The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Cortistatin A由来抗腫瘍リード化合物の改良合成法の開発と標的同定への応用 |
| Author(s) | 伊藤, 葵 |
| Citation | 大阪大学, 2017, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://doi.org/10.18910/61700 |
| rights | |
| Note | |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

# Cortistatin A 由来抗腫瘍リード化合物の改良合成法の開発と標的同定への応用

2017 年

伊藤　葵

# 目次

緒論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
本論
第一章 Cortistatin A アナログ化合物の合成研究・・・・・・・・・・・・・・10
第一節 アナログ化合物の改良合成法の確立・・・・・・・・・・・・・・ 10
第二節 新規アナログ化合物の合成と活性評価・・・・・・・・・・・・・17

第二章 Cortistatin A の標的分子の解明研究・・・・・・・・・・・・・・ 23
第一節 研究背景と着想に至った経緯・・・・・・・・・・・・・・・・・23
第二節 ビオチン化プローブの合成・・・・・・・・・・・・・・・・・・25
第三節 プローブ分子を用いた標的分子の探索・・・・・・・・・・・・・28

結論 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・31

謝辞 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・32

実験の部・・ ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・33

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・61

# 略語表

Ac : acetyl

Bpy : 2,2’-bipyridine

DEAD : diethyl azodicarboxylate

DIBAL-H : diisobutylaluminum hydride

DIPEA : *N*,*N*-diisopropylethylamine

DMF : *N*,*N*-dimethylformamide

EDCI・HCl : 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

HMDS : 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane

HMPA : hexamethylphosphoramide

HOBt : 1-hydroxybenzotriazole

HUVEC : human umbilical vein endothelial cell

IBX : *o*-iodoxybenzoic acid

iPr : isopropyl

KHMDS : potassium bis(trimethylsilyl)amide

MOM : methoxymethyl

NP-40 : nonidet P-40

PBS : phosphate buffered saline

Pd(dppf)$Cl_2$ : bis(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium(II)

pin : pinacolate

PPTS : pyridinium *p*-toluenesulfonate

S.I. : selective index ($IC_{50}$ against KB3-1/$IC_{50}$ against HUVEC)

TBAF : tetrabutylammonium fluoride

TBDPSCl : *tert*-butylchlorodiphenylsilane

TBS : *tert*-butyldimethylsilyl

TCEP・HCl : tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride

Tf : trifluoromethanesulfonyl

TEA : triethylamine

TFA : trifluoroacetic acid

THF : tetrahydrofuran

TMS : trimethylsilyl

WST-8 : water-soluble tetrazolium-8

# 緒論

がんは、日本人の死因において依然トップの疾患であり、現在もなお罹患率は増加傾向にある。一方で近年、分子生物学の研究が飛躍的に進み、抗体医薬 nivolumab (Opdivo®) などがんにより亢進した遺伝子やタンパク質の機能を抑制する分子標的薬の開発が盛んに行われている。また、がん細胞の周囲を取り囲む間質細胞もがん治療の標的と捉えて治療に生かそうという試みがなされており、特にがん微小環境に存在する腫瘍血管は、がん細胞のみならず、間質の細胞をも養っており、それらを標的とする治療が重要視されている。

腫瘍が増殖や転移するには、栄養と酸素を獲得して老廃物・代謝産物を運び出すために血管新生が必要になる。がん血管新生は、虚血に陥った組織において低酸素や増殖因子の影響などでがん細胞が vascular endothelial growth factor (VEGF) や basic fibroblast growth factor (bFGF) などの血管新生促進因子を放出することで誘導される。血管新生促進因子の刺激により、血管内皮細胞が活性化され、matrix metalloproteinase (MMP) 類の産生による血管基底膜の消化、内皮細胞の増殖と遊走、管腔形成といった過程を経て、新生血管を形成することが知られている。腫瘍内に侵入した新生血管はがん細胞の全身血流への侵入経路の役割も果たし、がんの転移の足掛かりとなるため、血管新生を阻害することができれば、がん細胞特異的に増殖を抑制し、がん転移にも抑制効果を示すことが期待される。血管新生阻害療法は全ての固形がんに共通する血管新生を標的としているため、多くの癌腫で抗がん剤との併用で相乗効果が認められている。しかし、血管新生を標的とした治療薬は bevacizumab (Avastin®) や sorafenib (Nexavar®) に代表されるように正常血管にも必須である VEGF 経路を遮断することによる副作用の問題もあり、依然として新たな作用メカニズムを有する薬剤の開発が望まれている。[1)]

こうした背景のもと、著者の研究室ではがん血管新生に関わる分子全体を標的とできるフェノタイプスクリーニングを用いた新規活性物質の探索研究を行ってきている。具体的には、上述した血管新生の過程全てに関わっている血管内皮細胞を格好のターゲットと考え、他の細胞と比較して、血管内皮細胞に対して選択的に増殖阻害活性を示す化合物を見いだすべく、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) およびヒト咽頭上皮がん細胞 KB3-1 に対する増殖阻害活性試験の結果を指標とした、天然薬物資源由来の血管新生阻害物質の探索研究を進めている。本スクリーニング系を用いて、これまでに大環状ブロモチロシン誘導体 bastadin 類や新規イソマラバリカン型トリテルペン globostellatic acid 類など種々の化合物が HUVEC 選択的な増殖阻害活性を有することを見出すととも

に、それらの合成研究なども展開している　(Figure 1)。[2-4)]

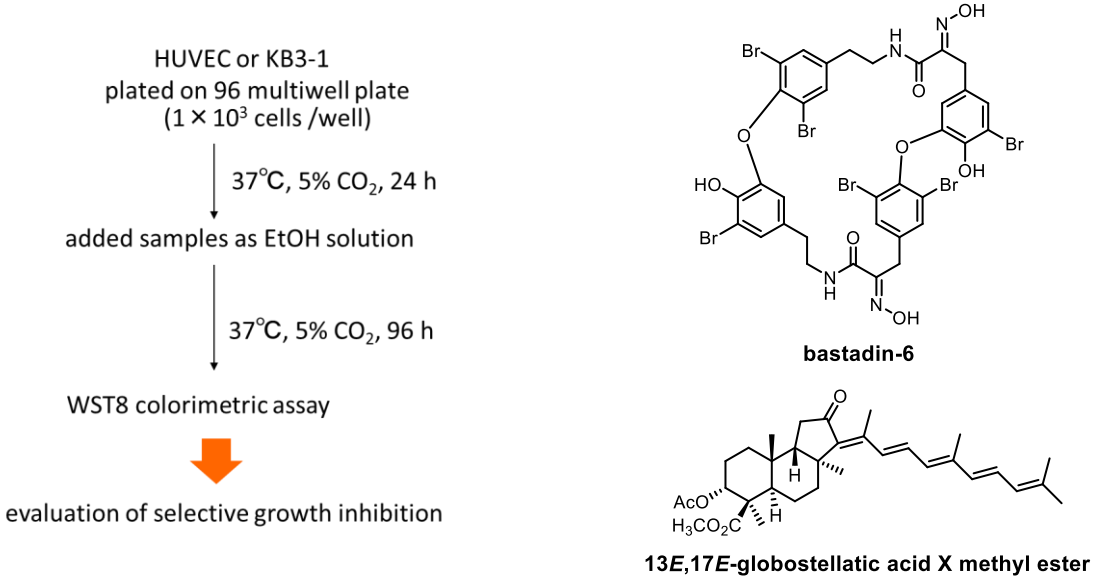
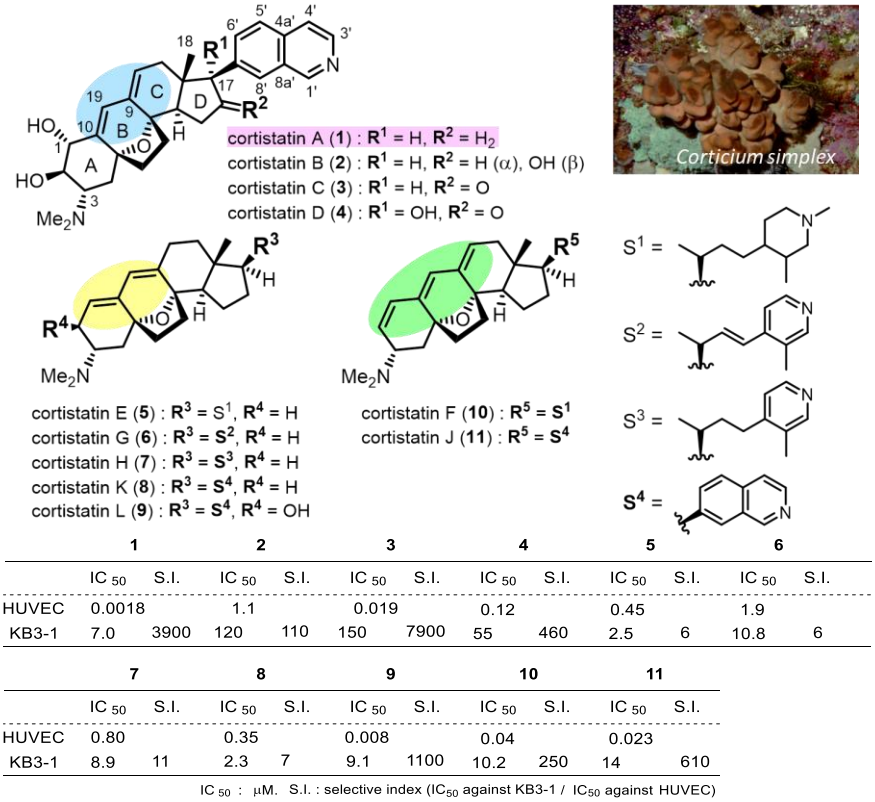



**Figure 1. 血管新生阻害物質のスクリーニング法と活性物質の例**

こうした中、2006 年にインドネシア産海綿 *Corticium simplex* の MeOH 抽出エキスから、HUVEC に対して強力かつ高選択的な増殖抑制効果を示す新規アルカロイド cortistatin 類を見出している。[5-7)] Cortistatin 類はいずれも変異ステロイド骨格を有するアルカロイドであり、その B 環部分に特徴的な oxabicyclo[3.2.1]octene 構造を有している。主活性成分である cortistatin A (**1**) は $IC_{50}$ が 1.8 nM というごく低濃度で血管内皮細胞の増殖を抑制し、他のがん細胞や正常細胞と比較して 3000 倍以上の選択性を示すことを明らかにしている（Figure 2）。また、詳細は後述するが、既存の血管新生阻害剤とは異なる経路で作用していることも明らかにしており、新規抗がん剤シーズとして非常に有望な化合物である。[8)] しかしながら、海綿から単離された量はごくわずかであり、*in vivo* での活性評価や詳細な作用メカニズムの解析などを行うためには、化学合成による供給が不可欠であった。




| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | 6 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $IC_{50}$ | S.I. | $IC_{50}$ | S.I. | $IC_{50}$ | S.I. | $IC_{50}$ | S.I. | $IC_{50}$ | S.I. | $IC_{50}$ | S.I. |
| HUVEC | 0.0018 | | 1.1 | | 0.019 | | 0.12 | | 0.45 | | 1.9 | |
| KB3-1 | 7.0 | 3900 | 120 | 110 | 150 | 7900 | 55 | 460 | 2.5 | 6 | 10.8 | 6 |

| | 7 | | 8 | | 9 | | 10 | | 11 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $IC_{50}$ | S.I. | $IC_{50}$ | S.I. | $IC_{50}$ | S.I. | $IC_{50}$ | S.I. | $IC_{50}$ | S.I. |
| HUVEC | 0.80 | | 0.35 | | 0.008 | | 0.04 | | 0.023 | |
| KB3-1 | 8.9 | 11 | 2.3 | 7 | 9.1 | 1100 | 10.2 | 250 | 14 | 610 |

$IC_{50}$ : μM. S.I. : selective index ($IC_{50}$ against KB3-1 / $IC_{50}$ against HUVEC)

**Figure 2. Cortistatin 類の構造**

Cortistatin A (**1**)の特異な化学構造と顕著な生物活性は世界中の有機合成化学者の注目を集め、全合成研究が盛んに行われた結果、すでに数例の不斉全合成が達成されている。以下に、これまでに報告されている **1** の全合成例の概略を示す（Figure 3）。

Shair らのグループは、環拡大反応と aza-Prins cyclization を鍵反応として B 環部、A 環部を順次構築している。[9] また、Hirama らのグループは、aldol 反応に続く電子環状反応とラジカル環化を利用し、Nicolaou らのグループは、1,4 付加に続く aldol 反応を利用して B 環部を構築し、cortistatin A の全合成を達成している。[10, 11] 一方、Myers らは olefin metathesis を、Sarpong らは enyne cycloisomerization を利用して B 環部 7 員環を構築し、続いて超原子価ヨウ素試薬を用いたエーテル環架橋の構築に成功し、全合成を達成している。[12,13] 一方、Baran らのグループは、環拡大反応を利用し cortistatin A の全合成を達成した。Baran らの全合成は、ステロイド化合物を出発物質とし、$SmI_2$ をを用いた環拡大反応を鍵反応とすることで、他の全合成例と比べ短工程で全合成を達成している。[14] しかし、最終工程での 16 位のオレフィンの位置選択的な還元が、グラムスケールで再現よく行えないことが報告されており、天然物の大量供給の観点からみると、改善の余地がある。

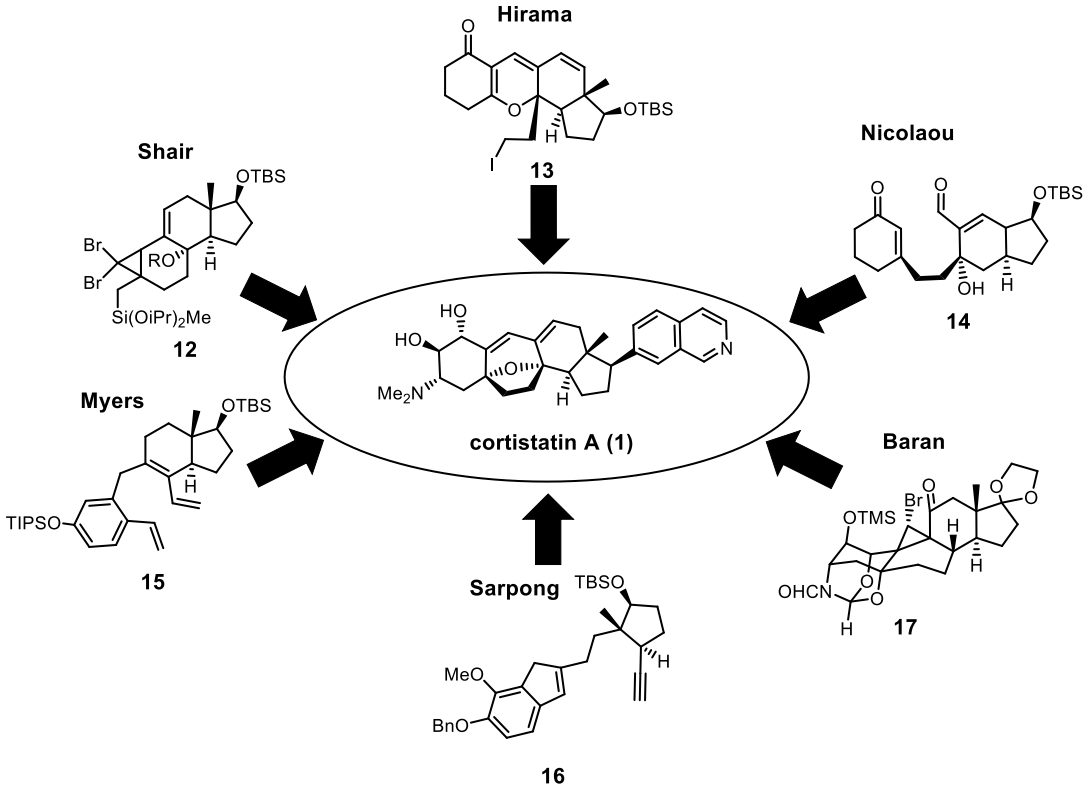



**Figure 3. Cortistatin A (1)の全合成研究例**

著者らの研究室においても全合成研究を行っており、分子内 Heck 反応を鍵反応とした B 環部の構築に成功し、主炭素骨格の合成を達成している(Figure 4)。[15] しかし、その炭素骨格構築には多工程を必要としており、上述の全合成例を含め、cortistatin 類を実用的なレベルで大量供給することは極めて困難である。

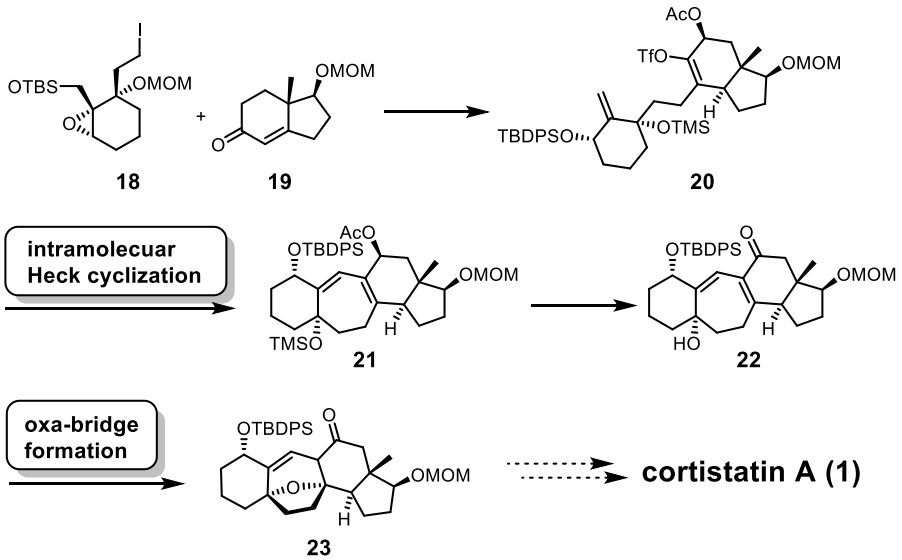
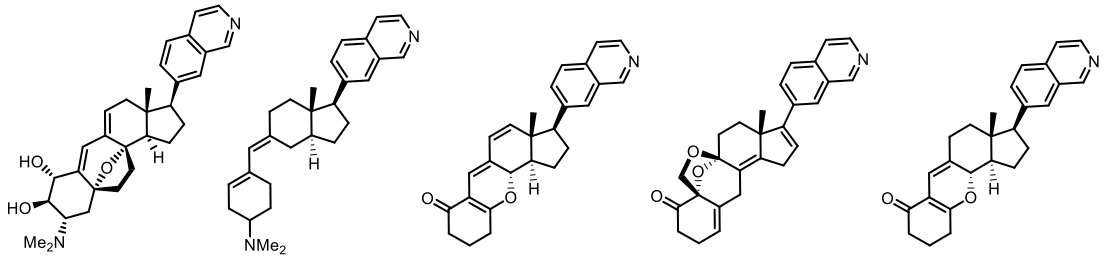



**Figure 4. 当研究室での cortistatin A (1)の全合成研究**

そこで、著者らは、新規医薬リード化合物の創製を目指して、より簡便に合成できる cortistatin A のアナログ化合物の合成研究に着手した。天然より得られた cortistatin 類縁体の構造活性相関の結果をもとに、活性発現において最も重要であることが示唆されたイソキノリン側鎖およびその周辺構造を保持しつつ、複雑な構造ゆえ骨格構築に多工程を要する AB 環部を簡略化したアナログ化合物が有効であると考え、種々の化合物を設計・合成し、活性評価を行ってきた。Figure 5 にその一部を示す。

Analog A は、最安定コンフォマーにおいて、活性発現に重要であると考えられるイソキノリン環とジメチルアミノ基の空間配置が cortistatin A と類似するように設計したが、期待していたような活性発現は得られなかった。一方、B 環部分をピラン環とし、cortistatin A と同様の、自由度が低く平面的な骨格を有するように設計した analog B では、HUVEC に対する $IC_{50}$ が 0.1 μM、KB3-1 細胞との選択性が 105 倍と、良好な結果を得ることができた。また、天然物がもつような cytostatic な活性を有し、*in vitro*、 *in vivo* においても比較的良好な血管新生阻害活性を示す魅力的な化合物であった。よって、analog 化合物の活性発現には、自由度が低く平面的な四環性骨格が重要であることが分かる。一方、より簡便に四環性骨格を構築するため、B 環部をケタール骨格とした analog C では、期待したような強い活性は見られなかった。分子力場計算による最安定配座を解析した結果、ABC 環が折れ曲がった平面的でない構造である可能性が高いため、やはり母核部分が平面的な構造を有することが標的分子との結合に重要であることが示唆された。

種々検討の結果、有望なリード化合物として、analog B の C 環部分の二重結合を還元した analog O (**27**)を見いだした。[16] **27** は HUVEC に対する $IC_{50}$ が 35 nM、KB3-1 細胞との選択性が 300 倍と、analog B よりも活性が強く、著者の研究室でこれまで合成したアナログ化合物の中でも、最も活性の強いものとなった。[15]




| | cortistatin A (**1**) | | analog A (**24**) | | analog B (**25**) | | analog C (**26**) | | analog O (**27**) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $IC_{50}$ | S.I. | $IC_{50}$ | S.I. | $IC_{50}$ | S.I. | $IC_{50}$ | S.I. | $IC_{50}$ | S.I. |
| HUVEC | 0.0018 | | 2.0 | | 0.1 | | 3.3 | | 0.035 | |
| KB3-1 | 7.0 | 3900 | 18 | 9.0 | 10.5 | 105 | 10 | 30 | 10.5 | 300 |

$IC_{50}$ : μM

**Figure 5. 合成アナログ化合物の活性評価**

さらに analog O (**27**)については、*in vivo* においても有効性を示すことをあきらかにしている。すなわち、マトリゲルプラグアッセイを用いた血管新生阻害活性試験において、**27** は 10 mg/kg の経口投与により、bFGF 刺激による新生血管の誘導を非投与群と比較して有意に阻害することがわかっている（Figure 6）。

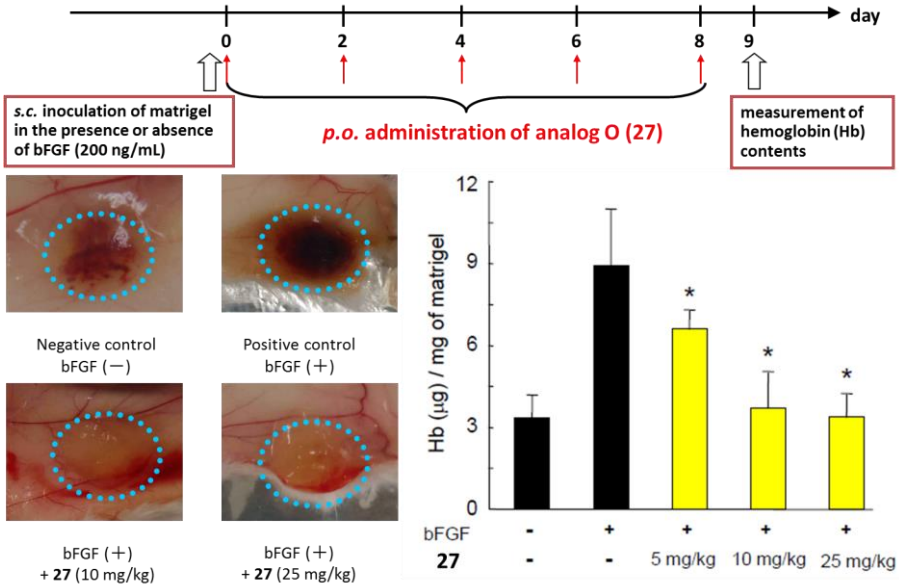



**Figure 6.　Analog O (27)の *in vivo* 血管新生阻害活性**

また、マウス肉腫 S180 細胞移植モデルマウスを利用し、抗腫瘍活性についても評価を行った結果、**27** は 25 mg/kg 以上の経口投与で、腫瘍重量がコントロールの 90%以下に減少することを見いだしている（Figure 7）。

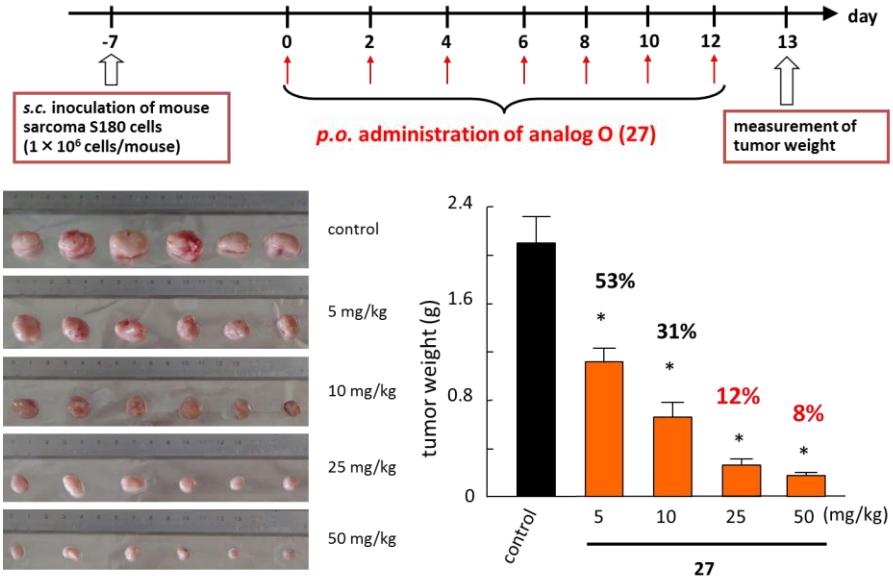
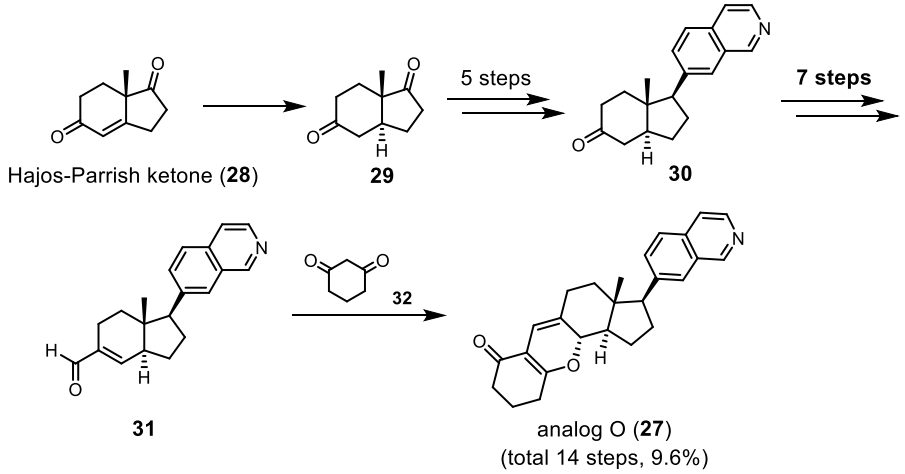


