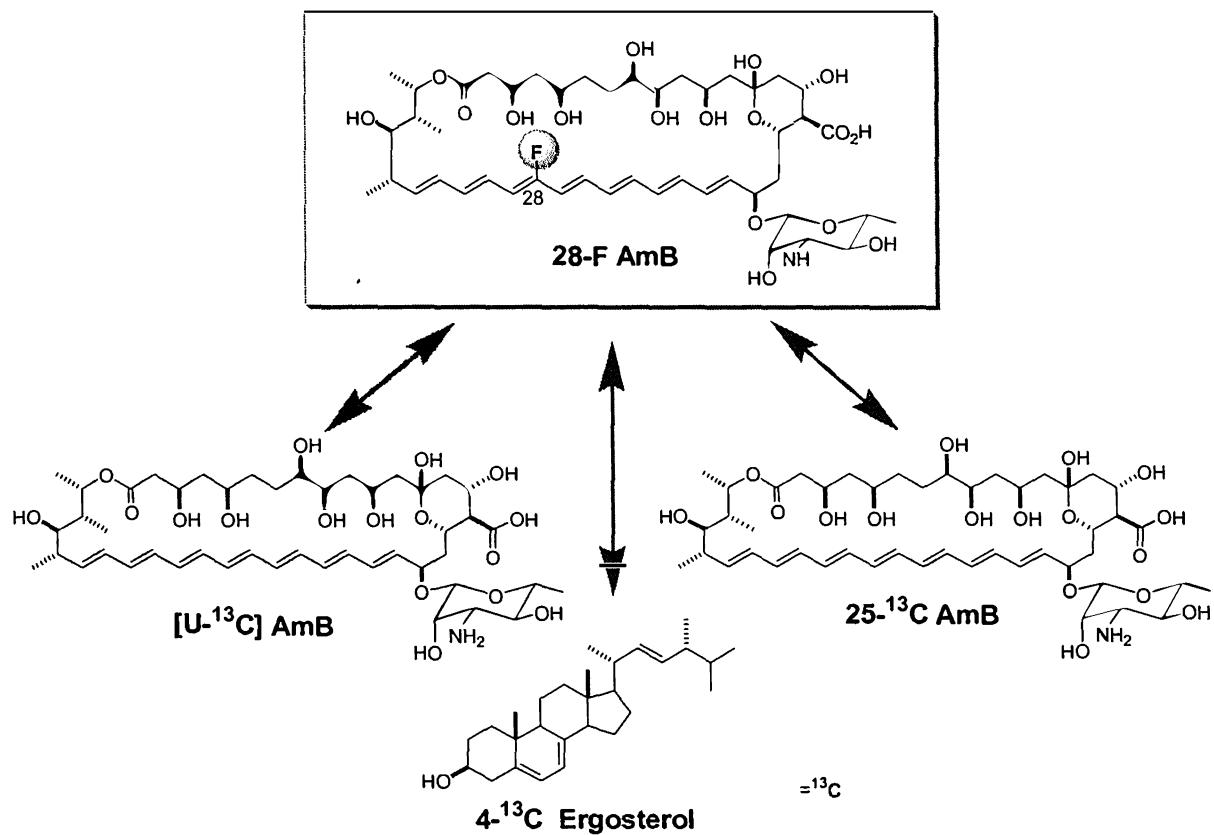


図1-11

参考文献

- 1) Ghannoum, M.; Rice, L. B. *Clin. Microb. Rev.*, **1999**, *12*, 501-517.
- 2) Kitajima, Y. *Jpn. J. Med. Mycol.* **2000**, *41*, 211-217.
- 3) Hazen, E. L.; Brown, R. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1951**, *76*, 93-97.
- 4) Sternberg, T. H.; Wright, E. T.; Oura, M. *Antibiotics Ann.* **1956**, *1955-1956*, 566-573.
- 5) Struyk, A. P.; Hoette, I.; Drost, G.; Waisvisz, J. M.; van Eek, T.; Hoogerheide, J. C. *Antibiotics Ann.* **1958**, *1957-1958*, 878-885.
- 6) Davisson, J. W.; Tanner, F. W. Jr; Finlay, A. C.; Solomons, I. A. *Antibiot. Chemother.* **1951**, *1*, 289-290.
- 7) Taber, W. A.; Vining, L. C.; Waksman, S. A., *Antibiot. Chemother.* **1954**, *4*, 455-461.
- 8) Whitfield, G. B.; Brock, T. D.; Ammann, A.; Gottlieb, D.; Carter, H. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 4799-4801.
- 9) Igarashi, M.; Ogata, K.; Miyake, A. *J. Antibiot. Ser. B*, **1956**, *9*, 79-80.
- 10) Barnes, R. A.; Johnson, E. M.; Odds, F. C. (Eds). *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, *49*, *suppl. S1*, 1-86.
- 11) Dupont, B. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, *49*, *suppl. S1*, 31-36.
- 12) Szoka, F.C.; Tang, M. *J. Liposome Res.* **1993**, *3*, 363-375.
- 13) Delay, G. J. *Antimicrob. Chemother.* **2002**, *49*, *suppl. S1*, 37-41.
- 14) Cybulska, B.; Gadomska, I.; Mazerski, J.; Borowski, J. G. E.; Cheron, M.; Bolard, J. *Acta Biochim. Polonica* **2000**, *47*, 121-131.
- 15) sedlak, M.; Buchta, V.; Kubicova, L.; Simunek, P.; Holcapek, M.; Kasparova, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2833-2835.
- 16) Hac-Wydro, K.; Dynarowicz-Latka, P.; Grzybowska, J.; Borowski, E. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *287*, 476-484.
- 17) Paquet, V.; Carreira, E. M. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1807-1809.
- 18) T. H. Sternberg, E. T. Wright and M. Oura, *Antibiot. Annu.*, **1956**, 566; B. A. Steinberg, W. P. Jambar and L. O. Suydam, *Antibiot. Annu.*, **1956**, 574; W. Gold, H. A. Stout, J. F. Pagano and R. Donovick, *Antibiot. Annu.*, **1956**, 579; J. Vandeputte, J. L. Wachtel and E. T. Stiller, *Antibiot. Annu.*, **1956**, 587.
- 19) Ganis, P.; Avitabile, G; Mechlinski, W.; Shaffner, C. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4560-4564.

- 20) Andreoli, T. E.; Dennis, V. M.; Weigl, A. M. *J. Gen. Physiol.* **1969**, *53*, 133-156.
- 21) Cass, A.; Finkelstein, A.; Krespi, V. *J. Gen. Physiol.* **1970**, *56*, 100-124.
- 22) De Kruijff, B.; Gerritsen, W. J.; Oerlemans, A.; Demel, R. A.; van Deenen, L. L. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *339*, 30-43.
- 23) Kinsky, S. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1962**, *48*, 1049-1056.
- 24) Lampen, J. O.; Arnow, P. M.; Borowska, Z.; Laskin, A. I. *J. Bact.* **1962**, *84*, 1152-1160.
- 25) Lampen, J. O. *Sym. Soc. Gen. Microbiol.* **1966**, *16*, 111-130.
- 26) Kinsky, S. C.; Luse, S. A.; Van Deenen, L. L. M. *Fed. Proc.* **1966**, *25*, 1503-1510.
- 27) (a) Bolard, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *864*, 257-304. (b) Brajtburg, J.; Poewderly, W. G.; Kobayashi, G. S.; Medoff, G. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **1990**, *34*, 183-188. (c) Gagos, M.; Koper, R.; Gruszki, W. I. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1511*, 90-98. (d) Ernst, C.; Grange, J.; Rinnert, H.; Dupont, G.; Lemantre, J. *Biopolymers* **1981**, *20*, 1575-1588. (e) Fujii, G.; Chang, J. E.; Coley, T.; Steere, B. *Biochemistry* **1997**, *36*, 4959-4968. (f) Mazerski, J.; Bolard, J.; Borowski, E. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1236*, 170-176.
- 28) De Kruijff, B.; Demel, R. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *339*, 57-70.
- 29) Archer, D. B.; Gale, E. F. *J. Gen. Microbiol.* **1975**, *90*, 187-190.
- 30) Read, J. D.; Bittman, R. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *685*, 219-224.
- 31) Chéron, M.; Cybulski, B.; Mazerski, J.; Grzybowska, J.; Czerwiński, A.; Borowski, E. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 827-836.
- 32) Dufourc, E. J.; Smith, I. C. P. *Biochemistry* **1985**, *24*, 2420-2424.
- 33) Dufourc, E. J.; Smith, I. J. P.; Jarrell, H. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *776*, 317-329.
- 34) Baginski, M.; Resat, H.; McCammon, J. A. *Molecular Pharmacol.* **1997**, *52*, 560-570.
- 35) HsuChen, C C.; Feingold, D. S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, *51*, 972-978.
- 36) Van Hoogeveest, P.; De Kruijff, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *511*, 397-407.
- 37) Milhaud, J.; Hartmann, M.; Bolard, J. *Biochimie* **1989**, *71*, 49-56.
- 38) Whyte, B. S.; Peterson, R. P.; Hartsel, S. C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *164*, 609-614.
- 39) Hartsel, S. C.; Benz, S. K.; Peterson, R. P.; Whyte, B. S. *Biochemistry* **1991**, *30*, 77-82.
- 40) Cohen, B. E. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1108*, 49-58.
- 41) Wolf, B. D.; Hartsel, S. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1238*, 156-162.
- 42) Cohen, B. E. *Int. J. Pharm.* **1998**, *162*, 95-106.

- 43) Ruckwardt, T.; Scott, A.; Scott, J.; Mikulecky, P; Hartsel, S. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1372*, 283-288.
- 44) Cotero, B. V.; Rebolledo-Antunez, S.; Ortega-Blake, I. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1375*, 43-51.
- 45) Clejan, S.; Bittman, R. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 2884-2889.
- 46) Matsuoka, S.; Murata, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1564*, 429-434.
- 47) Matsuoka, S.; Murata, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1617*, 109-115.
- 48) Gullion, T.; Schaefer, J. *Adv. Magn. Reson.* **1989**, *13*, 55.
- 49) Holl, S. M.; Marshall, G. R.; Schaefer, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4830-4833.
- 50) Ulrich, A. S. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2005**, *46*, 1-21.
- 51) Gerig, J. T. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1994**, *26*, 293.
- 52) Danielson, M. A.; Falke, J. J. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, *25*, 163.
- 53) Gakh, Y. G.; Gakh, A. A.; Gronenborn, A. M. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 551.
- 54) 安藤喬志, 宗宮創, これならわかる NMR **1997**
- 55) Balbach, J. J., Ishii, Y., Antzutkin, O. N., Leapman, R. D., Rizzo, N. W., Dyda, F., Reed, J., and Tycko, R. *Biochemistry*, **2000**, *39*, 13748-13759.
- 56) Smith, S. O., Kawakami, T., Liu, W., Ziliox, M., and Aimoto, S. *J. Mol. Biol.*, **2001**, *313*, 1139-1148.
- 57) Wang, J., Balazs, Y. S., and Thompson, L. K. *Biochemistry*, **1997**, *36*, 1699-1703.
- 58) Michal, C. A., and Jelinski, L. W. *J. Biol. NMR*, **1998**, *12*, 231-241.
- 59) Toke, O.; O'Connor, R. D.; Weldeghiorghis, T. K.; Maloy, W. L.; Glaser, R. W.; Ulrich, A. S.; Schaefer, J. *Biophys. J.*, **2004**, *87*, 675-687.
- 60) Mani, R.; Tang, M.; Wu, X.; Buffy, J. J.; Waring, A. J.; Sherman, M. A.; Hong, M. *Biochemistry*, **2006**, *45*, 8341-8349.
- 61) Schiff, P. B., Fant, J., and Horwitz, S. B. *Nature*, **1979**, *277*, 665-667.
- 62) Li, Y.; Poliks, B.; Cegelski, L.; Poliks, M.; Gryczynski, Z.; Piszczech, G; Jagtap, P.G ; Studelska, D.R.; Kingston, D.G.I.; Schaefer, J.; Bane, S. *Biochemistry*, **2000**, *39*, 281.
- 63) Reynolds, P. *Biochim. Biophys. Acta*, **1961**, *52*, 403.
- 64) Matsuhashi, S., and Strominger, J. L. *J. Bacteriol.*, **1967**, *93*, 2017-2019.
- 65) Kim, S. J., Cegelski, L., Studelska, D. R., O'Connor, R. D., Mehta, A. K., and Schaefer, J. *Biochemistry*, **2002**, *41*, 6967-6977.
- 66) Kim, S. J., Cegelski, L., Preobrazhenskaya, M., and Schaefer, J. *Biochemistry*, **2006**, *45*,

5235-5250.

- 67) Metha, A. K.; Schaefer, J. *J. Magn. Reson.* **2003**, *163*, 188-191.
- 68) (a) Matsumori, N.; Yamaji, N.; Matsuoka, S.; Oishi, T.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4180-4181; (b) Yamaji, N.; Matsumori, N.; Matsuoka, S.; Oishi, T.; Murata, M. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2087-2089; (c) Matsumori, N.; Masuda, R.; Murata, M. *Chem. Biodiversity* **2004**, *1*, 346-352.
- 69) (a) Matsuoka, S.; Murata, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1617*, 109-115; (b) Matsuoka, S.; Matsumori, N.; Murata, M. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3882-3884; (c) Matsuoka, S.; Ikeuchi, H.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biochemistry* **2005**, *44*, 704-710.
- 70) (a) Matsumori, N.; Eiraku, N.; Matsuoka, S.; Oishi, T.; Murata, M.; Aoki, T.; Ide, T. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 673-679; (b) Matsuoka, S.; Murata, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1564*, 429-434; (c) Matsumori, N.; Sawada, Y.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10667-10675.
- 71) McNamara, C. M.; Box, S.; Crawforth, J. M.; Hickman, B. S.; Norwood, T. J.; Rawlings, B. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **1998**, 83-87.
- 72) 梅川 雄一 大阪大学理学研究科化学専攻 平成17年度修士論文
- 73) Matsumori, N.; Umegawa, Y.; Oishi, T.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3565-3567.

第二章 F-AmB の合成

2-1 緒言

現在までにポリエンマクロライド化合物の全合成の報告は十数例あるが、糖を有するポリエンマクロライドの全合成としては 1987 年に Nicolaou らによって報告された AmB の全合成が唯一である（図 2-1）¹⁾。すなわち、Nicolaou らはまずポリオールセグメントとポリエンセグメントをキシロースおよび酒石酸ジエチルからそれぞれ 44 段階、27 段階で合成している。続いてエステル化によりフラグメントを連結し、分子内 Horner-Emmons 反応により環化させてマクロライド環を構築後、2'位の隣接基関与を利用して β -グリコシル化により糖部分を導入している。その後 2'位のヒドロキシル基を反転させ、TBS 基の除去、アジドの還元、アセトナイトおよびメチルケタールの除去を経て、最後にメチルエステルを加水分解し AmB の全合成に成功している。しかし、糖部分を導入する β -グリコシル化、およびアセトナイトの脱保護の収率が非常に悪いことが問題として残っていた^{1f)}。特にグリコシル化については、導入部位がポリエン部分のアリル位のヒドロキシル基であるため、条件を強くすると基質が分解してしまい、逆に弱いと反応せず、副生成物としてオルトエステルが生成してしまうという結果が得られていた。AmB の全合成からほぼ 20 年経過してもなお、糖を有するポリエンマクロライド化合物の全合成がなされていないのは、この β -グリコシル化の困難さが原因の一つであると思われる。AmB 以外の糖を有するポリエンマクロライド化合物において、アグリコン部分のみが合成されているものは存在し、1990 年に 正宗らにより報告された Pimarolide methyl ester²⁾と、2004 年に Rychnovsky らにより報告された Rimocidinolide methyl ester³⁾がある（図 2-2）。いずれも残るは糖部分を導入するだけであったが、やはり β -グリコシル化と脱保護の困難さから、今だにその全合成は報告されていない。

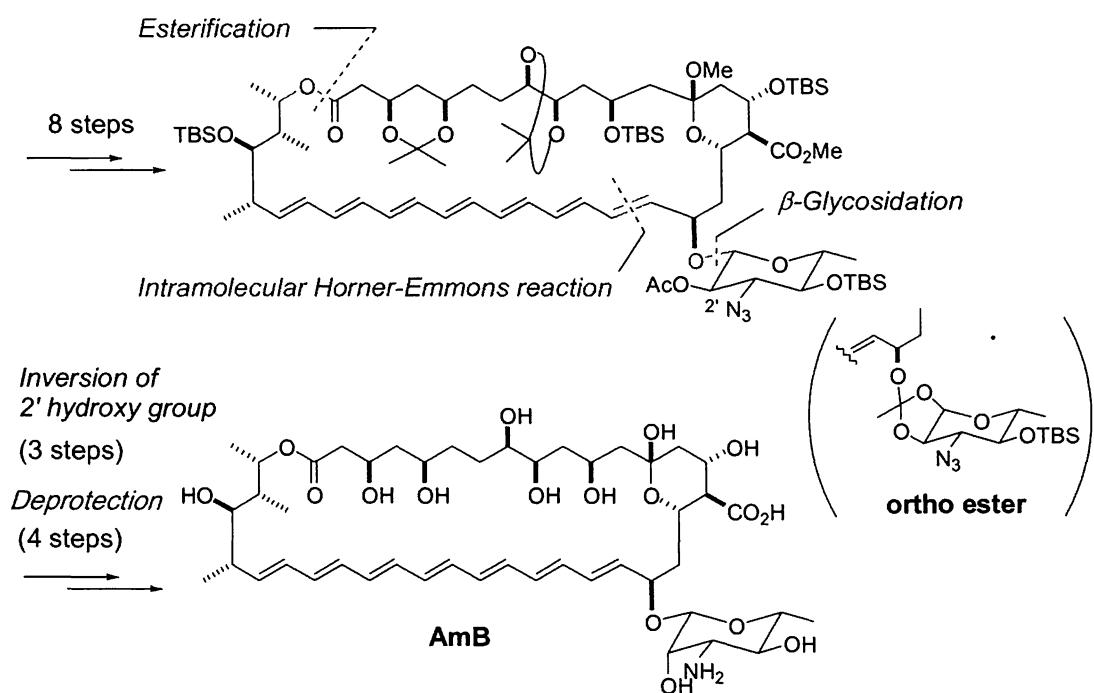
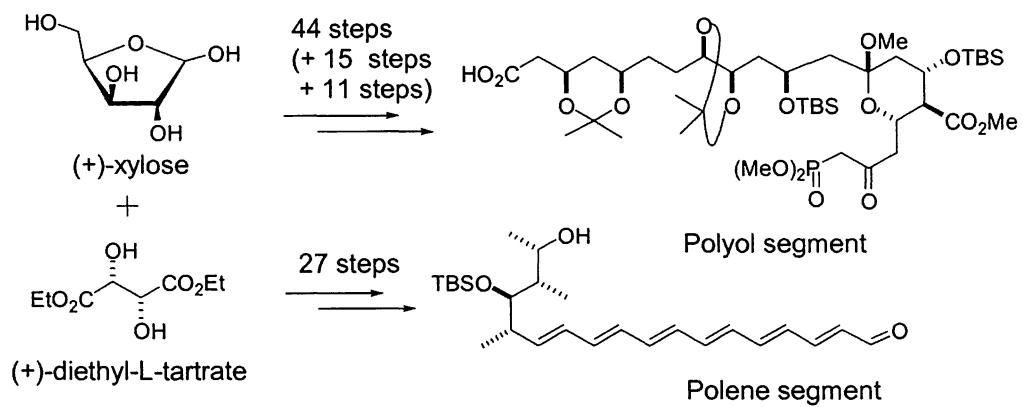


図2-1

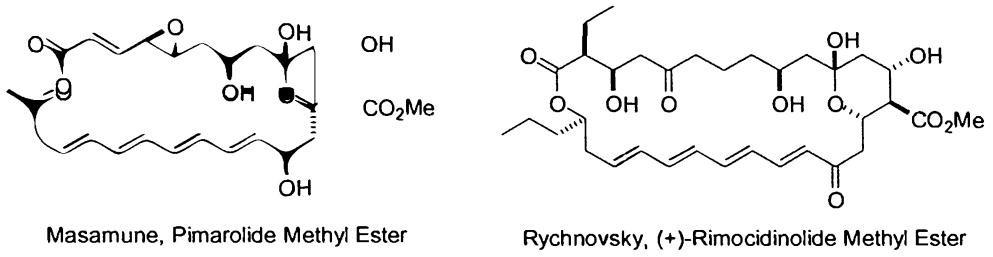


図2-2

糖を有さないポリエンマクロライドや、ラクトンのカルボニル基がポリエン部分と共に役しているオキソポリエンマクロライド類については、全合成が数例報告されている（図 2-3）。1993 年に Rychnovsky らがオキソポリエンマクロライドである (+)-Mycoticin A の最初の全合成を報告して以来⁴⁾、同グループは、ポリオール部分の統一的な合成法を用いることで、1994 年に非天然型である (-)-Roxaticin⁵⁾、1997 年に Roflamycin⁶⁾、1999 年に Filipin III⁷⁾、2001 年に Dermostatin A⁸⁾の全合成に成功している。また、他のグループでは 1995 年に森らにより (+)-Roxaticin の最初の全合成が報告されている⁹⁾。最近では 2003 年に Evans らにより (+)-Roxaticin の全合成が報告され¹⁰⁾、続いて RK-397 の全合成が 2004 年に McDonald ら¹¹⁾、2005 年に Denmark ら¹²⁾によりそれぞれ報告されている。このように、1980 年代に Nicolaou らにより AmB の全合成が達成されて以来、有機合成化学の進歩とともに複雑な構造を有するポリエンマクロライド化合物の合成も可能となり、非常に効率的な合成法も確立されてきている。しかし、このような状況においても依然としてその合成には多段階を必要とするため、有機合成的な構造活性相関研究や作用機構の解明を目的とした分子プローブ化といった研究はほとんど行われていないのが現状である。

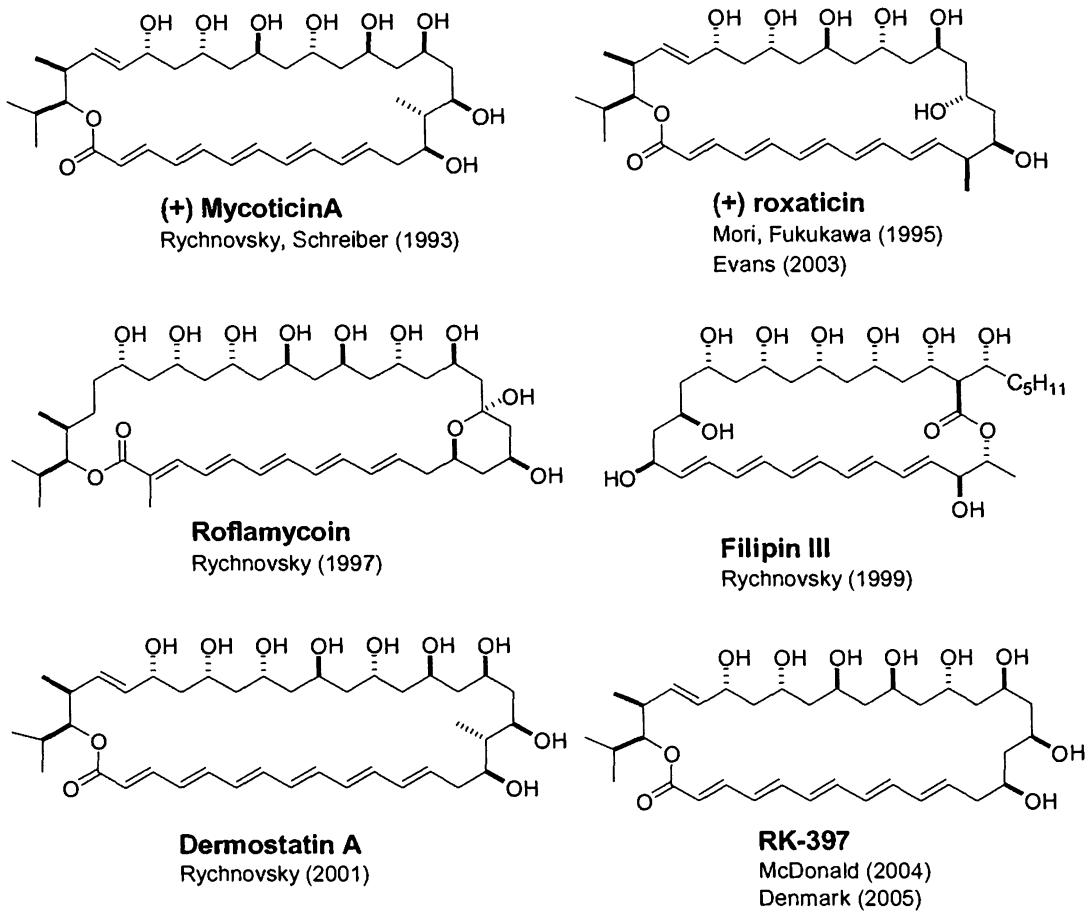


図2-3

F-AmBの合成を考える上で最も重要なのがマクロライド環の構築法である。以下にこれまでのポリエンマクロライドの全合成に用いられた手法を数例示す。

まず一つ目として、エステル化によるフラグメントの連結と分子内 Horner-Emmons 反応による環化を利用した構築法である（図 2-4）。これは前述した AmB の全合成にも用いられており（図 2-1）、Filipin III や (+)-Rimocidinolide methyl ester の全合成において、比較的収率良く進行している^{1e,7,3)}。しかしこのように分子内 Horner-Emmons 反応により環化するには β -ケトホスホン酸エ斯特ルを経由する必要があり、AmB の場合と同様に、生じたケトンを還元した後、糖部分を導入する段階が必要となる。

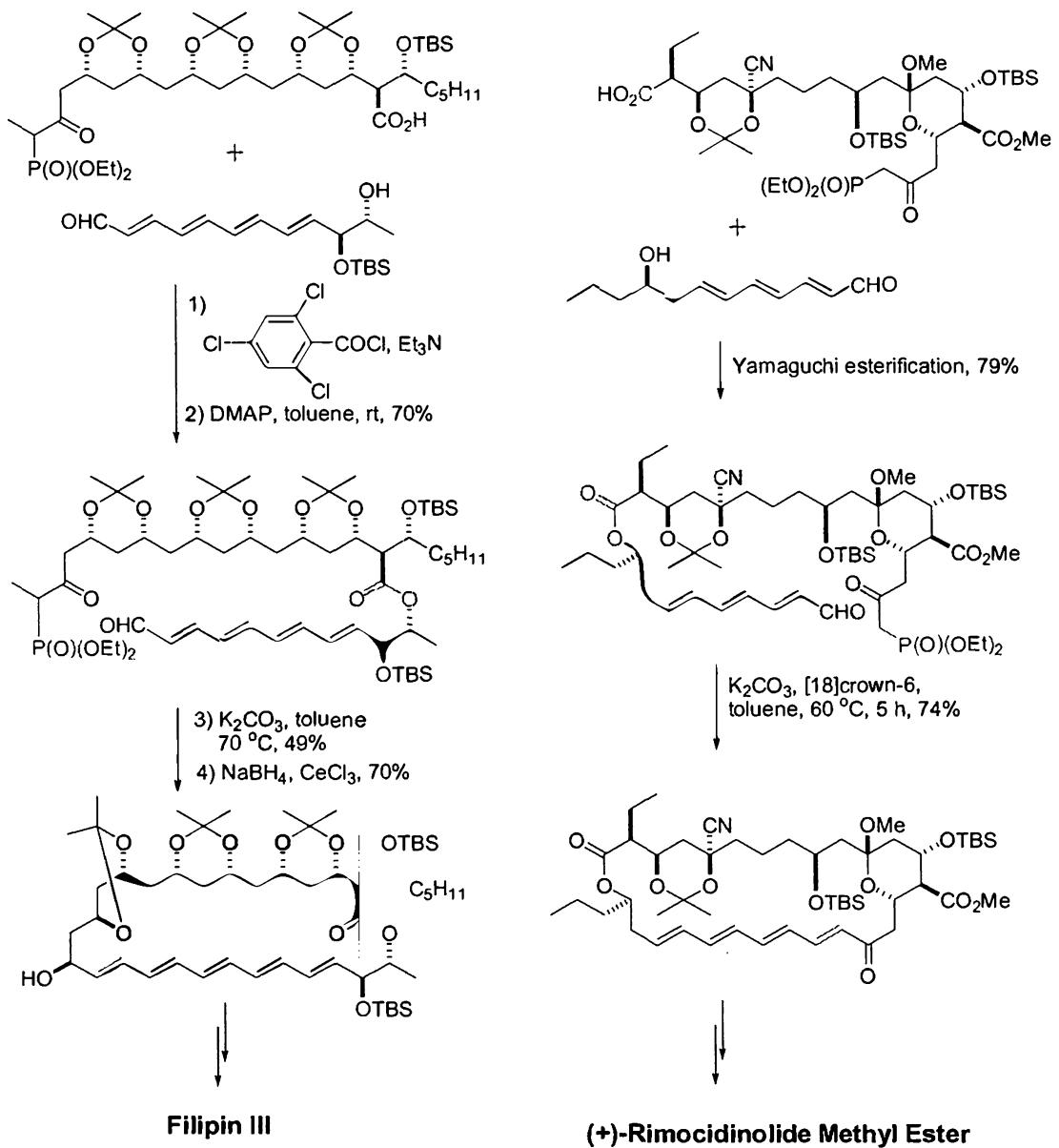


図2-4

2つ目は、Horner-Emmons 反応により連結した後、マクロラクトン化により環化させる方法である（図 2-5）。このスキームは Roxaticin や RK-397 の全合成に用いられており、マクロラクトン化による環化も収率良く進行している^{10,12)}。しかし、強塩基を用いた Horner-Emmons 反応によりセグメントを連結するステップが、AmB のような糖を有する化合物に適用できるかが疑問である。

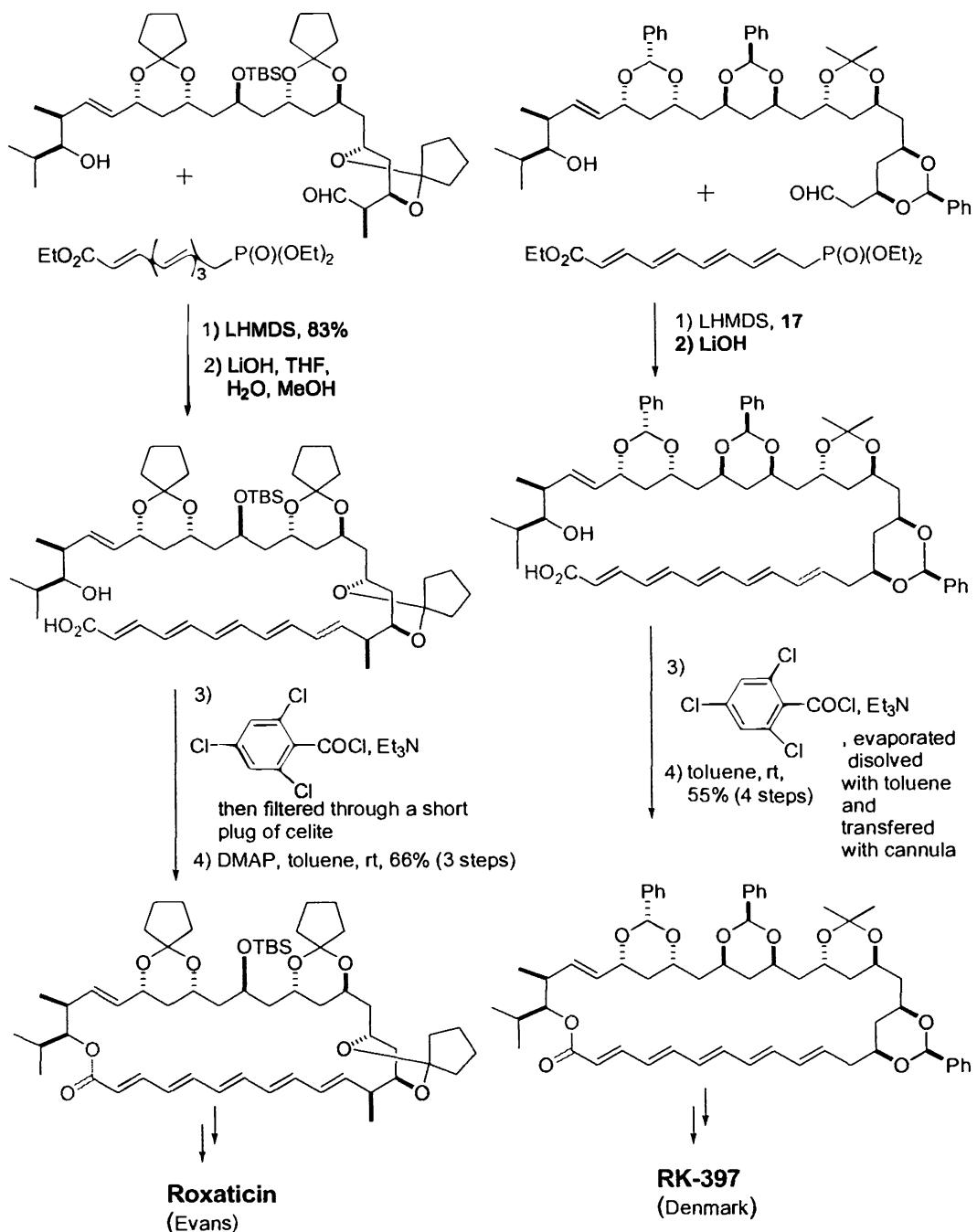


図2-5

次に3つ目として、Stilleカップリングによる連結と分子内 Horner-Emmons 反応による環化である(図2-6)。これはRK-397やDermostatin Aの全合成において利用

されており、マイルドな条件でオレフィン部分を連結しているため、AmB にも適用できると考えられる。しかし、環化にはやはり分子内 Horner-Emmons 反応が用いられており、オキソポリエンマクロライド合成には非常に有用であるが、AmB の環化には適用できないと考えられる。

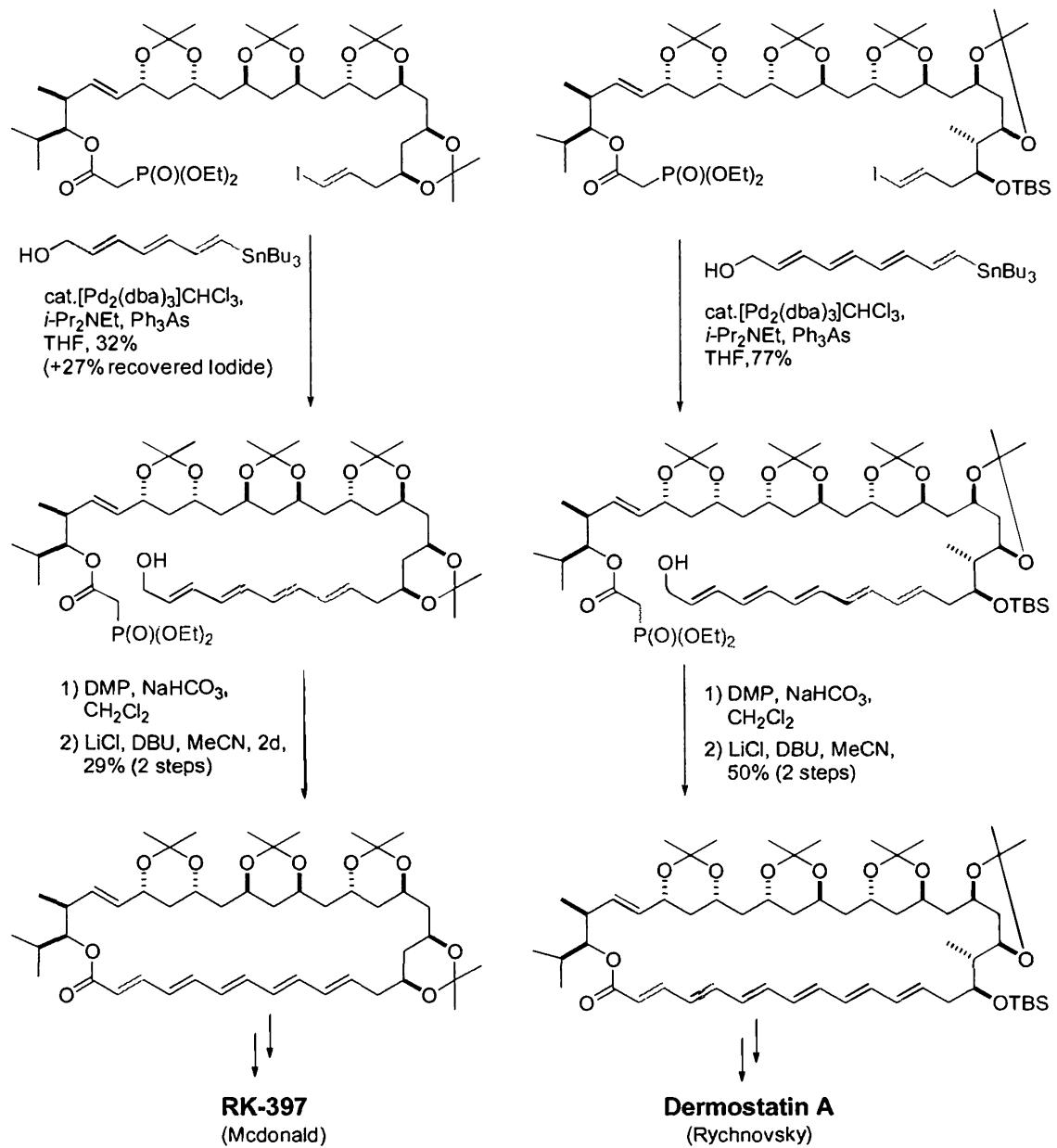


図2-6

2-2 F-AmB の逆合成

前述したように、一般に構造の複雑なポリエンマクロリドの全合成は多段階を要するため、本研究の目的であるプローブ合成を、全合成によって達成するのは現実的ではない。また、AmB のマクロライド骨格に糖部分を導入するのは非常に困難であり、このようなステップの存在は標識体の効率的合成にとっては致命的である。しかし、天然物の誘導化のみによるプローブ合成にも限界があり、実際の作用機構解明にはそれだけでは不十分である。したがって、より有用な標識体の調製には、全合成ほど手間はかけずに、効率よく標識を導入することが望まれる。

そこで本論文では、フッ素標識化 AmB の合成に対して、化学合成と天然物の分解を組み合わせた、実用的で用途の広い合成法を適用することにした。このような手法による分子プローブの合成は今までに前例は無く、これが可能となればプローブ合成の新しい方法論になると考えられる。合成計画を図 2-7 に示す。2-1 でも示したように、過去のポリエンマクロライドの全合成において、大きく分けて 3 種類の方法によりマクロライド環の構築が行われてきた。これらの結果を踏まえて考えると、F-AmB の骨格を構築するには Stille カップリング¹³⁾による連結とマクロラクトン化¹⁴⁾による環化を用いることが最良であると考えられる。すなわち、28F-AmB は、フッ素を含むポリエン部分である C22-C37 セグメントと、ポリオール部分である C1-C21 セグメントを Stille カップリングにより連結した後、マクロラクトン化を行うことで合成しようと計画した。立体障害の大きい 21 位での Stille カップリングや、その後のマクロラクトン化による環化という一連の環構築スキームは、過去のポリエンマクロライド合成では報告例は無く、これらの反応が進行するかどうかが非常に重要なステップである。セグメント 2 はヨードオレフィン 4 とビニルスズ 5 を Stille カップリングにより連結し、さらにアルデヒドへ酸化した後、ホスホン酸エステル 6 との Horner-Emmons 反応により合成することにした。一方、セグメント 3 については、天然の AmB からオゾン分解、高井オレフィン化を行うことで、後の段階で導入することが困難であるマイコサミン部分をそのまま保持した状態で調製できると考えた¹⁵⁾。

