

2022 年度博士論文

抗感染症薬創製を指向した微生物由来 生物活性天然物の合成と機能解明

指導者 北里大学大村智記念研究所・大学院感染制御科学府

砂塚敏明 教授

感染制御科学専攻・創薬科学履修コース 生物有機化学

DI-20001 金井田 将裕

略語表

AMR: Antimicrobial Resistance

WHO: World Health Organization

MRSA: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

HA-MRSA: Hospital Acquired-Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*

CA-MRSA: Community Acquired-Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*

LA-MRSA: Livestock-Associated MRSA

PVL: Panton-Valentine Leucocidine

MDPR: Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*

SCC_{mec} (Staphylococcal cassette chromosome *mec*)

TSST-1 (Toxic Shock Syndrome Toxin-1)

PBP: Penicillin Binding Protein

MSSA: Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*

VRE: Vancomycin Resistant *Enterococci*

MDRP: Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*

ABK: Arbekacin

VCM: Vancomycin

TEIC: Teicoplanin

LZD: Linezolid

TZD: Tedizolid

DAP: Daptomycin

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

VRSA: Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*

ESBL: Extended Spectrum β -Lactamase

CDI: *Clostridioides difficile* infection

MEPM: Meropenem

HMG-CoA: 3-Hydroxy-3-Methyl hydroxymethylglutaryl-CoA

FIC: Fractional Inhibitory Concentration

EtOAc: Ethyl acetate

TBDPS: *tert*-Butyldiphenylsilyl

Ph: Phenyl

TMS: Trimethylsilyl

TBS: *tert*-Butyldimethylsilyl

TBAF: Tetrabutylammonium Fluoride

DIBAL-H: Diisobutylaluminum Hydride
DCM: Dichloromethane
r.t.: room temperature
Ts: Tosyl
DMF: *N,N*-Dimethyl formamide
DME: Dimethoxyethane
DMSO: Dimethylsulfoxide
THF: Tetrahydrofuran
DEAD: Diethyl Azodicarboxylate
PT: 5-Phenyltetrazole
LHMDS: Lithium Hexamethyldisilazide
KHMDs: Potassium Hexamethyldisilazide
HMPA: Hexamethylphosphoric Triamide
MS: Molecular Sieves
TBACN: Tetrabutylammonium Cyanide
TASF: Tris(dimethylamino)sulfonium Difluoromethylsilicate
MOM: Methoxymethyl
BOM: Benzyloxymethyl
PMB: *p*-Methoxybenzyl
DIPEA: *N,N*-Diisopropylethylamine
TFA: Trifluoroacetic Acid
Ac: Acetyl
Ac-CoA: Acetyl-CoA
AcAc-CoA: Acetoacetyl-CoA
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
DTNB: 5,5'-Dithiobis(-2-nitrobenzoic Acid)
NCBI: National Center for Biotechnology Information
TNB: 5-Mercapto-2-nitrobenzoic acid
MIC: Minimum Inhibitory Concentration
LBDD: Ligand-Based-Drug-Design
SBDD: Structure-Based-Drug-Design
GPCR: G-Protein Coupled Receptor
SLC: Solute Carrier
ADCC: Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
CDCC: Complement Dependent Cellular Cytotoxicity
PPI: Protein-Protein Interaction

GTP: Guanosine Triphosphate
 RNA: Ribonucleic Acid
 EF: Elongation Factor
 HATU: 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-Oxide
 Hexafluorophosphate
 NOE: Nuclear Overhauser Effect
 Alloc: Allyloxycarbonyl
 NMP: *N*-methylpyrrolidone
 TEMPO: 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy
 TC: Thiophen Carboxylate
 Boc: *tert*-Butoxycarbonyl
 Bn: Benzyl
 Ms: Mesyl:
 mCPBA: *m*-Chloroperoxybenzoic Acid
 NIS: *N*-Iodosuccinimide
 dppf: 1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene
 DABAL-Me₃: (μ-1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane- κ N¹: κ N⁴)(hexamethyl)dialuminium
 COMU: 1-[(1-(Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylideneaminoxy)dimethylaminomorpholino)]
 uronium hexafluorophosphate
 DIPEA: *N,N*-diisopropylethylamine
 DBU: 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
 dba: Dibenzylideneacetone
 Fmoc: 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
 MNBA: 2-Methyl-6-nitrobenzoic Anhydride
 DCC: Dicyclohexylcarbodiimide
 DMAP: 4-Dimethylaminopyridine
 PyBrop: Bromo-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate
 PyAOP: (7-Azabenzotriazol-1-yloxy)trispyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
 BOPCl: Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinic Chloride
 T3P: Propylphosphonic Acid Anhydride
 TLC: Thin-layer Chromatography
 NMR: Nuclear Magnetic Resonance
 IR: Infrared Spectroscopy

目次

略語表

第 1 章

1.序論

	page
1-1 薬剤耐性(AMR: Antimicrobial Resistance)について	9
1-2 MRSA 感染症について	9
1-3 MRSA の耐性機構	11
1-4 β -ラクタム系薬剤:メロペネム (MEPM)	14
1-5 新たな創薬アプローチ: Circumventor について	14
1-6 創薬シード化合物としての微生物由来天然物	15
1-7 MEPM 耐性克服活性物質の探索	16
1-8 微量液体希釈法を用いた MEPM 耐性克服活性評価	19
1-9 微量液体希釈法を用いた FIC index の算出	20
1-10 β -ラクトン天然物・Hymeglusin (1)と Fusarilactone A (2)	20

2.本論

2-1 Hymeglusin (1)および Fusarilactone A (2)の逆合成	23
2-2 β -ラクトンフラグメント 3 の合成	28
2-3 PT-スルホンフラグメント 4 の合成	31
2-4 Julia-Kocienski カップリングの初期検討	32
2-5 β -ラクトン α 位官能基化の検討	32
2-6 Julia カップリングの新戦略	33
2-7 Julia-Kocienski カップリングにおける選択性の考察	34
2-8 脱シリル化に伴う aldol 反応の検討	35
2-9 Fusarilactone A (2)の不斉全合成	37
2-10 Fusarilactone A (2)における天然物と合成品の各機器データの比較	38
2-11 Hymeglusin (1)の不斉全合成	39
3-1 Hymeglusin (1)の既知の生物活性とメバロン酸経路における HMG-CoA synthase	40

3-2	大村、供田らによる哺乳類 HMG-CoAsynthase 阻害活性とその結合サイト	41
3-3	Miziorko らによる <i>E. faecalis</i> mvaS と Hymeglusin (1) の X 線共結晶構造図	41
3-4	関水らの <i>S. aureus</i> における mva A の役割の検証	42
3-5	<i>S. aureus</i> における Hymeglusin (1) の作用機序の推定	43
3-6	DTNB 法を用いた Hymeglusin (1) とリコンビナント MRSA mvaS の相互作用の検証	43
3-7	<i>S. aureus</i> ミュータントを用いた菌体内における Hymeglusin (1) の相互作用の検証	45
3.	小括	47
4.	参考文献	48
5.	実験項	51
6.	機器データ	64

第二章

1.	序論	page
1-1	医薬品モダリティとしての中分子医薬	80
1-2	低分子医薬の発展と近年の傾向	80
1-3	抗体医薬を代表とする高分子医薬の登場	82
1-4	新たな薬剤標的・タンパク質間相互作用 (Protein-Protein Interaction: PPI)	83
1-5	新たな創薬モダリティ・中分子医薬	85
1-6	中分子天然物 Dityromycin (1)	86
1-7	細菌のタンパク合成における翻訳伸長因子 EF-G の役割とメカニズム	88
1-8	Dityromycin (1) を利用した EF-G の構造解明	90
1-9	Dityromycin (1) をリード化合物とした創薬研究	93

2. 本論	
2-1 Dityromycin (1)の逆合成	95
2-2 Northern part (2)合成の初期検討と逆合成	96
2-3 South-western part 等価体 37 の合成	100
2-4 Decapeptide (42)の合成	103
2-5 環化反応の検討	104
3.小括	106
4.参考文献	107
5.総括	110
6.実験項	112
7.機器データ	
8.謝辞	144

第 1 章

β -ラクタム薬耐性克服活性を有する Hymeglusin および
Fusarilactone A の不斉全合成と作用機序の解明

1. 序論

1-1 薬剤耐性(AMR: Antimicrobial Resistance)について

微生物（細菌・真菌・寄生虫・ウイルス）の薬剤耐性（AMR: Antimicrobial Resistance）は、抗菌薬の濫用、誤った使用によって獲得される。現在、薬剤耐性菌の拡散は世界的な問題となっており、その死者数は世界で約 70 万人/年にも上る。加えて WHO の試算によれば、薬剤耐性菌に対し今後、対策を取らなかった場合には、2050 年にその死者数は 1000 万人/年に増加し、経済的損出は 100 兆ドルとも予測される¹⁾。特に従来の感染症治療薬として頻用されてきた β -ラクタム薬に対しては、その耐性化が深刻であり、各種耐性菌に対する新規薬剤の開発は急務である (Table 1)。

Table 1 米国における各種耐性菌の年間推定罹患者数と死亡者数²⁾

耐性菌	推定罹患者数(人)	推定死亡者数(人)
MRSA	80,000	11,000
薬剤耐性肺炎球菌	1,200,000	7,000
ESBL産生菌	26,000	1,700
VRE	20,000	13,000
カルバペネム耐性腸内細菌	93,000	610
多剤耐性アシネトバクター	7,300	500
多剤耐性緑膿菌	6,700	440

1-2 MRSA 感染症について

近年、薬剤耐性菌の中でも死者数が多く、院内感染症の中で特に問題視されているのが MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌) による感染症である。本病原菌の病原性は高くないものの、宿主の免疫機能の低下に伴い感染症を発症し、多くは肺炎や菌血症を併発することが問題となっている (Fig. 1)。

本感染症は病原菌を獲得する環境によって 2 種類に大別され、病院内で獲得する医療施設型 MRSA (Hospital Acquired-MRSA, HA-MRSA) と市中感染型 MRSA (Community Acquired-MRSA, CA-MRSA) がある³⁾。特に前者は老年層、後者は若年層を中心に蔓延し、多くの施設で分離される菌のトップを占めている³⁾。加えて CA-MRSA は β -ラクタム系薬剤以外に対する薬剤耐性遺伝子を多く持たないものの、白血球溶解毒素 (Panton-Valentine Leucocidin: PVL) などの病原因子を保有する

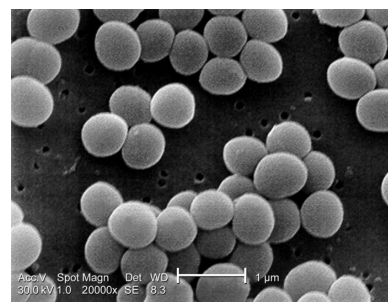


Fig. 1 MRSA の走査電子顕微鏡図
(CDC image library より引用)

強毒株が MRSA 治療歴のない健常者から高頻度に分離され、高い死亡率と若い患者で発症する傾向がある。

また近年では、MRSA の新しい型として、家畜由来の薬剤耐性遺伝子を含む SCCmec (staphylococcal cassette chromosome mec) type XI を持つ家畜関連 MRSA (Livestock-associated MRSA, LA-MRSA) が北欧で報告されたことから、家畜から人へ伝播される可能性も考えられる。本国の 2017 年の報告においては、薬剤耐性菌による新規罹患者 18,877 人のうち 94% が MRSA に感染していた³⁾。以下に CA-MRSA と HA-MRSA の比較を示す⁴⁾ (Table 2)。

Table 2 院内感染型および市中感染型 MRSA の比較⁴⁾

	院内感染型 (HA-MRSA)	市中感染型 (CA-MRSA)
臨床的定義	入院患者から分離される MRSA	市中の健康人から分離される MRSA
細菌学的定義 (SCCmecI による分類)	主に type II	主に type IV
毒素	エンテロトキシンや TSST-1	PVL* が特徴
流行の場所	院内	学校、幼稚園、家庭
保菌者の年齢層	主に高齢者	主に若年者、小児
感染部位	各種臓器	主に皮膚、軟部組織
薬剤感受性	多剤耐性	比較的多くの抗菌薬に感受性
治療経過	難治性	反応良好

*PVL: Pantone-Valentine Leukocidin 白血球破壊毒素

MRSA の歴史としては最初にヨーロッパで 1960 年代にその出現が報告され、本国においても約 30 年前に確認されている。そして現在、MRSA は世界的に拡散しており、北欧など一部の地域を除いてほとんどの国で検出され、新しい病原性や薬剤耐性をもつ株が次々と出現し、医療現場において脅威となっている^{5,6)}。

1-3 MRSA の耐性機構

世界初の抗生物質である Penicillin が臨床で使用されるようになったのは 1940 年である。しかしながら数年のうちに Penicillin を分解する β -ラクタマーゼを産生することで耐性化した *S. aureus* が出現し、大きな問題となった⁷⁾。Penicillin を含む β -ラクタム薬は細菌の細胞壁合成において最終段階に関与する酵素群・ペニシリン結合タンパク (Penicillin-Binding-Protein, PBP) と結合することによりトランスペプチダーゼ活性やトランスグリコシダーゼ活性を阻害し抗菌作用を示す。トランスペプチダーゼ活性とは、ペプチド結合を他のペプチドやアミノ酸と交換する触媒作用であり、トランスグリコシラーゼ活性とは、グリコシド結合を求核的な糖受容体に対して転位させる触媒作用である。 β -ラクタム薬の β -ラクタム構造は PBP の活性部位にあるセリン残基と安定なエステル結合を形成する。しかしながら MRSA においてはこの作用が阻害され、その耐性化機構は 2 つに大別される。

i) β -ラクタマーゼ産生による β -ラクタム薬の失活

MRSA において *blaZ* 遺伝子にコードされる β -ラクタマーゼは、 β -ラクタム薬を加水分解することで薬効を失活させる。 β -ラクタマーゼは基質特異性、酵素蛋白の等電点 (pI)、分子量等、生化学的、物理化学的特性によって以下のように分類されてきた (Table 3)⁸⁾。

Table 3 β -ラクタマーゼの種類と分類⁸⁾

セリン β -ラクタマーゼ	
クラスA β -ラクタマーゼ	Penicillin への基質特異性が高いため、ペニシリナーゼとも呼ばれる。産生する菌は、ペニシリン系及び第1、第2世代セファロスポリンに耐性を示すが、セファマイシン系、第3世代セファロスポリン及びカルバペネム系抗菌薬は分解せず感受性を示す。 例外的に <i>Klebsiella pneumoniae</i> 及び <i>Proteus vulgaris</i> はこの遺伝子を染色体上に持っており、アンピシリンに自然耐性を示す。
クラスC β -ラクタマーゼ	腸内細菌、 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 等のグラム陰性桿菌が産生し、主にセファロスポリン系抗菌薬を分解する。
クラスD β -ラクタマーゼ	腸内細菌、 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 等のグラム陰性桿菌が産生し、ペニシリナーゼの一種である。
メタロ- β -ラクタマーゼ (亜鉛 β -ラクタマーゼ)	
クラスB β -ラクタマーゼ (カルバペネマーゼ)	イミペネムを効率よく分解し、更にその他のカルバペネム系抗菌薬 (パニペネム、メロペネム) に対しても、中もしくは高度の耐性を示す。 染色体性、プラスミド性を含め、 <i>Bacteroides fragilis</i> 、 <i>Serratia marcescens</i> 、 <i>Klebsiella pneumoniae</i> 、 <i>Escherichia coli</i> 等複数のグラム陰性菌で報告がある。

ii) PBP2'の発現によるβ-ラクタム薬の基質特異性の低下

mecA 遺伝子にコードされる PBP の代替酵素である PBP2'が発現し、これが狭域半合成ペニシリンやセフェム系薬剤に対して親和性が低いため細胞壁合成が可能となり、耐性化が起こる。*mecA* 遺伝子は、外来性の遺伝子カセット *SCCmec* と呼ばれる特徴的なゲノムアイランド上に存在する。この *SCCmec* がメチシリン感受性 *S. aureus* (Methicillin-Susceptible *S. aureus*: MSSA)の菌体内に水平伝播し、染色体 DNA に挿入され MRSA となる⁹⁾。

当初 MRSA は「*mecA* 遺伝子を持ち、β-ラクタム系抗生物質に耐性化した黄色ブドウ球菌」と定義されていた。しかし、プラスミドやトランスポゾンなどによる外来性遺伝子の獲得および遺伝子の変異などにより、その他の様々な薬剤に対しても耐性を獲得してきたため、β-ラクタム系以外の抗生物質でも MRSA に単剤として有効なものは少ない。現在、我が国の MRSA 感染症治療薬 (Fig. 2)としてはアミノグリコシド系の ABK (Arbekacin)、グリコペプチド系の VCM(Vancomycin)や TEIC (Teicoplanin)、オキサゾリジノン系の LZD (Linezolid)、TZD (Torezolid)、リポペプチド系の DAP(Daptomycin)が認可されており、CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)と EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)の2種類において感受性基準 (break point)が設けられている¹⁰⁾ (Table 4)。しかしながら、既にどの薬剤に対しても耐性菌の出現が確認されている。例えば MRSA 感染症に著効を示している VCM に関しては、MIC 値の上昇である MIC creeping が観測されてきており、2002 年に米国においてバンコマイシン耐性 MRSA (VRSA)の出現が報告されている¹¹⁾。

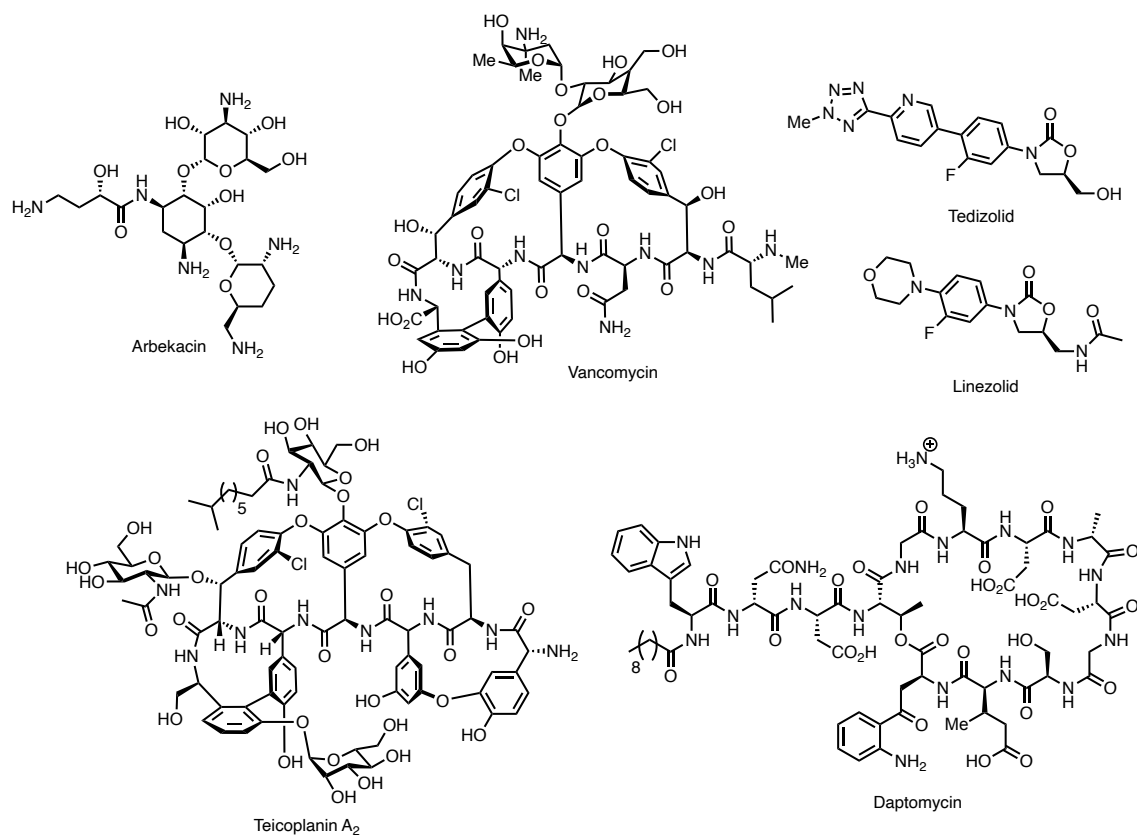


Fig. 2 我が国のMRSA感染症治療薬

Table 4 各種抗MRSA薬の*S. aureus*に対するbreak point (CLSIとEUCASTの比較)¹⁰⁾

MIC (μg/mL)					
CLSI			EUCAST		
	S	I	R	S	R
VCM	≤2	4.8	≥16	≤2	>2
TEIC	≤8	16	≥32	≤2	>2
LZD	≤4	-	≥8	≤4	>4
DAP	≤1	-	-	≤1	>1
ABK (GM)	≤4	8	≥16	≤1	>1
TZD	≤0.5	-	-	≤0.5	>0.5

S: susceptible, I: intermediate, R: resistant

ABKのbreakpointは記載がないのでGentamicinで代用。

1-4 β -ラクタム系薬剤:メロペネム (MEPM)

一方で Penicillin の臨床応用を契機に β -ラクタム構造を共通のモチーフとして様々な β -ラクタム薬が開発されてきた。これらはセファロスポリン系、カルバペネム系、モノバクタム系、ペニシリン系に大

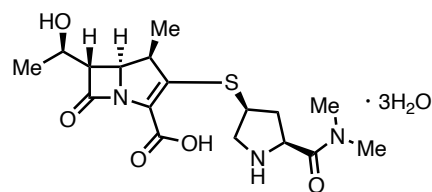


Fig. 3 Meropenem (MEPM)

別され、本研究は中でも有用なカルバペネム系抗菌薬 Meropenem (MEPM)に着目した。MEPM は ESBL (Extended Spectrum β -lactamase)生産菌を含む黄色ブドウ球菌による髄膜炎、腹腔内感染、敗血症および炭疽菌感染症に対して有効な広域スペクトルを有する抗菌薬である。本薬剤は図に示すような化学構造を有し、様々な β -ラクタマーゼにより分解されない特徴を持つ (Fig. 3)。主たる副作用としては吐き気、下痢、便秘、頭痛、発疹、注射部位の痛みなどがあり、加えて重篤な副作用として、*Clostridioides* 感染症 (*Clostridioides difficile* Infection: CDI)の誘発、痙攣、アナフィラキシーなどのアレルギー症状が含まれる。

しかしながら MRSA 感染症においては、その多くがグラム陰性桿菌との混合感染によることから、MEPM はその広域スペクトルにより、一層有用であると考えられる。

1-5 新たな創薬アプローチ: Circumventor について

抗生物質の開発と耐性菌の出現の歴史は切り離すことのできない関係にあり、従来の単剤によるアプローチでは解決は困難である。そこで MRSA に代表される AMR の問題を解決すべく、現在、精力的に研究が展開されるのが“Circumventor”である。Circumventor とは北里大学の太田博士によって新しい抗生物質のコンセプトとして「耐性菌の治療を目的とし、薬剤耐性機構を標的とする抗生物質」として提唱されている¹²⁾。すなわち薬剤耐性菌の耐性機構を標的とすることで薬剤非耐性の菌株には影響せず、新たな耐性菌の出現を抑えることができる。例えば、太田博士らによって見出された Clavulanic acid¹³⁾や Naphthacemycin¹⁴⁾、Cyslabdan¹⁵⁾は ABK および β -ラクタム薬 Imipenem の耐性克服活性および増強活性を示す化合物として報告されている (Fig. 4)。

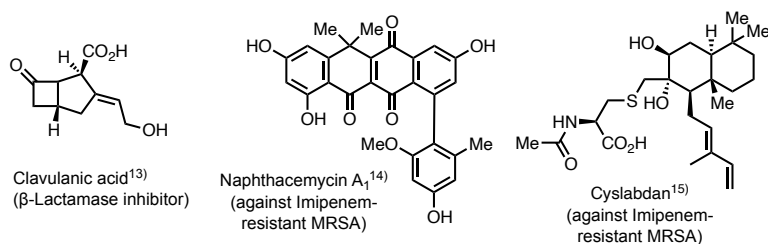


Fig. 4 MRSAにおける既存薬との併用効果を示す化合物

1-6 創薬シード化合物としての微生物由来天然物

人類が天然物を疾病の治療に用い始めた歴史は古く、紀元前 500 年頃の中国においてアメーバ赤痢の治療薬として吐根の有効成分の Emetine を用いていた記録がある。また、17 世紀のヨーロッパにおいてはマラリアの治療薬としてキナの皮から Quinine を利用していた。これらの例においては植物体を直接摂取して治療に用いていたが、Florey 博士、Chain 博士らは、Fleming 博士が 1928 年に発見した抗菌物質 Penicillin を微生物培養液中から単離・精製し、医薬品として利用できるようにした。さらに Waksman 博士は土壌微生物の放線菌に着目し、*Streptomyces griseus* から抗結核作用のある Streptomycin を発見し、今日まで化学療法薬として使用され続けている。この Streptomycin などの探索を機に、多くの研究機関や医薬品企業は微生物資源から創薬シード化合物の探索研究を行い、これまで多くの医薬品を世に送り出してきた¹⁶⁾。

その中でも特筆すべき一例としては、1979 年、北里研究所の大村らによって放線菌 *Streptomyces avermectinius* から単離された Avermectin とその誘導体 Ivermectin である。本化合物は家畜の駆虫薬のみならず、熱帯病であるオンコセルカ症やリンパ系フィラリア症の治療薬として見出され、年間約 3 億人を失明の危機から救っている。このように微生物由来の天然物は創薬シード化合物として人類の福祉に多大なる貢献を果たしてきた¹⁷⁾。

現在、上市される医薬品の約 60% が天然物、および天然物からファーマコフォアを抽出、誘導化したものでありその重要性は論を待たない¹⁸⁾。加えて、天然物がコンビナトリアル合成化合物より優れている点として、ケミカルスペースの多様性がある。天然物はコンビナトリアル合成化合物と比較して硫黄、ハロゲン原子の含有割合は同程度であるものの、酸素原子を多く含む特徴があり、これは標的タンパクと水素結合を介した donor/acceptor による親和性が高いことを意味する。そして構造的な特徴として、 sp^3 炭素を多く含み、環構造に起因する構造的な複雑性を見出すことができる。

さらに、現時点においてコンビナトリアル合成化合物の構造の多様性に限界があり、当初考えられていた以上に誘導体の構造的な多様性を得られないことが問題点となってきた。さらに、Ortholand らは化合物のケミカルスペース（化合物の物理化学定数などに基づいた統計学的解析によって評価される多様性空間）を比較した結果、コンビナトリアル合成化合物の占有するケミカルスペースが現在用いられている医薬品の占有するケミカルスペースの極わずかな空間しか占めないのに対し、微生物二次代謝産物

ではその多様性はほぼ一致することを見出している¹⁹⁾。このことから微生物二次代謝産物を利用した創薬シード化合物の探索は今後も重要な創薬研究において重要な位置を占めると考えられる。

1-7 MEPM 耐性克服活性物質の探索

上述した通り、MEPM は安全性・有効性が担保された薬剤であり、また β -ラクタマーゼに抵抗性を示す優れた特徴があることから、MEPM との併用により MRSA の薬剤耐性を克服する新規薬剤の創製は有効であると考えられる。そしてその探索源は微生物由来の天然物とすることで、構造的に多様な化合物が得られると考えた。

そのような背景のもと、北里大学大村智記念研究所において微生物二次代謝産物より MEPM 耐性克服活性物質の探索スクリーニングが行われた。

本スクリーニング方法は MRSA の β -ラクタム薬に対する耐性機構である PBP2' の阻害物質の探索を行うことを目的として構築した²⁰⁾。試験菌として PBP2' 発現株である MRSA KUB2750 株を使用し、 β -ラクタム薬として MEPM を使用した。MEPM 含有寒天培地上において選択的に阻止円が確認できたものは PBP2' を阻害することで MEPM 本来の活性を回復した可能性が高いため、ペーパーディスク法にて評価を行うこととした。

スクリーニングとして MRSA KUB2750 株の増殖に影響を与えない濃度の MEPM (1 $\mu\text{g/mL}$) を含有する寒天培地と非含有寒天培地において検討を行い、MEPM 含有寒天培地において選択的に生育阻止円径を形成するサンプルを選抜した (Fig. 5)。

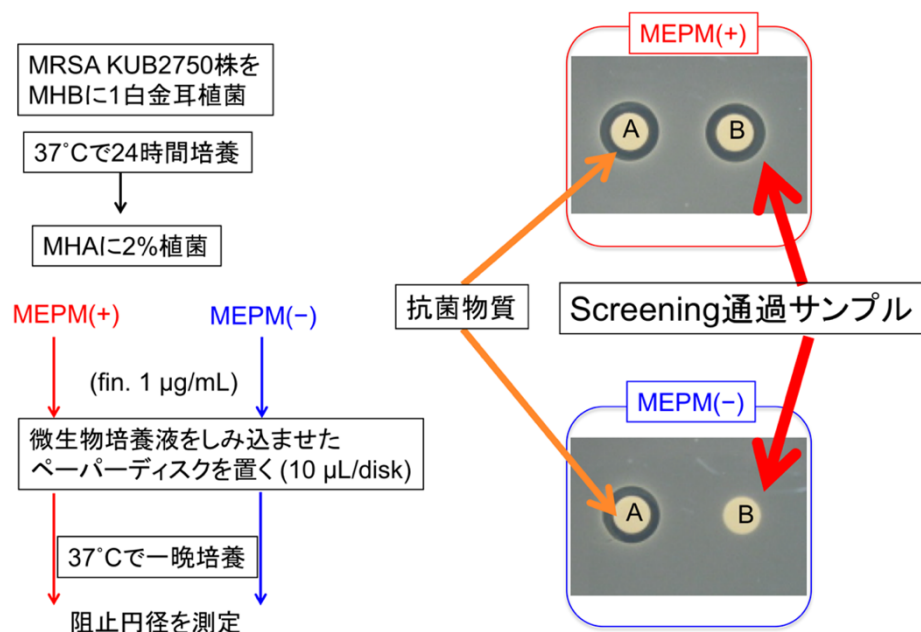


Fig. 5 微生物培養液からのMEPM耐性克服活性物質の探索スクリーニング方法

放線菌 2,865 株、糸状菌 4,360 株の計 7,225 サンプルをスクリーニングした結果 (Table 5)、沖縄県・石垣島の土壌より単離された糸状菌 *Fusarium falciforme* FKI-8363 株 (Fig. 6)が強力な MEPM 耐性克服活性物質を生産することが明らかとなった。そこで活性物質を単離すべく、FKI-8363 株培養物からの活性物質の精製を以下に示す方法で行った。

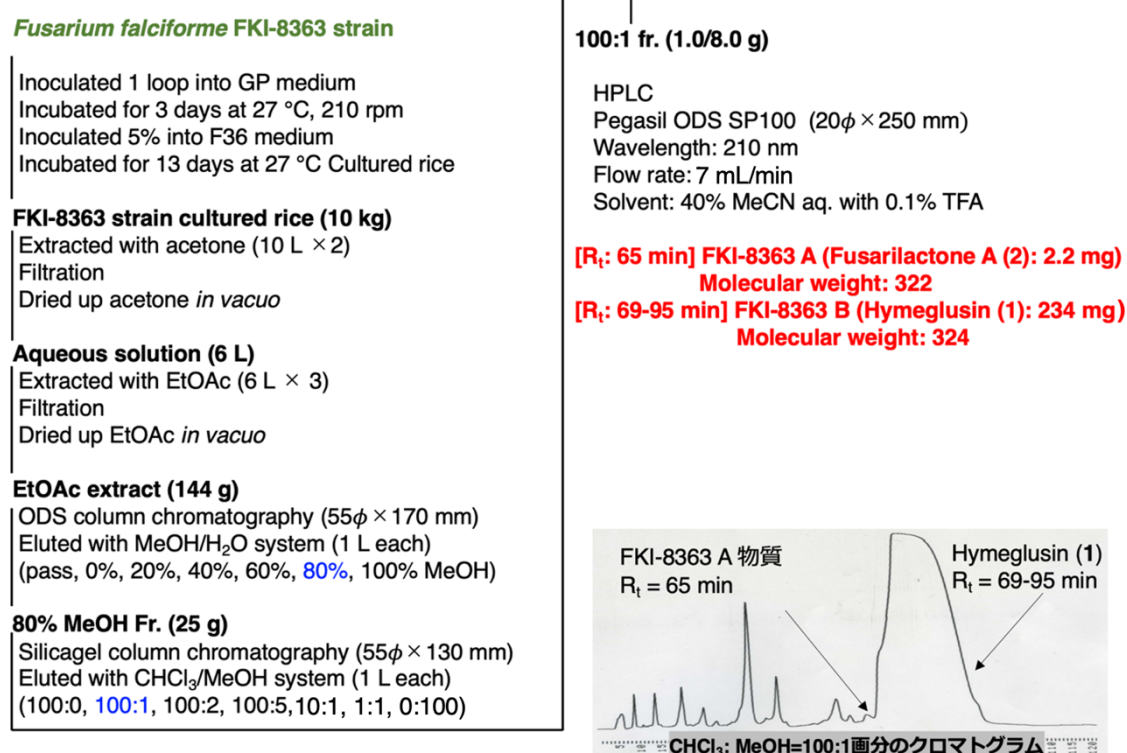


Fig. 6 *Fusarium falciforme* FKI-8363

Table 5 MEPM耐性克服活性物質探索スクリーニングの結果²⁰⁾

微生物培養液	サンプル数	スクリーニング通過数
放線菌由来	2,865	11
糸状菌由来	4,360	18
合計	7,225	39

得られた FKI-8363 株培養物にアセトンを加え、吸引濾過を行いアセトン抽出液を 20 L 得た。アセトンを留去し、EtOAc 抽出を行ったのちに EtOAc を留去し、EtOAc 抽出物を得た。EtOAc 抽出物を ODS カラムクロマトグラフィーにより段階的に MeOH aq. で溶出した。活性が確認された 80% MeOH aq. 画分をさらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、CHCl₃-MeOH 系 100:1 画分に活性が確認できたため、HPLC にて精製を行うことで、活性物質として FKI-8363A 物質を 2.2 mg、FKI-8363B 物質を 234 mg 単離した (Scheme 1)。



Scheme 1 *Fusarium falciforme* FKI-8363株培養物の精製スキーム

得られた活性物質の各種機器データと文献値^{21,22)}との比較により FKI-8363 B 物質および A 物質を Hymeglusin (1) および Fusarilactone A (2) と決定した。単離した両化合物の MEPM 耐性克服活性をペーパーディスク法により評価した。また、試験菌には臨床分離 MRSA KUB2750 株を用いた。単離した化合物溶液を染み込ませたペーパーディスクを、MRSA の生育に影響を与えない濃度の MEPM (1 μg/mL) を含有する寒天培地および MEPM 非含有寒天培地にそれぞれ置き、37 °C で一晚培養後その生育阻止円径を測定した。測定結果を以下に示す (Table 6)。

1 は MEPM 含有寒天培地上で 0.1 $\mu\text{g}/\text{disc}$ で活性を示し、MEPM 非含有時と比較して 10 倍の MEPM 耐性克服活性を示した。**2** は MEPM 含有寒天培地上で 10 $\mu\text{g}/\text{disc}$ で活性を示し、MEPM 非含有時と比較して 3 倍の MEPM 耐性克服活性を示した。

Table 6 ペーパーディスクによる活性評価

Inhibition zone (mm)/6 mm disc				
$\mu\text{g}/\text{disc}$	Hymeglusins (1)		Fusarilactone A (2)	
	MEPM (+)	MEPM (-)	MEPM (+)	MEPM (-)
30	25	19	15	11
10	23	17	11	–
3	20	–	–	–
1	17	–	–	–
0.3	11	–	–	–
0.1	9	–	–	–
0.03	–	–	–	–

検定菌:臨床分離MRSA KUB-2750株
 MEPM (+): 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 MEPM (-): None
 –: No inhibition

1-8 微量液体希釈法を用いた MEPM 耐性克服活性評価

天然物 **1** 及び **2** について MRSA 92-1191 株、MRSA ATCC33591 株、MRSA KUB 2750 株、MSSA KUB851 株を用いて MEPM 増強活性を微量液体希釈法により評価した (Table 7)。その結果、Hymeglusins (**1**)及び Fusarilactone A(**2**)は、MRSA 3 株に対して 4 倍以上の MEPM 増強活性を示した。しかしながら、MSSA KUB851 に対し

Table 7 Hymeglusins (1)およびFusarilactone A (2)のMEPM耐性克服活性評価

MIC (μg/mL)								
MRSA 92-1191		MRSA ATCC33591		MRSA KUB2750		MSSA KUB851		
MEPM (+)	MEPM (−)	MEPM (+)	MEPM (−)	MEPM (+)	MEPM (−)	MEPM (+)	MEPM (−)	
16 μg/mL		4 μg/mL		0.5 μg/mL		7.8 × 10 ^{−3} μg/mL		
Compound								
MEPM	64		16		2		0.063	
Hymeglusin (1)	0.25	2	0.25	2	0.25	1	1	4
Fusarilactone A (2)	4	16	2	32	4	16	8	32

でも MEPM 増強活性を示したため、PBP2'と関係なく *S. aureus* に対して MEPM 増強活性を有していることがわかった。

1-9 微量液体希釈法を用いた FIC index

の算出

MRSA 92-1191 株、MRSA ATCC33591 株、MRSA KUB2750 株を用いて、チェッカーボード法により 1 と MEPM の FIC

(Fractional Inhibitory Concentration) index を算出した。FIC index とは併用薬剤における相乗効果を評価する計算式²³⁾である (Fig. 7, Table 8)。その結果、全ての菌株において、MEPM に対する相乗効果を示した (Table 9)。また、FIC index 値は最小値について評価した。

FIC index =	薬剤A 併用時 MIC/薬剤A単独 MIC
	+ 薬剤B 併用時 MIC/薬剤B単独 MIC

Fig. 7 FIC indexの計算式

Table 8 FIC indexの評価基準

FIC index range	効果
≤0.5	相乗効果
>0.5~≤1	相加効果
>1~≤2	不関効果
2>	拮抗効果

Table 9 Hymeglusin (1)とMEPMの併用効果

Strain	MIC (μg/mL)		MEPM + Hymeglusin		
	MEPM	Hymeglusin	併用濃度 (μg/mL)		FIC index
	単剤	単剤	MEPM	Hymeglusin	
MRSA (92-1191 株)	64	2	16	0.13	≤0.13
MRSA (ATCC33591 株)	16	2	4	0.25	0.38
MRSA (KUB2750 株)	2	1	0.5	0.13	0.26

1-10 β-ラクトン天然物・Hymeglusin (1)と Fusarilactone A (2)

Hymeglusin (1) (別名:1233A, L659, L699)²¹⁾(Fig. 8)は、1987 年北里研究所において真菌 *Scoprariopsis* sp. F-244 の培養液中より単離された *trans*-β-ラクトン α 位に備えたヒドロキシメチル基、β 位に共役

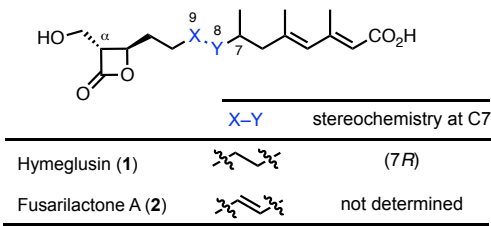


Fig. 8 Hymeglusin (1)とFusarilactone A (2)の化学構造

ジエンに共役したカルボン酸を有する天然物である^{24,25)}。

1 は単離当初に哺乳類の脂質合成において必須であるメバロン酸経路における 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) synthase 阻害活性を有することから、脂質異常症の有望なリード化合物として広く研究されてきた。加えて **1** は *Candida albicans* など数種の菌類に対して抗菌活性を示すことが明らかとなっている^{21,23)}。

一方で **1** の類縁体として見出された **2** (Fig. 8) は Qiu らによって 2019 年に **1** とともに単離、 β -ラクトン環部位の相対立体配置および生物活性が報告されている²²⁾。本報告において **1** および **2** は、中国の重要な農作物である茶の病原性真菌

Pestalotiopsis theae に対する抗菌活性 (ED_{50} , **1**: $18.35 \pm 1.27 \mu\text{g/mL}$, **2**: $38.14 \pm 1.67 \mu\text{g/mL}$) を報告しているとともに RT-PCR 法によって *P. theae* の HMG-CoA synthase 阻害活性を報告している。なお現在までに HMG-CoA synthase 阻害活性を有する天然物は **1** および **2** のみである。

上述してきたように Hymeglusin (**1**) および Fusarilactone A (**2**) は、新規 MEPM 併用薬としてのポテンシャルを有し、 β -ラクトン環という有機合成化学的にも興味深い構造を持つ天然物である。創薬リード化合物創製には全合成的手法による網羅的な誘導体の創製が有効であると考えられるが、**1** の天然物の誘導化では、 β -ラクトン環部位の高い反応性により適用可能な化学修飾に制限がある。そこで筆者は、本研究の目的として、i) 収束的な **1** および **2** の不斉全合成経路の確立とそれに伴う **2** の絶対立体構造の決定、ii) 今回我々が新たに見出した MEPM 増強活性における **1** の機能解明を設定し、はじめに全合成経路の確立を行うこととした。

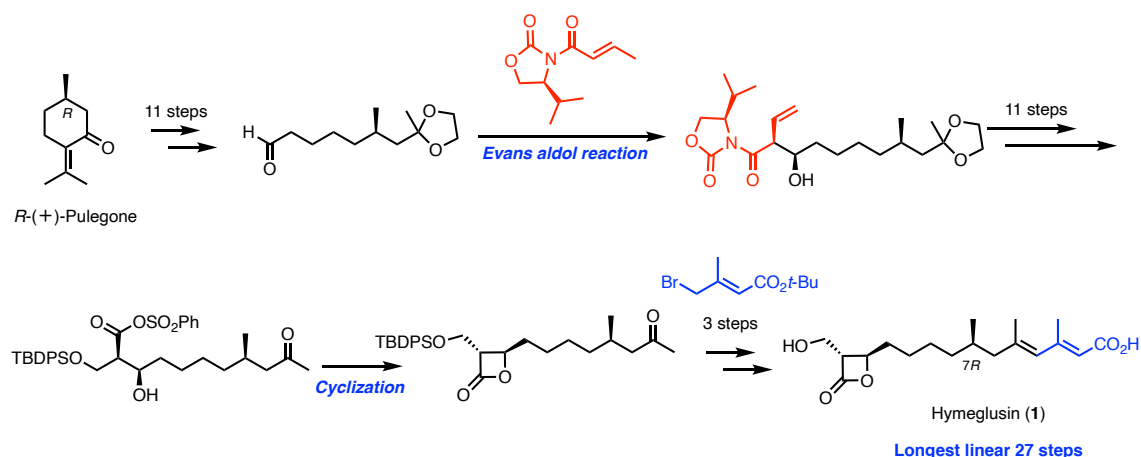
2. 本論

2-1. Hymeglusin (1)および Fusarilactone A (2)の逆合成

1 はその 1987 年の単離から現在までに 6 報の全合成が報告されている²⁶⁻³¹⁾。その 6 報はいずれも独自の戦略にて全合成を達成しており、標的化合物へ向けた直線的な合成経路が多いことが特徴である。各合成経路において共通する鍵反応としては、
i) C7 位の不斉中心の構築および、ii) 立体選択的な *trans*-β-ラクトン環の構築である。以下にそれらの特徴と全合成経路を示す。

Chang らによる初の全合成 (1989 年)²⁶⁾

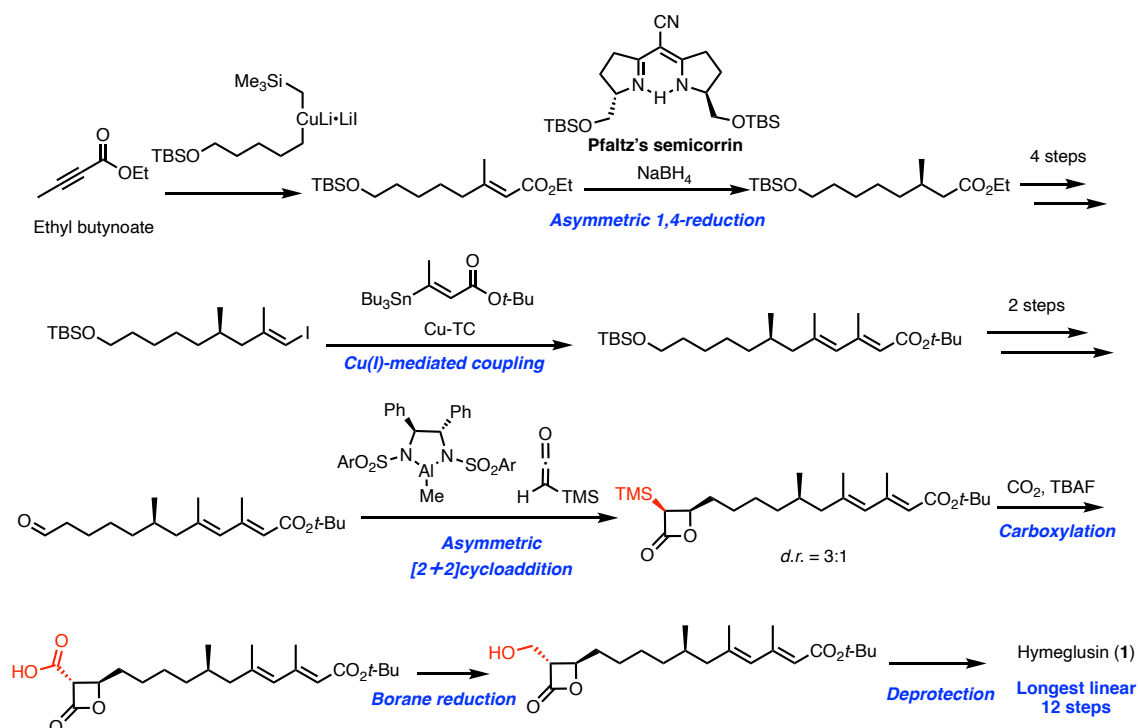
Hymeglusin (1)の初の全合成は 1989 年に Chang らによって達成された²⁶⁾。本合成経路の特徴としては、出発原料の(*R*)-(+)-Pulegone の不斉炭素原子を 1 の 7 位不斉炭素原子として利用している。また、光学活性な β-ラクトン環の構築に関しては、Evans aldol 反応によって立体化学を構築した β-ヒドロキシカルボン酸の環化反応によって合成している (Scheme 1)。



Scheme 1 Chang らによる Hymeglusin (1) の全合成²⁶⁾

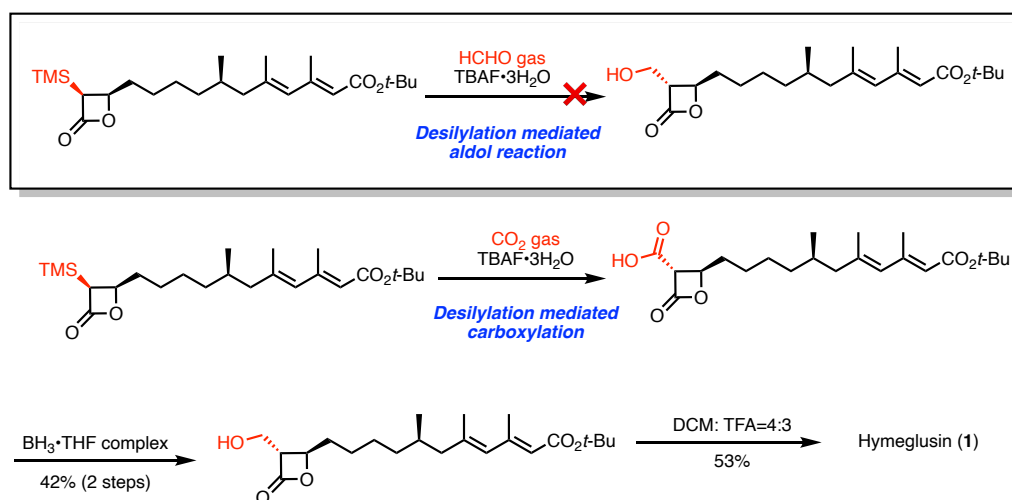
Kocienski, Pons らによる全合成 (1998 年)²⁷⁾

Kocienski, Pons らの Hymeglusin (1) の全合成経路²⁷⁾は、鍵反応として (i) Pfaltz's semicorrin を不斉触媒とした 1,4 還元による 立体選択的な C7 位メチル基の構築、(ii) Cu (I) 触媒を用いたビニルヨードとビニルスズ化合物のカップリング反応、(iii) 不斉 Al 触媒を用いた TMS ケテンとアルデヒドの [2+2] 環化付加反応による立体選択的な β -ラクトン環の構築の 3 点を特徴とした経路である (Scheme 2)。



Scheme 2 Kocienski, Pons らによる Hymeglusin (1) の全合成²⁷⁾

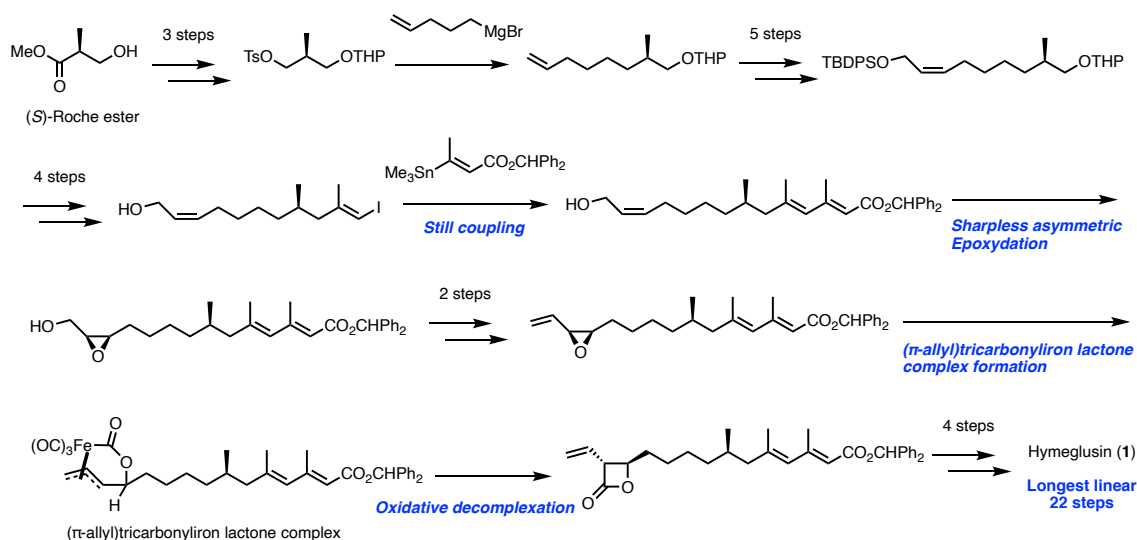
また、本合成経路の興味深い点としては、 β -ラクトン環 α -位のヒドロキシメチル基導入の起点として TMS 基を利用している点である。Kocienski, Pons らは当初の検討において TMS 基を TBAF \cdot 3H₂O で処理することにより、ホルムアルデヒドとの aldol 反応によって直接的にヒドロキシメチル基の導入を試みている。しかしながら、ホルムアルデヒドとの aldol 反応は進行しなかったため、その解決策として CO₂ ガスを用いたカルボキシレーションによってカルボン酸を導入し、続く BH₃ \cdot THF complex によるカルボン酸の選択的な還元によって段階的にヒドロキシメチル基へと導いている (Scheme 3)。



Scheme 3 ハイドロキシメチル基の導入における検討

Tilbrook らによる全合成 (1999 年)²⁸⁾

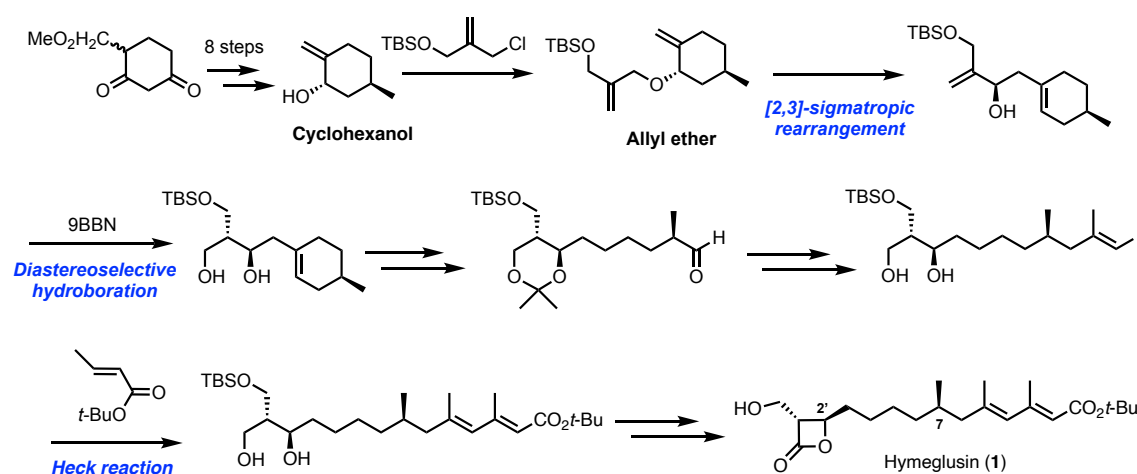
Tilbrook らによる全合成経路²⁸⁾は、(R)-Roche ester の不斉炭素原子を **1** の C7 位炭素原子とし、連続的に基本炭素骨格を伸長している。**1** の β 位脂肪酸側鎖の共役系は Still カップリング によって構築する一方で、立体選択的な β-ラクトン環の構築は、その前駆体を光学活性なエポキシドとした(π-allyl) tricarbonyliron lactone complex の形成に続く酸化的脱錯体化によって構築する戦略をとっている(Scheme 4)。



Scheme 4 Tilbrook らによる Hymeglusin (1) の全合成²⁸⁾

Uskokovic らによる全合成 (1993 年)²⁹⁾

上述した全合成経路以外にも Uskokovic らは、**1** の有する 7 位メチン炭素を利用して 2' 位不斉炭素をジアステレオ選択的な [2,3]-シグマトロピー転位にて構築する合成経路によって全合成を達成している²⁹⁾。C7 位メチル基の不斉源は光学活性なシクロヘキサノールを出発原料としアリルエーテルへと導いて調製するものとして、合成初期段階に *n*-BuLi を作用させた [2,3]-シグマトロピー転位によって 2' 位不斉炭素を構築している (Scheme 4)。その後、9BBN を用いたジアステレオ選択的なヒドロホウ素によりトリオールへと導き、Heck 反応による共役ジエン部位の構築を経て **1** を合成した。



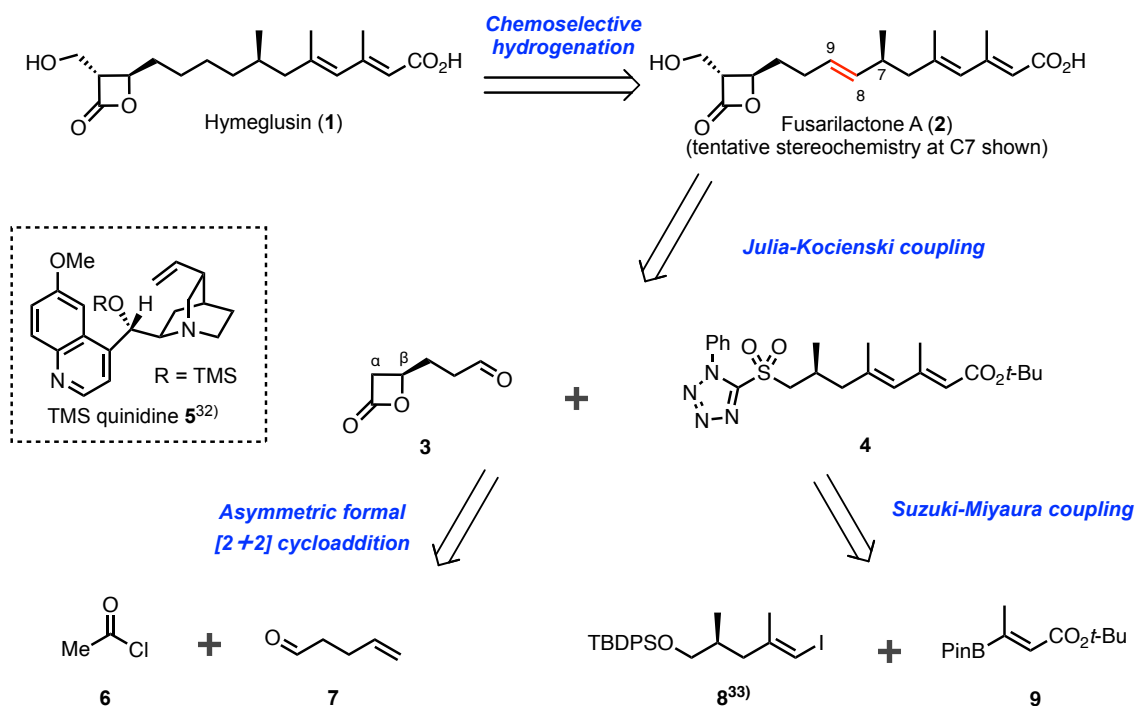
Scheme 5 Uskokovic らによる Hymeglusin (**1**) の全合成²⁹⁾

このように上述した合成例は、いずれの経路も不安定な β -ラクトン環を合成最終段階において構築する点で共通している

そこで筆者は、これらの知見と今後の誘導体創製を踏まえて、効率的に誘導体の合成を可能とする収束的な全合成経路を立案した (Scheme 6)。

すなわち **1** は、その前駆体を **2** とし、化学選択的な水素添加反応によって合成できるものとした。一方で、**2** の基本炭素骨格の構築に関しては天然物の C8-9 位の幾何が *E* であることから Julia-Kocienski カップリングによって構築できるものとし、 β -ラクトンフラグメント **3** と PT-スルホンフラグメント **4** から導くこととした。そして光学活性な **3** の調製に関しては Nelson らによって報告された TMS quinidine **5** を不斉触媒とした立体選択的な形式 [2+2] 環化付加反応³²⁾によって構築する一方で、**4** の合成はカルボン酸に共役したジエンの構築を鍵として、ビニルヨージド **8**³³⁾ とビニルボロナート **9** を鈴木-宮浦カップリングに付すことで得られるものとした。

本逆合成の鍵と挑戦的な点としては、反応性の高いβ-ラクトン環存在下において、いかにして Julia-Kocienski カップリングを含む官能基変換を行うかにある。合成終盤にて構築されることが一般的なβ-ラクトン環を予めフラグメントに組み込んでおくことによって、収束的に基本炭素骨格の構築ができるものとした。以下に本逆合成を着想するまでに至った合成の初期検討を述べる。



Scheme 6 Hymeglusin (1)とFusarilactone A (2)の逆合成

2-2. β -ラクトンフラグメント 3 の合成

β -ラクトン環構築の初期検討

3 の合成について、*trans*- β -ラクトンの構築法は先述した 1 の全合成経路において用いられてきた手法が主に知られている。

すなわち光学活性な β -ヒドロキシカルボン酸の環化反応によって構築する手法²⁶⁾と、合成が比較的容易な *cis*- β -ラクトンを[2+2]環化付加反応によって合成し、異性化によって *trans*- β -ラクトンとする手法²⁷⁾、光学活性なエポキシドを用いた(π -allyl)

tricarboxyliron lactone complex の形成に続く酸化的脱錯体化²⁸⁾による手法である。

β -ラクトン環を構築する工程数は、前者と比較して後者の方が短工程かつ効率的である。しかしながら、[2+2]環化付加反応によって *trans*- β -ラクトンを一挙に合成する報告は非常に少なく、基質一般性を欠くものが多い。

そのような背景の中、2012 年に Peter らによって報告された Salen-Al complex (Fig.1)を用いた[2+2]環化縮合反応³⁴⁾は、酸ブロミドとアルデヒドから光学純度の高い *trans*- β -ラクトンを良好な収率で与える数少ない手法である。

本手法は酸ブロミドに塩基を作用させることで生じたケテンに対し、遊離したブロミドアニオンが求核

攻撃することによって α -ブロモエノラートを生成する。この α -ブロモエノラートが系内のアルデヒドと反応することで *trans*- β -ラクトンを与える。

なお、本反応が進行する際の遷移状態は Salen-Al complex の Al 原子、ピリジニウム塩それぞれにアルデヒドと α -ブロモエノラートが配位する位置が異なる Path A および Path B が提唱されている (Fig. 2)。

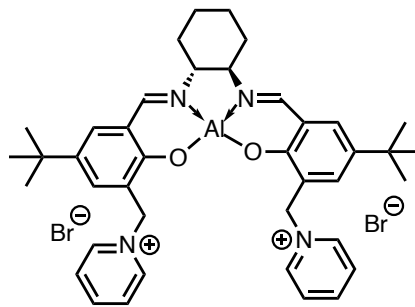


Fig. 1 Salen-Al complex

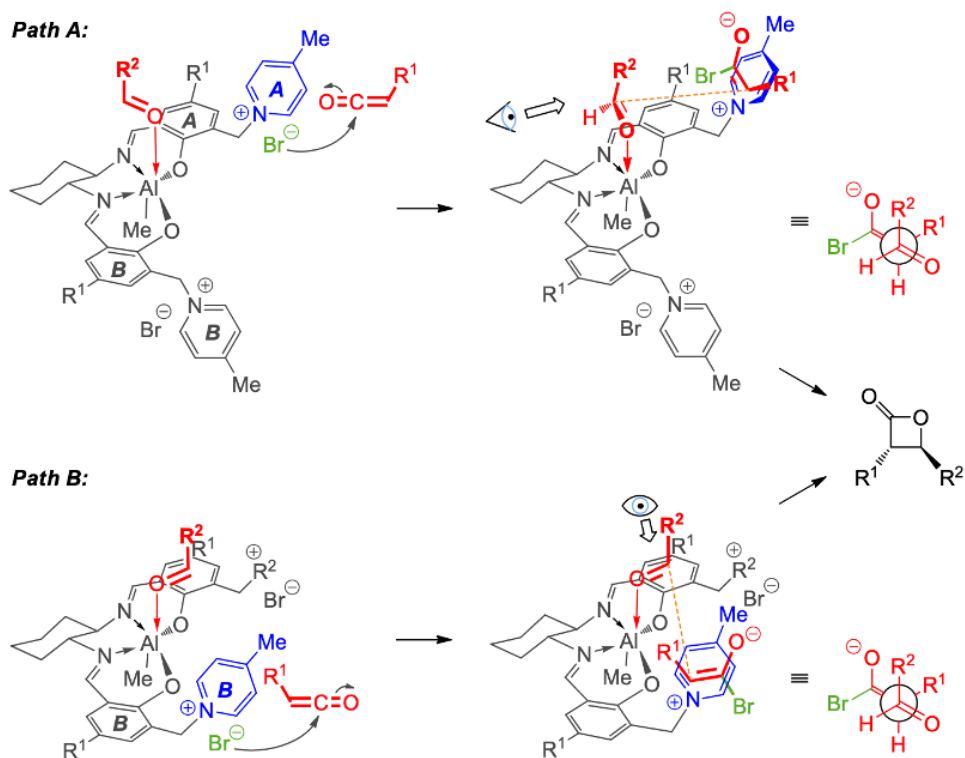
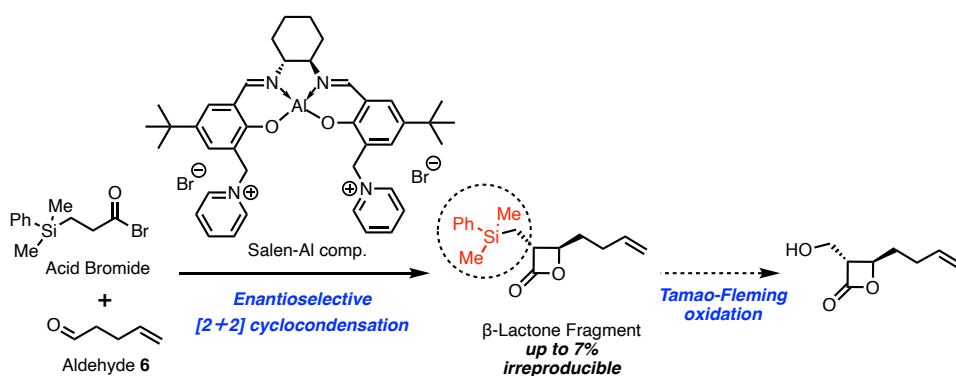


Fig. 2 Salen-Al Comp.を用いた[2+2]環化付加反応の遷移状態³⁴⁾

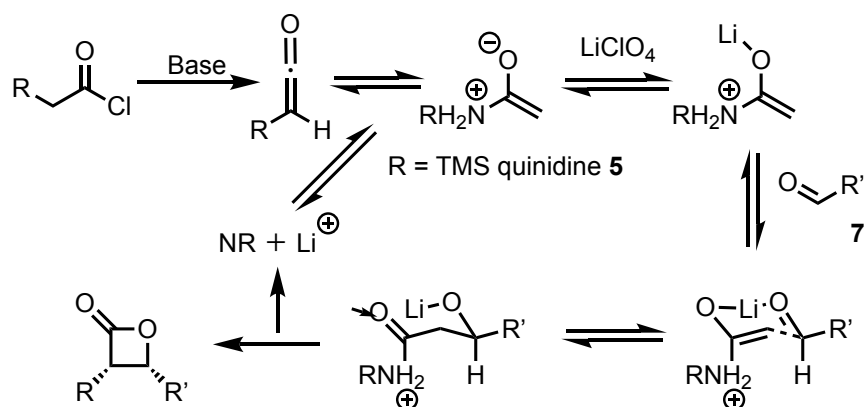
そこで β -ラクトン環の構築における初期検討として、Salen-Al complex を用いた手法によって合成を試みた。しかしながら、目的の *trans*- β -ラクトンは 7%と低収率の取得に留まり、触媒の空気への不安定性により再現性を欠く結果となった (Scheme 7)。



