

基盤研究C(2)

11660207

海洋産アルカロイド、ラメラリンをモデルとした新規抗腫瘍性化合物の開発

石橋郁人

長崎大学水産学部

平成一三年三月

目 次

1. 緒言	1
2. ラメラリン誘導体の合成	
2-1. 合成方法	6
2-2. ベンジルイソキノリンの調製	8
2-2-1. 1-(3-Benzyloxy-4-methoxy)phenyl-2-nitrostyrene	9
2-2-2. 2-Methoxy-2-(3-benzyloxy-4-methoxyphenyl)nitroethane	9
2-2-3. 2-Methoxy-2-(3-benzyloxy-4-methoxyphenyl)ethyl-amine	10
2-2-4. N-(Alkoxyphenyl)acetyl-2-(3-benzyloxy-4-methoxyphenyl)ethylamine	12
2-2-5. 1-(Alkoxybenzyl)-6-benzyloxy-7-methoxyisoquinoline	13
2-3. 芳香族カルボン酸エステルの合成	14
2-3-1. Methyl 4-Benzyloxy-5-methoxy-2-methoxymethoxybenzoate	14
2-3-2. Methyl 2-methoxymethoxybenzoate	15
2-3-3. Methyl 4-benzyloxy-2-methoxymethoxybenzoate	15
2-3-4. Methyl 5-methoxy-2-methoxymethoxybenzoate	15
2-3-5. Methyl 2-methoxymethoxy-4,5-methylenedioxy-benzoate	17
2-4. ベンジルイソキノリンと芳香族カルボン酸エステルとの縮合反応	18

2-5. ラメラリン骨格の構築反応	20
2-6. ベンジル基の加水素分解による脱保護	22
2-7. ベンジル基とメチル基の同時除去によるポリヒドロキシ体の合成	23
3. ラメラリン誘導体の生理活性	24
3-1. ブラインシュリンプテスト	24
3-2. 細胞毒性試験	26
4. 結論	28
5. 実験の項	30
参考文献	55
参考資料	58

は し が き

本報告書は、文部省科学研究補助金（基盤研究（C））の補助をいただいて行った研究の成果を収めてある。

巻き貝の一種 *Lamellaria* sp. やホヤ類 *Didemnum* sp. から単離されたイソキノリン骨格を持つアルカロイドであるラメラリン類は、ウニ卵の細胞分裂阻害、細胞毒性、免疫調節活性、エイズウイルス増殖阻害活性、ガン細胞の多剤耐性（MDR）機構阻害活性など多様な生理活性を持つことが知られている。

著者等が合成に成功したラメラリンDの細胞毒性を二種類の正常細胞（Vero 及び MDCK）及び腫瘍細胞（HeLa 及び XC）を用いコロニー形成阻害活性を指標に調べた結果、細胞種間の選択性には欠けるものの、ラメラリンDは対照薬剤として用いた抗生物質マイトマイシンCをしのぐ高い活性がみられた（IC₅₀ 10-23 nM）。

そこで本研究では、ラメラリン類の構造と活性の関係を解明し、新規抗ガン剤の開発のための基礎的知見を得ることを目的とし、石橋がラメラリンDの基本骨格上の置換基を変化させた一連の誘導体を合成し、小田がそれらの細胞毒性を調べた。その結果、ラメラリンDの8位と20位の水酸基は細胞毒性発現に必須であるが、13位のメトキシ基、14位の水酸基および21位のメトキシ基は細胞毒性に必ずしも関与しておらず、場合によっては取り除くことが可能であるなど、ラメラリンをモデルとした新しいタイプのガン治療薬の開発研究へと展開する上で基礎的かつ重要な知見を得ることができた。

研究組織

研究代表者：石橋郁人（長崎大学水産学部助教授）

研究分担者：小田達也（長崎大学水産学部助教授）

研究経費

平成 1 1 年度 2,400 千円

平成 1 2 年度 1,200 千円

計 3,600 千円

研究発表

(2)口頭発表

Ishibashi, F.; Tanabe, S.; Oda, T.; Iwao, M., Synthesis and Biological Activity of Lamellarin Derivatives, The 6th Joint Symposium of Cheju National University and Nagasaki University on Science and Technology, Abstract pp. 104-107, Cheju, Korea, April 20-22, 2000.

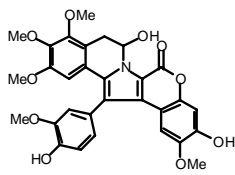
1. 緒言

海洋には数万種に及ぶ生物が生息し、多種多様な生理活性物質を生産している。近年、海洋生物由来の生理活性物質に関する分野における研究の進歩には著しいものがあり、新規な化学構造と多様で強力な生理活性を有する物質が続々と明らかにされている。また、研究の目的も医・農薬素材の検索、水産増養殖産業発展への寄与、水産食品の安全性確保など多様化している。

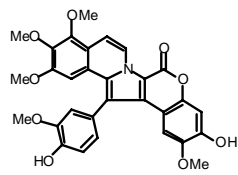
ラメラリンは、1995年 Faulkner 等 [1]によりカリブ海産の軟体動物 *Lamellaria sp.* から初めて単離されたアミノ酸 L-DOPA 由来のピロール骨格を持つアルカロイドである。その後、Faulkner 等が単離した4種のラメラリン（ラメラリンA、B、C、D）に加え、セイシェル諸島産 *Didemnum chartaceum* [2]、グレートバリアーリーフ産 *Didemnum sp.* [3]、南オーストラリア産 *Didemnum sp.* [4]、アラビア海産の未同定種 [5, 6]、グレートバリアーリーフ産 *D. chartaceum* [7]等のホヤからも同族体が続々と単離され、現在では30種類以上のラメラリン類が知られている (Fig. 1)。

ラメラリン類は次のような多彩で重要な生理活性を持つことが知られている。

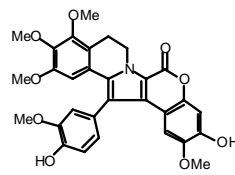
- 1) Anderson 等 [1]は、ラメラリンD及びCは19 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で、ウニ卵の細胞分裂をそれぞれ78%及び15%阻害することを報告している。
- 2) Carroll 等 [3]は、ラメラリンI、K及びLはいずれもP388及びP549細胞に対し高い細胞毒性 (IC₅₀ 約0.25 mg/mL) を示し、K及びLは免疫調節活性 (LcV:MLR 147及び98) を持つことが明らかにされている。
- 3) Reddy 等 [5]は、ラメラリンNは、細胞毒性に2種類のメラノーマ細胞種間である程度の選択性を示すことを報告している (SK-MEL-5細胞のLC₅₀ 1.87 x 10⁻⁷ Mに対しUACC-62細胞のLC₅₀ 9.88 x 10⁻⁶ M)。



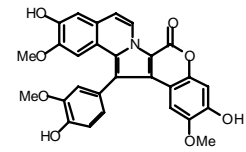
lamellarin A



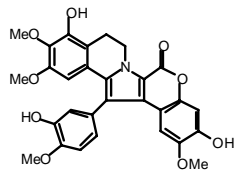
lamellarin B



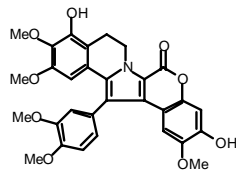
lamellarin C



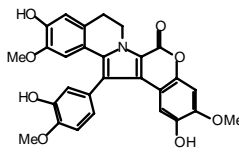
lamellarin D



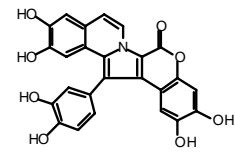
lamellarin E



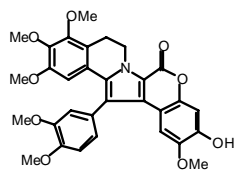
lamellarin F



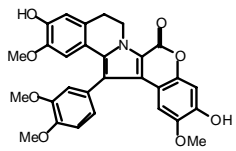
lamellarin G



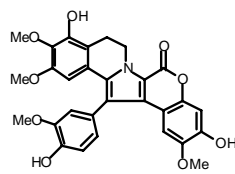
lamellarin H



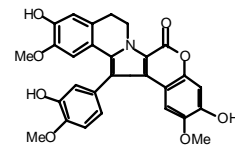
lamellarin I



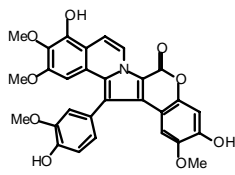
lamellarin J



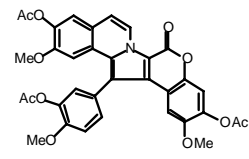
lamellarin K



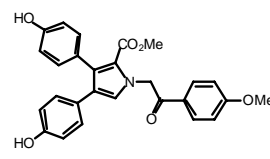
lamellarin L



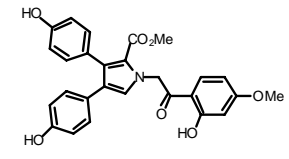
lamellarin M



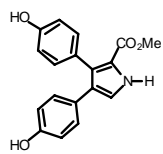
lamellarin N triacetate



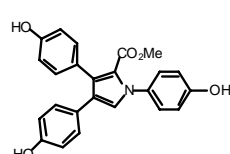
lamellarin O



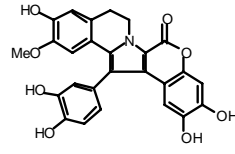
lamellarin P



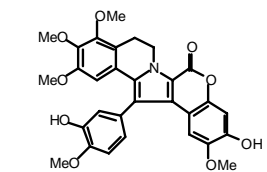
lamellarin Q



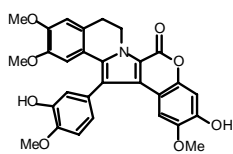
lamellarin R



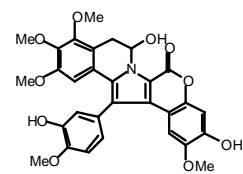
lamellarin S



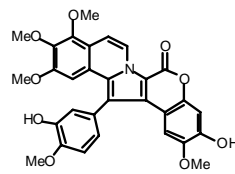
lamellarin T
(20-sulfate)



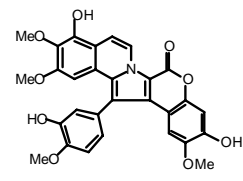
lamellarin U
(20-sulfate)



lamellarin V
(20-sulfate)



lamellarin W



lamellarin X

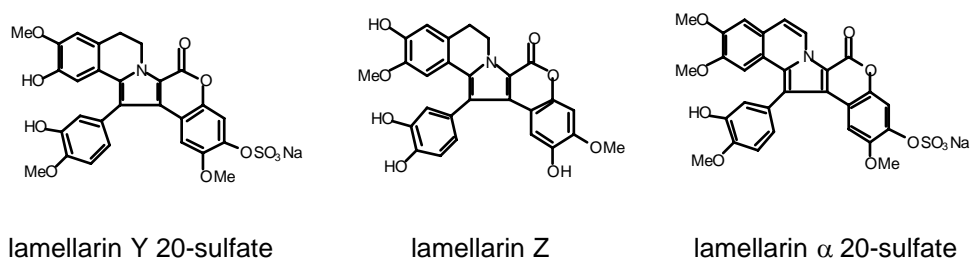


Fig. 1. Naturally Occurring Lamellarins

4) 多剤耐性 (MDR) は、ガンの化学療法においてよく起こる副作用である。腫瘍細胞やヒトのガンの両方でおこることが報告されている。MDR は P-糖タンパク質、多剤耐性タンパク質 (MRP)、肺耐性タンパク質 (LRP) などの薬剤追放タンパク質の過剰発現の結果である。Quesada 等[8]は 13 種のラメラリン (A, B, D, I, J, K, L, M, N とそれらのアセテート) が多剤耐性 (MDR) 獲得ガン細胞に対しても細胞毒性を示すこと、また、ラメラリン I を用いた実験により、これらは MDR の主要な機構である p-糖タンパク質による薬物の細胞外への放出を阻害することを明らかにしており、ラメラリン類は新しいタイプの抗ガン剤あるいは抗 MDR 剤としてガンの化学療法に活用されることが期待されている。

5) Faulkner 等[6]は、近年新たに単離されたラメラリン α 20-スルフェートはレトロウイルスの複製に関与する酵素である HIV-1 integrase を *in vitro* において特異的に阻害し (IC₅₀ 16 μM for terminal cleavage activity and 22 μM for the strand transfer activity)、*in vivo* においても HIV-1 ウイルスの複製を阻害することを見だし (IC₅₀ 8 μM)、新しい抗エイズ薬のリードとして有望であることを指摘している。

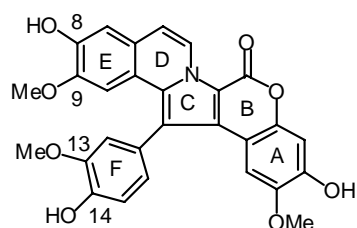
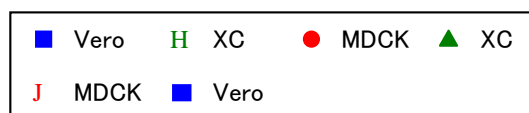
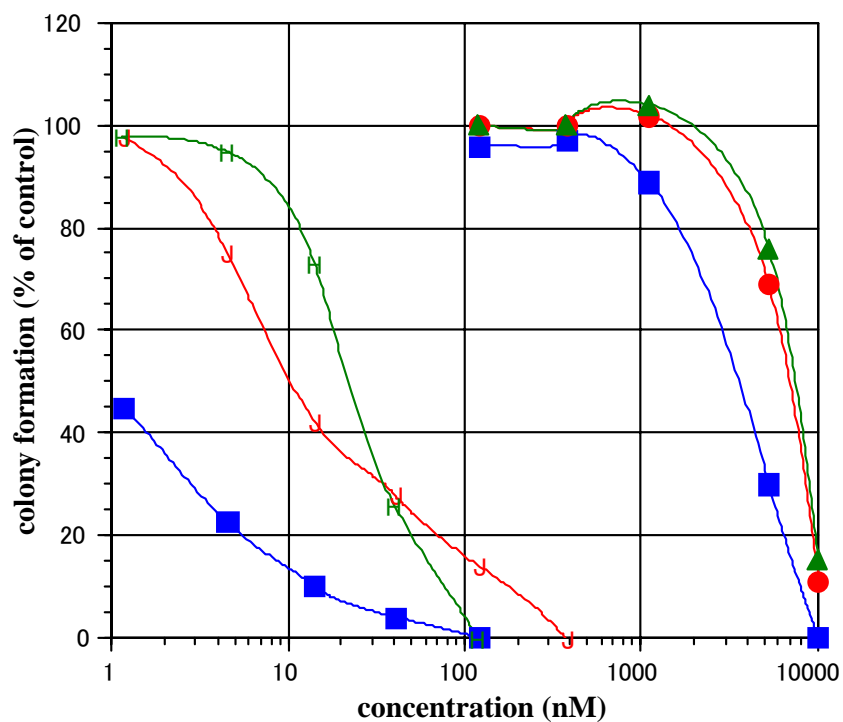
一方、著者等が合成に成功[9]したラメラリンD (LD, **1a**)の細胞毒性を二種類の正常細胞 (Vero 及び MDCK) 及び腫瘍細胞 (HeLa 及び XC) を用いコロニー形成阻害活性を指標に調べた結果 (Fig. 2)、細胞種間の選択性には欠けるものの、ラメラリンDは対照薬剤として用いた抗生物質マイトマイシンCをしのぐ高い活性がみられた[10] (IC_{50} 10-23 nM)。

そこで本研究では、ラメラリン類の構造と活性の関係を解明し、新規抗ガン剤の開発のための基礎的知見を得ることを目的とした。具体的には、以下の内容の研究を行った。

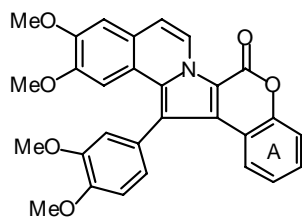
1) ラメラリン基本骨格上に結合した種々の酸素官能基の細胞毒性に対する役割を明らかにするために、これらを除いた化合物あるいは他の基で置換した誘導体を各種合成し、その生理活性を調べた。

2) 8, 9, 13, 14位にメトキシ基を持つラメラリン誘導体は天然には存在しないが、市販試薬パパベリンからの誘導が可能であり、合成のステップを大幅に短縮することができ、医薬としての実用化には有利であるので、A環上の置換基を変化させた一連の8, 9, 13, 14-テトラメトキシ体を合成し、それらの生理活性を天然物のものと比較した。