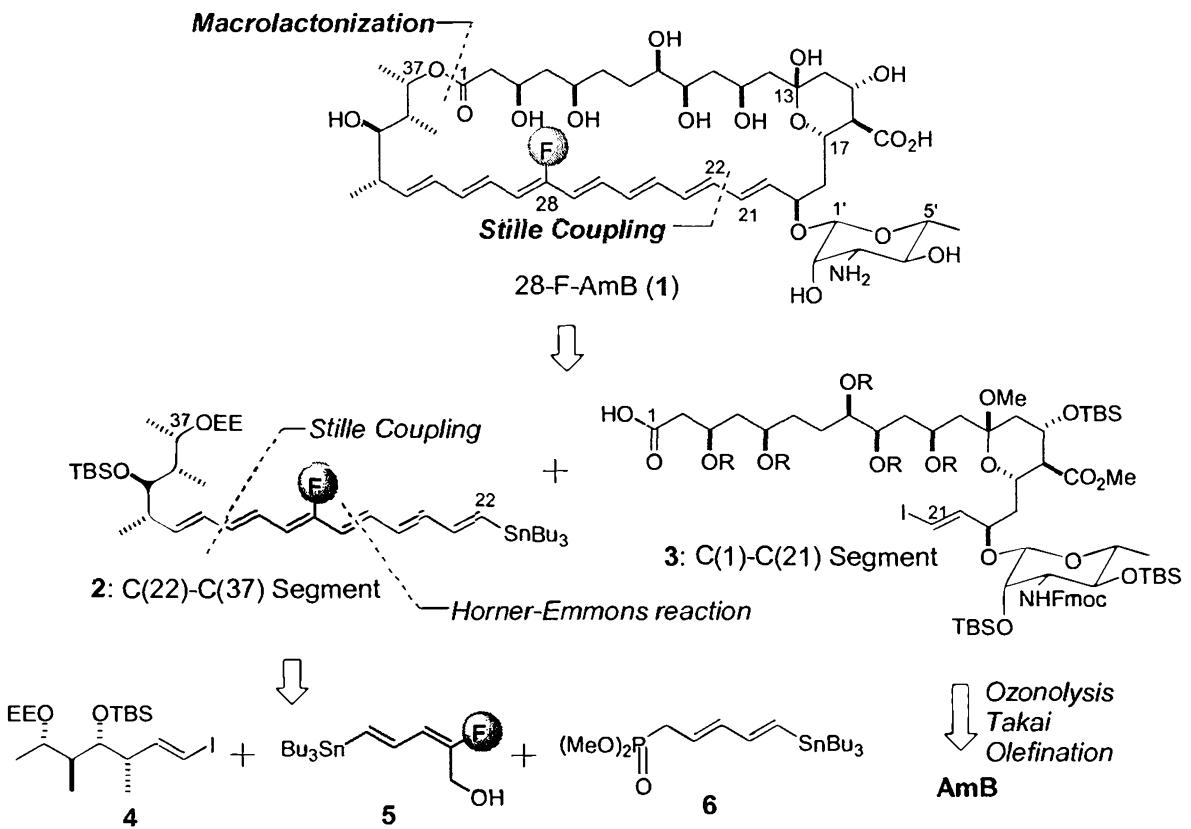


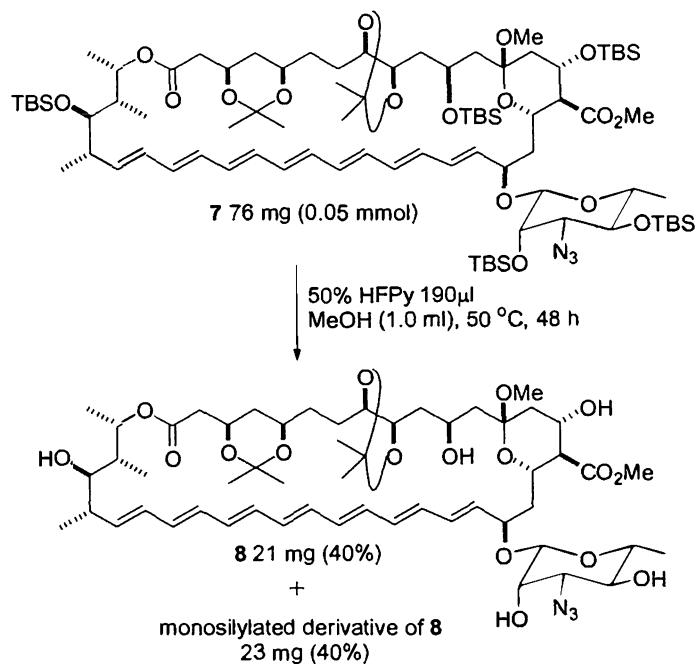
図2-7

2-3 脱保護の検討

Nicolaou らによる AmB の全合成において、脱保護の段階は、糖部分の導入と同様に収率が悪いという問題があった¹⁰。特にアセトナイトの除去の段階が大きな問題となっていたが、シリル基の除去についてもやや問題が残っていた。そこで、実際の標識体の合成を進めるのに先立ち、まず非標識体を用いて脱保護の検討を行うことにした。

2-3-a TBS 基の除去の検討

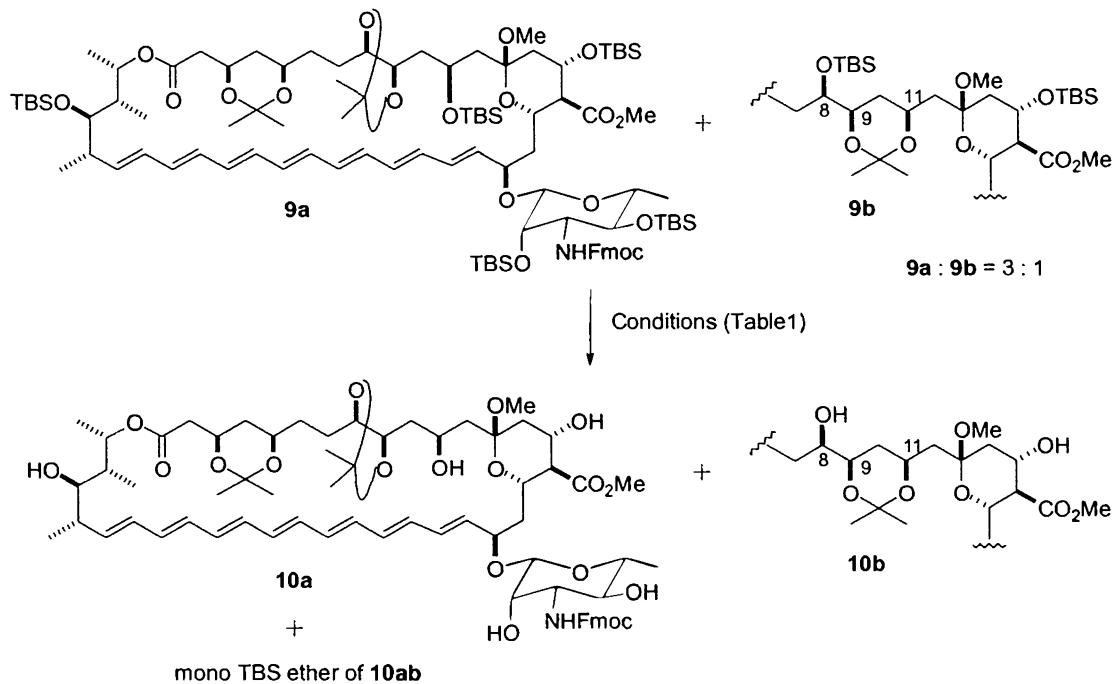
まず、TBS 基の除去を検討した。スキーム 2-1 に示すように、Nicolaou らはペント TBS 体 7 に対して 50% の HFPy を作用させることで、目的物である 8 と 1 つ TBS 基が残ったモノ TBS 体（残っている位置は未確認）をそれぞれ 40% の収率で得ている^{1f)}。



スキーム 2-1

そこで、基質としてフッ素を含まない **9ab** を用いて TBS 基の除去を検討した（スキーム 2-2、Table1）。**9ab** は AmB より 4 段階で調製でき、実際の F-AmB 合成の中間体としてデザインした化合物である。まず、エントリー1、2 では Nicolaou らの報告に従い 50% に希釈した HFPy を用いて反応を行ったが、目的物は全く得られず、2 時間程で分解してしまった。この分解物は主に酸により糖部分が外れてしまった副生成物であると考えられた。そこで、エントリー3 ではさらにピリジンで希釈し、HF の濃度を下げて (27% HFPy) 反応を行った。すると目的物はある程度得られたが、やはり分解物が多少生成しており、アセトナイトが一部外れてしまったものも確認された。最終的にエントリー4 に示すように 18% の HFPy を用いたところ、反

応時間は長くなってしまったが目的とする **10ab** が主生成物として得られ、単離収率は 53% であった。この際、多少残っているモノ TBS 体を消費するためにさらに長時間攪拌すると、TLC で高極性側に分解物のスポットが現れてきた。したがって、現在のところではモノ TBS 体を分離回収して繰り返し反応を行っている。



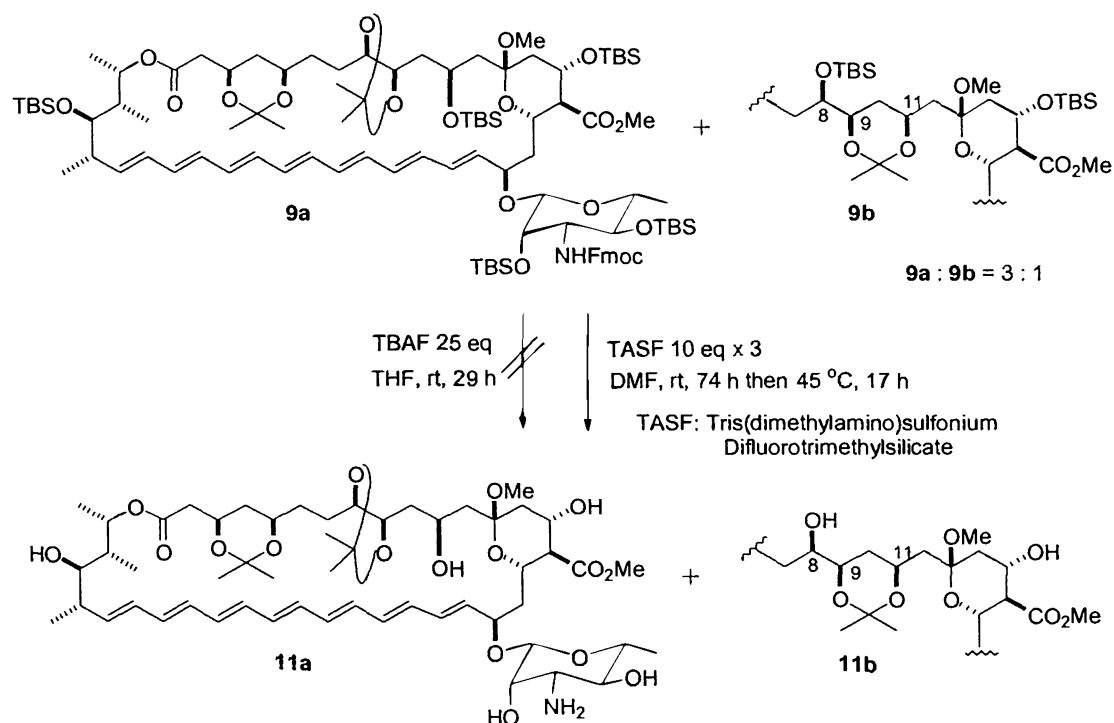
スキーム 2-2

Table 1

Entry	9ab / mg	50% HFPy / μl	Solv.	Temp. / $^{\circ}\text{C}$	time / h	result
1	20	127	MeOH (0.5 ml), THF (0.25 ml)	50	51	decomposed
2	30	114	MeOH (0.4 ml), THF (0.2 ml)	50	2	decomposed
3	20	114	MeOH (0.4 ml), THF (0.1 ml), pyridine (0.2 ml)	50	4	di-TBS derivative (20%), ^{a)} mono-TBS derivative (38%), 10ab (28%)
4	14	114	MeOH (0.4 ml), pyridine (0.2 ml)	50	28	Crude (10ab : mono-TBS derive. = 1 : 0.25 from MS), 10ab (53%)

a) In this condition, acetonide group was gradually deprotected.

また、フッ化物イオンによるシリル基の除去も検討した（スキーム 2-3）。TBAF を用いたところ、まず Fmoc 基が脱保護された後、複雑な混合物となってしまい、目的とする脱保護体 **11ab** は全く得られなかった。次に、より塩基性の弱い TASF を用いたところ、やはり直ちに Fmoc 基が除去されてしまったが、長時間攪拌すると MS 上で **11ab** の生成が確認された。しかし、アミノ基がフリーであるため精製が困難であり、NMR での構造確認はできなかった。TASF についてはさらなる検討の余地があると思われるが、現段階では 18% HFPy を用いたほうがよいと判断した。

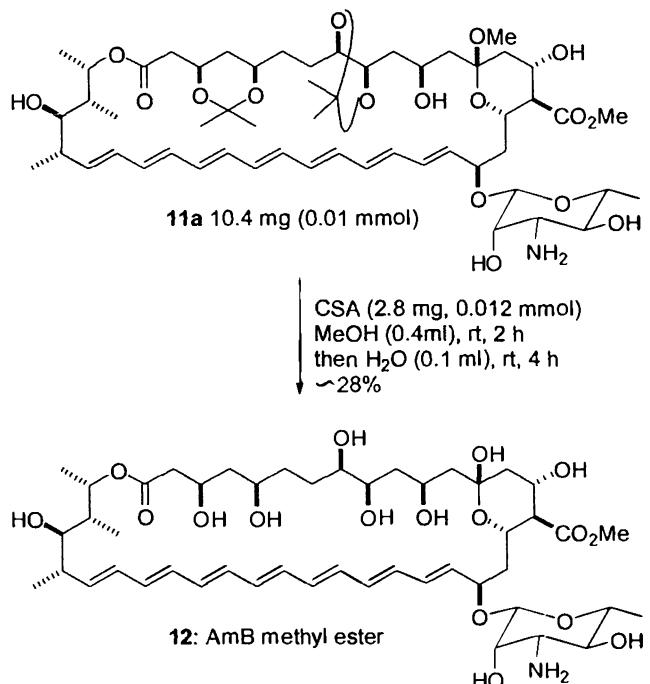


スキーム 2-3

2-3-b ビスアセトナイト、メチルケタールの除去の検討

次に、2箇所のアセトナイトおよび13位メチルケタールの除去を検討した。

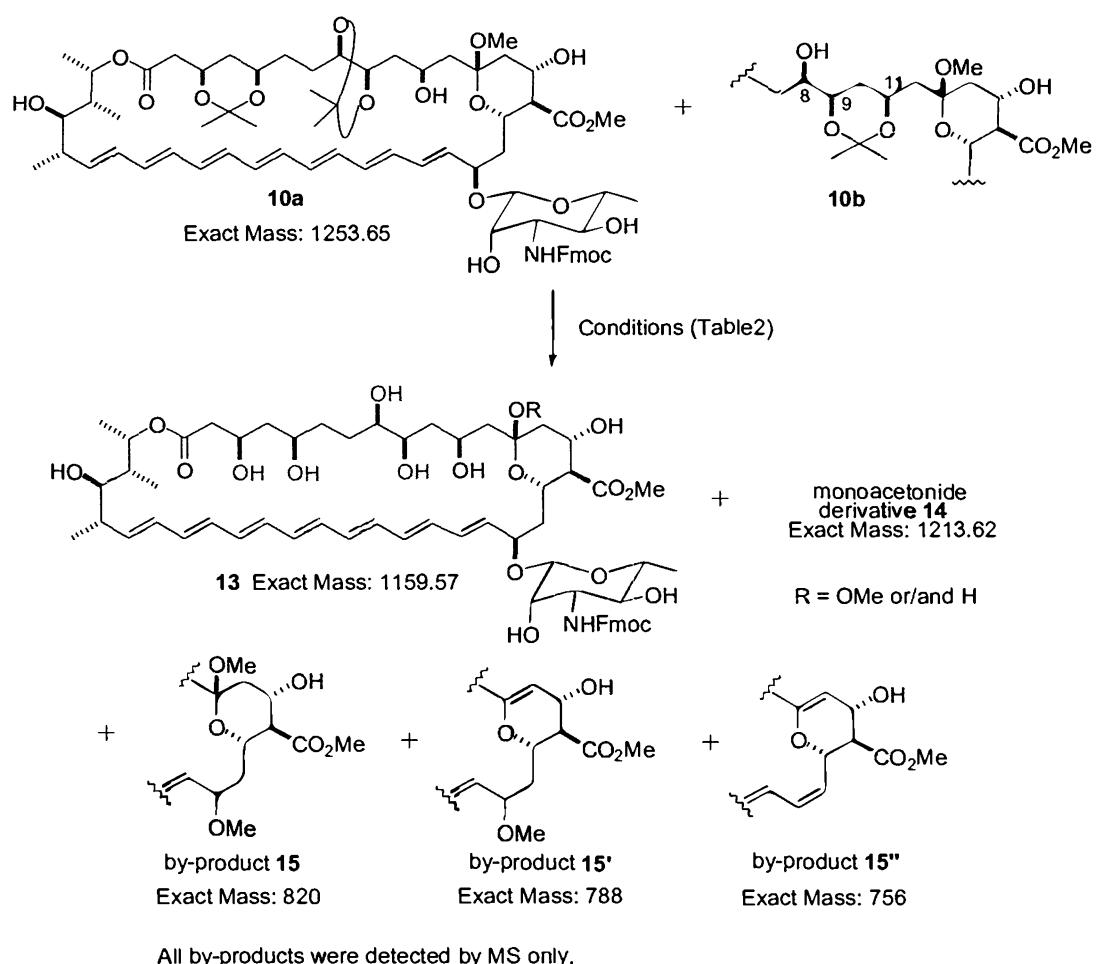
Nicolaou らは、AmB の全合成において **11a** に対して無水メタノール中、CSA を 1.2 当量加えて室温で 2 時間攪拌した後、水を加えて 4 時間攪拌することで、目的の AmB methyl ester **12** の合成に成功しているが（スキーム 2-4）、その単離収率は約 28% であった¹⁰。



スキーム 2-4

そこでまず、アミノ基が Fmoc で保護された **10ab** に対して、Nicolaou らと同様の条件で反応を行った（スキーム 2-5、Table2）。エントリー1で、メタノール中室温で攪拌すると、MS より 30 分程でモノアセトナイト体 **14** が主生成物となったが、糖部分が外れたと思われる副生成物のピーク (*m/z* 700～900 付近) も検出されってきた（モノアセトナイト体の半分ほどのピーク強度）。その後 1 時間攪拌すると、副生成物のピークのみ（主に **15'** や **15''**, *m/z* 811, 757）になり、目的の **13** は全く得られなかった。次にエントリー2では、エチレングリコールを共存させてアセトナ

イドの加溶媒分解を促進し、CSA の当量を抑えて酸による分解を防ごうと考えた。しかし、結果はやはりモノアセトナイト体は生成してきたが、2つ目の脱保護は進行せず、糖脱離による副生成物を与えるのみだった。エントリー3では、酸として NaHSO_4 on silicagel を用いて反応を行ったが、やはり2つ目のアセトナイトが外れず、温度を上げると分解するのみであった。以上の結果から、基質 **10ab** は酸に対して非常に不安定であり、酸によるアセトナイトの脱保護の条件に耐えられないことが示唆された。

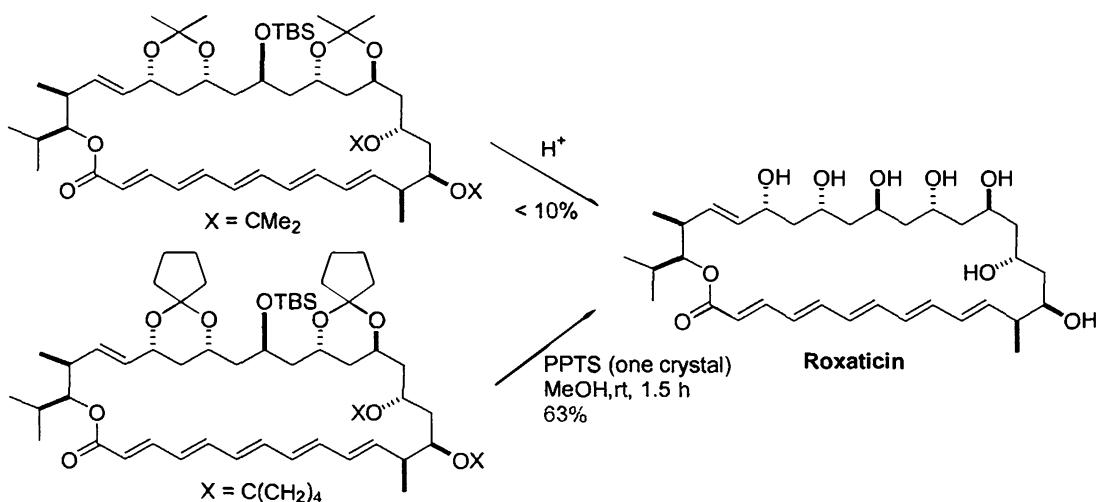


スキーム 2-5

Table 2

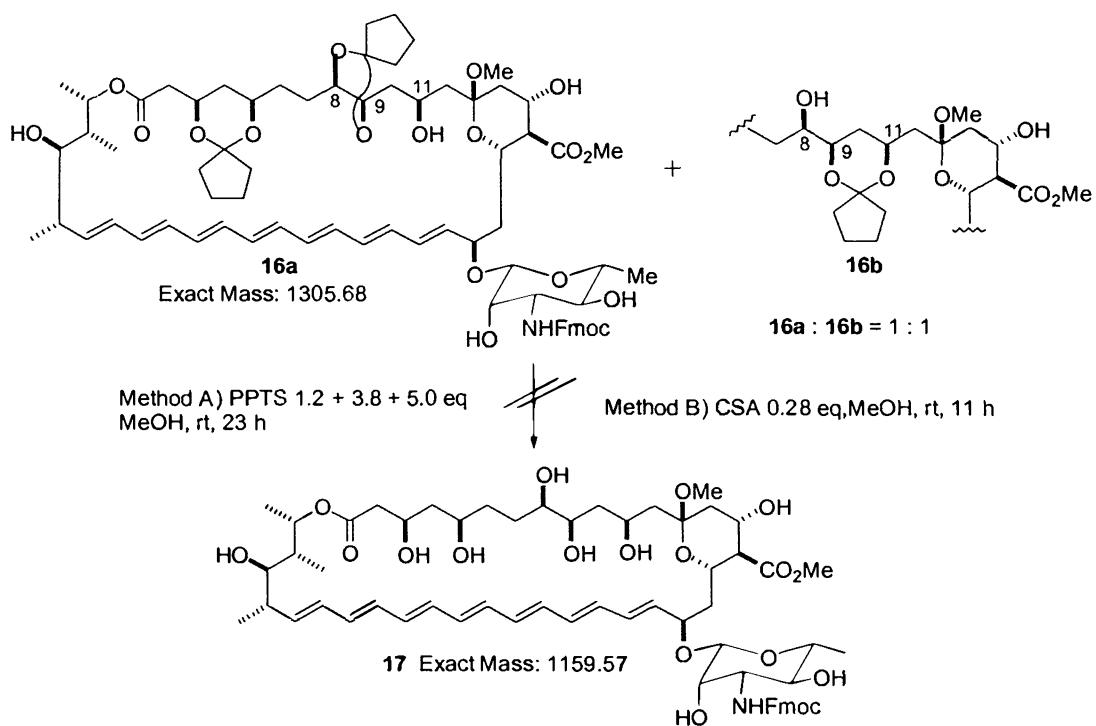
Entry	10ab / mg (μmol)	Acid (eq)	Solv. (ml), Temp. / $^{\circ}\text{C}$, Time / h	Result (detected by MS and TLC)
1	12.5 (10)	CSA (1.2)	MeOH (0.4), rt, 2 h then H_2O (0.1), rt, 4 h	After 30 min, 14 (main) After 2 h, 15 , 15' (main) and 13 was not observed. After H_2O addition, no change was observed.
2	14.5 (11.6)	CSA (0.23)	MeOH (0.2), Ethyleneglycol (0.2), rt, 7 h	After 2 h, 14 (main) After 7 h, 15 , 15' (main) and 13 was not observed.
3	15.4 (12.3)	NaHSO ₄ on silica-gel	MeOH (0.5), rt, 3 h then 45 $^{\circ}\text{C}$, 2 h , 16.7 mg	After 1 h at rt, 14 (main) After 30 min at 45 $^{\circ}\text{C}$, 15 , 15' (main) and 13 was not observed.

Evans らの Roxaticin の全合成においても、アセトナイトの酸による脱保護の収率は 10% 以下であった（スキーム 2-6）。しかし、より酸に不安定なシクロペンチリデンケタールを用いることで、PPTS というマイルドな条件での脱保護が可能となり、63% という収率で Roxaticin を合成することに成功している¹⁰⁾。



スキーム 2-6

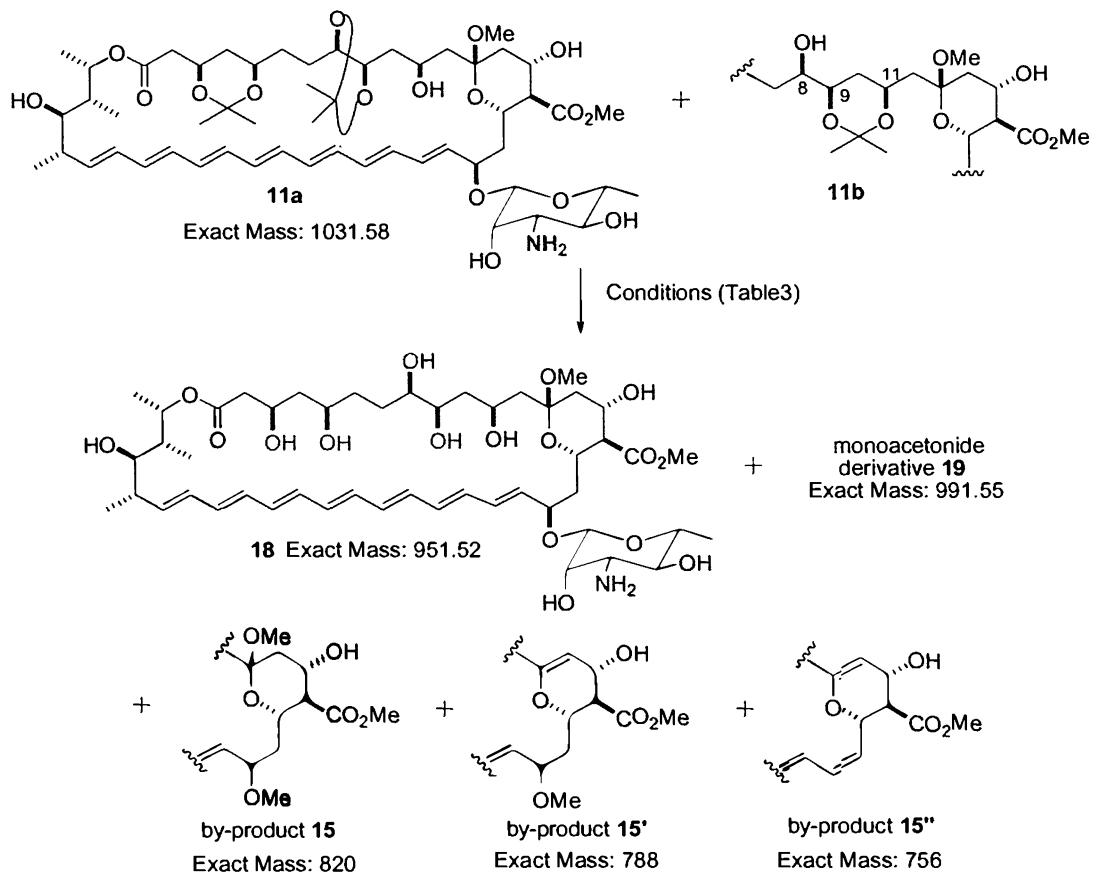
この報告に従い、基質として **16ab** を用いてシクロペンチリデンケタールの除去を検討することにした。(スキーム 2-7)。まず方法 A として PPTS を 5 当量加えて 5 時間程攪拌したところ、脱保護はあまり進行せず、原料 **16ab** がかなり残っていた。さらに 5 当量追加したが、反応は進行せず、徐々に分解物が増加するのみだった。次に方法 B として CSA での脱保護も検討したが、アセトナイトの場合とそれほど差はなく、モノケタール体が主生成物となった後、徐々に分解した。以上の結果から、基質 **16ab** でもシクロペンチリデンが外れる前に分解してしまうことがわかり、やはり酸に対する不安定性が問題であった。



スキーム 2-7

Nicolaou らはスキーム 2-4 に示すように、アミノ基を無保護の状態でアセトナイトの除去を行っていた¹¹⁾。そこで次に、アミノ基フリーの **11ab** に対してアセトナイトの除去を検討した（スキーム 2-8）。

まずエントリー1で、メタノール中 CSA を 1.2 当量作用させ室温で 1 時間攪拌したところ、反応はほとんど進行しなかったので徐々に試薬を追加した。最終的に 1.8 当量加えて 3 時間攪拌すると、MS よりモノアセトナイト体 **19** 由来のピーク (*m/z* 1014, 992, 960) がメインとなり、2 つ外れた **18** と思われるピーク (*m/z* 974, 952, 920) も確認できた。その後攪拌を続けたが **19** のピークは消失せず、糖脱離体（主に **15'**）が増加し複雑な混合物となってしまった。さらに水を加えて 4 時間攪拌したが、MS で変化は見られなかった。（この条件は基質を **11b** との混合物として用いている以外は Nicolaou らの条件と全く同じである。それにもかかわらず、1.2 当量の CSA ではほとんど反応が進行しなかった。その理由として **11b** の反応性が極端に低いことが考えられるが、もともと比率が少ないため (**11a** : **11b** = 3 : 1) こののみが影響しているとは考えにくい。また、前段階の Fmoc の脱保護に用いたピペリジンが多少基質に混入していて、そのために過剰の CSA が必要であった可能性は考えられる。）続いてエントリー2として NaHSO₄SiO₂ を用いたところ、3.5 時間で **19** のピークがメインとなり、2 つ外れた **18** と思われるピークも若干確認できた。その後 12 時間攪拌すると **18** のピークは増加したが、依然として **19** が主生成物であり、糖脱離体（主に **15'**）のピークも増加した。エントリー3では、酸としてイオン交換樹脂を使用したが、糖脱離が優先して進行し、目的物は全く得られなかった。次にエントリー4では、濃塩酸を用いる脱保護を検討した。これは Denmark らが RK-397 の全合成の際に用いていた方法であり、メタノールで希釀した塩酸 (86 mM) で処理することで、3 箇所のベンジリデンアセタールと 1 箇所のアセトナイトを収率良く除去している（スキーム 2-9）¹²⁾。基質 **11ab** のメタノール溶液を塩酸・メタノール中に滴下し、室温で 20 分攪拌すると MS より **19** と **18** がほぼ 1 : 1 で得られた。さらに攪拌すると、**18** が主生成物になってきたが、20 分も経つと糖脱離体のピークのほうが強くなってしまった。

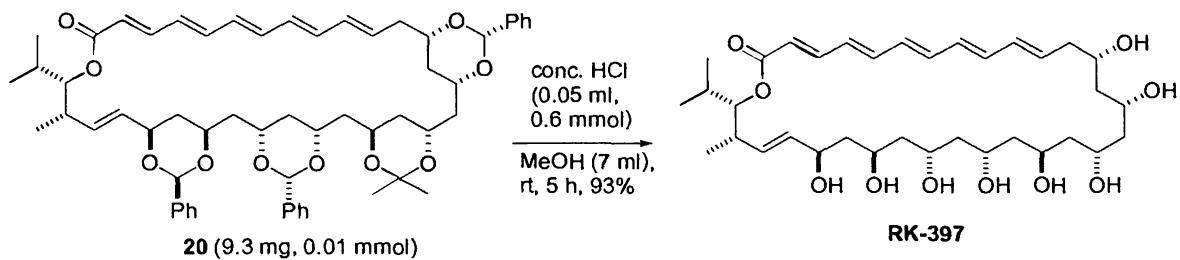


All by-products were detected by MS only.

スキーム 2-8

Table 3

Entry	11ab / mg (μ mol)	Acid	Solv. (ml), Temp. / °C, Time /h	Result (detected by MS and TLC)
1	14.8 (14)	CSA (1.8 eq)	MeOH (0.57), rt, 12 h then H ₂ O (0.14), rt, 4 h	After 3 h, 19 (main) and a few 18 was observed. After 12 h, complex mixture (19 : 18 : 15', 15") After H ₂ O addition, no change was observed.
2	13.3 (13)	NaHSO ₄ S iO ₂ , 34 mg	MeOH (1.0), rt, 12 h then H ₂ O (0.14), rt, 4 h	After 3.5 h, 19 (main) and a few 18 was observed. After 12 h, 19 : 18 : 15', 15" = 1.7 : 1 : 0.7 After H ₂ O addition, no change was observed.
3	3.4 (3.3)	DOWEX 50x 8, 30+50 mg	MeOH (0.77), rt, 12 h then H ₂ O (0.2), rt, 4 h	2.5 h after 30 mg addition, no reaction 3 h after 50 mg addition, only by-pro was detected.
4	10.6 (13)	Conc HCl (50 μ l, 0.6 mmol)	MeOH (7 ml), rt, 40 min	After 20 min, 19 : 18 : 15" = 1.3 : 1 : 0.3 After 40 min, 19 : 18 : 15', 15" = 1.3 : 1 : 1.5



スキーム 2-9

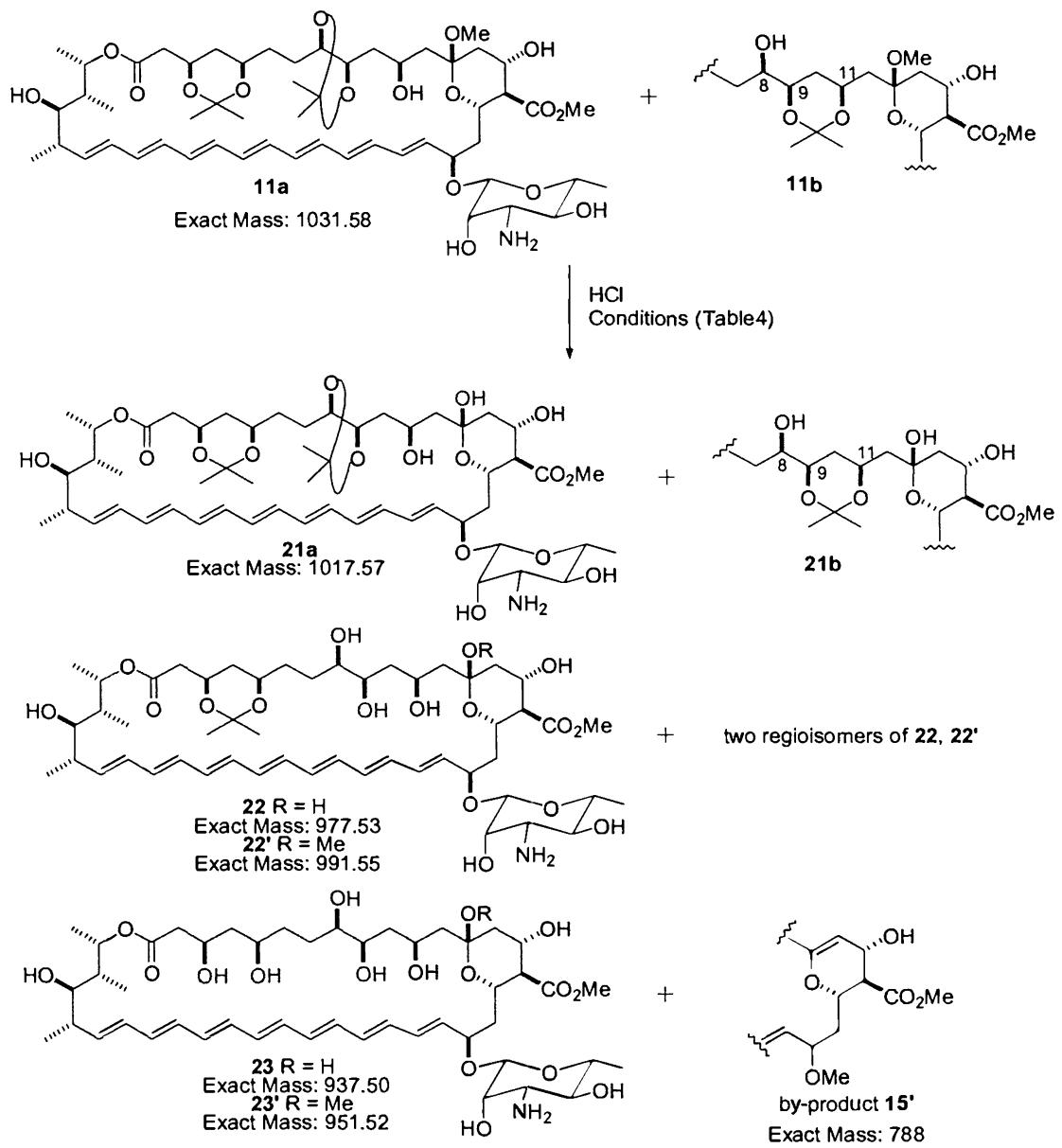
以上の結果から、アミノ基を Fmoc 基で保護した基質よりも無保護の基質の方が明らかに 2 つ目のアセトナイトが外れやすいことがわかった。この理由として、アミノ基がフリーであるほうが酸性条件で電子吸引性のアンモニウム塩となっている

ために、糖の脱離が抑制されているということが考えられるが、詳しいことはよくわからない。Table 3 のエントリー4 に示した、塩酸を用いる条件が比較的良好な結果を与えたので、この条件の最適化を行うことにした（スキーム 2-10、Table4）。

まずエントリー1 では、メタノールと水の混合溶媒を用い、アセトナイトの除去とメチルケタールの加水分解を同時にに行なうことにした。室温攪拌 1 時間でモノアセトナイト体のピークがメインになったが、メチルケタールの加水分解は半分ほどしか進行していなかった ($22 : 22' = 1:1.5$)。（ただし MS でのみ追跡していたため、実際はさらに 2 種類の位置異性体の混合物の可能性がある）その後、エチレングリコールを加えて 3 時間攪拌したが、2 つ目のアセトナイトの脱保護もメチルケタールの加水分解もあまり進行せず、マルチピークを与えた。エントリー2 で、アセトン・水の混合溶媒で反応を行うと、まずメチルケタールの加水分解が完全に進行した。その後徐々にアセトナイトが外れてきたが、アセトナイトが残った糖脱離体のピーク ($m/z 837, 877$) も徐々に増加し、マルチピークとなった。エントリー3 では、*t*BuOH・水の混合溶媒を用いたが、メチルケタールの加水分解のみ進行し、アセトナイトの除去は全く進行しなかった。次にエントリー4 では、水・THF 系で反応させたところ、アセトナイトの加水分解は進行してきたが、副生成物のピークが増加してきた。今までに生成していた糖脱離体はほとんど見られなかつたが、最終的に $m/z 976$ のピーク（構造は不明）がメインで得られ、全体的にシグナル自体も弱くなつていた。

エントリー1-4 の結果をまとめると、溶媒としてメタノールを用いる場合が最もアセトナイトが外れやすく、*t*-BuOH では全く外れないという結果であった。またメタノールを用いる場合、系中に始めから水を共存させると、メチルケタールの加水分解が完全には進行しないことがわかつた。そこでエントリー5 として、まずメタノールで処理してアセトナイトを除去した後、続けて水を加えることでメチルケタールを除去することにした。室温で 50 分攪拌すると MS より $22' : 23' : 15' = 1:1:0.5$ になった。この時点では水を加えメチルケタールの加水分解を行つたが、やはり半分ほどしか進行せず、混合物のままであった。次にエントリー6 として、塩酸・メタノールで処理した後、炭酸水素ナトリウムでクエンチして溶媒を留去し、さらに溶媒を水に変換して再び塩酸で処理することで、アセトナイトとメチルケタールを段階的に除去することにした。するとこの方法ではメチルケタールの加水分解は完全に進行し、目的とする 23 とモノアセトナイト体 22 と副生成物 15' が MS より $1:0.7:0.3$ の比で得られた。エントリー7、8 では処理する塩酸の濃度を変えてみたが、生成物

の比率はほとんど変わらなかった。しかしあントリー9において、アセトナイトの脱保護を0度で行うと、反応時間は長くなってしまったが、糖脱離体の副生はやや抑えられ、最終的に $22 : 23 : 15' = 0.5 : 1 : 0.25$ となった。条件検討の結果、一応目的物が主生成物として得られるようになり、副生成物の量も減らすことができたが、やはり依然としてモノアセトナイト体 **22** がかなり残ってしまうというのが問題であった。



