

シアノバクテリンをモデルとした新規光合成阻害剤  
の開発

(課題番号 13660202)

平成 13 年度～平成 14 年度科学研究費補助金  
(基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

平成 15 年 3 月

研究代表者 石橋郁人  
(長崎大学水産学部助教授)

# 目 次

1. 緒言	1
2. 合成計画	4
3. キラルシントロン(4 <i>R</i> )- <b>2</b> の調製	7
4. 3-Chloro-4,5-methylenedioxybenzylbromide の合成	8
5. 光学活性なシアノバクテリンの合成	
5-1. 2位の異性化による 2,3-シス体への変換	10
5-2. 3位の立体反転による(+)-シアノバクテリンの合成	
5-2-1. ブテノリドの3位への共役付加反応	12
5-2-2. ブテノリド2位のアルキル化	13
5-2-3. 4位のメントキシ基の加水分解	14
5-2-4. 4-Methoxybenzyl phenyl selenide の調製	16
5-2-5. 4-メトキシベンジリデン基の導入	16
5-2-6. アリル位の水酸化	17
5-3. 2-アリリデンラクトン <b>17</b> の還元反応による合成	20
5-4. Methyl 3-isopropyl-3-(dimethoxy)methylpropanoate ( <b>19</b> ) のアルキル化による合成	22
5-5. 合成した 2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> -シアノバクテリンの解析	24
6. シアノバクテリンとエピシアノバクテリンの生理活性	
6-1. 陸上高等植物に対する活性	26
6-2. 海洋植物（藻類）に対する活性	
6-2-1. 赤潮原因植物性プランクトンに対する毒性	27
6-2-2. ヒラアオノリに対する殺藻活性および成長抑制活性	27

7. 結論と考察	32
8. 実験の項	33
参考文献	44
参考資料	46

## は し が き

本報告書は、文部省科学研究補助金（基盤研究（C））の補助により行った研究の成果を収めてある。

淡水産のらん藻 *Scytonema hofmanni* UTEX158 株のアレロパシー物質として単離されたシアノバクテリンは、特徴的な構造を有するγ-ラクトンであり、その作用機構は光合成光化学系Ⅱにおける電子伝達系の阻害であることが解明されている。この物質は、らん藻だけでなく陸上植物に対しても高い殺草活性を示すことが知られており、新しい除草剤のリード化合物として期待される。また、シャットネラ等の渦鞭毛藻類やアカシオモ等のラフィド藻のような赤潮の原因となる植物性プランクトンに対しても光合成阻害活性を示すことが予想され、赤潮防除への利用が期待できる。

そこで本研究では、シアノバクテリンをモデルとした新しい除草剤や赤潮防除物質の開発を行うための基礎研究として、石橋が誘導体の合成にも適応可能なシアノバクテリンの高選択的な不斉合成法の開発を行い、桑野が合成されたシアノバクテリン関連化合物の陸上植物に対する生長阻害活性ならびに微細藻類に対する増殖阻害活性・殺藻活性を調べた。この結果、シアノバクテリンおよびその3位のエピマーであるエピシアノバクテリンは、赤潮の原因となる渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* および *Chattonella marina* に対して DCMU をしのぐ殺藻活性と高い種間選択性を示し、赤潮防除物質のリード化合物として有効であることが示唆された。

## 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：桑野和可（長崎大学水産学部助教授）

## 交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 13 年度	2,400	0	2,400
平成 14 年度	1,100	0	1,100
総 計	3,500	0	3,500

## 研究発表

### (1) 学会誌等

S. Park, T. Kusano, K.Kuwano, and F. Ishibashi, Synthesis and Algicidal Activity of (+)-Cyanobacterin, *Phytochemistry*, 2003 年 投稿予定

### (2) 口頭発表

Soohwan Park, Takako Kusano, and Fumito Ishibashi, Enantioselective Total Synthesis of Cyanobacterin Employing (5*R*)-5-(*l*-Menthylloxy)-2(5*H*)-furanone as the Chiral Synthone, 18th International Congress of Heterocyclic Chemistry, Yokohama, Japan, July 29-August 3, 2001, pp 327

## 研究成果による工業所有権の出願・取得状況

該当なし

## 1. 緒言

近年，農薬による環境汚染が社会問題となっており，環境に優しい農薬の開発に対する社会的要請が高まっている。このような薬剤のリードを低残留性・高選択性・易分解性といった特徴を持つ天然物に求めることは合理的であり，その中でも，海洋の天然物（淡水産を含む）は陸上のものには見られない新規な構造と強力な生理活性を持つものが多く，特に注目に値する。

淡水産のらん藻 *Scytonema hofmanni* は、他のらん藻や緑藻と同時に培養すると、それらの生育を著しく阻害することが知られていたが<sup>1)</sup>、1982年 Mason 等<sup>2)</sup>は、*Scytonema hofmanni* UTEX158 株からはじめてこのアレロパシー物質の単離に成功し、シアノバクテリンと命名した。このものの2位と3位の相対立体配置を含む化学構造は、Mason 等<sup>2)</sup>および Pignatello 等<sup>3)</sup>により、NMR 等の各種スペクトルを用い Fig. 1 のように決定された。さらに、Karl 等<sup>4)</sup>による X 線回折により、2位と3位の絶対配置は 2*R*,3*R* 配置であることが明らかにされた。

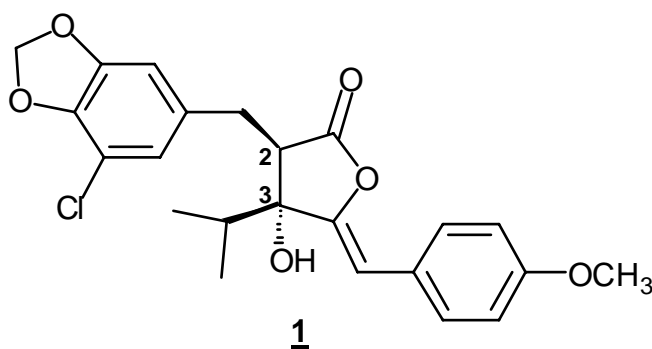


Fig. 1. Structure of cyanobacterin

らん藻 *Synechococcus* sp. の葉緑体を用いた組織学的観察によると、シアノバクテリンは、チラコイド膜の微細構造を変化させること、また、光照射下 *Synechococcus* 細胞からの酸素の発生を阻害することが明らかにされている。シアノバクテリンの作用機構としては、光合成光化学系 II（明反応、Hill 反応）における電子伝達系の阻害機構が 1984 年に明らかにされている<sup>5)</sup>。さらにシアノバクテリンは 1987 年に細胞質内の pH を徐々に低下させることにより、光化学系 II の初期段階にあるプロトンポンプ機構に作用することが示唆された<sup>6)</sup>。この

機構は、細胞内のヌクレオチドやリン酸化糖レベルに変化を与える 2,4-ジニトロフェノール (DNP) のような脱共役剤 (uncoupler) や代表的な Hill 反応阻害剤であるジクロロフェニルジメチル尿素 (DCMU) のものとは明確に異なっている。

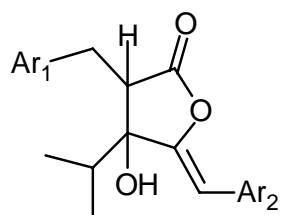
Janet 等<sup>7)</sup> は、1987 年にシアノバクテリンの二つの芳香環部位の置換基と 3 位の水酸基に関する構造活性相関を報告している (Table 1)。これによると、2 位の置換ベンジル基上の塩素原子および 3 位の水酸基は、それぞれを除去した誘導体は完全に Hill 反応阻害活性を失うことにより、活性発現に必須の置換基であること、また、2 位の置換ベンジル基上のメチレンジオキシ基および 4 位の置換ベンジリデン基上のメトキシ基は、それぞれを除去した誘導体は天然物と比べると活性の低下は認められるものの活性を保持しており、活性発現に必ずしも必須ではないことが明らかにされている。しかしながら、これ以上の構造活性相関研究は行われておらず、3 位のイソプロピル基の影響や絶対構造と活性の関係などは未解明である。

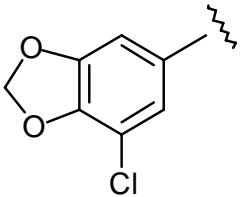
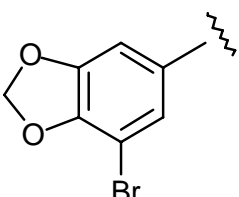
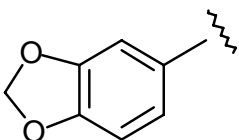
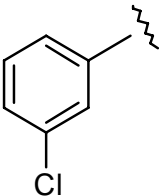
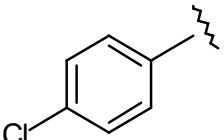
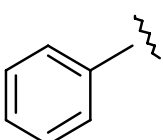
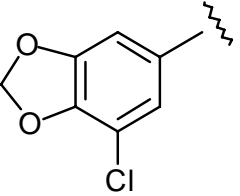
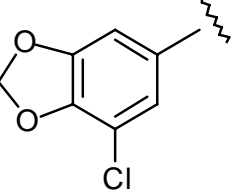
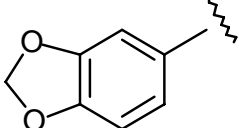
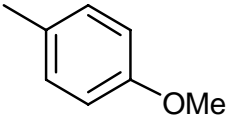
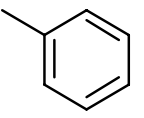
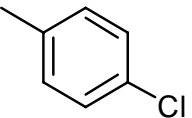
シアノバクテリンの全合成は、1984 年 Jong 等<sup>8)</sup> により初めて報告された。Jong 等の合成法は二つのユニット (A と B) を縮合させた後、酸化的なラクトン化を行うというもので (Fig. 2)、短工程で目的物を得ることができるといった利点を持つが、反応の立体制御がなされておらず、ラセミ体の合成に止まっている。

シアノバクテリンは、らん藻だけでなく陸上植物に対しても高い殺草活性を示すことが知られており、新しい除草剤のリード化合物として期待される。また、シャットネラ等の渦鞭毛藻類やアカシオモ等のラフィド藻のような赤潮の原因となる植物性プランクトンに対しても光合成阻害活性を示すことが予想され、赤潮防除への利用が期待できる。そこで本研究では、シアノバクテリンをモデルとして新しい除草剤や赤潮防除物質の開発を行うための基礎研究として以下の課題を順次検討することとした。

- 1) 研究を行うために不可避である誘導体の合成にも適応可能なシアノバクテリンの高選択的な不斉合成法の開発を行う。
- 2) 上述の方法により合成したシアノバクテリン及び関連化合物の植物生長阻害活性を調べ、構造と活性の関係に関する情報を得る。
- 3) シアノバクテリン及び関連化合物の赤潮の原因となる微細藻類に対する生