Scheme 7 β -Lactone フラグメント合成の初期検討

TMS quinidine 5 による β -ラク톤の構築

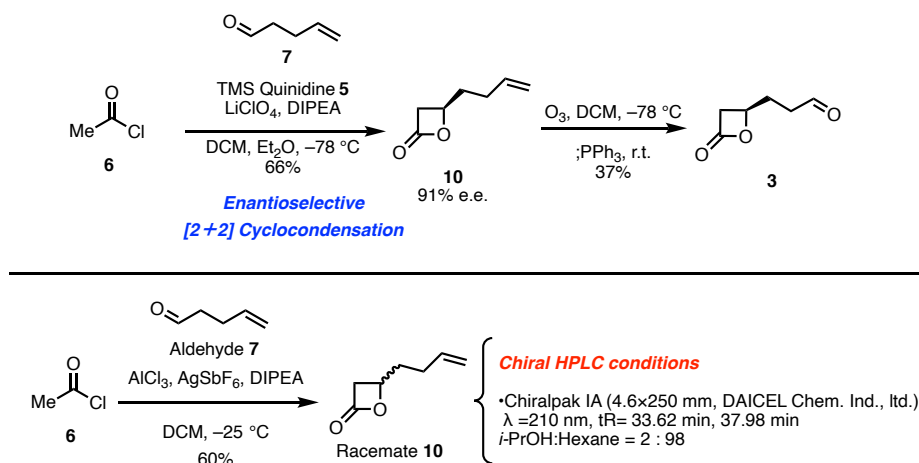
そこで、次なるアプローチとして Nelson らによって報告されたシンコナルカロイドである quinidine 誘導体を不斉触媒とした形式[2+2]環化付加反応³²⁾を試みた。本反応のメカニズムとしては、酸クロライドに塩基を作用させることにより生じたケテンに対し、quinidine の第3級アミンが求核攻撃しキラルなエノラートを発生させる。そこにアルデヒドが Li を介した椅子型 6 員環遷移状態を取ることで、キラルな *cis*- β -ラク톤を合成することができる (Scheme 8)。



Scheme 8 TMS quinidine 5 を用いた不斉形式[2+2]環化付加反応

しかしながら本系を **1** および **2** に適用するには、 β -ラク톤環 α 位の立体化学に関して、天然物の *trans* の幾何へと異性化をさせる必要があるが、塩基を作用させた異性化は基質の分解を伴い低収率にとどまる。また、別の合成法としては β -ラク톤に aldol 反応の条件を適用すると β 位置換基の立体障害を避けるように α 位に置換基が導入され、*trans* の立体化学の構築が容易である³⁵⁾。そこで筆者は、TMS quinidine **5** によって β 位に不斉中心を有する β -ラク톤を合成し、後に α 位を aldol 反応によって官能基化することとした。

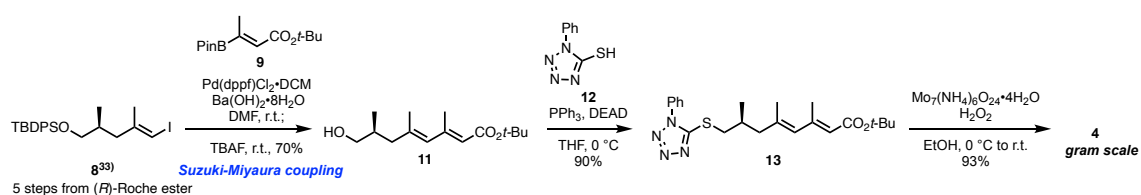
Acetyl chloride (**6**)とアルデヒド **7** に対し **5** を作用させることで良好な光学純度にて β -ラク톤 **10** を得た。なお光学純度の決定は、合成した **10** のラセミ体を標品とし、キラル HPLC による解析によって決定した。そして **10** のエキソオレフィンをおゾン分解によってアルデヒドへと導き、 β -ラクトンフラグメント **3** とした (Scheme 9)。



Scheme 9 β-Lactone フラグメント 3の合成と光学純度の確認

2-3. PT-スルホンフラグメント 4 の合成

一方で、カップリングパートナーである PT-スルホンフラグメント 4 の合成に関しては、前述の逆合成にしたがって共役ジエンの構築を鍵として合成経路を確立した (Scheme 10)。はじめに Ley らの報告³³⁾に従って、不斉中心を有するビニルヨージド 8 を調製しテトラール酸から 2 工程にて導いたビニルボロネート 9 との鈴木-宮浦カップリングによって共役ジエンを構築した。そして本反応の後処理を TBAF にて行うことで TBDPS 基を除去し、第一級アルコールとした。得られた第一級アルコールを起点に 1-Phenyl-5-mercaptotetrazole との光延反応によってスルフィド 13 とし、モリブデン触媒を用いた Trost 酸化によってスルホンへと導き 4 の合成を完了した。

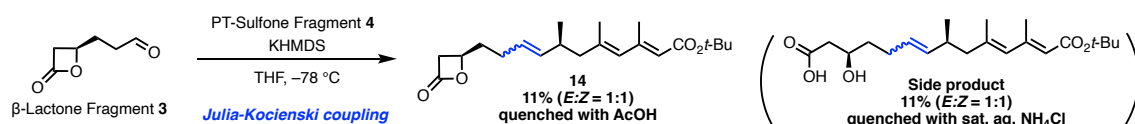


Scheme 10 PT-スルホンフラグメント 4の合成

2-4. Julia-Kocienski カップリングの初期検討

取得した β -ラクトンフラグメント **3** と PT-スルホンフラグメント **4** を用いて Julia-Kocienski カップリングによる **2** の基本炭素骨格の構築を試みた。目的のカップリング体は 11% ($E:Z = 1:1$) と低収率ながら得られたものの、本反応は基質の分解を観測する結果となった。加えて、本反応は後処理を飽和塩化アンモニウム水溶液によって行くと β -ラクトン環が加水分解された β -ヒドロキシカルボン酸が得られたことから、カップリング反応の低収率の原因は β -ラクトン部位の反応性の高さに起因する副反応であると考察した (Scheme 11)。

そこで β -ラクトン α 位にあらかじめ置換基を導入した基質にて Julia-Kocienski カップリングを行うことで立体障害の効果によって副反応を抑制し収率の向上を図ることとした。



Scheme 11 Julia-Kocienski カップリングの初期検討

2-5. β -ラクトン α 位官能基化の検討

はじめに β -ラクトン α 位の官能基化に際して、天然物と同様のヒドロキシメチル基等価体の導入を試みた (Table 1)。先に述べた Kocienski、Pons らの **1** の全合成²⁷⁾においては、 HCHO を求電子剤として用いた aldol 反応においては目的物は得られず、 CO_2 を用いたカルボキシレーションのみが進行したと報告している。筆者の検討においても同様に基質として **10** を用いた aldol 反応は目的物を観測できず、また HCHO 等価体として 1*H*-Benzotriazole methanol を用いた系においても原料の分解を観測するのみの結果となった (Entry 1, 2)。そこでヒドロキシメチル基等価体として BOMCl や MOMCl など種々アルキルハライドを求電子剤とした検討を行なったが、これらも基質の分解を抑制することはできなかった (Entry 3, 4)。しかしながら、これら検討の中で唯一 β -ラクトン α 位の官能基化が進行したのが TMSCl を求電子剤とした系であり、目的の β -ラクトン **15** を収率 66%、単一のジアステレオマーにて得ることができた。なお、この段階において β -ラクトンの立体化学は $^1\text{H NMR}$ にて α 、 β 位プロトンのカップリング定数を確認することにより、*trans* の立体化学であることを確認している。一般に β -ラクトン環 α 、 β 位プロトンのカップリング定数は *cis* 体で 6.5 Hz 付近をとり、*trans* 体で 4-4.5 Hz をとることが知られている³⁶⁾。**15** の β -ラクトン環 α 位のカップリング定数は、4.0 Hz であるため、*trans* 体であると判断した。

Table 1 β -lactone α 位官能基化の検討

Entry	Electrophile	Results
1	formaldehyde (THF solution)	Decomp.
2	1 <i>H</i> -Benzotriazole-1-methanol ¹³⁾	//
3	BOMCl	//
4	MOMCl	//
5	TMSCl	66% (Single diastereomer)

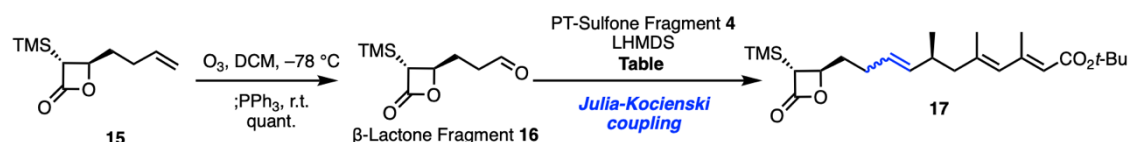
2-6. 新戦略による Julia-Kocienski カップリング

先の戦略に則り、 β -Lactone Fragment **16** を合成し、Julia-Kocienski カップリングの検討を行った (Table 2)。先に得られた α -TMS β -ラクトン **15** に対しオゾン分解によって β -Lactone フラグメント **16** とした。そして取得した **16** を用いて Julia-Kocienski カップリングを試みたところ、予想通り基質の分解は抑制され、カップリング体 **17** の収率は 86%と β -Lactone フラグメント **3** の 11%と比較して大幅に向上した。しかしながら、望みの *E* 選択的な取得には至らず、*Z* 体との 1:1 の分離困難な混合物を与える結果となった。

そこで *E* 選択的にカップリング体を取得すべく、添加剤、溶媒、反応温度などの条件を検討していくこととした。Entry 2 においては -85 °C と低温化での反応を試みたところ、収率の低下が見られたものの *EZ* 比が僅かながら向上する結果となった (*E:Z* = 3:2)。一方で、溶媒効果の検証として DME および DMF を検討したが、いずれも系内が複雑化し、*EZ* 比の向上は見られなかった。そして次なる検討として Li^+ 補足剤として HMPA を添加した系においては基質が分解し、痕跡量の目的物の取得に留まったが *EZ* 比 7:2 と選択性が向上する結果となった (Entry 5)。なお、本系における基質の分解の原因としては、スルホナートアニオンの対イオン Li^+ が HMPA によって捕捉されたことで生じた naked anion の反応性が高いために β -ラクトン環との副反応が起きたと考察している。

その後さらなる収率の向上および *E* 選択性の向上を図り、加水分解を抑制する目的で HMPA の脱水剤として 4 Å MS を添加³⁷⁾したところ、42%(*E*:*Z*=14:1)と中程度の収率で *E* 選択的に **17** を与える条件を見出した (Entry 6)。

Table 2 Julia-Kocienskiカップリングの検討



Entry	Additive	Temp.	Solv.	Results
1	None	−78 °C	THF	86% (<i>E</i> : <i>Z</i> =1:1)
2	None	−85 °C	THF	75% (<i>E</i> : <i>Z</i> =3:2)
3*	None	−58 °C	DME	12% (<i>E</i> : <i>Z</i> =1:1)
4*	None	−60 °C	DMF	22% (<i>E</i> : <i>Z</i> =1:1)
5	HMPA	−85 °C	THF	6% (<i>E</i> : <i>Z</i> =7:2)
6	HMPA, 4 Å MS	−85 °C	THF	42% (<i>E</i> : <i>Z</i> =14:1)

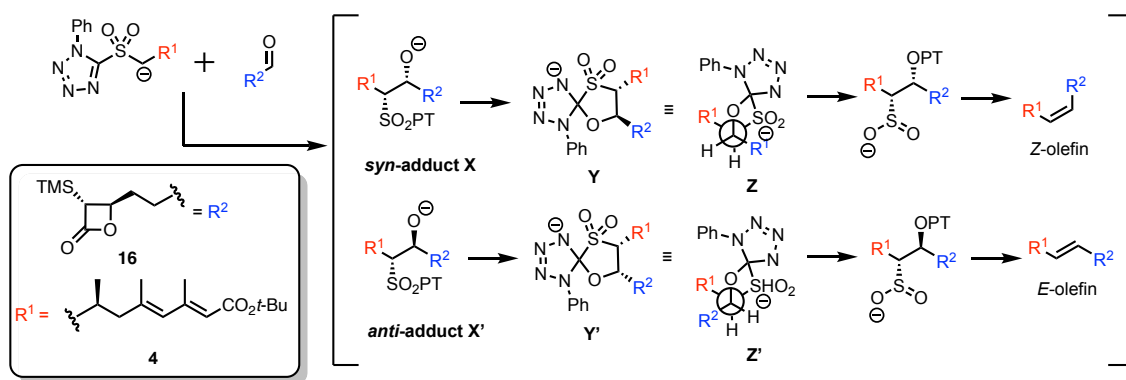
※DME、DMFの融点はそれぞれ−58℃、−61℃

2-7. Julia-Kocienski カップリングにおける選択性の考察

一般に Julia-Kocienski カップリングは、*E* オレフィン選択的に目的物を与える手法として認知されているが、**16** と **4** を用いた系においては、良好な収率および選択性にてカップリング体を得る条件を見出すことはできなかった。この理由について筆者はメカニズムを鑑みて以下のように考察する (Scheme 11)³⁸⁾。

一般に Julia-Kocienski カップリングの *E*/*Z* 選択性を決定する段階は、本反応のメカニズムの中で 2 か所ある。1 つ目はスルホナートがアルデヒドに求核付加し *syn*/*anti* 付加体を与える中間体 **X**, **X'** と 2 つ目は、その後フェニルテトラゾールに対しアルコキシドが付加したスピロ **Y**, **Y'** である。通常の反応条件においては、スルホナートのアルデヒドへの付加は不可逆であり、*felkin-ahn* モデルにて説明可能な付加の選択性にて *syn*/*anti* 付加体が生成し、*E*/*Z* 選択性が発現する。しかしながら、ベンジル/アリルスルホナートを基質として用いた場合は、クラウンエーテルなどの金属カチオン補足剤を添加すると、アルデヒドへの付加が可逆的になり、*E*/*Z* 選択性を決定するのは、**Y**, **Y'** となる。この *E*/*Z* 両異性体を与える中間体 **Y**, **Y'** においては、*E* オレフィンを与える中間体 **Z** の方が **Z'** に比べ、活性化エネルギーが低い。そのため、Curtin-Hammett 則の観点から、中間体 **Y**, **Y'** の生成比に因らず生成物は *E* オレフィンに偏ることで選択性が発現する。

本メカニズムを **1** に適用し、*E/Z* 選択性を考えると **16** のアルデヒド α 位はメチレン鎖であり、スルホナートの付加時における *syn/anti* 選択性は発現しなかったと考えられる。一方で HMPA のようなカチオン補足剤を添加した場合において *E* 選択性は発現したものの、基質の分解を観測したことから、naked anion の反応性の高さが副反応を併発したものと考えられた。



Scheme 12 Julia-Kocienskiカップリングのメカニズム

2-8. 脱シリル化に伴う aldol 反応の検討

ここで良好な *E* 選択性にて取得したカップリング体 **17** に対して脱シリル化に伴う aldol 反応によってヒドロキシメチル基の導入を検討することとした (Table 3)。

先述したとおり Kocienski らの報告によれば、HCHO ガスを用いた脱シリル化に伴う aldol 反応は目的物が得られないとの記載がある²⁷⁾。本報告においてはその具体的な理由は明記されていないが、筆者はその原因を 2 点考察している。

1 つ目は、モノマーの HCHO が系内に存在する微量の水および反応温度によって容易にポリマー化し、不活化しているためであり、2 つ目は、系内に存在する水が脱シリル化によって生じた β -ラクトン環 α 位のアニオンを即座にプロトン化しているためだと考えた。

そこで系内を完全な無水にし、ホルムアルデヒドのポリマー化を抑制することができれば本反応は進行すると考え、以下の検討を行った (Table 3)。

モノマーの HCHO については、パラホルムアルデヒドをモノマー化させた THF 溶液を調製することとした。本溶液の調製法は、パラホルムアルデヒドとトリフルオロメタンスルホン酸無水物の THF 溶液を加熱蒸留することによって、ポリマーを開裂させモノマーとした HCHO 溶液を得る手法が知られている。

一方で、脱シリル化を行う F⁻ のソースとして頻用される TBAF の THF 溶液は、F⁻ が強力な水素結合受容体であるために完全な脱水試薬を得ることが難しい。

そこで無水条件にて F⁻ を得るべく、Lawrynowicz らの報告³⁹⁾にある TBAF \cdot 3H₂O を加熱条件下、減圧吸引し水を留去することで得た無水の TBAF を用いて反応を試み

た。しかしながら、望みのヒドロキシメチル体 **18** は取得することが出来ず、定量的に脱シリル体 **14** を与えるのみの結果となった (Entry 1)。

次なるアプローチとして Dimagno らによる TBACN と Hexafluorobenzene の陰イオン交換による TBAF の調製⁴⁰⁾を試みた結果、痕跡量の **18** は確認できるものの、この系においても **14** が優先する結果となった (Entry 2)。

その他の手法としては、中性条件下かつ無水で調製可能な TASF の THF 溶液も同様に検討を行ったが、先の検討と同様に **18** の取得には至らなかった (Entry 3)。

上述の検討より、目的の **18** が得られず、脱シリル化が優先するのは、加熱蒸留して取得したモノマーのホルムアルデヒド溶液のポリマー化が速やかに進行することに加え、取り扱いが困難であることから、速やかに不活化していることが考えられた。

そこでこれらの結果を踏まえ、モノマーの HCHO を取得する次なるアプローチを検討することとした。

モノマーの HCHO を調製する次なるアプローチとして、Marsais らの報告した 1*H*-Benzotriazole-1-methanol を用いた手法⁴¹⁾に着目した (Entry 4)。

本手法は、1*H*-Benzotriazole-1-methanol に塩基を作用させることで、第一級アルコールの脱プロトン化に伴って HCHO の生成を系中で行うことができる。本論文では、実験操作も簡便であるこの手法によって、種々求核試薬に良好な収率でヒドロキシメチル基を導入している。

そこで本系に用いる塩基を TBACN と Hexafluorobenzene から調製した脱水 TBAF に設定し、脱シリル化を一挙に行いながら反応を試みたところ、望みのヒドロキシメチル体 **18** を 30% の収率にて取得することができた。しかしながら、生成した **18** はマイナー成分として *cis*- β -ラクトンを含み(*trans*:*cis* = 5:1)、加えて Julia-Kocienski カップリングで構築したオレフィンの幾何異性体も含む 4 種類の異性体が分離困難な混合物として取得された。

また、aldol 反応の収率は、その後の添加剤、反応温度などの条件検討においても向上には至らなかった。その原因として、反応開始直後の TLC によるモニタリングで確認していた目的物が、長時間の反応により減少していく挙動を見せたことからレトロ aldol 反応が速やかに起きていると推察された。

そこで化合物の物理化学的性質が変わることを期待し、あらかじめヒドロキシメチル基を導入した β -Lactone フラグメントにて Julia-Kocienski カップリングを検討することとした。

Table 3 脱シリル 化に伴う aldol 反応の検討

Entry	HCHO source	F ⁻ Source	Result
1	HCHO THF 溶液	TBAF·3H ₂ O	14 (100%)
2	"	TBACN, Hexafluorobenzene	Trace amount of 18 , 14 (98%)
3	"	TASF	14 (100%)
4	1 <i>H</i> -Benzotriazole-1-methanol	TBACN, Hexafluorobenzene	18 (30%, <i>trans</i> : <i>cis</i> = 5:1)

2-9. Fusarilactone A (2) の不斉全合成

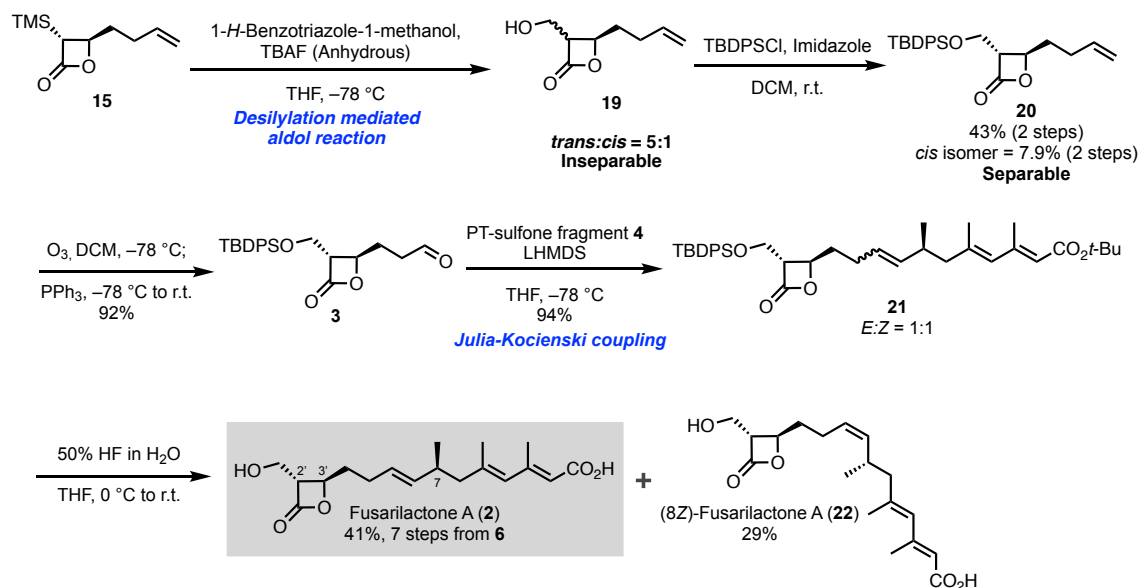
先に示した戦略に従って、**15** を TBACN と Hexafluorobenzene によって調製した脱水 TBAF·THF 溶液⁴⁰⁾で処理し、1*H*-Benzotriazole-1-methanol を作用させたところ、所望のヒドロキシメチル体 **19** を粗生成物の NMR 上にて *cis*-β-ラクトンとの混合物として確認することが出来た。しかしながら、本反応によって TMS 基の除去された **10** も観測され、また **19** は *cis* β-ラクトンおよび試薬の残渣との分離も困難であったことから、ショートカラムクロマトグラフィーにて簡易的に精製し、次の変換に用いることとした (Scheme 13)。

ヒドロキシメチル体 **19** を後のオゾン分解と Julia-Kocienski カップリングに付すには、副反応を誘発し得る第一級アルコールの保護が必要であると考えた。

そこで保護基を設定する際に、Chang らの **1** の全合成経路を参考に *t*-ブチルエステル基と一挙に脱保護することのできる TBDPS 基を用いることとした。加えて **19** は揮発性を示すため、分子量の高い保護基を導入することによってこの問題も解決することができると期待した。

先の合成にて取得したヒドロキシメチル体 **19** の粗生成物に対し TBDPSCI を作用させることでシリル化を行なった。得られた **20** はカラムクロマトグラフィーによる異性体の分離が可能であり、*trans*-β-ラクトンを単一の異性体として 2step, 43% の収率にて取得することができた。そして得られた **20** をオゾン分解の条件に付すことでアルデヒド

へと導き、**4** との Julia-Kocienski カップリングを試みたところ、本基質においても良好に反応は進行し 94%の収率にてカップリング体 **21** を得ることができた。しかしながら、得られた の *E/Z* 異性体混合物は、カラムクロマトグラフィーによる分離が困難であったことから、異性体混合物のままフッ化水素酸にて処理し、この段階で分離することにより、**2** の初の不斉全合成と **2** の *Z* 異性体の合成を達成した (Scheme 13)。



Scheme 13 Fusarilactone A (**2**)の初の不斉全合成

2-10. Fusarilactone A (**2**)における天然物と合成品の各機器データの比較

合成した **2** の ^1H NMR をはじめとする各機器データの値を以下に示す (Fig. 3, 詳細な機器データは、実験項を参照)。両化合物ともに非常に良い一致を示したことから、天然物の絶対立体構造は $2'R$ 、 $3'R$ 、 $7S$ であると決定した。

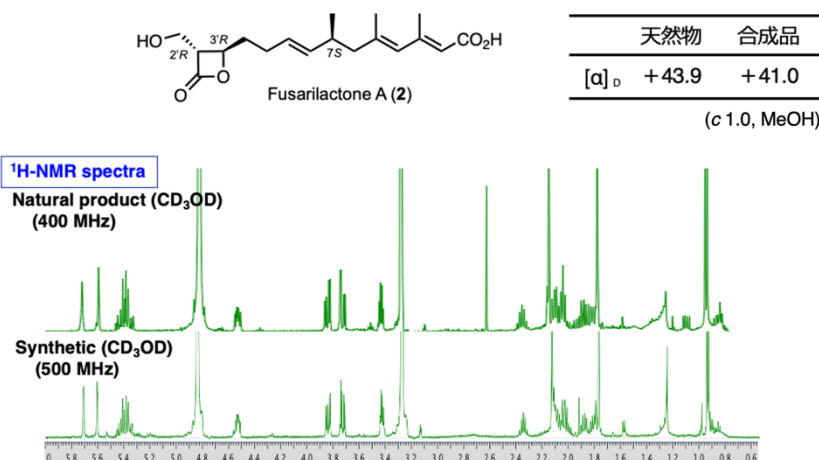


Fig. 3 Fusarilactone A (**2**)の天然物と合成品の ^1H NMRチャートと比旋光度の比較

2-11. Hymeglusin (1)の不斉全合成

2の不斉全合成経路の確立と絶対立体構造の決定ができたので、位置選択的な水素添加反応による1の取得を検討することとした (Table 4)。本反応において問題となり得るのが、2のカルボン酸に共役したジエン構造とC8-9位オレフィンにおける位置選択性の発現である。基質としては *syn* 付加にて還元反応が進行しやすい22を用いることとし、触媒の検討を行なった。Pd/Cを用いた検討においては水素ガスを作用させた条件において、目的のC8-9位に加えてジエン部位も還元された複雑な混合物を与える結果となり、水素源の当量を調節することのできるギ酸アンモニウムを用いた系においては、反応の進行が観測されなかった(Entry 1, 2)。一方でPdを被毒化したLindlar触媒においても同様にジエン部位の還元体が観測され、単一の1の取得には至らなかった。しかしながら、これら検討の中で唯一、Wilkinson触媒をベンゼン溶液中加熱条件下にて作用させたところ、望みの1を40%の収率 (brsm: 50%)にて得られる条件を見出すことができた。Wilkinson触媒は上記の検討において唯一、均一系触媒であることから基質の反応性を再現性よく制御できたものと考えられる。

Table 4 位置選択的な水素添加反応の検討

(8Z)-Fusarilactone A (22) $\xrightarrow{\text{Table}}$ Hymeglusin (1)
Chemoselective hydrogenation
8 steps from 6

Entry	Catalyst	Solvent	H ₂ Source	Results
1	Pd/C	THF	H ₂ gas	Over reduction
2	Pd/C	MeOH	Ammonium formate	No reaction
3	Lindlar's catalyst	THF	H ₂ gas	Over reduction
4	Wilkinson's catalyst	Benzene (70 °C)	H ₂ gas	40% (brsm = 50%)

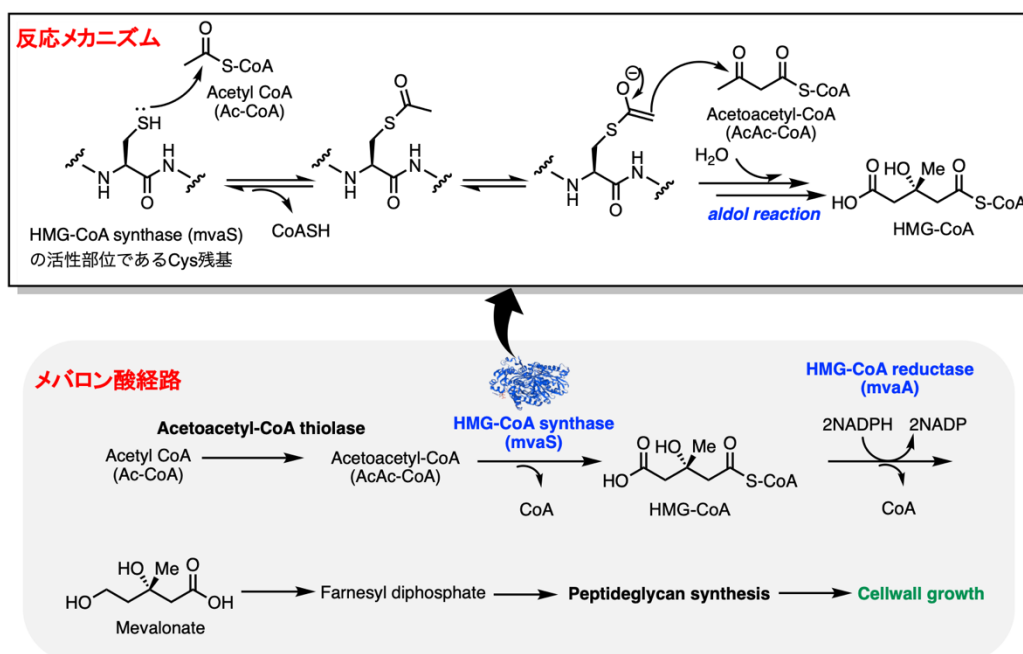
こうして、Hymeglusin (1)および Fusarilactone A (2)の不斉全合成経路が確立できたため、本研究の2つ目の課題であるMEPM増強活性における1の機能解明に着手することとした。

3-1. Hymeglusin (1)の既知の生物活性とメバロン酸経路における HMG-CoA synthase

Hymeglusin (1)および Fusarilactone A (2)の MEPM 併用薬剤としての作用機序を推定するにあたり筆者は、既に報告されている 1 の生物活性を参考にした。以下に、HMG-CoA synthase (mvaS)のメバロン酸経路における触媒メカニズムと 3 報の文献、(1)大村、供田らによって報告された哺乳類の HMG-CoA synthase 阻害活性における作用機序⁴²⁾、(2) Mizioro らによる乳酸菌 *E. faecalis* mvaS と 1 の X 線共結晶構造図⁴³⁾、(3)関水らによる *S. aureus* のペプチドグリカン合成における mvaA の役割⁴⁴⁾について記す。

(1)メバロン酸経路における HMG-CoA synthase (mvaS)の触媒メカニズム

メバロン酸はイソプレノイドの前駆体であり、多様な生体分子の構成成分となる。イソプレノイドの生合成経路は、メバロン酸が中間体となるメバロン酸経路、および非メバロン酸経路 (GAP-pyruvate 経路)の 2 つが知られている。*S. aureus* や、ヒトなど多くの動物は、メバロン酸経路だけを持つが、これらの生物においては、メバロン酸経路がイソプレノイド生合成の律速経路であり、様々な生体分子を生合成する上で必須な経路である。HMG-CoA synthase はこのメバロン酸経路において、Acetyl-CoA (Ac-CoA)と Acetoacetyl-CoA (AcAc-CoA)の aldol 反応を触媒し、3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA (HMG-CoA)の生成を行う。すなわち、HMG-CoA(mvaS)の活性部位である Cys 残基のチオールが Ac-CoA と反応し、CoA-SH の脱離を伴ってチオエステルを形成



Scheme 14 メバロン酸経路とHMG-CoA synthase (mvaS)の触媒反応メカニズム

する。このチオエステルに対し AcAc-CoA が求電子剤となり aldol 反応が起こること
で、HMG-CoA が生成する⁴⁵⁾ (Scheme 14)。

本触媒反応は Cys 残基のチオールが起点となるため、ヒト HMG-CoA synthase にお
いて Cys 残基を Ala、Ser へとポイントミューテーションを行ったリコンビナントタンパク
は酵素活性を失うことが確認されている。

なお、本反応によって生成した HMG-
CoA は NADPH を補酵素として HMG-
CoA reductase (mvaA) の触媒作用を受
け、メバロン酸へと還元される。なお、こ
の HMG-CoA reductase を薬剤標的と
した脂質異常症の治療薬はスタチン類
を代表として多く開発されている⁴⁶⁾

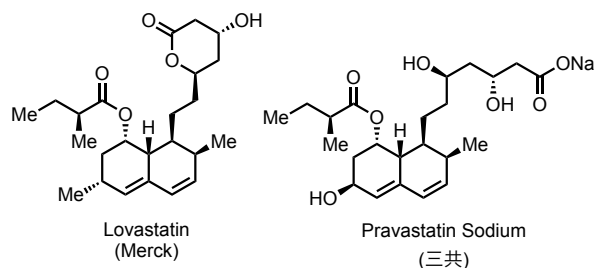


Fig. 4 代表的なスタチン類と製造企業

(Fig. 4)。

3-2. 大村、供田らによる哺乳類 HMG-CoA synthase 阻害活性とその結合サイト⁴²⁾

単離当初 **1** は、脂質合成の阻害剤探索スクリーニングにより見出され、¹⁴C でラベル化
した acetate と mevalonate をラット肝臓の酵素で処理する実験系から、薬剤標的は
Acetoacetyl CoA thiolase、HMG-CoA reductase、HMG-CoA synthase の 3 つに絞られ
た。さらに本論文で著者らはそれぞれのリコンビナントタンパクと **1** のアッセイにより、**1**
は HMG-CoA synthase のみを阻害し、他の 2 つには活性を示さないことを報告してい
る。

その後、Rokosz らによる実験⁴⁷⁾により **1** の阻害活性は可逆的であることが報告された
が、大村・供田らの実験によって **1** と HMG-CoA synthase は不可逆的に結合している
ことが示された。具体的には、**1** の産生菌である *Scopliariopsis* sp. F-244 に L-[¹⁴C or
³H-methyl]methionine (57 Ci/mol or 185 MBq/mol) を添加した培養条件にて [¹⁴C] or
[³H]-Hymegluslin を調製した。これをハムスター HMG-CoA synthase と共培養し V8
プロテアーゼで処理することによって、ペプチド断片を得た。そして得られたペプチド断
片を HPLC にて分画し解析することで、**1** は Cys¹²⁹ と結合していることを示している。

3-3. Miziorko らによる *E. faecalis* mvaS と Hymegluslin (**1**) の X 線共結晶構造図⁴³⁾

一方で Miziorko らはリコンビナント *E. faecalis* mvaS と **1** の動的パラメータや X 線共
結晶構造図を報告し、詳細な検証を行なっている。**1** はヒト、ハムスター、ラットなど哺
乳類における HMG-CoA synthase の阻害剤としての報告は多いものの、哺乳類の
HMG-CoA synthase と細菌の mvaS の相溶性は非常に低い (ex. *E. faecalis*: 27-
28%)。しかしながら、それぞれの酵素のアミノ酸配列を BLAST 検索すると、活性部位
である Cys 残基周辺のアミノ酸配列は高度に保存されており、同様の触媒作用を示

す。加えて **1** は *E. faecalis* や *C. albicans* などの抗菌活性が報告されていたが³⁸⁾、これが *mvaS* 阻害によるものかは知見がなかった。そこで Mizioroko らは、原核生物の過剰発現ベクター pT7HMT を用いて *E. coli* BL21 (DE3) に異種発現させリコンビナント *E. faecalis mvaS* を調製し、**1** とのアッセイおよび X 線共結晶構造図を取得した (Fig. 5)。はじめにリコンビナント *mvaS* と **1** の阻害率における動的パラメータを DTNB 法にて測定すると **1** は経時的に *mvaS* の酵素活性を阻害していることが明らかとなり ($K_{\text{inact}} = -1$ of 3.5 ± 0.6 min, $K_I = 700 \pm 18.5$ nM)、競合阻害剤である Hydroxamic acid を添加すると *mvaS* の酵素活性は回復した。なお、同様の実験をヒト HMG-CoA synthase に行うと *E. faecalis mvaS* と比較して **1** は 1/8 程度の酵素阻害活性を示した。次にリコンビナント *E. faecalis mvaS* と **1** の X 線共結晶構造図を解析したところ、**1** は酵素活性部位である Cys¹¹¹ とチオエステルを形成し、**1** の β -ラクトン環が開環した結果生じる第 2 級アルコールと共役カルボン酸部位がそれぞれ His²³⁹ と Glu⁷⁹ と水素結合する。特に His²³³ は *mvaS* の触媒作用において AcAc-CoA と水素結合を介して活性部位に基質を運搬する役割を有していることから重要なアミノ酸残基の一つである。そして特筆すべき点としては、*E. faecalis mvaS* のトンネル状のキャビティと **1** の接触面積は 381.4 Å² であり、これは **1** が酵素内で占めることの面積値の 84% に相当する。この親和性の高さが **1** に強力な酵素阻害活性をもたらしていると考えられる。

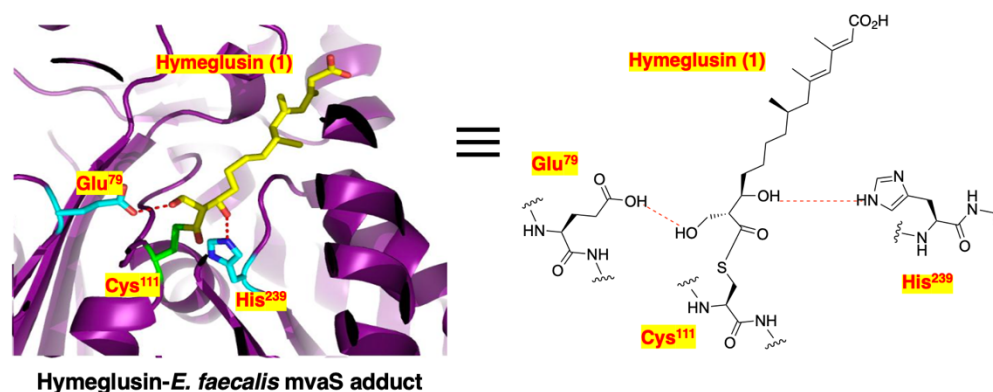


Fig. 5 *E. faecalis mvaS* と Hymeglusins (1) の X 線共結晶構造図

3-4. 関水らの *S. aureus* における *mvaA* の役割の検証⁴⁴⁾

関水らは、遺伝子破壊実験により、*S. aureus* の *mvaA* 遺伝子は増殖に必要な因子であることが示されていることから、その役割を *S. aureus* 温度感受性変異株とそのミュータントを調製し、機能を検証している。

HMG-CoA reductase (*mvaA*) はメバロン酸経路の律速酵素であり、HMG-CoA を還元してメバロン酸を合成する反応を触媒する。病原性細菌である *S. aureus* においては、*mvaA* 遺伝子が、HMG-CoA reductase の機能を担う *mvaA* タンパクをコードする遺伝

子として存在する。よって、*mvaA* は *S. aureus* に対する抗菌治療薬の標的分子の有力な候補である。しかしながら、*mvaA* 遺伝子の変異株を用いた遺伝学的解析の報告はなく、メバロン酸およびその代謝産物であるイソプレノイドが、*S. aureus* の増殖に必須なメカニズムは明らかではなかった。一方で温度感受性変異株は、アミノ酸配列の変異を調べることにより、酵素の三次元構造を決定づける重要な位置を検証することができることから、酵素機能を検証するうえで有用な実験株である。

そこで関水らは、3 株の *S. aureus* 温度感受性変異株を用いて *mvaA* 遺伝子を解析したところ、M77I、A335V、C366Y の 3 箇所においてアミノ酸変異を起こす一塩基変異を見出した。その中でも特に Met⁷⁷ は、HMG-CoA と相互作用する三次元立体構造解析から必須アミノ酸ではないことが知られている。一方で、HMG-CoA を還元することによって得られるメバロン酸は Farnesyl diphosphate へと変換され、細胞壁合成に関与するペプチドグリカンへ導かれる。そこで M77I 変異株において放射性同位体標識した GlcNAc の取り込み能を検証したところ、野生株と比較してペプチドグリカンの生成が減弱していたことから、*mvaA* によって供給されたメバロン酸がペプチドグリカンの合成に必須であることが示された。

3-5. *S. aureus* における Hymeglusin (1) の作用機序の推定

以上に述べてきた 3 報はそれぞれ、多くの生物種において共通して保存された HMG-CoA synthase (*mvaS*)、HMG-CoA reductase (*mvaA*) と Hymeglusin (1) の関係性を強く示唆するものである。そこで、これらの報告から導かれる 1 の MEPM 増強効果の作用機序として“MRSA (*S. aureus*) *mvaS* を阻害するとメバロン酸経路において下流に存在する *mvaA* が阻害され、細胞壁合成が阻害される”という仮説を立てることができる。一方で本仮説を証明する上での必要条件は MRSA (*S. aureus*) *mvaS* に対し 1 が阻害活性を示さねばならない。しかしながら、同じく細菌でもラット、*E. faecalis* と *S. aureus* における *mvaS* の相同性はそれぞれ 28%、60% と低い (NCBI (National Center for Biotechnology Information) 公開情報より)。

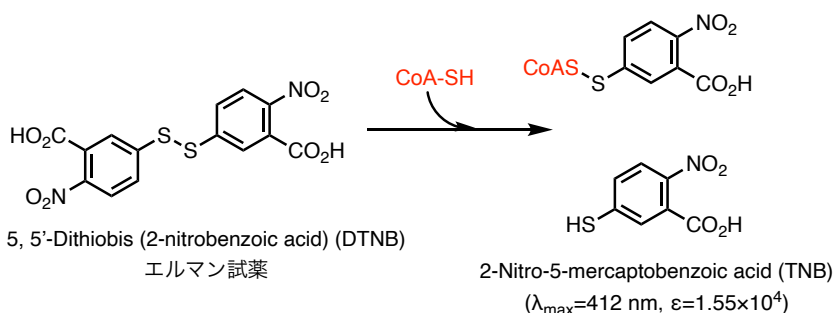
そこで、我々はケミカルバイオロジー的手法にて、分子レベル、菌体内における 1 と MRSA *mvaS* の相互作用を検証することとした。

3-6. DTNB 法を用いた Hymeglusin (1) とリコンビナント MRSA *mvaS* の相互作用の検証

はじめに 1 と MRSA *mvaS* の分子レベルでの相互作用を検証すべくリコンビナント MRSA *mvaS* の結合を DTNB 法にて評価を行った (Fig. 6)。

リコンビナント MRSA *mvaS* は、臨床分離 MRSA KUB2750 株の *mvaS* をコードする whole ゲノムを組み込んだベクター pDEST17 を *E. coli* HST08 に形質転換し調製したプラスミドを *E. coli* BL21-A I に導入して得た。

DTNB 法とは Mizioroko らによって報告されたメバロン酸経路における HMG-CoA synthase (mvaS)の酵素活性をエルマン試薬と呼ばれる DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid))分子を用いて評価する手法である⁴⁸⁾。HMG-CoA synthase (mvaS)は Ac-CoA と AcAc-CoA の aldol 反応を触媒するが、その副生物として CoA-SH が生成する。このチオールは DTNB 分子のジスルフィドと反応することによって TNB (5-Mercapto-2-nitrobenzoic acid)分子を生成することから、この TNB 分子の吸光度 ($\lambda_{\max}=412\text{ nm}$ 、 $\varepsilon=1.55\times10^4$)を測定する (Scheme 15)。



Scheme 15 DTNB法の測定原理

そこでリコンビナント MRSA mvaS と Ac-CoA、AcAc-CoA、DTNB が含まれる反応系に **1** を各濃度(0.015, 0.15, 1.52, 15.2 $\mu\text{g/mL}$)にてインキュベートし、TNB 分子の吸光度を測定した (Fig. 6)。また、 β -ラクトン環の重要性を検証するため、同様の実験をメチルエステル体 **23** を用いて行った。その結果、**1** はコントロールと比較して濃度依存的にリコンビナント MRSA mvaS の酵素活性を阻害し、**23** は酵素活性をほぼ阻害しなかったことから、**1** は分子スケールにおいてリコンビナント MRSA mvaS を阻害することが明らかとなった。また、その活性発現においては β -ラクトン環の重要性が示唆された。

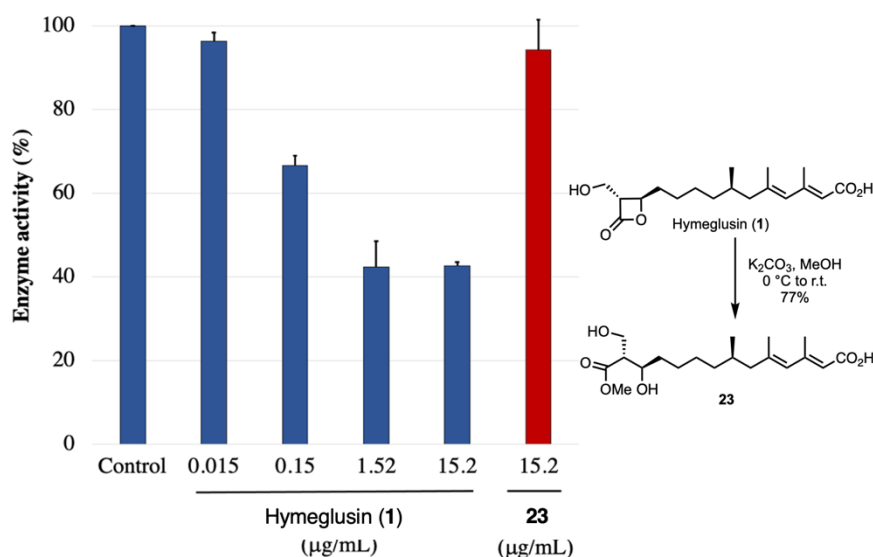


Fig. 6 DTNB法を用いたリコンビナントMRSA mvaSの酵素アッセイ
 (data are presented as the means \pm standard deviations from at least three independent experiments.)

3-7. *S. aureus* ミュータントを用いた菌体内における Hymeglusin (1) の相互作用の検証

DTNB 法による分子スケールでの Hymeglusin (1) の結合が確認できた為、次なる検証として *S. aureus* 菌体内における 1 の作用を検証することとした。

実験株 *S. aureus* RN4220 株と MRSA mvaS 過剰発現株、活性部位である Cys¹¹¹ において、求核性を欠いた Ala¹¹¹ へとポイントミューテーションを行った MRSA mvaS C111A 過剰発現株の 3 株を用いて 1 の単剤によるアッセイを行った。

各ミュータントは、臨床分離 MRSA KUB2750 株の mvaS 遺伝子を組み込んだベクター pMD20 を *E. coli* HST08 に異種発現させ、Miniprep 法によって得たプラスミドを再度シャトルベクター pND-50⁴⁹⁾ に組み込み、実験株 *S. aureus* RN4220 株に導入することで調製した。

予想されるアッセイの結果としては、1 が MRSA mvaS を阻害する場合、*S. aureus* RN4220 株 wild type に対し、抗菌活性が観測されるはずである (Fig. 7)。一方で MRSA mvaS 過剰発現株において 1 は、過剰発現したタンパクに消費され wild type と比較して抗菌活性が減弱することが予測される。さらに Cys¹¹¹ が 1 の結合サイトであった場合、MRSA mvaS C111A 過剰発現株において 1 は消費されることなく、*S. aureus* が本来発現している mvaS を阻害することで抗菌活性が観測される。

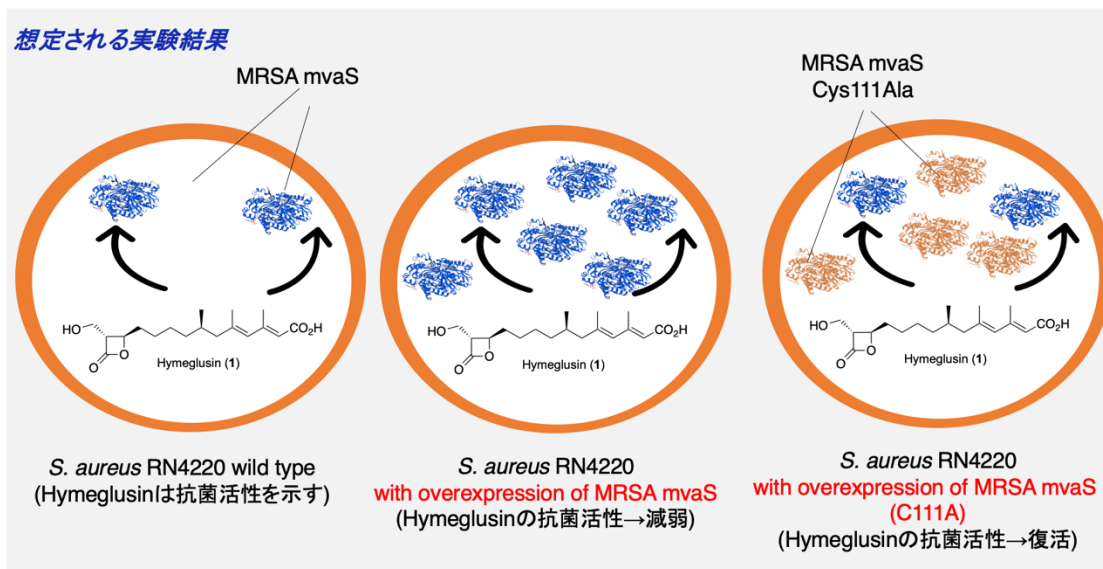


Fig. 7 *S. aureus* ミュータントにおけるアッセイ結果の予想

そこで先に示した予想のもとアッセイを実施したところ、1 は *S. aureus* RN4200 株 wild type に対して抗菌活性を示したのに対し (MIC = 0.125 μ g/mL)、MRSA mvaS 過剰発現株においては、抗菌活性が 128 倍減弱する (MIC = 32 μ g/mL) ことが明らかとなった。加えて、C111A ミュータントにおいては 1 の抗菌活性を観測したことから (MIC

= 0.0125 μ g/mL)、我々の想定した実験結果と一致し、MRSA mvaS と **1** は *S. aureus* 菌体内においても結合し、かつその結合サイトは Cys¹¹¹であることが示唆された⁵⁰⁾。

Table 8 *S. aureus* ミュータントにおけるHymeglusin (1)のアッセイ

Strain	MIC (μ g/mL)	
	MEPM	Hymeglusin (1)
<i>S. aureus</i> RN 4220 wild type	0.015	0.25
<i>S. aureus</i> RN 4220 with overexpression of MRSA mvaS	0.015	32
<i>S. aureus</i> RN 4220 with overexpression of MRSA mvaS /Cys111Ala	0.015	0.0125-0.063

小括

筆者は新規 MEPM 併用薬の開発を目指し、大村智記念研究所において見出された Hymeglusin (**1**)、Fusarilactone A (**2**)を標的に全合成研究とケミカルバイオロジー的手法による新規活性における作用機序の提唱を行った。

1と**2**はそれぞれ、市販試薬を出発原料として Julia-Kocienski カップリングを鍵反応とした 7 工程、8 工程の効率的な不斉全合成経路を確立し、**2**に関しては初の不斉全合成に伴い絶対立体構造を決定した。

一方で作用機序の推定に関しては、既知の報告を参考に作用機序仮説を立てリコンビナント MRSA *mvaS* を用いた DTNB 法と *S. aureus* ミュータントによる **1** のアッセイで分子スケール、菌体内スケールでの相互作用を証明した。

今後、筆者が確立した不斉全合成経路と作用機序における知見をもとに、MRSA における新規 MEPM 併用薬が開発されることが期待される。

ドラッグデザインとしては、本論でも述べたように **1** の薬剤標的である MRSA *mvaS* とラットの HMG-CoA synthase のホモロジーは 28%と低いため、この差異を考慮した選択的な誘導化が可能であると考えられる。具体的には、ファーマコフォアである *trans*- β -ラクトン環は保持したまま α 位、 β 位の官能基変換が考えられる。また一方で、**1** はマウスを用いた *in vivo* 試験において血中安定性が低く、これは β -ラクトン環が容易に加水分解される不安定性に起因するものと考えられる。そこで、 β -ラクトン環をより反応性の低い β -ラクタム環へと変換した誘導体なども有効であると考えられる。

参考文献

- 1) *Tackling Drug-resistant Infections globally: Final report and recommendation*, **2016**.
- 2) 山口哲央, 日本化学療法学会雑誌, **2019**, 67, 567.
- 3) 前崎繁文, 日救急医学会誌, **2010**, 21, 51.
- 4) MRSA 感染症の治療ガイドライン, **2019**, 2. “MRSA の疫学と感受性”より引用
- 5) 公開情報 2017 年 厚生労働省院内感染症サーベイランス
- 6) 河野茂, MRSA-基礎・臨床・対策- 医療ジャーナル社 (2006)
- 7) M. P. Jevons, *Br Med J*. **1961**, 5219, 124.
- 8) 日本 BD “ β -ラクタマーゼについて”より引用。
<https://www.bdj.co.jp/micro/articles/1f3pro00000rwl1f.html>
- 9) 片山由紀, 生化学, **2016**, 88, 386.
- 10) 石井良和, 日本化学療法学会雑誌, **2011**, 59, 454.
- 11) *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, **2002**, 51, 565–567.
- 12) 大村智, 日本細菌学雑誌, **1999**, 54, 795.
- 13) C. Reading, M. Cole, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1977**, 11, 852.
- 14) A., Fukumoto, Y., Kim, M., Iwatsuki, T., Hirose, T., Sunazuka, H., Hanaki, S., Ōmura and K., Shiomi, *J. Antibiot.*, **2017**, 70, 568.
- 15) A. Fukumoto, Y. Kim, A. Matsumoto, Y. Takahashi, K. Shiomi, H., Tomoda, S., Ōmura, *J. Antibiot.*, **2008**, 61, 1.
- 16) 池田治生, 化学と生物, **2016**, 54, 17.
- 17) 岩井譲, 化学と生物, **2016**, 54, 7.
- 18) D. J. Newmann, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.*, **2020**, 83, 770.
- 19) J.Y. Ortholand, A. Ganesan, *Curr Opin Chem Biol.*, **2004**, 8:271-280.
- 20) 江口修平, 2018 年度 北里大学大学院感染制御科学府 修士論文
- 21) S. Ōmura H. Tomoda, H. Kumagai, *J. Antibiot.*, **1987**, 40, 1356.
- 22) X. Tang, X. Yan, W. Fu, L. Yi B. Tang, L. Yu, M. Fang, Z. Wu and Y. Qiu, *J. Agric. Food Chem.*, **2019**, 67, 2877.
- 23) M. J. Hall, R. F. Middleton, D. Westmacott, *J. Antimicrob. Chemother.*, **1983**, 11, 427.
- 24) D. C. Aldridge, S. Galt, D. Giles, W.B. Turner, *J. Chem. Soc. C.*, **1971**, 23, 3888.
- 25) M. D. Greenspan, J. B. Yudkovitz, L. Chia-Yee, J. S. Chen, A. W. Alberts, V. M. Hunt, M. N. Chang, S. S. YANG, K. L. Thompson, Y. P., Chiang, J. C. Chavala, R. L. Monaghan and R.L. Schwartz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, 84, 7488.

- 26) P. Yuan-Ching Chiang, S. S. Yang, V. J. Heck, J. C. Chabala, and M. N. Chang, *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 5708.
- 27) B. W. Dymock, P. J. Kocienski, J. M. Pons, *Synthesis*, **1998**, *11*, 1665.
- 28) R. Bates, E. Fernabdez-Megia, S. Ley, K. Ruck-Braun and M. D. Tilbrook, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1999**, *1*, 1917.
- 29) P. M. Wovkulich, K. Shankaran, J. Kiegiel, M. R. Uskokovic, *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 832.
- 30) O. Dirat, C. Kouklovsky, Y. Langlois, *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 6634.
- 31) G. Guanti, L. Banfi, G. Schmid, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 4239.
- 32) C. Zhu, S. Xiaoqiang, S. G. Nelson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 5352.
- 33) S. V. Ley, N. J. Anthony, A. Armstrong, M. G. Brasca, T. Clarke, D. Culshaw, C. Greek, P. Grice, A. B. Jones, B. Lygo, A. Madin, R. N. Sheppard, A. Slawin and D. J. Williams, *Tetrahedron*, **1989**, *45*, 7161.
- 34) T. Kull and R. Peters, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 5461.
- 35) A. Griesbeck, D. Seebach, *Helvetica Chimica Acta*, **1987**, *70*, 1320.
- 36) A. Pommier, J.-M. Pons, *Synthesis*, **1993**, *5*, 441.
- 37) T. Takahashi, H. Watanabe, T. Kitahara, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 9219.
- 38) G. Sakaine, Z. Leitis, R. Ločmele, G. Smits, *Eur. J. Org. Chem.*, **2022**, accepted.
- 39) D. P. Cox, J. Terpinski, W. Lawrynnowicz, *J. Org. Chem.*, **1984**, *49*, 3216.
- 40) H. Sun, S. G. DiMagno, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 2050.
- 41) G. Deguest, L. Bischoff, C. Fruit, and F. Marsais, *Org. Lett.*, **2007**, *9*, 1165.
- 42) H. Tomoda, N. Ohbayashi, Y. Morikawa, H. Kumagai, S. Ōmura, *Biochim. Biophys. Acta*, **2004**, *1636*, 22-28.
- 43) D. A. Skaff, K. X. Ramyar, J. McWhorter, M. L. Barta, B. V. Geisbrecht and H. M. Mizioro, *Biochemistry*, **2012**, *51*, 4713.
- 44) Y. Matsumoto, J. Yasukawa, M. Ishii, Y. Hayashi, S. Miyazaki, K. Sekimizu, *Sci. Rep.*, **2016**, 22894-22908.
- 45) M. J. Theisen, I. Misra, D. Saadat, and D. H. T. Harrison, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2004**, *101*, 16442.
- 46) S. Ramkumar, A. Raghunath, S. Raghunath, *Acta Cardiol Sin.*, **2016**, *32*, 631.
- 47) P. L. Holmans, Shet M. S., Martinwixtrom C.A., Fisher C.W., Estabrook R.W. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1994**, *312*, 1.
- 48) D. A. Skaff, H. M. Mizioro, *Anal. Biochem.*, **2010**, *396*, 96.
- 49) C. Kaito, Y. Saito, G. Nagano, M. Ikuo, Y. Omae, Y. Hanada, X. Han, K. Kuwahara-Arai, T. Hishinuma, T. Baba, T. Ito, Keiichi H, K. Sekimizu, *PLoS Pathog.*, **2011**, *7*, e1001267.

50) M. Kanaida, A. Kimishima, S. Eguchi, M. Iwatsuki, Y. Watanabe, M. Honsho, T. Hirose, Y. Noguchi, K. Nonaka, G. Sennari, H. Matsui, C. Kaito, H. Hanaki, Y. Asami, T. Sunazuka, *ChemMedChem*, **2021**, *16*, 2106.

実験の部

1. General methods

To carry out the assay by paper disc method for our screening program, the mediums and reagents were purchased from the suppliers described as follows; Difco Muller-Hinton broth (Becton Dickinson Co. Ltd.), LB-Medium (Funakoshi Co. Ltd.), chloramphenicol (Sigma-Aldrich Co. LLC), ethanol (EtOH, FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. Ltd.), Difco Muller-Hinton Agar (Becton Dickinson Co. Ltd.), TAIYO-AGAR (Shimizu Shokuhin Kaisya Ltd.), 6 mm paper disc (Toyo Roshi Kaisha Ltd.), plate (10-14 cm, Eiken Kizai), meropenem trihydrate (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. Ltd.), dimethylsulfoxide (DMSO, for Biochemistry, FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. Ltd.). The turbidity of the broth was measured by densitometer DEN-1B (Wakenbtech. Co. Ltd.) and the broth was stored in Caplugs Evergreen (BM Equipment Co. Ltd., cat No. 222-2094-050). Purification of compounds were performed with ODS gel (YMC Co. Ltd.) and HPLC Pegasil ODS SP100 column, 20 i.d. × 250 mm (Senshu Scientific Co. Ltd.). In organic syntheses, all of anhydrous solvents; tetrahydrofuran (THF), dimethylformamide (DMF), toluene (PhMe), methylenedichloride (DCM), methanol (MeOH), ethanol (EtOH), benzene (PhH) were purchased from Kanto Chemical Co. Inc.. Reagents were purchased from the company of Tokyo Chemical Industry Co. Ltd. (TCI), Kanto Chemical Co. Inc., Sigma-Aldrich Co. LLC, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Thermo Fisher Scientific at the highest commercial quality and used without further purification respectively.

Precoated silica gel plates with fluorescent indicator (Merck 60 F₂₅₄) were used for analytical and preparative chromatography which was carried out with Kanto Chemical silica gel (40-50 mm, 60N, spherical neutral, 0.040-0.050 mm, Cat. No. 37563-84) or Merck Millipore silica gel (0.040-0.63 mm, 60N, for column chromatography 230-400 mesh ASTM, CAS. No. 7631-86-9).

¹H and ¹³C NMR spectra were measured on JEOL JNM-ECA 500 (500 MHz) and JEOL JNM-ECA 500 (125 MHz) respectively. Chemical shifts are expressed in ppm downfield from the internal solvent peaks for CDCl₃ (¹H; δ = 7.26 ppm, ¹³C; δ = 77.16 ppm), CD₃OD (¹H; δ = 3.31 ppm, 4.84 ppm ¹³C; δ = 49.0 ppm), DMSO-*d*₆ (¹H; δ = 2.50 ppm, ¹³C; δ = 39.5 ppm) and *J* values were given in Hertz. Abbreviations for multiplicity are as follows, app indicates apparent, br indicates broad, d indicates doublet, t indicates triplet, q indicates quartet, m indicates multiplet. IR spectra were obtained on Horiba FT-710 spectrometer. High-and-Low resolution mass spectroscopy data were measured on JEOL JMS-T100LP and JEOL HMS-700 MStation. Optical rotations were measured with a Jasco P-1010 polarimeter. CD spectra were recorded on a JASCO J-720 spectropolarimeter (JASCO Co.) with a quartz cell (light path length: 10 mm) and Analytical High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was conducted by an Elite Lachrome system (Hitachi Ltd.).

In a series of biological experiments, the reagents were purchased from the suppliers described as follows, acetoacetyl-CoA (Sigma-Aldrich Co. LLC), 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB, TCI), Ni-NTA-Agarose column (QIAGEN Ltd.), glucose (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. Ltd.), yeast extract (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. Ltd.), MgSO₄·7H₂O (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. Ltd.), polypeptone (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. Ltd.), ULTRA Tablets, Mini, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail Tablets cOmplete™ (Sigma-Aldrich Co. LLC), Proteinase K (Takara Bio Inc.). *Escherichia coli* strain BL21, HST08 and T-vector-pMD20 were obtained from Takara Bio Inc., pDEST17 vector and pDONR-201 obtained from Thermo Fisher Scientific™ Inc. Plasmid pND-50 is a shuttle vector.

2. Experimental procedures

2-1. Screening and isolation

Screening program to discover a new circumventors of β-lactam drug resistance by MRSA

Based on our previous reports,^[1] we have conducted the screening program for new circumventor and screened 7,225 samples of microbial secondary metabolites which are from fungus and actinomycete. The paper disc method was described as follows. One loopful strain of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) KUB 2750 was incubated in 3 mL of Difco Mueller Hinton broth on a rotary shaker at 37 °C for 20 h. The culture broth was poured into Difco Mueller Hinton agar and adjusted to 2% volume at 50 °C. 30 mL of the culture was transferred to a 10-14 cm plate and each plate were prepared with or without MEPM (adjusted to 1 µg/mL) whose concentration has no effect on the growth of MRSA. 6 mm paper discs containing a microbial culture broth were placed on the plate and incubated at 37 °C overnight. Circumventing effect of β-lactam drug resistance were expressed as a diameter (mm) of inhibition zone.

As a result, hymeglusins (**1**) and fusarilactone A (**2**) were isolated from the culture broth of *Fusarium falciforme* FKI-8363 strain and found to show the circumventing effect toward β-lactam drug resistance by MRSA (Table S1).

Table S1. A comparison of single and combination treatment with MEPM and hymeglusins using a paper disc method

µg/disc	Inhibition zone (mm)/6 mm disc			
	hymeglusins		fusarilactone A	
	MEPM (+)	MEPM (-)	MEPM (+)	MEPM (-)
30	25	19	15	11
10	23	17	11	–
3	20	–	–	–
1	17	–	–	–
0.3	11	–	–	–
0.1	9	–	–	–
0.03	–	–	–	–

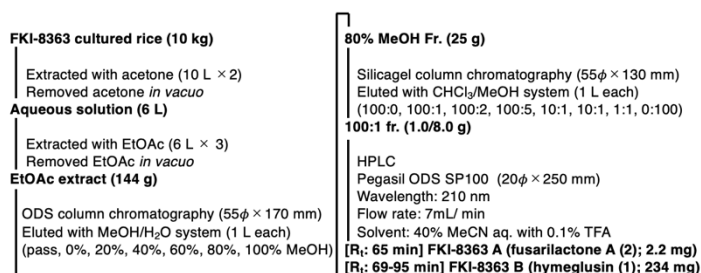
MEPM (+): 1 µg/mL, MEPM (-): None, –: No inhibition.