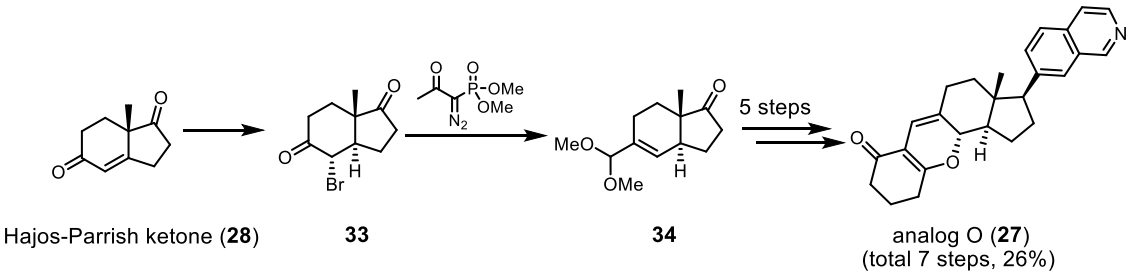

**Figure 7.　Analog O (27)の *in vivo* 抗腫瘍活性**

そこで、著者は analog O (**27**)を重要な抗がんリード化合物と位置づけ、詳細な構造最適化を行うことで、さらに優れた抗がんリード化合物を創出することができると考えた。しかし、先の合成法には、いくつかの問題点があった（Scheme 1）。まず、全 14 工程のうち、C 環部分の変換に 7 工程を必要としており、総収率の低減の原因となっていることである。また、C 環部分の変換の前に活性発現に重要なイソキノリン側鎖を導入しているため、様々な側鎖を導入したアナログ化合物の合成が困難になっている。そこで今回、私は多様な類縁体を効率よく合成するために、**27** をより短工程かつ高収率で合成できる方法論の開発を目指して検討を行った。




**Scheme 1. 従来の analog O (27)の合成法**

その結果、Hajos-Parrish ケトン (**28**) を出発物質として用い、立体選択的な 1,4-還元の後、生じたエノラートを臭素で捕捉して文献既知の α-ブロモケトン **33** を得、その後に大平–Bestmann 試薬を作用させることにより、[17] 二重結合を有するアセタール体 **34** を収率よく得ることができた。[18, 19] 続いてイソキノリン環の導入、アセタールの加水分解など 5 工程を経て、**27** を合成することに成功した (Scheme 2)。この改良合成法では、**28** から 7 工程、総収率 26%と、短工程かつ高収率で **27** を得ることが可能であり、従来法と比較して工程数を大幅に改善することができた (第一章、第一節)。




**Scheme 2. Analog O (27)の改良合成法**

次に本法を応用し、新規アナログ化合物の合成を行った。天然の cortistatin 類縁体の構造活性相関研究から、A 環部分の極性官能基も活性発現に影響を与えていることが示唆されていた。また、Corey らによってイソキノリン環の置換位置の異なるアナログ化合物で良好な活性を持つものが存在することが報告されていた。[20] そこで、analog O (**27**) を基盤として、A 環部分に極性官能基としてヒドロキシメチル基、アセトアミド基を導入した化合物、およびイソキノリン側鎖の構造変換を行った化合物の合成を検討し、活性評価を行った (Figure 8)。その結果、cortistatin A (**1**) に匹敵するような HUVEC 選択的な増殖阻害活性を有するアナログ化合物の創製に成功した (第一章、第二節)。

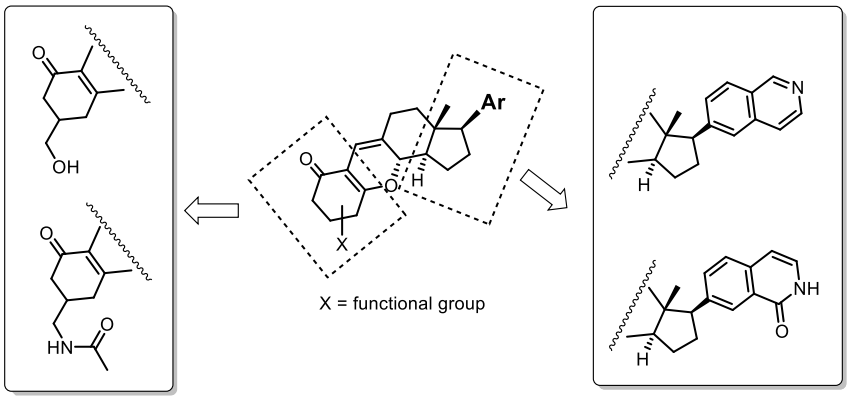



**Figure 8. 新規アナログ化合物の合成計画**

一方で、cortistatin A (**1**) を超えるような強力な活性を示す医薬リード化合物の創製に向けた構造最適化を合理的に進めるには、**1** の標的分子を明らかにし、その構造情報をもとに化合物を設計・合成することが最も効率的な方法である。そこで著者は、今回新たに開発した活性アナログ化合物由来のプローブ分子を合成し、これを用いたプルダウン実験を行うことで、cortistatin A (**1**)の標的分子解析を検討した。

著者の研究室では近年、プローブ分子の系統的な合成法を確立しており、これを用いてプローブ分子を合成することとした。[21,22] リンカーや捕捉補助基であるフェニルジアジリン、ビオチンタグなどを導入した共通前駆体と、マレイミド基を導入したリガンドと反応させることで、目的のプローブ分子を合成した。また、活性のないアナログ化合物から同様の方法でプローブ分子を合成し、ネガティブコントロール化合物とした (Figure 9)。これらのプローブ分子を用いてプルダウン実験を行い、標的分子の同定を検討した (第二章)。

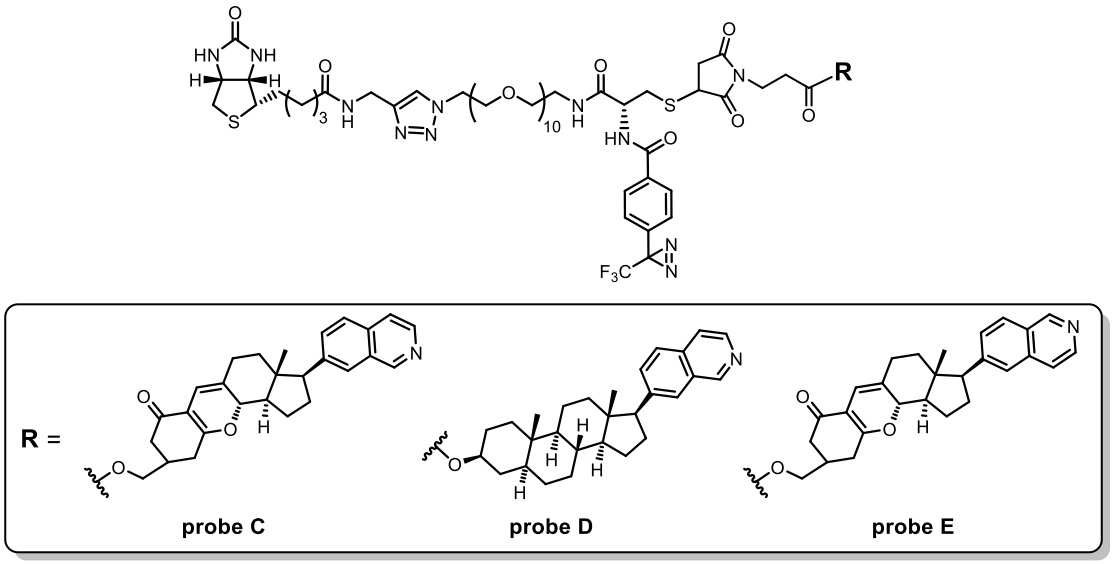



**Figure 9. プローブ分子の合成**

# 本論

## 第一章　Cortistatin A アナログ化合物の合成研究

### 第一節　アナログ化合物の改良合成法の確立

緒論で述べた通り、著者は analog O (**27**)を基盤とした構造最適化研究を進めるにあたり、種々の誘導体を簡便に合成していくことが、効率よく研究を展開する上で重要であると考え、まずはその合成法の改良に着手した。

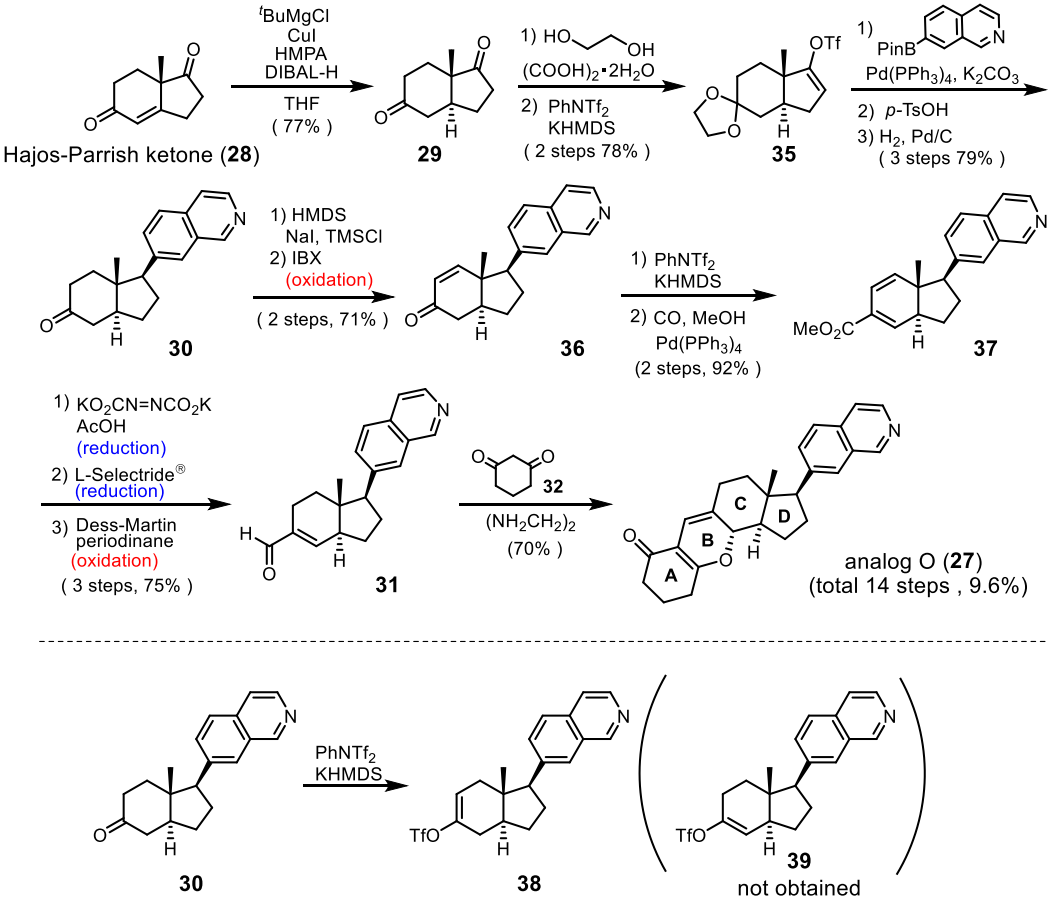
市販の Hajos-Parrish ケトン (**28**) を出発物質とし、総収率 9.6%で Analog O (**27**) を合成できる手法がすでに確立されている (Scheme 3)。[16] 本合成法にて数百 mg のスケールで目的の **27** を合成できることを確認しており、マウスを用いた *in vivo* 活性試験に必要な化合物量を確保できる状況にはあるが、構造最適化を進める、あるいはさらに大量の化合物を安定に供給するといった観点から、改善すべき点があると考えた。

すなわち、従来法においては全 14 工程で analog O (**27**)の合成を行っているが、そのうちの半分にあたる 7 工程を C 環部の変換、具体的には化合物 **30** のケトン部分を変換して不飽和アルデヒド **31** へと導く過程に要している。このわずかな変換にこれだけの工程数が必要となった原因として、**30** を *O*-トリフリル化した際、オレフィンが望みの位置とは逆側のエノールトリフラート体 **38** が得られることがあげられる。そのためにまずシリルエノールエーテルを経由する伊藤–三枝酸化により二置換アルケンのエノン **36** へと導き、続いてエノールのトリフリル化によって望みの位置にオレフィンを導入した後に、CO 挿入反応によりエステル化を行い、化合物 **37** を得ている。その後ジイミド還元により二置換アルケンのみを選択的に還元した後、エステルのアルコールへの還元、続く酸化によりアルデヒド体 **31** を合成している。このように酸化還元を繰り返し行う煩雑な変換を行わなければならなかったために多工程になり、その結果、総収率の低減を引き起こしている。

工業スケールでの大量合成を行うプロセス化学においては、反応制御が困難であり、毒性の高い副生成物を伴うことが多い酸化還元反応は敬遠される傾向にある。また、酸化還元反応は一般に官能基選択性に乏しいことから保護基の利用が避けられず、結果として更なる工程数の増加、原子効率の低下を引き起こすこととなるため、酸化状態を必要以上に変えずに目的の変換を達成する、”redox economy”を意識した合成が注目されている。著者は、C 環部の変換を”redox economical”な形で実現できれば、工程数の短縮につながり、将来的な大量合成にも対応可能な実用的な合成法が確立できると考えた。[23]

また、構造最適化研究を進めるにあたり、側鎖部分の最適化も必要となるが、従来法

ではイソキノリン側鎖を C 環部の変換前に導入しているため、様々な側鎖を導入した誘導体の合成を行ううえでも効率の悪い合成法であるといえる。以上の考えのもと、著者は **27** を効率よく合成できる新たな方法論の開発を目指して検討を開始した。




**Scheme 3.　Analog O (27)の従来の合成法と問題点**

著者は、本合成法の最初の反応工程が改良合成法の開発につながる重要な鍵であると考えた。すなわち、Scheme 3 の最初の工程では、Hajos-Parrish ケトン (**28**)のエノン部分を、文献既知の手法を用いて立体選択的に 1,4-還元することで *trans*-hydrindane 骨格を有する化合物 **29** へと導いているが、この反応系中で中間体として生じているエノラートイオンは、analog O (**27**)の合成に必要なオレフィンを有している。従って、これを何らかの求電子剤で捕捉すれば望みの位置にオレフィンを有する化合物が得られ、工程数を削減できるのではないかと考えた(Figure 10)。

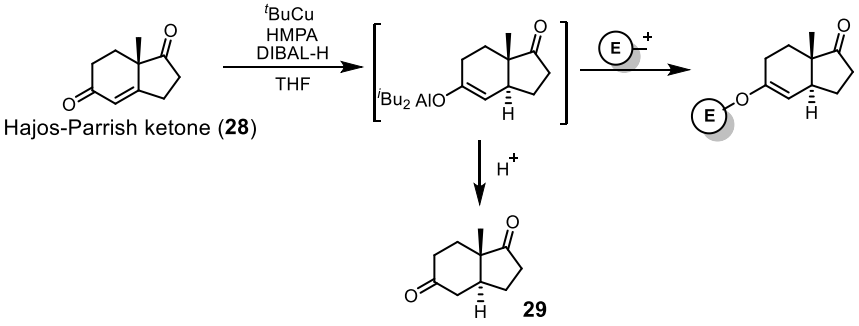
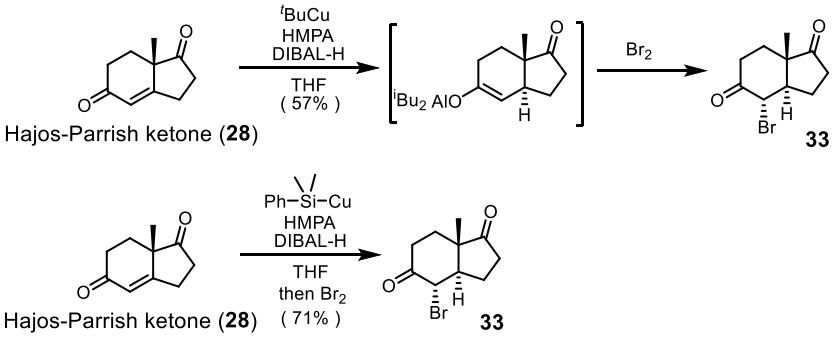


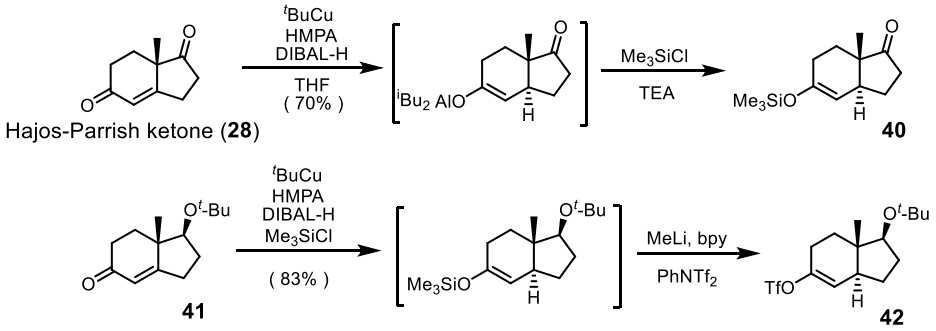

**Figure 10. 改良合成法の計画**

文献を検索した結果、Daniewski らは市販の Hajos-Parrish ケトン (**28**)を用いて立体選択的な 1,4-還元の後、生じたエノラートを臭素で捕捉して α-ブロモケトン **33** を合成できることを報告している (Scheme 4)。[18, 19] 本法は 100 グラムスケールでも対応可能な反応であることが示されており、ビタミン D 誘導体の合成に利用されている。




**Scheme 4. Daniewski らによる α−ブロモケトンの合成例**

また Daniewski らは、クロロトリメチルシランとトリエチルアミンを用いてトリメチルシリルエノールエーテル **40** の合成にも成功している。[24] また、Meijere らは Hajos-Parrish ケトン (**28**)から 2 工程で合成できる化合物 **41** を、トリメチルシリルエノールエーテルを経由して、より反応性の高いリチウムエノラートを反応系中で発生させた後、*N*,*N*-bis(trifluoromethylsulfonyl)aniline を用いることでエノールトリフラート **42** を合成している(Scheme 5)。[25]




**Scheme 5. Daniewski, Meijere らによるエノラートの捕捉例**

著者は、これらのうち、α-ブロモケトン **33** を原料に用いることで、目的の変換反応を短工程で行えると考え、Figure 11 に示す新たな合成計画を立案した。すなわち、**33** に対する Wittig 反応によりビニルエーテルを導入できれば、これを酸で処理することで加水分解が起こり、オレフィンの移動と共に臭化物イオンが脱離することにより、望みの位置にオレフィンを導入しつつ、酸化度を調整することなく、不飽和アルデヒドへと変換できるのではないかと考えた。イソキノリン側鎖の導入は以前と同じく 5 員環ケトンをエノールトリフラートへと変換し、別途調製したボロン酸エステルとの鈴木カップリングにより行えるものとし、側鎖の導入を行った後に酸処理することで、アナログ合成の最終中間体である化合物 **31** が得られると考えた。

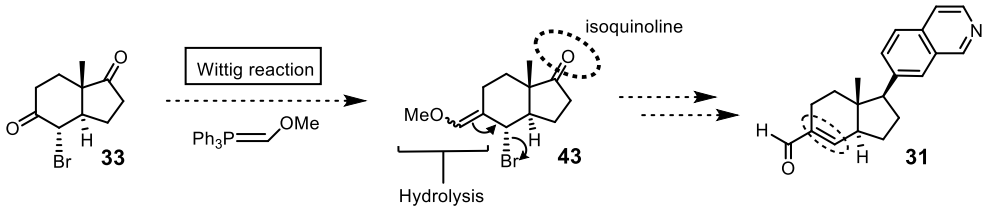
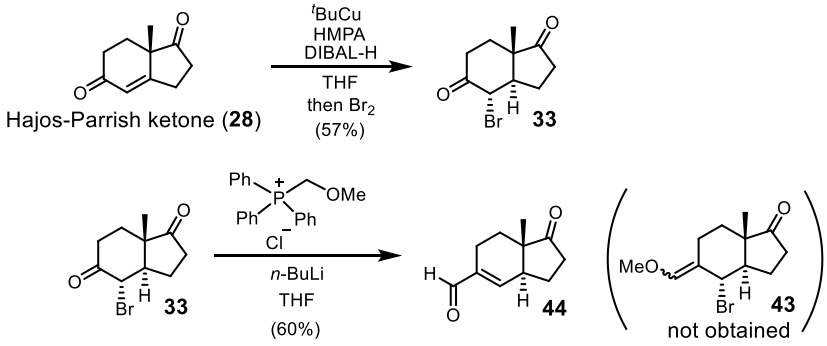


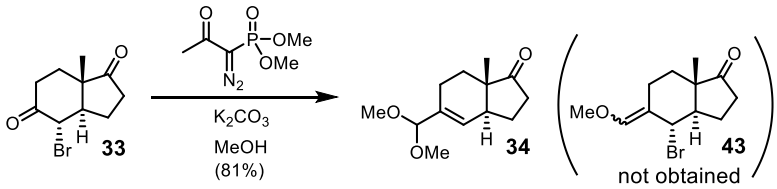

**Figure 11. 化合物 31 の合成計画**

まずビニルエーテルの合成を検討した。Hajos-Parrish ケトン (**28**)を出発物質として用い、立体選択的な 1,4-還元の後、生じたエノラートを臭素で捕捉して文献既知の α-ブロモケトン **33** を得た。続いて **33** に(methoxymethyl)triphenylphosphonium chloride を用いて Wittig 反応を行い、ビニルエーテル **43** を合成しようとしたが、**43** が加水分解して生成したと考えられるアルデヒド **44** が主生成物として単離された他、複雑な化合物が得られる結果となった。このことから望みのビニルエーテル **43** は非常に不安定であることが示唆された(Scheme 6)。



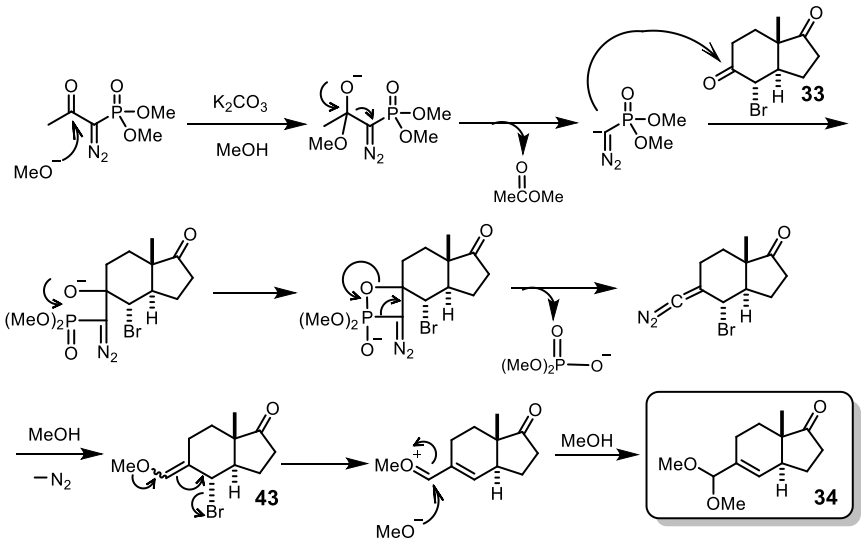

**Scheme 6. 改良合成法の検討①**

一方、同様のビニルエーテル合成に用いられる大平–Bestmann 試薬を用いて検討したところ、**44** とは異なる化合物を収率良く与えた。[17] 構造を確認したところ、予想していた化合物 **43** ではなく、ジメチルアセタール体 **34** であることが分かった(Scheme 7)。



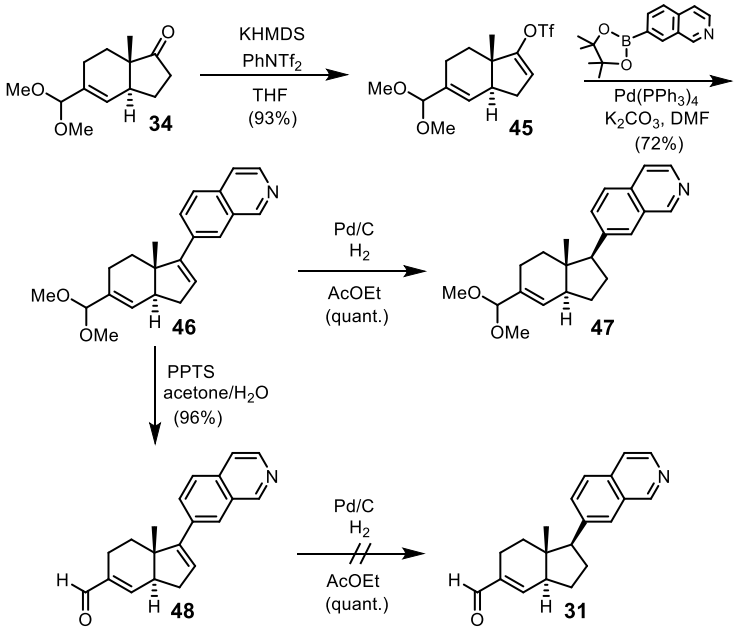

**Scheme 7. 改良合成法の検討②**

この反応機構は以下のように考えている。まずメトキシドが大平–Bestmann 試薬のカルボニルを攻撃し、酢酸メチルが脱離し、ホスホナートカルボアニオンが生成する。これが **33** を攻撃し、Wittig 反応と同様に四員環状のオキサホスフェタン中間体を経て、ホスホン酸塩、続いてジアゾ基の脱離が起こり、ビニルエーテル **43** が生成する。しかしそこで反応は終了せず、メトキシ基の孤立電子対からの電子供与により臭化物イオンが脱離し、生成したオキソニウムイオンに対して溶媒の MeOH が付加することで二重結合を有するアセタール体 **34** が得られたものと考えられる(Scheme 8)。