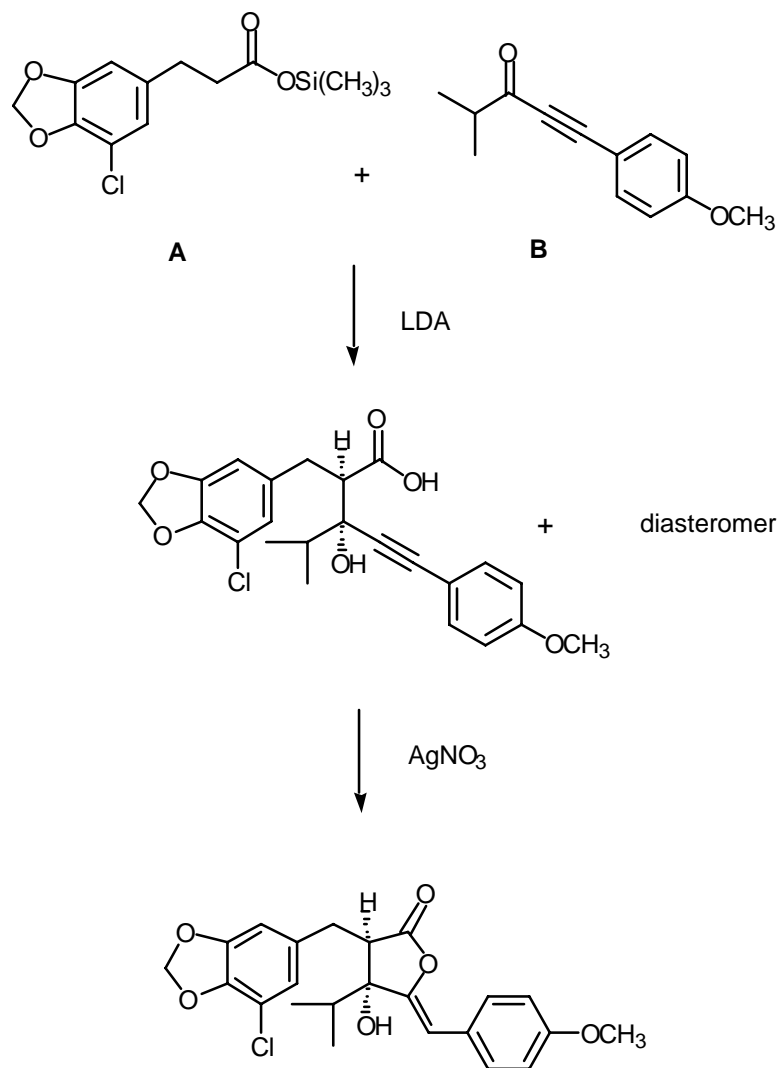
**Table 1. Inhibition of Oxygen Evolution Caused by the Natural Cyanobacterin and the Racemic Analogs**



Ar <sub>1</sub> =			
	25nM (natural product)	60nM	Not active
Ar <sub>1</sub> =			
	1.5 μM	Not active	Not active
Ar <sub>1</sub> =			
	+	+	+
Ar <sub>2</sub> =			
	25nM (natural product)	143nM	Not active

Concentration of analogs which caused complete inhibition of the evolution of oxygen by thylakoid membranes isolated from *Synechococcus* sp. ATCC 27146 was determined using  $K_3Fe(CN)_6$  as the electron acceptor





**Fig. 2. Jong`s Synthesis of (±) - Cyanobacterin**

理活性（増殖阻害活性，殺傷活性など）を調べ，赤潮防除物質としての有効性について検討する。

## 2. 合成計画

強力な光合成阻害活性を有するシアノバクテリアの効率的な合成は、生理活性機構の解明や本物質をモデルとした新規光合成阻害物質の創世に関わる研究

に必要であるが、上述の Jong 等のラセミ体の合成以来報告がない。Janet 等の研究に示されているよう、3位の水酸基とその配置がシアノバクテリンの作用の重要な鍵となることから、本研究では2位、3位の立体制御の可能性および、合成の効率化についていくつかの方法を検討した。

Feringa 等は、4*R*-(*l*-menthyloxy)-4-butenolide (**2**)の簡便な合成法と光学活性な天然物合成の出発物質（キラルシントン）としての有用性について報告している<sup>9)</sup>。Feringa 等の天然物合成の戦略は、4位のかさ高いメントキシ基の立体障害を利用して、ブテノリド **2** の3位への共役付加反応と2位のアルキル化により立体選択的に2,3位に置換基を導入した後、1位と4位を修飾することにより天然物へと変換するというものである (Fig. 3)。

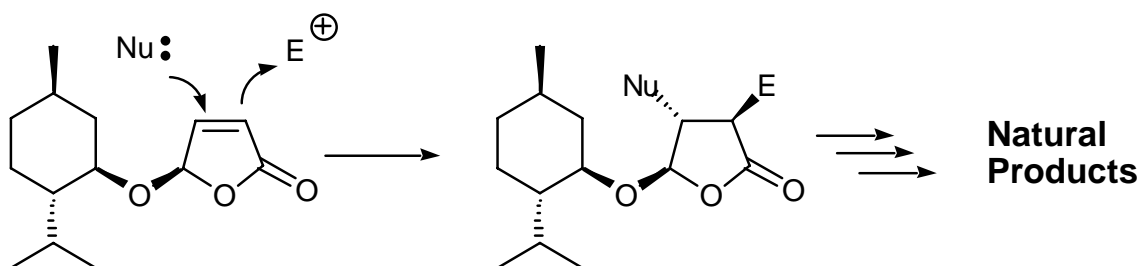
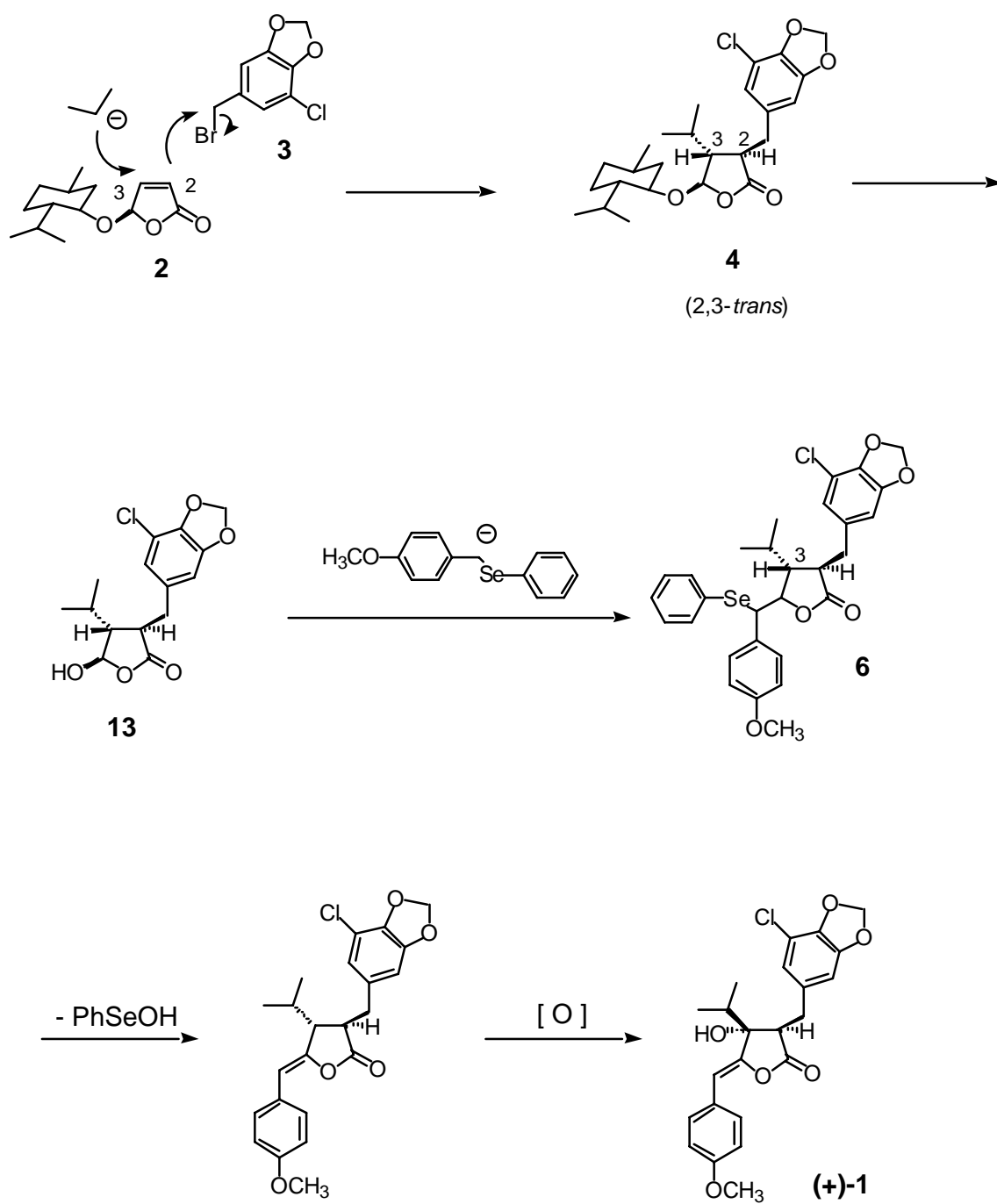


Fig. 3. Feringa 's General Strategy for the Enantioselective Synthesis of Natural Product

著者は、シアノバクテリンにおいてもこの戦略を適用することが可能であると考え、次のような合成計画を立てた (Fig. 4)。

まず、キラルなブテノリド **2** の3位にイソプロピル基を共役付加させ、次いでラクトン2位のアルキル化を行い、2位と3位と4位が全てトランスになるように立体選択的に置換基を導入した後、加水分解によりラクトール **13** とする。次いで、4-methoxybenzyl phenyl selenide 由来のカルバニオン7の付加、ラクトン化及び酸化的脱セレン化により、4位に4-メトキシベンジリデン基を導入する。最後に、3位の水酸化により光学活性なシアノバクテリンへと変換する計画である。この方法の利点は、(1) 原料の調整が容易なこと、(2) 全6工程と単工程であること、(3) 効率的に2位に不斉を導入することができること、(4) 2位と3位に自由に置換基を導入することができ誘導体の合成にも適応可能な