Fermentation

One loopful of strain FKI-8363 grown on an LcA slant (0.1% glycerol, 0.08% KH_2PO_4 , 0.02% K_2HPO_4 , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02% KCl, 0.2% NaNO_3 , and 1.5% agar, pH 6.0) was inoculated into a 500 mL-Erlenmeyer flask containing 100 mL of a seed culture medium (2.0% glucose, 0.2% yeast extract, 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5% polypeptone, 0.1% KH_2PO_4 , and 0.1% agar, pH 6.0) and incubated on a rotary shaker at 27 °C for 3 days. 50 mL of the seed culture was inoculated into each of 10 culture bags containing a production medium (10 kg of water-sodden rice). Static fermentation was continued at 25 °C for 13 days.

Isolation and identification of hymeglusin (1) and fusarilactone A (2)

Isolation of **1** and **2** was executed referring to the scheme 1. The stationary culture was extracted with acetone (20 L) and the extracts were filtrated. The filtrate was concentrated *in vacuo* to remove acetone. The remaining aqueous solution (6 L) was extracted three times with an equal volume of EtOAc (total 18 L). The organic layer was concentrated to dryness to afford crude extracts (144 g). The extracts were applied to an ODS gel column (55 i.d. × 170 mm) and eluted stepwise with a mixture of MeOH/H₂O (pass, 0:100, 20:80, 40:60, 60:40, 80:20 and 100:0). The 80:20 fraction was concentrated to dryness to afford a crude residue (25 g). The residue was chromatographed on a silica gel column (55 i.d. × 170 mm) and eluted stepwise with a mixture of $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (100:0, 100:1, 100:2, 100:5, 10:1, 1:1 and 0:100). The active fraction (100:1) was concentrated *in vacuo* to remove the organic solvents. Finally, the concentrated materials (1.0/8.0 g) were applied to an HPLC (Pegasil ODS SP100 (20 i.d. × 250 mm) with an isocratic solvent system of 40% acetonitrile/H₂O with 0.1% trifluoroacetic acid solution at a flow rate of 7 mL min⁻¹) to give hymeglusin (**1**) (R_t = 69-95 min, 234 mg) and fusarilactone A (**2**) (R_t = 65 min, 2.2 mg) (Figure 1).



Scheme S1. Isolation protocol of hymeglusin (**1**) and fusarilactone A (**2**).

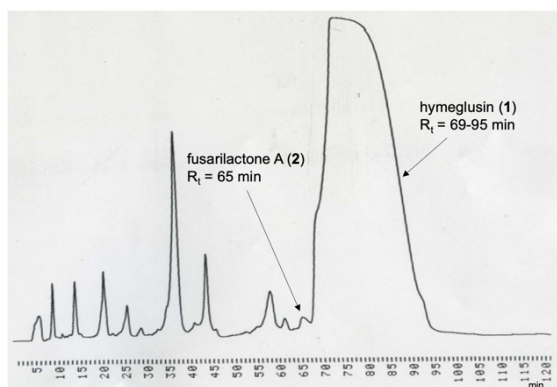


Figure S1. A chromatogram of HPLC separation.

Physical data comparisons of reported natural products with our measurement

Table S2. A comparison of the NMR spectra of Hymeglusin (1) determined from FKI-8363 B

Position	¹³ C		¹ H	
	Reported (CDCl ₃) ^[2]	Measurement (CDCl ₃ , CD ₃ OD)	Reported (CDCl ₃) ^[2]	Measurement (CDCl ₃ , CD ₃ OD)
1	169.6	170.2, 171.9	-	-
2	116.5	116.6, 118.7	5.69	5.68, 5.64
3	157.0	156.9, 155.6	-	-
4	129.5	129.4, 130.6	5.73	5.72, 5.76
5	142.0	142.0, 142.2	-	-
6	-	48.9, 49.9	1.85, 2.10	(1.88, 2.07), (1.70, 1.88)
7	-	36.4, 37.7	-	-, 2.11
8	-	30.8, 32.0	1.13, 1.33	(1.13, 1.33), (1.15, 1.34)
9	25.2 or 26.6	26.5, 26.3	-	-, 1.44
10	25.2 or 26.6	25.0, 27.7	-	-, 2.12
11	-	33.7, 34.9	1.93	1.92, 1.91
12	-	58.4, 59.9	4.60	4.58, 4.55
13	74.9	75.0, 76.3	3.35	3.42, 3.46
14	170.9	171.7, 170.3	-	-
15	-	57.5, 58.0	3.88, 4.08	(3.88, 4.08), (3.76, 3.89)
16	19.4 or 20.0	19.2, 18.6	0.82	0.83, 0.86
17	18.5	18.4, 18.4	1.82	1.81, 1.81
18	19.4 or 20.0	19.8, 19.9	2.25	2.24, 2.20

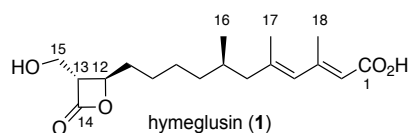


Figure S2. Structure of natural hymeglusin (1) and its numbering of C atom.

Table S3. A comparison of the NMR spectra of Fusarilactone A (2) determined from FKI-8363 A.

Position	¹³ C		¹ H	
	Reported (DMSO- <i>d</i> ₆) ^[3]	Measurement value (CD ₃ OD)	Reported (DMSO- <i>d</i> ₆) ^[3]	Measurement value (CD ₃ OD)
1	168.6	170.4	No Data	-
2	119.2	118.8	5.55	5.62
3	152.4	155.7	-	-
4	129.9	130.9	5.71	5.75
5	140.4	141.8	-	-
6	48.5	49.3	1.98, 2.02	2.08
7	34.6	36.3	2.33	2.39
8	136.8	138.2	5.34	5.36
9	127.1	128.1	5.40	5.44
10	28.0	29.2	2.04	2.12
11	33.6	35.1	1.78, 1.85	1.86, 1.94
12	74.3	75.8	4.52	4.55
13	58.7	60.0	3.51	3.46
14	170.8	171.8	-	-
15	56.6	58.0	3.61, 3.71	3.76, 3.87
16	20.4	20.8	0.91	0.92
17	18.7	18.6	1.76	1.81
18	19.5	19.8	2.13	2.18

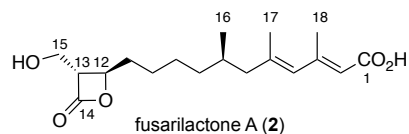


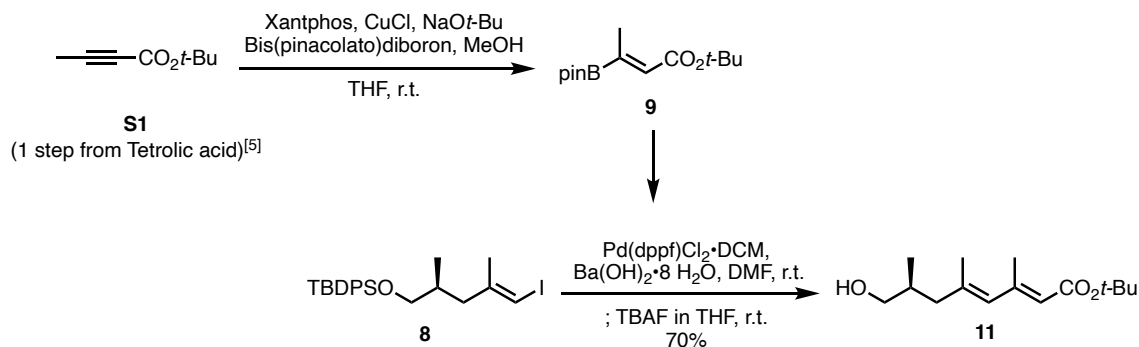
Figure S3. Structure of natural Fusarilactone A (2) and its numbering of C atom

2-2. Total syntheses

Experimental procedures and spectra data

Compound 6

(Note: Vinyl iodide **6** was prepared from (*R*)-Roche ester according to S. Ley's protocol.^[4] They used (*S*)-Roche ester in their synthesis, the all of our experiments performed the same yield of their report in 49% yield over 5 steps and (*S*)-**7** indicated opposite sign of optical rotation of (*R*)-**7**. (*S*)-**7**; $[\alpha]_D^{21} = -4.8$, (*R*)-**7**; $[\alpha]_D^{20} = +1.1$ ^[4] ($c = 4.5$, in CHCl_3 respectively).



Compound 11

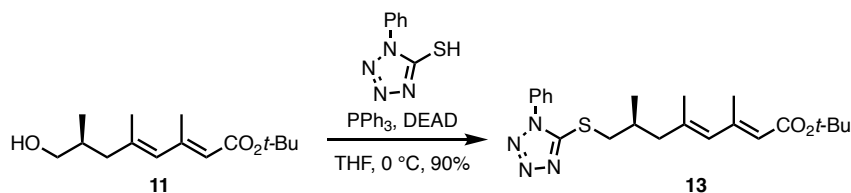
To a stirred solution of CuCl (1.0 mg, 0.01 mmol) and Xantphos (5.2 mg, 0.009 mmol) in THF (2 mL) was slowly added Sodium *tert*-butoxide solution (2.0 M in THF, 9.0 mL, 0.018 mmol) at room temperature under N_2 atmosphere. After stirring for 30 min, Bis(pinacolato)diboron (76 mg, 0.3 mmol) in THF (0.5 mL) was added and stirred for further 10 min. The solution of **S1** (37 mg, 0.3 mmol) in THF (0.5 mL) and MeOH (24 mL, 0.6 mmol) were added sequentially. After stirring for 1 h, the reaction mixture was filtrated through a pad of Celite®. The filtrate was washed with brine (10 mL) and extracted with hexanes (20 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford the crude product **7**, which was used in the next reaction without further purification.

To a stirred solution of **8** (44 mg, 0.1 mmol) in DMF (1 mL) was added a solution of crude **9** in DMF (1 mL), $\text{Ba(OH)}_2\cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (47 mg, 0.15 mmol), $\text{Pd(dppf)Cl}_2\cdot\text{DCM}$ (11 mg, 0.013 mmol) sequentially at room temperature under N_2 atmosphere. After stirring for 1 h, the reaction mixture was cooled to 0°C . Tetrabutylammonium Fluoride (TBAF) solution (ca. 1.0 M in THF, 0.3 mL, 0.3 mmol) was added to the reaction mixture and the mixture was stirred for further 2 h at room temperature. The resulting mixture was washed with brine (10 mL) and extracted with EtOAc (7 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The crude residue was purified by silica gel chromatography (10% EtOAc in hexanes) to afford **11** (18 mg, 70%) as a colorless oil.

(Note; Compound **S1** was prepared according to the known procedure.^[5])

Compound 11

Rf = 0.19 (hexanes: EtOAc = 6:1). $[\alpha]_D^{22} = -4.8$ ($c = 0.1$, in MeOH). **¹H NMR (500 MHz, CDCl_3)**: δ (ppm) 5.71 (s, 1H), 5.58 (s, 1H), 3.50 (dd, $J = 10.9, 5.7$ Hz, 1H), 3.45 (dd, $J = 10.9, 5.2$ Hz, 1H), 2.20 (dd, $J = 11.5, 5.2$ Hz, 1H), 2.19 (s, 3H), 1.92-1.83 (complex m, 2H), 1.82 (s, 3H), 1.48 (s, 9H), 0.89 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H). **¹³C NMR (125 MHz, CDCl_3)**: δ (ppm) 166.8, 152.6, 139.9, 130.0, 119.7, 79.8, 68.2, 45.2, 34.0, 28.4, 19.5, 18.5, 16.6. **IR (neat) ν_{max} (cm^{-1})**: 2927, 1705, 1620, 1454, 1390, 1366, 1331, 1239, 1136, 1039, 984, 886, 868, 802. **HRMS (FAB) m/z** calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 277.1780, found: 277.1772.



Compound 13

To a stirred solution of **11** (57 mg, 0.22 mmol) in THF (2.2 mL) was added PPh_3 (147 mg, 0.56 mmol), thiol (80 mg, 0.45 mmol), diethyl azodicarboxylate (DEAD, 2.2 M in PhMe, 0.25 mL, 0.56 mmol) sequentially at 0°C under N_2 atmosphere. After stirring for 1 h, the reaction mixture was diluted with EtOAc (10 mL) and sat. aq. NaHCO_3 (7 mL) was added. The resulting mixture was extracted with EtOAc (10 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The crude residue was purified by silica gel chromatography (10% EtOAc in hexanes) to afford **13** (82 mg, 90%) as a colorless slurry oil.

Compound 13

Rf = 0.42 (hexanes: EtOAc = 3:1). $[\alpha]_D^{23} = +60.9$ ($c = 0.1$, in MeOH) **¹H NMR (500 MHz, CDCl_3)**: δ (ppm) 7.58-7.52 (complex m, 5H), 5.72 (s, 1H), 5.58 (s, 1H), 3.47 (dd, $J = 13.2, 5.7$ Hz, 1H), 3.21 (dd, $J = 13.2, 7.4$ Hz, 1H), 2.28-2.20 (complex m, 2H), 1.99 (dd, $J = 12.5, 7.4$ Hz, 1H), 1.82 (s, 3H), 1.48 (s, 9H), 1.01 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H). **¹³C NMR (125 MHz, CDCl_3)**: δ (ppm) 166.7, 154.7, 152.3, 138.7, 133.9, 130.7, 130.3, 130.0, 124.0, 120.0, 79.9, 47.8, 40.2, 31.4, 28.4, 19.5, 19.1, 18.4. **IR (neat) ν_{max} (cm^{-1})**: 2795, 2356, 2340, 1702, 1622, 1597, 1499, 1455, 1411, 1388, 1365, 1238, 1136, 1014, 889, 760, 694. **HRMS (FAB) m/z** calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_2\text{SNa}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 437.1987, found: 437.1986.

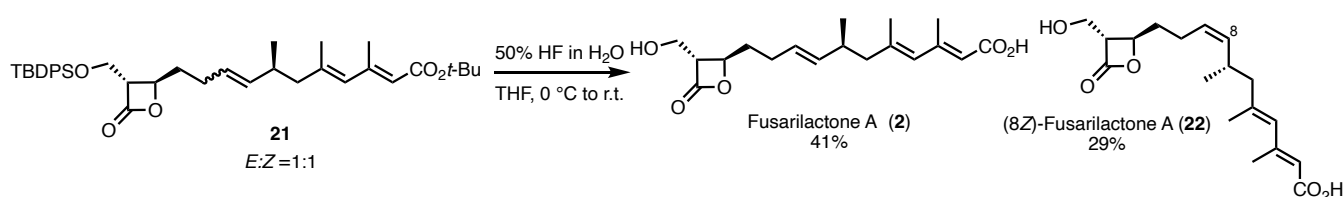
(Note: The anhydrous TBAF in THF solution was prepared in according to Dimagno's protocol)^[8]

RF = 0.17 (hexanes: EtOAc = 8:1). $[\alpha]_D^{22} = +21.6$ ($c = 0.1$, in MeOH). **^1H NMR (500 MHz, CDCl_3)**: δ (ppm) 7.65-7.63 (complex m, 4H), 7.47-7.38 (complex m, 6H), 5.79 (ddt, $J = 17.2, 10.3, 6.9$ Hz, 1H), 5.06-5.00 (complex m, 2H), 4.63 (dt, $J = 6.3, 4.0$ Hz, 1H), 4.01 (dd, $J = 11.5, 4.6$ Hz, 1H), 3.80 (dd, $J = 11.5, 3.5$ Hz, 1H), 3.35 (q, $J = 4.0, 3.5$ Hz, 1H), 2.18 (m, 2H), 2.02 (dt, $J = 7.4, 6.3$ Hz, 1H), 1.83 (m, 1H), 1.05 (s, 9H). **^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3)**: δ (ppm) 169.4, 136.7, 135.8, 135.6, 133.0, 132.5, 130.1, 128.0, 116.2, 116.1, 74.2, 59.0, 33.2, 29.3, 26.8, 19.3. **IR (neat) ν_{max} (cm^{-1})**: 2932, 1822, 1427, 1264, 1111, 1033, 914, 821, 737, 702, 613, 503. **HRMS (FAB) m/z calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_3\text{SiNa}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$** : 417.1862, found: 417.1861.

RF = 0.17 (hexanes: EtOAc = 8:1). $[\alpha]_D^{25} = +8.1$ ($c = 0.1$, in MeOH). **^1H NMR (500 MHz, CDCl_3)**: δ (ppm) 7.71-7.54 (complex m, 4H), 7.52-7.30 (complex m, 6 H), 5.81 (ddt, $J = 16.6, 10.3, 6.3$ Hz, 1H), 5.10-5.01 (complex m, 2H), 4.63 (dt, $J = 6.3, 4.0$ Hz, 1H), 4.03 (dd, $J = 11.5, 8.0$ Hz, 1H), 3.92 (dd, $J = 11.5, 3.4$ Hz, 1H), 3.80 (ddd, $J = 10.3, 6.3, 3.4$ Hz, 1H), 2.31 (m, 1 H), 2.17 (m, 1H), 2.02 (m, 1H), 1.05 (s, 9H). **^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3)**: δ (ppm) 169.2, 136.8, 135.8, 135.6, 135.6, 132.9, 132.4, 130.1, 128.0, 116.0, 75.1, 57.8, 55.5, 29.7, 29.2, 26.9, 19.2. **IR (neat) ν_{max} (cm^{-1})**: 2931, 1820, 1676, 1468, 1427, 1389, 1262, 1108, 1036, 1000, 913, 824, 798, 736, 613. **HRMS (FAB) m/z** calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_3\text{SiNa}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 417.1862, found: 417.1850.

Rf = 0.36 (hexanes: EtOAc = 2:1). $[\alpha]_D^{20} = +23.0$ ($c = 0.1$, in MeOH). **^1H NMR (500 MHz, CDCl_3)**: δ (ppm) 9.80 (s, 1H), 7.69-7.57 (complex m, 4H), 7.49-7.39 (complex m, 6 H), 4.62 (dt, $J = 8.6, 4.0$ Hz, 1H), 4.02 (dd, $J = 11.5, 4.6$ Hz, 1H), 3.83 (dd, $J = 11.5, 2.9$ Hz, 1H), 3.40 (q, $J = 4.0$ Hz, 1H), 2.61 (m, 1H), 2.16 (m, 1H), 2.07 (m, 1H), 1.05 (s, 9H). **^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3)**: δ (ppm) 200.1, 168.9, 135.8, 135.7, 132.9, 132.4, 130.2, 128.1, 128.0, 73.7, 59.2, 58.9, 39.5, 26.9, 26.5, 19.4. **IR (neat) ν_{max} (cm^{-1})**: 2932, 2857, 1822, 1725, 1468, 1427, 1389, 1112, 1034, 822, 785, 741, 702, 613, 503, 431, 407. **HRMS (FAB) m/z** calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{SiNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 419.1655. found: 419.1661.

Compound 2: $\text{RF} = 0.53$ (hexanes: EtOAc = 3:1). **^1H NMR (500 MHz, CDCl_3):** δ (ppm) 7.67-7.65 (complex m, 8H), 7.48-7.39 (complex m, 12 H), 5.69 (s, 1H), 5.67 (s, 1H), 5.51 (s, 2 H), 5.44-5.19 (complex m, 4H), 4.65 (complex m, 2 H), 4.01 (dd, $J = 11.4$, 4.0 Hz, 2H), 3.83 (dd, $J = 11.4$, 2.9 Hz), 2.72 (m, 1H), 2.33 (dt, $J = 7.4$, 6.9 Hz, 1H), 2.13 (s, 6H), 2.22-2.02 (complex m, 8H), 2.00-1.80 (complex m, 4H), 1.79 (d, $J = 1.1$ Hz, 3 H), 1.75 (d, $J = 1.1$ Hz, 3 H), 1.47 (s, 18H), 1.04 (s, 18H), 0.94 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 0.93 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H). **^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3):** δ (ppm) 171.5, 168.0, 154.0, 141.1, 141.0, 138.2, 138.0, 136.0, 136.5, 134.0, 133.9, 133.6, 131.0, 130.7, 130.6, 128.9, 128.8, 127.8, 127.4, 120.87, 75.1, 75.0, 59.7, 59.6, 49.5, 49.4, 35.9, 34.8, 34.6, 31.5, 28.9, 28.4, 27.124.1, 21.3, 20.4, 19.9, 19.6, 19.5, 18.7, 18.4. **IR (neat) ν_{max} (cm^{-1}):** 2930, 1824, 1703, 1622, 1428, 1366, 1240, 1134, 1034, 822, 738, 703, 612, 504, 431, 408. **HRMS (FAB) m/z calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{52}\text{O}_5\text{SiNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$:** 639.3477, found: 639.3482.



Fusarilactone A (2) and compound 22

To a stirred solution of **21** (50 mg, 0.08 mmol) in THF (0.5 mL) was slowly added a 50% solution of HF in H₂O (0.73 mL) at 0 °C. After stirring for 12 h at room temperature, the reaction mixture was quenched with sat. aq. NaHCO₃ (7.0 mL) and extracted with Et₂O (20 mL). The organic phase was washed with brine (12 mL) and dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The crude residue was purified by silica gel chromatography (1% MeOH in CHCl₃) to afford a mixture of **2** and **22**.

The isomers were separated by HPLC (Pegasil ODS SP100, 20 i.d. × 250 mm) with an isocratic solvent system of CH₃CN/H₂O/TFA (40: 60: 0.1) at a flow rate of 7.0 mL min⁻¹ detected by UV 210 nm. Compound **2** (*R*_t = 53 min, 11 mg, 41%) and **15** (*R*_t = 55 min, 7.6 mg, 29%) were obtained as a colorless amorphous solids respectively.

Fusarilactone A (2)

Synthetic

R_f = 0.22 (CHCl₃: MeOH = 10:1). [α]_D²² = +21.0 (*c* = 0.5, in MeOH). **¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ (ppm) 5.71 (s, 1H), 5.54 (s, 1H), 5.40 (dt, *J* = 15.4, 6.2 Hz, 1H), 5.34 (dd, *J* = 15.4, 6.8 Hz, 1H), 4.52 (m, 1H), 3.71 (dd, *J* = 11.5, 4.0 Hz, 1H), 3.61 (dd, *J* = 11.5, 3.4 Hz, 1H), 3.51 (m, 1H), 2.33 (dt, *J* = 7.4, 6.7 Hz, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.04 (m, 1H), 2.01 (dd, *J* = 12.8, 8.0 Hz, 1H), 1.98 (dd, *J* = 12.8, 7.5 Hz, 1H), 1.84 (dt, *J* = 14.0, 6.9 Hz, 1H), 1.78 (dt, *J* = 14.0, 6.8 Hz, 1H), 1.75 (s, 3H), 0.91 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H). **¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ (ppm) 170.8, 168.2, 152.8, 140.6, 136.9, 130.0, 127.2, 118.9, 74.3, 58.8, 56.6, 48.6, 34.7, 33.7, 28.1, 20.5, 19.6, 18.8. **IR (neat) ν_{\max} (cm⁻¹)**: 2924, 1817, 1684, 1614, 1444, 1258, 1125, 1032, 970, 804, 706, 551, 535. **HRMS (FAB) *m/z*** calcd for C₁₈H₂₆O₅Na [M+Na]⁺: 345.1678, found: 345.1670.

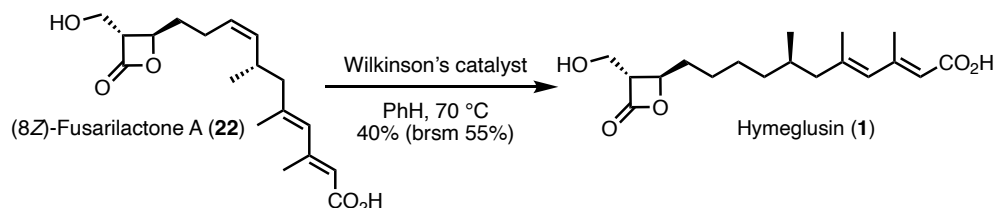
Reported by Qiu^[3]

IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3406, 1654, 1436.

[α]_D²⁵ = +16.0 (*c* = 0.5, MeOH). **¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ (ppm) 5.71 (s, 1H), 5.55 (s, 1H), 5.40 (dt, *J* = 15.4, 6.2 Hz, 1H), 5.34 (dd, *J* = 15.4, 6.8 Hz, 1H), 4.52 (m, 1H), 3.71 (dd, *J* = 11.6, 3.9 Hz, 1H), 3.61 (dd, *J* = 11.6, 3.5 Hz, 1H), 3.51 (covered by residual H₂O signal), 2.33 (spt, *J* = 6.7 Hz, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.04 (m, 1H), 2.02 (dd, *J* = 12.8, 8.0 Hz, 1H), 1.98 (dd, *J* = 12.8, 7.5 Hz, 1H), 1.85 (dt, *J* = 14.0, 6.9 Hz, 1H), 1.78 (dt, *J* = 14.0, 6.8 Hz, 1H), 1.76 (s, 3H), 0.91 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H). **¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆)**: δ (ppm) 170.8, 168.6, 152.4, 140.4, 136.8, 129.9, 127.1, 119.2, 74.3, 58.7, 56.6, 48.5, 34.6, 33.6, 28.0, 20.4, 19.5, 18.7. **HRMS (ESI) *m/z*** calcd for C₁₈H₂₆O₅Na [M+Na]⁺: 345.1672, found: 345.1668.

Compound 22

R_f = 0.22 (CHCl₃: MeOH = 10:1). [α]_D²³ = -22.6 (*c* = 0.1, in MeOH). **¹H NMR (500 MHz, CD₃OD)**: δ (ppm) 5.75 (s, 1H), 5.62 (s, 1H), 5.36 (dt, *J* = 10.9, 6.9 Hz, 1H), 5.22 (app t, *J* = 10.9 Hz, 1H), 4.63 (m, 1H), 3.88 (dd, *J* = 12.0, 4.6 Hz, 1H), 3.76 (dd, *J* = 12.0, 3.4 Hz, 1H), 3.49 (q, *J* = 4.0 Hz, 1H), 2.73 (ddt, *J* = 8.6, 8.0, 6.9 Hz, 1H), 2.22 (dt, *J* = 8.0, 6.9 Hz, 2H), 2.18 (s, 3H), 2.10 (dd, *J* = 13.2, 6.3 Hz, 1H), 2.02 (dd, *J* = 13.2, 8.6 Hz, 1H), 1.87 (m, 2H), 1.84 (s, 3H), 0.97 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H). **¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)**: δ (ppm) 171.8, 170.5, 155.4, 141.8, 138.0, 131.1, 127.7, 119.1, 75.8, 60.0, 57.9, 49.7, 35.3, 31.6, 24.3, 21.4, 19.8, 18.8. **IR (neat) ν_{\max} (cm⁻¹)**: 2926, 1813, 1679, 1603, 1263, 1129, 889, 843, 734, 802, 520, 469, 431. **HRMS (FAB) *m/z*** calcd for C₁₈H₂₆O₅Na [M+Na]⁺: 345.1678, found: 345.1666.



Hymeglusin (1)

To a stirred solution of **22** (4.6 mg, 0.012 mmol) in PhH (0.34 mL) was added the Wilkinson's catalyst (1.1 mg). The flask was evacuated and backfilled with H₂ gas and warmed to 70 °C. After stirring for 3 h, the reaction mixture was cooled to room temperature and filtrated through a pad of Celite®. The solvent was concentrated *in vacuo* and the crude residue was purified by HPLC (Pegasil ODS SP100, 20 i.d. × 250 mm) with an isocratic solvent system of CH₃CN/H₂O/TFA (40: 60: 0.1) at a flow rate of 7.0 mL min⁻¹ detected by UV 210 nm. Compound **1** (*R*_t = 65 min, 1.6 mg, 40%, brsm 55%) and recovered **22** (*R*_t = 55 min, 1.0 mg, 26%) were obtained respectively.

Hymeglusin (1)

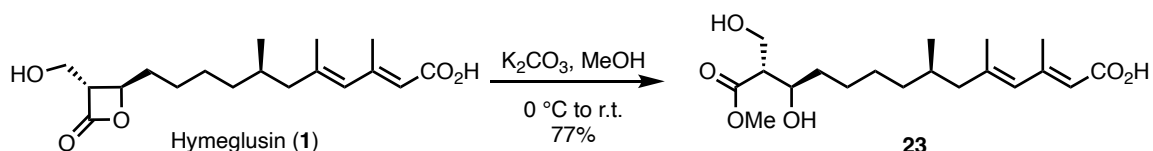
Synthetic

R_f = 0.22 (CHCl₃: MeOH = 10:1). [α]_D²² = +10.6 (*c* = 0.1, in CHCl₃). **¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)**: δ (ppm) 5.73 (s, 1H), 5.68 (s, 1H), 4.60 (ddd, *J* = 7.4, 5.7, 4.1, Hz, 1H), 4.07 (dd, *J* = 11.5, 4.6 Hz, 1H), 3.91 (dd, *J* = 12.0, 4.0 Hz, 1H), 3.42 (q, *J* = 4.0 Hz, 1H), 2.25 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H), 2.10 (dd, *J* = 13.2, 6.3 Hz), 1.82 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H), 1.96-1.60 (complex m, 5H), 1.47-1.10 (complex m, 6H), 0.85 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H). **¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)**: δ (ppm) 171.7, 170.2, 156.9, 142.0, 129.4, 116.6, 75.0, 58.4, 57.5, 48.9, 36.4, 33.8, 30.8,

26.5, 25.0, 19.8, 19.2 18.4. IR (neat) ν_{\max} (cm⁻¹): 2924, 1813, 1683, 1254, 1125, 882, 447. HRMS (FAB) m/z calcd for C₁₈H₂₈O₅Na [M+Na]⁺: 347.1834, found: 347.1822.

Reported by Pons^[9]

[α]_D = +28.8 (*c* = 0.25, in CHCl₃), ¹H (360 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 5.73 (s, 1H), 5.69 (s, 1H), 4.60 (ddd, *J* = 7.3, 5.8, 4.1 Hz, 1H), 4.06 (dd, *J* = 11.6, 4.6 Hz, 1H), 3.90 (dd, *J* = 11.4, 4.0 Hz, 1H), 3.42 (q, *J* = 4.3 Hz, 1H), 2.25 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H), 2.09 (dd, *J* = 12.8, 6.4 Hz, 1H), 1.82 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H), 1.99-1.58 (complex m, 5H), 1.47-1.10 (complex m, 6H), 0.85 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H). ¹³C (90 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 171.0, 169.9, 157.2, 142.3, 129.7, 116.6, 75.1, 58.8, 58.3, 49.2, 36.8, 34.0, 31.1, 26.8, 25.4, 20.2, 19.6, 18.7. IR (film) ν_{\max} (cm⁻¹): 3500-2500, 3389, 2925, 2855, 1820, 1689, 1614, 1462, 1379, 1256, 1142. HRMS (EI mode) m/z calcd for C₁₈H₂₈O₅ [M]⁺: 324.1937 (error -2.7 ppm), found: 324.1928.

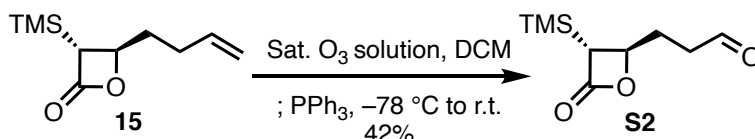


Compound 23

To a stirred solution of **1** (7.6 mg, 0.023 mmol) in MeOH (0.46 mL) was added K₂CO₃ (4.1 mg, 0.03 mmol) at 0 °C. After stirring for 2 h at room temperature, the reaction mixture was quenched with sat. aq. NH₄Cl (7 mL) and extracted with DCM (15 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The crude residue was purified by preparative TLC (20% MeOH in CHCl₃) to afford **23** (6.3 mg, 77%) as a colorless oil.

Compound 23

R_f = 0.50 (CHCl₃: MeOH = 6:1). [α]_D²⁰ = -1.1 (*c* = 0.1, in CHCl₃). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 5.76 (s, 1H), 5.64 (s, 1H), 3.83-3.79 (complex m, 2H), 3.73-3.70 (complex m, 4H), 2.66 (ddd, *J* = 8.6, 8.0, 5.7 Hz, 1H), 2.19 (s, 3H), 2.12 (dd, *J* = 13.2, 6.3 Hz, 1H), 1.88 (dd, *J* = 13.2, 8.6 Hz, 1H), 1.81 (s, 3H), 1.71 (m, 1H), 1.57-1.29 (complex m, 7H), 1.15 (m, 1H), 0.84 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 175.2, 170.8, 155.2, 142.2, 130.6, 119.1, 71.0, 61.6, 56.3, 52.0, 50.0, 37.9, 36.1, 32.1, 28.0, 26.9, 19.9, 19.8, 18.5. IR (neat) ν_{\max} (cm⁻¹): 2200, 2069, 1705, 1654, 1446, 1116, 962. HRMS (FAB) m/z calcd for C₁₉H₃₂O₆Na [M+Na]⁺: 379.2097, found: 379.2088.



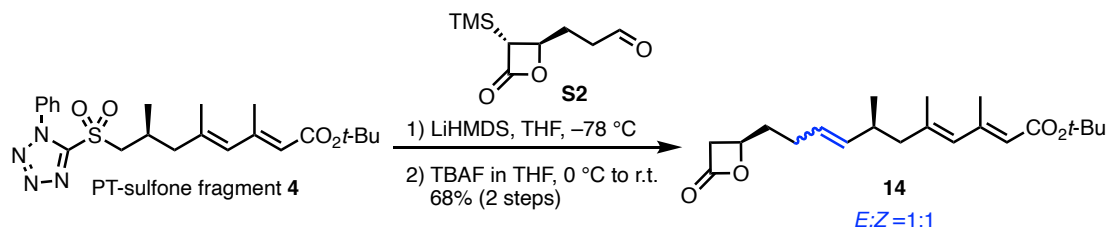
Compound 16

To a stirred solution of **15** (1.6 g, 7.9 mmol) in DCM (158 mL) was slowly added saturated O₃ solution (ca. 0.03 M in DCM, 400 mL, 12 mmol) at -78 °C. After stirring for 30 min, the reaction mixture was sparged with N₂ for 20 min. PPh₃ (6.2 g, 23.8 mmol) was added to the reaction mixture and the mixture was stirred for further 12 h at room temperature. The resulting mixture was concentrated *in vacuo* and the crude residue was purified by silica gel chromatography (Merck Millipore 60 N, 0.040-0.63 nm, 10% EtOAc in hexanes) to afford **S2** (664 mg, 42%) as a colorless oil.

Compound 16

R_f = 0.25 (hexanes: EtOAc = 5:1). [α]_D²² = -18.4 (*c* = 0.1, in CHCl₃). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 9.82 (s, 1H), 4.30 (dt, *J* = 8.6, 4.6 Hz, 1H), 2.95 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 2.66 (dt, *J* = 12.3, 10.9, 6.9 Hz, 2H), 2.15 (ddt, *J* = 12.3, 8.1, 6.9 Hz, 1H), 2.06 (dt, *J* = 8.1, 6.9 Hz, 1H), 0.185 (s, 9H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 200.3, 170.0, 71.3, 47.8, 39.0, 27.1, -3.4. IR (neat) ν_{\max} (cm⁻¹): 2920, 2851, 1798, 1722, 1455, 1376, 1252, 1112, 1065.

(Note; The corresponding Mass spectrometry data of S2 was not obtained.)



Compound 14

To a stirred solution of **4** (36 mg, 0.081 mmol) in THF (1.0 mL) was slowly added Lithium Bis(trimethylsilyl)amide (LiHMDS) solution (1.0 M in THF, 0.12 mL, 0.12 mmol) at -78 °C under N₂ atmosphere. After stirring for 10 min, the solution of **S2** (33 mg, 0.16 mmol) in THF (0.6 mL) was slowly added. The reaction mixture was stirred for further 5 min and quenched with acetic acid (0.5 mL). The resulting mixture was diluted with brine (10 mL) and extracted with EtOAc (20 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The crude product was carried out the next reaction without further purification.

The crude residue was dissolved in THF (1.6 mL) and slowly added 1.0 M Tetrabutylammonium Fluoride (TBAF) solution in THF (0.12 mL, 0.12 mmol) at 0 °C. After stirring for 10 min, the reaction mixture was quenched with acetic acid (0.5 mL) and diluted with

brine (7.0 mL). The resulting mixture was extracted with EtOAc (15 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The crude residue was purified by silica gel chromatography (10% EtOAc in hexanes) to afford **25** as a colorless oil (16 mg, 68%).

Compound 14

R_f = 0.46 (hexanes: EtOAc = 3:1). **¹H NMR (500 MHz, CDOD₃)**: δ(ppm) 5.71 (s, 1H), 5.51 (s, 1H), 5.41 (ddd, *J* = 8.6, 6.9, 6.3 Hz, 1H), 5.36-5.31 (complex m, 2H), 5.21 (app. t, *J* = 9.7 Hz, 1H), 4.55-4.48 (complex m, 2H), 3.54 (dd, *J* = 16.6, 5.7 Hz, 1H), 3.50 (dd, *J* = 16.6, 2.9 Hz, 1H), 3.13 (dd, *J* = 8.0, 4.0 Hz, 1H), 3.10 (dd, *J* = 8.0, 4.0 Hz, 1H), 2.74 (m, 1H), 2.38 (dt, *J* = 7.5, 6.9 Hz, 1H), 2.15 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H), 2.14 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H), 2.21-1.97 (complex m, 8H), 1.90-1.76 (complex m, 4H), 1.81 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H), 1.79 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H), 1.47 (s, 18H), 0.97 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.96 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H). **¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD)**: δ(ppm) 170.3, 170.3, 170.0, 154.1, 154.0, 141.6, 141.3, 138.2, 137.9, 130.8, 128.0, 127.6, 120.3, 80.8, 80.8, 72.2, 72.049.8, 49.7, 43.4, 43.3, 36.3, 35.9, 35.5, 31.6, 29.124.2, 21.5, 21.1, 19.8, 19.7, 18.9, 18.7. **IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹)**: 2967, 2926, 2826, 1706, 1620, 1446, 1365, 1238, 1139, 877, 750. **HRMS (FAB) *m/z* [M+Na]⁺** calcd for C₃₈H₅₂O₅SiNa [M+Na]⁺: 371.2198, found: 371.2187.

Evaluation of antimicrobial activities and circumventing effect of synthetic compounds

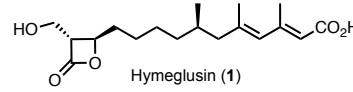
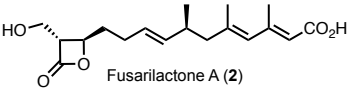
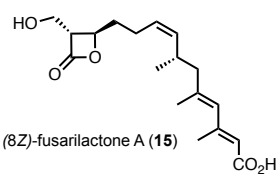
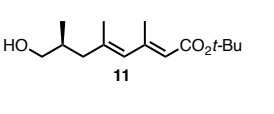
Table S4. Antimicrobial assay of Hymeglusin (**1**), Fusarilactone A (**2**) and compound **23** against MRSA series.

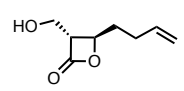
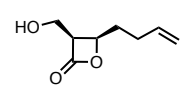
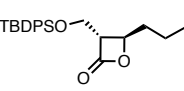
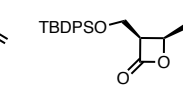
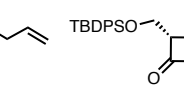
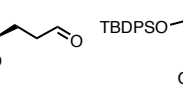
	MIC (μg/mL)		
	MRSA 92-1191	MRSA ATCC 33591	MRSA KUB 2750
Hymeglusin (Natural product)	2	2	2
Hymeglusin (Synthetic product)	4	1–2	2
Fusarilactone A (Synthetic product)	16	8	8
Compound 23	> 256	> 256	64–128

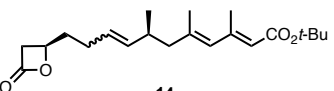
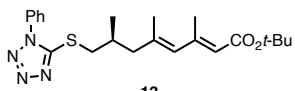
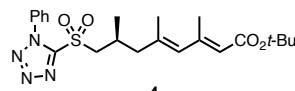
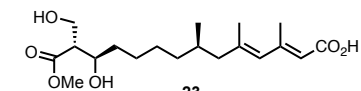
Table S5. Combination treatment of Hymeglusin (**1**), Fusarilactone A (**2**) and compound **23** with MEPM

Inhibitor	MIC of MEPM with inhibitor (combination dose; 0.5 μg/mL)		
	MRSA 92-1191	MRSA ATCC 33591	MRSA KUB 2750
Hymeglusin (Natural product)	0.125	0.125	0.0156
Hymeglusin (Synthetic)	0.125	0.063–0.125	0.0156–0.0313
Fusarilactone A (Synthetic)	8	2	0.25
Compound 23	128	32	4–8

Table S6. A combination treatment of synthetic compounds with MEPM utilizing a paper disc method.

 Hymeglusin (1)		 Fusarilactone A (2)		 (8Z)-fusarilactone A (15)		 11	
MEPM (+)	MEPM (-)	MEPM (+)	MEPM (-)	MEPM (+)	MEPM (-)	MEPM (+)	MEPM (-)
0.01	0.03	3	10	10	30	10	100

 S		 S		 20		 <i>cis</i> - 22		 3		 <i>cis</i> - 3	
MEPM (+)	MEPM (-)	MEPM (+)	MEPM (-)	MEPM (+)	MEPM (-)	MEPM (+)	MEPM (-)	MEPM (+)	MEPM (-)	MEPM (+)	MEPM (-)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

 14 <i>E:Z</i> = 1:1		 13		 4		 23	
MEPM (+)	MEPM (-)	MEPM (+)	MEPM (-)	MEPM (+)	MEPM (-)	MEPM (+)	MEPM (-)
-	-	-	-	-	-	30	100

The numbers in table show the amount of compound (μg per disk).
MEPM (+); 1 $\mu\text{g/mL}$, MEPM (-); None, [-]; No inhibition

2-3. Enzymatic assay and antimicrobial assay

Cloning, Overexpression and Purification of MRSA mvaS.

A gene fragment encoding the entire mvaS open reading frame was amplified from MRSA (KUB 2750) genomic DNA by PCR with Prime STAR HS DNA polymerase (Primer (5'-CGCGCATATGCCTGGGTCACTTCCTTTG-3') and primer (5'-CGCGGAATTCTTAGTGTTACCGTTACTAA-3') were designed for PCR). With the DNA fragment as a template, adaptor PCR for adding B1 and B2 arrangement was carried out. The B1 and B2 arrangement added fragment (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3', 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3') was subcloned into pDONR-201 by BP reaction and the gene of mvaS was cloned into pDEST17 by LP reaction to construct a destination vector. The destination vector was treated with Proteinase K and transformed into *E. coli* HST08 by heat shock method. The corresponding strain was cultured in LB agar plate with Ampicillin (100 µg/mL) at 37 °C after preculture with SOC broth. The strain colonies were picked up and cultured with LB broth with Ampicillin (100 µg/mL) at 37 °C. The MRSA mvaS encoded gene inserted plasmid was extracted using Miniprep. Upon confirmation of its DNA sequence, the plasmid was transformed into *E. coli* BL21 by heat shock method and the resulting strain was cultured in LB with Ampicillin (100 µg/mL) at 27 °C to an A₆₀₀ nm of 0.5. Protein expression was induced overnight at 27 °C by adding arabinose and glucose to 0.25% and 0.1% final concentration respectively. Bacterial cell lysate was harvested by centrifugation, resuspended in buffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.0) with protease inhibitor tablets) and cell disintegration. The soluble tagged protein was purified on a Ni-NTA-Agarose column using 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer with protease inhibitor tablets and imidazole and dialyzed. The recombinant MRSA mvaS was stored at 4 °C for further use.

Enzyme Inhibition assay utilizing DTNB method.

The enzyme activity assay of MRSA mvaS which was described by Miziorko et al,^[10] was optimized for our system. The optimized general condition for this assay is shown below.

Recombinant- MRSA mvaS (45 ng/mL in 100 mM Tris-HCl buffer pH 8.0, 50 µL) and 0.3 µL of inhibitor (hymeglusins or Compound **16**, 15.2 µg/mL in DMSO) were incubated at r.t. After 3 min., 10 mL of AcCoA (1.5 mM), 10 mL of AcetoAcCoA (70 µM), and 10 µL of DTNB (1.5 mM) were added and the enzyme activity was measured in the microplate reader (412 nm).

Cloning and overexpression of MRSA mvaS and mvaS/Cys111Ala into RN 4220 strain.

The MRSA mvaS gene was cloned and introduced into *S. aureus* RN 4220 strain referring to the protocol from Kaito and Sekimizu.^[11] The experimental details are as follows. RN 4220 with overexpression of MRSA mvaS, a gene fragment encoding the entire MRSA mvaS open reading frame containing promoter region was amplified from MRSA (KUB 2750) genomic DNA by polymerase chain reaction with Prime STAR HS DNA polymerase (Primer (5'-CTTCTCTAAAGCTTTAATGTCTGC-3') and primer (5'-TTACTCTGGTCTGTGATATTCG-3') were designed for PCR). The gene fragment was added dA with A-overhang enzyme and subcloned into pMD20 vector. The MRSA mvaS encoded gene plasmid was transformed into *E. coli* HST08 by heat shock method. The strain was cultured in LB agar with Ampicillin (100 µg/mL) at 37 °C after preculture with SOC broth. The strain colonies were picked up and cultured with LB broth with Ampicillin (100 µg/mL) at 37 °C. The plasmid was extracted using Miniprep. The plasmid and the shuttle vector pND-50 were digested by SphI and BamHI at 37 °C and the digested fragment of pND-50 was treated with alkaline Phosphatase CIP at 37 °C for 30 min and 50 °C for 15 min for the dephosphorylation of 5' end. Overnight ligation of the digested fragment into digested pND-50 was carried out at 16 °C. The ligation product was transformed into *E. coli* HST08. The strain was cultured in TSB agar with chloramphenicol (20 µg/mL) at 37 °C after preculture with SOC broth. The strain colonies were picked up and cultured with TSB broth with chloramphenicol (20 µg/mL) at 37 °C. The plasmid was extracted using Miniprep. Upon confirmation of its DNA sequence, the MRSA mvaS encoded gene inserted pND-50 was transformed into RN 4220 by electroporation (25 µF, 2.3 kV, 100 Ω). The strain was aerobically cultured in TSB agar with chloramphenicol (12.5 µg/mL) at 30 °C after preculture with SOC broth. The strain colonies were picked up and cultured with TSB broth with chloramphenicol (12.5 µg/mL) at 30 °C to afford the RN 4220 with overexpression of MRSA mvaS.

RN 4220 with overexpression of mvaS/Cys111Ala, the overexpression mutant strain was obtained using site directed mutagenesis method. With the MRSA mvaS gene inserted pND-50 (mentioned above) as a template, PCR with Prime STAR HS DNA polymerase was conducted to get the Cys111Ala mutant gene fragment (Primer (5'-CTTCTCTAAAGCTTTAATGTCTGC-3') and primer (5'-TTACTCTGGTCTGTGATATTCG-3'). The PCR product was transformed into *E. coli* HST08. The strain was cultured in TSB agar with chloramphenicol (20 µg/mL) at 37 °C after preculture with SOC broth. The strain colonies were picked up and cultured with TSB broth with chloramphenicol (20 µg/mL) at 37 °C to afford the RN 4220 with overexpression of MRSA mvaS. The plasmid was extracted using Miniprep. Upon confirmation of its DNA sequence, the MRSA mvaS encoded gene inserted pND-50 was transformed into RN 4220 by electroporation (25 µF, 2.3 kV, 100 Ω). The strain was cultured in TSB agar with chloramphenicol (12.5 µg/mL) at 30 °C after preculture with SOC broth. The strain colonies were picked up and cultured with TSB broth with chloramphenicol (12.5 µg/mL) at 30 °C to afford the RN 4220 with overexpression of mvaS/Cys111Ala.

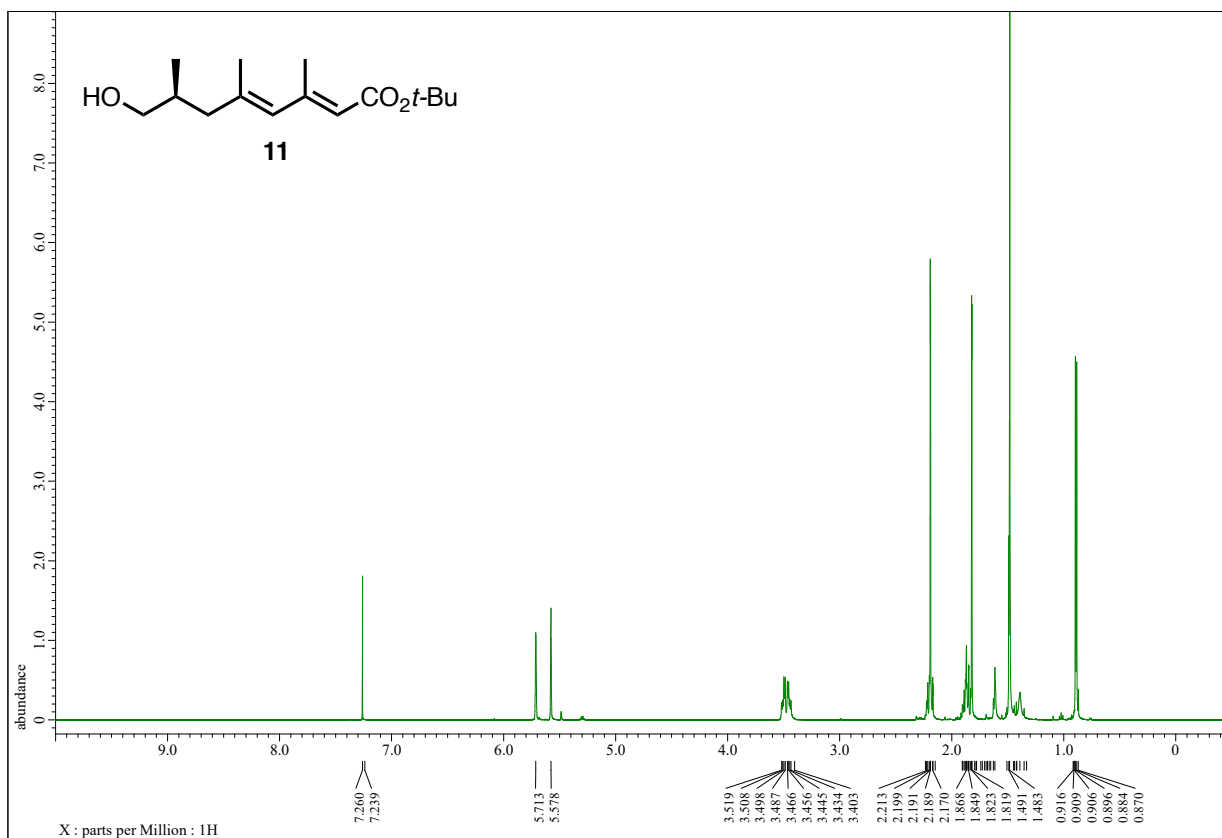
Evaluation of antimicrobial activity of **1** against MRSA mvaS and mvaS/Cys111Ala overexpressed strains using liquid microdilution method.

Measurement of antibiological activity of hymeglusins (**1**) was carried out by the broth microdilution method^[12] using MSSA RN 4220 wild type, RN 4220 with overexpression of MRSA mvaS, and RN 4220 with overexpression of mvaS/Cys111Ala. An overnight culture of MSSA strains was diluted with fresh medium to the appropriate bacterial density and spread onto a plate of Difco Mueller Hinton Agar. The plates were incubated at 30 °C for 18 h.

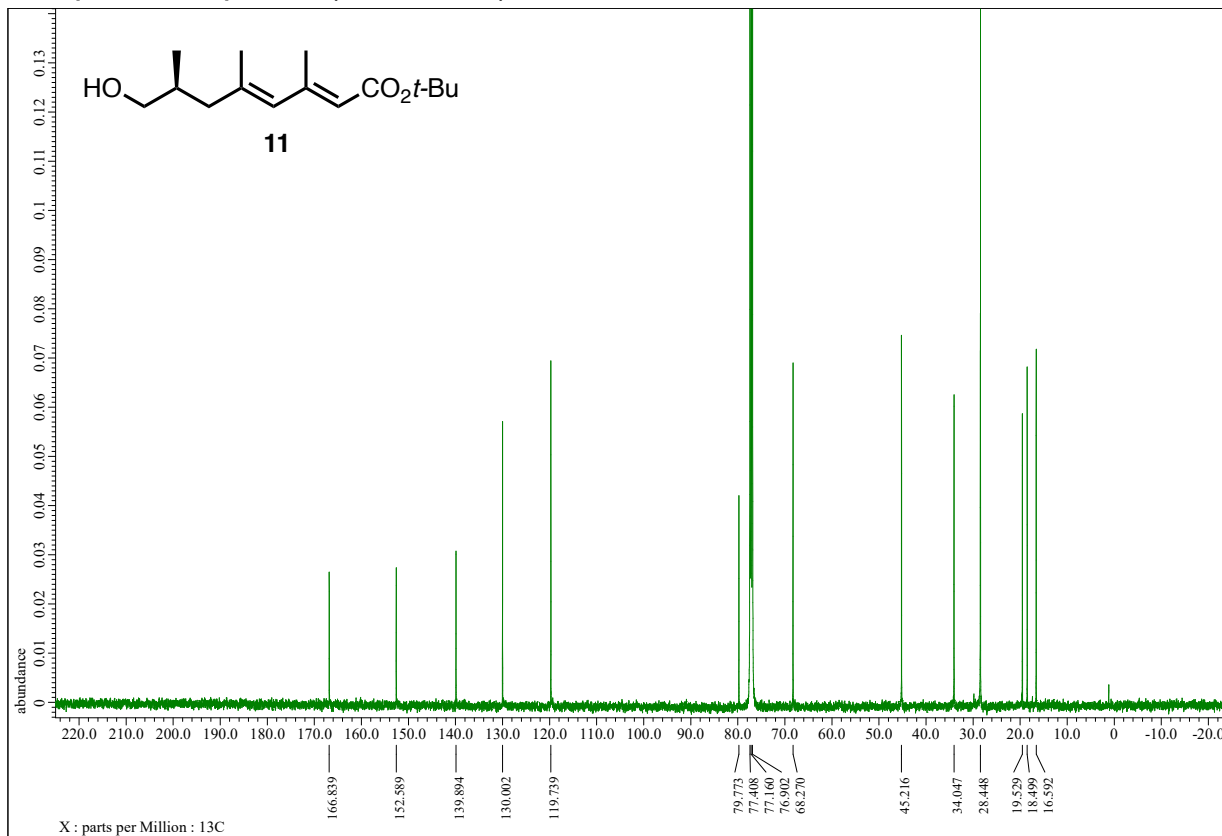
3. References

- [1] a) N. Koyama, T. Nagahiro, Y. Yamaguchi, R. Masuma, H. Tomoda, S. Ōmura, *J. Antibiot.* **2005**, *58*, 695-703; b) T. Suga, T. Ishii, M. Iwatsuki, T. Yamamoto, K. Nonaka, R. Masuma, H. Matsui, H. Hanaki, S. Ōmura, K. Shiomi, *J. Antibiot.* **2012**, *65*, 527-529; c) M. Shiina, T. Suga, Y. Asami, K. Nonaka, M. Iwatsuki, S. Ōmura, K. Shiomi, *J. Antibiot.* **2016**, *69*, 719-722; d) K. Takata, M. Iwatsuki, T. Yamamoto, T. Shirahata, K. Nonaka, R. Masuma, Y. Hayakawa, H. Hanaki, Y. Kobayashi, G. A. Peterson, S. Ōmura, K. Shiomi, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 4678-4681; e) M. Iwatsuki, T. Ishimori, T. Yamamoto, K. Takata, M. Mori, K. Nonaka, R. Masuma, Y. Hayakawa, H. Hinaka, K. Shiomi, *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 6644-6648.
- [2] K. Koseki, Y. Takahashi, K. Shimazaki, T. Ebata, T. Chuman, K. Mori, *Biosci. Biotech. Biochem.* **1992**, *56*, 1728-1731.
- [3] X. X. Tang, Xia Yan, W. H. Fu, L. Q. Yi, B. W. Tang, L. B. Yu, M. J. Fang, Z. Wu, Y. K. Qiu, *J. Agric. Food. Chem.* **2019**, *67*, 2877-2885.
- [4] S. V. Ley, N. J. Anthony, A. Armstrong, M. G. Brasca, T. Clarke, D. Culshaw, C. Greck, P. Grice, A. B. Jones, B. Lygo, A. Madin, R.N. Sheppard, A. M.Z. Slawin, D. J. Williams, *Tetrahedron*, **1989**, *45*, 7161-7194.
- [5] A. Otaka, E. Mitsuyama, T. Kinoshita, H. Tamamura, N. Fujii, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4888-4899.
- [6] Z. Liu, C. Xu, J. del Pozo, S. Torker, A. H. Hoveyda, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 7137-7146.
- [7] A. Pommier, J. M. Pons, *Synthesis*, **1993**, *5*, 441-459.
- [8] H. Sun, S. G. Dimagno, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2050-2051.
- [9] B. W. Dymock, P. J. Kocienski, J. M. Pons, *Synthesis*, **1998**, *11*, 1665-1661
- [10] D. A. Scaff, H. M. Miziroko, *Anal. Biochem.* **2010**, *396*, 96-102.
- [11] C. Kaito, Y. Saito, G. Nagano, M. Ikuo, Y. Omae, Y. Hanada, X. Han, K. Kuwahara-Arai, T. Hishinuma, T. Hishinuma, T. Baba, T. Ito, K. Hiramatsu, K. Sekimizu, *PLoS Pathog.* **2011**, *7*: e1001267
- [12] M. P. Weinstein, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 11th Edition, **2018**.

