

博 士 論 文

神経栄養因子関連化合物の合成と
その生物活性評価および作用機序に関する
研究

徳島文理大学大学院薬学研究科
薬学専攻 博士課程

柳 本 剛 志

指導教授 今川 洋

令和三年提出

目次

略号	1
緒論	3
第一章 NVC-バングレン-ハイブリッド化合物の合成とその生物活性評価	
第一節 序説	11
第二節 NVC-バングレン-ハイブリッド化合物の合成	13
第三節 NVC-バングレン-ハイブリッド化合物の生物活性評価	17
第二章 NVC および <i>trans</i> -バングレンの作用機序解明に向けた研究	
第一節 序説	21
第二節 <i>trans</i> -バングレン誘導体の合成	23
第三節 <i>trans</i> -バングレン誘導体の生物活性評価	26
第四節 光親和性標識基を導入した NVC 誘導体を用いた標的タンパク質の探索	27
第三章 スピロテヌイペシン A の全合成とその生物活性評価	
第一節 序説	30
第二節 (±)-スピロテヌイペシン A の全合成と誘導体の合成	32
第三節 ジアステレオマー法によるスピロテヌイペシン A 両鏡像異性体の調製	41
第四節 スピロテヌイペシン A および誘導体の生物活性評価	43
総括	49
発表論文	51
実験の部	52
参考文献	119
謝辞	123

略号

Ac	acetyl
Akt	protein kinase B
Aq	aqueous solution
Ar	aryl
Bn	benzyl
Bu	butyl
Bz	benzoyl
DEAD	diethyl azodicarboxylate
DIBAL-H	diisobutylaluminium hydride
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMF	<i>N, N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethylsulfoxide
EDC	1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide
eq	equivalent
ERK	extracellular regulated kinase
Et	ethyl
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GSK-3 β	glycogen synthase kinase 3
HRP	Horseradish peroxidase
KHMDS	potassium hexamethyldisilazide
LDA	lithium diisopropylamide
M α NP acid	2-methoxy-2-(1-naphthyl)propionic acid
MALDI	matrix assisted laser desorption/ionization
Me	methyl
MeO	methoxy
MNBA	2-methyl-6-nitrobenzoic anhydride
mTOR	mammalian target of rapamycin

<i>n</i> -	normal
NGF	nerve growth factor
NVC	neovibsanin core structure
<i>p</i> -	para
PBS	phosphate buffered saline
Ph	phenyl
PMB	<i>p</i> -methoxybenzyl
ppm	parts per million
PPTS	pyridinium <i>p</i> -toluenesulfonate
PVDF	polyvinylidene difluoride
quant.	quantitative
rt	room temperature
SDS	sodium dodecyl sulfate
SE	standard error
<i>t</i> -	tertiary
TBAC	tetrabutylammonium chloride
TBAF	tetrabutylammonium fluoride
TBS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
TEMPO	2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine <i>N</i> -oxyl
Tf	trifluoromethanesulfonyl
THF	tetrahydrofuran
THP	2-tetrahydropyranyl
TIPS	triisopropylsilyl
TMS	trimethylsilyl
Trk	tropomyosine receptor kinase
TsOH	<i>p</i> -toluenesulfonic acid

緒論

近年、急激な高齢化が進行している国際社会では、認知症患者数の増大が深刻な社会問題となっている。2019年に発表されたWHOの認知症に関するガイドライン¹⁾によると、世界の認知症患者数は約5000万人で、2050年には約1億5000万人まで増加すると推測されている。さらに、世界中での認知症に関わる費用と経済的な損失を併せた金額は8180億ドルにのぼり、世界の総GDPの約1.1%に相当する。

一方、日本においても認知症患者数の増加は深刻であり、九州大学の二宮らの報告²⁾によると、2020年で631万人、2050年には1016万人まで増加すると推計されている。筑波大学の朝田らの報告³⁾によると、認知症の主な原因として、神経変性疾患の一つであるアルツハイマー病が全体の3分の2を占めている。すなわち、アルツハイマー病を予防、あるいは治療することができれば認知症患者数を大幅に減少させることが可能となる。しかしながら、未だその根本的な治療法は確立されていない。

現在、我が国では、アルツハイマー型認知症治療薬としてアセチルコリンエステラーゼ阻害剤であるリバスチグミン(1)、ガランタミン(2)、ドネペジル(3)の3剤およびN-メチル-D-アスパラギン酸型グルタミン酸受容体拮抗薬(以下、NMDA受容体拮抗薬)のメマンチン(4)の計4剤が使用されている(Fig. 1)。アセチルコリンエステラーゼ阻害剤は、患者の脳内において神経伝達物質であるアセチルコリンの分解を抑制することで、神経細胞間で低下した情報伝達能を改善させる。また、NMDA受容体拮抗薬であるメマンチンは興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸による過度な神経刺激によって生じる神経障害を抑制することを目的としている。

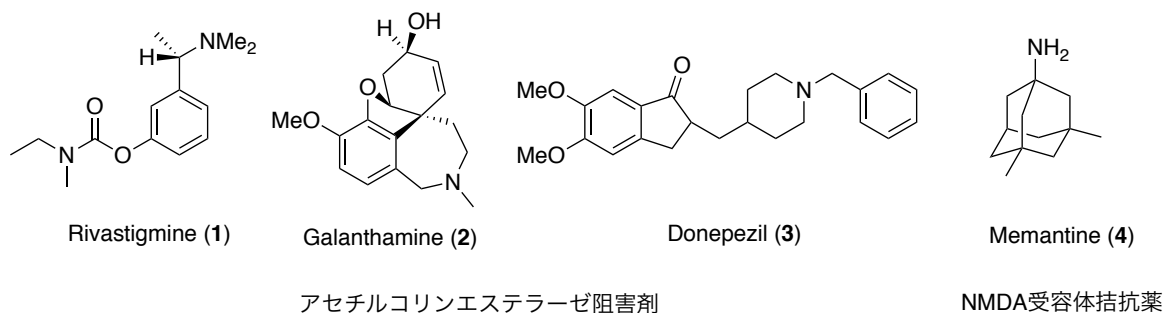


Fig. 1 現在、使用されているアルツハイマー型認知症治療薬

アルツハイマー病の病理学的特徴として、アミロイド β の蓄積による老人斑の形成や神経原繊維変性、神経細胞死が起こる⁴⁾(Fig. 2)。これらが引き金となって神経間の情報伝達能の低下や脳神経細胞の脱落が生じることで認知機能が低下するとされている。既存の医薬品であるアセチルコリンエステラーゼ阻害剤と NMDA 受容体拮抗薬は、いずれも既に低下した認知機能の一時的な改善を目的としており、アルツハイマー病の病態を改善できないことから、新たなアルツハイマー病治療薬の開発が切望されている。

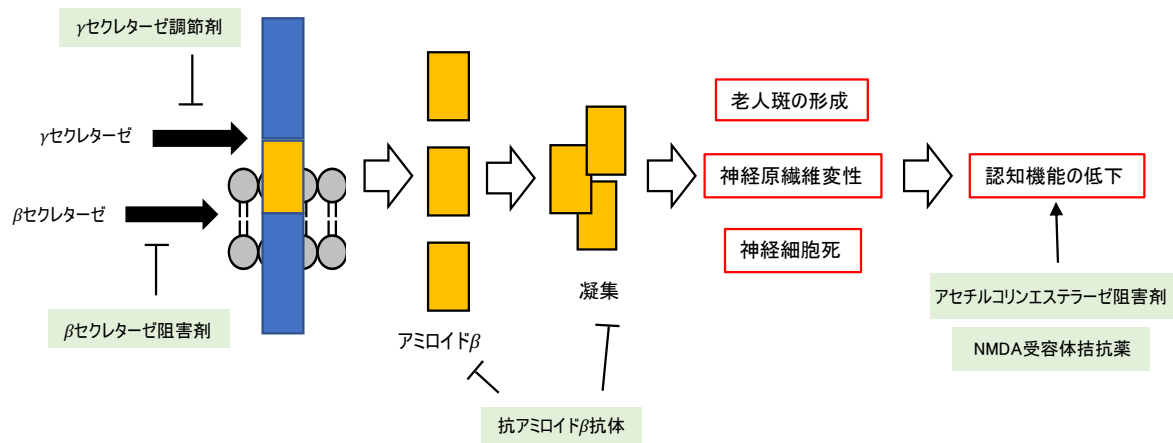


Fig. 2 アルツハイマー病における病理学的特徴

そこで、多くの研究者が、アミロイド β の生成を抑制する β セクレターゼ阻害剤や γ セクレターゼ調節剤、アミロイド β に対する抗体などの開発に取り組んだが、2021 年の現在、医薬品として承認されたものはない⁵⁾。現在審査中のものでは、2020 年にバイオジェンが開発した抗アミロイド β 抗体であるアデュカヌマブがあり、その有効性が臨床試験において確認されている。しかしながら、その効果は、アルツハイマー病の進行を初期の段階から緩やかにするものであり、病状の進行した患者の治療は期待できない。アルツハイマー病によって低下した認知機能を回復させるには、病状の進行によって脱落した神経細胞の再生が必要であると考えられる。

神経の再生を目的とする医薬品候補として、神経栄養因子が期待されている。神経栄養因子は生体内で分泌されるタンパク質であり、NGF や BDNF, NT-3, NT-4 など多様な種類が報告されており、神経細胞の生存や分化、成長、可塑的变化に関わることが知られている⁷⁾。そして、神経栄養因子は、神経変性疾患に伴う神経細胞死の抑制や障害

された神経細胞を修復することが報告されている。しかし、生体内での安定性や血液脳関門の透過性などに課題を抱えている⁸⁾。それらの問題を解決する方法として、タンパク質である神経栄養因子に代わり、神経栄養因子様の生物活性を持つ低分子化合物の応用が期待されている。その先進的な例として、富士フィルムが開発した T-817MA (5)⁹⁾があり、神経突起伸展促進作用や神経保護作用などの神経栄養因子様の活性を示し、アルツハイマー型認知症治療薬および脳卒中後の運動機能改善薬として、現在、臨床第二相試験が行われている (Fig. 3)。

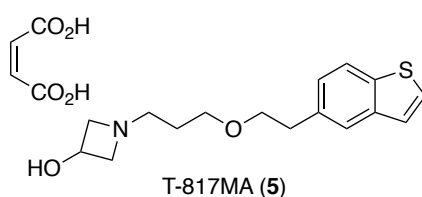


Fig. 3 現在、臨床試験が行われている神経栄養因子様活性を持つ化合物

一方、神経栄養因子様の活性を示す化合物は天然物からも数多く報告されている。Fig. 4 には、神経栄養因子様活性として、神経モデル細胞である PC12 細胞¹⁰⁾を神経様細胞へと分化させる分化誘導活性や、神経様細胞へと分化した PC12 細胞の神経様突起を伸展する突起伸展促進活性を持つ化合物を示した。メロン *Cucumis melo* から単離されたククルビタシン B (6)¹¹⁾は分化誘導活性と突起伸展促進活性を示す。また、*trans*-バングレン (7)および *cis*-バングレン (8)は、福山らによってインドネシア産のジャワシヨウガ *Zingiber purpureum* から単離され、分化誘導活性と突起伸展促進活性を示すことが報告されている¹²⁾。また、*Aspergillus* 属の海産真菌から単離されたアスペルミチン A (9)¹³⁾やリンドウ科植物 *Gentiana ringescens* から単離されたゲンチシド C (10)¹⁴⁾、ウマノスズクサ科植物 *Aristrochia arcuata* から単離されたタラウミジン (11)¹⁵⁾はそれぞれ突起伸展促進活性を示す。

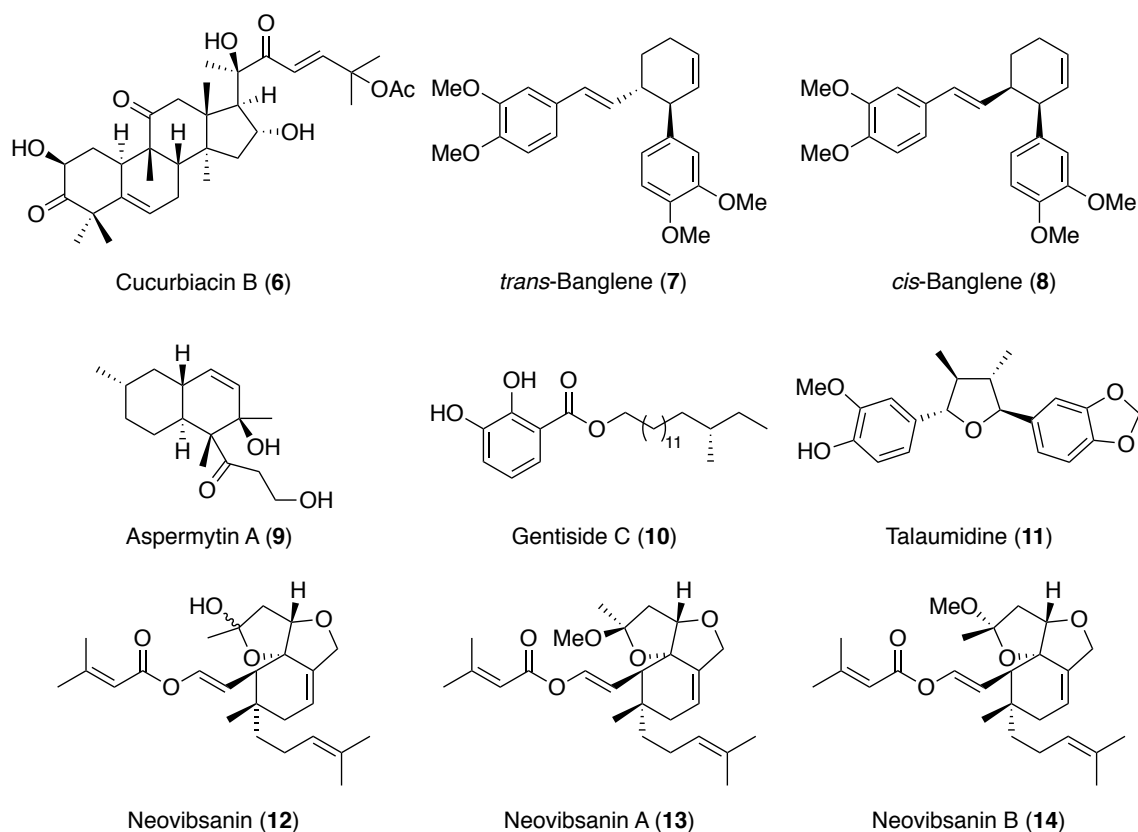


Fig. 4 神経栄養因子様活性を持つ天然物由来の化合物

以上のように、数多くの活性化合物が天然物から得られているが、著者の所属研究室では、その中でもネオビブサニン類に着目した研究に取り組んでいる。ネオビブサニン A (13) および B (14) は 1996 年に福山らによって、スイカズラ科サンゴジュ *Viburnum awabuki* の葉から単離されたビブサン型ジテルペンであり、PC12 細胞に対して突起伸展促進活性を示す¹⁶⁾。当研究室卒業生の西條¹⁷⁾、山口¹⁸⁾らはネオビブサニン B (14) の構造活性相関研究に取り組み、側鎖を全て取り払ったシンプルな三環性構造の 18 (Neovibsanin core structure, 以下, NVC) が (±)-14 と同等の活性を示すことを明らかにしている¹⁹⁾ (Fig. 5)。著者は、この 18 の構造を基に、高活性なアルツハイマー病治療薬シード化合物の創製を目指した。

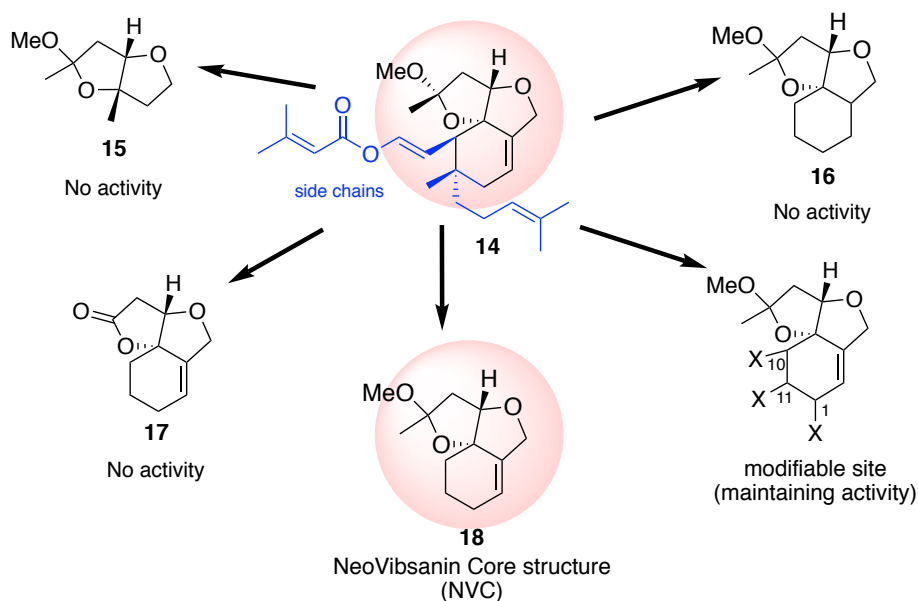


Fig. 5 ネオビブサニン B の構造活性相関研究

高活性な化合物を開発する方法として、著者は 2 種類の化合物の活性を組み合わせる分子設計を思索した。すなわち、共通する部分構造を持つ 2 種類の活性化合物の構造を、共通部分を介して重ね合わせ、両分子の活性を併せ持つことが期待できるハイブリッド化合物をデザインする方法を考案した (Fig. 6)。天然から得られる活性化合物は多様な化学構造を持つが、それらの構造は生合成によって制限されている。この構造重ね合わせによってハイブリッド構造を生み出す手法は、天然には存在し得ない多様な活性を持つ天然物様の新奇なシード骨格の創出に有効であると考えた。さらに、2 分子の活性を 1 分子に保有させることができたならば、2 種類の化合物を一挙に投与する場合と比較して代謝系への負担軽減や、薬物動態の調査および投与設計が容易になるなど医薬品シーズの観点からの利点が多いと考えられる。

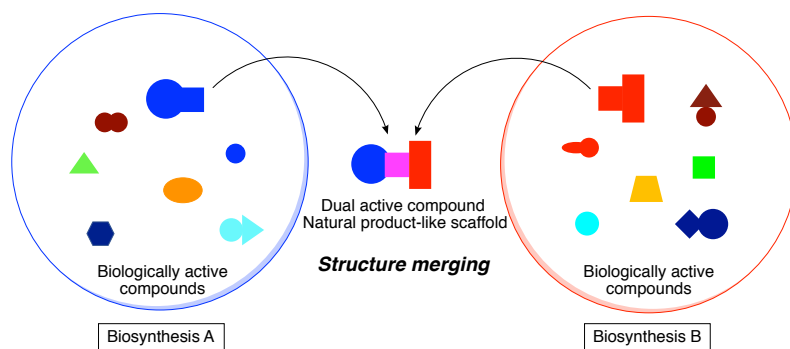


Fig. 6 構造重ね合わせ法による多様な活性を持つ新奇天然物様骨格化合物の創製

著者は、構造重ね合わせによる活性化合物の設計において、NVC(18)の構造中のシクロヘキセンを利用した分子設計を計画した(Fig. 7)。すなわち、シクロヘキセンを介して、NVC(18)と *trans*-バングレン(7)の構造を重ね合わせることで、両分子の活性を併せ持つことが期待できるハイブリッド化合物 19 の創製に取り組み、ネオビブサニン関連化合物としては初めて、PC12 細胞に対して分化誘導活性を示す化合物の開発に成功した²⁰⁾。その詳細は本論第一章で詳述する。

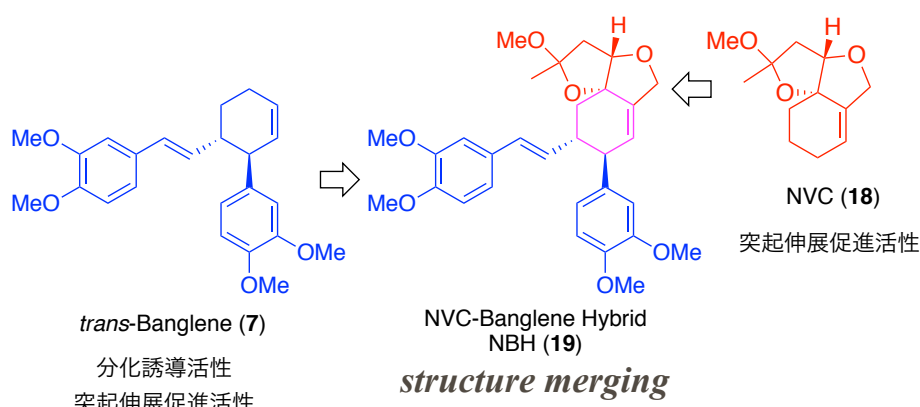


Fig. 7 構造重ね合わせによるハイブリッド化合物の創製 (第一章)

ハイブリッド化合物が両化合物の活性を示すことを明確にするためには NVC(18)および *trans*-バングレン(7)のそれぞれの作用機序を解明する必要がある。そこで、それぞれの分子プローブを調製して、作用機序探索研究に取り組んだ(Fig. 8)。NVC(18)については、当研究卒業生の柳井、小松、清水によって合成された光親和性標識基を持つ誘導体 20²¹⁻²³⁾を用いて、標的タンパク質の探索実験を行い、NVC(18)に親和性を示すタンパク質の検出に成功した。また、*trans*-バングレン(7)については、蛍光標識基を持つ 21 をはじめとする各種誘導体を調製して活性評価を行い、アリル位に置換基を導入した誘導体が突起伸展促進活性を保持していることを明らかにした。これらについては第二章に詳述する。

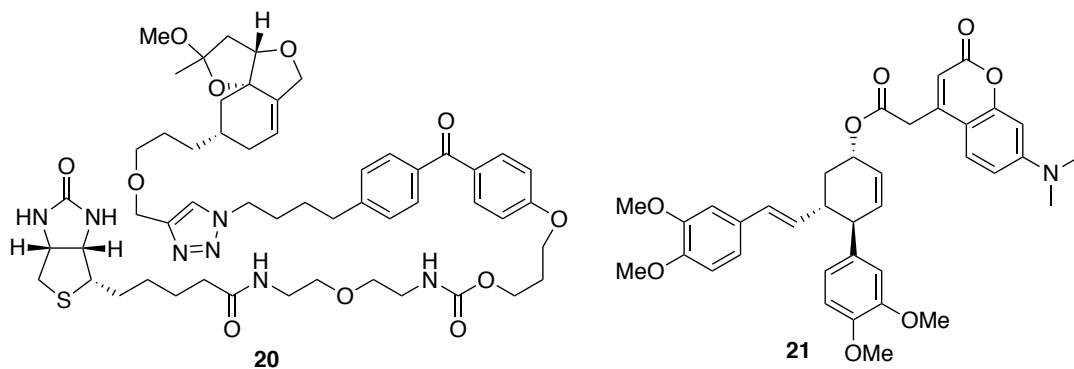


Fig. 8 NVC および *trans*-バングレンの作用機序探索を目的とした分子プローブ (第二章)

一方, Fig. 9 にはグリア細胞からの神経栄養因子産生を促進する化合物を示している. ヤマブシタケ *Hericium erinaceus* から単離されたヘリセノン C (22)²⁴⁾ は天然物で初めて NGF 産生促進活性が確認された化合物である. また, 同じくヤマブシタケから単離されたエリナシン A (23)²⁵⁾ も NGF 産生促進活性が確認されている. 担子菌ケロウジ *Sarcodon scabrosus* から単離されたスカブロニン A (24)²⁶⁾ は, エリナシン A と同じシアタン骨格を有しており, 同様に NGF 産生促進活性を示す. 一方, 冬虫夏草ハナサナギダケ *Paecilomyces tenuipes* から単離されたスピロテヌイペシン A (25) および B (26) はグリア細胞から神経栄養因子の産生を促進することが報告されているが, その種類の特定には至っていない²⁷⁾.

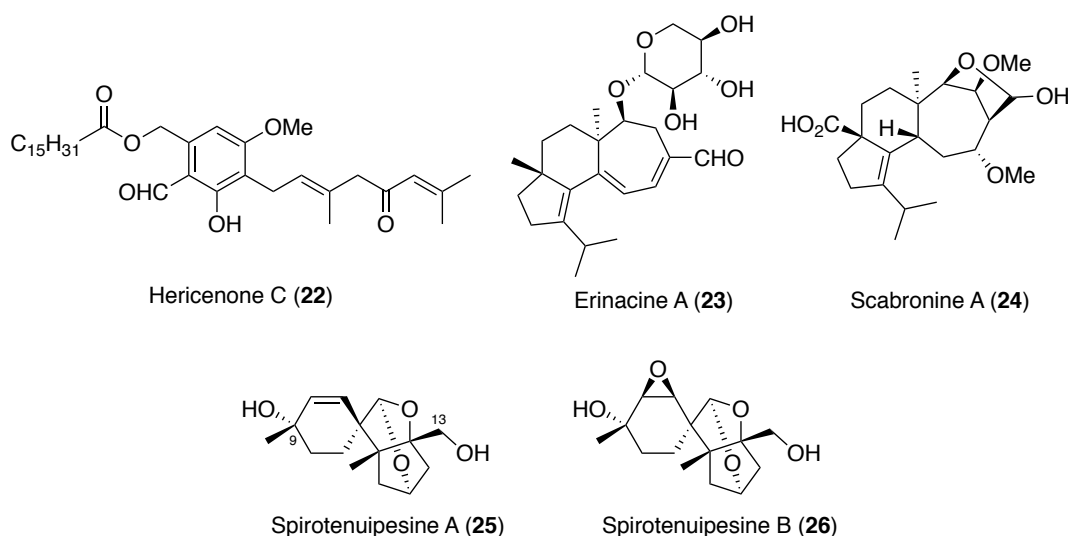


Fig. 9 神経栄養因子産生促進活性を持つ天然物由来の化合物

著者は、神経栄養因子産生促進活性を示すこれらの化合物のうち、スピロテヌイペシン A (**25**) に着目した。 **25** は構造中にシクロヘキセンを有していることから、NVC との構造重ね合わせによる高活性分子の設計が期待できる。しかし、 **25** の構造活性相関や作用機序に関する報告は未だない。そこで、まず著者は生物学的試験に供するサンプルの量的確保を目的として **25** の全合成に取り組み、その効率的合成を達成した。そして、 **25** とその誘導体を含めた合成サンプルの生物活性評価を行い、 **25** の活性発現に天然物と同じである(+)-体の立体化学や、構造中の 2 つのアルコールおよび二重結合が必須であることを見出した。さらに、抗体による中和実験の結果から、 **25** はグリア細胞に作用して NGF とは異なる神経栄養因子の産生を促進していることを明らかにした。これらの成果に関しては本論第三章で詳述する。

第一章 NVC-バングレン-ハイブリッド化合物の合成と その生物活性評価

第一節 序説

ネオビブサニン B (**14**) は、NGF 刺激によって分化した PC12 細胞に対して突起伸展促進活性を示す¹⁶⁾。この活性は構造が簡略化された NVC (**18**) でも同等程度保持されることが明らかにされている¹⁹⁾。また、当研究室卒業生の山口¹⁸⁾、小松²²⁾らによって NVC の 1 位および 11 位に置換基を導入した誘導体 **27**, **28** が弱いながら突起伸展促進活性を示すことが確認されている (Fig. 10)。

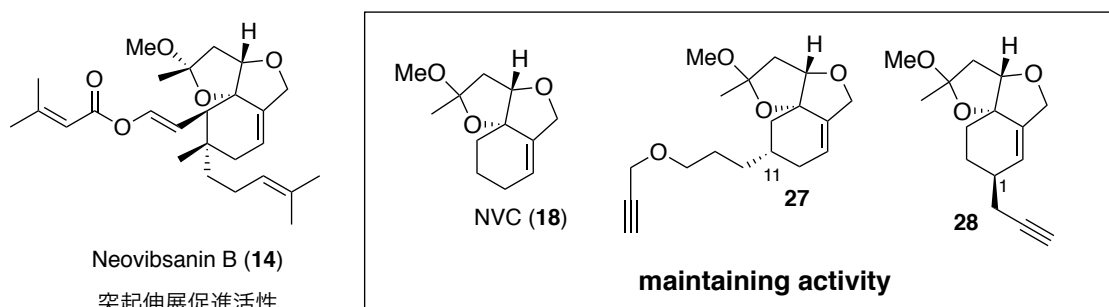


Fig. 10 ネオビブサニン B の活性を保持した NVC の 1 位および 11 位置換誘導体

一方、*trans*-バングレン (**7**) は、福山らによってジャワショウガから単離され、PC12 細胞に対して分化誘導活性と突起伸展促進活性の両方を示すことが報告されており¹²⁾、アリル位に置換基を導入した誘導体においても突起伸展促進活性が保持される (第二章で後述)。NVC (**18**) と *trans*-バングレン (**7**) は異なる作用機序によってその活性を示すことが推察されるが、共通構造としてシクロヘキセンを有している。著者は、この構造類似性から、両分子の構造を重ね合わせたハイブリッド化合物設計の着想を得た。すなわち、NVC (**18**) の構造において置換基導入が可能な 1 位および 11 位に *trans*-バングレンの側鎖を導入することで、NVC に対して *trans*-バングレンの活性が付与されることが期待されるハイブリッド化合物 **19** を設計した (Fig. 11)。

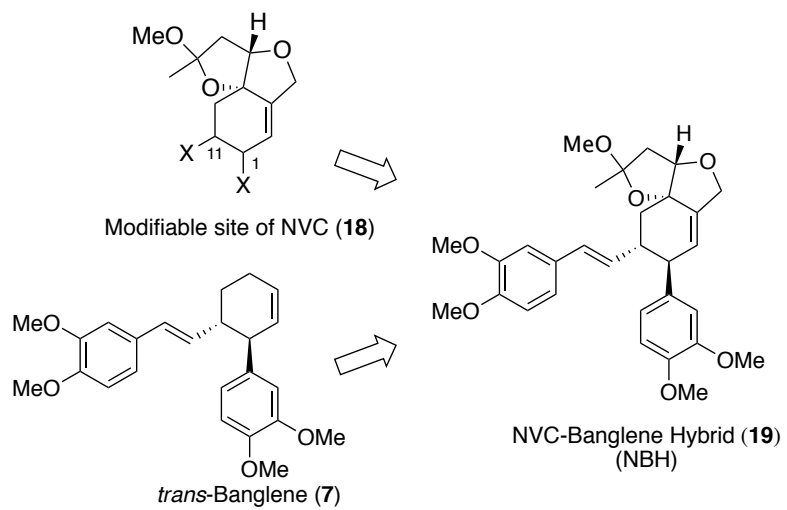
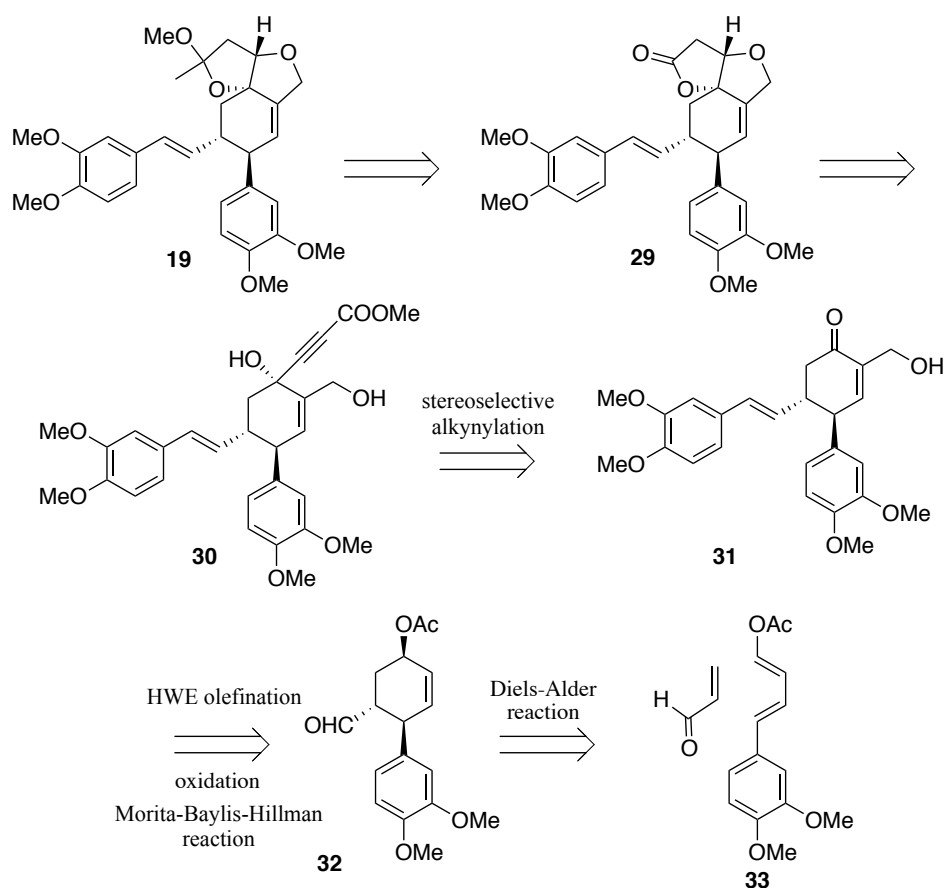


Fig. 11 構造重ね合わせによるハイブリッド化合物の設計

第二節 NVC-バンブレン-ハイブリッド化合物の合成

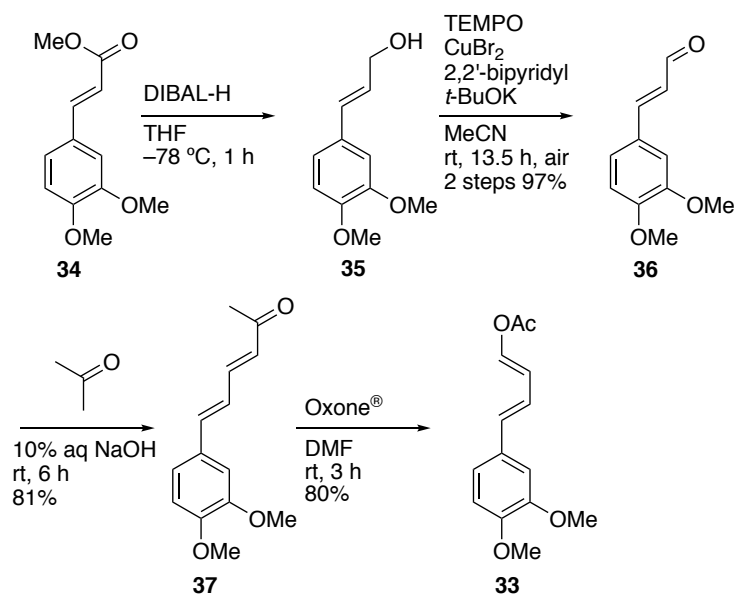
ハイブリッド化合物 **19** の合成計画を Scheme 1 に示す。まずジエン **33** とアクロレインによる Diels-Alder 反応によってシクロヘキセン部を構築する。そして、Horner-Wadsworth-Emmons 反応によるオレフィン化，森田-Baylis-Hillman 反応を経て，**31** が得られると考えた。**31** の立体選択的なアルキニル化を行い，以降の合成は今川らによるネオビブサニン B の合成法を参考とすることで **19** へ導けると考えた²⁸⁾。

Scheme 1 ハイブリッド化合物 **19** の合成計画



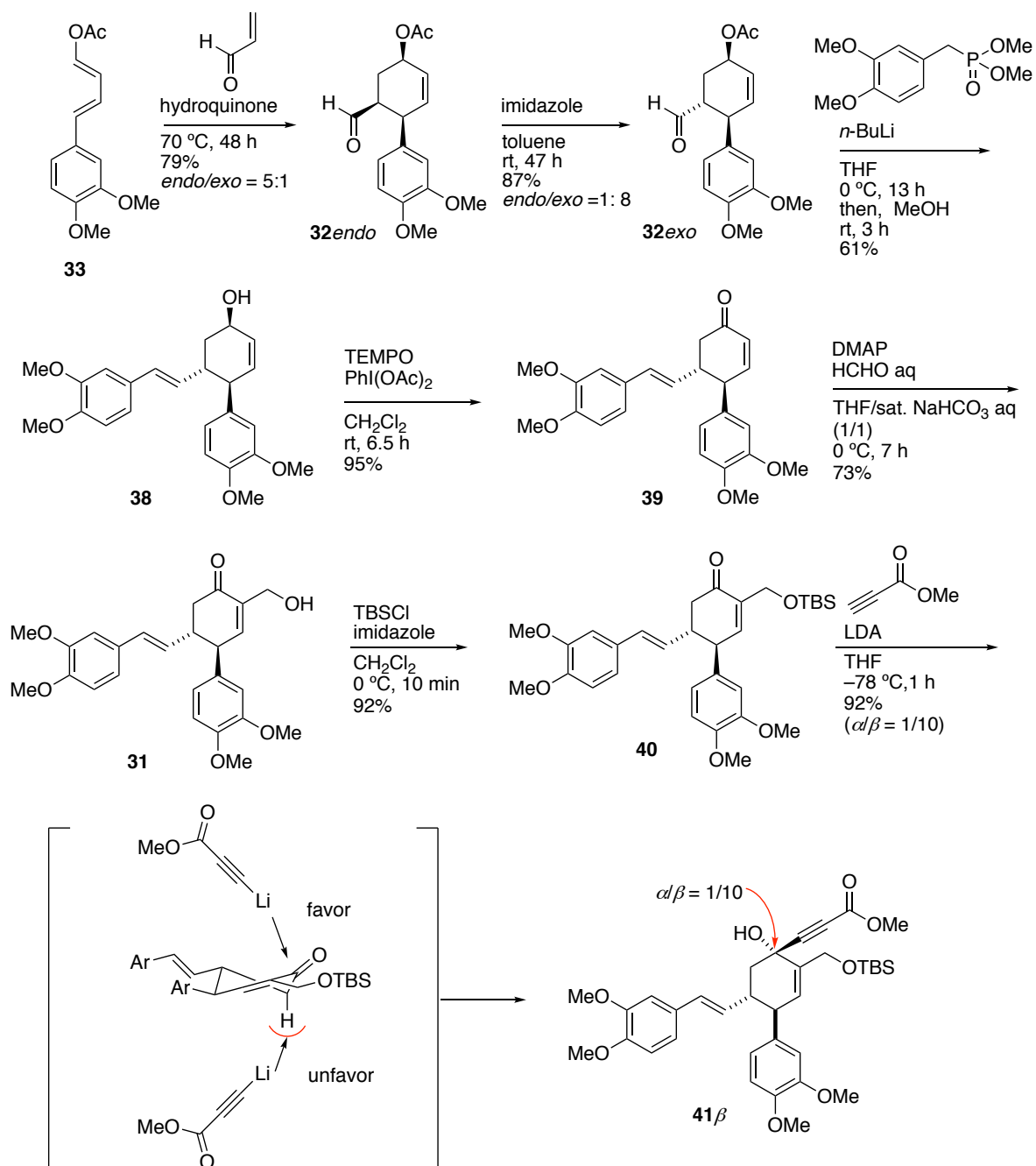
まず，ジエン **33** の調製を行なった (Scheme 2)。**34** を出発原料として，DIBAL-H によってエステル部を還元し，アリルアルコール **35** を得た。得られた **35** を不飽和アルデヒド **36** へと酸化²⁹⁾した後，アセトンとのアルドール縮合反応によって **37** へと導いた。最後に，Baeyer-Villiger 酸化によって目的とするジエン **33** を調製した³⁰⁾。

Scheme 2 ジェン 33 の調製



調製した **33** とアクロレインによる Diels-Alder 反応では、反応溶媒にトルエンを用いた加熱条件では反応がほとんど進行しなかった。そこで、アクリル酸を溶媒とする Byrne らの条件³¹⁾を参考に、アクロレインを溶媒としてヒドロキノンを添加した加熱還流条件を適用したところ、79%の収率で環化付加体 **32** を得た。しかし、本反応では *endo* 付加体 **32_{endo}** が優位に得られたため、混合物である **32** を塩基で処理して異性化させることで、望む相対立体配置を有する **32_{exo}** へと導いた。**32_{exo}** に対して Horner-Wadsworth-Emmons 反応を行い、トランス二重結合を持つ **38** を単一の生成物として得た^{32,33)}。TEMPO 酸化によって **38** をエノン **39** へ酸化後³⁴⁾、DMAP を触媒とする 森田-Baylis-Hillman 反応³⁵⁾を行い、73%の収率で **31** を得た。次いで、**31** のアルコールを TBS 基で保護した **40** に、リチオ化したプロピオン酸メチルを求核付加させた。このとき立体電子効果によって、アセチリドによる擬アキシャル位からの求核攻撃が優先して進行することで、 β 付加体が選択的に生成し、 α 付加体 **41 α** と β 付加体 **41 β** が 1:10 の比率で得られた。得られたジアステレオマー混合物を HPLC によって分取し、望む相対立体配置を持つ **41 β** を続く反応に使用した。

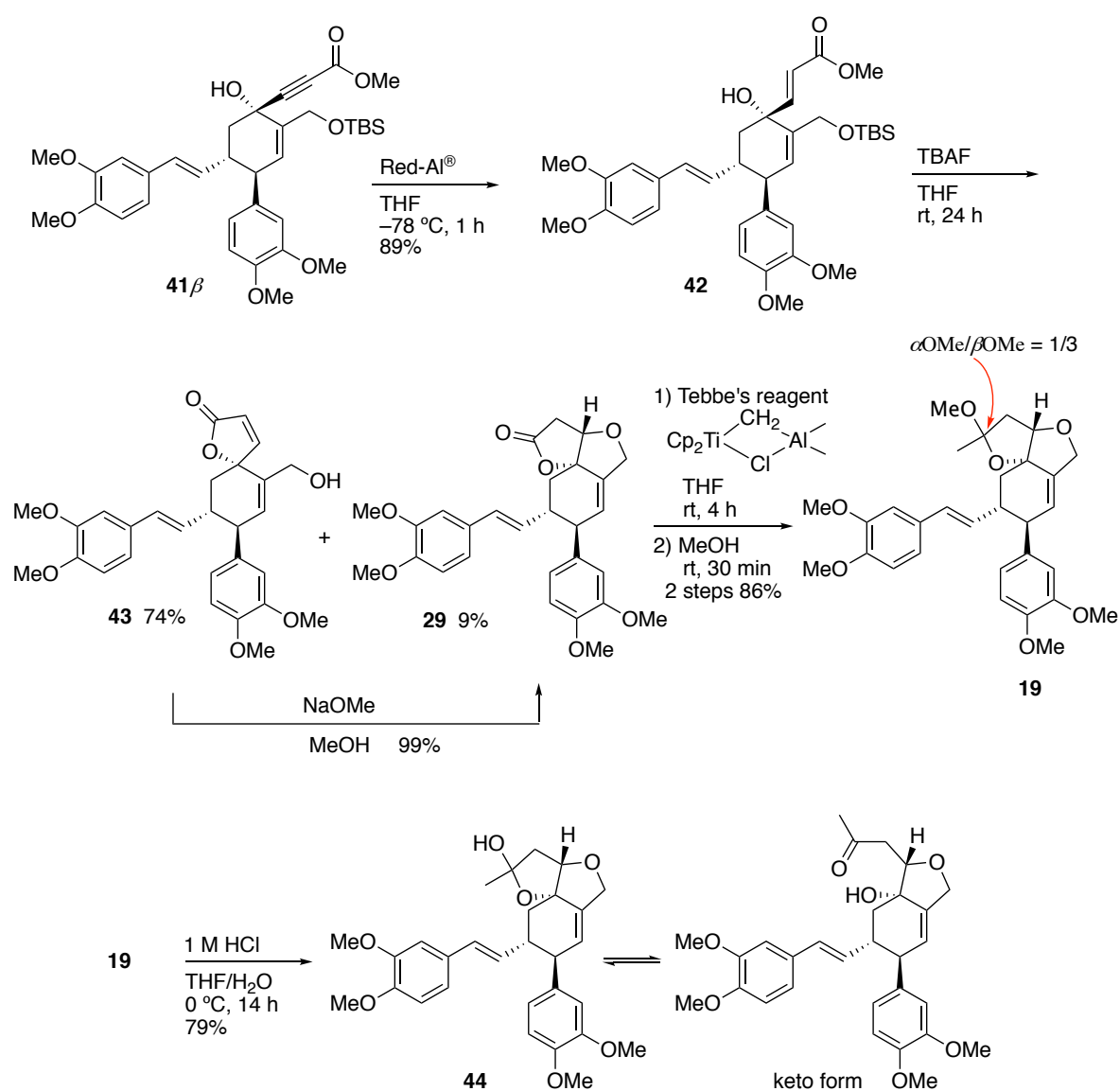
Scheme 3 アルキン付加体 **41 β** の合成



以降の合成は、今川らによって報告されたネオビブサニン B の合成法を参考に行った²⁸⁾(Scheme 4). すなわち、**41 β** の三重結合を Red-Al[®]³⁶⁾によって、89%の収率でトランス二重結合へと変換し、得られた**42**を TBAF で処理することで、シリル基の脱保護から連続的な分子内オキシマイケル付加-ラクトン化反応によって一挙に**29**への変換を試みた。しかし期待に反し、主生成物は不飽和スピロラクトン**43**であった。**43**は、いったん生成した**29**がレトロマイケル反応を起こした結果、生成したと推測される。