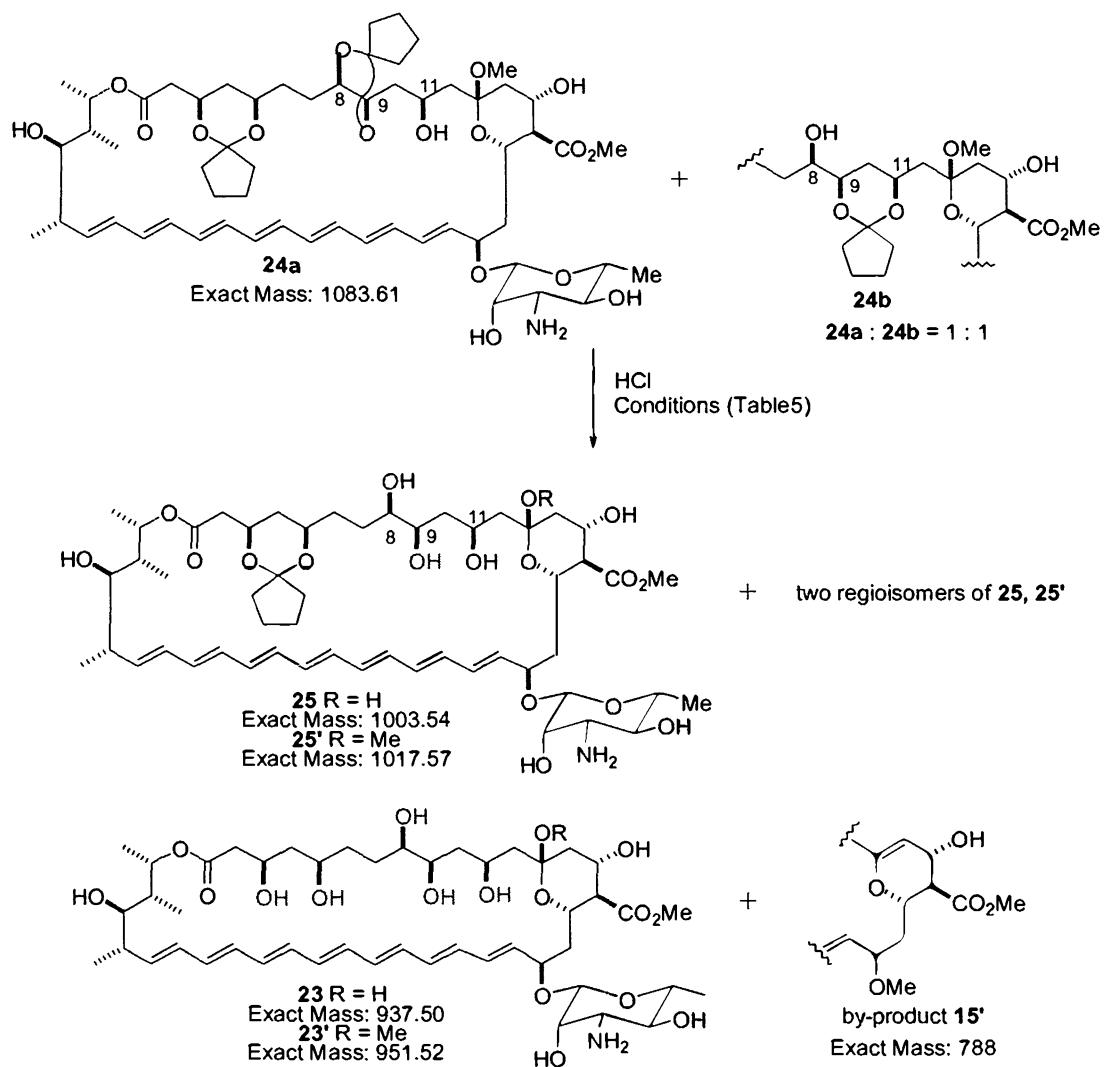
スキーム 2-10

Table 4

Entry	11ab / mg (μ mol)	HCl / μ l	Solv. (ml), Temp. / $^{\circ}$ C, Time	Result (detected by MS and TLC)
1	10.0 (9.7)	50	MeOH (5.6), H ₂ O (1.4), rt, 2.5 h then Ethylene glycol (0.5), rt, 3 h	After 1 h, 22 , 22' main (22 : 22' = 1 : 1.5) After 3 h, 22 , 22' : 23 , 23' : 15' = 1 : 1 : 0.2
2	9.1 (8.8)	50	acetone (6.36), H ₂ O (0.64), rt, 10 h	After 5 min, 21ab (single) After 2 h, 21ab : 22 : 23 : by-pro = 1 : 1.5 : 1 : 1 (by-product: m/z 837, 877)
3	3.5 (3.4)	15.7	tBuOH (2.0), H ₂ O (0.2), rt, 1.5 h	After 30min, 21ab (single) After 1.5 h, acetonide was not deprotected.
4	3.2 (3.1)	16.5	H ₂ O (2.31), THF (0.3), rt, 7 h	After 50 min, 22 : 23 = 1 : 1 mixture After 3 h, 22 : 23 = 1.3 : 1 and by-pro (m/z 976, 1016) After 7 h, by-pro (m/z 976) was mainly observed.
5	3.5 (3.4)	8.3	MeOH (1.15), rt, 50 min then H ₂ O (1.15), rt, 2 h	After 50 min, 22' : 23' : 15' = 1 : 1 : 0.5 After H ₂ O added 2 h, 22 , 22' : 23 , 23' : 15' mixture
6	3.5 (3.4)	16.5	MeOH (2.31), rt, 30 min and quenched , evaporated then H ₂ O (2.31), rt, 50 min	After 30 min, 22' : 23' : 15' = 1 : 1 : 0.5 After H ₂ O 50 min, 22 : 23 : 15' = 0.7 : 1 : 0.3
7	3.2 (3.1)	33	MeOH (2.31), rt, 24 min and quenched, evaporated then H ₂ O (2.31), rt, 1 h	After 24 min, 22' : 23' : 15' = 1 : 1 : 0.75 After H ₂ O 50 min, 22 : 23 : 15' = 0.7 : 1 : 0.7
8	3.1 (3.0)	16.5	MeOH (4.62), rt, 50 min and quenched, evaporated then H ₂ O (2.31), rt, 75 min	After 50 min, 22' : 23' : 15' = 1 : 1 : 0.5 After H ₂ O 75 min, 22 : 23 : 15' = 0.5 : 1 : 0.5
9	3.1 (3.0)	16.5	MeOH (2.31), 0 $^{\circ}$ C, 10 h 20 min and quenched, evaporated then H ₂ O (2.31), rt, 1 h	After 10 h, 22' : 23' : 15' = 1 : 1 : 0.3 After H ₂ O 1 h, 22 : 23 : 15' = 0.5 : 1 : 0.25

そこで次に、スキーム 2-7 で検討したように、保護基をシクロペンチリデンケタールに変えて検討することにした（スキーム 2-11、Table5）。アセトナイト体の場合とほぼ同じ条件で行ったところ（Table4、エントリー6,9 参照）、シクロペンチリデンの場合のほうがより最終生成物の比率が増加した。すなわち、エントリー2 に示すように、基質 **24ab** を塩酸・メタノール中 0 °C で 15 時間攪拌後、クエンチして溶媒を留去し、再び塩酸・水で処理することで、モノケタール体 **25** と目的物 **23** および副生成物 **15'** を 0.2 : 1 : 0.2 の比で得ることに成功した。

以上の結果より、この Table5、エントリー2 の条件を実際の基質に適用することにした。



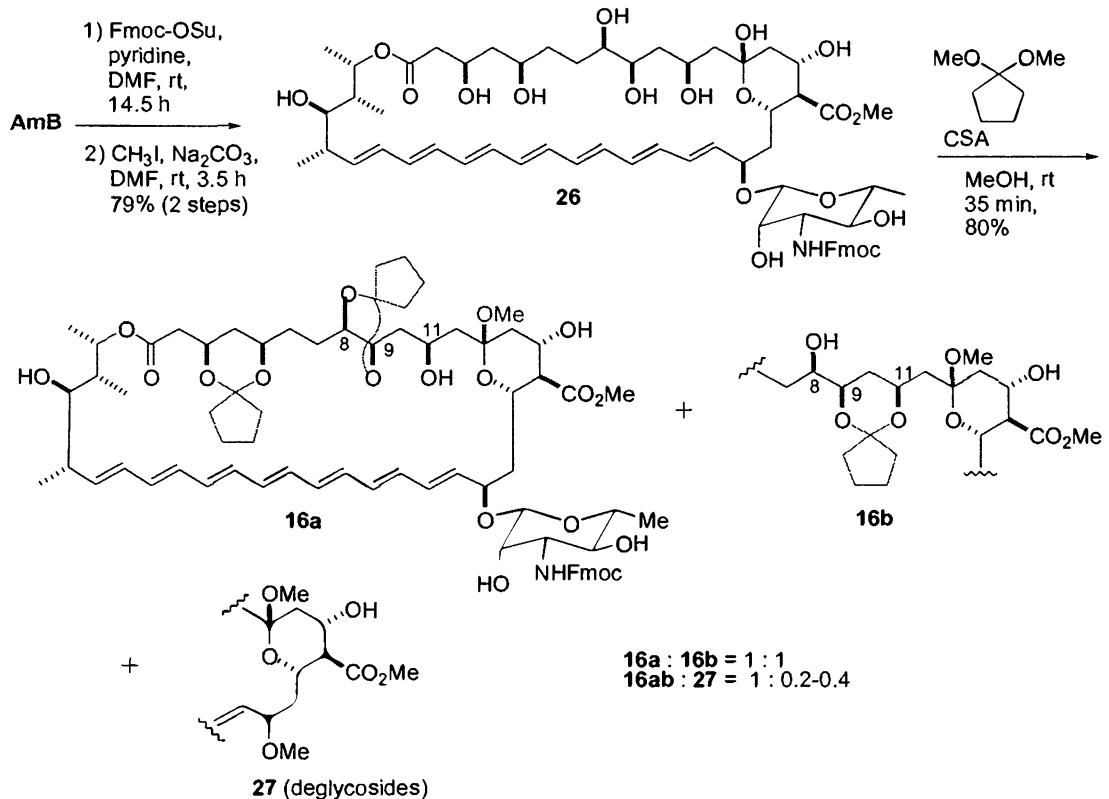
スキーム 2-11

Table 5

Entry	24ab / mg (μ mol)	HCl / μ l	Solv. (ml), Temp. / $^{\circ}$ C, Time	Result (detected by MS and TLC)
1	3.2 (3.1)	16.5	MeOH (2.31), rt, 30 min and quenched, evaporated then H ₂ O (2.31), rt, 40 min	After 30 min, 25' : 23' : 15' = 0.7 : 1 : 0.3 After H ₂ O 40 min, 25' : 23' : 15' = 0.3 : 1 : 0.3
2	3.5 (3.2)	16.5	MeOH (2.31), 0 $^{\circ}$ C, 15 h and quenched, evaporated then H ₂ O (2.31), rt, 1 h	After 30 min, 25' : 23' : 15' = 0.3 : 1 : 0.25 After H ₂ O 1 h, 25' : 23' : 15' = 0.2 : 1 : 0.2

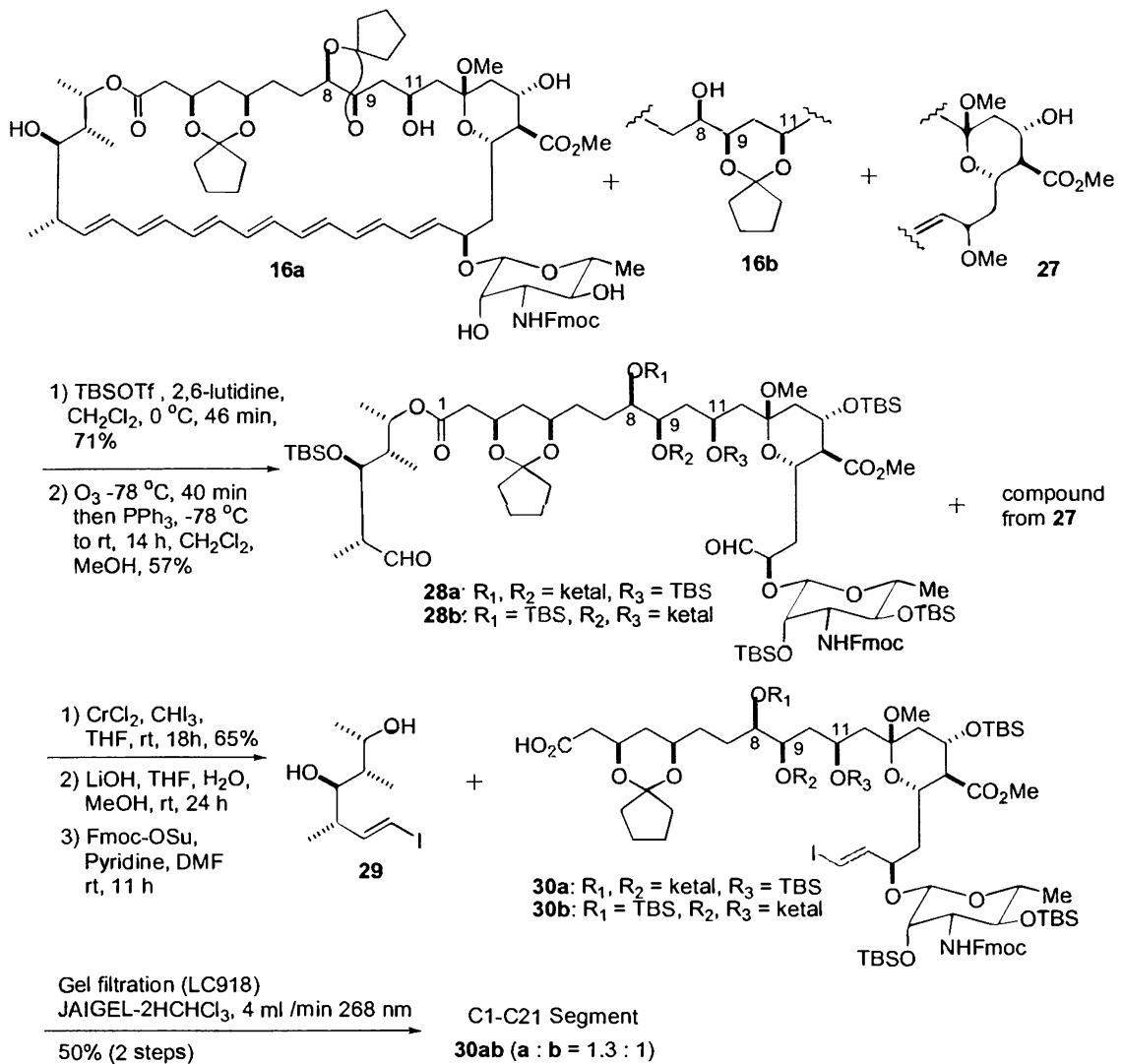
2-4 C1-C21 セグメントの調製

実際の基質に使用する保護基が決定したので、まず、C1-C21 セグメントの調製に着手した（スキーム 2-12）。出発原料の AmB のアミノ基を Fmoc 基で保護し、カルボン酸をメチルエステル化して **26** とした¹⁵⁾。続いて酸触媒下、メタノールと 2,2-ジメトキシシクロヘキサンを作用させ、ジオールのシクロヘキサリデン保護と 13 位のメチルケタール化を行ったところ、5 員環アセトナイト **16a** と 6 員環アセトナイト **16b** の分離困難な混合物が得られた。また、脱保護の検討においても問題となっていた糖脱離体 **27** が副生し、反応時間が長くなるにつれて多く生成した (**16ab** : **27** = 1 : 0.2 – 0.4)。これらは分離が困難であったので混合物のまま次の反応に用いた。



スキーム 2-12

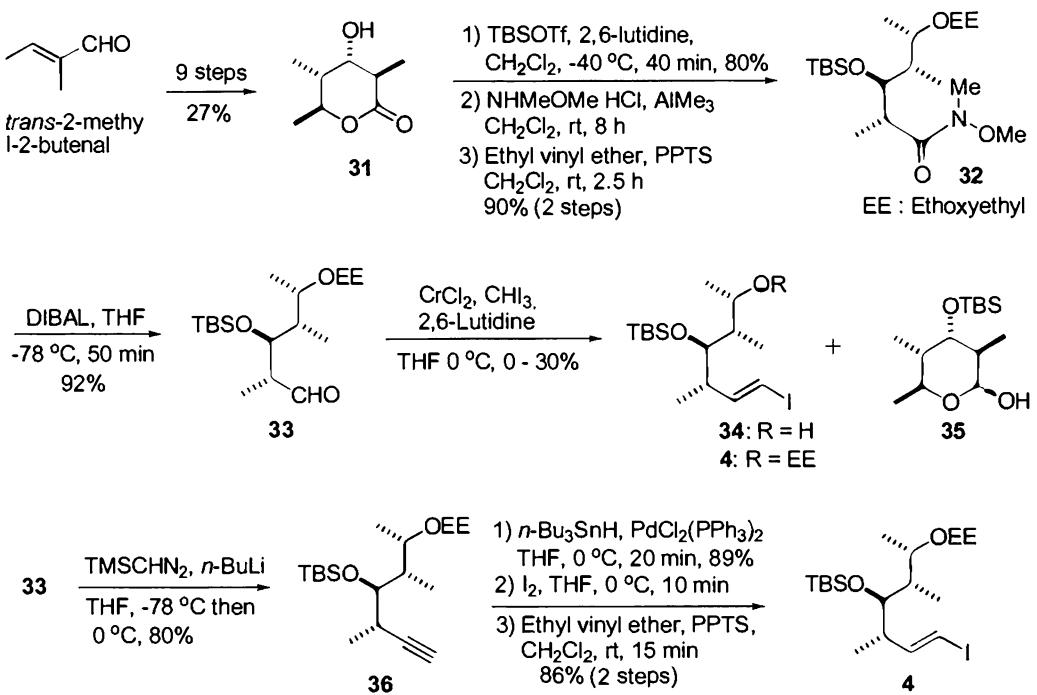
残るヒドロキシ基を TBS 基で保護し、さらにオゾン分解によりジアルデヒド体 **28** へと変換した（スキーム 2-13）^{1c)}。この段階で糖脱離体由来の副生成物はある程度除くことができた。続いてジアルデヒドに対し、塩化クロムとヨードホルムを作用させて高井オレフィン化¹⁶⁾を行ったところ、65%の収率でトランスのジヨードオレフィンを得た¹⁵⁾。さらに水酸化リチウムで 1 位のエステルを選択的に加水分解したが、同時に Fmoc 基が除去されてしまったため、再びアミノ基を Fmoc で保護し、**30ab** へと変換した。副生成物である **29** と **30ab** のシリカゲルカラムでの分離が困難であったため、最終的にゲルろ過により精製し、目的とする C1-C21 セグメント **30ab** を単離した。



スキー^ム 2-13

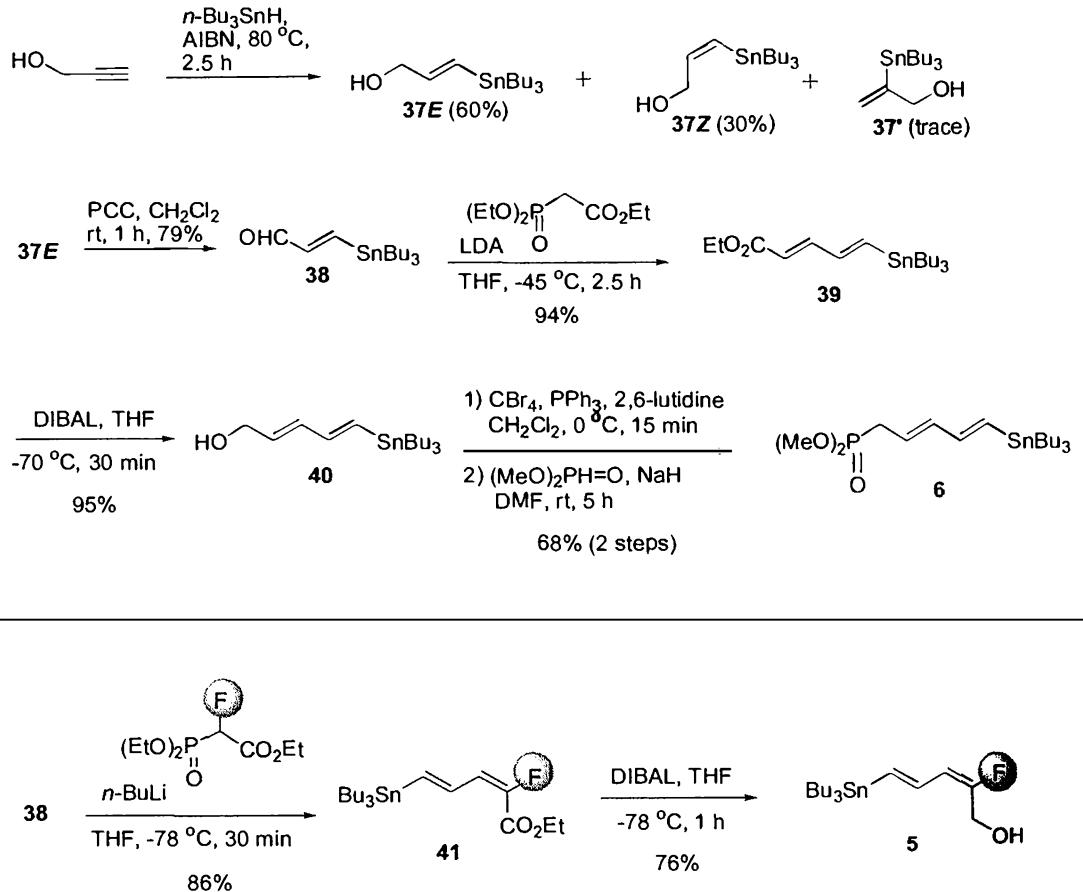
2-5 C22-C37 セグメントの合成

次にフッ素原子を含む C22-C37 セグメント 2 の化学合成を検討した。まずヨードオレフィン 4 の合成を行った (スキーム 2-14)。Carreira の報告に従い、大量に入手可能なトランス-2-メチル-2-ブテナールから 9 段階でラクトン 31 を合成し¹⁷⁾、ヒドロキシル基の TBS 化、さらにラクトンの開環によりワインレブアミド¹⁸⁾へと変換後、生じたヒドロキシル基をエトキシエチル基で保護してアミド 32 を得た。続いて DIBAL で還元してアルデヒド 33 とし、さらに高井オレフィン化により目的のヨードオレフィンを得ようと考えた。しかし、一部 EE 基が外れた 34 や、原料が環化してしまった 35 が副生してしまい、非常に収率が悪かった。また、再現性も悪く、30% ほどで目的物が得られる時もあれば全く得られない時もあった。そこで、アルデヒドからアセチレンを経由して 3 段階でヨードオレフィンへと変換することにした。アルデヒド 33 に対し、まず TMS ジアゾメタン¹⁹⁾とブチルリチウムを作用させてアセチレン 36 へと変換した。さらにハイドロスタネーション²⁰⁾、ヨウ素化を行ったところ EE 基が外れてしまったが、再び保護することで目的とする 4 を収率良く得ることができた。



スキーム 2-14

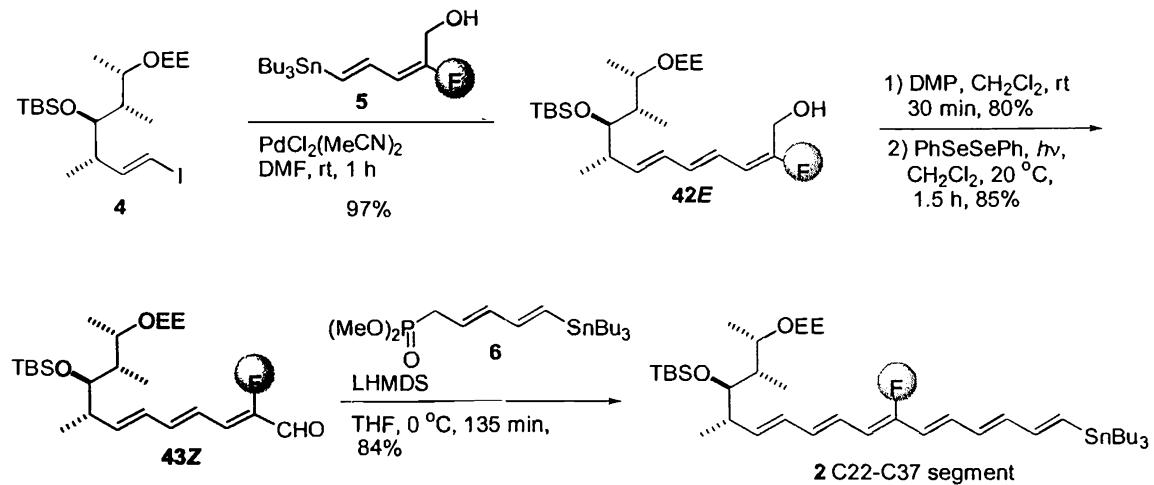
続いてホスホン酸エステル⁶およびビニルスズ⁵の合成を行った(スキーム 2-15)。Paquette らの報告²¹⁾に従いプロパルギルアルコールから 3 段階でジエニルスタナン³⁹を合成し、エステルを DIBAL で還元してアルコール⁴⁰を得た。⁴⁰に対し、系の酸性化を防ぐためにルチジンを共存させてプロモ化を行ったところ、反応は速やかに進行し、目的とするプロモ体が得られた。この化合物は非常に不安定でかつ揮発性であったのでフロリジルカラムで大まかに精製した後、ただちに次の反応に用いた。DMF 中、亜リン酸ジメチルと水素化ナトリウムで処理することで、ホスホン酸エステル⁶を 2 段階 68% の収率で得た。一方、ビニルスズ⁵については Shinada らの報告²²⁾に従い、アルデヒド³⁸に対して、フッ素の入ったリン酸エステルを作用させることでフッ素を導入し、得られたエステルを DIBAL で還元して合成した。



スキーム 2- B

合成したフラグメントを用いて C(22)- C(7)セグメント **2** を合成した（スキーム 2- 16）。まず、ヨードオレフィン **4** とビニルスズ **5** の Stille カップリングを行ったところ、反応は収率良く進行し、**42E** を单一生成物として与えた。その後、Dess- Martin 酸化²³⁾を行いアルデヒドとし、さらに光照射条件下、ジフェニルジセレン化により異性化させることで、目的のオールトランスの立体を有する **43Z**を单一の生成物として得た²⁴⁾。この光異性化の際、光照射により温度が上昇すると、EE 基が外れてしまう副反応が起こるので注意して反応を行った。**43Z**に対し、リン酸エステル **6** から LH MDS により発生させたアニオンを反応させたところ、84%の収率で目的のセグメント **2** が单一の異性体として得られた。このヘキサエン部分の立体配置については、プロトンの結合定数よりオールトランスであることを確認した。また、**2**

は酸に不安定であり、シリカゲルカラムで精製すると、一部スズが脱離して末端オレフィンとなってしまった。そのため、**2** の精製はフロリジルカラムおよび 1 % トリエチルアミンの溶出液を用いて行った。

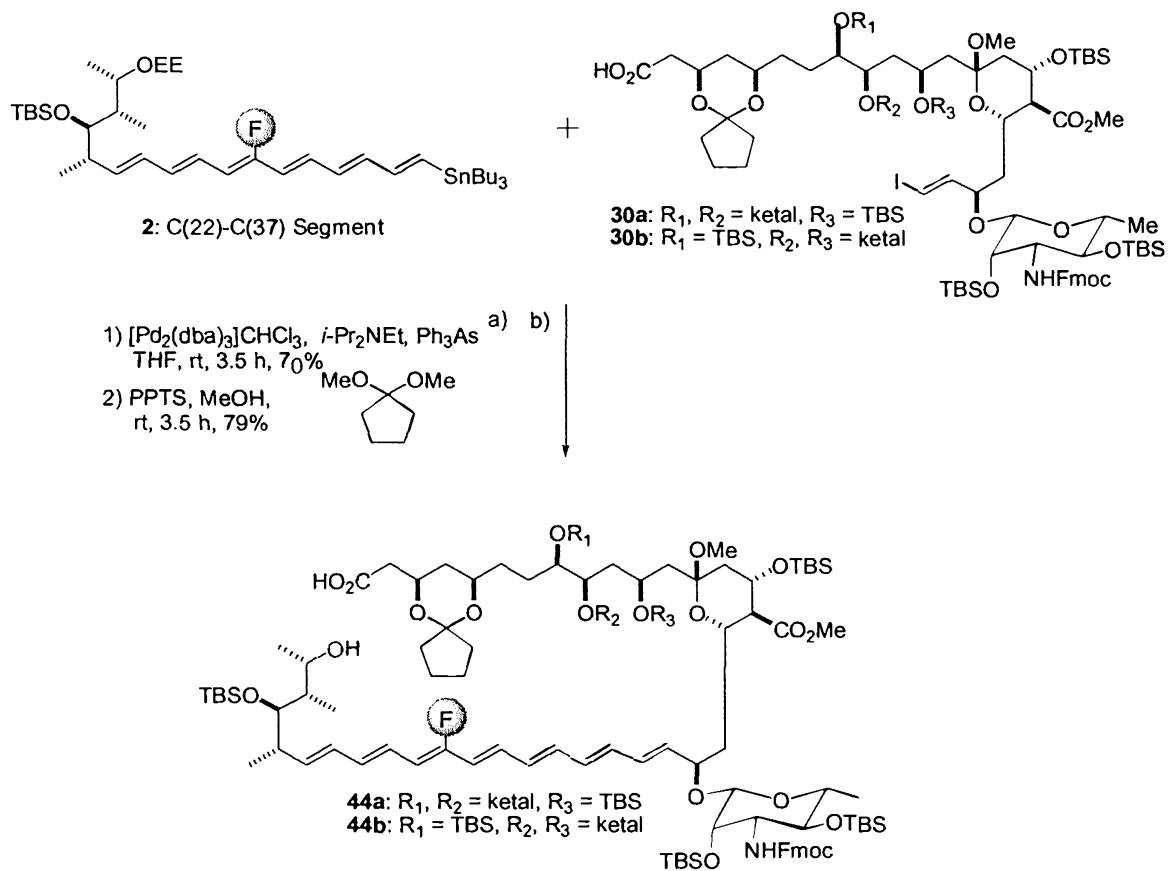


スキーム 2-16

2-6 セグメントのカップリング

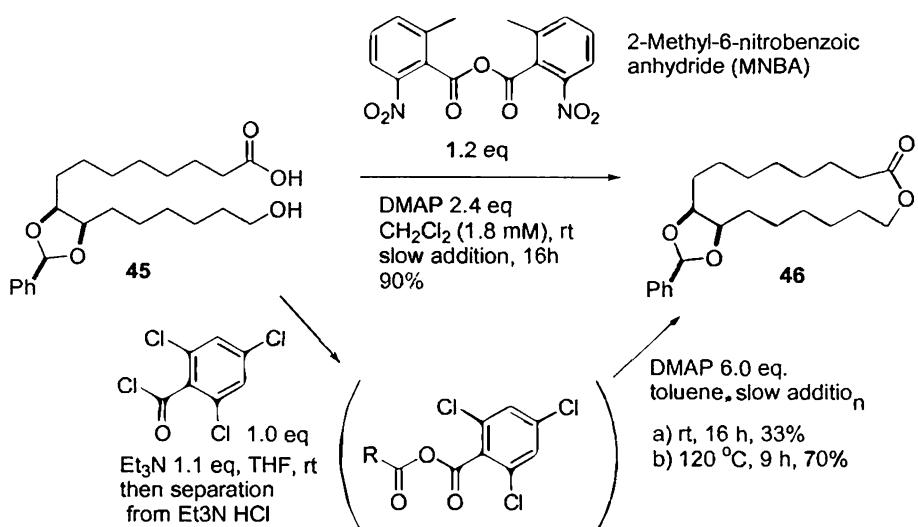
セグメント **30ab**、**2** の合成が完了したので、続いて両者のカップリング反応を検討することにした（スキーム 2-17）。前述のように Rychnovsky らは、0 倍のパラジウム触媒を用いた Stille カップリングにより Dermostatin A のポリエン部の導入に成功している（図 2-6）^{8b}。そこでまず、この報告に従いカップリングを検討した。すなわち、THF 溶媒中、セグメント **30ab** に対してセグメント **2** を 2.5 当量用い、触媒

としてトリスジベンジリデンアセトンジパラジウム、塩基としてジイソプロピルエチルアミン、配位子としてトリフェニルヒ素を共存させ、室温で 3.5 時間攪拌した。すると、予想以上に反応は速やかに進行し、目的とするカップリング体が 70% の収率で得られた。生成物はシクロペンチリデンの位置異性体と EE 基のジアステレオマーの計 4 種類の分離困難な混合物（比率は不明）であったため、分離せずに次の反応を行った。メタノール中、シクロペンタノンジメチルケタール共存下、PPTS で処理することで EE 基を選択的に除去し、セコ酸 **44ab** を 79% の収率で合成した。



スキーム 2-17

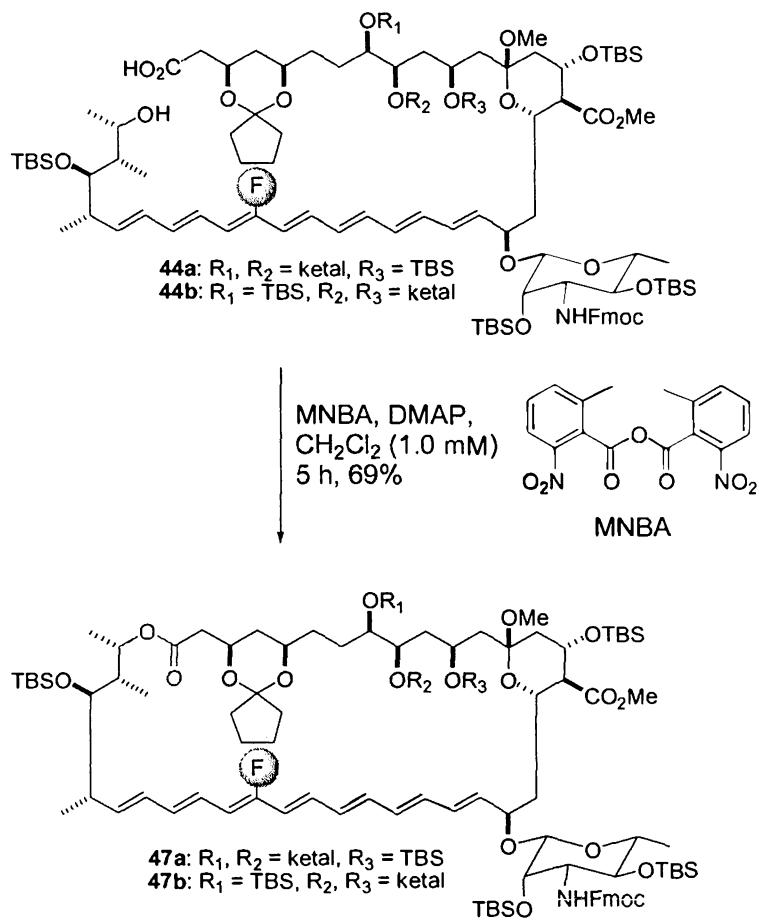
次にマクロラクトン化を検討した。前述したように、過去のポリエンマクロライド合成におけるマクロラクトン化はすべて Yamaguchi 法が適用されている。しかし、一度混合酸無水物を単離しないと収率が低下することや、反応性の乏しい基質では加熱還流を行う必要があった。最近、Shiina らのグループにより、2-メチル-6-ニトロ安息香酸無水物 (MNBA) を用いるマクロラクトン化が、Yamaguchi 法よりも操作が簡便で、かつ反応性が高いという報告がなされた²⁵⁾。スキーム 2-18 に示すように、アリューリット酸ラクトンの環化前駆体である化合物 45 に対して Yamaguchi 法を適用した場合、活性化の際に副生するトリエチルアミン塩酸塩の除去が必要であり、また、収率は室温では 33%、トルエン中加熱還流させても 70% であった。これに対し、MNBA、DMAP を用いる Shiina らの条件では、室温 16 時間で中間体の酸無水物を単離することなく、目的のラクトン 46 が 90% の収率で得られた。このように、マクロラクトン化が温和な条件で、かつ収率良く進行することが期待できるので、今回、化合物 44ab に対して、まず MNBA 法を適用することにした。



a) Shiina, I.; Kubota, M.; Ibuka, R. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7535.

スキーム 2-18

MNBA と DMAP をジクロロメタンに溶かし、そこへ **44ab** のジクロロメタン溶液を室温で 5 時間かけて滴下した（スキーム 2-19）。すると、環化は非常にきれいに進行し、目的とするフッ素が導入されたマクロラクトン **47ab** を、69% の収率で合成することに成功した。また、**a** と **b** の比率はほぼ 1:1 であり、シクロペンチリデンの位置異性による反応性の違いは見られなかった。



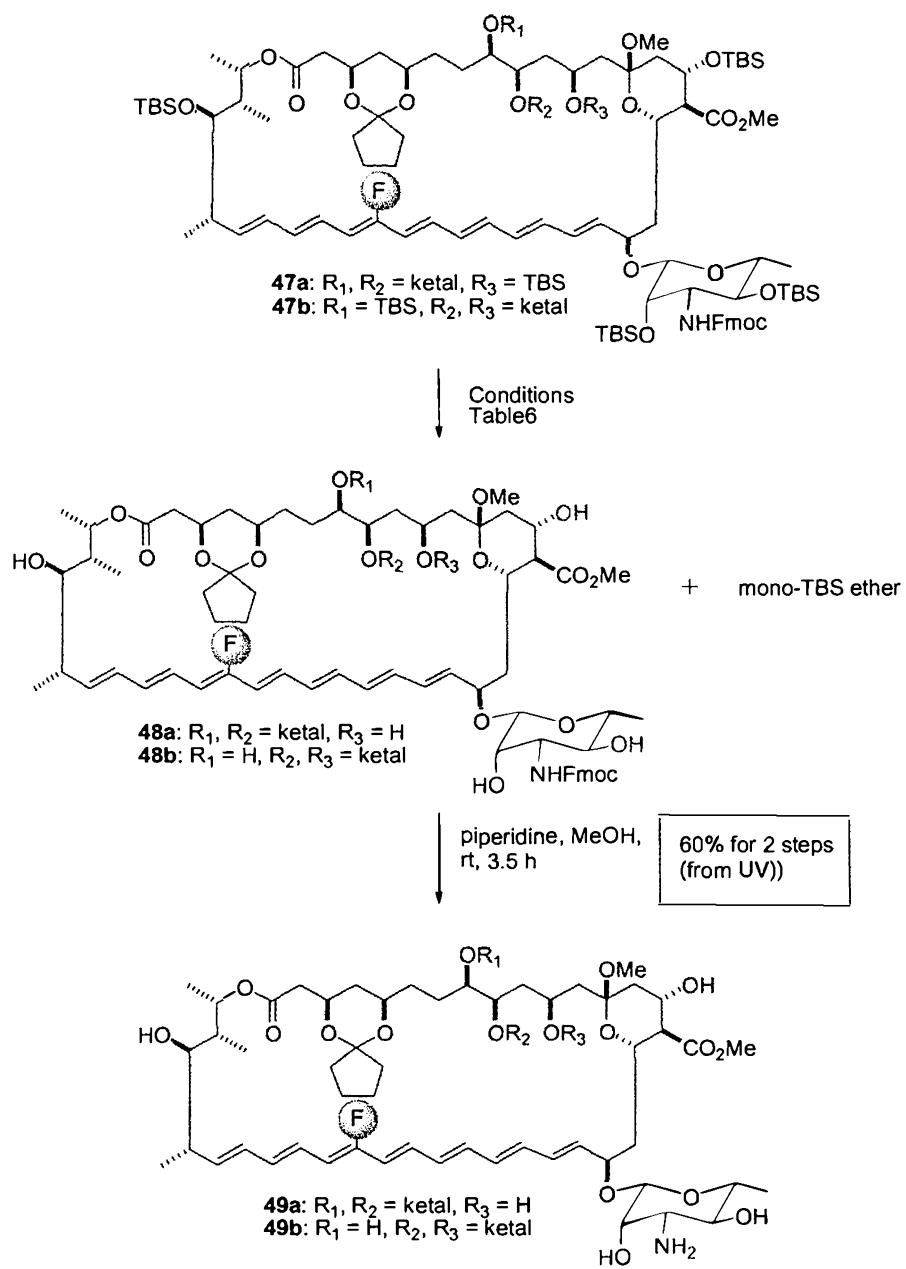
スキーム 2-19

以上示すように、今回の合成スキームにおいて鍵反応と予想された、Stille カップリングによるフラグメントの連結と、続くマクロラクトン化による環化は問題なく

進行した。この Stille カップリングとマクロラクトン化を組み合わせたマクロライド構築法がポリエンマクロライド合成に適用されたのは初めてであり、今回のような立体障害の大きいフラグメント同士でも使用できることがわかった。また、過去の方法より簡便でかつ温和な条件であるため、マクロライド環構築後では導入の難しい糖部分を有したままでも、問題なく反応が進行することがわかった。今後この方法が、アンフォテリシン B 以外にはなされていない糖化ポリエンマクロライドの全合成にも適用できることが期待される。

2-7 脱保護

続いて脱保護を検討した（スキーム 2-20）。まず、TBS 基および Fmoc 基の除去を行った。条件としては、前述の Table 1 の結果を受け、18% の HF-ピリジンを用いて行った。Table 6 に示すように、反応はモデル実験の場合よりもきれいに進行し、単離収率はほぼ 9 割だった。また、エントリー 4 では HPLC で反応を追跡し、39 時間攪拌すると目的物とモノ TBS 体の比は約 1:0.08 となった（図 2-8）。前述のフッ素を含まない基質では長時間攪拌すると、TLC 上で高極性の分解物が得られてきたため、モノ TBS 体がある程度残っている段階で反応を停止していたが、実際の基質 47ab に関しては、HPLC や TLC においてもそのような分解物は確認できなかった。従って、モノ TBS 体がほぼ完全に消失するまで攪拌を続けることができ、結果として収率が向上したと考えられる。この分解物は、TLC 上でしか確認できていないので詳細はわからないが、フッ素がヘプタエンに導入された基質では全く生成しないことから、おそらく基質のヘプタエン部分が反応してダイマー化等を起こした副生成物ではないかと考えている。得られた 48ab の Fmoc 基をピペリジンにより除去し、化合物 49ab とした。この段階で UV による定量を行ったところ、収率は 2 段階で約 60% であり、秤量から算出した収率の約 7 割程度になった。



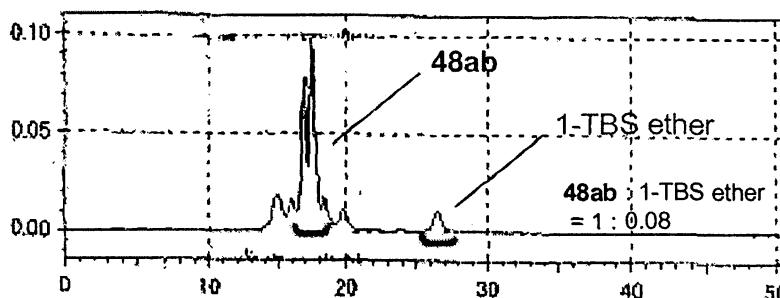
スキーム 2-20

Table 6

Entry	47ab / mg	50% HFPy / μ l	Solv.	Temp. / °C	time / h	result ^{a)}
1	15	114	MeOH (0.4 ml), Pyridine (0.2 ml)	50	28	48ab : 1TBS ether = 1 : 0.2 from MS Separated 48ab (80%)
2	20	148	MeOH (0.52 ml), Pyridine (0.26 ml)	50	22.5	Separated 48ab (88%)
3	20	156	MeOH (0.55 ml), Pyridine (0.27 ml)	50	27	Separated 48ab (92%)
4	53	156	MeOH (1.41 ml), Pyridine (0.71 ml)	50	39	48ab : 1TBS ether = 1 : 0.08 from HPLC Separated 48ab (90%)

a) All the yields were calculated from weighing.