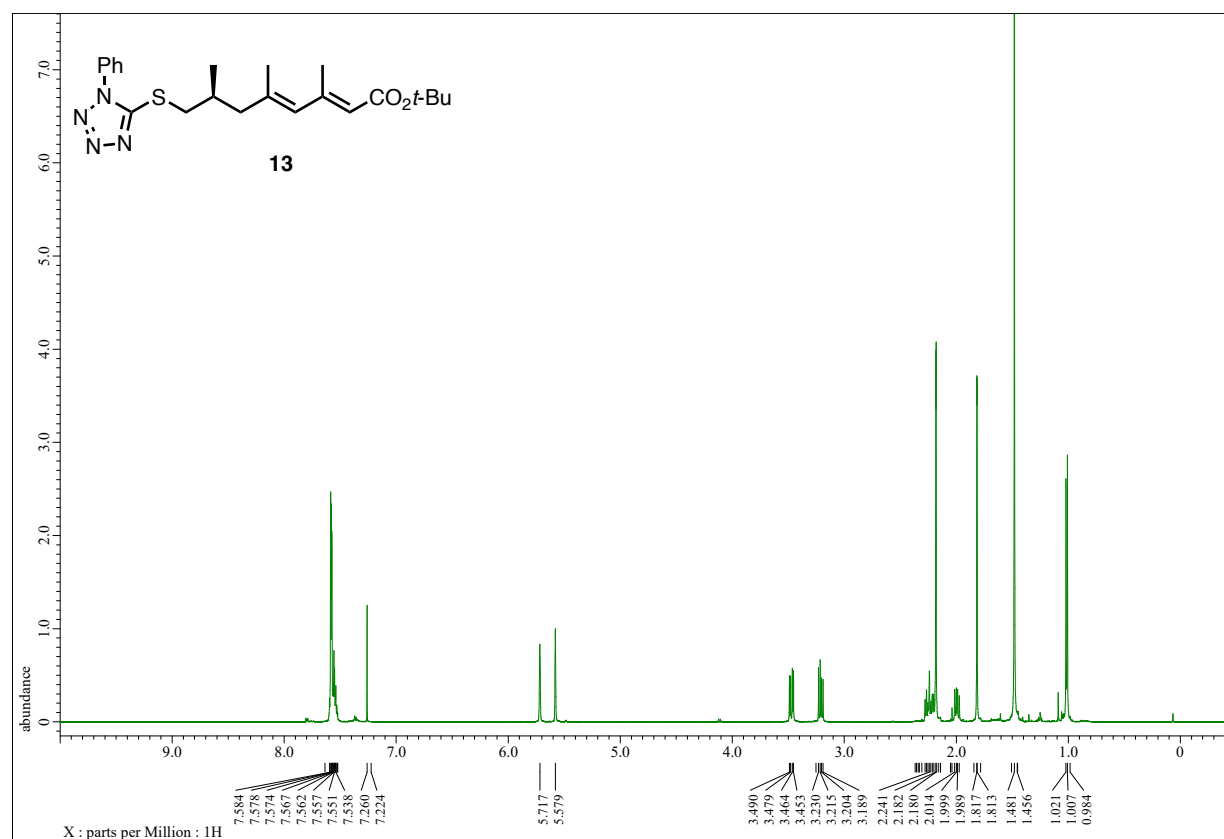
¹H NMR spectra of compound 11 (CDCl₃, 500 MHz)



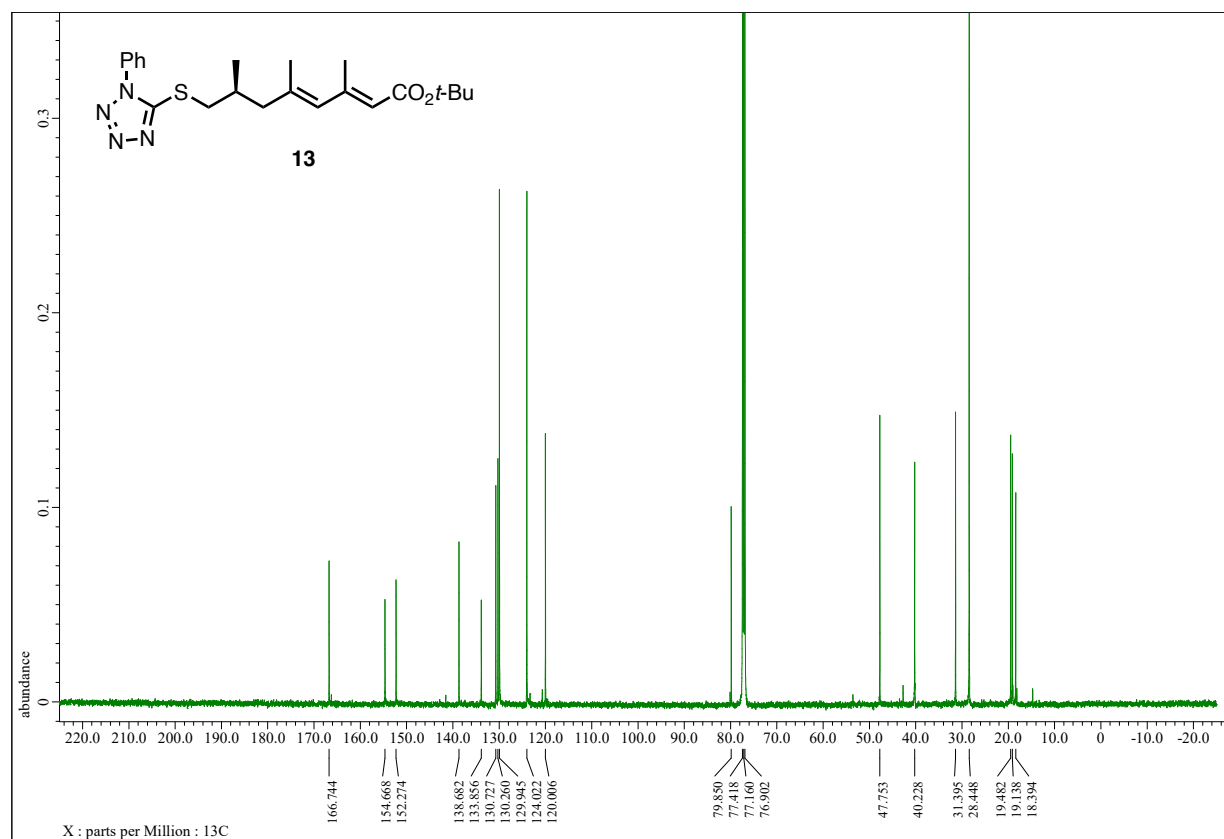
¹³C NMR spectra of compound 11 (CDCl₃, 125 MHz)



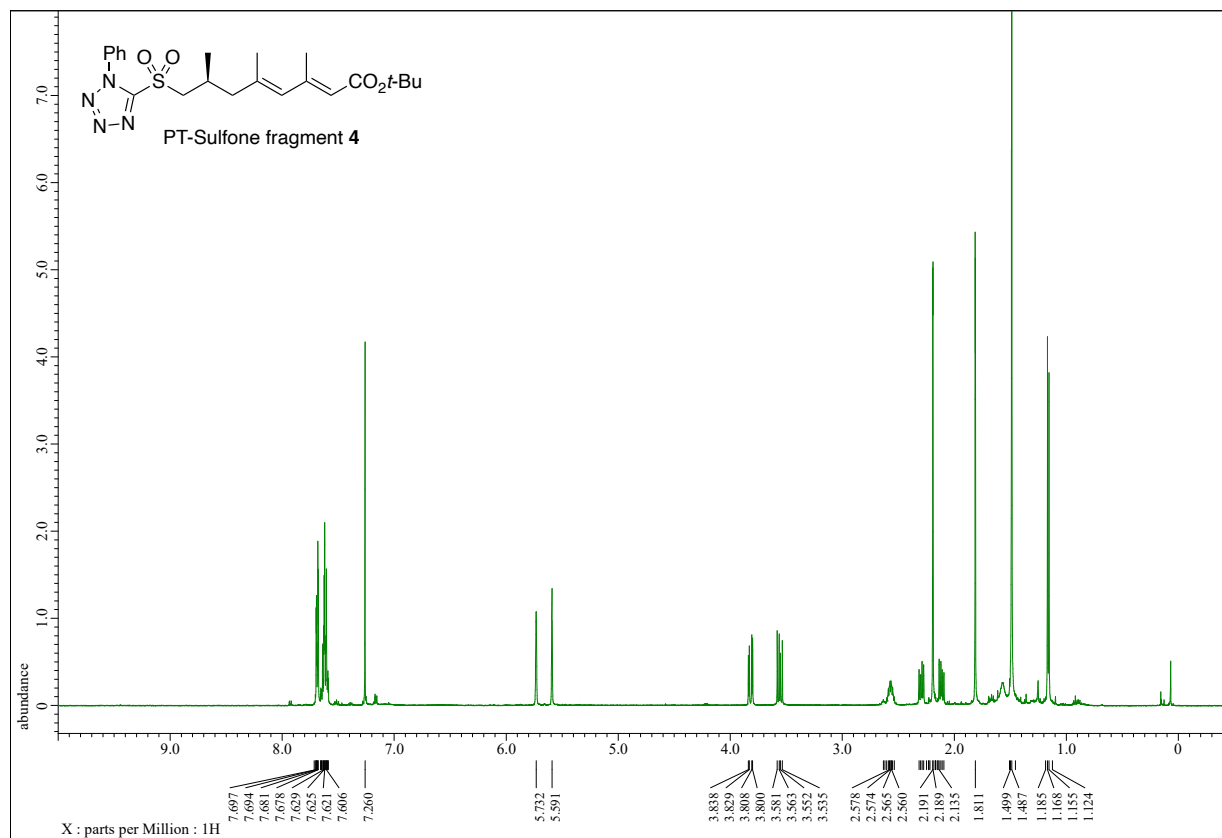
¹H NMR spectra of compound 13 (CDCl₃, 500 MHz)



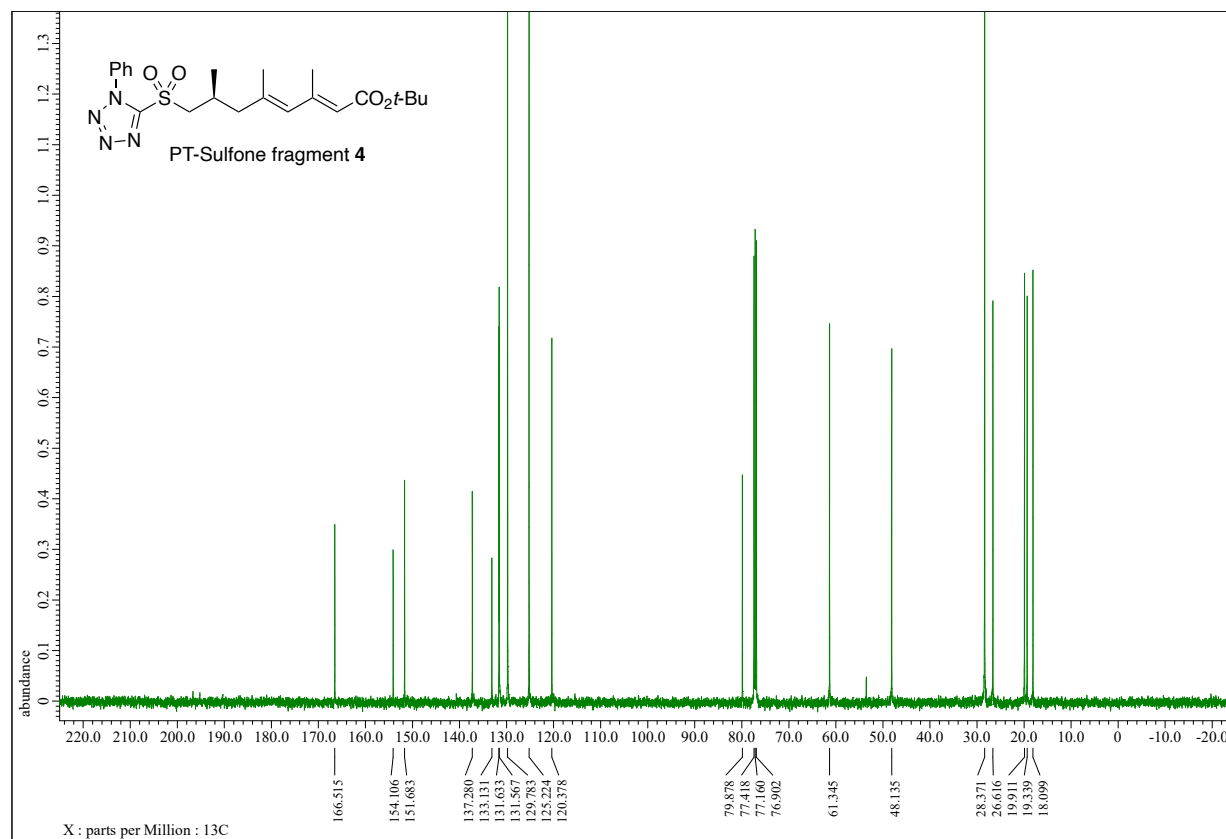
¹³C NMR spectra of compound 13 (CDCl₃, 125 MHz)



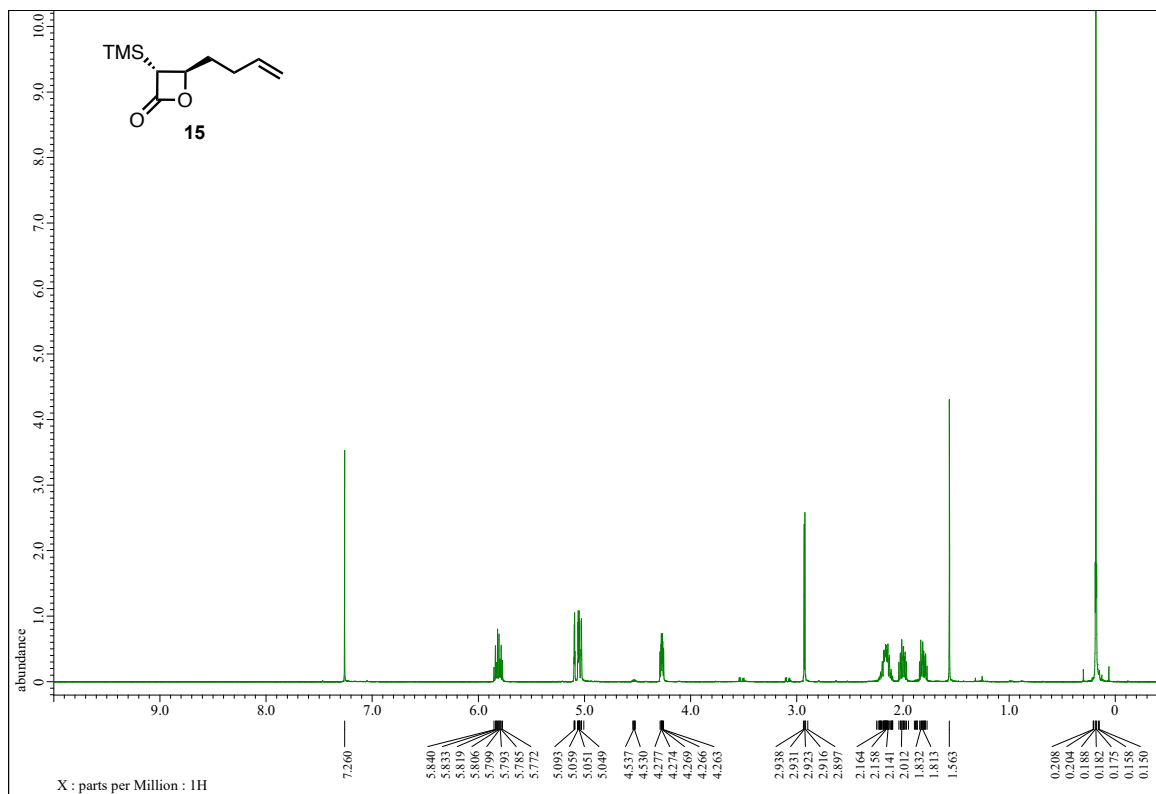
¹H NMR spectra of compound PT-sulfone fragment 4 (CDCl₃, 500 MHz)¹



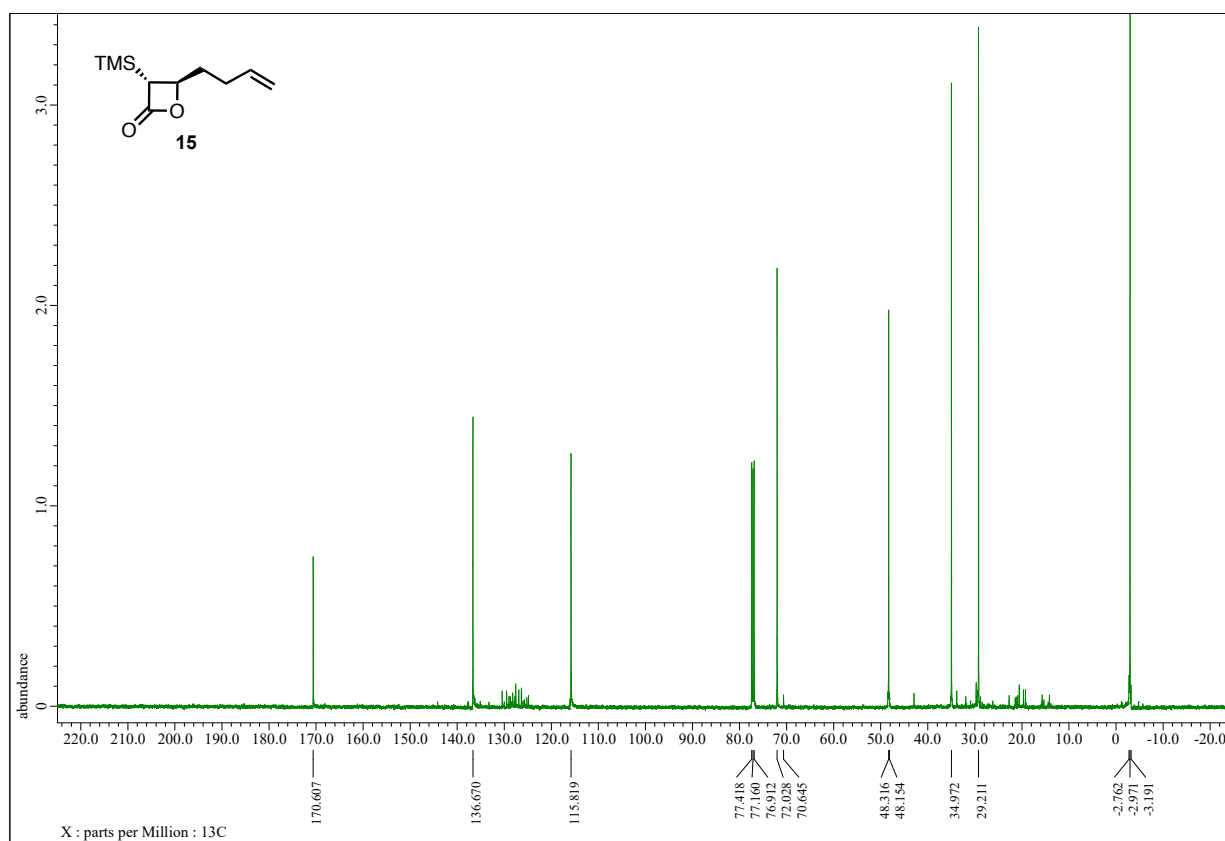
¹³C NMR spectra of compound PT-sulfone fragment 4 (CDCl₃, 125 MHz)



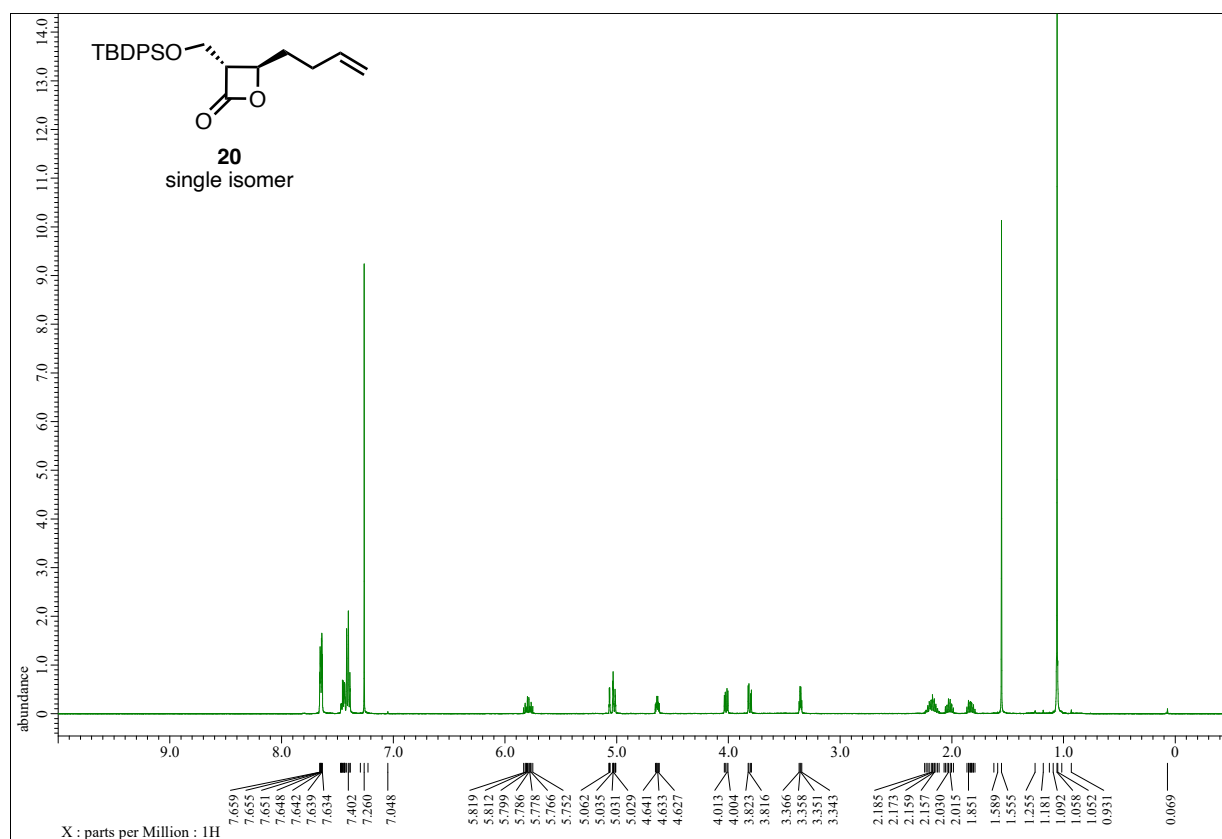
¹H NMR spectra of compound 15 (CDCl₃, 500 MHz)



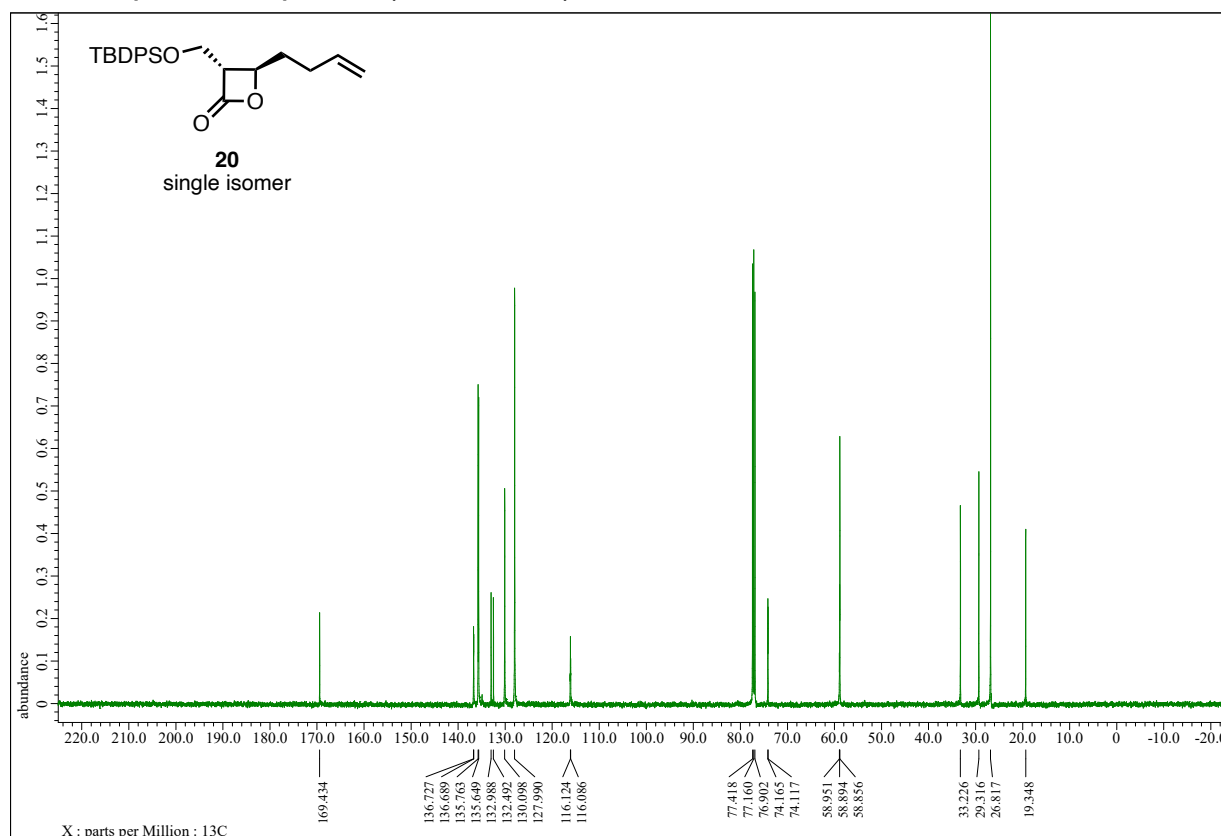
¹³C NMR spectra of compound 15 (CDCl₃, 125 MHz)



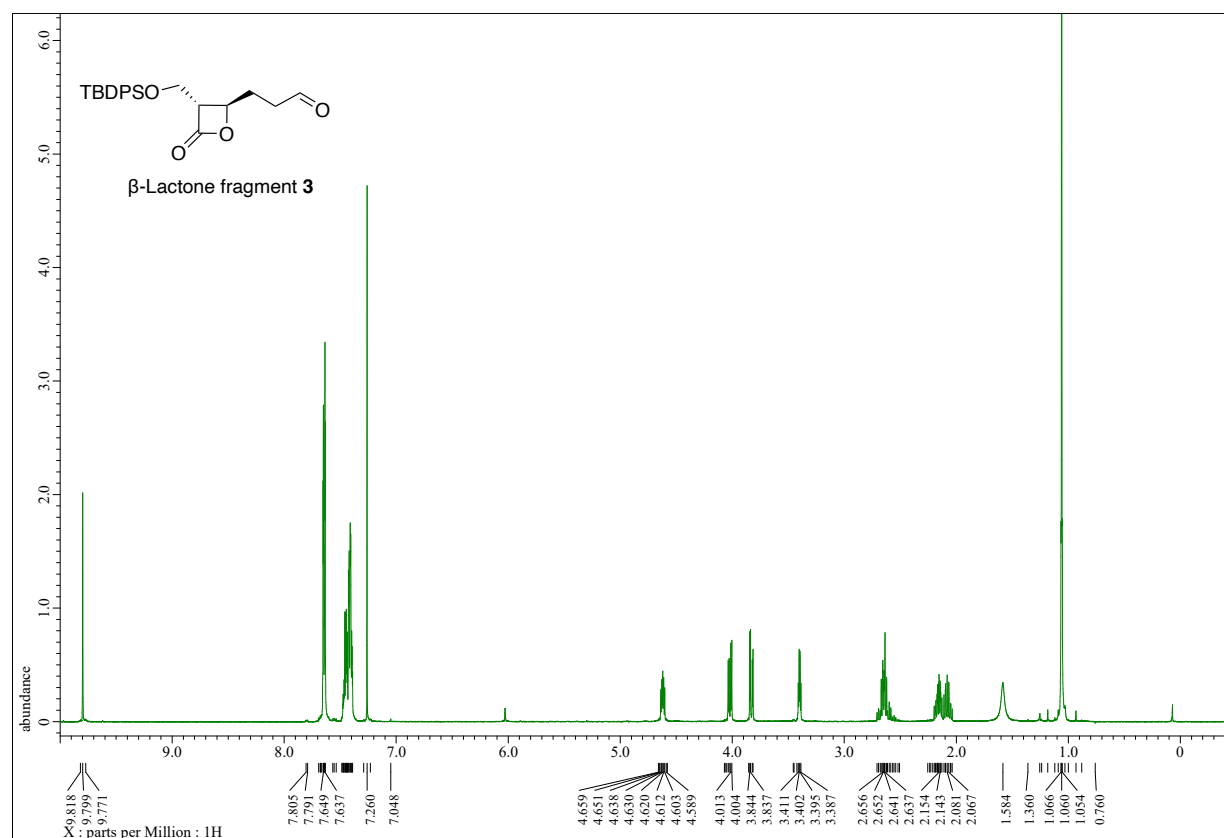
¹H NMR spectra of compound 20 (CDCl₃, 500 MHz)



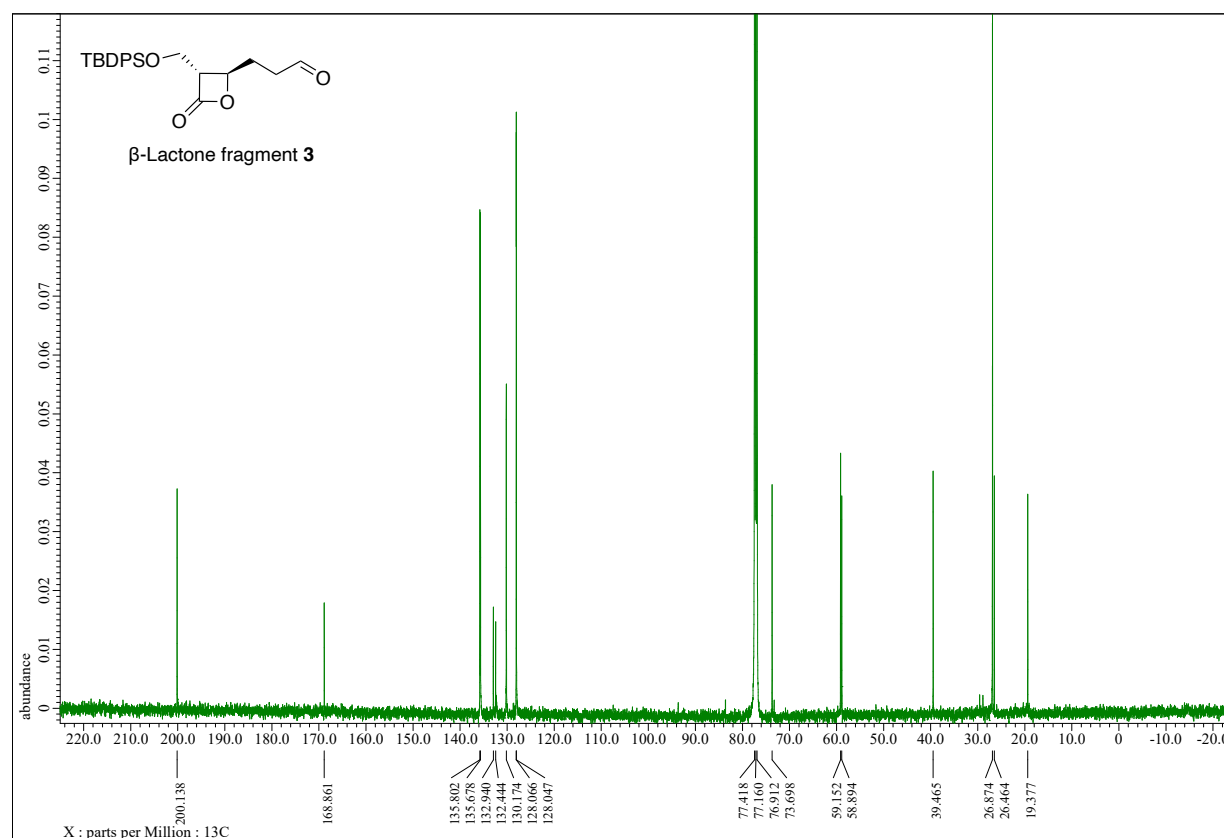
¹³C NMR spectra of compound 20 (CDCl₃, 125 MHz)



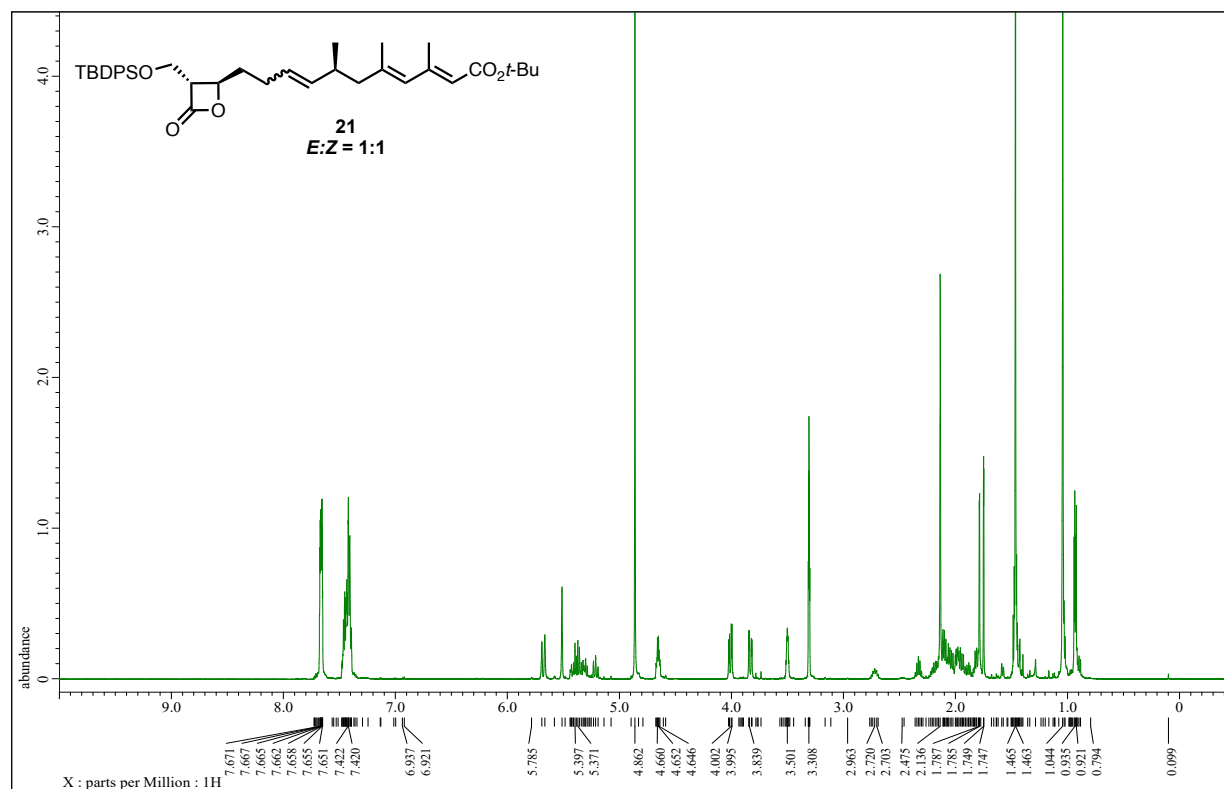
¹H NMR spectra of β-lactone fragment 3 (CDCl₃, 500 MHz)



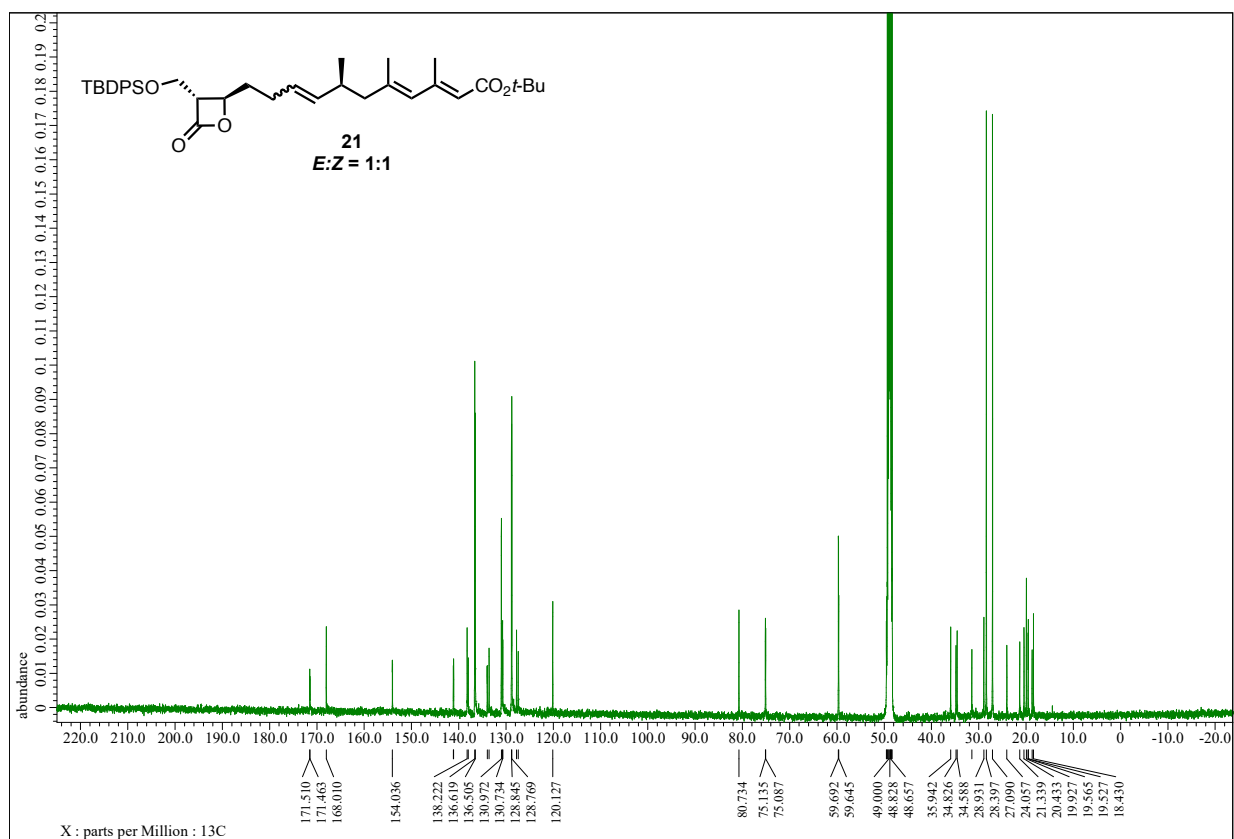
¹³C NMR spectra of β-lactone fragment 3 (CDCl₃, 125 MHz)



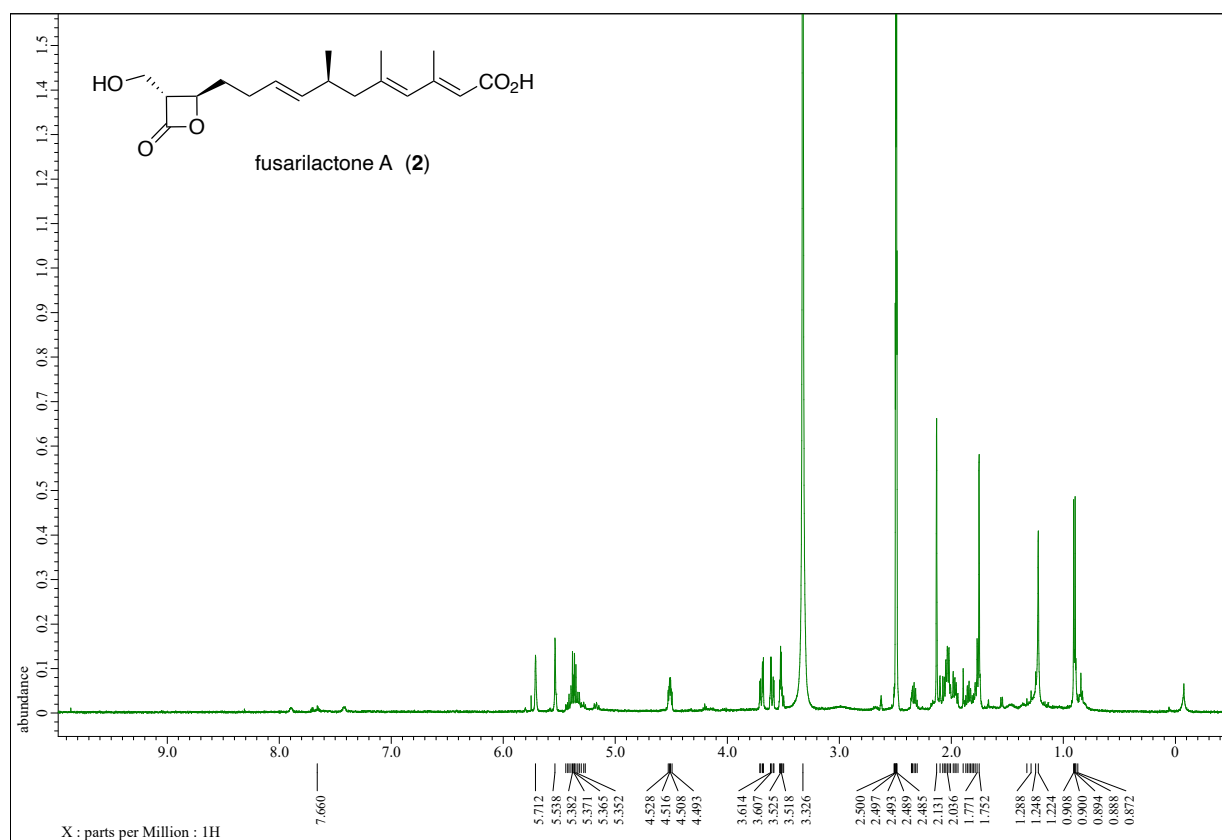
¹H NMR spectra of compound 21 (CD₃OD, 500 MHz)



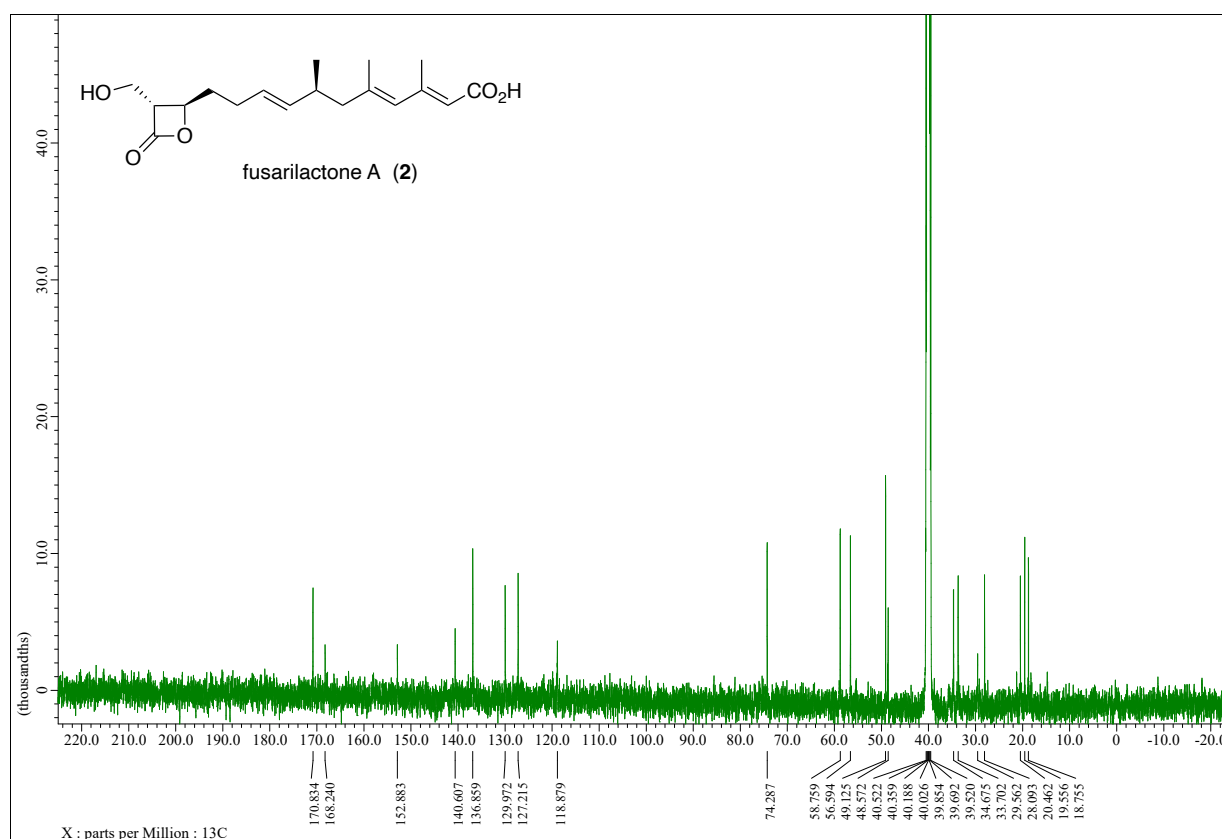
¹³C NMR spectra of compound 21 (CD₃OD, 125 MHz)



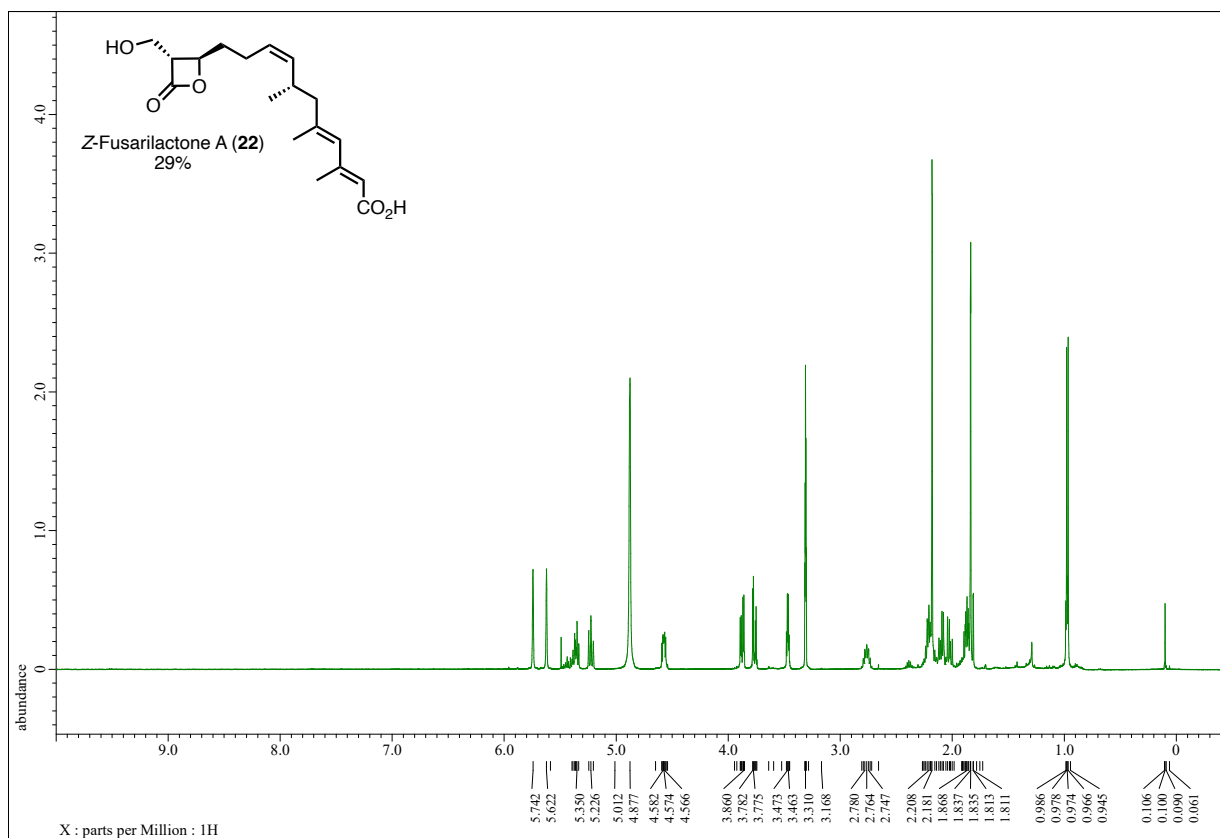
¹H NMR spectra of synthetic fusarilactone A (2) (DMSO-*d*₆, 500 MHz)



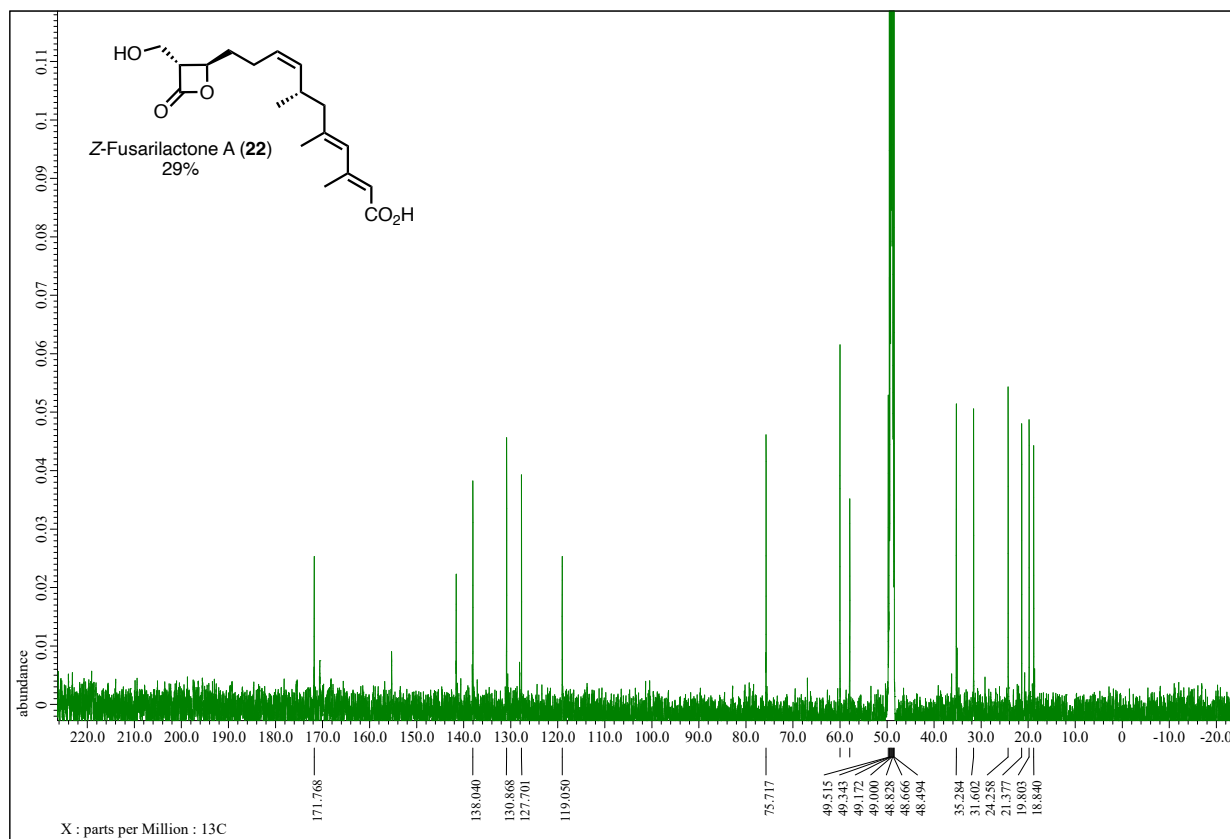
¹³C NMR spectra of synthetic fisarilactone A (2) (DMSO-*d*₆, 125 MHz)



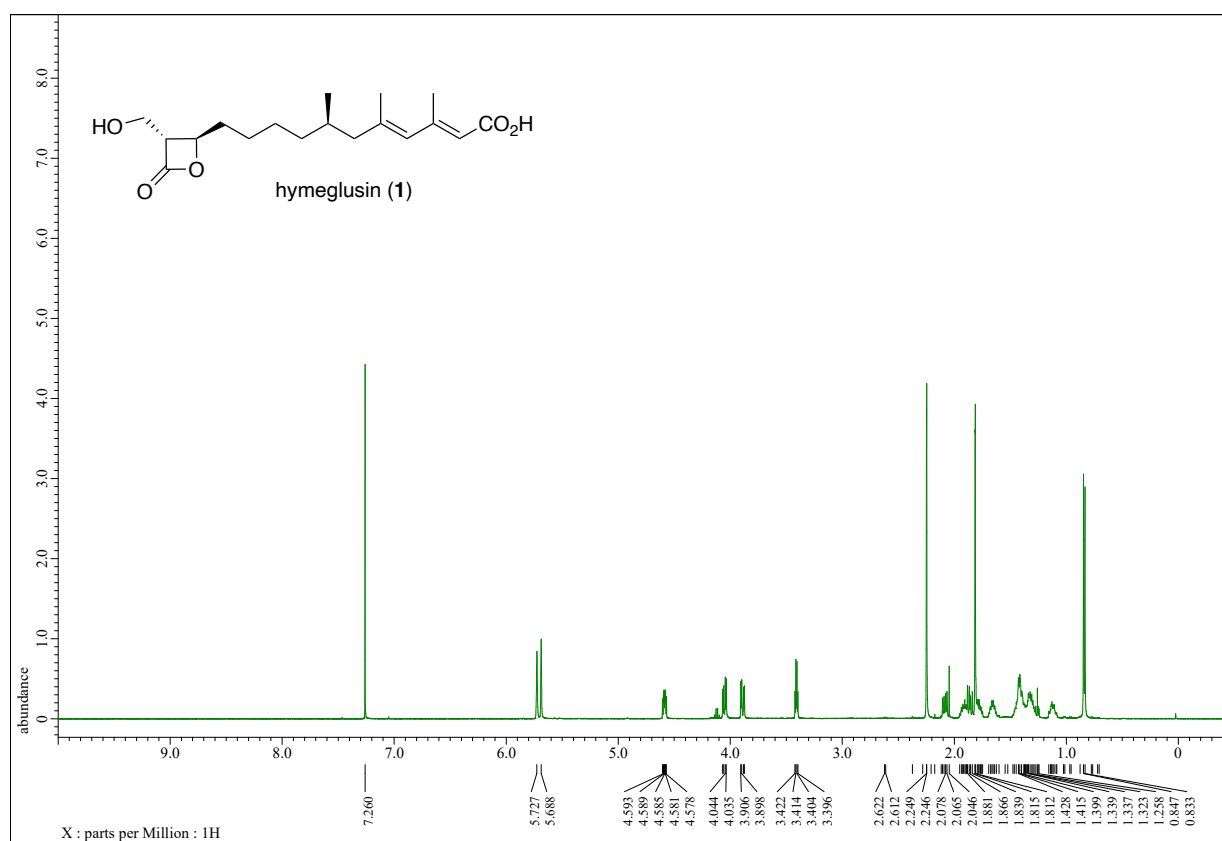
¹H NMR spectra of compound 22 (CD₃OD, 500 MHz)



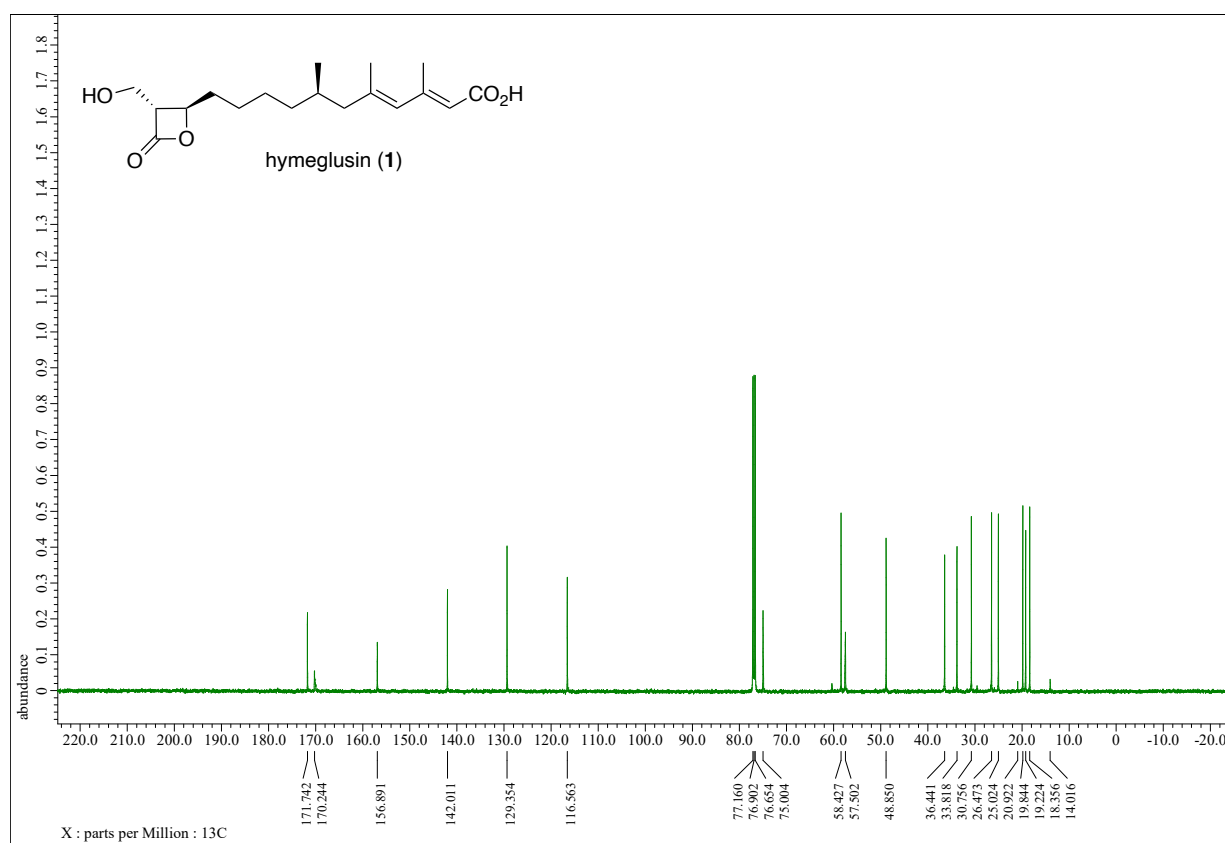
¹³C NMR spectra of compound 22 (CD₃OD, 125 MHz)



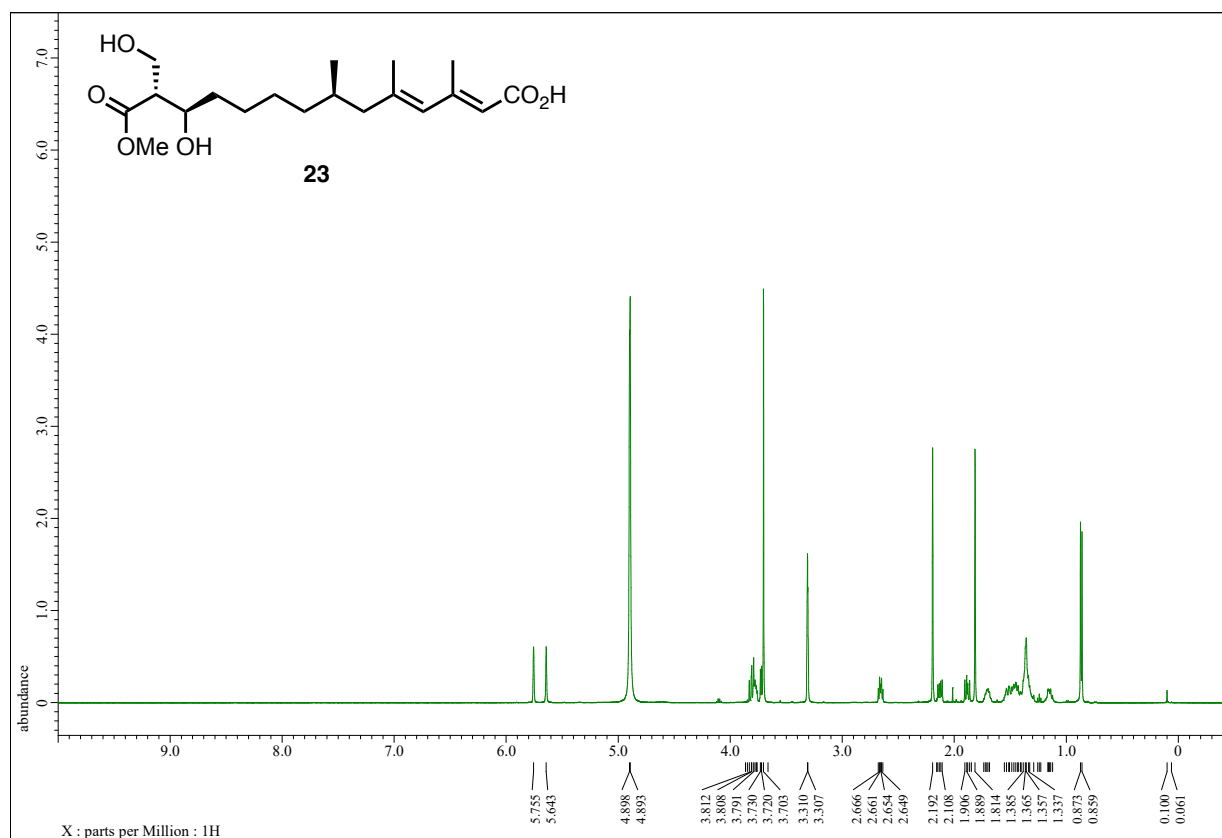
¹H NMR spectra of synthetic hymeglusin (1) (CDCl₃, 500 MHz)



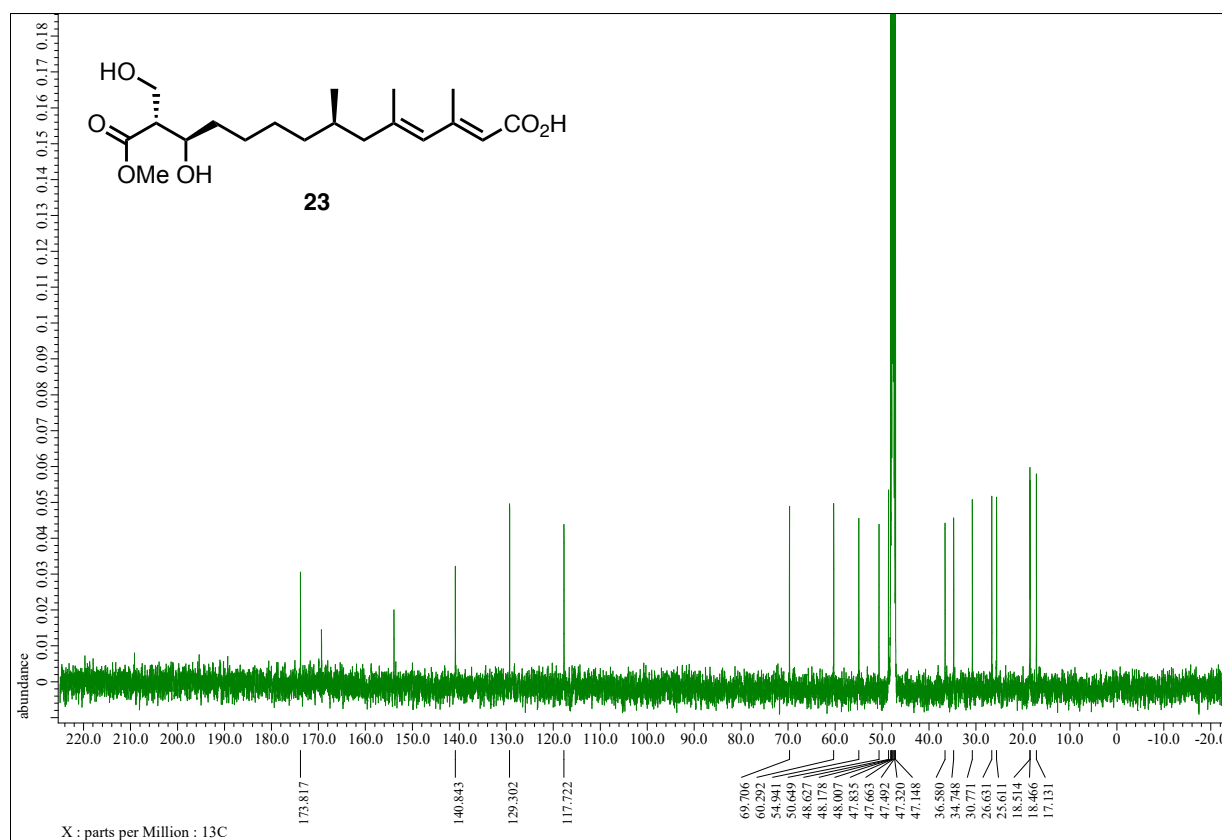
¹³C NMR spectra of synthetic hymeglusin (1) (CDCl₃, 125 MHz)



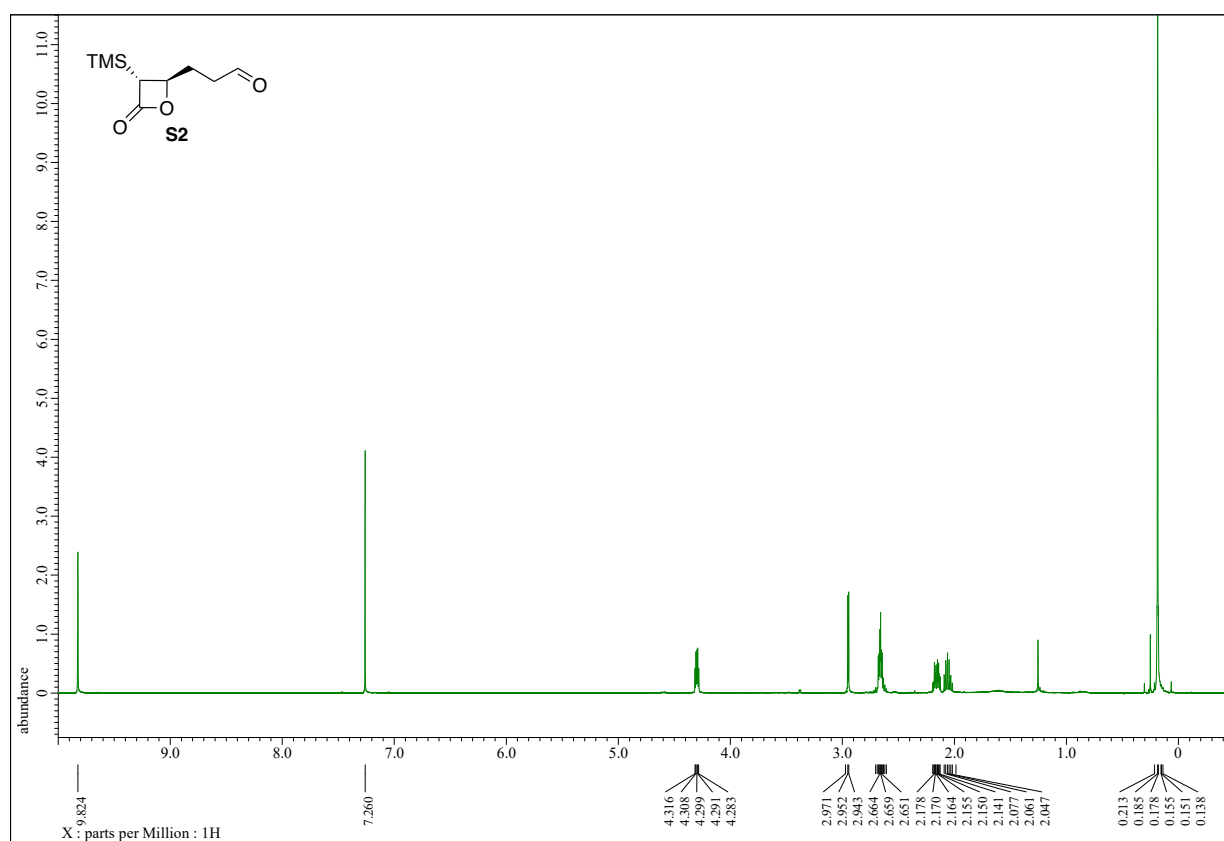
¹H NMR spectra of compound 23 (CD₃OD, 500 MHz)



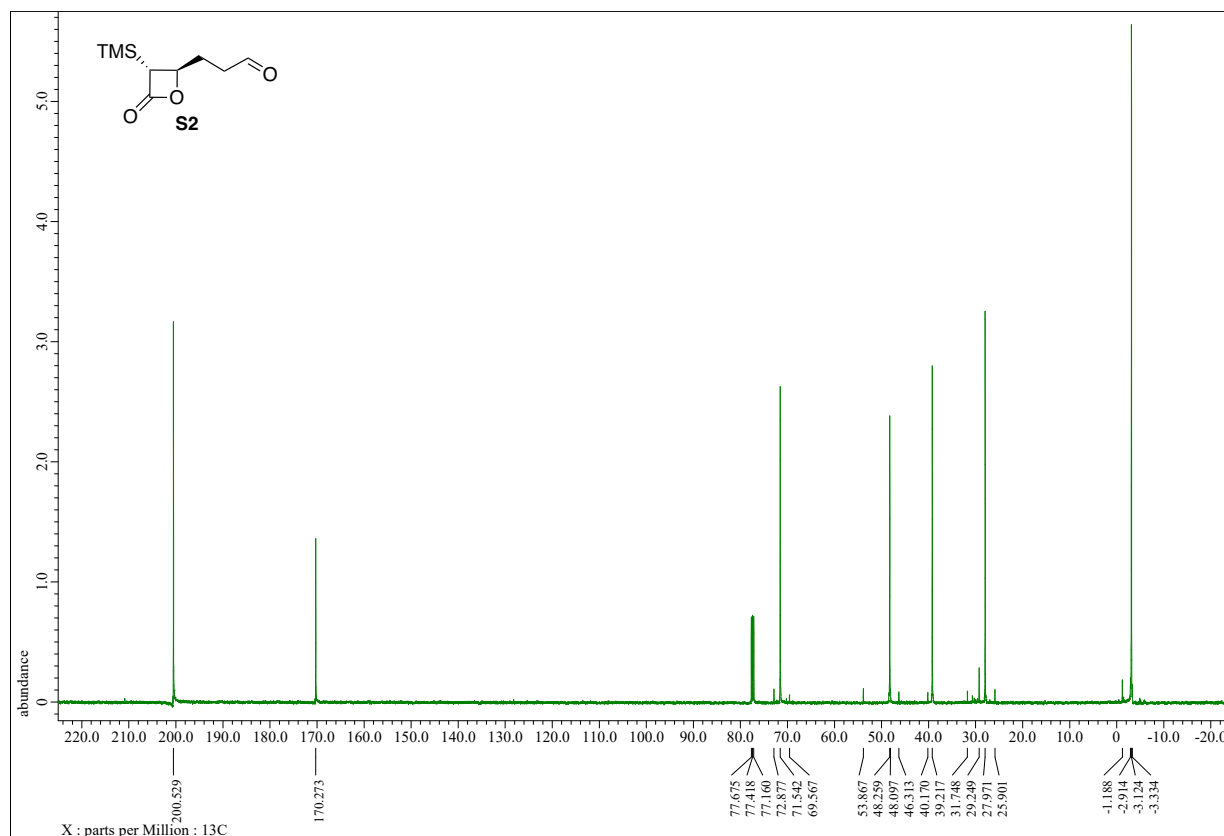
¹³C NMR spectra of compound 23 (CD₃OD, 125 MHz)