そこで、得られた **43** をメタノール溶媒中、ナトリウムメトキシドで処理すると、三環性ラクトン **29** が反応系中で固体として析出し、レトロマイケル反応の進行を防ぎ、ほぼ定量的に目的の **29** へと変換することができた。ラクトン **29** を Tebbe 試薬³⁷⁾ で処理した後に、得られた生成物をメタノールに溶解させ室温で攪拌することで、アセタール化が進行し、2 工程 86% の収率で目的とする **19** の合成を達成した。また、**19** のメチルアセタール部をヘミアセタールへと変換した **44** も併せて調製した。

Scheme 4 ハイブリッド化合物の合成



第二節 NVC-バングレン-ハイブリッド化合物の 生物活性評価

まずはじめにハイブリッド化合物 **19** を用いて PC12 細胞による活性評価を行った。PC12 細胞は、ラット副腎髄質褐色細胞腫から単離、株化された細胞であり、神経栄養因子の 1 種である NGF の刺激によって神経様細胞へと分化する性質を持つ¹⁰⁾。ここでは、PC12 細胞に対して直接、化合物を作用させて神経様細胞へと分化させる分化誘導活性と、NGF 刺激によって神経様細胞へと分化した PC12 細胞に対して化合物を作用させて、突起の伸展を促進させる突起伸展促進活性の活性評価を行った (Fig. 12)。

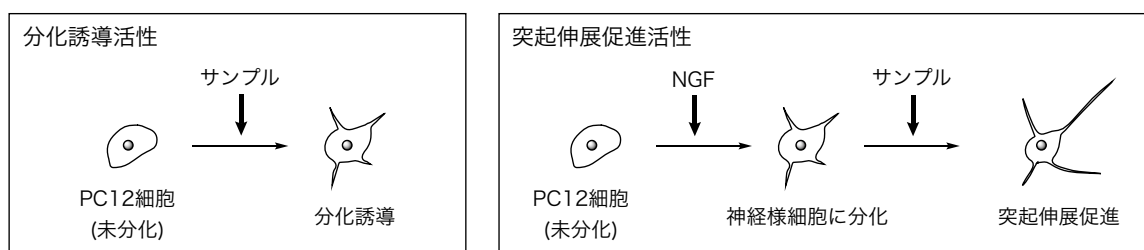


Fig. 12 PC12 細胞による神経栄養因子活性の評価

しかし、その過程で **19** が PC12 細胞の培養培地内で結晶として析出してしまい、その活性を正確に評価することができなかった。一方、岐阜医療科学大学の松井敦聡先生らによって、NVC (**18**) をマウスに腹腔内投与すると大脳皮質や海馬において TrkB およびその下流シグナルタンパク質のリン酸化が促進されることが報告されている³⁸⁾ (Fig. 13)。そこで、**19** をマウスに投与して TrkB シグナルのリン酸化を確認した。

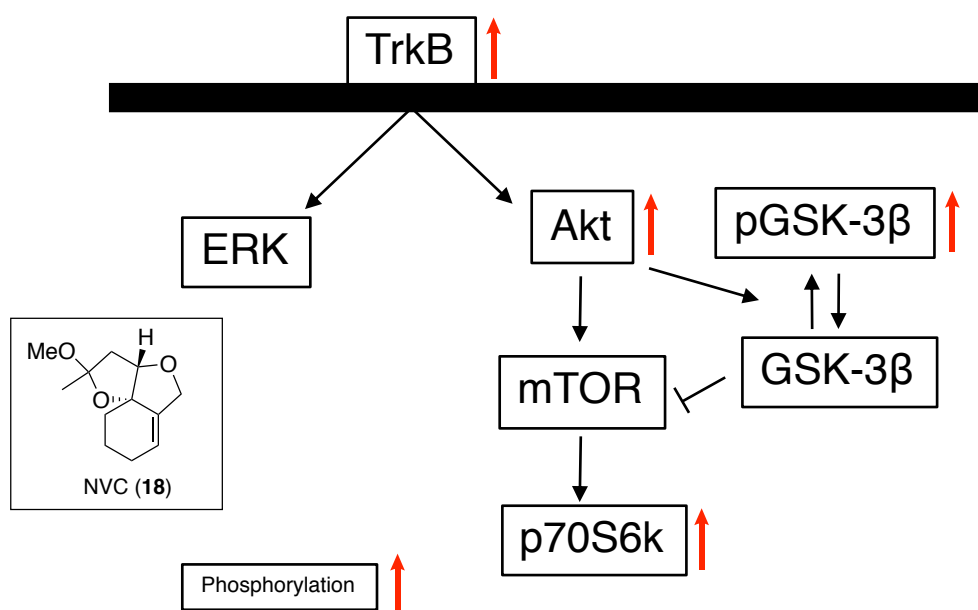
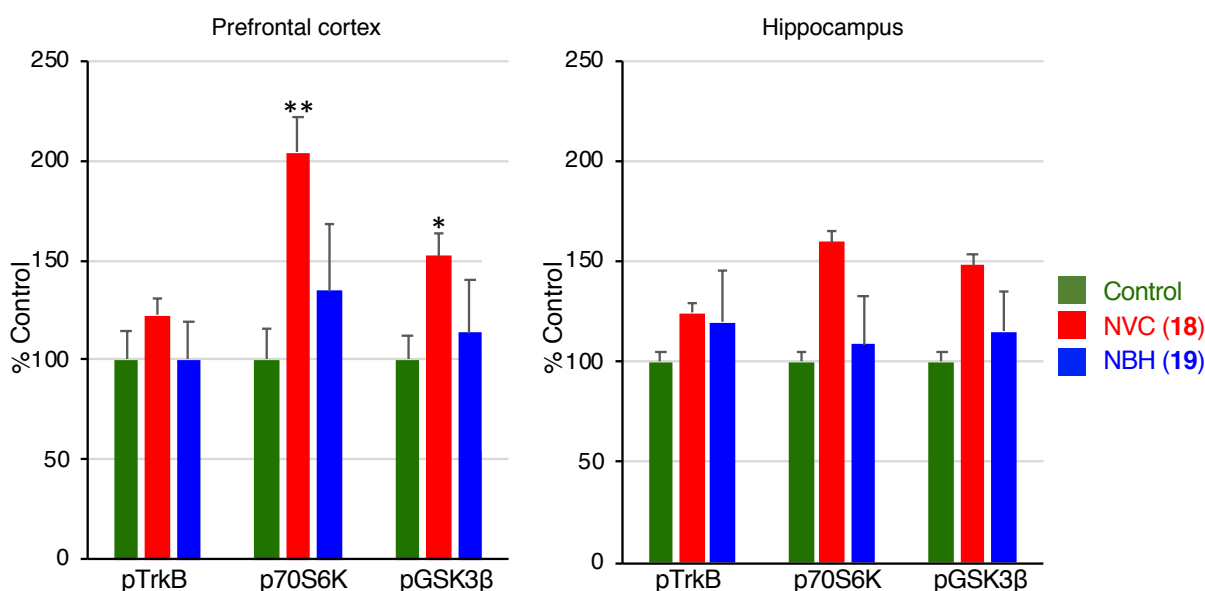


Fig. 13 NVCによる TrkB 受容体シグナル活性化作用

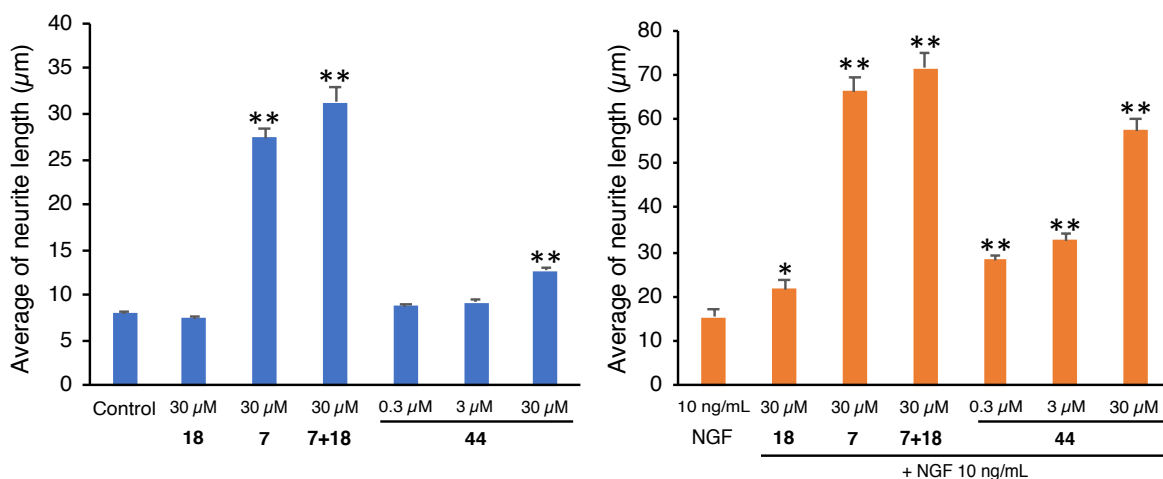
その結果、コントロールと比較して、**19** を投与した系では、わずかにシグナルタンパク質のリン酸化の増加傾向が見られたものの、有意差は確認できなかった (Fig. 14). 投与量や実験回数を増やすことで有意なリン酸化の増加を確認できる可能性も残されたが、実験に多量のサンプルが必要となることに加え、これまでの *in vitro* の活性評価の結果から、**19** は水溶性に明らかな課題があることから、さらなる活性評価試験の実施を断念した. そこで次に、**19** のアセタール部をヘミアセタールへと変換した **44** を用いた PC12 細胞による活性評価を行った.



The ddY mice were intraperitoneally received samples (30 mg/kg). After 30 min, the lysates were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblotting with antibodies against phosphorylated TrkB, and 70S6K, GSK3β. Signal intensities from immunoblots were measured densitometrically. Data are expressed as the mean \pm SE (n = 4). * P < 0.05; **P < 0.01 versus control (1% Tween 80); Dunnett's *t*-test.

Fig. 14 マウス腹腔内投与後の TrkB および TrkB 下流シグナルタンパク質のリン酸化

44 の活性評価では、分化誘導活性と突起伸展促進活性を PC12 細胞の突起の長さを測定することで評価した。すなわち、PC12 細胞培養培地に対して、分化誘導活性の評価ではサンプルのみを加え、突起伸展促進活性の評価では PC12 細胞を神経様細胞へと分化させるのに必要な少量(10 ng/mL)の NGF とサンプルを共に添加し、PC12 細胞の突起の長さを測定して評価した。まず、本活性評価の信頼性を担保するため、ポジティブコントロールの活性を確認した。その結果、NVC(**18**)が NGF 存在下、突起伸展促進活性を示すこと、*trans*-バングレン(**7**)は突起伸展促進活性と分化誘導活性の両方を示すことが確認された。さらに、両化合物の相互作用を確認する目的で、両化合物を同時に添加した系も試験した。その結果、*trans*-バングレン(**7**)単独の活性よりもわずかに強い活性が確認された。一方、**44** は分化誘導活性および突起伸展促進活性の両方を示し、いずれも濃度依存的に活性が増強した。**44** は、*trans*-バングレン(**7**)よりも低活性ではあるものの、ネオビブサニン関連化合物として、初めて PC12 細胞に対する分化誘導活性を示した。また、**44** の突起伸展促進活性では、*trans*-バングレン(**7**)にはやや劣るものの、母格の NVC(**18**)よりも強力な活性を示した(Fig. 15)。



Quantitative evaluation of the neurogenic activity in the presence of samples. Data are expressed as the mean \pm SE (n = 100). **P < 0.01 versus control (0.1% DMSO); Dunnett's *t*-test.

Quantitative evaluation of neurite outgrowth promoting activity in the presence of samples. Each sample was contained NGF. Data are expressed as the mean \pm SE (n = 100). * P < 0.05; **P < 0.01 versus NGF; Dunnett's *t*-test.

Fig. 15 PC12 細胞を用いた分化誘導活性と突起伸展促進活性の確認

これらの結果から、**44** は比較的 low 活性ではあるものの、*trans*-バングレン(**7**)に由来する分化誘導活性を有していることが明らかとなった。したがって、突起伸展促進活性のみを示す NVC(**18**)に対して *trans*-バングレン(**7**)の分化誘導活性を付与することに成功した。一方、今回の活性評価系において、NVC(**18**)と *trans*-バングレン(**7**)の構造重ね合わせによる相加的な活性強度の増強は確認されず、**44** は *trans*-バングレン単独よりも低活性であった。しかし、第二章で後述する *trans*-バングレンのアリル位が置換された誘導体は分化誘導活性を消失していることに対し、**44** はその活性を保持していることから、NVC 骨格とのハイブリッド化による分化誘導活性への何らかの影響が示唆された。

第二章 NVC および *trans*-バングレンの 作用機序解明に向けた研究

第一節 序論

第一章で合成したハイブリッド化合物 **44** が、基となる NVC (**18**) および *trans*-バングレン (**7**) の両化合物の活性を有していることを証明するためには、それぞれの作用標的に作用することを明確にする必要がある。しかしながら、未だ **18** と **7** の作用標的は明らかとなっていない。そこで、著者はそれぞれの作用機序探索にも取り組んだ。NVC (**18**) については当研究室卒業生の西條¹⁷⁾、前川³⁹⁾らによって、蛍光標識基を導入した誘導体 **45** が PC12 細胞の細胞内に移行して、神経様突起の先端に集積することが見出されている¹⁹⁾。また、柳井、小松、清水らによって **18** に光親和性標識基として機能するベンゾフェノンと標識したタンパク質の検出用官能基としてビオチンを導入した誘導体 **20** が合成されている²¹⁻²³⁾ (Fig. 16)。光親和性標識基とは、特定の波長の光を吸収することで活性化され、近傍に存在するタンパク質と共有結合を形成する性質を持つ官能基であり、光親和性標識基を導入した分子プローブは活性分子の標的タンパク質の探索に有用である⁴⁰⁾。著者は今回、**20** を用いて NVC (**18**) の作用標的タンパク質の探索に取り組んだ。

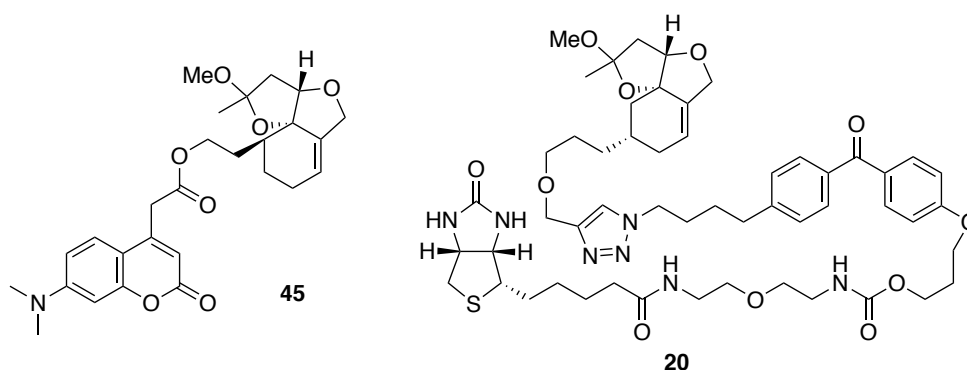


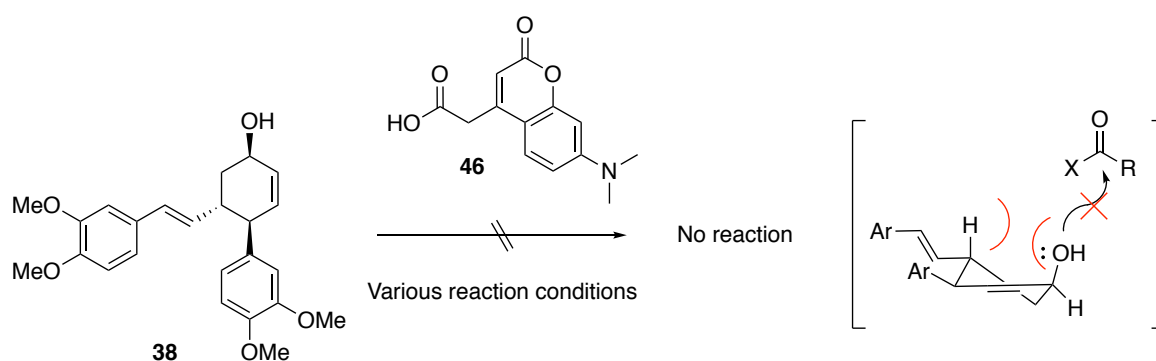
Fig. 16 NVC に蛍光標識基および光親和性標識基を導入した誘導体

また, *trans*-バングレン (**7**) については, 仲井によって, 一部の構造活性相関が明らかとなっているが⁴¹⁾, 置換基の導入による活性への影響は検討されていない. そこで, 第一章で合成したハイブリッド化合物 **19** の合成中間体である **38** を利用して, 蛍光標識基を導入したものをはじめ, 各種誘導体を調製し, 活性評価と, PC12 細胞内での挙動の観察を計画した.

第二節 *trans*-バングレン誘導体の合成

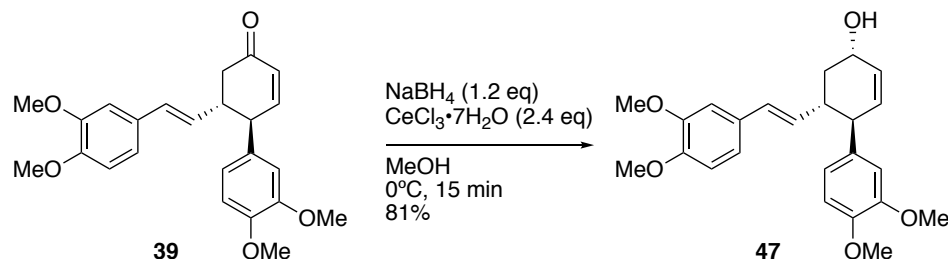
まず、ハイブリッド化合物 **19** の合成中間体 **38** に対して、脱水縮合反応や光延反応による蛍光標識色素 **46** の導入を種々検討したが、目的とする生成物を得ることはできなかった。この結果から、**38** のアリル位のアルコールの立体化学が擬アキシャル位をとっており、立体障害によって反応性が低下していることが推察された (Scheme 5)。

Scheme 5 **38** と **46** の縮合反応の検討



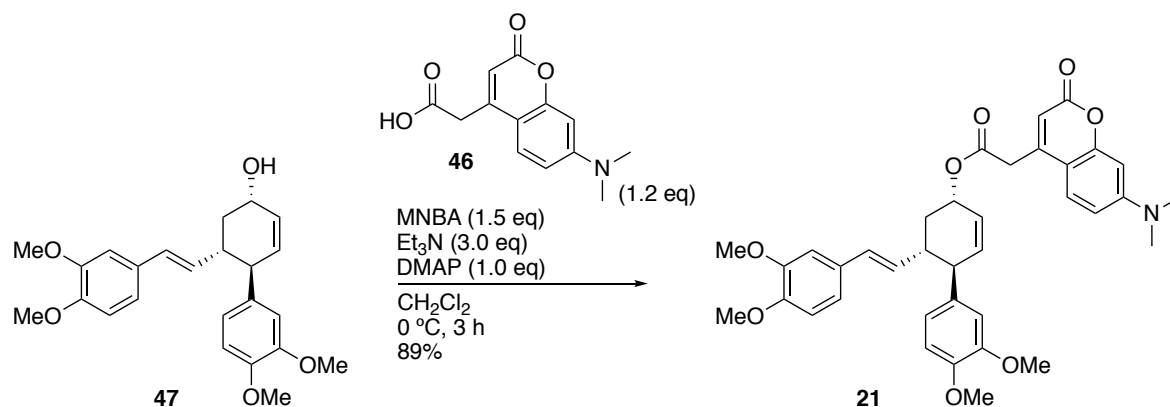
そこで、**38** のアルコールの立体化学を反転させることを試みた。すなわち、**38** を酸化することで得られたエノン **39** を Luche 還元⁴²⁾によって、81%の収率で **38** のアルコールを立体反転させた **47** へと導いた (Scheme 6)。

Scheme 6 **47** の合成



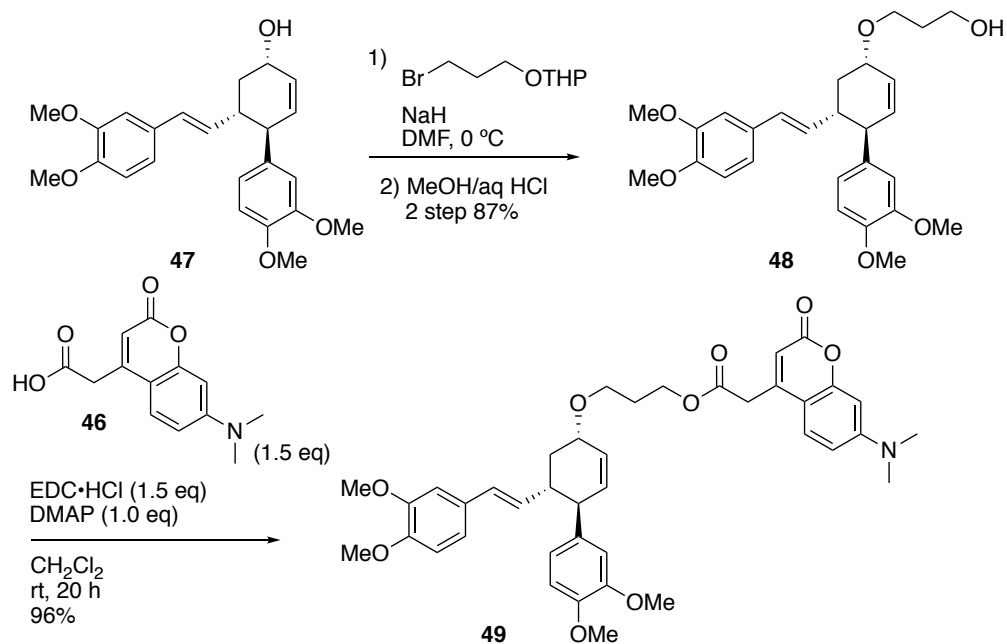
得られた **47** に対して、MNBA⁴³⁾を用いた **46** の縮合反応はスムーズに進行し、高収率で蛍光標識体 **21** を調製できた (Scheme 7)。

Scheme 7 蛍光標識体 **21** の合成



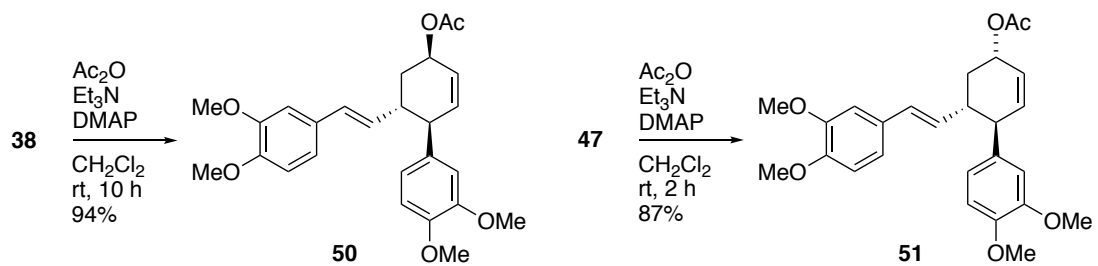
また、**47** に対してアルキルブロミド⁴⁴⁾との $\text{S}_{\text{N}}2$ 反応によって側鎖を導入後、THP 基を加水分解し、2 段階 87%の収率で **48** を得た。得られた **48** に **46** を縮合させることで C-3 のリンカーを有する蛍光標識体 **49** を 96%の収率で得た (Scheme 8)。

Scheme 8 蛍光標識体 **49** の合成



さらに、**38** および **47** にアセチル基を導入した **50** と **51** を調製した (Scheme 9)。

Scheme 9 アセチル化体 **50**, **51** の合成



第三節 *trans*-バングレン誘導体の生物活性評価

まずは、調製した各誘導体を用いて PC12 細胞による活性評価を行なった (Fig. 17). その結果、いずれの誘導体も 30 μ M の濃度で分化誘導活性を示さないことが明らかになった. 一方、突起伸展促進活性については同濃度で活性が保持していることが確認された. また、各誘導体を 60 μ M の濃度で PC12 細胞に作用させた場合には、全てのサンプルで毒性が現れ、ほとんどの細胞が死滅することも明らかとなった.

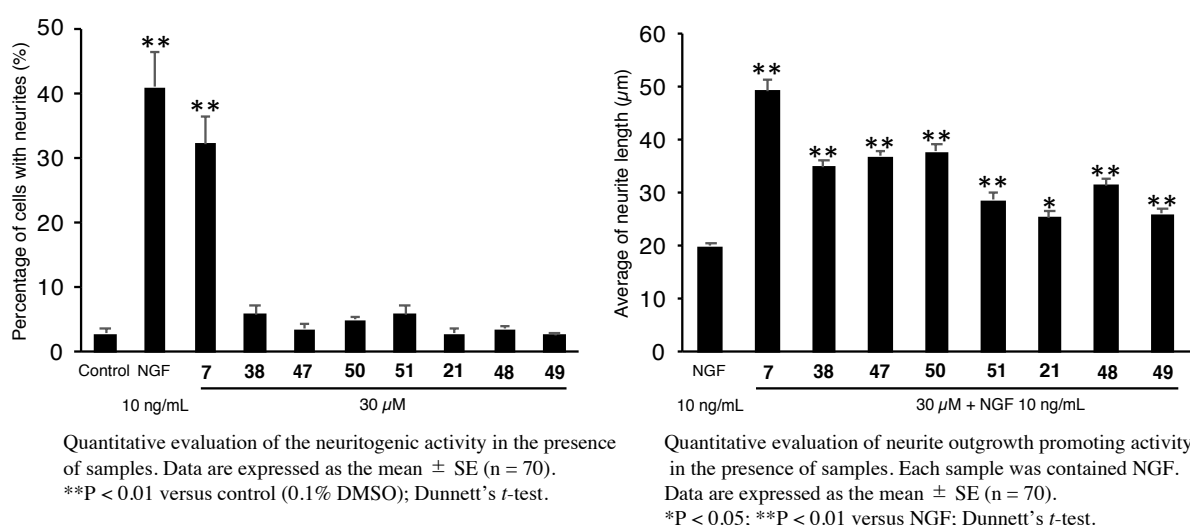


Fig. 17 *trans*-バングレン誘導体の活性評価

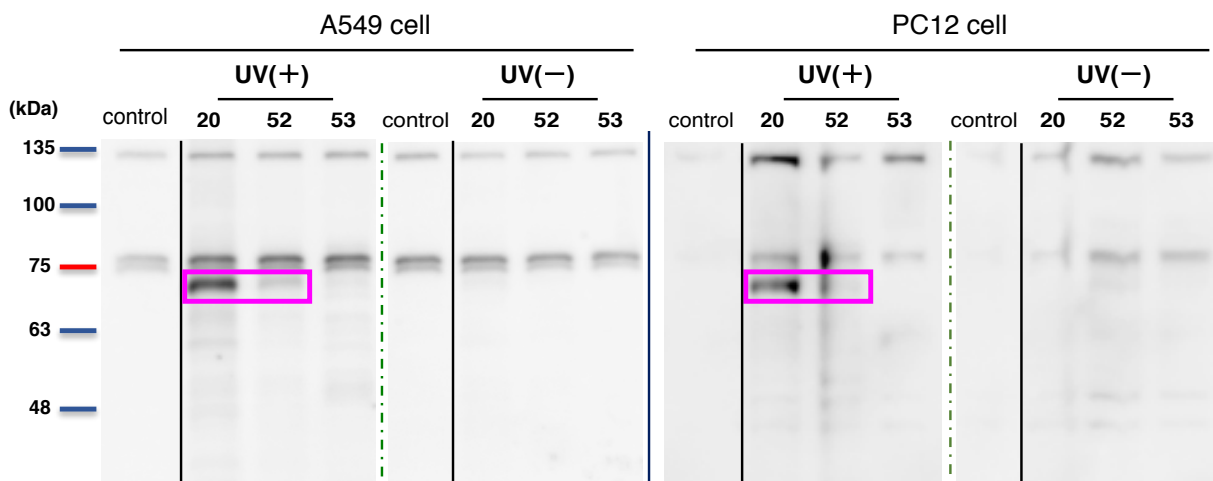
次に、蛍光標識体 **21** と **49** を NGF 存在下、30 μ M の濃度で PC12 細胞に作用させ、蛍光顕微鏡による観察を試みたが細胞への蛍光の集積は観察されなかった. **21** と **49** は同濃度で突起伸展促進活性を示すことから PC12 細胞に確実に作用しているが、蛍光の観察に十分な量の分子が細胞の特定の部位には集積しないことが明らかとなった.

第四節 光親和性標識基を導入した NVC 誘導体を用いた 標的タンパク質の探索

NVC(**18**)の作用標的は不明ではあるが、NGF 刺激を受けた PC12 細胞に対して突起伸展促進活性を示すことを念頭におくと、標的タンパク質は NGF の受容体である TrkA や p75 のシグナル伝達に關与するタンパク質の可能性が高いと推測される。また、**18** はマウス脳内の神経細胞において、TrkB および TrkB 下流のシグナルタンパク質のリン酸化を促進することから³⁸⁾、その作用標的は Trk A および Trk B のシグナル伝達系に共通するタンパク質であると予想できる。

そこで、突起伸展促進活性の活性評価に使用している PC12 細胞と TrkA を過剰発現していることが知られている A549 細胞を用いて、NVC にベンゾフェノンとビオチンを導入した誘導体 **20** および比較対象として、**20** の NVC 部分を突起伸展促進活性を示さないラクトンに置き換えた **52** および、シクロヘキササンに置き換えた **53** を用いた光親和性標識実験を行った。そして、得られたタンパク質抽出液を用いてウエスタンブロットを行い、検出されるタンパク質を比較した。

その結果、A549 細胞および PC12 細胞のいずれを使用した場合においても、**20** を添加して UV を照射した系では 70 kDa 付近に特異的なバンドが明確に確認された。一方、UV を照射しなかった系では、コントロールとの相違が確認されなかったことから、**20** が UV によって活性化されてタンパク質を標識していることが明らかとなった。また、**52** を添加した系においても **20** と同様に、非常に薄くではあるが 70 kDa 付近に特異的なタンパク質のバンドが観察された。この結果から、ラクトン構造にも作用標的に対する弱い親和性があると推察される。そして、**53** を添加した系ではコントロールと比較して、特異なタンパク質のバンドが観察されなかったことから、70 kDa 付近に観察されたタンパク質は NVC (**18**) を認識する可能性が示唆された (Fig. 18)。また、A549 細胞および PC12 細胞のいずれを使用した場合でも、同様の結果が得られたことから、以降の実験では、比較的取り扱いの容易な A549 細胞を使用した。



Each of cells (1×10^5 cells/mL) were incubated with samples at room temperature for 30 min under UV irradiation. The lysates were subjected to SDS-PAGE followed by using streptavidin HRP to detect the biotinylated proteins.

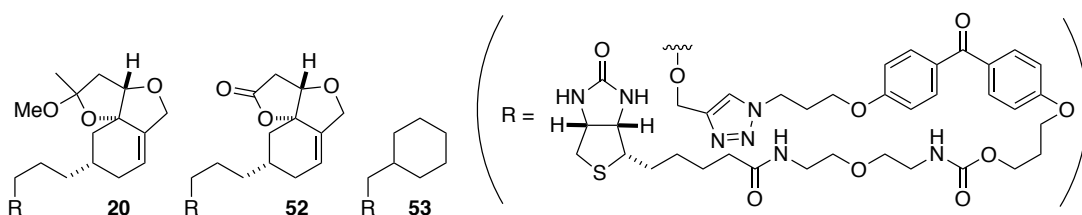
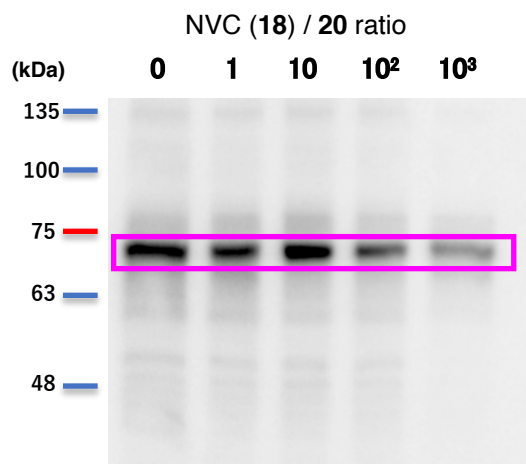


Fig. 18 A549 細胞および PC12 細胞を用いた光親和性標識実験

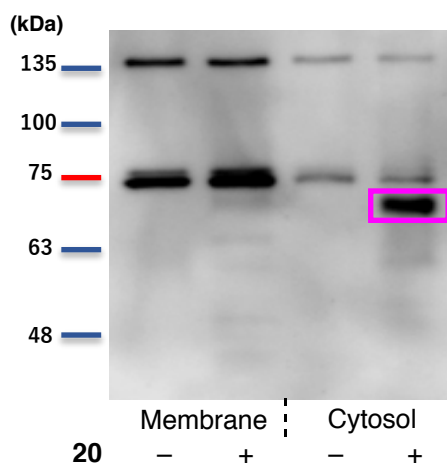
次に、70 kDa 付近に確認された特異的なタンパク質に対して、NVC (**18**) が親和性を示すことを証明することを目的として、**20** と同時に **18** を添加する競合実験を行った。その結果、**18** を添加した系において濃度依存的に 70 kDa 付近のタンパク質のバンドが薄くなったことから、標的タンパク質に対する **20** の結合が **18** によって競合的に阻害されたことが確認された。したがって、**20** は NVC (**18**) に親和性を示すタンパク質を特異的に標識していることが証明された (Fig. 19)。なお、**20** の標的タンパク質に対する結合の阻害に大過剰の **18** が必要となった原因として、本実験系において細胞内への **18** の移行が十分では無いことが考えられる。



A549 cells (1×10^5 cells/mL) were incubated with **18** and **20** at room temperature for 30 min under UV irradiation. The lysates were subjected to SDS-PAGE followed by using streptavidin HRP to detect the biotinylated proteins.

Fig. 19 NVCによる**20**との競合実験

次に、**20**によって標識されたタンパク質の細胞内での局在を確認することを目的として、細胞からのタンパク質抽出に際して分画キットを使用し、細胞質画分と細胞膜画分の試料を調製した。そして、各試料のウェスタンブロットを行った結果、標識タンパク質は細胞膜画分には確認されず、細胞質画分に局在することが確認された (Fig. 20)。この結果は NVC の蛍光標識体が PC12 細胞内に移行し、突起伸展促進活性を示した結果と合致する¹⁹⁾。



A549 cells (1×10^5 cells/mL) were incubated with **20** at room temperature for 30 min under UV irradiation. The lysates were subjected to SDS-PAGE followed by using streptavidin HRP to detect the biotinylated proteins.

Fig. 20 **20**によって標識されたタンパク質の細胞質への局在

第三章 スピロテヌイペシン A の全合成と その生物活性評価

第一節 序説

スピロテヌイペシン A (**25**) および B (**26**) は 2004 年に東北大学の 大島, 菊地らによつて冬虫夏草ハナサナギダケの子実体から単離構造決定されたセスキテルペンである²⁷⁾(Fig. 21). 構造的な特徴として, アセタールを含むかご状の部分構造, スピロ炭素原子を含む隣接した不斉第四級炭素を有している. また, これらの化合物が, ヒトグリア細胞に対する神経栄養因子産生促進活性を有することが報告されている. しかし, その詳細な活性発現メカニズムは未だ解明されていない.

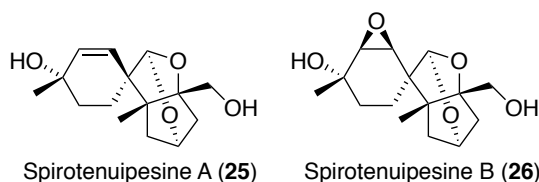
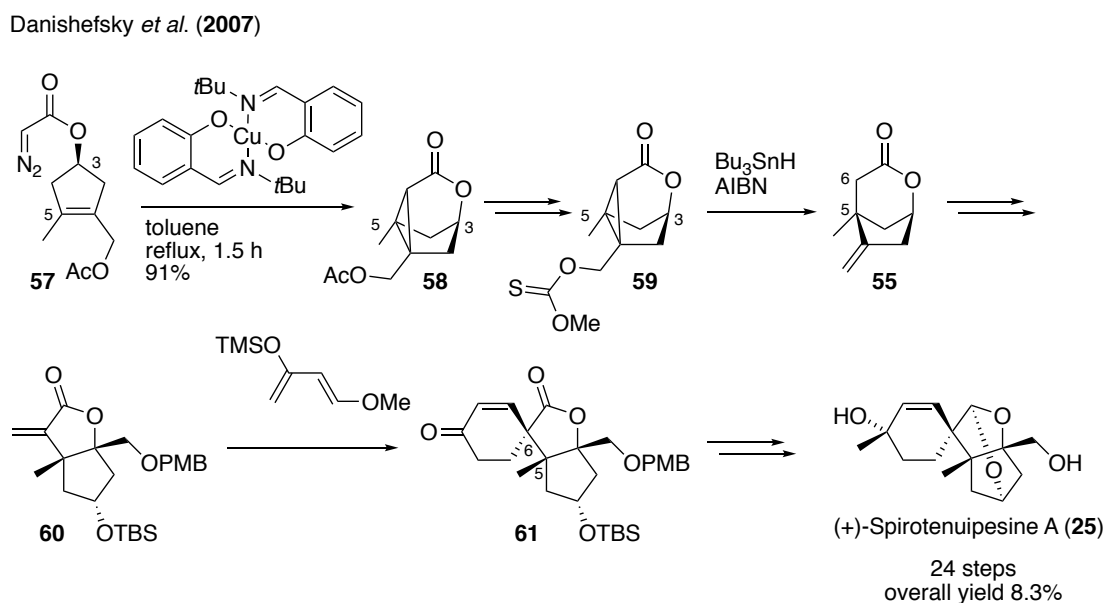
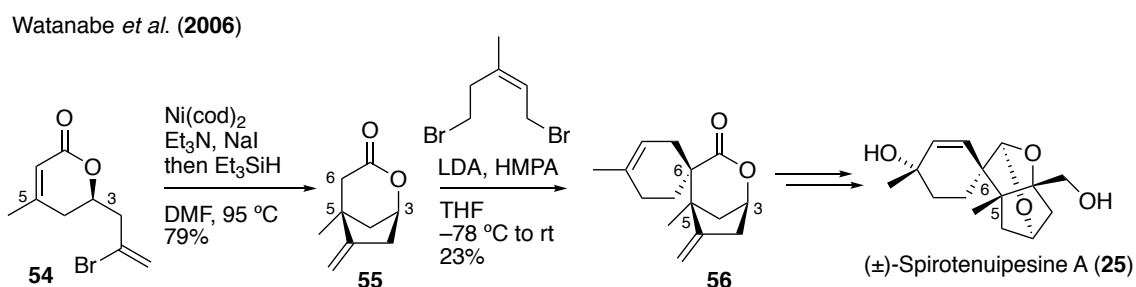


Fig. 21 スピロテヌイペシン A および B の構造

スピロテヌイペシン類のユニークな構造と生物活性は, 有機合成化学者の興味を惹きつけ, 2006 年に東京大学の渡邊らによるスピロテヌイペシン A (**25**) のラセミ全合成⁴⁵⁾, 2007 年にはコロンビア大学の Danishefsky らによるスピロテヌイペシン A (**25**) および B (**26**) の不斉全合成⁴⁶⁾がそれぞれ報告されている (Scheme 10). 渡邊らの合成は無保護での合成を特徴としており, **54** に対してニッケルを用いた分子内環化反応によるビスクロラクトン **55** の構築と, ジブロミドを用いた二重アルキル化によるスピロ環構築を鍵反応としている. 一方, Danishefsky らは, **57** の分子内シクロプロパン化と, それに続くシクロプロパン環のラジカル開裂を鍵反応として, 渡邊らの合成ルートにおける鍵中間体と同一の **55** を得ている. その後, 数工程の変換を経て得られた **60** に対して, Danishefsky-北原ジェンとの Diels-Alder 反応によって **61** へと導いた後に, スピロテヌイペシン A (**25**) への変換を達成している.