**Fig. 4. Synthetic Plan**

こと、などがあげられるが、2位と3位の置換基はトランスに導入され、シアノバクテリンのそれらはシスに位置しているため、最終段階の3位の水酸化反

応において3位の立体を反転させる必要がある。

### 3. キラルシントロン(4R)-2の調製

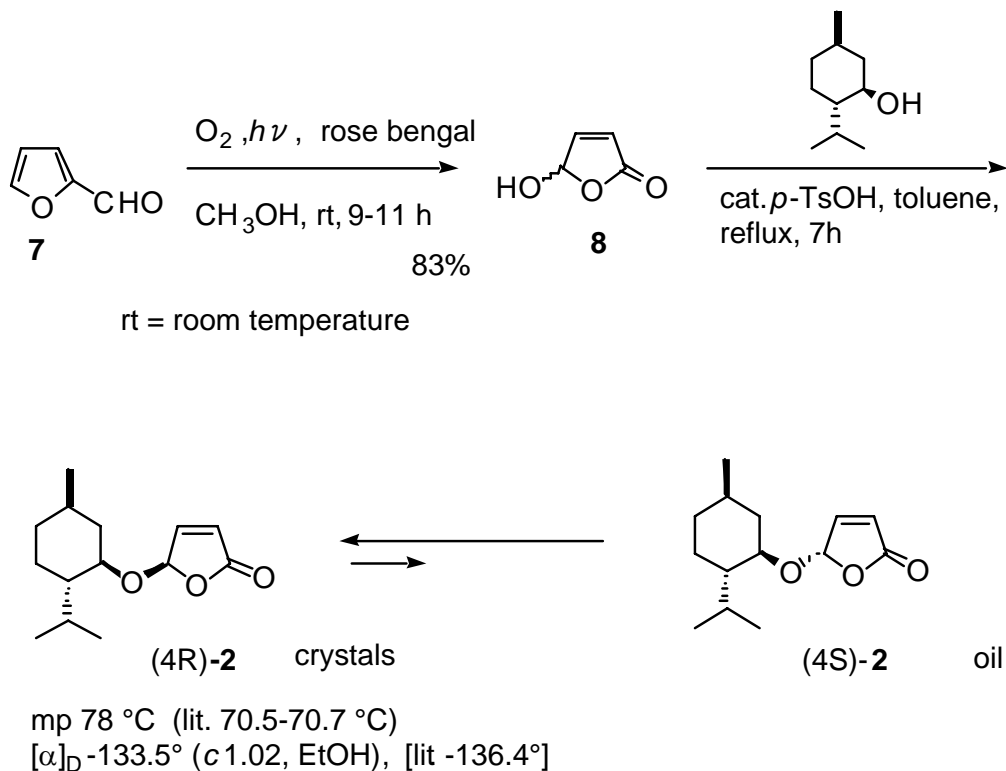


Fig. 5. Synthesis of (4 R)-4-Menthoxy-4-butenolide

キラルなブテノリド(4R)-2の調製は Feringa 等の方法<sup>10)</sup>に準じ行った(Fig. 4)。まず、フルフラール(7)を原料とし、光増感剤ローズベンガルの存在下、光反応装置を用い酸素気流下9-11時間100Wの高圧水銀ランプ光照射を行い、ラクトール8を83%の収率で得た。時間とともに光増感剤の色が薄くなったことにより、徐々に光増感剤が分解したものと考えられたので、色が薄くなってきたら、その度増感剤を追加して反応を続けた。また、光増感剤としてメチレンブルーを用いた場合は反応収率が著しく低下した(8%)。次に8を(1R,2S,5R)-(-)-mentholと共に100°Cで20時間加熱するとジアステレオマー性の縮合物2が得られた。この両者は平衡関係にあるが、4S体は液体で4R体は結晶であるので、再結晶を繰り返すことにより4R体のみを純粋に単離することができ

た。1回目の再結晶母液には、かなりの量の4*R*体が含まれており、石油エーテルから結晶化させ回収することができるが、この操作は3回が限度で、純粋な結晶の収率は18%と非常に悪かった(Feringa等は収率36%で(4*R*)-**2**を得ている)。そこでこの縮合反応は可逆反応であることに着目し、生成する水蒸気を反応系外に除去することを試みた。水分離器を用いトルエン中で加熱し水分を共沸により除去し反応を行った結果、収率を45%まで改善することができた。また、ここで得られた4*R*体の比旋光度は $[\alpha]_D = -133.5^\circ$  ( $c$  1.02, EtOH)とほぼ文献値( $[\alpha]_D = -136.4^\circ$ )どおりであり、光学的に純粋であると考えられた。

#### 4. 3-Chloro-4,5-methylenedioxybenzyl bromide の合成

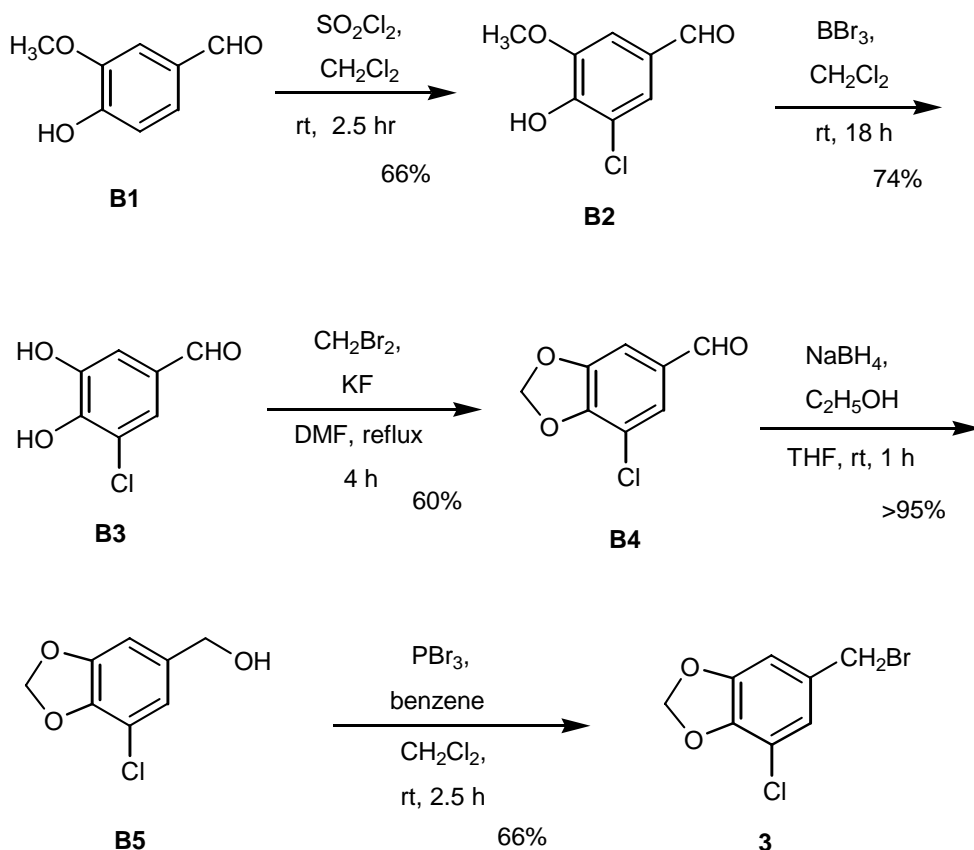


Fig. 6. Synthesis of 3-Chloro-4,5-methylenedioxybenzyl Bromide

合成のもう一方のシントンである 3-chloro-4,5-methylenedioxybenzylbromide (**3**) は、バニリンを原料とした Jong 等の方法<sup>8)</sup>に改良を加え合成した (Fig. 6)。まず、バニリンのジクロロメタン溶液に塩化スルフリルを長時間かけて滴下し、その後室温で反応させることにより 5 位を選択的に塩素化し **B2** を得た。次にこのものの脱メチル化を検討した (Table 2)。従来の合成法では、高価な三臭化ホウ素あるいは三塩化ホウ素を脱メチル化試薬に用いられていたが、今回は大量合成のために安価な臭化水素酸を用いる方法を検討した。3 回ほど実験を行ったが、再現性良く 74%程度の好収率で反応が進行し、臭化水素酸は三臭化ホウ素に代用できることが分かった。

**Table 2.** Demethylation of 5-Bromovaniline

run	reagent	solvent	conditions	yield
1	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SiI	CH <sub>3</sub> CN	reflux, 30 min	0%
2	BBr <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	rt, overnight	74%
3	HBr (48%)	H <sub>2</sub> O	115°C, 6 h	74%

次にカテコール **B3** のメチレン化反応の検討を行った (Table 3)。メチレン化の活性化剤としてフッ素イオンを用いる方法<sup>11)</sup>と相間移動触媒を用いる方法<sup>12)</sup>を試みた。まず、フッ素イオン源としてフッ化ナトリウムとフッ化カリウムを比較したところ、フッ化ナトリウムを使用した場合は目的物を得ることができず、フッ化カリウムの方が優れていることが分かった。また、相間移動触媒を使用した方法では、収率は最高でも 14%しか得られず、良い結果は得られなかった。

**Table 3.** Methylenation of Catechol **B3**

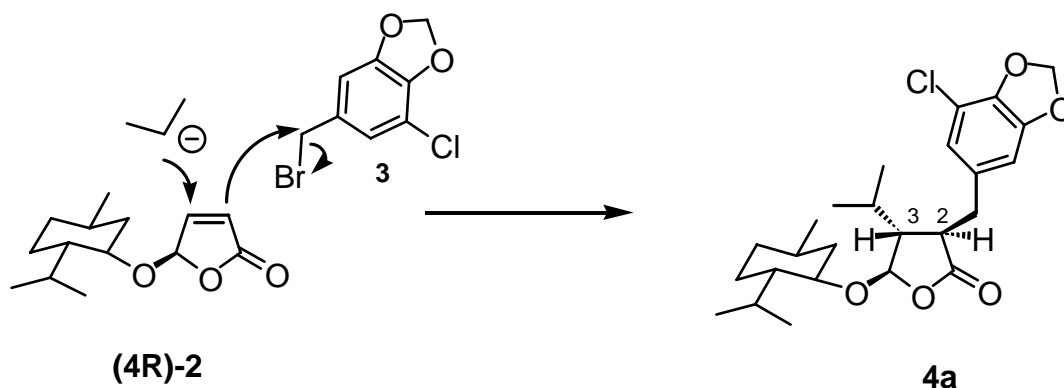
run	reagents	solvent	conditions	yield
1	CH <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> , KF	DMF	reflux, 4 h	60%
2	CH <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> , NaF	DMF	reflux, 2.5 h	0%
3	CH <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> , NaOH, PTC*	H <sub>2</sub> O	reflux, 1.5 h	14%

\*PTC: trioctylmethylammonium chloride

アルデヒド **B4** のアルコール **B5** への還元、ならびに最後の臭素化反応は問題なく進行し、ブロミド **3** をバニリンからの通算収率 18% で得た。

## 5. 光学活性なシアノバクテリンの合成

シアノバクテリンの合成はブテノリド(**4R**)-**2** の 3 位へのイソプロピル基の共役付加とアルキル化反応から始める (**Fig. 7**)。ここで得られる化合物 **4a** の 2 位の置換ベンジル基と 3 位のイソプロピル基はトランス配置になることが予想され、シアノバクテリン(**1**)のそれらはシス配置である。従って、目的物への変換には化合物 **4a** の 2 位あるいは 3 位いずれかの立体を反転させる必要がある。このシス配置への変換方法としては次の二つの方法が考えられる。①あらかじめ化合物 **4** の 2 位の立体を反転させ 2,3-シス体へと変換しておく。②最終工程の 3 位の水酸化の際に 3 位の立体を反転させる。ただし①の方法では、**4R-2** からは非天然型(-)体のシアノバクテリンが得られることになる。