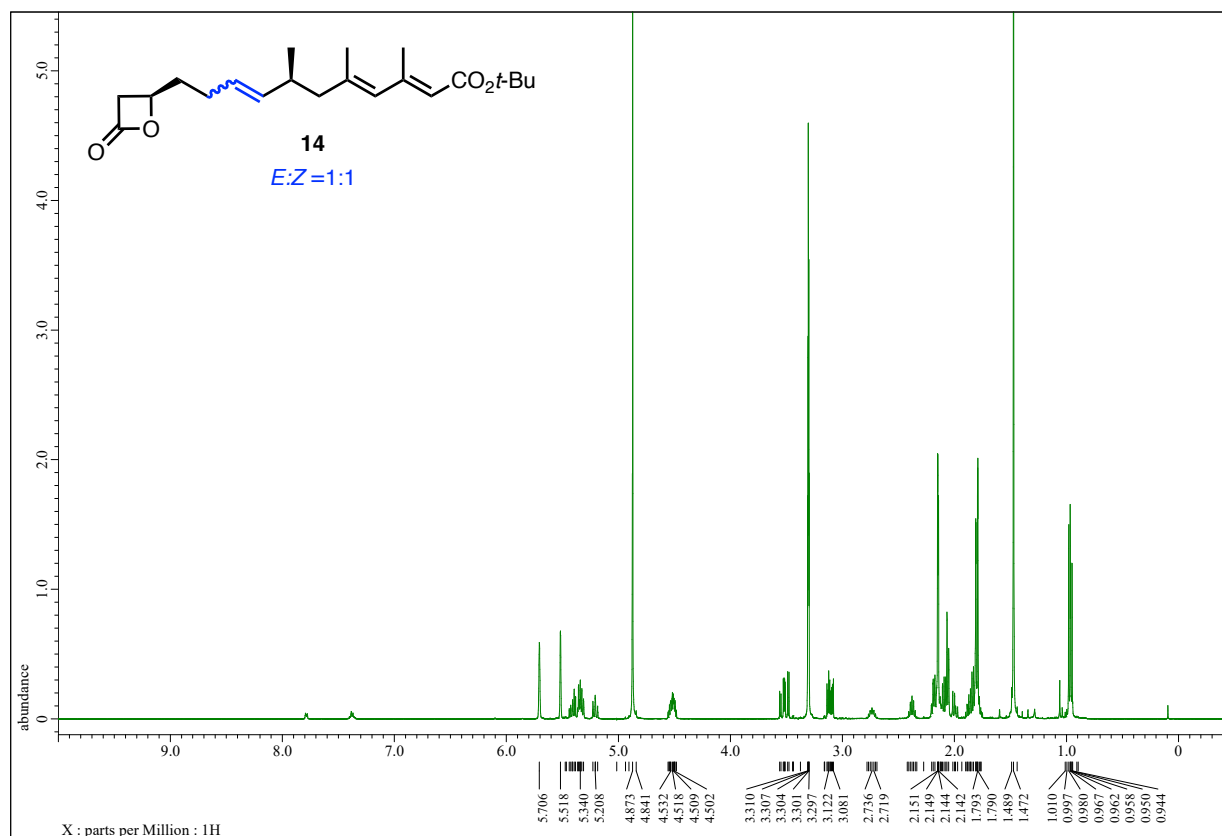
¹H NMR spectra of compound S2 (CDCl₃, 500 MHz)



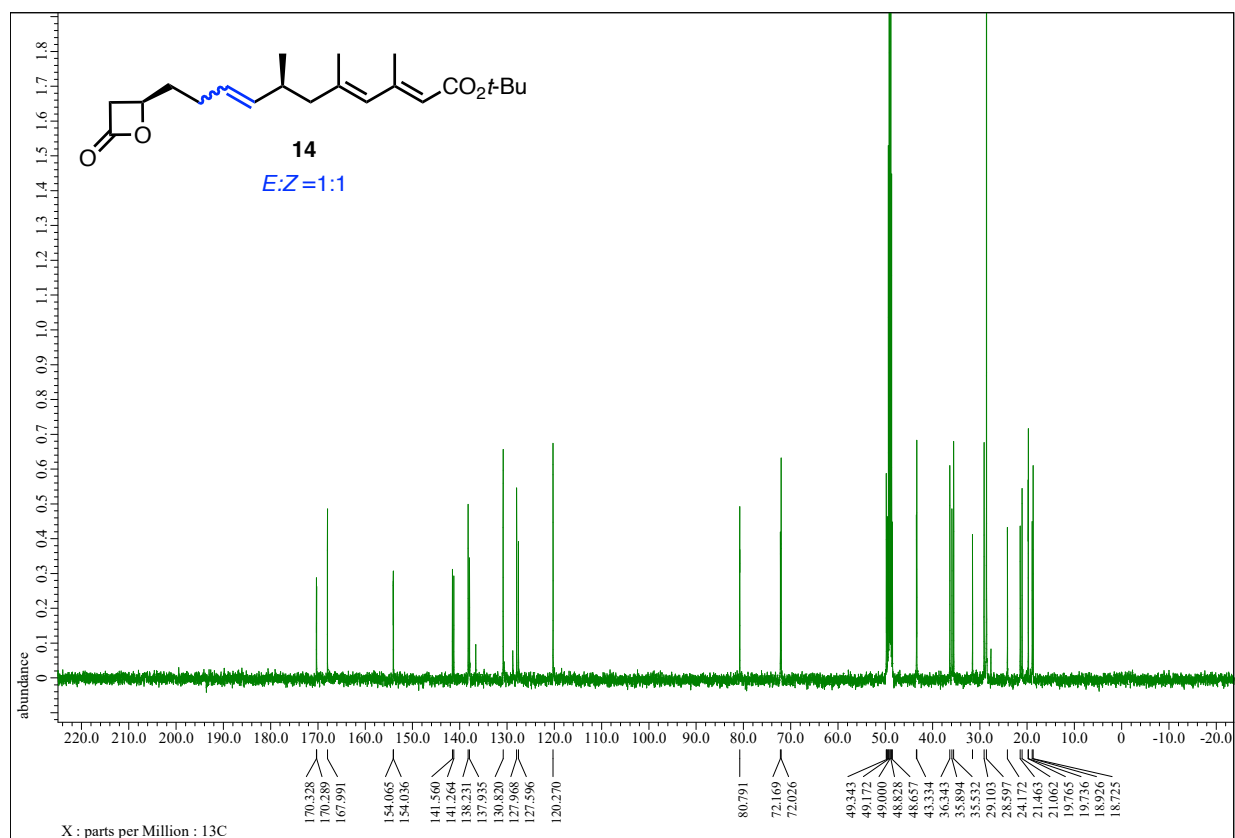
¹³C NMR spectra of compound S2 (CD₃OD, 125 MHz)



¹H NMR spectra of compound 14 (CDCl₃, 500 MHz)



¹³C NMR spectra of compound 14 (CD₃OD, 125 MHz)



第 2 章

新規 PPI 阻害剤創製を指向した中分子天然物

Dityromycin の全合成研究

1. 序論

1-1. 医薬品モダリティとしての中分子医薬

近年、がんや認知症、予防医薬などを含む疾患ニーズの拡大やアンメットメディカルニーズの認知に伴って、創薬アプローチも多様化しており、従来のスクリーニング創薬に加え、高分子医薬品である抗体医薬を主とするバイオ医薬の占める割合が高くなりつつあり(Fig. 1)。これら医薬は製造技術の観点から2つに大別され、一つは有機合成化学を基盤とした化学合成によるモダリティと、もう一方は、バイオテクノロジーを駆使した生物生産によるモダリティである。前者は主に、低分子医薬をはじめとして、合成ペプチド、核酸医薬、放射線治療薬、合成診断薬、合成ワクチンが挙げられる。また後者は、抗体医薬の発展を主として遺伝子治療薬、細胞治療薬、生ワクチン、バイオ診断薬などが分類される。

スクリーニング創薬における低分子医薬品は、微生物発酵培養法や有機合成化学の発展に伴って進歩を遂げてきたが、創薬標的の枯渇による難易度の高まりが指摘されており、減少傾向にある。また、その一方で高分子医薬品は標的疾患への選択性に優れる反面、製造費用や用途が細胞外標的に限られてしまうことが課題として挙げられる。

以下に低、高分子医薬の特徴と、これらのデメリットを克服し両者のメリットを活かすことが期待される中分子医薬について述べる。

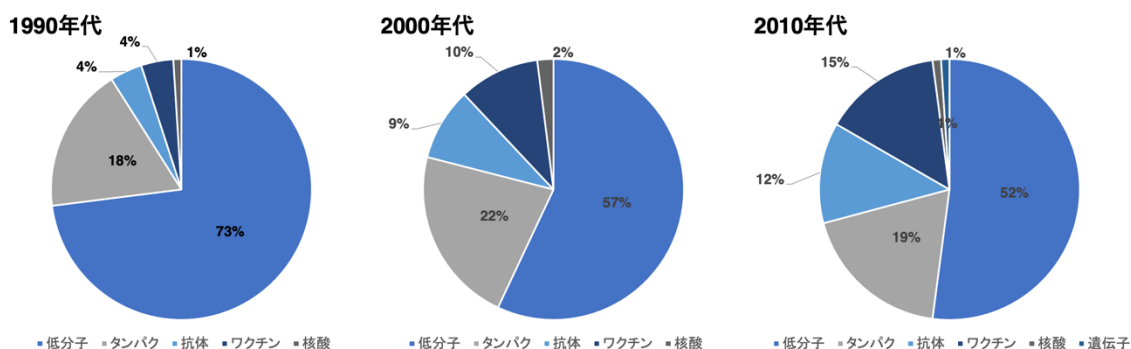


Fig. 1 上市された医薬品の割合と年代別の推移¹⁾

1-2. 低分子医薬の発展と近年の傾向

一般に低分子医薬とは、その定義を分子量 500 未満の医薬とし、これは経口剤になりやすい化合物の特徴を経験的に示した Lipinski の“Rule of 5”に基づいている²⁾。すなわち、

- ① 水素結合供与基が 5 個以下
- ② 水素結合受容基が 10 個以下
- ③ 分子量が 500 以下
- ④ 分配係数が log P として 5 以下

を挙げることができ、上記項目のうち2つ当てはまらないものとすると消化管吸収性が低く医薬品になりにくいとされる。

一方で1928年にFlemingが青カビ *Penicillium chrysogenum* より、ブドウ球菌感染症に有効な化学物質として Penicillin (Fig. 2)を発見して以降、低分子医薬を用いた化学療法は人類の福祉に多大なる貢献を果たしてきた。

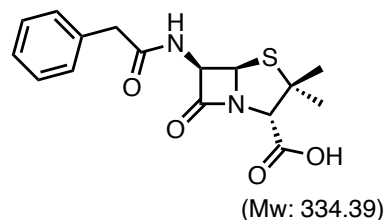


Fig. 2 Penicillin Gの化学構造

しかしながらその中でも、疾病の発症や進行の抑制、治癒を目的とする化学合成医薬の登場は、19世紀後半と比較的近年からであり、現在でも用いられる Aspirin (消炎鎮痛薬、1899年)、Acetaminophen (解熱鎮痛剤、1893年)、Heroin (鎮痛剤、1889年)などの開発に端を発する³⁾。また、1944年には Woodwardらによるマラリア治療薬の供給源としてキニーネの全合成などが報告されたが⁴⁾、当時はまだ実用的とは言い難く、化学療法の発展と有機合成化学の進歩は大きく関係している。そして化学療法の歴史は、はじめに低分子医薬を主役として興り、コンビナトリアル化合物ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニング(HTS)などの新たな技術の導入や LBDD (Ligand-Based-Drug-Design)や SBDD (Structure-Based-Drug-Design)ともに発展してきた。

しかしながら、日本における低分子医薬の上市品目数は1970年代の151品目から1980年代におけるピークの365品目を記録したものの、2010年代においては166品目と顕著に減少している (Fig. 3)。

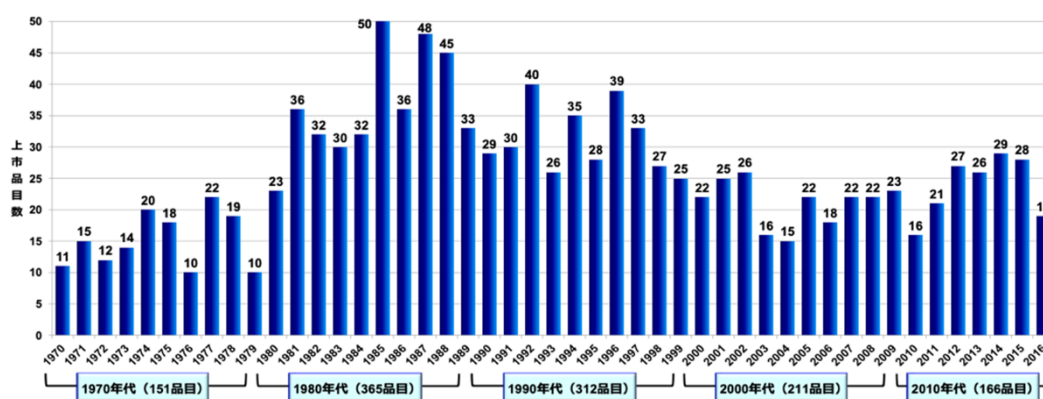


Fig. 3 低分子医薬品目数の年次推移 (1970～2016年)

(出所: Informa社のPharmaprojects™ならびにClarivate Analytics社のIntegrity™をもとに戸邊が作成したものを引用した¹⁾)

これは、低分子医薬における薬剤標的の枯渇が原因である¹⁾と考えられており、低分子医薬の新規標的分子(薬剤標的)の推移は、先に述べた上市品目数の推移と一致する。また、その中でも新規標的分子は主に酵素やトランスポーター、受容体を標的としたものが多く作用面積が小さいものが多いという特徴を見出すことができる (Fig.

4)。しかしながら、低分子医薬は 2016 年の世界の医薬品売り上げ推移においても依然として、54%と高い割合を占めていることから、研究開発の継続の必要性は高いと考えられる。



Fig. 4 新規標的分子数の年代別推移¹⁾

1-3. 抗体医薬を代表とする高分子医薬の登場

抗体医薬を代表とする高分子医薬は、1980 年の開発ブームを契機に現在、精力的に研究が展開される医薬品群である⁵⁾。抗体医薬は生体の免疫機能を利用することから、疾患への特異性が高く、低分子医薬のデメリットを克服している点も多い。主な標的疾患はガンや関節リウマチなどの自己免疫疾患、アルツハイマーなど低分子医薬では治療の困難であった疾病に威力を発揮し、アンメットメディカルニーズを満たすことが可能である。

その作用機序としては、薬剤標的分子陽性細胞膜表面を抗体が Fab 部位にて認識し、結合することで NK 細胞やマクロファージ、補体による細胞障害を誘発（抗体依存性細胞障害作用: ADCC)(補体依存性細胞障害作用: CDCC)する⁵⁾。

抗体医薬の種類としては、①マウス抗体、②キメラ抗体、③ヒト化抗体、④ヒト抗体とあり、由来となる抗体の組成によって分けることができる。抗体医薬は、それ自体が免疫系の標的となり得るので、ヒト抗体が最も血中半減期が長く抗体反応による副作用が低いと期待される (Fig. 5)。

しかしながら、抗体医薬は調製に動物を必要とする点、ヒト化抗体には遺伝子組み換えが不可欠であり、これらの要因が薬価を高額にしている。例えば、脊髄性筋萎縮症の治療薬として 2020 年に上市されたゾルゲンスマは 1 億 6700 万円の価格となり、一

般への普及はいまだ現実的とはいえない (Fig. 6)。加えて、抗体医薬は多数のジスルフィド結合を含む巨大タンパクである(約 150kDa)であるという性質であることから、細胞膜を透過することができず、薬剤標的が細胞外に限られる。

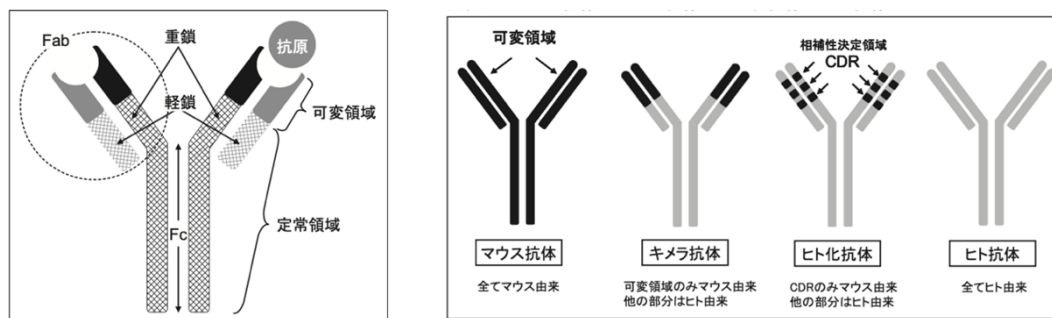


Fig. 5 抗体構造の模式図とモノクローナル抗体の種類⁵⁾

製品名	種別	収載時適応症	保険収載年月	収載時薬価 (円)	ピーク時 患者数(人)	ピーク時市場規模 (百万円)
ゾルゲンスマ	遺伝子治療	脊髄性筋萎縮症	2020年5月	167,077,222	25	4,200
イエスカルタ	細胞治療	再発または難治性の大細胞B細胞リンパ腫	2021年4月	34,113,655	232	7,900
キムリア	細胞治療	再発または難治性のCD19抗原のB細胞性急性リンパ球芽性白血病再発または再発または難治性のびまん性大細胞B細胞リンパ腫	2019年5月	33,493,407	216	7,200
ステミラック	核酸医薬	脊髄損傷に伴う神経症候および機能障害の改善	2017年8月	14,957,755	249	3,700
スピラザ	核酸医薬	乳児型脊髄性筋萎縮症	2018年5月	9,320,424	294	9,200
ヘムライブラ	抗体医薬	血液凝固第Ⅷ因子に対するインヒビターを保有する先天性血液凝固第Ⅷ因子欠乏症患者における出血傾向の抑制	2018年5月	1,552,824	117	5,000
アキラルックス	抗体医薬	切除不能な局所進行または局所再発の頭頸部癌	2020年11月	1,026,825	416	3,800
テムセル	細胞治療	造血幹細胞移植後の急性移植片対宿主病	2015年11月	884,767	260	3,500
オブジーボ	抗体医薬	根治切除不能な悪性黒色腫	2014年9月	729,849	470	3,100

Fig. 6 直近高額の薬価を算定した製品⁶⁾

1-4. 新たな薬剤標的・タンパク質間相互作用 (Protein-Protein Interaction: PPI)

上述してきた低、高分子医薬はメリットがあるもののそれぞれ薬剤標的に制限がある。そのような背景のもと、現在、新たな薬剤標的として注目を集めるのがタンパク質間相互作用 (Protein-Protein Interaction: PPI)である。

“インタラクトーム”と称される生体分子の相互作用は、タンパク質を起点とした相互作用であり、対応する分子によって①タンパク質間相互作用、②タンパク質-核酸相互作用、③タンパク質-小分子相互作用に大別される。

インタラクトームの中でも、PPI は生体内のタンパク質分子間に起こる相互作用の総称であり、人体の信号系を構築する約 65 万の PPI は、恒常性を維持するネットワークを構築している。PPI の特徴としては、作用面の広さが挙げられ (1,500-3,000 Å)、従来の低分子医薬品とタンパク質の接触面積(300 - 1,000 Å)と比較すると、標的となり得る領域が非常に広く、多面的な標的認識が可能となり特異性が向上することがわかる。しかしながら PPI は生体内において多数のタンパク質が関与し非常に複雑かつ動的に相互作用ネットワークを形成していることから解析が困難であるため、阻害剤の探索はいまだ容易とはいえない(Fig. 7)。現在、PPI の研究論文数は増加を続けており、2016 年は 2,549 件であり 2000 年の件数の約 3 倍となっていることから、次世代の薬剤標的としての開拓が期待される。

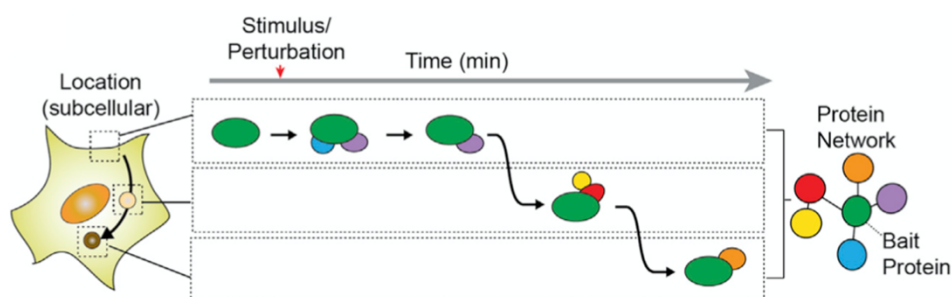


Fig. 7 刺激/摂動への応答における動的PPIsネットワークの模式図⁷⁾

そして創薬モダリティの中でも PPI を標的とし得る化合物群は中分子医薬であり、以下にその特徴と上市されている医薬品について述べる。

1-5. 新たな創薬モダリティ・中分子医薬

医薬品モダリティの中でも低、高分子の中間に位置する中分子医薬は、高分子医薬と比較して分子量が2桁以上小さくなることで(分子量 500-3000 程度)、蓄積された有機合成化学的な手法が適用可能となり、従来とは異なる薬剤標的の開拓が可能となることがメリットとして期待される。

また構造的観点から見た中分子化合物は、高 F_{sp^3} 係数⁸⁾を示すことで、柔軟なコンフォメーションをとり多彩な生物活性を示す。以下の表に低、中、高分子医薬の特徴とそのメリット、デメリットの比較を記す (Fig. 8)。

	低分子医薬	中分子医薬	高分子医薬	
分子量	～500	500～2000	15万程度	Advantages
経口投与	○	△	×	・高い F_{sp^3} 係数を示す(全炭素中の sp^3 炭素の割合)
細胞膜透過性	◎	○	×	・有機合成化学的手法による分子修飾が可能。 標的タンパクを多点認識するため、疾患への 特異性が高い薬剤の創製が期待される。
PPI阻害	×	◎	◎	
コスト	安価	比較的安価	高価	

Fig. 8 低、中、高分子医薬の比較と中分子医薬の利点

中分子医薬の一例として、マクロライド系抗菌薬である中分子医薬 Erythromycin (Fig. 9)は、従来のグラム陰性桿菌に対する抗菌作用に加えて、消化管ホルモンであるモチリンのアゴニストやびまん性気管支炎などの抗炎症作用が報告されている⁹⁾。また、免疫抑制剤である Cyclosporin A (Fig. 9)はTリンパ球によるインターロイキン-2,4,5,13やインターフェロン- γ などのサイトカイン転写を特異的かつ可逆的に抑制し、サイトカイン産生と遊離を抑制する¹⁰⁾。加えて Cyclosporin A はミトコンドリアに作用することでアポトーシスを誘導するシトクロム c の放出を抑制する作用も報告されており、多彩な生物活性を示す。加えて特筆すべきは、細胞膜を透過することで細胞膜内タンパクを標的としていることである¹¹⁾。

このようにいくつかの中分子化合物はその生物活性と細胞膜透過性、PPI 阻害によって薬剤開発の成功例として、顕れ始めている。

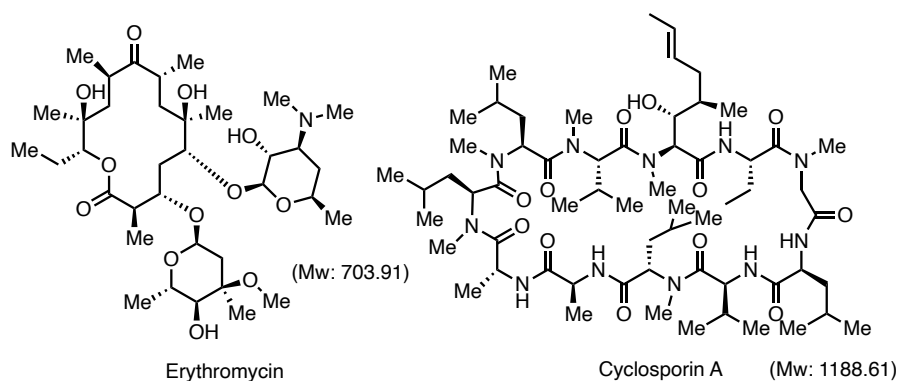


Fig. 9 ErythromycinとCyclosporin Aの化学構造

1-6. 中分子天然物 Dityromycin (1)

本研究の合成標的である Dityromycin (1) は、1977 年に北里研究所の大村らによって放線菌 *Streptomyces* sp. AM-2504 株の培養液より単離および活性報告がなされた天然物である¹²⁾。その後、手嶋、大村らによって天然物の分解実験による

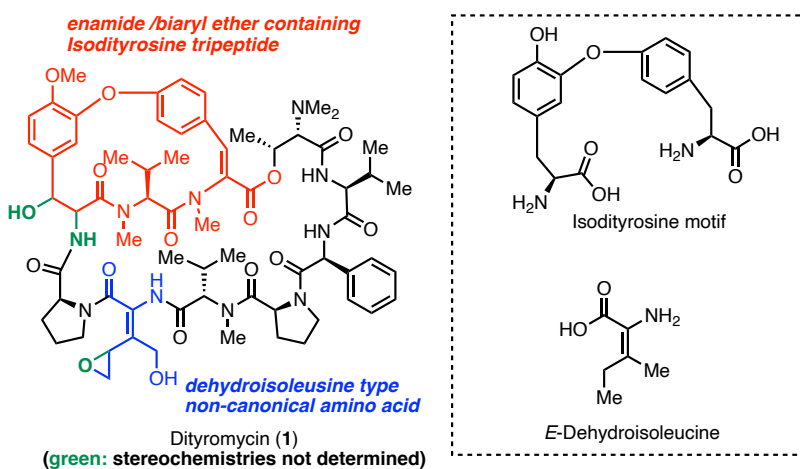


Fig. 10 Dityromycin (1)の化学構造

部分構造の決定や Marfey 法を用いたアミノ酸の立体化学の決定が行われ、1988 年に図に示すような化学構造を有することが明らかとなった (Fig. 9)¹³⁾。

構造的特徴としては、エナミド/ビアリアルエーテルを含有するイソジチロシン型環状トリペプチドとデヒドロイソロイシンがエポキシド、アリルアルコールへと高度に酸素官能基化された異常アミノ酸を有する。なお、単離報告から 45 年が経過した現在もなお、この異常アミノ酸部位の絶対立体化学は明らかとされていない。

またその生物活性として **1** は、*Bacillus subtilis* や *Bacillus cereus* を含む偏性好気性菌や偽膜性大腸炎の原因細菌として知られる *Clostridioides difficile* をはじめとする偏性嫌気性、好気性細菌に対して抗嫌気性菌活性を有する Luminamicin や Vancomycin に匹敵する抗菌活性を示す (Table 1)。

Table 1. Dityromycin (1)、Luminamicin、Vancomycinの各種病原性細菌における抗菌活性

一般細菌

strain	MIC(μg/ml)		
	Luminamicin	Dityromycin	Vancomycin
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA209P	>64	>64	1
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	>64	>64	2
MRSA Low resistance	>64	>64	1
MRSA High resistance	>64	>64	1
MRSA 70	>64	>64	0.5
MRSA 92-1191	>64	>64	1
<i>Staphylococcus aureus</i> Macrolide resistance ①	>64	>64	1
<i>Staphylococcus aureus</i> Macrolide resistance ②	>64	>64	1
MRSA Mu50	>64	>64	8
MRSA LZD-resistant strain⑥	>64	>64	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	>64	>64	1
<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC9341	8	>64	1
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	>64	64	4
<i>Enterococcus faecalis</i> NCTC12201(VanA)	>64	64	>128
<i>Enterococcus faecium</i> NCTC12204(VanA)	>64	>64	>128
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	>64	>64	>128
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC8090	>64	>64	>128
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC9632	>64	>64	>128
<i>Proteus mirabilis</i> IFO3849	>64	>64	>128
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	>64	>64	>128
<i>Morganella morganii</i> IID Kono	>64	>64	>128
<i>Serratia marcescens</i> IFO12648	>64	>64	>128
<i>Enterobacter cloacae</i> IFO13535	>64	>64	>128
<i>Enterobacter aerogenes</i> NCTC10006	>64	>64	>128

嫌気性細菌

strain		MIC(μg/ml)		
		Dityromycin	Luminamicin	Vancomycin
<i>Clostridium difficile</i>	KUB2978	8	2	1
<i>Clostridium difficile</i>	KUB2996	8	2	0.5
<i>Clostridium difficile</i>	KUB2994	8	2	0.5
<i>Clostridium perfringens</i>	KUB2981	8	0.5	1
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	KUB2980	8	0.5	0.5
<i>Parvimonas micra</i>	KUB2999	4	32	0.5
<i>Parvimonas micra</i>	KUB3000	4	32	1
<i>Eggerthella lenta</i>	KUB2979	8	8	2
<i>Olsenella uli</i>	KUB3012	0.25	8	1
<i>Bulleidia extructa</i>	KUB3013	8	>32	1
<i>Atopobium rimae</i>	KUB3014	1	16	2
<i>Bacteroides fragilis</i>	KUB3003	32	16	64
<i>Bacteroides fragilis</i>	KUB2982	2	8	64
<i>Bacteroides fragilis</i>	KUB2983	2	8	32
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	KUB2977	>32	>32	128
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	KUB2984	32	32	128
<i>Bacteroides ovatus</i>	KUB3008	32	16	>128
<i>Bacteroides ovatus</i>	KUB3009	32	16	128
<i>Prevotella histicola</i>	KUB2989	1	32	>128
<i>Prevotella intermedia</i>	KUB2991	1	4	64
<i>Prevotella melaninogenica</i>	KUB3005	1	32	32
<i>Prevotella buccae</i>	KUB2992	4	32	128
<i>Fusobacterium varium</i>	KUB2741	>32	>32	>128
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	KUB2742	>32	16	No data
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	KUB3010	32	16	No data
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	KUB3002	1	8	No data
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	KUB3001	0.5	4	No data

1 はこれまでに全合成研究の報告はない一方で、**1** における生化学的研究は多くの研究者によって報告がなされており、その薬剤標的は細菌のタンパク質合成の場である 70S リボソーム中に存在する 30S サブユニットの S12 タンパクと呼ばれるドメインである。加えてその結合様式の X 線共結晶構造図の取得も明らかとされている。**1** は S12 タンパクと結合することで、翻訳伸長因子 EF-G (Elongation factor-G) との PPI を阻害する。

以下の項目にその詳細について述べる。

1-7. 細菌のタンパク合成における翻訳伸長因子 EF-G の役割とメカニズム

生物の生育に必須なタンパク質合成の過程は、DNA から mRNA を経由して転写が行われ、リボソーム内にて tRNA を介して翻訳が行われるというセントラルドグマに従う。リボソームは真核生物と原核生物にて構造が異なり、それぞれ粒子の沈降係数に従って 80S リボソーム、70S リボソームと呼ばれる。細菌のタンパク質の合成は以下の段階を経て進行する¹⁴⁾。

1) tRNA の 2' または 3' に対して特異的なアミノ酸がアミノアシル tRNA 合成酵素 (Fig. 11) の触媒作用を受けエステル結合し活性化される。

開始コドン(UAA, UAG, UGA)に対応する開始 tRNA はメチオニンを最初のアミノ酸残基とし、ホルミル化を受けて tRNA^{fMet} となる。

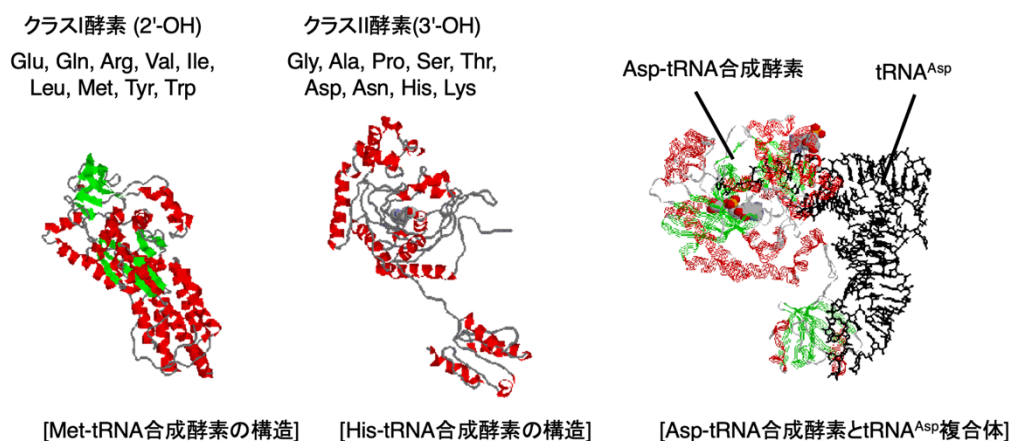


Fig. 11 *E. coli* アミノアシルtRNAおよびtRNA複合体の構造と分類¹⁴⁾

2) 不活性リボソームの 30S サブユニットに開始因子 3(IF-3) と開始因子 1(IF-1) が結合し、リボソームを解離する。続いて、GTP、mRNA、IF-2、Formyl-メチオニンが結合した開始 tRNA(fMet-tRNA^{fMet}) 複合体が 30S サブユニットの P 部位に結合する (Fig. 12)。

3) 不活性リボソームの 30Sサブユニットに開始因子 3(IF-3)と開始因子 1(IF-1)が結合し、リボソームを解離する。GTP、mRNA、IF-2、Formyl-Met を結合した開始 tRNA(fMet-tRNA^{fMet})複合体が 30Sサブユニットの P 部位に結合する。

4) IF-3 の遊離に続き、50S サブユニットが 30Sサブユニットに結合した GTP を加水分解しつつ、この複合体に結合する。IF-1 と IF-2 が離れ、次に tRNA^{fMet} が結合する。これにさらに 50Sサブユニットが付き、複合体が完成する。

5) 成長ペプチド鎖の C 末端にアミノ酸をつける3段階反応サイクルでタンパク質がつくられる。

- i) mRNA のコドンに対応するアミノアシル-tRNA-EF-Tu-GTP 複合体がリボソームの A 部位へ結合する。
 - ii) A 部位のアミノアシル-tRNA のアミノ基が P 部位の tRNA を求核置換し、ペプチド結合を形成する(ペプチド転移)。
 - iii) アミノ酸を放して空となった tRNA が P 部位を離れる。
 - iv) A 部位のペプチジル-tRNA が mRNA ごと P 部位に移動し(転座、トランスロケーション)、GTP を結合した EF-G が A 部位に結合する。
 - v) EF-G が GTP を加水分解してリボソームを離れ、1)から始まる次のサイクルに入る。
- このサイクルを繰り返すことで、1秒間に3〜5個のアミノ酸が連結されていく。

ここで EF-G とは、*fusA* 遺伝子¹⁵⁾にコードされる 704 個のアミノ酸残基よりなるタンパクであり、ドメイン I ～ V から構成される。N 末端側にドメイン I は GTP (グアノシン 5'-3 リン酸)加水分解酵素である GTPase との結合部位であり、ドメイン IV は、リボソーム 30S サブユニットと結合し^{16,17)}、mRNA と tRNA を A 部位から P 部位へ押し出すトランスロケーションを行う。また、EF-G の 5 つのドメイン I ～ V はさらに、5 つの 2 つのスーパードメインへ分けられる。スーパードメイン I はドメイン I と II から成り、スーパードメイン II はドメイン III～V から成る。

トランスロケーションの過程を通じて、スーパードメイン I はリボソームへの緊密な結合を担っており、構造は比較的变化しない。一方で、スーパードメイン II は、トランスロケーション前 (PRE) 状態からトランスロケーション後 (POST) 状態へ、大きな回転移動が起こる。POST 状態のスーパードメイン II は EF-Tu-GTP-アミノアシル tRNA 三者複合体の tRNA 分子を擬態している (分子擬態)。

このように細菌のタンパク合成における EF-G の作用は明らかとされているものの、そのダイナミクスは依然として未解明な点が多い。近年、Dityromycin (1)は S12 タンパク

と結合することにより EF-G との PPI を阻害することから、翻訳時における EF-G の立体構造の解明に利用されてきた^{18,19)}。

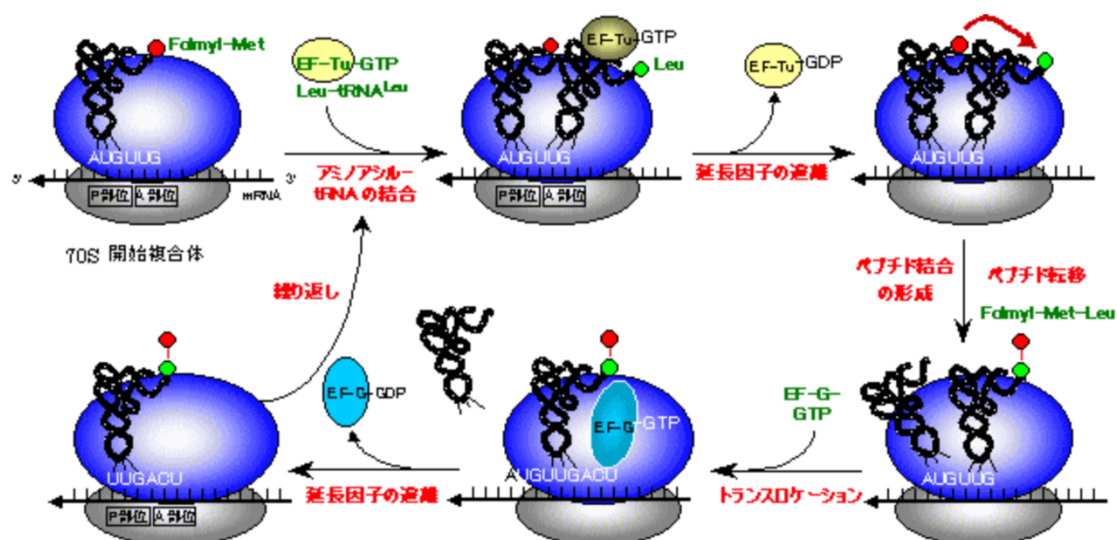


Fig. 12 *E. coli* タンパク合成におけるペプチド鎖の伸長の模式図¹⁴⁾

1-8. Dityromycin (1)を利用した EF-G の構造解明

Thermus thermophilus の S12 タンパクと Dityromycin (1)の X 線共結晶構造図¹⁸⁾

2014 年に Steitz らは、好気高熱性細菌 *Thermus thermophilus* の EF-G と 1 の X 線共結晶構造図を取得し、そのホットスポットを示している。

本報告より以前は、1 が 70S リボソーム中、特に 30S サブユニットと結合することは、50S サブユニットと 1 を前処理してもタンパク合成に影響しないことから示唆されていた。

Steitz らは、1 と S12 タンパクの X 線共結晶構造図により、1 のビアリアルエーテル部位と S12 タンパク中の Arg30、およびアリルアルコール部位と His76、*N,N*-ジメチルアミノ基と Arg55、1 の(*S*)-フェニルグリシンに含まれるベンゼン環と His76 がそれぞれ多面的に疎水性相互作用もしくは水素結合することを示した (Fig. 13)。さらに *E. coli* のリボソーム S12 タンパクにおいて His76 をアルギニン、リシン、グリシンもしくは、バリンをアスパラギン酸へとミューテーションを行った株においては、1 に対する耐性化を確認している。一方で抗生物質 Streptomycin は細菌の 23S rRNA に結合しコドンのミスリードを誘発するが、放射性同位体ラベリングアミノ酸を用いた mRNA の翻訳精度の検証において 1 は、コドンのミスリードを誘発していなかった。さらに S12 タンパクに隣接する S13 タンパクの機能を欠損させたミュータントの抗菌活性試験においても 1 は抗菌活性を維持したことから、1 の薬剤標的は S12 タンパクのみであることが明らか

となった。30S リボソームの P 部位から A 部位に位置する S12 タンパクは、EF-Tu のシグナル伝達に関与し、His76 (1 の結合サイト)が重要であることが知られている。

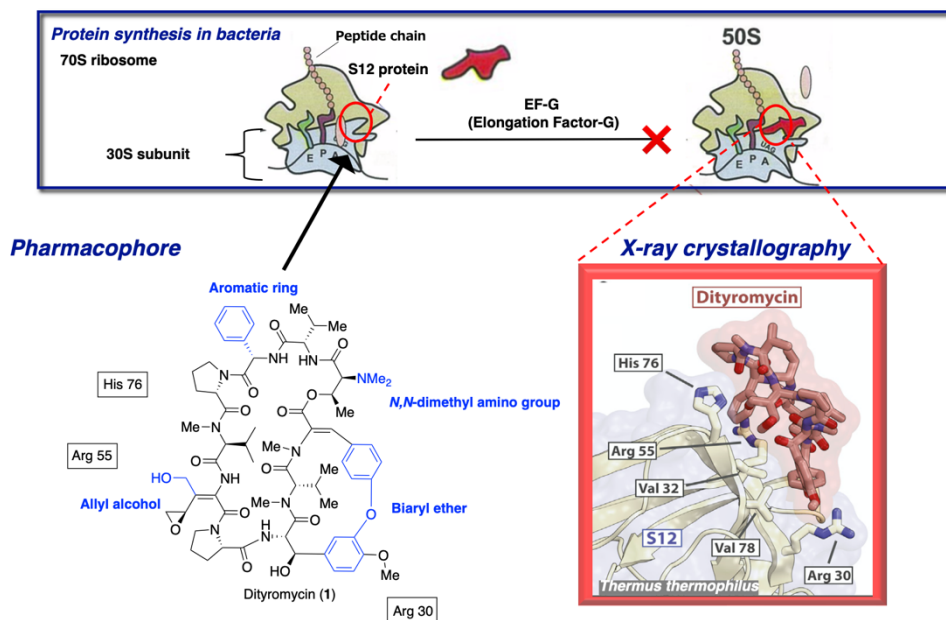


Fig. 13 好気高熱性細菌 *Thermus thermophilus*のS12タンパクとDityromycin (1)のX線共結晶構造図¹⁹⁾

PRE/POST translocation における EF-G のコンフォメーションの変化¹⁹⁾

2014 年における Dytiromycin (**1**)と S12 タンパクの X 線共結晶構造図の取得から翌年、Steitz らは 70S リボソームを **1** によって前処理した系において S12 タンパクと EF-G の PPI を阻害し、EF-G の PRE トランスロケーション時の立体構造を可視化することに成功した。本報告によると EF-G は PRE/POST トランスロケーションの前後においてスーパードメイン I に構造的変化は見られないものの、スーパードメイン II が伸長する大きな構造変化が起こるとされている (Fig. 14)。

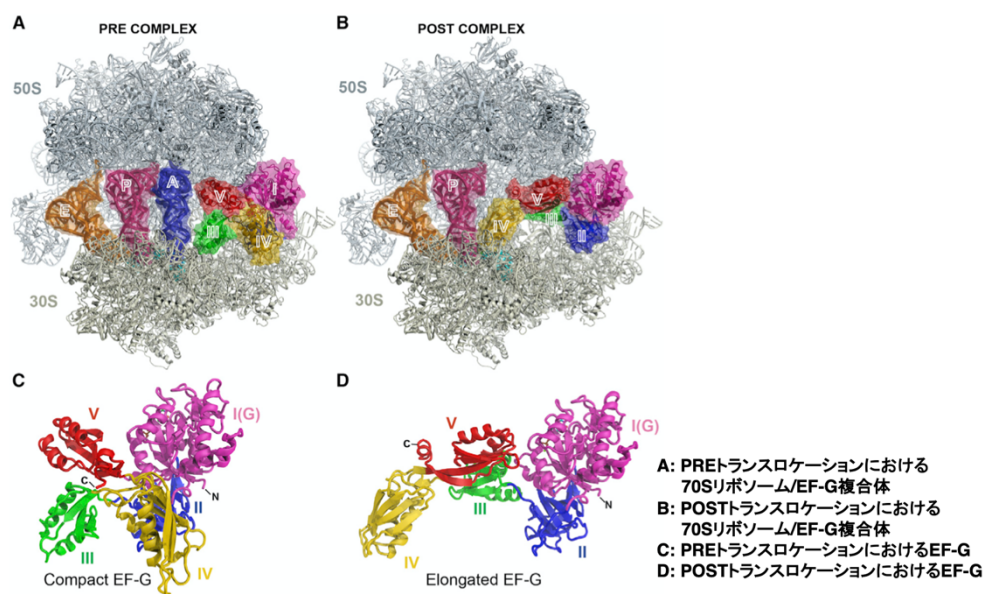


Fig. 14 好気高熱性細菌 *Thermus thermophilus*の70SリボソームとEF-GのX線結晶構造図¹⁹⁾

1-9. Dityromycin (1)をリード化合物とした創薬研究

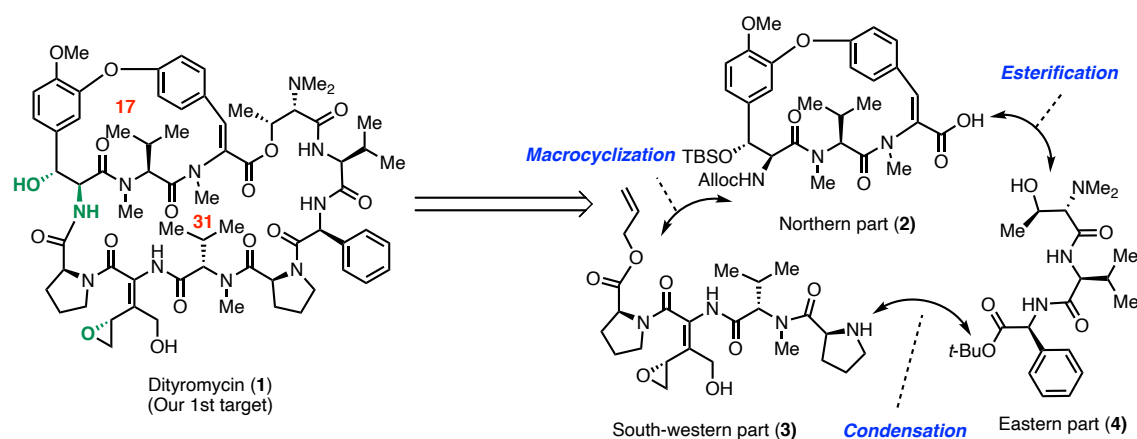
このように興味深い化学構造および、SBDDに基づく創薬展開を有利に進めることの出来る情報から **1** を創薬リードとした創薬研究を展開する意義は非常に大きいと考えられる。天然物 **1** を用いた創薬研究の展開としては、1977 年の大村らの取得以降、北里大学大村智記念研究所において、800 mg 程度のストックが保管されている。しかしながら、筆者が再度、生産菌の培養による天然物の取得を試みたところ、**1** の生産性は大きく減少しており、種々培地、培養条件の検討においても十分量の **1** は得ることができなかった。

そこで演者は、**1** の安定的な供給経路の確立および、**1** をリードとした誘導体合成、また未解明な絶対立体化学の決定に際しては、全合成経路の確立が有効であると考え、研究を開始することとした。

2. 本論

2-1. Dityromycin (1)の逆合成

Dityromycin (1)の全合成を目指すにあたって筆者は、のちの誘導化を効率的に行うことの出来る収束的な合成戦略を立案した。すなわち、**1**を3つのフラグメント、Northern part (2), South-western part (3)、Eastern part (4)に分割し、それぞれの合成経路を確立した上で、合成終盤にて縮合していくことで全合成を目指すというものである (Scheme 1)。なお、はじめに Scheme 1 に示した立体化学を有する **1** を合成標的として実験を開始した。これは、Steitz らによる X 線共結晶構造図においては電子密度が低いために断定は出来ないものの、天然物 **1** が有する可能性の最も高い立体化学である。



Scheme 1 Dityromycin (1)の逆合成

逆合成の着眼点として、31 員環形成を伴うマクロ環化反応は、反応点が近づき難い場合や、ダイマー化が懸念される。そこで **2** を起点として **4**、**3** を順次、縮合した環化前駆体 **5** を設定し、疎水性相互作用によって反応点が近づきやすくなる位置にて環化反応を試みることとした。さらに、**5** の鎖状ペプチド部位にはプロリンが2分子含まれている。プロリンは鎖状ペプチドにおいて、分子を歪曲させる作用が経験的に知られており、環化反応時において反応点を近づけることを期待した。

そして本合成の重要な点として、**1** に含まれる異常アミノ酸部位は **2** と **3** に含まれており、これらをどのようにして合成するかが鍵である。

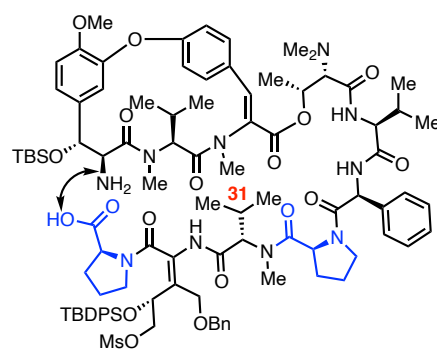
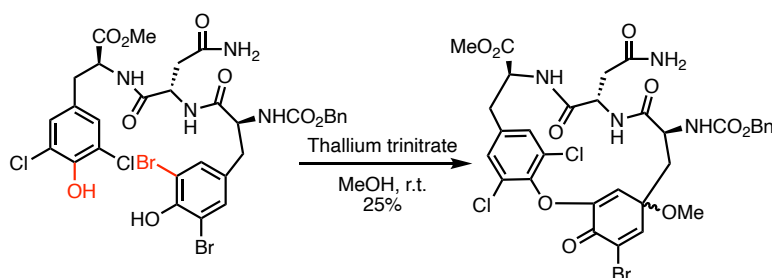


Fig. 1 環化前駆体 5

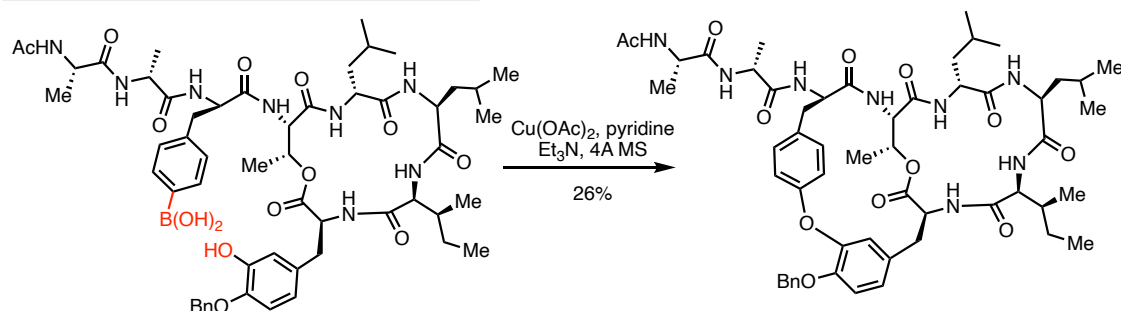
2-2. Northern part (2)合成の初期検討と逆合成

Northern part (2)を合成する上で鍵となるのが、17 員環を形成する環化反応である。一般に高度に官能基化されたイソジチロシン型環状トリペプチドは鎖状構造が熱力学的に安定なコンフォメーションであり、歪んだ環形成反応はいくつかの全合成研究において低収率にとどまることが報告されている (Scheme 2)^{20,21)}。

山村らによるOF4949-IIIの全合成²⁰⁾



HuttonらによるSeongusanamide Bの全合成²¹⁾

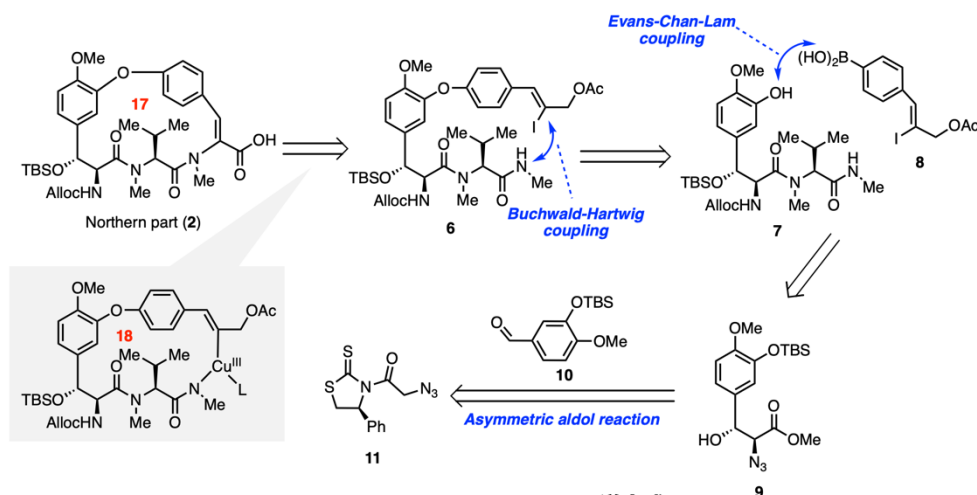


Scheme 2 山村²⁰⁾、Hutton²¹⁾らの全合成研究におけるイソジチロシン型環状トリペプチドの合成

これらの報告からもわかるように環化反応の位置はビアリールエーテル形成に伴う Ullmann カップリングや酸化的カップリング、Evans-Chan-Lam (ECL)カップリング、 S_NAr 反応²²⁾が選択肢として挙げられるが、ECL カップリングを除くいずれの反応も強塩基性、加熱条件を要するため、基質の分解を観測するケースが多い。一方で、あらかじめビアリールエーテルを構築したトリペプチドにおける分子内縮合反応による環化は Hutton が報告している通り、目的物が得られないため、活性化エネルギーの障壁を越えることは困難であることが予想される²¹⁾。

そこで筆者は、2 の有するエナミド構造に着目した。エナミドの合成は一般にエナミンとカルボン酸の縮合においては、エナミンのイミンへの互変異性による求核性の低下から進行せず、Schmidt ら²³⁾や大船ら²⁴⁾によって確立された Horner-Wadsworth-Emmons 反応による手法や、遷移金属触媒を用いた Buchwald-Hartwig (Goldberg)カップリング反応²⁵⁾が知られている。そこで筆者は特に、2 の合成において後者の反応条件を適用した場合、カップリング反応における遷移状態が、金属を介した 18 員環を

経由し、環歪みがわずかながら解消できると期待した。以下に分子内 Buchwald-Hartwig カップリングを環化の鍵反応とした **2** の逆合成を示す (Scheme 3)。

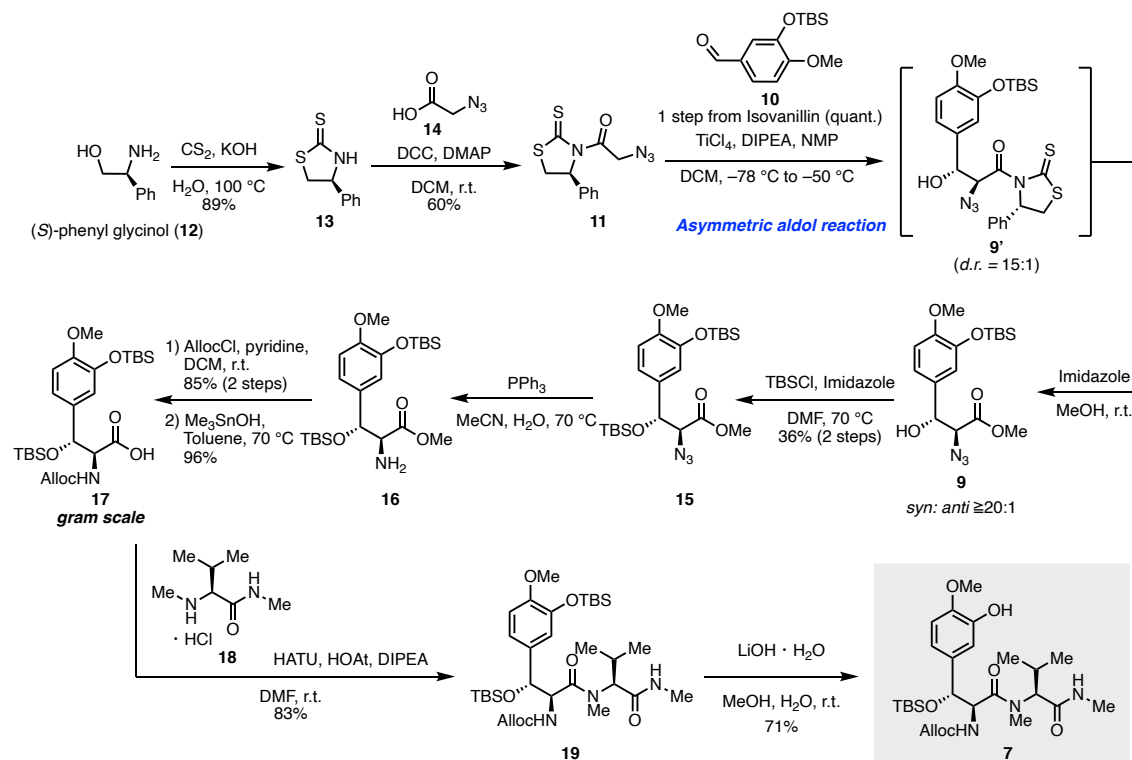


Scheme 3 Northern part (**2**)の逆合成

2 は、合成終盤における Buchwald-Hartwig カップリングによって形成可能なものとし、その前駆体をビアリールエーテル **6** とした。**6** のビアリールエーテル構築に関しては穏和かつ化学選択的に反応が進行する ECL カップリングを用いることとし、ジペプチド **7** から導くこととした。 β -ヒドロキシチロシン **9** の立体化学に関しては、Franck らによって報告されたチアゾリンチオン **11** を不斉補助基とした不斉 aldol 反応²⁶⁾によって構築するものとした。本研究の目的の一つは、**1** の絶対立体化学の決定であるため、aldol 反応の不斉補助の立体化学を切り替えることで、**9** の立体化学の作り分けができるものとした。

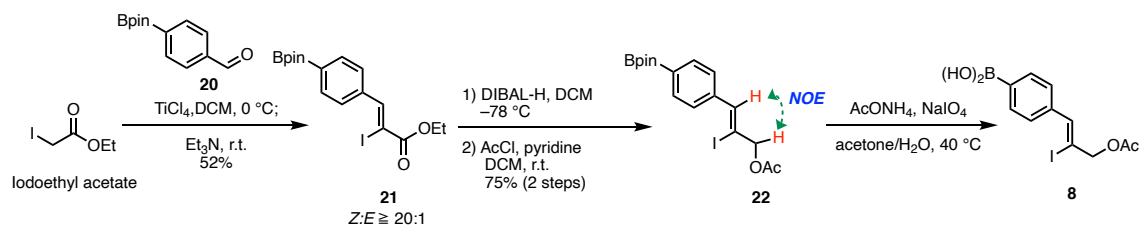
文献に従って調製したチアゾリンチオンにアジド酢酸を縮合したアミド **11** に対し、ベンズアルデヒド **10** を反応させ **9'** へと導き、ワンポットで加溶媒分解することで **9** を合成した。なお、加溶媒分解せず、**9'** の段階にて単離することで、¹H NMR からジアステレオ比を確認したところ、*dr* 比は 15:1 であった。そのため **9** におけるエナンチオ比も同様の値であると判断した。さらに単離した **9** の ¹H NMR を確認したところ、*syn: anti* \geq 20:1)であることを確認している。得られた **9** に対して TBSCl を作用させシリル化を行い、アジドを Staudinger 還元によって第一級アミンとし Alloc 基にて保護を行った。続いて、メチルエステル基に対し、LiOH \cdot H₂O を用いた加水分解を試みたところ、目的の加水分解と合わせて、フェノール部位における脱 TBS 化が併発したことから、化学選択的な加水分解が可能な Me₃SnOH を用いた反応条件によって β -ヒドロキシチロシン **17** をグラムスケールにて合成した。**17** に対しバリンユニット **18** を HATU を作用させ縮合することでジペプチド **19** とし、先のメチルエステル基の加水分解にてフェ

ノール選択的な TBS 基の除去を行うことができることを見出した $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ によって ECL カップリング前駆体として **7** を得た。



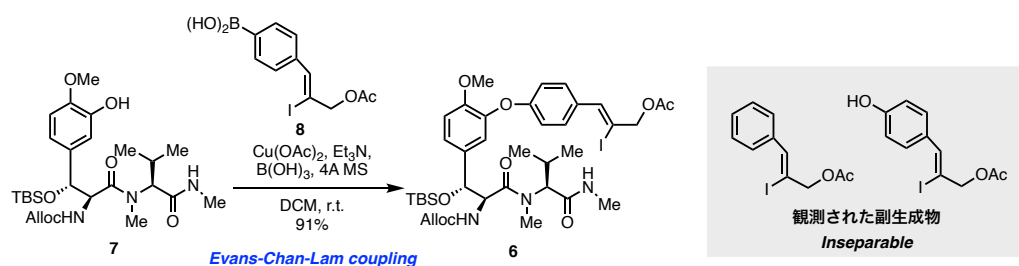
Scheme 4 ジペプチド **7** の合成

一方で **7** のカップリングパートナーである **8** の合成に関しては、ヨード酢酸エチルを原料に Augstin らの報告した TiCl_4 を作用させた Z エノラートを経由する Z-ビニルヨージドを与える aldol 縮合²⁷⁾により **21** を合成した ($Z:E \geq 20:1$) (Scheme 5)。そしてエチルエステル基の還元が続くアリルアルコールの Ac 基による保護によって **22** を合成した。なお、**22** の幾何に関しては、ビニルプロトンとアリル位メチレンプロトンの NOE 相関を観測することによって確認している。そして **22** に対して NaIO_4 を作用させ、ピナコールボランをボロン酸 **8** へと導いた。なお、**8** はカラムクロマトグラフィーによる精製操作に不安定なことが確認されたため、反応の後処理後、後の ECL カップリングに供することとした。



Scheme 5 アリールボロン酸 **8** の合成

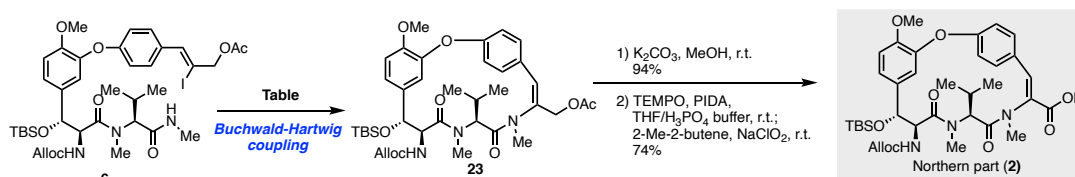
得られた **7** と **8** を用いて ECL カップリングを試みたところ、カップリング体 **6** は得られたものの、**8** においてボロン酸が脱離した化合物や系中の水と反応したフェノールが分離困難な副生成物として優先する結果となった。そこで、**7** に対して **8** を 10 当量用いた反応条件を試みたところ、副反応は併発するものの **6** を 91% という良好な収率で得ることができた (Scheme 6)。



Scheme 6 Evans-Chan-Lamカップリングの検討

そして、**6** に対して CuTC、Cs₂CO₃ を用いて環化反応²⁵⁾を試みた (Table 2)。はじめに Cu 触媒の溶媒兼リガンドとなり得る溶媒に焦点を絞り、*N,N'*-dimethyl acetoamide、1,3 dimethyl imidazolidinone、NMP (*N*-Methyl-Pyrrolidone) を検討したところ、NMP を用いた室温の条件において目的の **23** を 60% (brsm = 99%) の収率にて合成することができた (Entry 1, 2, 3)。そして、反応の効率化を図り、温度条件を検討したところ、40 °C において **23** を 86% の高収率にて合成可能な経路を確立することができた。そして **23** のアセチル基を除去し、TEMPO 酸化、Pinnick 酸化をワンポットにて行うことで **2** の合成を完了した。

Table 2. Buchwald-Hartwigカップリングの検討



Entry	Condition	Solv. (Temp.)	Results
1	CuTC, Cs ₂ CO ₃	1,3- dimethyl imidazolidinone (r.t.)	No reaction
2	CuTC, Cs ₂ CO ₃	<i>N,N'</i> -dimethyl acetoamide (r.t.)	16%
3	CuTC, Cs ₂ CO ₃	NMP (r.t.) (3 days)	60% (brsm: 99%)
4	CuTC, Cs₂CO₃	NMP (40 °C) (24 h)	86%

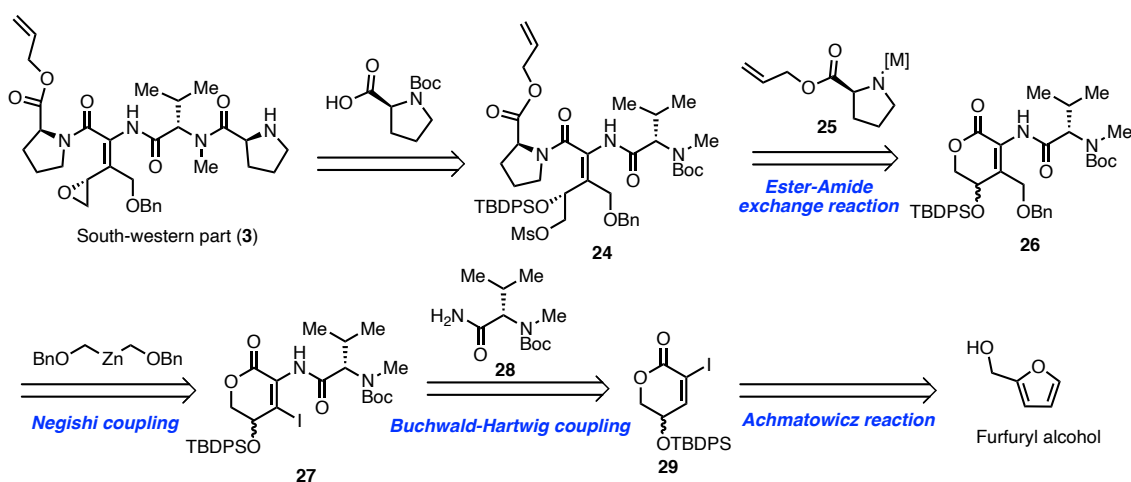
2-3. South-western part 等価体 37 の合成

South-western part (**3**)の逆合成に関して、**3**は、エナミド構造とそのアリル位に位置するエポキシド、アリルアルコールよりなる4置換オレフィンの特徴とする。そこで筆者は、エナミドを含む4置換オレフィンを構築の鍵として、以下の合成戦略を立案した (Scheme 7)。**3**の前駆体をトリペプチド **24** とし、*N* 末端に *N*-Boc-L-Pro-OH を縮合し Boc 基を除去することでテトラペプチドへと導けるものとした。なお、アミノ酸 *N* 末端の保護基の選定基準としては、**3** や **24** の有するエナミド構造の反応性を考慮して Boc 基を設定した。すなわち、一般にアミノ酸 *N* 末端の保護基として用いられる Fmoc 基や Cbz 基はそれぞれ、有機塩基を作用させる手法や水素添加反応による還元的条件によって保護基の除去を行う。しかしながら、これらの条件を適用した場合、エナミドの γ 位の脱プロトン化に伴う異性化や、接触水素化によるエナミドの還元が懸念された。