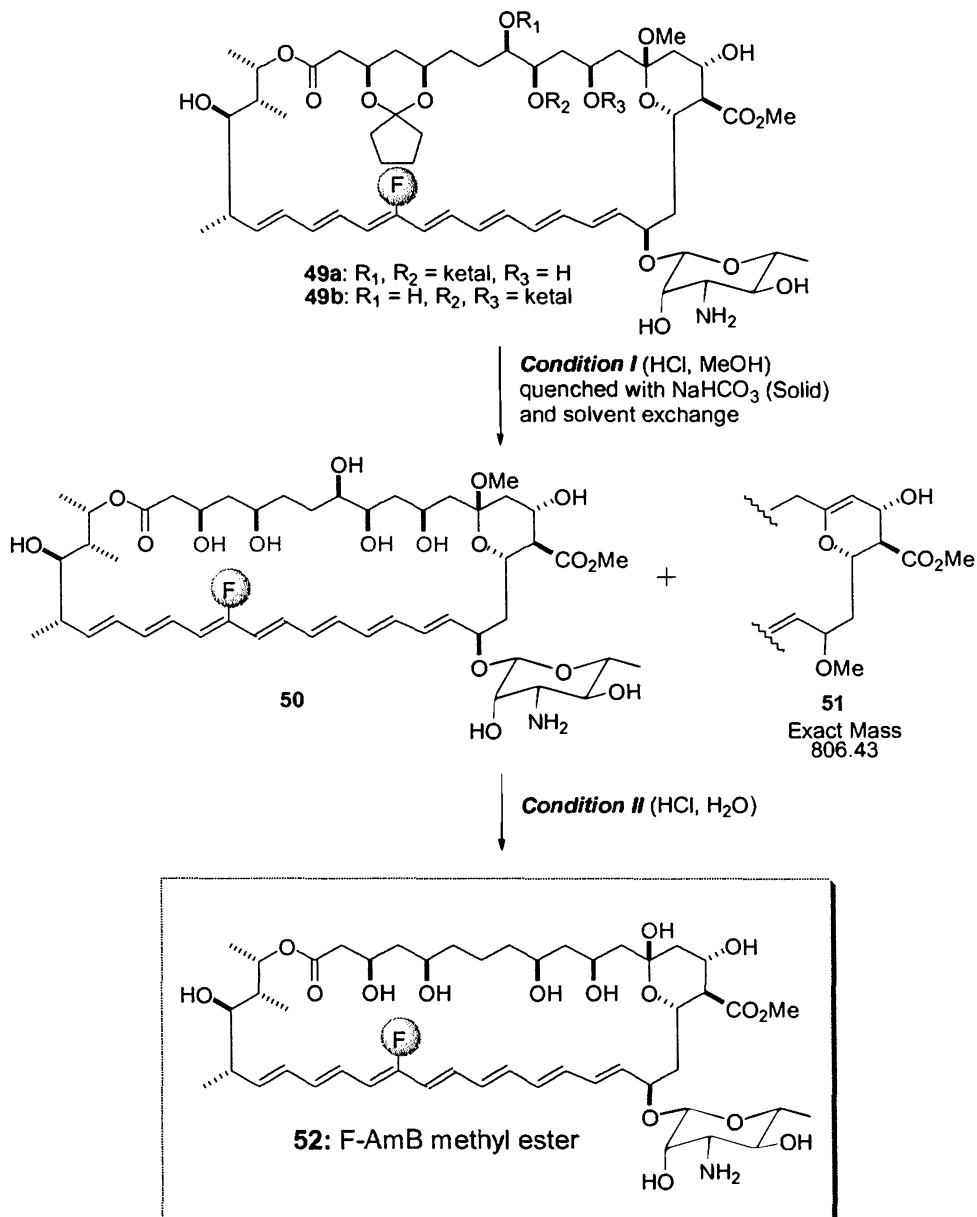
図2-8 HPLCクロマトグラム



Conditions, column: 5C18-ARII (10x250 mm), eluent: 100% MeOH, flow rate: 1.0 ml /min

続いてシクロペンチリデンとメチルケタールの除去を検討した（スキーム 2-21、Table 7）。まずエントリー1で、基質 **24ab** を用いて最適化した条件（Table 5、エントリー2）で反応を行った。反応を MS で追跡したところ、シクロペンチリデンケタールの加溶媒分解は進行してきたが、検討の時とは異なり、糖部分が脱離した副生成物 **51** のピーク (m/z 829) は全く見られなかった。続いて炭酸水素ナトリウムで

反応を停止後、溶媒を水に変えて再び塩酸で1時間処理すると、メチルケタールの加水分解が進行し、MSにおいて目的物である F-AmB methyl ester **52** がほぼ単一のピークとして確認された。ODS のオープンカラムで脱塩後、HPLC 精製を行ったところ、多少副生成物（構造は不明）のピークも見られたが、目的とする F-AmB methyl ester **52** が主生成物として得られた（図 2-9）。しかし、約 8mg（秤量値）の **49ab** から F-AmB methyl ester **52** は約 0.37mg（UV 定量）しか得られず、収率が非常に悪いことがわかった。



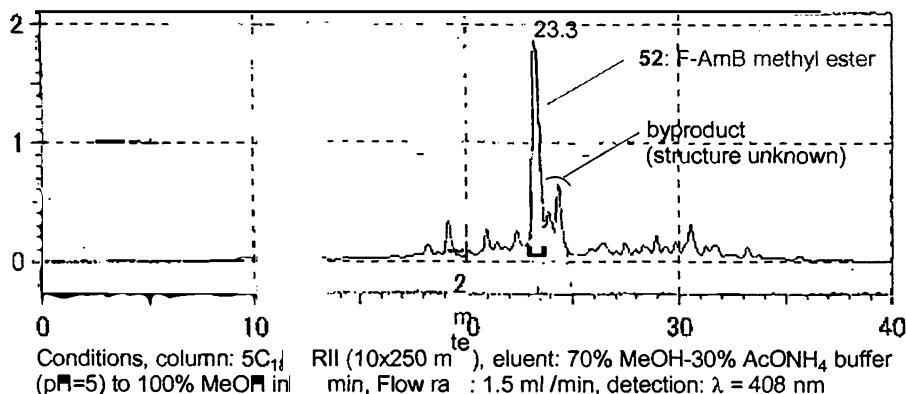
スキーム 2-21

Table 7

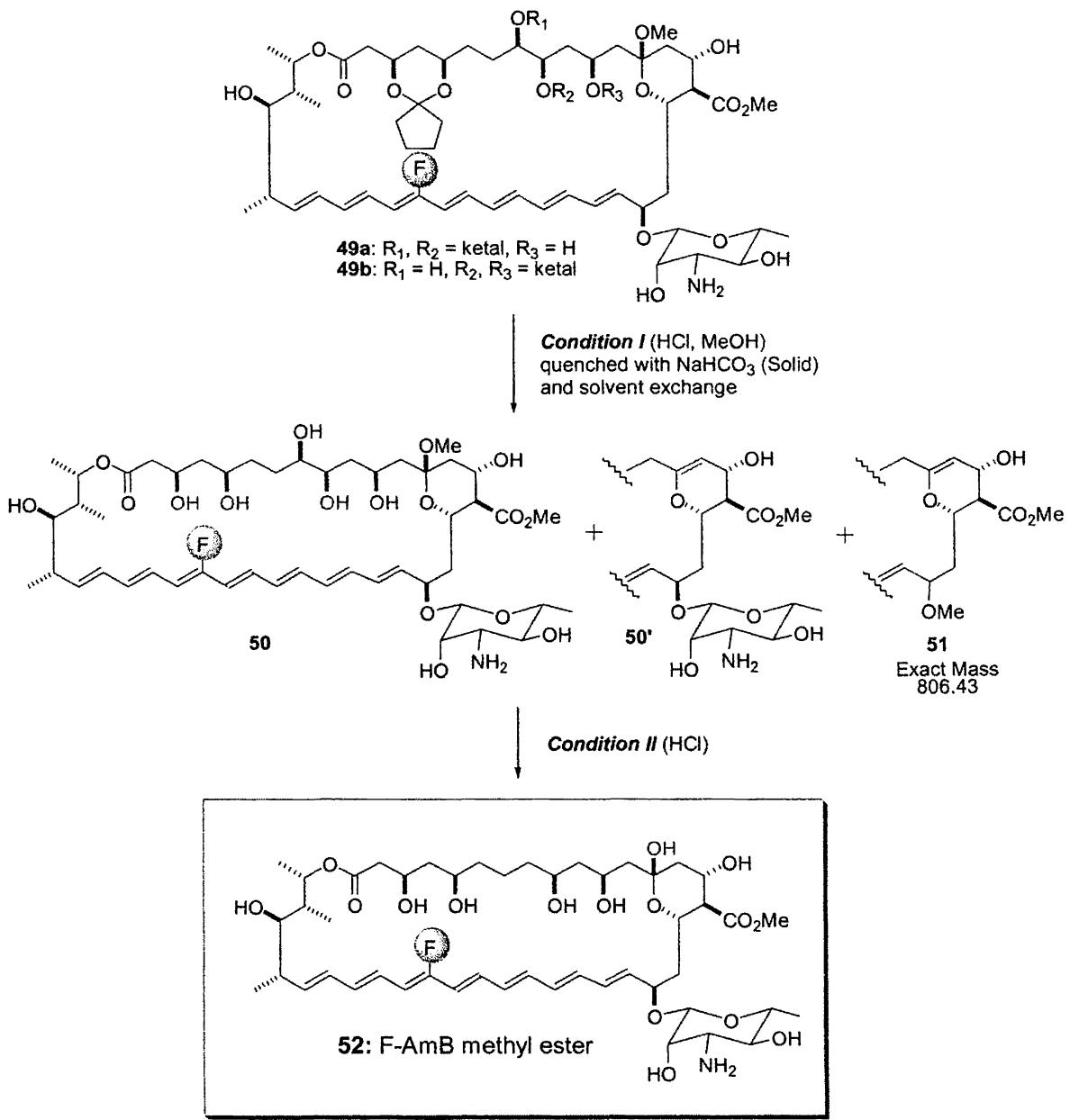
Entry	49ab ^{b)} / mg (μ mol)	Conc. HCl / μ l	(I) Solv. (ml), Temp./ °C., Time	(II) Solv. (ml), Temp./ °C., Time	Yeild
1 ^{a)}	8.0 (7.3)	41	MeOH (5.69), 0 °C, 14.5 h	H ₂ O (5.69), rt, 1 h	0.37 mg (5%)
2 ^{b)}	2.3 (2.1)	16.5	MeOH (5.69), 0 °C, 14.5 h	H ₂ O (0.21), <i>t</i> BuOH (2.1), rt, 45 min	no data
3 ^{b)}	9.0 (8.1)	64	MeOH (8.9), 0 °C, 14.5 h	H ₂ O (0.81), <i>t</i> BuOH (8.1), rt, 30 min	2.1 mg (27%)

- a) The reaction was detected by MS and the amount of substrate was calculated by weighing. The yield was determined by UV. (DMSO, 416 nm, $\epsilon = 1.022 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
- b) The reaction was detected by MS and HPLC and the amount of substrate was determined by UV. (DMSO, 416 nm, $\epsilon = 1.022 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

図2-9 HPLCクロマトグラム



エントリー1では反応の進行を定量性に欠ける MS スペクトルでのみ追跡していたので、実際には MS で確認できない分解物が副生している可能性があった。また、水中でのメチルケタールの加水分解では基質が完全には溶けておらず、反応の追跡が困難であった。そこでこれらの問題を考慮し、反応の進行をより詳細に追跡するために HPLC を用い、メチルケタールの加水分解を水と *t*-ブタノールの混合溶媒を用いて行うことにした（エントリー2、スキーム 2-22）。まず、メタノール中でのシクロペンチリデンケタール除去の反応の経時変化を HPLC で追跡した（図 2-10）。すると、0 度で 14.5 時間ほど攪拌した段階で、2 つのメインピークに収束することがわかった。この二つのメインピークを分取して MS を確認したところ、両者とも同じような *m/z* のピークパターンが見られたことから、目的とする **50** とそのグリカル体 **50'** であると判断した。（これらは単離して構造確認したわけではないので、確証は得られていない。）この HPLC の結果、および TLC や MS でも他の分解物は確認されなかつたので、シクロペンチリデンケタールの除去は問題なく進行していると判断した。続いて反応を停止し、溶媒を水と *t*-ブタノールの 1:10 の混合溶媒に変え、再び塩酸を加えて室温で攪拌し、HPLC で追跡した（図 2-11）。すると基質は完全に溶けて溶液となり、室温 45 分で原料のピークはほぼ完全に消失した。この段階で、目的物の低極性側にもピークが確認されたが、ODS のオープンカラムで脱塩後、再び HPLC を確認すると **52** のピークがほぼ单一となった。従って、低極性側のピークは副生成物ではなく、目的物 **52** のイオン化の状態が異なる化合物であったのではないかと考えている。以上の検討より、ケタールの除去の反応は、このエントリー2 の条件でほぼ問題なく進行すると判断した。



スキーム 2-22

図2-10 HPLCクロマトグラム

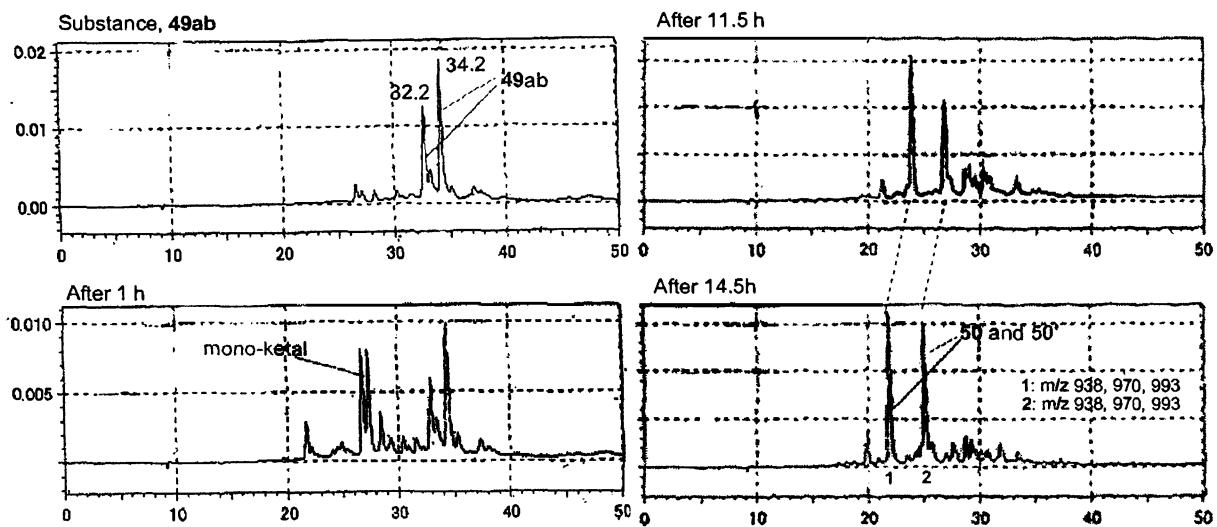
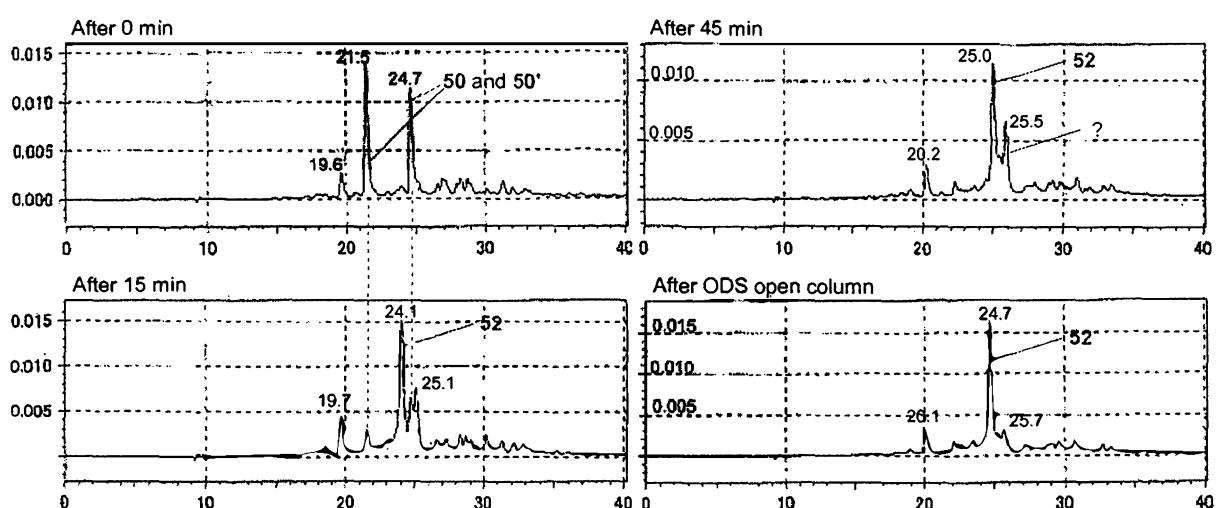
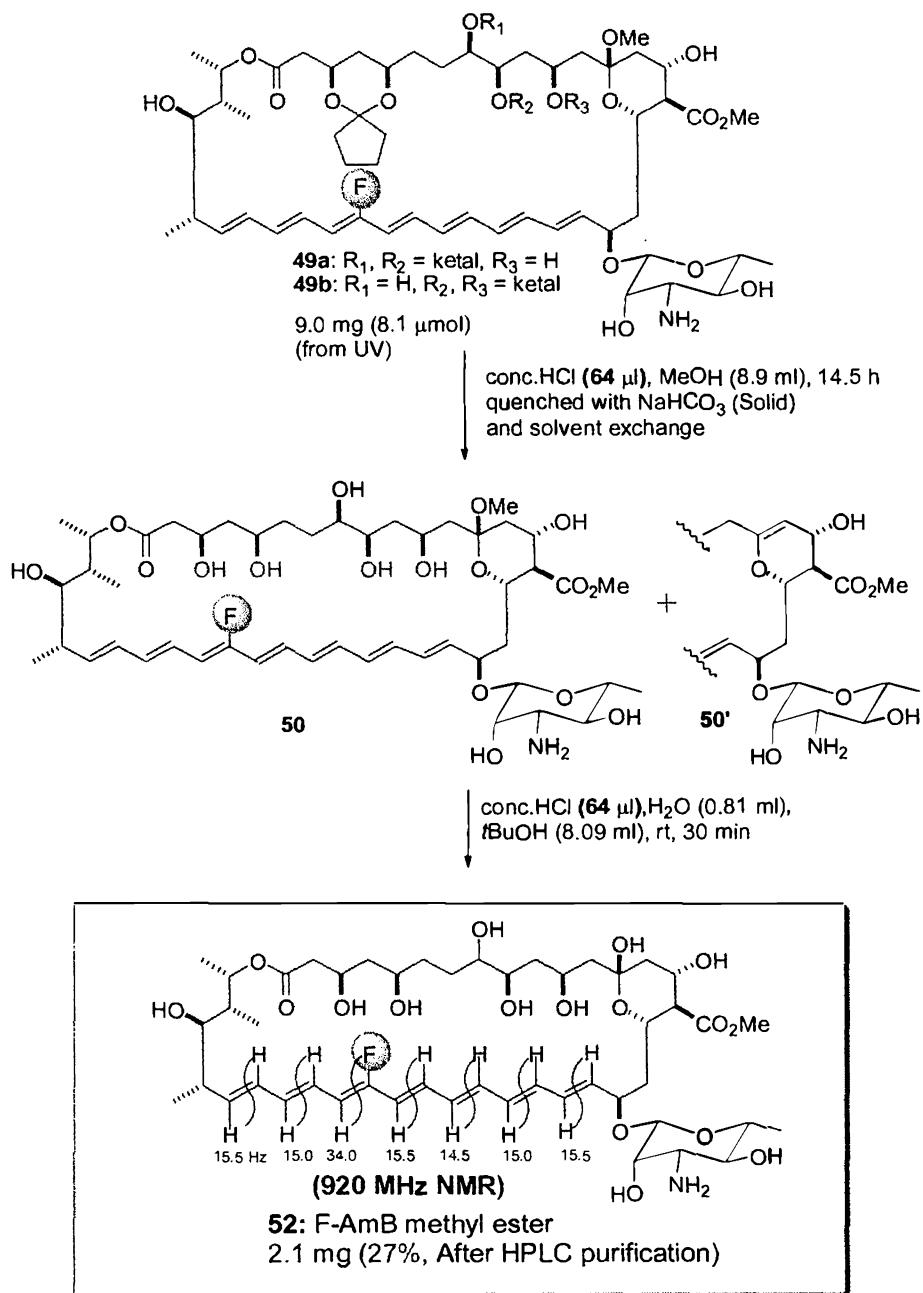


図2-11 HPLCクロマトグラム

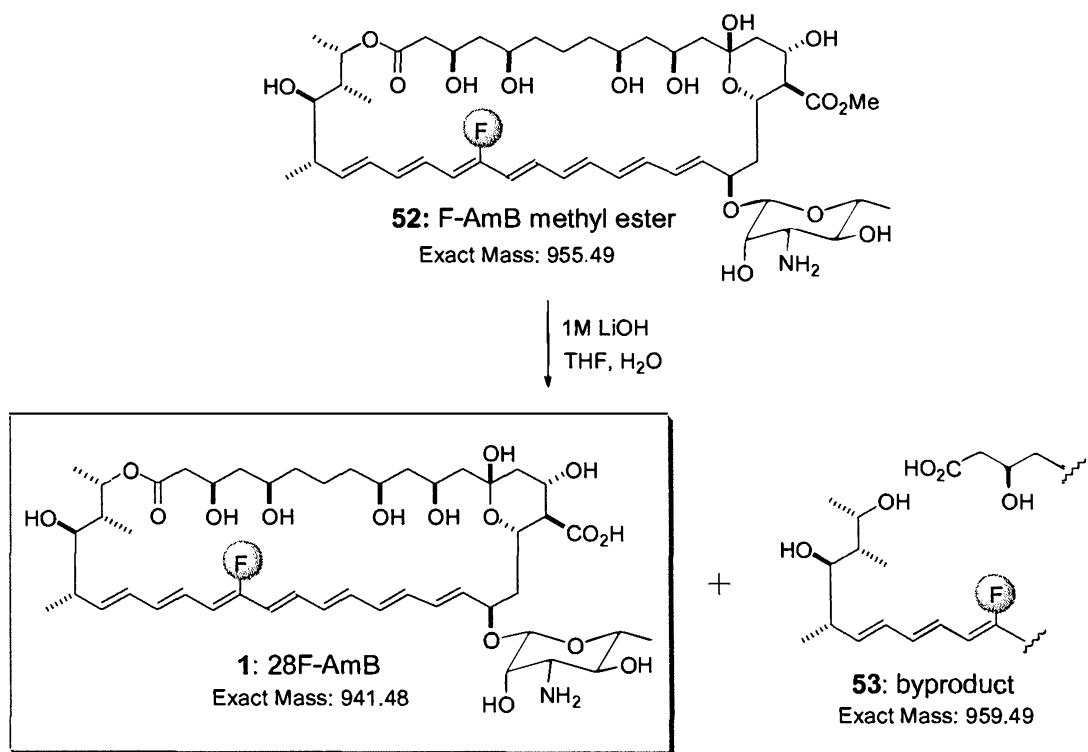


そこで、エントリー2の結果を踏まえ、再びスケールをあげて **49ab** のシクロペンチリデンケタールとメチルケタールの除去を行った(エントリー3、スキーム 2-23)。UV で定量した **49ab** を 9.0mg 用い、メタノール中、塩酸を加え 0 度で 14.5 時間攪拌した。**50** と **50'**が主生成物としてできていることを HPLC で確認した後、反応を停止してメタノールを留去し、溶媒を水と t-ブタノールの混合溶媒にかえて再び塩酸で処理した。室温で 30 分攪拌し、反応が終了していることを MS で確認後、反応を停止し、ODS オープンカラムで脱塩操作後、HPLC で分取精製した。得られた F-AmB methyl ester **52** を DMSO 中の UV (416 nm, $\epsilon = 1.022 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) で定量したところ、2.1 mg で収率は 27% であり、前回の 5% から大幅に改善された。また、HPLC (ODS) の回収率が最大でも 60~70% であることを考慮すると、2箇所のシクロペンチリデンケタールと 13 位メチルケタールの除去は、50% ほどの収率で進行していると考えられるので、悪くない結果であると言える。合成した **52** のオレフィン部分の構造については、920 MHz の NMR を用いてすべてのプロトンを帰属してその結合定数を算出し、オールトランスであることを確認した。



スキー一ム 2-23

最後にメチルエステルの加水分解を行った。Nicolaou らの報告では、THF、水の混合溶媒中、室温で水酸化リチウムを作用させることで、80%の収率で AmB の合成に成功している¹⁰。そこでほぼ同じ条件で加水分解を行った(スキーム 2-24、Table 8)。エントリー1-4 に示すように、THF、水の混合溶媒中、0 °C で水酸化リチウムを作用させたところ、加水分解が進行し、目的とする F-AmB 1 が主生成物として得られた。1 の構造については、¹H NMR より AmB とのヘプタエン部分以外の相同意より確認し、これにより、目的であった 28-F-AmB の合成に成功した。しかし、すべてのエントリーの場合において、マクロラクトンが開環してしまった副生成物 53 が同時に得られ、その比は **1 : 53 = 1 : 0.25-0.6** であった。この反応についてはさらなる条件検討が必要であり、収率向上が望まれる。



スキーム 2-24

Table 8

Entry ^{a)}	52 / mg (μ mol)	Base (eq)	Solv. (ml)	Temp., Time	Result (detected by MS and HPLC)
1	1.0 (1.1)	1 M LiOHaq (20)	THF (0.25), H ₂ O (0.1)	0 °C, 4.5 h	52 : 1 : 53 = 0 : 1 : 0.25^{a)}
2	1.1 (1.2)	1 M LiOHaq (15)	THF (0.25), H ₂ O (0.1)	0 °C, 9 h	52 : 1 : 53 = 0.17 : 1 : 0.4^{a)}
3	2.2 (2.3)	1 M LiOHaq (20)	THF (0.5), H ₂ O (0.2)	0 °C, 6.5 h	no data ^{b)}
4	2.3 (2.4)	1 M LiOHaq (20)	THF (0.5), H ₂ O (0.2)	0 °C, 4 h	52 : 1 : 53 = 0 : 1 : 0.6^{b)}

a) column: 5C₁₈-ARII (10x250 mm), eluent: 70% MeOH-30% AcONH₄ buffer to 100% MeOH in 30 min

b) column: 5C₁₈-ARII (10x250 mm), eluent: 40% MeOH-60% (0.14% NH₃aq) to 90% MeOH-10% (0.14% NH₃aq) in 25 min.

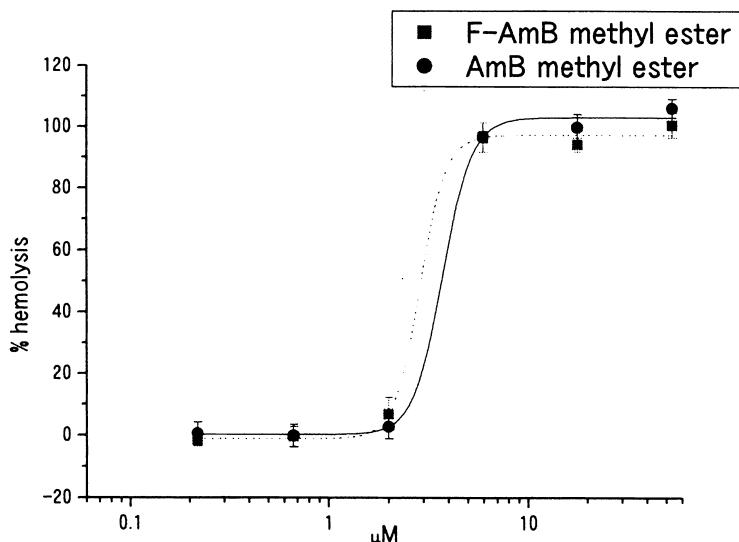
2-8 F-AmB methyl ester **52** の生物活性試験

AmB はそのカルボキシル基をメチルエステル化しても活性がそれほど変化しないことが知られている (Table 9)²⁶⁾。したがって、AmB methyl ester の状態でも AmB 同様のチャネルを形成していると考えられるため、固体 NMR による AmB チャネル複合体の構造解析のプローブとして、F-AmB ではなく、F-AmB methyl ester を使用しても問題ないと考えられる。前項で示したように、F-AmB methyl ester **52** の加水分解があまり収率よく進行しないこともあり、まずは、固体 NMR 測定に必要な試料量を調達することが可能な F-AmB methyl ester の段階で、生物活性試験を行うことにした。

Table 9

	AmB	AmB methyl ester
溶血活性 (human erythrocytes, EC ₅₀)	1.7 µg / ml	4.8 µg / ml
抗真菌活性 (<i>Candida albicans</i> , IC ₅₀)	0.03 µg / ml	0.05 µg / ml

まず、ヒトの赤血球に対する溶血活性を調べた。AmB がチャネルを形成すると Na^+ が流入し、ついで水が流入するため溶血が起きる。1% 赤血球浮遊液に各サンプルの DMSO 溶液を加え、38 °C で 18 時間インキュベートした。その後遠心分離すると、溶血していない赤血球は沈殿しほぼ透明な上澄み液を得られるのに対し、溶血を起こすとヘモグロビンが漏れ出し 450 nm に吸収を示すようになる。この波長で吸光度を測定し、どの程度溶血が起こっているかを評価した。ポジティブコントロールとして純水で希釈し完全溶血させたもの、ネガティブコントロールとしてサンプル溶液の代わりに DMSO を加えたものを用いた。その用量作用曲線を次に示す(図 2-12)。

図 2-12 縦軸 溶血活性 = $(A - A_0) / (A_{100} - A_0) \times 100\%$

A = 膜外に流出したヘモグロビンの吸光度(450 nm)

 A_{100} = ポジティブコントロールのヘモグロビンの吸光度 A_0 = ネガティブコントロールのヘモグロビンの吸光度

図 2-12 より大まかに EC₅₀ を求めると、AmB methyl ester は約 3.8 μM、F-AmB methyl ester は約 2.9 μM であった。これにより、F-AmB methyl ester は AmB methyl ester と同程度の溶血活性を保持していることが確認された。

続いて、抗カビ活性試験を行った。カビ(*Aspergillus niger*)を含む寒天培地上に抗カビ活性のある試薬を染み込ませたペーパーディスクを置くと、その周りだけカビの繁殖が抑えられ、図 2-13 のようにカビの無い領域（阻止円）ができる。この阻止円の有無により活性を評価した。

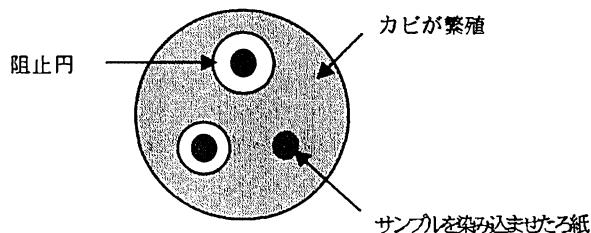


図 2-13 抗カビ活性試験

はじめに、*A. niger* を液体培地を用いて室温で培養し、その培養液を一定量寒天プレート上に広げた。ペーパーディスクにサンプルの DMSO 溶液を染み込ませ (50, 10 μg / disk)、*A. niger* 菌糸体を含む寒天プレート上に置いた。コントロールとしては DMSO のみを染み込ませたディスクを用いた。室温で培養しコントロールである DMSO の阻止円が消えた時点でのサンプルの周りの阻止円の形成を観察した。その結果、Table10 に示すように、AmB methyl ester 、 F-AmB methyl ester ともに 28 時間後では 10 μg でも阻止円が形成され、52 時間後では両サンプルとも阻止円が消失した。これにより、F-AmB methyl ester は AmB methyl ester と同程度の抗カビ活性を保持していることが確認された。

Table 10

	$\mu\text{g/disk}$ (<i>Aspergillus niger</i>)	28 h	52 h
AmB methyl ester	50	+	+
	10	+	-
F-AmB methyl ester	50	+	+
	10	+	-
DMSO		-	-

1) The formation of inhibitory zone was observed (+) or not (-)

以上の生物活性試験の結果から、ヘプタエンの 28 位にフッ素原子が導入された F-AmB methylester が AmB methyl ester と同等の生物活性を保持していることが確認された。したがって、F-AmB methylester は AmB と同様に膜中でチャネル複合体を形成していると考えられるので、固体 NMR 測定における有用なプローブになることが期待された。

第三章 F- AmBnethylester を用いた固体NMR測定

3-1 緒言

当研究室ではAmBのチャネル会合体の構造解析に対して固体NMRを適用しており、現在までにAmB-リン脂質およびAmB-ステロールにおいて、分子間相互作用を観測することに成功している²⁷⁾。AmB-リン脂質については、生合成的に調製した[tri-¹³C]AmBを用い、DMPCまたはDSPC膜中の脂質の³¹PとAmBの¹³C間のREDOR測定を行うことで、AmBがDMPC膜を単分子長で貫通していることが明らかになった^{27a)}。さらに全炭素が標識された[U-¹³C]AmBを用いたDLPC膜中のREDOR実験においても、AmBが単分子長で貫通していることが証明され、同時にリン脂質が会合体形成に大きく関与していることが示された^{27b)}。また、AmBとステロールについても、[U-¹³C]AmBと¹⁹F標識化ステロールの連結体を用いたREDOR測定により、AmBとステロール間の分子間相互作用が観測されている。

このように、AmBチャネル複合体の構造を解明する上で、固体NMRは非常に有用な方法であることが示されつつある。そこで、次にAmB-AmBの分子間相互作用を解析するため、標識化AmBを用いて固体NMR測定を行うことを計画した。まず、正確な距離測定ではなく、一度に多くの情報が得られる[U-¹³C]AmBを用いることにしたが、[U-¹³C]AmBに対して通常のREDOR測定を行うと、双極子の展開時間に同核種間のJカップリングによる展開も起こってしまうことが問題となる。そこで、同核種間の相互作用を抑えたRDX(REDOR of X cluster)測定法²⁸⁾(図3-1)を適用することにした。

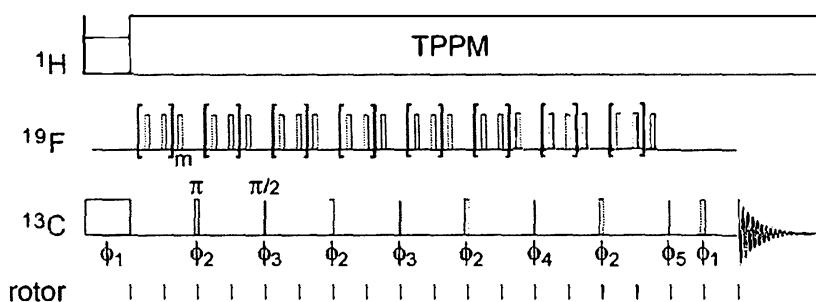


図3-1 RDXのパルスシーケンス

当研究室の梅川らは、DMPC 膜中で 14F-AmB と [$U^{-13}C$]AmB に対して RDX 実験を行うことで、13 位の ^{13}C に REDOR 減衰を観測することに成功している²⁹⁾(図 3-2、3-3)。この結果より、14 位のフッ素は 13 位の ^{13}C 原子から近い位置にあることが示唆され、これまでに推測されてきた樽板モデルと一致するものであった(図 3-4)。しかし、これは AmB が形成するポアの内側(親水性部分)のみの構造情報であるため、実際に AmB が図に示すような複合体を形成していることを証明するには、ポアの外側(ポリエン部分)の構造情報を知る必要がある。

そこで今回、前章で合成した 28F-AmB methyl ester (F-AME) を用いて同様の実験を行うことで、AmB チャネル複合体においてポリオール部分と同様に、ヘプタエン部分同士の分子間相互作用を観測しようと考えた。また、AmB のポリエン部分はエルゴステロールとも相互作用している可能性が示唆されているため、エルゴステロールの有無により、チャネルの外側部分であるフッ素原子周辺の構造が変化するかを確認しようと考えた。

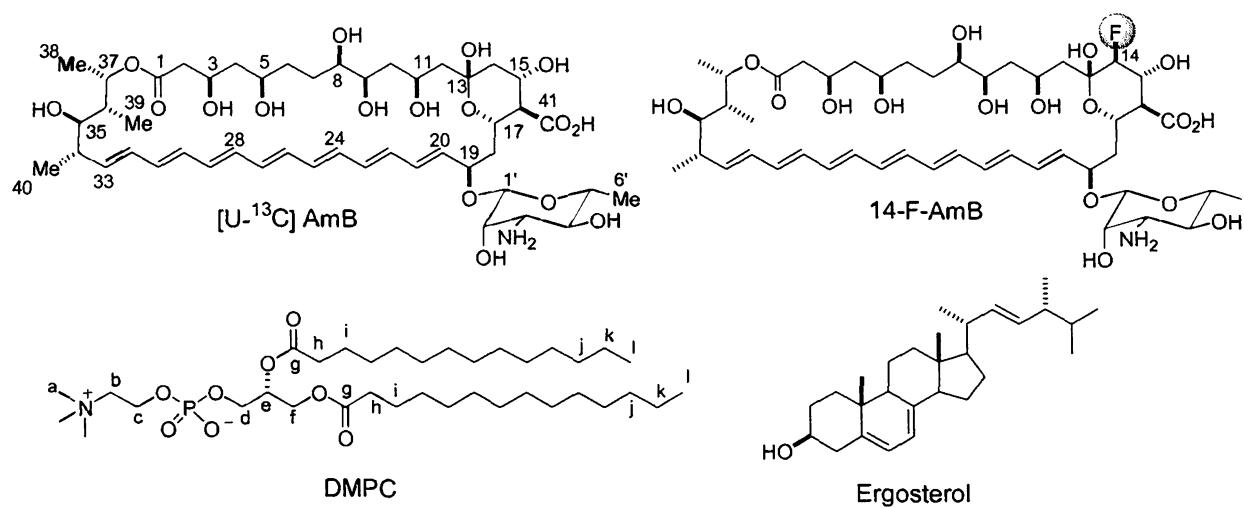


図3-2

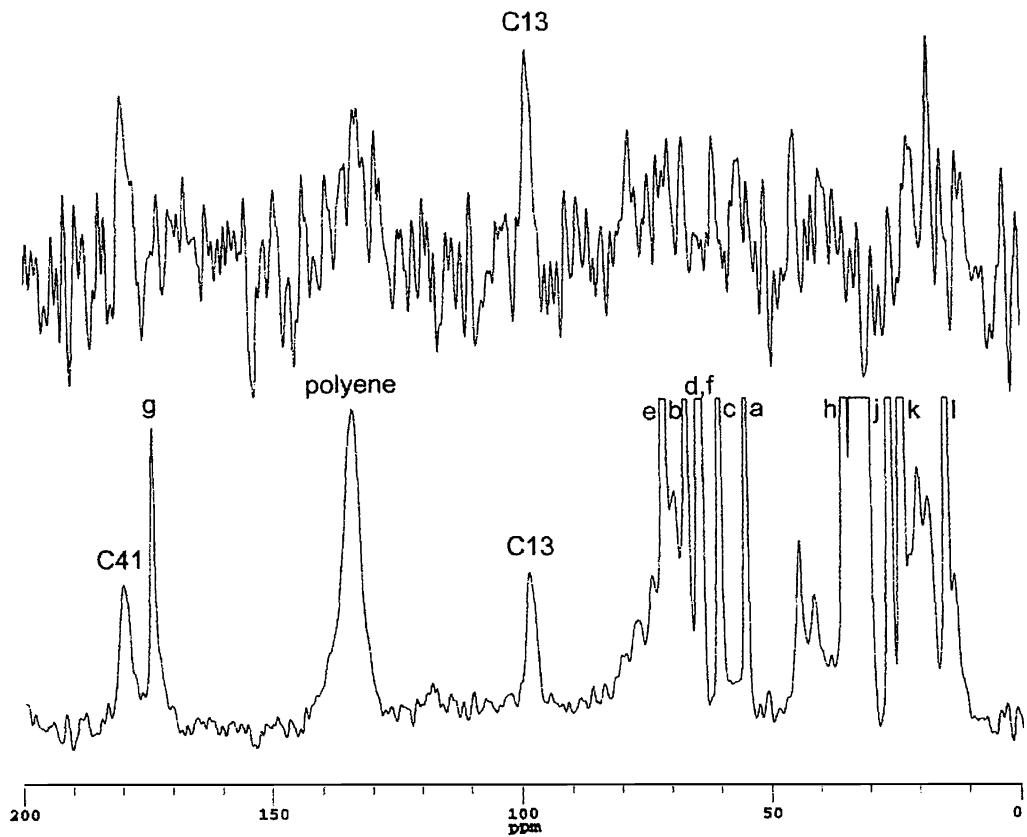


図 3-3 RDX スペクトル (上 : 差スペクトル ΔS 、下 : 非照射スペクトル S_0)