Fig. 2. Cytotoxicity of Lamellarin D and the Model Compound (colony assay)



Lamellarin D (Lam D)



Model Compound (MC)

	IC ₅₀ (nM)		
	Lam D	MC	MMC
Hela	10.5	5700	68
XC	12.4	5600	
Vero	10.5	4700	
MDCK	22.5	5600	

Lam D, lamellarin D; MC, model compound
MMC, mitomycin C

2. ラメラリン誘導体の合成

2- 1. 合成方法

ラメラリン誘導体は著者等が開発した方法[9]により合成した。そのアウトラインを **Fig. 3** に示す。まず、合成法が確立されており調製が容易なベンジルイソキノリン **A** を強塩基で処理し、ベンジル位のアニオンを発生させ、芳香族カルボン酸エステル **B** に付加させることにより縮合物 **C** とする。つぎに **C** の窒素原子をプロモ酢酸エチルでアルキル化し4級アンモニウム塩 **D** とする。さらに **D** をトリエチルアミン等の塩基で処理することにより窒素イリド発生させ、このものの分子内カルボニル基との脱水縮合と芳香化によるピロール環の形成と、ラクトン化を同時に行いラメラリン骨格 **E** を構築する。最後に、水酸基の保護基であるベンジル基を加水素分解し取り除くことによりラメラリン誘導体 **F** を得る。また、ポリヒドロキシ体はメチル基とベンジル基を三臭化ホウ素により同時に除去することにより得る。

本法によると、ベンジルイソキノリン **A** と芳香族カルボン酸エステル **B** を適当に組み合わせることにより、数々の誘導体の合成が可能となる。

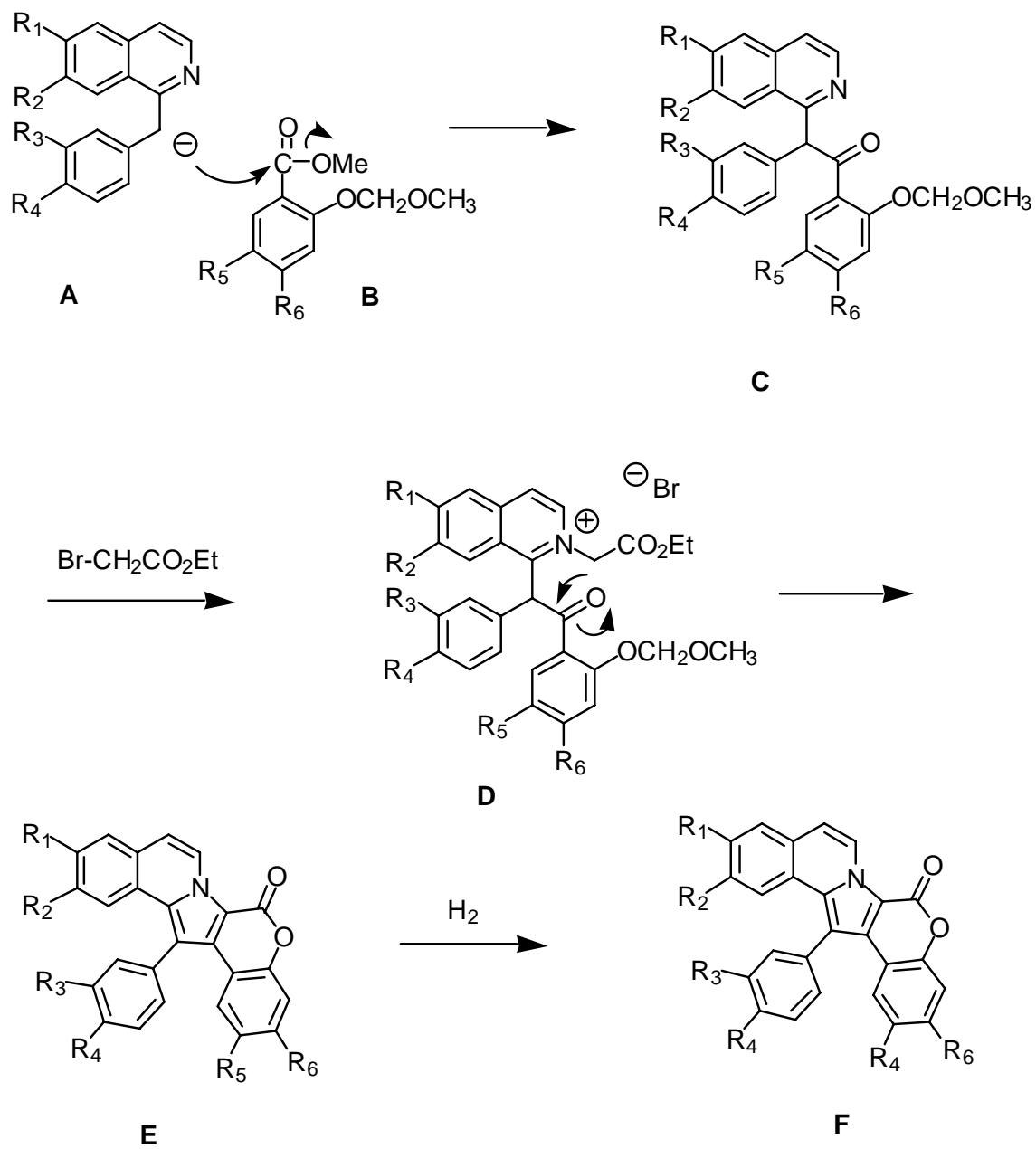


Fig. 3. Synthetic Route to Lamellarin Derivatives

2- 2. ベンジルイソキノリンの調製

まずは、上述の合成法での重要な中間体となるベンジルイソキノリン **A** の市販試薬として入手可能なパパベリン (**2d**: $R_1=R_2=R_3=R_4=OMe$) 以外のものは、すでに確立された方法[11]により調製した (Fig. 4)。

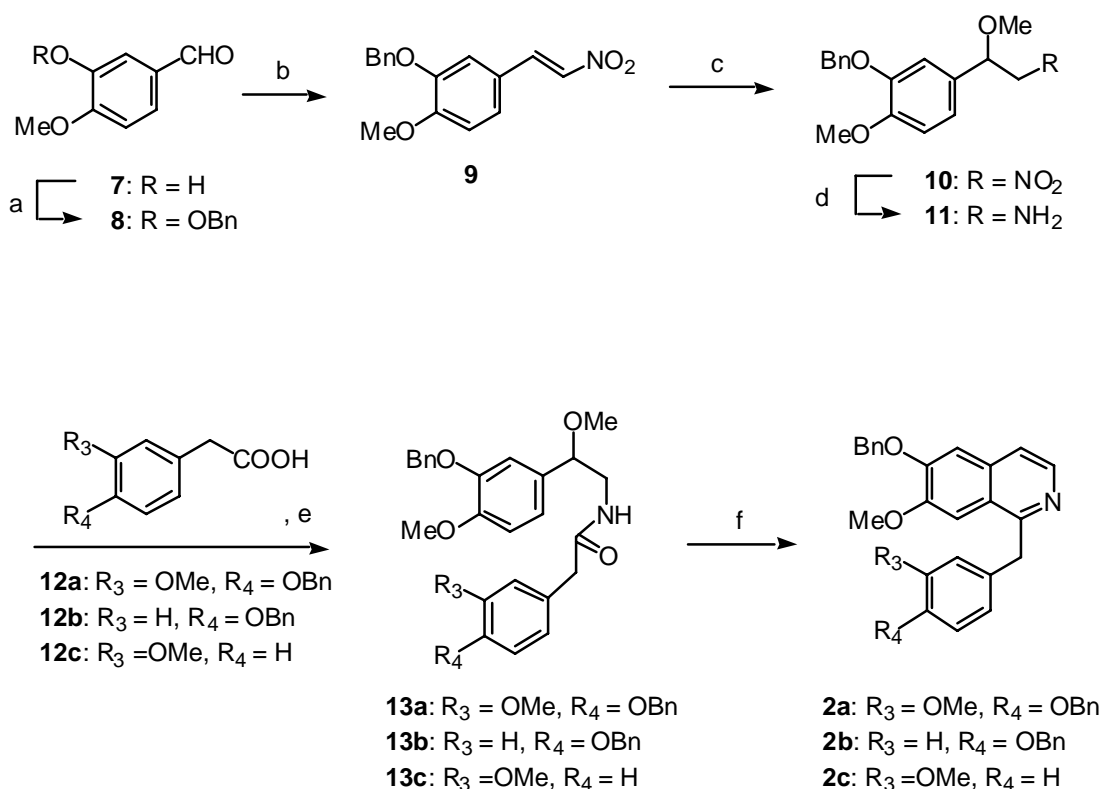


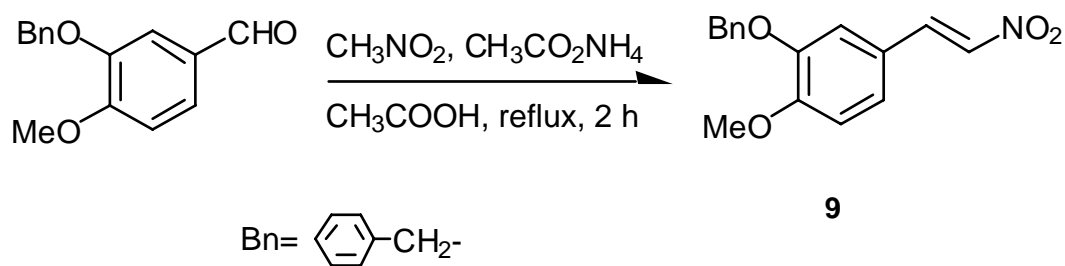
Fig. 4. Syntheses of Benzyloisoquinolines

reagents and conditions: (a) BnBr, K₂CO₃, acetone, reflux; (b) CH₃NO₂, AcONH₄, AcOH, reflux; (c) NaOMe, MeOH, rt, 5 min; (d) LiAlH₄, ether-THF, reflux; (e) DCC, CH₂Cl₂, rt; (f) POCl₃, benzene (or CH₂Cl₂), reflux.

原料としてイソバニリン (**7**) を用い、フェノール性水酸基をベンジル(Bn)基で保護し **8** とし、ニトロアルドール反応によりニトロスチレン **9** とする。このものの二重結合にメタノールを共役付加し **10** とし、ニトロ基を還元しアミン **11** とする。次にこのものを市販(**12c**)あるいは別途調製した(**12a, 12b**)フェニル酢

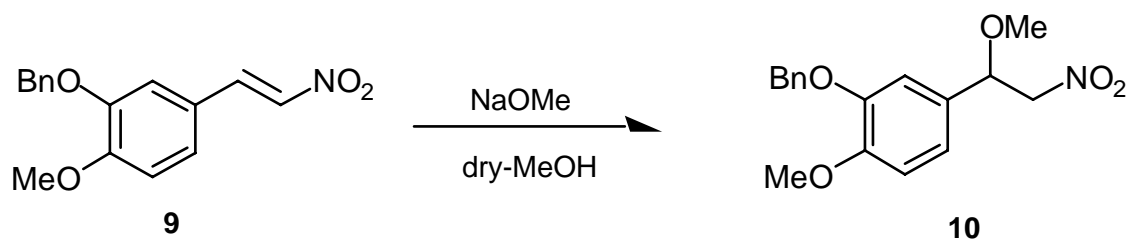
酸誘導体 **12a**~**12c** と縮合し、それぞれ、アミド **13a**~**13c** とする。最後にこれらを Bischler-Napieralski 反応に付し、ベンジルイソキノリン **2a**~**2c** とする。

2-2-1. 1-(3-Benzyloxy-4-methoxy)phenyl-2-nitrostyrene (9)



ベンジルイソバニリン、ニトロメタン及び酢酸アンモニウムの混合物を酢酸中 2 時間加熱還流することにより、ニトロスチレン **21** とした。この方法は、非常に再現性がよく、数回反応を行ったがいずれの場合も高収率で反応が進行した。

2-2-2. 2-Methoxy-2-(3-benzyloxy-4-methoxyphenyl)nitro-ethane (10)



次に、2-Methoxy-2-(3-benzyloxy-4-methoxyphenyl)nitroethane (**10**) の合成を行った (Table 1)。ニトロスチレン **9** へのメタノールの共役付加反応では、原料のニトロスチレン **9** がメタノールに非常に溶けにくいため反応は不均一で開始しなければならない。また、この反応は反応温度と時間に敏感で、長時

間の反応を行ったり反応温度が高くなると多くの重合物が生成し収率が著しく低下した。反応条件を検討した結果、ニトロスチレンのメタノールけんたく液に-10℃でナトリウムメトキシドのメタノール溶液を一度に加え、0℃付近で5分間攪拌し反応を直ちに停止するとかなりよい収率で付加物が得られることがわかった。

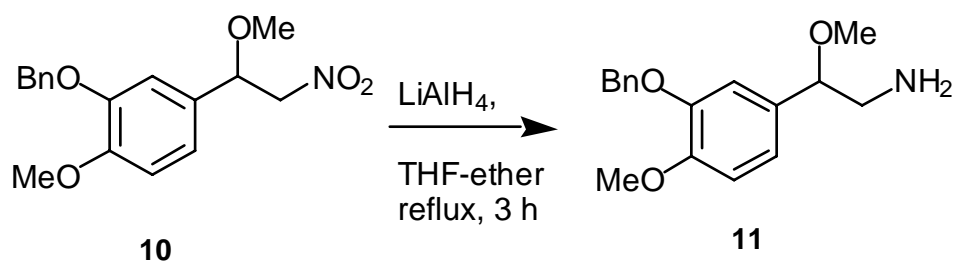
ここで、**9**を溶かす際にジクロロメタンを補助溶媒として用いる方法もあるが、収率が低下すると予測し、メタノールだけを溶媒とした。また、ナトリウム塩の代わりにカリウム塩を使用してみたが(run 5)、収率の向上には至らなかった。

Table 1 Addition of Methanol to the Nitro-olefin **9**

run	reaction time	reagents	yield
1	5min	dry MeOH	61%
2	5min	dry MeOH	49%
3	5min	dry MeOH	75%
4	5min	dry MeOH	33%
5	5min	dryMeOH/t-BuOK	55%

2-2-3. 2-Methoxy-2-(3-benzyloxy-4-methoxyphenyl)ethyl-amine (**11**)

ニトロ化合物 **10** のアミン **11** への還元反応は、比較的小スケールで反応を行った方が高収率であった (Table 2)。収率を上げるために何度か分けて行った。また、ここでの反応は3回ほど行ったが、いずれも収率が64%、0%、



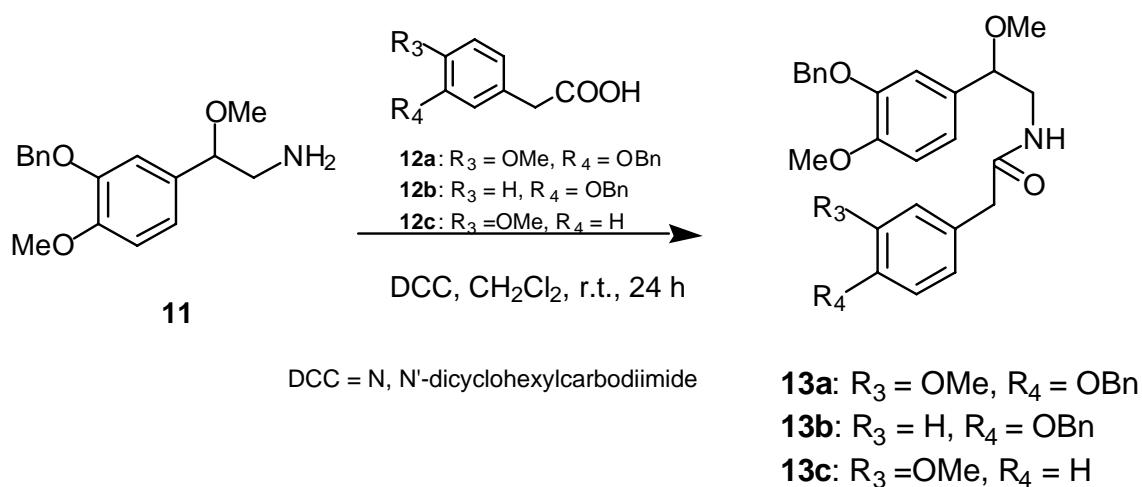
40%とばらつきがあった。目的物が得られなかったときの原因としては、還元剤が活性を失っていたのではないかと考えられる。また、run1 と 2 の実験で収率が悪かった理由は反応中に水が入ったり抽出が不十分であったためと考えられる。また、この化合物は幾分不安定であるため長期間の放置は分解を引き起こすことがわかった。

Table 2 Reduction of the Nitro Compound 11

run	reagents	reaction time	yield
1	LiAlH ₄ (2eq) ether-THF	reflux,3h	40%
2	LiAlH ₄ (2eq) ether-THF	reflux,3h	0%
3	LiAlH ₄ (3eq) ether-THF	reflux,3h	64%

2-2-4.