24 は、バリンとエナミド構造を介して縮合した δ -ラクトン **26** に対し、L-Pro 金属種 **25** を作用させたエステルアミド交換反応によって合成可能なものとし、**26** の4置換オレフィンの構築に関しては、根岸クロスカップリング、Buchwald-Hartwig カップリングによって順次官能基化していくこととした。

そして δ -ラクトン **29** の合成に関しては、文献を参考に Furfuryl alcohol から、Achmatowicz 反応を用いた数工程の変換によって得られるものとした²⁸⁾。

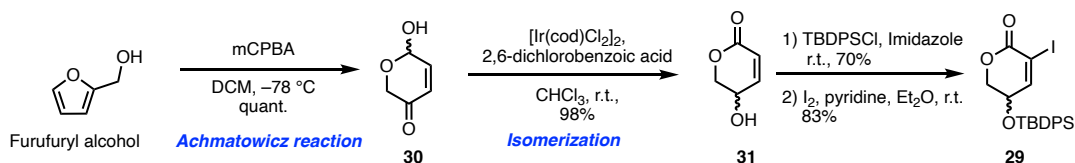
なお、本研究の目的は、**1** の絶対立体化学の決定であるため、**3** の合成は、ラセミ体 **29** を出発原料としてエポキシド部位における両ジアステレオマーを調製可能なものとして設計した。



Scheme 7 South-western part (**3**)の逆合成

はじめに Furfuryl alcohol を原料に mCPBA を作用させた Achmatowicz 反応によって酸素官能基化されたシクロヘキセン **30** を調製した。続いて Tang らによって報告された水素移動を伴う異性化²⁹⁾によってシクロヘキセノン **31** へと導き、生じたアリルア

ルコール を TBDPS 化し、塩基性条件下、ヨウ素を作用させることでビニルヨージド **29** を合成した (Scheme 8)。



Scheme 8 シクロヘキセノン **29**の合成

そして、Hartwig らがビニルハライドとアミドのカップリング反応として報告している条件を参考に反応³⁰⁾を試みたところ、目的のカップリング成績体 **32** を 9% と低収率ながらも取得することが出来た (Table 3, Entry 1)。しかしながら、原料も高収率で回収されたことから、Cu 触媒が系内で失活し触媒サイクルが停止していることが示唆された。そこで Entry 2 においては、触媒、リガンドの当量を増量して反応を試みたところ、原料は全て消失したものの、**32** の収率は 14% と僅かな向上にとどまった。加えて Entry 1 においては第二級アミンであるリガンド **33** と **29** がカップリングした副生成物も取得されたことから、次なる最適化として触媒を過剰量加えてもカップリング反応の起こらない第三級アミンである *N,N'*-ジメチルアミノグリシン塩酸塩 **34** を用いて検討を行うこととした (Entry 3, 4)。Entry 3 においては目的物の収率が 26% と向上したため、本条件を基に Cs₂CO₃ の当量を最適化したところ、参考文献の条件より過剰量加えた系において収率を 43% まで向上させることが出来た (Entry 4)。しかしながら、最適化した本条件はグラムスケールの量的供給では再現性に乏しかった。そこで、用いる触媒の金属種を Pd へと変更し、さらなる最適化を試みたところ、Pd₂(dba)₃、リガンドとして Xantphos を用いた系において、安定的に **32** を 70% の収率にて得る条件を見出すことができた。

Table 3. Buchwald-Hartwigカップリングの検討

Ligands

33

34

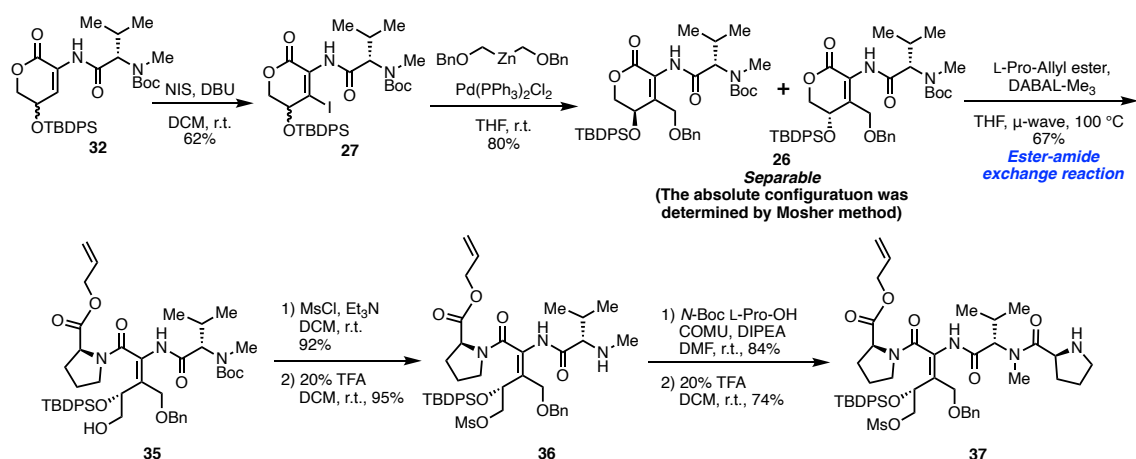
Side product

Entry	condition (eq.)	Ligand (eq.)	Base (eq.)	Solvent	32	Side product	SM
1	CuI (0.05)	33 (0.1)	Cs ₂ CO ₃ (2.0)	Toluene (70 °C)	9%	ca. 5%	57%
2	" (0.25)	"	" (2.0)	" (70 °C)	14%	-	0%
3	" (0.5)	34 (0.5)	" (2.0)	Dioxane (65 °C)	26%	-	0%
4	" (0.5)	"	" (3.0)	" (65 °C)	43%	-	0%
5	Pd ₂ (dba) ₃ (0.5), MS 3A	Xantphos (0.5)	Ag ₂ CO ₃ (3.0)	Toluene (65 °C)	70%	-	0%

こうして得られた **32** に対し、NIS を作用させることで、エナミド構造を利用した β 位選択的なヨウ素化、すなわちエナミドのヨードニウムカチオン生成に続くイミン形成によるヨウ素原子の導入によって **27** を取得した (Scheme 9)。そして、別途調製したアルキル Zn 種を Pd 触媒存在下、作用させることで 4 置換オレフィンを含む **26** を合成した。なお、この段階において両ジアステレオマーは分離することができたため、TBDPS 基を除去し、アリルアルコールを Mosher エステル化することで、ジアステレオマーの立体化学をそれぞれ決定した (機器データについては実験項を参照)。

そして分離した単一ジアステレオマー **26** に対し、L-Pro ユニットの導入を行うこととした。しかしながら、初期検討として **26** を加水分解し H-Pro-OBu との縮合反応を試みたところ、**26** は加水分解されたのち容易に分子内縮合し原料への戻り反応が観測された。そこで、L-Pro ユニットの導入するもう一つのアプローチとして L-Pro-Al 種を用いたエステルアミド交換反応を検討した。

はじめに Me_3Al を Al 源として用いた条件においては目的のトリペプチド **27** を得ることができたものの、再現性を欠く結果となった。これは、 Me_3Al 試薬が空气中で不安定であり、部分的に失活しているためであると考えられ、購入した試薬のロット差によっても収率のばらつきが観測された。そこで DABAL- Me_3 を Al 源としたエステルアミド交換反応³¹⁾を検討することとした。本試薬は、空气中でも安定に取り扱うことができると報告されており、試薬の当量、温度条件を検討したところ、マイクロ波照射下、 100°C の反応条件にて、目的の **35** を 67% の収率にて安定的に供給する経路を確立することができた。続いて、開環の結果生じたホモアリルアルコールを Ms 化し、L-Val 残基の Boc 基を TFA で処理することで除去し、**36** とした。そして、N-Boc-L-Pro-OH と COMU を用いて縮合しテトラペプチドとし、L-Pro 残基の Boc 基を TFA で処理して除去することで South-western part 等価体 **37** の合成を完了した。



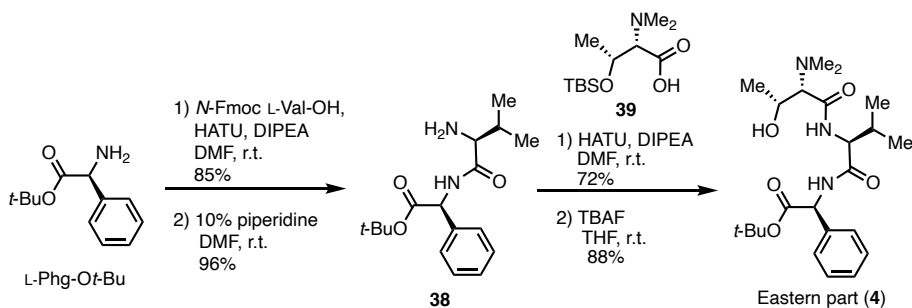
Scheme 9 South western part等価体 **37** の合成

2-4. Decapeptide (42)の合成

Eastern part (4)と Decapeptide (42)の合成

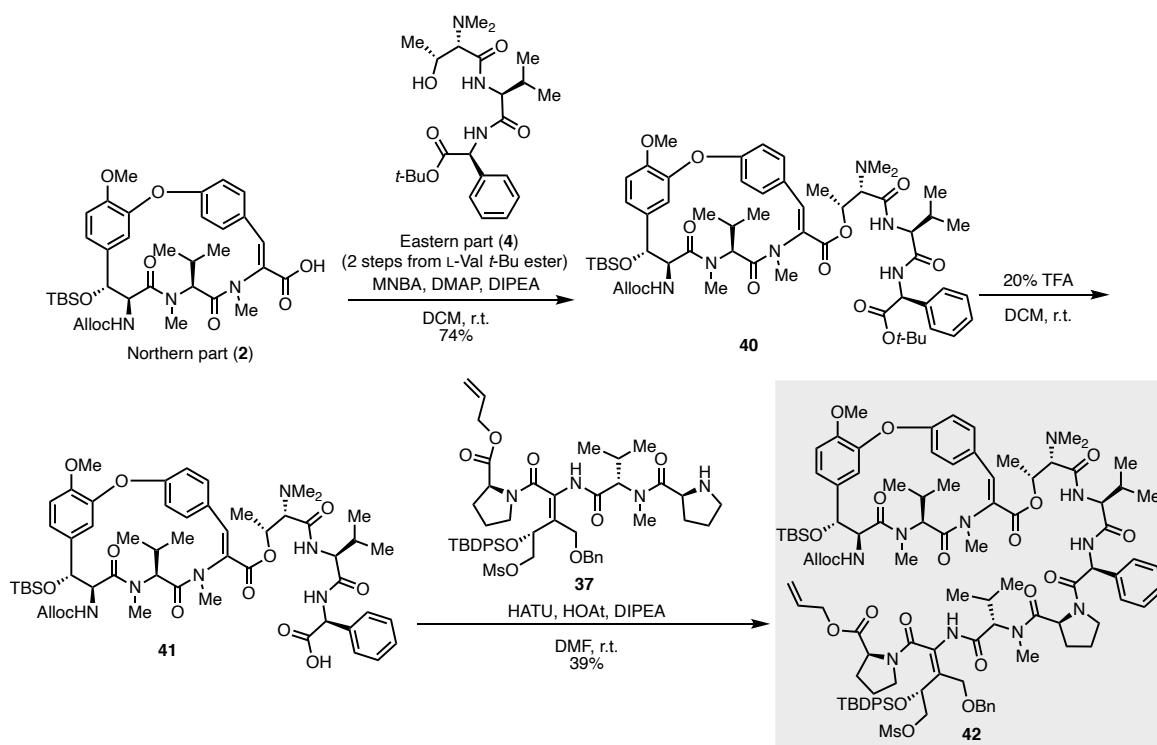
こうして **1** に含まれる全ての異常アミノ酸部位 (化合物 **2** および **37**)の構築法が確立できたため、全合成に向け両化合物を Eastern part (**4**)を介して縮合する検討を行うこととした。

4 の合成に関しては、はじめに市販の L-Phg-O*t*-Bu に対し、Fmoc-L-Val-OH を縮合することで、ジペプチドとし、Fmoc 基をピペリジンによって除去することで **38** を合成した (Scheme 10)。そして別途調製した、*N,N'*-dimethyl L-Thr-OH **39** との縮合によってトリペプチドとしたのちに TBAF を作用させ TBS 基を除去することで **4** の調製を完了した。



Scheme 10 Eastern part (**4**)の合成

続いて先に合成した Northern part (**2**)と **4** のエステル化を行ったところ、椎名試薬を用いた条件にて目的の Hexapaptide (**40**)を 74%と良好な収率にて合成することができた。そして **40** の *t*-Bu エステル基を TFA にて処理することで除去し、先に調製した **37** と HATU を作用させることで縮合し、目的の Decapeptide (**42**)の合成を完了した。



Scheme 11 Decapeptide **42**の合成

2-5. 環化反応の検討

Decapeptide **42** が取得できたため、Alloc 基、Allyl エステル基の脱保護を $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ 、Morpholine にて行い環化前駆体 **5** とし、環化反応の検討を行った (Scheme 12)。はじめに縮合剤として HATU を用いた条件を試みたところ、目的の環化体 **43** は観測されず、単離には至らなかったものの第一級アミンと HATU が反応した副生成物を系内の ESI-Mass 解析によって検出した (Fig. 15)。一般に HATU や COMU などのウロニウム系縮合剤は、アミノ酸の立体障害が大きい場合、望みの活性エステルへのアミンの求核攻撃に先行してアミンが HATU と反応しグアニジンの形成が副反応として観測される。**5** においても活性エステルは生

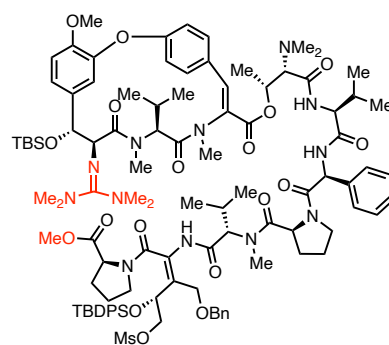


Fig. 2 Side product (推定構造)
(Detected on ESI-Mass when used HATU)

成し、ESI-Mass の測定溶媒である MeOH と反応したことが、メチルエステルの生成から推測できるものの、同時にアミンも HATU と反応していることが示唆された。

そこで、上記のような副反応を起こさないホスホニウム系縮合剤の PyBrop、PyAOP、BOPCI もしくは T3P (Fig. 3)を検討したが、いずれも原料回収および基質の分解を観測する結果となった。

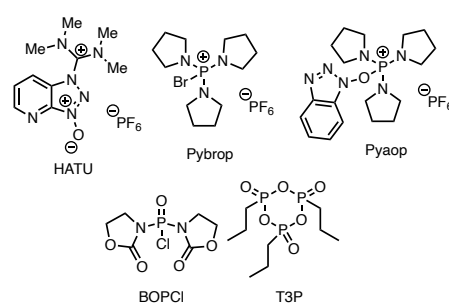
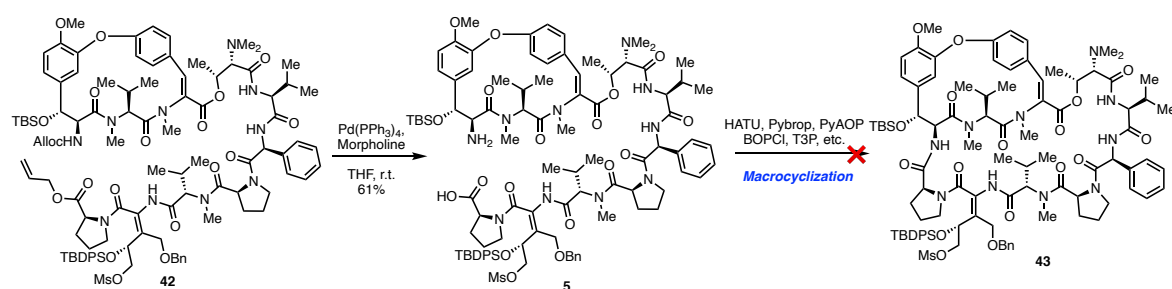


Fig. 3 検討した縮合剤の化学構造



Scheme 12 マクロ環化反応の検討

小括

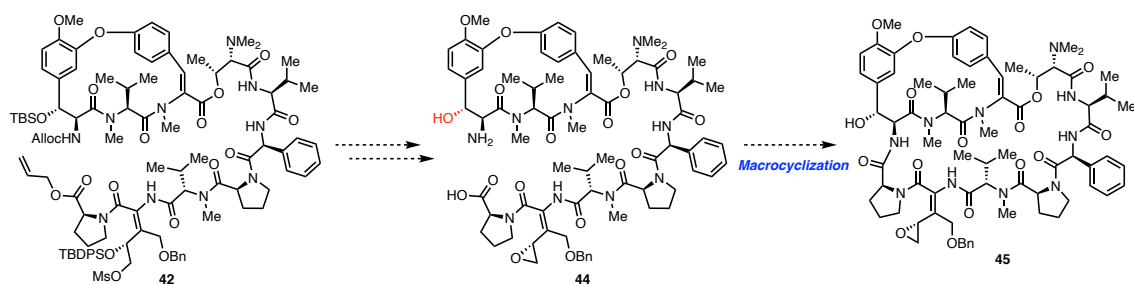
筆者は新規 PPI 阻害剤のリード化合物として有望な Dityromycin (**1**)に着目し、全合成研究を行った。本研究においては、**1**に含まれる全ての異常アミノ酸ユニットの合成経路を確立し、**1**の全構成アミノ酸を有する Decapeptide (**42**)の合成を達成した。

特に、Northern part (**2**)の合成においては、構築が困難なイソジチロシン型環状トリペプチドの構築法を Buchwald-Hartwig カップリングを鍵反応として高収率にて得られる経路を確立し、South-western part (**3**)においては、エナミドを含む 4 置換オレフィンの構築を鍵として合成経路の確立を行った。

しかしながら、環化前駆体 **5** のマクロ環化反応は進行しなかったため、今後は反応点である第一級アミンに隣接する第二級アルコールの TBS 基を除去し立体障害の影響を抑えた環化前駆体 **44** に対し、31 員環形成によるマクロ環化反応を検討する

(Scheme 13)。

そして環化が成功した際には、その後の種々官能基変換によって **1** の全合成経路の確立および絶対立体構造の決定が期待される。



Scheme 13 環化前駆体 44を用いたマクロ環化の計画

参考文献

- 1) 戸邊雅則, *Research paper series*, **2018**, 72.
- 2) C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Del. Rev.*, **1997**, 23, 3.
- 3) 宮地弘幸, 化学と教育, **2020**, 68, 282.
- 4) R. B. Woodward, M. P. Cava, W. D. Ollis, A. Hunger, H. U. Daeniker, K. Schenker, *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**, 76, 4749.
- 5) 関根進, *Science & Technology Trends*, **2009**, 13.
- 6) 厚生労働省中央社会保険医療協議会資料
- 7) M. P. H. Stump, T. Thorne, E. de Silva, R. Stewart, H. Jun An, M. Lappe, and C. Wiuf, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2008**, 105, 6959.
- 8) W. Wei, S. Cherukupalli, L. Jing, X. Liu and P. Zhan, *Drug Discovery Today*, **2020**, 25, 1839.
- 9) 砂塚敏明, 日本化学療法学会雑誌, **2004**, 52, 367.
- 10) B. Kim, E., S. M. Barman, B. Heddwen L., Yuan, J. X.-J., **2005**, *Review of medical physiology*, 22nd edition, Lange medical books, chapter 27. Medical, p. 530.
- 11) J. L. Mott, D. Zhang, J. C. Freeman, P. Mikolajczak, S. W. Chang, and H. P. Zassenhaus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2004**, 319, 1210.
- 12) S. Ōmura, Y. Iwai, A. Hirano, J. Awaya, Y. Suzuki, K. Matsumoto, *Agric. Biol. Chem.*, **1977**, 41, 1827.
- 13) T. Teshima, M. Nishikawa, I. Kubota, T. Shiba, Y. Iwai, S. Ōmura, *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 1963.
- 14) 福岡大学理学部講義資料より引用。 <http://www.sc.fukuoka-u.ac.jp/~bc1/Biochem/translat.htm#Top>
- 15) L. E. Post, M. Nomura, *Biological Chemistry*, **1980**, 255, 4660.
- 16) K. Liu, J. E. Rehfus, E. Mattson and C. M. Kaiser, *Protein Science*, **2017**, 26, 1439.
- 17) M. A. Carlson, B. G. Haddad, A. J. Weis, C. S. Blackwood, C. D. Shelton, M. E. Wuerth, J. D. W. and P. C. Spiegel Jr, *The FEBS Journal*, **2017**, 284, 1631.
- 18) D. Bulkley, L. Brandi, Y. S. Polikanov, A. Fabbretti, M. O'Connor, C. O. Gualerzi, and T. A. Steitz, *Cell Reports*, **2014**, 6, 357.
- 19) J. Lin, M. G. Gagnon, D. Bulkley, and T. A. Steitz, *Cell Reports*, **2015**, 160, 219.
- 20) S. Nishiyama, Y. Suzuki, and S. Yamamura, *Tetrahedron Letters*, **1988**, 559
- 21) S. Shabani and C. A. Hutton, *Org. Lett.*, **2020**, 22, 4557.
- 22) M. J. Moore, S. Qu, C. Tan, Y. Cai, Y. Mogi, D. J. Keith, and D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, 142, 16039.

- 23) U. Schmidt, H. Griesser, V. Leitenberger, A. Lieberknecht, R. Mangold, R. Meyer, B. Riedl, *Synthesis*, **1992**, 487.
- 24) Y. Yasuno, M. Hamada, T. Yamada, T. Shinada and Y. Ohfune, *Eur. J. Org. Chem.*, **2013**, 1884.
- 25) T. Kuranaga, Y. Sesoko and M. Inoue, *Nat. Prod. Rep.*, **2014**, 31, 514.
- 26) J. Patel, G. ClavØ, P.-Y. Renard, and X. Franck, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 4224.
- 27) J. K. Augustine, A. Bombrun, S. Venkatachaliah and A. Jothib, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, 11, 8065.
- 28) C. Falencyk, B. Pölloth, P. Hilgers and B. König, *Synthetic Commun.*, **2015**, 45, 348.
- 29) H. Y. Wang, K. Yang, S. R. Bennett, S. R. Guo and W. Tang, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, 54, 8756.
- 30) F. Paul, J. Patt, J. F. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 5969.
- 31) D. Glynn, D. Bernier, S. Woodward, *Tetrahedron Lett.*, **2008**, 49, 5687.

筆者は、北里大学大村智記念研究所において見出された低分子天然物 **Hymeglusin** および **Fusarilactone A**、中分子天然物 **Dityromycin** を合成標的とした全合成研究を展開し、作用機序の解明に取り組んできた。

特に前者においては、新たに **MEPM** 併用薬としての利用が期待される **Hymeglusin** および **Fusarilactone A** の効率的な不斉全合成経路を確立し、**Fusarilactone A** においては初の全合成に伴って絶対立体構造を決定した (Scheme 1)。



また、本研究においては、MEPM 耐性克服活性における作用機序の解明に向けて、推定標的タンパクである MRSA mvaS のリコンビナントタンパク、*S. aureus* ミュータントを用いたアッセイを実施し、重要な知見を得る事で作用機序の提唱を行った (Fig. 1, 2)。

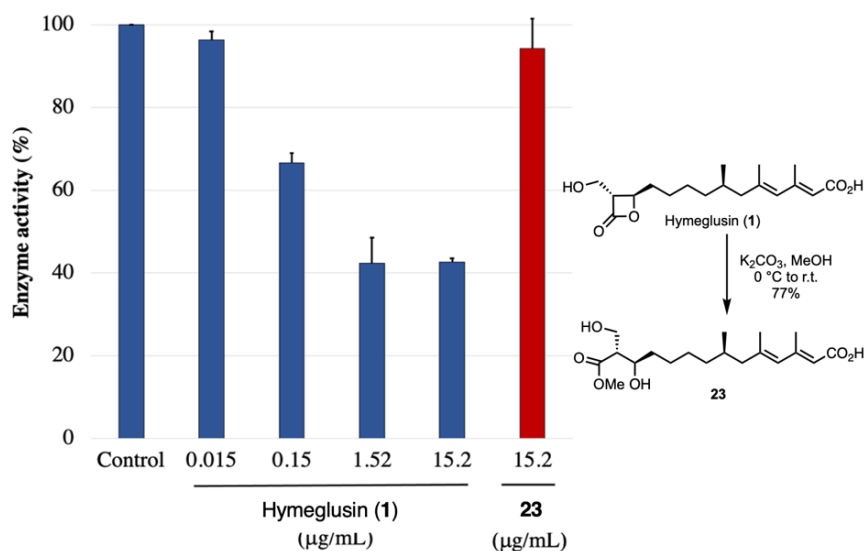


Fig. 1 DTNB法を用いたリコンビナントMRSA mvaSの酵素アッセイ
(data are presented as the means \pm standard deviations from at least three independent experiments.)

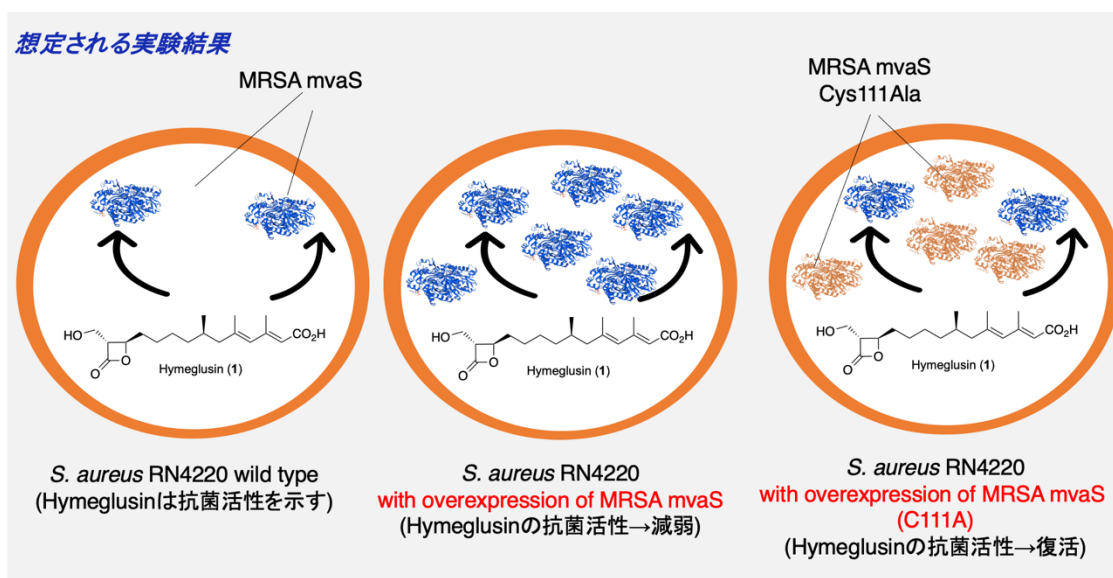
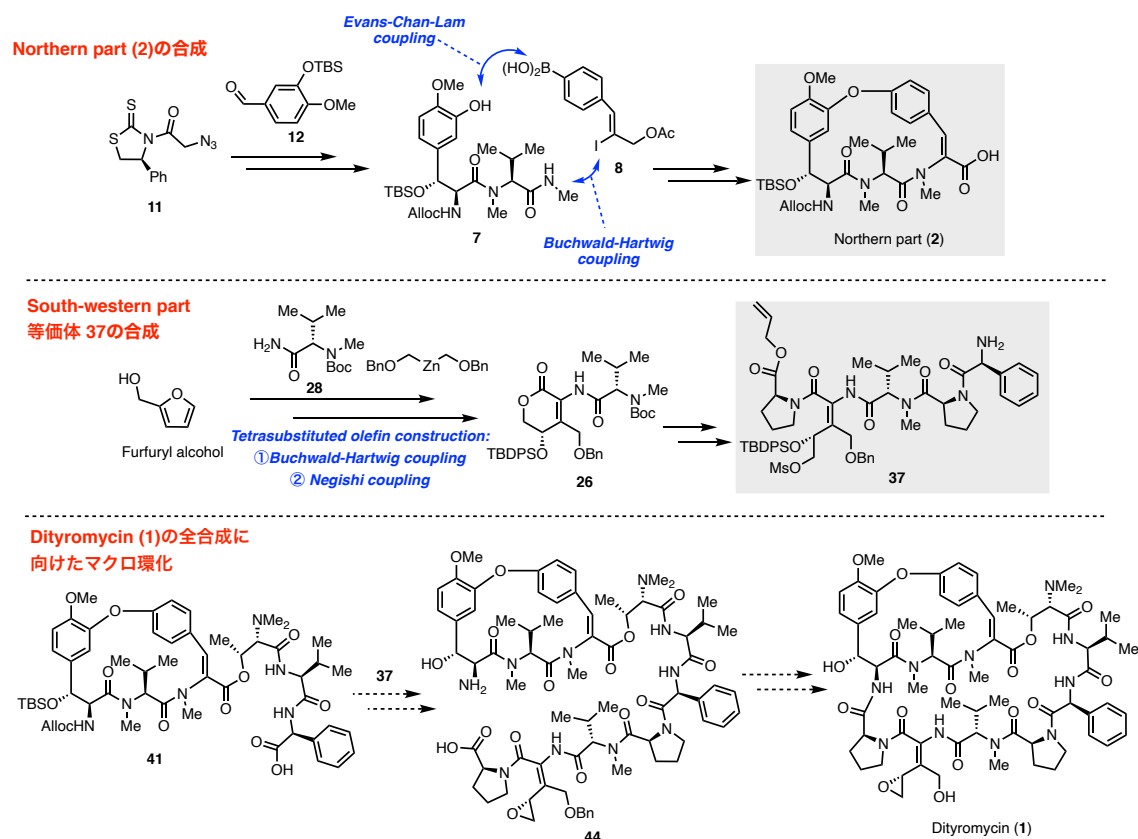


Fig. 2 *S. aureus*ミュータントにおけるアッセイ結果の予想

一方で、後者の研究においては、新規 PPI 阻害剤のリード化合物として期待される Dityromycin の異常アミノ酸ユニット全ての合成経路を確立し、**1** の構成アミノ酸全てを有する Decapeptide (**42**)の合成を達成した (Scheme 2)。
今後、筆者が確立、解明してきた知見が活かされ新たな医薬が開発されることを期待する。



Scheme 2 Northern part (2)、South-western part等価体 37の合成とDityromycin (1)の全合成に向けた検討

6. 実験項

1. General methods

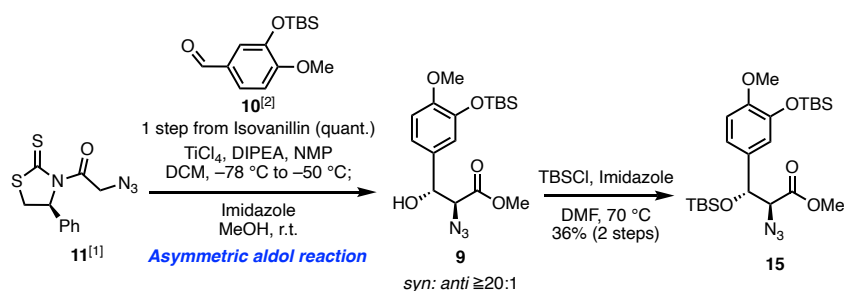
To carry out the assay by paper disc method for our screening program, the mediums and reagents were purchased from the suppliers described as follows; Difco Muller-Hinton broth (Becton Dickinson Co. Ltd.), LB-Medium (Funakoshi Co. Ltd.), chloramphenicol (Sigma-Aldrich Co. LLC), ethanol (EtOH, FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. Ltd.), Difco Muller-Hinton Agar (Becton Dickinson Co. Ltd.), TAIYO-AGAR (Shimizu Shokuhin Kaisya Ltd.), 6 mm paper disc (Toyo Roshi Kaisha Ltd.), plate (10-14 cm, Eiken Kizai), meropenem trihydrate (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. Ltd.), dimethylsulfoxide (DMSO, for Biochemistry, FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. Ltd.). The turbidity of the broth was measured by densitometer DEN-1B (Wakenbtech. Co. Ltd.) and the broth was stored in Caplugs Evergreen (BM Equipment Co. Ltd., cat No. 222-2094-050). Purification of compounds were performed with ODS gel (YMC Co. Ltd.) and HPLC Pegasil ODS SP100 column, 20 i.d. × 250 mm (Senshu Scientific Co. Ltd.). In organic syntheses, all of anhydrous solvents; tetrahydrofuran (THF), dimethylformamide (DMF), toluene (PhMe), methylenedichloride (DCM), methanol (MeOH), ethanol (EtOH), benzene (PhH) were purchased from Kanto Chemical Co. Inc.. Reagents were purchased from the company of Tokyo Chemical Industry Co. Ltd. (TCI), Kanto Chemical Co. Inc., Sigma-Aldrich Co. LLC, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Thermo Fisher Scientific at the highest commercial quality and used without further purification respectively.

Precoated silica gel plates with fluorescent indicator (Merck 60 F₂₅₄) were used for analytical and preparative chromatography which was carried out with Kanto Chemical silica gel (40-50 mm, 60N, spherical neutral, 0.040-0.050 mm, Cat. No. 37563-84) or Merck Millipore silica gel (0.040-0.63 mm, 60N, for column chromatography 230-400 mesh ASTM, CAS. No. 7631-86-9).

¹H and ¹³C NMR spectra were measured on JEOL JNM-ECA 500 (500 MHz) and JEOL JNM-ECA 500 (125 MHz) respectively. Chemical shifts are expressed in ppm downfield from the internal solvent peaks for CDCl₃ (¹H; δ = 7.26 ppm, ¹³C; δ = 77.16 ppm), CD₃OD (¹H; δ = 3.31 ppm, 4.84 ppm ¹³C; δ = 49.0 ppm), DMSO-*d*₆ (¹H; δ = 2.50 ppm, ¹³C; δ = 39.5 ppm) and *J* values were given in Hertz. Abbreviations for multiplicity are as follows, app indicates apparent, br indicates broad, d indicates doublet, t indicates triplet, q indicates quartet, m indicates multiplet. IR spectra were obtained on Horiba FT-710 spectrometer. High-and-Low resolution mass spectroscopy data were measured on JEOL JMS-T100LP and JEOL HMS-700 MStation. Optical rotations were measured with a Jasco P-1010 polarimeter. CD spectra were recorded on a JASCO J-720 spectropolarimeter (JASCO Co.) with a quartz cell (light path length: 10 mm) and Analytical High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was conducted by an Elite Lachrome system (Hitachi Ltd.).

2. Experimental procedures

Experimental procedures and spectra data



Compound 15

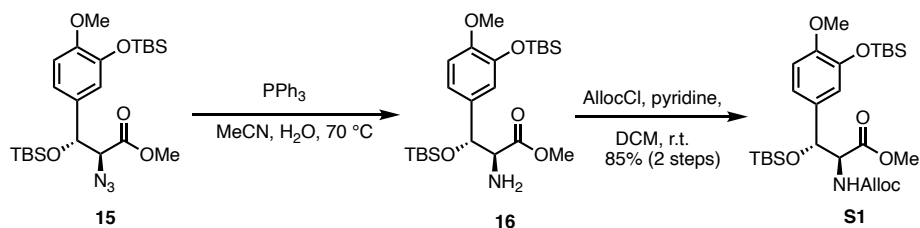
To a stirred solution of **11**^[1] (6.5 g, 32.0 mmol) in DCM (320 mL) was slowly added TiCl₄ solution (1.0 M in DCM, 33.6 mL, 33.6 mmol) at -78 °C under N₂ atmosphere. After stirring for 15 min, DIPEA (6.1 mL, 33.6 mmol) was slowly added and stirred for further 1 h, then NMP (6.2 mL, 35.2 mmol) was slowly added and stirred for 15 min. After stirring, **10**^[2] in DCM (240 mL) was slowly added and stirred for further 2 h at -50 °C. The reaction mixture was cooled to -78 °C, Imidazole (44.0 g, 640.0 mmol) and MeOH (320 mL) was added and stirred for 6 h at room temperature. The reaction mixture was cooled to 0 °C and sat. aq. NH₄Cl solution (500 mL) was added filtrated through a pad of Celite®. The filtrate was washed with brine (300 mL) and extracted with DCM (800 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford the crude product **9** (*syn:anti* ≥ 20:1, based on ¹H NMR), which was used in the next reaction without further purification.

To a stirred solution of crude **9** in DMF (320 mL) was added Imidazole (13.0 g, 192.0 mmol), TBSCl (14.0 g, 96 mmol) sequentially at -70 °C under N₂ atmosphere. After stirring for 1 h, the reaction mixture was cooled to 0 °C. Sat. aq. NH₄Cl solution was added to the reaction mixture, washed with brine (400 mL) and extracted with a solution of hexanes and EtOAc (1:1, 700 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The crude residue was purified by silica gel chromatography (10% EtOAc in toluene) to afford **15** (5.69 g, 36%, 2 steps) as a yellow oil.

(Note; Compound **11** and **10** were prepared according to the known procedure.^{[1][2]})

Compound 15

R_f = 0.40 (hexanes: EtOAc = 2:1). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 6.92 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.88 (dd, *J* = 8.0, 2.3 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.16 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.59 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 1.00 (s, 9H), 0.88 (s, 9H), 0.16 (d, *J* = 8.0 Hz, 6H), 0.02 (s, 3H), -0.17 (s, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 169.5, 155.1, 151.0, 144.8, 133.1, 119.7, 119.2, 111.7, 77.4, 77.2, 76.9, 68.7, 55.7, 52.2, 25.8, 25.7, 18.6, -4.5, -4.6, -5.5. HRMS (FAB) *m/z* calcd for C₂₃H₄₅N₄O₅Si₂ [M+NH₄]⁺: 513.2928, found: 513.2956.



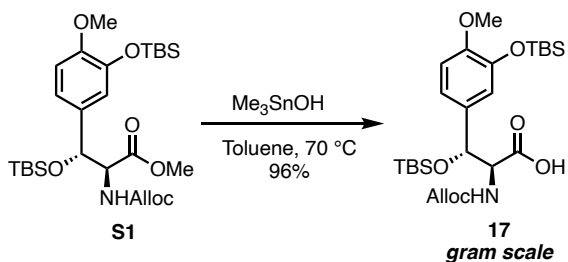
Compound S1

To a stirred solution of **15** (6.7 g, 32.0 mmol) in a solution of THF and H₂O (1:1, 134 mL) was added PPh₃ (11.0 g, 40.2 mmol) at room temperature under N₂ atmosphere. After stirring for 30 min at -70 °C, the reaction mixture was cooled to room temperature, added brine (300 mL), and extracted with EtOAc (300 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford the crude product **16**, which was used in the next reaction without further purification.

To a stirred solution of crude **16** in DCM (134 mL) was added pyridine (13.4 mL), AllocCl (13.4 mL, 20.1 mmol) sequentially at 0 °C under N₂ atmosphere. After stirring for 2 h at room temperature, the reaction mixture was cooled to 0 °C. Sat. aq. NH₄Cl solution was added to the reaction mixture, washed with brine (400 mL) and extracted with DCM (400 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The crude residue was purified by silica gel chromatography (10% EtOAc in hexanes to 60% EtOAc in hexanes) to afford **S1** (6.30 g, 85%, 2 steps) as a yellow oil.

Compound S1

R_f = 0.43 (hexanes: EtOAc = 2:1). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.35-7.28 (m, 4H), 6.9 (dd, *J* = 3.4, 10.3 Hz, 2H), 6.8 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.5 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 5.2 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 5.0 (q, *J* = 12.0 Hz, 2H), 4.4 (dd, *J* = 2.3, 9.9 Hz, 1H), 3.8 (s, 1H), 3.7 (s, 1H), 1.0 (s, 9H), 0.87 (s, 9H), 0.14 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H), -0.02 (s, 3H), -0.14 (s, 3H).



Compound 17

To a stirred solution of **S1** (6.30 g, 32.0 mmol) in a solution of toluene (114 mL) was added Me₃SnOH (211.0 g, 116.1 mmol) at room temperature under N₂ atmosphere. After stirring for 6 h at 60 °C, the reaction mixture was cooled to room temperature, added aq. KHSO₄ solution (0.1 M, 200 mL), and extracted with EtOAc (300 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford the crude product **17**. The crude residue was purified by silica gel chromatography (5% MeOH in CHCl₃) to afford **17** (5.91 g, 96%) as a yellow oil.

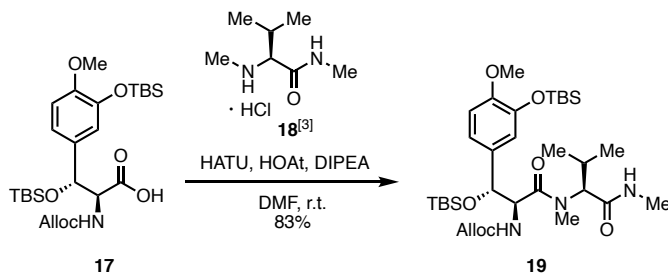
Compound 17

R_f = 0.29 (CHCl₃: MeOH = 6:1). [α]_D²² = -48.4 (*c* = 0.1, in MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ(ppm) 6.94-6.82 (m, 3H), 6.79 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.87 (qd, *J* = 11.1, 5.3 Hz, 1H), 5.41 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 5.29-5.17 (m, 4H), 4.57-4.47 (m, 4H), 3.81-3.75 (m, 4H), 1.05-0.94 (m, 13H), 0.93-0.79 (m, 13H), 0.14 (s, 2H), 0.13 (s, 4H), 0.12 (s, 2H), 0.09 (d, *J* = 3.4 Hz, 2H), 0.06-0.02 (m, 3H), -0.06-0.22 (m, 3H).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(ppm) 156.1, 151.0, 144.9, 132.5, 119.7, 119.2, 117.9, 111.8, 77.4, 77.2, 76.9, 73.8, 66.1, 60.4, 55.6, 25.8, 25.8, 18.5, 18.2, -3.6, -4.6, -5.3.

HRMS (FAB) *m/z* calcd for C₂₆H₄₅NO₇Si₂Na [M+Na]⁺: 562.2632, found: 562.2753.



Compound 19

To a stirred solution of **17** (1.8 g, 3.33 mmol) and **18**^[3] (1.2 g, 6.64 mmol) in a solution of DMF (33 mL) was added DIPEA (1.7 mL, 10.0 mmol), HATU (1.9 g, 5.00 mmol), HoAt (873 mg, 5.00 mmol) sequentially at room temperature under N₂ atmosphere. After stirring for 1 h, the reaction mixture was added sat. aq. NH₄Cl (0.1 M, 100 mL), and extracted with a solution of hexanes and EtOAc (1:1, 150 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford the crude product **19**. The crude residue was purified by silica gel chromatography (50% EtOAc in hexanes to 70% EtOAc in hexanes) to afford **19** (1.83 g, 83%) as a pale yellow solid.

(Note; compound **18** was prepared according to the literature^[3].)

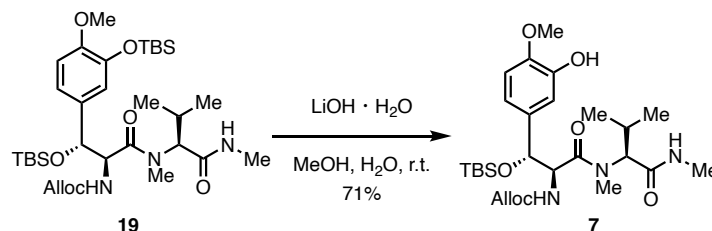
Compound 19

R_f = 0.23 (EtOAc: hexanes= 2:1). [α]_D²² = -68.1 (c = 0.1, in MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 6.88 (s, 1H), 6.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.89 (qd, *J* = 15.7, 10.9 10.3, 5.2, 4.8 Hz, 1H), 5.40 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 5.28 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 5.19 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H), 4.76 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.68 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.55 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.40 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 3.77-3.73 (s, 3H: 2.58/3 (3.77), 0.52/3 (3.73)), 2.79-2.72 (s, 3H: 0.59/3 (2.79), 2.41/3 (2.72)), 2.66-2.62 (s, 3H: 0.39/3 (2.66), 0.54/3 (2.65), 1.16/3 (2.63), 0.92/3 (2.62)), 2.21-2.13 (m, 1H), 1.91-1.68 (brs, 1H), 0.98 (s, 9H), 0.82 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.84 (s, 9H), 0.71 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.11 (s, 9H), 0.02 (s, 3H), -0.19- -0.21 (s, 3H: 2.33/3 (-0.19), 0.67/3 (-0.21)).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 171.8, 169.8, 157.3, 156.0, 151.1, 144.9, 138.0, 133.1, 132.8, 132.4, 120.3, 119.8, 118.8, 117.7, 112.0, 111.3, 75.6, 66.7, 65.9, 62.3, 57.6, 57.3, 55.6, 55.4, 30.8, 29.0, 26.7, 26.1, 26.0, 25.8, 25.8, 20.0, 18.5, 18.4, 18.2, -4.6, -5.0

HRMS (FAB) *m/z* calcd for C₃₃H₅₉N₃O₇Si₂Na [M+Na]⁺: 688.3789, found: 688.4011. IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹): 1722, 1681, 1624, 1584, 1509, 1466, 1439, 1409, 1389, 1362, 1278, 1251, 1231, 1159, 1133, 1089, 1039, 992, 938, 911, 881, 854, 834, 780, 709, 669.



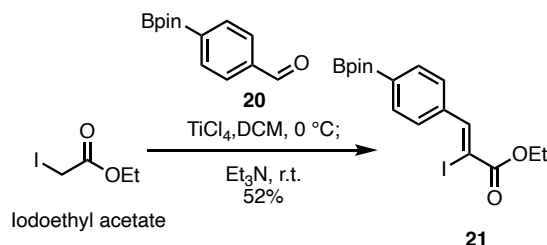
Compound 7

To a stirred solution of **19** (1.8 g, 2.70 mmol) in a solution of MeOH and H₂O (3:1, 27 mL) was added LiOH·H₂O (113 mg, 2.70 mmol) at room temperature. After stirring for 5 h, the reaction mixture was added aq. HCl solution (0.1 M, 20 mL), and extracted with a solution of hexanes and EtOAc (1:1, 150 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford the crude product **7**. The crude residue was purified by silica gel chromatography (20% EtOAc in hexanes) to afford **7** (1.06 g, 71%) as a colorless amorphous.

Compound 7

R_f = 0.25 (EtOAc: hexanes= 1:1). [α]_D²² = -86.5 (c = 0.1, in MeOH) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 6.97-6.87 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H: 0.27/1 (6.97), 0.73/1 (6.87)), 6.84-6.81 (dd, *J* = 1.6, 8.6 Hz, 1H: 0.87/1 (6.84), 0.13/1 (6.81)), 6.75- 6.72 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H: 0.83/1 (6.75), 0.17/1 (6.72)), 5.90 (qd, *J* = 16.4, 10.6, 10.6, 5.8 Hz, 1H), 5.73-5.68 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H: 0.76/1 (5.73), 0.24/1 (5.68)), 5.50 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 5.28 (dd, *J* = 16.4, 0.96 Hz, 1H), 5.23-5.19 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H: 0.14/1 (5.23), 0.86/1 (5.19)), 4.87-4.78 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H: 0.21/1 (4.87), 0.79/1 (4.78)), 4.71 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.59-4.51 (m, 1H), 4.55 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.41 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 3.86-3.83 (s, 3H: 2.49/3 (3.86), 0.51/3 (3.83)), 2.86-2.72 (s, 3H: 0.08/3 (2.86), 0.49/3 (2.80), 2.43/3 (2.72)), 2.67-2.65 (s, 3H: 1.1/3 (2.67), 1.25/3 (2.66), 0.65/3 (2.65)), 2.22-2.12 (m, 1H), 0.87-0.79 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H: 2.54/3 (0.87), 0.46/3 (0.79)), 0.84-0.71 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H: 0.54 (0.84), 2.46 (0.71)), 0.83 (s, 9H), 0.04-0.02 (s, 3H: 0.50/3 (0.04), 2.5/3 (0.02)), -0.02 (s, 3H), ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 172.1, 170.0, 156.3, 146.8, 145.3, 134.0, 133.1, 118.7, 118.0, 113.6, 110.6, 75.9, 66.1, 62.5, 58.0, 56.2, 30.9, 26.3, 26.2, 26.0, 20.1, 18.6, 18.4, -4.3, -4.8,

HRMS (FAB) *m/z* calcd for C₂₇H₄₅N₃O₇SiNa [M+Na]⁺: 574.2924, found: 574.2928. IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹): 1708, 1620, 1503, 1453, 1409, 1265, 1159, 1133, 1035, 988, 938, 877, 807, 732, 646, 628.



Compound 21

To a stirred solution of Iodoethyl acetate (2.2 g, 10.8 mmol) and **20** (2.4 g, 10.3 mmol) in DCM (15 mL) was added TiCl₄ solution (1.0 M in DCM, 12.4 mL, 12.4 mmol) slowly at 0 °C under N₂ atmosphere. After stirring for 50 min at room temperature, the reaction mixture was added Et₃N (2.9 mL, 20.6 mmol) slowly, and stirred for further 2 h at room temperature. The reaction mixture was added sat. aq. NaHCO₃ (100 mL) and extracted with DCM (100 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in*

vacuo to afford the crude product **21**. The crude residue was purified by silica gel chromatography (10% EtOAc in hexanes) to afford **21** (2.35 g, 52%) as a colorless amorphas.

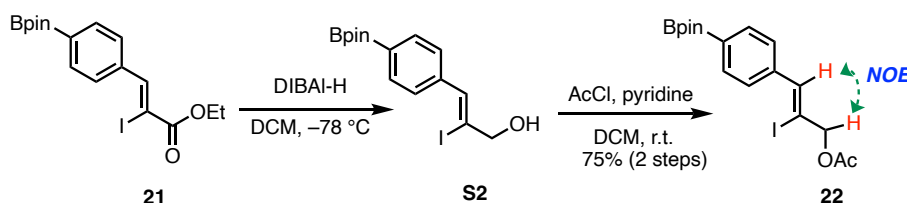
Compound 21

Rf = 0.43 (EtOAc: hexanes= 4:1). $[\alpha]_D^{25} = -0.52$ ($c = 0.1$, in MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) δ 8.26 (s, 1H), 7.86 (d, $J = 8.02$ Hz, 2H), 7.73 (d, $J = 8.02$ Hz, 2H), 4.34 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.33 (t, 7.0 Hz, 3H), 1.35 (s, 12 H).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 163.8, 148.1, 138.3, 134.7, 128.6, 92.2, 84.1, 77.4, 77.2, 76.9, 62.9, 25.0, 14.4.

HRMS (FAB) m/z : calcd for C₁₇H₂₃BrO₄ [M+H]⁺: 429.0734, found: 429.0734. **IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹)**: 1715, 1604, 1509, 1396, 1355, 1351, 1328, 1267, 1238, 1200, 1159, 1139, 1086, 1035.



Compound 22

To a stirred solution of **21** (2.3 g, 5.4 mmol) in DCM (53 mL) was added DIBAL-H (1.0 M in DCM, 13.4 mL, 13.4 mmol) slowly at -78 °C. After stirring for 4 h, the reaction mixture was added a aq. solution of HCl (1.0 M, 50 mL) and stirred for 20 min at room temperature. The reaction mixture was extracted with a DCM (150 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford the crude product **S3**. The crude residue was purified by silica gel chromatography (10% EtOAc in hexanes) to afford **S3**, which was used in the next reaction without further purification.

To a stirred solution of crude **S3** in DCM (134 mL) was added pyridine (10.7 mL), AcCl (766 mL, 10.7 mmol) sequentially at 0 °C under N₂ atmosphere. After stirring for 30 min at room temperature, the reaction mixture was cooled to 0 °C and aq. HCl solution (1.0 M, 30 mL) was added. The reaction mixture was washed with brine (100 mL) and extracted with DCM (400 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The crude residue was purified by silica gel chromatography (10% EtOAc in hexanes) to afford **22** (1.70 g, 75%, 2 steps) ($Z:E \geq 20:1$, based on ¹H NMR) as a yellow oil.

(Note; The geometry of compound **S2** was determined by NOE correlation between vinyl and methylene proton (highlighted in red).)

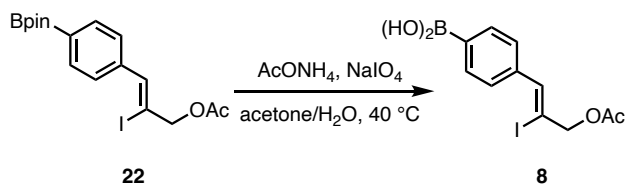
Compound 22

Rf = 0.52 (EtOAc: hexanes= 3:1). $[\alpha]_D^{25} = -3.46$ ($c = 0.1$, in MeOH)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.81 (d, $J = 8.02$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J = 8.02$ Hz, 2H), 7.08 (s, 1H), 4.92 (s, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.34 (s, 12H),

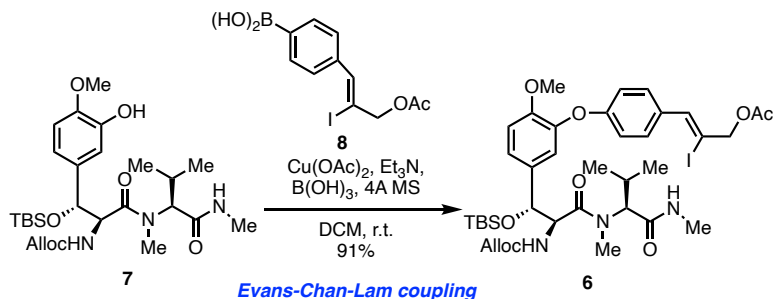
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.1, 139.5, 137.0, 134.6 (2C), 127.9 (2C), 98.7, 84.1, 83.9, 83.9, 77.4, 77.2, 76.9, 72.8, 24.8, 21.0.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹): 2977, 2922, 2379, 2357, 2338, 2325, 2250, 2190, 2170, 2149, 2131, 2058, 2004, 1983, 1736, 1608, 1554, 1397, 1358, 1142, 1087, 1020, 857, 733, 436.



Compound 8

To a stirred solution of **22** (1.4 g, 3.3 mmol) in a solution of acetone and H₂O (3:1, 33 mL) was added AcONH₄ (1.5 g, 19.8 mmol) and NaIO₄ (4.2 g, 19.8 mmol) sequentially at room temperature. After stirring for 5 h at 40 °C, the reaction mixture was added sat. aq. solution of NaHCO₃ (50 mL). The reaction mixture was extracted with EtOAc (150 mL) and washed with brine (150 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford the crude product **8**, which was used in the next reaction without further purification.



Compound 6

To a stirred solution of **8** (1.4 g, 3.3 mmol) and **7** (368 mg, 0.670 mmol) in DCM (6.7 mL) was added 4A MS (871 mg), Et₃N (560 μ L, 4.02 mmol), B(OH)₃ (83 mg, 1.34 mmol) and Cu(OAc)₂ (365 mg, 2.10 mmol) sequentially at room temperature. After stirring vigorously for 3 h, the reaction mixture was added sat. aq. solution of NH₄Cl (30 mL). The reaction mixture was extracted with EtOAc (200 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The crude residue was purified by silica gel chromatography (30% EtOAc in hexanes) to afford **6** (524 mg, 91%) as a yellow amorphous.

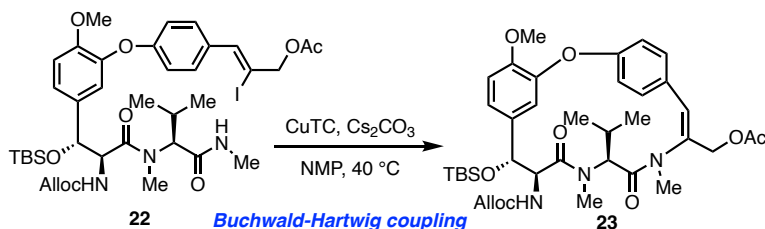
Compound 6

R_f = 0.33 (EtOAc: hexanes= 1:1).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.53-7.50 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H: 1.63/2 (7.53), 0.37/2 (7.50)), 7.14-7.03 (dd, *J* = 1.9, 8.5 Hz, 2H: 0.12/2 (7.13), 0.65/2 (7.07), 1.23/2 (7.05)), 7.04 (s, 1H), 6.91-6.88 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H: 0.6/1 (6.91), 0.4/1 (6.88)), 6.85 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 5.89 (qd, *J* = 16.0, 10.9, 10.3, 5.7 Hz, 1H), 5.45 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 5.38 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.28 (dd, *J* = 16.0, 1.1 Hz, 1H), 5.25-5.18 (dd, *J* = 10.9, 1.1 Hz, 1H: 0.21/1 (5.25), 0.79/1 (5.18)), 4.93-4.90 (s, 2H: 1.88/2 (4.93), 0.11/2 (4.92), 0.01/2 (4.90)), 4.83-4.71 (m, 2H), 4.58-4.53 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H: 0.29/2 (4.58), 1.71/2 (4.54)), 4.38 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H), 3.80-3.79 (s, 3H: 2.36/3 (3.80), 0.64/3 (3.79)), 2.87-2.80 (s, 3H: 1.89/3 (2.87), 0.46/3 (2.84), 0.53/3 (2.81), 0.12/3 (2.80)), 2.67-2.64 (s, 3H: 0.35/3 (2.67), 1.53/3 (2.65), 1.14/3 (2.64)), 2.24-2.17 (m, 1H), 2.15-2.09 (s, 3H: 2.46/3 (2.15), 0.09/3 (2.09), 0.45/3 (2.08)), 0.89 (d, *J* = 6.4, 3H), 0.85-0.81 (s, 9H: 0.08/9 (0.85), 0.4/9 (0.83), 8.52/9 (0.81)), 0.73 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.068-0.027 (s, 3H: 0.20/3 (0.068), 0.58/3 (0.053), 2.22/3 (0.027)), -0.15 – 0.18 (s, 3H: 1.91/3 (-0.15), 0.34/3 (-0.17), 0.43/3 (-0.17), 0.07/3 (-0.18)).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 171.2, 170.4, 169.8, 169.1, 158.5, 155.9, 151.7, 144.0, 136.7, 133.7, 132.8, 130.7, 130.4, 130.3, 124.0, 120.9, 120.4, 118.5, 117.9, 116.7, 116.1, 112.8, 112.2, 96.4, 75.4, 74.9, 73.4, 66.7, 66.5, 66.0, 62.5, 57.3, 57.2, 56.3, 56.1, 30.9, 29.8, 29.1, 26.8, 26.1, 26.0, 25.8, 25.8, 21.1, 19.8, 18.4, 18.2, 17.7, -4.6, -4.9.

HRMS (FAB) *m/z* calcd for C₃₈H₅₅IN₃O₉Si [M+H]⁺: 852.2752, found: 852.2742.

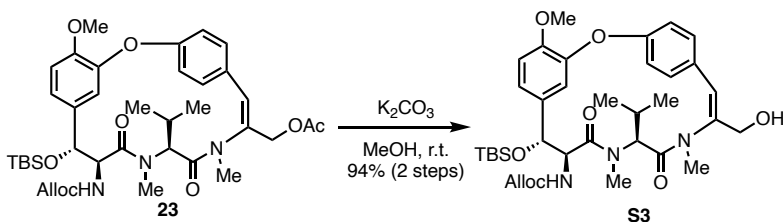


Compound 23

In a round bottom flask, **6** (286 mg, 0.336 mmol), CuTC (197 mg, 0.671 mmol) and Cs₂CO₃ (365 mg, 0.671 mmol) were evacuated and backfilled with N₂ gas and added NMP (3.4 mL) at room temperature. After stirring for 48 h at 40 °C, the reaction mixture was cooled to 0 °C and added sat. aq. NH₄Cl (20 mL). The reaction mixture was extracted with a solution of EtOAc and hexanes (1:1, 100 mL) and washed with brine (50 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford the crude product **23**, which was used in the next reaction without further purification.

Compound 23

R_f = 0.25 (EtOAc: hexanes= 1:1). [α]_D²³ = -95.58. **IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹):** 2932, 2373, 2320, 1723, 1680, 1625, 1503, 1290, 1266, 1220, 1166, 1124, 1091, 1027, 853, 730, 702, 574, 551, 442, 427, 418, 406.



Compound S3

To a stirred solution of crude **23** in MeOH (3.4 mL) was added K₂CO₃ (93 mg, 0.671 mmol) at 0 °C. After stirring for 30 min at room temperature, the reaction mixture was cooled to 0 °C and added sat. aq. solution of NH₄Cl (20 mL). The reaction mixture was extracted with EtOAc (80 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The crude residue was purified by silica gel chromatography (50% EtOAc in hexanes) to afford **S3** (216 mg, 94%, 2steps) as a white amorphas.

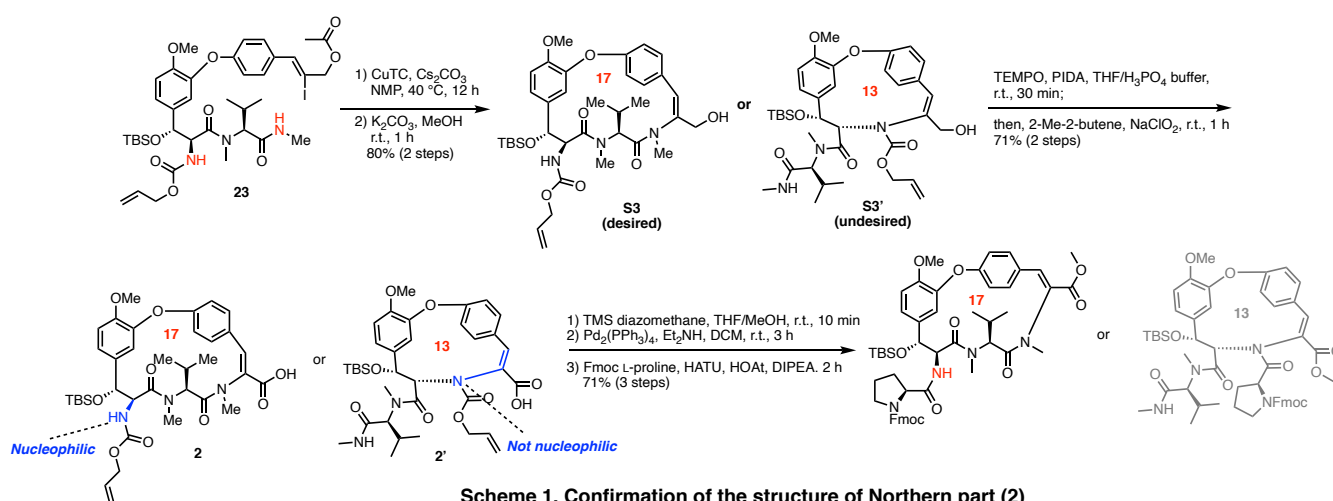
Compound S3

R_f = 0.36 (EtOAc: hexanes= 1:2). [α]_D²³ = -76.92 (c = 0.1, in MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.36 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.07-7.21 (complex m, 2H), 6.89 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.77 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 5.88 (dq, *J* = 5.6, 9.9, 5.2, 15.7 Hz, 1H), 5.51 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 5.39 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.28 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 5.29-5.19 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H: 0.25/1 (5.23), 0.75/1 (5.20)), 4.91-4.70 (complex m, 2H), 4.54 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.47 (s, 2H), 4.38 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 3.78-3.77 (s, 3H: 1.95/3 (3.78), 1.05/3 (3.77)), 2.86-2.81 (s, 3H: 2.20/3 (2.86), 0.80/3 (2.81)), 2.66-2.65 (s, 3H: 1.50/3 (2.66), 1.50/3 (2.66)), 2.20 (m, 1H), 1.74 (brs, 1H), 1.62 (brs, 1H), 0.89 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.80 (s, 9H), 0.73 (d, *J* = 0.64 Hz, 3H), 0.066-0.025 (s, 3H: 0.51/3 (0.066), 0.45/3 (0.051), 2.04/3 (0.025)), -0.16- -0.18 (s, 3H: 2.0/3 (-0.16), 1.0/3 (-0.18)).

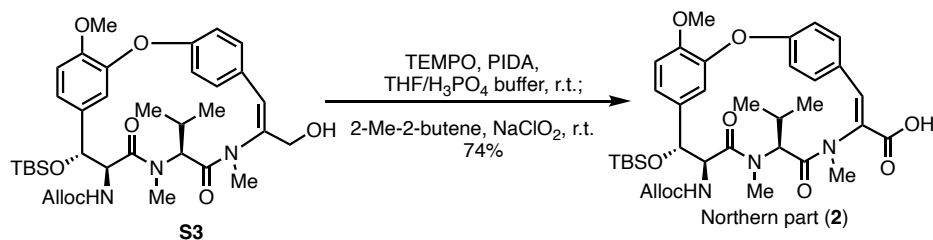
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 171.2, 170.2, 169.8, 169.1, 158.5, 157.4, 155.9, 151.6, 144.4, 143.7, 134.0, 133.7, 133.4, 133.3, 132.8, 132.3, 124.3, 124.1, 120.9, 120.4, 118.6, 117.9, 117.0, 116.7, 116.5, 116.4, 112.7, 112.2, 86.5, 85.5, 77.4, 77.2, 76.9, 75.3, 74.9, 66.7, 66.5, 66.0, 62.5, 57.3, 57.2, 56.2, 56.0, 51.8, 30.9, 29.1, 26.8, 26.1, 26.0, 25.8, 25.7, 19.8, 19.5, 18.4, 18.2, 18.1, 17.7, 1.2, -4.6, -4.9.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹): 1722, 1674, 1617, 1500, 1416, 1271, 1227, 1159, 1116, 1086, 1032, 834, 780, 571, 527, 497, 460.