14F-AmB / [^{13}C] AmB / Ergosterol / DMPC = 0.5 / 0.5 / 1 / 9

50% wt. in HEPES / D_2O , pH 7.0

展開時間 : 24 ms, MAS : 5 kHz, 温度 : 30°C, 積算 : 71440

図中のアルファベットは DMPC 由来

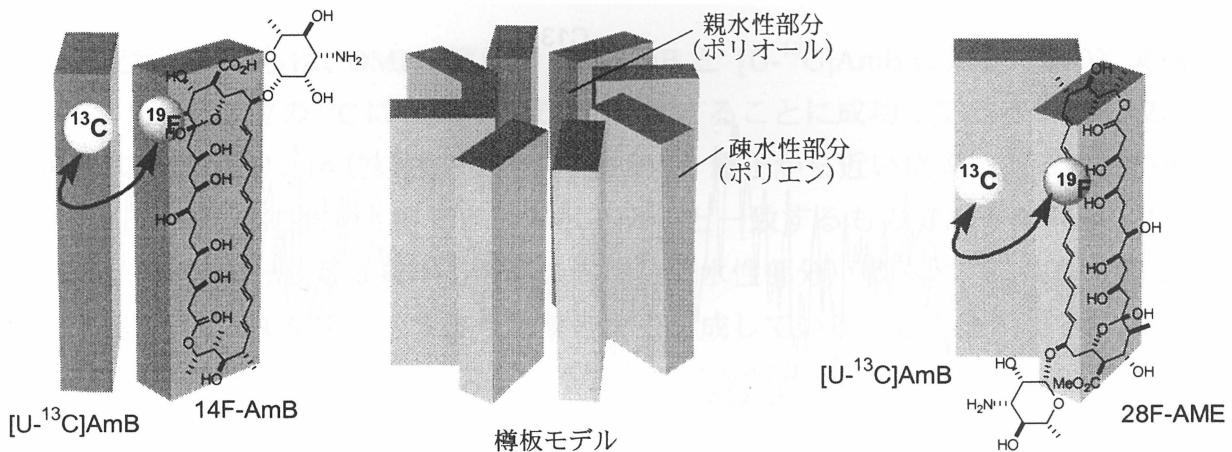


図3-4

3-2 測定

3-2-a 28F-AME、[U-¹³C] AmB、およびErgosterol を用いた RDX 測定

リン脂質としては、AmB の分子長とほぼ同じ疎水性領域を持つ DMPC を用い、エルゴステロール存在下、28F-AME と 50% 標識率の[U-¹³C] AmB を用いた(図 3-5)。28F-AME / [U-¹³C] AmB / Ergosterol / DMPC が 0.5 / 0.5 / 1 / 9 となるようにサンプルを調製し、RDX 測定を行った(図 3-6)。下側のスペクトルはフッ素核にパルスを照射していないスペクトルで、通常の CP-MAS スペクトルに相当する。上側のスペクトルは REDOR の差スペクトルになっており、REDOR 減衰が起こったところにシグナルが現れる。図 3-6 より、AmB のヘプタエン部分に有意なシグナルの減衰が観測された。この減衰の割合を算出したところ、 $\Delta S / S_0$ は 16% となり、これは F-AME の分子内に存在する天然存在比の ¹³C からの寄与 (2%) よりもはるかに大きい。したがって観測された減衰は AmB 分子間の相互作用によるものであり、隣接する AmB のヘプタエン部分が 28 位のフッ素原子から近い位置にあることが示唆された。これらの結果より、AmB はヘプタエン同士を近接させて複合体を形成していると考えられる。

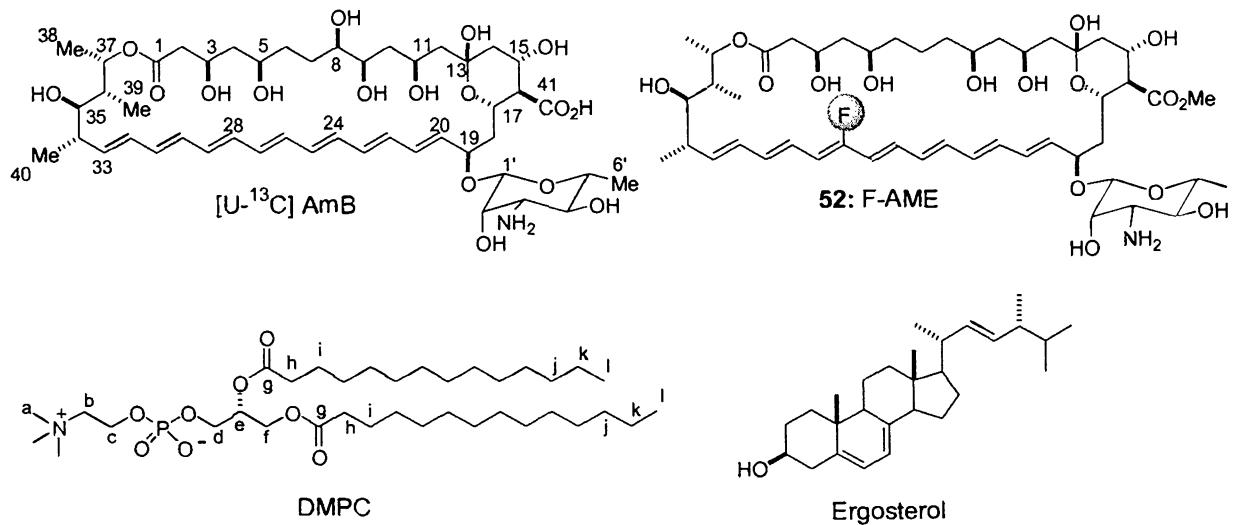


図 3-5

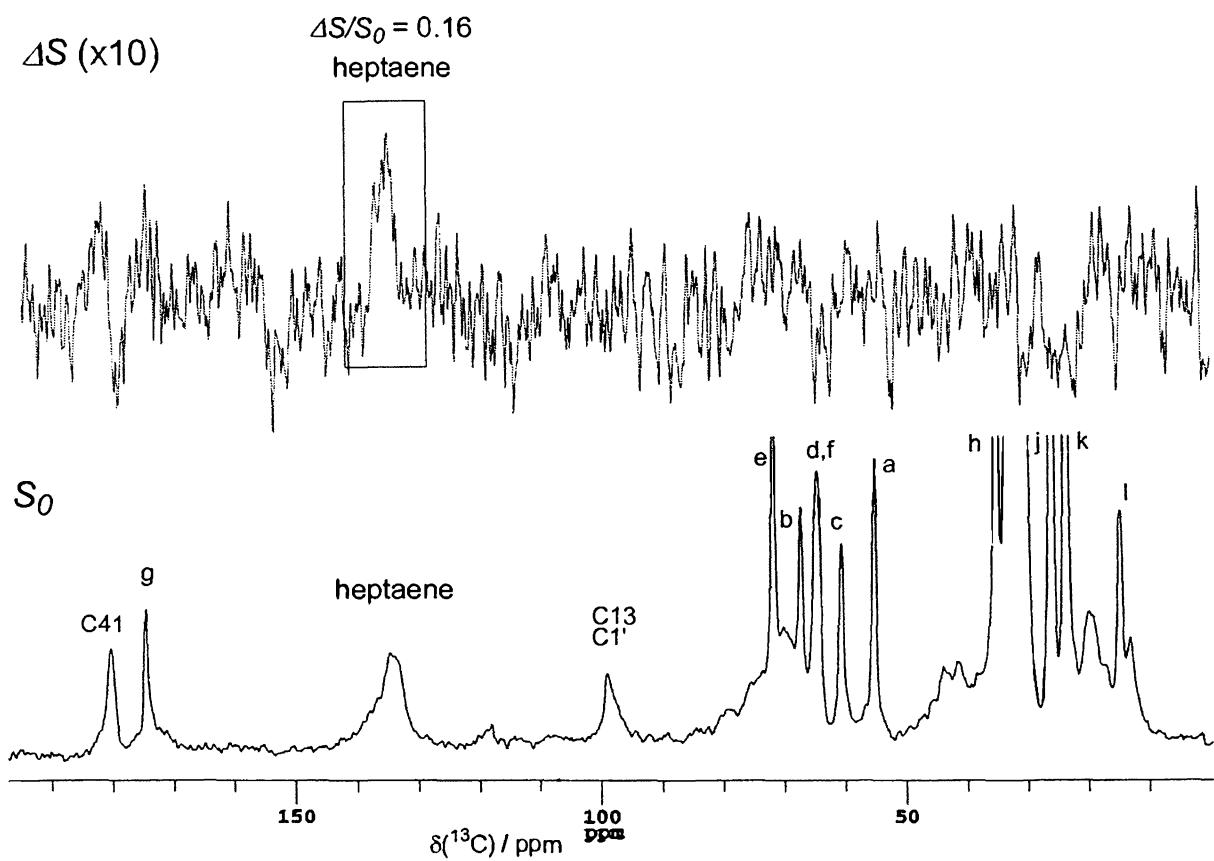


図 3-6 RDX スペクトル（上：差スペクトル ΔS 、下：非照射スペクトル S_0 ）

F-AME / [U-¹³C] AmB / Ergosterol / DMPC = 0.5 / 0.5 / 1 / 9

50% wt. in HEPES / D₂O, pH 7.0

展開時間 : 16 ms, MAS : 5 kHz, 温度 : 30°C, 積算 : 60960

図中のアルファベットは DMPC 由来

3-2-b F-AME、[U-¹³C] AME を用いた測定

次にエルゴステロール非存在下、28F-AME と[U-¹³C] AME を用い、28F-AME/[U-¹³C] AME / DMPC が 0.5 / 0.5 / 10 となるようにサンプルを調製し、RDX 測定を行った（図 3-7、3-8）。その結果、試料量や積算回数が少ないためにやや S/N が悪くなっているが、この条件の場合でも AmB のヘプタエン部分に有意なシグナル減衰が観測された。また、この減衰の割合を算出したところ、 $\Delta S/S_0$ は 16% であり、エルゴステロール存在下の場合と同程度であった。

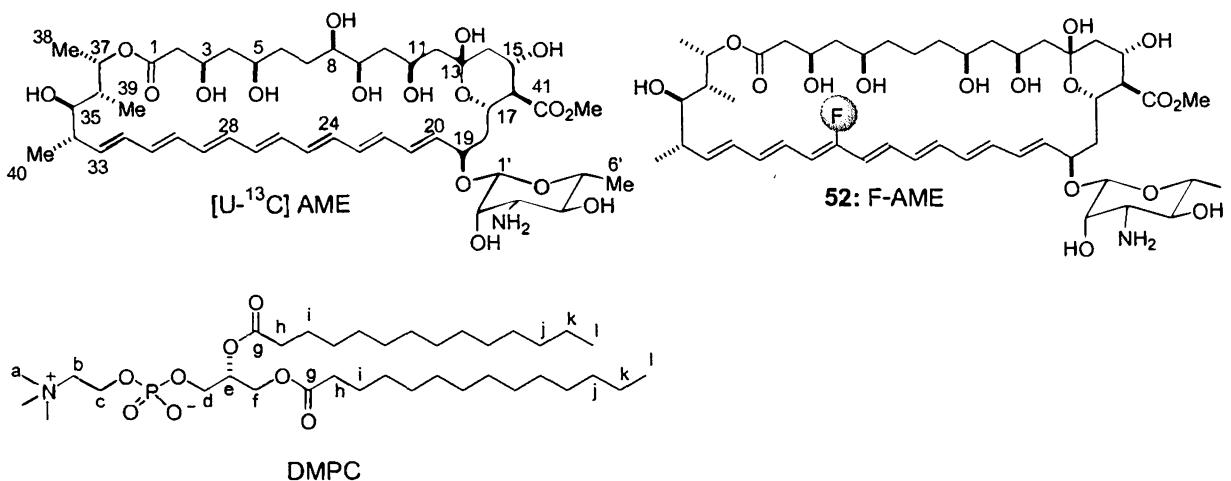


図 3-7

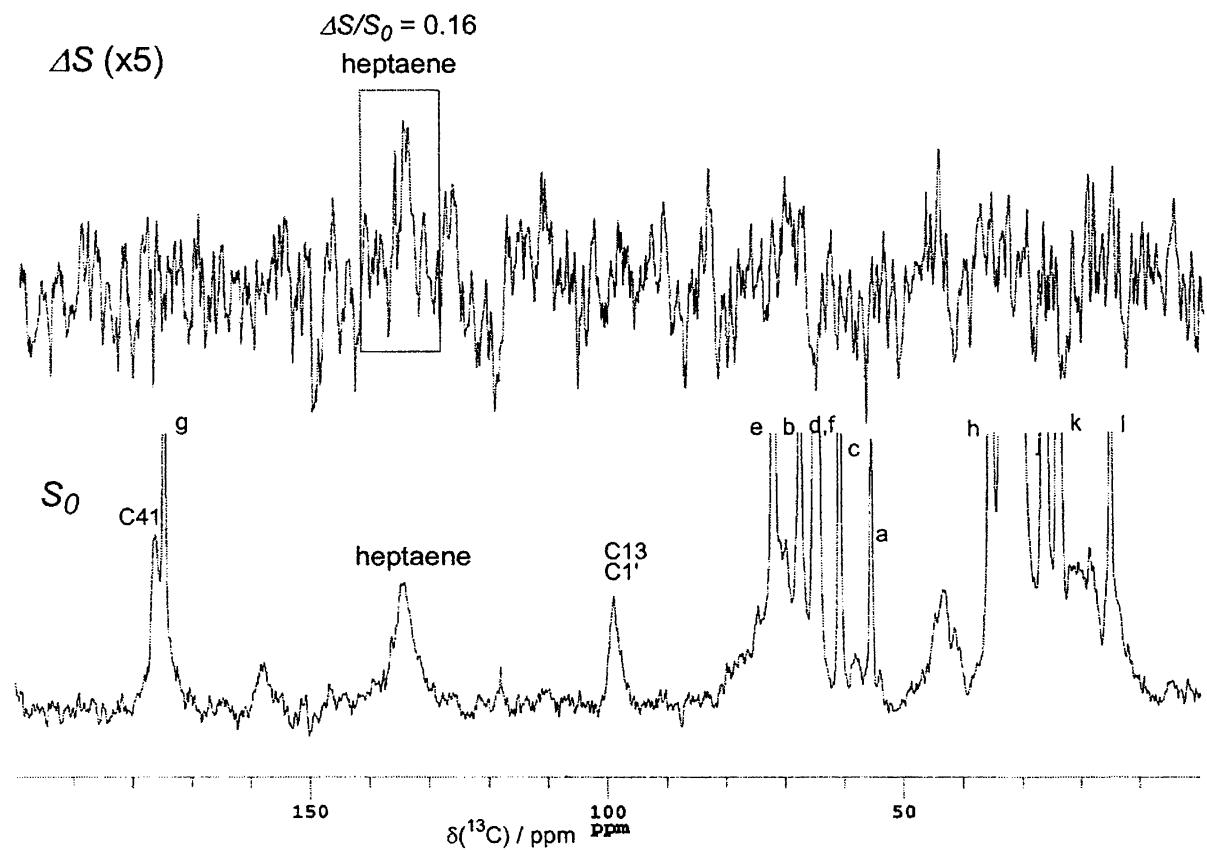


図 3-8 RDX スペクトル（上：差スペクトル ΔS 、下：非照射スペクトル S_0 ）

F-AME / [U- ^{13}C] AME / DMPC = 0.5 / 0.5 / 10

50% wt. in HEPES / D₂O, pH 7.0

展開時間 : 16 ms, MAS : 5 kHz, 温度 : 30°C, 積算 : 32752

図中のアルファベットは DMPC 由来

3-3 結果の考察

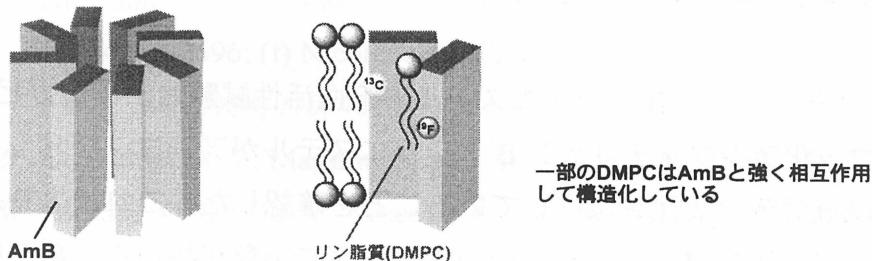
以上の測定結果から、AmB 複合体中において AmB のヘプタエン部分に分子間相互作用を確認することができた。これは、AmB のヘプタエン同士が近い位置に存在していることを示唆しており、当研究室において行われた 14F-AmB を用いた実験とあわせて、図 3-4 に示したモデル構造と矛盾が無いと考えられる。また、今回の実験条件では、標識 AmB が非連結体であるため、観測したいチャネル複合体が不安定であることや、¹³C-標識体と ¹⁹F-標識体が必ずしも隣り合わないという問題が考えられた。加えて、フッ素の導入位置についても、推定構造ではヘプタエン部分は外側に位置するため、もともと分子同士の距離が遠く、減衰自体が観測されない可能性もあった。したがって、今回、このように測定が困難な条件においても、ヘプタエン部分にシグナル減衰が観測されたことから、28F-AME が固体 NMR 測定の分子プローブとして有用であることが証明された。今後、同様の方法で位置特異的 ¹³C 標識化 AmB を調製し、これら標識体を用いて REDOR 測定を行うことで、AmB 分子間のより正確な距離情報が取得可能であると考えられ、最終的に AmB のチャネル複合体構造の解明につながるものと期待している。

また、今回の RDX 実験により、AmB のヘプタエン部分同士の分子間相互作用が観測されたが、その減衰の割合はエルゴステロールの有無に関わらず、ほぼ同程度であった。これは、エルゴステロールの存在する場合としない場合において、AmB 分子同士の相互作用（距離）が変わらなかつたことを意味している。この結果はエルゴステロールが複合体に直接関与していないという可能性を示唆するようにも思われるが、現在のところ次のように解釈している。

AmB はステロール非含有膜においてもチャネルを形成することが知られている³⁰⁻³²⁾。また、DMPC のような飽和リン脂質は AmB との相互作用が大きいために³³⁾、AmB が形成する分子複合体には構造化したリン脂質が含まれると考えられ、このことは、当研究室の AmB と DMPC を用いた REDOR 実験からも示唆されている^{27a)}。これらのこと考慮すると、まず、エルゴステロール非含有 DMPC 膜中では、AmB は一部の DMPC と強く相互作用し、チャネル複合体を形成していると推測される（図 3-9）。一方、エルゴステロール含有 DMPC 膜中では、AmB はエルゴステロールと強く相互作用するため、AmB-エルゴステロール複合体を形成すると考えられる（しかし、DMPC の AmB に対する親和性も大きいために、依然として AmB-DMPC 複合体も混在している可能性もある）。AmB の間に存在するものが DMPC、エルゴ

ステロールのいずれにしても、AmB 同士の距離に RDX 測定で観測できるほどの違いは見られないと考えられ、その結果、今回エルゴステロールの有無により、REDOR 減衰に顕著な差が見られなかつたのではないかと考えている。今後、エルゴステロールによる AmB の構造の変化を観測するためには、DMPC よりも AmB との親和性が小さい脂質を用いて REDOR 実験を行う必要があると考えている。

エルゴステロール非含有DMPC 膜



エルゴステロール含有DMPC 膜

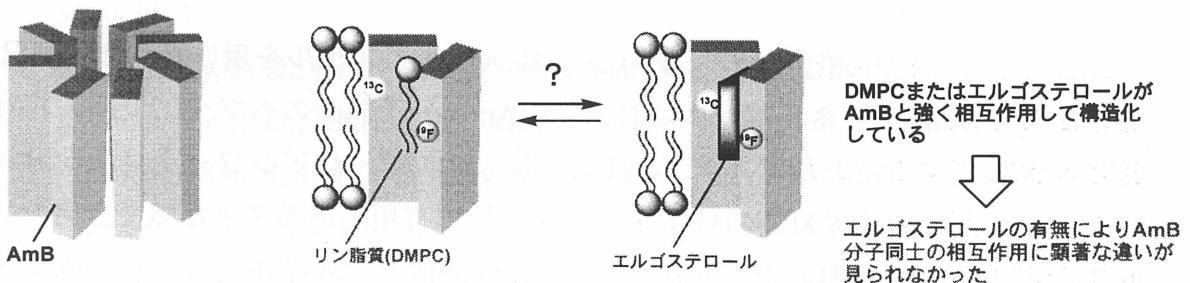


図 3-9 AmB チャネル複合体の模式図

第四章 結論

天然のアンフォテリシンBを分解して調製したC1-C21セグメントと、化学合成したフッ素標識化C22-C37セグメントをStilleカップリングにより連結し、さらにマクロラクトン化を行うことで、28位にフッ素原子が導入されたアンフォテリシンBの合成に成功した。このように、天然物からの分解と化学合成を組み合わせた新しい分子プローブ合成法は、全合成よりも効率的であり、天然物の誘導化のみでは得られない化合物を調製することに適しているため、今後、この方法論を用いて、多くの誘導体を調製することが期待される。

28位フッ化アンフォテリシンBメチルエステルの溶血活性試験および抗カビ活性試験より、28位フッ化アンフォテリシンBメチルエステルがアンフォテリシンBメチルエステルとほぼ同等の活性を保持していることを確認した。これにより、ヘプタエン部分にフッ素原子を導入しても、その生物活性に影響が無いことが証明された。

調製した28位フッ化アンフォテリシンBメチルエステルを用いた固体NMR測定により、AmBチャネル複合体において、AmB分子同士のヘプタエン間の相互作用を直接観測することができた。これにより、28位フッ化アンフォテリシンBメチルエステルが、固体NMRの分子プローブとして有用であることが確認できた。今後、同様の手法で調製可能な位置特異的¹³C標識体との連結体を調製し、固体NMR測定を行うことで、AmB分子同士の正確な距離を測定できると考えられ、最終的にAmBチャネル複合体構造の解明につながることが期待される。

参考文献

- 1) Total synthesis of AmB, see: (a) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Chakraborty, T. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2208-2210; (b) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Chakraborty, T. K.; Ogawa, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2821-2822; (c) Nicolaou, K. C.; Chakraborty, T. K.; Ogawa, Y.; Daines, R. A.; Simpkins, N. S.; Furst, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4660-4672; (d) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Uenishi, J.; Li, W. S.; Papahatjis, D. P.; Chakraborty, T. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4672-4685; (e) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Chakraborty, T. K.; Ogawa, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4685-4696; (f) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Ogawa, Y.; Chakraborty, T. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4696-4705.
- 2) Duplantier, A. J.; Masamune, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7079-7081.
- 3) Packard, G. K.; Hu, Y.; Vescovi, A.; Rychnovsky, S. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2822-2826.
- 4) Poss, C. S.; Rychnovsky, S. D.; Schreiber, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3360-3361.
- 5) Rychnovsky, S. D.; Hoye, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1753-1765.
- 6) Rychnovsky, S. D.; Khire, U. R.; Yang, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2058-2059.
- 7) (a) Richardson, T. I.; Rychnovsky, S. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12360-12361. (b) Richardson, T. I.; Rychnovsky, S. D. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 8977-8996.
- 8) (a) Sinz, C. J.; Rychnovsky, S. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3224-3227. (b) Sinz, C. J.; Rychnovsky, S. D. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 6561-6576.
- 9) (a) Mori, Y.; Asai, M.; Okumura, A.; Furukawa, H. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 5299-5314. (b) Mori, Y.; Asai, M.; Kawada, J.; Furukawa, H. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 5315-5330.
- 10) Evans, D. A.; Connell, B. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10899-10905.
- 11) Burova, S. A.; McDonald, F. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2495-2500.
- 12) Denmark, S. E.; Fujimori, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8971-8973.
- 13) (a) Stille, J. K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, *25*, 508-524; (b) Nicolaou, K. C.; Bulger, P. G.; Sarlah, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4442-4489.
- 14) Parenty, A.; Moreau, X.; Campagne, J.-M. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 911-939.
- 15) Rogers, B. N.; Selsted, M. E.; Rychnovsky, S. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 3177-3182.

- 16) Takai, K.; Nitta, K.; Utimoto, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7408-7410.
- 17) Tholander, J. Carreira, E. M. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 613-622.
- 18) Nahm, S.; Weinreb, S. M. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3815-3818.
- 19) (a) Colvin, E. W.; Hamill, B. J. *Chem. Commun.* **1973**, 151-152; (b) Miwa, K.; Aoyama, T.; Shioiri, T. *Synlett* **1994**, 107-108.
- 20) Zhang, H. X.; Guibé, F.; Balavoine, G. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1857-1867.
- 21) Paquette, L. A.; Pissarnitski, D.; Barriault, L. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7389-7398.
- 22) Shinada, T.; Sekiya, N.; Bojkova, N.; Yoshihara, K. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 3675-3686.
- 23) Dess, D. B.; Martin, J. C. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155-4156.
- 24) Ushakov, E. N.; Lednev, I. K.; Alfimov, M. V. *Doklady Akademii Nauk SSSR* **1990**, *313*, 903-907.
- 25) Shiina, I.; Kubota, M.; Ibuka, R. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7535-7539.
- 26) Chéron, M.; Cybulska, B.; Mazerski, J.; Grzybowska, J.; Czerwiński, A.; Borowski, E. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 827-836.
- 27) (a) Matsuoka, S.; Ikeuchi, H.; Matsumori, N. and Murata, M. *Biochemistry*, **2005**, *44*, 704-710. (b) Matsuoka, S.; Ikeuchi, H.; Umegawa, Y.; Matsumori, N.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6608-6614. (c) Matsumori, N.; Sawada, Y.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *28*, 11977-11984.
- 28) Metha, A. K.; Schaefer, J. *J. Magn. Reson.* **2003**, *163*, 188-191.
- 29) 梅川 雄一 大阪大学理学研究科化学専攻 平成 17 年度修士論文
- 30) Cohen, B. E. *Int. J. Pharm.* **1998**, *162*, 95-106.
- 31) Ruckwardt, T.; Scott, A.; Scott, J.; Mikulecky, P; Hartsel, S. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1372*, 283-288.
- 32) Cotero, B. V.; Rebolledo-Antunez, S.; Ortega-Blake, I. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1375*, 43-51.
- 33) Miñones, J. Jr.; Conde, O.; Miñones, J.; Rodriguez-Patino, J. M.; Seoane, R. *Langmuir* **2002**, *18*, 8601-8608.

実験の部

5-1 F-AmB の合成

一般的的事項

試薬および溶媒

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

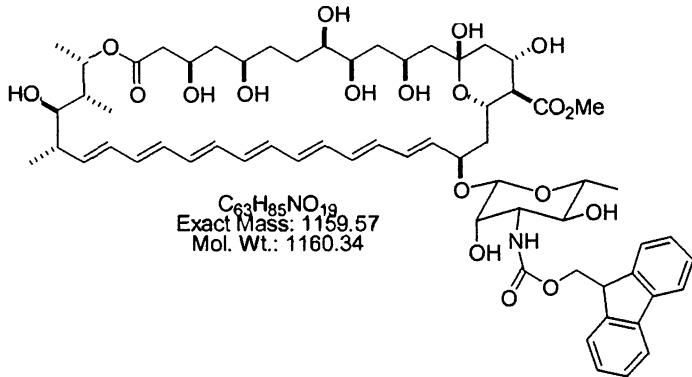
クロマトグラフィー

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

機器分析法

NMR スペクトルは、JEOL 社製 GSX-500 (^1H NMR: 500 MHz, $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$ NMR: 125.7 Hz)を用いて測定した。NMR 測定溶媒として CDCl_3 または $\text{DMSO}-d_6$ を用いた。質量分析には、サーモクエスト社製 LCQ DECA を用いた。赤外吸収スペクトルは、JASCO 社製の FT/IR-300E を用い、測定法は、液膜法、もしくは KBr 法により測定した。HPLC は、島津製作所製の SCL-10Avp, SPD-M10Avp, LC-10Avp, DGS-12A からなる装置を使用し、カラムは、ナカライトスク製の COSMOSIL 5C₁₈-MS-□を使用した。可視紫外分光光度計は島津製作所製の UV-2500PC を使用した。ボルテクスミキサーは scientific industries VOLTEX-2GENIE を用い、超音波洗浄器はヤマト社製 BRANSON 1510 を使用した。

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



N-Fmoc-AmB methyl ester 26

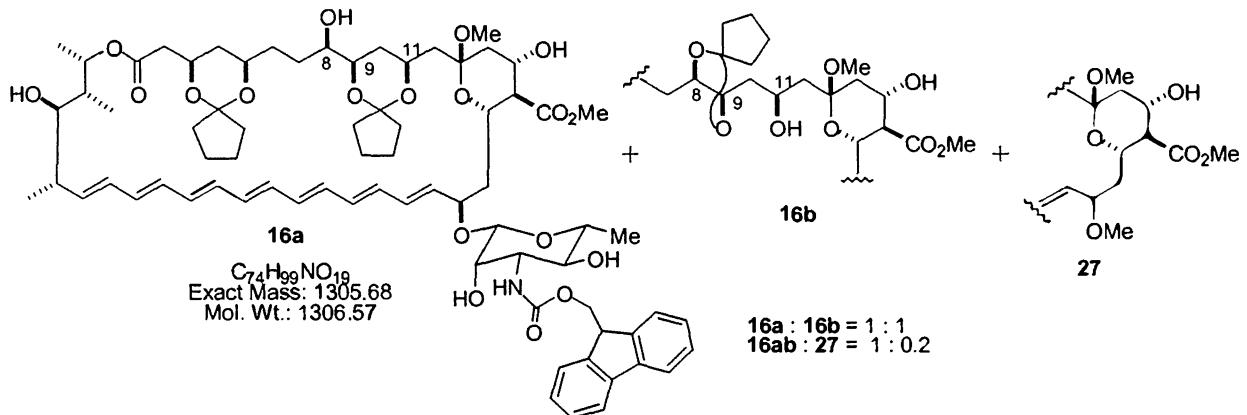
Note No.: VIII-47

AmB (5.25 g, 5.68 mmol) と FmocOSu (2.49 g, 7.39 mmol) を DMF (90 ml) に溶解し、ピリジン(2.0 ml, 6.0 mmol) を加え、室温で 17.5 時間攪拌した。反応溶液をエーテル (1 l) に加えて沈殿させ、エーテル (500 ml) で洗浄した。G3 ガラスフィルターを用いて沈殿をろ過し、エーテル (500 ml) で洗浄した。ガラスフィルター上の固体をできるだけ分取し、残りはクロロホルム／メタノールの 2:1 溶液 (450 ml) で溶かして溶出させた。このろ液をさきに分取したものと合わせて濃縮し、得られた Crude の Fmoc-AmB はトルエン共沸により乾燥させた後、そのまま次の反応に用了。Fmoc-AmB を DMF (50 ml) に溶かして 0 度に冷却後、炭酸ナトリウム (783 mg, 7.39 mmol) とヨウ化メチル (0.71 ml, 11.36 mmol) を加え、室温にあげて 5 時間攪拌した。反応溶液をエーテル (1 l) に加えて沈殿させ、エーテル (300 ml) で洗浄した。G3 ガラスフィルターを用いて沈殿をろ過し、エーテル (300 ml) で洗浄した。ガラスフィルター上の固体をできるだけ分取し、残りはクロロホルム／メタノールの 2:1 溶液 (300 ml) で溶かして溶出させた。このろ液をさきに分取したものと合わせて溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:10-1:8 メタノール/クロロホルム) で精製し、N-Fmoc-AmB methyl ester 26 (5.33 g, 81% for 2 steps) を黄色固体として得た。

Yellow solid

$R_f = 0.63$ (silica, $CHCl_3/MeOH=5/1$)

MS (ESI) m/z calcd for $C_{63}H_{85}NO_{19} (M+Na^+)$ 1182, found 1182



シクロペンチリデンケタール体 **16ab** (ca. 1:1 ratio of isomers, **16ab**:**27** = 1: 0.2)

Note No.: VII-135

トルエン共沸により乾燥させた N-Fmoc-AmB methyl ester **26** (400 mg, 0.345 mmol) を蒸留メタノール (4.5 ml) と 2,2-ジメトキシシクロペンタン (1.5 ml) に溶かし、 CSA (17 mg, 0.069 mmol) を加え、室温で 35 分間攪拌した。反応溶液を 0 度に冷却して飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:50-1:30 メタノール/クロロホルム) で精製し、シクロペンチリデンケタール体 **16ab** を糖脱離体 **27** との混合物として得た (MS より、収率は約 80%)。

Yellow solid

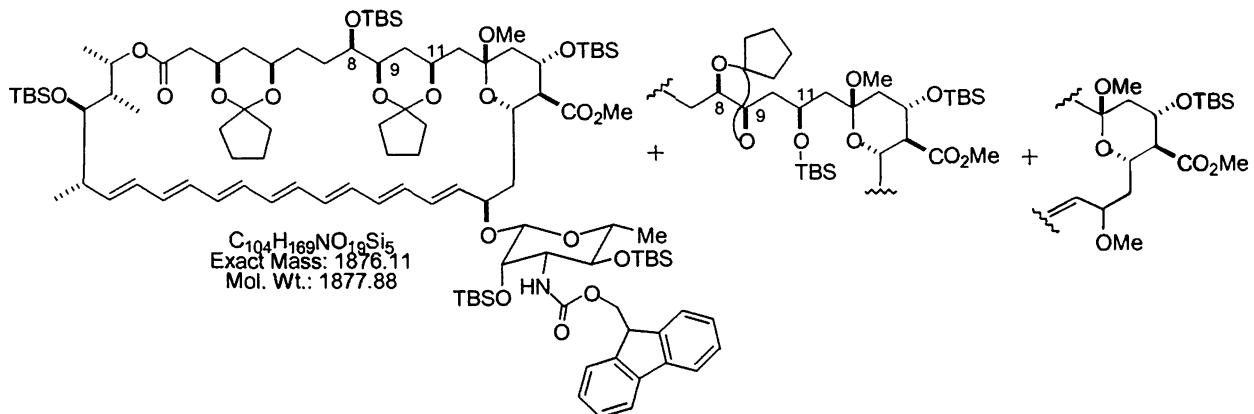
R_f = 0.55 (silica, CHCl₃/MeOH=10/1 x2)

¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 7.75(2H, d, *J*=7.5 Hz, Fmoc), 7.58(2H, m, Fmoc), 7.39(2H, t, *J*=7.5Hz, Fmoc), 7.31 (2H, t, *J*=7.5Hz, Fmoc), 6.18-6.25(12H, m, H21-H32), 5.83(1H, td, *J*=15.0Hz, 6.0Hz, H20), 5.65(1H, d, *J*=8.0Hz, H1’), 5.42(1H, ddd, *J*=8.0Hz, 5.5Hz, 15.5Hz, H33), 5.21(1H, m, H37), 4.57(1H, m, H19), 4.52(1H, m, NH), 4.42(2H, t, *J*=7.5Hz, Fmoc), 4.42(1H, m, H15), 4.21(1H, t, *J*=7.0Hz, Fmoc), 4.06(1H, m, H3), 3.91-4.00(2H, m, H11, H17), 3.87(1H, m), 3.73(3H, s, COOMe), 3.66(1H, m, H2’), 3.52-3.59(2H, m, H5, H9), 3.40(1H, m, H8), 3.33(1H, m, H35), 3.08(1.5H, s, MeO) 3.00(1.4H, s, MeO), 2.60(1H, m), 2.47(1H, m, H2a), 2.39(1H, m, H34), 2.29(1H, m, H16), 2.14(1H, m, H2b), 1.32(2H, m, H18), 1.46(1H, m, H14), 1.31(3H, dd, *J*=6.0Hz, 3.0Hz, H6’), 1.18(3H,d, *J*=6.5Hz, 38Me), 1.10(3H, d, *J*=6.0Hz, 40Me), 1.05(1H, m, H4), 0.99(3H, d, *J*=7.5Hz, 39Me).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 173.09, 169.65, 169.53, 158.03, 143.69, 141.31, 135.77,

134.29, 134.01, 133.30, 133.13, 132.95, 132.80, 132.48, 132.31, 131.91, 131.84, 130.32, 130.13, 127.76, 127.09, 125.04, 125.00, 120.01, 118.42, 110.42, 110.27, 100.95, 100.10, 97.29, 80.98, 79.92, 78.40, 78.24, 77.65, 77.52, 75.11, 74.14, 73.51, 73.14, 70.16, 69.97, 69.70, 69.34, 67.34, 66.87, 66.69, 66.57, 66.15, 56.52, 55.66, 52.17, 48.31, 48.19, 47.14, 42.45, 42.19, 41.57, 41.31, 41.19, 40.74, 40.18, 40.11, 40.05, 37.58, 37.50, 36.93, 32.88, 32.68, 32.53, 31.35, 31.19, 31.14, 29.67, 27.84, 27.72, 18.31, 17.57, 17.19, 17.12, 11.43, 11.36.

MS (ESI) m/z calcd for C₇₄H₉₉NO₁₉ (M+Na⁺) 1328, found 1328



5-TBS 体

Note No.: VIII-59 (ca. 1:1 ratio of isomers, **16ab**: **27** = 1: 0.1)

トルエン共沸により乾燥させたシクロペンチリデンケタール体 **16ab** (4.45 g, 3.41 mmol) をジクロロメタン(50 ml)に溶かし、2,6-ルチジン (4.76 ml, 40.9 mmol) と TBSOTf (6.79 ml, 29.0 mmol)を加え、0 度で 1 時間攪拌した。エーテルで希釈後、メタノール (10 ml) と飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、エーテルで抽出した。有機層を 0.25M の塩酸 (100 ml x3)、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (0:1-1:5 酢酸エチル/ヘキサン) で精製し、TBS 体を糖脱離体 **27** との混合物として得た (4.93 g, MS より、収率は約 77%)。

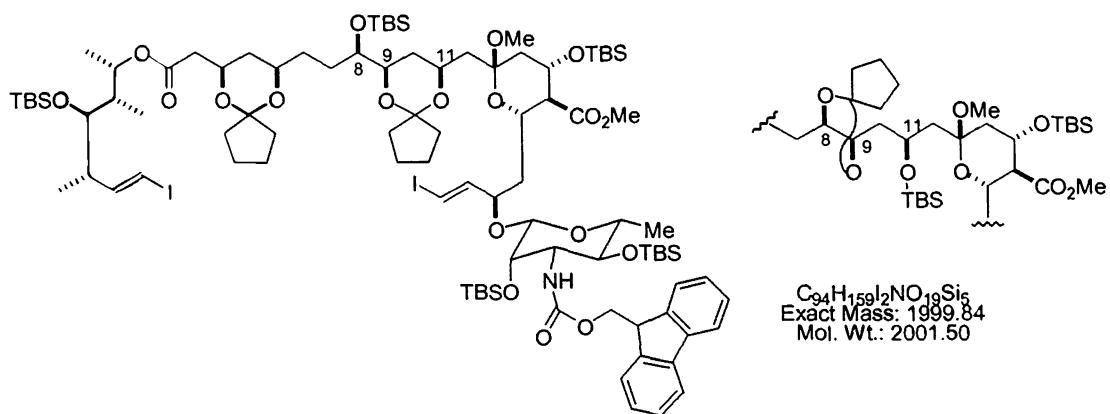
Yellow amorphous solid

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

^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 7.74 (2H, d, $J=7.5$ Hz, Fmoc), 7.57 (2H, m, Fmoc), 7.37 (2H, t, $J=7.5$ Hz, Fmoc), 7.27 (2H, t, $J=7.5$ Hz, Fmoc), 6.06-6.23 (10H, m, H22-31), 5.99 (1H, dd, $J=15.0$, 10.0Hz, 32H) 5.47-5.84 (2H, m, H20,H21) 5.53(1H, dd, $J=15.0$ Hz, 10Hz, 33H), 4.84-4.88(2H, m, NH, H38), 4.58(1H, m, H15), 4.44(1H, m, Fmoc), 4.34(1H, m, Fmoc), 4.16(1H, t, $J=6.5$ Hz, Fmoc), 4.03(1H, m, H3), 3.82-3.83(2H, m, H35, 2') 3.67(3H, s, COOMe), 3.45-3.65(4H, m, H5, 8, 9, 3'), 3.32(1H, m, H4'), 3.25(1H, m, H5'), 3.09(1H, s, COOMe), 2.97(2H, s, COOMe), 2.56(1H, dd, $J=10.5$ Hz, 9.0Hz, H16) 2.41(1H, d, $J=8.0$ Hz, H2) 2.33(1H, m, H34), 2.06(1H, m, H18), 1.18-1.24(16H, m, pentylidene), 0.97(3H, d, $J=7.0$ Hz, Me38) 0.80-0.90(m, TBS, Me39), -1.22-0.98(30H, m, TBS).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 173.09, 170.01, 170.00, 155.61, 143.91, 141.38, 135.75, 133.78, 133.75, 133.41, 133.28, 133.26, 132.98, 132.70, 132.68, 132.47, 131.97, 131.72, 127.64, 127.31, 126.98, 125.38, 124.94, 119.91, 119.75, 110.24, 100.62, 100.00, 98.13, 74.20, 74.06, 72.41, 66.78, 66.70, 66.26, 65.97, 57.27, 51.76, 47.19, 43.35, 42.76, 40.95, 40.49, 40.25, 40.11, 37.75, 37.70, 37.54, 36.61, 32.86, 32.74, 31.92, 31.57, 31.29, 31.10, 30.32, 29.70, 29.36, 27.51, 27.08, 26.08, 26.01, 25.74, 25.69, 25.56, 24.85, 24.32, 24.21, 23.67, 23.57, 22.84, 22.39, 22.33, 18.84, 18.39, 18.25, 18.12, 17.99, 17.77, 14.10, -2.72, -2.96, -3.50, -3.82, -4.01, -4.25, -4.35, -4.57, -5.14, -5.34.