N-(Alkoxyphenyl) acetyl-2-(3-benzyloxy-4-methoxy-phenyl) ethylamine
(13a~13c)



得られたアミン **11** とカルボン酸 **12a**[12]~**12c** とのアミド化反応においては、脱水縮合剤としてジシクロロヘキシルカルボジイミド (DCC) を用いる方法により行った (Table 3)。まず、乾燥 CH_2Cl_2 に DCC を溶かし攪拌した溶液にそれぞれのカルボン酸を加 25 分攪拌した。この溶液に乾燥 CH_2Cl_2 に溶かしたアミン **23** を加え一晩攪拌した後に水を加えて反応を停止した後に抽出及び精製を行いアミドを得た。ここでの反応において、いずれのカルボン酸を用いた場合でも、スケールが大きくなるにつれて収率は低下した。

Table 3 Amidation of **11**

amide	R_3	R_4	yield
13a	OMe	OBn	76% (from 10)
13b	H	OBn	71%
13c	OMe	H	60%

2-2-5. 1-(Alkoxybenzyl)-6-benzyloxy-7-methoxyisoquino-line (2a-c)

この反応は、古くからオキシ塩化リン(POCl_3)を縮合剤として使用することにより進行することが知られており、ベンゼン中アミド **13a-c** を 3.0 等量のオキシ塩化リンとともに加熱還流することによりそれぞれ 57, 52, 35%の収率で得ることができた (Table 4)。この反応は過剰のオキシ塩化リンを使用しないとよく反応が進行しないので反応停止の際には十分に冷却し未反応のオキシ塩化リンを分解する必要があった。

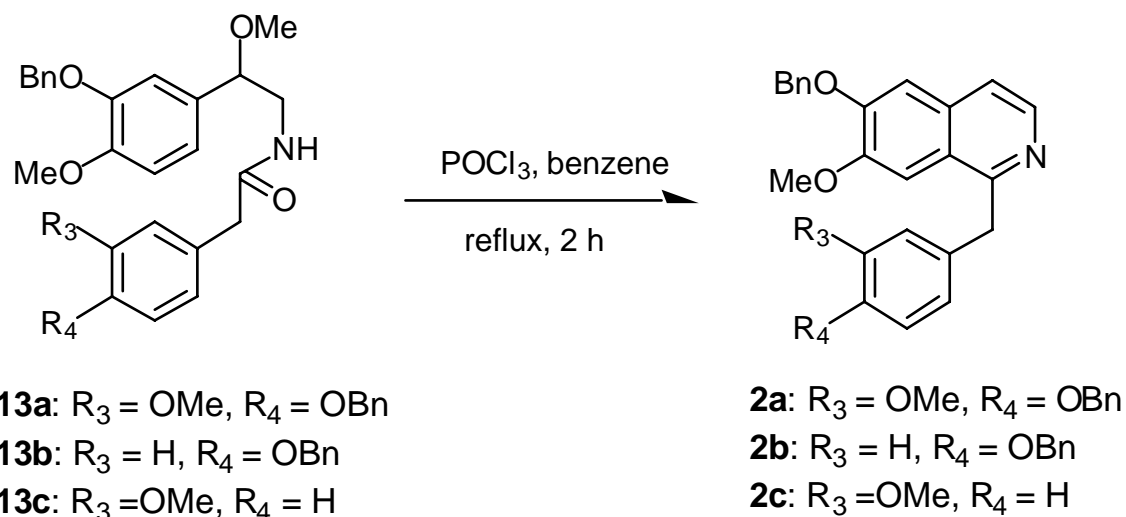


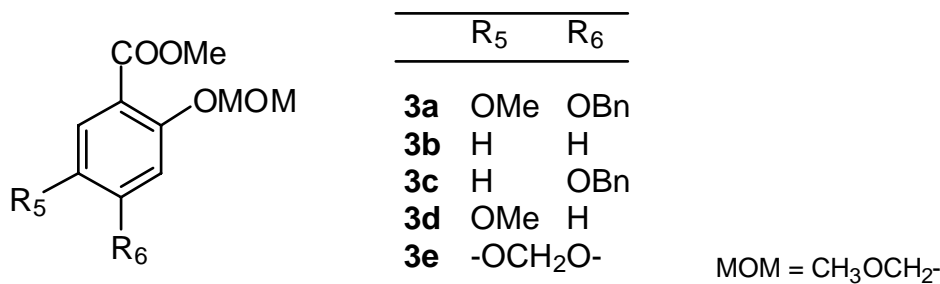
Table 4 Bischler-Napieralski Reaction of 13a-13c

product	R_3	R_4	yield
2a	OMe	OBn	57%
2b	H	OBn	52%
2c	OMe	H	35%

また、アミド **13c** に於いては、溶媒をベンゼンの代わりに、より沸点が高いトルエンに換えて環化反応を行ってみたが、33%と収率の向上には至らなかった。

2- 3. 芳香族カルボン酸エステルの合成

もう一方のフラグメントである芳香族カルボン酸エステル **3a**~**3e** はそれぞれ次のように合成した。



2-3-1. Methyl 4-Benxyloxy-5-methoxy-2-methoxymethoxybenzoate (**3a**)

このものは、既に報告した方法[9]により 2,4-ジヒドロキシ安息香酸メチルより 4 工程で調製した (Fig. 5)。2,4-ジヒドロキシ安息香酸メチルの水素結合をしていない 4 位の水酸基のみを選択的にベンジル化[13]し **15** とし、5 位を位置選択的に臭素化し **16** を得た。このものの臭素原子を銅イオン存在化の置換反応[14]によりメトキシ基に置換し **17** とし、最後に 2 位の水酸基をメトキシメチル基で保護し **3a** とした。

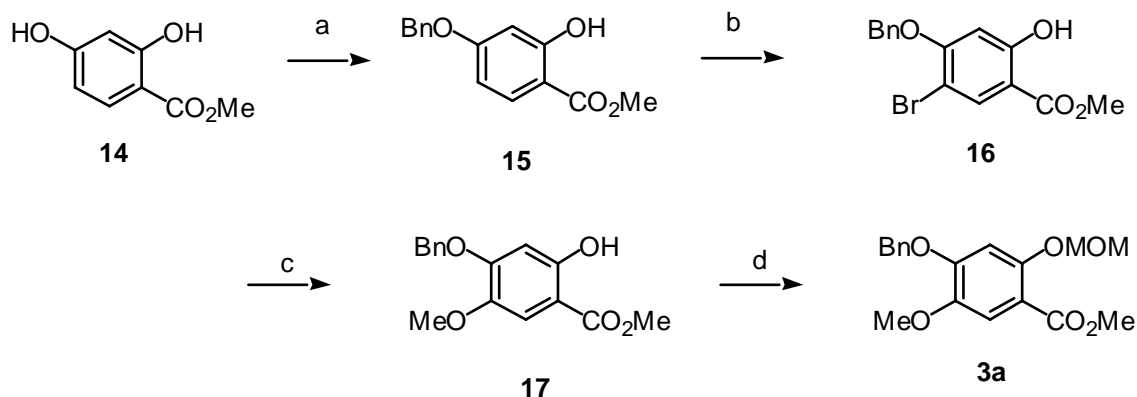


Fig. 5. Synthesis of Methyl 4-benzyloxy-5-methoxy-2-methoxymethoxybenzoate (**3a**)
reagents and conditions: (a) BnBr, K₂CO₃, acetone, reflux, 91%; (b) Br₂, CHCl₃, rt, 91%;
 (c) NaOMe, CuCl₂, DMF-MeOH, reflux, 63%; (d) MOMCl, *t*-BuOK, THF, rt, 94%.

2-3-2. Methyl 2-methoxymethoxybenzoate (3b)

この化合物は、市販のサリチル酸メチルをメトキシメチル化することにより調製した。

2-3-3. Methyl 4-benzyloxy-2-methoxymethoxybenzoate (3c)

この化合物は、4位をベンジル化した2,4-ジヒドロキシ安息香酸メチル(2-3-1章参照)をメトキシメチル化することにより調製した。

2-3-4. Methyl 5-methoxy-2-methoxymethoxybenzoate (3d)

この化合物は、市販の5-ブロモサリチル酸から3工程で調製した (Fig. 6)。

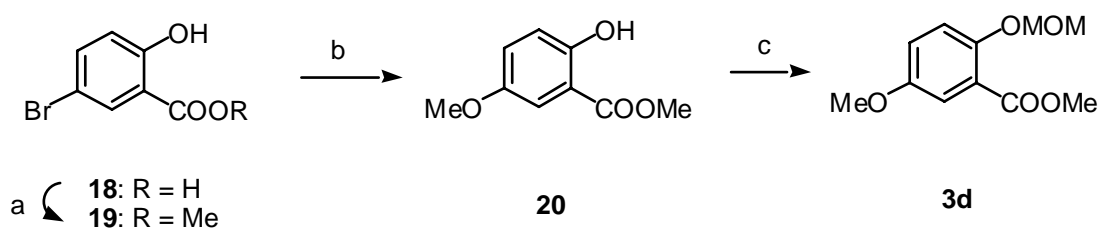


Fig. 6 Synthesis of Methyl 5-methoxy-2-methoxymethoxybenzoate (3d)
reagents and conditions: (a) $\text{BF}_3\text{-MeOH}$, reflux, 8h, 80%; (b) NaOMe , CuCl_2 , DMF-MeOH , 80°C , 17%; (c) MOM-Cl , NaH , THF , rt, 2 h, 86%.

まずは 5-ブロモサリチル酸のエステル化反応から始めたが、一般に芳香族カルボン酸は反応性に乏しく通常の硫酸とメタノールを用いたメチルエステル化では反応が進行しにくいと予想されたので、反応性の良い BF_3 -メタノール錯体中で加熱する方法を用いた。この方法により目的物を高収率で得ることができた。

次に **19** の臭素原子をメトキシ基に置換した。芳香環上の求核置換反応は通常の求核試薬ではほとんど反応が進行しないことが知られているが、銅イオン存在下では例外的に進行する。2 価の塩化銅を触媒として使用することにより **19** の芳香環上の臭素原子をメトキシ基で置換した。収率が 17% とあまり高収率ではなかったがこの原因としては銅塩由来のものと思われる難溶性の微細結晶が副成し、除去が困難であったためと考えられる。

化合物 **20** のフェノール性水酸基は、ベンジルイソキノリンとの縮合に置いてカルバニオンを発生させるために反応性の高い水酸基が障害とならないように保護する必要がある。保護基としては酸性条件下での除去が容易なメトキシメチル基 (MOM) を用いた。水素化ナトリウムの THF 溶液にフェノール **20** の THF 溶液を滴下しフェノキシドを発生させこれにクロロメチルメチルエーテルを加えることにより高収率で目的物を得ることができた。

2-3-5. Methyl 2-methoxymethoxy-4,5-methylenedioxybenzoate (3e)

この芳香族カルボン酸エステルは、セサモールを原料とし3工程で調製した (Fig. 7)。

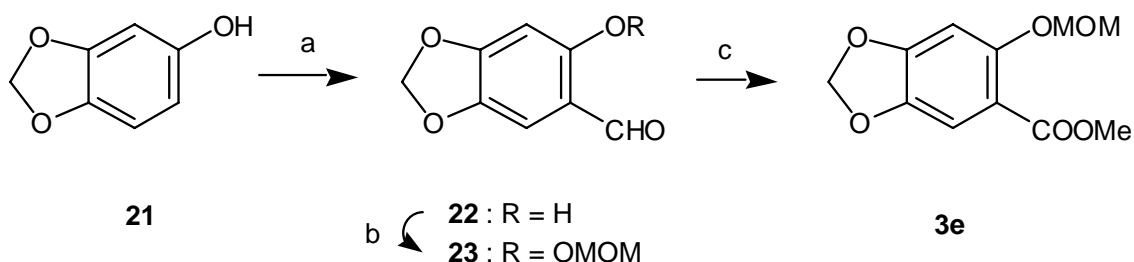


Fig. 7 Synthesis of Methyl 2-methoxymethoxy-4,5-methylenedioxybenzoate (**3e**)
reagents and conditions: (a) POCl₃, DMF, 55%; (b) KOH, MOMCl, CH₃CN, 73%;
(c) MnO₂, cat. KCN, MeOH, AcOH, 79%.

Vilsmeier 法により、セサモール (**21**) の2位にホルミル基を導入し、ベンズアルデヒド **22**[15]を 55%の収率で得た。このアルデヒドのフェノール性水酸基をメトキシメチル基で保護し **23** とし、アルデヒド基をエステルへ酸化することによって目的の合成中間体である芳香族カルボン酸エステル **3e** を通算収率 32%で得た。

2,4-ジヒドロキシ安息香酸から芳香族カルボン酸エステル **3a** への通算収率は 30%であり、**3e** のもの (32%) と大差はないが、合成に要する工程を **3a** の 5工程から 3工程へと短縮でき、また中間体がすべて結晶であるため取り扱いが容易であり、ラメラリンHの等の、20位と21位に水酸基を持つラメラリン類の鍵中間体としては **3e** の方がすぐれていることがわかった。また、メチレンジオキシ基は、ベンジル基やメトキシ基の存在下、選択的に脱保護することができるので、さらなる誘導体の合成にも有利である。

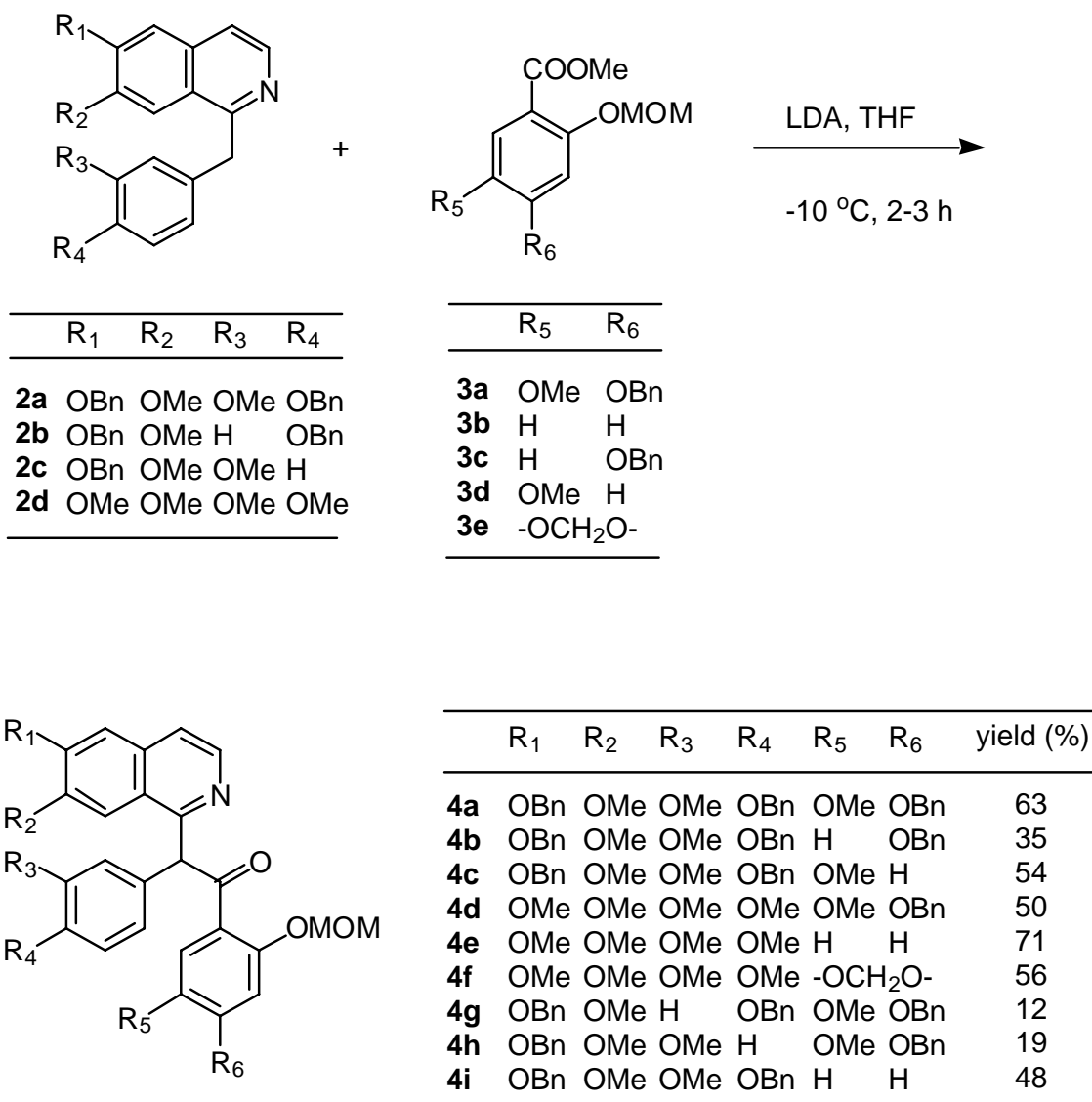
2- 4. ベンジルイソキノリンと芳香族カルボン酸エステルとの縮合反応

4種類のベンジルイソキノリン **2a~d** とべ5種類の芳香族カルボン酸エステル **3a~e** を適当に組み合わせ、縮合させることにより、**4a~4h** の合計8種の縮合物を得た (Fig. 8)。