Scheme 10 過去のスピロテヌイペシン A の合成例



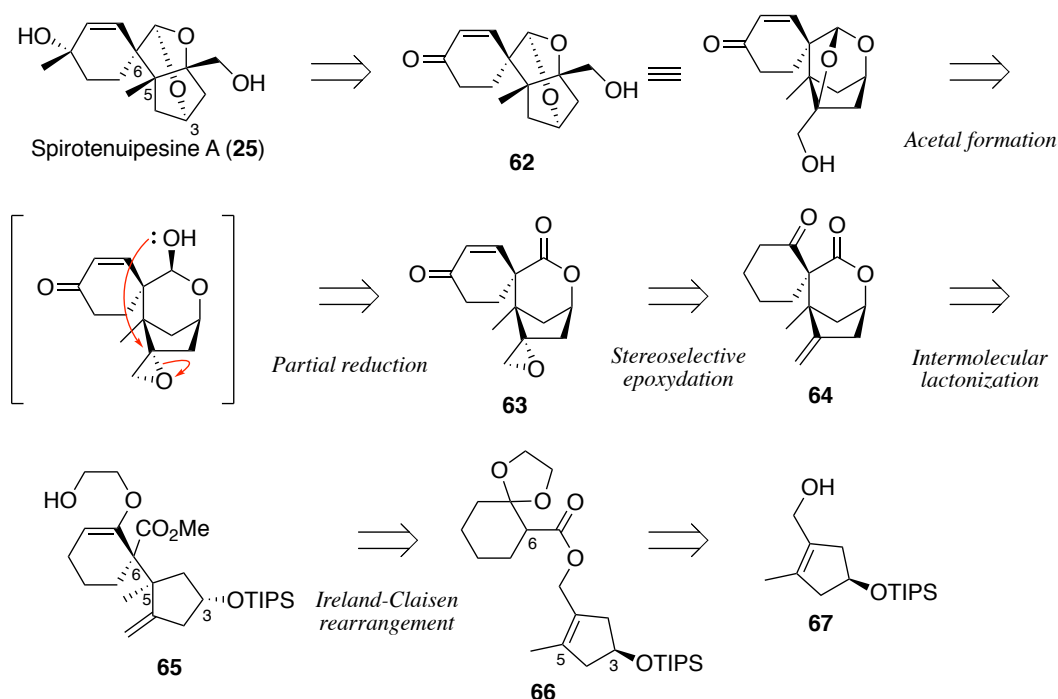
いずれの合成ルートでも、3位の立体化学を足掛かりとして、まず5位不斉第四級炭素を構築し、続いて6位不斉第四級炭素を順次構築している。生物学的試験の実施に向けた量的供給に指向すると、渡邊らの合成ルートは短工程ではあるものの、収率に課題がある。一方、Danishefskyらの合成ルートは、少量で反応を実施している工程が多く、スケールアップに課題があると考えられる。

そこで著者は、より効率的に量的供給の可能なスピロテヌイペシン A の合成ルート開発を目指し、Ireland-Claisen 転位によって5位、6位不斉第四級炭素を一挙に構築する合成法を計画した。

第二節 (±)-スピロテヌイペシン A の全合成と誘導体の合成

スピロテヌイペシン A (**25**) の合成計画を Scheme 11 に示す。エステル **66** は既知法を参考に不斉に調製可能なアルコール **67** を出発原料として、カルボン酸を縮合させて導けると考えた。 **66** に対して Ireland-Claisen 転位を適用することで 5 位, 6 位第四級炭素を一挙に構築して **65** が得られると考えた。本反応では 3 位に相当する二級アルコール部からの遠隔不斉転写を期待した。 **65** からのラクトン化とビニルエーテルの加水分解を経て **64** へと導き、カルボニル基の転位とアルケンの導入、立体選択的なエポキシ化によって **63** が得られると考えた。 **63** の部分還元によって生じるラクトールがエポキシドを求核攻撃して開裂させることでアセタール **62** へと導き、最後に立体選択的にメチル化することでスピロテヌイペシン A (**25**) を合成できると考えた。

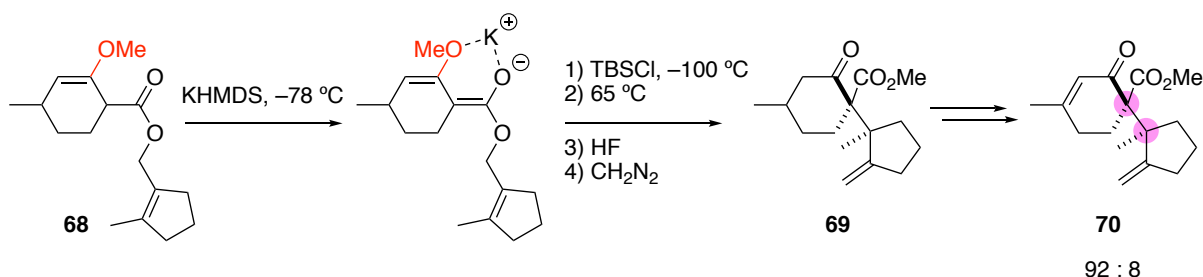
Scheme 11 スピロテヌイペシン A の合成計画



合成計画の鍵となる Ireland-Claisen 転位は, Gilbert らの報告⁴⁷⁾を参考に設計した (Scheme 12). Gilbert らは, トリコジエンの合成において, **68** から Ireland-Claisen 転位によって隣接する 2 つの第四級不斉炭素を高立体選択的に構築している. この選択性の発現には,

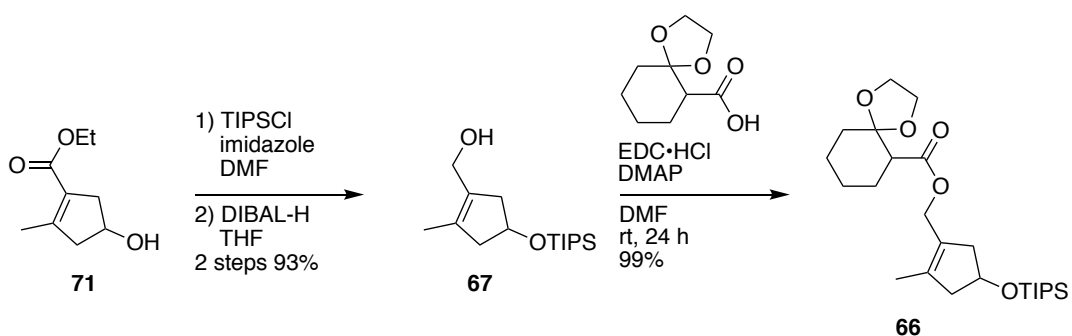
エステルの β 位に存在するエノールエーテルによるキレーション効果によって反応系中で発生するエノラートの立体化学が制御されていることに起因する。そこで、 β 位にエノールエーテルの代わりに、より化学的に安定かつ不斉補助基への発展も可能なアセタールを導入した **66** を基質として Ireland-Claisen 転位を行う方法を考案した。

Scheme 12 キレーション効果を利用した立体選択的な Ireland-Claisen 転位

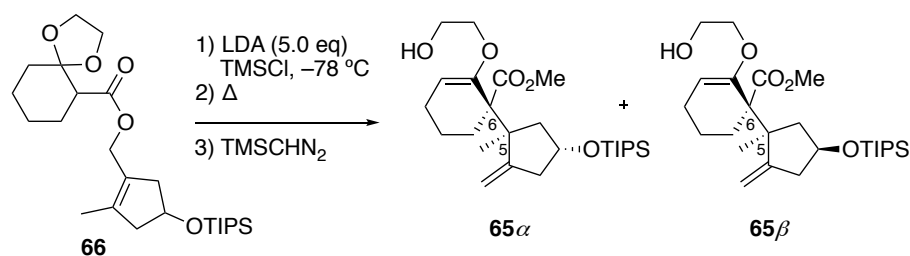


まず、既知法⁴⁸⁾で調製可能な **71** を出発原料として、二級アルコールのシリル化とエステルの還元によって 2 工程 93%の収率で、アリルアルコール **67** へと導いた。そして、カルボン酸部⁴⁹⁾と縮合させ、99%の収率で Ireland-Claisen 転位前駆体 **66** を得た (Scheme 13)。

Scheme 13 エステル **66** の調製



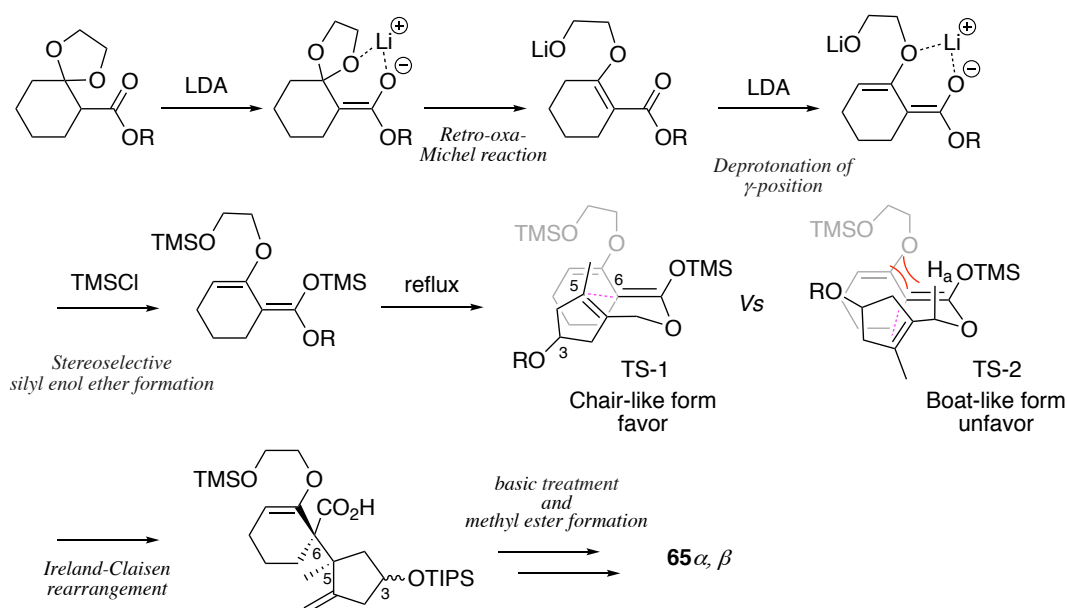
66 に対する Ireland-Claisen 転位の条件検討では、転位反応後、得られたカルボン酸をメチルエステルへと変換したのちに収率を確認した (Table 1)。検討の結果、Entry 4 に示す TMSCl, LDA をそれぞれ 5 当量、加熱還流条件で 24 時間反応させたものが 62% と最も良い収率を与え、立体選択的に 5 位と 6 位の第四級炭素を構築することができた。しかし、3 位の立体化学に由来するジアステレオマーがほぼ 1 : 1 の比率で生成することが明らかになった。なお、生成した **65 α** , **65 β** は容易にシリカゲルカラムクロマトグラフィーで単離可能であった。

Table 1 Ireland-Claisen 転位の条件検討

Entry	Temperature	TMSCl (eq)	Time (h)	Yield	65α : 65β
1	rt	5	24	24%	53 : 47
2	rt	0	24	decomposed	—
3	60 °C	5	24	51%	53 : 47
4	reflux	5	24	62%	52 : 48
5	reflux	5	18	55%	52 : 48
6	reflux	5	36	51%	53 : 47

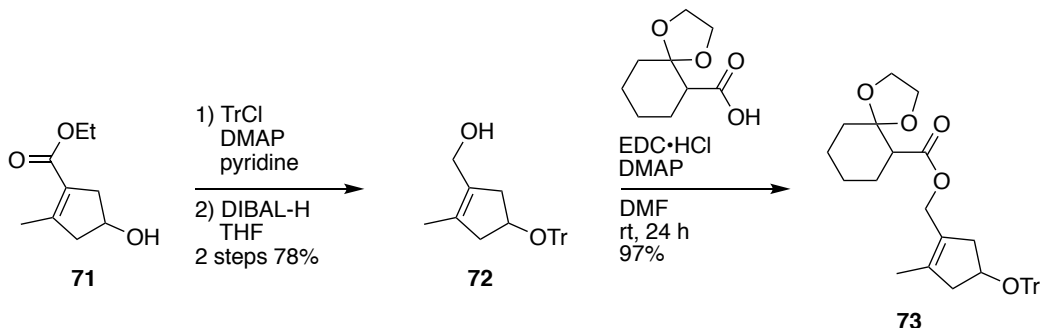
本反応の推定反応機構を Scheme 14 に示す. まず, LDA による脱プロトン化に続く, レトロマイケル反応によってアセタールが開環する. 続いてエステルの γ 位脱プロトン化が進行する. この時, リチウムカチオンに対するエノラートアニオンおよびエノラートの β 位の酸素原子によるキレーション効果によって *Z* 選択的にエノラートが形成される. 形成したエノラートを TMSCl でトラップしたのちに昇温すると TS-1 で示した擬いす型の遷移状態を経由して反応が進行することで, 新たに生じる 5 位と 6 位の四級炭素の立体化学が制御される⁵⁰. 一方, 3 位アルコール部は反応点から離れた位置に存在するために選択性への影響は認められず, **65α** と **65β** の生成比が, ほぼ 1 : 1 になったと考えられる.

Scheme 14 Ireland-Claisen 転位の推定反応機構



そこで、立体選択性の向上を目的として、**66**の3位アルコール部の保護基をトリチル基に置き換えたエステル**73**に対する Ireland-Claisen 転位を計画した。すなわち、Si-O間の結合距離 (1.63 Å) よりも C-O間の結合距離 (1.43 Å)の方が短いことを考慮すると、TIPS 基をトリチル基に置き換えることで、3位アルコール部が反応点へと近づき、立体障害による影響が増大すると期待した。そこで、**71**にトリチル基を導入後、エステルを還元して得られたアリルアルコール**72**をカルボン酸と縮合させて目的とする Ireland-Claisen 転位前駆体**73**を調製した (Scheme 15)。

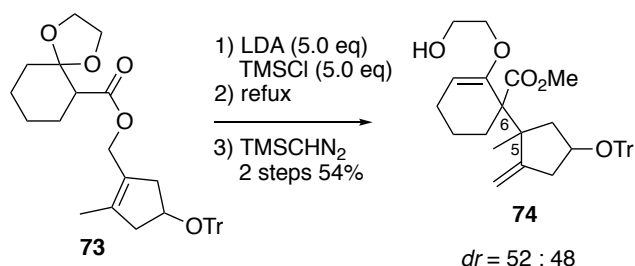
Scheme 15 **73**の合成



得られた**73**を Ireland-Claisen 転位の条件に伏したところ、立体化学は未決定ではあるが2種類のジアステレオマーの混合物**74**が2段階54%の収率で得られた。¹H NMR

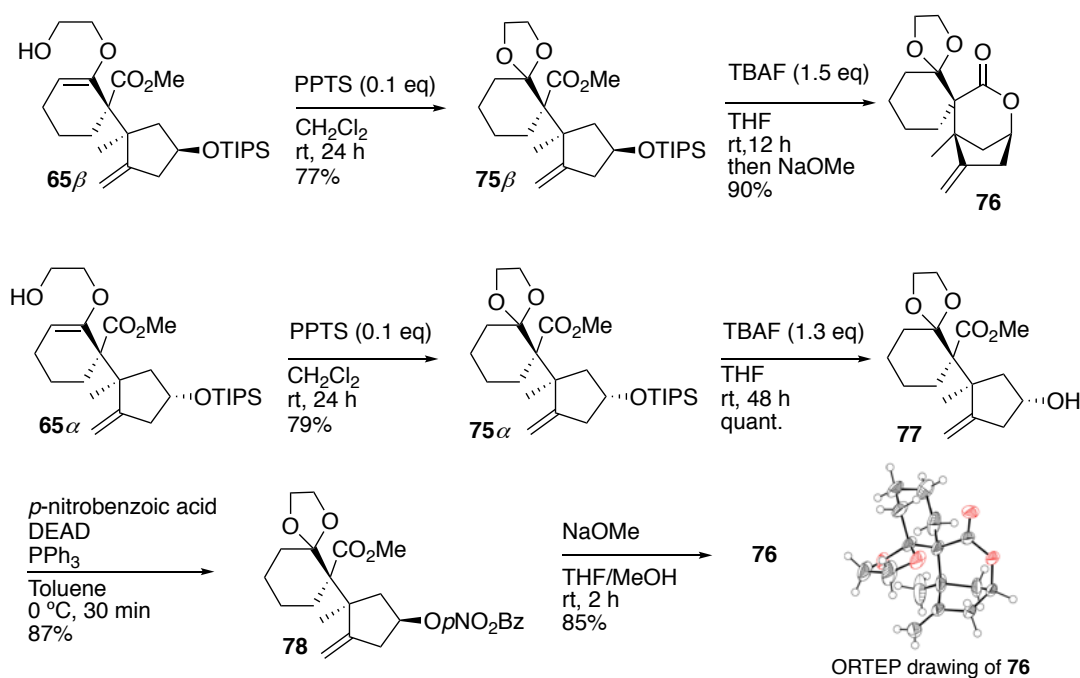
から算出したそれぞれのジアステレオマーの生成比は、ほぼ 1 : 1 であり、3 位のアルコール保護基を変更したことによる選択性の向上は、期待に反してほとんど確認できなかった (Scheme 16)。

Scheme 16 74 の合成



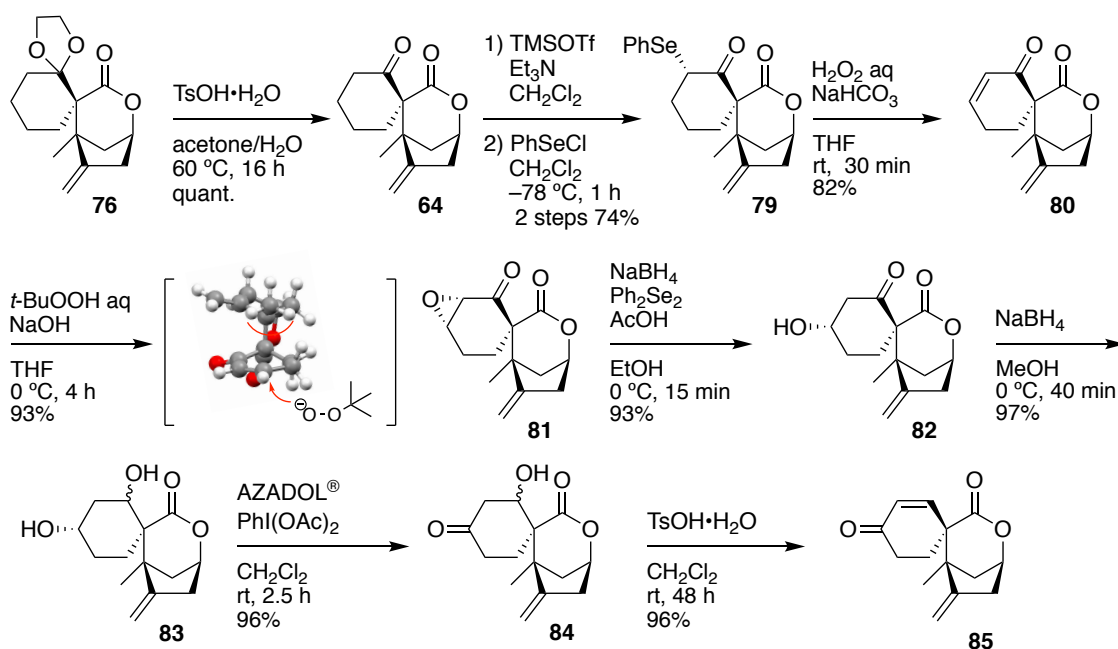
そこで、まずは **65 α** , **65 β** からラセミ体でのスピロテヌイペシン A (**25**) の合成を目指すことにした。**65 β** を PPTS で処理して 77% の収率でアセタール **75 β** を得た。**75 β** のシリル基を脱保護した後に反応系中にナトリウムメトキシドを加えることで、ラクトン化が進行し、一挙に 90% の収率で **76** へと導くことができた。一方、**65 α** をアセタール化した後、シリル基を定量的に脱保護し、光延反応⁵¹⁾で二級アルコールの立体を反転させることで、87% の収率で **78** を得た。続いて、**78** をナトリウムメトキシドで処理することでラクトン化が進行し、85% の収率で **76** へと導くことができた。なお、**76** の相対立体化学は X 線結晶構造解析で確認した (Scheme 17)。

Scheme 17 ビシクロラクトン **76** の合成



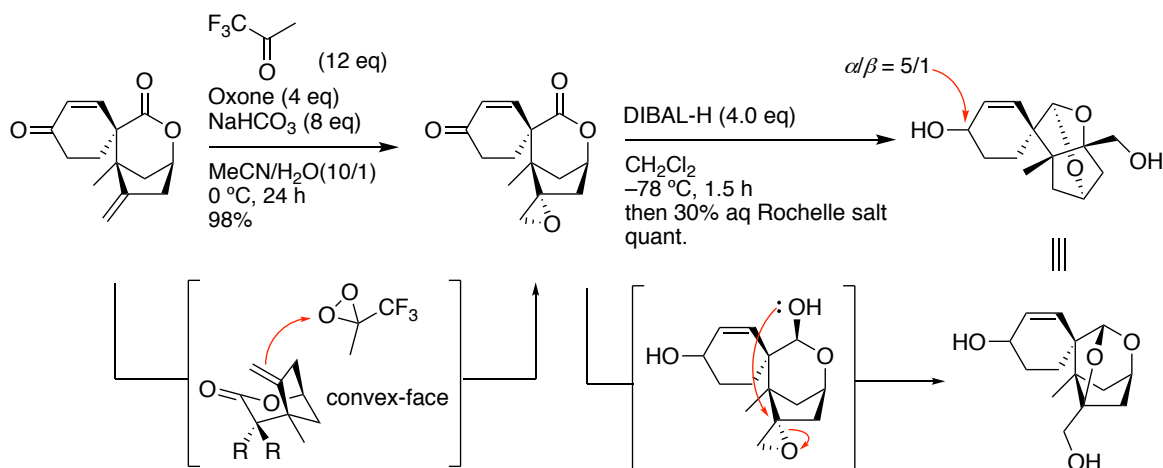
次に、得られた **76** のアセタール部を脱保護してケトン **64** を得た。 **64** に対して、シリルエノールエーテルを経由したフェニルセレン化、酸化によるセレノキシドの β 脱離を行い、3 工程 61%の収率で二重結合を導入した。 **80** を塩基性条件下、*t*-BuOOH で処理するとメチル基による立体障害を避けて反応が進行し、エポキシド **81** を 93%の収率で得た。 続いて、宮下らの条件を参考に **81** のエポキシドの還元的開環⁵²⁾を行い、93%の収率で β ヒドロキシケトン **82** とした後に水素化ホウ素ナトリウムでケトンを還元して高収率にジオール **83** を得た。 AZADO 酸化⁵³⁾によって **83** の一方の二級アルコールのみを 96%の収率で選択的に酸化した後に、酸で処理して脱水し、96%の収率でエノン **85** へと導いた (Scheme 18)。

Scheme 18 エノン **94** の合成



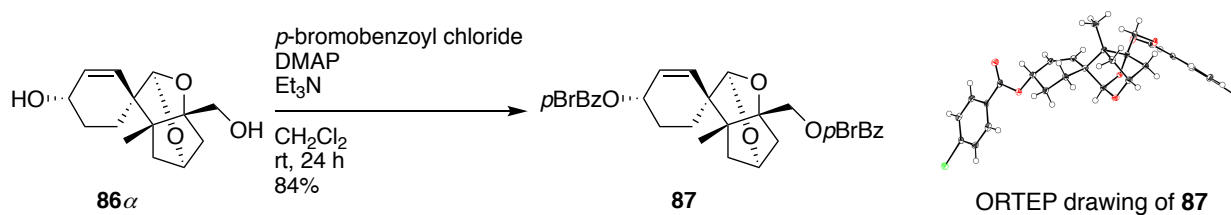
85 から **86** への変換は渡邊らの合成ルート⁴⁵⁾を参考に、反応条件を改良して進めた。まず、1, 1, 1-トリフルオロアセトンを利用したジオキシラン酸化⁵⁴⁾によって **63** のエキソオレフィン を 98%の収率で選択的にエポキシ化した。この反応では高い選択性で convex 面から反応が進行した。 **63** から **86** への変換では、DIBAL-H による **63** の部分還元の後、酸処理によるアセタールの構築を検討したが低収率であった。しかし、 **63** をラクツールへと変換後、ロッシェル塩水溶液で処理して、室温で攪拌することで、ラクツールのエポキシドに対する求核攻撃がスムーズに進行し、定量的に **86** を得ることができた (Scheme 19)。

Scheme 19 アセタール部の構築



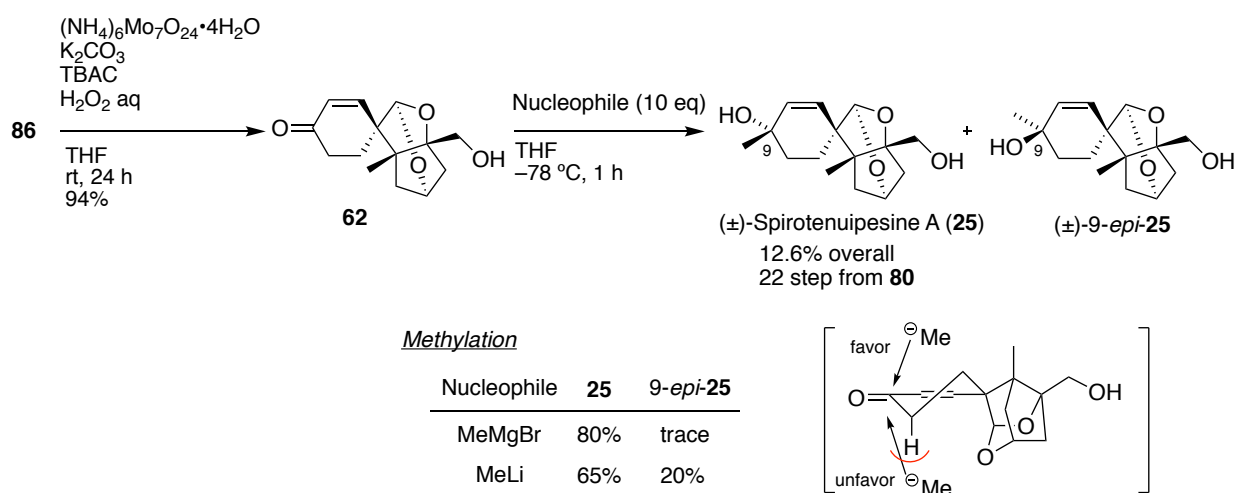
また、**86** を精製して得た α -OH 体 **86 α** を *p*-ブロモベンゾイル化した後、単結晶の試料を調製し、その X 線結晶構造解析によって、立体化学を確認した (Scheme 20)。

Scheme 20 **86 α** の立体化学の確認



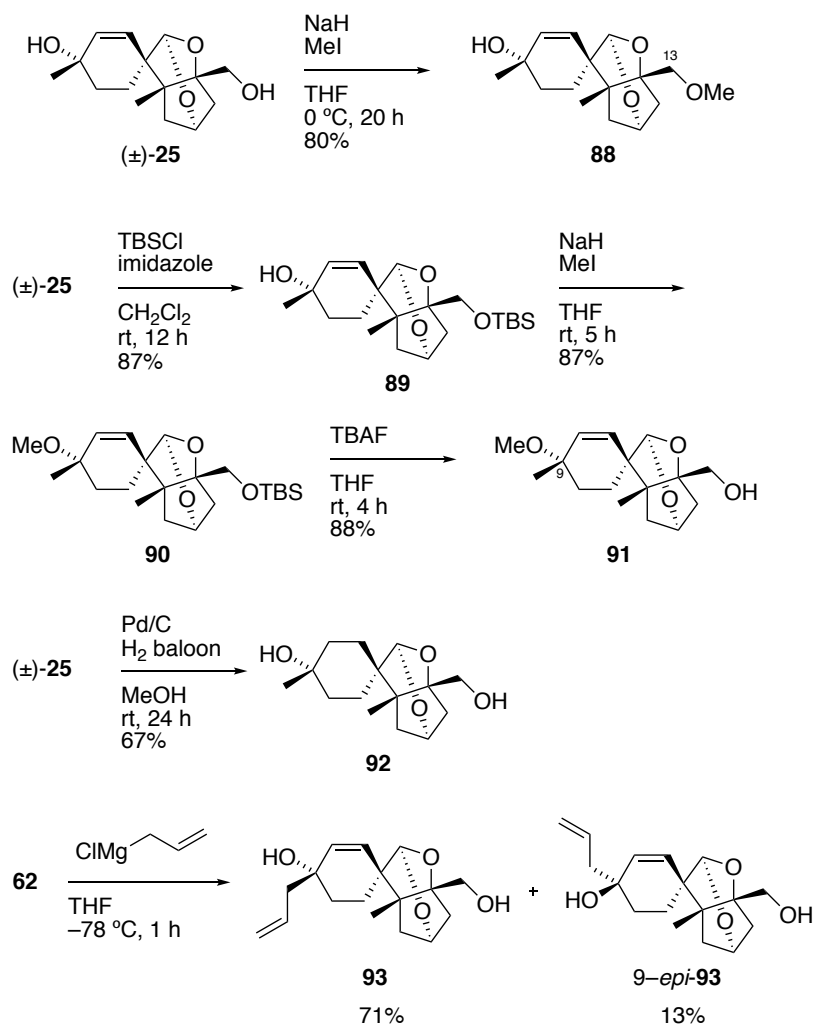
86 の酸化は、二酸化マンガンを用いた場合では低収率かつ、その再現性も低かった。そこで、Trost 酸化⁵⁵⁾を適用したところ、二級アリルアルコールの選択的酸化が進行し、94%の収率で **62** を得た。得られた **62** に対してメチル化を行うと、擬アキシャル位からの攻撃が優先的に進行し、80%の収率で(±)-スピロテヌイペシン A (**25**) の合成が達成できた。**71** から総収率は 22 工程 12.6%であった (Scheme 21)。

Scheme 21 スピロテヌイペシン A の合成



さらに構造活性相関の調査を目的として、スピロテヌイペシン A (**25**) の誘導体合成にも取り組んだ (Scheme 22). まず、9 位、13 位アルコールが活性に与える影響を確認することを目的とした誘導体 **88**, **91** を調製した. (\pm) -スピロテヌイペシン A (**25**) を 0°C で水素化ナトリウム、ヨウ化メチルと反応させることで、13 位アルコールがメチル化された **88** が 80% の収率で得られた. また、 (\pm) -**25** の 13 位アルコールを TBS で保護したのちに 9 位アルコールのメチル化を行い、TBAF で処理することで **91** を 3 工程 67% の収率で得た. また、二重結合の活性への影響を確認するために (\pm) -**25** を接触水素添加によって還元し、67% の収率で **92** を得た. 一方で、作用機序探索に向けた分子プローブの合成を指向して、9 位メチル基部を多様な官能基の導入が可能なアリル基に置き換えた誘導体も合成した. すなわち、**62** に対して Grignard 試薬を作用させることで、**93** を 71% の収率で合成した.

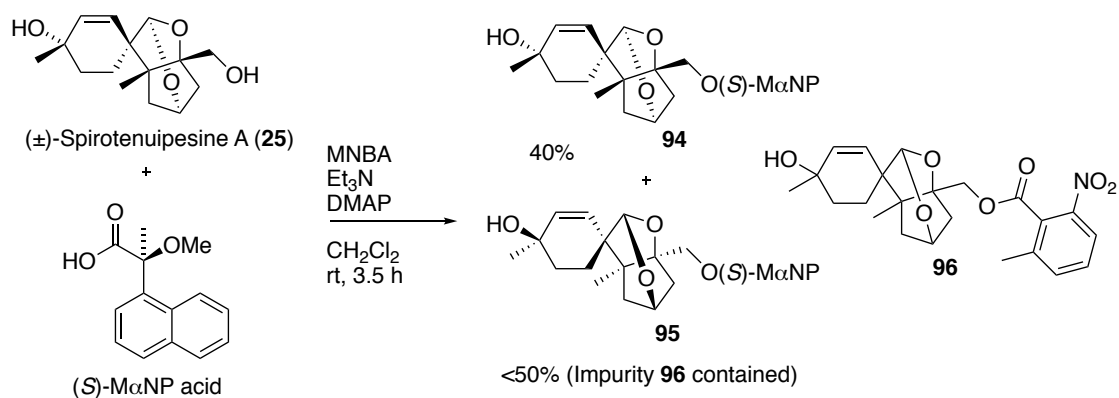
Scheme 22 スピロテヌイペシン A 誘導体の合成



第三節 ジアステレオマー法による スピロテヌイペシン A 両鏡像異性体の調製

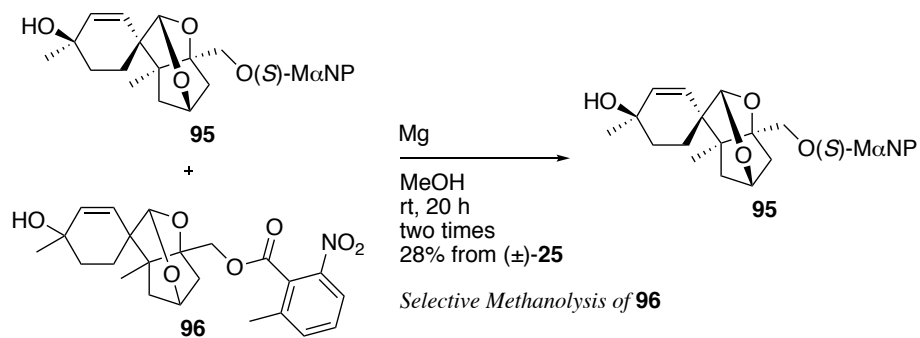
スピロテヌイペシン A (**25**)の両鏡像異性体の合成は、光学活性な原料 **71** を用いて合成を進め、Ireland-Claisen 転位後の **65 α** と **65 β** に相当するジアステレオマーを分割することで達成できると考えられる。しかし、十分量のラセミ体の **25** の合成が達成できたことから、ここでは、**25** のジアステレオマー化による光学分割を検討した。(±)-スピロテヌイペシン A (**25**)の一級アルコール部に、原田、葛西らによって開発されたキラルカルボン酸⁵⁶⁾を縮合させることでジアステレオマー化した。一級アルコールを利用したジアステレオマー化による分割は、一般に困難とされているが、驚くべきことに得られたジアステレオマー**94**, **95** をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで容易に分離することができた(Scheme 23)。

Scheme 23 (±)-スピロテヌイペシン A のジアステレオマー化



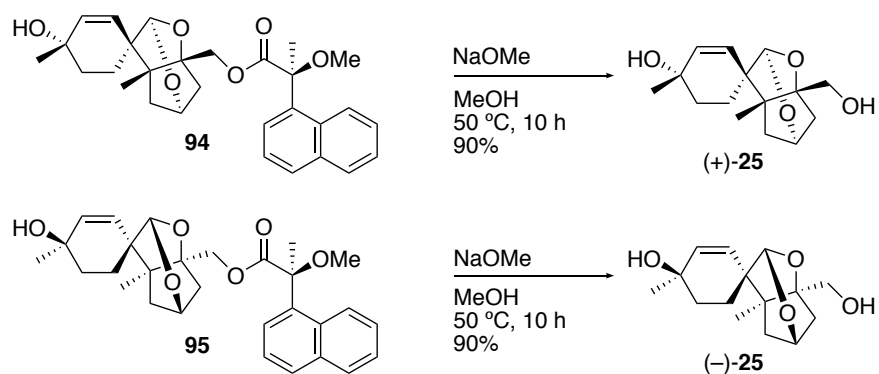
94 と **95** の分離には成功したが、**95** には MNBA 由来のカルボン酸が縮合したと推測される不純物 **96** が混在しており、HPLC を用いても完全には単離できなかった。そこで、これらをメタノール溶媒中、反応系中で発生させたマグネシウムメトキシド⁵⁷⁾と反応させることで **96** を選択的に加溶媒分解し、純粋な **95** を得た(Scheme 24)。

Scheme 24 96 の選択的な加溶媒分解



得られた **94** および **95** をそれぞれナトリウムメトキシドで処理することで、スピロテヌイペシン **A** の両光学活性体 (+)-**25**, (-)-**25** をそれぞれ良好な収率で得た (Scheme 25).

Scheme 25 スピロテヌイペシン A 両光学異性体の合成



第四節 スピロテヌイペシン A および誘導体の生物活性評価

合成したサンプルを用いた生物活性評価の方法は、小原らによる報告⁵⁸⁾を参考に行った。すなわち、グリア細胞に対してサンプルを添加して 48 時間後の培地上清を回収し、その回収した培地上清を利用して PC12 細胞を培養した。96 時間培養後の PC12 細胞の形態変化から、グリア細胞からの神経栄養因子産生を評価した (Fig. 22)。

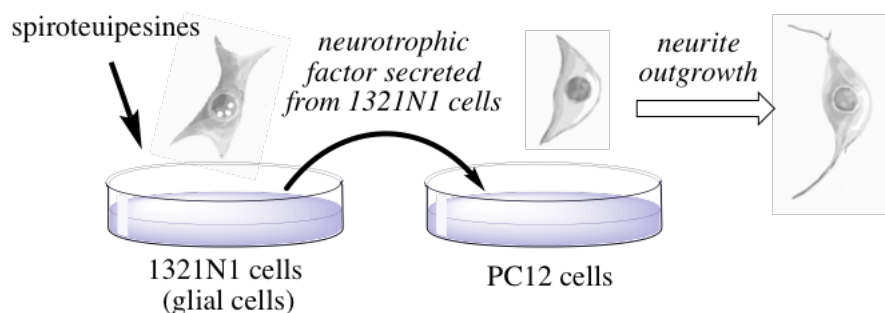
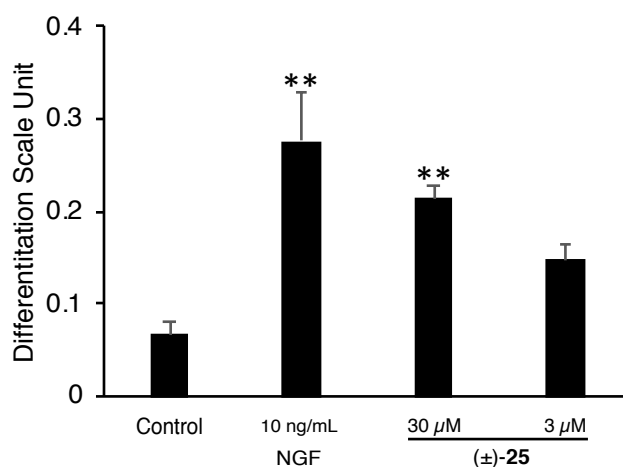


Fig. 22 神経栄養因子産生促進活性の活性評価系

まずはラセミ体のスピロテヌイペシン A (**25**) を用いて活性評価を行った。その結果、サンプルを加えた系ではコントロールに比べ、有意に PC12 細胞の形態変化が確認され、合成品として初めてスピロテヌイペシン A (**25**) のグリア細胞に対する神経栄養因子産生促進活性を確認した (Fig. 23)。



Neurite outgrowth of PC 12 cells by a conditioned culture medium with 1321N1 cells. The neurotrophic factor secretion-promoting activity of (±)-**25** from glial cells (1321N1) was evaluated by the observation of neurotrophic factor-induced morphological changes in PC12 cells. Data are expressed as the mean \pm SE for three wells. **P < 0.01 versus control (0.1% DMSO); Dunnett's *t*-test.

Fig. 23 (±)-スピロテヌイペシン A の活性評価

PC12 細胞の形態変化がスピロテヌイペシン A (**25**) の直接作用によるものではないことを確認する目的で、サンプルを直接 PC12 細胞の培養培地に添加して、PC12 細胞の形態変化を確認した。その結果、サンプルを加えた系とコントロールとの差は確認されず、スピロテヌイペシン A (**25**) は PC12 細胞に対して直接作用していないことが証明された (Fig. 24)。

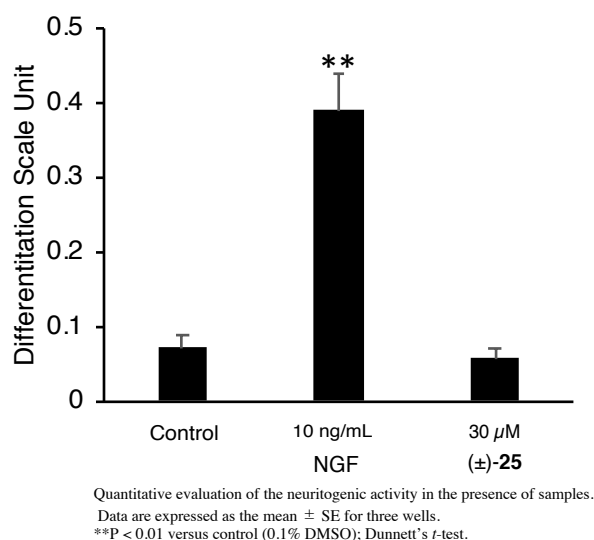
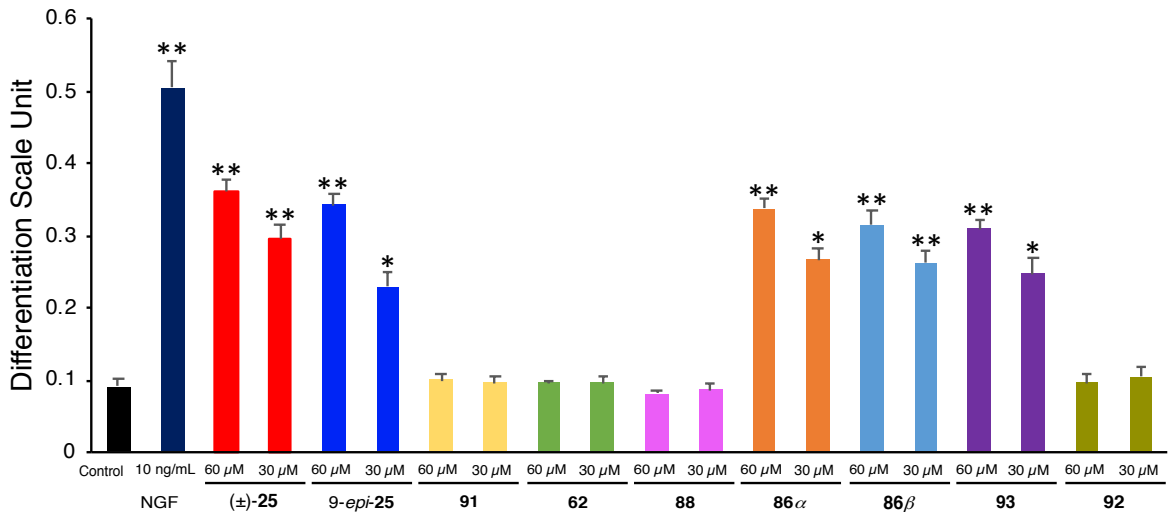
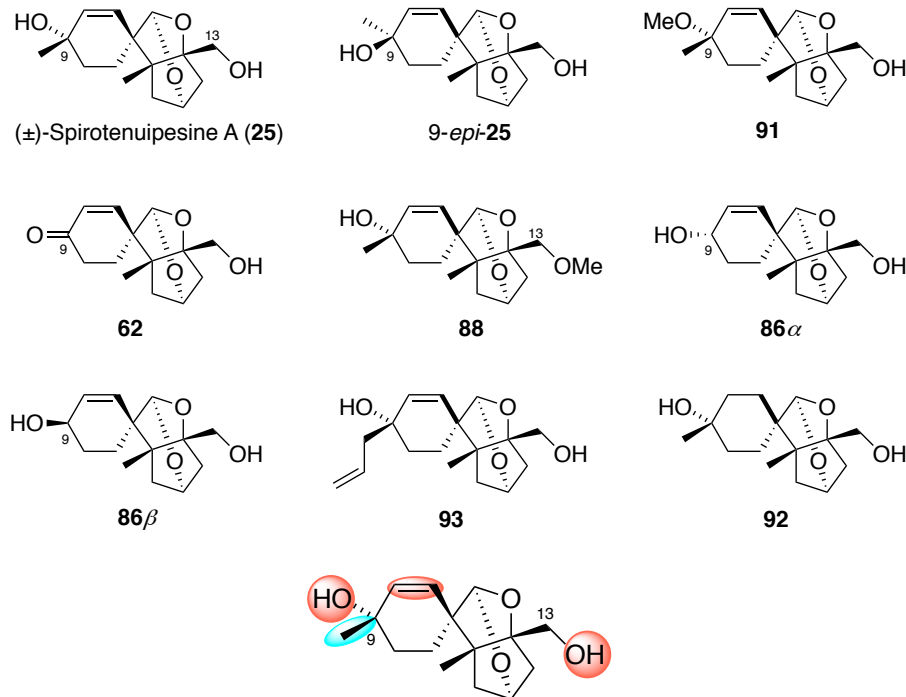


Fig. 24 (±)-スピロテヌイペシン A の PC12 細胞に対する直接作用

次に、スピロテヌイペシン A 誘導体の活性評価を行った。9-*epi*-**25** では活性が保持されていたが、9 位アルコールをメチル化した **91** とエノン **62** は活性を示さなかった。また、13 位アルコールをメチル化した **88** も活性を示さなかった。一方、9 位メチル基のないアリルアルコール **86 α , β** および 9 位メチル基をアリル基に置き換えた **93** では活性が保持されていた。さらに、二重結合を還元した **92** は活性を示さなかった。これらの結果から、9, 13 位のアルコールと二重結合は活性発現に必須であることが確認された。また、9 位メチル基は活性発現に必須ではないことから、**93** の 9 位アリル基の変換による、作用機序探索に向けた分子プローブの合成が期待できる (Fig. 25)。



Neurite outgrowth of PC 12 cells by a conditioned culture medium with 1321NI cells. The neurotrophic factor secretion-promoting activity of samples from glial cells (1321NI) was evaluated by the observation of neurotrophic factor-induced morphological changes in PC12 cells. Data are expressed as the mean \pm SE for three wells. **P < 0.01 versus control (0.1% DMSO); Dunnett's *t*-test.