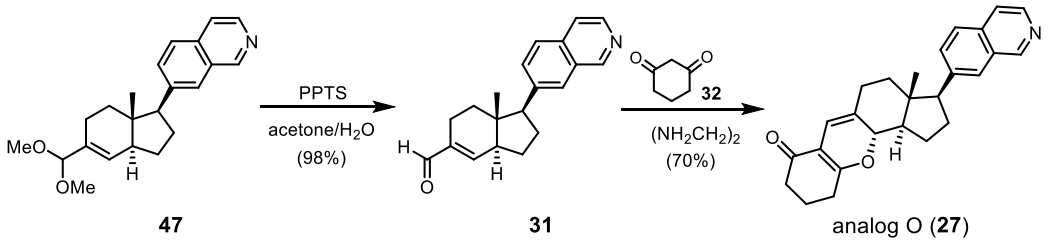

**Scheme 8. 大平–Bestmann 試薬を用いた 34 生成の推定反応機構**

**34** の 5 員環ケトンをエノールトリフラートへと変換した後、別途調製したボロン酸エステルとの鈴木カップリングによりイソキノリン側鎖を導入し、化合物 **45** へと導いた。続いて、接触還元により D 環のオレフィンのみを選択的に還元した化合物 **45** を合成することができた。一方、化合物 **46** を先に加水分解し、得られたアルデヒド **48** の接触還元を行うと、D 環のオレフィンでの還元は起こらず、複雑な化合物が得られるのみとなった(Scheme 9)。



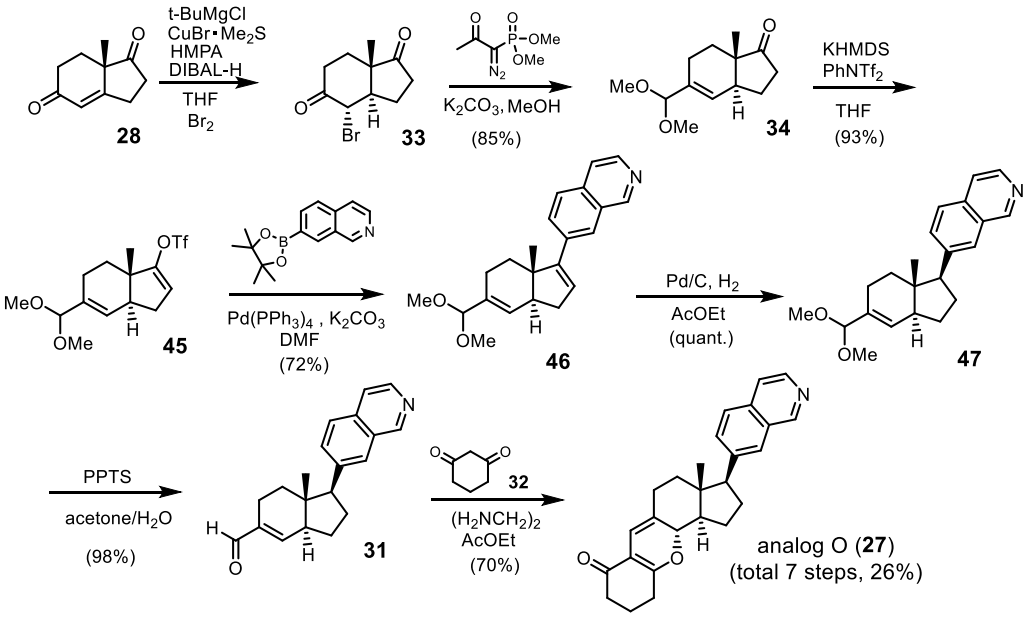

**Scheme 9. 改良合成法の検討③**

最後にジメチルアセタール **47** を加水分解してアルデヒド **31** を得、これを 1,3-cyclohexanedione (**32**) との Knoevenagel 反応と続く電子環状反応によって analog O (**27**) を合成することに成功した(Scheme 10)。




**Scheme 10. 改良合成法の検討④**

以上のようにして開発した第二世代合成法を Scheme 11 に示した。本合成法では、文献既知の α-ブロモケトン **33** を経由して、市販の Hajos-Parrish ケトン (**28**) から 7 工程、総収率 26%と、短工程かつ高収率で analog O (**27**) を合成することが可能となった。C 環部の構築を”redox economy”を意識した新たな変換法に変えることで、従来法と比較して工程数を大幅に改善することができた。また、各工程とも 1g スケールで再現よく合成できることを確認しており、簡便かつ大量に合成することが可能な手法である。さらに、イソキノリン側鎖の導入以降の工程数が短縮され、多様なアナログ化合物の合成が可能になった。




**Scheme 11. Analog O (27)の改良合成法**

## 第二節　新規アナログ化合物の合成と活性評価

上述のように今回、工程数を大幅に短縮した改良合成法の開発に成功したので、次に著者は、本法を利用してさらに種々の新規アナログ化合物を合成し、より優れた活性を示す化合物へと導いていく構造最適化研究に着手した。

以前に開発した analog O (**27**)について、分子力場計算にて算出した最安定配座を cortistatin A (**1**)と比較した。Figure12 にその重ね合わせた図を示すように、両者の三次元構造は非常によく一致することが明らかになっている。そこで、構造最適化を進めるにあたり、analog O (**27**)を基盤として、導入する官能基を種々変換することで最適構造を導けるものと考え、具体的には、母核部分の構造はそのままの形で残し、側鎖部分および A 環部分を変換していくこととした。A 環部については合成の最終段階で導入するため容易に変換が可能であり、上述の改良合成法によって側鎖の導入以降の工程数が大幅に短縮された。また、側鎖部分についても構造展開を検討しやすい状況になったため、効率的に最適化研究を進められると考えた。

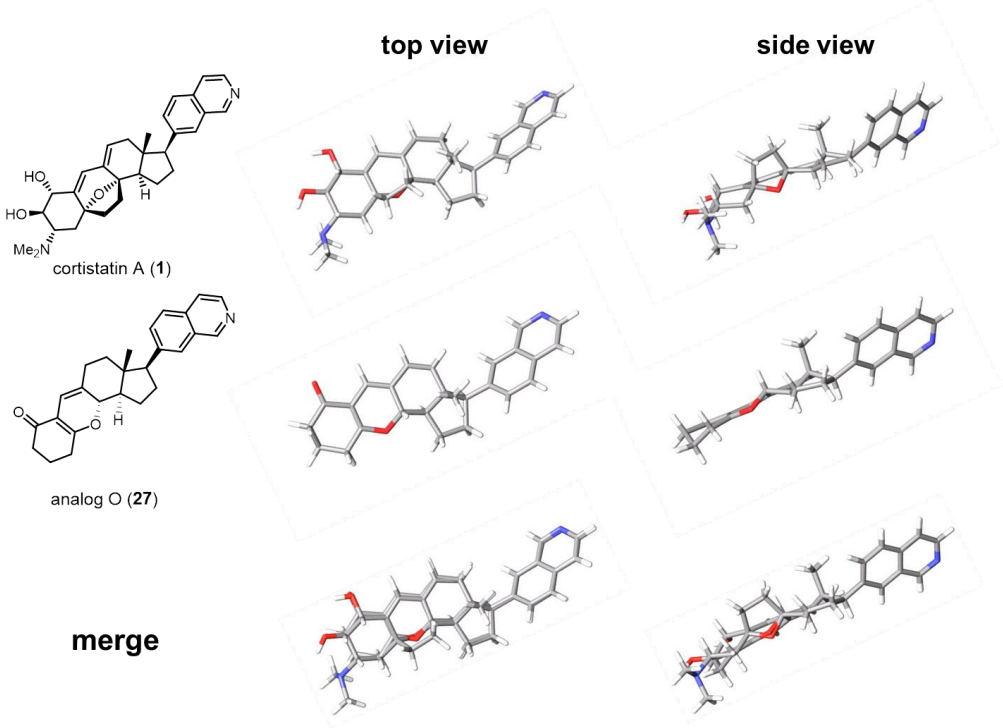
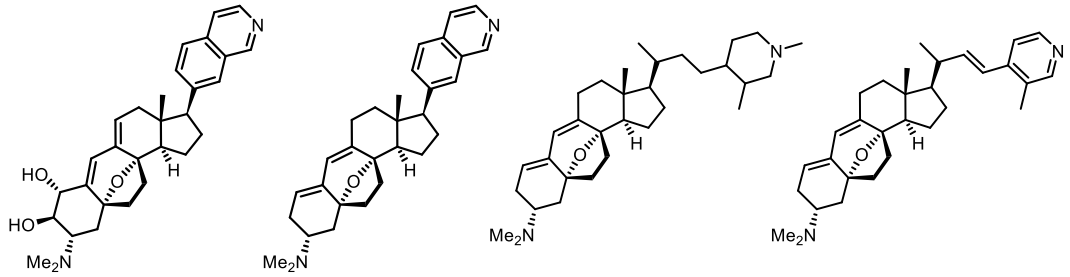



**Figure 12.　Cortistatin A (1)と analog O (27)の三次元構造**

アナログ化合物の設計にあたり、改めて天然由来の cortistatin 類縁体の構造活性相関情報を参考にすることとした。すなわち、A 環部分については、cortistatin A (**1**)と cortistatin K (**8**)を比較すると、**1** の方が HUVEC に対して約 20 倍強力な増殖抑制活性を示したことから、A 環部分に水酸基などの極性官能基を導入することで HUVEC に対す

る増殖抑制活性の向上が期待できると考えた。[8] 一方、cortistatin E (**5**), cortistatin G (**6**) など、側鎖部にピペリジン環もしくはピリジン環を有する類縁体では、HUVEC に対する増殖抑制活性が大幅に減弱することから、側鎖構造の大幅な変更は活性の低下につながることが示唆された (Figure 13)。




| | $IC_{50}$ (μM) | S.I. | $IC_{50}$ (μM) | S.I. | $IC_{50}$ (μM) | S.I. | $IC_{50}$ (μM) | S.I. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HUVEC | 0.0018 | | 0.04 | | 0.45 | | 0.8 | |
| KB3-1 | 7.0 | 3900 | 10.2 | 250 | 2.5 | 6 | 8.9 | 11 |

**Figure 13.　Cortistatin 類縁体の構造活性相関**

一方、著者らの研究以外にも、cortistatin 類の化学構造を単純化したアナログ化合物の合成研究も数例報告されているが、それらのうち、Corey らの研究グループが見いだした、estrone 誘導体を出発物質とし、イソキノリン側鎖と３位ジメチルアミノ基を導入したアナログ化合物については、イソキノリン環の置換位置の異なる化合物においても、HUVEC に対して比較的良好な増殖阻害活性を示すものが報告されている (Figure 14)。[20] 他の細胞との選択性については記載がないため分からないが、置換位置の変更や軽微な官能基変換程度であれば許容される可能性があると考えた。

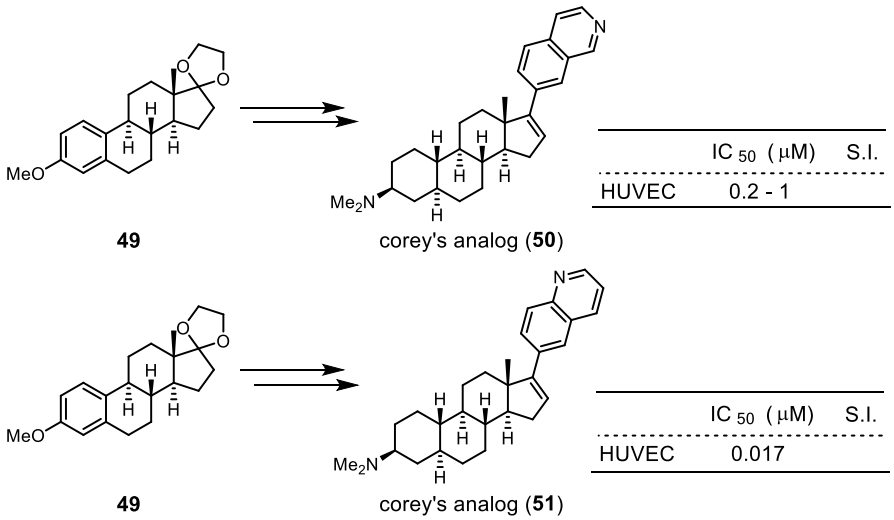
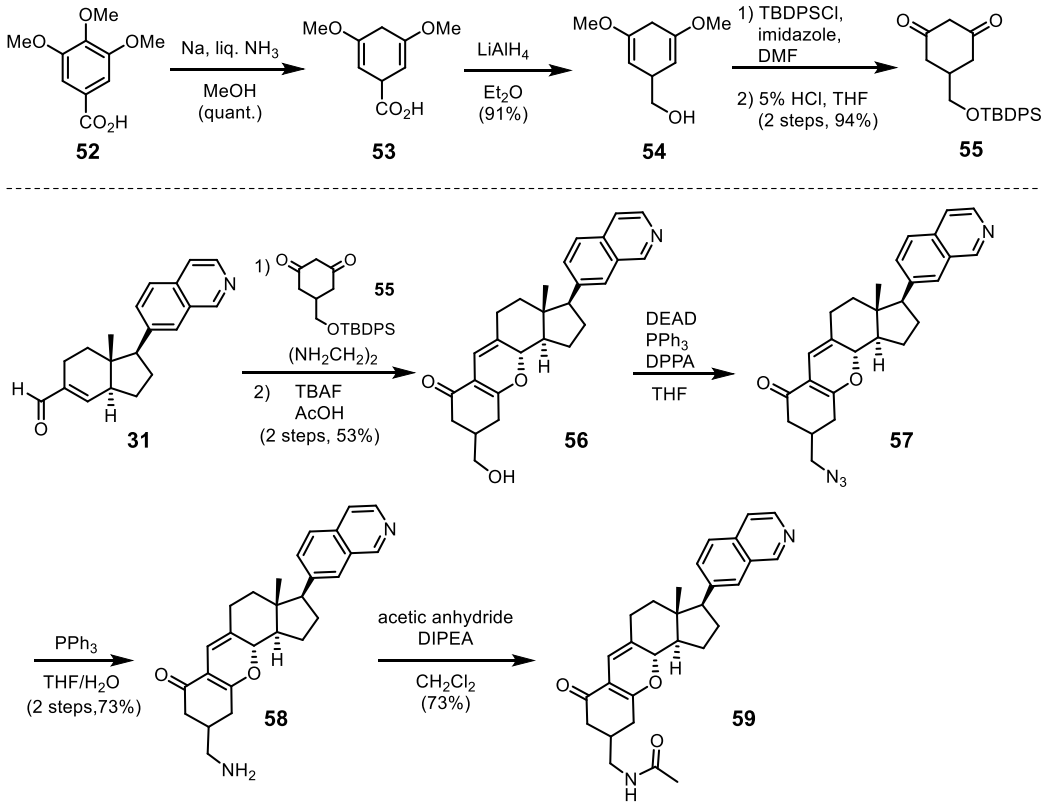



**Figure 14.　Corey らのアナログ化合物**

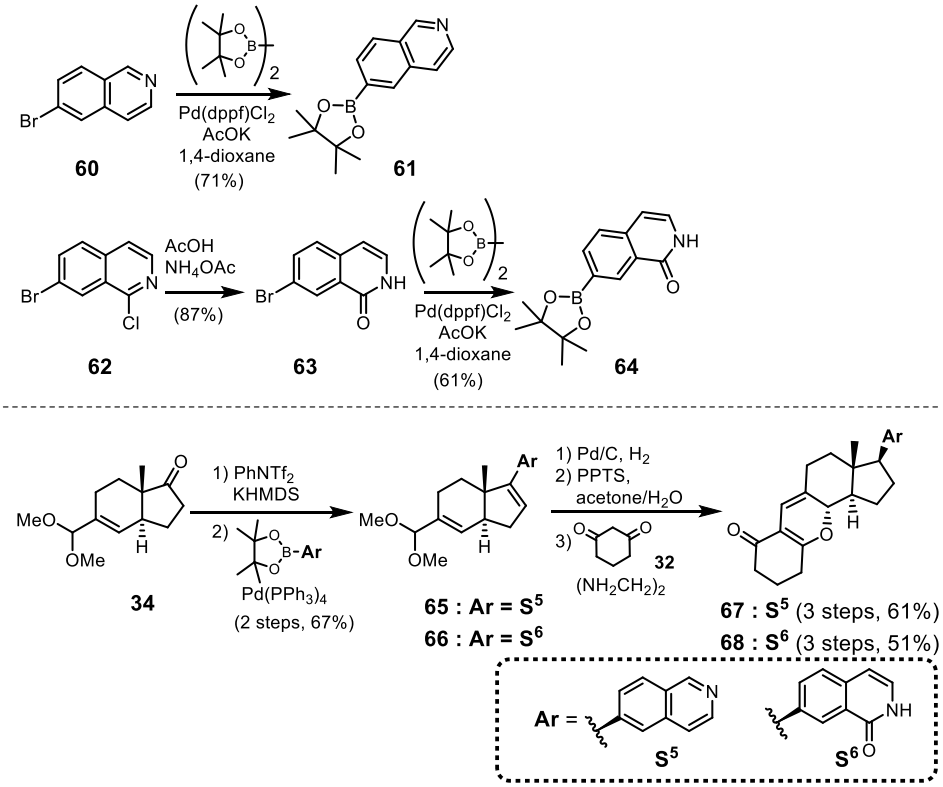
上述の指針のもと、著者はまず、analog O (**27**) を基盤として、A 環部分に極性官能基を導入したアナログ化合物の合成を検討した。A 環部分は合成の最終工程で、前駆体となる不飽和アルデヒド **31** に対して、1,3-ジケトンとの Knoevenagel 縮合と続く電子環状反応で構築できるため、用いる 1,3-ジケトンにあらかじめ官能基を導入しておくことで合成できると考えた。置換基の導入位置については、非対称なジケトン、すなわち４位に置換基を有する 1,3-ジケトンを用いて同反応を行った場合、反応機構上、環化後のアナログ化合物については２位あるいは４位のどちらかに選択的に置換基を導入することは困難であるため、化合物 **55** のように σ 対称な 1,3-ジケトンを用いることで、３位に極性官能基を導入したアナログ化合物を合成することとした。

目的の 1,3-ジケトンは Scheme 12 に示すように合成した。市販の 3,4,5-トリメトキシ安息香酸 (**52**)を Birch 還元により文献既知のカルボン酸 **53** とし、[26] $LiAlH_4$ 還元によってアルコール **54** とした後、水酸基を TBDPS 基で保護することで 1,3-ジケトン **55** を合成した。これをエチレンジアミン存在下、化合物 **31** と反応させることで、1,3-ジケトンとの Knoevenagel 縮合と続く電子環状反応が進行し、TBDPS 基の脱保護を経て、A 環部分にヒドロキシメチル基を導入したアナログ化合物 **56** を合成した。また、**56** の水酸基を光延反応によってアジド化した後、Staudinger 反応によるアジド基の還元、続くアミノ基のアセチル化により、アセトアミド基を導入したアナログ化合物 **59** の合成に成功した (Scheme 12)。なお、化合物 **56** および **59** については、３位に新たな不斉炭素が構築されるためジアステレオマーの混合物であることを NMR により確認している。これらの HPLC による分離を試みたところ、二つのピークに分離したため、それぞれを分取した。しかし、それぞれのピークを HPLC により分析したところ、再び二つのピークが見られた。この結果から、ピラン環が開環することで再び混合物に戻ってしまうことが示唆されたため、分離は困難であると考え、ジアステレオマーの混合物のまま活性評価に供した。



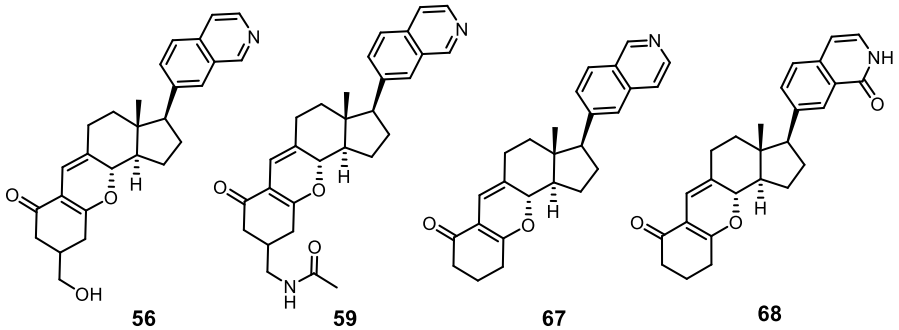

**Scheme 12.　A 環部分の構造変換したアナログ化合物の合成**

次にイソキノリン側鎖の構造変換を行った化合物を合成することを検討した。まず、側鎖の導入に用いるボロン酸誘導体 **61** と **64** を、市販の化合物 **60** および **62** より文献既知の方法で得られる **63** と、bis(pinacolato)diboron との鈴木カップリングによって調製した。[27, 28] 一方、ジメチルアセタール **34** をエノールトリフラート体とした後、合成した **61** および **64** をそれぞれ鈴木カップリングにより導入し、続く接触還元、加水分解、1,3-cyclohexanedione (**32**)との Knoevenagel 縮合と電子環状反応により、イソキノリン環の６位で連結した化合物 **67**、およびイソキノリン環の１位が酸化された構造を有する化合物 **68** を合成した(Scheme 13)。




**Scheme 13. イソキノリン側鎖の構造変換を行った化合物を合成**

次に、合成した 4 種の新規アナログ化合物について活性評価を行った(Figure 15)。その結果、A 環部分に極性官能基を導入した化合物 **56**、**59** は、HUVEC 選択的な増殖阻害活性を示した。特にアセトアミド基を導入した **59** は analog O (**27**)と比較して HUVEC に対する増殖阻害活性が 10 倍以上増強され、cortistatin A (**1**) に匹敵する強力かつ高選択的な活性を示す有望な化合物であることが分かった。一方で、側鎖の構造変換を行った化合物 **67**、**68** では母核が同一である analog O (**27**)と比較して活性、選択性ともに大きく減弱した。化合物 **67** は、イソキノリンの窒素原子の位置が隣にずれただけの違いにも関わらず、HUVEC に対する増殖阻害活性が大幅に減弱していることから、標的タンパク質による側鎖構造の認識は非常に厳密であると考えられる。これらの知見をもとに、今後さらに構造最適化を進め、さらに優れた活性と選択性を有する化合物を見いだしていきたいと考えている。



| | 56 | | 59 | | 67 | | 68 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $IC_{50}$ (μM) | S.I. | $IC_{50}$ (μM) | S.I. | $IC_{50}$ (μM) | S.I. | $IC_{50}$ (μM) | S.I. |
| HUVEC | 0.02 | | 0.0026 | | 18 | | 87 | |
| KB3-1 | 16.3 | 815 | 8.21 | 3150 | 11 | 0.59 | 25 | 0.28 |

**Figure 15. 新規アナログ化合物の活性評価**

## 第二章　Cortistatin A の標的分子の解明研究

### 第一節　研究背景と着想に至った経緯

第一章で著者は、analog O を基盤とした構造最適化の過程において、10 倍以上活性が増強し、天然物に匹敵する強力かつ選択的な増殖阻害作用を示す新たなリード化合物を見出すことができた。引き続きランダムな誘導体合成を網羅的に展開することで、さらに優れた活性を示す化合物を見出せる可能性もあるが、より合理的に構造最適化を進めていくためには、その標的分子（タンパク質）との結合様式を明らかにし、より親和性の高い分子を設計・合成していくことが必要である。そこで著者は、cortistatin A (**1**) を超えるような強力な活性を示す医薬リード化合物の創製に向け、誘導体合成と並行して、その標的分子の探索を行うこととした。

生物活性物質の標的探索研究は医薬リード化合物の創製だけでなく、新規創薬ターゲットを見出すうえでも重要な研究である。最も有名な例として、Schreiber らのグループは免疫抑制剤として知られている FK506 (Tacrolimus®)が FKBP (FK506 binding protein, *cis-trans* peptidyl-prolyl isomerase)を標的タンパク質としていることを明らかにした。[29] Schreiber らは FK506 をアフィニティーマトリックスに固定化し、細胞破砕液の中から FK506 と結合親和性の高いタンパク質を精製するアフィニティークロマトグラフィーにより FKBP を見出している。この研究を皮切りに、低分子化合物を起爆剤として未知の細胞内シグナル伝達経路を解明していく、いわゆるケミカルバイオロジー研究が今日まで発展するに至っている。また、がん血管新生に関しても、血管新生阻害活性を有する真菌由来の二次代謝物 fumagillin の標的探索研究から、血管新生に関わる新たなタンパク質として、Methionine aminopeptidase-2 (MetAP-2)が見出されている。[30] Sin らは fumagillin からビオチン誘導体を合成し、牛の脳の抽出液から fumagillin と親和性の高いタンパク質を結合させ、アビジンアガロースによりビオチン誘導体を回収した結果、結合タンパク質が MetAP-2 であることを明らかにしている(Figure 16)。

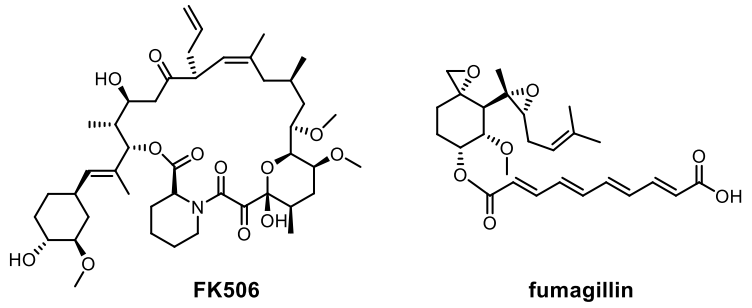



**Figure 16.　FK506 と fumagillin の構造**

著者の研究室でも最近、活性天然物由来のプローブ分子を合成し、これと特異的に結合するタンパク質を細胞の破砕液から捕捉するケミカルプルダウン法を用いた標的分子の解明研究を行っている。例えば、当研究室においてインドネシア産海綿から見出したフラノセスタテルペン furospinosulin-1 は、低酸素環境選択的にヒト前立腺がん DU145 細胞の増殖を阻害し、腫瘍移植モデルマウスを用いた *in vivo* 抗腫瘍活性試験においても経口投与で有効性を示す有望な医薬シーズであったことから、その標的分子の解析研究を行った。[22] 並行して進めていたアナログ化合物の合成研究において、furospinosulin-1 の側鎖末端にアルキニル基を有する化合物が天然物より強力な活性を示すことが明らかになったため、これを足掛かりとしてプローブ分子を合成し、標的分子探索を行った結果、これまでがん細胞の低酸素適応や代謝変化に関与することが報告されていない 2 つの転写制御因子、LEDGF および $p54^{nrb}$ を見出すことに成功している (Figure 17)。