縮合反応は、まずブチルリチウムとジイソプロピルアミンからテトラヒドロフラン (THF) 中で調製した強塩基、リチウムジイソプロピルアミド (LDA) の溶液に、ベンジルイソキノリンの THF 溶液を -78°C にて滴下し、ベンジル位の水素を引き抜くことによりカルバニオンを発生させる。この際に生じるアニオンは深赤色をしており、アニオンの発生度により色の濃さが変わるために発生状況が目視できる。この際用いる LDA の量は 1.1 もしくは 1.2 等量程度で、それ以上加えると収率が著しく低下する。これは、おそらく生成物が塩基性条件下に不安定で分解するためであるためと考えられる。また、カルバニオンを十分発生させるためには、ベンジルイソキノリンの滴下後、反応温度を -10°C まで徐々に昇温する必要がある。このようにして調製したアニオン溶液に芳香族カルボン酸エステルを加えることにより、縮合反応を行うが、反応溶液の色がしだいに薄くなり、反応終了時には黄色もしくは橙色になるので反応の終了時点が明らかである。これら一連の反応は、反応時間や反応湿度に敏感であり完全に無水条件でおこなわないと反応が全く進行しないか収率が著しく低下した。

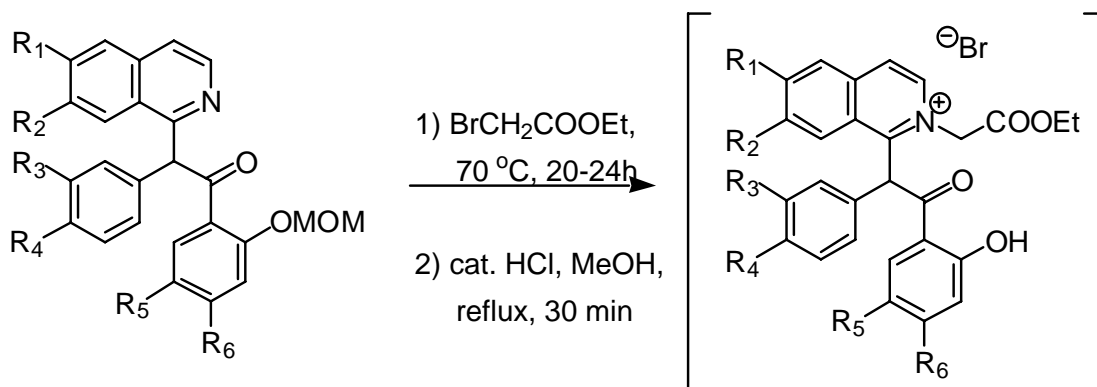
反応の収率は一般には 50%前後で、最高でも 71%であり、反応条件をさらに検討する必要がある。また、縮合物 **4h** の収率が 19%と著しく悪いのは、操作法のミスによるものと思われる。

Fig. 8. Condensation of Benzyloisoquinoline 2a-d with Benzoate 3a-e

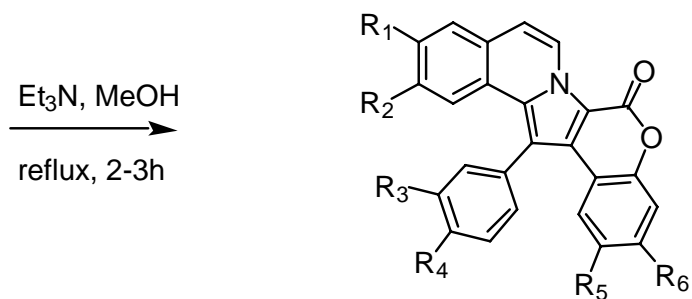


2- 5. ラメラリン骨格の構築反応

Fig. 9. Construction of Lamellarin Framework



5a-h



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Yield (%)
6a	OBn	OMe	OMe	OBn	OMe	OBn	34
6b	OBn	OMe	OMe	OBn	H	OBn	27
6c	OBn	OMe	OMe	OBn	OMe	H	33
6d	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	OBn	28
1f	OMe	OMe	OMe	OMe	H	H	33
1j	OMe	OMe	OMe	OMe	-OCH ₂ O-		28
6e	OBn	OMe	H	OBn	OMe	OBn	58
6f	OBn	OMe	OMe	H	OMe	OBn	17
6g	OBn	OMe	OMe	OBn	H	H	15

次にこの縮合物 **4a~4i** からラメラリン骨格を構築した (Fig. 9)。まず、**4a~4i** をブロモ酢酸エチルと共に加熱し 4 級塩化したが、この反応の際、メトキシメチル基の一部がはずれ、生成物はメトキシメチル基があるものと内ものとの混合物として得られたので、このものは未精製のまま、メタノール性の塩酸で加熱し、メトキシメチル基を完全に取り除き **5a~5h** とした。さらにこのものも単離することなく、過剰のトリエチルアミンで処理し窒素イリドを発生させ、メタノール中で加熱還流することにより分子内縮合およびラクトン化を同時に行い、ラメラリン骨格を持つ化合物 **5a~5c** を得た。

この反応はもともと最高でも 35% 程度の収率しか得られないことがわかっているが、化合物 **6f** と **6g** に関しては、それぞれ 17 および 15% と極端に悪い収率でしか得られなかった。低収率であった理由は、この反応で副生する物質の構造から次のように考えられる。

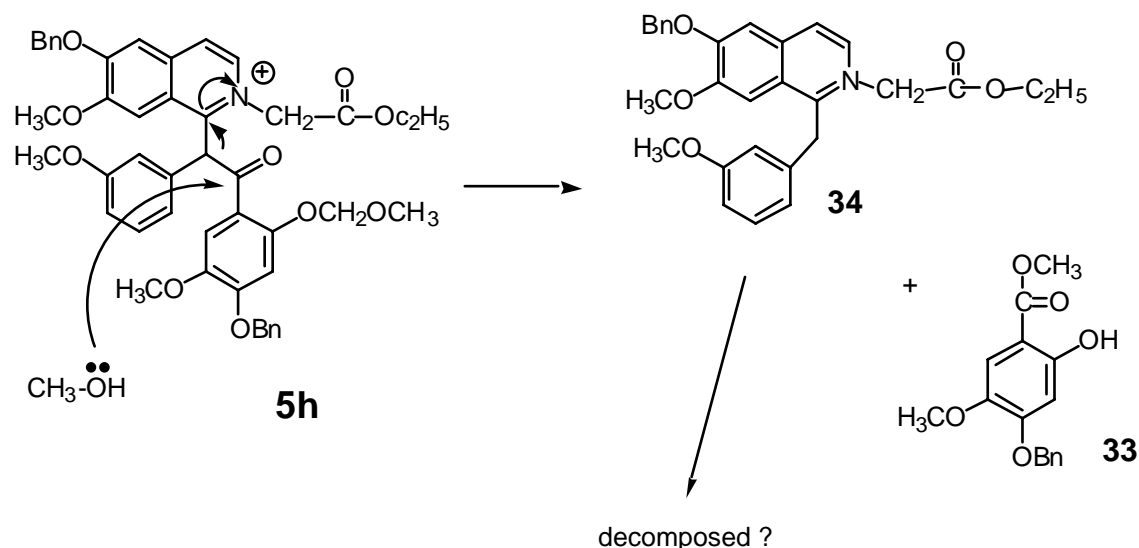
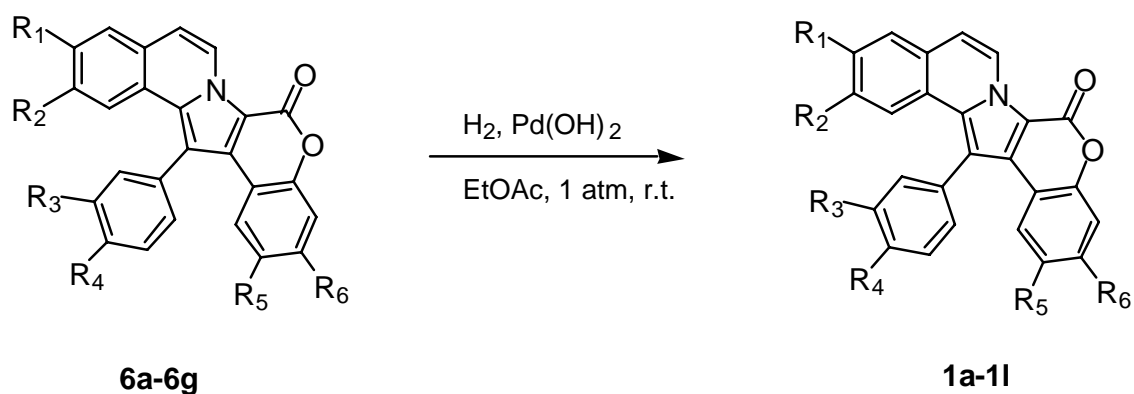


Fig.10. Methanolysis of 5h

縮合物 **4h** からの反応の結果、かなり多量の芳香族カルボン酸のメチルエステル **33** が回収された (Fig. 10)。このことにより反応溶媒として用いたメタノールが 4 級塩のケトンカルボニル基を求核攻撃し、その結果、芳香族エステル由来の部分が脱離してしまったものと思われる。**34** に相当する残りの部分は確認できていないが、反応物の TLC 分析によると多くのスポットが確認できたことより、さらに複雑な経路により分解したのではないかと思われる。

2-6. ベンジル基の加水素分解による脱保護

Fig. 11. Synthesis of Lamellarin Derivatives 1a-1l by Debenzoylation of 6a-6f



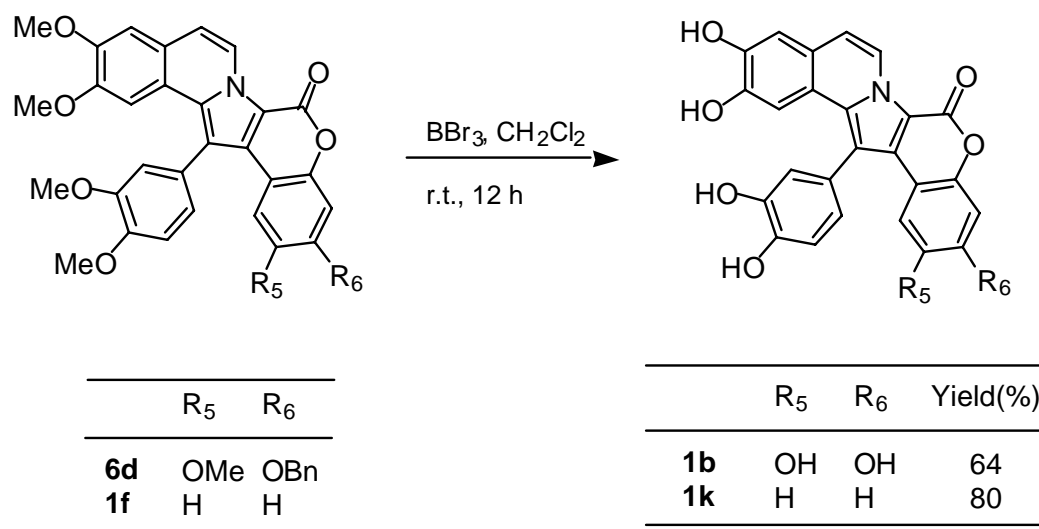
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Yield(%)
1a	OH	OMe	OMe	OH	OMe	OH	82
1c	OH	OMe	OMe	OH	H	OH	58
1d	OH	OMe	OMe	OH	OMe	H	76
1e	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	OH	81
1h	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	75
1i	OH	OMe	OMe	H	OMe	OH	72
1l	OH	OMe	OMe	OH	H	H	50

最後に、この化合物 **6a**~**6g** の水酸基の保護基であるベンジル基を酢酸エチル中 Pearlman 触媒[16]を用い常温常圧下加水素分解することにより7種類のラメラリン誘導体 **1a**~**11** へと導いた (Fig. 11)。

2- 7. ベンジル基とメチル基の同時除去によるポリヒドロキシ体の合成

ラメラリンH (**1b**) および 8,9,13,14-トリヒドロキシ体 (**1k**) は三臭化ホウ素を用いベンジル基とメチル基を同時に取り除くことにより収率良く合成した (Fig. 12)。

Fig. 12. Synthesis of Lamellarin Derivatives 1b and 1k by Dealkylation



3. ラメラリン誘導体の生理活性

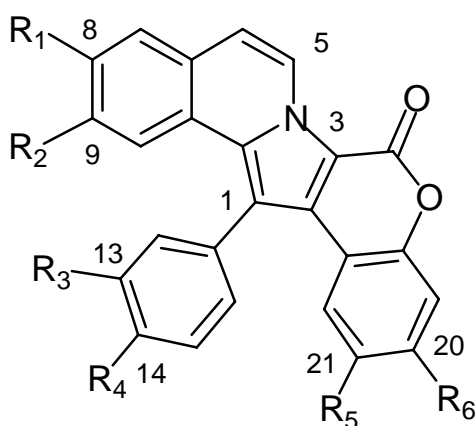
合成したラメラリン誘導体の生理活性としては、ブラインシュリンプ幼生に対する殺傷活性（ブラインシュリンプテスト）[17]及び腫瘍細胞である HeLa 細胞に対する細胞毒性[18]を調べた。

3- 1. ブラインシュリンプテスト

ブラインシュリンプテストは簡便なアッセイ法として開発されたもので近年生理活性天然物の単離の際のガイドとして、あるいは農薬の一次スクリーニングによく用いられている。また、ブラインシュリンプ幼生に対する殺傷活性は細胞毒性活性とよく相関していることが知られている[17]。方法としては、Mayer の方法[17]に若干の変更を加えたものを用いた。サンプルの DMSO 溶液 0.1ml を加えた人工海水 5ml で孵化後 2~3 日以内のブラインシュリンプ 10 匹を 28℃で培養し、24 時間後の死亡率を測定した。1 検体あたり 2 種類の濃度で 3 連で実験を行った。その結果を **Table 5** に示す。14-デヒドロキシ体 (**1i**) 及び 21-デメトキシ体 (**1c**) にはラメラリン D (**1a**) のものとほぼ同等の活性がみられ、13-デメトキシ体 (**1h**) は中程度の活性を示した。一方、20-デヒドロキシ体 (**1d**) は 20 μ g/ml 濃度でも 26%とラメラリン D (**1a**) に比べてかなり活性が低下することがわかった。

後にも述べるが、今回行ったブラインシュリンプテストと細胞毒性の間には非常によい相関が見られ、細胞毒性の一つの指標となりうることがわかった。

Table 5 Toxic Effect to Brine Shrimp (*Artemia salina*)