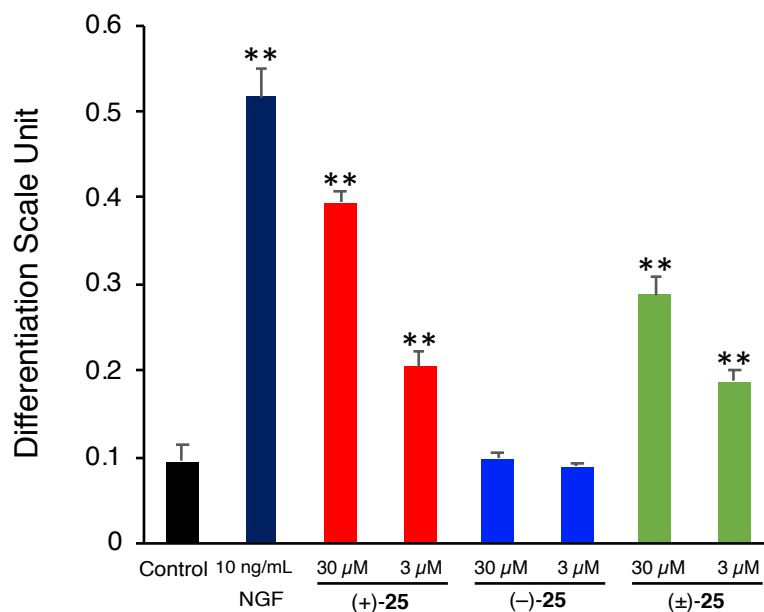


Hydroxy group and double bond are essential

Methyl group is not essential

Fig. 25 スピロテヌイペシン A の構造活性相関

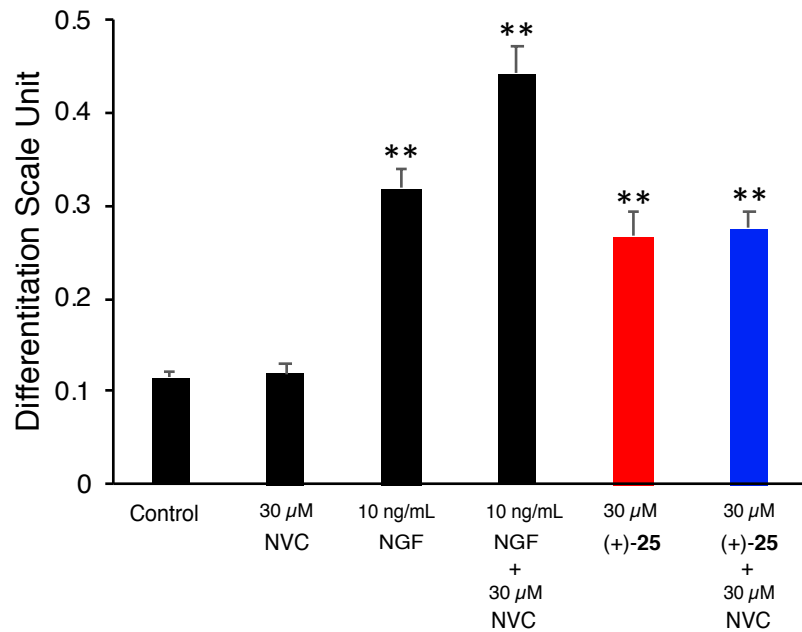
続いて、スピロテヌイペシン A (25) の光学活性体を用いた活性評価を行った。コントロールと比較して、(+)-25 および(±)-25 では活性が確認されたが、(-)-25 では活性が確認できなかった。この結果から、25 は天然物と同じ立体化学を有する(+)-25 のみが活性を示し、(-)-25 には活性がないことが明らかとなった (Fig. 26)。



Neurite outgrowth of PC 12 cells by a conditioned culture medium with 1321NI cells. The neurotrophic factor secretion-promoting activity of samples from glial cells (1321NI) was evaluated by the observation of neurotrophic factor-induced morphological changes in PC12 cells. Data are expressed as the mean \pm SE for six wells. **P < 0.01 versus control (0.1% DMSO); Dunnett's *t*-test.

Fig. 26 スピロテヌイペシン A 光学活性体の活性評価

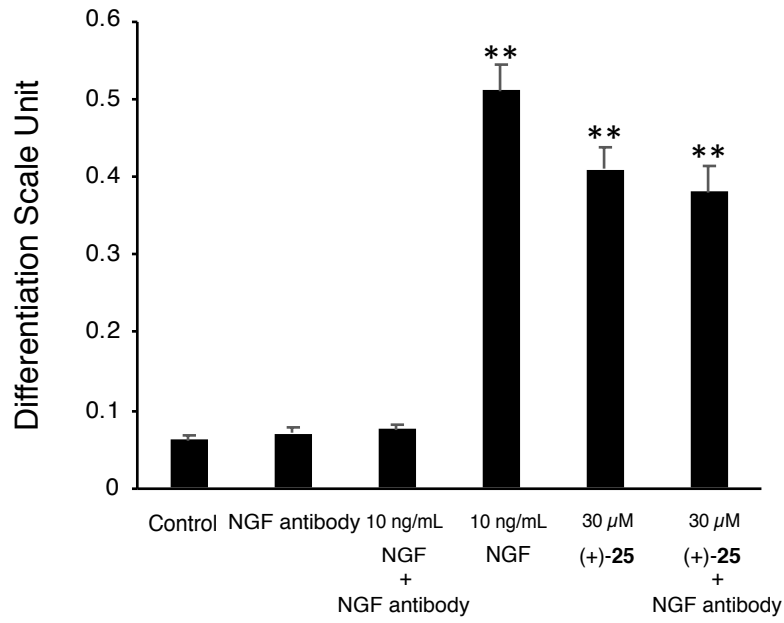
次に、スピロテヌイペシン A で処理したグリア細胞培養培地に NVC (**18**) を添加して活性への影響を確認した。その結果、NVC (**18**) の添加の有無による活性の差は確認されなかった。NVC (**18**) は NGF 刺激を受けた PC12 細胞に対して突起伸展促進活性を示すことから、この結果は、スピロテヌイペシン A (**25**) はグリア細胞から、NGF とは異なる神経栄養因子の産生を促進していることを示唆する (Fig. 27)。



Neurite outgrowth of PC 12 cells by a conditioned culture medium with 1321NI cells. The neurotrophic factor secretion-promoting activity of samples from glial cells (1321NI) was evaluated by the observation of neurotrophic factor-induced morphological changes in PC12 cells. Data are expressed as the mean \pm SE for three wells. **P < 0.01 versus control (0.1% DMSO); Dunnett's *t*-test.

Fig. 27 NVC とスピロテヌイペシン A の組み合わせによる活性への影響

そこで、次に抗 NGF 抗体を用いた中和実験⁵⁹⁾を行った。NGF に対して抗 NGF 抗体処理を施したものでは PC12 細胞の形態変化がほとんど確認されなかった。このことから、抗 NGF 抗体が本アッセイ条件下、機能していることが確認できる。しかし、(+)-スピロテヌイペシン A (**25**) を添加した系では、抗体処理による活性への影響は殆ど確認されなかった。したがって、この結果からも **25** はグリア細胞から、NGF とは異なる神経栄養因子の産生を促進していることが証明された (Fig. 28)。なお、グリア細胞から産生される神経栄養因子のうち、GDNF については 100 ng/mL の濃度で、PC12 細胞の形態変化を起こさないことを確認している。したがって、**25** によって産生が促進される神経栄養因子は GDNF では無いと考えられる。



Neurite outgrowth of PC 12 cells by a conditioned culture medium with 1321NI cells. The neurotrophic factor secretion-promoting activity of samples from glial cells (1321NI) was evaluated by the observation of neurotrophic factor-induced morphological changes in PC12 cells. Data are expressed as the mean \pm SE for three wells. **P < 0.01 versus control (0.1% DMSO); Dunnett's *t*-test.

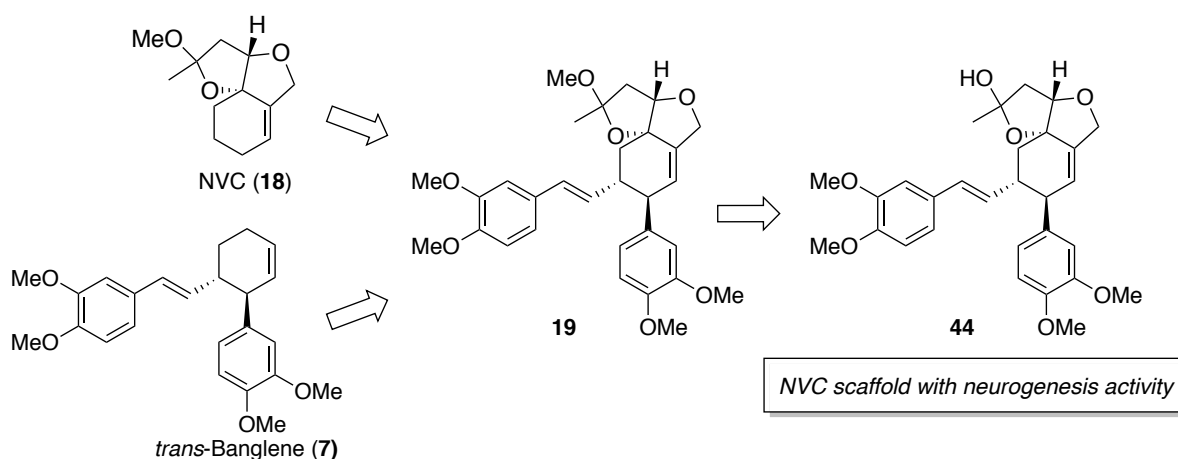
Fig. 28 NGF 抗体によるスピロテヌイペシン A 活性への影響

総括

本論文において著者は、神経栄養因子様の生物活性を示す化合物に着目し、それらの合成および生物活性評価、作用機序探索に取り組んだ。

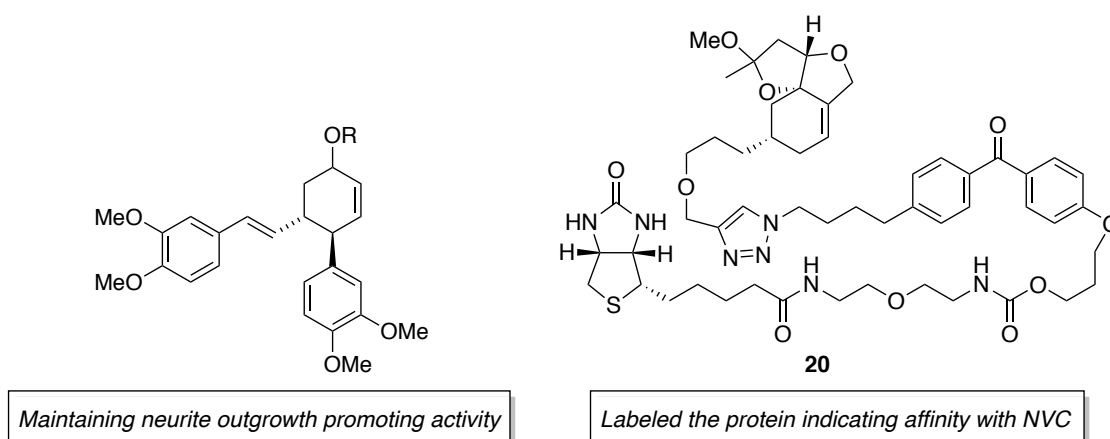
第一章では、異なる生物活性を示す NVC (**18**) と *trans*-バングレン (**7**) の構造を重ね合わせることによって得られるハイブリッド化合物の合成と生物活性評価を行った。その結果、*trans*-バングレン由来の分化誘導活性が付与された NVC 骨格を持つハイブリッド化合物 **44** の開発に成功した。

第一章 NVC-バングレンハイブリッド化合物の合成とその生物活性評価



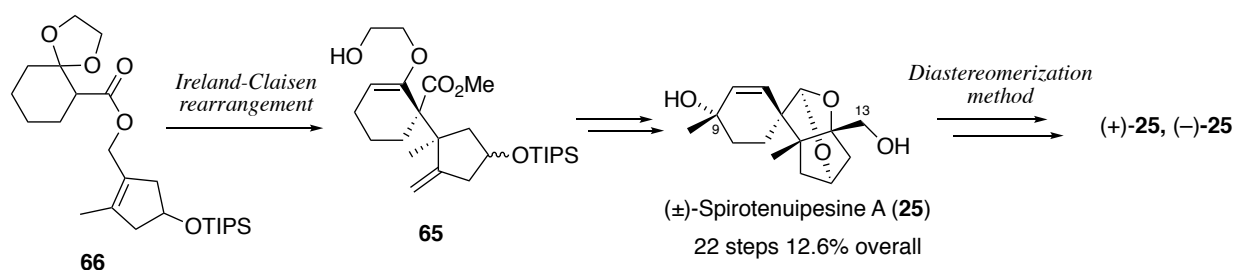
第二章では、NVC (**18**) と *trans*-バングレン (**7**) の作用機序探索に向けた研究に取り組み、アリル位に置換基を導入した *trans*-バングレン誘導体が突起進展活性を保持していることを明らかにした。また、NVC (**18**) に光親和性標識基を導入した分子プローブ **20** を用いて、NVC (**18**) に親和性を示すタンパク質の検出に成功した。

第二章 NVC および *trans*-バングレンの作用機序解明に向けた研究



第三章では、神経栄養因子産生促進活性を示すスピロテヌイペシン A (**25**) のラセミ合成とジアステレオマー法による両光学異性体の調製を達成した。さらに、誘導体合成にも取り組み、合成したサンプルの生物活性評価を行うことで、スピロテヌイペシン A (**25**) の活性発現には、(+)-体の立体化学と 9, 13 位のアルコール、二重結合が必要であり、9 位メチル基が必要無いことを見出した。また、NGF の作用を増強する活性をもつ NVC (**18**) を共存させた実験及び抗 NGF 抗体を利用した中和実験の結果から、スピロテヌイペシン A (**25**) はグリア細胞から NGF とは異なる神経栄養因子の産生を促進していることを明らかにした。

第三章 スピロテヌイペシン A の全合成とその生物活性評価



発表論文

- 1) Yanagimoto, T.; Kishimoto, S.; Kasai, Y.; Matsui, N.; Kubo, M.; Yamamoto, H.; Fukuyama, Y.; Imagawa, H. Design and Synthesis of Dual Active Neovibsanin Derivatives Based on a Chemical Structure Merging Method. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2020**, *30*, 127497.
- 2) Yanagimoto, T.; Yamada, S.; Kasai, Y.; Yamamoto, H.; Kubo, M.; Fukuyama, Y.; Imagawa, H. Total Synthesis of (±)-Spirotenuipesine A, a Promoter of Neurotrophic Factor Secretion from Glial Cells. *Tetrahedron Lett.*, **2020**, *64*, 152723.

実験の部

合成用試薬, 溶媒, 実験操作について

特に断りのない限り, 反応はアルゴン雰囲気下で行い, 試薬は市販のものをそのまま使用した. 反応溶媒には特級溶媒もしくは関東化学株式会社製脱水溶媒, 脱水・脱酸素溶媒を使用した. 溶媒の留去は減圧下, ロータリーエバポレーターで行った. 分析用薄層クロマトグラフィー(TLC)は Merck Kieselgel 60F 254 (0.25 mm)を使用した. スポットの検出には 250 nm 及び 356 nm の UV ランプの照射, 2% *p*-アニスアルデヒド-5% 濃硫酸エタノール溶液に浸した後, 加熱することで検出した. または, ヨウ素をまぶしたシリカゲルに浸すことで検出した. 順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーは関東化学順相シリカゲル 60 (球状, 63-210 μm)を用い, 逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーはナカライテスク社製 Cosmosil 140 C18-PREP または 75 C18-OPN を使用した. クロマトグラフィーに使用した溶媒比は v:v で示した. 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は日本分光社製 JASCO PU-987 型クロマトポンプ, JASCO PU-2080plus 型クロマトポンプを用いて, 検出器として日本分光社製 JASCO UV-970 型検出器, または JASCO UV-2075 型検出器を用いた.

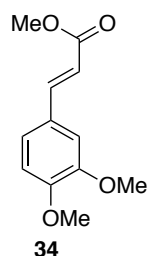
物性データについて

比旋光度($[\alpha]_D$)は, 日本分光JASCO P-1030型旋光計を用いて測定した. 赤外線吸収スペクトル(以下IRと略す)は日本分光JASCO FT-IR410型を用いて, 反射法で測定した. 核磁気共鳴スペクトル(NMRと称す)は, Varian社製 Gemini-200型, Unity-200型, Mercury-300型, MR-400型, Mercury-500型, Unity-600型, またはBruker社製 検出プローブにBBO cryoprobeを用いたAVANCE III HD 500 MHz spectrometer を用いて, テトラメチルシラン(TMS)を内部標準として測定した. また, 測定溶媒は重クロロホルム(CDCl_3), 重ベンゼン(C_6D_6), 重DMSO($\text{C}_2\text{D}_6\text{SO}$), 重メタノール(CD_3OD), 重ピリジン ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)を用いた. 化学シフト(δ)をppm単位で表記し, 結合定数(J)をHz単位で測定した. シグナルは,

一重線をs, 二重線をd, 三重線をt, 四重線をq, 五重線をquin., 多重線をmで示した. また幅広信号はbrとした. 質量分析スペクトル(以下MSと略す)は, 日本電子社製 AX-500型を用いて, 化学イオン化法(以下CIと略す), 又は高速原子イオン化法(以下FABと略す)とWaters社製 SYNAPT G2-Si HDMS を用いて, エレクトロスプレーイオン化法(以下ESIと略す)で測定した. なお, 質量分析スペクトルとNMR Unity-600 の測定は徳島文理大学中央機器センターに依頼した.

第一章

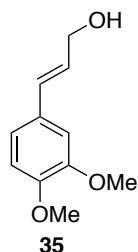
Methyl (*E*)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)acrylate (**34**)



3,4-ジメトキシシンナム酸 (10.021 g, 48.13 mmol)のメタノール (96 mL)溶液に *p*-トルエンスルホン酸一水和物 (904 mg, 4.75 mmol)を加え, 17.5 時間攪拌しながら加熱還流した. 室温まで放冷後, 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え, エバポレーターでメタノールを留去した. 酢酸エチルで抽出し, 得られた有機層を蒸留水, 飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣 **34** (10.948 g, quant.)を精製することなく次の反応に使用した.

34: white solid; FT IR (neat) 3001, 2950, 2839, 1714, 1633, 1600, 1519, 1464, 1455 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz in CDCl_3) δ 3.80 (3H, s), 3.91 (6H, s, OMe \times 2), 6.31 (1H, d, $J = 15.9$ Hz), 6.86 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.04 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 7.10 (1H, d, $J = 8.1, 1.8$ Hz), 7.63 (1H, d, $J = 15.9$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz in CDCl_3) δ 51.52, 55.75, 55.84, 109.41, 110.86, 115.32, 122.51, 127.20, 144.68, 149.04, 150.98, 167.57 ; MS (Cl^+) m/z 222 [M] $^+$; HRMS (Cl^+) m/z calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$: 222.0892, found 222.0895.

(*E*)-3-(3,4-Dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-ol (**35**)

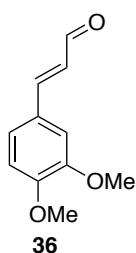


34 (10.908 g, 49.08 mmol)の THF (97 mL)溶液を -78 $^{\circ}\text{C}$ に冷却したのち, 水素化ジイソプロピルアルミニウム (1M トルエン溶液 100 mL, 100 mmol)を加え, そのままの温度で 1 時間攪拌した. 30%ロッシェル塩水溶液を加えた後, 反応溶液が無色透明になるまで

室温で終夜攪拌した。エバポレーターで有機溶媒を留去したのち、蒸留水を加え、酢酸エチルで抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣 **35** (9.653 g, quant.)を精製することなく次の反応に使用した。

35: white solid; FT IR (neat) 3389, 3002, 2936, 2837, 1603, 1584, 1517 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz in CDCl_3) δ 2.19 (1H, br), 3.84 (3H, s), 3.85 (3H, s), 4.27 (2H, dd, $J = 5.7, 1.2$ Hz), 6.22 (1H, dt, $J = 15.9, 6.0$ Hz), 6.50 (1H, d, $J = 15.9$ Hz), 6.77 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 6.88 (1H, dd, $J = 8.1, 2.1$ Hz), 6.90 (1H, d, $J = 1.8$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz in CDCl_3) δ 55.63, 55.73, 63.52, 108.63, 110.90, 119.50, 126.45, 129.60, 130.79, 148.65, 148.79; MS (CI^+) m/z 194 [M] $^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$: 194.0943, found 194.0945.

(*E*)-3-(3,4-Dimethoxyphenyl)acrylaldehyde (**36**)

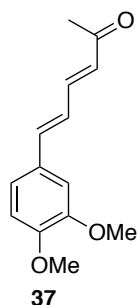


35 (9.363 g, 48.20 mmol)のアセトニトリル (160 mL)溶液に TEMPO (377 mg, 2.41 mmol), 臭化銅(II) (543 mg, 2.43 mmol), 2,2'-ビピリジル (375 mg, 2.40 mmol), *t*-BuOK (273 mg, 2.44 mmol)を加え、空気雰囲気下、室温で 13.5 時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。得られた有機層を蒸留水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 4:1 から 1:1)で精製して **36** (9.030 g, 97%)を得た。

36: yellow solid; FT IR (neat) 3004, 2937, 2838, 2744, 1681, 1621, 1601, 1519 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz in CDCl_3) δ 3.92 (3H, s), 3.93 (3H, s), 6.61 (1H, dd, $J = 15.9, 7.8$ Hz), 6.90 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.07 (1H, d, $J = 1.5$ Hz), 7.16 (1H, dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz), 7.41 (1H, d, $J = 15.9$ Hz), 9.65 (1H, d, $J = 7.8$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz in CDCl_3) δ 55.89, 56.00, 109.77, 111.05, 123.39,

126.65, 126.98, 149.30, 151.91, 152.78, 193.49; MS (CI⁺) *m/z* 192 [M]⁺; HRMS (CI⁺) *m/z* calcd for C₁₁H₁₂O₃: 192.0786, found 192.0787.

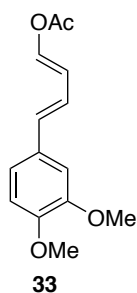
(3E,5E)-6-(3,4-Dimethoxyphenyl)hexa-3,5-dien-2-one (37)



36 (12.814 g, 66.66 mmol)のアセトン (67mL)溶液に 10%水酸化ナトリウム水溶液 (5.3 mL, 13.25 mmol)を加え、室温で6時間攪拌した。1M 塩酸を加えて中和した後、酢酸エチルで抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 4:1 から 1:1)で精製して、**37** (12.518 g, 81%)を得た。

37: yellow solid; FT IR (neat) 2997, 2937, 2838, 1747, 1647, 1616, 1597, 1580, 1518 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz in CDCl₃) δ 2.30 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.91 (3H, s), 6.21 (1H, d, *J* = 15.6 Hz), 6.74 (1H, dd, *J* = 15.3, 10.5 Hz), 6.82-6.91 (2H, m), 7.01 (2H, m), 7.27 (1H, dd, *J* = 15.3, 10.5 Hz); ¹³C NMR (75 MHz in CDCl₃) δ 27.29, 55.85, 55.91, 108.99, 111.07, 121.36, 124.66, 129.01, 129.48, 141.22, 143.78, 149.15, 150.24, 198.35; MS (CI⁺) *m/z* 232 [M]⁺; HRMS (CI⁺) *m/z* calcd for C₁₄H₁₆O₃: 232.1099, found 232.1098.

(1E,3E)-4-(3,4-Dimethoxyphenyl)buta-1,3-dien-1-yl acetate (33)

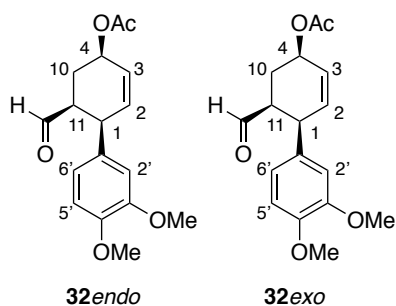


37 (1.617 g, 6.96 mmol)の DMF (7.0 mL)溶液に Oxone[®] (5.133 g, 8.35 mmol)を加え、室温で

3 時間攪拌した。セライトパッドで濾過後、蒸留水を加え、酢酸エチルで抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン:酢酸エチル 6:1）で精製して、**33** (1.389 g, 80%)を得た。

33: yellow solid; FT IR (neat) 3080, 2996, 2937, 2840, 1741, 1646, 1616, 1596, 1579, 1518 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz in CDCl_3) δ 2.17 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.91 (3H, s), 6.18 (1H, dd, $J = 12.3, 10.2$ Hz), 6.47 (1H, d, $J = 15.9$ Hz), 6.58 (1H, dd, $J = 15.9, 10.2$ Hz), 6.81 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 6.90-6.93 (2H, m), 7.50 (1H, d, $J = 12.3$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz in CDCl_3) δ 20.70, 55.76, 55.88, 108.31, 111.09, 115.93, 119.43, 121.74, 130.24, 132.00, 138.03, 148.76, 149.00, 167.76; MS (Cl^+) m/z 248 [M] $^+$; HRMS (Cl^+) m/z calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_4$:248.1049, found 248.1058.

(1R*,2S*,4R*)-2-Formyl-3',4'-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-4-yl acetate (32endo) and **(1R*,2R*,4R*)-2-Formyl-3',4'-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-4-yl acetate (32exo)**



The numbering of positions is according to the skeleton of natural neovibsanins

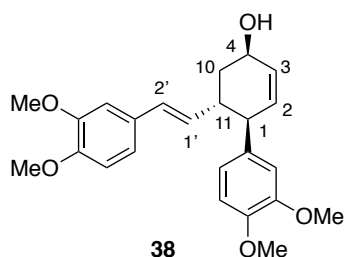
33 (13.05 g, 52.56 mmol)のアクロレイン (25 mL)溶液にヒドロキノン (580 mg, 5.267 mmol)を加え、加熱還流して 48 時間攪拌した。アクロレインを留去したのち、蒸留水を加え、酢酸エチルで抽出した。得られた有機層を蒸留水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン:酢酸エチル 5:1 から 3:1）で精製して、**32** (12.676 g, 79%)を得た。得られた **32** (12.67 g, 41.63 mmol)のトルエン (416 mL)溶液にイミダゾール (2.83 g, 41.57 mmol)を加え、室温で 48 時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウム

で乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル 6：1 から 4：1) で精製して、**32_{exo}** (9.143 g, 72%), **32_{endo}** (1.161g, 9%)を得た。

32_{endo}: yellow oil; FT IR (neat) 2938, 2836, 2721, 1730, 1590, 1514 cm^{-1} ; ^1H NMR (600 MHz in CDCl_3) δ 1.90 (1H, ddd, $J = 13.3, 11.8, 8.8$ Hz, H-10 β), 2.10 (3H, s, OCOMe), 2.27 (1H, ddd, $J = 13.3, 6.2, 3.2$ Hz, H-10 α), 2.89 (1H, m, H-11), 3.85 (3H, s, OMe), 3.86 (3H, s, OMe), 3.96 (1H, m, H-1), 5.44 (1H, m, H-4), 5.94 (1H, m, H-1), 5.98 (1H, ddd, $J = 10.0, 4.1, 1.5$ Hz, H-2), 6.74 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 6.79 (1H, dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, H-6'), 6.82 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 9.51 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, CHO); ^{13}C NMR (150 MHz in CDCl_3) δ 21.17 (OCOMe), 24.58 (C-10), 40.75 (C-1), 48.90 (C-11), 55.84 (OMe), 55.87 (OMe), 68.37 (C-4), 111.19 (C-Ar), 112.54 (C-Ar), 121.35 (C-Ar), 128.17 (C-3), 130.60 (C-Ar), 131.62 (C-2), 148.44 (C-Ar), 148.93 (C-Ar), 170.48 (OCOMe), 202.20 (CHO); MS (CI^+) m/z 304 [M] $^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_5$: 304.1311, found 304.1306.

32_{exo}: yellow oil; FT IR (neat) 3001, 2938, 2836, 2724, 1734, 1591, 1517 cm^{-1} ; ^1H NMR (600 MHz in CDCl_3) δ 1.87 (1H, ddd, $J = 14.3, 11.7, 4.4$ Hz, H-10 α), 2.11 (3H, s, OCOMe), 2.15 (1H, ddt, $J = 14.3, 3.3, 1.0$ Hz, H-10 β), 2.87 (1H, m, H-11), 3.63 (1H, m, H-1), 3.87 (3H, s, OMe), 3.88 (3H, s, OMe), 5.36 (1H, m, H-4), 5.93 (1H, dd, $J = 9.9, 2.3$ Hz, H-2), 5.96 (1H, m, H-3), 6.75 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 6.79 (1H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, H-6'), 6.83 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 9.68 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, CHO); ^{13}C NMR (150 MHz in CDCl_3) δ 21.26 (OCOMe), 27.51 (C-10), 41.80 (C-1), 50.18 (C-11), 55.90 (OMe), 55.93 (OMe), 65.03 (C-4), 111.38 (C-Ar), 111.43 (C-Ar), 120.28 (C-Ar), 124.84 (C-3), 134.46 (C-Ar), 135.45 (C-2), 148.16 (C-Ar), 149.14 (C-Ar), 170.39 (OCOMe), 202.87 (CHO); MS (CI^+) m/z 304 [M] $^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_5$: 304.1311, found 304.1304.

(1R*,2S*,4R*)-2-((E)-3,4-Dimethoxystyryl)-3',4'-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-4-ol (38)

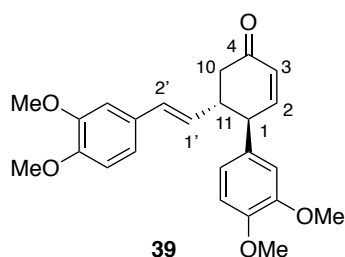


The numbering of positions is according to the skeleton of natural neovibsanins

Dimethyl (3,4-dimethoxybenzyl)phosphonate⁰⁰ (9.200 g, 35.35 mmol)の THF (100 mL)溶液を -78°C に冷却後, *n*-ブチルリチウム (1.6 M ヘキサン溶液 20.6 mL, 32.96 mmol)を加え, そのままの温度で10分攪拌した. **32***exo* (7.150 g, 23.49 mmol)の THF (20 mL)溶液を加え, 0°C に昇温して13時間攪拌した. メタノールを加え, 室温で3時間攪拌後, 飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた. 酢酸エチルで抽出後, 得られた有機層を飽和食塩水で洗浄し, 無水硫酸ナトリウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 3:1 から 1:1)で精製して, **38** (5.650 g, 61%)を得た.

38: pale yellow solid; FT IR (neat) 3491, 2935, 2835, 1588, 1514 cm^{-1} ; ^1H NMR (600 MHz in CDCl_3) δ 1.69 (1H, brs, OH), 1.87 (1H, ddd, $J = 11.8, 9.5, 4.3$ Hz, H-10 α), 2.05 (1H, m, H-10 β), 2.63, (1H, m, H-11), 3.11 (1H, ddd, $J = 9.2, 3.9, 2.2$ Hz, H-1), 3.82 (3H, s, OMe), 3.850 (3H, s, OMe), 3.853 (3H, s, OMe), 3.87 (3H, s, OMe), 4.37 (1H, d, $J = 3.4$ Hz, H-4), 5.89 (1H, ddd, $J = 9.9, 2.2, 0.8$ Hz, H-2), 5.97 (1H, dd, $J = 15.9, 7.7$ Hz, H-1'), 6.01 (1H, m, H-3), 6.12 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-2'), 6.69 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, Ar-H), 6.73 (1H, dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, Ar-H), 6.76-6.79 (4H, m, Ar-H); ^{13}C NMR (150 MHz in CDCl_3) δ 36.82 (C-10), 40.23 (C-6), 48.45 (C-1), 55.79 (OMe), 55.83 (OMe), 55.86 (OMe), 55.90 (OMe), 63.68 (C-4), 108.71 (C-Ar), 110.95 (C-Ar), 111.13 (C-Ar), 111.62 (C-Ar), 118.82 (C-Ar), 120.41 (C-Ar), 128.40 (C-3), 129.53 (C-2'), 130.69 (C-Ar), 131.02 (C-1'), 134.69 (C-2), 136.08 (C-Ar), 147.56 (C-Ar), 148.36 (C-Ar), 148.68 (C-Ar), 148.91 (C-Ar); MS (CI⁺) m/z 396 [M]⁺; HRMS (CI⁺) m/z calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_5$:396.1937, found 396.1933.

(1*R,2*S**)-2-((*E*)-3,4-Dimethoxystyryl)-3',4'-dimethoxy-2,3-dihydro-[1,1'-biphenyl]-4(1*H*)-one (39)**

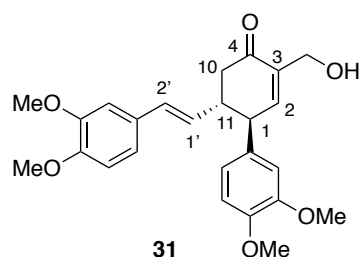


The numbering of positions is according to the skeleton of natural neovibsanins

38 (1.771 g, 4.467 mmol)のジクロロメタン (22 mL)溶液に TEMPO (68.8 mg, 0.440 mmol), ビスアセトキシヨードベンゼン (1.580 g, 4.905 mmol)を室温に加え, そのままの温度で 4 時間攪拌後, さらにビスアセトキシヨードベンゼン (572 mg, 1.776mmol)を加え, 2.5 時間攪拌した. 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液/飽和チオ硫酸ナトリウム(1:1)水溶液を加えた後, ジクロロメタンで抽出し, 無水硫酸ナトリウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 4:1 から 1:1)で精製して, **39** (1.667 g, 95%)を得た.

39: colorless oil; FT IR (neat) 2935, 2835, 1676, 1589, 1515 cm^{-1} ; ^1H NMR (600 MHz in CDCl_3) δ 2.57 (1H, dd, $J = 16.2$ Hz, H-10 α), 2.72 (1H, dd, $J = 16.2$ Hz, H-10 β), 2.94 (1H, m, H-11), 3.51 (1H, dt, $J = 9.2, 2.6$ Hz, H-1), 3.84 (3H, s, OMe), 3.86 (3H, s, OMe), 3.867 (3H, s, OMe), 3.868 (3H, s, OMe), 5.95 (1H, dd, $J = 15.6, 7.4$ Hz, H-1'), 6.11 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-2'), 6.19 (1H, dd, $J = 10.2, 2.6$ Hz, H-3), 6.67 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, Ar-H), 6.73 (1H, dd, $J = 7.8, 2.1$ Hz, Ar-H), 6.78 (3H, m, Ar-H), 6.83 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, Ar-H), 6.93 (1H, dd, $J = 10.2, 2.6$ Hz, H-2); ^{13}C NMR (150 MHz in CDCl_3) δ 42.90 (C-10), 46.60 (C-11), 48.76 (C-1), 55.81 (OMe), 55.86 (OMe), 55.89 (OMe, overlap with another OMe peak), 108.81 (C-Ar), 111.11 (C-Ar), 111.20 (C-Ar), 111.39 (C-Ar), 119.08 (C-Ar), 120.46 (C-Ar), 128.44 (C-1'), 129.36 (C-3), 129.93 (C-Ar), 130.59 (C-2'), 133.84 (C-Ar), 148.13 (C-Ar), 148.71 (C-Ar), 148.95 (C-Ar), 149.02 (C-Ar), 152.62 (C-2), 198.92 (C-4); MS (CI^+) m/z 394 [M] $^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_5$:394.1780, found 394.1784.

(1*S,2*S**)-2-((*E*)-3,4-Dimethoxystyryl)-5-(hydroxymethyl)-3',4'-dimethoxy-2,3-dihydro-[1,1'-biphenyl]-4(1*H*)-one (31)**

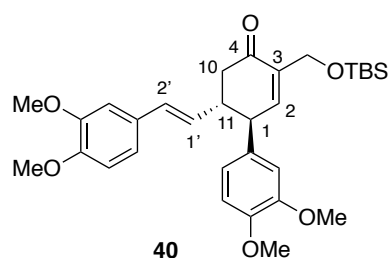


The numbering of positions is according to the skeleton of natural neovibsanins

39 (3.861 g, 9.788 mmol)の THF/飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (1:1, 32mL)溶液を 0 °C に冷却後, 37%ホルマリン水溶液 (6.36 mL, 78.36 mmol), DMAP (1.196 g, 9.790 mmol)を加え, そのままの温度で 7 時間攪拌した. 飽和塩化アンモニウム水溶液を加え, 酢酸エチルで抽出した. 得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 2:1 から 1:2)で精製して, **31** (3.043 g, 73%)を得た.

31: colorless oil; FT IR (neat) 3501, 2935, 2835, 1668, 1590, 1513 cm⁻¹; ¹H NMR (600 MHz in CDCl₃) δ 2.60 (2H, m, H-10_α, OH), 2.75 (1H, dd, *J* = 16.2, 4.0 Hz, H-10_β), 2.96 (1H, m, H-11), 3.54 (1H, dd, *J* = 9.6, 2.1 Hz, H-1) 3.83 (3H, s, OMe), 3.85 (3H, s, OMe), 3.862 (3H, s, OMe), 3.864 (3H, s, OMe), 4.36 (2H, brs, CH₂OH), 5.92 (1H, dd, *J* = 15.8, 7.3 Hz, H-1'), 6.11 (1H, d, *J* = 15.8 Hz, H-2'), 6.67 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, Ar-H), 6.73 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, Ar-H), 6.77 (3H, m, Ar-H), 6.82 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, Ar-H), 6.87 (1H, m, H-2); ¹³C NMR (150 MHz in CDCl₃) δ 43.26 (C-10), 46.43 (C-11), 48.81 (C-1), 55.80 (OMe), 55.85 (OMe), 55.87 (OMe), 55.93 (OMe), 61.70 (CH₂OH), 108.80 (C-Ar), 111.10 (C-Ar), 111.23 (C-Ar), 111.48 (C-Ar), 119.08 (C-Ar), 120.41 (C-Ar), 128.18 (C-1'), 129.85 (C-Ar), 130.68 (C-2'), 133.86 (C-Ar), 137.74 (C-3), 148.15 (C-2), 148.72 (C-Ar), 148.93 (C-Ar), 148.99 (C-Ar), 149.01 (C-Ar), 199.72 (C-4); MS (CI⁺) *m/z* 424 [M]⁺; HRMS (CI⁺) *m/z* calcd for C₂₅H₂₈O₆: 424.1886, found 424.1884.

(1*S,2*S**)-5-(((*Tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-2-((*E*)-3,4-dimethoxystyryl)-3',4'-dimethoxy-2,3-dihydro-[1,1'-biphenyl]-4(1*H*)-one (40)**

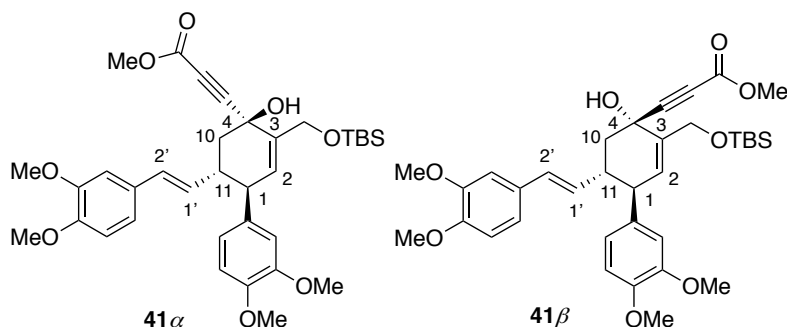


The numbering of positions is according to the skeleton of natural neovibsanins

31 (2.864 g, 6.747 mmol)のジクロロメタン (22 mL)溶液を 0 °C に冷却後、イミダゾール (1.321 g, 8.765 mmol), *t*-ブチルジメチルシリルクロリド (1.321 g, 8.765 mmol)を加え、そのままの温度で 10 分攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた後、ジクロロメタンで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 5:1 から 3:1)で精製して、**40** (3.354 g, 92%)を得た。

40: colorless oil; FT IR (neat) 2998, 2952, 2931, 2855, 1737, 1672, 1590, 1517 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz in CDCl₃) δ 0.08 (6H, s, *t*-BuSiMe₂), 0.88 (9H, s, *t*-BuSiMe₂), 2.57 (1H, dd, *J* = 15.9, 12.8 Hz, H-10α), 2.70 (1H, dd, *J* = 16.2, 3.5 Hz, H-10β), 2.89 (1H, m, H-11), 3.54 (1H, d, *J* = 8.9 Hz, H-1), 3.82 (3H, s, OMe), 3.85 (3H, s, OMe), 3.86 (6H, s, OMe × 2), 4.46 (2H, m, CH₂OTBS), 5.94 (1H, dd, *J* = 15.9, 7.3 Hz, H-1'), 6.08 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-2'), 6.66 (1H, s, Ar-H), 6.72 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, Ar-H), 6.75-6.79 (3H, m, Ar-H), 6.81 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, Ar-H), 6.94 (1H, s, H-2); ¹³C NMR (125 MHz in CDCl₃) δ -5.38 (*t*-BuSiMe₂), 18.32 (Me₃CSiMe₂), 25.87 (Me₃CSiMe₂), 43.24 (C-10), 46.91 (C-11), 48.64 (C-1), 55.76 (OMe), 55.78 (OMe), 55.79 (OMe), 55.85 (OMe), 59.82 (CH₂OTBS), 108.57 (C-Ar), 110.88 (C-Ar), 110.93 (C-Ar), 111.15 (C-Ar), 119.02 (C-Ar), 120.50 (C-Ar), 128.58 (C-1'), 129.91 (C-Ar), 130.43 (C-2'), 134.47 (C-Ar), 138.20 (C-3), 146.33 (C-2), 147.84 (C-Ar), 148.54 (C-Ar), 148.81 (C-Ar), 148.82 (C-Ar), 198.40 (C-4); MS (CI⁺) *m/z* 538 [M]⁺; HRMS (CI⁺) *m/z* calcd for C₃₁H₄₂O₆Si: 538.2751, found 538.2751.