MS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{104}\text{H}_{169}\text{NO}_{19}\text{Si}_5$ ($\text{M}+\text{Na}^+$) 1899, found 1899



Diiodoolefin product (ca. 1:1 ratio of isomers)

Note No.: VII-141, VII-187

5-TBS 体 (268 mg, 0.143 mmol) をジクロロメタン (4.5 ml) とメタノール (0.3 ml) に溶かし、-78 度でオゾンを 40 分間バブリングした。その後、酸素、アルゴンの順で 10 分づつバブリングし、トリフェニルホスフィン (561 mg, 2.14 mmol) のジクロロメタン溶液 (3 ml) を加えた後、4 時間かけて室温まで昇温し、10 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣をそのままシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:5-1:1 エーテル/ヘキサン) で精製し、ジアルデヒド体 **28ab** (142 mg, 57%) を無色無定形固体として得た。これをトルエン共沸により乾燥させ、すぐに次の反応に用いた。グローブボックス内で、塩化クロム(II) (348 mg, 2.83 mmol) を秤量し、スターラーバー入りの 30ml ナス型フラスコに移した。その後、減圧下 20 分間ヒートガンで乾燥させ、アルゴン雰囲気下室温に戻し、直前にベンゾフェノンケチルで蒸留した THF (3.5 ml) を加えて 0 度に冷却した。この溶液に対し、ヨードホルム (159 mg, 0.41 mmol) とジアルデヒド体 **28ab** (142 mg, 0.081 mmol) の THF (2.2 ml) 溶液を加え、0 度で 20 分、その後室温で 18 時間攪拌した。0°C に冷却して飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止し、エーテルで抽出した。有機層を飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:12-1:5 酢酸エチル/ヘキサン) で精製し、ジヨードオレフィン体 (106 mg, 65%) を無色無定形固体として得た。

Colorless amorphous

R_f = 0.47 (silica, hexane/AcOEt=5/1)

$[\alpha]_D^{27}$ -3.4° (*c* 0.75, CHCl₃)

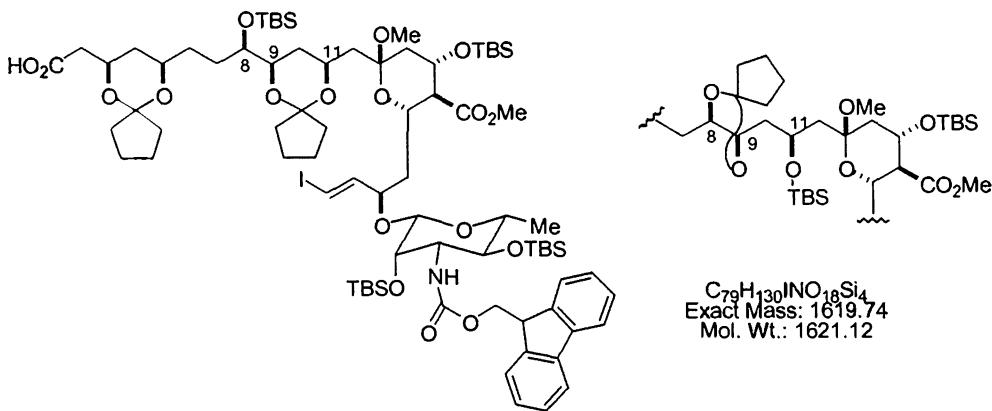
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.73 (2H, d, *J* = 7.5 Hz, Fmoc), 7.55 (2H, m, Fmoc), 7.37 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, Fmoc), 7.26 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, Fmoc), 6.51 (1H, dd, *J* = 14.5, 8.0 Hz, H20), 6.46 (1H, dd, *J* = 14.5, 8.0 Hz, H33), 6.32 (1H, d, *J* = 14.5 Hz, H21), 6.00 (1H, d, *J* = 14.5 Hz, H32), 5.06 (1H, dq, *J* = 6.0 Hz, H37), 4.80 (1H, d, *J* = 10.0 Hz, NH), 4.42 (1H, dd, *J* = 10.0, 6.0 Hz, Fmoc), 4.36 (1H, s, H1’), 4.34 (1H, dd, *J* = 10.0, 6.0 Hz, Fmoc), 4.12-4.27 (4H, m, H3, 15, 19, Fmoc), 4.02 (1H, m, H11), 3.72-3.81 (2H, m, H5, 2’), 3.65 (3H, s, CO₂Me), 3.50-3.70 (4H, m, H8, 9, 17, 3’), 3.48 (1H, t, *J* = 5.0 Hz, H35), 3.30 (0.4H, t, *J* = 9.0 Hz, H4’), 3.17-3.14 (1H, m, H5’), 3.07 (1.5H, s, OMe), 3.03 (1.5H, s, OMe), 2.49 (1H, dd, *J* = 15.0, 7.5 Hz, H2a), 2.39 (1H, m, H-34), 2.33 (1H, dd, *J* = 15.0, 5.5 Hz, H2b), 2.21 (1H, m, H16), 2.03-2.11 (2H,

m, H₁₄_{eq}, 12a), 1.22 (3 H, d, *J* = 6.0 Hz, H_{6'}), 1.12 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H₃₈), 0.97 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H₄₀).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 172.76, 170.02, 155.43, 150.09, 146.05, 143.85, 143.77, 141.26, 127.59, 127.51, 126.91, 124.88, 124.77, 119.90, 119.81, 118.04, 110.40, 100.64, 100.45, 99.19, 80.79, 79.46, 78.76, 75.24, 74.23, 73.94, 72.21, 71.50, 71.43, 70.42, 70.35, 69.70, 69.64, 67.74, 67.46, 67.34, 66.86, 66.69, 66.45, 57.37, 57.19, 51.73, 51.63, 47.97, 47.21, 43.72, 42.85, 42.39, 42.23, 41.78, 41.51, 40.54, 40.33, 38.81, 37.55, 36.78, 32.54, 32.23, 31.68, 31.34, 27.74, 26.11, 25.80, 25.64, 24.88, 24.48, 23.53, 22.88, 22.55, 18.90, 18.82, 18.41, 18.07, 17.81, 16.39, 14.22, 11.30, -3.54, -3.90, -4.14, -4.45, -5.03, -5.20.

IR (film) ν 2952, 2929, 2887, 2856, 1734, 1508, 1473, 1460, 1450, 1437, 1377, 1333, 1254, 1194, 1109, 1080, 1034, 837, 775, 758 cm⁻¹.

MS (ESI) m/z calcd for C₉₄H₁₅₉I₂NO₁₉Si₅ (M+Na⁺) 2023, found 2055 (high mode)



C1-C21 Segment 30ab (ca. 1:0.77 ratio of isomers)

Note No.: VII-195, VIII-75

ジヨードオレフィン体 (698 mg, 0.349 mmol) を THF (12 ml)、水 (6 ml)、メタノール (4 ml) の混合溶媒に溶かし、水酸化リチウム 1 水和物 (293 mg, 6.98 mmol) を加えて室温で 48 時間攪拌した。0°C に冷却して飽和塩化アンモニウム水溶液で反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去し、残渣を精製せずそのまま次の反応に用いた。残渣をトルエン共

沸により脱水した後、DMF (13 ml) に溶かし、ピリジン (0.987 ml, 12.2 mmol) および 9-フルオレニルメチルスクシンイミジルカーボネート (1.18 g, 3.49 mmol) を加えて室温で 12 時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液で反応を停止し、エーテルで抽出した。有機層を 0.25M の塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:100-1:20 メタノール/クロロホルム) で精製し、**30ab** を副生成物 **29** との混合物として得た。これを HPLC 用クロロホルム (10 ml) に溶かし、LC918 を用いたゲルろ過 (JAIGEL-2H, CHCl₃, 4 ml /min, 268 nm, 1.5 ml ずつインジェクト) により精製し、**30ab** (310 mg, 50% for 2 steps) を白色固体として得た。

White solid

*R*_f = 0.45 and 0.50 (silica, CHCl₃/MeOH=20/1, 2 times)

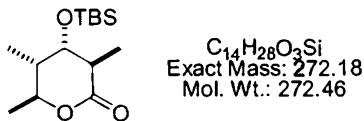
[α]_D²⁷ -3.2° (*c* 0.85, CHCl₃)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.73 (2H, d, *J* = 7.5 Hz, Fmoc), 7.55 (2H, m, Fmoc), 7.37 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, Fmoc), 7.26 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, Fmoc), 6.50 (0.6H, dd, *J* = 14.5, 8.0 Hz, H20), 6.49 (0.4H, dd, *J* = 14.5, 8.0 Hz, H20), 6.32 (1H, d, *J* = 14.5 Hz, H21), 4.81 (1H, d, *J* = 10.0 Hz, NH), 4.44 (0.4H, t, *J* = 6.5 Hz, Fmoc), 4.42 (0.6H, t, *J* = 6.5 Hz, Fmoc), 4.31-4.38 (2H, m, H1', Fmoc), 4.13-4.26 (4H, m, H3, 15, 19, Fmoc), 4.02 (1H, m, H11), 3.73-3.82 (2H, m, H5, 2'), 3.65 (3H, s, CO₂Me), 3.57-3.65 (3H, m, H9, 17, 3'), 3.53 (1H, m, H8), 3.30 (0.4H, t, *J* = 9.0 Hz, H4'), 3.29 (0.6H, t, *J* = 9.0 Hz, H4'), 3.21 (1H, m, H5'), 3.07 (1.8H, s, OMe), 3.03 (1.2H, s, OMe), 2.57 (1H, dd, *J* = 15.5, 7.0 Hz, H2a), 2.47 (1H, m, H2b), 2.15-2.26 (1H, m, H16), 2.10 (1H, dd, *J* = 13.5, 5.0 Hz, H14_{eq}), 2.05 (1H, dd, *J* = 15.0, 3.5 Hz, H12a), 1.23 (1.2 H, d, *J* = 6.5 Hz, H6'), 1.21 (1.8 H, d, *J* = 6.5 Hz, H6').

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 173.52, 173.12, 172.77, 155.63, 155.49, 146.06, 143.75, 141.26, 127.57, 126.91, 124.79, 119.85, 118.10, 110.77, 110.35, 100.64, 100.40, 99.34, 99.21, 80.77, 79.46, 79.23, 79.12, 78.91, 78.82, 74.21, 73.94, 72.39, 72.29, 72.16, 70.42, 69.85, 67.40, 67.33, 66.81, 66.74, 66.46, 66.33, 57.46, 57.18, 51.69, 48.00, 47.88, 47.17, 42.95, 42.43, 41.86, 40.83, 40.55, 40.30, 38.90, 37.50, 36.36, 32.49, 32.06, 31.68, 31.36, 29.75, 27.78, 27.54, 26.07, 25.69, 24.88, 24.41, 23.49, 22.89, 22.48, 18.83, 18.43, 18.31, 18.05, 17.79, -3.66, -3.86, -4.16, -4.50, -5.04, -5.22.

IR (film) ν 2952, 2929, 2892, 2856, 1734, 1508, 1473, 1460, 1450, 1437, 1377, 1333, 1254, 1215, 1196, 1109, 1080, 1034, 837, 777, 758 cm⁻¹.

MS (ESI) m/z calcd for C₇₉H₁₃₀INO₁₈Si₄ (M+Na⁺) 1643, found 1643.



TBS 体

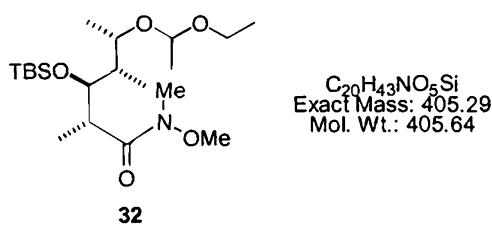
アルコール **31**(1.41 g, 8.93 mmol)をジクロロメタン(45 ml)に溶かし、-40°Cに冷却した。そこに2,6-Lutidine(2.6 ml, 22.3 mmol)とTBSOTf(4.1 ml, 17.9 mmol)を滴下し、40分間攪拌した。その後、イオン交換水を加えて反応を停止し、ジクロロメタンで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1:5 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、TBS 体 (1.96 g, 80%)を白色固体として得た。

White solid

Rf 0.4 (1:4-ethyl acetate/hexane)

1H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4.44 (1H, dq, $J=10.0, 6.0$ Hz, H37), 3.62 (1H, dd, $J=3.0, 2.0$ Hz, H35), 2.62 (1H, qd, $J=8.0, 3.0$ Hz, H34), 1.79 (1H, dqd, $J=9.5, 7.0, 2.0$ Hz, H36), 1.33 (3H, d, $J=6.0$ Hz, H38), 1.25 (3H, d, $J=7.5$ Hz, H40), 0.962 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H39), 0.859 (9H, s, *t*-Bu-Si), 0.029 (6H, s, Me-Si)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 174.21, 74.22, 44.11, 36.05, 25.68, 19.82, 17.94, 16.51, 13.89, -4.53, -4.85.



ワインレブアミド体 **32**

NHMeOMe・HCl (2.84 g, 29.1 mmol)をジクロロメタン(50 ml)に溶かして0°Cに冷却し、1.0M AlMe₃(28.6 ml)を加えて10分間攪拌した。その後TBS 体(1.56 g, 5.72 mmol)のジクロロメタン溶液(30 ml)を滴下し、室温で8時間攪拌した。0°Cに冷却

した後、飽和酒石酸ナトリウムカリウム水溶液を加えて反応を停止し、ジクロロメタンで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去し、残渣を続けて次の反応に用いた。

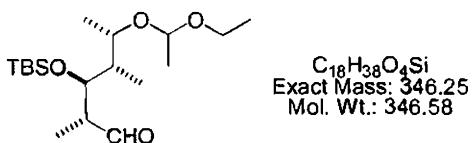
残渣をジクロロメタン(72 ml)に溶かし、そこに Ethylvinylether (11 ml, 114 mmol) と PPTS (718 mg, 2.86 mmol) を加え、室温で 2 時間 30 分攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、ジクロロメタンで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1:10 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、ワインレブアミド体 **32** (2.09 g, 90% for 2 steps) を無色無定形固体として得た。

Colorless amorphous solid

Rf 0.6 (1:1-ethyl acetate/hexane)

¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 4.67 (0.5H, q, *J*=5.0 Hz, EE), 4.64 (0.5H, q, *J*=5.0 Hz, EE), 3.95-3.91 (1H, m, H37), 3.68 (3H, s, N-OMe), 3.15 (3H, s, N-Me), 3.05 (0.5H, dq, *J*=7.0, 5.0 Hz, H34), 1.91 (0.5H, qd, *J*=7.0, 2Hz, H36), 1.74 (0.5H, qd, *J*=7.0, 2.0 Hz, H36), 1.25 (3H, d, *J*=5.0 Hz, EE), 1.15 (1.5H, t, *J*=7.0 Hz, H38), 1.10 (1.5H, t, *J*=7.0 Hz, H38), 1.09 (1.5H, d, *J*=6.0 Hz, H40), 1.03 (1.5H, d, *J*=6Hz, H40), 0.889 (9H, s, *t*-Bu-Si), 0.828 (1.5H, d, *J*=3Hz, H39), 0.813 (1.5H, d, *J*=3Hz, H39), 0.00 (6H, s, Me-Si)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 128.96, 128.15, 99.75, 98.63, 74.07, 71.49, 61.17, 60.05, 60.93, 59.60, 43.12, 42.66, 39.33, 26.12, 21.22, 20.66, 18.38, 15.33, 15.22, -3.78, -4.11.



33

アルデヒド体 **33**

ワインレブアミド体 **32** (1.86 g, 4.59 mmol)を THF (70 ml) に溶かし、-78°Cに冷却した。そこに 1.0 M DIBAL (11.5 ml) を滴下し、50 分間攪拌した。飽和酒石酸ナトリウムカリウム水溶液を加えて反応を停止し、ジエチルエーテルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留

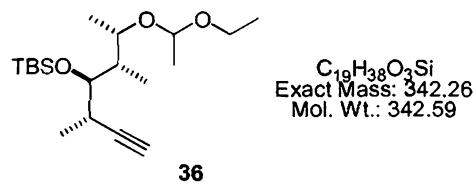
去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1:5 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、アルデヒド体 **33** (1.46 g, 92%) を無色無定形固体として得た。

Colorless amorphous solid

Rf 0.5 (1:5-ethyl acetate/hexane)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.70 (1H, s, CHO), 4.65 (0.5H, q, *J*=5.0 Hz, EE), 4.64 (0.5H, q, *J*=5.0 Hz, EE), 4.24 (0.5H, dd, *J*=5 Hz, 2.5 Hz, C37H), 4.24 (0.5H, dd, *J*=5.0 Hz, 2.5 Hz, H37), 3.86 (0.5H, dd, *J*=7.0, 7.0 Hz, H35), 3.85 (0.5H, dd, *J*=7.0, 7.0 Hz, H35), 3.57 (1H, dq, *J*=7.0, 3.0 Hz, EE), 3.43 (1H, dq, *J*=7.0, 3.0 Hz, EE), 2.53 (0.5H, qd, *J*=7.0, 2.5 Hz, H34), 2.46 (0.5H, qd, *J*=7.0, 2.5 Hz, H34), 1.95 (0.5H, qd, *J*=7.0, 2.0 Hz, H36), 1.88 (0.5H, qd, *J*=7.0, 2.0 Hz, H36), 1.21 (1.5H, d, *J*=5.0 Hz, EE), 1.21 (1.5H, d, *J*=5.0 Hz, EE), 1.12 (1.5H, t, *J*=7.0 Hz, EE), 1.10 (1.5H, t, *J*=7.0 Hz, EE), 1.08 (1.5H, s, H40), 1.07 (1.5H, s, H40), 1.05 (1.5H, d, *J*=6.0 Hz, H38), 1.02 (1.5H, d, *J*=6.0 Hz, H38), 0.889 (9H, s, *t*-Bu-Si), 0.812 (1.5H, d, *J*=7.0 Hz, H39), 0.799 (4.5H, s, *t*-Bu-Si), 0.794 (4.5H, s, *t*-Bu-Si), 0.782 (1.5H, d, *J*=7.0 Hz, H39), 0.040 (6H, s, Me-Si)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 205.46, 205.19, 99.12, 98.09, 72.80, 71.85, 71.39, 61.03, 59.99, 49.89, 49.52, 43.34, 42.42, 25.92, 25.88, 20.85, 20.73, 18.25, 18.21, 16.18, 15.57, 15.29, 10.80, 10.36, 7.55, 7.46, -4.11, -4.26.



アセチレン体 **36**

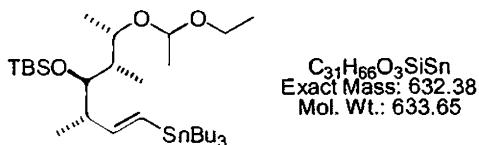
THF (26 ml) を-78°Cに冷却し、そこに 2.0 M TMSCHN₂(2.8 ml, 5.5 mmol) と 1.6 M *n*-BuLi(3.26 ml, 4.9 mmol) を滴下し、20 分間攪拌した。そこにアルデヒド体 **33** (1.13 g, 3.26 mmol) の THF 溶液 (13 ml) を加え、40 分間攪拌した。その後 0°Cにして 1.5 時間攪拌後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止し、ジエチルエーテルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1:20 酢

酸エチル/ヘキサン)で精製し、アセチレン **36** (0.893 g, 80 %) を無色無定形固体 NMR 得た。

Colorless amorphous solid

Rf 0.5 (1:9-ethyl acetate/hexane)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4.72 (0.5H, q, *J* = 5.0 Hz, EE), 4.69 (0.5H, q, *J* = 5.0 Hz, EE), 4.09-4.03 (1H, m, H37), 3.68-3.58 (2H, m, H35, EE), 3.47-3.43 (1H, m, EE) δ 2.68-2.64 (1H, m, H34), 2.04 (0.5H, d, *J* = 8.0 Hz, H32), 2.03 (0.5H, d, *J* = 8.0 Hz, H32), 1.95 (0.5H, qd, *J* = 6.0, 2.0 Hz, H36), 1.88 (0.5H, qd, *J* = 6.0, 2.0 Hz, H36), 1.20 (1.5H, d, *J* = 5.0 Hz, EE), 1.20 (1.5H, d, *J* = 5.0 Hz, EE), 1.10 (1.5H, t, *J* = 7.0 Hz, EE), 1.07 (1.5H, t, *J* = 7.0 Hz, EE), 1.03 (1.5H, d, *J* = 6.0 Hz, H38), 0.949 (1.5H, d, *J* = 6.0 Hz, H38), 0.857-0.738 (15H, m, H40, H39, *t*-Bu-Si), 0.105 (3H, s, Me-Si), 0.076 (3H, s, Me-Si)
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 99.36, 98.24, 88.23, 88.14, 76.50, 76.43, 73.57, 71.56, 70.00, 69.83, 60.78, 59.98, 42.61, 42.51, 29.64, 26.14, 21.06, 20.86, 18.40, 18.37, 17.05, 16.41, 15.85, 15.66, 15.35, 15.29, 10.67, 10.56, -3.77, -4.19.



ビニルスズ体

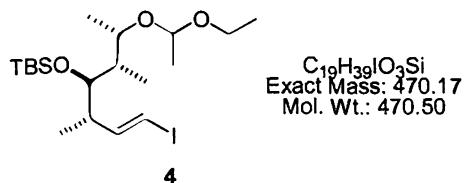
アセチレン **36** (1.06 g, 3.09 mmol) を THF (52 ml) に溶かし、0°Cに冷却した。そこに PdCl₂(PPh₃)₂ (105 mg, 0.15 mmol) と *n*-Bu₃SnH (2.5 ml, 9.27 mmol) を加え、20 分攪拌した。その後溶媒を減圧留去し、残渣をそのままシリカゲルカラムクロマトグラフィー (0:1-1:10 酢酸エチル/ヘキサン) で精製し、ビニルスズ体 (1.74 g, 89%) を無色無定形固体として得た。

Colorless amorphous solid

Rf 0.4 (1:20-ethyl acetate/hexane)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6.09-5.99 (1H, m, H33), 5.93-5.87 (1H, m, H33), 4.65 (0.5H, q, *J* = 5.0 Hz, EE), 4.63 (0.5H, q, *J* = 5.0 Hz, EE), 3.97-3.92 (1H, m, H37), 3.66-3.40 (3H, m, H35, EE), 2.39-2.38 (1H, m, H34), 1.94 (0.5H, qd, *J* = 6.0, 2.0 Hz, H36), 1.84 (0.5H, qd, *J* = 6.0, 2.0 Hz, H36), 1.28-0.776 (21H, m), 0.066 (3H, s, Me-Si), 0.020 (3H, s, Me-Si)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 153.33, 153.23, 126.30, 126.18, 99.12, 98.42, 77.74, 77.58, 73.34, 71.46, 60.86, 60.08, 44.68, 44.42, 42.28, 42.08, 29.14, 27.33, 26.17, 21.07, 21.02, 18.42, 16.42, 15.36, 15.32, 14.34, 13.68, 10.68, 10.47, 9.35, -3.50, -3.56, -4.00.



ヨードオレフィン 4

I₂(703 mg, 2.77 mmol)を THF (42 ml) に溶かし、0°Cに冷却した。そこにビニルスズ体(1.35 g, 2.13 mmol)のジクロロメタン溶液(11 ml)を滴下し、10 分間攪拌した。飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液と飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、ジクロロメタンで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をジクロロメタン(22 ml) に溶かし、Ethylvinylether(1.04 ml, 10.9mmol)と PPTS(78 mg, 0.31 mmol)を加え、室温で 15 分間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、ジエチルエーテルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1:20 酢酸エチル/ヘキサン)で精製し、ヨードオレフィン 4 (0.826 g, 86%) を無色無定形固体として得た。

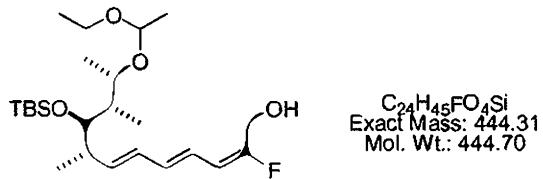
Colorless amorphous solid

Rf 0.4 (1:10-ethyl acetate/hexane)

¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 6.55 (0.5H, dd, *J* = 14.5, 7.5 Hz, H33), 6.52 (0.5H, dd, *J* = 14.5, 7.5 Hz, H33), 6.00 (0.5H, d, *J* = 14.0 Hz, H32), 5.99 (0.5H, d, *J* = 14 Hz, H32), 4.64 (0.5H, q, *J* = 5.0 Hz, EE), 4.64 (0.5H, q, *J* = 5.0 Hz, EE), 3.90-3.88 (1H, m, H37), 3.60 (1H, dq, *J* = 15.0, 7.5 Hz, EE), 3.50 (0.5H, dd, *J* = 8.0, 3.0 Hz, H35), 3.46 (0.5H, dd, *J* = 8.0, 3.0 Hz, H35), 3.43 (1H, dq, *J* = 15.0, 7.5 Hz, EE), 2.43-2.39 (1H, m, H34), 1.90 (0.5H, qd, *J* = 7.0, 2.0 Hz, H36), 1.82 (0.5H, qd, *J* = 7.0, 2.0 Hz, H36), 1.26 (1.5H, d, *J* = 5.0 Hz, EE), 1.26 (1.5H, d, *J* = 5.0 Hz, EE), 1.18 (1.5H, t, *J* = 7.0 Hz, EE), 1.18 (1.5H, t, *J* = 7.0 Hz, EE), 1.06 (1.5H, d, *J* = 6.5 Hz, H38), 0.999 (1.5H, d, *J* = 6.5 Hz, H38), 0.983 (1.5H, s, H40),

0.969 (1.5H, s, H40), 0.889 (9H, s, *t*-Bu-Si), 0.816 (1.5H, d, *J* = 7.0 Hz, H39), 0.795 (1.5H, d, *J* = 7.0 Hz, H39), 0.040 (6H, s, Me-Si)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 150.89, 150.70, 99.00, 98.29, 76.64, 76.44, 75.02, 74.98, 72.73, 71.32, 61.06, 60.10, 43.70, 43.51, 42.68, 41.95, 26.11, 26.09, 21.04, 20.89, 18.36, 16.29, 15.36, 12.96, 12.83, 10.48, 10.28, -3.78, -3.86.



アルコール 42E

Note No.: VI-179

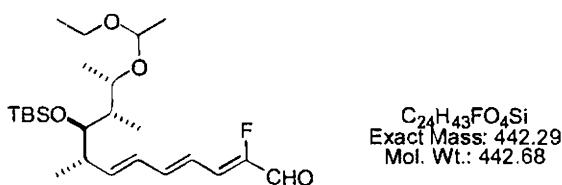
ヨードオレフィン 4 (336 mg, 0.714 mmol) とビニルスズ 5 (503 mg, 1.29 mmol) を DMF (9 ml) に溶かし、そこへ Pd 触媒 (18.5 mg, 0.071 mmol) の DMF (1 ml) 溶液を加え、室温で 1 時間攪拌した。イオン交換水を加えて反応を停止し、エーテルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:10-1:2 エーテル/ヘキサン) で精製し、アルコール 42E (283 mg, 89%) を無色無定形固体として得た。

Colorless amorphous solid

*R*_f = 0.19 (silica, hexane/AcOEt=5/1)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6.17 (1H, dd, *J* = 15.0, 10.5 Hz, H31), 5.99-6.13 (2H, m, H30, 32), 5.90 (1H, dd, *J* = 18.5, 11.0 Hz, H29), 5.77 (0.5H, dd, *J* = 15.0, 7.5 Hz, H33), 5.73 (0.5H, dd, *J* = 15.0, 7.5 Hz, H33), 4.64 (1H, m, EE), 4.30-4.38 (2H, m, H27), 3.89-3.94 (1H, m, H37), 3.55-3.66 (1H, m, EE), 3.37-3.48 (2H, m, H35, EE), 2.43 (1H, m, H34), 1.92 (0.5H, m, H36), 1.83 (0.5H, m, H36), 1.17 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, EE), 1.06 (1.5H, d, *J* = 6.5 Hz, H38), 0.99 (4.5H, d, *J* = 6.5 Hz, H38, 40), 0.83 (1.5H, d, *J* = 7.0 Hz, H39), 0.80 (1.5H, d, *J* = 7.0 Hz, H39).

MS (ESI) m/z calcd for C₂₄H₄₅FO₄Si (M+Na⁺) 467, found 467.



アルデヒド 43Z

Note No.: VII-159, VIII-125-127

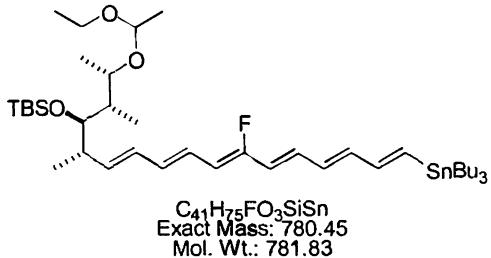
アルコール **42E** (401 mg, 0.90 mmol) をジクロロメタン(20 ml)に溶かし、Dess-Martin 試薬 (497 mg, 1.17 mmol) を加えて室温で 25 分攪拌した。チオ硫酸ナトリウム水溶液と飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、エーテルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をフロリジルカラムクロマトグラフィー (100-200 mesh, 1:2-1:0 酢酸エチル/ヘキサン) で精製し、アルデヒド体 (317 mg, 80%, E 体が主生成物) を無色無定形固体として得た。これをジクロロメタン (12.5 ml) に溶かし、タングステンランプによる光照射条件下、ジフェニルジセレニド (22 mg, 0.071 mmol) を作用させて 20 度で 1.5 時間攪拌した。チオ硫酸ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、エーテルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をフロリジルカラムクロマトグラフィー (100-200 mesh, 1:5-1:1 エーテル/ヘキサン) で精製し、アルデヒド **43Z** (270 mg, 85%) を無色無定形固体として得た。

Colorless amorphous solid

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

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 9.20 (1H, d, $J = 18.0$ Hz, CHO), 6.62 (1H, dd, $J = 15.0, 11.0$ Hz, H31), 6.53 (0.5H, dd, $J = 15.0, 11.0$ Hz, H30), 6.52 (0.5H, dd, $J = 15.0, 11.0$ Hz, H30), 6.39 (1H, dd, $J = 30, 11.0$ Hz, H29), 6.19 (1H, dd, $J = 15.0, 11.0$ Hz, H32), 6.11 (0.5H, dd, $J = 15.0, 7.0$ Hz, H33), 6.07 (0.5H, dd, $J = 15.0, 7.0$ Hz, H33), 4.65 (1H, m, EE), 3.90 (1H, m, H37), 3.38-3.63 (3H, m, EE, H35), 2.53 (1H, m, H34), 1.92 (0.5H, m, H36), 1.85 (0.5H, m, H36), 1.24-1.27 (3H, m, EE), 1.15-1.20 (3H, m, EE), 1.07 (1.5H, d, $J = 6.5$ Hz, H38), 1.04 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H40), 1.01 (1.5H, d, $J = 6.5$ Hz, H38), 0.85 (1.5H, d, $J = 7.0$ Hz, H39), 0.83 (1.5H, d, $J = 7.0$ Hz, H39).

MS (ESI) m/z calcd for C₂₄H₄₃FO₄Si (M+Na⁺) 465, found 465.



C22-C37 Segment 2

Note No.: VIII-21, 129

トルエン共沸により脱水したホスホン酸エステル **6** (386 mg, 0.830 mmol) をベンゾフェノンケチルで脱水した THF (14 ml) に溶かし、-78°Cに冷却後、1.06 M LHMDS (0.748 ml, 0.793 mmol) を加えて 15 分攪拌した。続いてトルエン共沸により脱水したアルデヒド **43Z** (270 mg, 0.610 mmol) の THF (7 ml) 溶液を滴下後、遮光下約 30 分かけて-78°Cから 0°Cに昇温し、その後 0°Cで 2.5 時間攪拌した。イオン交換水を加えて反応を停止し、エーテルで抽出した。有機層を饱和食塩水で洗净し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をフロリジルカラムクロマトグラフィー (100-200 mesh, 1:80-1:10 酢酸エチル/ヘキサン, 1% トリエチルアミン) で精製し、**2** (402 mg, 84%) を黄色無定形固体として得た。

Yellow amorphous solid

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

[α]_D³¹ -16.7° (c 0.520, CHCl₃)

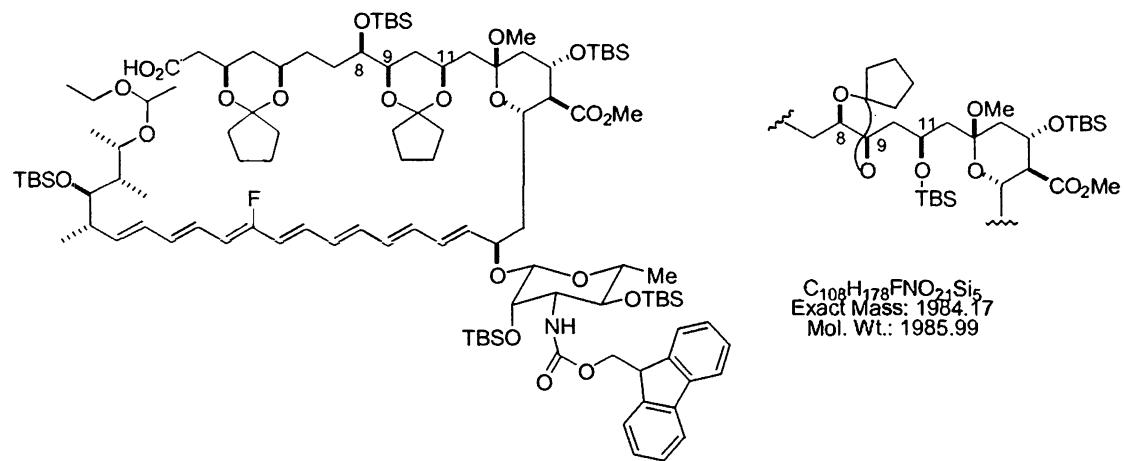
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6.58 (1H, dd, J = 19.0, 10.0 Hz, H23), 6.53 (1H, dd, J = 15.0, 11.0 Hz, H26), 6.45 (0.5H, dd, J = 14.5, 11.0 Hz, H30), 6.44 (0.5H, dd, J = 14.5, 11.0 Hz, H30), 6.37 (1H, d, J = 19.0 Hz, H22), 6.29 (1H, dd, J = 14.5, 10.0 Hz, H24), 6.19 (2H, dd, J = 14.5, 11.0 Hz, H25, H31), 6.10 (1H, dd, J = 15.0, 11.0 Hz, H32), 5.95 (1H, dd, J = 27.0, 15.0 Hz, H27), 5.79 (0.5H, dd, J = 15.0, 7.5 Hz, H33), 5.75 (0.5H, dd, J = 15.0, 7.5 Hz, H33), 5.49 (1H, dd, J = 33.0, 11.0 Hz, H29), 4.61-4.66 (1H, m, EE), 3.92 (1H, m, H37), 3.38-3.65 (1H, m, EE), 3.38-3.52 (2H, m, H35, EE), 2.45 (1H, m, H34), 1.93 (0.5H, m, H36), 1.84 (0.5H, m, H36), 1.15-1.53 (18H, m, EE, SnCH₂CH₂), 1.07 (1.5H, d, J = 7.0 Hz, H38), 1.00 (4.5H, d, J

= 7.0 Hz, H38, H40), 0.85-0.96 (24H, m, Si-*t*-Bu, Sn(CH₂)₂CH₂CH₃), 0.84 (1.5H, d, *J* = 7.0 Hz, H39), 0.82 (1.5H, d, *J* = 7.0 Hz, H39), 0.01 (6H, m, SiMe₂).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 156.40 (d, ¹J_{CF} = 259 Hz), 146.46, 140.41, 140.18, 137.62, 137.47, 133.20, 133.07, 130.56, 129.80, 129.58, 123.20, 111.76, 98.94, 98.28, 72.93, 71.48, 60.97, 60.11, 42.62, 42.02, 40.30, 29.17, 27.35, 26.25, 21.18, 21.03, 18.52, 16.39, 15.45, 14.18, 14.09, 13.79, 10.73, 10.52, 9.71, -3.50, -3.77.

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

MS (ESI) m/z calcd for C₄₁H₇₅FO₃SiSn (M+Na⁺) 803, found 803.



Stille カップリング生成物 (ca. 1:1 ratio of isomers, 1:1 ratio of EE epimers)

Note No.: VIII-19, 131

トルエン共沸により脱水した C1-C21 Segment **30ab** (303 mg, 0.187 mmol) と、ジイソプロピルエチルアミン (81 μl, 0.467 mmol) を THF (6.5 ml) に溶かし、そこへ、トルエン共沸により脱水した C22-C37 Segment **2** (377 mg, 0.482 mmol) の THF (15 ml) 溶液を加えた。これに対し、グローブボックス内で秤量したトリスジベンジリデンアセトンジパラジウム (58 mg, 0.056 mmol) とトリフェニルヒ素 (172 mg, 0.561 mmol) の THF (6.5 ml) を加え、遮光下室温で 3.5 時間攪拌した。THF を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:10 酢酸エチル/ヘキサン、

1:80-1:10 メタノール/クロロホルム、1%トリエチルアミン)で粗精製し、カップリング生成物を得た(405 mg, impure、NMRより収率としては約70%)。

Yellow amorphous solid

R_f = 0.61 and 0.54 (HPTLC, CHCl₃/MeOH=20/1)

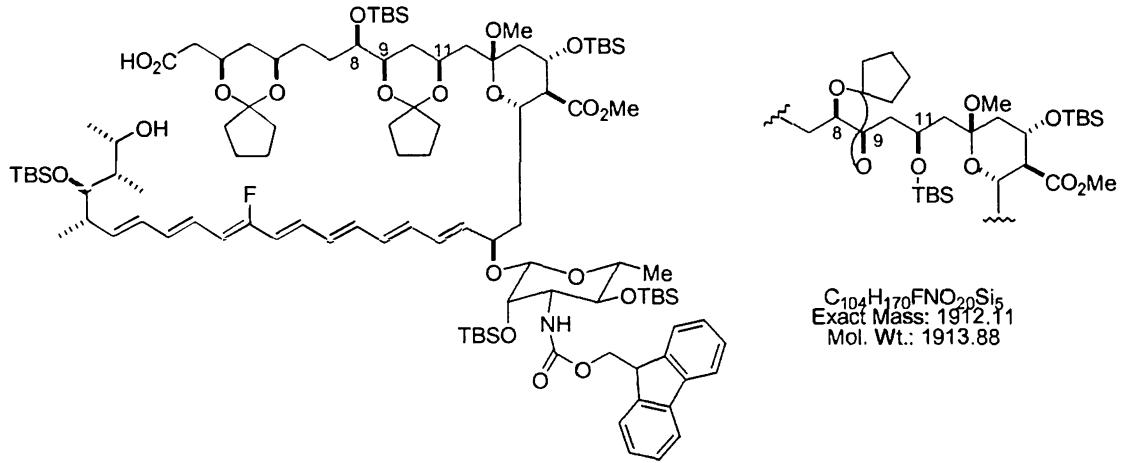
[α]_D²⁷ +6.7° (c 0.46, CHCl₃)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.73 (2H, d, J = 8.0 Hz, Fmoc), 7.55 (2H, m, Fmoc), 7.37 (2H, t, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.27 (2H, t, J = 8.0 Hz, Fmoc), 6.54 (1H, dd, J = 15.0, 11.0 Hz, H26), 6.45 (0.5H, dd, J = 15.0, 11.0 Hz, H30), 6.44 (0.5H, dd, J = 15.0, 11.0 Hz, H30), 6.14-6.37 (6H, m, H21, 22, 23, 24, 25, 31), 6.09 (1H, dd, J = 15.5, 11.0 Hz, H32), 5.94 (1H, dd, J = 27.5, 15.0 Hz, H27), 5.79 (0.5H, dd, J = 15.5, 7.5 Hz, H33), 5.76 (0.5H, dd, J = 15.5, 7.5 Hz, H33), 5.62 (1H, dd, J = 14.5, 8.5 Hz, H20), 5.51 (1H, dd, J = 33.5, 11.0 Hz, H29), 4.85 (1H, d, J = 10.0 Hz, NH), 4.61-4.66 (1H, m, EE), 4.40-4.46 (1H, m, Fmoc), 4.39 (1H, s, H1'), 4.31-4.36 (1H, m, Fmoc), 4.13-4.26 (4H, m, H3, 15, 19, Fmoc), 4.02 (1H, m, H11), 3.92 (1H, m, H37), 3.73-3.82 (2H, m, H5, 2'), 3.64 (3H, s, CO₂Me), 3.37-3.70 (7H, m, H8, 9, 17, 35, 3', EE), 3.28 (1H, m, H4'), 3.19 (1H, m, H5'), 3.02 (2H, s, OMe), 2.99 (1H, s, OMe), 2.58 (1H, dd, J = 15.5, 6.5 Hz, H2a), 2.42-2.52 (2H, m, H2b, 34), 2.15-2.26 (1H, m, H16), 2.00-2.10 (2H, m, H14eq, 12a), 1.06, 1.00 (3H, d, J = 6.5 Hz, H38).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 172.94, 155.71, 155.49, 143.78, 143.76, 141.27, 134.77, 133.87, 133.71, 133.06, 132.39, 129.73, 129.31, 128.83, 128.67, 128.18, 127.57, 126.91, 124.82, 123.18, 119.85, 118.07, 112.13, 110.82, 110.33, 100.71, 100.50, 100.30, 99.45, 98.98, 98.78, 98.31, 98.15, 80.80, 74.23, 73.93, 72.36, 72.22, 71.44, 70.47, 69.92, 67.48, 66.83, 66.48, 66.30, 60.96, 60.06, 57.21, 51.62, 48.01, 47.91, 47.74, 47.18, 43.05, 42.96, 42.52, 42.11, 41.89, 40.65, 40.31, 39.68, 37.48, 36.34, 32.51, 32.12, 31.67, 31.38, 29.76, 29.24, 27.88, 27.58, 27.11, 26.66, 24.88, 24.44, 23.56, 23.45, 22.90, 22.51, 21.19, 21.02, 18.93, 18.48, 18.32, 18.06, 17.80, 16.54, 16.33, 15.43, 14.01, 13.75, 10.68, 10.50, -3.47, -3.76, -3.88, -4.15, -4.50, -5.04, -5.25.