**Fig. 7** Stereochemistry of the Product of Conjugate Addition to (4R)-**2** and Subsequent Alkylation

### 5-1. 2位の異性化による2,3-シス体への変換

まず、**4a** の 2,3-トランス体から 2,3-シス体への変換を試みた。この実験には、反応条件を検討するため、容易に得られるラセミ体のブテノリド **9** を使用した。ラセミ体のラクトン **9** は、**8** をメタノール中触媒量の *p*-トルエンスルホン酸

(*p*-TsOH)とオルトギ酸メチルを加え室温でかくはんすることにより、65%の収率で得られた (Fig.8)。

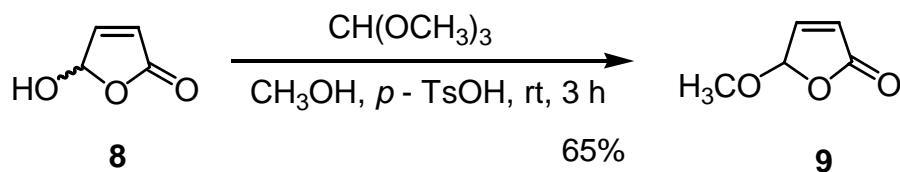


Fig. 8. Methylation of hydroxyfuranone

次いで、*in situ* で調製したグリニャール試薬であるイソプロピルマグネシウムブロミド、触媒として1価銅塩<sup>13)</sup>及び反応促進剤<sup>14)</sup>としてトリメチルクロロシランとヘキサメチルホスホラミド(HMPA)を用いラクトン9の3位へイソプロピル基の共役付加反応を行い、収率78%で4位の置換基に対して3位のイソプロピル基がトランスに位置したラクトン10のみを立体選択的に得た。

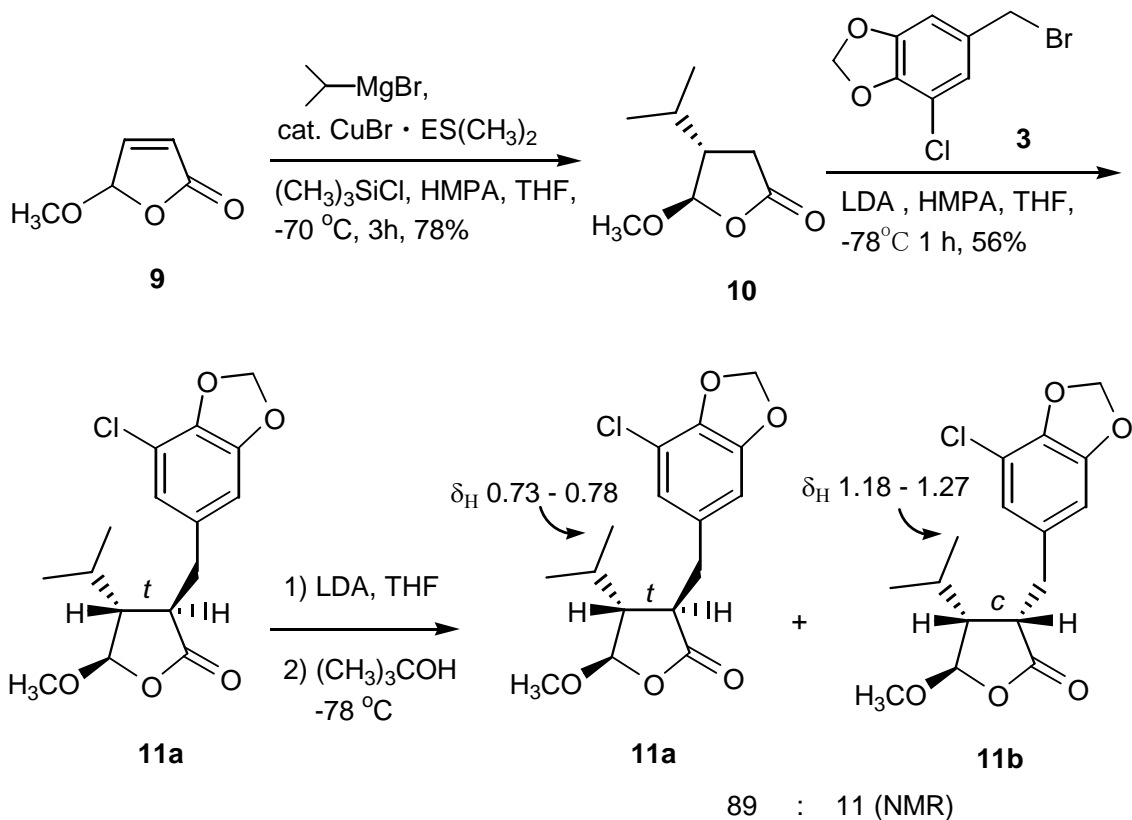


Fig. 9. Epimerization at C-2



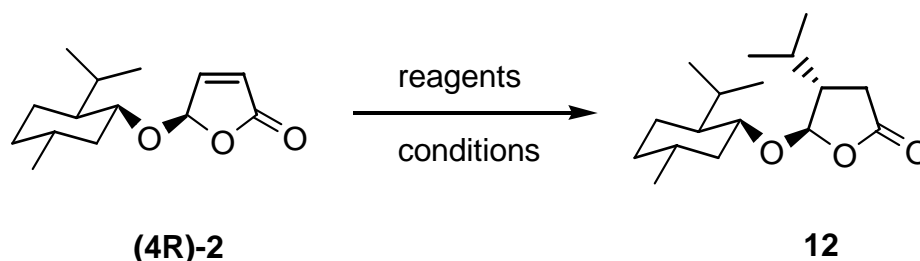
次いで、ラクトン2位をリチウムジイソプロピルアミド(LDA)存在下、ブロミド **3** でアルキル化し **11a** とした。この反応でも 2,3-トランス体のみが選択的に得られた。次いで、この 2,3,4 位の置換基が全てトランス配置の **11a** の2位を異性化するために、再び **11a** を強塩基である LDA で処理しエノレートを発生させ、1位、2位を sp<sup>2</sup> 平面とし、低温でかさ高いアルコールを用いプロトン化を行った (**Fig. 9**)。トランス体がシス体へ異性化したことを NMR により確認したが、2位の異性化は 10%程度しか進行せず、両者の分離も困難だった。そこで、最後の水酸化の際に立体反転する方法を検討した。

## 5-2. 3位の立体反転による(+)-シアノバクテリンの合成

### 5-2-1. ブテノリドの3位への共役付加反応

まず、ブテノリド(**4R**)-**2** の3位へのイソプロピル基の共役付加反応の条件を検討した(**Table 4**)。

**Table 4.** Conjugate Addition to Butenolide (**4R**)-**2**



run	reagents	solvent	conditions	yield
1	<i>i</i> -PrMgBr, CuCl	THF	-10°C→rt, 20 h	0%
2	<i>i</i> -PrMgBr, TMSCl	THF	-10°C→rt, 1 h	0%
3	<i>i</i> -PrMgBr, TMSCl, CuBr·SMe <sub>2</sub> , HMPA	THF	-78°C, 3 h	51%
4	<i>i</i> -Pr-I, Zn(Cu), ultrasound	aq. EtOH	rt, 2.5 h	54%

1 価の銅塩錯体と反応促進剤としてトリメチルクロロシランおよび HMPA を



この立体選択性は次のように考えられる (Fig 11)。LDA との反応により生じたリチウムエノレートは5員環平面の3位に下向きにかさ高いイソプロピル基が、4位に上向きにメントキシ基が結合しているが、反応点は2位なのでより近い3位のイソプロピル基の立体反発のほうが遠い4位のメントキシ基の立体反発よりも大きく現れ、上の面での反応が優先的に進行し、その結果2,3-トランス体が優勢に生成したと思われる。

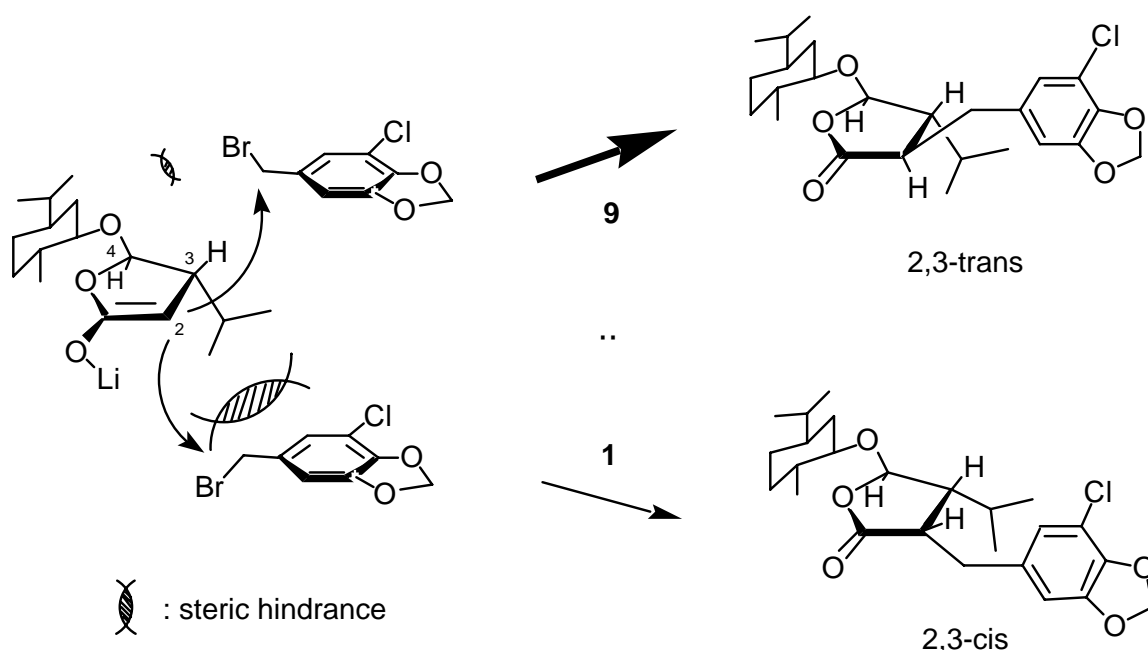
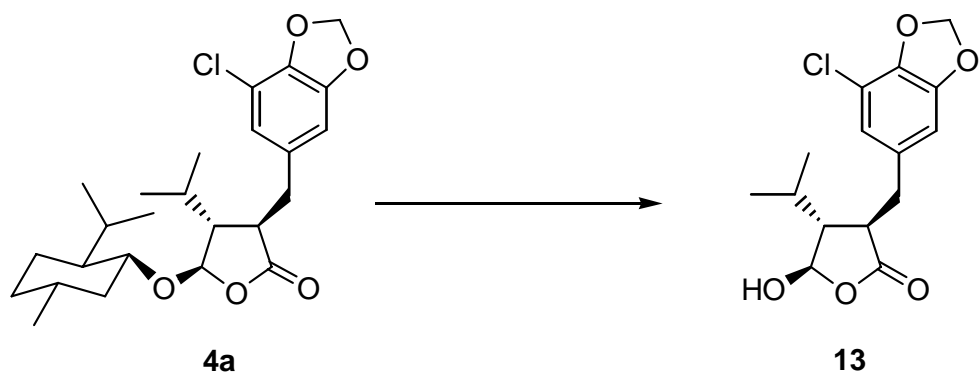