Methyl 3-((1*S,2*S**,4*S**)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-2-((*E*)-3,4-dimethoxystyryl)-4-hydroxy-3',4'-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)propionate (41 α) and Methyl 3-((1*S**,2*S**,4*R**)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-2-((*E*)-3,4-dimethoxystyryl)-4-hydroxy-3',4'-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)propionate (41 β)**



The numbering of positions is according to the skeleton of natural neovibsanins

ジイソプロピルアミン (2.60 mL, 18.5 mmol)の THF (50mL)溶液に $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ で *n*-ブチルリチウム (1.6 M ヘキサン溶液 11.5 mL, 18.4 mmol)を加え、 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ に昇温して30分攪拌した。再度、 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ に冷却後、プロピオン酸メチル (1.53 mL, 18.4 mmol)を加え、そのままの温度で20分攪拌した後、**40** (3.308 g, 6.14 mmol)の THF (10 mL)溶液を加えてそのままの温度で1時間攪拌する。飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 3:1 から 1:1)で精製して **41** (3.620 g)を得た。さらに高速液体クロマトグラフィーで精製してジアステレオマー **41 α** (333 mg, 9%), **41 β** (3.177 g, 83%)を単離した。

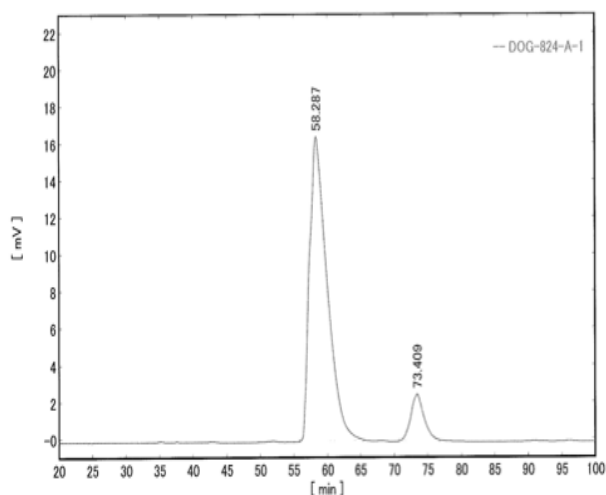
41 α : yellow oil; FT IR (neat) 3461, 3000, 2952, 2856, 2228, 1716, 1586, 1514 cm^{-1} ; ^1H NMR 500 MHz in CDCl_3) δ 0.13 (3H, s, *t*-BuSiMe₂), 0.15 (3H, s, *t*-BuSiMe₂), 0.93 (9H, s, *t*-BuSiMe₂), 2.09 (1H, t, *J* = 12.8 Hz, H-10 α), 2.48 (1H, dd, *J* = 12.7, 2.3 Hz, H-10 β), 2.68-2.74 (1H, m, H-11), 3.22 (1H, d, *J* = 9.8 Hz, H-1), 3.79 (3H, s, OMe), 3.81 (3H, s, OMe), 3.85 (6H, s, OMe \times 2), 3.86 (3H, s, OMe), 4.30 (1H, d, *J* = 12.4 Hz, CH₂OTBS), 4.76 (1H, d, *J* = 12.3 Hz, CH₂OTBS), 5.24 (1H, s, OH), 5.71 (1H, s, H-2), 5.94 (1H, dd, *J* = 15.9, 7.3 Hz, H-1'), 6.12 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-2'), 6.63 (1H, s, H-Ar), 6.66 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-Ar), 6.75-6.78 (4H, m, H-Ar), ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ -5.56 (*t*-BuSiMe₂), -5.46 (*t*-BuSiMe₂), 18.15

(Me₃CSiMe₂), 25.77 (Me₃CSiMe₂), 43.24 (C-11), 43.44 (C-10), 48.81 (C-1), 52.70 (OMe), 55.78 (OMe), 55.79 (OMe), 55.85 (OMe), 55.89 (OMe), 66.35 (CH₂OTBS), 69.13 (C-4), 75.75 (alkyne), 90.11 (alkyne), 108.76 (C-Ar), 111.02 (C-Ar), 111.10 (C-Ar), 111.44 (C-Ar), 118.92 (C-Ar), 120.37 (C-Ar), 129.06 (C-1'), 130.11 (C-2'), 130.39 (C-Ar), 131.63 (C-2), 135.41 (C-Ar), 135.77 (C-3), 147.78 (C-Ar), 148.48 (C-Ar), 148.83 (C-Ar), 148.90 (C-Ar), 153.95 (COOMe); MS (CI⁺) *m/z* 622 [M]⁺; HRMS (CI⁺) *m/z* calcd for C₃₅H₄₆O₈Si: 622.2962, found 622.2956.

41β: yellow oil; FT IR (neat) 3468, 3001, 2952, 2856, 2228, 1714, 1586, 1516 cm⁻¹; ¹H NMR 600 MHz in CDCl₃) δ 0.13 (3H, s, *t*-BuSiMe₂), 0.16 (3H, s, *t*-BuSiMe₂) 0.93 (9H, s, *t*-BuSiMe₂), 2.09 (1H, t, *J* = 12.8 Hz, H-10α), 2.48 (1H, dd, *J* = 12.6, 2.7 Hz, H-10β) 2.69-2.74 (1H, m, H-11), 3.23 (1H, d, *J* = 9.9 Hz, H-1) 3.79 (3H, s, OMe), 3.82 (3H, s, OMe) 3.85 (6H, s, OMe × 2), 3.86 (3H, s, OMe), 4.30 (1H, d, *J* = 12.2 Hz, CH₂OTBS), 4.76 (1H, m, CH₂OTBS), 5.23 (1H, s, OH), 5.71 (1H, t, *J* = 1.1 Hz, H-2), 5.94 (1H, dd, *J* = 15.9, 7.4 Hz, H-1'), 6.12 (1H, d, *J* = 15.8 Hz, H-2'), 6.63 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-Ar), 6.67 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.9 Hz, H-Ar) 6.76-6.80 (4H, m, H-Ar); ¹³C NMR (150 MHz in CDCl₃) δ -5.56 (*t*-BuSiMe₂), -5.46 (*t*-BuSiMe₂), 18.15 (Me₃CSiMe₂), 25.77 (Me₃CSiMe₂), 43.24 (C-11), 43.46 (C-10), 48.81 (C-1), 52.67 (OMe), 55.78 (OMe), 55.80 (OMe), 55.86 (OMe), 55.89 (OMe), 66.31 (CH₂OTBS), 69.12 (C-4), 75.76 (alkyne) 90.12 (alkyne), 108.81 (C-Ar), 111.06 (C-Ar), 111.14 (C-Ar), 111.47 (C-Ar), 118.93 (C-Ar), 120.38 (C-Ar), 129.07 (C-1'), 130.12 (C-2'), 130.41 (C-Ar), 131.60 (C-2), 135.43 (C-Ar), 135.80 (C-3), 147.80 (C-Ar), 148.50 (C-Ar), 148.85 (C-Ar), 148.92 (C-Ar), 153.94 (COOMe); MS (CI⁺) *m/z* 622 [M]⁺; HRMS (CI⁺) *m/z* calcd for C₃₅H₄₆O₈Si: 622.2962, found 622.2965.

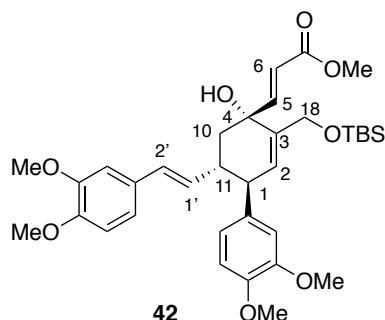
HPLC separation of **41α**, **β**

YMC-Pack SIL 4.6 × 250 mm, hexane ; EtOAc = 4:1, flow rate 4 mL/min, detected wavelength 254 nm; **41β**: *t_R* = 58.3 min, **41α**: *t_R* = 73.4 min.



PKNO	NAME	TIME	MARK	CONC	AREA	HEIGHT	NTP
1		58.29		89.898	2885403.21	18475.68	2133
2		73.41		10.102	335482.04	2509.93	7060
Total				100.000	3320885.25	18985.61	

Methyl (*E*)-3-((1*S,2*S**,4*R**)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-2-((*E*)-3,4-dimethoxystyryl)-4-hydroxy-3',4'-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)acrylate (**42**)**



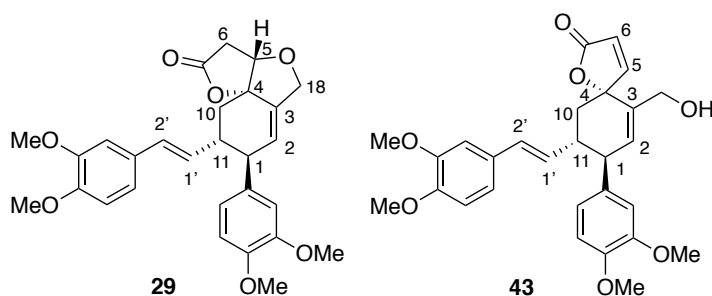
The numbering of positions is according to the skeleton of natural neovibsanins

41 β (224 mg, 0.358 mmol) の THF (3.6 mL) 溶液を $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ に冷却後, Red-Al® (3.215 M トルエン溶液 (0.34 mL, 1.09 mmol) を加え, そのままの温度で 1 時間攪拌した. 飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた後, 酢酸エチルで抽出し, 得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した. 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 4:1 から 1:1) で精製して, **42** (201 mg, 89%) を得た.

42: colorless oil; FT IR (neat) 3451, 2998, 2953, 2932, 2856, 1724, 1652, 1586, 1518 cm^{-1} ; ^1H ; NMR (600 MHz in CDCl_3) δ 0.096 (3H, s, *t*-BuSiMe₂) 0.097 (3H, s, *t*-BuSiMe₂), 0.91 (9H, s, *t*-BuSiMe₂) 2.09 (1H, dd, $J = 12.9, 12.6$ Hz, H-10 α), 2.13 (1H, dd, $J = 12.9, 3.4$ Hz, H-10 β),

2.50 (1H, m, H-11), 3.27 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-1), 3.78 (3H, s, OMe), 3.81 (3H, s, OMe), 3.85 (3H, s, OMe), 3.86 (3H, s, OMe \times 2), 4.14 (1H, d, $J = 11.9$ Hz, $\underline{\text{CH}}_2\text{OTBS}$), 4.44 (1H, ddd, $J = 11.9, 1.2, 0.7$ Hz, $\underline{\text{CH}}_2\text{OTBS}$), 4.81 (1H, s, OH), 5.81 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-2), 5.93 (1H, dd, $J = 15.6, 9.8$ Hz, H-1'), 6.06 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-2'), 6.21 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, $\text{COCH}=\underline{\text{CH}}$), 6.62 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-Ar), 6.67 (1H, dd, $J = 8.2, 2.4$ Hz, H-Ar), 6.77 (3H, m, H-Ar), 6.80 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-Ar), 7.18 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, $\text{CO}-\underline{\text{CH}}=\underline{\text{CH}}$) ; ^{13}C NMR (150 MHz in CDCl_3) δ -5.55 ($t\text{-BuSiMe}_2$), -5.44 ($t\text{-BuSiMe}_2$), 18.08 ($\text{Me}_3\text{CSiMe}_2$), 25.75 ($\text{Me}_3\text{CSiMe}_2$), 43.06 (C-10,11, overlap), 48.82 (C-1), 51.67 (OMe), 55.80 (OMe), 55.84 (OMe), 55.87 (OMe), 55.90 (OMe), 66.23 ($\underline{\text{CH}}_2\text{OTBS}$), 74.57 (C-4), 108.75 (C-Ar), 111.12 (C-Ar), 111.64 (C-Ar), 118.92 (C-Ar), 119.82 ($\text{COCH}=\underline{\text{CH}}$), 120.20 (C-Ar), 129.59 (C-1'), 130.03 (C-2'), 130.44 (C-Ar), 132.38 (C-2), 135.66 (C-Ar), 136.15 (C-3), 147.75 (C-Ar), 148.47 (C-Ar), 148.74 (C-Ar), 148.91 (C-Ar), 152.63 ($\text{COCH}=\underline{\text{CH}}$), 167.14 (COOMe); MS (CI^+) m/z 624 [M] $^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{48}\text{O}_8\text{Si}$: 624.3118, found 624.3151.

((3a*S,7*S**,8*S**,9a*S**)-7-(3,4-Dimethoxyphenyl)-8-((*E*)-3,4-dimethoxystyryl)-3,3a,5,7,8,9-hexahydro-2*H*-furo[3,2-*c*]isobenzofuran-2-one (29) and (5*R**,8*S**,9*S**)-8-(3,4-Dimethoxyphenyl)-9-((*E*)-3,4-dimethoxystyryl)-6-(hydroxymethyl)-1-oxaspiro[4.5]deca-3,6-dien-2-one (43)**



The numbering of positions is according to the skeleton of natural neovibsanins

42 (1.145 g, 1.832 mmol)の THF (18 mL)溶液に TBAF (1M THF 溶液, 5.5 mmol) を室温で加え, そのままの温度で 24 時間攪拌した. 飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた後, 酢酸エチルで抽出し, 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 2:1 から 1:3)で精製

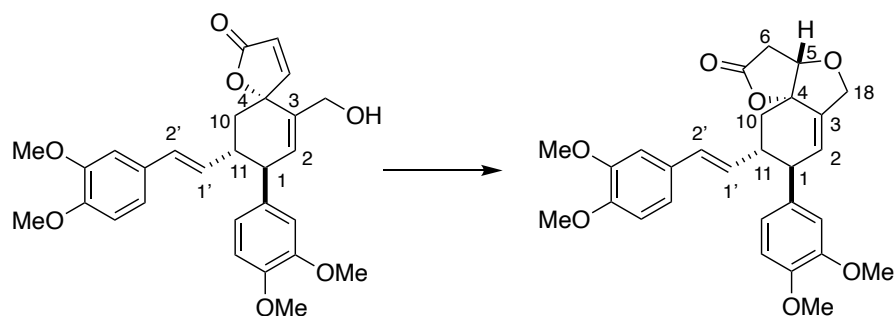
して, **29** (82 mg, 9%), **43** (649 mg, 74%)を得た.

29: pale yellow solid; FT IR (neat) 2932, 2836, 1777, 1585, 1514 cm^{-1} ; ^1H NMR 600 MHz in CDCl_3) δ 2.00 (1H, dd, $J = 14.3, 9.6$ Hz, H-10 α), 2.09 (1H, dd, $J = 14.3, 9.6$ Hz, H-10 β), 2.73-2.77 (3H, m, H-6, H-11), 3.55 (1H, t, $J = 2.1$ Hz, H-1), 3.870 (3H, s, OMe), 3.872 (3H, s, OMe), 3.88 (3H, s, OMe), 3.91 (3H, s, OMe), 4.41 (1H, dd, $J = 3.6, 2.1$ Hz, H-5), 4.54 (1H, d, $J = 11.8$ Hz, H-18), 4.69 (1H, m, H-18), 6.02 (1H, t, $J = 1.9$ Hz, H-2) 6.33 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-2'), 6.40 (1H, dd, $J = 15.7, 9.1$ Hz, H-1'), 6.67 (1H, dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, H-Ar), 6.71 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-Ar), 6.80 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-Ar), 6.83 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-Ar), 6.90 (1H, dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, H-Ar), 6.93 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-Ar); ^{13}C NMR (150 MHz in CDCl_3) δ 31.97 (C-10), 37.00 (C-6), 44.31 (C-11), 45.59 (C-1), 55.87 (OMe), 55.91 (OMe), 55.94 (OMe), 56.02 (OMe), 70.19 (C-18), 83.05 (C-5), 87.16 (C-4), 109.11 (C-Ar), 111.21 (C-Ar), 111.26 (C-Ar), 111.50 (C-Ar), 119.18 (C-Ar), 119.63 (C-Ar), 127.64 (C-2), 129.27 (C-2'), 130.47 (C-Ar), 131.33 (C-1'), 135.37 (C-Ar), 136.26 (C-3), 148.12 (C-Ar), 148.58 (C-Ar), 149.05 (C-Ar), 149.23 (C-Ar), 174.65 (C=O); MS (CI^+) m/z 478 [$\text{M}]^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_7$: 478.1992, found 478.1992.

43: yellow solid; FT IR (neat) 3502, 3060, 3000, 2937, 2836, 1835, 1767, 1661, 1602, 1519 cm^{-1} ; ^1H NMR 600 MHz in CDCl_3) 2.03 (1H, dd, $J = 12.8, 2.7$ Hz, H-10 β), 2.48 (1H, t, $J = 12.8$ Hz, H-10 α), 2.64 (1H, m, H-11), 3.35 (1H, dd, $J = 9.5, 2.1$ Hz, H-1), 3.80 (3H, s, OMe), 3.86 (3H, s, OMe), 3.87 (6H, s, OMe \times 2), 4.02 (1H, d, $J = 13.0$ Hz, CH_2OH), 4.09 (1H, d, $J = 13.0$ Hz, CH_2OH), 5.96 (1H, dd, $J = 15.9, 7.6$ Hz, H-1'), 6.07 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-2'), 6.10 (1H, t, $J = 1.4$ Hz, H-2), 6.18 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, CO- $\text{CH}=\text{CH}$), 6.65 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-Ar), 6.71 (1H, dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, H-Ar), 6.77-6.79 (3H, m, H-Ar), 6.82 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-Ar), 7.61 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, CO- $\text{CH}=\text{CH}$); ^{13}C NMR (150 MHz in CDCl_3) δ 39.62 (C-10), 44.34 (C-11), 48.58 (C-1), 55.87 (OMe), 55.93 (OMe), 55.99 (OMe, overlap with another OMe peak), 61.10 (CH_2OH), 88.49 (C-4), 108.81 (C-Ar), 111.20 (C-Ar), 111.35 (C-Ar), 112.10 (C-Ar), 119.11 (C-Ar), 120.01 (C-Ar), 120.75 (CO- $\text{CH}=\text{CH}$), 128.40 (C-1'), 129.97 (C-Ar), 130.80 (C-2'), 134.05 (C-2), 134.73 (C-3), 134.86 (C-Ar), 148.07 (C-Ar), 148.79 (C-Ar), 148.83

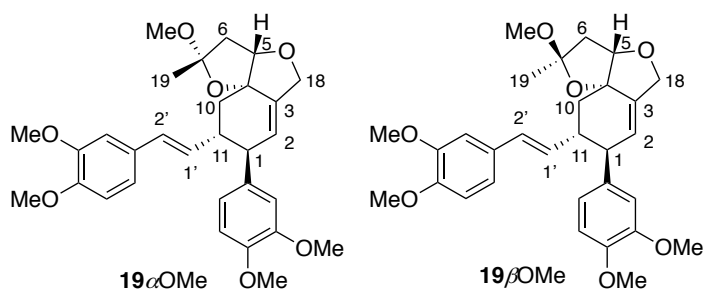
(C-Ar), 149.04 (C-Ar), 158.76 (CO-CH=CH), 172.28 (C=O); MS (CI⁺) m/z 478 [M]⁺; HRMS (CI⁺) m/z calcd for C₂₈H₃₀O₇: 478.1992, found 478.1993.

43から29の合成



43 (548 mg, 1.145 mmol)のメタノール (11.5 mL)溶液にナトリウムメトキシド (28% メタノール溶液 0.022 mL, 0.114 mmol)を加え, 室温で1時間攪拌した. 飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた後, 酢酸エチルで抽出し, 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 2:1 から 1:1)で精製して, **29** (545 mg, 99%)を得た.

Hybrid compound 19



The numbering of positions is according to the skeleton of natural neovibsanins

29 (200 mg, 0.418 mmol)の THF (42mL)溶液を 0 °C に冷却後, Tebbe 試薬 (0.5M トルエン溶液 1.68 mL, 0.840 mmol)を加え, 室温に昇温して4時間攪拌した. 反応容器を塩化ナトリウムを加えた氷浴で冷却して 10%水酸化ナトリウム水溶液を数滴加えたのち, セライトパッドで濾過した. 濾液を濃縮して得られた残渣をメタノール (84 mL)に溶解させて30分室温で攪拌した. 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた後, 酢酸エチルで抽出し, 得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した. 無水硫酸マグネシウムで乾燥さ

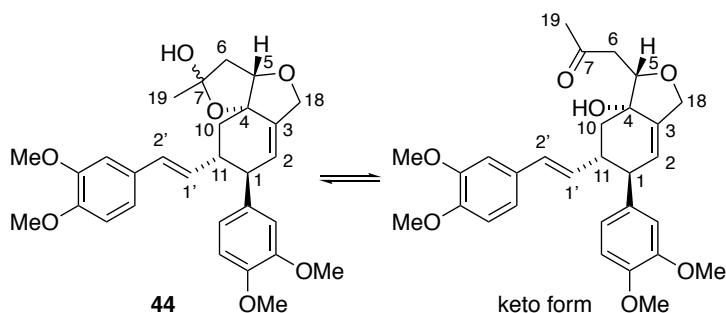
せ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル 2:1, 1% トリエチルアミン）で精製して，**19** (183 mg, 86%, $\alpha:\beta = 1:3$)を得た。

19 α OMe isomer: white solid; FT IR (neat) 2936, 2833, 1727, 1603, 1584, 1514 cm^{-1} ; ^1H NMR (600 MHz in C_6D_6) δ 1.30 (3H, s, H-19), 1.73 (1H, dd, $J = 14.1, 5.8$ Hz, H-6 β), 1.93 (1H, dd, $J = 13.6, 4.4$ Hz, H-10 α), 1.99 (1H, dd, $J = 13.6, 5.4$ Hz, H-10 β), 2.51 (1H, d, $J = 14.1$ Hz, H-6 α), 2.78 (1H, m, H-11), 3.24 (3H, s, OMe), 3.39 (3H, s, OMe), 3.44 (3H, s, OMe), 3.47 (3H, s, OMe), 3.49 (3H, s, OMe), 4.33 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H-5), 4.38 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-18 β), 4.94 (1H, m, H-18 α), 5.69 (1H, m, H-2), 6.39 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-2'), 6.60 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-Ar), 6.66 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-Ar), 6.75-6.76 (2H, m, H-Ar), 6.83 (1H, dd, $J = 15.8, 9.5$ Hz, H-1'), 6.97 (1H, dd, $J = 8.1, 2.1$ Hz, H-Ar), 7.04 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-Ar); ^{13}C NMR (150 MHz in C_6D_6) δ 23.77 (C-19), 35.29 (C-10), 45.82 (C-11), 46.24 (C-1), 46.93 (C-6), 48.80 (OMe), 55.46 (OMe), 55.59 (OMe), 55.74 (OMe), 55.77 (OMe), 70.54 (C-18), 87.41 (C-4), 88.90 (C-5), 109.12 (C-7), 110.12 (C-Ar), 112.42 (C-Ar), 112.63 (C-Ar), 113.03 (C-Ar), 119.51 (C-Ar), 120.23 (C-Ar), 123.93 (C-2), 128.53 (C-2'), 131.74 (C-Ar), 134.90 (C-1'), 137.42 (C-Ar), 141.67 (C-3), 149.17 (C-Ar), 149.66 (C-Ar), 150.36 (C-Ar), 150.44 (C-Ar); MS (CI $^+$) m/z 508 [M] $^+$; HRMS (CI $^+$) m/z calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{O}_7$:508.2461, found 508.2467.

19 β OMe isomer: colorless oil; FT IR (neat) 3033, 2935, 2863, 2833, 1603, 1584, 1515 cm^{-1} ; ^1H NMR (600 MHz in C_6D_6) δ 1.48 (3H, s, H-19), 2.02 (1H, dd, $J = 13.9, 4.3$ Hz, H-10 β), 2.30 (1H, dd, $J = 13.9, 3.8$ Hz, H-10 α), 2.33 (1H, dd, $J = 14.1, 5.5$ Hz, H-6 α), 2.43 (1H, dd, $J = 14.1, 5.5$ Hz, H-6 β), 2.85 (1H, m, H-11), 3.17 (3H, s, OMe), 3.37 (3H, s, OMe), 3.43 (3H, s, OMe), 3.44 (3H, s, OMe), 3.47 (3H, s, OMe), 3.55 (1H, br, H-1), 4.30 (1H, d, $J = 12.5$ Hz, H-18 β), 4.32 (1H, dd, $J = 5.5, 1.2$ Hz, H-5), 4.66 (1H, m, H-18 α), 5.62 (1H, m, H-2), 6.47 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-2'), 6.58 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-Ar), 6.65 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-Ar), 6.72-6.73 (2H, m, H-Ar), 6.98 (1H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, H-Ar), 7.02-7.07 (2H, m, H-Ar, H-1'); ^{13}C NMR (150 MHz in C_6D_6) δ 23.61 (C-19), 32.37 (C-10), 45.79 (C-11), 46.30 (C-1), 47.62 (C-6), 49.32 (OMe), 55.48 (OMe), 55.56 (OMe), 55.78 (OMe, overlap with another OMe peak), 69.89 (C-18), 86.65 (C-4), 89.40 (C-5), 110.10 (C-Ar), 110.74 (C-7), 112.45 (C-Ar), 112.65 (C-Ar), 113.05 (C-Ar), 119.54 (C-Ar), 120.25 (C-Ar), 123.41 (C-2), 128.53 (C-2'), 131.46 (C-Ar),

133.73 (C-1'), 136.80 (C-Ar), 140.91 (C-3), 149.28 (C-Ar), 149.69 (C-Ar), 150.42 (C-Ar), 150.48 (C-Ar); MS (CI⁺) *m/z* 508 [M]⁺; HRMS (CI⁺) *m/z* calcd for C₃₀H₃₆O₇: 508.2461, found 508.2451.

Hybrid compound 44



The numbering of positions is according to the skeleton of natural neovibsanins

19 (112 mg, 0.220 mmol)の THF/H₂O (3:1, 4.4 mL)溶液を 0 °C に冷却後, 1M 塩酸 (0.022mL, 0.022 mmol)を加え, そのままの温度で 14 時間攪拌した. 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた後, 酢酸エチルで抽出し, 得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した. 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 2:1, 1%トリエチルアミン)で精製して **44** (86 mg, 79%)を得た.

44: white solid; FT IR (neat) 3499, 3005, 2935, 2868, 2836, 1714, 1603, 1585, 1517 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz in C₆D₆) δ 1.46 (3H, s, Me, α-OH), 1.51 (3H, s, Me, β-OH), 1.65-1.70 (2H, m, H-6, H-10, β-OH), 1.78 (1H, dd, H-10, β-OH), 1.83 (3H, s, H-19, keto), 1.93 (1H, br, OH, α-OH), 1.96 (1H, dd, *J* = 14.4, 5.0 Hz, H-10, keto), 2.07 (1H, br, OH, keto), 2.08 (1H, dd, *J* = 13.8, 4.4 Hz, H-10, α-OH), 2.27 (1H, d, *J* = 14.0 Hz, H-6, β-OH), 2.31-2.35 (2H (H-6, α-OH), 1H (H-10, keto), m), 2.43 (1H, dd, *J* = 13.9, 4.8 Hz, H-10, α-OH), 2.61 (1H, dd, *J* = 16.4, 4.9 Hz, H-6, keto), 2.79-2.85 (1H (H-11, α-OH), 1H (H-11, β-OH), 2H (H-6, H-11, keto), 3.89-3.49 (nine singlet signals overlapping, OMe), 3.53 (1H (H-1, β-OH), 1H (H-1, α-OH), m), 3.62 (1H, m, H-1, keto), 3.99 (1H, d, *J* = 3.1 Hz, H-5, β-OH), 4.05 (1H, br, OH, β-OH), 4.17 (1H, dd, *J* = 7.1, 5.1 Hz, H-5, keto), 4.22-4.31 (1H (H-18, β-OH), 1H, (H-18, α-OH), 1H (H-5, α-OH) 1H (H-18, keto), m), 4.59-4.69 (1H (H-18, α-OH), 1H (H-18, β-OH), 1H (H-18-keto),

m), 5.54 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-2, keto)), 5.57 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2, β -OH), 5.64 (1H, d, $J = 1.3$ Hz, H-2, α -OH), 6.44-6.50 (1H (H-1', α -OH), 1H (H-1', β -OH), 1H (H-1', keto), m), 6.58-6.73 (2H (H-Ar, H-2', α -OH), 2H (H-Ar, H-2', β -OH), 2H (H-Ar, H-2', keto), 6.89-7.00 (3H (H-Ar, H-2', α -OH), 3H (H-Ar, H-2', β -OH), 3H (H-Ar, H-2', keto); ^{13}C NMR (125 MHz in C_6D_6) δ 28.04 (C-19, β -OH), 29.51 (C-19, α -OH), 30.67 (C-19, keto), 33.02 (C-10, keto), 33.57 (C-10, α -OH, β -OH), 42.78 (C-6, keto), 44.13 (C-11, keto), 44.79 (C-6, β -OH), 45.29 (C-1, keto), 45.83 (C-11, β -OH), 45.91 (C-11, α -OH), 46.40 (C-1, α -OH), 46.48 (C-1, β -OH, C-6, α -OH), 55.46 (OMe), 55.52 (OMe), 55.55 (OMe), 55.59 (OMe), 55.72 (OMe), 55.75 (OMe), 55.82 (OMe), 68.48 (C-18, keto), 69.92 (C-18, α -OH), 70.35 (C-18, β -OH), 73.89 (C-4, keto), 83.77 (C-5, keto), 86.15 (C-4, β -OH), 86.71 (C-4, α -OH), 89.37 (C-5, α -OH), 89.60 (C-5, β -OH), 106.86 (C-7, β -OH), 107.74 (C-7, α -OH), 110.02 (C-Ar), 110.23 (C-Ar), 112.40 (C-Ar), 112.48 (C-Ar), 112.51 (C-Ar), 112.54 (C-Ar), 112.58 (C-Ar), 112.82 (C-Ar), 112.98 (C-Ar), 113.03 (C-Ar), 119.52 (C-Ar), 119.58 (C-Ar), 120.09 (C-Ar), 120.19 (C-Ar), 120.23 (C-Ar), 122.46 (C-2, keto), 123.93 (C-2, α -OH), 124.13 (C-2, β -OH), 128.29 (C-2', β -OH), 128.48 (C-2', α -OH), 129.42 (C-2', keto), 130.80 (C-Ar), 131.57 (C-Ar), 131.66 (C-Ar), 133.25 (C-1', keto), 133.66 (C-1', β -OH), 133.98 (C-1', α -OH), 136.57 (C-Ar), 136.91 (C-Ar), 137.12 (C-Ar), 140.52 (C-3, β -OH), 140.82 (C-3, α -OH), 142.73 (C-3, keto), 149.21 (C-Ar), 149.26 (C-Ar), 149.70 (C-Ar), 149.73 (C-Ar), 149.99 (C-Ar), 150.42 (C-Ar), 150.44 (C-Ar), 150.47 (C-Ar), 205.34 (ketone); MS (CI⁺) m/z 494 [M]⁺; HRMS (CI⁺) m/z calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_7$: 494.2305, found 494.2316; elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_7$: C 70.43, H 6.93, found C 70.16, H 6.97.

PC12細胞を用いた活性評価

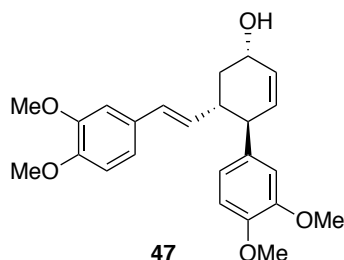
PC12細胞をDMEM/10% HS, 5%FBS, 100 unit penicillin-streptomycinで組成された培地中, 8000 cells/mLの細胞密度で24ウェルプレート of 1 ウェルにつき400 μL ずつ播種する. 24時間インキュベーター内で培養した後, 各サンプルDMSO溶液混入のDMEM/2% HS, 1%FBS, 100 unit penicillin-streptomycin組成培地 (DMSO最終濃度 0.1%)に各々交換する.

インキュベーターで培養を続け、96時間後にプレート中の培地に4%ホルムアルデヒドPBS溶液を400 μ Lずつ加えて5分間放置する。培地を吸引除去してから各ウェルに4%ホルムアルデヒドPBS溶液を400 μ Lずつ加えて15分間放置する。4%ホルムアルデヒドPBS溶液を吸引除去して、PBS buffer 400 μ Lで二回洗浄後、0.1M Borate Buffer 400 μ Lで1回洗浄する。0.1%メチレンブルー 300 μ Lを加え、固定した細胞を室温で2時間染色する。染色後、ミリQで洗浄し、顕微鏡で観察する。

活性評価の定量化では、デジタルカメラで各ウェルの写真を重ならないようランダムに撮影する。測定対象にする細胞を各サンプルの各濃度からそれぞれ100個選択して突起の長さを測定する。得られた各データの統計処理は、Mac統計解析を使用し、有意差検定に関しては、Dunnett's t-testを採用した。

第二章

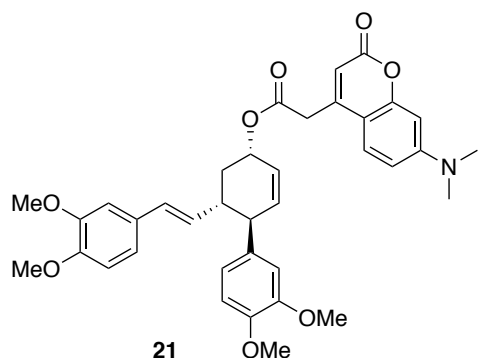
(1*R**,2*S**,4*S**)-2-((*E*)-3,4-Dimethoxystyryl)-3',4'-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-4-ol (**47**)



39 (100 mg, 0.254 mmol)のメタノール (2.5 mL)溶液を 0 °C に冷却し, 塩化セリウム 7 水和物 (227 mg, 0.609 mmol), 水素化ホウ素ナトリウム (11.5 mg, 0.304 mmol)を順次加え, そのままの温度で 15 分撹拌した. 飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた後, 酢酸エチルで抽出し, 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 2:1 から 1:1)で精製して, **47** (81 mg, 81%)を得た.

47: white solid; FT IR (neat) 3398, 2934, 2835, 1588, 1515 1464, 1417 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.66 (1H, dt, $J = 12.2, 10.1$ Hz), 2.30 (1H, dd, $J = 11.7, 4.6$ Hz), 2.41-2.46 (1H, m), 3.16 (1H, dt, $J = 9.5, 1.9$ Hz), 3.80 (3H, s), 3.847 (3H, s), 3.853 (3H, s), 3.86 (3H, s), 4.53 (1H, br), 5.75 (1H, d, $J = 10.1$ Hz), 5.88 (1H, d, $J = 10.0$ Hz), 5.96 (1H, dd, $J = 15.9, 7.2$ Hz), 6.04 (1H, d, $J = 16.0$ Hz), 6.63 (1H, s), 6.68 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 6.75-6.79 (4H, m); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 38.94, 44.99, 48.48, 55.81, 55.82, 55.84, 55.91, 67.57, 108.70, 110.91, 111.12, 111.59, 118.87, 120.40, 129.53, 130.28, 130.55, 131.34, 132.52, 136.27, 147.54, 148.42, 148.62, 148.92; MS (CI^+) m/z 396 [M] $^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_5$: 396.1937, found 396.1935.

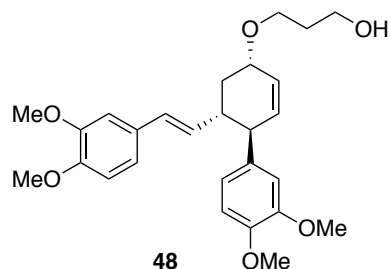
(1*R,2*S**,4*S**)-2-((*E*)-3,4-Dimethoxystyryl)-3',4'-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-4-yl 2-(7-(dimethylamino)-2-oxo-2*H*-chromen-4-yl)acetate (**21**)**



47 (10.0 mg, 0.0252 mmol)のジクロロメタン (0.5 mL)溶液を 0 °C に冷却し、2-(7-(Dimethylamino)-2-oxo-2*H*-chromen-4-yl)acetic acid (7.5 mg, 0.0303 mmol), トリエチルアミン (0.01 mL, 0.0717mmol), 2-メチル-6-ニトロ安息香酸無水物 (13.0 mg, 0.0378 mmol), DMAP (3.0 mg, 0.0246 mmol)を順次加え、そのままの温度で3時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた後、ジクロロメタンで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (トルエン:酢酸エチル 5:1)で精製して、**21** (14.1 mg, 89%)を得た。

21: yellow solid; ¹H NMR (500 MHz in CDCl₃) δ 1.75 (1H, dt, *J* = 12.3, 11.2 Hz), 2.27 (1H, dd, *J* = 11.0, 5.1 Hz), 2.48 (1H, m), 3.05 (6H, s), 3.18 (1H, m), 3.71 (2H, s), 3.79 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.86 (3H, s), 5.63 (1H, br), 5.75 (1H, d, *J* = 10.3 Hz), 5.83 (1H, d, *J* = 10.1 Hz), 5.93 (1H, dd, *J* = 15.9, 7.5 Hz), 6.03 (1H, d, *J* = 16.0 Hz), 6.08 (1H, s), 6.52 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 6.61-6.63 (2H, m), 6.66 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 6.76-6.77 (4H, m), 7.42 (1H, d, *J* = 9.0 Hz); ¹³C NMR (125 MHz in CDCl₃) δ 34.29, 38.45, 40.07, 44.62, 48.23, 55.80, 55.82, 55.88, 71.49, 98.34, 108.41, 108.72, 108.96, 110.69, 110.93, 110.10, 111.42, 118.86, 120.38, 125.20, 126.61, 129.55, 129.88, 130.36, 134.72, 135.65, 147.65, 148.31, 148.47, 148.69, 148.90, 152.94, 155.93, 161.72, 168.87; HRMS (MALDI) *m/z* calcd for C₃₇H₃₉NO₈Na:648.2568, found 648.2571.

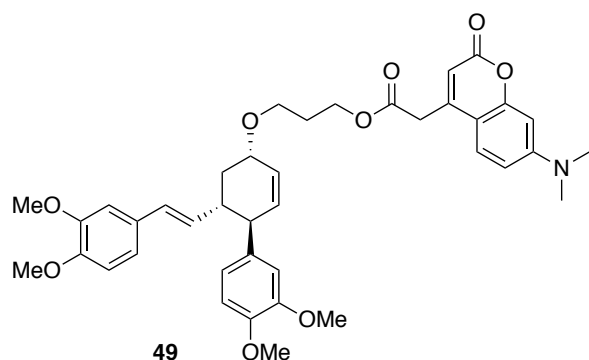
3-(((1*R,2*S**,4*S**)-2-((*E*)-3,4-Dimethoxystyryl)-3',4'-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-[1,1'-bi-phenyl]-4-yl)oxy)propan-1-ol (48)**



47 (40.0 mg, 0.101 mmol)と 2-(3-Bromopropoxy)tetrahydro-2*H*-pyran⁴⁴⁾ (115 mg, 0.515 mmol)を加えた DMF (0.5 mL)溶液を 0 °C に冷却し、水素化ナトリウム (60% , 流動パラフィンに分散 21.0 mg, 0.525 mmol)を加え、そのままの温度で 12 時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた後、ヘキサン/酢酸エチル(4:1)混合溶媒で抽出し、有機層を蒸留水、飽和食塩水で洗浄してから無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (トルエン:酢酸エチル 5:1)で精製して得た生成物 (51.1 mg)をメタノール/1M 塩酸 (10:1, 0.5 mL)に溶解させて、室温で 4 時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた後、酢酸エチルで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 2:1 から 1:2)で精製して、**48** (40.0 mg, 93%)を得た。

48: colorless oil; FT IR (neat) 3435, 2935, 1585, 1514, 1464, 1417 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz in CDCl₃) δ 1.68 (1H, dt, *J* = 12.3, 11.2 Hz), 1.87 (2H, m), 2.31 (1H, m), 2.40 (1H, m), 3.15 (1H, m), 3.73-3.82 (6H, m), 3.79 (3H, s), 3.836 (3H, s), 3.843 (3H, s), 3.87 (3H, s), 4.21 (1H, br), 5.75 (1H, d, *J* = 10.2 Hz), 5.90 (1H, d, *J* = 10.2 Hz), 5.96 (1H, dd, *J* = 15.9, 7.3 Hz), 6.03 (1H, d, *J* = 16.0 Hz), 6.62 (1H, d, *J* = 1.7 Hz), 6.67 (1H, dd, *J* = 8.2, 1.8 Hz), 6.74-6.78 (4H, m); ¹³C NMR (125 MHz in CDCl₃) δ 32.30, 35.24, 44.87, 48.64, 55.75, 55.76, 55.79, 55.85, 62.03, 67.37, 75.07, 108.62, 110.87, 111.07, 111.55, 118.82, 120.31, 128.80, 129.43, 130.32, 130.51, 132.90, 136.26, 147.48, 148.35, 148.55, 148.86; MS (CI⁺) *m/z* 454 [M]⁺; HRMS (CI⁺) *m/z* calcd for C₂₇H₃₄O₆: 454.2355, found 454.2358.

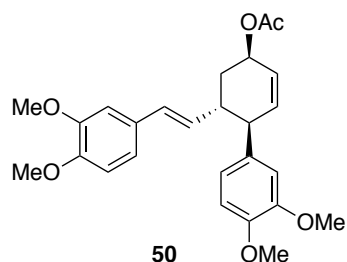
3-(((1*R,2*S**,4*S**)-2-((*E*)-3,4-Dimethoxystyryl)-3',4'-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-[1,1'-bi-phenyl]-4-yl)oxy)propyl 2-(7-(dimethylamino)-2-oxo-2*H*-chromen-4-yl)acetate (**49**)**



48 (9.1 mg, 0.0200 mmol) のジクロロメタン (0.5 mL) 溶液を 0 °C に冷却し、2-(7-(Dimethylamino)-2-oxo-2*H*-chromen-4-yl)acetic acid (7.5 mg, 0.0303 mmol), EDC•HCl (5.9 mg, 0.0307mmol), DMAP (2.4 mg, 0.0196 mmol) を室温で加え、そのままの温度で 20 時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた後、ジクロロメタンで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (トルエン:酢酸エチル 5:1) で精製して、**49** (13.1 mg, 96%) を得た。

49: yellow solid; ¹H NMR (500 MHz in CDCl₃) δ 1.57-1.64 (1H, m, H₂O peak overlapped), 1.90 (2H, m), 2.21 (1H, d, *J* = 6.8 Hz), 2.37 (1H, m), 3.01 (6H, s), 3.14 (1H, d, *J* = 7.7 Hz), 3.53 (2H, m), 3.69 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.85 (6H, s, OMe peak overlapped), 3.86 (3H, s), 4.08 (1H, br), 4.26 (2H, t, *J* = 6.3 Hz), 5.72 (1H, d, *J* = 10.2 Hz), 5.81 (1H, d, *J* = 10.2 Hz), 5.96 (1H, dd, *J* = 15.9, 7.1 Hz), 6.03 (1H, d, *J* = 16.0 Hz), 6.06 (1H, s), 6.49 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 6.60 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.1 Hz), 6.63 (1H, s), 6.67 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 6.75-6.80 (4H, m), 7.41 (1H, d, *J* = 9.0 Hz); ¹³C NMR (125 MHz in CDCl₃) δ 29.23, 35.27, 38.34, 40.05, 44.89, 48.69, 55.81, 55.84, 55.89, 62.78, 64.14, 98.32, 108.41, 108.69, 108.96, 110.70, 110.90, 111.09, 111.63, 118.86, 120.35, 125.26, 128.89, 129.43, 130.43, 130.59, 132.87, 136.36, 147.50, 148.37, 148.39, 148.60, 148.91, 152.92, 155.93, 161.66, 169.03; HRMS (MALDI) *m/z* calcd for C₄₀H₄₅NO₉Na [M+Na⁺], 706.2987, found 706.2980.