IR (film) ν 2954, 2929, 2892, 2856, 1734, 1508, 1473, 1458, 1450, 1438, 1377, 1333, 1254, 1196, 1109, 1078, 1034, 1003, 837, 775, 758 cm⁻¹.

MS (ESI) m/z calcd for C₁₀₈H₁₇₈FNO₂₁Si₅ (M+Na⁺) 2007, found 2037. (High mode)



セコ酸 44ab (ca. 1:1 ratio of isomers)

Note No.: VIII-25, 133

Stille カップリング生成物 (405 mg, impure) をメタノール (7 ml) とシクロペンタノンジメチルケタール (3.5 ml) に溶かし、PPTS (470 mg, 1.87 mmol) を加えて遮光下室温で 3.5 時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止し、エーテルで抽出した。有機層を 0.25M の塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:10 酢酸エチル/ヘキサン、1:100-1:30 メタノール/クロロホルム) で精製し、44ab (369 mg, impure、NMR より収率としては約 79%) を黄色無定形固体として得た。

Yellow amorphous solid

R_f = 0.56 and 0.50 (HPTLC, $CHCl_3/MeOH=20/1$)

$[\alpha]_D^{27} +10.3^\circ$ (c 0.49, $CHCl_3$)

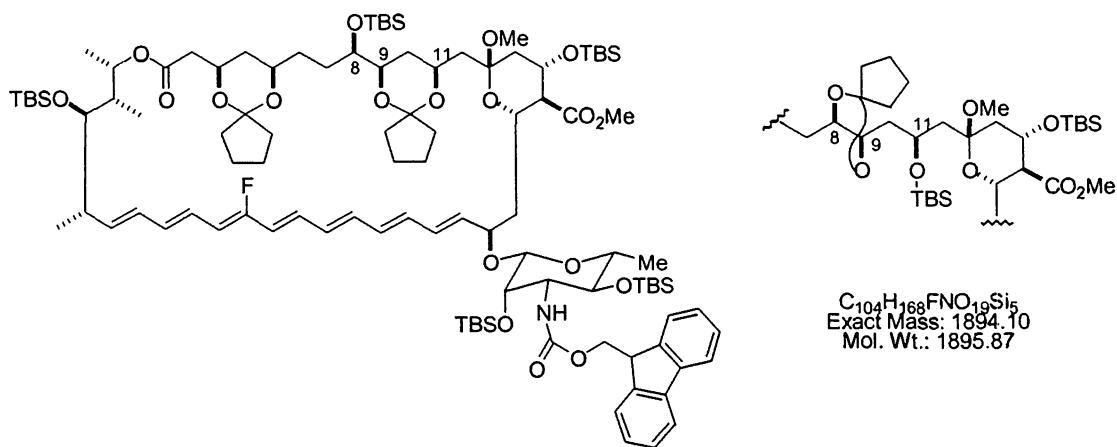
1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.73 (2H, d, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.55 (2H, m, Fmoc), 7.37 (2H, t, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.27 (2H, t, J = 7.5 Hz, Fmoc), 6.54 (1H, dd, J = 15.0, 11.0 Hz, H26), 6.45 (1H, dd, J = 14.5, 11.5 Hz, H30), 6.15-6.37 (6H, m, H21, 22, 23, 24, 25, 31), 6.12 (1H, dd, J = 15.0, 11.0 Hz, H32), 5.94 (1H, dd, J = 26.5, 15.0 Hz, H27), 5.72 (1H, dd, J = 15.0, 8.0 Hz, H33), 5.62 (1H, m, H20), 5.50 (1H, dd, J = 33.0, 11.5 Hz, H29), 4.85 (1H, d, J = 10.0 Hz, NH), 4.40-4.46 (1H, m, Fmoc), 4.39 (1H, s, H1'), 4.31-4.36 (1H, m, Fmoc), 4.13-4.24 (4H, m, H3, 15, 19, Fmoc), 4.02 (1H, m, H11), 3.73-3.81 (2H, m, H5, 2'), 3.64 (3H, s, CO_2Me), 3.50-3.72 (6H, m, H8, 9, 17, 35, 37, 3'), 3.27 (1H, m, H4'), 3.19 (1H, m, H5'), 3.02 (1.5H, s, OMe), 2.99 (1.5H, s, OMe), 2.58 (1H, dd, J = 15.5, 6.0 Hz, H2a), 2.42-2.53 (2H, m, H2b, 34),

2.17-2.25 (1H, m, H16), 2.08 (1H, dd, J = 12.5, 5.0 Hz, H14eq), 2.05 (1H, m, H12a), 1.11 (3 H, d, J = 6.5 Hz, H38), 1.02 (3H, d, J = 7.0 Hz, H40).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 184.52, 172.94, 155.68, 155.51, 143.75, 143.76, 141.27, 133.97, 133.68, 133.42, 133.31, 133.08, 132.55, 131.28, 131.16, 130.82, 129.80, 129.43, 127.57, 126.91, 124.82, 123.49, 119.85, 118.09, 112.04, 110.91, 110.81, 110.34, 100.52, 100.34, 99.01, 81.12, 80.79, 73.89, 72.21, 70.52, 69.86, 67.46, 66.82, 66.52, 66.33, 60.86, 57.51, 57.22, 51.63, 47.16, 44.04, 43.00, 42.82, 42.58, 42.45, 40.74, 40.59, 40.32, 39.78, 39.66, 37.46, 36.81, 36.73, 36.35, 36.14, 32.54, 32.11, 32.00, 31.93, 31.62, 31.38, 29.75, 29.40, 27.84, 27.59, 27.12, 26.54, 25.18, 24.89, 24.44, 23.54, 23.45, 22.90, 22.50, 20.75, 20.52, 18.92, 18.75, 18.46, 18.31, 18.06, 17.80, 16.54, 15.82, 15.72, 15.47, 15.35, 13.75, 10.68, 10.50, -3.46, -3.71, -3.93, -4.15, -4.49, -5.05, -5.26.

IR (film) ν 2952, 2929, 2895, 2856, 1734, 1508, 1473, 1460, 1450, 1437, 1363, 1333, 1254, 1215, 1196, 1109, 1078, 1034, 1003, 837, 775, 758 cm^{-1} .

· MS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{104}\text{H}_{170}\text{FNO}_{20}\text{Si}_5$ ($\text{M}+\text{Na}^+$) 1935, found 1935.



マクロラクトン 47ab (ca. 1:1 ratio of isomers)

Note No.: VIII-135

グローブボックス内で秤量した 2-メチル-6-ニトロ安息香酸無水物 (193 mg, 0.561 mmol) と DMAP (137 mg, 1.12 mmol) をジクロロメタン (137 ml) に溶かし、その中へセコ酸 44ab (369 mg, impure) のジクロロメタン (50 ml) 溶液を 5 時間かけて

滴下した。室温で 40 分攪拌後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止し、エーテルで抽出した。有機層を 0.25M の塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:10-1:5 酢酸エチル/ヘキサン、0:1-1:20 メタノール/クロロホルム) で精製し、**47ab** (123 mg、NMR より収率としては約 69%、Stille カップリングより 3 段階では 35%) を黄色無定形固体として得た。

Yellow amorphous solid

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

$[\alpha]_D^{25} +47.7^\circ (c\ 0.76, \text{CHCl}_3)$

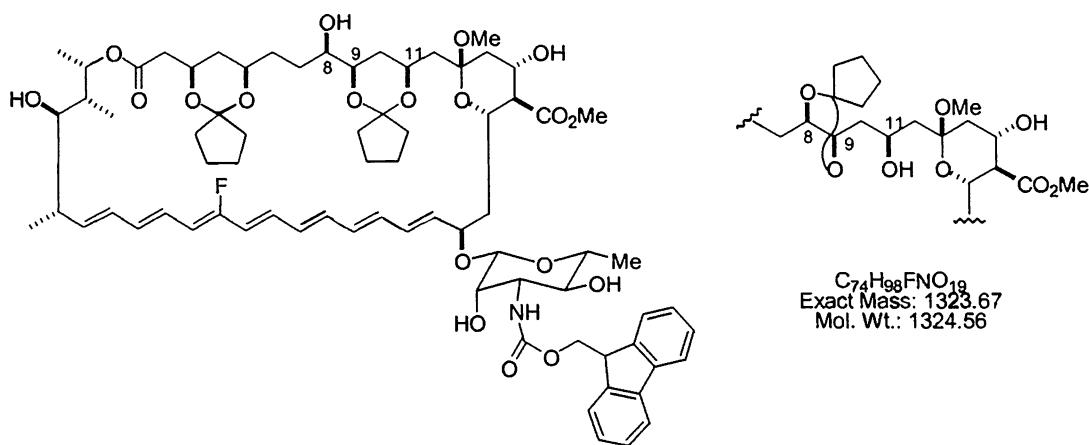
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.74 (2H, d, J = 8.0 Hz, Fmoc), 7.56 (2H, m, Fmoc), 7.37 (2H, t, J = 8.0 Hz, Fmoc), 7.27 (2H, t, J = 7.5 Hz, Fmoc), 6.53 (1H, dd, J = 15.0, 11.0 Hz, H26), 6.44 (0.5H, dd, J = 14.5, 11.5 Hz, H30), 6.42 (0.5H, dd, J = 14.5, 11.5 Hz, H30), 6.15-6.37 (5H, m, H21, 22, 23, 24, 25), 6.11 (1H, dd, J = 14.5, 11.5 Hz, H31), 6.03 (1H, dd, J = 15.0, 11.5 Hz, H32), 5.91 (0.5H, dd, J = 26.5, 15.0 Hz, H27), 5.87 (0.5H, dd, J = 26.5, 15.0 Hz, H27), 5.85 (0.5H, dd, J = 15.0, 6.5 Hz, H20), 5.78 (0.5H, dd, J = 15.0, 6.5 Hz, H20), 5.61 (0.5H, dd, J = 15.0, 9.5 Hz, H33), 5.54 (0.5H, dd, J = 15.0, 9.5 Hz, H33), 5.46 (0.5H, dd, J = 33.5, 11.5 Hz, H29), 5.45 (0.5H, dd, J = 33.5, 11.5 Hz, H29), 4.87 (1H, d, J = 10.0 Hz, NH), 4.82-4.89 (1H, m, H37), 4.41-4.52 (2H, m, H19, Fmoc), 4.30-4.37 (2H, m, H1', Fmoc), 4.14-4.26 (2H, m, H15, Fmoc), 4.06-4.13 (1H, m, H3), 4.02 (1H, m, H11), 3.77-3.88 (3H, m, H2', 17, 35), 3.68 (1.5H, s, CO_2Me), 3.67 (1.5H, s, CO_2Me), 3.52-3.70 (4H, m, H5, 8, 9, 3'), 3.28-3.36 (1H, m, H4'), 3.18-3.26 (1H, m, H5'), 3.08 (1.5H, s, OMe), 2.97 (1.5H, s, OMe), 2.49 (0.5H, dd, J = 17.0, 8.0 Hz, H2a), 2.39 (0.5H, dd, J = 17.0, 8.0 Hz, H2a), 2.23-2.35 (2H, m, H16, 34), 2.20 (0.5H, dd, J = 13.0, 5.0 Hz, H14eq), 2.09 (1H, dd, J = 17.0, 4.0 Hz, H2b), 2.04 (0.5H, dd, J = 15.0, 4.0 Hz, H14eq), 1.18 (3H, d, J = 6.5 Hz, H38), 0.98 (3H, d, J = 7.0 Hz, H40).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 172.85, 169.79, 169.59, 155.46, 143.87, 143.78, 141.26, 136.74, 136.62, 135.78, 134.57, 133.61, 133.01, 132.71, 131.41, 131.04, 130.63, 130.24, 130.00, 129.81, 129.47, 128.57, 128.53, 128.36, 127.54, 126.90, 125.46, 124.84, 123.64, 123.44, 123.25, 123.08, 121.85, 119.83, 118.07, 117.93, 111.82, 111.30, 110.19, 100.55, 99.91, 97.98, 74.07, 73.85, 72.36, 69.65, 68.00, 67.91, 67.42, 66.70, 66.46, 66.31, 66.22, 66.02, 65.92, 57.26, 56.06, 51.81, 51.59, 48.34, 48.09, 47.23, 46.71, 43.30, 43.04, 42.84, 42.38, 41.13, 40.88, 40.75, 40.53, 40.30, 40.16, 37.78, 37.48, 37.36, 37.17, 37.01, 36.76, 36.41,

32.77, 32.00, 31.63, 31.21, 30.95, 30.37, 30.11, 29.75, 29.42, 27.64, 27.04, 26.55, 26.10, 25.79, 25.67, 24.91, 24.38, 23.70, 23.62, 23.42, 23.19, 22.88, 22.73, 22.45, 18.92, 18.46, 18.33, 18.06, 17.83, -3.43, -3.70, -3.90, -4.13, -4.47, -5.02, -5.21.

IR (film) ν 2954, 2856, 1734, 1716, 1699, 1684, 1653, 1635, 1558, 1541, 1520, 1506, 1473, 1456, 1254, 1194, 1078, 1036, 1001, 837, 775 cm^{-1} .

MS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{104}\text{H}_{168}\text{FNO}_{19}\text{Si}_5$ ($\text{M}+\text{Na}^+$) 1917, found 1917.



TBS 脱保護ペントオール体 **48ab** (ca. 1:1 ratio of isomers)

Note No.: VIII-143, 167

テフロンチューブにマクロラクトン **47ab** (53 mg, 0.028 mmol) を移し、メタノール (1.41 ml) とピリジン (0.706 ml) を加えた。室温で HF ピリジン (0.40 ml) を滴下し、その後 50 度に昇温して 39 時間攪拌した。反応溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液中に滴下して反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を 0.25M の塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:80-1:5 メタノール/クロロホルム) で精製し、**48ab** (33 mg、秤量値では 90%) を黄色無定形固体として得た。

Yellow amorphous solid

$R_f = 0.47$ (silica, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=10/1$)

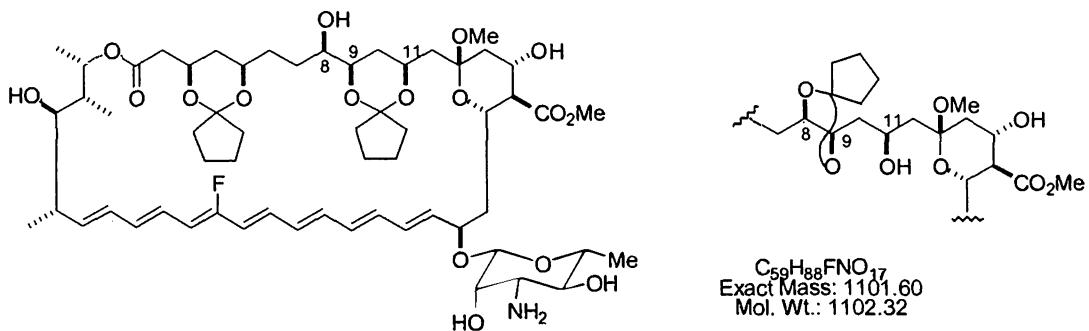
$[\alpha]_D^{28} +55.0^\circ$ (c 1.05, CHCl_3)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.74 (2H, d, *J* = 7.5 Hz, Fmoc), 7.58 (2H, m, Fmoc), 7.37 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, Fmoc), 7.29 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, Fmoc), 6.53 (1H, dd, *J* = 15.0, 11.0 Hz, H26), 6.45 (1H, dd, *J* = 15.0, 11.5 Hz, H30), 6.15-6.40 (6H, m, H21, 22, 23, 24, 25, 32), 6.11 (1H, dd, *J* = 14.5, 11.5 Hz, H31), 5.95 (1H, dd, *J* = 27.0, 15.0 Hz, H27), 5.86 (0.5H, dd, *J* = 15.5, 5.5 Hz, H20), 5.83 (0.5H, dd, *J* = 15.5, 5.5 Hz, H20), 5.70 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, NH), 5.40-5.55 (2H, m, H29, 33), 5.13-5.20 (1H, m, H37), 4.50-4.60 (1H, m, H19), 4.33-4.45 (2H, m, H1', Fmoc), 4.05-4.28 (4H, m, H3, 15, Fmoc x2), 3.76-3.98 (3H, m, H11, 17, 2'), 3.71 (3H, s, CO₂Me), 3.50-3.75 (3H, m, H5, 9, 3'), 3.31-3.45 (3H, m, H8, 35, 4'), 3.22-3.30 (1H, m, H5'), 3.07 (1.5H, s, OMe), 2.98 (1.5H, s, OMe), 2.39-2.58 (2H, m, H2a, 34), 2.07-2.32 (3H, m, H2b, 14eq, 16), 1.22 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H6'), 1.05-1.19 (6H, m, H38, 40), 0.98 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H40).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 172.91, 170.99, 170.62, 170.46, 169.48, 169.34, 157.80, 157.54, 155.49, 143.59, 141.17, 136.96, 136.55, 136.21, 135.78, 135.45, 135.16, 134.04, 133.60, 132.98, 132.66, 132.39, 132.07, 131.87, 131.39, 130.86, 130.28, 129.60, 129.30, 128.89, 128.54, 127.65, 127.00, 124.95, 123.92, 123.68, 123.27, 122.94, 122.15, 119.91, 118.33, 111.86, 111.48, 110.05, 110.37, 100.91, 100.04, 97.61, 96.81, 73.80, 73.24, 72.74, 72.35, 70.62, 70.19, 69.86, 69.56, 69.34, 68.06, 67.32, 66.81, 66.49, 66.27, 66.09, 65.78, 60.78, 60.40, 59.70, 59.28, 56.78, 56.35, 55.94, 55.72, 52.85, 52.44, 51.87, 51.59, 47.67, 47.24, 46.66, 42.28, 41.24, 40.21, 37.51, 36.97, 36.49, 33.16, 32.88, 32.63, 31.94, 31.31, 29.70, 29.34, 27.91, 26.11, 24.39, 23.53, 22.48, 21.16, 21.00, 18.21, 17.68, 14.24, 11.57.

IR (film) ν 3440, 2951, 2875, 1718, 1560, 1543, 1523, 1508, 1458, 1450, 1387, 1333, 1192, 1153, 1072, 1026, 1001, 758 cm⁻¹.

MS (ESI) m/z calcd for C₇₄H₉₈FNO₁₉ (M+Na⁺) 1347, found 1347.



Fmoc 脱保護体 **49ab** (ca. 1:1 ratio of isomers)

Note No.: VIII-31, 145, 171

48ab (12 mg, 9.1 μ mol) をメタノール (0.57 ml) に溶かし、ピペリジン (18 μ l, 0.18 mmol) を加えて室温で 3.5 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1:10-2:1 メタノール/クロロホルム) で精製し、**49ab** (9.5 mg、秤量値では 95%) を黄色固体として得た。

Yellow solid

R_f = 0.11 (silica, $CHCl_3/MeOH=5/1$)

$[\alpha]_D^{27} +36.7^\circ$ (c 0.74, $CHCl_3$)

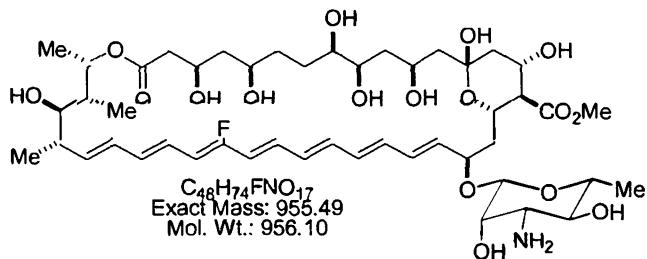
1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 6.54 (1H, dd, J = 14.5, 11.0 Hz, H26), 6.45 (1H, dd, J = 14.5, 11.0 Hz, H30), 6.17-6.40 (6H, m, H21, 22, 23, 24, 25, 32), 6.12 (1H, dd, J = 14.5, 11.5 Hz, H31), 5.80-5.97 (2H, m, H20, 27), 5.42-5.56 (2H, m, H29, 33), 5.12-5.24 (1H, m, H37), 4.59 (1H, m, H19), 4.45 (1H, s, H1’), 4.07-4.30 (2H, m, H3, 15), 3.55-3.97 (4H, m, H5, 9, 11, 17), 3.72 (3H, s, CO_2Me), 3.08 (1.5H, s, OMe), 2.99 (1.5H, s, OMe), 2.62 (1H, m, H4’), 2.05-2.53 (6H, m, H2a, 2b, 14eq, 16, 34, 3’), 1.05-1.11 (6H, m, H38, 40), 0.99 (3H, d, J = 6.0 Hz, H40).

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 173.28, 170.58, 169.48, 169.35, 157.53, 155.53, 137.72, 136.49, 136.29, 135.54, 134.02, 132.74, 131.79, 131.36, 130.85, 129.66, 129.32, 128.91, 128.10, 125.18, 123.92, 123.16, 122.05, 118.32, 111.75, 110.38, 100.93, 100.07, 98.07, 97.28, 73.80, 73.53, 73.30, 72.63, 72.34, 72.06, 71.60, 70.98, 70.24, 69.91, 69.57, 69.29, 68.15, 67.74, 67.26, 67.15, 66.76, 66.52, 66.27, 66.08, 65.89, 56.69, 56.40, 55.77, 52.46, 51.94, 48.16, 42.33, 42.07, 41.30, 41.12, 40.25, 37.52, 36.98, 36.50, 33.17, 32.90, 32.63, 31.96, 31.32, 31.05, 29.74, 29.37, 27.96, 27.68, 26.14, 24.39, 23.53, 22.49, 21.56, 21.41, 18.18, 17.90, 17.50, 17.33, 14.18, 11.57.

IR (film) ν 3415, 2945, 2868, 1718, 1655, 1637, 1560, 1543, 1458, 1439, 1383, 1333, 1207,

1153, 1111, 1068, 1005 cm^{-1} .

MS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{59}\text{H}_{88}\text{FNO}_{17}$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 1102, found 1102.



28-F amphotericin B methyl ester (F-AME) 52

Note No.: VIII-165, 169

濃塩酸 (63 μl) をメタノール (2.53 ml) に溶かし 0 度に冷却後、49ab (9.0 mg, 8.2 μmol) のメタノール溶液 (6.33 ml) を 6 分かけて滴下し、0 度で 14.5 時間攪拌した。炭酸水素ナトリウム (76 mg) を加えて反応を停止し、pH が 7 付近になったことを確認し溶媒を減圧留去した。濃塩酸 (63 μl) を水と t-BuOH の 10:1 混合溶媒 (2.53 ml) に溶かし、そこへ先ほどの残渣の水、t-BuOH の混合溶液 (6.33 ml) を滴下し、室温で 30 分間攪拌した。0 度に冷却して炭酸水素ナトリウム (125 mg) と水 (3.8 ml) を加えて反応を停止し、t-BuOH を減圧留去後、反応水溶液をそのまま ODS のオープンカラム ($\text{H}_2\text{O}-\text{MeOH}$) にチャージして精製した。粗精製物を HPLC を用いて再精製し、最終的に純粋な F-AmB methylester 52 (2.1 mg, 27%) が黄色固体として得た。

Yellow solid

¹H NMR (920 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6.56 (1H, dd, *J* = 14.5, 12.0 Hz, H24), 6.56 (1H, dd, *J* = 15.5, 11.0 Hz, H26), 6.43 (1H, dd, *J* = 15.0, 10.5 Hz, H22), 6.34 (1H, dd, *J* = 14.5, 11.0 Hz, H25), 6.33 (1H, dd, *J* = 15.0, 11.0 Hz, H30), 6.29 (1H, dd, *J* = 15.0, 12.0 Hz, H23), 6.23 (1H, dd, *J* = 15.0, 10.5 Hz, H31), 6.17 (1H, dd, *J* = 28.0, 15.5 Hz, H27), 6.12 (1H, dd, *J* = 15.5, 10.5 Hz, H32), 6.12 (1H, dd, *J* = 15.5, 10.5 Hz, H21), 5.96 (1H, dd, *J* = 15.5, 9.0 Hz, H20), 5.75 (1H, dd, *J* = 34.0, 11.0 Hz, H29), 5.51 (1H, dd, *J* = 15.5, 9.5 Hz, H33), 5.18 (1H, m, H37), 4.37 (1H, m, H19), 4.25 (1H, s, H1'), 4.23 (2H, m, H11, H17), 4.05 (1H, m, H3), 4.03 (1H, m, H15), 3.62 (3H, s, -CO₂CH₃), 3.59 (1H, m, H5), 3.51 (1H, br s, H2'), 3.46 (1H, m,

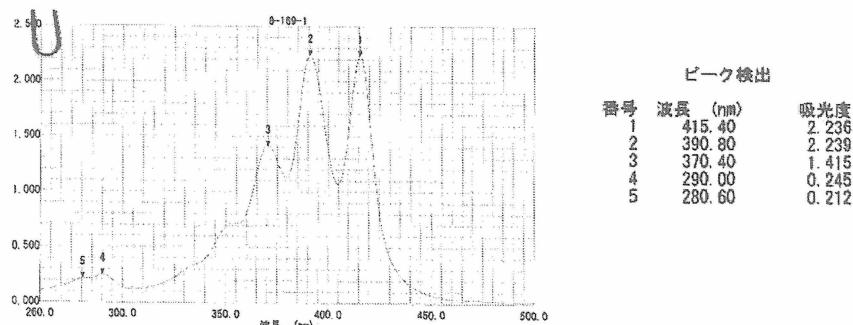
H9), 3.12 (1H, m, H35), 3.11 (1H, m, H8), 3.05 (1H, m, H5'), 2.86 (1H, m, H4'), 2.29 (2H, m, H3', H34), 2.20 (1H, dd, $J = 16.5, 9.0$ Hz, H2a), 2.14 (1H, dd, $J = 16.5, 3.0$ Hz, H2b), 2.08 (1H, m, H16), 1.90 (1H, dd, $J = 12.0, 5.0$ Hz, H14_{eq}), 1.87 (1H, dd, $J = 16.0, 5.5$ Hz, H18a), 1.71 (1H, m, H36), 1.55 (1H, m, H18b), 1.48-1.57 (2H, m, H10), 1.45-1.53 (2H, m, H7), 1.26-1.40 (6H, m, H4, H6, H12), 1.15 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H6'), 1.13 (1H, m, H14_{ax}), 1.12 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H38), 1.04 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H40), 0.91 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H39).

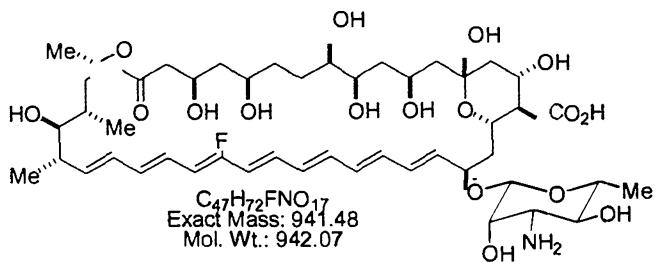
¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.82, 170.15, 156.20 (d, $^1J_{CF} = 252$ Hz), 137.22, 137.13, 136.72, 136.11, 135.97, 134.51, 132.45, 131.36, 131.04, 130.68, 129.75 (d, $^2J_{CF} = 14.5$ Hz), 128.73, 123.08, 121.65, 97.38, 97.24, 96.66, 73.80, 73.36, 73.14, 72.96, 70.02, 69.84, 69.28, 69.13, 67.15, 66.56, 65.87, 64.58, 56.82, 56.46, 45.90, 44.52, 44.14, 42.44, 42.26, 41.07, 36.80, 34.90, 28.98, 18.46, 17.97, 17.06, 11.96.

MS (ESI) m/z calcd for C₄₈H₇₄FNO₁₇ (M+Na⁺) 978, found 978.

HPLC: 5C₁₈-MS-II (10 x 250 mm, nacalai tesque.), detector $\lambda = 408$ nm, flow rate 1.5 ml / min, Elution with a gradient solvent system (70% MeOH in AcONH₄ buffer to 100% MeOH in 30min) gave a solution of F-AME (*t*_R 24.7 min).

UV: λ_{max} : 415 nm ($\epsilon_{\text{max}} = 1.022 \times 10^5$ M⁻¹cm⁻¹).





28-F amphotericin B

Note No.: VIII-43

F-AmB methylester **52** (1.0 mg, 1.0 μmol) を THF (0.25 ml)、ミリ Q 水 (0.1 ml) に溶かし、1M の水酸化リチウム水溶液 (20 μl , 20 μmol) を加えて 0 度で 4.5 時間攪拌した。0.25M の塩酸を加えて反応を停止し、pH が 6 付近になったことを確認し溶媒を減圧留去した。残渣を HPLC を用いて精製し F-AmB を黄色固体として得た。

Yellow solid

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 6.00-6.57 (11H, m), 5.74 (1H, dd, J = 34.0, 11.0 Hz, H29), 5.49 (1H, dd, J = 15.0, 10.0 Hz, H33), 5.16 (1H, m, H37), 4.35 (1H, m, H19), 4.23 (1H, m, H11), 4.12 (1H, t, J = 10.0 Hz, H17), 4.05 (1H, m, H3), 3.95 (1H, m, H15), 1.16 (3H, d, J = 6.0 Hz, CH₃), 1.09 (3H, d, J = 6.5 Hz, CH₃), 1.02 (3H, d, J = 6.0 Hz, CH₃), 0.90 (3H, d, J = 7.0 Hz, CH₃).

MS (ESI) m/z calcd for C₄₇H₇₂FNO₁₇ ($M+\text{Na}^+$) 964, found 964.

HPLC: 5C₁₈-MS-II (10 x 250 mm, nacalai tesque.), detector λ = 408 nm, flow rate 1.5 ml / min, Elution with a gradient solvent system (70% MeOH in AcONH₄ buffer to 100% MeOH in 30min) gave a solution of F-AmB (t_R 22.6 min).

UV: λ_{max} : 415 nm ($\epsilon_{\text{max}} = 1.022 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

5-2 活性試験

5-2-a 溶血活性試験

ヒトの血液を 2000 rpm で 5 分間遠心分離し赤血球を沈殿させた後、PBS 緩衝溶液で 3 回洗浄した。得られた赤血球を元の血液の 1%になるように PBS 緩衝溶液で薄

めた。AmB と AmB 誘導体を DMSO に溶かして各濃度の溶液を調整し、この溶液 4 μl に対し 1% のヒト赤血球溶液 196 μl を加えて 38°C で 18 時間インキュベートした。

その後各サンプルを 2000 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄み 180 μl を UV 測定用のマイクロプレートにとり、波長 450 nm における吸光度を micro-plate reader(Molecular Devices)を用いて測定した。ポジティブコントロールとして赤血球を蒸留水で希釈し完全溶血させたもの、ネガティブコントロールとしてサンプルの代わりに DMSO を 4 μl 加えたものを調製した。

$$\% \text{hemolysis} = (A - A_0) / (A_{100} - A_0) \times 100$$

A = absorbance of sample

A_{100} = absorbance of positive control

A_0 = absorbance of negative control

5-2-b 抗カビ活性試験

抗カビ試験用の培地には GP 寒天培地を用いた。培地成分は以下に示す通りである。

GP 寒天培地 (精製水 1L 当り)	
ブドウ糖	20 g
粉末酵母エキス (酵母エキス)	2 g
硫酸マグネシウム	0.5 g
ポリペプトン (カゼイン製ペプトン)	5 g
リン酸二水素カリウム	1 g
カンテン	15 g

GP 寒天培地の粉末 4.35 g を精製水 100 ml に溶かし、オートクレーブで 120°C、20 分間滅菌した。温かいうちに、培地 2 ml をシャーレに取り薄く広げ蓋をしてビニールテープで密閉した。この作業はクリーンベンチ内で行ない冷蔵庫に保存した。

この培地に別途培養しておいた黒コウジカビ (*A. niger*) を含む培地を薄く広げ、あらかじめサンプルを染み込ませておいたディスクをのせて、24°C、暗所でインキ

ュベートした。また、ネガティブコントロールとして DMSO のみを、ポジティブコントロールとして AmB を染み込ませた disk についても同時にを行い、活性の有無については、DMSO のみの disk の阻止円が消滅した時点でサンプルの阻止円が保持されているかどうかで判断した。

5-3 固体 NMR 測定

F-AmB methyl ester、[U-¹³C] AmB、Ergosterol を用いた測定

10 ml ナシ型フラスコにフッ素標識 AmB methylester **52** (2.1 mg, 2.2 μmol) と [U-¹³C] AmB (2.0 mg, 2.1 μmol, No.227-50%¹³C)、エルゴステロール (1.7 mg, 4.3 μmol)、DMPC (26.4 mg, 38.9 μmol) をとり、MeOH 1.92 ml と CHCl₃ 1.92 ml の混合溶媒に溶かした後、溶媒を留去し、フラスコの壁に薄膜を形成させた。真空下で終夜（16 時間）乾燥させ、完全に溶媒を除いた。アルゴン置換した後、10 mM HEPES 緩衝液 32 μl とミリ Q 水 1 ml を加え、voltex で水和させた。この時フラスコの壁についている膜は超音波を用いて落とした。凍結融解、voltex を 5 回繰り返し、完全に水和させた後、1.5 ml のエッペンチューブに移しかえ、凍結乾燥を終夜（16 時間）行った。パウダー状になったサンプルに D₂O 32 μl を加え、遠心操作、凍結融解、voltex、を繰り返し行い、完全に再水和を行いペースト状にした。水和サンプルを遠心分離機を用いてガラスインサートに移し変え、ボンドで密閉した。ガラスインサートを固体 NMR 測定用のローターにつめ、測定を行った。

F-AmB methyl ester、[U-¹³C] AmB methyl ester を用いた測定

10 ml ナシ型フラスコにフッ素標識 AmB methylester **52** (1.2 mg, 1.26 μmol) と [U-¹³C] AmB methyl ester (1.2 mg, 1.35 μmol, No.222-49%¹³C)、DMPC (17.7 mg, 26 μmol) をとり、MeOH 1.2 ml と CHCl₃ 1.2 ml の混合溶媒に溶かした後、溶媒を留去し、フラスコの壁に薄膜を形成させた。真空下で終夜（16 時間）乾燥させ、完全に

溶媒を除いた。アルゴン置換した後、10 mM HEPES 緩衝液 20 μ l とミリ Q 水 0.64 ml を加え、voltex で水和させた。この時フラスコの壁についている膜は超音波を用いて落とした。凍結融解、voltex を 5 回繰り返し、完全に水和させた後、1.5 ml のエッペンチューブに移しかえ、凍結乾燥を終夜（17 時間）行った。パウダー状になったサンプルに D₂O 20 μ l を加え、遠心操作、凍結融解、voltex、を繰り返し行い、完全に再水和を行いペースト状にした。水和サンプルを遠心分離機を用いてガラスインサートに移し変え、ボンドで密閉した。ガラスインサートを固体 NMR 測定用のローターにつめ、測定を行った。

測定条件

	図 3-6	図 3-8
scans	60960	32752
MAS frequency	5 kHz	5 kHz
temperature	30°C	30°C
spectral width	30 kHz	30 kHz
¹ H $\pi/2$ pulse width	3.5 μ s	3.5 μ s
¹³ C π pulse width	8 μ s	8 μ s
¹⁹ F π pulse width	12 μ s	12 μ s
CP contact time	1.5 ms	1.5 ms
pulse delay	4 s	4 s
dephasing time	16 ms	16 ms
¹⁹ F phase cycling	xy-8 $\phi_1(x, y, x, y)_4, \phi_2(x, y, -x, -y)_4$ $\phi_3(x, y, -x, -y, -x, -y, x, y)_2$ $\phi_4(-x, -y, x, y, x, y, -x, -y)_2$ $\phi_5(x, y, -x, -y, -x, -y, x, y, -x, -y, x, y, x, y, -x, -y)$	
¹³ C phase cycling		

謝辞

920MHz の NMR を測定して下さった分子研、魚住泰広教授、 笹川ひろあき博士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村田研究室で行われたものであり、研究生活の様々な面で御懇篤なる御指導、御助言を賜りました村田道雄教授に深く感謝致します。本研究を遂行するにあたり、直接の実験指導から常日頃より適切且つ丁寧な御助言及び多大な御助力を賜りました大石徹助教授に心から感謝致します。また、数々の適切な指導や有益な御助言、御討論いただきました松森信明助手に深く感謝致します。

研究のみならず日常生活においても様々な御助言をくださいました松岡 茂博士、葛西祐介博士、同期の丸吉京介博士、鳥飼浩平博士および、生体分子化学研究室の皆さんに深く感謝致します。

最後に、経済的、精神的に支えてくださいました両親に深く感謝致します。

付録

公表論文

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

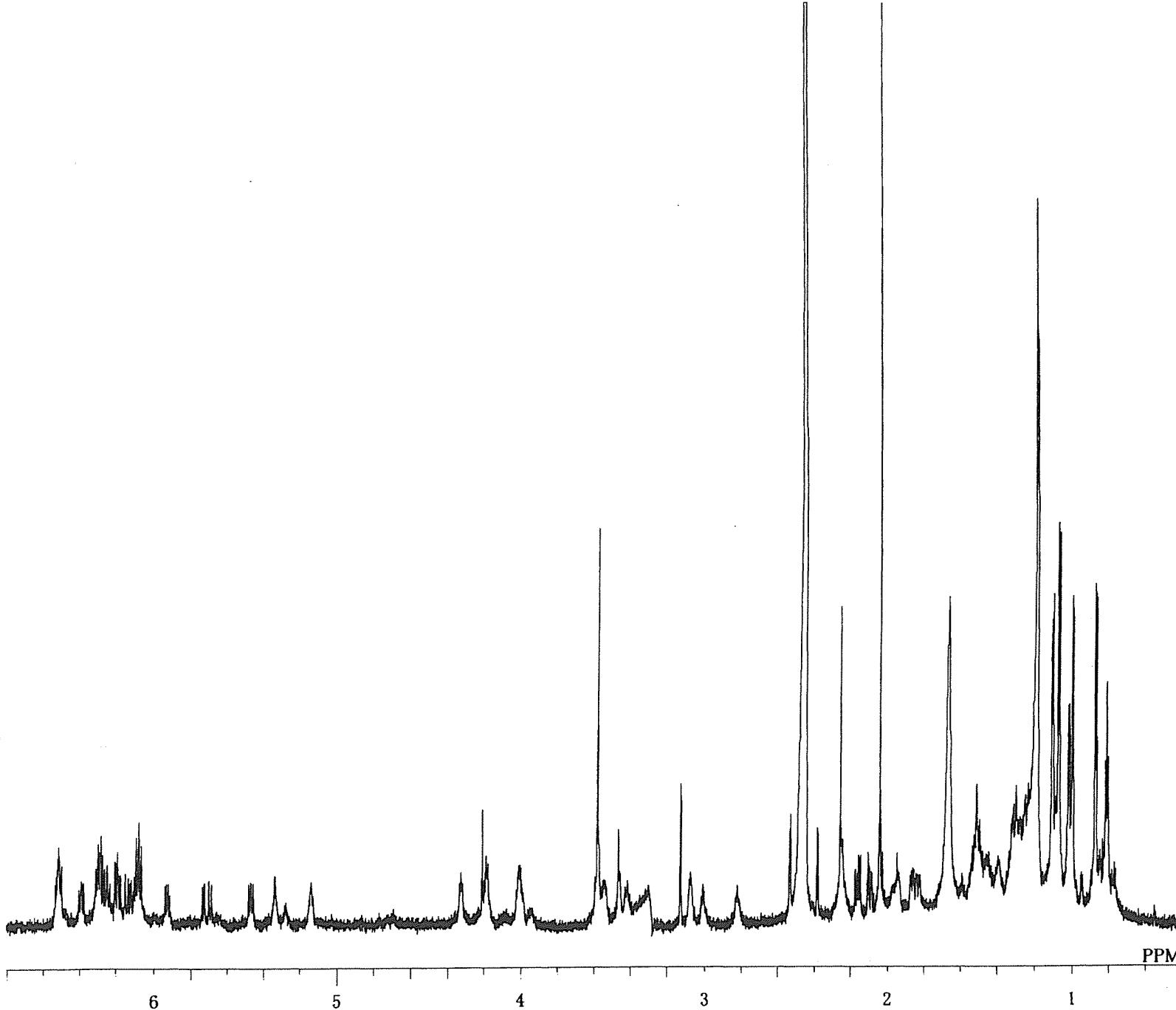
参考論文

Synthesis of endogenous sperm-activating and attracting factor isolated from ascidian *Ciona intestinalis*. Oishi, T., Tsuchikawa, H., Murata, M., Yoshida, M. and Morisawa, M. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 6387-6389.