Scheme 1. Confirmation of the structure of Northern part (2)

Note: We could not confirm the cyclized structure by spectroscopic analysis (HMBC, NOESY etc.). So we carried out a series of experiments to prove the cyclized structure indirectly. If we consider that the cyclization occurs at whether Alloc N-H or amide N-H, the resulting functional group of Alloc deprotection would be different (primary amine or enamine). Enamine moiety would be less nucleophilic due to its resonance structure, but cyclized product was coupled with Fmoc-L-Pro-OH (Scheme 1).



Northern part (2)

To a stirred solution of **S3** (328 mg, 0.48 mmol) in a solution of THF and phosphate buffer solution (pH = 7.0, 0.1 M, NaHPO₄, Na₂HPO₄) (1:1, 4.8 mL) was added TEMPO (75 mg, 0.48 mmol), PIDA (310 mg, 0.96 mmol) sequentially at 0 °C. After stirring for 1 h at room temperature, the reaction mixture was cooled to 0 °C and added 2-Me-2-butene (512 μ L, 4.8 mmol), NaClO₂ (218 mg, 2.4 mmol) sequentially. After stirring for further 1 h at room temperature, the reaction mixture was cooled to 0 °C and added sat. aq. solution of NH₄Cl (10 mL). The reaction mixture was extracted with EtOAc (40 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The crude residue was purified by silica gel chromatography (30% EtOAc in hexanes to 2% MeOH in CHCl₃) to afford **2** (247 mg, 74%) as a white amorphas.

Northern part (2)

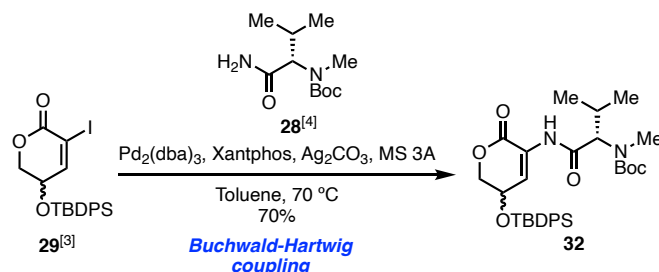
R_f = 0.20 (CHCl₃: MeOH= 10:1). [α]_D²² = -107.38 (c = 0.1 in MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.52 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.10 (d, *J* = 9.6 Hz, 2H), 7.04 (s, 1H) 6.91 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 5.88 (qd, *J* = 11.1, 5.6, 10.9, 16.8 Hz, 1H), 5.45 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.28 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H), 5.2 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H),

4.86 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 4.8 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 4.55 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.40 (d, J = 10.9 Hz, 1H), 3.77-3.76 (s, 3H: 1.85/3 (3.77), 1.15/3 (3.76)), 2.93-2.82 (s, 3H: 2.03/3 (2.93), 0.51/3 (2.88), 0.46/3 (2.82)), 2.70-2.66 (s, 3H: 0.94/3 (2.70), 1.14/3 (2.69), 0.62/3 (2.62), 0.60/3 (2.66)), 2.19 (m, 1H), 1.77-1.66 (brs, 1H), 0.88 (d, J = 6.15 Hz, 3H), 0.82 (s, 9H), 0.74 (d, J = 6.15 Hz, 3H), 0.05-0.032 (s, 3H: 0.52/3 (0.05), 2.48/3 (0.032)), -0.16- -0.18 (s, 3H: 2.44/3 (-0.16), 0.56/3 (-0.18)).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 171.4, 170.3, 169.9, 169.3, 159.5, 157.7, 156.0, 151.6, 143.0, 134.7, 134.4, 133.7, 132.8, 132.5, 124.4, 121.4, 118.7, 117.9, 116.0, 114.5, 112.5, 77.4, 77.2, 76.9, 75.4, 66.7, 66.5, 65.9, 62.4, 57.5, 55.9, 31.0, 26.1, 25.8, 19.7, 19.4, 18.4, 18.2, 18.1, -4.6, -4.9.

HRMS (FAB) m/z calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{50}\text{N}_3\text{O}_5\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 696.3316, found: 696.9672. **IR (neat) ν_{max} (cm^{-1}):** 1710, 1618, 1502, 1414, 1374, 1265, 1227, 1163, 1123, 1089, 897, 835, 781, 732, 703, 656, 593, 554, 529, 515, 455, 444, 428, 417, 405.



Compound 32

In a round bottom flask, **29**^[3] (10.5 g, 22.0 mmol), **28**^[4] (6.1 g, 26.4 mmol), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (1.0 g, 1.1 mmol), Xantphos (1.9 g, 3.3 mmol), Ag_2CO_3 (8.5 g, 30.8 mmol), MS 3A (1.7 g) was evacuated and backfilled with N_2 gas and added toluene (260 mL). After stirring for 1 h at room temperature, the reaction mixture was stirred for further 14.5 h at 70 °C and cooled to room temperature. The reaction mixture was filtrated through a pad of Celite® and filtrate was concentrated *in vacuo* to afford the crude product **32**. The crude residue was purified by silica gel chromatography (10% EtOAc in toluene) to afford **32** (8.9 g, 70%) as a white amorphas. (Note; compound **29** and **28** were prepared according to the literature^{[3][4]})

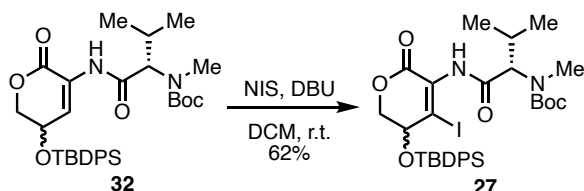
Compound 32

Rf = 0.65 (EtOAc: hexanes= 1:1). $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -86.76$ (c = 0.1, MeOH).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8.49-8.10 (brs, 1H: 0.52/1 (8.49), 0.48/1 (8.10)), 7.67 (dd, J = 1.3, 7.9 Hz, 2H), 7.63 (dd, J = 1.65, 7.9 Hz, 2H), 7.47-7.37 (complex m, 7H), 4.45 (ddd, J = 14.0, 11.8, 3.8 Hz, 1H), 4.31 (t, J = 11.8 Hz, 1H), 4.20-3.97 (t, J = 14.0 Hz, 1H: 0.78/1 (4.20), 0.22/1 (3.97)), 2.82-2.76 (s, 3H: 0.79/3 (2.82), 0.83/3 (2.79), 1.38/3 (2.76)), 2.23 (m, 1H), 1.70-1.46 (s, 1H: 0.34/9 (1.70), 2.15/9 (1.55), 2.11/9 (1.53), 2.34/9 (1.50), 2.07/3 (1.46)), 1.06 (s, 9H), 0.99-0.94 (d, J = 5.4 Hz, 3H: 1.33/3 (0.99), 1.67/3 (0.94)), 0.89 (d, J = 7.25 Hz, 3H).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 136.3, 136.2, 133.6, 133.2, 130.7, 128.5, 128.5, 82.1, 81.4, 77.9, 77.6, 77.4, 72.7, 66.8, 65.9, 63.3, 54.0, 28.9, 27.4, 26.6, 20.6, 20.5, 19.7, 19.1.

IR (neat) ν_{max} (cm^{-1}): 1732, 1695, 1520, 1473, 1455, 1429, 1392, 1362, 1318, 1234, 1159, 1100, 1082, 1012, 992, 944, 921, 884, 843, 820, 780, 732, 705, 615, 565, 504, 484.



Compound 27

To a stirred solution of **32** (325 mg, 0.56 mmol) and NIS (1.2 g, 4.96 mmol) in DCM (6.0 mL) was added DBU (630 μL , 4.2 mmol) at 0 °C. After stirring for 12 h at room temperature, the reaction mixture was added an aq. solution of HCl (0.1 M, 20 mL), sat. aq. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solution (50 mL) and extracted with DCM (100 mL). The organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford the crude product **27**. The crude residue was purified by silica gel chromatography (25% EtOAc in hexanes) to afford **27** (264 mg, 62%) as a white amorphas.

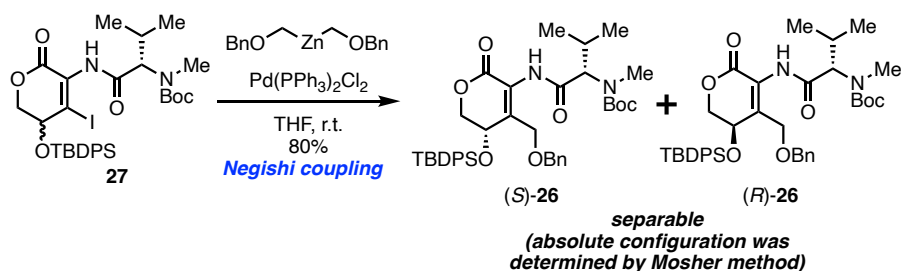
Compound 27

Rf = 0.45 (EtOAc: hexanes= 2:1).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8.05-7.91 (brs, 1H: 0.48/1 (8.05), 0.52/1 (7.91)), 7.74 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.70 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.50-7.39 (complex m, 6H), 4.46 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 4.21-4.12 (complex m, 2H), 2.83-2.79 (s, 3H: 1.90/3 (2.83), 1.10/3 (2.79)), 2.30 (m, 1H), 1.54-1.48 (s, 9H: 1.57/9 (1.54, brs), 3.95/9 (1.50), 3.38/9 (1.48)), 1.08 (s, 9H), 1.04 (brs, 3H), 0.90 (d, J = 6.4 Hz, 3H).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 168.4, 168.2, 157.7, 157.5, 157.2, 136.3, 135.8, 135.6, 132.7, 132.7, 131.6, 130.5, 130.3, 128.1, 115.6, 80.9, 80.7, 77.4, 77.2, 76.9, 72.6, 72.4, 70.5, 64.6, 53.5, 30.8, 30.5, 28.6, 28.5, 27.0, 26.1, 25.8, 20.0, 19.9, 19.5, 18.7.

HRMS (FAB) m/z calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{I}_2\text{N}_2\text{O}_5\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 707.2013, found: 707.2053.



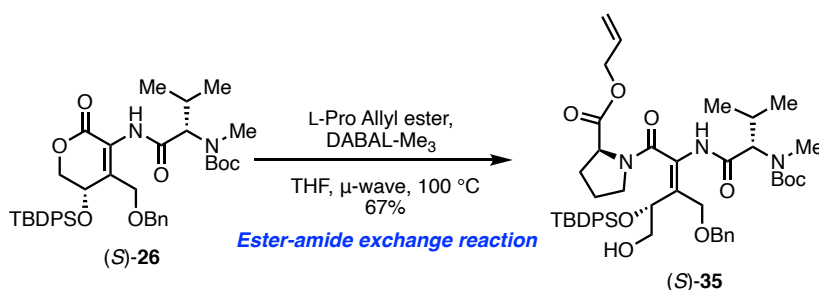
Compound **26**

In a round bottom flask, **27** (2.1 g, 2.92 mmol) and Pd(PPh₃)₂Cl₂ (1.2 g, 1.73 mmol) was evacuated and backfilled with N₂ gas and added bis((benzyloxy)methyl)zinc solution^[5] (4.8 M in THF, 30 mL). After stirring for 1 h at room temperature, the reaction mixture was cooled to 0 °C and added sat. aq. NH₄Cl solution (60 mL). The reaction mixture was extracted with DCM (70 mL) and the organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The crude residue was purified by silica gel chromatography (toluene) to afford **26** (1.5 g, 80% ((R)-**26**: 41%, (S)-**26**: 39%)) as a white amorphas.

(Note; bis((benzyloxy)methyl)zinc solution was prepared according to the literature^[5])

Compound **26**

R_f = (R)-**26**: 0.54, (S)-**26**: 0.52 (EtOAc: hexanes= 1:1).

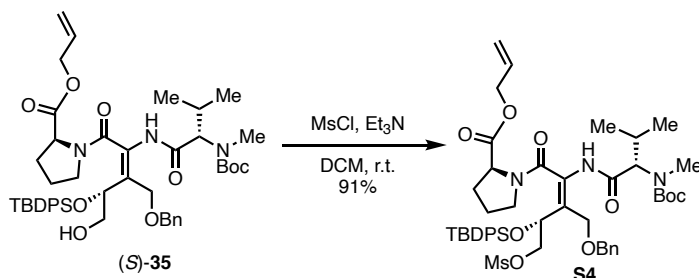


Compound (S)-**35**

In a microwave reaction vial, (S)-**26** (77.0 mg, 0.11 mmol), L-Pro Allyl ester (17.0 mg, 0.11 mmol) and DABAL-Me₃ (23 mg, 0.089 mmol) was evacuated and backfilled with N₂ gas and added THF (0.2 mL). After stirring and irradiated microwave (290W, 100 °C) for 10 min, the reaction mixture was cooled to 0 °C. The reaction mixture was added aq. HCl solution (1.0 M, 3 mL), sat. aq. Rochelle salt solution (10 mL) and stirred for further 1 h. After stirring, the reaction mixture was extracted with DCM (30 mL) the organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. The crude residue was purified by silica gel chromatography (toluene) to afford (S)-**35** (63 mg, 67%) as a white amorphas.

Compound (S)-**35**

R_f = 0.55 (EtOAc: hexanes= 2:1).



Compound **S4**

To a stirred solution of **35** (57 mg, 0.067 mmol) in DCM (0.67 mL) was added Et₃N (94 μL, 0.67 mmol) and MsCl (26 μL, 0.34 mmol) sequentially at 0 °C under N₂ atmosphere. After stirring for 30 min at room temperature, the reaction mixture was cooled to 0 °C and added sat. aq. solution of NH₄Cl (5 mL). The reaction mixture was extracted with DCM (20 mL) and the organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford the crude product **S4**. The crude residue was purified by preparative TLC (25% EtOAc in hexanes) to afford **S4** (57 mg, 91%) as a white amorphas.

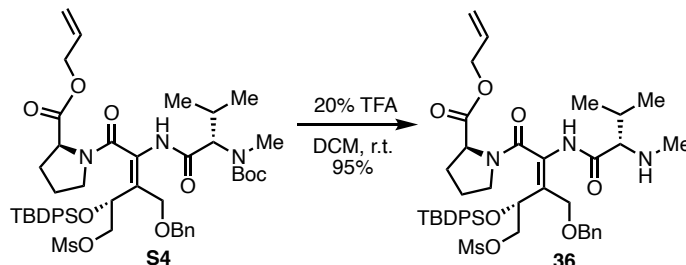
Compound **S4**

R_f = 0.50 (EtOAc: hexanes= 2:1). [α]_D²² = -36.22 (c= 0.1 in MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ(ppm) 7.74-7.60 (complex m, 4H), 7.55 (d, J= 7.1 Hz, 1H), 7.43-7.26 (complex m, 10 H), 5.94-5.57 (qd, J= 12.1, 11.1, 5.9, 5.5 Hz, 1H: 0.88/1 (5.94), 0.12/1 (5.94)), 5.36-5.10 (complex m, 5H), 4.72 (brs, 1H: 0.48/1 (4.72), 0.52 (4.70)), 4.62 (d, J= 4.1 Hz, 1H), 4.57-4.35 (complex m, 2H), 4.06 (brs, 1H), 3.51 (brs, 1H), 3.25 (t, J= 12.1 Hz, 1H), 3.01 (m, 1H), 2.82-2.72 (s, 3H: 0.32/3 (2.82), 0.19/3 (2.79), 0.90/3 (2.75), 0.80/3 (2.73), 0.69/3 (2.71)), 2.19 (m, 1H), 1.93-1.75 (brs, 1H), 1.50 (s, 3H), 1.46-1.44 (s,

9H: 2.25/9 (1.46), 1.29/9 (1.45), 3.58/9 (1.43), 0.99/9 (1.38), 0.55/9 (1.35), 0.18/9 (1.34), 0.18/9 (1.33)), 1/08-1.01 (complex m, 6H), 0.98 (s, 3H), 0.98-0.72 (complex m, 9H).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 167.0, 136.2, 135.8, 133.1, 132.0, 130.1, 129.7, 129.7, 128.6, 128.6, 128.6, 128.1, 127.6, 127.6, 127.6, 127.1, 128.5, 127.9, 127.6, 119.1, 66.0, 66.0, 65.2, 64.6, 60.5, 60.2, 60.5, 58.4, 58.4, 53.6, 47.4, 31.8, 29.3, 28.5, 27.3, 27.3, 27.1, 27.0, 24.8, 21.5, 19.8, 19.8, 19.5, 19.5, 18.7, 14.3. **IR (neat) ν_{\max} (cm⁻¹):** 1739, 1695, 1651, 1476, 1429, 1389, 1365, 1331, 1311, 1157, 1106, 1059, 995, 935, 881, 820, 783, 732, 705, 612, 571, 547, 504, 463, 443, 409.

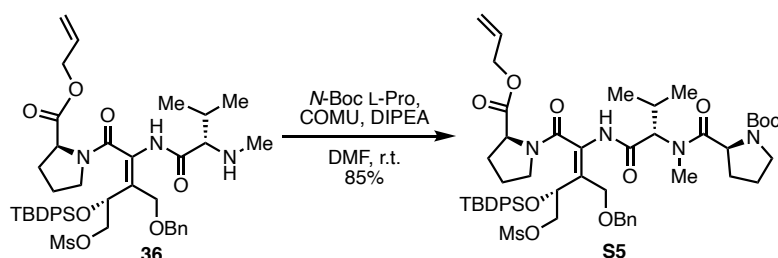


Compound 36

To a stirred solution of **S4** (400 mg, 0.43 mmol) in DCM (4.3 mL) was added TFA (0.86 mL) slowly at room temperature under N₂ atmosphere. After stirring for 1.5 h, the reaction mixture was cooled to 0 °C and added sat. aq. solution of NaHCO₃ (10 mL). The reaction mixture was extracted with DCM (40 mL) and the organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford the crude product **36**. The crude residue was purified by silica gel chromatography (0.5% MeOH in CHCl₃) to afford **36** (340 mg, 95%) as a brown amorphas.

Compound 36

R_f = 0.25 (CHCl₃: MeOH= 6:1).

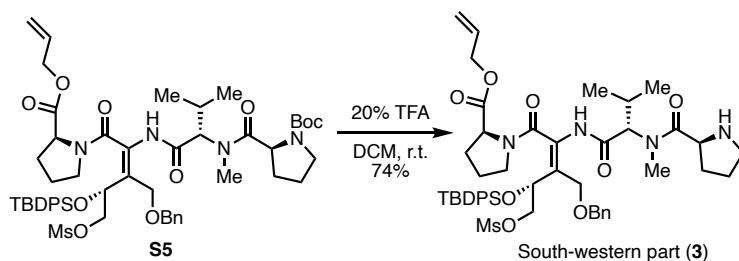


Compound S5

To a stirred solution of **36** (236 mg, 0.28 mmol) and *N*-Boc L-Pro-OH in DMF (2.9 mL) was added DIPEA (247 μL, 1.42 mmol) and COMU (242 mg, 0.57 mmol) sequentially at 0°C under N₂ atmosphere. After stirring for 6 h, the reaction mixture was added sat. aq. solution of NH₄Cl (15 mL). The reaction mixture was extracted with a solution of EtOAc and hexanes (1:1, 40 mL) and the organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford the crude product **S5**. The crude residue was purified by preparative TLC (20% EtOAc in hexanes) to afford **S5** (248 mg, 85%) as a brown amorphas.

Compound S5

R_f = 0.55 (EtOAc: hexanes= 1:2).



South-western part (3)

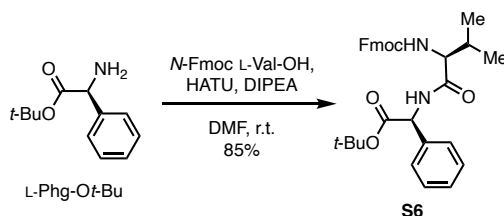
To a stirred solution of **S5** (180 mg, 0.18 mmol) in DCM (1.8 mL) was added TFA (0.35 mL) slowly at room temperature under N₂ atmosphere. After stirring for 2 h, the reaction mixture was cooled to 0 °C and added sat. aq. solution of NaHCO₃ (15 mL). The reaction mixture was extracted with DCM (60 mL) and the organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford the crude product **3**. The crude residue was purified by silica gel chromatography (5% MeOH in CHCl₃) to afford **3** (120 mg, 74%) as a brown amorphas.

South-western part (3)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.94-7.59 (m, 3H), 7.45-7.28 (m, 10H), 7.26-7.05 (m, 3H), 5.94-5.81 (m, 1H), 5.31-5.24 (m, 1H), 5.16 (t, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.84-4.12 (m, 8H), 4.04-3.77 (m, 1H), 3.74-3.25 (m, 2H), 3.14-2.84 (m, 4H), 2.80-2.50 (m, 2H), 2.44-2.34 (m, 1H), 2.19 (d, *J* = 24.1 Hz, 1H), 1.99 (d, *J* = 25.8 Hz, 2H), 1.89-1.76 (m, 3H), 1.42-1.37 (m, 1H), 1.09-0.97 (m, 8H), 0.92-0.73 (m, 9H).
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 166.4, 163.0, 136.1, 133.0, 132.2, 130.3, 128.8, 128.8, 127.9, 127.8, 118.4, 77.4, 77.2, 76.9, 73.7, 72.7, 69.2, 65.6, 58.8, 47.9, 47.7, 36.7, 29.8, 27.0, 25.7, 25.3, 24.7, 24.5, 19.7, 19.5, 18.7, 18.6, 1.2.

R_f = 0.35 (CHCl₃: MeOH = 10:1).

HRMS (FAB) *m/z* calcd for C₄₉H₆₇N₄O₁₀SSi [M+H]⁺: 931.4347, found: 931.4404.



Compound S6

To a stirred solution of N-Fmoc L-Val-OH (7.9 g, 23.3 mmol) in DMF (230 mL) was added DIPEA (8.1 mL, 46.6 mmol) and COMU (10.0 g, 23.3 mmol) sequentially at 0°C under N₂ atmosphere. After stirring for 1 h, the reaction mixture was added L-Phg-O-*t*-Bu (7.9 mg, 0.28 mmol) in one portion and stirred for further 24 h. The reaction mixture was added sat. aq. solution of NH₄Cl (400 mL). The reaction mixture was extracted with a solution of EtOAc and hexanes (1:1, 800 mL) and the organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford the crude product **S6**. The crude residue was purified by silica gel chromatography (20% EtOAc in hexanes) to afford **S6** (10.5 g, 85%) as a white amorphas.

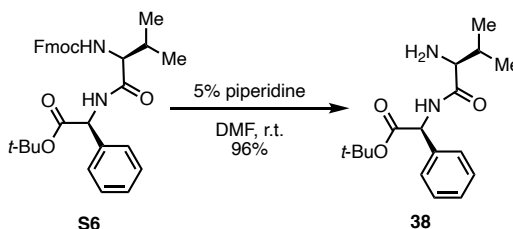
Compound S6

R_f = 0.40 (EtOAc: hexanes = 1:1). [α]_D²³ = −46.08 (*c* = 0.1 in MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.79-7.75 (m, 3H), 7.63-7.56 (m, 3H), 7.44-7.35 (m, 2H), 7.33-7.25 (m, 10H), 7.02 (m, 1H), 5.53 (m, 1H), 5.45-5.41 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.36 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.31-4.28 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.22-4.13 (m, 2H), 2.19-2.13 (m, 1H), 1.39 (s, 9H), 1.04 (d, *J* = 6.3 Hz), 0.97 (d, *J* = 6.3 Hz).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 170.7, 169.6, 156.5, 144.0, 143.9, 141.4, 136.7, 128.9, 128.8, 128.6, 128.4, 128.3, 127.8, 127.2, 125.2, 120.0, 82.9, 82.7, 77.4, 77.2, 76.9, 67.2, 60.1, 57.2, 47.2, 31.6, 28.2, 27.9, 19.2, 18.0, 17.8.

HRMS (FAB) *m/z* calcd for C₃₂H₃₇N₂O₅ [M+H]⁺: 529.2702, found: 529.2731.



Compound 38

To a stirred solution of **S6** (1.9 g, 3.60 mmol) in DMF (36 mL) was added piperidine (1.8 mL) at 0°C under N₂ atmosphere. After stirring for 1 h, the reaction mixture was added sat. aq. solution of NH₄Cl (200 mL). The reaction mixture was extracted with a solution of EtOAc and hexanes (1:1, 800 mL) and the organic phase was washed with brine (200 mL), dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford the crude product **38**. The crude residue was purified by silica gel chromatography (1% MeOH in CHCl₃ to 5% MeOH in CHCl₃) to afford **38** (1.05 g, 96%) as a white amorphas.

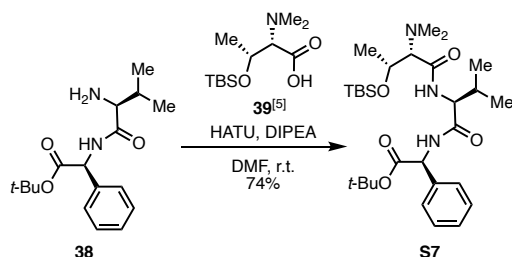
Compound 38

R_f = 0.45 (CHCl₃: MeOH = 10:1). [α]_D²³ = +59.90 (*c* = 0.1 in MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.22 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.34-7.18 (complex m, 5H), 5.45-5.34 (m, 1H), 3.36 (s, 1H), 2.42 (brs, 1H), 2.24 (m, *J* = 3.2 Hz, 1H), 1.38 (s, 9H), 0.94 (d, *J* = 3.4 Hz, 3H), 0.76 (d, *J* = 2.9 Hz, 3H).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 173.4, 173.1, 171.2, 170.0, 137.3, 128.8, 128.7, 128.1, 127.2, 127.2, 82.4, 77.4, 77.2, 76.9, 60.4, 59.8, 56.9, 56.8, 31.0, 27.9, 21.1, 19.5, 16.4, 16.3, 14.2.

IR (neat) *v*_{max} (cm^{−1}): 3336, 2964, 2358, 2182, 2358, 2182, 2046, 20009, 1734, 1660, 1496, 1369, 1153, 843, 697, 608, 540, 499, 461, 440, 402.



Compound S7

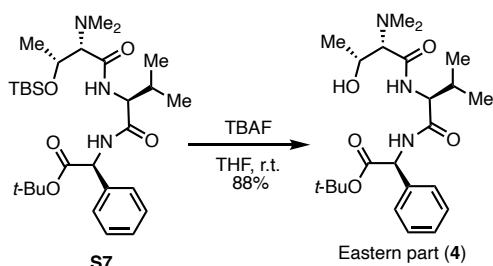
To a stirred solution of **39**^[6] (834 mg, 3.2 mmol) in DMF (32 mL) was added DIPEA (1.1 mL, 6.4 mmol) and HATU (1.2 g, 3.2 mmol) sequentially at 0°C under N₂ atmosphere. After stirring for 1 h at room temperature, the reaction mixture was added **38** (978 mg, 3.2 mmol) in one portion and stirred for further 46 h. The reaction mixture was added sat. aq. solution of NH₄Cl (100 mL). The reaction mixture was extracted with a solution of EtOAc and hexanes (1:1, 300 mL) and the organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford the crude product **S7**. The crude residue was purified by silica gel chromatography (20% EtOAc in hexanes) to afford **S7** (1.26 g, 74%) as a white amorphous.

(Note; compound **39** was prepared according to the literature^{[3][4]})

Compound S7

R_f = 0.66 (EtOAc: hexanes = 1:2). [α]_D²⁵ = +7.86 (c = 0.1 in MeOH).

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹): 2008, 1981, 1957, 1742, 1634, 1536, 1372, 1240, 1157, 1062, 834, 756.



Eastern part (4)

To a stirred solution of **S7** (691 mg, 1.26 mmol) in THF (13 mL) was added a solution of TBAF (1.0 M in THF, 2.5 mL) at 0°C. After stirring for 2 h at room temperature, the reaction mixture was added sat. aq. solution of NH₄Cl (100 mL). The reaction mixture was extracted with EtOAc (150 mL) and the organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford the crude product **4**. The crude residue was purified by silica gel chromatography (5% MeOH in CHCl₃) to afford **4** (482 mg, 88%) as a colorless oil.

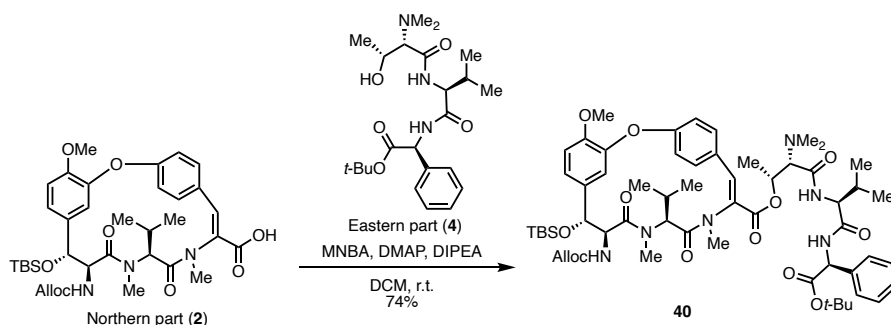
Eastern part (4)

R_f = 0.25 (CHCl₃:MeOH = 10:1). [α]_D²⁵ = -35.50.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.42-7.28 (m, 5H), 7.09-6.98 (m, 1H), 5.41 (dd, *J* = 6.9, 9.8 Hz, 1H), 4.44-4.27 (m, 1H), 4.05-3.96 (m, 1H), 3.05 (s, 1H), 2.46 (s, 6H), 2.21-2.03 (m, 1H), 1.41-1.28 (m, 9H), 1.17 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 1.13-1.09 (m, 1H), 1.04-0.98 (m, 2H), 0.93-0.83 (m, 3H).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 170.2, 169.6, 169.2, 137.1, 136.7, 128.9, 128.9, 128.4, 128.4, 127.3, 127.2, 83.0, 82.9, 77.4, 77.2, 76.9, 74.1, 74.0, 64.5, 58.7, 58.2, 57.3, 42.3, 31.0, 30.8, 27.9, 19.5, 19.4, 18.6, 18.2.

IR (neat) ν_{max} (cm⁻¹): 3288, 2972, 1737, 1637, 1534, 1454, 1392, 1369, 1320, 1285, 1254, 1220, 1151, 1126, 1105, 1033, 697.



Compound 40

To a stirred solution of **2** (120 mg, 0.17 mmol), **4** (113 mg, 0.26 mmol) and MS 4A (51 mg) in DCM (1.7 mL) was added DIPEA (105 μ L, 0.60 mmol) and DMAP (11 mg, 0.34 mmol) and MNBA (118 mg, 0.34 mmol) sequentially at 0°C under N₂ atmosphere. After stirring for 17 h at room temperature, the reaction mixture was cooled to 0°C and added sat. aq. solution of NH₄Cl (15 mL). The

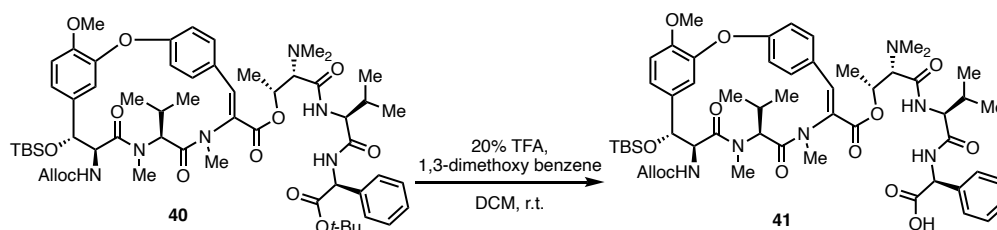
reaction mixture was extracted with DCM (40 mL) and the organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford the crude product **40**. The crude residue was purified by silica gel chromatography (60% EtOAc in hexanes) to afford **40** (142 mg, 74%) as a white amorphous.

Compound 40

Rf = 0.27 (EtOAc: hexanes= 1:2).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.49 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.33-7.29 (m, 6H), 7.1 (complex m, 2H), 6.90 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.80 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 5.88 (m, 1H), 5.55-5.39 (m, 3H), 5.27 (d, *J* = 17.7 Hz, 1H), 5.19 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 4.81-4.72 (m, 1H), 4.56 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 4.38 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 4.34-4.26 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 2.86 (s, 2.22/3 H), 2.81 (0.78/3 H), 2.66 (s, 1.5/3 H), 2.65 (1.5/3 H), 2.47 (brs, 3H), 2.17 (s, 6H), 1.67 (brs, 2H), 1.38 (s, 4.5/9H), 1.36 (s, 4.5/9 H), 1.25-1.20 (s, 1H), 1.00 (dd, *J* = 9.2, 6.9 Hz, 2H), 0.89 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.81 (s, 9H), 0.71 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.03 (s, 3H), -0.15 (s, 3H).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 171.2, 170.2, 169.8, 169.5, 160.4, 157.4, 155.9, 153.4, 151.6, 143.0, 137.2, 136.8, 135.1, 133.8, 132.7, 128.9, 128.8, 128.3 (2C), 127.2, 124.7, 121.3, 117.9, 116.2, 112.3, 82.8 (2C), 80.5, 77.4, 77.2, 76.9, 75.2, 66.7, 66.5, 65.9, 62.4, 57.3, 57.2, 56.0, 30.9, 27.9, 26.0, 25.7, 25.7, 19.7, 19.5 (2C), 18.5, 18.4, 18.3, 18.2, 18.1, -4.6, -5.0



Compound 41

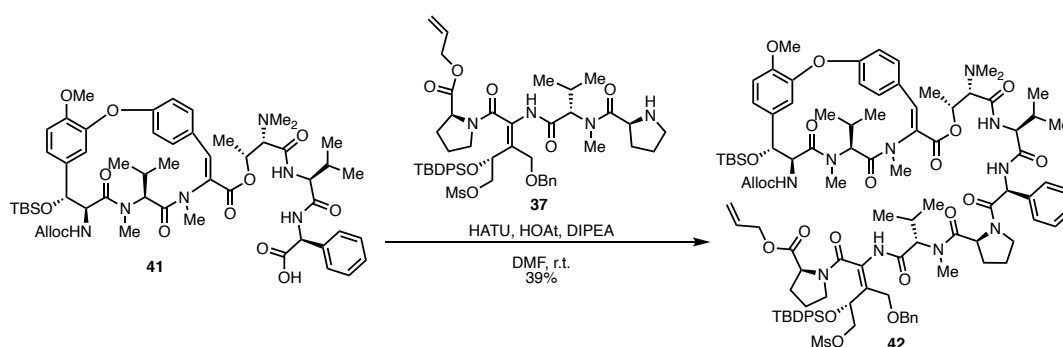
To a stirred solution of **40** (4.2 mg, 0.0038 mmol) in DCM (0.1 mL) was added 1,3-dimethoxybenzene (7.3 μ L, 0.057 mmol) and TFA (0.02 mL) sequentially at room temperature under N₂ atmosphere. After stirring for 2 h, the reaction mixture was cooled to 0 °C and added sat. aq. solution of NaHCO₃ (12 μ L) adjusted to pH 7.0 and diluted with H₂O (8 mL). The reaction mixture was extracted with DCM (10 mL) and the organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford the crude product **41**. The crude residue was used for the next reaction without further purification.

Compound 41

Rf = 0.36 (CHCl₃: MeOH= 6:1). $[\alpha]_D^{23}$ = -50.02 (*c* = 0.1 in MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.6-7.29 (complex m, 10H), 7.06 (m, 1H), 6.90 (m, 1H), 6.76 (m, 1H), 6.50 (s, 0H), 5.90 (m, 1H), 5.49 (m, 1H), 5.28 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 5.19 (m, 1H), 4.78 (m, 2H), 4.53 (m, 2H), 3.82-3.64 (complex m, 6H), 3.07 (m, 1H), 2.92-2.65 (complex m, 5H), 2.33-2.07 (complex m, 6H), 1.25-1.14 (complex m, 3H), 0.87 (m, 3H), 0.81 (s, 4.5/9 H), 0.80 (s, 4.5 Hz), 0.73 (m, 3H), 0.032 (s, 1.48/3 H), 0.014 (s, 1.52/3 H), -0.15 (s, 1.28/3 H), -0.182 (s, 1.71/3 H).

HRMS (FAB) *m/z* calcd for C₅₅H₇₇N₆O₁₃Si [M+H]⁺: 1057.5318, found: 1057.5348.



Compound 42

To a stirred solution of crude **41**^[6] in DMF (0.05 mL) was added DIPEA (2.0 μ L, 0.011 mmol) and HATU (1.7 mg, 0.0046 mmol) sequentially at 0 °C under N₂ atmosphere. After stirring for 30 min at room temperature, the reaction mixture was added **37** (3.5 mg, 0.0046 mmol) in DMF (0.1 mL) and stirred for further 8 h. The reaction mixture was added sat. aq. solution of NH₄Cl (2 mL). The reaction mixture was extracted with a solution of EtOAc and hexanes (1:1, 8 mL) and the organic phase was dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to afford the crude product **42**. The crude residue was purified by preparative TLC (5% MeOH in CHCl₃) to afford **37** (2.9 g, 39%) as a white amorphous.

Compound 42

R_f = 0.56 (CHCl₃: MeOH= 10:1).

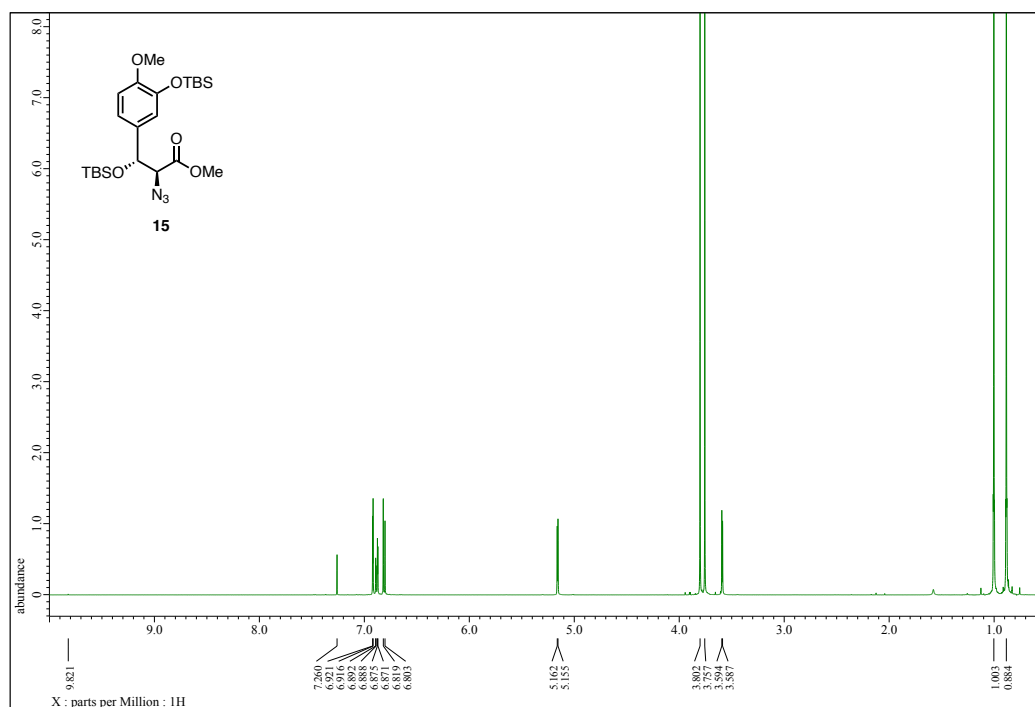
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.61-7.52 (complex m, 5H), 7.41-7.34 (complex m, 10H), 7.10-7.07 (complex m, 2H), 6.90 (d, *J*= 8.6 Hz, 1H), 6.78 (m, 2H), 5.87 (m, 2H), 5.52 (1H), 5.40 (m, 1H), 5.26 (m, 2H), 5.17 (m, 2H), 4.81-4.69 (complex m, 5H), 4.56-4.45 (complex m, 5 H), 4.18-4.09 (complex m, 2H), 3.95 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 2.99-2.93 (complex m, 12H), 2.83 (s, 6H), 2.66-2.63 (m, 12H), 2.23 (m, 2H), 1.96 (m, 2H), 1.62 (s, 12H), 1.41 (m, 2H), 1.24-1.23 (m, 6H), 1.01 (s, 6H), 0.97-0.86 (complex m, 6H), 0.81 (s, 9 H), 0.736 (d, *J*= 6.3 Hz, 6 H), 0.068 (s, 6H), 0.033 (s, 6H) –0.15 (s, 6H).

HRMS (FAB) *m/z* calcd for C₁₀₄H₁₄₀N₁₀O₂₂SSi₂Na [M+H]⁺: 1991.9301, found:1991.9869.

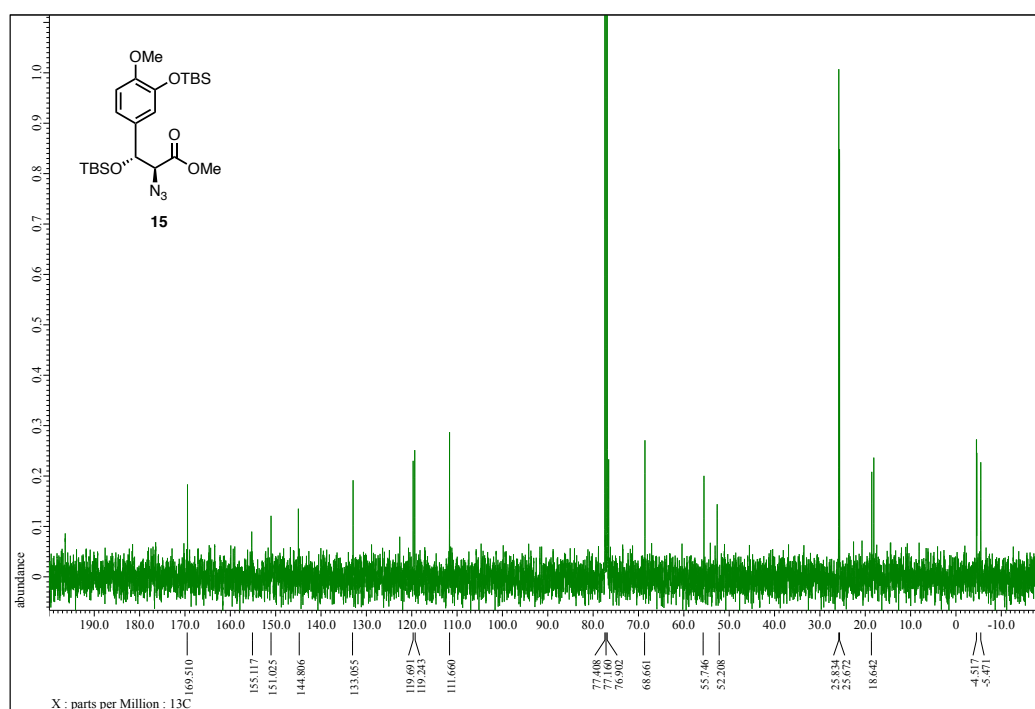
3. References

- [1] X. Franck *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 4224.
- [2] K. G. Pinney *et al.* *Tetrahedron Letters* **2015**, 56, 3624.
- [3] I. Alfonso *et al.* *RSC Advances* **2013**, 3, 11556.
- [4] T. V. RajanBabu *et al.* *Org. Lett.* **2010**, 12, 2162.
- [5] H. J. Gais *et al.* *Chem. Eur. J.* **2019**, 25, 8371.

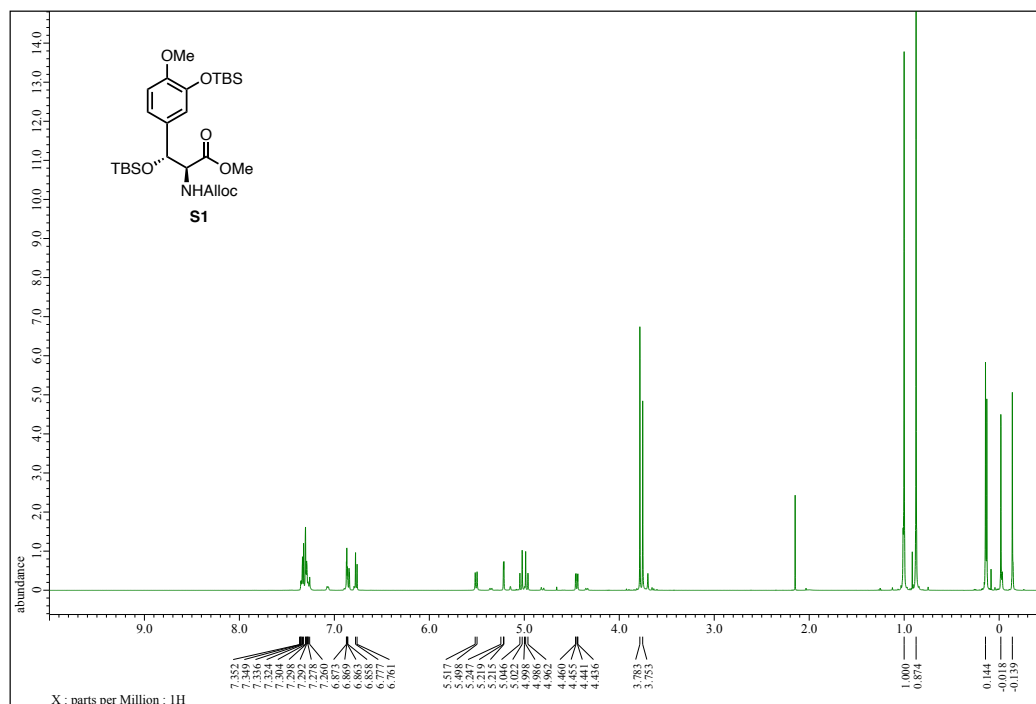
¹H NMR spectra of compound 15 (CDCl₃, 500 MHz)



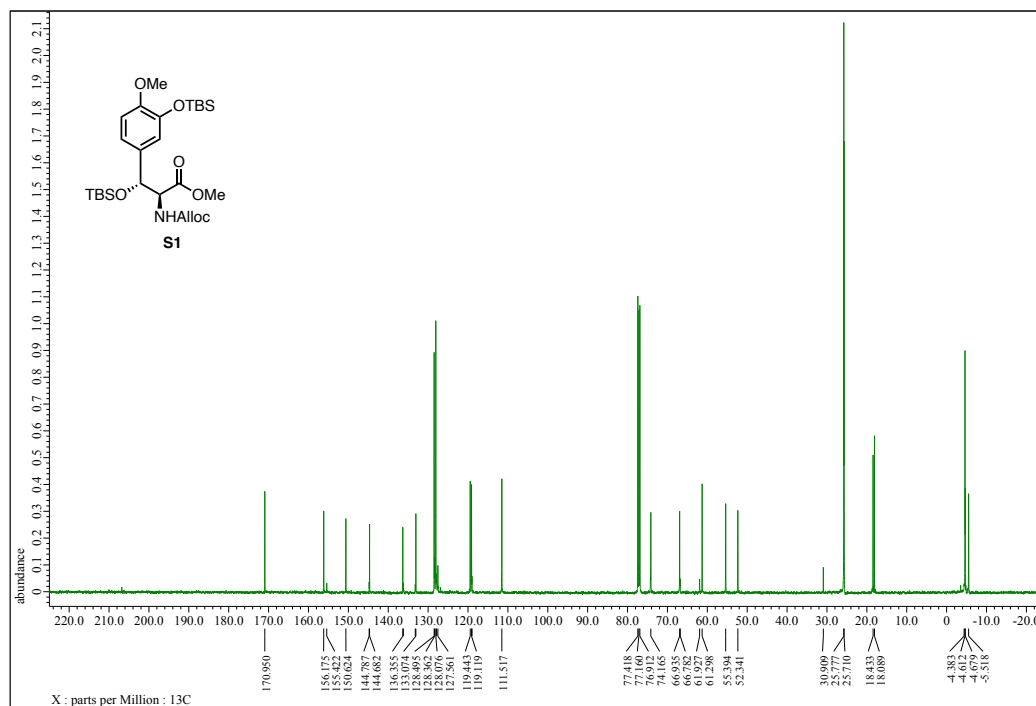
¹³C NMR spectra of compound 15 (CDCl₃, 125 MHz)



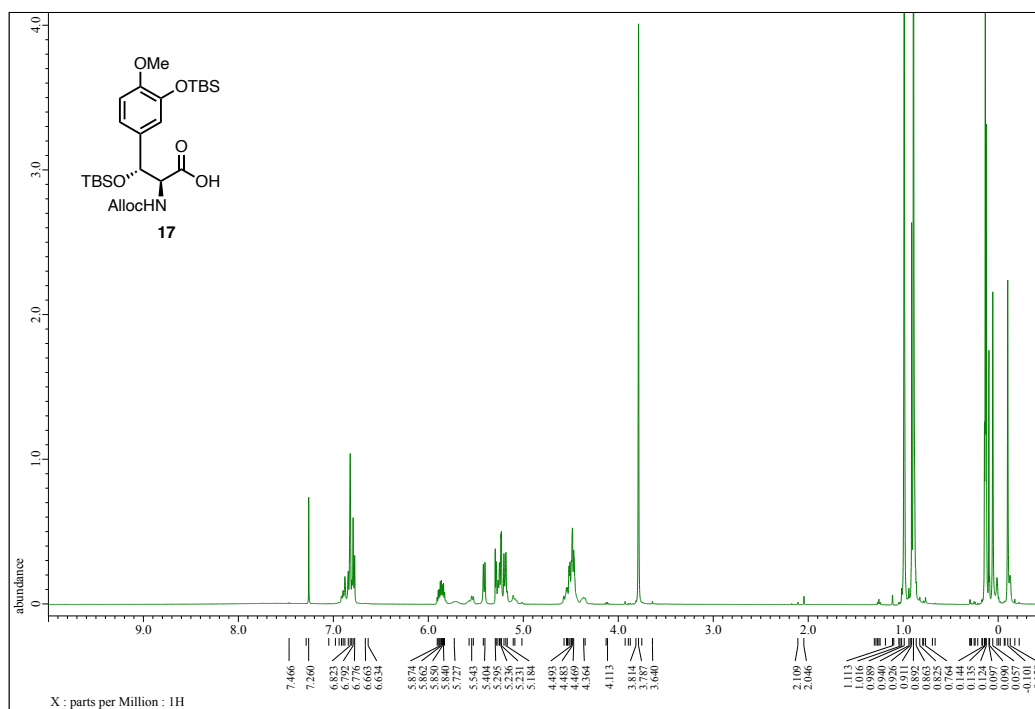
¹H NMR spectra of compound S1 (CDCl₃, 500 MHz)



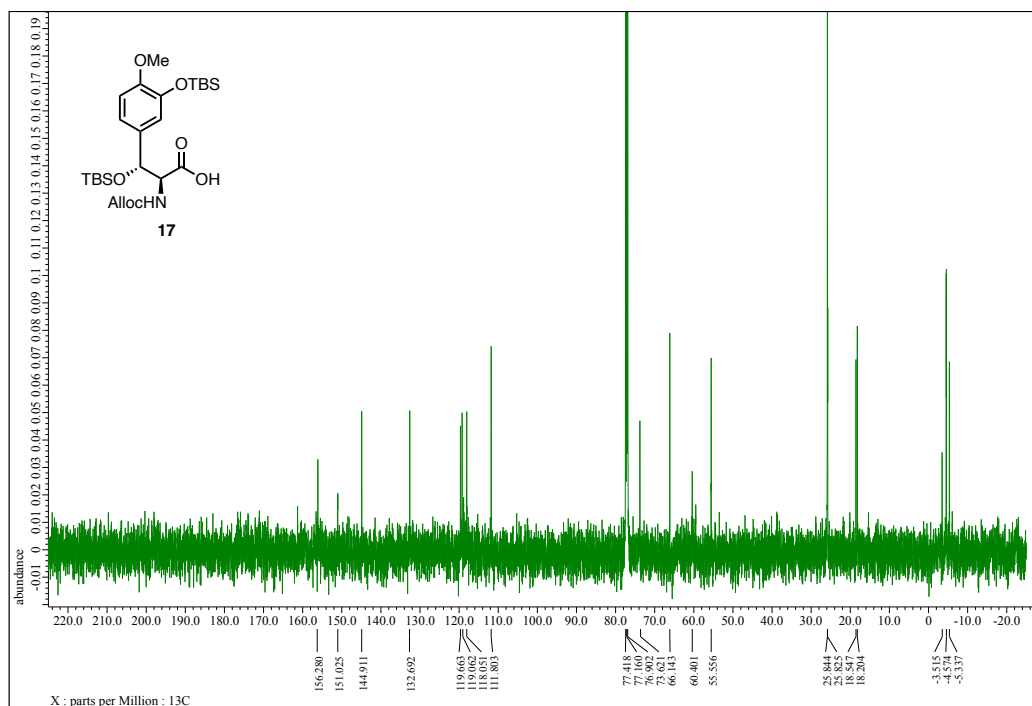
¹³C NMR spectra of compound 15 (CDCl₃, 125 MHz)



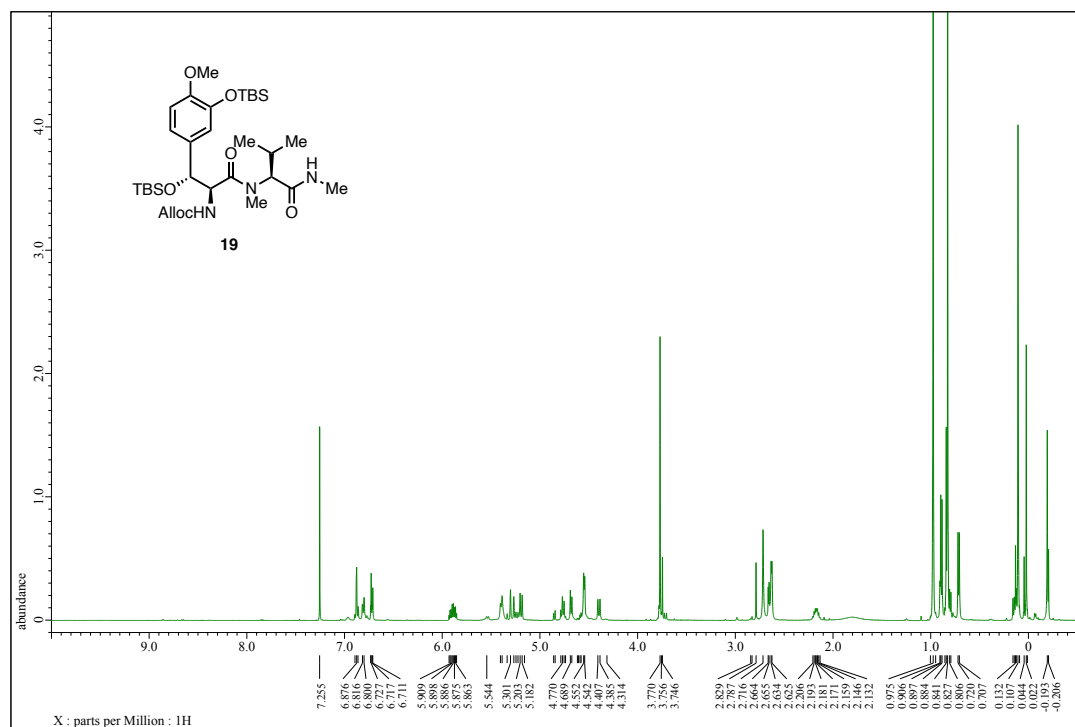
¹H NMR spectra of compound 17 (CDCl₃, 500 MHz)



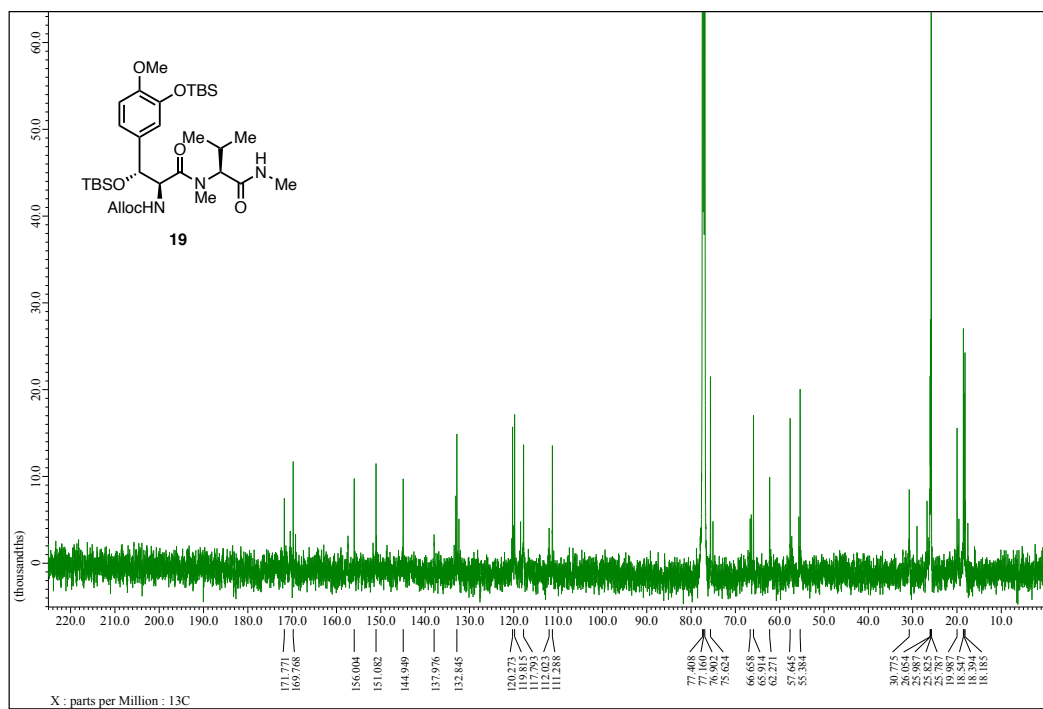
¹³C NMR spectra of compound 17 (CDCl₃, 125 MHz)



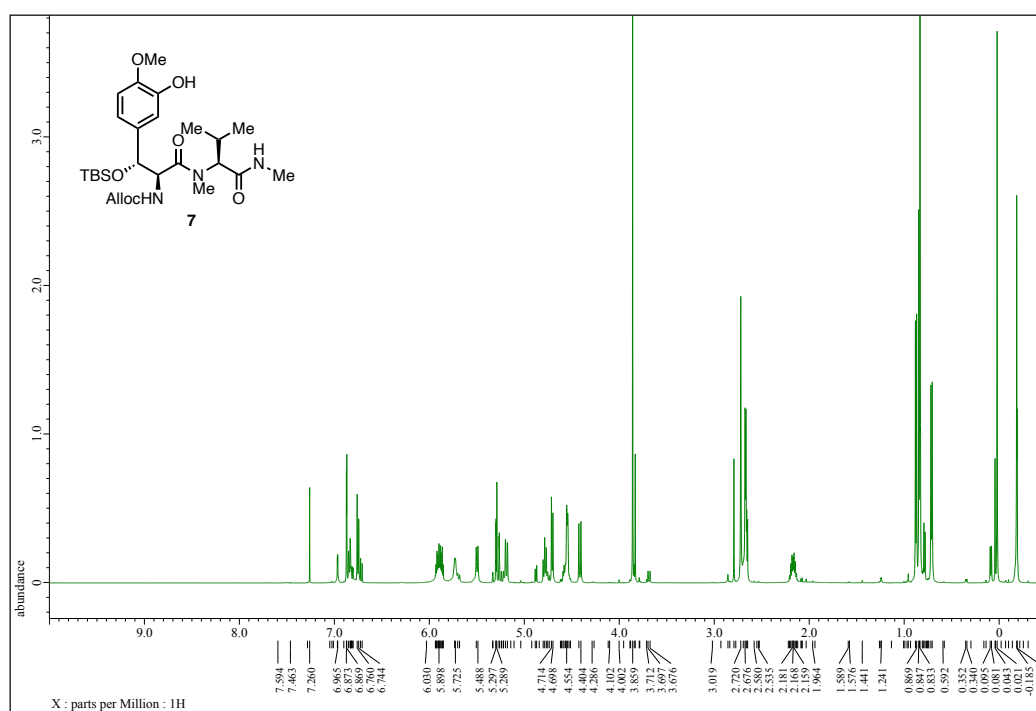
¹H NMR spectra of compound 19 (CDCl₃, 500 MHz)



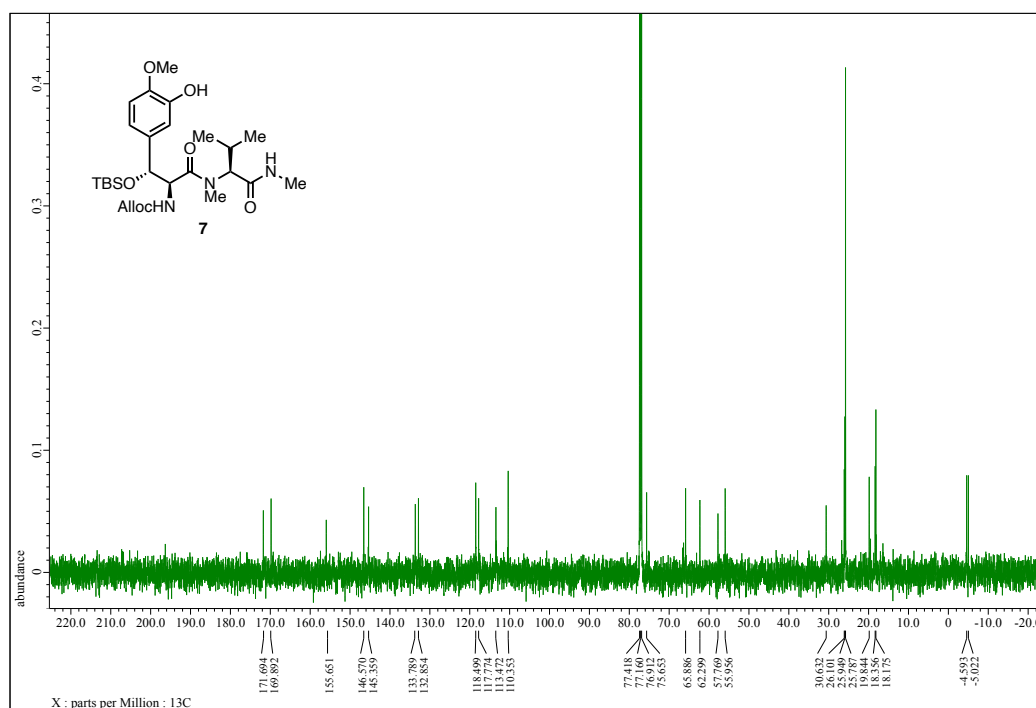
¹³C NMR spectra of compound 19 (CDCl₃, 125 MHz)



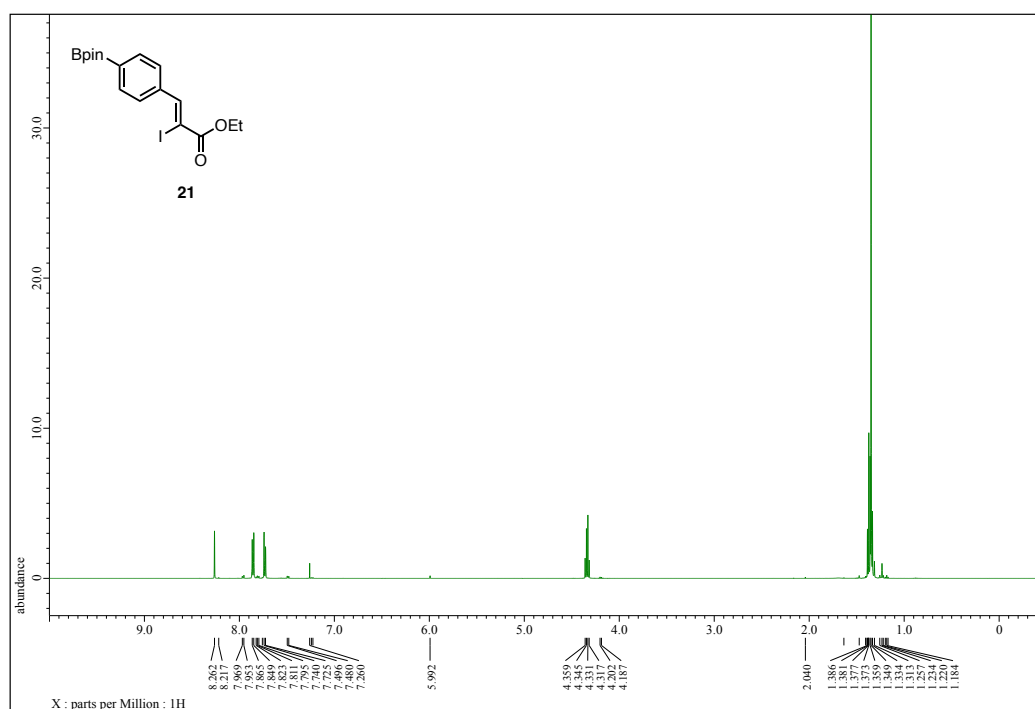
¹H NMR spectra of compound 7 (CDCl₃, 500 MHz)