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	mortality (%)		
							concentration (μg/mL)		
							20	10	5
1a	OH	OMe	OMe	OH	OMe	OH	94	84	69
1b	OH	OH	OH	OH	OH	OH	0	0	0
1c	OH	OMe	OMe	OH	H	OH	83	-	77
1d	OH	OMe	OMe	OH	OMe	H	26	-	23
1e	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	OH	-	82	-
1f	OMe	OMe	OMe	OMe	H	H	-	58	42
1g	OMe	OMe	OMe	OMe	-OCH ₂ O-		-	2	2
1h	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	43	-	40
1i	OH	OMe	OMe	H	OMe	OH	90	-	87
1j	OAc	OAc	OAc	OAc	OAc	OAc	-	-	-
1k	OH	OH	OH	OH	H	H	-	-	-
1l	OH	OMe	OMe	OH	H	H	-	70	-
berberine HCl*							88	52	35

* used as a positive contro

3-2. 細胞毒性試験

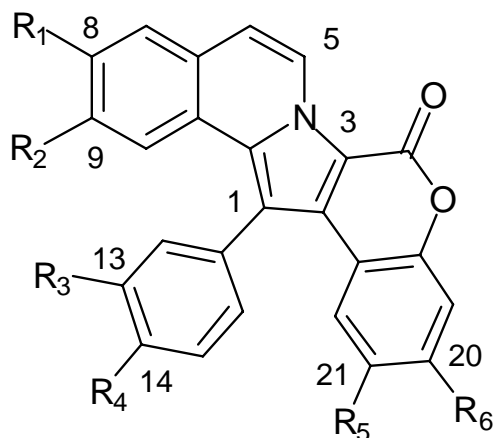
ラメラリン誘導体の細胞毒性としてはHeLa細胞に対するコロニー形成阻害活性を指標とした。種々の濃度の被検化合物を含む細胞を5～8日間培養(5% CO₂, 37℃)し、染色(1%メチレンブルー)後コロニー数を測定した[18]。Dose-response curveから推定した。IC₅₀値をTable 6に示す。

表から明らかなように、ラメラリンH(1b)以外で、8位と20位の両方に水酸基を持つ化合物(1a, 1c, 1h, 1i)はいずれも高い細胞毒性を示した(IC₅₀ 10.5～70.0 nM)。ラメラリンHの活性が低い理由のひとつは、この化合物はバイオアッセイを行う培地への溶解度が低いことがあげられる(生理活性試験中に析出することが観察された)。20-デヒドロキシ体(1d)はラメラリンD(1a)のものに比べ大幅に活性が低下することにより(約1/85程度)、20位の水酸基は活性発現に重要な役割を演じていることが判明した。この20位の水酸基の重要性は8,9,13,14-テトラメトキシ体においても明らかである。即ち、20位に水酸基を持つ1eに対し、そのものが欠如した1fあるいはマスクされた1gでは活性が減少している。

14位に水酸基を持たない1iはある程度の活性を保持しているのにも関わらず、ラメラリンD(1a)の8位と14位の両方の水酸基がメチル基でマスクされた1eは、1/240もの活性の減少を引き起こした。従って、8位の水酸基も活性発現に高く関与していることが伺える。

また、14-デヒドロキシ体(1i)、13-デメトキシ体(1h)および21-デメトキシ体(1c)は1/4～1/7程度の減少はあるものの、ラメラリンD(1a)とほぼ同レベルの活性を示した。これらの結果より、ラメラリンDの14位の水酸基、13位のメトキシ基および21位のメトキシ基及びは活性発現に必ずしも必要でないことが明らかになった。

Table 6 Inhibitory Effect of Lamellarin Deivatives on the Colony Formation of HeLa Cells



compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	IC ₅₀ (μM)
1a (lam.D)	OH	OMe	OMe	OH	OMe	OH	0.0105
1c	OH	OMe	OMe	OH	H	OH	0.0395
1d	OH	OMe	OMe	OH	OMe	H	0.8500
1l	OH	OMe	OMe	OH	H	H	4.0
1h	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	0.0380
1i	OH	OMe	OMe	H	OMe	OH	0.0700
1e	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	OH	2.5
1f	OMe	OMe	OMe	OMe	H	H	5.7
1g	OMe	OMe	OMe	OMe	-OCH ₂ O-		>100
1b (lam.H)	OH	OH	OH	OH	OH	OH	>100
1k	OH	OH	OH	OH	H	H	1.1
1j	OAc	OAc	OAc	OAc	OAc	OAc	11.0

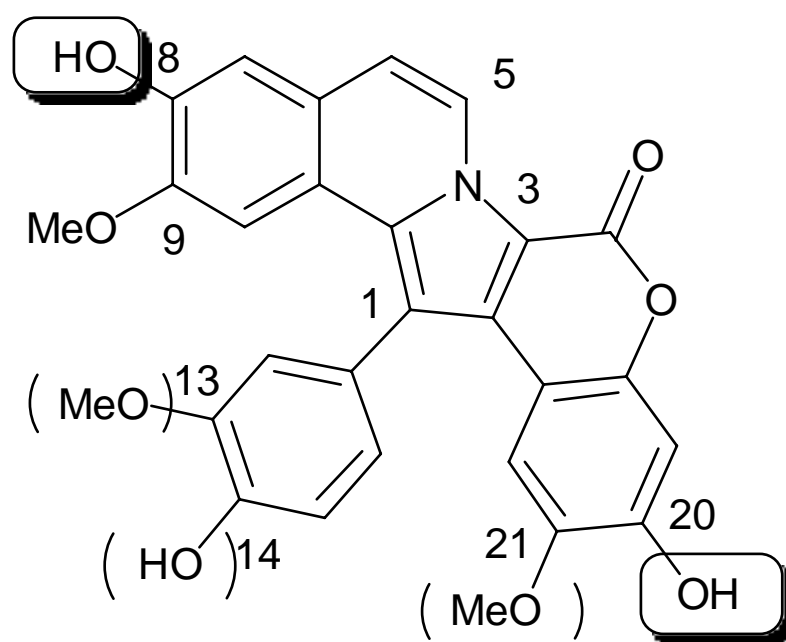
また、ブラインシュリンプテストと細胞毒性試験の結果を比較した結果、化合物 **1h** と **1i** の結果に逆転があるものの、かなり良く相関しており、ブラインシュリンプテストは細胞毒性活性のある程度の指標になると思われる。

4. 結論

ラメラリンDの4種類の誘導体を合成しその生理活性を調べた結果、8位と20位の水酸基は細胞毒性発現に必須であるが、13位のメトキシ基、14位の水酸基および21位のメトキシ基は細胞毒性に必ずしも関与しておらず、場合によっては取り除くことが可能であるなど、ラメラリンDの構造と活性の関係を部分的にはあるが明らかにすることができた (Fig. 13)。

今後は、この研究で得られた生理活性への構造要求性を考慮に入れ、さらに構造を改変することにより、新しいタイプのガン治療薬の開発研究へと展開する予定である。

Fig. 13. Effect of the Hydroxyl and Methoxy Groups on the Cytotoxicity



 : essential group for the activity

() : unimportant group for the activity

5. 実験の項

融点は柳本微量融点測定器で測定し、すべて未補正である。核磁気共鳴(NMR)スペクトルは VARIAN Gemini 200, Gemini 300 核磁気共鳴装置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。なお、ことわりがない限りは測定溶媒には重クロロホルム (CDCl_3)を用いた。

無水テトラヒドロフラン(THF)及び無水エーテルは、ナトリウム-ベンゾフェノンケチルより蒸留した物を用いた。無水ジメチルフォルムアミド(DMF)は減圧下水素化カルシウムより蒸留した物を用いた。無水ジクロロメタン及び無水メタノールはそれぞれ五酸化二リン及びマグネシウムメトキシドより蒸留した物を用いた。ほかの溶媒は市販品をそのまま用いた。カラムクロマトグラフィーには関東化学製シリカゲル 60 (球状)を、分取薄層クロマトグラフィー (prep. TLC)には Merck TLC plate silica gel 60 F₂₅₄ (0.50 or 0.25 mm layer thickness)を用いた。

3-Benzoyloxy-4-methoxybenzaldehyde (8)

イソバニリン(42.4 g, 0.278 mol)、炭酸カリウム(57.6 g, 0.416 mol)及びベンジルブロミド(50.0 g, 0.292 mol)の混合物を乾燥アセトン(450 ml)中3.5時間加熱還流した。反応終了後溶媒を留去し、残渣に水(200 ml)を加え、氷水で冷却した後種を加え結晶化させた。ろ過後、結晶をエタノール(100 ml)で再結晶し、ベンジルイソバニリン **22**(60.7 g, 0.251 mol)を収率 90%で得た。白色プリズム、mp 58~59 °C。

^1H NMR (200 MHz) δ 3.96 (s, 3H), 5.19 (s, 2H), 6.99 (d, 1H, $J=8.7$ Hz), 7.25-7.50 (m, 17H), 9.81 (s, 1H).

Anal. Calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$: C, 74.36; H5.82. Found: C, 74.31; H, 5.88.

1-(3-Benzoyloxy-4-methoxyphenyl)-2-nitroethene (9)

ベンジルイソバニリン **8** (30.0 g, 0.124 mol)、ニトロメタン(16.8 ml, 0.308 mol)、酢酸アンモニウム(10.5 g, 0.136 mol)の酢酸(100 ml)溶液を、2時間加熱還流した。冷却後、現れた結晶をろ過し、冷却したエタノールで2回洗い、ニトロスチレン(26.5 g, 0.0928 mol)を得た。また、そのろ液を水(350 ml)に加え、析出した結晶をエタノールで再結晶することによって、さらに **9** (2.20 g, 0.00771 mol)を得た、全収率 81%、黄色プレート、m p 129~130 °C。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz) δ 3.95 (s, 3H), 5.18 (s, 2H), 6.94 (d, 1H, J=8.1 Hz), 7.03 (s, 1H), 7.18 (d, 1H, J=8.1 Hz), 7.25-7.47 (m, 5H), 7.91 (d, 1H, J=14.7 Hz).

Anal. Calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{NO}_4$: C, 67.36; H, 5.29; N, 4.90. Found: C, 67.22; H, 5.37; N, 4.85.

2-Methoxy-2-(3-benzyloxy-4-methoxyphenyl)-1-nitroethane (10)

ニトロスチレン **9** (30.0 g, 0.105 mol)の乾燥ジクロロメタン(200 ml)溶液に、乾燥メタノール(250 ml)を加え懸濁液とした。この懸濁液に直ちに冷却したナトリウムメトキシドのメタノール溶液[ナトリウム(2.90 g, 0.126 mol)と乾燥メタノール(126 ml)から調製]を一度に加え、室温で5分間攪拌した後、酢酸(14 ml)を加えることにより反応を停止した。溶媒を留去し、残渣に水を加えエーテル次いで酢酸エチルで抽出し、抽出物を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去後、エーテル(100 ml)で再結晶し、ニトロエタン **10** (21.5 g, 0.0678 mol)を65%の収率で得た、淡黄色針状結晶、m p 102~103 °C。

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz) δ 3.17 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 4.30, (dd, 1H, J=12.5, 3.4 Hz), 4.52 (dd, 1H, J=12.4, 9.9 Hz), 4.83 (dd, 1H, J=9.9, 3.4 Hz), 5.16 (s, 2H), 6.88-6.80 (m, 3H), 7.25-7.48 (m, 5H).

Anal. Calcd. for C₁₇H₁₉NO₅: C, 64.34; H, 6.04; N, 4.41. Found: C, 64.45; H, 6.01; N, 4.39.

2-Methoxy-2-(3-benzyloxy-4-methoxyphenyl)ethylamine (11)

氷冷した水素化リチウムアルミニウム (4.62 g, 0.122 mol) の乾燥エーテル (150 ml) の懸濁液に、アルゴン気流下ニトロエタン **10** (9.66 g, 30.5 mmol) の乾燥テトラヒドロフラン (60 ml) 溶液を滴下した。3.5 時間加熱還流した後冷却し、水飽和のエーテル次いで酒石酸ナトリウムカリウム飽和溶液を順次加え、過剰の試薬を分解した。ゲル状の生成物をセライトろ過し、固形物を酢酸エチルで加熱抽出した。ろ液と抽出液は混合し濃縮した。得られた油状の粗アミンは精製することなく次の反応にそのまま用いた、白色結晶。

¹H NMR (200 MHz) δ 1.51 (br, 2H), 2.74 (dd, 1H, J=13.2, 4.7 Hz), 2.85 (dd, 1H, J=13.2, 7.3 Hz), 3.18 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 4.01 (dd, 1H, J=7.3, 4.7 Hz), 5.17 (s, 2H), 6.78-6.90 (m, 3H), 7.23-7.47 (m, 6H).

(4-Benzyloxy-3-methoxy)phenylacetic acid (12a)

ベンジルバニリン (28.59 g, 0.1180 mol)、馬尿酸 (21.16 g, 0.1181 mol)、融解後粉末にした酢酸ナトリウム (9.69 g, 0.118 mol) 及び無水酢酸 (40 ml) の混合物を徐々に 100 °C まで加熱した。黄色の結晶が現れた後、100 °C で 1 時間加熱した。反応混合物を冷却後、エタノールを使用しろ過し、取り出した結晶を温水 (300 ml x 2) で 2 度、エタノール及びエーテルで順次洗い、得られた結晶を 100 °C で 1 時間乾燥しアザラクトン 4-(4-Benzyloxy-3-methoxybenzyl-idene)-2-phenyl-4,5-dihydrooxazol-5-one (32.46 g, 0.08422 mol) を 71% の収率で得た。

このアザラクトン (32.00 g, 0.08303 mol) に水酸化バリウム (91.43 g, 0.2898

mol)水溶液をアルゴン気流下に加え、その後、消泡剤としてエタノール(50 ml)を加えた。4日間加熱還流後冷却し、バリウム塩の結晶をろ過し集めた。この結晶を 1.2 M HCl (500 ml) 中 40 °C で攪拌し、ろ過後水で洗い 3-(4-Benzyloxy-3-methoxy)phenyl-2-oxopropionic acid (25.28 g, 0.07941 mol) を 96%の収率で得た。

このケト酸(20.95 g, 0.06580 mol)の 1M NaOH(200 ml)溶液に、30% H_2O_2 (8.60 ml)の水(20 ml)溶液を 5~10°Cで滴下し、5 °Cで一晩放置した。濃塩酸を加え溶液を酸性にすることにより、析出した結晶をろ過した。ベンゼンで再結晶し、目的物 **12a** (11.64 g, 0.04275 mol) を 65%の収率で得た。

N-(4-Benzyloxy-3-methoxyphenylacetyl)-2-methoxy-2-(3-benzyloxy-4-methoxyphenyl)ethylamine (13a)

冷却した DCC(6.54 g, 31.7 mmol)の乾燥ジクロロメタン(100 ml)溶液に、カルボン酸 **12a** (7.85 g, 28.8 mmol)を加え、25分間攪拌した。アミン **11** の乾燥ジクロロメタン(50 ml)溶液をこれに加え、室温で一晩攪拌した。析出したジシクロヘキシル尿素をセライトを用いてろ別し、ろ液を濃縮後エタノールで再結晶しアミド **13a** (5.95 g, 10.9 mmol)を得た。母液を濃縮後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=2：5) で精製しさらにアミド (6.82 g, 12.6 mmol) を得た。2-methoxy-2-(3-benzyloxy-4-methoxy-phenyl)ethylamine から通算収率 76%、白色結晶、m p 104~105 °C。

1H NMR (300 MHz) δ 3.05-3.27 (m, 4H), 3.46-3.60 (m, 3H), 3.87 (s x 2, 6H), 4.02-4.09 (m, 1H), 5.12 (s, 2H), 5.15 (s, 2H), 5.73 (br, 1H), 6.64-6.85 (m, 6H), 7.25-7.46 (m, 10H).

Anal. Calcd. for $C_{33}H_{35}NO_6$: C, 73.18; H, 6.51; N, 2.59. Found: C, 72.88; H, 6.65;

N, 2.65.