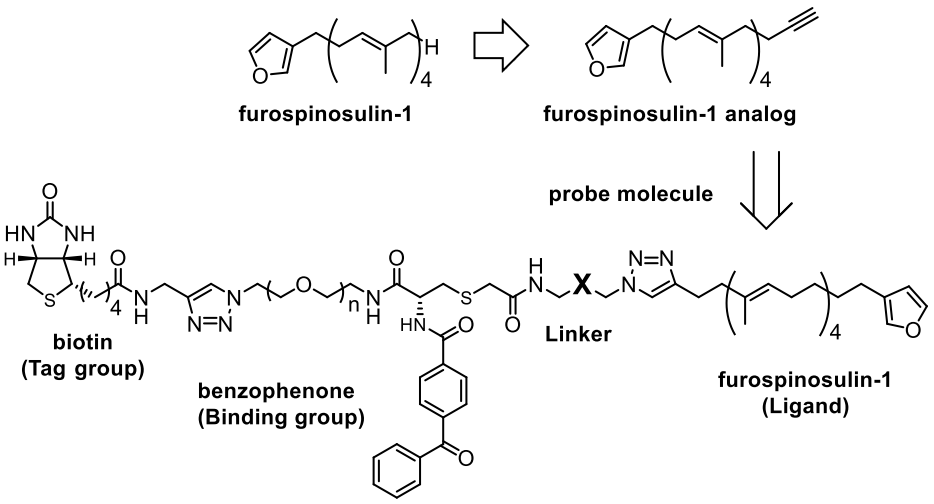



**Figure 17. プローブ分子の合成法**

一方で、cortistatin A (**1**)の作用メカニズムについては、ウェスタンブロット法を用いたシグナル解析のみ検討されており、既存の血管新生阻害剤の多くが標的としている VEGF のシグナル伝達経路を阻害しないことを示唆するデータが得られているが、その標的分子は未解明のままである(Figure 18)。[8] 天然より単離された cortistatin A の量がごくわずかであったことが更なる作用メカニズム解析が進まない一因であったが、上述のように、今回著者は、天然物に匹敵する活性を示すアナログ化合物を見いだすことに成功している。そこで、これを利用してプローブ分子を合成し、ケミカルプルダウン法によって結合タンパク質を見いだすことができるのではないかと考え、研究に着手した。

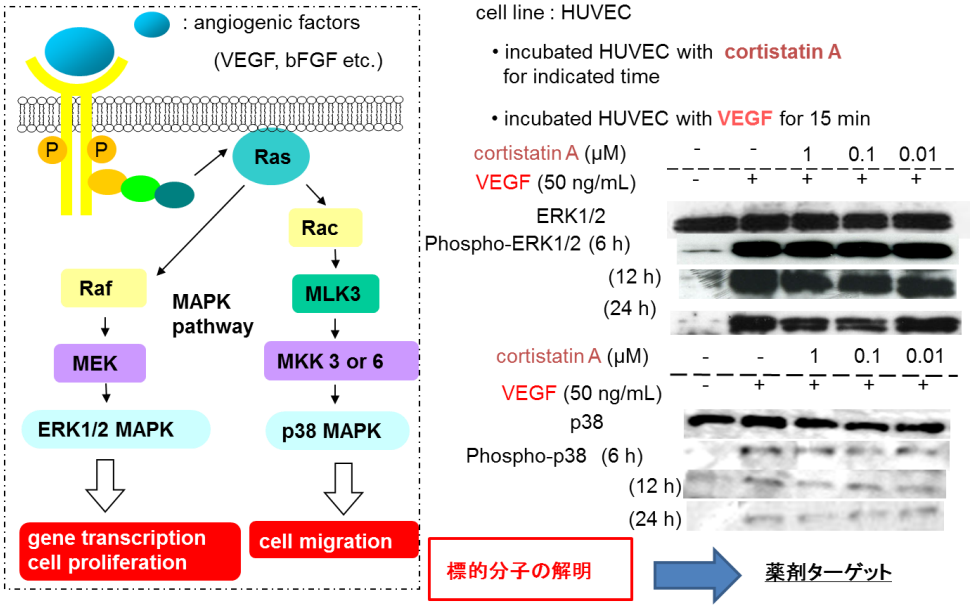



**Figure 18. Cortistatin A (1)の作用メカニズム解析**

## 第二節　ビオチン化プローブの合成

活性物質由来のプローブ分子を合成するうえで重要な点は、標的分子との親和性を損なわないように誘導化することである。上述したいずれの例においても、構造活性相関の知見をもとに、活性発現への影響が最も少ない部位にある官能基を足がかりにして誘導化している。今回の cortistatin A アナログにおいては、第一章で見いだした知見から、構造変換に対する許容性が最も小さい側鎖部分が標的分子との結合に重要であると考えられる一方、側鎖から最も離れた位置にある A 環部については、極性官能基の導入によって活性が増強する傾向にあることから、この位置を足がかりにして、有効なプローブ分子を合成できると考え、容易に誘導化が可能な一級水酸基を有するアナログ化合物 **56** 由来のプローブ分子を合成することとした (Figure 19)。

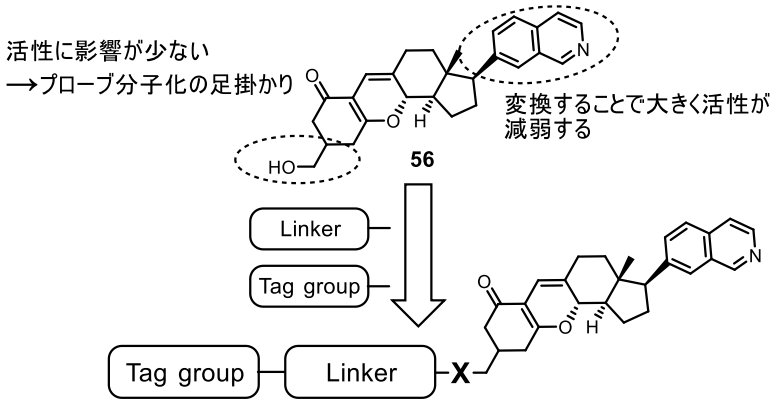



**Figure 19.　Cortistatin A アナログ由来のプローブ分子の設計**

著者らの研究室では最近、官能基選択的な反応を利用したプローブ分子の系統的合成法を確立しており、上述のように furospinosulin-1 由来のプローブ分子合成にも適用している。[21, 22] すなわち、cystine 誘導体を出発物質に用いて、順次リンカーや捕捉補助基、ビオチンタグなどを導入したプローブ前駆体を合成し、最後にマレイミドやヨードアセトアミド基などのチオールと特異的に反応する官能基を導入したリガンドと反応させることで、種々構造を変換したプローブ分子を容易に合成できる手法である(Figure 20)。今回もこれを適用し、アナログ **56** にマレイミド基を導入した化合物を用いて、有効なプローブ分子を見いだしていけると考えた。

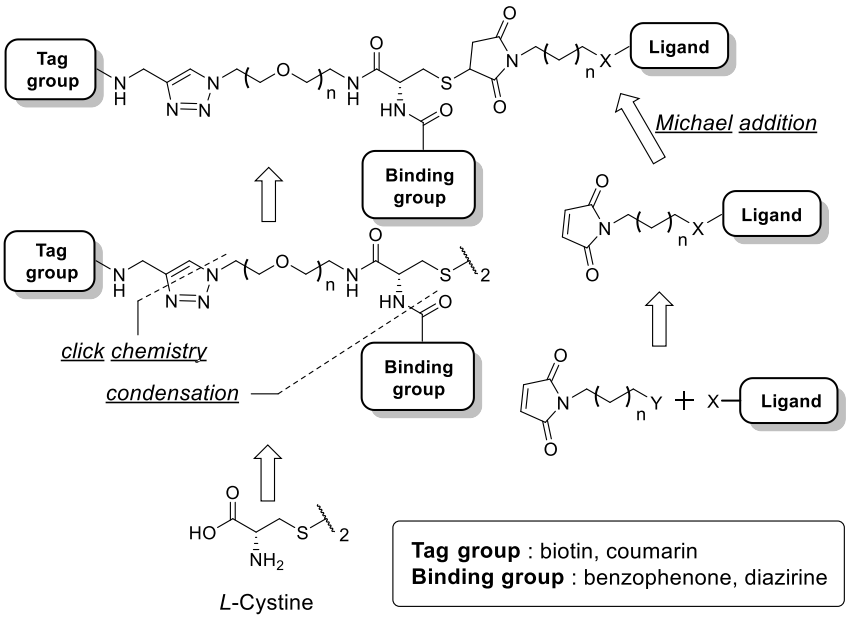
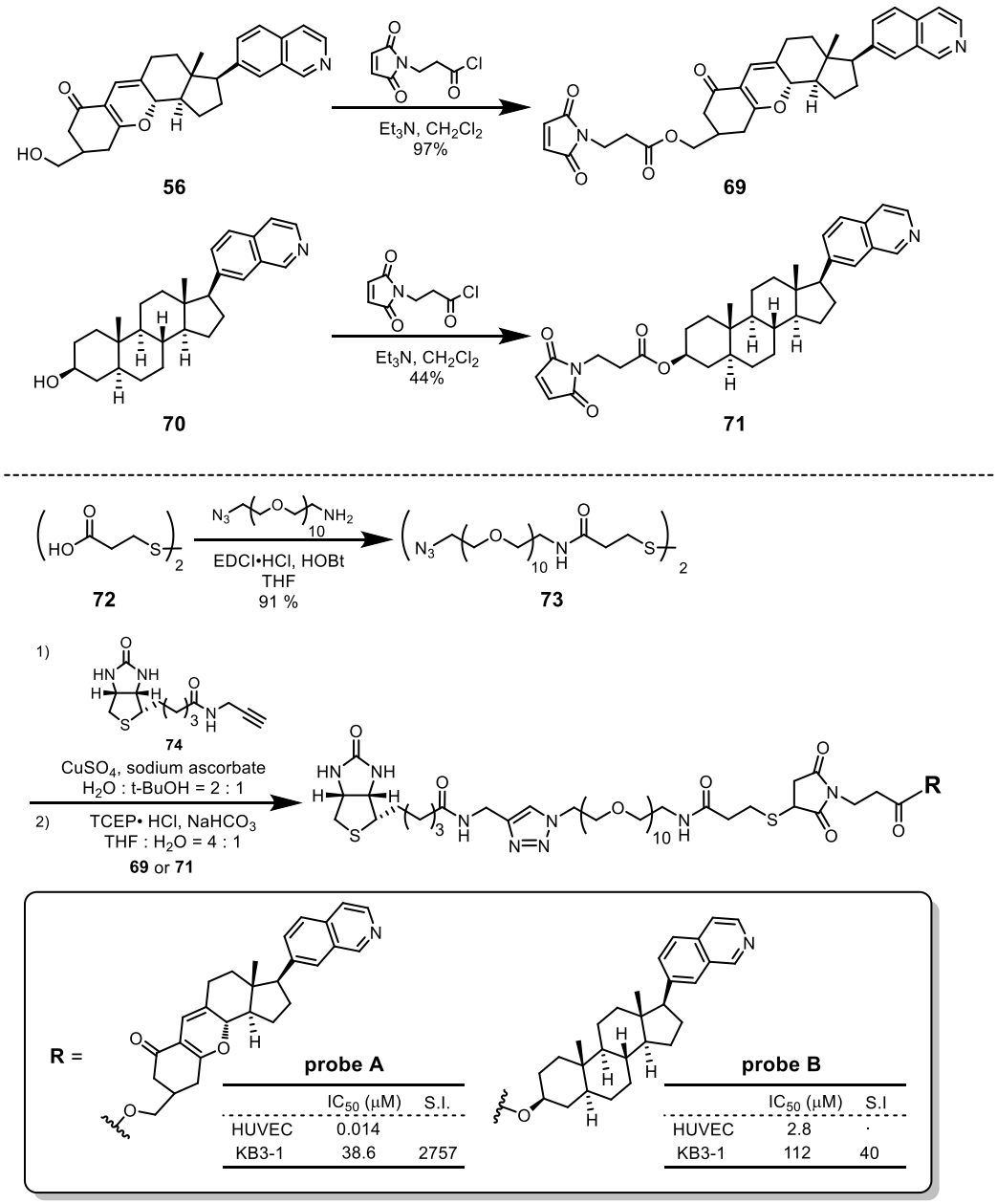



**Figure 20. システインを母核としたプローブ分子の系統的合成法**

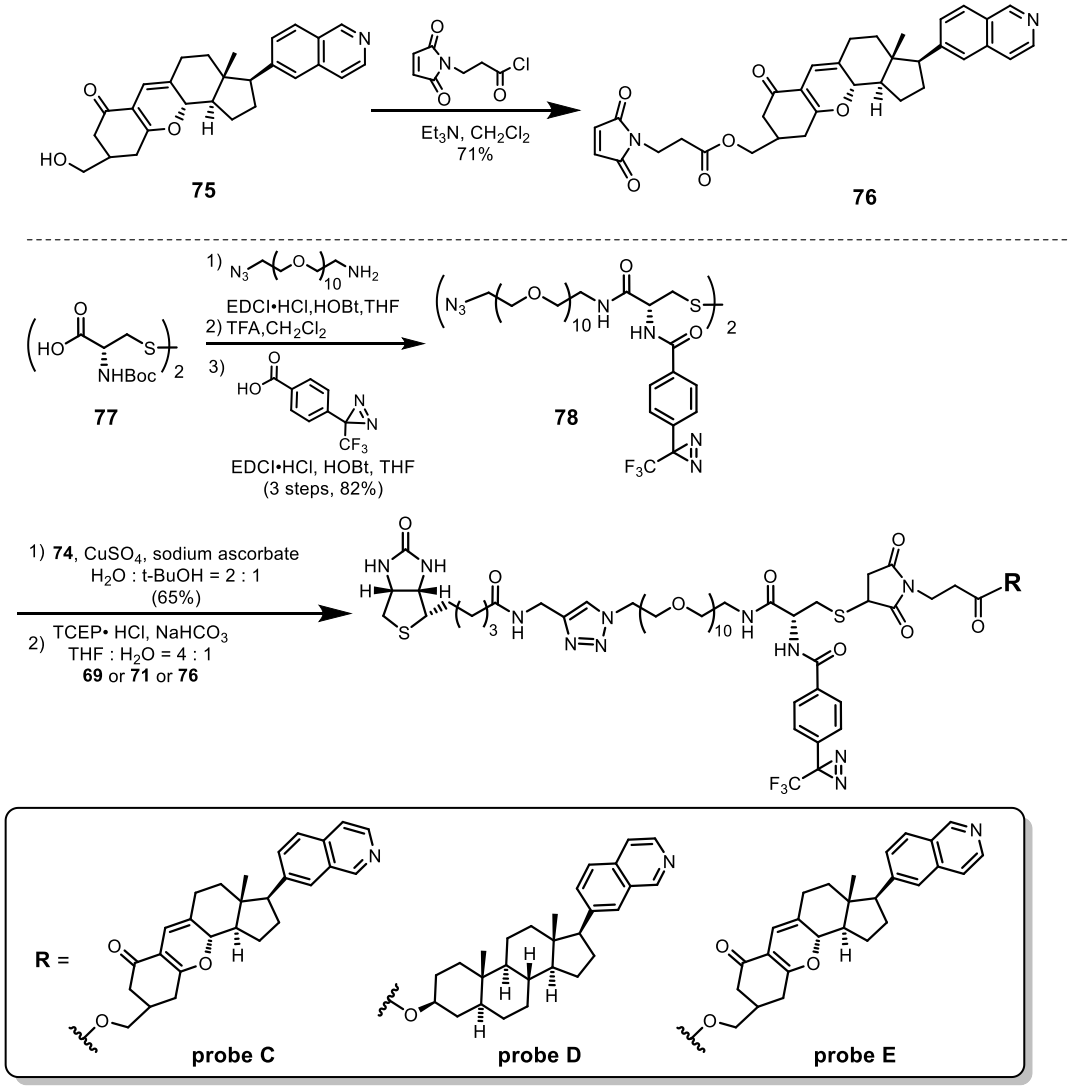
まず、ビオチンタグのみを導入したプローブ分子を合成し、活性物質との親和性を利用して、血管内皮細胞の破砕液から標的分子のプルダウン実験を行うこととした。ジチオジプロピオン酸 (**72**) に末端にアジド基を持った PEG を縮合させ **73** とした後、硫酸銅とアスコルビン酸を用いた Huisgen 反応により末端にアルキンを導入したビオチン **74** を導入して、プローブ分子前駆体を合成した。[31] 最後に TCEP によりジスルフィド結合を還元することでチオール体とした後、**56** にマレイミドを導入したアナログ化合物 **69** に Michael 付加させることで **probe A** を合成することに成功した。[32] 同様にして、ステロイド型アナログにマレイミドを導入した **71** を付加させることでネガティブコントロールとして用いる **probe B** の合成を行った（Scheme 14）。これらのプローブ分子について活性試験を行ったところ、**probe A** は HUVEC 選択的な増殖阻害活性を有していることが分かったため、プローブ分子として利用できることが明らかになった。




**Scheme 14. ビオチン化プローブ分子の合成**

また、リガンドに結合したタンパク質を確実に捕捉するために光親和性基であるフェニルジアジリンを導入したプローブ分子の調製を計画し、出発原料に Boc-*L*-シスチン (**77**) を用いて先と同様の方法で合成した。すなわち、**77** に対して末端にアジド基を持った PEG を縮合させた後、Boc 基の脱保護を行い、4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]benzoic acid を縮合し **78** とした。次に硫酸銅とアスコルビン酸を用い Huisgen 反応により末端にアルキンを導入したビオチン **74** を導入して、プローブ分子前駆体を合成した。最後に TCEP によりジスルフィド結合を還元によ

りチオール体としたのち、別途合成したマレイミドを導入したアナログ化合物 **69** に Michael 付加させることで **probe C** を合成することに成功した。同様にして、**71** または **76** を付加させることでネガティブコントロールとして用いる **probe D**、**E** の合成を行った (Scheme 15)。次にこれらを用いて標的分子の探索実験を行うこととした。




**Scheme 15. フォトアフィニティープローブ分子の合成**

## 第三節　プローブ分子を用いた標的分子の探索

合成したプローブ分子を用いて標的分子のプルダウン実験を行った。HUVEC の細胞破砕液に **probe A** を加えて標的分子を結合させた後、streptavidin-Dynabeads を用いてプローブ分子を捕捉し、洗浄バッファーで洗浄した。プローブ分子に結合したタンパク質を SDS-PAGE で展開し、銀染色にて検出した (Figure 21)。また、ネガティブコントロールとして合成した **probe B** についても同様の操作を行うことで **probe A** と比較検討し

た。その結果、**probe B** では検出されず **probe A** に特異的に結合していると思われるタンパク質がいくつか存在することが明らかになった。しかし、それ以外にプローブ分子やビーズに非特異的に結合しているタンパク質が多数検出されて、この中から標的分子を同定することは困難だと考えられた。そこで、洗浄バッファーに含まれる界面活性剤の濃度を高くし、非特異的に結合しているタンパク質を洗い落とすことで、**probe A** に特異的に結合しているタンパク質をより明確に検出することを試みた。上記のように、0.01%の濃度になるように Nonidet P-40 (NP-40) を加えた PBS buffer で洗浄しても多くの非特異結合が検出されてしまうことから、0.1%の濃度になるように NP-40 を加えた PBS buffer で洗浄した。その結果、非特異的に結合をしているタンパク質とともにリガンドに結合している標的タンパク質も洗い出されてしまった。この結果は、予想に反して **probe A** と標的タンパク質との親和性がそれほど強くないことを示唆している。

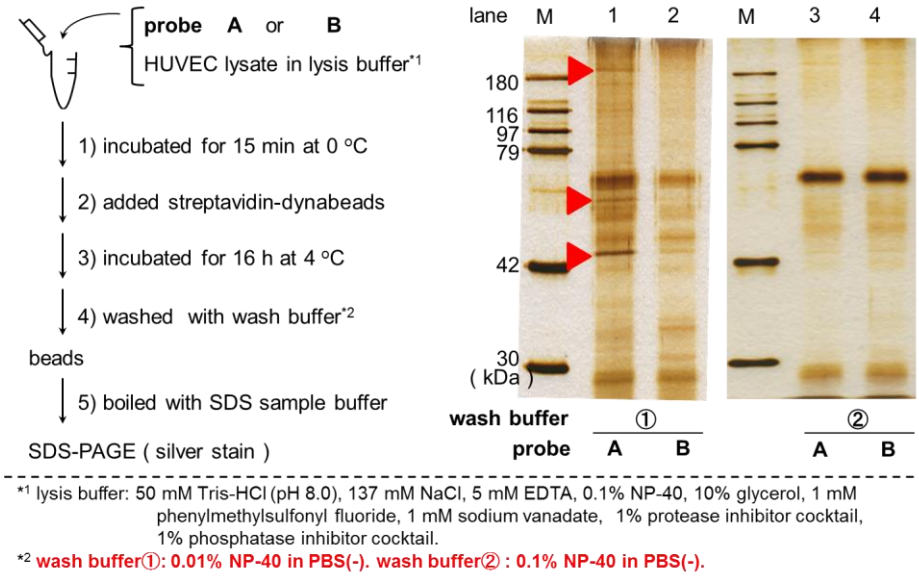



**Figure 21.　Probe A, B を用いた標的分子のプルダウン実験**

そこで、標的タンパク質を共有結合によって確実に捕捉するため、光親和性基を導入したプローブ分子を用いて標的分子の同定を検討することとした。HUVEC の lysate に **probe C** を加えて標的分子に結合させた後、30 分間紫外線照射をすることで共有結合を形成させ、neutravidin agarose を用いてプローブ分子を捕捉し、0.1%の濃度になるように NP-40 を加えた PBS buffer で洗浄した。プローブ分子に結合したタンパク質を SDS-PAGE で展開し、銀染色にて検出した。また、**probe D** についても同様の操作を行うことで **probe C** と比較検討した。その結果、約 40 kDa に **probe D** では検出されず **probe**

**C** に特異的に結合していると思われるタンパク質が存在することが明らかとなった (Figure 22)。現在、そのタンパク質を標的タンパク質の候補とし、さらなる検討を行っている。

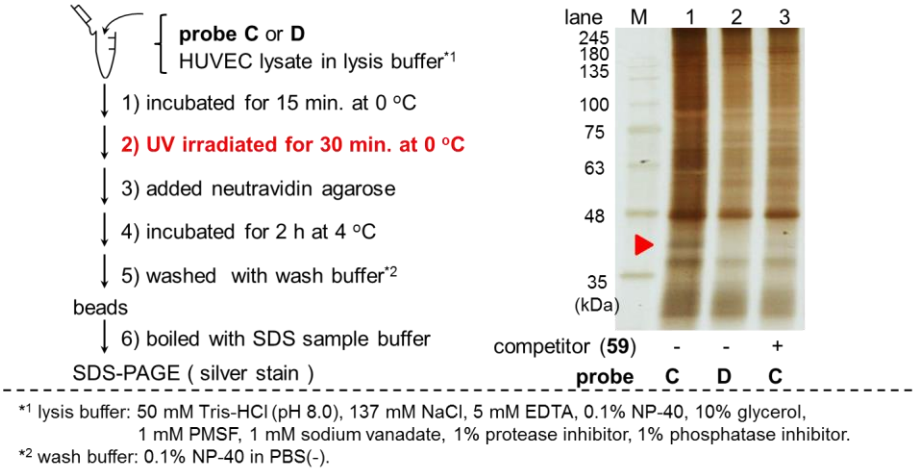
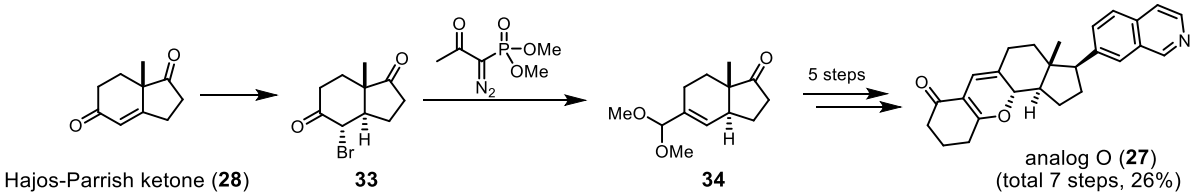


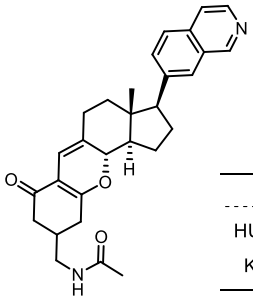

**Figure 22.　Probe C, D を用いた標的分子のプルダウン実験**

# 結論

1. HUVEC に対して良好な選択的増殖阻害活性を示し、経口投与で *in vivo* 抗腫瘍活性を示す analog O (**27**)を、短工程かつ高収率（7 工程、総収率 26%）で合成できる改良合成法を見出すことに成功した。



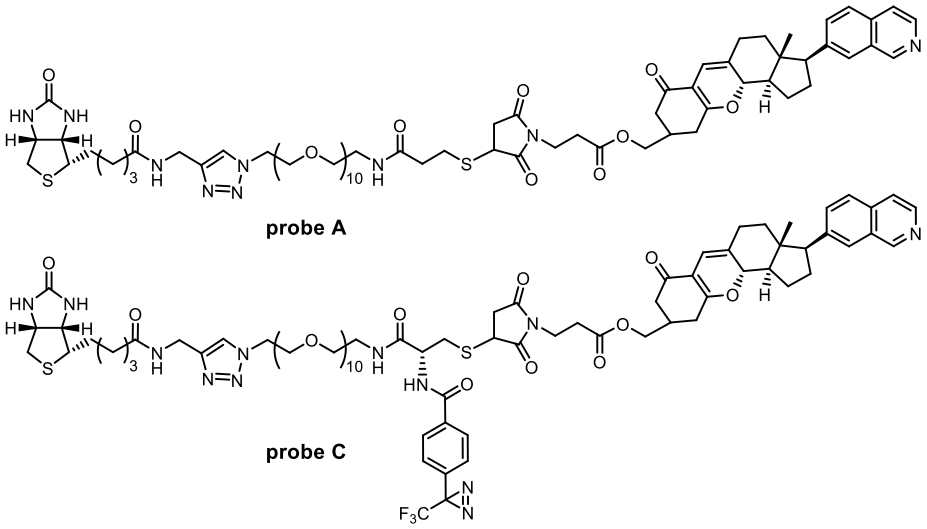

2. 改良合成法を利用して新規アナログ化合物の創製を検討した結果、活性評価を行った結果、非常に強力な HUVEC 選択的な増殖阻害活性を示す A 環にアセトアミド基を導入したアナログ **59** を見出すことができた。