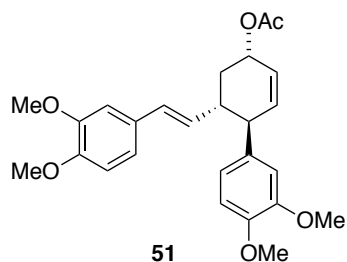
(1*R,2*S**,4*R**)-2-((*E*)-3,4-Dimethoxystyryl)-3',4'-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-4-yl acetate (50)**



38 (10.0 mg, 0.0252 mmol)のジクロロメタン (0.5 mL)溶液に、トリエチルアミン (0.03 mL, 0.215 mmol), DMAP (3.0 mg, 0.0246 mmol), 無水酢酸 (0.01 mL, 0.106 mmol)を室温で加え、そのままの温度で 2 時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた後、ジクロロメタンで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 3:1)で精製して、**50** (10.4 mg, 94%)を得た。

50: yellow solid; FT IR (neat) 2999, 2936, 2835, 1731, 1586, 1515, 1464, 1417 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.90 (1H, m), 2.08 (1H, m), 2.11 (3H, s), 2.60 (1H, m), 3.12 (1H, d, $J = 9.5$ Hz), 3.83 (3H, s), 3.855 (3H, s), 3.859 (3H, s), 3.87 (3H, s), 5.38 (1H, d, $J = 2.7$ Hz), 5.96 (1H, dd, $J = 15.9, 7.5$ Hz), 5.98-6.01 (2H, m), 6.11 (1H, d, $J = 16.0$ Hz), 6.69 (1H, s), 6.74 (1H, dd, $J = 8.2, 1.5$ Hz), 6.77-6.81 (5H, m); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 21.40, 33.56, 40.68, 48.27, 55.77, 55.83, 55.85, 55.87, 66.39, 108.66, 110.96, 111.08, 111.73, 118.83, 120.41, 124.68, 129.71, 130.45, 130.52, 135.79, 136.64, 147.62, 148.39, 148.64, 148.88, 170.67; MS (CI^+) m/z 438 [M] $^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_6$: 438.2042, found 438.2038

(1*R,2*S**,4*S**)-2-((*E*)-3,4-Dimethoxystyryl)-3',4'-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydro-[1,1'-biphenyl]-4-yl acetate (51)**



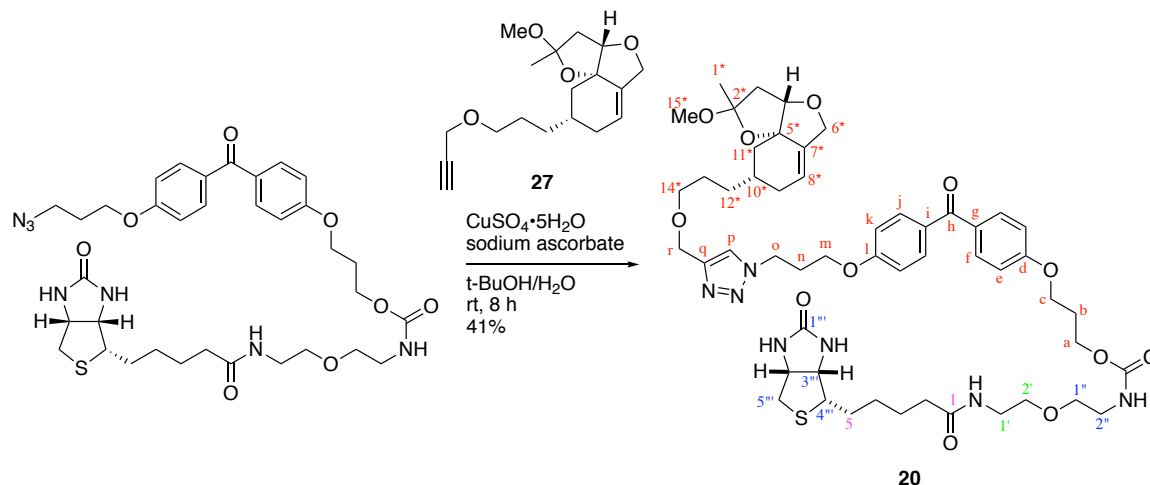
50 と同様の手順に従って、**47** (10.0 mg, 0.0252 mmol)から **51** (9.8 mg, 89%)を得た。

51: white solid; FT IR (neat) 2998, 2934, 2834, 1727, 1584, 1516, 1464, 1418 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.77 (1H, dt, $J = 12.3, 11.2$ Hz), 2.10 (3H, s), 2.32 (1H, m), 2.50 (1H, m), 3.19 (1H, d, $J = 9.4$ Hz), 3.81 (3H, s), 3.85 (6H, s, OMe peak overlapped), 3.86 (3H, s), 5.60 (1H, br), 5.80 (1H, d, $J = 10.8$ Hz), 5.84 (1H, d, $J = 10.3$ Hz), 5.95 (1H, dd, $J = 15.9, 7.4$ Hz), 6.05 (1H, d, $J = 16.0$ Hz), 6.64 (1H, s), 6.68 (1H, dd, $J = 8.2, 1.3$ Hz), 6.75-6.79 (4H, m); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 21.34, 34.49, 44.67, 48.38, 55.79, 55.84, 55.90, 70.18, 108.73, 110.93, 111.11, 111.42, 118.86, 120.42, 127.35, 129.72, 129.81, 130.48, 134.19, 135.87, 147.63, 148.44, 148.70, 148.91, 170.85; MS (CI^+) m/z 438 [M] $^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_6$: 438.2042, found 438.2033.

PC12細胞を用いた活性評価

PC12細胞を用いて第一章と同様の手順で実験を行う。活性評価の定量化では、デジタルカメラで各ウェルの写真を重ならないようランダムに撮影する。測定対象にする細胞を各サンプルの各濃度からそれぞれ70個選択し、突起伸展促進活性の評価では突起の長さを測定し、分化誘導活性の評価では細胞体よりも長い突起を形成している細胞の割合を算出した。得られた各データの統計処理は、Mac統計解析を使用し、有意差検定に関しては、Dunnett's t-testを採用した。

3-(4-(4-(3-(4-((3-((3aS*,8S*,9aS*)-2-Methoxy-2-methyl-3,3a,5,7,8,9-hexahydro-2H-furo[3,2-c]isobenzofuran-8-yl)propoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propoxy)benzoyl)phenoxy)propyl(2-(2-(5-((3aS*,4S*,6aR*)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanamido)ethoxy)ethyl)carbamate (20)

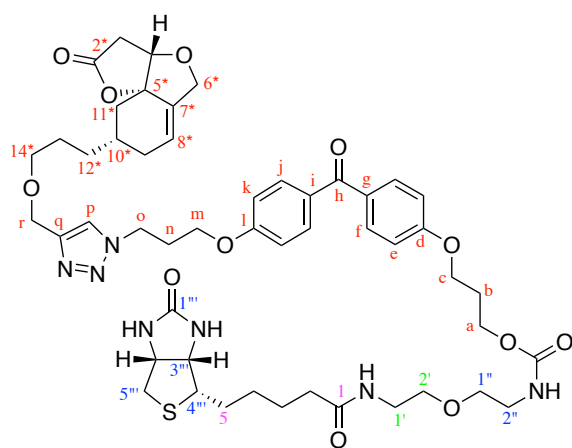


アジド²¹⁾ (14.2 mg, 0.020mmol)と **27**²²⁾ (12.3 mg, 0.040 mmol)を *t*-BuOH/H₂O (3:1, 2.0 mL) 溶液に硫酸銅(II)五水和物 (6.0 mg, 0.024 mmol)を加え、室温で吸引しながら攪拌して脱気した後にアスコルビン酸ナトリウム (4.8 mg, 0.024 mmol)を加えて室温で8時間攪拌する。反応溶液を順相シリカゲルで濾過して、得られた残渣を逆相カラムクロマトグラフィー (メタノール:水 1.5:1)で精製して、**20** (8.3 mg, 41%)を得た。

20: FTIR 2924, 2853, 1714, 1600, 1506 cm⁻¹; ¹H NMR (600 MHz in CD₃OD) δ 1.30 (1H, m, H-11A), 1.38 (3H, s, H-1*minor), 1.40 (3H, s, H-1*), 1.39-1.45 (4H, m, H-4, 13*), 1.54-1.76 (6H, m, H-3, 5, 9*A-minor, H-10*), 1.80 (1H, dd, *J* = 13.8, 4.4 Hz, H-9*A), 1.90 (1H, m, H-9*B-minor), 1.92 (1H, dd, *J* = 13.8, 6.0 Hz, H-9*B), 2.05 (1H, dd, *J* = 13.8, 5.4 Hz, H-3*A-minor), 2.16 (2H, t, *J* = 6.2 Hz, H-b), 2.19 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-2), 2.19 (1H, d, *J* = 13.8 Hz, H-3*A), 2.24 (1H, d, *J* = 13.8 Hz, H-3*B), 2.25 (1H, d, *J* = 13.8 Hz, H-3*B-minor), 2.42 (2H, quin, *J* = 6.4 Hz, H-h), 2.68 (1H, d, *J* = 12.6 Hz, H-5'''α), 2.89 (1H, dd, *J* = 12.6, 5.0 Hz, H-5'''β), 3.15 (3H, s, H-15*minor), 3.16 (1H, m, H-4'''), 3.22 (3H, s, H-15*), 3.27 (2H, t, *J* = 5.4 Hz, H-2''), 3.33 (2H, t, *J* = 6.0 Hz, H-1'), 3.49 (6H, m, H-2', 1'', 14*), 4.09 (2H, t, *J* = 5.6

Hz, H-m), 4.10 (1H, m, H-4*), 4.11 (1H, d, $J = 10.7$ Hz, H-6*A-minor), 4.16 (1H, d, $J = 10.7$ Hz, H-6*A), 4.17 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H-c), 4.18 (1H, m, H-4*minor), 4.24 (2H, t, $J = 6.2$ Hz, H-a), 4.27 (1H, dd, $J = 13.8, 4.6$ Hz, H-3'''), 4.37 (1H, m, H-6*B), 4.46 (1H, dd, $J = 7.8, 4.6$ Hz, H-6'''), 4.49 (1H, m, H-6*B-minor), 4.55 (2H, m, H- γ), 4.64 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, H-o), 5.69 (1H, m, H-8*minor), 5.72 (1H, m, H-8*), 7.00 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-k), 7.04 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-e), 7.72 (1H, d, $J = 4.9$ Hz, H-j), 7.75 (1H, d, $J = 4.9$ Hz, H-f), 7.96 (1H, d, $J = 3.3$ Hz, H-p); ^{13}C NMR (150 MHz in CD_3OD) δ 23.92 (C-1*minor), 24.08 (C-1*), 26.83 (C-3), 29.20 (C-5), 29.49 (C-13*), 29.75 (C-4), 30.11 (C-6), 30.61 (C-11*), 30.83 (C-n), 32.12 (C-12*), 32.71 (C-10*minor), 33.47 (C-10*), 36.09 (C-9*), 36.74 (C-2), 40.29 (C-1'), 41.04 (C-5'''), 41.68 (C-2''), 46.73 (C-3*minor), 47.08 (C-3*), 48.41 (C-o), 49.30 (C-15*minor), 50.09 (C-15*), 56.98 (C-4'''), 61.63 (C-6'''), 62.58 (C-a), 62.58 (C-a), 63.37 (C-3'''), 64.65 (C- γ), 66.02 (C-c), 66.10 (C-m), 70.45 (C-2'), 70.74 (C-6*), 70.86 (C-1''), 71.22 (C-6*minor), 71.80 (C-14*), 88.66 (C-5*), 89.76 (C-4*), 89.94 (C-4*minor), 110.14 (C-2*minor), 111.61 (C-2*), 115.27 (4C, C-e, k), 123.07 (C-8*minor), 123.54 (C-8*), 125.31 (C-p), 131.74 (C-g), 131.97 (C-i), 133.34 (4C, C-f, j), 139.16 (C-7*), 146.40 (C-q), 159.10 (OCONH), 163.70 (C-l), 164.05 (C-d), 166.07 (C-1'''), 176.17 (C-1), 196.60 (C-h); HRMS (FAB⁺) m/z calcd for $\text{C}_{52}\text{H}_{71}\text{N}_7\text{NaO}_{12}\text{S}$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 1040.4779, found 1040.4779.

3-(4-(4-(3-(4-((3a*S,8*S**,9a*S**)-2-Oxo-3,3a,5,7,8,9-hexahydro-2*H*-furo[3,2-*c*]isobenzofuran-8-yl)propoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)propoxy)benzoyl)phenoxy)propyl (2-(2-(5-((3a*S**,4*S**,6a*R**)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamido)ethoxy)ethyl)carbamate (52)**



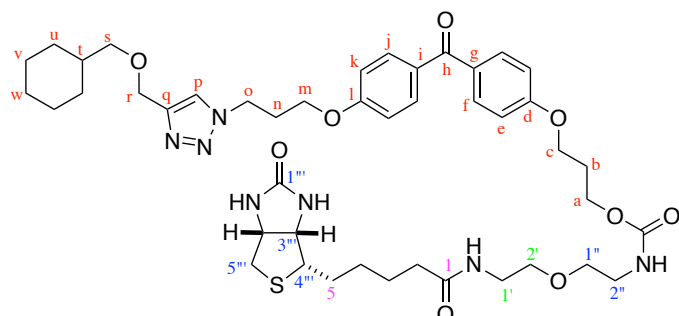
52

The numbering of positions is according to **20**

20と同様の手順に従って、アジド (17.8mg, 0.025 mmol)から**52** (18.6 mg, 75%)を得た。

52: FTIR 3254, 3070, 2931, 2872, 1698, 1643, 1599, 1554, 1509 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.40-1.52 (3H, m, H-4, H-12* or 13*), 1.58-1.74 (7H, m, H-3, 5, 12*, 13*), 1.81 (1H, dd, $J = 13.7, 4.0$ Hz, H-11*A), 1.89 (3H, m, H-10*, 11*B), 2.09 (1H, d, $J = 18.9$ Hz, H-9*A), 2.11-2.23 (4H, m, H-2, b), 2.28 (1H, dd, $J = 18.9, 2.6$ Hz, H-9*B), 2.45 (2H, m, H-n), 2.68-2.74 (3H, m, H-3*, 5'''A), 2.88 (1H, dd, $J = 12.9, 4.8$ Hz, H-5'''B), 3.10 (1H, m, H-4'''), 3.35 (2H, m, H-2''), 3.41 (1H, t, $J = 5.0$ Hz), 3.49-3.53 (6H, m, H-1'', 2', 14*), 4.06 (2H, t, $J = 5.7$ Hz, H-m), 4.13 (2H, t, $J = 6.3$ Hz, H-c), 4.25-4.27 (4H, m, H-1', 3''', 4*), 4.34 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-6*A), 4.46-4.51 (2H, m, H-2''', 6*B), 4.60-4.63 (4H, m, H-o, r), 5.57 (2H, m, $\underline{\text{HNCONH}}$, $\underline{\text{HNCOO}}$), 5.88 (1H, brs), 6.32 (1H, brs, $\underline{\text{HNCONH}}$), 6.63 (1H, brs, $\underline{\text{HNCOC}}$), 6.94 (4H, m, H-e, k), 7.65 (1H, s, H-p), 7.76 (4H, m, H-f, j); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 25.52 (C-3), 27.99, 28.12, 28.20 (C-4 or 5 or 13*), 28.91 (C-b), 29.80 (C-9*), 29.85 (C-n), 30.34 (C-12*), 30.53 (C-10*), 33.27 (C-11*), 35.76 (C-2), 36.94 (C-3*), 38.99 (C-1'), 40.51 (C-5'''), 40.72 (C-2''), 61.45 (C-a), 61.77 (C-3'''), 64.34 (C-r), 64.42 (C-m), 64.65 (C-c), 69.68, 69.83 (C-1'' or C-2'), 70.22 (C-6*), 70.54 (C-14*), 83.02 (C-4*), 87.78 (C-5*), 113.94, 113.95 (C-e or k), 122.86 (C-p), 125.36 (C-8*), 130.65, 130.96 (C-1 or g), 132.21 (2C, C-f, j), 134.04 (C-7*), 145.55 (C-q), 156.76 ($\underline{\text{OCONH}}$), 161.71 (C-l), 162.10 (C-d), 163.90 ($\underline{\text{HNCONH}}$), 173.41 (C-1), 175.38 (C-2*), 194.35 (C-h) ; HRMS (MALDI) m/z . calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{66}\text{N}_7\text{O}_{12}\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 988.4485, found 988.4498.

3-(4-(4-(3-(4-((Cyclohexylmethoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)propoxy)benzoyl)phenoxy)propyl(2-(2-(5-((3*aS,4*S**,6*aR**)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamide)ethoxy)ethyl)carbamate (53)**



53

20と同様の手順に従って、アジド (21.0 mg, 0.0302 mmol)から**53** (18.2 mg, 65%)を得た.

53: FTIR 3329, 2926, 2854, 1701, 1654, 1645, 1600, 1541 cm^{-1} ; ^1H NMR (600 MHz in CDCl_3) δ 0.80 (2H, m, H-uA), 1.16 (2H, m, H-w), 1.24 (4H, m, H-v), 1.43 (2H, quint, $J = 7.2$ Hz, H-4), 1.55-1.78 (7H, m, H-3, 5, t, uB), 2.14 (2H, quint, $J = 6.3$ Hz, H-b), 2.22 (2H, dt, $J = 7.2, 3.3$ Hz, H-2), 2.45 (2H, m, H-n), 2.70 (1H, d, $J = 12.9$ Hz, H-5'''A), 2.89 (1H, dd, $J = 12.9, 5.1$ Hz, H-5'''B), 3.12 (1H, m, H-4'''), 3.31 (2H, d, $J = 6.4$ Hz, H-s), 3.36 (2H, m, H-2''), 3.42 (2H, m, H-1'), 3.54 (4H, m, H-1'', 2'), 4.06 (2H, t, $J = 5.8$ Hz, H-m), 4.13 (2H, t, $J = 6.3$ Hz, H-c), 4.28 (3H, m, H-3''', a), 4.48 (1H, dd, $J = 12.6, 5.1$ Hz, H-6''), 4.60 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, H-o), 4.60 (2H, d, $J = 0.4$ Hz, H-r), 5.30 (1H, brs, HNCONH), 5.50 (1H, brs, OCONH), 6.08 (1H, brs, HNCONH), 6.52 (1H, brs, CH_2CONH), 6.94 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-k), 6.95 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-e), 7.55 (1H, s, H-p), 7.76 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-f), 7.77 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-j); ^{13}C NMR (150 MHz in CDCl_3) δ 25.47 (C-3), 25.80 (C-w), 26.55 (C-t), 28.00 (C-4), 28.05 (C-5), 28.93 (C-6), 29.81 (C-v), 29.81 (C-n), 30.02 (C-u), 35.73 (C-2), 39.04 (C-1'), 40.52 (C-5'''), 40.72 (C-2''), 46.95 (C-o), 55.44 (C-4'''), 60.10 (C-6'''), 61.51 (C-3'''), 61.78 (C-m), 64.33 (C-r), 64.55 (C-c), 64.68 (C-1''), 69.70 (C-2'), 69.88 (C-s), 113.93 (C-k), 113.98 (C-e), 122.67 (C-p), 130.68s (C-g), 131.10s (C-i), 132.23d (2C, C-f), 132.26d (2C, C-j), 145.80s (C-q), 156.77s (OCONH), 161.65 (C-l), 162.13 (C-d), 163.67 (C-1'''), 173.36 (C-1), 194.37 (C-h); MS (FAB-) m/z 862 (M^-); HRMS (FAB-) m/z calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{60}\text{N}_7\text{O}_9\text{S}$ [M^-] 862.4173, found 862.4176.

ウエスタンブロットによるタンパク質の検出

•タンパク質抽出液の調製

A549細胞またはPC12細胞を 1×10^5 cells/mLの濃度で24ウェルプレートに500 μ Lずつ播種して、インキュベーター内で24時間インキュベートする。培地を交換後、細胞培養培地内での濃度が40 μ Mになるように各サンプルのDMSO溶液を添加して2時間インキュベーターで培養する。その後、クリーンベンチ内で30分間UVを照射する。照射後、培地を除去し、PBS buffer 500 μ Lで2回洗浄後、RIPA buffer [ナカライテスク] 100 μ Lでかきとり、エッペンドルフチューブに移す。超音波で沈殿を溶解後、遠心分離 (10min, 5 °C, 15000rpm) した上清を新たなエッペンドルフチューブに移して、細胞からのタンパク質抽出液を調製した。

•ウエスタンブロットによるタンパク質抽出液の解析

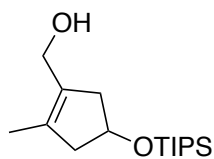
調製したタンパク質抽出液を2% SDSサンプルbufferと等量ずつ混合して3分間煮沸したものに1%クマシーブリリアントブルー R-250水溶液を少量添加したサンプル15 μ Lと分子量マーカー3.0 μ Lを、10%ポリアクリルアミドゲルにアプライして30 mAで1時間、SDS-PAGEを行った。SDS-PAGE後のゲルとPVDF膜を張り合わせ、メタノールバッファー中、150 mAで2時間、室温で転写を行った。転写後、PVDF膜をTBS-Tween 20で2回、5分間の洗浄した後、ハイブリバックにBlocking One 2.0 mLとPVDF膜を入れて、室温で30分間振とうした。PVDF膜をバックから取り出し、TBS-Tween 20で5分間の洗浄を3回繰り返した。洗浄後のPVDF膜をBlocking Oneで2000倍希釈したStreptavidin-HRPでパックし、4 °Cで終夜振とうした。パックしたPVDF膜を取り出しTBS-Tween 20で5分間の洗浄を3回繰り返した。洗浄後、PVDF膜をラップ上に移し、水分を取り、HRP substrate peroxide solution 250 μ L, HRP substrate luminol reagent 250 μ L [Millipore], 及び滅菌蒸留水 500 μ Lをよく混和した溶液を滴下し、1分間放置した後、余分な水分を吸い取り、PVDF膜をImage reader LAS-4000 mini [Fuji film]で解析した。

•抽出タンパク質の分画

6ウェルプレートに 1×10^5 cells/mLの濃度でA549細胞を2 mLずつ播種する。Mem-PER plus Membrane Protein Extraction Kit [Thermo Fisher]のプロトコールにしたがってタンパク質を抽出し，細胞膜画分と細胞質画分に分画したタンパク質抽出液を調製した。

第三章

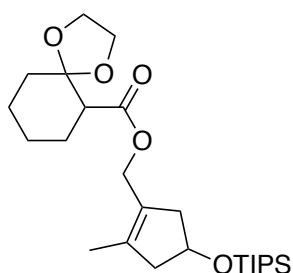
(2-Methyl-4-((triisopropylsilyl)oxy)cyclopent-1-en-1-yl)methanol (67)



67

既知法に従って調製した **71**⁴⁸⁾ (2.80 g, 16.5 mmol)の DMF (33 mL)溶液にイミダゾール (2.80 g, 41.1mmol), トリイソプロピルシリルクロリド (3.80 mL, 17.9 mmol)を順次加え, そのままの室温で 24 時間攪拌した. 蒸留水を加えた後, ヘキサン/酢酸エチル(4:1)混合溶媒で抽出し, 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣の THF (41 mL)溶液に-78 °C で水素化ジイソプロピルアルミニウム (1M トルエン溶液 41 mL, 41.0 mmol)を加え, そのままの温度で 30 分攪拌した. メタノール (32 mL)と 30% ロッシェル塩水溶液 (48 mL)を加えて室温で 24 時間攪拌した後, 酢酸エチルで抽出し, 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 5:1)で精製して, **67** (4.353 g, 93%)を得た. **67**: colorless oil; FT IR (neat) 3314, 2941, 2865, 1463 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz in CDCl₃) δ 1.03-1.10 (21H, m), 1.67 (3H, s), 2.35 (1H, dt, *J* = 16.6, 1.3 Hz), 2.44 (1H, dd, *J* = 16.1, 1.3 Hz), 2.62 (1H, dd, *J* = 16.6, 7.1 Hz), 2.77 (1H, dd, *J* = 16.0, 7.1 Hz), 4.16 (2H, s), 4.56 (1H, m); ¹³C NMR (125 MHz in CDCl₃) δ 12.08, 13.75, 17.96, 44.48, 48.98, 59.02, 70.78, 131.77, 133.36; MS (CI⁺) *m/z* 283 [M-H]⁺; HRMS (CI⁺) *m/z* calcd for C₁₆H₃₁O₂Si: 283.2088, found 283.2094.

(2-Methyl-4-((triisopropylsilyl)oxy)cyclopent-1-en-1-yl)methyl 1, 4-dioxaspiro[4. 5]decane-6-carboxylate (66)

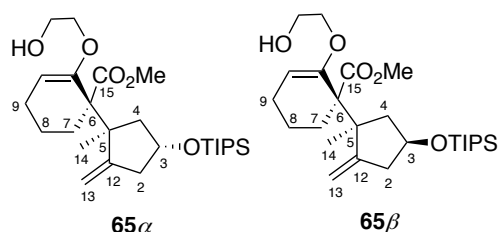


66

67 (9.775 g, 30.54 mmol)の DMF (30 mL)溶液に 1,4-Dioxaspiro[4.5]decane-6-carboxylic acid⁴⁹⁾ (6.255 g, 33.59 mmol), DMAP (373 mg, 3.05 mmol), EDC•HCl (7.610 g, 39.70 mmol) を順次加え、室温で 24 時間攪拌した。蒸留水を加えた後、ヘキサン:酢酸エチル(4:1) 混合溶媒で抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 30:1 から 15:1)で精製して、**66** (13.710 g, 99%)を得た。

66: colorless oil; FT IR (neat) 2957, 2723, 1739, 1463 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.01-1.08 (21H, m), 1.29-1.32 (1H, m), 1.44-1.49 (1H, m), 1.58-1.71 (3H, m), 1.69 (3H, s), 1.80-1.95 (3H, m), 2.35 (2H, m), 2.60 (1H, dd, $J = 15.8, 6.8$ Hz), 2.65-2.71 (2H, m), 3.84-3.96 (4H, m), 4.54 (1H, m), 4.62 (2H, m); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 12.04, 13.87, 17.93, 22.86, 22.91, 23.34, 27.30, 34.53, 34.59, 44.85, 44.87, 48.846, 48.854, 49.88, 60.50, 64.46, 64.81, 64.84, 70.70, 108.54, 108.55, 127.50, 127.52, 135.84, 135.88, 172.36; MS (CI^+) m/z 451 $[\text{M}-\text{H}]^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{O}_5\text{Si}$: 451.2885, found 451.2887.

Methyl (*S)-2-(2-hydroxyethoxy)-1-((1*S**,4*R**)-1-methyl-2-methylene-4-((triisopropylsilyloxy)cyclopentyl)cyclohex-2-ene-1-carboxylate (**65 α**) and Methyl (*S**)-2-(2-hydroxyethoxy)-1-((1*S**,4*S**)-1-methyl-2-methylene-4-((triisopropylsilyloxy)cyclopentyl)cyclohex-2-ene-1-carboxylate (**65 β**)**



The numbering of positions is according to the skeleton of natural spirotenuipesine A

ジイソプロピルアミン (7.1 mL, 50.3 mmol)の THF (80 mL)溶液に -78 $^{\circ}\text{C}$ で *n*-ブチルリチウム (1.6 M ヘキサン溶液 31.3 mL, 50.1 mmol)を加え、 0 $^{\circ}\text{C}$ に昇温して 20 分攪拌した。再度、 -78 $^{\circ}\text{C}$ に冷却したのちに **66** の THF (20 mL)溶液を加えてそのままの温度で 30 分攪拌した後、トリメチルシリルクロリド (6.3 mL, 49.6 mmol)を加え、徐々に室温に昇温後、反応溶液を加熱して 24 時間加熱還流させた。室温で放冷したのちに 4M 水

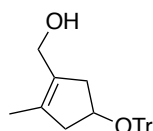
酸化ナトリウム水溶液 (10 mL)とメタノール (10 mL)を加えて、室温で終夜攪拌した後、1M 塩酸を加えて中和後、酢酸エチルで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 4:1 から酢酸エチルのみ)で精製して低極性の不純物を除去した。得られた混合物のトルエン/メタノール (3:1, 32 mL)溶液に TMS ジアゾメタン (2M エーテル溶液 5.0 mL, 10.0 mmol)を加えて室温で 30 分攪拌する。気泡の発生が消失するまで酢酸を加えて攪拌したのちに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた。酢酸エチルで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 15:1 から 10:1)で精製して、**65 α** (1.413 g, 30%), **65 β** (1.510 g, 32%)を得た。

65 α : colorless oil; FT IR (neat) 3486, 3060, 2946, 2866, 2722, 1726, 1656, 1463 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.00-1.06 (21H, m, TIPS), 1.14-1.23 (1H, m, H-8a), 1.40 (1H, t, $J = 13.2$ Hz, H-7a), 1.48 (3H, s, H-14), 1.67 (1H, m, H_2O peak overlapped, H-8b), 1.75 (1H, dd, $J = 13.9, 1.9$ Hz, H-4a), 1.95-2.08 (2H, m, H-9), 2.22 (1H, dd, $J = 13.9, 4.4$ Hz, H-4b), 2.41 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-7b), 2.45 (1H, d, $J = 13.3$ Hz, H-2a), 2.58 (1H, m, H-2b), 3.04 (1H, br, OH), 3.70 (3H, s, OMe), 3.77-3.87 (4H, m, $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 4.30 (1H, t, $J = 4.6$ Hz, H-3), 4.79 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-10), 4.99 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-13a), 5.01 (1H, s, H-13b); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 12.05 (TIPS), 18.01 (TIPS), 18.02 (TIPS), 20.61 (C-8), 24.01 (C-9), 29.16 (C-14), 30.78 (C-7), 47.87 (C-2), 48.67 (C-4), 49.18 (C-5), 51.66 (OMe), 57.60 (C-6), 60.76 ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 68.28 ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 71.28 (C-3), 99.90 (C-10), 108.84 (C-13), 154.90 (C-11), 156.91 (C-12), 175.21 (C-15); MS (CI^+) m/z 467 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{47}\text{O}_5\text{Si}$; 467.3187, found 467.3185.

65 β : colorless oil; FT IR (neat) 3477, 2943, 2866, 1723, 1656, 1462 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.03-1.09 (21H, m, TIPS), 1.21-1.25 (1H, m, H-8a), 1.27 (3H, s, H-14), 1.65-1.76 (2H, m, H-7a, 8b), 1.86 (1H, dd, $J = 12.5, 7.4$ Hz, H-4a), 1.98-2.10 (2H, m, H-9), 2.39 (2H, m, H-4b, 7b), 2.61 (1H, dd, $J = 14.9, 7.2$ Hz, H-2a), 2.69 (1H, br, H-2b), 3.29 (1H, br, OH), 3.69 (3H, s, OMe), 3.72-3.87 (4H, m, $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 4.28 (1H, m, H-3), 4.80 (1H, dd, $J = 5.0, 2.5$ Hz, H-10), 4.89 (1H, s, H-13a), 4.92 (1H, s, H-13b); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 12.11

(TIPS), 17.93 (TIPS), 20.61 (C-8), 23.89 (C-9), 28.07 (C-14), 30.95 (C-7), 46.17 (C-2), 48.43 (C-5), 48.88 (C-4), 51.65 (OMe), 56.99 (C-6), 61.20 (HOCH₂CH₂O-), 68.73 (HOCH₂CH₂O-), 70.51 (C-3), 99.46 (C-10), 107.86 (C-13), 155.04 (C-11), 155.64 (C-12), 175.25 (C-15); MS (CI⁺) *m/z* 467 [M+H]⁺; HRMS (CI⁺) *m/z* calcd for C₂₆H₄₇O₅Si: 467.3187, found 467.3194.

(2-Methyl-4-(trityloxy)cyclopent-1-en-1-yl)methanol (72)

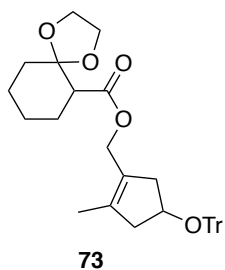


72

71 (550 mg, 3.23 mmol)のピリジン (6.4 mL)溶液に室温で DMAP (39 mg, 0.319 mmol), トリチルクロリド (1.350 g, 4.84 mmol)を順次加え, 100 °C に加熱して 6 時間攪拌した. 室温まで放冷した後, 蒸留水を加え, ヘキサン/酢酸エチル(4:1)混合溶媒で抽出し, 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 60:1)で精製して, 得られた生成物 (4.353 g) の THF (5.7 mL)溶液に-78 °C で水素化ジイソプロピルアルミニウム (1M トルエン溶液 6.3 mL, 6.30 mmol)を加え, そのままの温度で 30 分攪拌した. メタノール (6.0 mL), 30% ロッシェル塩水溶液 (8.0 mL)を加えて室温で 12 時間攪拌した後, 酢酸エチルで抽出し, 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 15:1)で精製して, **72** (934 mg, 2 steps 78%)を得た.

72:colorless oil; FT IR (neat) 3313, 3057, 2926, 1596, 1490, 1447 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz in CDCl₃) δ 1.06 (1H, br), 1.53 (3H, s), 1.99 (1H, dd, *J* = 17.0, 7.9 Hz), 2.15 (1H, m), 2.23-2.32 (2H, m), 4.03 (2H, s), 4.30 (1H, m), 7.22 (3H, m), 7.28 (6H, m), 7.48 (6H, m); ¹³C NMR (125 MHz in CDCl₃) δ 13.57, 41.87, 46.25, 58.81, 73.01, 87.19, 126.84, 127.76, 128.80, 131.58, 133.35, 145.15

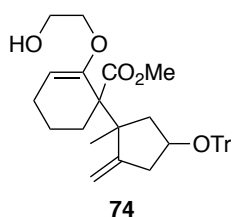
(2-Methyl-4-(trityloxy)cyclopent-1-en-1-yl)methyl 1,4-dioxaspiro[4.5]decane-6-carboxylate (73)



66と同様の手順に従って、**72** (17.8mg, 0.025 mmol)から**73** (520 mg, 97%)を得た

73: colorless oil; FT IR (neat) 3058, 3031, 2936, 2890, 1732, 1596, 1491, 1448, cm^{-1} ;
 ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.30 (1H, m), 1.47 (1H, m), 1.55 (3H, s), 1.59-1.67 (3H, m), 1.79-1.87 (2H, m), 1.88-2.00 (2H, m), 2.12-2.29 (3H, m), 2.63 (1H, dd, $J = 8.5, 5.1$ Hz), 3.81-3.93 (4H, m), 4.29 (1H, m), 4.47-4.54 (2H, m), 7.22 (3H, m), 7.27 (6H, m), 7.47 (6H, m); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 13.72, 22.92, 22.95, 23.36, 27.31, 34.56, 34.64, 42.24, 46.10, 46.15, 49.88, 60.36, 64.48, 64.83, 64.86, 72.95, 72.98, 87.16, 87.17, 108.53, 126.84, 127.30, 127.34, 127.74, 128.79, 135.84, 135.87, 145.12, 172.29, 172.31; MS (CI^+) m/z 538 $[\text{M}]^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{O}_5$: 538.2719, found 538.2715..

Methyl 2-(2-hydroxyethoxy)-1-(1-methyl-2-methylene-4-(trityloxy)cyclopentyl)cyclohex-2-ene-1-carboxylate (74)

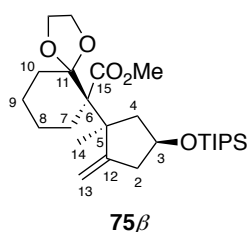


65と同様の手順に従って、**73** (100 mg, 0.186 mmol)から**74** (55 mg, 54%)を得た

74: colorless oil; FT IR (neat) 3490, 3086, 3058, 2935, 2874, 2840, 1718, 1656, 1597, 1491, 1448 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 0.99 (3H, s), 1.01 (1H, dd, $J = 13.0, 6.8$ Hz), 1.08-1.21 (3H, m), 1.26-1.37 (2H, m), 1.47 (3H, s), 1.53-1.64 (3H, m), 1.83-2.02 (6H, m), 2.06 (1H, d, $J = 16.2$ Hz), 2.27-2.35 (3H, m), 2.44 (1H, br), 2.91 (1H, br), 2.96 (1H, br), 3.630 (3H, s), 3.634 (3H, s), 3.65-3.70 (2H, m), 3.75-3.81 (6H, m), 3.92 (1H, m), 4.06 (1H, m), 4.69-4.75 (3H, m), 4.81 (1H, s), 4.88 (1H, s), 4.94 (1H, s), 7.19-7.23 (6H, m), 7.25-7.30 (12H, m), 7.46

(6H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.49 (6H, d, $J = 7.5$ Hz); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 20.54, 23.85, 23.92, 27.94, 28.73, 30.84, 44.14, 44.97, 45.77, 46.10, 47.57, 48.99, 51.61, 51.63, 56.78, 57.31, 60.58, 60.96, 67.93, 68.24, 72.25, 73.06, 86.93, 87.16, 99.53, 99.68, 108.09, 126.76, 126.86, 127.69, 127.73, 128.68, 128.88, 145.06, 145.17, 154.48, 154.67, 156.92, 175.02, 175.10; MS (CI^+) m/z 553 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{41}\text{O}_5$: 553.2949, found 553.2959.

Methyl (S^*)-6-(($1S^*$, $4R^*$)-4-hydroxy-1-methyl-2-methylenecyclopentyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-6-carboxylate (75β)



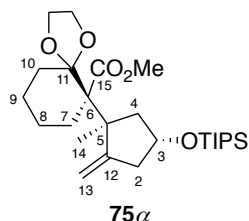
The numbering of positions is according to the skeleton of natural spirotenuipesine A

65 β (910 mg, 1.95 mmol)のジクロロメタン (6.5 mL)溶液に PPTS (49 mg, 0.195 mmol) を室温で加え、そのままの温度で 24 時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた後、ジクロロメタンで抽出し、得られた有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 20:1 から 10:1)で精製して、**75 β** (701 mg, 77%), **65 β** (184 mg, 20%)を得た。

75 β : white solid; FT IR (neat) 2944, 2866, 1723, 1650, 1464, 1432 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.05 (21H, m, TIPS), 1.23 (3H, s, H-14), 1.38 (1H, dt, $J = 13.0, 3.6$ Hz, H-10a), 1.47-1.68 (6H, m, H-4a, 8, 9 10b, H_2O peak overlapped), 2.02 (1H, dt, $J = 13.1, 4.0$ Hz, H-7a), 2.13 (1H, d, $J = 14.0$ Hz, H-7b), 2.32 (1H, m, H-2a), 2.48 (1H, dd, $J = 13.5, 5.8$ Hz, H-2b), 2.84 (1H, dd, $J = 13.0, 10.0$ Hz, H-4), 3.72 (3H, s, OMe), 3.85 (1H, dd, $J = 14.9, 7.5$ Hz, H-acetal), 3.90 (1H, dd, $J = 13.5, 7.5$ Hz, H-acetal), 4.04-4.13 (3H, m, H-3, acetal), 4.61 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H-13a), 4.96 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-13b); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 12.18 (TIPS), 18.02 (TIPS), 18.03 (TIPS), 22.55 (C-8 or C-9), 22.60 (C-8 or C-9), 29.05 (C-14), 29.98 (C-7), 33.50 (C-10), 47.51 (C-4), 47.72 (C-2), 48.86 (C-5), 51.03 (OMe), 59.89 (C-6), 61.93

(C-acetal), 63.72 (C-acetal), 70.40 (C-3), 109.42 (C-13), 112.72 (C-11), 155.70 (C-12), 172.73 (C-15); MS (CI⁺) *m/z* 467 [M+H]⁺; HRMS (CI⁺) *m/z* calcd for C₂₆H₄₇O₅Si: 467.3187, found 467.3203.

Methyl (S^{*})-6-((1S^{*},4R^{*})-1-methyl-2-methylene-4-((triisopropylsilyloxy)cyclopentyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-6-carboxylate (75 α)

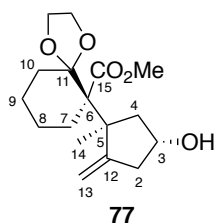


The numbering of positions is according to the skeleton of natural spirotenuipesine A

75 β と同様の手順に従って、**65 α** (1.350 g, 2.89 mmol)から **75 α** (1.069 g, 79%), **65 α** (234 mg, 17%)を得た。

75 α : white solid; FT IR (neat) 3079, 2946, 2714, 1730, 1650, 1464 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz in CDCl₃) δ 1.02-1.04 (21H, m, TIPS), 1.36 (1H, dt, *J* = 12.6, 4.2 Hz, H-10a), 1.41 (3H, s, H-14), 1.43-1.59 (5H, m, H-4a, 8, 9), 1.65 (1H, d, *J* = 15.0 Hz, H-10b), 1.87 (1H, dt, *J* = 12.6, 4.3 Hz, H-7a), 2.12 (1H, d, *J* = 13.2 Hz, H-7b), 2.31 (1H, d, *J* = 14.8 Hz, H-2a), 2.47 (1H, m, H-2b), 3.12 (1H, dd, *J* = 14.3, 5.0 Hz, H-4b), 3.71 (3H, s, OMe), 3.83 (1H, dd, *J* = 14.5, 7.4 Hz, H-acetal), 3.88 (1H, dd, *J* = 14.4, 7.3 Hz, H-acetal), 4.00-4.06 (2H, m, H-acetal), 4.29 (1H, t, *J* = 4.5 Hz, H-3), 4.69 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-13a), 5.01 (1H, s, H-13b); ¹³C NMR (125 MHz in CDCl₃) δ 12.07 (TIPS), 18.02 (TIPS), 22.59 (C-8), 22.71 (C-9), 29.29 (C-14), 29.85 (C-7), 33.23 (C-10), 47.80 (C-2), 48.27 (C-4), 49.69 (C-5), 50.99 (OMe), 60.31 (C-6), 61.84 (C-acetal), 63.68 (C-acetal), 71.37 (C-3), 109.36 (C-13), 112.78 (C-11), 157.45 (C-12), 172.75 (C-15); MS (CI⁺) *m/z* 467 [M+H]⁺; HRMS (CI⁺) *m/z* calcd for C₂₆H₄₇O₅: 467.3187, found 467.3184.

Methyl (S^{*})-6-((1S^{*},4R^{*})-4-hydroxy-1-methyl-2-methylenecyclopentyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane-6-carboxylate (77)

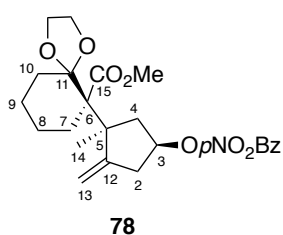


The numbering of positions is according to the skeleton of natural spirotenuipesine A

75 α (1.00 g, 2.14 mmol)の THF (4.3 mL)溶液に TBAF (1M THF 溶液, 2.8 mL, 2.80 mmol) を室温に加え, そのままの温度で 48 時間攪拌した. 飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた後, 酢酸エチルで抽出し, 得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (ヘキサン:酢酸エチル 1:1 から 1:5)で精製して, **75** (665 mg, quant.)を得た.

75: white solid; FT IR (neat) 3501, 2946, 2885, 1716, 1446 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.34 (1H, dt, $J = 12.5, 4.4$ Hz, H-10a), 1.41 (3H, s, H-14), 1.42-1.53 (5H, m, H-4a, H-8, H-9a, OH), 1.57 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, H-9b), 1.65 (1H, d, $J = 14.3$ Hz, H-10b), 1.85 (1H, dt, $J = 12.8, 3.8$ Hz, H-7a), 2.08 (1H, d, $J = 13.7$ Hz, H-7b), 2.30 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, H-2a), 2.54 (1H, dt, $J = 15.3, 2.1$ Hz, H-2b), 3.22 (1H, dd, $J = 14.9, 4.9$ Hz, H-4) 3.71 (3H, s, OMe), 3.82 (1H, dd, $J = 14.4, 7.7$ Hz, H-acetal), 3.88 (1H, dd, $J = 13.8, 7.5$ Hz, H-acetal), 3.98-4.06 (2H, m, H-acetal), 4.27 (1H, t, $J = 4.4$ Hz, H-3), 4.74 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-13a), 5.09 (1H, s, H-13b); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 22.47 (C-9), 22.57 (C-8), 29.75 (C-7), 29.92 (C-14), 33.17 (C-10), 47.07 (C-2), 47.45 (C-4), 49.31 (C-5), 51.10 (OMe), 60.17 (C-6), 61.80 (C-acetal), 63.63 (C-acetal), 70.92 (C-3), 110.53 (C-13), 112.64 (C-11), 156.76 (C-12), 172.50 (C-15); MS (CI^+) m/z 311 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{O}_5$: 311.1853, found 311.1849.