N-(4-benzyloxyphenylacetyl)-2-methoxy-2-(3-benzyloxy-4-methoxyphenyl)-ethylamine (13b)

DCC (2.48 g, 0.0120 mol, 1.5 eq) を乾燥ジクロロメタンによく溶解し、カルボン酸 **12b** (2.91 g, 0.0120mol, 1.5 eq) を加え 25 分間室温で撹拌した。この溶液にアミン **11** (2.40 g, 0.00801 mol) の乾燥ジクロロメタン溶液を入れて、室温で一晩撹拌した。撹拌後、反応物をセライトでろ過し、ろ液を順次 2M の塩酸、5%炭酸水素ナトリウム溶液で洗浄し、乾燥、濃縮後残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル : トリエチルアミン=50 : 50 : 2) により精製し目的物 **13b** を収率 71% で得た、mp 95°C。

$^1\text{H NMR}$ (300MHz) δ 3.06-3.19 (m, 4H), 3.46-3.59 (m, 4H), 3.86 (s, 3H), 4.07 (m, 1H), 5.05 (s, 1H), 5.11 (s, 1H), 5.70 (br, 1H), 6.76-6.94 (m, 5H), 7.26-7.43 (m, 14H).

2-(3-Benzyloxy-4-methoxyphenyl)-2-methoxy-N-(3-Methoxyphenylacetyl)-ethylamine (13c)

カルボン酸 **12c** (2.46g, 0.0148mol) 及び DCC (3.09g, 0.0148 mol) を冷却しながら乾燥ジクロロメタン (13 ml) 中で 25 分間撹拌した。その後、アミン **11** (3.90g, 0.0136mol) の乾燥ジクロロメタン溶液を加え 1 晩室温で撹拌した。撹拌後、2M 塩酸、5%炭酸水素ナトリウム水溶液で順次洗浄した。有機層は硫酸ナトリウムで乾燥した後濃縮した。析出した結晶をエタノールで再結晶し、母液をシリカゲルクロマトグラフィー (溶媒 EtOAc:Hexane:Et₃N=50:50:2) で精製することにより、アミド **13c** (5.13g, 0.0095mol) を収率 70% で得た、白色結晶, mp 105-124°C。

$^1\text{H NMR}$ (300MHz) δ 3.07 (3H, s), 3.13 (1H, m), 3.52 (3H, s), 3.54 (1H, m), 3.80 (3H, s), 3.88 (3H, s), 4.07 (1H, dd, J=8.4 4.8 Hz), 5.12 (2H, s), 5.73 (1H, br, N-H), 6.70-6.88

(6H, m), 7.20-7.48 (6H, m).

6-Benzyloxy-1-(3-methoxy-4-benzyloxybenzyl)-7-methoxy-isoquinoline (2a)

アミド **13a** (18.50 g, 34.15 mmol) とオキシ塩化リン (9.55 ml, 0.102 mol) の乾燥ベンゼン (150 ml) 溶液を、2 時間 80°C で加熱した。水、2M NH₄OH (250 ml)、濃 NH₄OH (15 ml) を順次加え試薬を分解した後酢酸エチル (150 ml, 100 ml) で 2 回抽出し、抽出物を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去し、残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー及びトルエンからの再結晶で精製を行い、イソキノリン **2a** (8.38 g, 17.1 mmol) を 50% の収率で得た、白色針状結晶、mp 150~151 °C。

¹H NMR (300 MHz) δ 3.77 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 4.51 (s, 2H), 5.09 (s, 2H), 5.27 (s, 2H), 6.75-6.83 (m, 3H), 7.07 (s, 1H), 7.26-7.49 (m, 12H), 8.33 (d, 1H, J=5.6 Hz).

Anal. Calcd. for C₃₂H₂₉NO₄: C, 78.19; H, 5.94; N, 2.85. Found: C, 78.31; H, 6.02; N, 2.80.

6-Benzyloxy-1-(4-benzyloxybenzyl)-7-methoxyisoquinoline (2b)

アミド **13b** (1.36 g, 0.00354 mol) とオキシ塩化リン (1 ml) をベンゼン (50 ml) 中混合し、3 時間加熱還流した。冷却後、細かく砕いた氷を入れたビーカーに溶液を注ぎ、2M 水酸化アンモニウムを加え塩基性にした。ジクロロメタンで抽出し、濃縮後、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル : トリエチルアミン = 50 : 50 : 2) により精製し目的物 **2b** を収率 52% で得た、白色結晶、mp 115°C。

¹H NMR (300MHz) δ 3.88 (s, 3H), 4.53 (s, 2H), 5.01 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 6.89 (d, 2H, J=8.6 Hz), 7.08 (s, 1H), 7.21 (d, 2H, J=8.6 Hz), 7.27-7.49 (m, 19H), 8.34 (d, 1H, J=5.3 Hz).

6-Benzyloxy-1-(3-methoxybenzyl)-7-methoxyisoquinoline (2c)

化合物 2b と同様の方法で合成した、白色結晶、mp 112-114°C。

¹H NMR (300MHz) δ 3.73 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 4.57 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 6.72 (1H, d, J=7.8 Hz), 6.82 (s, 1H), 6.90 (d, 1H, J=7.8 Hz), 7.08 (s, 1H), 7.20-7.49 (m, 8H), 8.35 (d, 1H, J=5.6 Hz).

Methyl 2,4-dihydroxybenzoate (14)

2,4-ジヒドロキシ安息香酸(25.0 g, 0.162 mol)の乾燥メタノール(17.71 ml)溶液に冷却したジメチルアミノピリジン(1.98 g, 0.0162 mol)のジクロロメタン(150 ml)溶液を加えた。この溶液に DCC(36.82 g, 0.178 mol)のジクロロメタン(50 ml)溶液を滴下し、室温で2時間攪拌した。ろ過後、ろ液を0.5 M HCl、5% NaHCO₃ で順次洗った。有機層を無水硫酸ナトリウムにて乾燥後濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン : 酢酸エチル= 4:1)で精製した。目的物 14(9.57 g, 56.9 mmol)を57%の収率で得た、白色結晶、mp 116-117°C。

¹H NMR (200 MHz) δ 3.91 (s, 3H), 5.52 (s, 1H), 6.32-6.50 (m, 2H), 7.73 (d, 1H, J=8.4Hz), 10.98 (s, 1H).

Anal. Calcd. for C₈H₈O₄: C, 57.14; H, 4.79. Found: C, 57.18; H, 4.77.

Methyl 4-benzyloxy-2-hydroxybenzoate (15)

2,4-ジヒドロキシ安息香酸メチル(10.0 g, 59.5 mmol)及び炭酸カリウム(9.00 g, 65.4 mmol)を乾燥アセトン(300 ml)中室温で1時間攪拌した後、ベンジルブロミド(7.80 ml, 65.4 mmol)を加え、3.5時間加熱還流した。反応終了後ろ過し、ろ液を濃縮した。残渣に水を加えジクロロメタンで抽出し、抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去し、残った結晶を温メタノール(100 ml)

で洗浄し、ベンゾエート **15** (13.98 g, 54.15 mmol) を 91% の収率で得た、白色結晶、m p 99~100 °C。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz) δ 3.91 (s, 3H), 5.08 (s, 2H), 6.49-6.55 (m, 2H), 7.26-7.45 (m, 5H), 7.75 (dd, $J=0.9, 8.3$ Hz, 1H), 10.96 (s, 1H).

Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_4$: C, 69.76; H, 5.46. Found: C, 69.62; H, 5.49.

Methyl 4-benzyloxy-5-bromo-2-hydroxybenzoate (16)

冷却したベンゾエート **15** (6.63 g, 25.7 mmol) のクロロホルム (70 ml) 溶液に、臭素 (1.46 ml, 28.3 mmol) のクロロホルム溶液を 1 時間滴下した。室温で 30 分攪拌後水を加え、ジクロロメタンで抽出し、抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去し、残った結晶を温メタノールで洗浄し、臭素化物 **16** (7.91 g, 23.5 mmol) を 91% の収率で得た、白色針状結晶、m p 141~142 °C

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz) δ 3.93 (s, 3H), 5.17 (s, 2H), 6.53 (s, 1H), 7.26-7.58 (m, 5H), 8.01 (s, 1H), 10.91 (s, 1H).

Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{BrO}_4$: C, 53.43; H, 3.88. Found: C, 53.41; H, 3.86.

Methyl 4-benzyloxy-5-methoxy-2-hydroxybenzoate (17)

細かく切ったナトリウム (3.17 g, 0.138 mmol) を乾燥メタノール (80 ml) に徐々に加えナトリウムメトキシドのメタノール溶液を調製した。約 2/3 等量のメタノールを留去した後、この溶液に、臭素化物 **16** (11.63 g, 34.49 mmol) と塩化銅 (II) (1.85 g, 13.8 mmol)、DMF (70 ml) 溶液を加え、約 115°C で 1.5 時間加熱した。反応終了後冷却し、水次いで 4M HCl (25 ml) を加え酸性にした。セライトを用い固形物をろ別し、さらに固形物を酢酸エチルで加熱抽出した。抽出液は飽和食塩水で洗った後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去後、残渣をヘキサン : ジクロロメタン = 1 : 1 による再結晶及びシリカゲルカラムク

ロマトグラフィーによる精製を行い 60%の収率でメトキシ置換体 17 (6.00 g, 20.8 mmol)を得た、白色針状結晶、m p 131~132 °C。

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz) δ 3.85 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 5.17 (s, 2H), 6.51 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.30-7.48 (m, 6H).

Anal. Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_5$: C, 66.66; H, 5.59. Found: C, 66.32; H, 5.63.

Methyl 4-benzyloxy-5-methoxy-2-methoxymethoxybenzoate (3a)

冷却した化合物 17 (9.18 g, 0.0318 mol)の乾燥テトラヒドロフラン(250 ml)溶液に、カリウム *tert*-ブトキシド(3.96 g, 0.0353 mol)の乾燥テトラヒドロフラン(40 ml)溶液を、滴下した。0 °Cで30分攪拌した後、乾燥テトラヒドロフラン(20 ml)に溶かしたクロロメチルメチルエーテル(2.66 ml, 0.0350 mol)を加えた。室温で3時間攪拌後、さらにクロロメチルメチルエーテル(0.50 ml, 0.0066 mol)及びカリウム *tert*-ブトキシド(0.46 g, 0.0041 mol)を加えた。さらに30分攪拌後、反応物に希アンモニア水と10% NH_4Cl の混合物を加え、エーテル(200 ml x 2)で2回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗い、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去し、残渣はジイソプロピルエーテルで再結晶することによって目的物を得た。さらに、母液を濃縮し残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、全収率 94%で目的物(9.98 g, 0.0300 mol)を得た、白色針状結晶、m p 61~62 °C。

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz) δ 3.46 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 5.10 (s, 2H), 5.19 (s, 2H), 6.80 (s, 1H), 7.27-7.48 (m, 6H).

Anal. Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_6$: C, 65.05; H, 6.06. Found: C, 64.96; H, 6.06.

Methyl 4-benzyloxy-2-methoxymethylbenzoate (3c)

乾燥テトラヒドロフラン 20 ml 中水素化ナトリウム(1.76 g, 0.0440 mol)

を 0°C で攪拌した中にテトラヒドロフラン中エステル **15** (9.46 g, 0.0367 mol) を滴下した。その後 30 分攪拌した後に、テトラヒドロフラン中クロロメチルエチルエーテル (3.54 g, 0.0330 mol) を加えて 3 時間室温で攪拌した。攪拌後、溶媒を濃縮し水とジクロロメタンで抽出を行い再度濃縮を行いメタノールで再結晶を行い目的物 **3c** を収率 98% で得た、白色結晶, mp 92~99 °C

Methyl 5-bromo-2-hydroxy benzoate (19)

5-ブロモサリチル酸 (8.16 g, 0.0376 mol) に $\text{BF}_3 \cdot \text{メタノール錯体}$ (50 ml) の混合物を 8 時間加熱還流を行ったのちに十分に冷却し水を加えた。酢酸エチルで抽出を行った後 5% 炭酸水素ナトリウム溶液で洗浄した。濃縮後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) により精製し目的物 **19** (6.99 g, 0.0302 mol) を収率 80% で得た。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz) δ 3.78 (3H, s), 6.93 (1H, d, $J=8.9$ Hz), 7.61 (1H, dd, $J=2.5, 8.9$ Hz), 8.04 (1H, d, $J=2.5$ Hz), 10.29 (1H, s)

Methyl 5-methoxy-2-hydroxybenzoate (20)

乾燥メタノールに、ナトリウム (2.99 g, 0.130 mol) を溶かし 100°C まで加熱し蒸留することによりその 1/3 を留去した。その中に DMF (30 ml) に溶かしたブロマイド **19** (6.99 g, 0.0321 mol) と塩化銅 (1.63 g, 0.0121 mol) の混合物を加え 100°C ~ 120°C で 2 時間加熱還流した。この反応物に水と 6M の塩酸 (30 ml) を加え析出した結晶を濾過した後にエーテルで抽出した。濃縮後、残査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) により精製し目的物 **20** (0.92 g, 0.0051 mmol) を収率 17% で得た。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz) δ 3.78 (3H, s), 6.93 (1H, dd, $J=3.1, 10.4$ Hz), 7.08 (1H, d, $J=10.4$ Hz), 7.29 (1H, d, $J=3.1$ Hz), 10.37 (1H, s).

Methyl 5-methoxy-2-methoxymethylbenzoate (3d)

フェノール **20** の乾燥テトラヒドロフラン (5 ml) 溶液に氷冷しながら、水素化ナトリウム加え、0°Cで 15 分間攪拌した。クロロメチルメチルエーテルを加え、2 時間加熱還流した。水で反応を停止し、ジクロロメタンで抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥した。濃縮後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) により精製し目的物 **3d** (0.9636 g, 4.26 mmol) を収率 86% で得た。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz) δ 3.52 (3H, s), 3.79 (3H, s), 3.90 (3H, s), 5.16 (2H, s), 7.00 (1H, dd, $J=2.5, 9.7$ Hz), 7.13 (1H, d, $J=9.7$ Hz), 7.33 (1H, d, $J=2.5$ Hz).

2-Hydroxy-4,5-methylenedioxybenzaldehyde (22)

セサモール (4.12 g, 29.8 mmol) の乾燥 DMF (6 ml) 溶液にオキシ塩化リン (4.00 ml, 42.9 mmol) を滴下した。105~115°Cで 3 時間反応を行った後冷却し、酢酸ナトリウム (ca. 100 ml) で反応を停止した。一晩攪拌後、酢酸エチルで抽出、無水硫酸ナトリウムで乾燥、溶媒を留去した。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、目的物 **22** (2.72 g, 16.3 mmol) を 55% の収率で得た、淡黄色針状結晶、m p 123~125 °C。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz) δ 6.02 (s, 2H), 6.47 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 9.62 (s, 1H), 11.79 (s, 1H).

Anal. Calcd. for $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_4$: C, 57.84; H, 3.64. Found: C, 57.82; H, 3.67.

2-Methoxymethoxy-4,5-methylenedioxybenzaldehyde (23)

フェノール **22** (1.00 g, 6.02 mmol)、水酸化カリウム (0.68 g, 12.0 mmol)、及び触媒量の 18-クラウン-6 の混合物をアセトニトリル (50 ml) 中室温で 30 分

攪拌した。クロロメチルメチルエーテル(0.590 ml, 7.82 mmol)を加え3時間攪拌した後、水を加えエーテルで2回抽出した。抽出液は無水硫酸ナトリウムで乾燥した後濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン：酢酸エチル=3：1)によって精製し、目的物 **23**(874 mg, 4.16 mmol)を69%の収率で得た、白色針状結晶、m p 77~78 °C。

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz) δ 3.52 (s, 3H), 5.22 (s, 2H), 6.01 (s, 2H), 7.26 (s, 1H), 10.30 (s, 1H).

Anal. Calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_5$: C, 57.15; H, 4.79. Found : C, 57.36; H, 4.76.

Methyl 2-methoxymethoxy-4,5-methylenedioxybenzoate (3e)

アルデヒド **23**(1.25 g, 5.98 mmol)とシアン化カリウム(73.5 mg, 1.13 mmol)の乾燥メタノール(10 ml)混合液に、酢酸(72.3 μl , 1.26 mmol)と二酸化マンガ(1.65 g, 18.9 mmol)を加え、23時間攪拌した。反応終了後、混合物にジクロロメタン(50 ml x 2)を加え、不溶物をろ別した。ろ液を5%炭酸水素ナトリウム(100 ml)で洗い、水層をジクロロメタン(50 ml)で抽出した。抽出液を混合し無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去後、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、83%の収率で目的物 **3e**(1.19 g, 4.98 mmol)を得た、淡黄色結晶。

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz) δ 3.52 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 5.16 (s, 2H), 5.99 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 7.28 (s, 1H).