Fig. 11. Proposed Mechanism of the Alkylation

### 5-2-3. 4位のメントキシ基の加水分解

まず、4位に4-メトキシベンジリデン基を導入する付加反応を行うためには4位を水酸基に置換しておく必要があるため、4位の加水分解を行った(Fig 12)。ラクトン環の安定性に注意しながら弱い酸性の条件から反応性を検討した(Table 5)。Run 1 から5までの酸加水分解では反応が全く進行しないか、あるいは非常に遅く、また副生成物を多く生じた。そこで、アルカリ加水分解反応を検討したところ、短時間でかなり高収率で目的物を得ることができた(run 6,7)。



**Fig. 12.** Hydrolysis of the menthoxy ether

**Table 5.** Hydrolysis of the menthoxy ether

Run	Reagent	Solvent	Condition	Yield(%)
1	CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	THF - H <sub>2</sub> O	rt, 24h	0
2	<i>p</i> -TsOH	acetone - H <sub>2</sub> O	rt, 24h	0
3	6MHCl	THF - H <sub>2</sub> O	reflux, 3h	0
4	CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	reflux, 3h	0
5	CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	rt, 24h	11
6	1M KOH	THF - MeOH	rt, 3h	86
7	1M KOH	THF - H <sub>2</sub> O	rt, 3h	83

#### 5-2-4. 4-Methoxybenzyl phenyl selenide の調製

次いで4メトキシベンジリデンユニットとなるセレニド **14** を調製した (Fig. **13**)。セレニド **14** はジフェニルジセレニドを金属ナトリウムと共に窒素気流下6時間加熱還流を行い還元し<sup>16)</sup>、析出した黄色のナトリウム塩に HMPA に溶かした 4-メトキシベンジルクロリドを加えアルキル化することにより白色結晶として得られた<sup>17)</sup>。

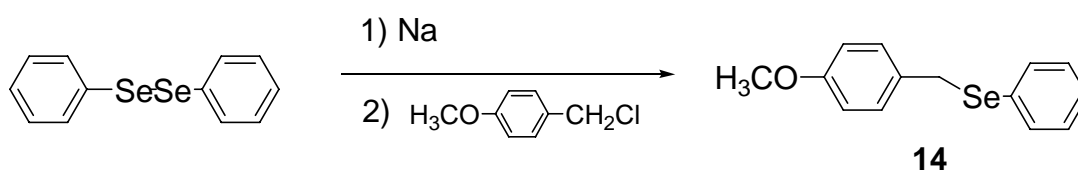


Fig. 13. Preparation of selenide 14

#### 5-2-5. 4-メトキシベンジリデン基の導入

調製したセレニド **14** を LDA で処理しカルバニオンを発生させた後、THF に溶かしたラクツール **13** を加えて付加反応を行った。この反応ではラクトン環が開環しカルボン酸リチウム塩が生じるため、塩酸酸性後抽出・濃縮し、ベンゼンに溶かし *p*-TsOH を触媒量加え 60°C に加熱しラクトン化を行った。その結果、**15** をジアステレオマー混合物としてを得た (収率 62%)。次いでこのものを過酸化水素水で処理したところ、セレニドの酸化と同時にセレノキシドの熱脱離反応が室温で進行し、4Z 体と 4E 体のオレフィン混合物として得ることができた (Fig. **14**)。なお、Z 体と E 体の構造決定は、導入したベンジリデン基の二重結合のプロトンの NMR 化学シフト値より行った (Z 体は 5.41 ppm、E 体は 6.25 ppm)。また、生成比は 58 : 42 (NMR 積分値により) で、両者はシリカゲルクロマトグラフィーにより分離可能であった。

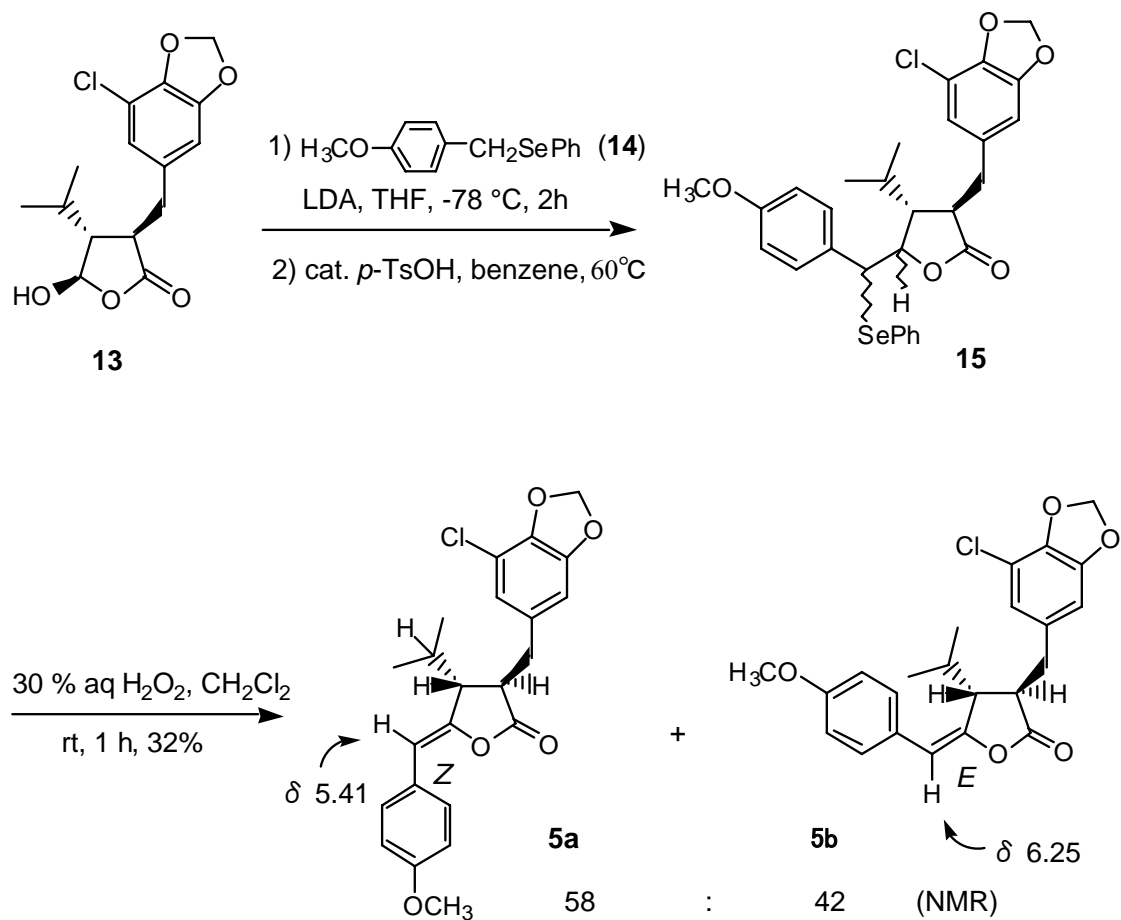
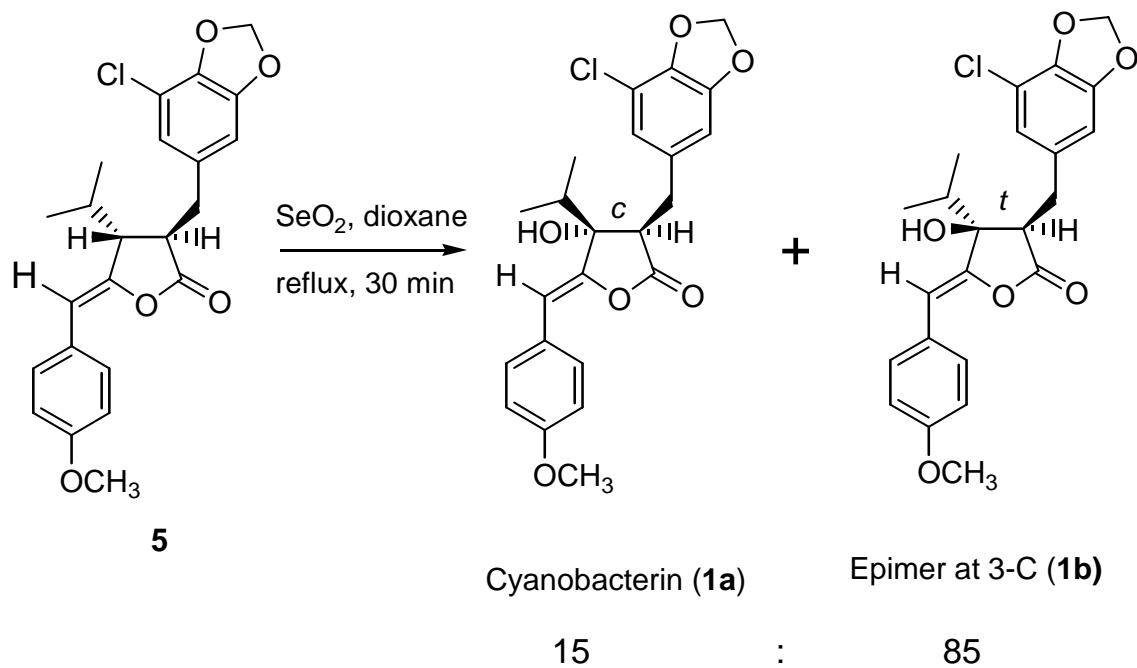