Methyl (S*)-6-((1S*,4S*)-1-methyl-2-methylene-4-((4-nitrobenzoyl)oxy)cyclopentyl)-1,4-dioxaspiro[4. 5]decane-6-carboxylate (78)

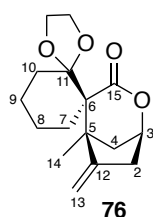


The numbering of positions is according to the skeleton of natural spirotenuipesine A

77 (550 mg, 1.77 mmol)のトルエン(18 mL)溶液にトリフェニルホスフィン (651 mg, 2.48 mmol), *p*-ニトロ安息香酸 (415 mg, 2.48 mmol)を順次加え, 0 °C に冷却後, アゾジカルボン酸ジエチル (2.2M トルエン溶液 1.13 mL, 2.49 mmol)を加え, そのままの温度で30分攪拌した. 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた後, 酢酸エチルで抽出し, 得られた有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄後, 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン: 酢酸エチル 10:1 から 4:1)で精製して, **78** (710 mg, 87%)を得た.

78: white solid; FT IR (neat) 2944, 2883, 1717, 1526 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.30 (3H, s, H-14), 1.37 (1H, dt, $J = 12.5, 4.3$ Hz, H-10a), 1.45-1.54 (3H, m, H-8, H-9a), 1.61 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-9b), 1.67 (1H, d, $J = 13.9$ Hz, H-10b), 1.91-2.02 (2H, m, H-4a, 7a), 2.17 (1H, d, $J = 13.3$ Hz, H-7b), 2.51 (1H, dd, $J = 13.5, 11.0$ Hz, H-2a), 2.79 (1H, dd, $J = 13.6, 6.3$ Hz, H-2b), 3.08 (1H, dd, $J = 13.0, 10.4$ Hz, H-4b), 3.72 (3H, s, OMe), 3.83 (1H, dd, $J = 14.8, 7.4$ Hz, H-acetal), 3.89 (1H, dd, $J = 14.3, 6.9$ Hz, H-acetal), 4.06 (2H, m, H-acetal), 4.74 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-13a), 5.06 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-13b), 5.16 (1H, m, H-3), 8.17 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-Ar), 8.25 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-Ar); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 22.42 (C-8), 22.51 (C-9), 28.88 (C-14), 29.87 (C-7), 32.91 (C-10), 43.11 (C-2 or C-4), 43.12 (C-2 or C-4), 48.58 (C-5), 51.21 (OMe), 59.71 (C-6), 61.70 (C-acetal), 63.56 (C-acetal), 73.65 (C-3), 111.00 (C-13), 112.53 (C-11), 123.36 (C-Ar), 130.61 (C-Ar), 135.65 (C-Ar), 150.30 (C-Ar), 153.14 (C-12), 164.46 ($-\text{COO}-p\text{NO}_2\text{Ph}$), 172.35 (C-15); MS (CI^+) m/z 459 [M] $^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{NO}_8$: 459.1893, found 459.1891.

(1S*,2S*,5S*)-1-Methyl-7-methylene-4-oxadispiro[bicyclo[3.2.1]octane-2,1'-cyclohexane-2',2''-[1,3]dioxolan]-3-one (76)



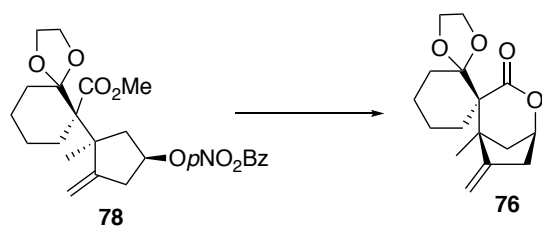
The numbering of positions is according to the skeleton of natural spirotenuipesine A

75 β (500 mg, 1.07 mmol)の THF (2.1 mL)溶液に TBAF (1M THF 溶液, 1.6 mL, 1.6 mmol)を室温で加え, そのままの温度で 12 時間攪拌した. その後, メタノール (2.1 mL), ナトリウムメトキシド (28% メタノール溶液, 1.03mL, 5.34 mmol)を室温で加え, そのままの温度で 9 時間攪拌した. 飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた後, 酢酸エチルで抽出し, 得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 10:1 から 5:1)で精製して, **76** (269 mg, 90%)を得た.

76: white solid; FT IR (neat) 2925, 2863, 1730, 1653, 1448, 1421 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.32-1.39 (2H, m, H-4a, H-9a), 1.40 (3H, s, H-14), 1.49-1.57 (2H, m, H-8a, 10a), 1.65-1.69 (1H, m, H-9b), 1.89 (1H, d, $J = 13.3$ Hz, H-10b), 1.97 (1H, dt, $J = 12.8, 3.8$ Hz, H-7a), 2.05 (1H, tq, $J = 12.8, 3.8$ Hz, H-8b), 2.12 (1H, dd, $J = 13.0, 2.6$ Hz, H-4b), 2.24 (1H, dt, $J = 12.8, 3.8$ Hz, H-7b), 2.59 (1H, dd, $J = 17.9, 5.2$ Hz, H-2a), 2.88 (1H, dd, $J = 17.9, 2.5$ Hz, H-2b), 3.60 (1H, dd, $J = 14.7, 7.7$ Hz, H-acetal), 3.80 (1H, dd, $J = 13.3, 6.7$ Hz, H-acetal), 3.86-3.89 (2H, m, H-acetal), 4.64 (1H, t, $J = 4.1$ Hz, H-3), 4.77 (1H, s, H-13a), 4.86 (1H, s, H-13b); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 21.03 (C-8), 22.74 (C-9), 23.23 (C-14), 31.18 (C-7), 31.22 (C-10), 40.51 (C-2), 43.65 (C-4), 48.14 (C-5), 58.21 (C-6), 62.38 (C-acetal), 63.79 (C-acetal), 76.05 (C-3), 106.82 (C-13), 112.38 (C-11), 154.95 (C-12), 172.06 (C-15); MS (CI^+) m/z 279 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_4$: 279.1591, found 279.1591.

Crystallographic data for the structure of **76** have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre as supplementary publication numbers CCDC 2039727.

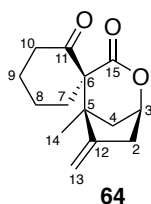
78から76の合成



78 (690 mg, 1.50 mmol)の THF (2.5 mL)溶液にメタノール (1.06 mL), ナトリウムメトキシ

シド (28% メタノール溶液, 1.44 mL, 7.46 mmol)を室温で加え, そのままの温度で2時間攪拌した. 飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた後, 酢酸エチルで抽出し, 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 5:1)で精製して, **76** (357 mg, 85%)を得た.

(1S*,2S*,5S*)-1-Methyl-7-methylene-4-oxaspiro[bicyclo[3.2.1]octane-2,1'-cyclohexane]-2',3-dione (64)



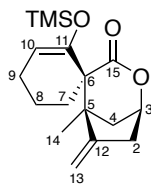
The numbering of positions is according to the skeleton of natural spirotenuipesine A

76 (600 mg, 2.156 mmol)のアセトン/水(10:1, 7.2 mL)溶液に *p*-トルエンスルホン酸一水和物 (123 mg, 0.647 mmol)を室温で加え, 60 °C に加熱して16時間攪拌した. 室温まで放冷してから飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた後, 酢酸エチルで抽出し, 得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 2:1)で精製して, **64** (506 mg, quant.)を得た

64: white solid; FT IR (neat) 3075, 2952, 2871, 1736, 1700, 1656, 1460, 1422 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz in CDCl₃) δ 1.47 (3H, s, H-14), 1.55 (1H, dd, *J* = 13.2, 3.0 Hz, H-4a), 1.76-1.93 (3H, m, H-8, 9a), 1.98-2.02 (1H, m, H-9b), 2.16-2.30 (3H, m, H-4b, 7a, 10a), 2.49 (1H, ddd, *J* = 14.5, 11.1, 5.3 Hz, H-7b), 2.63-2.69 (2H, m, H-2a, 10b), 2.91 (1H, dd, *J* = 18.4, 2.4 Hz, H-2b), 4.76 (1H, t, *J* = 3.6 Hz, H-3), 4.92 (1H, t, *J* = 2.4 Hz, H-13a), 5.02 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-13b); ¹³C NMR (125 MHz in CDCl₃) δ 21.94 (C-14), 22.28 (C-8), 24.87 (C-9), 34.07 (C-7), 40.39 (C-2), 41.74 (C-4), 42.46 (C-10), 48.80 (C-5), 68.24 (C-6), 76.74 (C-3, overlapped CHCl₃ peak), 110.20 (C-13), 151.80 (C-12), 172.74 (C-15), 206.97 (C-11); MS (CI⁺) *m/z* 234 [M]⁺; HRMS (CI⁺) *m/z* calcd for C₁₄H₁₈O₃: 234.1256, found 234.1256.

(1S*,2S*,5S*)-1-Methyl-7-methylene-2'-((trimethylsilyl)oxy)-4-oxaspiro[bicyclo[3.2.1]octa

ne-2,1'-cyclohexan]-2'-en-3-one from 64

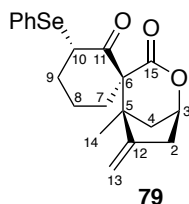


The numbering of positions is according to the skeleton of natural spirotenuipesine A

64 (1.380 g, 5.89 mmol)のジクロロメタン (20 mL)溶液を 0 °C に冷却後、トリエチルアミン (2.50 mL, 17.94 mmol), TMSOTf (1.60 mL, 8.85 mmol)を加え、室温に昇温して 2.5 時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた後、ジクロロメタンで抽出し、得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルパッドで濾過して、シリルエノールエーテル (1.799 g, quant.)を得た。

white solid; FT IR (neat) 3079, 3044, 2959, 2841, 1734, 1659, 1456, 1443, 1424 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 0.12 (9H, s, TMS), 1.30 (3H, s, H-14), 1.42 (1H, dd, $J = 13.0, 3.0$ Hz, H-4a), 1.64-1.69 (2H, m, H-8), 1.98-2.07 (3H, m, H-7a, 9), 2.12-2.19 (1H, m, H-7b), 2.30 (1H, dd, $J = 13.0, 2.4$ Hz, H-4b), 2.64 (1H, dt, $J = 18.1, 2.4$ Hz, H-2a), 2.81 (1H, dd, $J = 18.1, 2.4$ Hz, H-2b), 4.72 (1H, t, $J = 3.4$ Hz, H-3), 4.86 (1H, s, H-13a), 4.89 (1H, s, H-13b), 4.97 (1H, t, $J = 4.2$ Hz, H-10); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ -0.07 (C-TMS), 19.79 (C-8), 21.05 (C-14), 23.29 (C-7), 33.22 (C-9), 40.70 (C-4), 40.96 (C-2), 49.32 (C-5), 57.73 (C-6), 77.25 (C-3, overlapped CHCl_3 peak), 105.92 (C-10), 108.86 (C-13), 147.82 (C-11), 154.20 (C-12), 175.32 (C-15); MS (CI^+) m/z 306 [$\text{M}]^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{Si}$: 306.1651, found 306.1643.

(1S*,2S*,3'S*,5S*)-1-Methyl-7-methylene-3'-(phenylselanyl)-4-oxaspiro[bicyclo[3.2.1]octane-2,1'-cyclohexane]-2',3-dione (79)

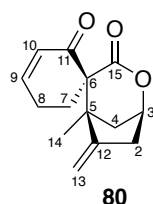


The numbering of positions is according to the skeleton of natural spirotenuipesine A

シリルエノールエーテル (526 mg, 1.716 mmol)のジクロロメタン (33 mL)溶液を $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ に冷却後、フェニルセレニルクロライド (347 mg, 1.802 mmol)のジクロロメタン (10 mL)溶液を加え、そのままの温度で 15 分撹拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた後、ジクロロメタンで抽出し、得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 10:1)で精製して、**79** (494 mg, 74%)を得た。

79: white solid; FT IR (neat) 3054, 2944, 2866, 1723, 1656, 1577, 1477, 1438 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.46 (1H, dd, $J = 13.2, 2.3$ Hz, H-4a), 1.46 (3H, s, H-14), 1.71-1.75 (1H, m, H-8a), 1.81-1.94 (2H, m, H-8b, 9a), 2.10 (1H, dt, $J = 11.2, 4.1$ Hz, H-7a), 2.28-2.33 (1H, m, H-9b), 2.36-2.40 (2H, m, H-4b, 7b), 2.68 (1H, dt, $J = 18.1, 2.0$ Hz, H-2a), 2.83 (1H, dd, $J = 18.1, 2.0$ Hz, H-2b), 4.76 (1H, s, H-3), 5.03 (1H, dd, $J = 10.8, 6.5$ Hz, H-10), 5.24 (1H, s, H-13a), 5.54 (1H, s, H-13b), 7.25-7.28 (3H, m, H-Ar), 7.57-7.58 (2H, m, H-Ar); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 20.27 (C-14), 21.71 (C-8), 35.04 (C-7), 35.13 (C-9), 40.69 (C-4), 41.06 (C-2), 48.79 (C-5), 52.91 (C-10), 65.66 (C-6), 78.49 (C-3), 115.32 (C-13), 127.71 (C-Ar), 128.48 (C-Ar), 129.02 (C-Ar), 135.00 (C-Ar), 148.64 (C-12), 170.56 (C-15), 202.53 (C-11); MS (CI^+) m/z 390 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{Se}$: 390.0734, found 390.0730.

(1S*,2S*,5S*)-1-Methyl-7-methylene-4-oxaspiro[bicyclo[3.2.1]octane-2,1'-cyclohexan]-3'-ene-2',3-dione (80)



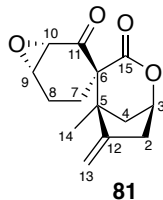
The numbering of positions is according to the skeleton of natural spirotenuipesine A

79 (1.000 g, 2.57 mmol)の THF (13 mL)溶液を $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ に冷却後、炭酸水素ナトリウム (1.082 g, 12.88 mmol), 30%過酸化水素水 (1.46 mL, 12.88 mmol)加え、室温に昇温して 30 分撹拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液/飽和チオ硫酸ナトリウム(1:1)水溶液を加えた後、酢酸エチルで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 3:1 から 2:1)で精製し

て, **80** (490 mg, 82%)を得た.

80: pale yellow solid; FT IR (neat) 2986, 2930, 1721, 1659, 1467, 1416 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.40 (3H, s, H-14), 1.60 (1H, dd, $J = 13.2, 3.0$ Hz, H-4a), 2.28 (1H, dd, $J = 13.2, 2.6$ Hz, H-4b), 2.43 (1H, ddd, $J = 14.7, 5.9, 2.6$ Hz, H-7a), 2.51-2.55 (2H, m, H-8), 2.66 (1H, m, H-2a), 2.82 (1H, dt, $J = 14.8, 8.5$ Hz, H-7b), 2.96 (1H, dd, $J = 18.4, 2.4$ Hz, H-2b), 4.74 (1H, t, $J = 2.3$ Hz, H-13a), 4.78 (1H, t, $J = 3.6$ Hz, H-3), 5.01 (1H, s, H-13b), 6.10 (1H, dt, $J = 10.3, 2.1$ Hz, H-10), 6.93 (1H, dt, $J = 10.3, 3.9$ Hz, H-9); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 20.10 (C-14), 24.50 (C-8), 29.19 (C-7), 40.31 (C-2), 41.04 (C-4), 49.40 (C-5), 65.13 (C-6), 77.23 (C-3) 110.50 (C-13), 130.28 (C-10), 149.06 (C-9), 152.07 (C-12), 172.83 (C-15), 194.42 (C-11); MS (CI^+) m/z 233 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{O}_3$: 233.1172, found 233.1186.

(1S*, 1'S*, 2S*, 5S*, 6'S*)-1-Methyl-7-methylene-4, 7'-dioxaspiro[bicyclo[3. 2.1]octane-2, 3'-bicyclo[4. 1. 0]heptane]-2', 3-dione (81**)**



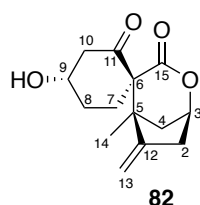
The numbering of positions is according to the skeleton of natural spirotenuipesine A

81 (400 mg, 1.61 mmol)の THF (4.8mL)溶液を 0°C に冷却後, 4M 水酸化ナトリウム水溶液 (0.86 mL, 3.44 mmol), 68% *t*-ブチルヒドロペルオキシド (0.46 mL, 3.47 mmol)を加え, そのままの温度で 4 時間攪拌した. 飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加えた後, 酢酸エチルで抽出し, 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 2:1 から 1:1)で精製して, **90** (398 mg, 93%)を得た.

81: white solid; FT IR (neat) 2945, 1726, 1703, 1463 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.35 (3H, s, H-14), 1.57 (1H, dd, $J = 13.3, 2.9$ Hz, H-4a), 2.17 (1H, dd, $J = 14.6, 5.7$ Hz, H-7a), 2.27 (1H, m, H-8a), 2.35 (1H, dd, $J = 13.3, 2.6$ Hz, H-8b), 2.40 (1H, dd, $J = 15.6, 6.4$ Hz, H-7b), 2.53 (1H, dt, $J = 13.6, 6.4$ Hz, H-4b), 2.69 (1H, dt, $J = 18.4, 2.4$ Hz, H-2a), 2.97 (1H, dd, $J =$

18.4, 2.4 Hz, H-2b), 3.27 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-10), 3.62 (1H, s, H-9), 4.74 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-13a), 4.77 (1H, t, $J = 3.5$ Hz, H-3), 5.10 (1H, s, H-13b); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 21.94 (C-14), 22.57 (C-8), 25.46 (C-7), 40.50 (C-4), 40.57 (C-2), 50.34 (C-5), 53.26 (C-10), 54.33 (C-9), 64.10 (C-6), 77.38 (C-3), 111.57 (C-13), 151.91 (C-12), 171.77 (C-15), 199.34 (C-11); MS (CI^+) m/z 249 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{O}_4$: 249.1121, found 249.1125.

(1S*, 2S*, 4'S*, 5S*)-4'-Hydroxy-1-methyl-7-methylene-4-oxaspiro[bicyclo[3.2.1]octane-2,1'-cyclohexane]-2',3-dione (91)



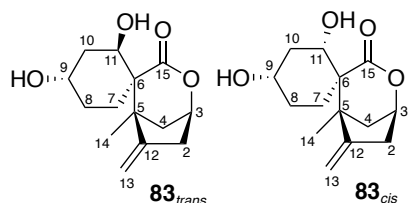
The numbering of positions is according to the skeleton of natural spirotenuipesine A

ジフェニルジセレニド (756 mg, 2.42 mmol)のエタノール (16 mL)溶液を 0 °C に冷却後, 水素化ホウ素ナトリウム (183 mg, 4.84 mmol), 酢酸 (0.03 mL, 0.525 mmol)を加え, そのままの温度で 15 分攪拌した. **81** (400 mg, 1.61 mmol)を加えた後, そのままの温度で 15 分攪拌した. 飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた後, 酢酸エチルで抽出し, 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 1:1 から 1:5) で精製して, **82** (375 mg, 93%)を得た.

82: white solid; FT IR (neat) 3444, 2972, 1726, 1698, 1464, 1417 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.44 (3H, s, H-14), 1.56 (1H, dd, $J = 13.2, 2.9$ Hz, H-4a), 1.97-2.09 (2H, m, H-7), 2.17 (1H, dt, $J = 14.7, 5.1$ Hz, H-8a), 2.28 (1H, dd, $J = 13.2, 2.5$ Hz, H-4b), 2.47 (1H, dd, $J = 15.0, 3.6$ Hz, H-10a), 2.55 (1H, d, $J = 3.7$ Hz, OH), 2.66 (1H, dt, $J = 18.4, 2.4$ Hz, H-2a), 2.72 (1H, ddd, $J = 16.3, 10.7, 6.0$ Hz, H-8b), 2.81 (1H, dd, $J = 15.0, 3.9$ Hz, H-10b), 2.89 (1H, dd, $J = 18.4, 2.2$ Hz, H-2b), 4.37 (1H, d, $J = 3.9$ Hz, H-9), 4.77 (1H, t, $J = 3.4$ Hz, H-3), 4.91 (1H, s, H-13a), 5.03 (1H, s, H-13b); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 21.26 (C-14), 28.60 (C-8), 29.54 (C-7), 40.34 (C-2), 41.57 (C-4), 48.65 (C-5), 50.09 (C-10), 67.27 (C-6), 68.31 (C-9), 77.20

(C-3), 110.60 (C-13), 151.26 (C-12), 172.47 (C-15), 205.68 (C-11); MS (CI⁺) *m/z* 251 [M+H]⁺; HRMS (CI⁺) *m/z* calcd for C₁₄H₁₉O₄: 251.1278, found 251.1293.

(1*S**,2*S**,2'*R**,4'*S**,5*S**)-2',4'-dihydroxy-1-methyl-7-methylene-4-oxaspiro[bicyclo[3.2.1]octane-2,1'-cyclohexan]-3-one (**83_{trans}**) and (1*S**,2*S**,2'*S**,4'*S**,5*S**)-2',4'-dihydroxy-1-methyl-7-methylene-4-oxaspiro[bicyclo[3.2.1]octane-2,1'-cyclohexan]-3-one (**83_{cis}**)



The numbering of positions is according to the skeleton of natural spirotenupesine A

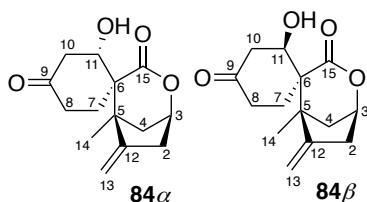
82 (350 mg, 1.40 mmol)のメタノール (7.0 mL)溶液を 0 °C に冷却後、水素化ホウ素ナトリウム (53 mg, 1.40 mmol)を加え、そのままの温度で 40 分攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた後、酢酸エチルで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 1:2) で精製して、**83_{trans}** (311 mg, 88%), **83_{cis}** (32 mg, 9%)を得た。

83_{trans}: white solid; FT IR (neat) 3342, 2933, 1698 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz in CDCl₃) δ 1.32 (1H, br, OH), 1.45 (3H, s, H-14), 1.50 (1H, dd, *J* = 13.2, 2.8 Hz, H-4a), 1.66 (1H, d, *J* = 4.2 Hz, OH), 1.79 (1H, d, *J* = 13.1 Hz, H-7a), 1.86 -1.90 (2H, m, H-8a,10a), 2.00 (1H, dq, *J* = 12.5, 3.8 Hz, H-8b), 2.14 (1H, dt, *J* = 13.6, 4.1 Hz, H-7b), 2.23 (1H, dd, *J* = 13.2, 2.4 Hz, H-4b), 2.50 (1H, m, H-10b), 2.73 (1H, dt, *J* = 18.4, 2.1 Hz, H-2a), 2.84 (1H, dd, *J* = 18.4, 2.2 Hz, H-2b), 4.00 (1H, m, H-9), 4.10 (1H, s, H-11), 4.69 (1H, s, H-3), 5.19 (1H, s, H-13a), 5.29 (1H, s, H-13b); ¹³C NMR (125 MHz in CDCl₃) δ 23.09 (C-14), 24.70 (C-7), 30.42 (C-8), 40.61 (C-10), 41.34 (C-2), 43.22 (C-4), 49.19 (C-5), 53.68 (C-6), 65.93 (C-9), 72.14 (C-11), 76.36 (C-3), 110.64 (C-13), 152.45 (C-12), 172.46 (C-15); MS (CI⁺) *m/z* 253 [M+H]⁺; HRMS (CI⁺) *m/z* calcd for C₁₄H₂₁O₄: 253.1434, found 253.1440.

83_{cis}: white solid; FT IR (neat) 3425, 2970, 2931, 2870, 1723 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz in CDCl₃) δ 1.25 (3H, s, H-14), 1.48 (1H, dd, *J* = 13.1, 2.7 Hz, H-4a), 1.59 (1H, m, H-7a), 1.73-1.76 (1H, m, H-8a), 1.85-1.94 (2H, m, H-7b, 8b), 2.14-2.17 (2H, m, H-10a, 10b), 2.25 (1H,

dd, $J = 13.1, 2.3$ Hz, H-4b), 2.71 (1H, m, H-2a), 2.94 (1H, dd, $J = 18.5, 1.7$ Hz, H-2b), 3.49-3.55 (1H, m, H-9), 3.85 (1H, t, $J = 8.6$ Hz, H-11), 4.71 (1H, s, H-3), 5.15 (1H, s, H-13a), 5.24 (1H, s, H-13b); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 19.91 (C-14), 27.79 (C-7), 29.77 (C-8), 39.95 (C-10), 40.79 (C-4), 40.98 (C-2), 48.51 (C-5), 56.40 (C-6), 68.34 (C-9), 68.54 (C-11), 76.32 (C-3), 109.64 (C-13), 158.72 (C-12), 171.14 (C-15); MS (CI^+) m/z 253 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{O}_4$: 253.1434, found 253.1434.

(1*S,2*S**,2'*S**,5*S**)-2'-hydroxy-1-methyl-7-methylene-4-oxaspiro[bicyclo[3.2.1]octane-2,1'-cyclohexane]-3,4'-dione (84 α)** and **(1*S**,2*S**,2'*R**,5*S**)-2'-hydroxy-1-methyl-7-methylene-4-oxaspiro[bicyclo[3.2.1]octane-2,1'-cyclohexane]-3,4'-dione (84 β)**



The numbering of positions is according to the skeleton of natural spirotenuipesine A

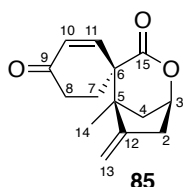
83 (*trans* isomer 311 mg and *cis* isomer 32 mg, total 1.36 mmol)のジクロロメタン (6.8 mL)懸濁液に AZAZOL® (20.8 mg, 0.136 mmol), ピスアセトキシヨードベンゼン (480 mg, 1.490 mmol)を室温で加え, そのままの温度で 2.5 時間攪拌した. 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液/飽和チオ硫酸ナトリウム(1:1)水溶液を加えた後, ジクロロメタンで抽出し, 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 3:1 から 1:1) で精製して, **84 β** (297 mg, 88%), **84 α** (30 mg, 9%)を得た.

84 α : white solid; FT IR (neat) 3545, 2952, 1719, 1645, 1476, 1445, 1423 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.30 (3H, s, H-14), 1.61 (1H, dd, $J = 13.2, 2.7$ Hz, H-4a), 1.98-2.04 (1H, m, H-7a), 2.19-2.26 (2H, m, H-7b, 8a), 2.31 (1H, dd, $J = 13.2, 2.2$ Hz, H-4b), 2.64 (1H, dd, $J = 16.1, 5.8$ Hz, H-10a), 2.72-2.80 (2H, m, H-2a, 8a), 2.88 (1H, d, $J = 5.1$ Hz, OH), 2.99 (1H, dd, $J = 18.6, 1.6$ Hz, H-2b), 3.20 (1H, dd, $J = 16.0, 10.9$ Hz, H-10b), 4.13 (1H, m, H-11), 4.81 (1H, s, H-3), 5.21 (1H, s, H-13a), 5.26 (1H, s, H-13b); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 19.61 (C-14), 28.29 (C-7), 36.98 (C-8), 40.91 (C-2), 40.98 (C-4), 46.45 (C-10), 48.76 (C-5), 56.68 (C-6),

68.51 (C-11), 76.74 (overlap CDCl₃ peak), 110.19 (C-13), 156.86 (C-12), 172.13 (C-15), 209.27 (C-9); MS (CI⁺) *m/z* 250 [M]⁺; HRMS (CI⁺) *m/z* calcd for C₁₄H₁₈O₄: 250.1205, found 251.1214.

84 β : white solid; FT IR (neat) 3351, 2972, 2932, 2895, 1699, 1426, 1401 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz in CDCl₃) δ 1.48 (3H, s, H-14), 1.60 (1H, dd, *J* = 13.4, 2.8 Hz, H-4a), 2.02-2.06 (2H, m, H-7a, OH), 2.24-2.29 (2H, m, H-4b, 10a), 2.38 (1H, m, H-8a), 2.55 (1H, dt, *J* = 12.9, 5.3 Hz, H-7b), 2.78 (1H, dt, *J* = 18.4, 2.0 Hz, H-2a), 2.88 (1H, dd, *J* = 18.4, 2.1 Hz, H-2b), 2.97 (1H, ddd, *J* = 15.7, 12.6, 6.6 Hz, H-8b), 3.54 (1H, dd, *J* = 16.1, 3.5 Hz, H-10b), 4.40 (1H, s, H-11), 4.78 (1H, s, H-3), 5.24 (1H, s, H-13a), 5.34 (1H, s, H-13b); ¹³C NMR (125 MHz in CDCl₃) δ 22.90 (C-14), 25.58 (C-7), 37.51 (C-8), 41.16 (C-2), 43.30 (C-4), 48.46 (C-10), 49.01 (C-5), 53.31 (C-6), 73.35 (C-11), 76.92 (C-3), 111.41 (C-13), 151.38 (C-12), 172.78 (C-15), 211.47 (C-9); MS (CI⁺) *m/z* 251 [M+H]⁺; HRMS (CI⁺) *m/z* calcd for C₁₄H₁₉O₄: 251.1278, found 251.1295.

(1S*,2R*,5S*)-1-Methyl-7-methylene-4-oxaspiro[bicyclo[3.2.1]octane-2,1'-cyclohexan]-2'-ene-3,4'-dione (85)



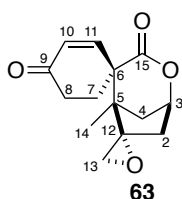
The numbering of positions is according to the skeleton of natural spirotenuipesine A

84 (β isomer 297 mg and α isomer 30 mg, total 1.306 mmol) のジクロロメタン (6.5 mL) 溶液に *p*-トルエンスルホン酸一水和物 (24.8 mg, 0.130 mmol) を室温で加え, そのままの温度で48時間攪拌した. 反応溶液をそのままシリカゲルパットで濾過後, 濃縮して **85** (291 mg, 96%) を得た.

85: white solid; FT IR (neat) 3077, 2969, 2882, 1729, 1686, 1461, 1426 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz in CDCl₃) δ 1.19 (3H, s, H-14), 1.66 (1H, dd, *J* = 13.5, 2.4 Hz, H-4a), 2.27-2.36 (2H, m, H-7ab), 2.41 (1H, dt, *J* = 17.1, 4.0 Hz, H-8a), 2.50 (1H, dd, *J* = 13.4, 2.6 Hz, H-4b), 2.68-2.76 (2H, m, H-2a, 8b), 2.85 (1H, dd, *J* = 18.3, 2.0 Hz, H-2b), 4.87 (1H, s, H-3), 5.14 (1H, t, *J* = 2.4

Hz, H-13a), 5.36 (1H, s, H-13b), 6.22 (1H, d, $J = 10.5$ Hz, H-10), 6.85 (1H, dd, $J = 10.5, 1.3$ Hz, H-11); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 19.50 (C-14), 28.69 (C-8), 33.59 (C-7), 38.34 (C-4), 41.18 (C-2), 48.49 (C-5), 51.54 (C-6), 78.58 (C-3), 113.66 (C-13), 132.88 (C-10), 146.25 (C-11), 149.79 (C-12), 170.09 (C-15), 198.54 (C-9); MS (CI^+) m/z 233 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{O}_3$: 233.1172, found 233.1173.

(1*R, 1'*R**, 5'*R**, 7'*S**)-1'-Methyl-4'-oxadispiro[cyclohexane-1, 2'-bicyclo[3.2.1]octane-7', 2''-oxiran]-2-ene-3', 4-dione (63)**

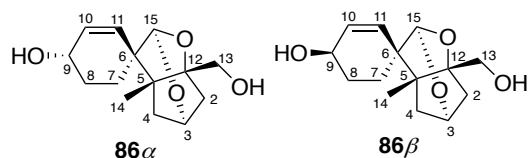


The numbering of positions is according to the skeleton of natural spirotenuipesine A

85 (120 mg, 0.517 mmol)のアセトニトリル/水 (10:1, 10 mL)溶液を 0 °C に冷却後, 1,1,1-トリフルオロアセトン (0.55 mL, 6.145 mmol), 炭酸水素ナトリウム (348 mg, 4.142 mmol), Oxone® (1.270 g, 2.066 mmol)を加え, そのままの温度で 24 時間攪拌した. 飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加えた後, 酢酸エチルで抽出し, 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 2:1 から 1:1)で精製して, **63** (126 mg, 98%)を得た.

72: white solid; FT IR (neat) 2936, 1720, 1685 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 0.96 (3H, s, H-14), 1.94 (H, dd, $J = 13.6, 2.9$ Hz, H-4a), 2.23 (1H, dd, $J = 16.7, 5.4$ Hz, H-2a), 2.34-2.41 (1H, m, H-8a), 2.43-2.51 (3H, m, H-4b, 7a, 8b), 2.62 (1H, dd, $J = 16.7, 2.8$ Hz, H-2b), 2.68 (1H, ddd, $J = 18.5, 11.9, 5.3$ Hz, H-7b), 3.02 (1H, d, $J = 4.1$ Hz, H-13a), 3.14 (1H, d, $J = 4.1$ Hz, H-13b), 4.93 (1H, m, H-3), 6.25 (1H, d, $J = 10.5$ Hz, H-10), 6.73 (1H, dd, $J = 10.5, 1.5$ Hz, H-11); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 13.57 (C-14), 29.52 (C-8), 33.99 (C-7), 37.90 (C-4), 41.70 (C-2), 48.30 (C-12), 49.03 (C-13), 52.09 (C-6), 63.83 (C-5), 77.72 (C-3), 132.95 (C-10), 144.11 (C-11), 171.39 (C-15), 197.49 (C-9); MS (CI^+) m/z 249 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{O}_4$: 249.1121, found 249.1128.

(1*R**,2'*R**,3*a*'*R**,5'*R**,6*a*'*R**)-6*a*'-(Hydroxymethyl)-3*a*'-methyl-3*a*',5',6',6*a*'-tetrahydro-2'*H*,4'*H*-spiro[cyclohexane-1,3'-[2,5]epoxycyclopenta[b]furan]-2-en-4-ol (**86**)



The numbering of positions is according to the skeleton of natural spirotenuipesine A

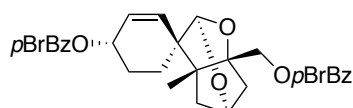
63 (50.0 mg, 0.201 mmol)のジクロロメタン (4.0 mL)溶液を $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ に冷却したのち、水素化ジイソプロピルアルミニウム (1M トルエン溶液 0.81 mL, 0.810 mmol)を加え、そのままの温度で 1.5 時間攪拌した。30%ロッシェル塩水溶液を加えた後、反応溶液が無色透明になるまで室温で攪拌する。反応溶液をジクロロメタンで希釈後、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 1:2 から 1:4)で精製することで、**86** (51.0 mg, quant.)を得た。

86 α : white solid; FT IR (neat) 3391, 2966, 2866, 1715, 1454 cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.01 (3H, s,), 1.05 (H, , $J = \text{Hz}$), 1.19 (1H, d, $J = 12.8\text{ Hz}$), 1.43-1.46 (2H, m), 1.49 (1H, d, $J = 11.9\text{ Hz}$), 1.78 (1H, br), 2.10-2.19 (3H, m), 2.23 (1H, dd, $J = 11.7, 3.4\text{ Hz}$), 2.35 (1H, d, $J = 12.9\text{ Hz}$), 3.73 (1H, d, $J = 12.3\text{ Hz}$), 3.83 (1H, d, $J = 12.3\text{ Hz}$), 4.18 (1H, s), 4.46 (1H, s), 5.03 (1H, s), 5.57 (1H, d, $J = 10.6\text{ Hz}$), 5.79 (1H, d, $J = 10.6\text{ Hz}$); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 15.53, 24.17, 31.42, 40.66, 43.17, 52.78, 64.68, 67.23, 76.08, 90.10, 102.91, 132.31, 133.82; MS (CI^+) m/z 252 [M] $^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_4$: 252.1362, found 252.1357.

86 β : white solid; FT IR (neat) 3395, 2924, 1649, 1438 cm^{-1} ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.07 (3H, s, H-14), 1.22 (1H, d, $J = 12.9\text{ Hz}$), 1.50 (1H, d, $J = 11.7\text{ Hz}$), 1.67 (1H, br), 1.70-1.78 (2H, m), 1.86-1.89 (1H, m), 1.95 (1H, m), 2.05 (1H, br), 2.23 (1H, dd, $J = 11.7, 3.3\text{ Hz}$), 2.48 (1H, d, $J = 12.8\text{ Hz}$), 3.76 (1H, dd, $J = 12.1, 2.5\text{ Hz}$, H-13a), 3.85 (1H, d, $J = 12.1\text{ Hz}$, H-13b), 4.12 (1H, s), 4.47 (1H, s), 4.96 (1H, s), 5.75 (1H, d, $J = 10.4\text{ Hz}$), 5.93 (1H, dd, $J = 10.4, 4.9\text{ Hz}$). ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 15.89, 19.84, 29.10, 40.96, 43.18, 49.04, 52.79, 62.67, 64.71, 76.15, 90.11, 102.59, 129.82, 135.06; MS (CI^+) m/z 253 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; HRMS (CI^+)

m/z calcd for $C_{14}H_{21}O_4$: 253.1434, found 253.1432.

((1*R,2'*R**,3*a*'*R**,4*S**,5'*R**,6*a*'*R**)-4-((4-Bromobenzoyl)oxy)-3*a*'-methyl-3*a*',4',5',6'-tetrahydro-2'*H*,6*a*'*H*-spiro[cyclohexane-1,3'-[2,5]epoxycyclopenta[b]furan]-2-en-6*a*'-yl)methyl 4-bromobenzoate (87)**



87

86 α (1.8 mg, 0.00713 mmol)のジクロロメタン (0.7mL)溶液に, *p*-ブロモベンゾイルクロリド (7.8 mg, 0.0355 mmol), トリエチルアミン (0.01 mL, 0.0717 mmol), DMAP (0.9 mg, 0.00737 mmol)を加え, 室温で2時間攪拌した. 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた後, ジクロロメタンで抽出し, 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 5:1)で精製して, **87** (4.0 mg, 91%)を得た.

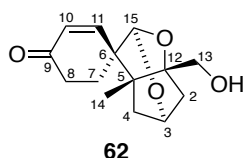
87: white solid; FT IR (neat) 2969, 1719, 1590, 1484, 1455 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.13 (3H, s), 1.30 (1H, d, $J = 13.0$ Hz), 1.60-1.65 (2H, m), 1.69-1.77 (1H, m), 2.23-2.28 (2H, m), 2.36 (1H, d, $J = 11.5$ Hz), 2.43 (1H, d, $J = 13.0$ Hz), 4.48 (1H, d, $J = 12.0$ Hz), 4.53 (1H, s), 4.62 (1H, d, $J = 12.5$ Hz), 5.12 (1H, s), 5.52 (1H, m), 5.77 (1H, d, $J = 10.5$ Hz), 5.85 (1H, d, $J = 10.5$ Hz); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 16.02, 23.78, 27.28, 40.61, 43.48, 50.18, 52.86, 66.23, 70.52, 76.05, 88.18, 102.86, 128.12, 128.45, 128.62, 129.95, 131.18, 131.68, 131.87, 133.98, 165.56, 165.63; MS (CI^+) m/z 616 [M] $^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{Br}_2\text{O}_6$: 616.0096, found 616.0089.

Sample and crystal data for **96**

Crystal system	triclinic
Space group	P -1
Unit cell dimensions	$a = 6.372(6)$ Å $\alpha = 96.236(12)^\circ$

	$b = 7.219(7) \text{ \AA}$	$\beta = 95.410(12)^\circ$
	$c = 26.58(2) \text{ \AA}$	$\gamma = 96.069(11)^\circ$
Volume	1201.7(19) \AA^3	
Z	2	
Goodness-of-fit on F2	1.144	
Final R indices	2541 data; $I > 2\sigma(I)$	R1 = 0.1089, wR2 = 0.2817
	all data	R1 = 0.1242, wR2 = 0.2927

(1*R,2'*R**,3*a*'*R**,5'*R**,6*a*'*R**)-6*a*'-(Hydroxymethyl)-3*a*'-methyl-3*a*',5',6',6*a*'-tetrahydro-2'*H*,4'*H*-spiro[cyclohexane-1,3'-[2,5]epoxycyclopenta[b]furan]-2-en-4-one (62)**



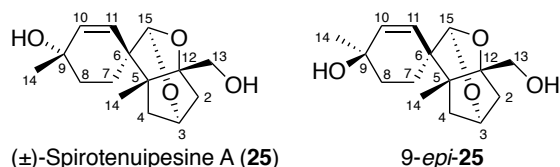
The numbering of positions is according to the skeleton of natural spirotenuipesine A

86 (40.0 mg, 0.159 mmol)の THF (3.2mL)溶液に、モリブデン酸アンモニウム四水和物 (196 mg, 0.159 mmol), 炭酸カリウム (44 mg, 0.318 mmol), 30%過酸化水素水 (0.09 mL, 0.794 mmol)を室温で加え、そのままの温度で 24 時間攪拌した。また、反応開始時から 8 時間後と 16 時間後にそれぞれ 30%過酸化水素水 (0.09 mL, 0.794 mmol)追加した。セライトパットで濾過後、溶媒を濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 3:1 から 1:1)で精製して、**62** (37.4 mg, 94%)を得た。

62: white solid; FT IR (neat) 3436, 2963, 1678, 1450 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.16 (3H, s, H-14), 1.29 (1H, d, $J = 13.1$ Hz, H-4 β), 1.53 (1H, d, $J = 11.8$ Hz, H-2 β), 1.94 (1H, ddd, $J = 13.2, 11.2, 7.7$ Hz, H-7 β), 2.13 (1H, br, OH), 2.21 (1H, dd, $J = 11.8, 3.2$ Hz, H-2 α), 2.37-2.42 (2H, m, H-4 α , H-7 α), 2.48-2.51 (2H, m, H-8), 3.86 (2H, m, H-13), 4.52 (1H, s, H-3), 5.21 (1H, s, H-15), 6.03 (1H, d, $J = 10.5$ Hz, H-10), 6.94 (1H, dd, $J = 10.5, 1.7$ Hz, H-11); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 16.13 (C-14), 25.30 (C-7), 35.20 (C-8), 40.98 (C-4), 43.04 (C-2), 49.58 (C-5), 53.41 (C-6), 63.94 (C-13), 76.39 (C-3), 90.25 (C-12), 101.69 (C-15), 129.74

(C-10), 153.50 (C-11), 198.70 (C-9); MS (CI⁺) *m/z* 251 [M+H]⁺; HRMS (CI⁺) *m/z* calcd for C₁₄H₁₉O₄:251.1278, found 251.1283.

(±)-Spirotenuipesine A (25) and (±)-9-*epi*-Spirotenuipesine A (9-*epi*-25)



The numbering of positions is according to the skeleton of natural spiro tenuipesine A

62 (12.0 mg, 0.0479 mmol)の THF (4.8 mL)溶液を−78 °Cに冷却したのち、メチルマグネシウムブロミド (3M エーテル溶液 0.16 mL, 0.480 mmol)を加え、そのままの温度で1時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた後、酢酸エチルで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:エーテル 1:2 からエーテルのみ) で精製して, (±)-**25** (10.2 mg, 80%)を得た。少量の 9-*epi*-**25** も生成していたが不純物との単離ができなかった。

メチル化剤としてメチルリチウムを用いた場合

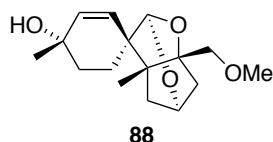
62 (38.4 mg, 0.139 mmol)の THF (14 mL)溶液を−78 °Cに冷却したのち、メチルリチウム (1.14 M エーテル溶液 1.20 mL, 1.37 mmol)を加え、そのままの温度で1時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた後、酢酸エチルで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:ジエチルエーテル 1:2 からジエチルエーテルのみ) で精製して, (±)-**25** (24.0 mg, 65%), 9-*epi*-**25** (7.5 mg, 20%)を得た。

(±)-**25**: white solid; FT IR (neat) 3405, 2969, 2930, 2869, 1456 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz in CDCl₃) δ 1.02 (3H, s, H-14), 1.20 (1H, d, *J* = 12.9 Hz, H-4 β), 1.27 (3H, s, H-16), 1.49 (1H, d, *J* = 13.1 Hz, H-2 β), 1.52 (1H, dd, *J* = 14.0, 3.2 Hz, H-7 β), 1.68 (1H, s, OH), 1.69 (1H, dt, *J* = 13.9, 3.2 Hz, H-8 α), 1.89 (1H, d, *J* = 12.9 Hz H-8 β), 2.07-2.13 (2H, m, H-7 α , OH), 2.23 (1H, dd, *J* = 11.6, 3.1 Hz, H-2 α), 2.37 (1H, d, *J* = 12.8 Hz, H-4 α), 3.73 (1H, dd, *J* = 12.3, 7.1 Hz,

H-13a), 3.83 (1H, dd, $J = 12.3, 5.4$ Hz, H-13b), 4.46 (1H, s, H-3), 5.01 (1H, s, H-15), 5.48 (1H, dd $J = 10.5, 1.4$ Hz, H-11), 5.71 (1H, dd, $J = 10.5, 1.5$ Hz, H-10); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 15.62 (C-14), 24.37 (C-7), 27.41 (C-16), 36.99 (C-8), 40.76 (C-4), 43.11 (C-2), 49.07 (C-5), 52.78 (C-6), 64.70 (C-13), 69.25 (C-9), 76.08 (C-3), 90.04 (C-12), 102.78 (C-15), 130.41 (C-11), 136.94 (C-10); MS (CI⁺) m/z 266 [M]⁺; HRMS (CI⁺) m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_4$: 266.1518, found 266.1525.