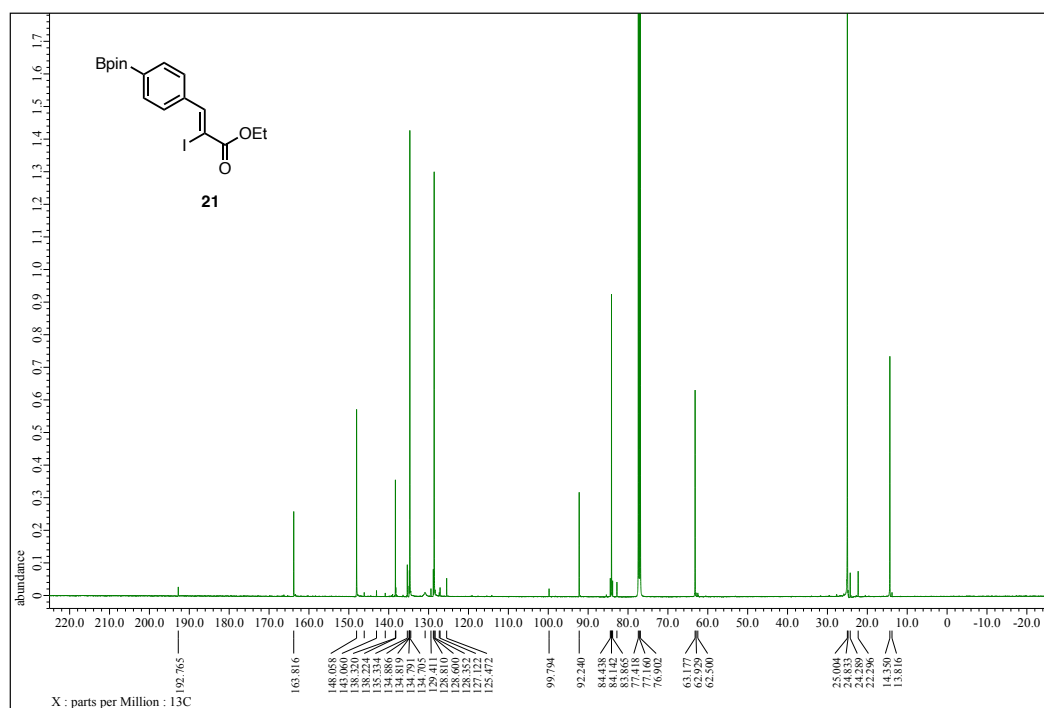
¹³C NMR spectra of compound 7 (CDCl₃, 125 MHz)



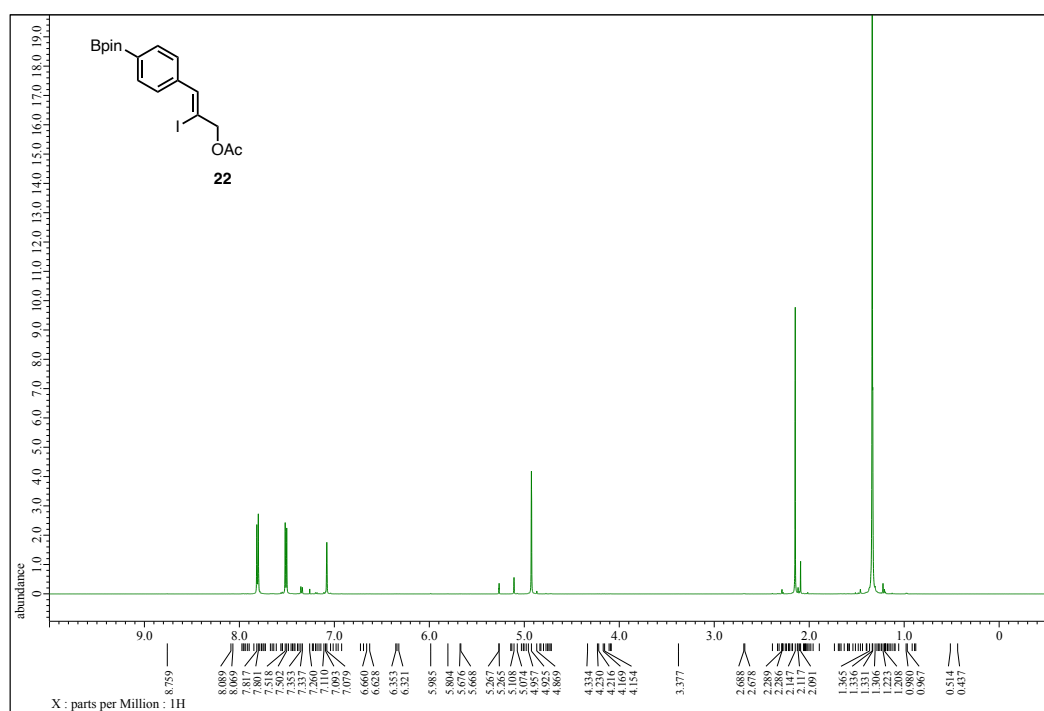
¹H NMR spectra of compound 21 (CDCl₃, 500 MHz)



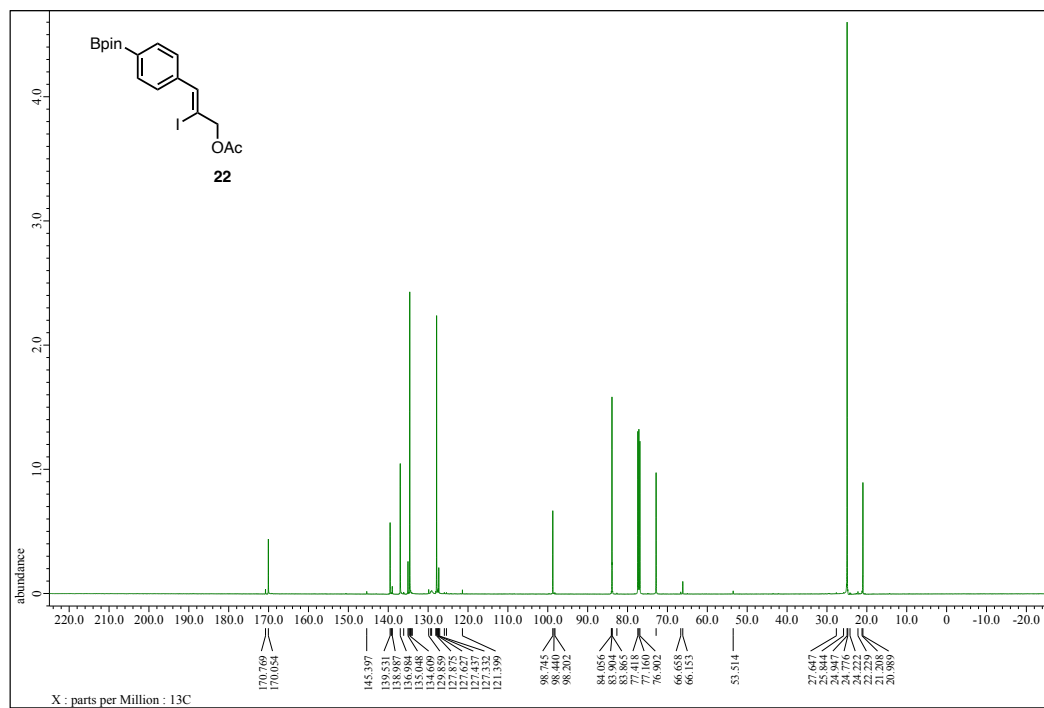
¹³C NMR spectra of compound 21 (CDCl₃, 125 MHz)



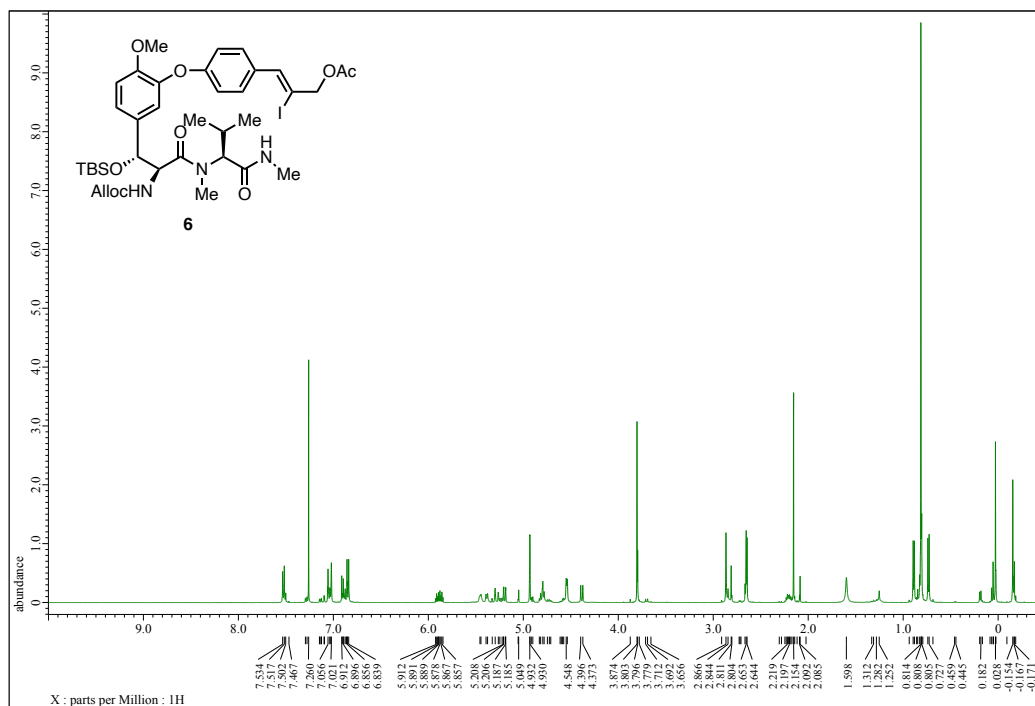
¹H NMR spectra of compound 22 (CDCl₃, 500 MHz)



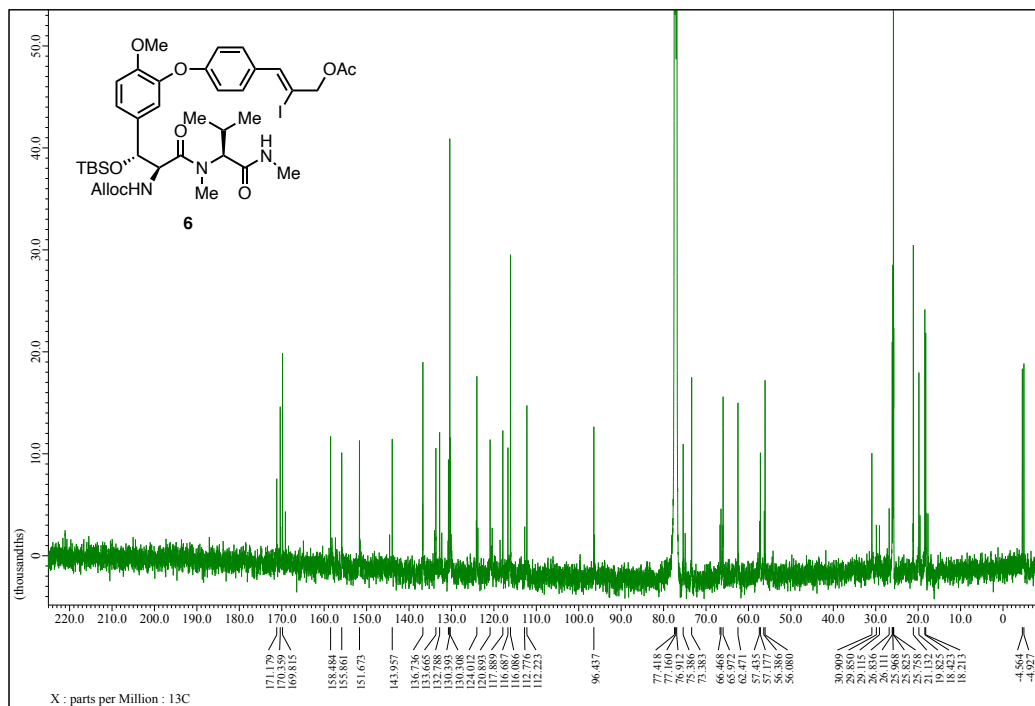
¹³C NMR spectra of compound 22 (CDCl₃, 125 MHz)



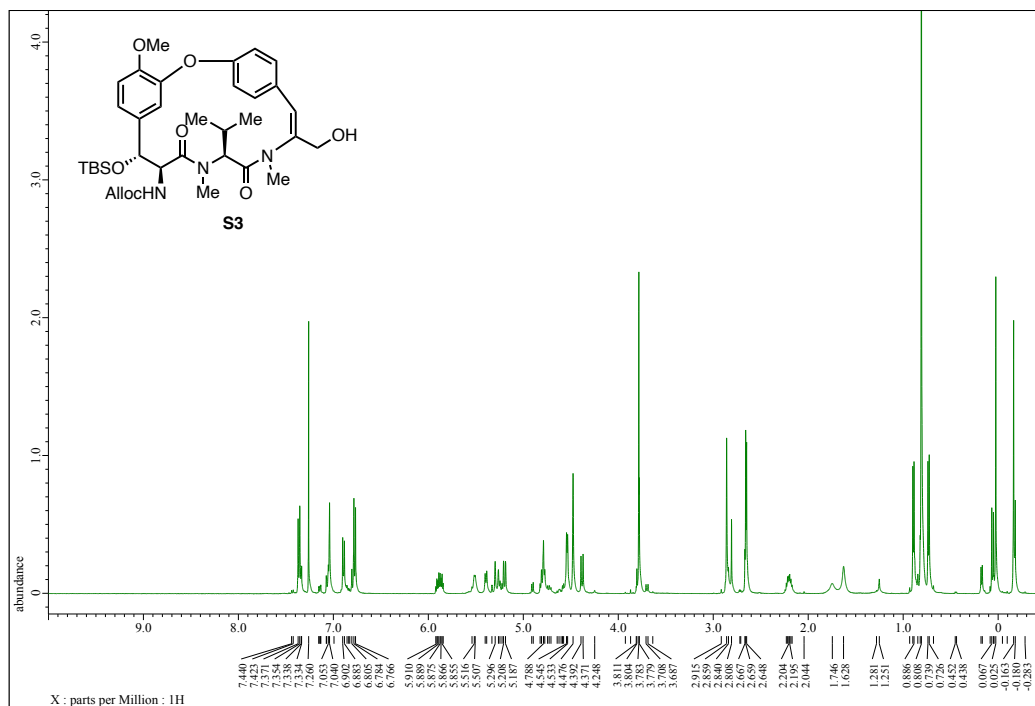
¹H NMR spectra of compound 6 (CDCl₃, 500 MHz)



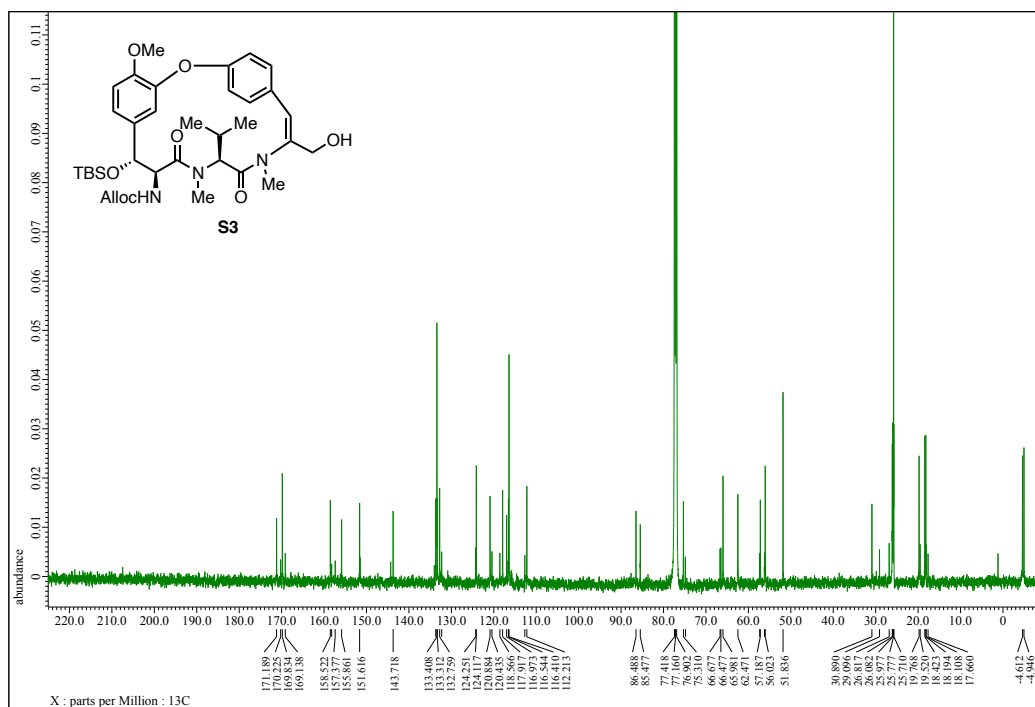
^{13}C NMR spectra of compound 6 (CDCl_3 , 125 MHz)



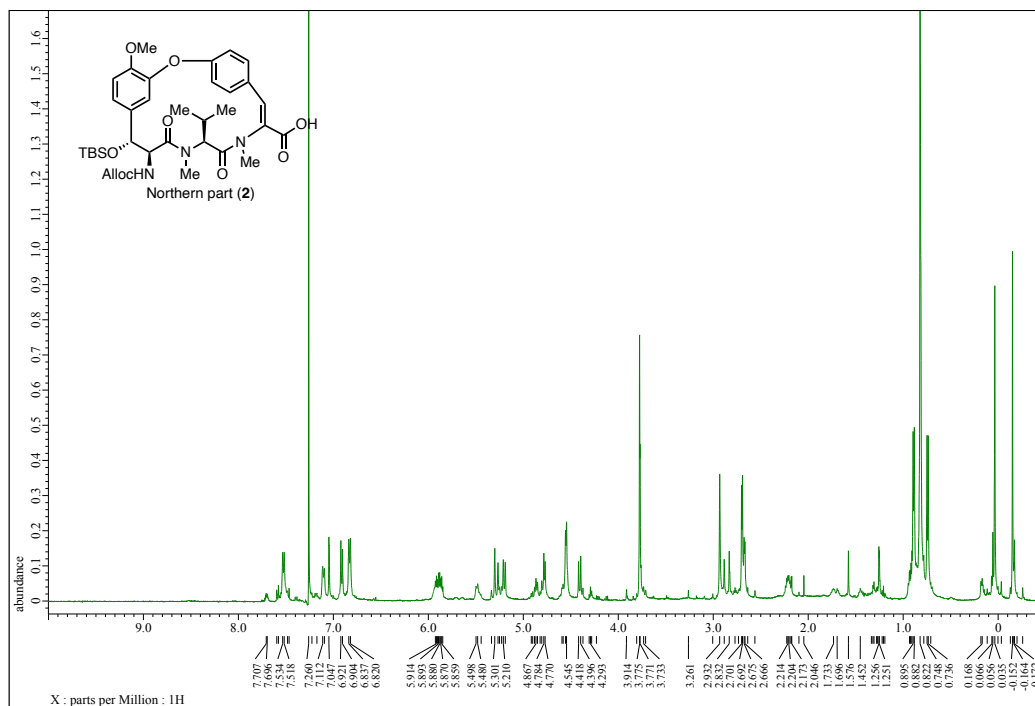
¹H NMR spectra of compound S3 (CDCl₃, 500 MHz)



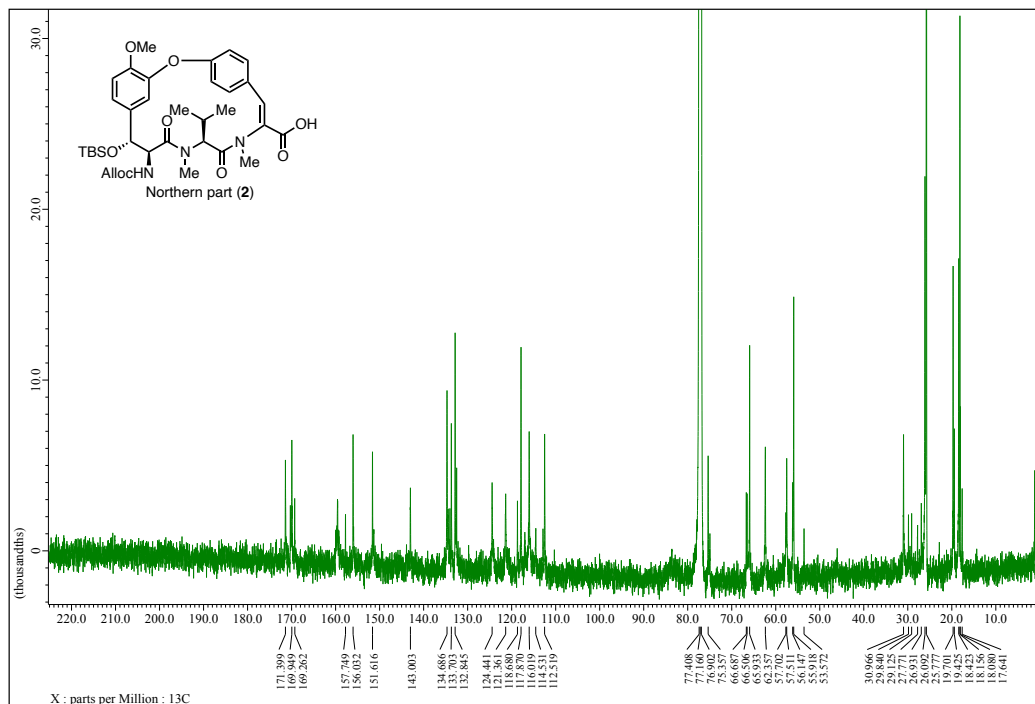
¹³C NMR spectra of compound S3 (CDCl₃, 125 MHz)



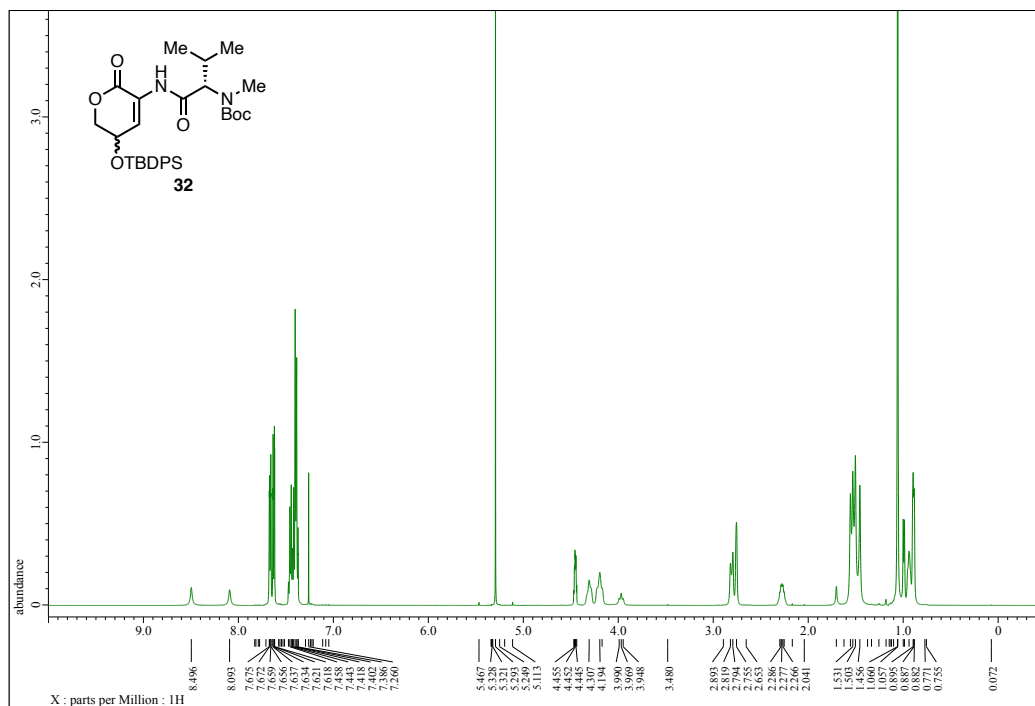
¹H NMR spectra of compound 2 (CDCl₃, 500 MHz)



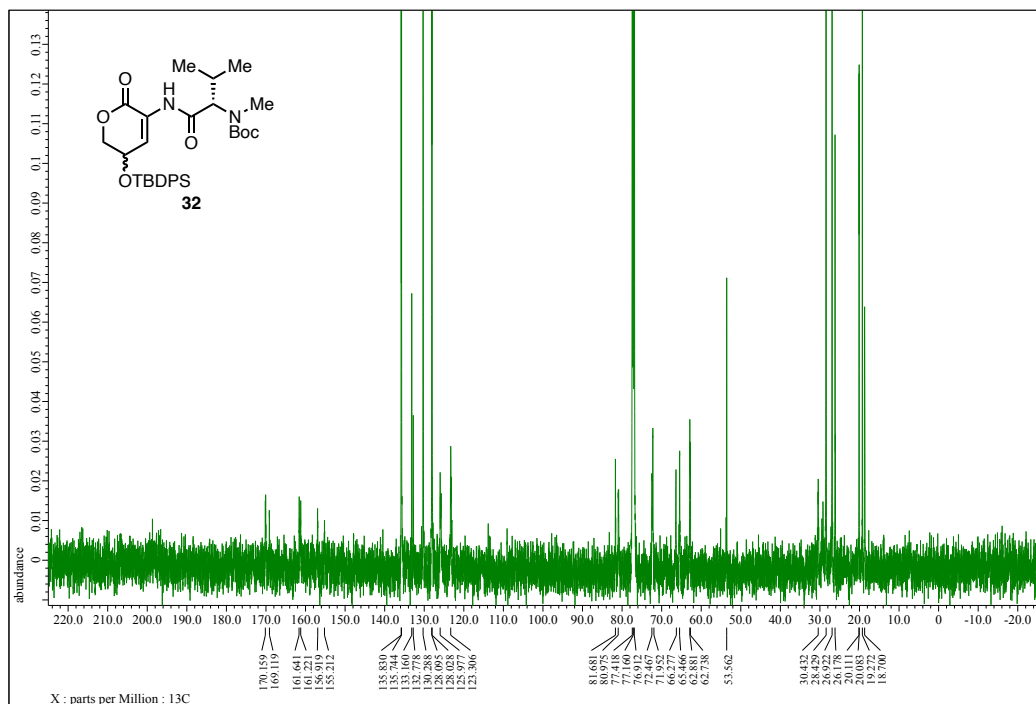
¹³C NMR spectra of compound 2 (CDCl₃, 125 MHz)



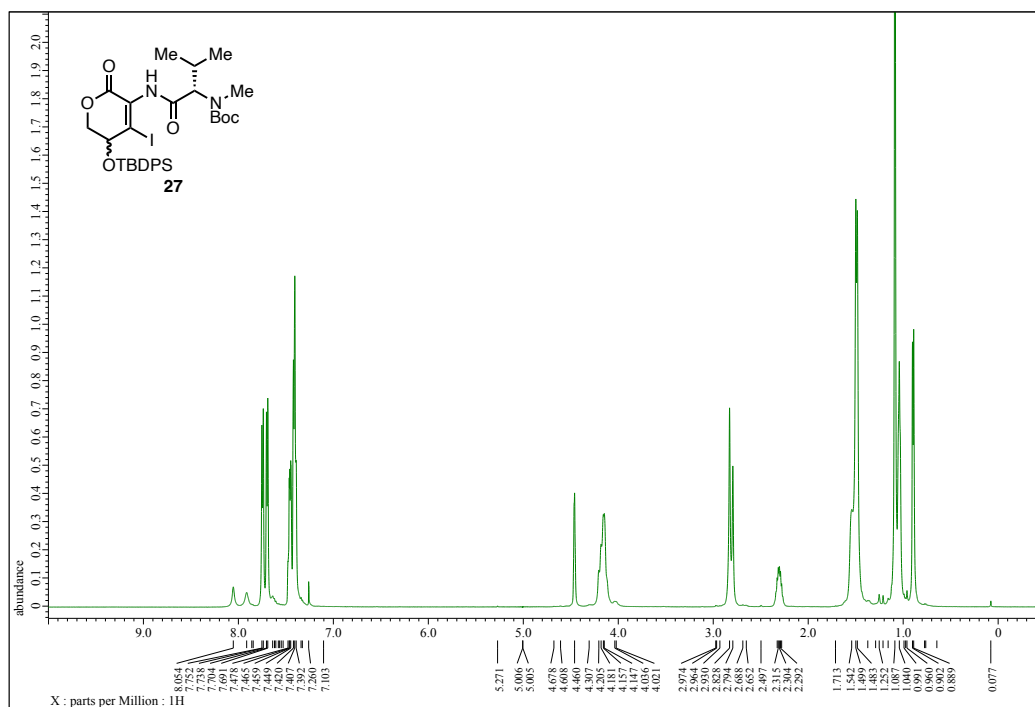
¹H NMR spectra of compound 32 (CDCl₃, 500 MHz)



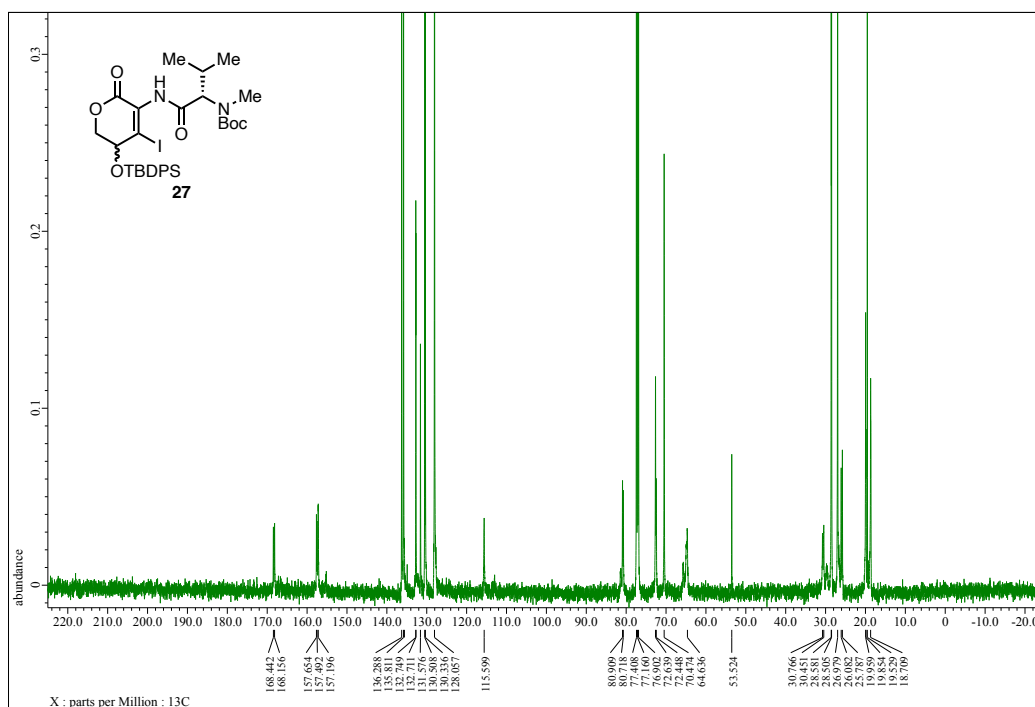
¹³C NMR spectra of compound 32 (CDCl₃, 125 MHz)



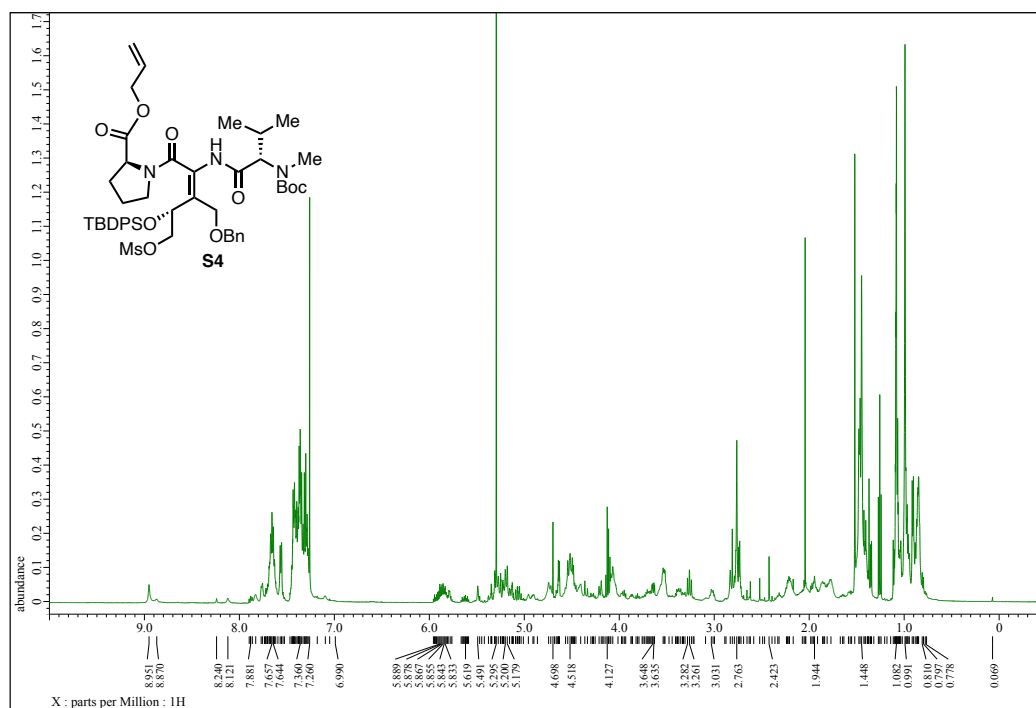
¹H NMR spectra of compound 27 (CDCl₃, 500 MHz)



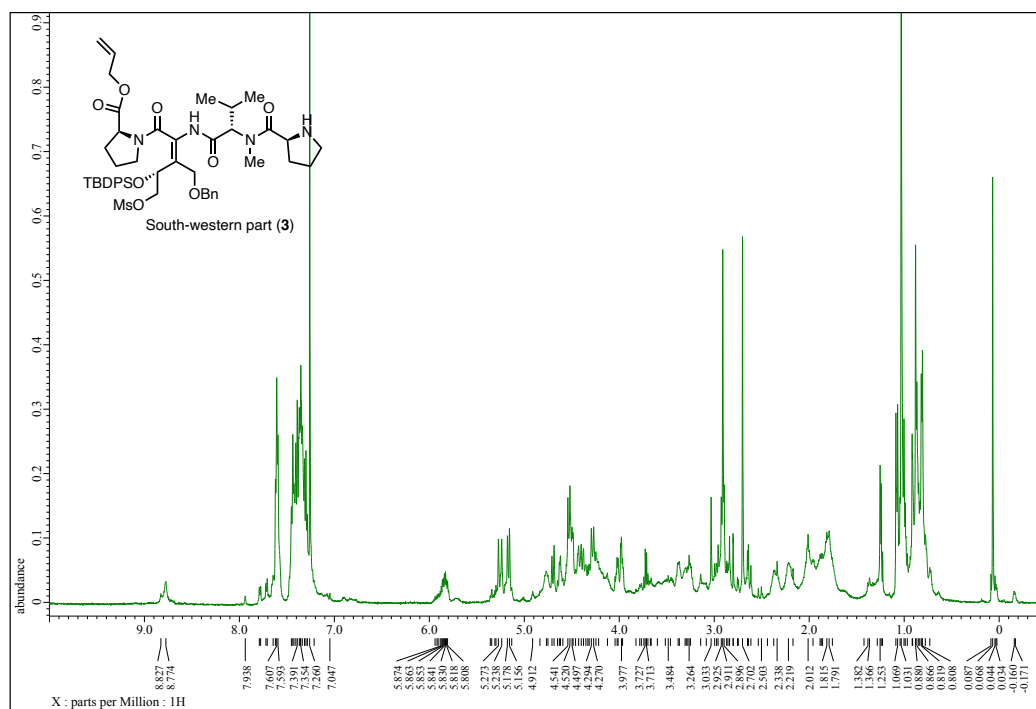
¹³C NMR spectra of compound 27 (CDCl₃, 125 MHz)



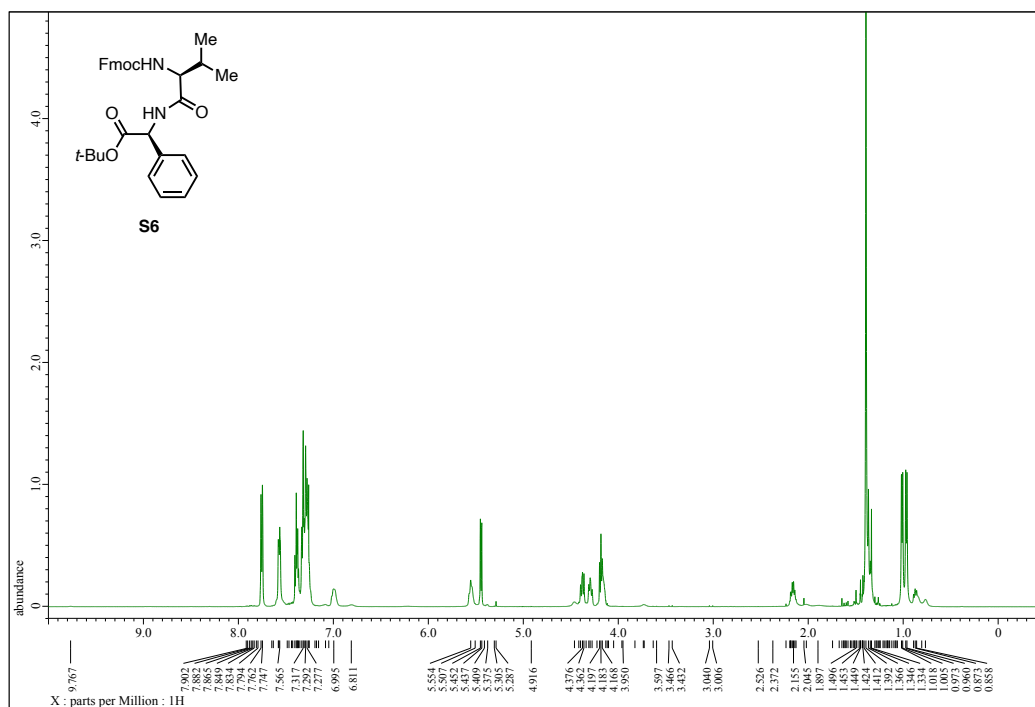
¹H NMR spectra of compound S4 (CDCl₃, 500 MHz)



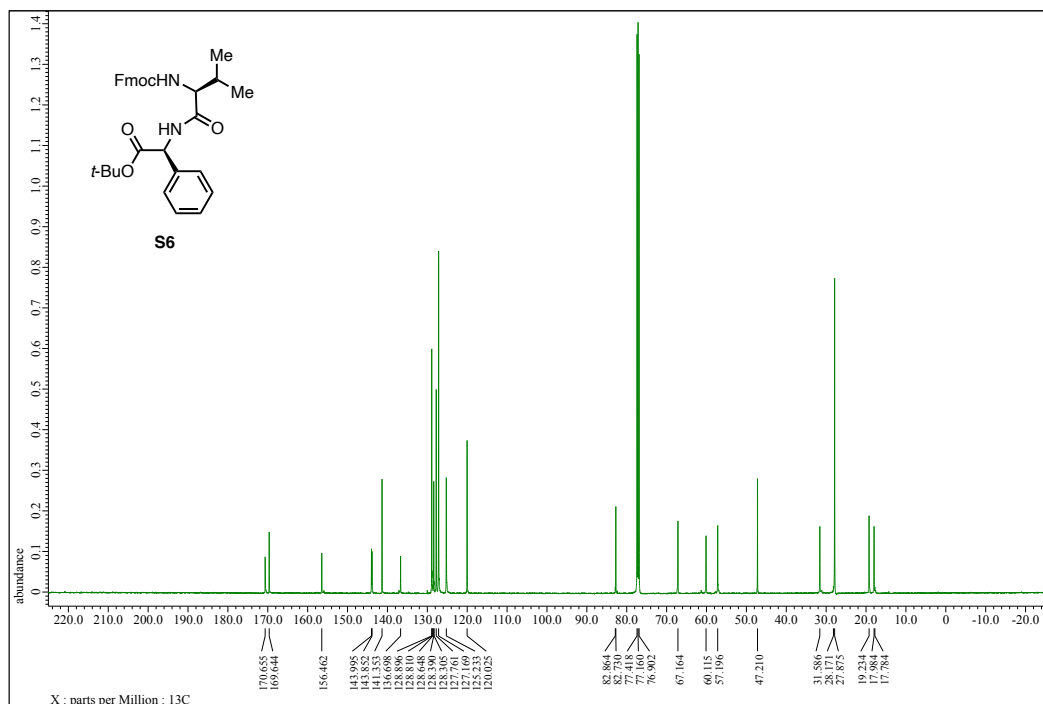
¹H NMR spectra of compound 3 (CDCl₃, 500 MHz)



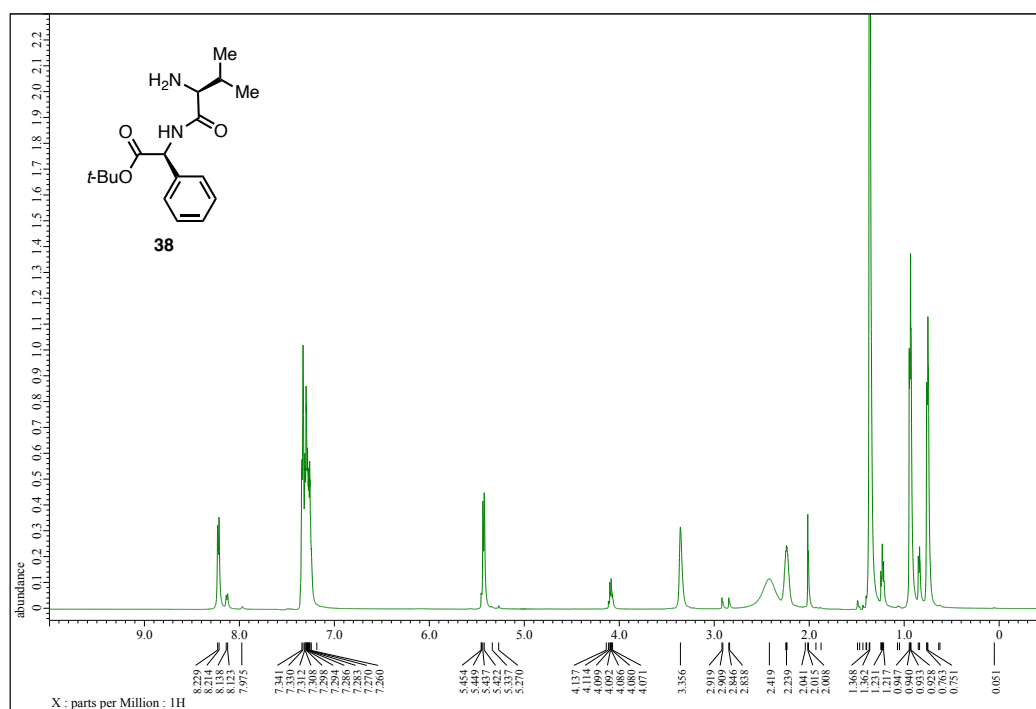
¹H NMR spectra of compound S6 (CDCl₃, 500 MHz)



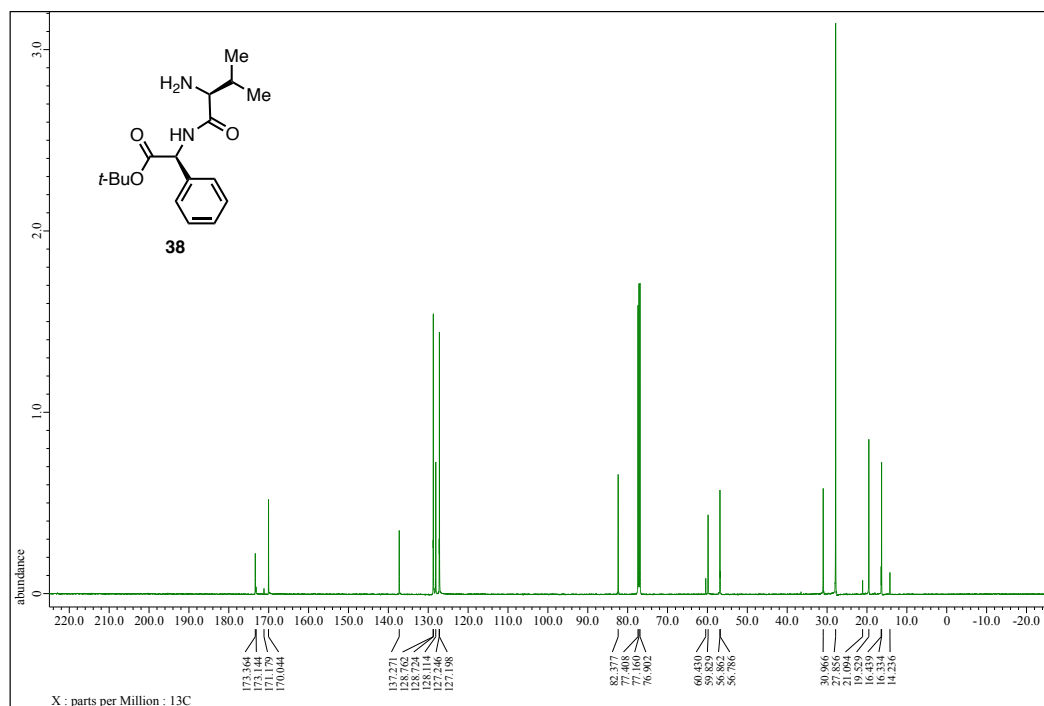
¹³C NMR spectra of compound S6 (CDCl₃, 125 MHz)



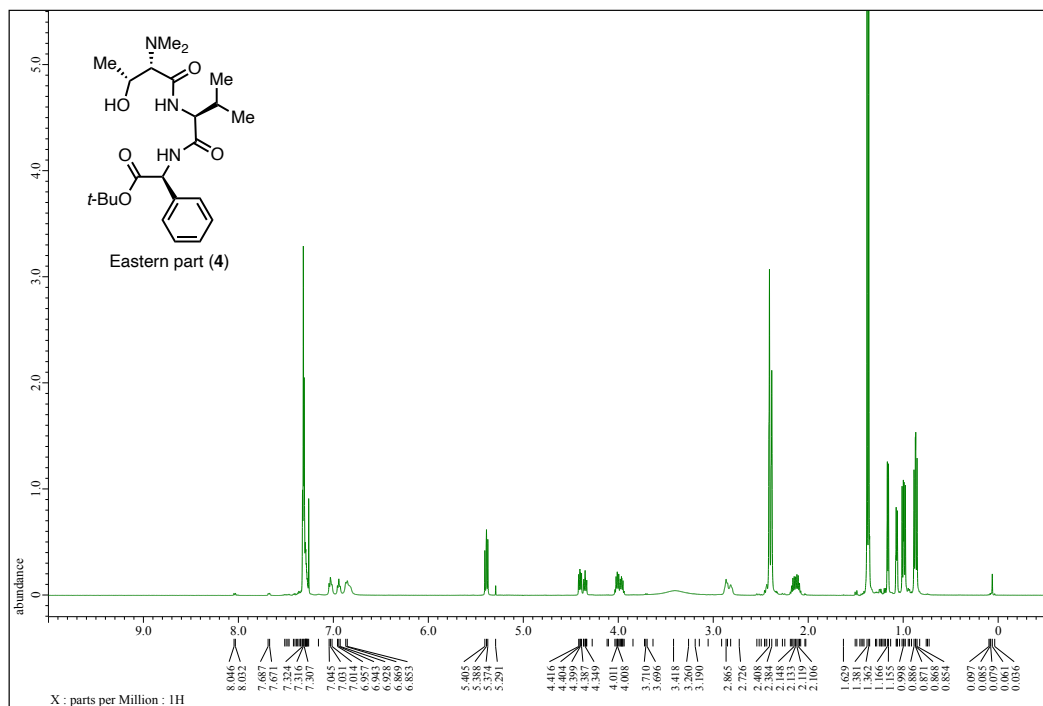
¹H NMR spectra of compound 38 (CDCl₃, 500 MHz)



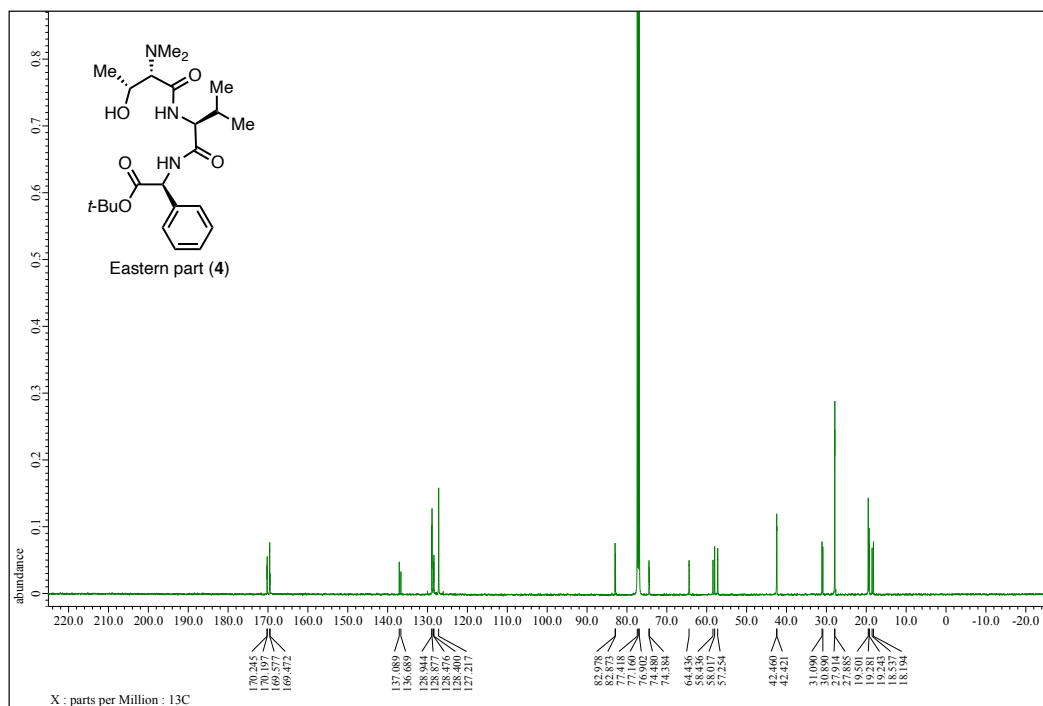
¹³C NMR spectra of compound 38 (CDCl₃, 125 MHz)



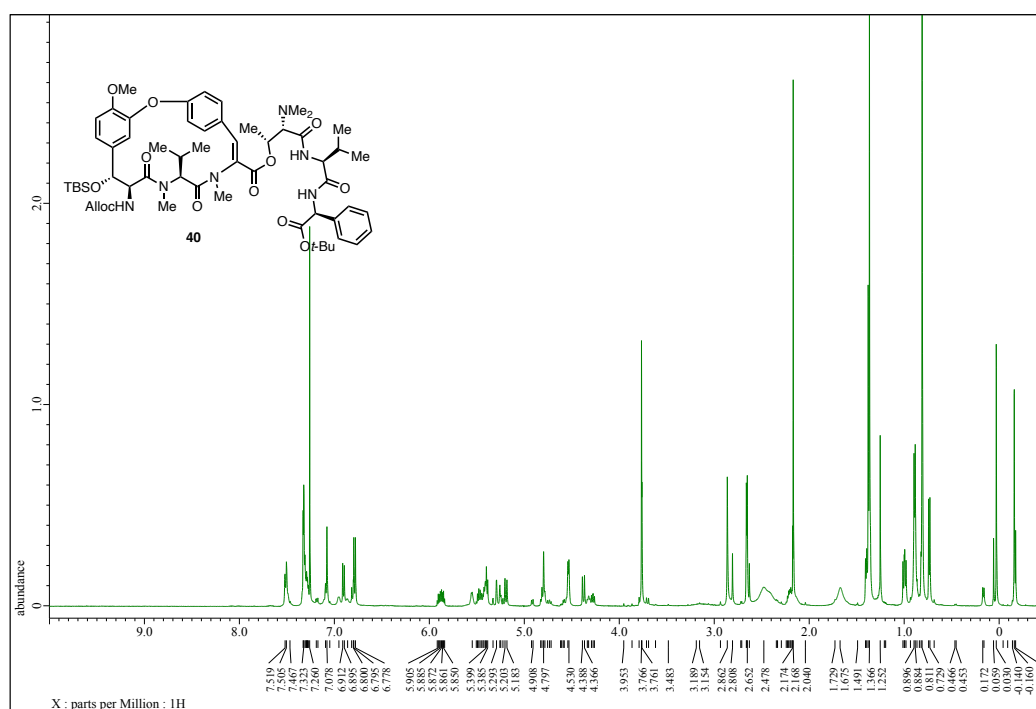
¹H NMR spectra of compound 4 (CDCl₃, 500 MHz)



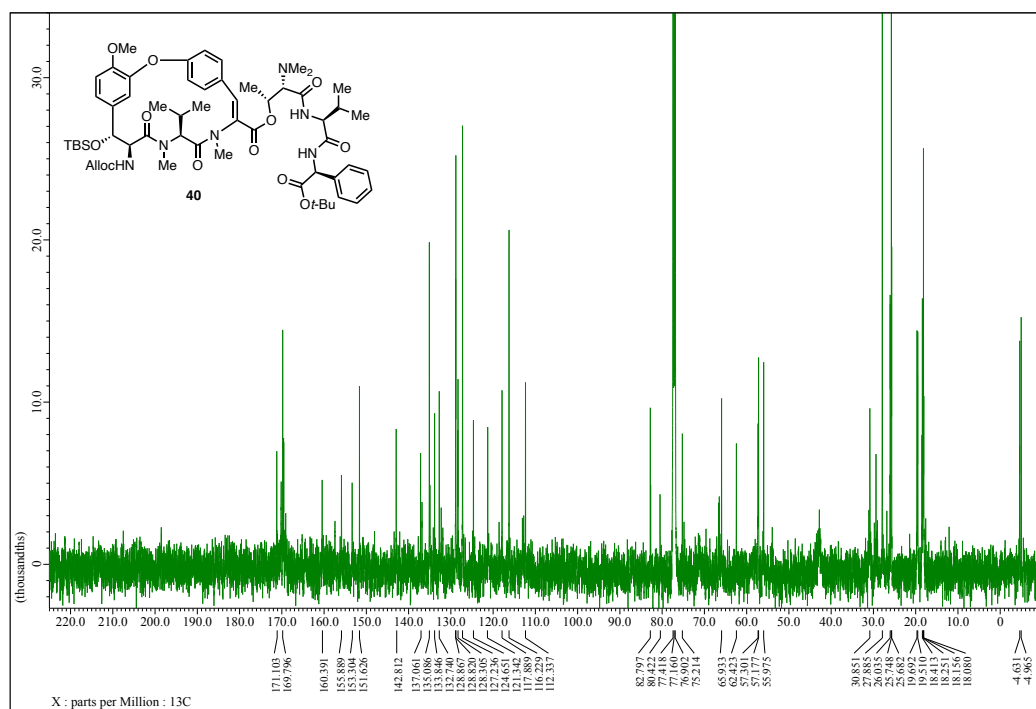
^{13}C NMR spectra of compound 4 (CDCl_3 , 125 MHz)



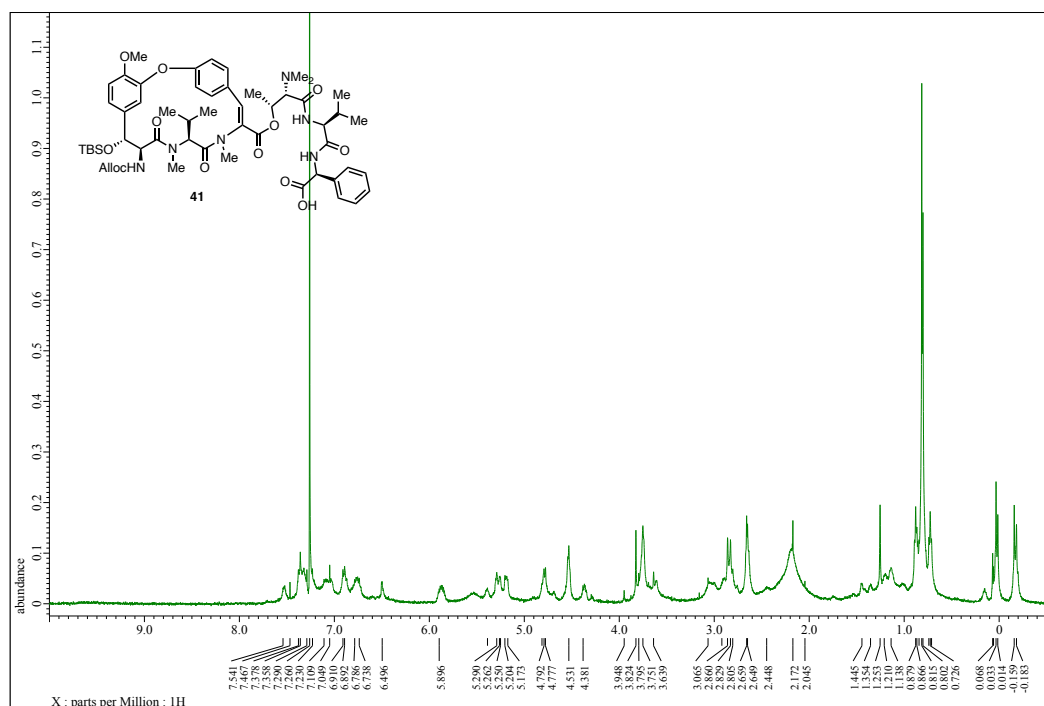
¹H NMR spectra of compound 40 (CDCl₃, 500 MHz)



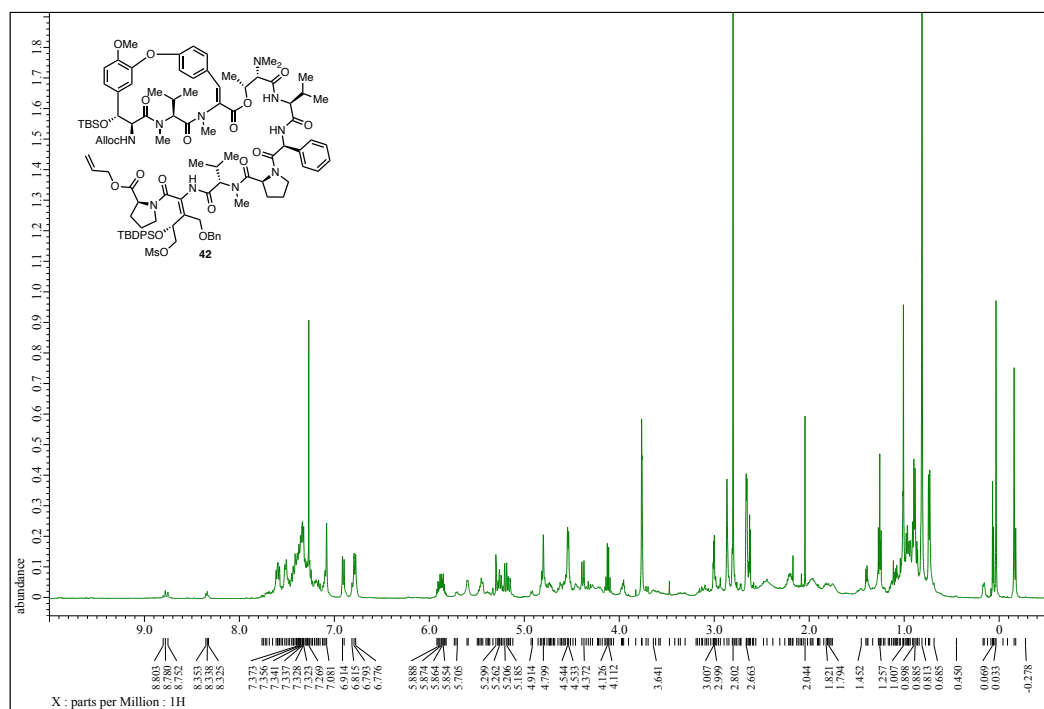
¹³C NMR spectra of compound 40 (CDCl₃, 125 MHz)



¹H NMR spectra of compound 41 (CDCl₃, 500 MHz)



¹H NMR spectra of compound 42 (CDCl₃, 500 MHz)



謝辞

本研究を行うにあたり、多大なる御指導、ご鞭撻を賜りました学校法人北里研究所 大村智 特別栄誉教授に厚く御礼申し上げます。

本研究は北里大学大村智記念研究所、生物有機化学研究室 砂塚敏明 教授の直接の御指導のもとに行われたものであり、海洋生命科学部からの配属当時は、アニオンやカチオンはおろか、カルボニル基も知らなかった筆者に卒業研究から博士課程の6年間において勉学のみならず、社会性や人間性に対する温かい御指導、御鞭撻を賜りましたことを心より感謝申し上げます。

また、本研究を実施するにあたり、日常の多くのケアや研究者としての在り方を背中で見し続けて頂き、数多くの御助言、御指導を賜りました廣瀬友靖 教授に深く感謝申し上げます。筆者のこれからの米国への留学、研究生活においても廣瀬教授の教えが礎となり、筆者の支えになると考えます。

また、研究や勉強会、日常生活にて多くの御指導を賜りました **Dityromycin** の共同研究者であり、良き指導教員であった野口吉彦 特任助教と池田朱里 特任助教、千成恒 特任助教に心から感謝を申し上げます。先生方と食事へ行き、研究についての哲学を伺えた経験は今後も筆者の財産となります。

また、**Hymeglusin** の創薬研究を実施するにあたり、ケミカルバイオロジーの分野において初学者の筆者を懇切丁寧に御指導くださった微生物応用化学研究室 浅見行弘 教授、君嶋葵 助教、本庄雅子 氏、そして江口修平 氏に感謝申し上げます。加えて、岡山大学医歯薬学系研究院 垣内力 教授にはシャトルベクターの提供や論文執筆におけるご助言を賜りましたことを感謝申し上げます。加えて、北里大学 感染制御研究センター 花木秀明 教授、松井秀仁 講師には **Hymeglusin**、**Fusarilactone A** のアッセイおよびご助言を賜りましたことを感謝申し上げます。

今回見出された **Hymeglusin** 類は、微生物資源研究センター 野中健一 准教授により見出された糸状菌から単離されたものであり、筆者に **Hymeglusin** 類と出会うきっかけを与えて下さったものであります。心より感謝申し上げます。

合成した化合物の構造決定および精製法など多くのご助言を賜りました熱帯病研究センター 岩月正人 准教授および渡邊善洋 助手に心から感謝申し上げます。

加えて Dityromycin の微生物培養による天然物の取得におきましては、稲橋佑起 講師、堤隼馬 特任助教、菊地雄太 氏、栗野友太 氏、春日昂伸 氏のご指導を賜りましたことを感謝申し上げます。

NMR スペクトルを測定していただいた北里大学薬学部化学系共有機器室 佐藤倫子 助教、MS スペクトルを測定していただいた長井賢一郎 講師、関玲子 助教に感謝致します。

卒業研究から修士課程まで研究、学生生活のサポートをしていただきました北里大学大村智記念研究所事務室の皆様、石井奈美 女史に感謝致します。

卒業研究配属時から修士課程一年時まで御指導を賜りました昨年度の卒業生である池谷佳紀 氏、齊藤亮 博士、野垣祐貴 氏、宮本岳洋 氏、佐藤達彦 氏に感謝申し上げます。

実験において御指導、御助言を頂戴した

住友ファーマ株式会社 福田展久 博士、児玉朋寛 博士

興和株式会社 岩間雄亮 博士

明治製菓ファルマ株式会社 西田佳祐 氏、松本雄一郎 氏、河野誉良 氏

名村響 博士、磯部泰一 氏、恩田桃子 氏、安達愛結美 氏、田村裕司 氏、美濃島麻衣 氏、安藤博康 博士、渡邊彰人 博士、大原基義 博士、高橋脩 博士、大西倫 氏、桐沢貴志 氏、富山昂大 氏、小嶋透 氏、高橋亮 氏、中嶋明日香 氏、上田あかり 氏、大野孝典 氏、関川章悟 氏、中里貴々 氏に感謝申し上げます。

そして、博士課程 3 年次において多くの時間を共にし、切磋琢磨しあった村田祐真 氏、小川昌也 氏、鈴木大貴 氏、寺内航 氏、中原大生 氏、鈴木智博 氏、吉岡修志 氏に心からの感謝を申し上げます。皆さんが日々、研究者を目指して努力する姿にはいつも刺激を受け、筆者が最後まで諦めずに研究を続けられたのは、皆様のおかげであると考えます。また、特に鈴木大貴 氏には Dityromycin の全合成研究において実験および日常生活から多大なるサポートを賜りましたことを心より感謝いたします。氏のこれからの就職活動、研究における飛躍と発展を願っております。

最後に、私に勉学の機会を与えてくださり、体調を崩しがちな私の身体を気遣ってサポートして下さった父、母、姉、に心から感謝申し上げます。