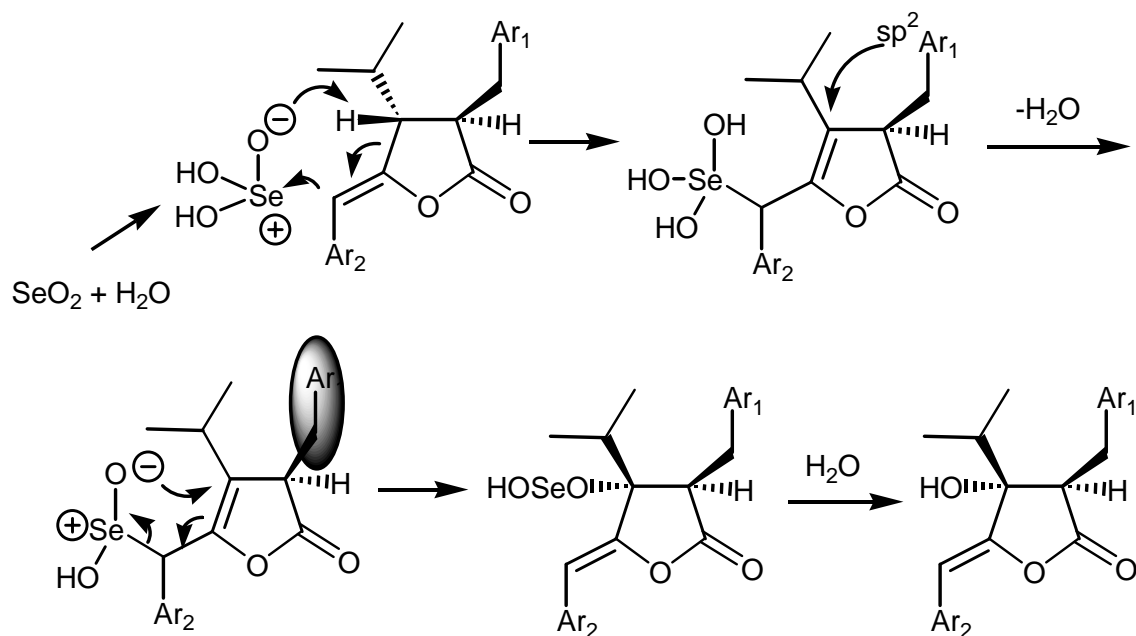
Fig. 14. Introduction of 4-Methoxy benzylidene group at 4-C

### 5-2-6. アリル位の水酸化

最後の工程として、ラクトン **5** の 3 位の反転を伴う水酸化反応を行った (Fig. **15**)。オレフィンのアリル位は種々の条件下で酸化され、アルコールもしくは対応するエステルやヒドロペルオキシドを与える。酸化法によっては二重結合が異性化したり、二重結合そのものが酸化されることもある。しかし、二酸化セレンは異性化などの副反応を伴わない優れた酸化剤であり、アリルアルコールの合成に広く用いられている<sup>18)</sup>。また、二酸化セレンの反応機構はアリリックなセレン化物を経由することが報告<sup>19)</sup>されているので 3 位の立体が結果的に反



**Fig. 15.** Selenium Dioxide Hydroxylation at 3-C



**Fig. 16.** Plausible Mechanism of Selenium Dioxide Allylic Oxidation

転することが期待できる (Fig. 16)。そこで、3位の水酸化反応は二酸化セレンを用いてジオキサン中加熱還流することにより行った。3当量以上の二酸化セレンを用い反応を行ったところ、目的物の 2*R*,3*R*-シアノバクテリンが得られたが、予想していた3位の立体反転はほとんど起こらず、3位のエピマー (1*b*) が主な生成物として得られた (1*a* : 1*b*=15:85)。なお、両者はシリカゲルクロマトグラフィー (toluene:EtOAc=95:5) で分離することができた。両者の立体構造は、エピマー1*b* のアセチル化物の NOESY スペクトルにおいて、イソプロピル基のメチルプロトン(Hb, Hc)と2位のメチンプロトン(Ha)の間に nOe (核オーバーハウザー効果) が観測されたことにより決定した(Fig. 17)。

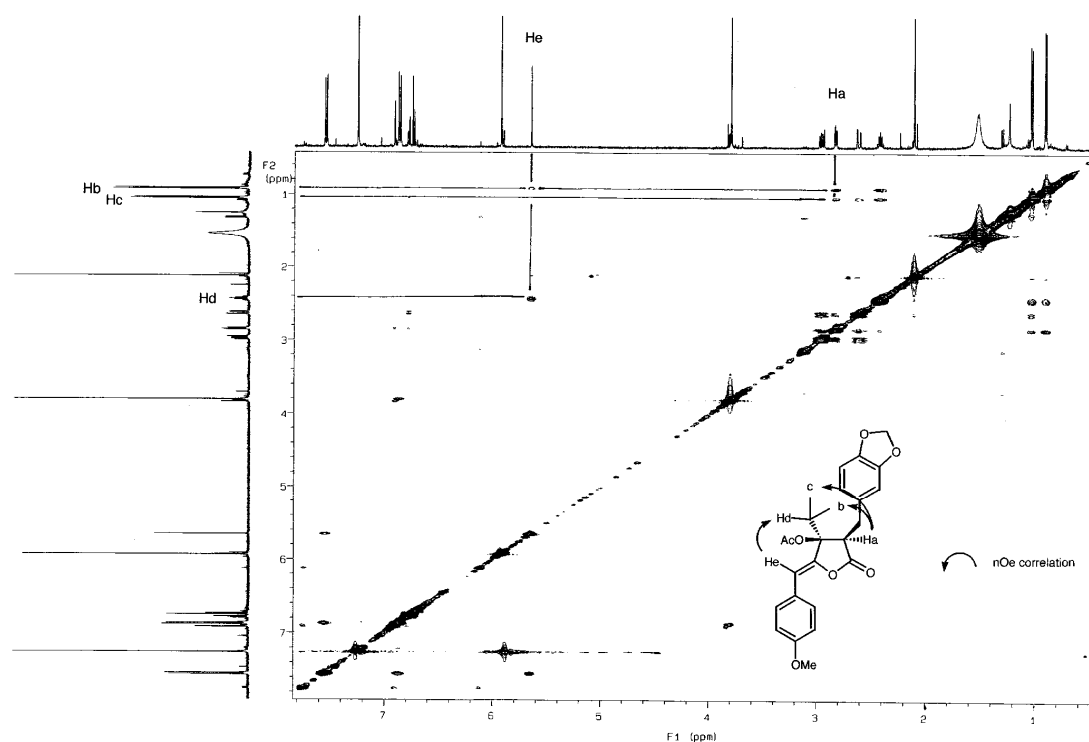


Fig. 17. NOESY Spectrum of 3-Epicyanobacterin Acetate (500MHz, CDCl<sub>3</sub>)

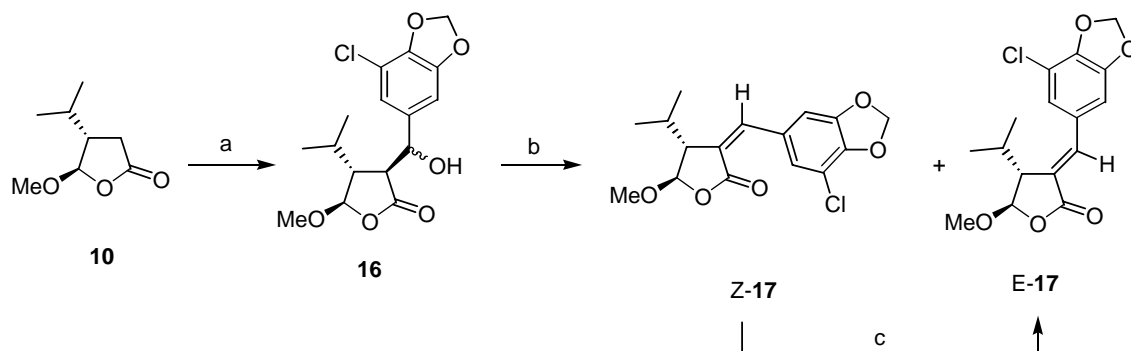
二酸化セレン以外の水酸化/アシル化試薬を種々検討したが [(1) O<sub>2</sub>, rose bengal, hv, MeOH; (2) Mn(Oac)<sub>3</sub>, KBrO<sub>3</sub>, acetone; (3) cat. SeO<sub>2</sub>, *t*-BuOOH, salicylic acid, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (4) Pd(OAc)<sub>2</sub>, HNO<sub>3</sub>, AcOH, CH<sub>3</sub>CN] 反応が進行したのは、酢酸中、酢酸パラジウムを使用する方法(4)のみであった。しかしながらこの場合は、基質に純粋な *Z* 体のオレフィン 5 を使用したにもかかわらず、目的のシアノバク



テリン酢酸エステル以外にエピ体および二重結合が異性化を起こした *E* 体の生成物を副製した。そこで、反応の最終段階において 3 位の立体反転を伴う水酸化／アシル化を行うことは断念し、再度、基質として 2,3-シス体のオレフィン **5** を調整する方法を検討した。

### 5-3. 2-アリリデンラクトン **17** の還元反応による合成

アリリデンラクトン **17** 二重結合の還元反応は 3 位のイソプロピル基の立体障害により  $\beta$  面で進行し、結果的に 2,3-シス体のラクトン **11b** が優先的に生成すると考えた。ラセミ体のラクトン **10** とアルデヒド **B4** とのアルドール型縮合により **16** とし、脱水反応によりアリリデンラクトン **17** とした(**Fig. 18**)。この際二重結合の幾何異性体の混合物が得られたが、それらは混合物のままチオフェノールの付加・脱離反応を行うことにより、全てを安定な *E* 体へと変換することが可能であった。

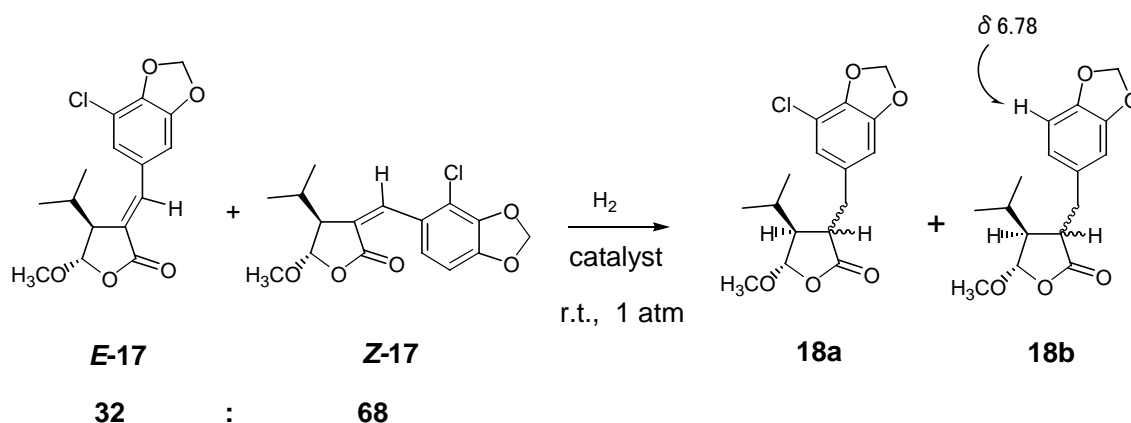


**Fig. 18.** reagents and conditions; (a) LDA, 3-chloro-4,5-methylenedioxybenzaldehyde, THF,  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1h, 91%; (b) MsCl,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rt, 4 h, then DBU, rt, 20 h, 94%; (c) PhSH, cat.  $t\text{-BuOK}$ , THF, rt, 20 h, 91%.