(±)-9-*epi*-**25**: white solid; FT IR 3398, 2963, 1455 (neat) cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.07 (3H, s, H-14), 1.22 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, H-4 β), 1.29 (3H, s, H-16), 1.41 (1H, s, OH), 1.51 (1H, d, $J = 11.7$ Hz, H-2 β), 1.61 (1H, dt, $J = 13.4, 3.1$ Hz, H-8 α), 1.70 (1H, dt, $J = 12.9, 3.1$ Hz, H-7 β), 1.82-1.88 (2H, m, H-8 β , OH), 2.00-2.04 (1H, m, H-7 α), 2.24 (1H, dd, $J = 11.6, 3.6$ Hz, H-2 α), 2.47 (1H, d, $J = 12.9$ Hz, H-4 α), 3.76 (1H, dd, $J = 12.2, 7.1$ Hz, H-13a), 3.86 (1H, dd, $J = 12.2, 5.7$ Hz, H-13b), 4.48 (1H, s, H-3), 4.96 (1H, s, H-15), 5.62 (1H, dd, $J = 10.3, 1.7$ Hz, H-11), 5.75 (1H, dd, $J = 10.3, 1.7$ Hz, H-10); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 15.71 (C-14), 21.60 (C-7), 29.81 (C-16), 35.44 (C-8), 40.99 (C-4), 43.20 (C-2), 49.08 (C-5), 52.83 (C-6), 64.77 (C-13), 66.36 (C-9), 76.12 (C-3), 89.97 (C-12), 102.49 (C-15), 133.00 (C-11), 134.83 (C-10); MS (CI⁺) m/z 267 [M+H]⁺; HRMS (CI⁺) m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{O}_4$: 267.1591, found 267.1599.

(1*R,2*R**,3*a*'*R**,4*S**,5'*R**,6*a*'*R**)-6*a*'-(Methoxymethyl)-3*a*',4-dimethyl-3*a*',5',6',6*a*'-tetrahydro-2'*H*,4'*H*-spiro[cyclohexane-1,3'-[2,5]epoxycyclopenta[b]furan]-2-en-4-ol (88)**

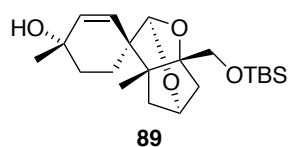


(±)-**25** (7.2 mg, 0.0270 mmol)の THF (1.0 mL)溶液を 0 °C に冷却したのち、水素化ナトリウム (60% , 流動パラフィンに分散 1.5 mg, .0375 mmol)を加え、そのままの温度で 10 分攪拌した。その後、ヨウ化メチル (0.01 mL, 0.161 mmol)を加え、そのままの温度で 10 時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた後、酢酸エチルで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラム

クロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 1:1)で精製して, **88** (6.1 mg, 80%)を得た.

88: colorless oil; FT IR (neat) 3419, 2928, 1731, 1455 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.03 (3H, s), 1.19 (1H, d, $J = 12.5$ Hz), 1.28 (3H, s), 1.48-1.54 (2H, m), 1.60 (1H, br), 1.68 (1H, dt, $J = 13.5, 3.5$ Hz), 1.88 (1H, m), 2.11 (1H, m), 2.20 (1H, dd, $J = 12.0, 3.0$ Hz), 2.35 (1H, d, $J = 12.5$ Hz), 3.41 (3H, s), 3.55 (2H, dd, $J = 15.0, 10.5$ Hz), 4.44 (1H, s), 4.98 (1H, s), 5.53 (1H, dd, $J = 10.5, 1.5$ Hz), 5.71 (1H, dd, $J = 10.5, 1.5$ Hz); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 15.71, 24.32, 27.41, 37.08, 40.74, 43.29, 49.39, 52.83, 59.53, 69.26, 74.22, 76.15, 89.00, 102.79, 130.76, 136.65; MS (CI^+) m/z 280 $[\text{M}]^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_4$: 280.1675, found 267.1673.

(1R*,2'R*,3a'R*,4S*,5'R*,6a'R*)-6a'-(((Tert-butyl)dimethylsilyloxy)methyl)-3a',4-dimethyl-3a',5',6',6a'-tetrahydro-2'H,4'H-spiro[cyclohexane-1,3'-[2,5]epoxycyclopenta[b]furan]-2-en-4-ol (89)

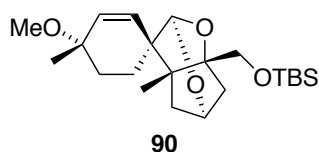


(\pm)-**25** (6.0 mg, 0.0225 mmol)のジクロロメタン (1.0 mL)溶液に, イミダゾール (6.2 mg, 0.0911 mmol), *t*-ブチルジメチルシリルクロリド (6.8 mg, 0.0451 mmol)を加え, 室温で12時間攪拌した. 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた後, ジクロロメタンで抽出し, 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 3:1)で精製して, **89** (7.5 mg, 87%)を得た.

89: colorless oil; FT IR (neat) 3423, 2956, 2930, 2859, 1472, 1462 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 0.08 (6H, s), 0.90 (9H, s), 1.07 (3H, s), 1.17 (1H, d, $J = 13.0$ Hz), 1.28 (3H, s), 1.50 (1H, dt, $J = 14.0, 3.0$ Hz), 1.56 (1H, d, $J = 11.5$ Hz), 1.68 (1H, dt, $J = 13.5, 3.0$ Hz), 1.88 (1H, d, $J = 13.0$ Hz), 2.05 (1H, dd, $J = 11.5, 3.0$ Hz), 2.10 (1H, d, $J = 13.5$ Hz), 2.33 (1H, d, $J = 13.0$ Hz), 3.72 (1H, d, $J = 11.0$ Hz), 3.84 (1H, d, $J = 11.0$ Hz), 4.43 (1H, s), 4.97 (1H, s), 5.62 (1H, d, $J = 10.5$ Hz), 5.67 (1H, d, $J = 10.5$ Hz); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ -5.65, -5.57, 15.98,

18.22, 24.26, 25.83, 27.42, 37.16, 40.98, 42.98, 49.02, 52.90, 64.17, 69.29, 76.13, 89.68, 102.56, 131.36, 136.10; MS (CI⁺) *m/z* 380 [M]⁺; HRMS (CI⁺) *m/z* calcd for C₂₁H₃₆O₄Si: 380.2383, found 380.2391.

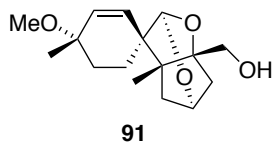
***Tert*-butyl(((1*R**,2*R**,3*a*'*R**,4*S**,5'*R**,6*a*'*R**)-4-methoxy-3*a*',4-dimethyl-3*a*',4',5',6'-tetrahydro-2'*H*,6*a*'*H*-spiro[cyclohexane-1,3'-[2,5]epoxycyclopenta[b]furan]-2-en-6*a*'-yl)methoxy)dimethylsilane (90)**



89 (7.4 mg, 0.0194 mmol)の THF (1.0 mL)溶液を 0 °C に冷却したのち、水素化ナトリウム (60%, 流動パラフィンに分散 7.8 mg, 0.195 mmol)を加え、そのままの温度で 10 分攪拌した。その後、ヨウ化メチル (0.024 mL, 0.386 mmol)を加え、室温に昇温して 5 時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた後、酢酸エチルで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 4:1)で精製して、**90** (6.7 mg, 87%)を得た。

90: colorless oil; FT IR (neat) 2930, 2858, 2822, 1463 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz in CDCl₃) δ 0.08 (6H, s), 0.91 (9H, s), 1.07 (3H, s), 1.17 (1H, d, *J* = 12.5 Hz), 1.24 (3H, s), 1.50 (1H, dt, *J* = 14.0, 3.5 Hz), 1.56 (1H, d, *J* = 11.5 Hz), 1.62 (1H, m), 1.91 (1H, dt, *J* = 13.5, 3.5 Hz), 2.06 (1H, dd, *J* = 11.5, 3.0 Hz), 2.13 (1H, m), 2.34 (1H, d, *J* = 13.0 Hz), 3.20 (3H, s), 3.73 (1H, d, *J* = 11.5 Hz), 3.85 (1H, d, *J* = 11.0 Hz), 4.44 (1H, s), 4.99 (1H, s), 5.61 (1H, dd, *J* = 10.5, 1.5 Hz), 5.72 (1H, dd, *J* = 11.0, 1.5 Hz); ¹³C NMR (125 MHz in CDCl₃) δ -5.64, -5.56, 15.86, 18.24, 23.96, 25.44, 25.84, 30.52, 40.96, 43.02, 49.02, 49.65, 52.82, 64.23, 73.94, 76.13, 89.66, 102.61, 133.31, 134.04; MS (CI⁺) *m/z* 394 [M]⁺; HRMS (CI⁺) *m/z* calcd for C₁₆H₂₄O₄ 394.2539: found 394.2535.

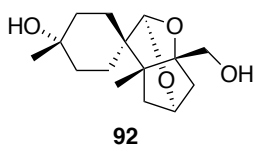
((1*R,2*R**,3*a*'*R**,4*S**,5'*R**,6*a*'*R**)-4-Methoxy-3*a*',4-dimethyl-3*a*',4',5',6'-tetrahydro-2'*H*,6*a*'*H*-spiro[cyclohexane-1,3'-[2,5]epoxycyclopenta[b]furan]-2-en-6*a*'-yl)methanol (91)**



90 (6.7 mg, 0.0170 mmol)の THF (0.85 mL)溶液に TBAF (1 M THF 溶液, 0.051 mL, 0.051 mmol) を室温に加え, そのままの温度で 4 時間攪拌した. 飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた後, 酢酸エチルで抽出し, 得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 3:1 から 1:1)で精製して, **91** (4.2 mg, 88%)を得た.

91: white solid; FT IR (neat) 3456, 2968, 1455 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.03 (3H, s), 1.20 (1H, d, $J = 13.0$ Hz), 1.24 (3H, s), 1.50 (1H, d, $J = 13.0$ Hz), 1.52 (1H, dt, $J = 14.0, 3.5$ Hz), 1.64 (1H, m), 1.89-1.95 (2H, m), 2.15 (1H, m), 2.24 (1H, dd, $J = 12.0, 3.5$ Hz), 2.39 (1H, d, $J = 13.0$ Hz), 3.20 (3H, s), 3.75 (1H, dd, $J = 12.0, 7.0$ Hz), 3.85 (1H, dd, $J = 12.0, 5.0$ Hz), 4.47 (1H, s), 5.03 (1H, s), 5.60 (1H, dd, $J = 10.5, 1.5$ Hz), 5.67 (1H, dd, $J = 10.5, 1.5$ Hz); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 15.51, 24.10, 25.38, 30.50, 40.79, 43.16, 49.09, 49.66, 52.75, 64.77, 73.88, 76.07, 89.92, 102.89, 132.41, 134.88; MS (CI^+) m/z 280 $[\text{M}]^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_4$: 280.1675, found 280.1679.

(1S*,2'R*,3a'R*,4S*,5'R*,6a'R*)-6a'-(Hydroxymethyl)-3a',4-dimethyltetrahydro-2'H,4'H-spiro[cyclohexane-1,3'-[2,5]epoxycyclopenta[b]furan]-4-ol (92)

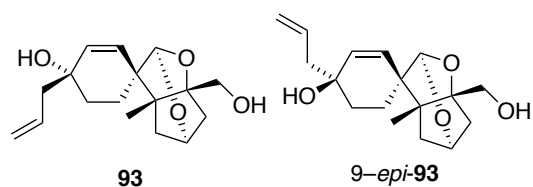


(\pm)-**25** (5.6 mg, 0.0210 mmol)のメタノール (4.2 mL)溶液に 10% Pd/C (11 mg, 0.103 mmol) を加え, 水素置換後, 24 時間攪拌した. 反応溶液をセライトで濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 1:1 から酢酸エチルのみ)で精製して, **92** (3.8 mg, 67%)を得た.

92: colorless oil; FT IR (neat) 3403, 2926, 1447 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.08 (3H, s), 1.14 (1H, d, $J = 12.5$ Hz), 1.26 (3H, s), 1.32-1.40 (2H, m), 1.47 (1H, d, $J = 11.5$ Hz),

1.51-1.64 (4H, m), 1.71 (1H, d, $J = 13.5$ Hz), 1.86 (1H, br), 2.04 (1H, m), 2.22 (1H, dd, $J = 12.0, 3.0$ Hz), 2.48 (1H, d, $J = 12.5$ Hz), 3.69 (1H, d, $J = 11.5$ Hz), 3.81 (1H, d, $J = 12.0$ Hz), 4.46 (1H, s), 5.29 (1H, s); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 15.24, 25.74, 25.77, 28.18, 35.80, 37.64, 41.67, 43.10, 48.56, 50.20, 65.05, 70.53, 76.16, 89.82, 101.45; MS (CI^+) m/z 268 [M] $^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_4$: 268.1675, found 268.1672.

(1*R**,2*R**,3*a*'*R**,4*R**,5*R**,6*a*'*R**)-4-Allyl-6*a*'-(hydroxymethyl)-3*a*'-methyl-3*a*',5',6',6*a*'-tetrahydro-2*H*,4*H*-spiro[cyclohexane-1,3'-[2,5]epoxycyclopenta[b]furan]-2-en-4-ol (**93**) and (1*R**,2*R**,3*a*'*R**,4*S**,5*R**,6*a*'*R**)-4-Allyl-6*a*'-(hydroxymethyl)-3*a*'-methyl-3*a*',5',6',6*a*'-tetrahydro-2*H*,4*H*-spiro[cyclohexane-1,3'-[2,5]epoxycyclopenta[b]furan]-2-en-4-ol (9-*epi*-**93**)

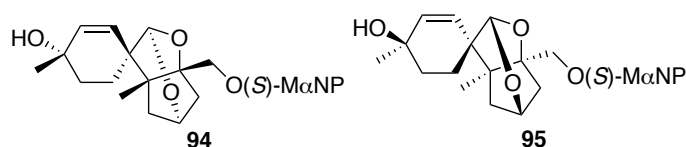


62 (6.0 mg, 0.0240 mmol)の THF (2.4 mL)溶液を -78 °C に冷却したのち、アリルマグネシウムクロリド (2 M THF 溶液 0.12 mL, 0.240 mmol)を加え、そのままの温度で1時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた後、酢酸エチルで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:ジエチルエーテル 4:1 からジエチルエーテルのみ)で精製して、**93** (5.0 mg, 71%), 9-*epi*-**93** (0.9 mg, 13%)を得た。

93: colorless oil; FT IR (neat) 3403, 2927, 1637, 1455 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.04 (3H, s), 1.22 (1H, d, $J = 12.5$ Hz), 1.50 (1H, d, $J = 11.5$ Hz), 1.55 (1H, dt, $J = 13.5, 3.0$ Hz), 1.65 (1H, dt, $J = 13.5, 3.0$ Hz), 1.75 (1H, br), 1.94 (1H, d, $J = 13.0$ Hz), 2.08 (1H, d, $J = 13.5$ Hz), 2.23-2.28 (2H, m), 2.34-2.39 (2H, m), 3.74 (1H, d, $J = 12.0$ Hz), 3.84 (1H, d, $J = 12.5$ Hz), 4.47 (1H, s), 5.02 (1H, s), 5.17 (2H, m), 5.55 (1H, d, $J = 10.5$ Hz), 5.70 (1H, d, $J = 10.5$ Hz), 5.89 (1H, m); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 15.81, 23.77, 34.21, 40.82, 43.11, 44.80, 49.11, 52.80, 64.74, 70.15, 76.07, 89.99, 102.91, 119.27, 131.32, 133.21, 135.85; MS (CI^+) m/z 293 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{O}_4$: 293.1747, found 293.1744.

9-*epi*-93: colorless oil; FT IR (neat) 3405, 2925, 1715, 1637, 1455 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 1.07 (3H, s), 1.22 (1H, d, $J = 12.9$ Hz), 1.25 (1H, br), 1.51 (1H, d, $J = 11.7$ Hz), 1.63 (1H, dt, $J = 13.8, 3.2$ Hz), 1.69 (1H, dt, $J = 12.7, 2.5$ Hz), 1.76 (1H, d, $J = 15.1$ Hz), 1.83 (1H, br), 2.02 (1H, m), 2.22-2.33 (3H, m), 2.47 (1H, d, $J = 13.2$), 3.76 (1H, dd, $J = 12.1, 5.8$ Hz), 3.86 (1H, dd, $J = 12.0, 3.6$ Hz), 4.47 (1H, s), 4.95 (1H, s), 5.13 (2H, m), 5.69 (1H, d, $J = 10.4$ Hz), 5.74 (1H, d, $J = 10.5$ Hz), 5.82 (1H, m); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 15.67, 21.31, 33.36, 40.98, 43.20, 46.98, 49.08, 52.98, 64.76, 67.91, 76.13, 89.99, 102.50, 119.09, 133.11, 133.16, 134.10; MS (CI^+) m/z 293 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{O}_4$: 293.1747, found 293.1750.

((1*R*,2'*R*,3*a'R*,4*S*,5'*R*,6*a'**R*)-4-Hydroxy-3*a'*,4-dimethyl-3*a'*,4',5',6'-tetrahydro-2'*H*,6*a'**H*-spiro[cyclohexane-1,3'-[2,5]epoxycyclopenta[b]furan]-2-en-6*a'*-yl)methyl (S)-2-methoxy-2-(naphthalen-1-yl)propanoate (94)** and **((1*S*,2'*S*,3*a'**S*,4*R*,5'*S*,6*a'**S*)-4-Hydroxy-3*a'*,4-dimethyl-3*a'*,4',5',6'-tetrahydro-2'*H*,6*a'**H*-spiro[cyclohexane-1,3'-[2,5]epoxycyclopenta[b]furan]-2-en-6*a'*-yl)methyl (S)-2-methoxy-2-(naphthalen-1-yl)propanoate (95)**



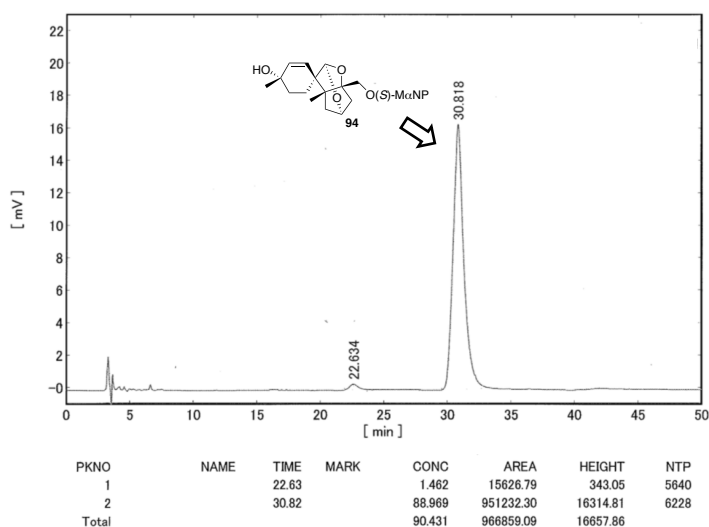
(\pm)-**25** (25.0 mg, 0.0939 mmol)のジクロロメタン (1.9 mL)溶液に(S)-M α NP acid (23.8 mg, 0.103 mmol), DMAP (11.4 mg, 0.0933 mmol), トリエチルアミン (0.052 mL, mmol), 2-メチル-6-ニトロ安息香酸無水物 (64.6 mg, 0.188 mmol)を加え, そのままの温度で3.5時間攪拌した. 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた後, 酢酸エチルで抽出し, 得られた有機層を飽和炭酸水素ナトリウムで洗浄後, 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:2-プロパノール 15:1 から 5:1) で精製して, **94** (18.0 mg, 40%), **95** (22.4 mg, <50%, 不純物 **96** を含む)を得た.

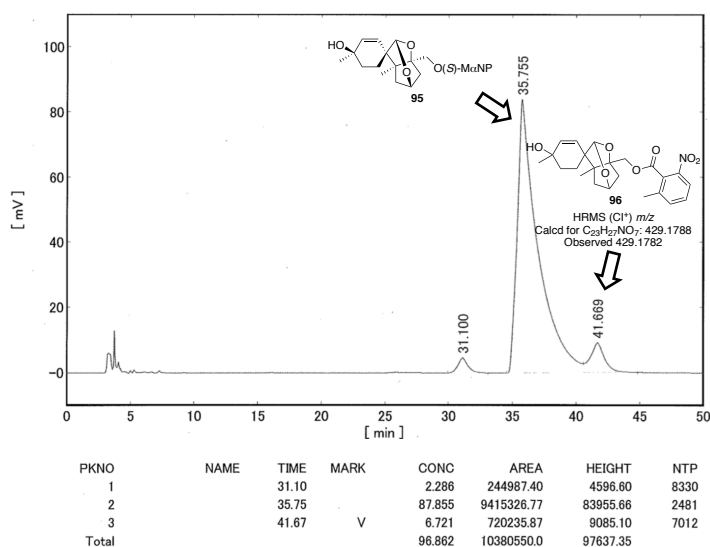
94: $[\alpha]_D^{16} = +22.0$ ($c = 1.5, \text{CHCl}_3$); FT IR (neat) 3457, 2969, 2932, 1740, 1600, 1509, 1458 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 0.53 (3H, s), 0.79 (1H, d, $J = 12.7$ Hz), 0.89 (1H, d, $J =$

12.0 Hz), 1.21 (3H, s), 1.25 (1H, br), 1.36 (1H, dt, $J = 14.0, 3.3$ Hz), 1.55-1.63 (3H, m), 1.80 (1H, d, $J = 12.9$ Hz), 1.96 (1H, d, $J = 13.9$ Hz), 2.03 (3H, s), 2.13 (1H, d, $J = 12.8$ Hz), 3.11 (3H, s), 4.15 (2H, dd, $J = 16.0, 12.1$ Hz), 4.20 (1H, s), 4.83 (1H, s), 5.19 (1H, dd, $J = 10.5, 0.8$ Hz), 5.61 (1H, dd, $J = 10.5, 1.0$ Hz), 7.45-7.48 (3H, m), 7.63 (1H, d, $J = 7.2$ Hz), 7.82-7.85 (2H, m), 8.38-8.40 (1H, m); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 15.13, 21.71, 24.01, 27.31, 36.83, 40.29, 42.48, 49.36, 50.83, 52.63, 66.22, 69.11, 75.75, 81.35, 87.44, 102.63, 124.73, 124.90, 125.69, 125.79, 126.59, 128.71, 129.54, 130.13, 131.31, 133.97, 134.62, 136.85, 173.93; MS (CI^+) m/z 478 [M] $^+$; HRMS (CI^+) m/z calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_6$:478.2355, found 478.2346.

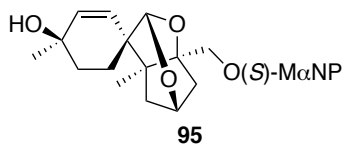
HPLC analysis of **94** and **95**

YMC-Pack SIL 4.6 \times 250 mm, hexane ; EtOAc = 1.5:1, flow rate 1 mL/min, detected wavelength 280 nm.





選択的なメタノリシスによる **96** の除去



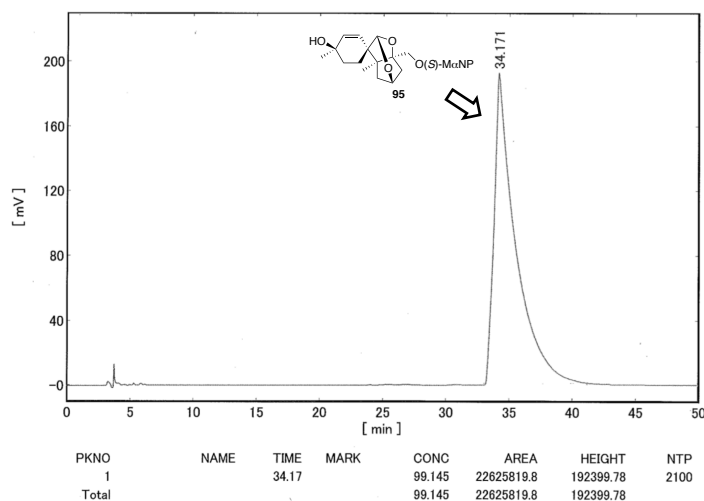
95 (18.1 mg, 不純物として **96** を含む)のメタノール (5.0 mL)溶液にマグネシウム (61 mg, 2.509 mmol)を加え, 室温で 20 時間攪拌した. 反応溶液をシリカゲルパッドで濾過後濃縮した. 得られた残渣のメタノール (5.0 mL)溶液にマグネシウム (61 mg, 2.509 mmol)を加え, 室温で 20 時間攪拌した. 反応溶液をシリカゲルパッドで濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 2:1 から 1:4)で精製して, **95** (10.0 mg, 28% from (±)-**25**)を得た.

95: $[\alpha]_D^{25} = -51.1$ ($c = 1.0$, CHCl_3); FT IR (neat) 3457, 2930, 1743, 1600, 1510, 1456 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) δ 0.24 (3H, s), 0.69 (1H, d, $J = 12.8$ Hz), 1.00 (1H, d, $J = 11.5$ Hz), 1.21 (3H, s), 1.29 (1H, dt, $J = 13.9, 3.3$ Hz), 1.58 (1H, dt, $J = 13.6, 3.2$ Hz), 1.78 (1H, d, $J = 13.0$ Hz), 1.82 (1H, dd, $J = 11.6, 2.7$ Hz), 1.94 (1H, d, $J = 13.8$ Hz), 2.03 (3H, s), 2.08 (1H, d, $J = 12.9$ Hz), 3.09 (3H, s), 4.09 (1H, d, $J = 12.3$ Hz), 4.20 (1H, s), 4.28 (1H, d, $J = 12.3$ Hz), 4.83 (1H, s), 5.12 (1H, dd, $J = 10.5, 1.1$ Hz), 5.56 (1H, dd, $J = 10.5, 1.4$ Hz), 7.44-7.48 (3H, m), 7.61 (1H, d, $J = 7.1$ Hz), 7.80-7.83 (2H, m), 8.39-8.41 (1H, m); ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) δ 14.89, 21.57, 24.16, 27.33, 36.89, 40.41, 43.05, 49.19, 50.76, 52.57, 65.59, 69.09, 75.69, 81.28, 87.50, 102.54, 124.77, 125.00, 125.79, 125.94, 126.69, 128.62, 129.57, 130.19, 131.47, 134.08,

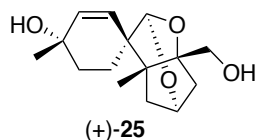
134.36, 136.71, 174.09; MS (CI⁺) *m/z* 478 [M]⁺; HRMS (CI⁺) *m/z* calcd for C₂₉H₃₄O₆:478.2355, found 478.2346.

HPLC analysis of **95**

YMC-Pack SIL 4.6 × 250 mm, hexane ; EtOAc = 1.5:1, flow rate 1 mL/min, detected wavelength 280 nm.



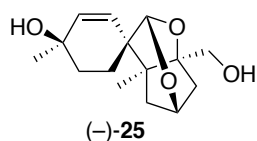
(+)-Spirotenuipesine A (**25**)



94 (10.0 mg, 0.0209 mmol)のメタノール (0.9 mL)溶液にナトリウムメトキシド (28% メタノール溶液 0.10mL, 0.518 mmol)を加え, 50 °C で 10 時間攪拌した. 飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた後, 酢酸エチルで抽出し, 無水硫酸マグネシウムで乾燥させ, 濾過後濃縮した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル 1:1 から 1:4)で精製して, (+)-**25** (5.0 mg, 90%)を得た. 旋光度以外の物性データは(±)-**25** と一致した.

(+)-**25**: white solid; $[\alpha]_D^{25} = + 52.9$ ($c = 0.45$, CHCl₃).

(-)-Spirotenuipesine A (25)



(+)-25 と同様の手順に従って，**95** (1.350 g, 2.89 mmol)から(-)-25 (4.5 mg, 90%)を得た．
旋光度以外の物性データは(±)-25 と一致した．

(-)-34: white solid; $[\alpha]_D^{25} = -52.1$ ($c = 0.45$, CHCl_3)

神経栄養因子産生促進活性の評価

PC12細胞をDMEM/10% HS, 5%FBS, 100 unit penicillin-streptomycinで組成された培地中，
10000 cells/mLの細胞密度で24ウェルプレートの1 ウェルにつき400 μL ずつ播種する．
24時間インキュベーター内で培養した後，培地を1321細胞培養培地*400 μL と交換する．
インキュベーターで培養を続け，96時間後にプレート中の培地に4%ホルムアルデヒド
PBS溶液を400 μL ずつ加えて5分間放置する．培地を吸引除去してから各ウェルに4%ホ
ルムアルデヒドPBS溶液を400 μL ずつ加えて15分間放置する．4%ホルムアルデヒドPBS
溶液を吸引除去して，PBS buffer 400 μL で二回洗浄後．0.1M Borate Buffer 400 μL で1回
洗浄する．0.1%メチレンブルー 300 μL を加え，固定した細胞を室温で2時間染色する．
染色後，ミリQで洗浄し，顕微鏡で観察する．

活性評価の定量化では，デジタルカメラで各ウェルの写真を重ならないようランダム
に撮影する．測定対象にする細胞を各サンプルの各濃度からそれぞれ70個選択して，
小原らの手法⁶⁰⁾を参考に突起の進展を評価する．各データの統計処理は，Mac統計解
析を使用し，有意差検定に関しては，Dunnett's t-testを採用した．

*1321N1細胞培養培地

1321N1細胞をDMEM/10% HS, 5%FBS, 100 unit penicillin-streptomycinで組成された培地
中，20000 cells/mLの細胞密度で24ウェルプレートの1 ウェルにつき500 μL ずつ播種す
る．24時間インキュベーター内で培養した後，各サンプルのDMSO溶液を含む
DMEM/10% HS, 5%FBS, 100 unit penicillin-streptomycin組成培地 (DMSO最終濃度0.1%)

に各々交換する。インキュベーターで培養を続け、48時間後にプレート中の培地を回収したものを使用した^{a,b)}。

- a) NVCの添加による効果を確認した実験では、1321細胞培養培地を回収した後にNVCを30 μM の濃度になるように加えたものを使用した。
- b) 抗NGF抗体による中和実験では1321細胞培養培地を回収後、抗NGF抗体を0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度になるように加え、4 $^{\circ}\text{C}$ で24時間静置したものを使用した

参考文献

- 1) WHO Guidelines : Risk reduction of cognitive decline and dementia
- 2) 二宮利治. 厚生労働科学研究費補助金特別研究事業. 日本における認知症の高齢者人口の将来推計に関する研究. 平成 26 年度総括・分担研究報告書.
- 3) 朝田隆. 厚生労働科学研究費補助金認知症対策総合研究事業. 都市部における認知症有病率と認知症の生活機能障害への対応. 平成 24 年度総括・分担研究報告書.
- 4) Selkoe, D. J.; Hardy, J. *EMBO Mol. Med.*, **2016**, *8*, 595–608.
- 5) (a) Ghosh, A. K.; Brindisi, M.; Tang, J. *J Neurochem.*, **2012**, *120*, 71–83. (b) Crump, C. J.; Johnson, D. S.; Li, Y. M. *Biochemistry*, **2013**, *52*, 3197–3216. (c) Plotkin, S. S.; Cashman, N. R. *Neurobiol. Dis.*, **2020**, *144*, 105010.
- 6) Sevigny, J.; Chiao, P.; Bussière, T.; Weinreb, P. H.; Williams, L.; Maier, M.; Dunstan, R.; Salloway, S.; Chen, T.; Ling, Y.; et al. *Nature*, **2016**, *537*, 50–56.
- 7) (a) Huang, E. J.; Reichardt, L. F. *Annu. Rev. Neurosci.*, **2001**, *24*, 677–736. (b) 化学と生物, **2008**, *46*, 24–31
- 8) Dawbarn, D.; Allen, S. J. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **2003**, *29*, 211–230.
- 9) 福島哲郎. 日本薬理学会, **2010**, *136*, 11–14.
- 10) Greene, L. A.; Tischler, A. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1976**, *73*, 2424–2428.
- 11) Li, J.; Sun, K.; Muroi, M.; Gao, L.; Chang, Y. T.; Osada, H.; Xiang, L.; Qi, J. *J. Cell. Mol. Med.*, **2019**, *23*, 6283–6294.
- 12) (a) Kubo, M.; Gima, M.; Baba, K.; Nakai, M.; Harada, K.; Suenaga, M.; Matsunaga, Y.; Kato, E.; Hosoda, S.; Fukuyama, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, *25*, 1586–1591. (b) Matsui, N.; Kido, Y.; Okada, H.; Kubo, M.; Nakai, M.; Fukuishi, N.; Fukuyama, Y.; Akagi, M. *Neurosci. Lett.*, **2012**, *513*, 72–77.
- 13) Tsukamoto, S.; Miura, S.; Yamashita, Y.; Ohta, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, *14*, 417–420.
- 14) Gao, L.; Xiang, L.; Luo, Y.; Wang, G.; Li, J.; Qi, J. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 6995–7000.

- 15) (a) Zhai, H.; Nakatsukasa, M.; Mitsumoto, Y.; Fukuyama, Y. *Planta Med.*, **2004**, *70*, 598–602. (b) Zhai, H.; Inoue, T.; Moriyama, M.; Esumi, T.; Mitsumoto, Y.; Fukuyama, Y. *Biol. Pharm. Bull.*, **2005**, *28*, 289–293.
- 16) (a) Fukuyama, Y.; Minami, H.; Takeuchi, K.; Kodama, M.; Kawazu, K. *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 6767–6770. (b) Kubo, M.; Nakai, M.; Harada, K.; Fukuyama, Y. *Tetrahedron*, **2019**, *75*, 2379–2384.
- 17) 西條速人. 徳島文理大学薬学部 修士論文 **2010**
- 18) 山口仁美. 徳島文理大学薬学部 卒業論文 **2013**
- 19) Imagawa, H.; Saijo, H.; Yamaguchi, H.; Maekawa, K.; Kurisaki, T.; Yamamoto, H.; Nishizawa, M.; Oda, M.; Kabura, M.; Nagahama, M.; Sakurai, J.; Kubo, M.; Nakai, M.; Makino, K.; Ogata, M.; Takahashi, H.; Fukuyama, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, *22*, 2089–2093.
- 20) Yanagimoto, T.; Kishimoto, S.; Kasai, Y.; Matsui, N.; Kubo, M.; Yamamoto, H.; Fukuyama, Y.; Imagawa, H. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **2020**, *30*, 127497.
- 21) 柳井翠. 徳島文理大学薬学部 卒業論文 **2015**
- 22) 小松加奈. 徳島文理大学薬学部 卒業論文 **2015**
- 23) 清水奈津美. 徳島文理大学薬学部 卒業論文 **2018**
- 24) Kawagishi, H.; Ando, M.; Shinba, K.; Sakamoto, H.; Yoshida, S.; Ojima, F.; Ishiguro, Y.; Ukai, N.; Furukawa, S. *Phytochemistry*, **1992**, *32*, 175–178.
- 25) Kawagishi, H.; Shimada, A.; Shirai, R.; Okamoto, K.; Ojima, F.; Sakamoto, H.; Ishiguro, Y.; Furukawa, S. *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 1569–1572.
- 26) (a) Ohta, T.; Kita, T.; Kobayashi, N.; Obara, Y.; Nakahata, N.; Ohizumi, Y.; Takaya, Y.; Oshima, Y. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 6229–6232.
- 27) Kikuchi, H.; Miyagawa, Y.; Sahashi, Y.; Inatomi, S.; Haganuma, A.; Nakahata, N.; Oshima, Y. *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*, 352–356.
- 28) Imagawa, H.; Saijo, H.; Kurisaki, T.; Yamamoto, H.; Kubo, M.; Fukuyama, Y.; Nishizawa, M. *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 1253–1255
- 29) Gamez, P.; Arends, I. W. C. E.; Reedijk, J.; Sheldon, R. A. *Chem. Commun.*, **2003**, *3*, 2414–

- 2415.
- 30) Poladura, B.; Martínez-Castañeda, Á.; Rodríguez-Solla, H.; Llavona, R.; Concellón, C.; Del Amo, V. *Org. Lett.*, **2013**, *15*, 2810–2813.
- 31) Tuntiwachwuttkul, P.; Limchawfar, B.; Reutrakul, VPO, Kusamran, K.; Byrne LT. *Aust J Chem.*, **1980**, *33*, 913 - 916
- 32) Smyth, M. S.; Stefanova, I.; Hartmann, F.; Horak, I. D.; Osherov, N.; Levitzki, A.; Burke, T. *R. J. Med. Chem.*, **1993**, *36*, 3010–3014.
- 33) Chu, J.; Suh, D. H.; Lee, G.; Han, A. R.; Chae, S. W.; Lee, H. J.; Seo, E. K.; Lim, H. J. *J. Nat. Prod.*, **2011**, *74*, 1817–1821.
- 34) Epp, J. B.; Widlanski, T. S. *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 293–295.
- 35) (a) Luo, S.; Wang, P. G.; Cheng, J. P. *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*, 555–558. (b) Kotoku, N.; Sumii, Y.; Kobayashi, M. *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 3514–3517.
- 36) (a) Meta, C. T.; Koide, K. *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 1785–1787. (b) Srinivasa Rao, K.; Mukkanti, K.; Srinivasa Reddy, D.; Pal, M.; Iqbal, J. *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 2287–2290.
- 37) Pine, S. H.; Cruz, S. G.; Gallego, C. H.; Tijerina, T.; Pettit, R. J.; Geib, G. D.; Pine, R. D. *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 1212–1216.
- 38) 松井敦聡, 田辺聡, 小関真由美, 小松加奈, 清水奈津美, 葛西祐介, 今川洋, 福山愛保. 第 132 回日本薬理学会近畿部会抄録集, **2017**, 30
- 39) 前川健. 徳島文理大学薬学部 卒業論文 **2012**
- 40) Smith, E.; Collins, I. *Future Med. Chem.*, **2015**, *7*, 159–183.
- 41) 仲井めぐみ. 徳島文理大学薬学部 修士論文 **2010**
- 42) Luche, J. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, 2226–2227.
- 43) Shiina, I.; Kubota, M.; Ibuka, R. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 7535–7539.
- 44) Pinchuk, A. N.; Rampy, M. A.; Longino, M. A.; Skinner, R. W. S.; Gross, M. D.; Weichert, J. P.; Counsell, R. E. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 2155–2165.
- 45) 岩田史恵, 土井史尚, 石神健, 渡邊秀典. 第 48 回天然有機化合物討論会講演要旨集, **2006** 427-432.
- 46) (a) Dai, M.; Danishefsky, S. J. *J. Am Chem Soc.*, **2007**, *129*, 3498–3499 (b) Dai, M.; Krauss,

- I. J.; Danishefsky, S. J. *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 9576–9583.
- 47) Gilbert, J. C.; Kelly, T. A. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 4193–4196.
- 48) (a) Aubin, Y.; Audran, G.; Monti, H.; De Clercq, E. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 374–381. (b) Dolby, L. J.; Elliger, C. A.; Esfandiari, S.; Marshall, K. S. *J. Org. Chem.*, **1968**, *33*, 4508–4511. (c) Audran, G.; Acherar, S.; Monti, H. *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 92–98.
- 49) Sparrow, K. J.; Carley, S.; Söhnel, T.; Barker, D.; Brimble, M. *Tetrahedron*, **2015**, *71*, 2210–2221.
- 50) Gilbert, J. C.; Selliah, R. D. *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 6259–6262.
- 51) Mitsunobu, O. *Synthesis*, **1981**, 1-28
- 52) Miyashita, M.; Suzuki, A.; Yoshikoshi, A. *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 4293–4296.
- 53) Iwabuchi, Y. *Chem. Pharm. Bull.*, **2013**, *61*, 1197–1213.
- 54) Yang, D.; Wong, M. K.; Yip, Y. C. *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 3887–3889.
- 55) Trost, B. M.; Masuyama, Y. *Tetrahedron Lett.*, **1984**, *25*, 173–176.
- 56) Kasai, Y.; Taji, H.; Fujita, T.; Yamamoto, Y.; Akagi, M.; Sugio, A.; Kuwahara, S.; Watanabe, M.; Harada, N.; Ichikawa, A.; et al. *Chirality*, **2004**, *16*, 569–585.
- 57) (a) Xu, Y. C.; Lebeau, E.; Walker, C. *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 6207–6210. (b) Xu, Y. C.; Bizuneh, A.; Walker, C. *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 455–458.
- 58) Obara, Y.; Nakahata, N.; Ohizumi, Y. *Brain Research*, **1998**, *806*, 79–88
- 59) Obara, Y.; Nakahata, N.; Kita, T.; Takaya, Y.; Kobayashi, H.; Hosoi, S.; Kiuchi, F.; Ohta, T.; Oshima, Y.; Ohizumi, Y. *Eur. J. Pharmacol.*, **1999**, *370*, 79–84.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました本学 今川洋教授に深謝いたします。著者が研究室に配属されてから、一から懇切丁寧に研究について御指導いただきました本学 葛西祐介講師に深く感謝いたします。研究に対する熱意の大切さを伝えてくださり、いつも励ましの言葉をいただきました本学 山本博文教授に深謝いたします。本論文を作成するにあたり、ご多忙の中、審査を賜りました本学 吉田昌裕教授、福山愛保教授、張功幸教授、徳島大学薬学部 難波康祐教授に厚く御礼申し上げます。本研究は多くの研究室の先生方の多大なる御協力によって遂行することができました。PC12細胞を用いた生物活性評価では、本学 福山愛保教授、久保美和准教授に御指導いただきました。第一章のマウスを用いた活性評価は岐阜医療科学大学薬学部 松井敦聡准教授に実施していただきました。第二章の光親和性標識実験では、本学 永浜政博教授、竹原正也講師に御指導いただきました。皆様に厚く御礼申し上げます。機器分析では、本学機器分析センター 田中正巳教授、岡本育子博士に御協力賜りました。厚く御礼申し上げます。本研究の遂行にあたり快く、様々な便宜を図っていただきました本学 薬品物理化学教室、微生物学教室の皆様に厚く御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、日本薬学会長井記念薬学研究奨励金によるご支援、日本科学協会の笹川科学研究助成によるご支援を賜りました。厚く御礼申し上げます。

研究室の庶務で大変お世話になりました藤井トシエ氏に深く感謝いたします。薬品製造学教室の先輩、同輩、後輩諸氏によって充実した研究室生活を送ることができました。厚く御礼申し上げます。

最後に、長い学生生活を支えてくれた両親、祖父母、兄、姉、弟に心から深謝いたします。