6-Benzyloxy-7-methoxy-1-[1-(4-benzyloxy-3-methoxy-phenyl)-2-(4-benzyloxy-5-methoxy-2-methoxymethoxy-phenyl)-2-oxoethyl]isoquinoline (4a)

ジイソプロピルアミン(873 ml, 6.23 mmol)の乾燥テトラヒドロフラン(20 ml)溶液に1.15 M ブチルリチウムヘキサン溶液(3.89 ml, 4.48 mmol)を滴下した後0°C

で30分攪拌し、リチウムジイソプロピルアミド溶液を調製した。この溶液にイソキノリン **2a** (2.00 g, 4.07 mmol)の乾燥テトラヒドロフラン(36 ml)溶液をアルゴン気流下-78°Cで滴下した。この溶液を-15°Cで1時間攪拌した後、エステル **3a** (1.62 g, 4.88 mmol)の乾燥テトラヒドロフラン(10 ml)溶液を滴下した。反応槽を冷却容器から出し、室温で3.5時間放置した。10%NH₄Cl (ca. 50 ml)を加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出、抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。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=1：1～2：1)で精製し、目的物 **4a** (2.03 g, 2.56 mmol)を63%の収率で得た。黄色不定形固体もしくは淡黄色結晶、m p 166～168 °C。

¹H NMR (300 MHz) δ 2.66 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 4.28 (d, J=7.2 Hz, 1H), 4.31 (d, J=7.2 Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 5.11 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 6.61 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 6.74-6.85 (m, 3H), 7.06 (s, 1H), 7.21-7.50 (m, 17H), 7.72 (s, 1H), 8.22 (d, J=5.7, 1H); IR (KBr) n_{max} 988, 1020, 1135, 1150, 1213, 1230, 1262, 1383, 1410, 1455, 1503, 1596, 1680, 2940 cm⁻¹; EI-MS *m/z* 791 (M⁺), 745, 730, 505, 491, 400, 91 (base); UV/Vis ln_m (log ε) 240.6 (4.82), 272.0 (4.37), 315.1 (sh., 4.22), 327.4 (4.28).

Anal. Calcd. for C₄₉H₄₅NO₉: C, 74.33; H, 5.72; N, 1.77. Found: C, 74.32; H, 5.83; N, 1.78.

6-Benzyloxy-7-methoxy-1-[1-(4-benzyloxy-3-methoxy-phenyl)-2-(4-benzyloxy-2-methoxymethoxyphenyl)-2-oxoethyl]isoquinoline (4b)

化合物 **4a** と同様な方法により、**2a** と **3c** から合成した (収率 35%)、黄色不定形粉末。

¹H NMR (200 MHz) δ 2.72 (3H, s), 3.76 (3H, s), 3.84 (3H, s), 4.48 (1H, d, J=6.9 Hz), 4.55 (1H, d, J=6.9 Hz), 5.03 (2H, s), 5.09 (2H, s), 5.26 (2H, s), 6.62 (1H, s), 6.64 (1H, s),

6.74-6.88 (3H, m), 7.05 (1H, s), 7.20-7.50 (18H, m), 8.11 (1H, d, J=8.4 Hz), 8.23 (1H, d, J=5.5 Hz).

Anal. Calcd. for C₄₈H₄₃NO₈: C, 75.67; H, 5.69; N, 1.84. Found: C, 75.71; H, 5.89; N, 1.95.

6-Benzoyloxy-7-methoxy-1-[1-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)-2-(5-methoxy-2-methoxymethoxyphenyl)-2-oxoethyl]isoquinoline (4c)

化合物 **4a** と同様な方法により、**2a** と **3d** から合成した (収率 54%)、黄色不定形粉末。

¹H NMR (300 MHz) δ 2.85 (3H, s), 3.77 (3H, s), 3.78 (3H, s), 3.85 (3H, s), 4.52 (2H, s), 5.11 (2H, s), 5.26 (2H, s), 6.68 (1H, s), 6.81 (1H, s), 6.82-6.89 (3H, m), 7.05 (1H, s), 7.24-7.48 (12H, m), 7.58 (1H, d, J=2.8 Hz), 8.23 (1H, d, J=5.3 Hz).

Anal. Calcd for C₄₂H₃₉NO₈: C, 73.56; H, 5.73; N, 2.04. Found: C, 73.51; H, 5.84; N, 2.16.

6,7-dimethoxy-1-[1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(4-benzyloxy-5-methoxy-2-methoxy-methoxyphenyl)-2-oxoethyl]-isoquinoline (4d)

化合物 **4a** と同様な方法により、**2d** と **3a** から合成した (収率 50%)、黄色不定形粉末。

¹H NMR (300MHz) δ 2.73 (3H, s), 3.75 (3H, s), 3.82 (3H, s), 3.87 (6H, s), 4.00 (3H, s), 4.28 (1H, d, J=7.7 Hz), 4.33 (1H, d, J=7.7 Hz), 5.10 (1H, d, J=11.0 Hz), 5.13 (1H, d, J=11.0 Hz), 6.63 (1H, s), 6.67 (1H, s), 6.77-6.88 (3H, m), 7.03 (1H, s), 7.25-7.42 (7H, m), 7.73 (1H, s), 8.26 (1H, d, J=7.6 Hz).

Anal. Calcd for C₃₇H₃₇NO₉: C, 69.47; H, 5.83; N, 2.19. Found: C, 68.99; H, 5.89; N, 2.15.

6,7-Dimethoxy-1-[1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(2-methoxymethoxyphenyl)-2-oxoethyl]isoquinoline (4e)

化合物 **4a** と同様な方法により、**2d** と **3b** から合成した (収率 71%)、黄色不定形粉末。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz) δ 2.92 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.99 (s, 3H), 4.66 (dd, 2H, $J=18.77, 6.87$ Hz), 6.68 (s, 1H), 6.80 (d, 1H, $J=8.01$ Hz), 6.83-6.90 (m, 2H), 7.02-7.06 (m, 2H), 7.03 (s, 1H), 7.33-7.37(m, 1H), 7.35 (d, 1H, $J=5.95$ Hz), 7.39 (s, 1H), 8.02 (dd, 1H, $J=7.78, 1.60$ Hz), 8.26 (d, 1H, $J=5.49$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ δ 55.75 (CH_3), 55.82 ($\text{CH}_3 \times 2$), 55.88 (CH_3), 56.05 (CH_3), 62.68 (CH), 94.45 (CH_2), 103.85 (CH), 105.41 (CH), 110.96 (CH), 113.34 (CH), 114.73 (CH), 118.57 (CH), 121.97 (CH $\times 2$), 122.86 (C), 128.39 (C), 130.88 (C), 131.74 (CH_2), 133.36 (CH_2), 133.45 (C), 140.77 (CH), 148.23 (C), 148.89 (C), 149.89 (C), 152.34 (C), 155.83 (C), 157.57 (C), 197.43 (C); IR (CHCl_3) ν_{max} 1158, 1205, 1270, 1480, 1508, 1590, 1680, 3010 cm^{-1} .

Anal. Calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{NO}_7$: C, 69.17; H, 5.81; N, 2.78. Found: C, 68.96; H, 5.92; N, 2.79.

6,7-Dimethoxy-1-[1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(2-methoxymethoxy-4,5-methylene-dioxyphenyl)-2-oxo]ethylisoquinoline (4f)

化合物 **4a** と同様な方法により、**2d** と **3e** から合成した (収率 56%)、黄色不定形粉末。

$^1\text{H NMR}$ (200MHz) δ 2.79 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 4.43 (s, 2H), 5.96 (s, 2H), 6.62 (s, 2H), 6.76-6.90 (m, 3H), 7.03 (s, 1H), 7.32-7.40 (m, 2H), 7.59 (s, 1H), 8.27 (d, 1H, $J=5.6$ Hz).

Anal. Calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{29}\text{NO}_8$: C, 65.81; H, 5.34; N, 2.56. Found: C, 65.38; H, 5.37, N, 2.75.

6-Benzyloxy-7-methoxy-1-[1-(4-benzyloxyphenyl)-2-(4-benzyloxy-5-methoxy-2-methoxymethoxyphenyl)-2-oxoethyl]isoquinoline (4g)

化合物 **4a** と同様な方法により、**2b** と **3a** から合成した (収率 12%)、黄色不定形粉末。

$^1\text{H NMR}$ (200MHz) δ 2.68 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.81 (3H, s), 4.31 (2H, s), 4.99 (2H, s), 5.11 (2H, s), 5.26 (2H, s), 6.63 (1H, s), 6.66 (1H, s), 6.90 (2H, d, $J=8.7$ Hz), 7.04 (1H, s), 7.21 (2H, d, $J=8.7$ Hz), 7.20-7.50 (14H, m).

Anal. Calcd. for $\text{C}_{48}\text{H}_{43}\text{NO}_8$: C, 75.67; H, 5.69; N, 1.84. Found: C, 75.73; H, 5.68, N, 2.03.

6-Benzyloxy-7-methoxy-1-[1-(3-methoxyphenyl)-2-(4-benzyloxy-5-methoxy-2-methoxymethoxyphenyl)-2-oxoethyl]isoquinoline (4h)

化合物 **4a** と同様な方法により、**2c** と **3a** から合成した (収率 19%)、黄色不定形粉末。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz) δ 2.96 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.88 (d, 6H, $J=2.97$ Hz), 4.33 (t, 2H), 5.13 (d, 2H, $J=3.51$ Hz), 5.27 (s, 2H), 6.67 (d, 2H, $J=3.66$ Hz), 6.81-7.72 (m, 19H), 8.25 (d, 1H, $J=5.67$ Hz).

6-Benzyloxy-7-methoxy-1-[1-(4-benzyloxy-3-methoxy-phenyl)-2-(2-methoxymethoxyphenyl)-2-oxoethyl]isoquinoline (4i)

化合物 **4a** と同様な方法により、**2a** と **3b** から合成した (収率 48%)、淡黄色結晶、mp 147–150 °C。

$^1\text{H NMR}$ (300MHz) δ 2.86 (3H, s), 3.77 (3H, s), 3.86 (3H, s), 4.62 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 4.68 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 5.11 (2H, s), 5.26 (2H, s), 5.66 (1H, s), 6.81 (1H, s), 6.82 (1H, s),

6.86 (1H, s), 6.95-7.08 (3H, m), 7.24-7.49 (13H, m), 8.02 (1H, dd, J=7.9, 2.0 Hz), 8.23 (1H, d, J=5.6 Hz).

Anal. Calcd. for C₄₁H₃₇NO₇: C, 75.10; H, 5.69; N, 2.14. Found: C, 74.64; H, 5.84; N, 5.01.

3,11-Bis(benzyloxy)-2,12-dimethoxy-14-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)-6H[1]benzopyrano-[4,3;4,5]pyrrolo[2,1-a]isoquinoline-6-one (6a)

化合物 **4a**(390 mg, 0.492 mmol)及びブロモ酢酸エチル(0.550 ml, 4.94 mmol)の混合物を、70℃で22時間反応させた。冷却後、乾燥エーテル(20 ml)中に、反応物を滴下し、析出した結晶をろ過した。この結晶をメタノール(12 ml)に溶かし、濃塩酸を1滴加え、30分間加熱還流した。冷却後、濃縮し残渣を乾燥ジクロロメタン(10 ml)に溶かした。この溶液にトリエチルアミン(1.0 ml)を加え、20時間室温で攪拌した。この溶液は、1M HCl 次いで 5%NaHCO₃ で洗い、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。濃縮後残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂)で精製を行い、34%の収率で目的物 **6a**(130 mg, 0.17 mmol)を得た、白色結晶、mp 217~218 °C

¹H NMR (200 MHz) δ 3.36 (s, 3H), 3.39 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 5.17 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 5.32 (s, 2H), 6.72 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.96 (d, J=7.42 Hz, 1H), 7.07-7.20 (m, 5H), 7.25-7.54 (m, 15H), 9.17 (d, J=7.42 Hz, 1H); EI-MS m/z 769 (M⁺), 745, 655, 368, 278, 220, 157, 91, 70, 57, 43 (base).

Anal. Calcd. for C₄₉H₃₉NO₈: C, 76.45; H, 5.10; N, 1.82. Found: C, 75.88; H, 5.15, N, 1.82.

3,11-Bis(benzyloxy)-12-methoxy-14-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)-6H[1]benzopyrano[4,3;4,5]pyrrolo[2,1-a]isoquinoline-6-one (6b)

化合物 **4b** より化合物 **6a** と同様の方法で合成した (収率 27%)、白色結晶、mp 227-228°C。

¹H NMR (300 MHz) δ 3.31 (3H, s), 3.88 (3H, s), 5.09 (2H, s), 5.24 (2H, s), 5.28 (1H, d, J=12.6 Hz), 5.38 (1H, d, J=12.6 Hz), 6.71 (1H, dd, J=2.6, 8.8 Hz), 6.97 (1H, d, J=7.4 Hz), 7.01 (1H, d, J=2.6 Hz), 7.05 (1H, s), 7.08 (1H, s), 7.15 (1H, dd, J=6.3, 8.9 Hz), 7.30-7.55 (18H, m), 9.19 (1H, d, J=7.4 Hz).

HREIMS calcd for C₄₈H₃₇NO₇ (M⁺) 739.2570, found 739.2620.

11-Benzyloxy-2,12-dimethoxy-14-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)-6H[1]benzo-pyrano[4,3;4,5]pyrrolo[2,1-a]isoquinoline-6-one (6c)

化合物 **4c** より化合物 **6a** と同様の方法で合成した (収率 33%)、白色結晶、mp 239-241°C。

¹H NMR (300 MHz) δ 3.35 (3H, s), 3.44 (3H, s), 3.90 (3H, s), 5.23 (1H, d, J=3.8 Hz), 5.24 (2H, s), 5.32 (1H, d, J=3.8 Hz), 6.77 (1H, d, J=3.0 Hz), 6.91 (1H, dd, J=3.0, 7.4 Hz), 7.50 (1H, d, J=7.4 Hz), 7.10-7.20 (2H, m), 7.13 (1H, s), 7.25-7.65 (13H, m), 9.24 (1H, d, J=7.6 Hz).

HREIMS calcd for C₄₂H₃₃NO₇ (M⁺) 663.2257, found 663.2279.

3-Benzyloxy-14-(3,4-dimethoxyphenyl)-2,11,12-trimethoxy-6H[1]benzopyrano-[4,3;4,5]pyrrolo[2,1-a]isoquinoline-6-one (6d)

化合物 **4d** より化合物 **6a** と同様の方法で合成した (収率 28%)、白色結晶、mp 253-254°C。

¹H NMR (300 MHz) δ 3.48 (3H, s), 3.50 (3H, s), 3.92 (3H, s), 3.93 (3H, s), 4.00 (3H, s), 5.04 (2H, s), 6.75 (1H, s), 6.81 (1H, s), 6.95-7.05 (3H, s), 7.12-7.43 (8H, m), 9.12 (1H, d, J=8.2 Hz).

Anal. Calcd. for C₃₇H₃₁NO₈: C, 71.85; H, 5.06; N, 2.27. Found: C, 71.93; H, 5.30; N, 2.15.

3,11-Bis(benzyloxy)-2,12-dimethoxy-14-(4-benzyloxyphenyl)-6H[1]benzopyrano-[4,3;4,5]pyrrolo[2,1-a]isoquinoline-6-one (6e)

化合物 4g より化合物 6a と同様の方法で合成した (収率 58%)、白色結晶、mp 198°C。

¹H NMR (200 MHz) δ 3.37 (3H, s), 3.40 (3H, s), 5.19 (2H, s), 5.23 (2H, s), 5.25 (2H, s), 6.68 (1H, s), 6.94 (1H, s), 6.96 (2H, d, J=7.0 Hz), 7.10 (2H, d, J=7.0 Hz), 7.40-7.57 (18H, m), 9.18 (1H, d, J=7.2 Hz).

Anal. Calcd for C₄₈H₃₇NO₇: C, 77.93; H, 5.04; N, 1.89. Found: C, 78.23; H, 5.15; N, 2.01.

3,11-Bis(benzyloxy)-2,12-dimethoxy-14-(3-methoxyphenyl)-6H[1]-benzopyrano-[4,3;4,5]pyrrolo[2,1-a]isoquinoline-6-one (6f)

化合物 4h より化合物 6a と同様の方法で合成した (収率 17%)、白色結晶、mp 270-271°C。

¹H NMR (300 MHz) δ 2.69 (3H, s), 3.71 (3H, s), 3.88 (3H, d, J=2.9 Hz), 4.30 (2H, d, J=3.0 Hz), 5.13 (2H, d, J=3.6 Hz), 5.27 (2H, s), 6.67 (2H, d, J=3.6 Hz), 6.81-7.72 (19H, m), 8.25 (1H, d, J=5.7 Hz).