ここで得られたオレフィンの接触還元による体への変換を試みた。基質のオレフィン、*E* 体 *Z* 体、32 対 68 の混合物を用い、5 種類の触媒を用い水素雰囲気下、常温・常圧で攪拌することにより反応した。その結果を **Table 6** に示す。まず、接触還元の触媒として最も一般的なパラジウム触媒を用いたが、2 重結合の還元だけにとどまらず、芳香環の塩素が還元されたものが主生成物として得られた(run1, 2)。この反応は 2 重結合の還元と塩素の還元の反応速度に差がほとんどなく、反応時間を短縮などによる反応のコントロールは不可能であった。

触媒として、酸化プラチナやロジウムアルミナを使用すると、若干脱塩素化を抑えることができたが、それでもなお、脱塩素体の生成比のほうが上回り、目的物の生成比は低かった(run 3, 4)。なお、酸化プラチナを用いた場合、回収した基質のすべてが E 体であることがわかり、その生成比は 32%と、基質の E 体の比率と同じであることから、この反応では Z 体のみが反応しており、Z 体のほうが反応速度が速いことが解った(run 3)。

**Table 6.** Catalytic Hydrogenation of the 2-Arylidenebutanolide *E,Z*-17



Run	catalyst	solvent	reaction period	product ratio (%) <sup>*</sup>			
				E-1	Z-1	18a <sup>*2</sup>	18b <sup>*2</sup>
1	5%Pd-C	CH <sub>3</sub> OH	1h	0	0	27	73
2	10%Pd(OH) <sub>2</sub> -C	CH <sub>3</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	3h	0	0	0	100
3	PtO <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	4h	32	0	26	42
4	5%Rh-alumina	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	3h	0	0	39	61
5	[(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>3</sub> RhCl]	benzene	2.5h	35	65	0	0

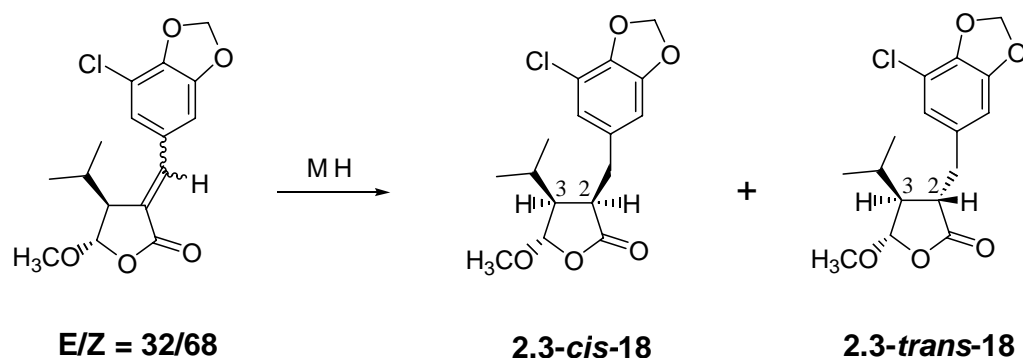
\* determined on the basis of NMR

<sup>\*2</sup> 2,3-trans isomer

次に金属水素化物による二重結合の還元を試みた(**Table 7**)。銅ヒドリドのクラスター<sup>20a,b)</sup>や図のような3種類のヒドロシラン<sup>21a-c)</sup>を用いた場合は、全く反応が進行せず、原料を回収した(run 1~4)。一方、lithium tri(*sec*-butyl)borohydride (商標 L-selectride) 還元<sup>22)</sup>では、還元物を定量的に得ることができたが、立体選択

性は全くなかった(run 5)。この反応は、プロトン化の際に生成物の立体が決定するので、シス体への立体選択性を高めるためには、*t*-ブチルアルコール以外のプロトン性溶媒を検討する必要があると思われる。

**Table 7.** Metal Hydride Reduction of the Alylidenebutanoliide **17**



run	reagent	solvent	condition	yield	<i>cis/trans</i> *
1	[Ph <sub>3</sub> P·CuH] <sub>6</sub>	benzene-H <sub>2</sub> O	rt, 2 h	0	–
2	PhSiH <sub>2</sub> , ZnCl <sub>2</sub> , Ph <sub>3</sub> P, Ph <sub>4</sub> Pd	CHCl <sub>3</sub>	rt, 2 days	0	–
3	Et <sub>3</sub> SiH, Et <sub>3</sub> B	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	rt, 1 day	0	–
4	(Me <sub>3</sub> Si) <sub>2</sub> SiH, Et <sub>3</sub> B	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	rt, 1 day	0	–
5	L-selectride®	<i>t</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> OH-THF	-78°C, 2h	100%	50/50

Ph = phenyl (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-), Et = ethyl (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>-), Me = methyl (CH<sub>3</sub>-)

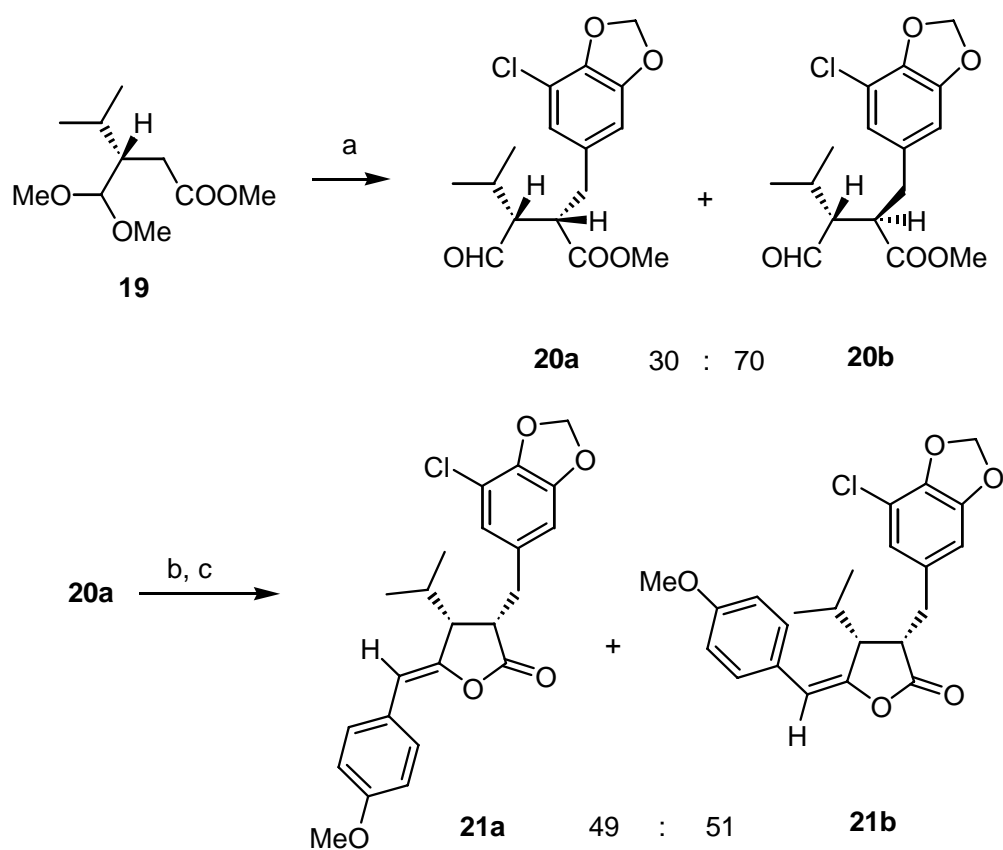
\* based on NMR

L-selectride = lithium tri(*sec*-butyl)borohydride [LiBH(*sec*-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>]

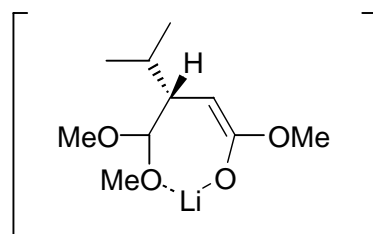
#### 5 – 4. Methyl 3-isopropyl-3-(dimethoxy)methylpropanoate (**19**)のアルキル化による合成

前述したように、ラクトン**4**の2位と3位の置換基がシスに配置する理由は環状系による立体制御を受けるためである(**Fig. 11**)。そこで、**4R-2**のメタノール分解 (cat. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MeOH, CH(OMe)<sub>3</sub>, reflux) により容易に得られる非環状化合物**19**をブロミド**3**とのアルキル化反応の基質として用いる方法を検討した(**Fig. 19**)。エステル**19**のアルキル化反応はやはり望みでないトランス体**20b**を優先的に与えたが (**20a:20b=30:70**)、これは、**19**のエノラートのメトキシ基酸素原子が

リチウム原子に分子内で配位した錯体を形成したため、エノレートのβ面（上面）での反応が優先したためと考えられる(**Fig. 20**)。従って、リチウム以外の金属の使用や配位力が強い **HMPA** 等の添加などにより、**20a** への選択性を高めることは十分可能であり今後の検討課題である。



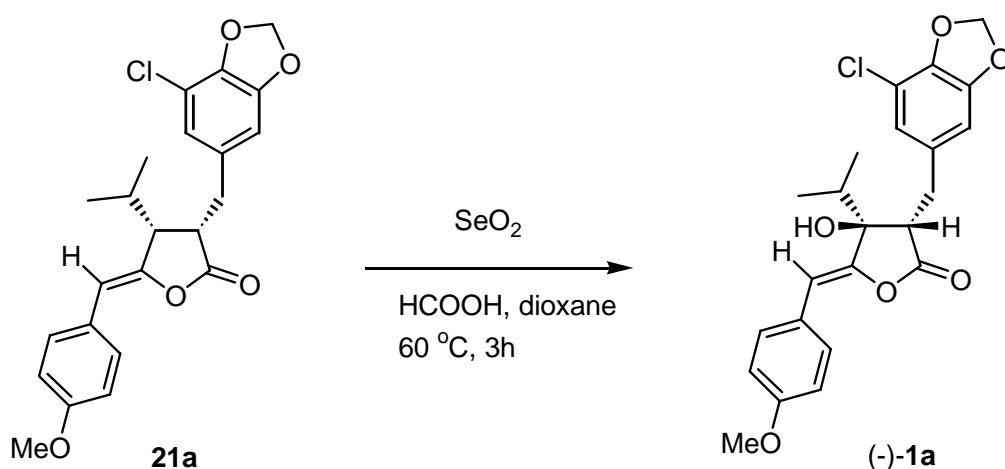
**Fig. 19.** reagents and conditions: (a) LDA, 3-chloro-4,5-methylenedioxybenzyl bromide (**3**), THF, -78 °C, 3h, then 10% aq. NH<sub>4</sub>Cl, 85%; (b) p-MeO(C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)CH<sub>2</sub>SePh, LDA, -78 °C, 1.5 h, 72%; (c) MCPBA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 2 h, 58%



**Fig. 20** Chirated lithium enolate

ここで得られたアルデヒド **20a** は、セレニド **14** 由来のカルバニオンの付加およびセレノキシドの脱離反応により、2,3-シス体のオレフィン **21** へと変換した。なお、この変換では、毒性が強いセレニドは1モル等量の使用で良く、ラクツール **13** に比べアルデヒド **20a** の方が基質として優れている。