**59**

| | $IC_{50}$ (μM) | S.I. |
|---|---|---|
| HUVEC | 0.0026 | |
| KB3-1 | 8.21 | 3150 |

3. 標的分子を捕捉するための活性アナログ **56** 由来のプローブ分子 (**probeA** および **probe C**) を設計・合成した。**Probe A** と **probe C** を用いてプルダウン実験を行い、標的分子を解析した。



# 謝辞

本研究に際し、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科天然物化学分野　恩師　小林　資正　教授に心から感謝致します。

実験を行うに際し、数々の有益なご助言とご指導をいただきました、古徳　直之　助教に心から感謝致します。また数々の有用なご助言をいただきました荒井　雅吉　准教授に深く感謝致します。

実験の際にご助力、ご助言いただきました本薬学研究科　天然物化学分野　住井　裕司博士、郭　修晗　博士、河内　崇志　博士、山浦　圭　博士、塩村　昌　修士、竹島　亜季　修士、角居　雄太　修士、水野　華奈子　学士、松本　紘和　学士、野形　真樹　氏、渋谷　俊一　学士に感謝致します。

大学院生活において、ご助言いただきました神谷　謙太郎　修士、石田　良典　修士、栗岡　昌利　修士、佐藤　陽紀　修士、韓　智秀　修士、毛利　晋輔　修士をはじめとする大阪大学大学院薬学研究科　天然物化学分野の皆様に感謝致します。

最後に日頃からご支援下さいました両親をはじめ家族、友人に心から感謝致します。

# 実験の部

エレクトロスプレーイオン化法飛行時間型質量分析 (ESI-TOF MS)は、Waters 製 Q-Tof Ultima を用いて測定し、溶媒として MeOH を用いた。

プロトン核磁気共鳴スペクトル($^1$H-NMR) は、JEOL Lambda 500 (500 MHz)および JEOL JNS-ECS 400SS (400 MHz)を用いて測定し、tetramethylsilane (TMS) を内部標準物質として用いた。$^1$H-NMR の分裂様式は、singlet, doublet, triplet, doublrdoublet, doubletriplet, multiplet をそれぞれ s, d, t, dd, dt, m に、broad は br と略して記載した。カーボン核磁気共鳴スペクトル ($^{13}$C-NMR) は、Varian unity inova 600 (150 MHz)を用いて測定した。chemical shift は δ (ppm)、結合定数は $J$ = (Hz)で表示した。

カラムクロマトグラフィーの担体は、関東化学株式会社製 Silica Gel 60N (63-210 mm)および Nacalai tesque 製 Cosmosil 75$C_{18}$-OPN を使用した。また、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)には、日立製作所製 L-2130 (UV-detector : L-2400H)を使用した。逆相カラムは Nacalai tesque 製 Cosmosil 5$C_{18}$-MS-II (4.6 mm i.d. × 250 mm)を使用した。

薄相クロマトグラフィー (TLC)は、Merck 製 TLC Silica gel 60 $F_{254}$ および HPTLC Silica gel 60 RP-18 $WF_{254}S$ を使用し、スポットの検出には、まず UV 照射下における発色の有無を検討した後、*p*-anisaldehyde / $H_2SO_4$ (AcOH 5.0 mL, *conc*. $H_2SO_4$ 25 mL, EtOH 425 mL, *p*-anisaldehyde 25 mL) もしくはリンモリブデン酸 / EtOH (リンモリブデン酸 5 g, EtOH 100 mL) を噴霧し、加熱時の発色により確認した。

合成反応は、特に記載がない限り、$N_2$ ガス雰囲気下で行った。各種添加剤、有機溶媒については市販のものをそのまま使用した。

$CO_2$ インキュベーターは TABAI ESPEC CORP 製 BNA-111 型炭酸ガス培養器を使用した。液体窒素凍結保存チャンバーはダイヤ冷凍工業製 DR22 を使用した。

高純度精製水は Milipore 製 Direct-Q UV を使用した。高圧蒸気滅菌(オートクレーブ)は平山製作所株式会社製　HA-240M を使用した。多本架冷却遠心機はトミー精工製 LX-120、高速遠心機はトミー精工製 RX-200 を使用した。超低温フリーザは三洋電機株式会社製 MDF-U537 および MDF-U33V を使用した。電気泳動で使用した泳動槽は日本エイドー社の NA-1011、またパワーサプライには BP-9 を使用した。ゲル転写装置は、日本エイドー社 NA-1510 を使用した。

タンパク質の定量は UV-2450 (SHIMADZU) を用いた。

UV ランプは UVP 製の Blak-Ray High Intensity Lamp B-100A を用いた。

## 第一章第一節の実験項

化合物 **33** は文献既知の方法により合成した。[18, 19)]

**(3a*S*,7a*S*)-5-(Dimethoxymethyl)-7a-methyl-2,3,3a,6,7,7a-hexahydro-1*H*-inden-1-one (34)**の合成

**33** (476 mg, 1.9 mmol) の MeOH 溶液 (15.5 mL) に、0 ℃で dimethyl (1-diazo-2-oxopropyl)phosphonate (0.44 mL, 2.9 mmol)、$K_2CO_3$ (537 mg, 3.9 mmol)を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応液を 0 ℃にした後、水を加え、AcOEt で抽出した。有機層を $Na_2SO_4$ で乾燥後ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/AcOEt = 4:1) にて精製し、**34** (350 mg, 81%) を白色の固体として得た。

$[\alpha]^{22}_{D}$ +71.8° (*c* = 1.38 in $CHCl_3$). IR (KBr): 1742, 1071, 1051 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (500 MHz, acetone-$d_6$) δ: 5.87 (1H, s), 4.53 (1H, s), 3.25 (6H, s), 2.53-2.47 (1H, m), 2.47 (1H, dd, *J* = 18.9, 8.6 Hz), 2.16-2.08 (3H, m), 2.03-1.99 (1H, m), 1.80-1.69 (2H, m), 1.48 (1H, dd, *J* = 18.9, 10.9 Hz), 0.83 (3H, s). $^{13}$C-NMR (125 MHz, acetone-$d_6$) δ: 217.7, 136.7, 125.9, 106.3, 53.6, 53.4, 48.0, 44.3, 36.5, 29.1, 23.1, 22.6, 13.2. ESI MS : *m/z* 247 $[M+Na]^+$. HR-ESI MS : *m/z* 247.1310, calcd for $C_{13}H_{20}O_3Na$, found 247.1314.

**(3a*S*,7a*S*)-6-(Dimethoxymethyl)-3a-methyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-1*H*-inden-3-yl-trifluoromethanesulfonate (45)**の合成

**34** (100 mg, 0.45 mmol) の THF 溶液 (4.5 mL) に、－78 ℃で *N*-phenyl-bis(trifluoromethanesulfonimide) (207 mg, 0.58 mmol)、KHMDS (0.5 M in toluene, 1.3 mL, 0.65 mmol)を加え、30 分間攪拌した。反応液を 0 ℃にした後、水を加え、$Et_2O$ で抽出した。有機層を $Na_2SO_4$ で乾燥後ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane : AcOEt = 5 : 1) にて精製し、**45** (148 mg, 93%) を無色のアモルファスとして得た。

$[\alpha]^{22}_{D}$ +51.2° (*c* = 1.61 in $CHCl_3$). IR (KBr): 1213, 1144, 1059 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 5.93 (1H, s), 5.59 (1H, s), 4.51 (1H, s), 3.33 (3H, s), 3.30 (3H, s), 2.76- 2.71 (1H, m), 2.36 (1H, ddd, *J* = 14.9, 6.3, 3.5 Hz), 2.26-2.21 (1H, m), 2.19-2.14 (1H,m), 1.84-1.75 (2H, m), 0.94 (3H, s). $^{13}$C-NMR (125 MHz, $CD_3OD$) δ: 160.3, 137.1, 125.7, 116.9, 107.4, 54.3, 54.0, 47.8, 46.4, 31.1, 30.0, 22.3, 15.3. ESI MS : *m/z* 379 $[M+Na]^+$. HR-ESI MS : *m/z* 379.0803, calcd for $C_{14}H_{19}F_3O_5SNa$, found 379.0836.

**7-[(3a*S*,7a*S*)-6-(Dimethoxymethyl)-3a-methyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-1*H*-inden-3-yl)]-isoquinoline (46)の合成**

**45** (148 mg, 0.42 mmol) の DMF 溶液 (1.0 mL) に、室温で 7-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)isoquinoline (147 mg, 0.65 mmol) の DMF 溶液 (3.2 mL)、$Pd(PPh_3)_4$ (72.1 mg, 0.062 mmol)、$K_2CO_3$ (172 mg, 1.25 mmol)を加え、50 ℃で 1.5 時間攪拌した。反応液を 0 ℃にした後、水を加え、$Et_2O$ で抽出した。有機層を $Na_2SO_4$ で乾燥後ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (toluene/acetone = 10:1) にて精製し、**46** (101 mg, 72%) を無色のアモルファスとして得た。

$[\alpha]^{22}_{D}$ +73.3° (*c* = 0.91 in $CHCl_3$). IR (KBr): 2932, 1103, 1073 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (500 MHz, acetone-$d_6$) δ: 9.31 (1H, s), 8.46 (1H, d, *J* = 5.7 Hz), 8.13 (1H, s), 7.89 (2H, d, *J* = 1.1 Hz), 7.73 (1H, d, *J* = 5.7 Hz), 6.25 (1H, s), 6.03 (1H, s), 4.56 (1H, s), 3.29 (3H, s), 3.28 (3H, s), 2.79-2.71 (1H, m), 2.43 (1H, ddd, *J* = 14.9, 6.9, 3.4 Hz), 2.39-2.35 (1H, m), 2.28-2.21 (3H, m), 1.78 (1H, dd, *J* = 19.5, 8.5 Hz) 1.12 (3H, s). $^{13}$C-NMR (125 MHz, acetone-$d_6$) δ: 153.7, 153.5, 143.8, 136.7, 136.2, 135.5, 130.6, 129.9, 129.8, 127.2, 126.2, 124.6, 120.7, 106.7, 53.5, 53.4, 50.3, 48.3, 32.9, 32.8, 22.9, 16.6. ESI MS : *m/z* 336 $[M+H]^+$. HR-ESI MS : *m/z* 336.1964, calcd for $C_{22}H_{26}NO_2$, found 336.1989.

**7-[(1*S*,3a*S*,7a*S*)-5-(Dimethoxymethyl)-7a-methyl-2,3,3a,6,7,7a-hexahydro-1*H*-inden-1-yl)]-isoquinoline (47)の合成**

**46** (36.8 mg, 0.110 mmol)の AcOEt 溶液 (2.0 mL) に室温で Pd/C (11.0 mg) を加え、$H_2$ 雰囲気下で 20 時間攪拌した。反応液をセライトろ過し、減圧濃縮することで、**47** (37.1 mg, quant.) を無色のアモルファスとして得た。

$[\alpha]^{24}_{D}$ +17.3° (*c* = 1.98 in $CHCl_3$). IR (KBr): 2932, 2876, 1196, 1073, 849 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (500 MHz, acetone-$d_6$) δ: 9.27 (1H, s), 8.45 (1H, d, *J* = 5.7 Hz), 7.98 (1H, s), 7.87 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.73 (1H, d, *J* = 5.7 Hz), 7.68 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 5.88 (1H, s), 4.49 (1H, s), 3.24 (1H, s), 3.23 (1H, s), 3.07 (1H, t, *J* = 9.7 Hz), 2.46-2.44 (2H, m), 2.15-2.13 (2H, m), 1.96-1.93 (2H, m), 1.65-1.63 (2H, m), 1.60-1.56 (1H, m), 0.50 (3H, s). $^{13}$C-NMR (125 MHz, acetone-$d_6$) δ: 153.1, 143.3, 141.4, 135.7, 135.3, 133.0, 129.6, 127.3, 126.8, 126.5, 120.7, 106.7, 55.8, 53.4, 53.3, 49.0, 45.3, 34.7, 27.1, 25.6, 22.9, 12.4. ESI MS : *m/z* 338 $[M+H]^+$. HR-ESI MS : *m/z* 338.2120, calcd for $C_{22}H_{28}NO_2$, found 338.2100.

**(1*S*,3a*S*,7a*S*)-1-(Isoquinolin-7-yl)-7a-methyl-2,3,3a,6,7,7a-hexahydro-1*H*-indene-5-carbaldehyde (31)の合成**

**47** (37.1 mg, 0.11 mmol)の acetone/$H_2O$ 溶液 (2.0 mL + 0.1 mL) に 0 ℃で pyridinium *p*-toluenesulfonate (27.6 mg, 0.11 mmol)を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応液を 0 ℃にした後、飽和 $NaHCO_3$ 水溶液を加え、AcOEt で抽出した。有機層を $Na_2SO_4$ で乾燥後ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/AcOEt = 1:1) にて精製し、**31** (31.3 mg, 98%) を無色のアモルファスとして得た。

$[\alpha]^{24}_{D}$ +55.8° (*c* = 2.10 in $CHCl_3$). IR (KBr): 2965, 2922, 1680, 850 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.43 (1H, s), 9.24 (1H, s), 8.49 (1H, s), 7.81 (1H, s), 7.76 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.63 (1H, d, *J* = 5.2 Hz), 7.59 (1H, dd, *J* = 8.6, 1.7 Hz), 6.87 (1H, d, *J* = 1.7 Hz), 3.03 (1H, t, *J* = 9.7 Hz), 2.69-2.64 (1H, m), 2.45-2.38 (2H, m), 2.28-2.22 (1H, m), 2.17-2.09 (2H, m), 1.80-1.73 (2H, m), 1.67-1.61 (1H, m), 0.48 (3H, s). $^{13}$C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ: 194.1, 152.3, 151.8, 142.5, 141.3, 139.6, 134.7, 132.0, 128.6, 126.1, 125.9, 120.1, 55.0, 50.0, 44.9, 33.1, 26.4, 24.0, 20.5, 12.3. ESI MS : *m/z* 292 $[M+H]^+$. HR-ESI MS : *m/z* 292.1701, calcd for $C_{20}H_{22}NO$, found 292.1695.

**(3*S*,3a*R*,11a*S*,11b*R*)-3-(Isoquinolin-7-yl)-3a-methyl-1,3,3a,4,5,8,9,10,11a,11b-decahydrocyclopenta[c]xanthen-7(*2H*)-one (analog O (27))の合成**

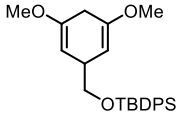
**31** (21.0 mg, 0.072 mmol)の AcOEt 溶液 (1.0 mL) に、0 ℃で cyclohexane- 1,3-dione (16.2 mg, 0.15 mmol)、ethylenediamine (7.2 μL (AcOEt で 20 倍に希釈), 0.11 mmol)を加え、室温で 19 時間攪拌した。反応液を 0 ℃にした後、水を加え、$CH_2Cl_2$ で抽出した。有機層を $Na_2SO_4$ で乾燥後ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/AcOEt = 1 : 3) にて精製し、**27** (19.3 mg, 70%) を白色の固体として得た。

$[\alpha]^{19}_{D}$ –31.0° ( c = 1.08 in $CHCl_3$ ). IR (KBr): 2947, 1647, 1604, 1406, 1381, 1219, 1167 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.23 (1H, s), 8.49 (1H, s), 7.79 (1H, s), 7.75 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.63 (1H, d, *J* = 4.9 Hz), 7.56 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 6.19 (1H, s), 4.92 (1H, d, *J* = 10.7 Hz), 3.02 (1H, t, *J* = 9.5 Hz), 2.43-2.28 (7H, m), 2.19-2.11 (3H, m), 2.01-1.90 (2H, m), 1.75-1.70 (1H, m), 1.60-1.58 (1H, m), 1.48 (1H, td, *J* = 12.7, 5.2 Hz), 0.61 (3H, s). $^{13}$C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ: 194.8, 171.3, 152.3, 142.5, 139.2, 134.7, 132.2, 128.9, 128.6, 126.3, 125.8, 120.1, 111.0, 110.7, 80.8, 56.7, 55.4, 46.7, 36.9, 36.4, 29.1, 28.1, 26.3, 23.9, 20.6, 12.3. ESI MS: *m/z* 408 $[M+H]^+$. HR-ESI MS: *m/z* 408.1939, calcd for $C_{26}H_{27}NO_2$. Found: 408.1931.

## 第一章第二節の実験項

化合物 **53**、**54** は文献既知の方法により合成した。[26)]

### *tert*-Butyl[(3,5-dimethoxycyclohexa-2,5-dien-1-yl)methoxy]diphenylsilane の合成




化合物 **54** (691 mg, 4.1 mmol)の DMF 溶液 (15 mL)に、0 ℃で imidazole (553 mg, 8.12 mmol)、*tert*-butylchlorodiphenylsilane (1.16 mL, 4.47 mmol)を加え、室温で 0.5 時間攪拌した。反応液を 0 ℃にした後、飽和 $NH_4Cl$ 水溶液を加え、$CH_2Cl_2$ で抽出した。有機層を $Na_2SO_4$ で乾燥後ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/AcOEt = 10:1) にて精製し、目的物 (1.56 g, 94%) を無色のアモルファスとして得た。

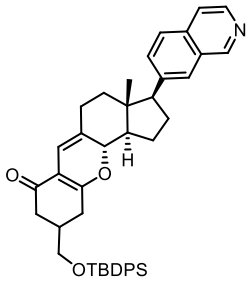
IR (KBr): 2953, 2933, 2901, 2857, 1694, 1206, 1148, 1111, 703 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.62-7.60 (4H, m), 7.35-7.28 (6H, m), 4.68-4.66 (2H, m), 3.46 (2H, d, *J* = 6.9 Hz), 3.41 (6H, s), 3.13-3.08 (1H, m), 2.59-2.57 (2H, m), 0.95 (9H, s). $^{13}$C-NMR (125 MHz, acetone-$d_6$) δ: 153.7, 136.3, 134.6, 130.5, 128.5, 93.3, 70.5, 54.3, 40.0, 32.1, 27.2, 19.8. MALDI MS : *m/z* 409 $[M+H]^+$. HR-MALDI MS : *m/z* 409.2194, calcd for $C_{22}H_{26}NO_3$. Found : 409.2200.

### 5-{[(*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy]methyl}cyclohexane-1,3-dione (55)の合成

*tert*-Butyl[(3,5-dimethoxycyclohexa-2,5-dien-1-yl)methoxy]diphenylsilane (39.5 mg, 0.097 mmol)の THF 溶液 (0.48 mL)に、0 ℃で 1N HCl (0.19 mL)を加え、室温で 3 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、**55** (43.9 mg, quant.)を白色の固体として得た。

IR (KBr): 2931, 2896, 2858, 1588, 1224, 1112, 703 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.64-7.62 (4H, m), 7.46-7.39 (6H, m), 3.62 (2H, d, *J* = 4.0 Hz), 3.40 (2H, m), 3.73-2.60 (4H, m), 2.30-2.29 (1H, m), 1.02 (9H, s). $^{13}$C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 203.6, 199.8, 178.5, 135.5, 135.4, 134.8, 133.2, 133.12, 133.09, 132.4, 129.8, 129.7, 129.67, 129.4, 127.7, 127.6, 127.5, 101.9, 67.1, 66.5, 66.3, 60.3, 57.6, 55.8, 43.4, 39.5, 36.3, 36.2, 33.4, 31.7, 26.7, 26.6, 26.5, 21.0, 19.2, 19.0, 14.1. MALDI MS: *m/z* 403 $[M+Na]^+$. HR-MALDI MS: *m/z* 403.1700, calcd for $C_{22}H_{26}NO_3$. Found: 403.1697.

**(3*S*,3a*R*,11a*S*)-9-{[(*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy]methyl}-3-(isoquinolin-7-yl)-3a-methyl-2,3,3a,4,5,8,9,10,11a,11b-decahydrocyclopenta[c]xanthen-7(1*H*)-one の合成**




**31** (11.7 mg, 0.04 mmol)の AcOEt 溶液 (0.8 mL) に、0 ℃で **55** (23.0 mg, 0.06 mmol)、ethylenediamine (5 μL, 0.08 mmol)を加え、室温で 19 時間攪拌した。反応液を 0 ℃にした後、水を加え、$CHCl_3$ で抽出した。有機層を $Na_2SO_4$ で乾燥後ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/AcOEt = 1:2) にて精製し、目的物 (14.0 mg, 53%) を無色のアモルファスとして 1:1 のジアステレオマー混合物で得た。IR (KBr): 2957, 2929, 2856, 1648, 1607, 1111, 703 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.24 (1H, s), 8.49 (1H, d, *J* = 4.8 Hz), 7.80 (1H, s), 7.77 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.65 (4H, d, *J* = 6.6 Hz), 7.58 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.45-7.38 (6H, m), 6.19 (1/2H, s), 6.17 (1/2H, s), 4.97 (1/2H, d, *J* = 10.2 Hz) , 4.93 (1/2H, d, *J* = 10.2 Hz), 3.63-3.57 (2H, m), 3.02 (1H, t, *J* = 9.0 Hz), 2.48-2.28 (7H, m), 2.19-2.12 (3H, m), 1.77-1.70 (1H, m), 1.61-1.58 (1H, m), 1.51-1.46 (1H, m), 1.06 (9H, s), 0.62 (3/2H, s), 0.61(3/2H, s). $^{13}$C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 194.5, 194.2, 170.8, 170.7, 151.9, 141.9, 139.4, 139.4, 135.5, 135.5, 134.8, 133.3, 133.2, 133.2, 132.4, 129.7, 129.0, 128.6, 128.5, 127.7, 126.4, 126.4, 125.8, 120.3, 111.1, 110.6, 110.6, 110.0, 81.0, 80.8, 66.6, 66.4, 56.7, 55.6, 55.2, 46.8, 46.6, 39.4, 39.1, 37.0, 36.6, 35.9, 35.3, 31.0, 30.7, 29.2, 29.0, 26.8, 26.3, 26.3, 24.0, 23.8, 19.3, 12.4, 12.3. ESI MS: *m/z* 676 $[M+Na]^+$. HR-ESI MS: *m/z* 676.3223, calcd for $C_{43}H_{47}NO_3NaSi$. Found: 676.3249.

**(3*S*,3a*R*,11a*S*)-9-(Hydroxymethyl)-3-(isoquinolin-7-yl)-3a-methyl-2,3,3a,4,5,8,9,10,11a,11b-decahydrocyclopenta[c]xanthen-7(1*H*)-one (56)の合成**

(3*S*,3a*R*,11a*S*)-9-{[(*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy]methyl}-3-(isoquinolin-7-yl)-3a-methyl-2,3,3a,4,5,8,9,10,11a,11b-decahydrocyclopenta[c]xanthen-7(1*H*)-one (14.0 mg, 0.021 mmol)の THF 溶液 (0.2 mL)に、0 ℃で acetic acid (1.8 μL, 0.032 mmol)、tetrabutylammonium fluoride (1.0 M in THF, 32.1 μL, 0.032 mmol)を加え、室温で 16 時間撹拌した。反応液を 0 ℃にした後、飽和 $NaHCO_3$ 水溶液を加え、$CHCl_3$ で抽出した。有機層を $Na_2SO_4$ で乾燥後ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($CHCl_3$/MeOH/$H_2O$ =

60:3: 1, lower phase) にて精製し、**56** (9.7 mg, 100%) を無色のアモルファスとして 1:1 のジアステレオマー混合物で得た。

IR (KBr): 3367, 2925, 2880, 1639, 1601, 1420, 1407, 1381, 1208, 754 $cm^{-1}$. $^{1}$H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.22 (1H, s), 8.47 (1H, s), 7.79 (1H, s), 7.76 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.65 (1H, s), 7.57 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 6.17 (1/2H, s), 6.16 (1/2H, s), 4.95 (1/2H, d, *J* = 10.2 Hz), 4.91 (1/2H, d, *J* = 10.2 Hz), 3.67-3.58 (2H, m), 3.03-2.99 (1H, m), 2.51-2.10 (11H, m), 1.73-1.69 (1H, m), 1.59-1.58 (1H, m), 1.50-1.45 (1H, m), 0.61 (3/2H, s), 0.60 (3/2H, s). $^{13}$C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 194.2, 194.0, 170.7, 170.5, 152.0, 142.0, 139.3, 134.8, 132.4, 129.1, 128.7, 126.4, 125.8, 120.4, 111.0, 110.6, 110.5, 110.1, 81.0, 80.9, 65.8, 65.5, 56.7, 55.5, 55.3, 46.7, 46.6, 39.2, 38.9, 37.0, 36.6, 35.8, 35.2, 31.0, 30.6, 29.2, 29.0, 26.3, 26.3, 23.9, 23.7, 12.3, 12.3. ESI MS: *m/z* 416 $[M+H]^+$. HR-ESI MS: *m/z* 416.2226, calcd for $C_{27}H_{30}NO_3$. Found: 416.2231.