HREIMS calcd for C₄₂H₃₃NO₇ (M⁺) 663.2257, found 663.2220.

11-Benzyloxy)-12-methoxy-14-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)-6H[1]benzo-pyrano [4,3;4,5]pyrrolo[2,1-a]isoquinoline-6-one (6g)

化合物 4i より化合物 6a と同様の方法で合成した (収率 48%)、白色結晶、mp

223–225°C。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz) δ 3.32 (3H, s), 3.88 (3H, s), 5.23 (2H, s), 5.28 (1H, d, $J=12.5$ Hz), 5.39 (1H, d, $J=12.5$ Hz), 6.97 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 7.02–7.18 (7H, m), 7.25–7.58 (12H, m), 9.22 (1H, d).

Anal. Calcd. for $\text{C}_{41}\text{H}_{31}\text{NO}_6$: C, 77.71; H, 4.93; N, 2.21. Found: C, 77.96; H, 5.14; N, 2.13.

11,12-Dimethoxy-14-(3,4-dimethoxyphenyl)-6H[1]benzopyrano[4',3';4,5]pyrrolo[2,1-a]isoquinoline-6-one (1f).

化合物 4e より化合物 6a と同様の方法で合成した (収率 33%)、白色結晶、mp 254–256 °C。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz) δ 3.47 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.99 (s, 3H), 4.03 (s, 3H), 7.03–7.20 (m, 6H), 7.26–7.46 (m, 4H), 9.28 (d, 1H, $J=7.4$ Hz); EI-MS m/z (relative intensity) 482 ($[\text{M}+1]^+$, 32.6), 481 (M^+ , 100).

Anal. Calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{23}\text{NO}_6$: C; 72.34; H, 4.81; N, 2.91. Found: C; 71.59; H, 4.82; N, 2.93.

11,12-Dimethoxy-14-(3,4-dimethoxyphenyl)-2,3-methylenedioxy6H[1]benzo-pyrano[4',3';4,5]pyrrolo[2,1-a]isoquinoline-6-one (1j).

化合物 4f より化合物 6a と同様の方法で合成した (収率 28%)、白色結晶、mp 267–268 °C。

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz) δ 3.45 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.98 (s, 3H), 4.02 (s, 3H), 5.97 (s, 2H), 6.69 (s, 1H), 6.94–7.15 (m, 7H), 9.24 (d, 1H, $J=7.24$).

Anal. Calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{23}\text{NO}_8$: C, 68.57; H, 4.41; N, 2.67. Found: C, 67.88; H, 4.44, N, 2.68.

Lamellarin D (1a)

化合物 **4a** (68.0 mg, 0.0883 mmol) と 20% Pd(OH)₂-C (36 mg) の混合物を酢酸エチル(40 ml) 中室温で水素気流下よく攪拌した。反応終了後(ca. 100 min)、混合物をろ過し濃縮した。残った固形物を酢酸エチルで洗浄し、**1a** (36.2 mg, 0.0725 mmol) を 80% の収率で得た、淡黄色粉末、mp 300°C 以上

¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 3.36 (s, 3H), 3.39 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 6.71 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 7.00 (dd, J=8, 1.8 Hz, 1H), 7.09-7.19 (m, 5H), 9.88 (d, J=7.4 Hz, 1H), 9.35 (s, 1H, D₂O exchangeable), 9.83 (br s, 1H, D₂O exchangeable), 9.94 (br s, 1H, D₂O exchangeable); EI-MS *m/z* (relative intensity) 499 (M⁺, 22), 192 (9), 138 (8), 91 (16), 57 (11), 55 (11), 43 (100).

HR-MS calcd. for C₂₈H₂₁NO₈ 499.1267, found 499.1297.

ラメラリン D トリアセテート, 白色結晶 [mp 300°C 以上]: ¹H NMR (300 MHz) δ 2.33 (s, 3H), 2.35 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 3.46 (s x 2, 6H), 3.84 (s, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.06 (d, J=7.4 Hz, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.217 (d, 1H, J=1.7 Hz), 7.223 (s, 1H), 7.24-7.26 (m, 1H), 7.30 (d, 1H, J=8.0 Hz), 7.40 (s, 1H), 9.24 (d, 1H, J=7.4 Hz).

3,11-Dihydroxy-12-methoxy-14-(4-benzyloxy-3-methoxyphenyl)-6H[1]benzo-pyran o[4,3;4,5]pyrrolo[2,1-a]isoquinoline-6-one (1c)

化合物 **1a** と同様な方法で化合物 **6b** から合成した (収率 58%)、淡灰色不定形粉末。

¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 3.47 (3H, s), 3.90 (3H, s), 6.64 (1H, dd, J=2.4, 8.7 Hz), 6.86 (1H, d, J=2.4 Hz), 7.03-7.28 (7H, m), 8.01 (1H, br. s, OH), 8.36 (1H, br. s, OH), 8.98 (1H, br. s, OH), 9.14 (1H, d, J=7.4 Hz).

HR-MS calcd. for C₂₇H₁₉NO₇ (M⁺) 469.1162, found 469.1174.

**11-Hydroxy)-2,12-dimethoxy-14-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6H[1]benzo-pyrano
[4,3;4,5]pyrrolo[2,1-a]isoquinoline-6-one (1d)**

化合物 **1a** と同様な方法で化合物 **6c** から合成した (収率 76%)、淡灰色結晶、
mp 300°C以上。

¹H NMR (200 MHz, acetone-d₆) δ 3.48 (3H, s), 3.49 (3H, s), 6.79 (1H, s), 6.88 (1H,
s), 7.17 (1H, d, J=7.2 Hz), 7.20-7.28 (3H, m), 7.46 (1H, s), 7.52 (1H, s), 8.27 (1H, s,
OH), 8.36 (1H, s, OH), 8.78 (1H, s, OH), 9.13 (1H, d, J=7.2 Hz).

HR-MS calcd. for C₂₈H₂₁NO₇ (M⁺) 483.1318, found 483.1313.

**3-Hydroxy-14-(3,4-dimethoxyphenyl)-2,11,12-trimethoxy-6H[1]benzopyrano-[4,3;4,
5]pyrrolo[2,1-a]isoquinoline-6-one (1e)**

化合物 **1a** と同様な方法で化合物 **6d** から合成した (収率 81%)、淡灰色結晶、
mp 267-268°C。

¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 3.42 (3H, s), 3.47 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.95 (3H,
s), 3.96 (3H, s), 6.78 (1H, s), 6.88 (1H, s), 7.20 (1H, s), 7.20-7.35 (4H, m), 7.36 (1H, s),
8.25 (1H, br. s), 9.16 (1H, d, J=7.4 Hz).

Anal. Calcd. for C₃₀H₂₅NO₈: C, 68.30; H, 4.78; N, 2.66. Found: C, 68.00; H, 5.09;
N, 2.39.

**3,11-Dihydroxy)-2,12-dimethoxy-14-(4-hydroxyphenyl)-6H[1]benzopyrano-[4,3;4,5]
pyrrolo[2,1-a]isoquinoline-6-one (1h)**

化合物 **1a** と同様な方法で化合物 **6e** から合成した (収率 75%)、淡灰色結晶、
mp 300°C以上。

¹H NMR (200 MHz, acetone-d₆) δ 3.48 (3H, s), 3.49 (3H, s), 6.79 (1H, s), 6.88 (1H,

s), 7.17 (1H, d, J=7.4 Hz), 7.20 (2H, d, J=8.6 Hz), 7.22 (1H, s), 7.25 (1H, s), 7.49 (2H, d, J=8.6 Hz), 8.26 (1H, br. s, D₂O exchangeable), 8.35 (1H, br. s, D₂O exchangeable), 8.76 (1H, br. s, D₂O exchangeable), 9.13 (1H, d, J=7.4 Hz).

3,11-Dihydroxy-2,12-dimethoxy-14-(3-methoxyphenyl)-6H[1]-benzopyrano-[4,3;4,5]pyrrolo[2,1-a]isoquinoline-6-one (1i)

化合物 **1a** と同様な方法で化合物 **6f** から合成した (収率 72%)、淡灰色不定形粉末。

¹H NMR (200 MHz, acetone-d₆) δ 3.42. (6H, s), 3.78 (3H, s), 5.72 (1H, br. s, OH), 5.81 (1H, br. s, OH), 6.60 (1H, s), 6.95 (1H, s), 6.95 (1H, d, J=7.6 Hz), 7.03 (1H, s), 7.01-7.16 (3H, m), 7.12 (1H, s), 7.48 (1H, d, J=7.4 Hz), 9.15 (1H, d, J=7.4 Hz).

11-Hydroxy-12-methoxy-14-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6H[1]benzopyrano-[4,3;4,5]pyrrolo[2,1-a]isoquinoline-6-one (1l)

化合物 **1a** と同様な方法で化合物 **6g** から合成した (収率 50%)、淡灰色結晶、mp 300 °C以上。

¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 3.38 (3H, s), 3.77 (3H, s), 6.95-7.50 (10H, m), 9.08 (1H, d, J=7.5 Hz), 9.37 (1H, s, D₂O exchangeable), 9.94 (1H, s, D₂O exchangeable).

HR-MS calcd. for C₂₇H₁₉NO₆ (M⁺) 453.1213, found 453.1218.

Lamellarin H (1b from 1j)

化合物 **1j** (103 mg, 0.167 mmol) の乾燥 CH₂Cl₂ (10 ml) 溶液をアルゴン雰囲気下-78°Cに冷却し、三臭化ホウ素 (0.0800 ml, 0.846 mmol) をマイクロシリンジにて加えた。この溶液を約3時間かけて徐々に室温まで昇温し、さらに室

温で一夜放置した後、2M NH₄OH 水溶液を加え反応を停止した。1M HCl 水溶液を用い水層の pH を 5 に調節した後、ジクロロメタンを溜去し、残渣を酢酸エチルで 2 回抽出した (20 ml x 2)。抽出液は水洗、乾燥 (Na₂SO₄) 後、濃縮した。残留物を温アセトンで 2 回 (25 ml x 2) 抽出し、抽出液を濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル : メタノール = 95 : 5) で精製し、**1b** (490 mg, 0.107 mmol) を淡灰色不定形粉末として得た、収率 64%。

FAB-MS (glycerin) *m/z* 456 [M+H]⁺. **1b** のヘキサアセテート, mp 235~238 °C (decomp., EtOAc-pentane, lit.[2] amorphous solid): ¹H NMR (200 MHz) δ 2.25 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.298 (s, 3H), 2.303 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 2.37 (2, 3H), 7.09 (s, 1H), 7.13 (d, 1H, J=7.4 Hz), 7.31 (s, 1H), 7.39 (d, 1H, J=1.8 Hz), 7.41 (d, 1H, J=1.8 Hz), 7.42 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 9.31 (d, 1H, J=7.4 Hz). EI-MS *m/z* (relative intensity) 709 (M⁺, 2.9), 667 (2.5), 625 (3.5), 602 (2.3), 566 (3.5), 564 (4.0), 541 (2.7), 486 (24.5), 455 (5.7), 354 (9.9), 278 (8.7), 256 (3.7), 212 (3.1), 117 (4.9).

HR-MS calcd for C₃₇H₂₇NO₁₄ 709.1431, found 709.1398.

11,12-Dihydroxy-14-(3,4-dihydroxyphenyl)-6H[1]benzopyrano[4',3';4,5]pyrrolo-[2,1-a]isoquinoline-6-one (1f).

化合物 **1b** と同様な方法で化合物 **1f** から合成した (収率 80%)、淡灰色不定形粉末。

¹H NMR (200 MHz) δ

ブラインシュリンプ殺傷活性試験 (ブラインシュリンプテスト)

サンプル溶液の調製

5 mg のサンプルを 1 mL の DMSO に溶かし、濃度 5 g/L の溶液を作成した。この溶液を 2 倍及び 4 倍に希釈し、それぞれ 2.5 g/L、1.25 g/L の溶液とした。

ブラインシュリンプの孵化

ブラインシュリンプ (*Artemia salina*) の卵を人工海水に入れ、25°C で 12.5 時間明所に、11.5 時間暗所に調節した人工気象中、活性炭フィルターを通した空気を吹き込み、数日間置き孵化させた。

殺傷活性試験

孵化後 2～3 日以内のブラインシュリンプ 10 匹をパスツールピペットを用いて 10ml のバイアルにいれ、全容を人工海水で 5 mL に調節した。これにサンプル溶液 20 μ L を加え、飼料としてドライイースト懸濁液 (3 mg/5 mL) を 2 滴加えた。これを上記の人工気象器に入れ、6 時間と 24 時間後の死亡率を測定した。1 サンプル 1 つの濃度につき 5 連で実験を行い、データは平均値とした。

細胞毒性試験 (コロニー形成阻害活性)

24 穴プレート各ウェルに 200 個の細胞を播種した。24 時間後、各ウェルの培地を取り除き、各種濃度のサンプルが入った培地を添加し、37°C インキュベーターで 6 日間培養した。その後、培地を取り除き、1% メチレンブルーを含む 50% メタノールで細胞を固定・染色し、コロニー数を計測した。サンプル無添加のウェルのコロニー数を 100% とし、各ウェルのコロニー数をパーセント表示した。また、サンプル濃度とコロニー形成率との関係から、50% 細胞増殖阻害濃度 (IC_{50}) を得た。

参考文献

1. Andersen, R. J.; Faulkner, D. J.; Cun-heng, H.; Van Duyne, G. D.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5492-5495.

2. Lindquist, N.; Fenical, W.; Van Duyne, G. D.; Clardy, J. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4570-4574.
3. Carroll, A. R.; Bowden, B. F.; Coll, J. C. *Aust. J. Chem.* **1993**, *46*, 489-501.
4. Urban, S.; Capon, R. J. *Aust. J. Chem.* 1996, *49*, 711-713.
5. Reddy, M. V. R.; Faulkner, D. J.; Venkateswarlu, Y.; Rao, M. R. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 3457-3466.
6. Reddy, M. V. R.; Rao, M. R.; Rhodes, D.; Hansen, M. S. T.; Rubins, K.; Bushman, F. D.; Venkateswarlu, Y.; Faulkner, D. J. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1901-1907.
7. Davis, R. A.; Carroll, A. R.; Pierens, G. K.; Quinn, R. J. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 419-424.
8. Quesada, A. R.; Garcia Gravalos, M. D.; Fernandez Puentes, J. L. *British Journal of Cancer* **1996**, *74*, 677-682.
9. Ishibashi, F.; Miyazaki, Y.; Iwao, M. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 5951-596
10. Ishibashi, F.; Tanabe, S.; Oda, T.; Iwao, M. Proceedings of the 6th Joint Symposium of Cheju National University and Nagasaki University on Science and Technology, **2000**, pp. 104-107
11. a) Chen, C. -H.; Soine, T. O.; Lee, K. -H. *J. Pharm.Sci.*, **1971**, *60*, 1634-1638;
 b) Battersby, A. R.; Le Count, D. J.; Garratt, S.; Thrift, R. I. *Tetrahedron*, **1961**, *14*, 46-53.
12. Douglas, K. W.; Gulland, J. M. *J. Chem. Soc.*, **1931**, 2893.
13. Robertson, D. W.; Beedle, E. E.; Krushinski, J. H.; Pollock, G. D.; Wilson, H.; Wyss, V. L.; Hayes, J. S. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 717-727.
14. a) Torii, S.; Tanaka, H.; Siroi, T.; Akada, M. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3005-3010;
 b) Rao, D. V.; Stuber, F. A. *Synthesis* **1983**, 308.
15. Fukui, K.; Nakayama, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1962**, *35*, 1321.

16. Pearlman, W. M. *Tetrahedron Lett.* **1967**, 1663-1664.
17. Meyer B. N.; Ferringni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, J. B.; Nichols, D. E.;
McLaughlin, J. L. *Planta Med.* **1982**, 45, 31-34.
18. Oda, T.; Sato, F.; Yamamoto, H.; Akagi, M.; Maeda, H. *Anticancer Res.* **1989**, 9,
261-266.

參考資料

著者の本研究に関連した論文、ならびに研究年度内に発表した論文を資料として添付する。