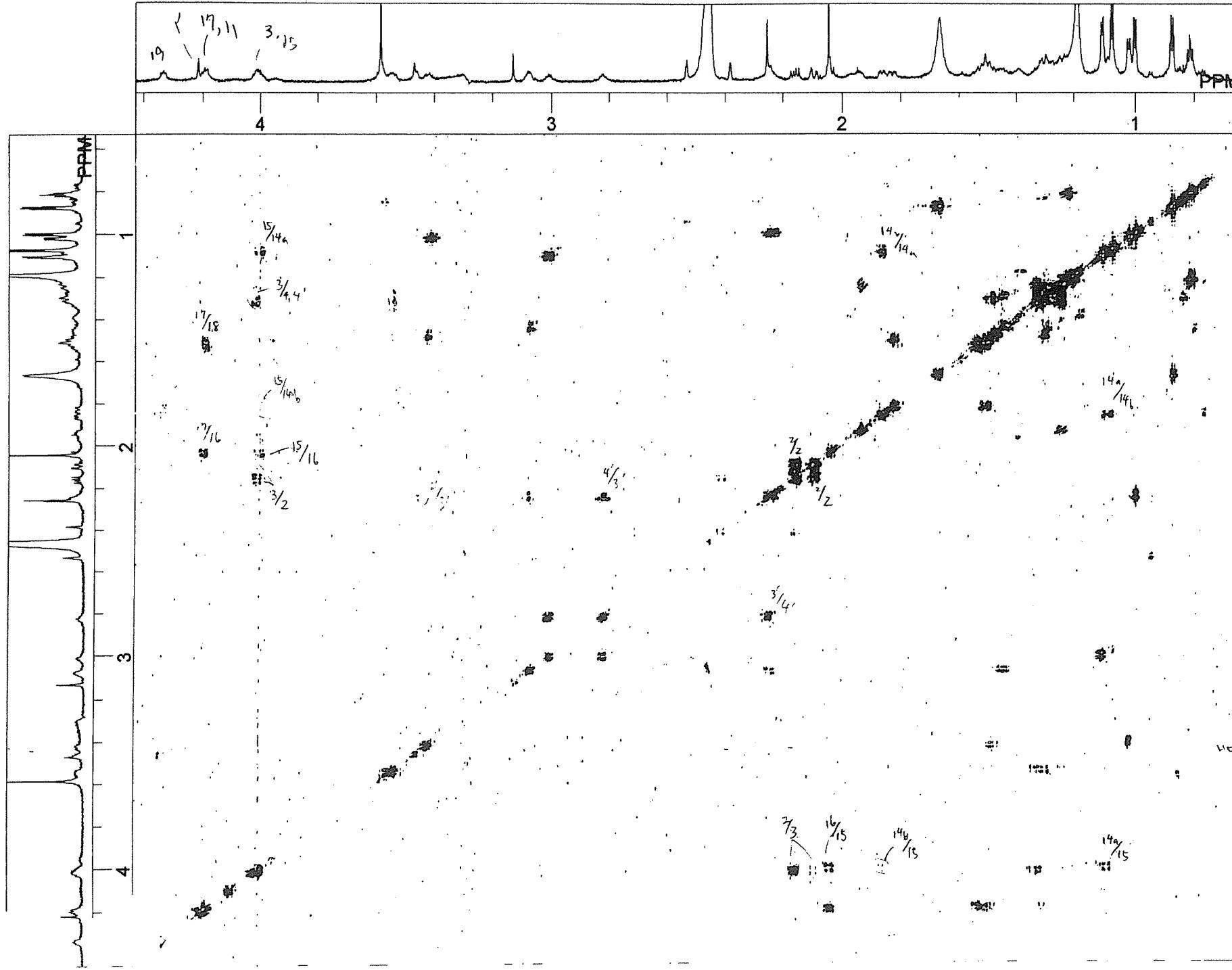
Synthesis of endogenous sperm activating and attracting factor isolated from ascidian *Ciona Intestinals*. Oishi, T., Tsuchikawa, H., Murata, M., Yoshida, M. and Morisawa, M. *Tetrahedron* **2004**, 60, 6971-6980.

DFILE F-AmB methyl ester.als
COMNT DMSO-d6, 30C
DATIM 28-11-2005 18:48:03
OBNUC 1H
EXMOD single_pulse.ex2
OBFRQ 920.70 MHz
OBSET 3.68 KHz
OBFIN 2.79 Hz
POINT 65541
FREQU 11510.13 Hz
SCANS 32
ACQTM 5.6938 sec
PD 4.3062 sec
PW1 3.73 usec
IRNUC 1H
CTEMP 30.0 c
SLVNT DMSO
EXREF 9.00 ppm
BF 0.80 Hz
RGAIN 60

2F-AmBメチルエーテル

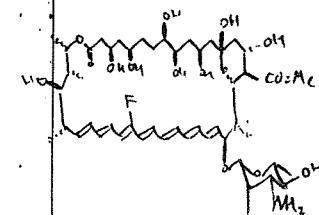


UHSU-ab, SU

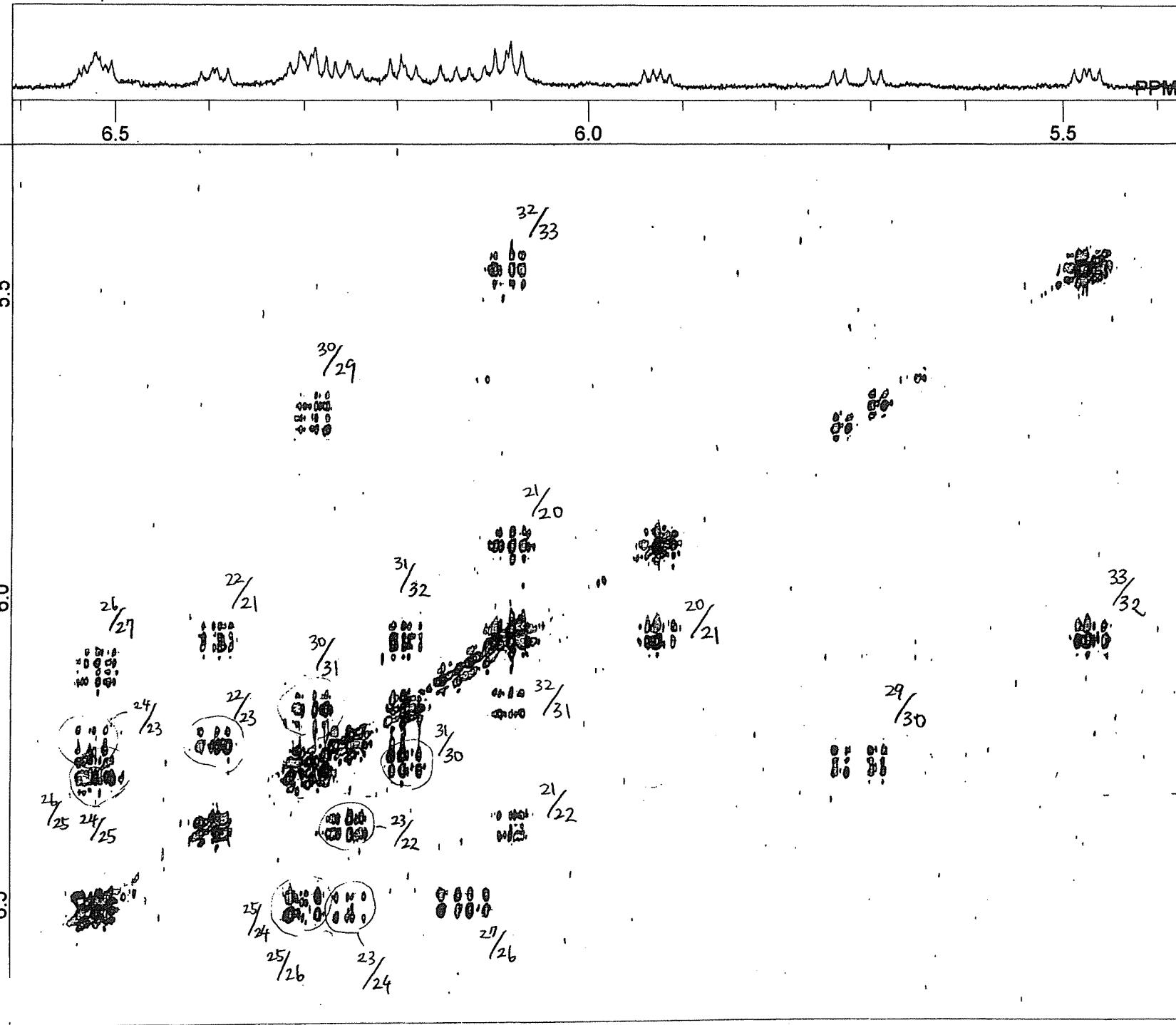


DFILE	C:\Docum
COMNT	DMSO-d6
DATIM	29-11-201
EXMOD	dqf_cosy.
OBNUC	1H
OBFRQ	920.7
OBSET	3.68
OBFIN	2.79
POINT	1310
FREQU	7367.4
CLPNT	179:
TODAT	438
CLFRQ	7365.9
SCANS	32
ACQTM	0.444
PD	1.500
PW1	7.47
PW2	0.00
PW3	0.00
PI1	0.000
PI2	0.000
PI3	0.000
IRNUC	1H
CTEMP	30.0
SLVNT	DMSO
EXREF	9.00
CLEXR	9.00
RGAIN	60

28-F-A+B×4ルエ入テル



DMSO-d6, 300



DFILE	C:\Docur
COMNT	DMSO-d
DATIM	29-11-20
EXMOD	dqf_cos)
OBNUC	1H
OBFRQ	920.
OBSET	3.6
OBFIN	2.7
POINT	131
FREQU	7367
CLPNT	179
TODAT	43
CLFRQ	7365
SCANS	32
ACQTM	0.44
PD	1.50
PW1	7.4
PW2	0.0
PW3	0.0
PI1	0.00
PI2	0.00
PI3	0.00
IRNUC	1H
CTEMP	30.
SLVNT	DMSO
EXREF	9.0
CLEXR	9.0
RGAIN	61

28-FAmBx4LWRTIL



Synthesis of 28-¹⁹F-amphotericin B methyl ester

Hiroshi Tsuchikawa, Naohiro Matsushita, Nobuaki Matsumori,
Michio Murata and Tohru Oishi*

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan

Received 9 June 2006; revised 27 June 2006; accepted 29 June 2006

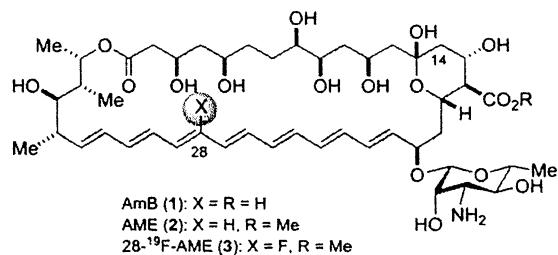
Available online 18 July 2006

Abstract—A fluorinated amphotericin B (AmB) derivative, 28-¹⁹F-AmB methyl ester (3), labeled at the polyene moiety, was synthesized by combining chemical synthesis with degradation of a natural product via cross-coupling reactions and macrolactonization. The fluorinated derivative 3 showed antifungal activity similar to that of AmB, and is expected to be a powerful tool for NMR-based investigation of the mechanism of ion-channel formation.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Amphotericin B (AmB, 1) is a polyene macrolide antibiotic which, despite its severe side effects, has long been used as a standard drug for treatment of deep-seated systemic fungal infections.¹ A variety of modified AmB products, such as amphotericin B methyl ester (AME, 2) and various amide, *N*-alkyl and *N*-acyl derivatives, have been prepared with the aim of developing more effective and less toxic drugs.² Although it is widely accepted that AmB associates with sterols in the phospholipid bilayer membrane of the target cell to form barrel-stave type pores,³ details of the molecular architecture of the ion-channel assembly remain unclear.^{4,5} We have been investigating the mode of action of the drug in lipid bilayer membranes, particularly the mechanism of ion-channel formation by AmB and sterol molecules, and molecular recognition between AmB/AmB,⁶ AmB/phospholipid,⁷ and AmB/sterol.⁸ In these experiments, ¹⁹F-labeled AmB derivatives are expected to be a versatile tool for examining intermolecular interactions via NMR, due to the particular properties of ¹⁹F: its nuclear spin of 1/2, high gyromagnetic ratio, 100% natural abundance, and low background signal in biological systems.⁹ Recently, we succeeded in preparing a bioactive fluorinated AmB derivative, (14*S*)-14-¹⁹F-AmB, labeled at the polyol side.¹⁰ We then turned our attention to fluorinated

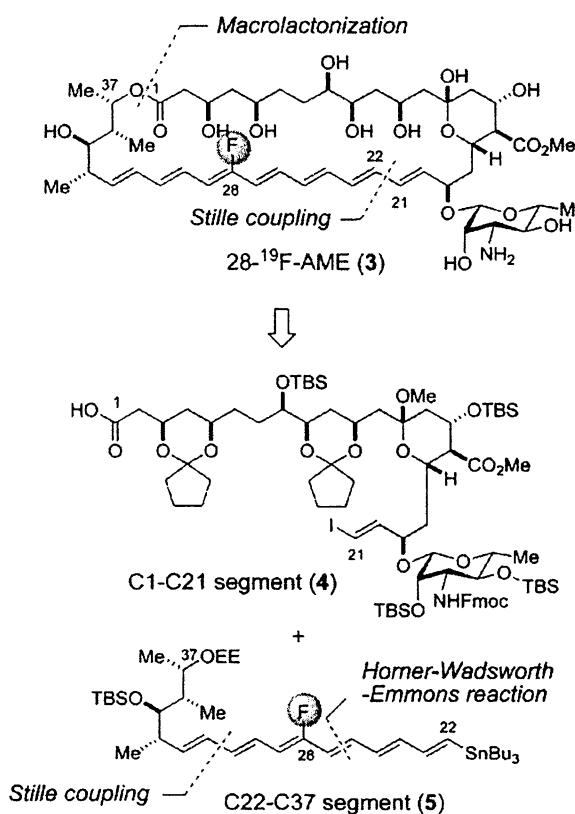
AME, which is expected to possess biological activities comparable to those of AmB, and should serve as a versatile intermediate for the preparation of covalent conjugates of AmB. Herein, we report a practical synthesis of 28-¹⁹F-amphotericin B methyl ester (28-¹⁹F-AME, 3), labeled at the polyene moiety, which is expected to be useful in NMR-based investigations of the mechanism of ion-channel formation.



Although total synthesis of AmB was achieved by Nicolaou in 1987,^{11,12} and remarkable progress has recently been made in the total synthesis of polyene macrolides,¹³ full assembly of the complex molecule can only be achieved over a large number of steps. For a practical and versatile synthesis of labeled AmB derivatives, we envisaged a hybrid synthetic strategy combining chemical synthesis and degradation of the natural product, as shown in Scheme 1. Compound 3, 28-¹⁹F-AME which seems to be most expeditiously prepared, was to be synthesized via a Stille coupling¹⁴–macrolactonization¹⁵ sequence, although until very recently there has been no precedent for this in the synthesis of polyene–polyol macrolides.¹⁶ The C1–C21 segment 4 was to be prepared

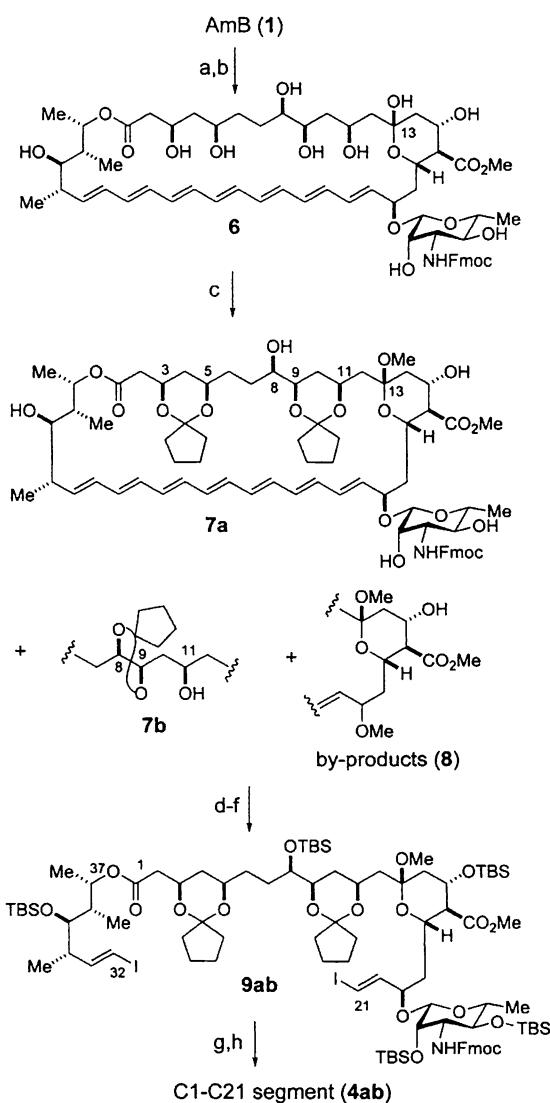
Keywords: Amphotericin B; Fluorine; Chemical synthesis; Degradation; Natural product; NMR.

* Corresponding author. Tel.: +81 6 6850 5775; fax: +81 6 6850 5785; e-mail: oishi@ch.wani.osaka-u.ac.jp

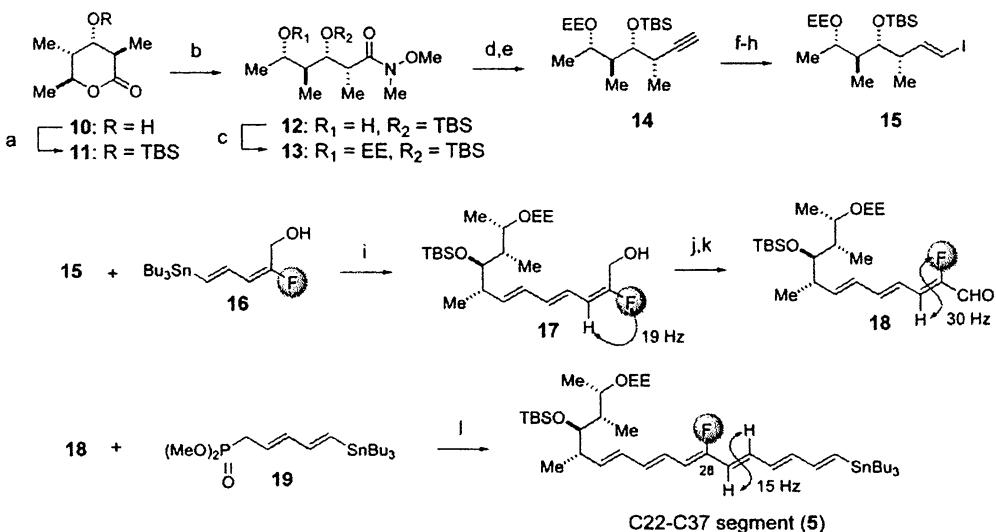
Scheme 1. Plan for synthesis of 28-¹⁹F-AME.

via degradation from natural AmB,¹⁷ which is commercially available in large quantities.¹⁸ In the synthesis of the ¹⁹F-labeled C22–C37 segment 5, Stille coupling and Horner–Wadsworth–Emmons reactions¹⁹ were envisioned for construction of the heptaene moiety.

Preparation of the C1–C21 segment 4 is depicted in Scheme 2. Treatment of AmB with 9-fluorenylmethylsuccinimidylcarbonate (Fmoc-OSu) followed by methyl iodide afforded 6 in 79% yield over two steps. In the synthesis of 3, the final deprotection steps, especially hydrolysis of the ketals under acidic conditions, were expected to be problematic due to the acid-labile property of AmB.^{11f} After considerable experimentation under both reported and modified conditions, cyclopentylidene ketals were chosen as protecting groups for the 1,3- or 1,2-diols (vide infra).²⁰ Thus, treatment of the polyol 6 with CSA and dimethoxycyclopentane in MeOH resulted in the formation of bis-ketals 7a and 7b as an inseparable mixture ($7a:7b = 1:1$), with conversion of the hemiketal at C13 to methyl ketal, and concomitant formation of deglycosidated by-products 8 (and/or other isomers, $7ab:8 = 1:0.2\text{--}1:0.4$). For synthesis of the C1–C21 segment, the remaining hydroxy groups of 7ab were protected as TBS ethers. Exhaustive ozonolysis of the heptaene moiety^{11c} followed by Takai olefination²¹ of the resulting dialdehyde gave bis(*trans*-iodoolefin) 9ab.¹⁷ Selective saponification in the presence of methyl ester with LiOH afforded the C1–C21 segment 4ab as an inseparable mixture of ketal regioisomers (removal of the Fmoc group occurred under saponification conditions, but re-protection was then carried out using Fmoc-OSu).

Scheme 2. Reagents and conditions: (a) Fmoc-OSu, pyridine, DMF, rt, 14.5 h; (b) CH_3I , Na_2CO_3 , DMF, rt, 3.5 h, 79% (2 steps); (c) cyclopentanone dimethyl acetal, CSA, MeOH, 30 min; (d) TBSOTf, 2,6-lutidine, CH_2Cl_2 , 0 °C, 50 min, 57% (2 steps); (e) O_3 , -78 °C, then PPh_3 , rt, 14 h, 57%; (f) CrCl_2 , CHI_3 , THF, rt, 18 h, 65%; (g) LiOH , THF, H_2O , MeOH, rt, 24 h; (h) Fmoc-OSu, pyridine, DMF, rt, 11 h, 50% (2 steps).

Synthesis of the C22–C37 segment 5 commenced with hydroxy δ -lactone 10, reported by Carreira,²² as shown in Scheme 3. Protection of the secondary alcohol of 10 as a TBS ether, followed by ring-opening of the lactone 11 by the action of Me_3Al , gave Weinreb amide 12.²³ The resulting secondary alcohol was protected as ethoxyethyl (EE) ether 13, which was converted to terminal alkyne 14 in two steps, that is, reduction with DIBAL and treatment of the resulting aldehyde with lithium trimethylsilyldiazomethane.²⁴ Hydrostannation²⁵ of 14, followed by treatment of the resulting alkenylstannane with iodine, afforded *E*-iodoolefin 15 (partial removal of the EE group occurred under these reaction conditions, but further treatment with ethyl vinyl ether resulted in recovery of 15). Stille coupling of 15 with fluorinated alkenylstannane 16²⁶ yielded 28E-fluoroolefin 17, which was further converted to unsaturated



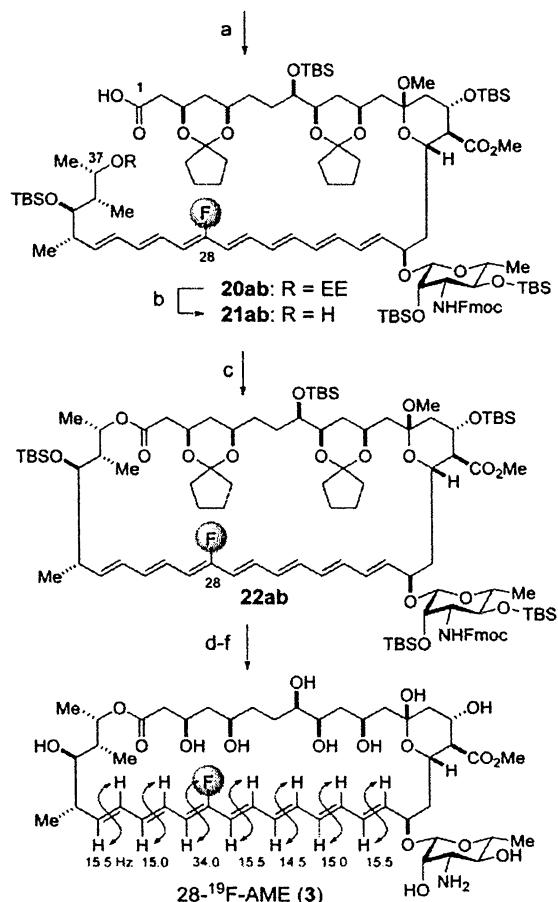
Scheme 3. Reagents and conditions: (a) TBSOTf, 2,6-lutidine, CH₂Cl₂, –45 °C, 40 min, 80%; (b) HNMeOMe HCl, Me₃Al, CH₂Cl₂, rt, 6 h; (c) ethyl vinyl ether, PPTS, CH₂Cl₂, rt, 2.5 h, 90% (2 steps); (d) DIBAL, THF, –78 °C, 50 min, 92%; (e) TMSCN₂, n-BuLi, THF, –78 °C then 0 °C, 80%; (f) n-Bu₃SnH, PdCl₂(PPh₃)₂, THF, 0 °C, 20 min, 89%; (g) I₂, THF, 0 °C, 10 min; (h) ethyl vinyl ether, PPTS, CH₂Cl₂, rt, 15 min, 86% (2 steps); (i) PdCl₂(MeCN)₂, DMF, rt, 1 h, 97%; (j) Dess–Martin periodinane, CH₂Cl₂, rt, 30 min; (k) PhSeSePh, hv, CH₂Cl₂, rt, 35 min, 68% (2 steps); (l) LiHMDS, THF, –78 °C then 0 °C, 84%.

aldehyde 28Z-18, as a single isomer, by Dess–Martin oxidation²⁷ and subsequent isomerization with PhSeSePh under irradiation by a tungsten lamp.²⁸ Horner–Wadsworth–Emmons reaction of stannylylphosphonate 19²⁹ with aldehyde 18 produced the fluorinated polyene segment 5 as a single isomer.

The critical sections of the present synthesis—Stille coupling of large segments 4ab (C1–C21) and 5 (C22–C37), and subsequent macrolactonization—were conducted as shown in Scheme 4. A mixture of iodide 4ab and stannane 5 in DMF was treated with Pd₂(dba)₃·CHCl₃ in the presence of Ph₃As and i-Pr₂NEt.³⁰ The coupling reaction, even in the complex polyene–polyol system, proceeded smoothly to afford heptaene 20ab in 70% yield.¹⁷ Selective removal of the EE group with PPTS in MeOH in the presence of cyclopentanone dimethylacetal (to avoid removing the cyclopentylidene ketals under the reaction conditions) gave 21ab in 79% yield. The next critical step was the unprecedented macrolactonization of the nonconjugated carboxylic acid, which was achieved using the method of Shiina et al.³¹ Lactonization of the seco acid 21ab by treatment with MNBA (2-methyl-6-nitrobenzoic anhydride) in the presence of DMAP in CH₂Cl₂ proceeded smoothly to afford the fluorinated macrolactone 22ab in 69% yield.

The final global deprotection steps were carried out under carefully controlled conditions. The TBS groups of 22ab were removed by treatment with 18% HF–pyridine in MeOH at 50 °C to yield a pentaol (82%), after which the Fmoc group was removed with piperidine (79%) prior to ketal hydrolysis to prevent the formation of deglycosidated by-products. Removal of the ketals with PPTS under mildly acidic conditions²⁰ proved to be too sluggish, and treatment with CSA in MeOH^{11f} followed by addition of water resulted in the formation of considerable amounts of mono-ketals with

C1-C21 segment (4ab) + C22-C37 segment (5)



Scheme 4. Reagents and conditions: (a) Pd₂(dba)₃·CHCl₃, AsPh₃, i-Pr₂NEt, THF, rt, 3 h, 70%; (b) PPTS, cyclopentanone dimethyl acetal, MeOH, rt, 1.5 h, 79%; (c) 2-methyl-6-nitrobenzoic anhydride, DMAP, CH₂Cl₂, rt, 1.5 h, 69%; (d) HF–pyridine, pyridine, MeOH, 50 °C, 27 h, 82%; (e) piperidine, MeOH, rt, 3 h, 79%; (f) HCl, MeOH, 0 °C, 34 h, then HCl, H₂O, t-BuOH, rt, 1 h, 53%.

decomposed by-products; however, stepwise removal of the ketals with HCl¹⁶ gave satisfactory results. The pentaol was treated with HCl in MeOH (86 mM) at 0 °C for methanolysis of the cyclopentylidene groups, and the reaction was then quenched by addition of solid NaHCO₃. After removal of the salts and solvents, the residue was treated with aqueous HCl (86 mM) at room temperature for hydrolysis of the methyl ketal, affording 28-¹⁹F-AME 3 in 53% yield.

The configuration of the heptaene moiety was unambiguously determined based on ³J_{H,H} and ³J_{H,F} values (Scheme 4) by 920 MHz ¹H NMR analysis.³² The anti-fungal activity of 3 against *Aspergillus niger* is comparable to that of AmB (MIC = 10 µg/disc)^{10,33} which suggests that the use of 3 may be a powerful tool for NMR-based investigations of the mechanism of ion-channel formation.

In summary, we have developed a practical and versatile method for synthesizing a fluorinated AmB derivative by combining chemical synthesis with degradation of a natural product. The present method should be applicable to the preparation of ¹³C-labeled AmB derivatives for solid-state NMR measurements; investigations in this area are currently in progress in our laboratory.

Acknowledgments

We are grateful to Professor Yasuhiro Uozumi and Dr. Hiroaki Sasagawa of the Institute for Molecular Science for measurement of 920 MHz ¹H NMR spectra. This work was supported by Grants-In-Aid for Scientific Research (Nos. 15201048 and 15350024), for Scientific Research in Priority Areas (A) (Nos. 12045243 and 16073211), and for Young Scientists (A) (No. 17681027) from MEXT, Japan.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.tetlet.2006.06.159.

References and notes

- Ellis, D. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002, 49, 7.
- (a) Chéron, M.; Cybulski, B.; Mazerski, J.; Grzybowska, J.; Czerwiński, A.; Borowski, E. *Biochem. Pharmacol.* 1988, 37, 827–836; (b) Czerwiński, A.; Zieniawa, T.; Borowski, E.; Micossi, L. G. *J. Antibiot.* 1990, 43, 680–683; (c) Paquet, V.; Carreira, E. M. *Org. Lett.* 2006, 8, 1807–1809.
- De Kruijff, B.; Demel, R. A. *Biochim. Biophys. Acta* 1974, 339, 57–70.
- (a) Fujii, G.; Chang, J.-E.; Coley, T.; Steere, B. *Biochemistry* 1997, 36, 4959–4968; (b) Millié, P.; Langlet, J.; Bergès, J.; Caillet, J.; Demaret, J.-P. *J. Phys. Chem. B* 1999, 103, 10883–10891; (c) Bonilla-Marin, M.; Moreno-Bello, M.; Ortega-Blake, I. *Biochim. Biophys. Acta* 1991, 1061, 65–77; (d) Khutorsky, V. E. *Biochim. Biophys. Acta* 1992, 1108, 123–127.
- (a) Zumbuehl, A.; Stano, P.; Heer, D.; Walde, P.; Carreira, E. M. *Org. Lett.* 2004, 6, 3683–3686; (b) Zumbuehl, A.; Jeannerat, D.; Martin, S. E.; Sohrmann, M.; Stano, P.; Vigassy, T.; Clark, D. D.; Hussey, S. L.; Peter, M.; Peterson, B. R.; Pretsch, E.; Walde, P.; Carreira, E. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2004, 43, 5181–5185.
- (a) Matsumori, N.; Yamaji, N.; Matsuoka, S.; Oishi, T.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 4180–4181; (b) Yamaji, N.; Matsumori, N.; Matsuoka, S.; Oishi, T.; Murata, M. *Org. Lett.* 2002, 4, 2087–2089; (c) Matsumori, N.; Masuda, R.; Murata, M. *Chem. Biodiversity* 2004, 1, 346–352.
- (a) Matsuoka, S.; Murata, M. *Biochim. Biophys. Acta* 2003, 1617, 109–115; (b) Matsuoka, S.; Matsumori, N.; Murata, M. *Org. Biomol. Chem.* 2003, 1, 3882–3884; (c) Matsuoka, S.; Ikeuchi, H.; Matsumori, N.; Murata, M. *Biochemistry* 2005, 44, 704–710.
- (a) Matsumori, N.; Eiraku, N.; Matsuoka, S.; Oishi, T.; Murata, M.; Aoki, T.; Ide, T. *Chem. Biol.* 2004, 11, 673–679; (b) Matsuoka, S.; Murata, M. *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1564, 429–434; (c) Matsumori, N.; Sawada, Y.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 10667–10675.
- Ulrich, A. S. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 2005, 46, 1–21.
- Matsumori, N.; Umegawa, Y.; Oishi, T.; Murata, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15, 3565–3567.
- Total synthesis of AmB, see: (a) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Chakraborty, T. K. *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 2208–2210; (b) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Chakraborty, T. K.; Ogawa, Y. *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 2821–2822; (c) Nicolaou, K. C.; Chakraborty, T. K.; Ogawa, Y.; Daines, R. A.; Simpkins, N. S.; Furst, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 4660–4672; (d) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Uenishi, J.; Li, W. S.; Papahatjis, D. P.; Chakraborty, T. K. *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 4672–4685; (e) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Chakraborty, T. K.; Ogawa, Y. *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 4685–4696; (f) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Ogawa, Y.; Chakraborty, T. K. *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 4696–4705.
- Synthetic studies of AmB, see: (a) Kennedy, R. M.; Abiko, A.; Takemasa, T.; Okumoto, H.; Masamune, S. *Tetrahedron Lett.* 1988, 29, 451–454; (b) McGarvey, G. J.; Mathys, J. A.; Wilson, K. J. *J. Org. Chem.* 1996, 61, 5704–5705; A recent review, see: (c) Cereghetti, D. M.; Carreira, E. M. *Synthesis* 2006, 914–942.
- Rychnovsky, S. D. *Chem. Rev.* 1995, 95, 2021–2040.
- (a) Stille, J. K. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1986, 25, 508–524; (b) Nicolaou, K. C.; Bulger, P. G.; Sarlah, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2005, 44, 4442–4489.
- Parenty, A.; Moreau, X.; Campagne, J.-M. *Chem. Rev.* 2006, 106, 911–939.
- Denmark, S. E.; Fujimori, S. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 8971–8973.
- Rogers, B. N.; Selsted, M. E.; Rychnovsky, S. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997, 7, 3177–3182.
- Natural AmB (50 g) was purchased from Nacalai Tesque, Inc.
- (a) Wadsworth, W. S., Jr.; Emmons, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* 1961, 83, 1733–1738; (b) Maryanoff, B. E.; Reitz, A. B. *Chem. Rev.* 1989, 89, 863–927.
- Evans, D. A.; Connell, B. T. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 10899–10905.
- Takai, K.; Nitta, K.; Utimoto, K. *J. Am. Chem. Soc.* 1986, 108, 7408–7410.

22. Tholander, J.; Carreira, E. M. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 613–622.
23. Nahm, S.; Weinreb, S. M. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3815–3818.
24. (a) Colvin, E. W.; Hamill, B. J. *Chem. Commun.* **1973**, 151–152; (b) Miwa, K.; Aoyama, T.; Shioiri, T. *Synlett* **1994**, 107–108.
25. Zhang, H. X.; Guibé, F.; Balavoine, G. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1857–1867.
26. Shinada, T.; Sekiya, N.; Bojkova, N.; Yoshihara, K. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 3675–3686.
27. Dess, D. B.; Martin, J. C. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155–4156.
28. Ushakov, E. N.; Lednev, I. K.; Alfimov, M. V. *Doklady Akademii Nauk SSSR* **1990**, *313*, 903–907.
29. Paquette, L. A.; Pissarnitski, D.; Barriault, L. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7389–7398.
30. Sinz, C. J.; Rychnovsky, S. D. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 6561–6576.
31. Shiina, I.; Kubota, M.; Ibuka, R. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7535–7539.
32. Compound 3: Chemical shifts are reported in δ (ppm) using residual DMSO as an internal standard of δ 2.50 for ^1H NMR, and DMSO- d_6 as that of δ 39.50 for ^{13}C NMR, respectively. ^1H NMR (920 MHz, DMSO- d_6) δ 6.56 (1H, dd, J = 14.5, 12.0 Hz, H24), 6.56 (1H, dd, J = 15.5, 11.0 Hz, H26), 6.43 (1H, dd, J = 15.0, 10.5 Hz, H22), 6.34 (1H, dd, J = 14.5, 11.0 Hz, H25), 6.33 (1H, dd, J = 15.0, 11.0 Hz, H30), 6.29 (1H, dd, J = 15.0, 12.0 Hz, H23), 6.23 (1H, dd, J = 15.0, 10.5 Hz, H31), 6.17 (1H, dd, J = 28.0, 15.5 Hz, H27), 6.12 (1H, dd, J = 15.5, 10.5 Hz, H32), 6.12 (1H, dd, J = 15.5, 10.5 Hz, H21), 5.96 (1H, dd, J = 15.5, 9.0 Hz, H20), 5.75 (1H, dd, J = 34.0, 11.0 Hz, H29), 5.51 (1H, dd, J = 15.5, 9.5 Hz, H33), 5.18 (1H, m, H37), 4.37 (1H, m, H19), 4.25 (1H, s, H1'), 4.23 (2H, m, H11, H17), 4.05 (1H, m, H3), 4.03 (1H, m, H15), 3.62 (3H, s, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 3.59 (1H, m, H5), 3.51 (1H, br s, H2'), 3.46 (1H, m, H9), 3.12 (1H, m, H35), 3.11 (1H, m, H8), 3.05 (1H, m, H5'), 2.86 (1H, m, H4'), 2.29 (2H, m, H3', H34), 2.20 (1H, dd, J = 16.5, 9.0 Hz, H2a), 2.14 (1H, dd, J = 16.5, 3.0 Hz, H2b), 2.08 (1H, m, H16), 1.90 (1H, dd, J = 12.0, 5.0 Hz, H14_{eq}), 1.87 (1H, dd, J = 16.0, 5.5 Hz, H18a), 1.71 (1H, m, H36), 1.55 (1H, m, H18b), 1.48–1.57 (2H, m, H10), 1.45–1.53 (2H, m, H7), 1.26–1.40 (6H, m, H4, H6, H12), 1.15 (3H, d, J = 6.0 Hz, H6'), 1.13 (1H, m, H14_{ax}), 1.12 (3H, d, J = 6.5 Hz, H38), 1.04 (3H, d, J = 6.5 Hz, H40), 0.91 (3H, d, J = 7.0 Hz, H39); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 172.82, 170.15, 156.20 (d, $^1J_{\text{CF}} = 252$ Hz), 137.22, 137.13, 136.72, 136.11, 135.97, 134.51, 132.45, 131.36, 131.04, 130.68, 129.75 (d, $^2J_{\text{CF}} = 14.5$ Hz), 128.73, 123.08, 121.65, 97.38, 97.24, 96.66, 73.80, 73.36, 73.14, 72.96, 70.02, 69.84, 69.28, 69.13, 67.15, 66.56, 65.87, 64.58, 56.82, 56.46, 45.90, 44.52, 44.14, 42.44, 42.26, 41.07, 36.80, 34.90, 28.98, 18.46, 17.97, 17.06, 11.96.; ESI-MS, m/z 978 ($\text{M}+\text{Na}^+$); UV: λ_{max} (DMSO) 416 nm ($\epsilon_{\text{max}} = 1.02 \times 10^5$); HPLC conditions: column, COSMO-SIL® 5C₁₈-MS-II ($\phi 10 \times 250$ mm, Nacalai Tesque Inc.); flow rate, 1.5 mL/min; solvent system, 70% MeOH in ammonium acetate buffer to 100% MeOH in 30 min, $t_R = 24.7$ min; detection, $\lambda = 408$ nm.
33. Mazerski, J.; Bolard, J.; Borowski, E. *Biochem. Biophys. Acta* **1995**, *1236*, 170–176.