**(3*S*,3a*R*,11a*S*)-9-(Azidomethyl)-3-(isoquinolin-7-yl)-3a-methyl-2,3,3a,4,5,8,9,10,11a,11b-decahydrocyclopenta[c]xanthen-7(1*H*)-one (57)の合成**

**56** (66.1 mg, 0.16 mmol)の THF 溶液 (1.6 mL)に、0℃で diethyl azodicarboxylate (2.2 M in toluene, 94 μL, 0.21 mmol)、triphenylphosphine (54.3 mg, 0.21 mmol)、diphenylphosphoryl azide (45 μL)を加え、40 分間撹拌した。反応液に MeOH を加えた後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($CHCl_3$/MeOH/$H_2O$ = 100:3:1, lower phase) にて精製し、**57** (112.1 mg, quant.) を無色のアモルファスとして得た。

IR (KBr): 2961, 2925, 2882, 2854, 2100, 1646, 1605, 1407, 1382, 1209, 755 $cm^{-1}$. $^{1}$H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.22 (1H, s), 8.49 (1H, d, *J* = 5.8 Hz), 7.79 (1H, s), 7.76 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.63 (1H, d, *J* = 5.8 Hz), 7.56 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 6.17 (1/2H, s), 6.16 (1/2H, s), 4.97 (1/2H, d, *J* = 10.6 Hz), 4.93 (1/2H, d, *J* = 10.6 Hz), 3.41-3.31 (2H, m), 3.02 (1H, t, *J* = 9.4 Hz), 2.53-2.10 (11H, m), 1.75-1.71 (1H, m), 1.62-1.57 (1H, m), 1.52-1.47 (1H, m), 0.62 (3/2H, s), 0.61 (3/2H, s). $^{13}$C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ: 193.0, 192.7, 169.7, 169.5, 152.2, 142.4, 139.1, 134.7, 132.2, 129.5, 129.1, 128.5, 126.3, 125.8, 120.1, 110.8, 110.7, 110.3, 110.2, 81.2, 81.1, 77.2, 77.0, 76.8, 56.7, 56.6, 55.5, 55.3, 55.2, 46.8, 46.6, 40.0, 39.7, 37.0, 36.6, 33.5, 33.0, 31.7, 31.4, 29.7, 29.3, 29.0, 26.3, 26.3, 23.9, 23.7, 22.7, 12.4, 12.3. ESI MS: *m/z* 441 $[M+H]^+$. HR-ESI MS: *m/z* 441.2291, calcd for $C_{27}H_{29}N_4O_2$. Found: 441.2292.

***N*-{[(3*S*,3a*R*,11a*S*)-3-(Isoquinolin-7-yl)-3a-methyl-7-oxo-1,2,3,3a,4,5,7,8,9,10,11a,11b-dodecahydrocyclopenta[c]xanthen-9-yl]methyl}acetamide (59)の合成**

**57** (70 mg, 0.16 mmol)の THF/$H_2O$ 溶液(1.6 mL + 0.4 mL)に triphenylphosphine (125 mg,

0.47 mmol)を加え、室温で 60 時間撹拌した。反応液を 0 ℃にした後、acetic acid の水溶液を加え、$Et_2O$、$CH_2Cl_2$ で抽出した。残った水層に飽和 $NaHCO_3$ 水溶液を加え、$CH_2Cl_2$ で抽出した。全ての有機層を $Na_2SO_4$ で乾燥後ろ過し、減圧濃縮することで **58** (48.2 mg, 73%) を無色のアモルファスとして得た。これ以上の精製は行わず、次の反応を行った。**58** (9.1mg, 0.022 mmol)の $CH_2Cl_2$ 溶液 (0.4 mL)に、0℃で *N*,*N*-diisopropylethylamine (0.04 mL, 0.22 mmol)、acetic anhydride (0.01 mL, 0.11 mmol)を加え、室温で 1 時間 30 分撹拌した。反応液を 0 ℃にした後、水を加え、$CH_2Cl_2$ で抽出した。有機層を $Na_2SO_4$ で乾燥後ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($CHCl_3$/MeOH/$H_2O$ = 60:3:1, lower phase) にて精製し、**59** (5.6 mg, 56%) を無色のアモルファスとして 1:1 のジアステレオマー混合物で得た。

IR (KBr): 3292, 2962, 2926, 2879, 2855, 1644, 1603, 1554, 1420, 1407, 1381, 1211, 756 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.25 (1H, s), 8.49 (1H, s), 7.81 (1H, s), 7.77 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.67 (1H, s), 7.58 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.15 (1/2H, s), 6.13 (1/2H, s), 5.83 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 4.95 (1/2H, d, *J* = 10.2 Hz), 4.91 (1/2H, d, *J* = 10.2 Hz), 3.36-3.34 (1H, m), 3.24-3.19 (1H, m), 3.02 (1H, t, *J* = 9.6 Hz), 2.50-2.10 (11H, m), 2.01 (3H, s), 1.74-1.71 (1H, m), 1.59-1.57 (1H, m), 1.49-1.46 (1H, m), 0.61 (3/2H, s), 0.60 (3/2H, s). $^{13}$C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 193.7, 193.5, 170.5, 170.5, 170.3, 151.8, 141.6, 139.4, 134.9, 132.5, 129.3, 128.9, 126.5, 125.9, 120.4, 110.8, 110.7, 110.4, 110.1, 81.1, 81.0, 77.2, 77.0, 76.8, 56.6, 56.6, 55.5, 55.2, 46.8, 46.6, 43.7, 43.5, 40.4, 40.1, 36.9, 36.6, 33.8, 33.1, 32.1, 31.9, 29.6, 29.3, 29.2, 29.0, 26.3, 26.3, 23.9, 23.7, 23.2, 12.3, 12.3. ESI MS: *m/z* 457 $[M+H]^+$. HR-ESI MS: *m/z* 457.2491, calcd for $C_{29}H_{33}N_2O_3$. Found: 457.2506.

化合物 **61**、**64** は文献既知の方法により合成した。[27, 28)]

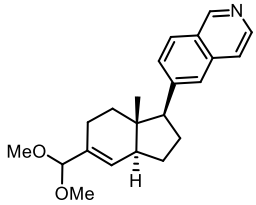
**6-[(3a*S*)-6-(Dimethoxymethyl)-3a-methyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-1*H*-inden-3-yl]isoquinoline (65)の合成**

**45** (200 mg, 0.56 mmol) の DMF 溶液 (5.6 mL) に、室温で 6-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)isoquinoline (214.3 mg, 0.84 mmol)、$Pd(PPh_3)_4$ (97 mg, 0.084 mmol)、$K_2CO_3$ (232 mg, 1.7 mmol)を加え、50 ℃で 1 時間撹拌した。反応液を 0 ℃にした後、水を加え、$Et_2O$ で抽出した。有機層を $Na_2SO_4$ で乾燥後ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane : acetone = 2 : 1) にて精製し、**65** (177.8 mg, 75%) を無色のアモルファスとして得た。

$[\alpha]^{27}_D$ +9.5° (*c* = 0.60 in MeOH). IR (KBr): 2929, 2844, 1626, 1102, 1073, 1053 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR

(600 MHz, acetone-$d_6$) δ: 9.22 (1H, s), 8.47 (1H, d, $J$ = 5.4 Hz), 8.03 (1H, d, $J$ = 8.4 Hz), 7.98 (1H, s), 7.79 (1H, m), 7.78 (1H, s), 6.30 (1H, s), 6.03 (1H, s), 4.56 (1H, s), 3.29 (3H, s), 3.28 (3H, s), 2.75 (1H, t, $J$ = 7.8 Hz), 2.44 (1H, ddd, $J$ = 15.6, 7.2, 3.0 Hz), 2.35 (1H, dd, $J$ = 12.0, 7.2 Hz), 2.28-2.21 (3H, m), 1.79-1.74 (1H, m), 1.12 (3H, s). $^{13}$C-NMR (125 MHz, acetone-$d_6$) δ: 153.7, 152.6, 144.1, 139.4, 136.6, 136.1, 131.0, 128.4, 128.0, 127.5, 126.0, 123.4, 121.1, 106.5, 53.4, 53.3, 50.1, 48.2, 32.7, 32.7, 22.7, 16.5. ESI MS: *m/z* 336 $[M+H]^+$. HR-ESI MS: *m/z* 336.1964, calcd for $C_{22}H_{26}NO_2$. Found: 336.1955.

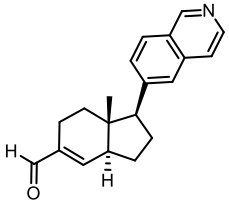
**6-[(1*S*,7a*S*)-5-(Dimethoxymethyl)-7a-methyl-2,3,3a,6,7,7a-hexahydro-1*H*-inden-1-yl]-isoquinoline** の合成




**65** (42.5 mg, 0.13 mmol)の AcOEt 溶液 (2.2 mL) に室温で Pd/C (10%, 14.2 mg) を加え、$H_2$ 雰囲気下で 22 時間攪拌した。反応液をセライトろ過し、減圧濃縮することで、目的物 (40.9 mg, 96%) を無色のアモルファスとして得た。

$[\alpha]^{26}_{D}$ +17.7° ($c$ = 1.19 in MeOH). IR (KBr): 2927, 2876, 1630, 1103, 1072 cm$^{-1}$. $^1$H-NMR (600 MHz, acetone-$d_6$) δ: 9.20 (1H, s), 8.43 (1H, d, $J$ = 5.4 Hz), 7.96 (1H, d, $J$ = 8.7 Hz), 7.76 (1H, s), 7.69 (1H, d, $J$ = 5.4 Hz), 7.54 (1H, t, $J$ = 8.7 Hz), 5.84 (1H, s), 4.45 (1H, s), 3.20 (3H, s), 3.18 (3H, s), 2.94 (1H, t, 9.6 Hz), 2.39-2.34 (2H, m), 2.11-2.04 (2H, m), 1.93-1.85 (2H, m), 1.60-1.58 (2H, m), 1.56-1.48 (1H, m), 0.44 (3H, s). $^{13}$C-NMR (150 MHz, acetone-$d_6$) δ: 152.6, 144.5, 143.7, 136.3, 135.5, 139.9, 128.4, 127.3, 127.0, 125.7, 120.8, 106.5, 55.8, 53.2, 48.9, 45.2, 34.5, 26.8, 25.4, 22.7, 12.3. ESI MS: *m/z* 338 $[M+H]^+$. HR-ESI MS: *m/z* 338.2120, calcd for $C_{22}H_{28}NO_2$. Found: 338.2104.

**(1*S*,7a*S*)-1-(Isoquinolin-6-yl)-7a-methyl-2,3,3a,6,7,7a-hexahydro-1*H*-indene-5-carbaldehyde** の合成




6-[(1*S*,7a*S*)-5-(Dimethoxymethyl)-7a-methyl-2,3,3a,6,7,7a-hexahydro-1*H*-inden-1-yl]-

isoquinoline (27.4 mg, 0.081 mmol)の acetone/$H_2O$ 溶液 (1.5 mL + 0.15 mL) に 0 ℃で pyridinium *p*-toluenesulfonate (20.4 mg, 0.081 mmol)を加え、室温で 2 時間攪拌した。反応液を 0 ℃にした後、飽和 $NaHCO_3$ 水溶液を加え、AcOEt で抽出した。有機層を $Na_2SO_4$ で乾燥後ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/AcOEt = 1:1) にて精製し、目的物 (22.0 mg, 93%) を無色のアモルファスとして得た。

$[\alpha]^{26}_{D}$ +64.1° (*c* = 0.62 in MeOH). IR (KBr): 2964, 2924, 2878, 1679, 1628 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR ( 600 MHz, $CDCl_3$ ) δ: 9.43 (1H, s), 9.22 (1H, s), 8.50 (1H, d, *J* = 6.0 Hz), 7.91 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.66 (1H, s), 7.61 (1H, d, *J* = 6.0 Hz), 7.51 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.87 (1H, s), 3.03 (1H, t, *J* = 9.6 Hz), 2.67-2.58 (1H, m), 2.47-2.39 (2H, m), 2.25-2.22 (1H, m), 2.17-2.09 (2H, m), 1.80-1.74 (2H, m), 1.67-1.62 (1H, m), 0.48 (3H, s). $^{13}$C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 194.1, 151.9, 151.7, 143.2, 142.8, 141.3, 135.7, 129.0, 127.7, 127.0, 125.2, 120.4, 55.3, 50.1, 45.1, 33.1, 26.3, 24.0, 20.5, 12.4. ESI MS: *m/z* 292 $[M+H]^+$. HR-ESI MS: *m/z* 292.1701, calcd for $C_{20}H_{22}NO$. Found: 292.1690.

**(3*S*,3a*R*,11a*S*)-3-(Isoquinolin-6-yl)-3a-methyl-2,3,3a,4,5,8,9,10,11a,11b-decahydrocyclopenta[c]xanthen-7(1*H*)-one (67)の合成**

(1*S*,7a*S*)-1-(Isoquinolin-6-yl)-7a-methyl-2,3,3a,6,7,7a-hexahydro-1*H*-indene-5-carbaldehyde (5.0 mg, 0.017 mmol)の AcOEt 溶液 (0.2 mL) に、0 ℃で cyclohexane- 1,3-dione (4.0 mg, 0.034 mmol)、ethylenediamine (1 滴)を加え、室温で 2 時間攪拌した。反応液を 0 ℃にした後、水を加え、$CH_2Cl_2$ で抽出した。有機層を $Na_2SO_4$ で乾燥後ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane : AcOEt = 1 : 2) にて精製し、**67** (4.6 mg, 69%) を無色のアモルファスとして得た。

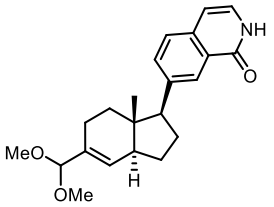
$[\alpha]^{26}_{D}$ +1.7° (*c* = 0.57 in MeOH). IR (KBr): 2928, 2880, 2854, 1645, 1631, 1604, 1406, 1381, 1218, 1168,754 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.21 (1H, s), 8.49 (1H, d, *J* = 5.7 Hz), 7.90 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.63 (1H, s), 7.60 (1H, d, *J* = 5.7 Hz), 7.47 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.19 (1H, s), 4.92 (1H, d, *J* = 10.2 Hz), 3.01 (1H, t, *J* = 9.6 Hz), 2.42-2.27 (7H, m), 2.16-2.12 (3H, m), 1.99-1.93 (2H, m), 1.74-1.72 (1H, m), 1.61-1.58 (1H, m), 1.50-1.47 (1H, m), 0.60 (3H, s). $^{13}$C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 194.9, 171.4, 152.0, 143.0, 142.6, 135.6, 129.1, 128.8, 127.7, 126.9, 125.3, 120.3, 110.9, 110.7, 80.7, 56.9, 55.4, 46.8, 36.8, 36.4, 29.1, 28.0, 26.3, 23.9, 20.6, 12.4. ESI MS: *m/z* 386 $[M+H]^+$. HR-ESI MS: *m/z* 386.2120, calcd for $C_{26}H_{28}NO_2$. Found: 386.2102.

**7-[(3a*S*)-6-(Dimethoxymethyl)-3a-methyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-1*H*-inden-3-yl]-isoquinolin-1(2*H*)-one (66)** の合成

**45** (82 mg, 0.23 mmol) の DMF 溶液 (2.3 mL) に、室温で 7-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)isoquinolin-1(2*H*)-one (93.3 mg, 0.34 mmol)、$Pd(PPh_3)_4$ (78.6 mg, 0.06 mmol)、$K_2CO_3$ (158.8 mg, 1.15 mmol)を加え、50 ℃で 6 時間攪拌した。反応液を 0 ℃にした後、水を加え、$Et_2O$ で抽出した。有機層を $Na_2SO_4$ で乾燥後ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/acetone = 4:1) にて精製し、**66** (39.7 mg, 49%) を無色のアモルファスとして得た。

$[\alpha]^{27}_D$ +25.3° (*c* = 1.11 in MeOH). IR (KBr): 3165, 2926, 2848, 1652, 1635, 1613, 1101, 1073 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (600 MHz, $CD_3OD$) δ: 8.31 (1H, s), 7.74 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.55 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.13 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 6.62 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 6.09 (1H, s), 5.98 (1H, s), 4.52 (1H, s), 3.31 (3H, s), 3.30 (3H, s), 2.68-2.66 (1H, m), 2.37-2.33 (1H, ddd, *J* = 15.0, 7.2, 3.0 Hz), 2.27-2.16 (3H, m), 2.15 (2H, s), 1.71-1.65 (1H, m), 1.05 (3H, s). $^{13}$C-NMR (150 MHz, $CD_3OD$) δ: 165.0, 154.1, 138.5, 136.9, 136.3, 132.7, 129.7, 128.5, 127.5, 127.2, 126.8, 124.7, 107.8, 107.7, 54.1, 54.0, 50.7, 48.5, 33.2, 33.1, 23.0, 16.7. MALDI MS: *m/z* 352 $[M+H]^+$. HR-MALDI MS: *m/z* 352.1907, calcd for $C_{22}H_{26}NO_3$. Found: 352.1917.

**7-[(1*S*,7a*S*)-5-(Dimethoxymethyl)-7a-methyl-2,3,3a,6,7,7a-hexahydro-1*H*-inden-1-yl]-isoquinolin-1(2*H*)-one** の合成

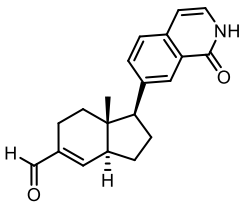



**66** (18.9 mg, 0.054 mmol)の AcOEt 溶液 (1.0 mL) に室温で Pd / C (6.3 mg) を加え、$H_2$ 雰囲気下で 5 時間攪拌した。反応液をセライトろ過し、減圧濃縮することで、目的物 (17.6 mg, quant.) を無色のアモルファスとして得た。

$[\alpha]^{27}_D$ +18.8° (*c* = 0.83 in MeOH). IR (KBr): 3164, 2926, 2874, 2830, 1652, 1636, 1614, 1103, 1070 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (600 MHz, $CD_3OD$) δ: 8.18 (1H, s), 7.58 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.55 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.11 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 6.63 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 5.85 (1H, s), 4.45 (1H, s), 3.26 (3H, s), 3.25 (3H, s), 2.88 (1H, t, *J* = 9.6 Hz), 2.38-2.36 (1H, m), 2.33-2.31 (1H, m), 2.12-2.06 (2H, m), 1.94-1.88 (2H, m), 1.58-1.51 (3H, m), 0.44 (3H, s). $^{13}$C-NMR (150 MHz, $CD_3OD$) δ: 165.1, 141.5, 138.18, 138.17, 135.8, 135.2, 128.4, 128.1, 127.0, 126.6, 107.9, 107.8, 56.2, 54.02, 54.00, 49.5, 45.5, 35.1, 27.6, 27.4, 26.0, 23.0, 12.5. ESI MS: *m/z* 354 $[M+H]^+$. HR-ESI MS: *m/z*

354.2069, calcd for $C_{22}H_{28}NO_3$. Found: 354.2083.

**(1*R*,7a*S*)-7a-Methyl-1-(1-oxo-1,2-dihydroisoquinolin-7-yl)-2,3,3a,6,7,7a-hexahydro-1*H*-indene-5-carbaldehyde の合成**




7-[(1*S*,7a*S*)-5-(Dimethoxymethyl)-7a-methyl-2,3,3a,6,7,7a-hexahydro-1*H*-inden-1-yl]-isoquinolin-1(2*H*)-one (15.4 mg, 0.044 mmol)の acetone / $H_2O$ 溶液 (1.0 mL + 0.1 mL) に 0 ℃で pyridinium *p*-toluenesulfonate (11.0 mg, 0.044 mmol)を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応液を 0 ℃にした後、飽和 $NaHCO_3$ 水溶液を加え、AcOEt で抽出した。有機層を $Na_2SO_4$ で乾燥後ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/acetone = 2:1) にて精製し、目的物 (16.3 mg, quant.) を無色のアモルファスとして得た。

$[\alpha]^{26}_{D}$ +36.8° (*c* = 1.44 in MeOH). IR (KBr): 3163, 2968, 2923, 2877, 1680, 1651, 1635, 754 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 11.80 (1H, s), 9.41 (1H, s), 8.28 (1H, s), 7.55 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.51 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.18 (1H, d, *J* = 6.9 Hz), 6.85 (1H, d, *J* = 1.2 Hz), 6.56 (1H, d, *J* = 6.9 Hz), 2.98 (1H, d, *J* = 9.6 Hz), 2.62 (1H, m), 2.44-2.40 (2H, m), 2.20-2.15 (1H, m), 2.06-2.05 (1H, m), 1.76-1.71 (2H, m), 1.61-1.60 (1H, m), 0.46 (3H, s). $^{13}$C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 194.1, 164.5, 152.1, 141.3, 139.2, 136.6, 133.6, 127.2, 126.2, 125.7, 125.6, 106.5, 54.9, 50.0, 44.7, 33.0, 29.2, 26.4, 23.9, 20.5, 12.9. ESI MS: *m/z* 308 $[M+H]^+$. HR-ESI MS: *m/z* 308.1651, calcd for $C_{20}H_{22}NO_2$. Found: 308.1664.

**7-[(3*S*,3a*R*,11a*S*)-3a-Methyl-7-oxo-1,2,3,3a,4,5,7,8,9,10,11a,11b-dodecahydrocyclopenta[c]xanthen-3-yl]-isoquinolin-1(2*H*)-one (68)の合成**

(1*R*,7a*S*)-7a-Methyl-1-(1-oxo-1,2-dihydroisoquinolin-7-yl)-2,3,3a,6,7,7a-hexahydro-1*H*-indene-5-carbaldehyde (10.9 mg, 0.035 mmol) の dioxane 溶液 (0.7 mL) に、0 ℃で cyclohexane-1,3-dione (8.0 mg, 0.071 mmol)、piperidine (2 滴)を加え、室温で 13 時間攪拌した。反応液を 0 ℃にした後、水を加え、$CHCl_3$ で抽出した。有機層を $Na_2SO_4$ で乾燥後ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/AcOEt = 1:2) にて精製し、**68** (7.3 mg, 51%) を無色のアモルファスとして得た。

$[\alpha]^{27}_{D}$ –8.6° (*c* = 0.64 in MeOH). IR (KBr): 3184, 2961, 2925, 2855, 1651, 1613, 1598, 1261, 800 $cm^{-1}$. $^{1}$H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 10.78 (1H, brs), 8.26 (1H, s), 7.54-7.49 (2H, m), 7.14 (1H, brs), 6.57 (1H, d, *J* = 6.8 Hz), 6.18 (1H, s), 4.91 (1H, d, *J* = 10.0 Hz), 2.96 (1H, t, *J* = 9.4 Hz), 2.43-2.35 (7H, m), 2.12-2.11 (3H, m), 1.98-1.92 (2H, m), 1.72-1.69 (1H, m), 1.59-1.55 (1H, m), 1.47-1.40 (1H, m), 0.59 (3H, s). $^{13}$C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 194.0, 170.4, 163.3, 137.9, 135.6, 132.9, 128.0, 126.1, 125.4, 124.7, 124.6, 109.9, 109.7, 105.6, 79.8, 55.6, 54.4, 45.5, 35.8, 35.4, 28.1, 27.1, 25.4, 22.9, 19.6, 11.3. ESI MS: *m/z* 424 $[M+Na]^+$. HR-ESI MS: *m/z* 424.1889, calcd for $C_{26}H_{27}NO_3Na$. Found: 424.1886.

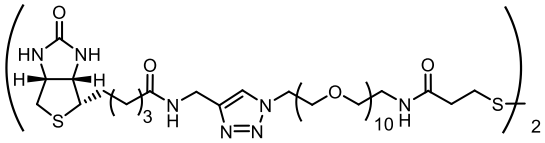
## 第二章第二節の実験項

**3,3'-Disulfanediylbis[*N*-(32-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaoxadotriacontyl)-propanamide] (73)**の合成

**72** (21.0 mg, 0.1 mmol)の THF 溶液 (1 mL)に *O*-(2-aminoethyl)-*O*'-(2-azidoethyl) nonaethylene glycol (110.4 mg, 0.21 mmol)、HOBt (32.4 mg, 0.24 mmol)、EDCI・HCl (45.9 mg, 0.24 mmol)を加え、室温で 3 時間撹拌した。反応液を減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($CHCl_3$/MeOH/$H_2O$ = 30:3:1, lower phase)にて精製し、**73** (111 mg, 91%)を無色のアモルファスとして得た。

IR (KBr): 3275, 2870, 2106, 1738, 1667, 1547, 1455 $cm^{-1}$. $^{1}$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 6.55 (2H, t-like), 3.62–3.59 (76H, m), 3.51 (4H, t, *J* = 5.2 Hz), 3.39 (4H, q, *J* = 5.2 Hz), 3.33 (4H, t, *J* = 5.2 Hz), 2.91 (4H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.54 (4H, t, *J* = 7.2 Hz). $^{13}$C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ: 170.8 (2C), 70.5 (2C), 70.5 (2C), 70.44 (2C), 70.35 (24C), 70.1 (6C), 69.85 (2C), 69.57 (2C), 50.5 (2C), 39.2 (2C), 35.5 (2C), 33.8 (2C). ESI MS: *m/z* 1249 $[M+Na]^+$. HR-ESI MS: *m/z* 1249.6135, calcd for $C_{50}H_{98}N_8O_{22}S_2Na$. Found: 1249.6166.

**(*S*,*R*,*S*)-*N*,*N'*-{[1,1'-(34,41-Dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-icosaoxa-37,38-dithia-33,42-diazatetraheptacontane-1,74-diyl)bis(1*H*-1,2,3-triazole-4,1-diyl)]bis(methylene)}bis{5-[(3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl]-pentanamide}**の合成



**73** (23.3 mg, 0.019 mmol)と **74** (11.2 mg, 0.04 mmol)の *t*-BuOH/$H_2O$ 溶液 (1:1, 0.2 mL)に $CuSO_4$ (0.05 M in water, 3.8 μL, 0.19 μmol)を加え、凍結脱気した。反応液に sodium ascorbate (0.05 M in water, 38 μL, 1.9 μL) を加え、室温で 27 時間撹拌した。反応液を減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($CHCl_3$/MeOH/$H_2O$ = 15:3:1, lower phase)にて精製し、目的物 (21 mg, 62%)を無色のアモルファスとして得た。IR (KBr) : 3267, 2908, 2876, 1696, 1659, 1543, 1460, 1111 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.81 (2H, t, *J* = 5.7 Hz), 7.70 (2H, s), 7.09 (2H, s), 6.87 (2H, t, *J* = 5.6 Hz), 6.59 (2H, s), 4.49–4.46 (8H, m), 4.35 (2H, dd, *J* = 15.2, 5.7 Hz), 4.30–4.28 (2H, m), 3.81 (4H, t, *J* = 5.2 Hz), 3.60–3.56 (72H, m), 3.52 (4H, t, *J* = 5.2 Hz), 3.39 (4H, q, *J* = 5.1 Hz), 3.09–3.07 (2H, m), 2.92 (4H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.86 (2H, dd, *J* = 12.6, 4.6 Hz), 2.72 (2H, d, *J* = 12.6 Hz), 2.55 (4H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.17–2.15 (4H, m), 1.72–1.69 (2H, m), 1.63–1.59 (6H, m), 1.40–1.36 (4H, m). $^{13}$C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ: 173.2 (2C), 171.0 (2C), 164.5 (2C), 144.9 (2C), 123.3 (2C), 70.4 (34C), 70.0 (2C), 69.7 (2C), 69.2 (2C), 61.6 (2C), 60.2 (2C), 55.7 (2C), 50.1 (2C), 40.5 (2C), 39.2 (2C), 35.6 (2C), 35.5 (2C), 34.2 (2C), 33.9 (2C), 28.1 (2C), 27.9 (2C), 25.3 (2C). ESI MS: *m/z* 918 $[M+H+Na]^{2+}$. HR-ESI MS: *m/z* 918.4292, calcd for $C_{38}H_{69}N_7O_{13}S_2Na$. Found: 918.4207.

**[(3*S*,3a*R*,11a*S*,11b*R*)-3-(Isoquinolin-7-yl)-3a-methyl-7-oxo-1,2,3,3a,4,5,7,8,9,10,11a,11b-dodecahydrocyclopenta[*c*]xanthen-9-yl]methyl-3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-propanoate (69)の合成**

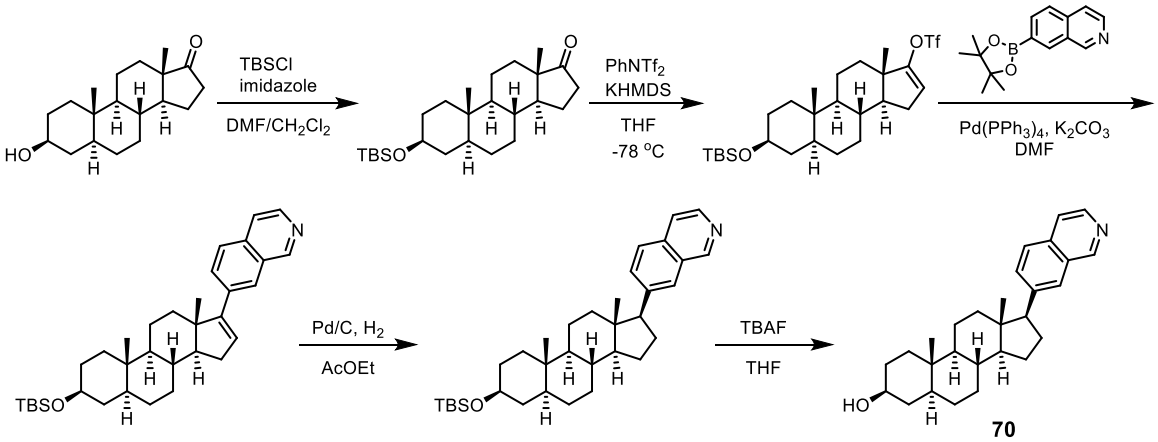
**56** (9.5 mg, 0.023 mmol)の $CH_2Cl_2$ 溶液 (0.5 mL)に、0 ℃で 3-maleimidopropionyl chloride (21.4 mg, 0.11 mmol)、$Et_3N$ (4.8 μL, 0.034 mmol)を加え、室温で 15 時間攪拌した。反応液を 0 ℃にした後、飽和 $NaHCO_3$ 水溶液を加え、$CH_2Cl_2$ で抽出した。有機層を $Na_2SO_4$ で乾燥後ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/AcOEt = 1:1, in 1% $Et_3N$) にて精製し、**69** (12.6 mg, 97%) を無色のアモルファスとして得た。

IR (KBr): 2922, 2853, 1736, 1711, 1649, 1606, 1406, 1381 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.23 (1H, brs), 8.49 (1H, brs), 7.79 (1H, s), 7.76 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.63 (1H, brs), 7.56 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.73 (2H, s), 6.17 (1/2H, s), 6.16 (1/2H, s), 4.97 (1/2H, d, *J* = 10.5 Hz), 4.93 (1/2H, d, *J* = 10.5 Hz), 4.05–4.04 (2H, m), 3.85 (2H, t, *J* = 7.1 Hz), 3.03 (1H, t, *J* = 9.4 Hz), 2.67 (2H, t, *J* = 6.9 Hz), 2.51–2.29 (4H, m), 2.24–2.15 (4H, m), 1.74–1.67 (1H, m), 1.62–1.58 (1H, m), 1.52–1.45 (1H, m), 1.41 (1H, t-like), 1.36–1.09 (1H, m), 0.62 (3/2H, s), 0.61 (3/2H, s). $^{13}$C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ: 194.3, 194.0, 170.7, 170.6, 152.2, 142.4, 139.18, 139.16, 134.7,

132.2, 129.1, 128.8, 128.5, 126.3, 125.8, 120.2, 111.0, 110.6, 110.5, 110.1, 81.0, 80.9, 65.8, 65.5, 56.7, 56.6, 55.5, 55.3, 46.7, 46.6, 39.2, 39.0, 37.0, 36.7, 35.9, 35.3, 31.0, 30.6, 29.2, 29.0, 26.30, 26.28, 23.9, 23.7, 12.33, 12.29. ESI MS: *m/z* 567 $[M+H]^+$.　HR-ESI MS: *m/z* 567.2495, calcd for $C_{34}H_{35}N_2O_6$. Found: 567.2501.

**(5*S*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-17-(Isoquinolin-7-yl)-10,13-dimethylhexadecahydro-1*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-3-ol (70)の合成**

**70** は市販の化合物から下図のようにして合成した。




$[\alpha]^{22}_{D}$ 7.4° (*c* = 0.88 in MeOH). IR (KBr): 3290, 2925, 2844 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.20 (1H, s), 8.46 (1H, d, *J* = 5.7 Hz), 7.78 – 7.69 (2H, m), 7.63 – 7.53 (2H, m), 3.73 – 3.55 (1H, m), 2.86 (1H, t, *J* = 9.8 Hz), 2.28 – 2.16 (1H, m), 2.09 – 1.92 (1H, m), 1.92 – 1.61 (4H, m), 1.61 – 1.51 (2H, m), 1.48 – 1.08 (10H, m), 1.08 – 0.92 (3H, m), 0.86 (1H, d, *J* = 15.6 Hz), 0.81 – 0.68 (4H, m), 0.47 (3H, s). $^{13}$C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ: 152.3, 142.3, 140.8, 134.5, 132.4 128.6, 126.0, 125.5, 120.1, 71.3, 57.2, 56.4, 54.6, 45.0, 44.9, 38.2, 37.9, 37.0, 36.0, 35.6, 32.1, 31.5, 28.7, 26.1, 24.5, 20.9, 12.9, 12.3. ESI MS: *m/z* 404 $[M+H]^+$.　HR-ESI MS: *m/z* 404.2953, calcd for $C_{28}H_{37}NO$. Found: 404.2944.

**(3*S*,10*S*,13*S*,17*S*)-17-(Isoquinolin-7-yl)-10,13-dimethylhexadecahydro-*1H*-cyclopenta[*a*] phenanthren-3-yl 3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-*1H*-pyrrol-1-yl)propanoate (71)の合成**

**70** (16.8 mg, 0.042 mmol)の $CH_2Cl_2$ 溶液 (0.5 mL)に、0℃で 3-maleimidopropionyl chloride (39.0 mg, 0.208 mmol)、 $Et_3N$ (9.0 μL, 0.062 mmol)を加え、室温で 15 時間攪拌した。反応液を 0 ℃にした後、飽和 $NaHCO_3$ 水溶液を加え、$CH_2Cl_2$ で抽出した。有機層を $Na_2SO_4$ で乾燥後ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー

(*n*-hexane : AcOEt = 1 : 1, in 1% $Et_3N$) にて精製し、**71** (10.1 mg, 44%) を無色のアモルファスとして得た。

$[\alpha]^{23}_{D}$ 18.6° (*c* = 0.94 in $CHCl_3$). IR (KBr): 2924, 2853, 1711, 1446, 1385 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.21 (1H, s), 8.46 (1H, d, *J* = 5.7 Hz), 7.76 (1H, s), 7.72 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.61 (1H, d, *J* = 5.7 Hz), 7.57 (1H, dd, *J* = 8.5, 1.3 Hz), 6.70 (2H, s), 4.73–4.66 (1H, m), 3.81 (2H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.87 (1H, t, *J* = 9.8 Hz), 2.60 (2H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.27–2.18 (1H, m), 2.12–1.93 (1H, m), 1.88–1.69 (5H, m), 1.64–1.51 (2H, m), 1.50–1.14 (7H, m), 1.10–0.93 (3H, m), 0.92–0.83 (1H, m), 0.80 (3H, s), 0.79–0.70 (1H, m), 0.47 (3H, s). $^{13}$C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 170.3, 170.2, 152.3, 142.2, 140.8, 134.5, 134.2, 132.5, 128.6, 126.0, 125.5, 120.1, 74.2, 57.1, 56.2, 54.4, 44.8, 44.7, 37.8, 36.7, 35.9, 35.5, 33.9, 33.7, 33.2, 32.0, 28.5, 27.3, 26.1, 24.5, 20.8, 12.9, 12.2. ESI MS: *m/z* 555 $[M+H]^+$. HR-ESI MS: *m/z* 555.3223, calcd for $C_{35}H_{42}N_2O_4$. Found: 555.3198.

**[(3*S*,3a*R*,11a*S*)-3-(Isoquinolin-7-yl)-3a-methyl-7-oxo-1,2,3,3a,4,5,7,8,9,10,11a,11b-dodecahydrocyclopenta[*c*]xanthen-9-yl]-methyl-3-[2,5-dioxo-3-({34-oxo-1-[4-({5-[(3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl]pentanamido}methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaoxa-33-Azahexatriacontan-36-yl}thio)pyrrolidin-1-yl]propanoate (probe A)** の合成

(*S*,*R*,*S*)-*N*,*N'*-{[1,1'-(34,41-Dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-icosaoxa-37,38-dithia-33,42-diazatetraheptacontane-1,74-diyl)bis(1*H*-1,2,3-triazole-4,1-diyl)]bis(methylene)}bis{5-[(3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl]-pentanamide} (2.9 mg, 1.6 μmol)の THF/$H_2O$ 溶液 (4:1, 0.3 mL)に $NaHCO_3$ (0.5 mg, 6.0 μmol)、TCEP・HCl (0.5 mg, 1.7 μmol)を加え、室温で 1 時間撹拌した。TLC チェックにより、チオール体へと還元されたことを確認した後、**69** (2 mg, 3.6 μmol)を加え、さらに室温で 5 時間撹拌した。反応液を減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($CHCl_3$/MeOH/$H_2O$ = 15:3:1, lower phase)にて精製し、目的物 (1.8 mg, 37 %)を無色のアモルファスとして得た。

IR (KBr): 3267, 2919, 2872, 1732, 1703, 1655, 1400, 1252, 1109 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.25 (1H, brs), 8.49 (1H, brs), 7.81 (1H, brs), 7.78 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.75 (1H, s), 7.67 (1H, d, *J* = 4.6 Hz), 7.59 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.42 (1H, brs), 6.84 (1H, brs), 6.49 (1H, brs), 6.17 (1/2H, s), 6.16 (1/2H, s), 5.89 (1H, brs), 4.98 (1/2H, d, *J* = 10.3 Hz), 4.93 (1/2H, d, *J* = 10.9 Hz), 4.60–4.47 (4H, m), 4.41 (1H, dd, *J* = 14.7, 5.2 Hz), 4.37–4.32 (1H, m), 4.10–3.98 (2H, m), 3.90–3.79 (2H, m), 3.68–3.58 (38H, m), 3.58–3.54 (2H, m), 3.51–3.41 (2H, m), 3.24–3.11

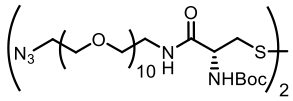
(3H, m), 3.07–2.99 (2H, m), 2.93 (2H, dd, *J* = 12.9, 4.9 Hz), 2.77 (1H, d, *J* = 12.6 Hz), 2.70–2.62 (2H, m), 2.61–2.53 (2H, m), 2.53–2.10 (8H, m), 2.00–1.56 (6H, m), 1.54–1.38 (3H, m), 1.34–1.18 (4H, m), 0.93–0.83 (3H, m), 0.62 (3/2H, s), 0.61 (3/2H, s). ESI MS: *m/z* 1485 $[M+Na]^+$. HR-ESI MS: *m/z* 1484.6709, calcd for $C_{72}H_{103}N_9O_{19}S_2Na$. Found: 1484.6757.

**(3*S*,5*S*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-17-(Isoquinolin-7-yl)-10,13-dimethylhexadecahydro-1*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-3-yl-3-[2,5-dioxo-3-({34-oxo-1-[4-({5-[(3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl]pentanamido}methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaoxa-33-azahexatriacontan-36-yl}thio)pyrrolidin-1-yl]propanoate (probe B)の合成**

(*S*,*R*,*S*)-*N*,*N'*-{[1,1'-(34,41-Dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-icosaoxa-37,38-dithia-33,42-diazatetraheptacontane-1,74-diyl)bis(1*H*-1,2,3-triazole-4,1-diyl)]bis(methylene)}bis{5-[(3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl]-pentanamide} (6.7 mg, 3.75 μmol)の THF/$H_2O$ 溶液 (4:1, 0.4 mL)に $NaHCO_3$ (1.4 mg, 16.5 μmol)、TCEP・HCl (1.2 mg, 4.1 μmol)を加え、室温で 1 時間撹拌した。TLC チェックにより、チオール体へと還元されたことを確認した後、**71** (2.5 mg, 4.51 μmol)を加え、さらに室温で 12 時間撹拌した。反応液を減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($CHCl_3$/MeOH/$H_2O$ = 15:3:1, lower phase)にて精製し、目的物 (6.1 mg, 93 %)を無色のアモルファスとして得た。

IR (KBr): 3265, 2920, 2870, 1705, 1669, 1545, 1451, 1254, 1105 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.23 (1H, s), 8.46 (1H, d, *J* = 5.7 Hz), 7.79 (1H, s), 7.76–7.73 (2H, m), 7.65 (1H, d, *J* = 5.7 Hz), 7.60 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.43 (1H, t-like), 6.80 (1H, brs), 6.52 (1H, brs), 5.93 (1H, brs), 4.74–4.65 (1H, m), 4.57–4.48 (4H, m), 4.41 (1H, dd, *J* = 15.2, 5.4 Hz), 4.37–4.32 (1H, m), 3.87–3.82 (2H, m), 3.79 (2H, t, *J* = 7.2 Hz), 3.67–3.59 (36H, m), 3.58–3.55 (2H, m), 3.48–3.42 (2H, m), 3.23–3.10 (3H, m), 3.02 (1H, dt, *J* = 13.8, 6.9 Hz), 2.96–2.85 (2H, m), 2.77 (1H, d, *J* = 12.6 Hz), 2.58 (4H, q, *J* = 7.5 Hz), 2.55–2.48 (1H, m), 2.30–2.17 (3H, m), 2.10–1.51 (14H, m), 1.51–1.14 (10H, m), 1.09–0.93 (2H, m), 0.81 (3H, s), 0.78–0.69 (1H, m), 0.47 (3H, s). ESI MS: *m/z* 1473 $[M+H]^+$. HR-ESI MS: *m/z* 1472.743, calcd for $C_{73}H_{111}N_9O_{17}S_2$. Found: 1472.7473.

**Di-*tert*-butyl[(35R,40R)-1,74-diazido-34,41-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-icosaoxa-37,38-dithia-33,42-diazatetraheptacontane-35,40-diyl]dicarbamate の合成**



**77** (250 mg, 0.57 mmol)の THF 溶液 (5.7 mL)に *O*-(2-aminoethyl)-*O*'-(2-azidoethyl) nonaethylene glycol (655 mg, 1.24 mmol)、HOBt (161 mg, 1.19 mmol)、EDCI・HCl (228 mg, 1.19 mmol)を加え、室温で 1.5 時間撹拌した。反応液を減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($CHCl_3$/MeOH/$H_2O$ = 30:3:1, lower phase)にて精製し、目的物 (845 mg, quant.)を無色のアモルファスとして得た。

$[\alpha]^{23}_D$ 16.3° (*c* = 1.15 in $CHCl_3$). IR (KBr): 3327, 2872, 2106, 1712, 1672, 1350, 1105 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.63 (2H, brs), 5.56 (2H, d, *J* = 9.5 Hz), 4.74 (2H, brs), 3.66-3.58 (76H, m), 3.54 (4H, t, *J* = 5.5 Hz), 3.47-3.41 (4H, m), 3.37 (4H, t, *J* = 5.0 Hz), 2.95 (4H, m), 1.44 (18H, s). $^{13}$C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ: 170.3, 155.6, 79.9. 70.4, 70.3, 70.1, 69.8, 69.4, 54.2, 50.5, 46.0, 39.2, 28.2. ESI MS: *m/z* 1479 $[M+Na]^+$. HR-ESI MS: *m/z* 1479.7401, calcd for $C_{60}H_{116}N_{10}O_{26}S_2Na$. Found: 1479.7411.

***N,N'*-[(35*R*,40*R*)-1,74-Diazido-34,41-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-icosaoxa-37,38-dithia-33,42-diazatetraheptacontane-35,40-diyl]bis{4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]benzamide} (78)の合成**

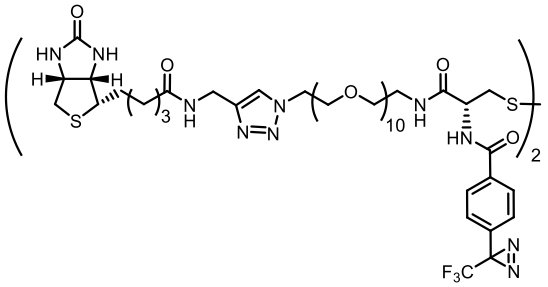
Di-*tert*-butyl[(35R,40R)-1,74-diazido-34,41-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-icosaoxa-37,38-dithia-33,42-diazatetraheptacontane-35,40-diyl]dicarbamate (845 mg, 0.61 mmol)の $CH_2Cl_2$ 溶液 (6.1 mL)に、0℃で TFA (3 mL)を加え、室温で 21 時間撹拌した。反応液を 0 ℃にした後、飽和 $NaHCO_3$ 水溶液を加え、$CH_2Cl_2$ で抽出した。有機層を $Na_2SO_4$ で乾燥後ろ過し、減圧濃縮した。得られた生成物を次の反応に使用した。

上記の生成物 (546 mg, 0.43 mmol) の THF 溶液に、4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]benzoic acid (210 mg, 0.91 mmol)、HOBt (123 mg, 0.91 mmol)、EDCI・HCl (175 mg, 0.91 mmol)を加え、室温で 5 時間撹拌した。反応液を減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($CHCl_3$/MeOH/$H_2O$ = 30:3:1, lower phase)にて精製し、**78** (572 mg, 82%)を無色のアモルファスとして得た。

$[\alpha]^{23}_D$ -12.9° (*c* = 0.88 in $CHCl_3$). IR (KBr): 3254, 2871, 2107, 1660, 1111 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (400

MHz, $CDCl_3$) δ: 8.23 (2H, t, *J* = 5.6 Hz), 7.88 (4H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.40 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.25 (4H, d, *J* = 9.2 Hz), 5.54 (2H, m), 3.67-3.51 (76H, m), 3.38 (4H, t, *J* = 5.2 Hz), 3.18-3.04 (4H, m). $^{13}$C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 170.1, 166.3, 134.5, 132.7, 127.7, 126.5, 121.8 ($CF_3$, q, *J* = 275 Hz), 70.60, 70.57, 70.54, 70.49, 70.47, 70.46, 70.44, 70.42, 70.40, 70.2, 69.9, 69.5, 53.9, 50.6, 45.8, 39.57, 28.3 (q, *J* = 40.4 Hz). ESI MS : *m/z* 1704 $[M+Na]^+$. HR-ESI MS: *m/z* 1703.6748, calcd for $C_{68}H_{106}F_6N_{14}O_{24}S_2Na$. Found: 1703.6671.

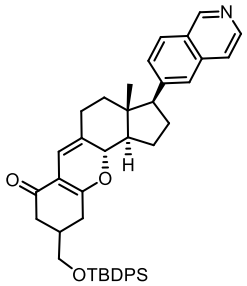
**_N,N'_-[(35_R_,40_R_)-1,74-Diazido-34,41-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-icosaoxa-37,38-dithia-33,42-diazatetraheptacontane-35,40-diyl]bis{4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]benzamide}**の合成



**78** (82 mg, 0.049 mmol)と **74** (29 mg, 0.10 mmol)の *t*-BuOH/$H_2O$ 溶液 (1:1, 0.3 mL)に $CuSO_4$ (0.05 M in water, 120 µL, 6 µmol)を加え、凍結脱気した。反応液に sodium ascorbate (0.5 M in water, 120 µL, 60 µL) を加え、室温で 12 時間撹拌した。反応液を減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($CHCl_3$/MeOH/$H_2O$ = 15:3:1, lower phase)にて精製し、目的物 (71 mg, 65%)を無色のアモルファスとして得た。

$[\alpha]^{23}_D$ 5.7° (*c* = 1.31 in $CHCl_3$). IR (KBr): 3290, 2913, 2871, 1695, 1659, 1545, 1110 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.26 (2H, t, *J* = 5.0 Hz), 7.91-8.00 (6H, m), 7.75 (2H, s), 7.70 (2H, t, *J* = 5.9Hz), 7.22 (4H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.06 (2H, s), 6.45 (2H, s), 5.54 (2H, m), 4.56-4.48 (8H, m), 4.41-4.30 (4H, m), 3.85 (4H, t, *J* = 5.0 Hz), 3.62-3.57 (76H, m), 3.56-3.54 (4H, m), 3.50-3.47 (2H, m), 3.15-3.10 (4H, m), 2.92-2.86 (2H, m), 2.75 (2H, m), 2.22-2.17 (4H, m), 1.71- 1.63 (8H, m), 1.44-1.41 (4H, m). $^{13}$C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 173.1, 170.4, 166.4, 164.5, 144.9, 134.6, 132.5, 127.9, 126.4, 123.4, 121.8 (q, *J* = 275 Hz), 70.5, 70.44, 70.42, 70.39, 70.32, 70.1, 70.0, 69.3, 61.6, 60.2, 55.7, 53.8, 50.2, 40.5, 39.5, 35.6, 34.3, 28.1 (q, *J* = 40.5 Hz), 25.3. ESI MS : *m/z* 1144 $[M+2Na]^{2+}$. HR-ESI MS: *m/z* 1144.4521, calcd for $C_{94}H_{144}F_6N_{20}Na_2O_{28}S_4$. Found: 1144.4724.

**(3*S*,3a*R*,11a*S*,11b*R*)-9-{[(*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy]methyl}-3-(isoquinolin-6-yl)-3a-methyl-2,3,3a,4,5,8,9,10,11a,11b-decahydrocyclopenta[c]xanthen-7(1H)-one の合成**




(1*S*,7a*S*)-1-(Isoquinolin-6-yl)-7a-methyl-2,3,3a,6,7,7a-hexahydro-1*H*-indene-5-carbaldehyde (17.7 mg, 0.06 mmol)の AcOEt 溶液 (1.2 mL) に、0 ℃で **55** (41 mg, 0.11 mmol)、ethylenediamine 一滴を加え、室温で 13 時間攪拌した。反応液を 0 ℃にした後、水を加え、$CHCl_3$ で抽出した。有機層を $Na_2SO_4$ で乾燥後ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/AcOEt = 1:2) にて精製し、目的物 (26 mg, 66%) を無色のアモルファスとして 1:1 のジアステレオマー混合物で得た。

IR (KBr): 2961, 2930, 2888, 2857, 1647, 1607, 1406, 1111 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.22 (1H, s), 8.50 (1H, d, *J* = 5.0 Hz), 7.90 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.70-7.65 (5H, m), 7.61 (1H, d, *J* = 5.6 Hz), 7.48-7.39 (7H, m), 6.20 (1/2H, s), 6.18 (1/2H, s), 4.97 (1/2H, d, *J* = 11.1 Hz) , 4.93 (1/2H, d, *J* = 11.1 Hz), 3.62-3.58 (2H, m), 3.02 (1H, t, *J* = 9.3 Hz), 2.51-2.29 (7H, m), 2.22-2.14 (3H, m), 1.77-1.71 (1H, m), 1.61-1.59 (1H, m), 1.51-1.45 (1H, m), 1.07 (9H, s), 0.62 (3/2H, s), 0.61(3/2H, s). $^{13}$C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 194.5, 194.2, 170.8, 170.6, 152.0, 143.0, 142.6, 135.6, 135.5, 135.5, 133.2, 133.2, 133.1, 129.7, 129.0, 128.9, 128.6, 127.7, 126.8, 125.3, 120.3, 111.1, 110.6, 110.6, 110.0, 80.9, 80.8, 66.6, 66.4, 56.9, 55.6, 55.3, 53.8, 46.9, 46.7, 39.4, 39.1, 37.0, 36.6, 35.9, 35.3, 31.0, 30.7, 29.2, 28.9, 26.8, 26.2, 26.2, 24.8, 24.0, 23.8, 19.2, 12.4, 12.3. ESI MS: *m/z* 654 $[M+H]^+$. HR-ESI MS: *m/z* 654.3403, calcd for $C_{43}H_{48}NO_3Si$. Found: 654.3403.

**(3*S*,3a*R*,11a*S*,11b*R*)-9-(Hydroxymethyl)-3-(isoquinolin-6-yl)-3a-methyl-2,3,3a,4,5,8,9,10,11a,11b-decahydrocyclopenta[c]xanthen-7(1H)-one (75)の合成**

(3*S*,3a*R*,11a*S*,11b*R*)-9-{[(*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy]methyl}-3-(isoquinolin-6-yl)-3a-methyl-2,3,3a,4,5,8,9,10,11a,11b-decahydrocyclopenta[c]xanthen-7(1H)-one (24.3 mg, 0.037 mmol)の THF 溶液 (0.4 mL)に、0 ℃で acetic acid (3.2 μL, 0.056 mmol)、tetrabutylammonium fluoride (1.0 M in THF, 0.5 mL, 0.056 mmol)を加え、室温で 16 時間撹拌した。反応液を 0 ℃にした後、飽和 $NaHCO_3$ 水溶液を加え、$CHCl_3$ で抽出した。有機層を $Na_2SO_4$ で乾燥後

ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($CHCl_3$/MeOH/$H_2O$ = 60:3: 1, lower phase) にて精製し、**75** (15.5 mg, 100%) を無色のアモルファスとして 1:1 のジアステレオマー混合物で得た。

IR (KBr): 3389, 2965, 2925, 2880, 2858, 1631, 1604, 1406, 1381,1208 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.20 (1H, s), 8.48 (1H, s), 7.89 (1H, d, *J* = 7.9 Hz), 7.63-7.60 (2H, m), 7.46 (1H, d, *J* = 7.9 Hz), 6.17 (1/2H, s), 6.16 (1/2H, s), 4.95 (1/2H, d, *J* = 10.5 Hz), 4.91 (1/2H, d, *J* = 10.5 Hz), 3.68-3.59 (2H, m), 3.01-2.98 (1H, m), 2.51-2.11 (11H, m), 1.73-1.72 (1H, m), 1.60-1.56 (1H, m), 1.49-1.45 (1H, m), 0.60 (3/2H, s), 0.59 (3/2H, s). $^{13}$C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ: 194.3, 194.0, 170.8, 170.6, 152.0, 142.8, 142.7, 135.6, 129.1, 128.7, 126.9, 125.3, 120.4, 111.0, 110.6, 110.5, 110.1, 81.0, 80.8, 65.8, 65.4, 56.9, 55.6, 55.3, 46.9, 46.7, 39.2, 38.9, 37.0, 36.7, 35.8, 35.3, 31.0, 30.6, 29.2, 29.0, 26.24, 26.21, 23.9, 23.8, 12.4, 12.3. ESI MS: *m/z* 416 $(M+H)^+$. ESI MS: *m/z* 416 $[M+H]^+$. HR-ESI MS: *m/z* 416.2226, calcd for $C_{27}H_{30}NO_3$. Found: 416.2226.

**[(3S,3aR,11aS,11bR)-3-(Isoquinolin-6-yl)-3a-methyl-7-oxo-1,2,3,3a,4,5,7,8,9,10,11a,11b-dodecahydrocyclopenta[c]xanthen-9-yl]methyl-**
**3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanoate (76)の合成**

**75** (20.0 mg, 0.048 mmol)の $CH_2Cl_2$ 溶液 (0.5 mL)に、0℃で 3-maleimidopropionyl chloride (18.0 mg, 0.097 mmol)、 $Et_3N$ (20.0 μL, 0.144 mmol)を加え、室温で 5 時間攪拌した。反応液を 0 ℃にした後、飽和 $NaHCO_3$ 水溶液を加え、$CH_2Cl_2$ で抽出した。有機層を $Na_2SO_4$ で乾燥後ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane : AcOEt = 1 : 1, in 1% $Et_3N$) にて精製し、**76** (19.4 mg, 71%) を無色のアモルファスとして得た。

IR (KBr): 2926, 2884, 2857, 1738, 1710, 1646, 1407 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.22 (1H, s), 8.51 (1H, brs), 7.90 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.63 (1H, s), 7.61 (1H, d, *J* = 5.2 Hz), 7.47 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 6.72 (2H, s), 6.17 (1/2H, s), 6.15 (1/2H, s), 4.97 (1/2H, d, *J* = 10.9 Hz), 4.93 (1/2H, d, *J* = 10.9 Hz), 4.14–4.05 (2H, m), 3.85 (2H, t, *J* = 6.9 Hz), 3.03 (1H, t, *J* = 9.4 Hz), 2.67 (2H, t, *J* = 6.6 Hz), 2.59–2.27 (4H, m), 2.21–2.11 (4H, m), 1.74–1.72 (1H, m), 1.62–1.59 (1H, m), 1.52–1.46 (1H, m), 1.41 (1H, t-like), 1.36–1.09 (1H, m), 0.62 (3/2H, s), 0.61 (3/2H, s). $^{13}$C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ: 193.0, 192.7, 170.5, 170.3, 169.6, 169.5, 152.1, 143.1, 142.5, 135.6, 134.2, 129.4, 129.1, 129.0, 126.9, 125.3, 120.3, 110.9, 110.8, 110.4, 110.2, 81.2, 81.0, 67.3, 67.1, 56.9, 55.7, 55.3, 46.9, 46.7, 39.2, 38.9, 37.1, 36.7, 33.6, 32.9, 32.6, 32.1, 31.1, 30.8, 29.3, 29.0, 26.29, 26.27, 24.0, 23.8, 12.4, 12.38. ESI MS: *m/z* 567 $[M+H]^+$. HR-ESI MS: *m/z*

567.2495, calcd for $C_{34}H_{35}N_2O_6$. Found: 567.2482.

**[(3S,3aR,11aS,11bR)-3-(Isoquinolin-7-yl)-3a-methyl-7-oxo-1,2,3,3a,4,5,7,8,9,10,11a,11b-dodecahydrocyclopenta[c]xanthen-9-yl]methyl-3-[2,5-dioxo-3-({(R)-34-oxo-1-[4-({5-[(3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl]pentanamido}methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]-35-{4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]benzamido}-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaoxa-33-azahexatriacontan-36-yl}thio)pyrrolidin-1-yl]propanoate (probe C)の合成**

*N*,*N*'-[(35*R*,40*R*)-1,74-Diazido-34,41-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-icosaoxa-37,38-dithia-33,42-diazatetraheptacontane-35,40-diyl]bis{4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]benzamide} (3.0 mg, 1.3 μmol)の DMF/$H_2O$ 溶液 (4:1, 0.3 mL)に $NaHCO_3$ (0.4 mg, 5.3 μmol)、TCEP・HCl (0.6 mg, 1.9 μmol)を加え、室温で 1 時間撹拌した。TLC チェックにより、チオール体へと還元されたことを確認した後、**69** (1.5 mg, 2.7 μmol)を加え、さらに室温で 15 時間撹拌した。反応液を減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($CHCl_3$/MeOH/$H_2O$ = 15:3:1, lower phase) にて精製し、目的物 (2.3 mg, 51 %)を無色のアモルファスとして得た。

IR (KBr): 3291, 2925, 2870, 2857, 1706, 1656, 1106 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.23 (1H, s), 8.49 (1H, d, *J* = 5.5 Hz), 7.93 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.79-7.75 (3H, m), 7.63 (1H, d, *J* = 7.0 Hz), 7.56 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.24 (2H, m), 6.72 (1H, s), 6.14 (1H, d, *J* = 6.9 Hz), 6.03 (1/2H, s), 6.00 (1/2H, s), 4.99-4.83 (2H, m), 4.67-4.49 (4H, m), 4.44–4.32 (2H, m), 4.15-4.12 (1/2H, m), 4.04 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 4.00-3.96 (1/2H, m), 3.86-3.80 (4H, m), 3.62-3.57 (45H, m), 3.50-3.47(2H, m), 3.44–3.10 (3H, m), 3.04–2.99 (1H, m), 2.94–2.92 (1H, m), 2.91–2.90 (1H, m), 2.89 (2H, s), 2.78-2.04 (14H, m), 1.93 (2H, s), 1.67-1.51 (4H, m), 1.48-1.38 (2H, m), 0.61 (3/2H, s), 0.60 (3/2H, s). ESI MS: *m/z* 867 $[M+2Na]^{2+}$. HR-ESI MS: *m/z* 867.3457, calcd for $C_{81}H_{107}F_3N_{12}Na_2O_{20}S_2$. Found: 867.3516.

**(3S,5S,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-(Isoquinolin-7-yl)-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-yl 3-[2,5-dioxo-3-({(R)-34-oxo-1-[4-({5-[(3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl]pentanamido}methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]-35-{4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]benzamido}-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaoxa-33-azahexatriacontan-36-yl}thio)pyrrolidin-1-yl]propanoate (probe D)の合成**

*N*,*N*'-[(35*R*,40*R*)-1,74-Diazido-34,41-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-icosaoxa-37,38-dithia-33,42-diazatetraheptacontane-35,40-diyl]bis{4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]benzamide} (20.0 mg, 8.9 μmol)の DMF/$H_2O$ 溶液 (4:1, 0.5 mL)に $NaHCO_3$ (3.0 mg, 36.0 μmol)、TCEP・HCl (3.8 mg, 13.2 μmol)を加え、室温で 1 時間撹拌した。TLC チェックにより、チオール体へと還元されたことを確認した後、**71** (10.0 mg, 18.0 μmol)を加え、さらに室温で 4 時間撹拌した。反応液を減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($CHCl_3$/MeOH/$H_2O$ = 15:3:1, lower phase)にて精製し、目的物 (22.8 mg, 75 %)を無色のアモルファスとして得た。
IR (KBr): 3291, 2925, 2871, 1706, 1658 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.21 (1H, s), 8.46 (1H, d, *J* = 6.0 Hz), 7.93-7.91 (2H, m), 7.77–7.72 (2H, m), 7.62-7.56 (2H,m), 7.40 (1H, t-like), 7.24 (2H, m), 6.57 (1H, s), 5.86 (1/2H, s), 5.83 (1/2H, s), 4.99-4.93 (1/2H, m), 4.88–4.83 (1/2H, m), 4.71–4.55 (1H, m), 4.54-4.49 (4H, m), 4.46–4.34 (1H, m), 4.21 (1H, s), 4.15-4.11 (1/2H, m), 3.97–3.94 (1/2H, m), 3.86-3.78 (4H, m), 3.63–3.57 (36H, m), 3.50–3.45 (2H, m), 3.31–3.11 (4H, m), 2.93–2.85 (2H, m), 2.77-2.73 (1H, m), 2.61–2.49 (3H, m), 2.34-2.15 (2H, m), 2.08-1.99 (1H, m), 1.85–1.52 (12H, m), 1.48–1.17 (18H, m), 1.04-0.86 (2H, m), 0.80 (3H, s), 0.47 (3H, s). ESI MS: *m/z* 861 $[M+2Na]^{2+}$. HR-ESI MS: *m/z* 861.3821, calcd for $C_{82}H_{115}F_3N_{12}Na_2O_{18}S_2$. Found: 861.3771.

**[(3S,3aR,11aS,11bR)-3-(Isoquinolin-6-yl)-3a-methyl-7-oxo-1,2,3,3a,4,5,7,8,9,10,11a,11b-dodecahydrocyclopenta[c]xanthen-9-yl]methyl 3-[2,5-dioxo-3-({(R)-34-oxo-1-[4-({5-[(3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl]pentanamido}methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]-35-{4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]benzamido}-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-decaoxa-33-azahexatriacontan-36-yl}thio)pyrrolidin-1-yl]propanoate (probe E)の合成**

*N*,*N*'-[(35*R*,40*R*)-1,74-Diazido-34,41-dioxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-icosaoxa-37,38-dithia-33,42-diazatetraheptacontane-35,40-diyl]bis{4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]benzamide} (23 mg, 10.2 μmol)の DMF/$H_2O$ 溶液 (4:1, 0.5 mL)に $NaHCO_3$ (3.4 mg, 40.4 μmol)、TCEP・HCl (4.4 mg, 15.3 μmol)を加え、室温で 1 時間撹拌した。TLC チェックにより、チオール体へと還元されたことを確認した後、**76** (11.6 mg, 20.5 μmol)を加え、さらに室温で 15 時間撹拌した。反応液を減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($CHCl_3$/MeOH/$H_2O$ = 15:3:1, lower phase)にて精製し、目的物 (15.6 mg, 45 %)を無色のアモルファスとして得た。
IR (KBr): 3291, 2922, 2875, 1705, 1649, 1151 $cm^{-1}$. $^1$H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 9.21 (1H, s),

8.50 (1H, d, *J* = 6.0 Hz), 7.93-7.88 (3H, m), 7.75 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 7.62 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.52 (1H, s), 7.46 (1H, s), 7.24 (2H, m), 6.14 (1H, d, *J* = 6.9 Hz), 6.03 (1/2H, s), 6.00 (1/2H, s), 4.99-4.83 (2H, m), 4.67-4.49 (4H, m), 4.44–4.32 (2H, m), 4.15-4.12 (1/2H, m), 4.04 (1H, m), 4.00-3.96 (1/2H, m), 3.86-3.80 (4H, m), 3.62-3.57 (45H, m), 3.50-3.47(2H, m), 3.44–3.10 (3H, m), 3.04–2.99 (1H, m), 2.94–2.92 (1H, m), 2.91–2.90 (1H, m), 2.89 (2H, s), 2.78-2.04 (14H, m), 1.93 (2H, s), 1.67-1.51 (4H, m), 1.48-1.38 (2H, m), 0.61 (3/2H, s), 0.60 (3/2H, s). ESI MS: *m/z* 867 $[M+2Na]^{2+}$. HR-ESI MS: *m/z* 867.3457, calcd for $C_{81}H_{107}F_3N_{12}Na_2O_{20}S_2$. Found: 867.3506.

**活性試験、プルダウン実験（第一章第二節、第二章第二節、第三節）**

**使用細胞株**

正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) は倉敷紡績株式会社より購入した。ヒト咽頭上皮癌細胞 KB3-1 は鹿児島大学医歯学総合研究科腫瘍学講座、秋山伸一教授より譲渡された株を使用した。

**活性試験**

1) 細胞培養用培地

a) HUVEC

HuMedia-EG2

| | 内　容 | 溶液濃度 | 分注量 | 培地中の最終濃度 |
|---|---|---|---|---|
| | 基礎培地　**HuMedia-EB2** | | 500 mL | |
| 増殖添加剤 | ①　ウシ胎児血清 (FBS) | 100% v/v | 10 mL | 2% v/v |
| | ②　ヒト組換え型上皮成長因子 (hEGF) | 10 μg/mL | 0.5 mL | 10 ng/mL |
| | ③　ハイドロコーチゾン | 1 mg/mL | 0.5 mL | 1 μg/mL |
| | ④　抗菌剤　ゲンタマイシン | 50 mg/mL | 0.5 mL | 50 μg/mL |
| | アンフォテリシン　B | 50 μg/mL | 0.5 mL | 50 ng/mL |
| | ⑤　ヒト組換え型塩基性繊維芽細胞増殖因子 (hEGF-B) | 5 μg/mL | 0.5 mL | 5 ng/mL |
| | ⑥　ヘパリン | 10 mg/mL | 0.5 mL | 10 μg/mL |

HUVEC の培養には、基礎培地 HuMedia-EB2 に上記の割合で増殖添加剤を加えたものを使用した。

b) KB3-1

KB3-1 には RPMI1640 (ナカライテクス)を使用した。また培養の際には、終濃度 10 %となるよう非動化ウシ胎児血清 (Intergen)および、終濃度 50 μg/mL となるようカナマイシン (和光純薬)を添加したものを用いた。

2)　細胞培養法

a)　HUVEC

$CO_2$インキュベーター(37°C,　5%$CO_2$雰囲気下)で 70~80%コンフルエントとなるよう培養した HUVEC の培養シャーレから培地を吸引除去した後、2.5 mL の HEPES 緩衝液で細胞を洗浄した。HEPES 緩衝液を吸引除去した後、5 mL の血管内皮細胞用 trypsin-EDTA 溶液(0.025% W/V trypsine、0.01%EDTA, クラボウ)で細胞を処理した。さらに 2.5 mL の HEPES 添加後、ピペッティングにより細胞を剥離させ、細胞懸濁液を 5 mL の trypsin 中和液(10%FBS-HEPES 緩衝液)に混合後、遠心分離することにより上清を除去した。細胞濃度を $2.0\times10^4$ cells/mL に調製しこれを活性評価に用いた。

b)　KB3-1

$CO_2$インキュベーター(37°C、5%$CO_2$雰囲気下)で 70~80%コンフルエントとなるよう培養した各細胞の培養シャーレから培地を吸引除去した後、5 mL の PBS で細胞を洗浄した。trypsin-EDTA solution (0.25%trypsin 1 mM EDTA・2Na)を 2 mL 添加し、細胞の形態が変化し始めた後に培地を添加した。ピペッティングにより細胞を剥離させ、細胞懸濁液を遠心分離することにより、上清を除去した後、細胞濃度を $2\times10^4$ cells/mL に調製し、これを活性評価に用いた。

3) 血管内皮細胞（HUVEC）に対する増殖抑制活性の評価法

細胞培養器から培地を吸引除去した後､3 ml の HEPES 緩衝液で細胞を約 30 秒間洗った。HEPES 緩衝液を吸引除去した後、5 ml の血管内皮細胞用の trypsi*n*-EDTA 溶液を細胞層に約 1 分間処理した後、HEPES を 2 ml 添加後、ピペッティングにより細胞を剥離させ、trypsin 中和液 5 ml 中に入れ、遠心分離し、上清を除去した。細胞を増殖用培地（HuMedia-EG2）で希釈して､96 穴のマルチウェルプレートに 1 ウェルあたり $1\times10^3$ 個/100 µl の細胞懸濁液 100 µl を分注した。翌日、細胞の接着を確認した後、設定濃度の被検薬物を 1 µl ずつ添加し､37 ℃､5% $CO_2$ 雰囲気下で 96 時間培養した。WST-8 solution (10 µl)を添加して 3 時間培養後、水溶性の formazan を比色定量（450 nm）し、生成した色素量から生存細胞数を算出して生育阻害率を求めた。

2) 癌細胞（KB3-1）に対する増殖抑制活性の評価法

細胞培養器から培地のみ吸引除去した後、trypsi*n*-EDTA solution を 5 ml 添加して 3 分間 $CO_2$ インキュベーター内（37 ℃、5% $CO_2$ 雰囲気下）に静置して細胞を剥離させたのち、新鮮培地を加え、細胞懸濁液を回収、遠心分離して上清の trypsi*n*- EDTA solution を

除去した後、再び新鮮培地を加えピペッティングによって細胞を洗浄後、遠心した。遠心後、上清を取り除き、細胞を新鮮培地で希釈して生細胞数を計測し、96 穴マルチウェルプレートに 1 ウェルあたり $1\times10^3$ 個/100 μl の細胞懸濁液 100 μl を分注した。翌日、細胞の接着を確認した後、各濃度の検体を 1 μl ずつ添加し、37 ℃、5% $CO_2$ 雰囲気下で 72 時間培養した。WST-8 solution (10 μl)を添加して 3 時間培養後、水溶性の formazan を比色定量（450 nm）し、生成した色素量から生存細胞数を算出して生育阻害率を求めた。

**プルダウン実験**

1) 試薬

a) Lysis buffer

| | 最終濃度 | |
|---|---|---|
| Tris-HCl (pH 8.0) | 50 mM | (Sigma Chemical) |
| EDTA・2Na | 5 mM | (和光純薬) |
| NaCl | 137 mM | (和光純薬) |
| NP-40 | 0.1% | (BDH laboratory) |
| Protease inhibitor cocktail | 1% | (Sigma Chemical) |
| Phosphatase inhibitor cocktail | 1% | (ナカライテスク) |

b) 2×SDS sample buffer

| | 最終濃度 | |
|---|---|---|
| Tris-HCl | 100 mM | (Sigma Chemical) |
| SDS | 4% | (ナカライテスク) |
| Mercaptoethanol | 10% | (和光純薬) |
| Glycerol | 20% | (ナカライテスク) |
| Bromophenol blue | 0.005% | (Sigma Chemical) |

c) 洗浄バッファー

D-PBS (−)に終濃度が 0.01%または 0.1%になるように NP-40 を加えた。

d)銀染色

銀染色IIキット ワコー (和光純薬)

2) Lysate の調整法

HUVEC を培地の入った培養シャーレに播種し、$CO_2$インキュベーター(37℃, 5%$CO_2$雰囲気下)で 90% confluent になるまで培養した。HUVEC の培養シャーレから培地を吸引除去した後、冷 D-PBS (−) 溶液で 2 回細胞を洗浄した。次に、lysis buffer (250 μL) を加えて-80℃で細胞を急速凍結した。そして氷上で融解させながら細胞を破砕し、セルスクレイパーで細胞破砕液をエッペンドルフチューブに回収し、4℃、15,000 rpm で 15 分間遠心分離した。得られた上清を lysate とした。

3) プルダウン実験

a)アフィニティープローブ分子

HUVEC の lysate (25 μg/40 μL)に probe(DMSO 溶液、終濃度 10 μM)加え 15 分間 0 ℃でインキュベーションし、streptavidin-Dynabeads (veritas, 125 μg suspended in lysis buffer (100 μL))を加え、16 時間 4 ℃で転倒混和した。その後、上清を除去し、洗浄バッファーで 10 分、2 回洗浄した。残った beads に 2×SDS sample buffer (50 μL)を加え、5 分間 100 ℃で煮沸し、アクリルアミドゲルを用いて電気泳動した後に、銀染色を行った。

b)フォトアフィニティープローブ分子

HUVEC の lysate (125 μg/1 mL)に probe (DMSO 溶液、終濃度 2 μM)加え 15 分間 0 ℃でインキュベーションし、30 分間 0℃で紫外線照射した。その後、neutravidin-agarose (thermo fisher scientific, 50 μg suspended in lysis buffer (100 μL))を加え、2 時間 4 ℃で転倒混和した。その後、上清を除去し、洗浄バッファーで 10 分、2 回洗浄した。残った beads に 2×SDS sample buffer (50 μL)を加え、5 分間 100 ℃で煮沸し、アクリルアミドゲルを用いて電気泳動した後に、銀染色を行った。

# 引用文献


1. Carmeliet, P.; Jain, R. K. *Nature*, **2000**, *407*, 249–257.
2. Aoki, S.; Cho, S.; Ono, M.; Kuwano, T.; Nakao, S.; Kuwano, M.; Nakagawa, S.; Gao, J. Q.; Mayumi, T.; Shibuya, M.; Kobayashi, M. *Anticancer Drugs*, **2006**, *17*, 269–278.
3. Aoki, S.; Cho, S.; Hiramatsu, A.; Kotoku, N.; Kobayashi, M. *J. Nat. Med.*, **2006**, *60*, 231–235.
4. Aoki, S.; Sanagawa, M.; Watanabe, Y.; Setiwan, A.; Arai, M.; Kobayashi, M. *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 4818–4828.
5. Aoki, S.; Watanabe, Y.; Sanagawa, M.; Setiawan, A.,; Kotoku, N.; Kobayashi, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 3148–3149.
6. Watanabe, Y.; Aoki, S.; Tanabe, D.; Setiawan, A.; Arai, M.; Kobayashi, M. *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 4074–4079.
7. Aoki, S.; Watanabe, Y.; Tanabe, D.; Setiawan, A.; Arai, M.; Kobayashi, M. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 4485–4488.
8. Aoki, S.; Watanabe, Y.; Tanabe, D.; Arai, M.; Suna, H.; Miyamoto, K. ; Tsujibo, H.; Tsujikawa, K.; Yamamoto, H.; Kobayashi, M. *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 6758–6762.
9. Lee, H. M.; Nieto-Oberhuber, C.; Shair, M. D. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 16864–16866.
10. Yamashita, S.; Kitajima, K.; Iso, K.; Hirama, M. *Tetrahedron Lett.*, **2009**, *50*, 3277–3279.
11. Nicolaou, K. C.; Peng, X. S.; Sun, Y. P.; Polet, D.; Zou, B.; Lim, C.S.; Chen, D. Y. K. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 10587–16897.
12. Flyer, A. N.; Si, C.; Myers, A. G. *Nature Chem.*, **2010**, *2*, 886–892.
13. Simmons, E. M.; Hardin-Narayan, A. R.; Guo, Xuelei.; Sarpong, R. *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 4696–4700.
14. Shenvi, R. A.; Guerrero, C. A.; Shi, J.; Li, C. C.; Baran, P. S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 7241–7243.
15. Kotoku, N.; Sumii, Y.; Kobayashi, M. *Org. Lett.*, **2011**, 13, 3514–3517.
16. Kotoku, N.; Sumii, Y.; Hayashi, T.; Tamura, S. ; Kawachi, T. ; Shiomura, S. ; Arai, M. ; Kobayashi, M. *ACS Med. Chem. Lett.*, **2012**, *3*, 673–677.
17. Tsutsumi, T.; Shinkai, H.; Kitano, Y.; Yamashita, M.; Kobayashi, S.; Matsui, K.; Oda, T.; Taniguchi, T.; Asahina, K. **WO2005025554 (A2)**.
18. Daniewski, A. R.; Liu W. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 626-628.
19. Daniewski, A. R.; Kiegiel J. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5534-5535.

20. Czako, B.; Kurti, L.; Mammoto, A.; Ingber, D. E.; Corey, E. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 9014-9019.
21. 郭　修晗　博士論文(2012)参考
22. Kotoku, N.; Nakata, C.; Kawachi, T.; Sato, T.; Guo, X. H.; Ito, A.; Sumii, Y.; Arai, M.; Kobayashi, M. *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, *22*, 2102–2112.
23. Baran, P. S.; Hoffmann, R. W.; Burns, N. Z. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2854–2867.
24. Daniewski, A. R.; Piotrowska, E.; Wojciechowska, W. *Liebigs. Ann. Chem.* **1989**, 1061-1064.
25. Sünnemann, H. W.; Hofmeister, A.; Magull, J.; Banwell, M. G.; Meijere, A. *Org. Lett.*, **2007**, *9*, 517-520.
26. Chapman, O. L.; Fitton, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 41–47.
27. Wang, Q.; Lucien, E.; Hashimoto, A.; Pais, G. C. G.; Nelson, D. M.; Song, Y.; Thanassi, J. A.; Marlor, C. W.; Thoma, C. L.; Cheng, J.; Podos, S. D.; Ou, Y.; Deshpande, M.; Pucci, M. J.; Buechter, D. D.; Bradbury, B. J.; Wiles, J. A. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 199–210.
28. Jarvis, C.; Han, Z.; Kalas, V.; Klein, R.; Pinkner, J. S.; Ford, B.; Binkley, J.; Cusumano, C. K.; Cusumano, A.; Mydock-McGrane, L.; Hultgren, S. J.; Janetka, J. W. *ChemMedChem*, **2016**, *11*, 367–373.
29. Harding, M. W.; Galat, A.; Uehling, D. E.; Schreiber, S. L. *Nature*, **1989**, *341*, 758–760.
30. Sin, N.; Meng, L.; Wang, M. Q. W.; Wen, J. J.; Bornmann, W. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 6099–6103.
31. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 2596–2599.
32. Burns, J. A.; Butler, J. C.; Moran, J.; Whitesides, G. M. *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 2648–2650.