最後に、シリカゲル TLC で分離した Z 体オレフィン **21a** の二酸化セレン酸化により非天然型(-)-シアノバクテリンを合成した(**Fig. 21**)。



**Fig. 21** Synthesis of (-)-Cyanobacterin by Allylic Oxidation of **21a**

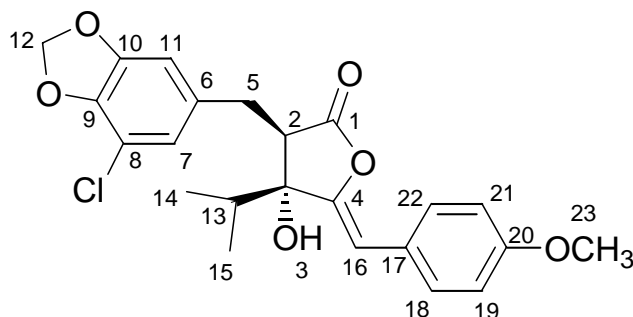
今後解決すべき課題として、エステル **19** のアルキル化反応の立体制御、および E 体オレフィン **21b** から Z 体への異性化反応が残されている。

### 5-5. 合成した 2R,3R-シアノバクテリンの解析

**Table 8** に今回合成したシアノバクテリン及び Mason 等によって単離された天然物の  $^1\text{H}$  NMR データを示している。イソプロピル基のメチルプロトン及びメトキシプロトンの共鳴値は両者とも完全に一致しており、その他のプロトンの共鳴値に関してもほぼ等しいので合成が間違いなく行われていることを確認し

た。また、比旋光度は $[\alpha]_D +67.2^\circ$  (c 0.25,  $\text{CHCl}_3$ )であり、天然物の値 $[\alpha]_D +102^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ )との比較により光学純度は 66%ee であった。光学純度の低下の理由は不明である。

**Table 8.**  $^1\text{H}$  NMR Spectral Data of Natural and Synthetic Cyanobacterin



	Natural (360MHz)	Synthetic (500MHz)
1		
2	2.90 (dd, J=13.00,5.42)	2.89 (dd, J=13.85,6.06)
3	1.83 - 1.94 [OH]	1.85 (s)
4		
5	3.10 - 3.20 (m)	3.10 - 3.18 (m)
6		
7	6.83 (d, J=1.63)	6.82 (d, J=1.60)
8		
9		
10		
11	6.78 (d, J=1.63)	6.77 (d, J=1.60)
12	6.03 (s)	6.02 (s)
13	2.19 (sep, J=6.68)	2.18 (qui, J=6.64)
14	0.90 (d, J=6.68)	0.91 (d, J=5.83)
15	1.09 (d, J=6.68)	1.09 (d, J=5.83)
16	5.72 (s)	5.71 (s)
17		
18,22	7.54 (d, J=9.03)	7.53 (d, J=8.80)
19,21	6.89 (d, J=9.03)	6.88 (d, J=8.80)
20		
23	3.82 (s)	3.82 (s)

s = singlet, d = doublet, t = triplet, qui = quintet, sep = septet, m = multiplet and coupling constants are in Hertz.

また、**Fig. 22** にシアノバクテリンの ESI-マススペクトル(postive ion)を示した。

$m/e$  412.98 に合成したシアノバクテリンの脱水物に相当するピーク ( $M-H_2O+H$ ) が観察された。

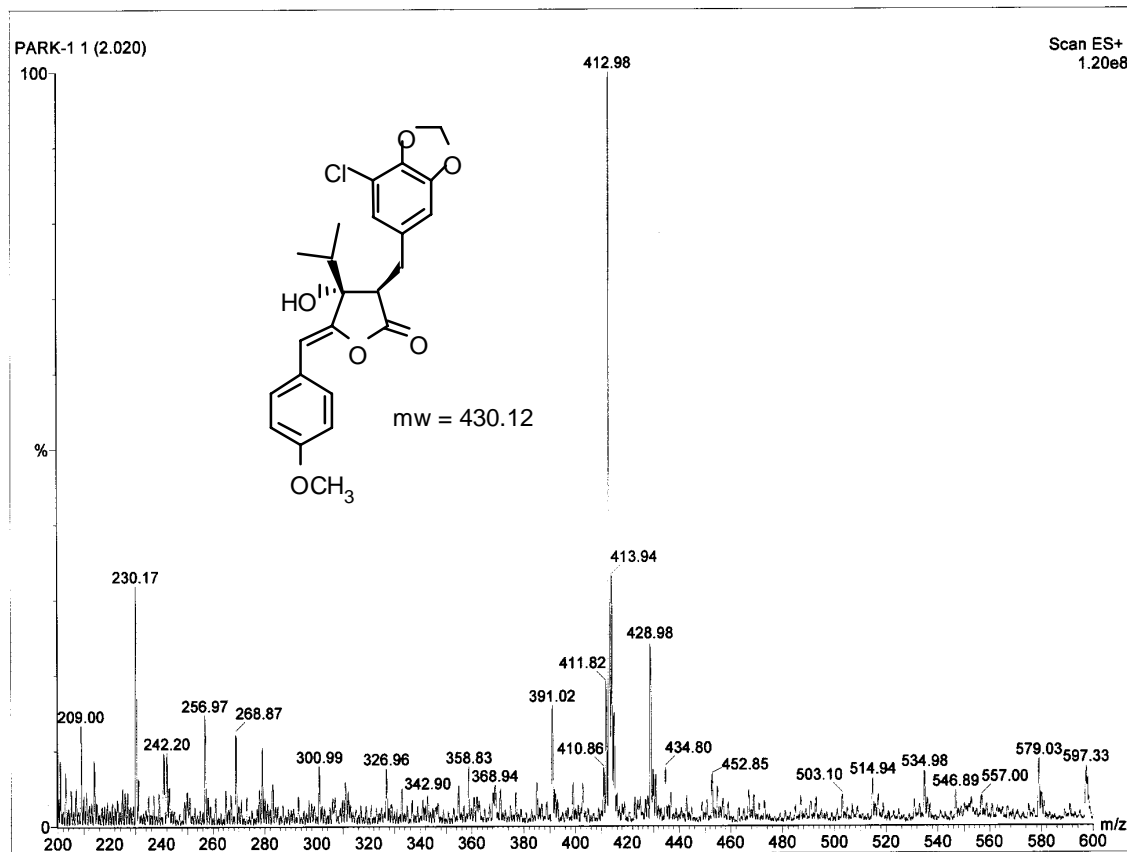


Fig. 22 ESI-Mass Spectrum of Cyanobacterin

## 6. シアノバクテリンとエピシアノバクテリンの生理活性

### 6-1. 陸上高等植物に対する活性

合成した(+)-シアノバクテリン(**1a**)、(+)-エピシアノバクテリン(**1b**)および合成中間体の所定濃度の 50%アセトン溶液を、ポットで栽培したイネに噴霧し、26 時間培養した後の植物の生育阻害を調べたが、顕著な活性を示す化合物は認められなかった (データは未公開)。酸素の発生量で求めた *in vitro* での光合成阻害

活性は高いことは知られているが、本化合物は *in vivo* での植物成長阻害活性は示さないことを示している。植物体内への透過性の低さ、あるいは薬物代謝を受けたことなどが主な原因と考えられる。

## 6-2. 海洋植物（藻類）に対する活性

### 6-2-1. 赤潮原因植物性プランクトンに対する毒性

(+)-シアノバクテリン(**1a**)および(+)-エピシアノバクテリン(**1b**)の4種の赤潮原因植物性プランクトンに対する殺藻活性試験の結果を **Table 9** に示す。なお、比較のため光合成阻害剤 DCMU の同条件での活性値を載せている。興味深いことに、シアノバクテリンのエピマー**1b** は、*Heterocapsa circularisquama* や *Chattonella marina* のような渦鞭毛藻に対してシアノバクテリンよりも高い活性を示し、*C. marina* においては DCMU の活性をしのいだ。また、ラフィド藻は、渦鞭毛藻に比べて光合成阻害剤に対する感受性が低いことが解った。

**Table 9.** Toxicity of cyanobacterin (**1a**) and its epimer (**1b**) to some red tide phytoplanktons at a dose of 10 µg/mL after 4 hrs, mortality (%) to control.

	(+)- <b>1a</b>	(+)- <b>1b</b>	DCMU
<i>Heterosigma akasiwo</i>	9	7	14
<i>Heterocapsa circularisquama</i>	30	45	63
<i>Chattonella marina</i>	64	97	84
<i>Alexandrium taylori</i>	-	-	-

Correct data could not be obtained for *Alexandrium taylori* since over 90% of the microorganisms was killed in the control experiment.

### 6-2-2. ヒラアオノリに対する殺藻活性および成長抑制活性

上述の化合物のヒラアオノリに対する生理活性の評価を次に行った。まずは殺藻活性を調べた。殺藻活性を検討する際、衰弱した藻体が着生基質からはがれ落ちてしまうと殺藻活性を正確に測定することができない。そこで、試料添加の前後で着生密度が変化していないかどうか確かめた。培養3日目の藻体お



よび培養 5 日目の藻体を用いて調べた結果、いずれについても試料添加前後で着生密度の差は認められなかった (Table 11, 12)。そこで各試料で処理した藻体をエリスロシン染色し、各試料の殺藻活性を検討した。その結果、DCMU も含め、どの試料で処理した藻体もエリスロシンには染まらなかった。よって、いずれの試料についても実験した条件下では殺藻活性は認められなかった。

**Table 10. ヒラアオノリの基質着生に対する効果 (1)**

培養 3 日目の藻体に試料を添加し、試料添加時と処理 2 日後の着生密度を比較した。

濃度 ( $\times 10^{-3}$ mg/ml)	残存率 (%)		
	DCMU	cyanobacterin	epicyanobacterin
5	104	107	97
1	99	101	86
0.2	91	95	87
0.04	87	99	83
0	98	-	-
(メタノール添加)			
0	94	-	-
(培養液のみ)			

**Table 11. ヒラアオノリの基質着生に対する効果 (2)**

培養 5 日目の藻体に試料を添加し、試料添加時と処理 1 日後の着生密度を比較した。

濃度 ( $\times 10^{-3}$ mg/ml)	残存率 (%)		
	DCMU	cyanobacterin	epicyanobacterin
5	96	103	117
1	81	114	106
0.2	76	113	92
0.04	74	97	97
0	95	-	-
(メタノール添加)			
0	90	-	-
(培養液のみ)			

殺藻活性が認められなくても、成長抑制活性を有している可能性はある。そこで、細胞数の増加を指標として各試料の成長抑制活性を比較した。培養 3 日目の藻体に試料を添加し、試料添加時および処理 2 日後に任意の 20 個体の細胞数を測定して平均を求め (Table 12, 図 1)、その値から成長速度を求めた。その結果、DCMU には成長抑制活性が認められ、実験区の中で最も希薄な  $4 \times 10^{-5}$

mg/ml 濃度でも、成長速度は対照区の 50%以下に抑制された (Table 12, 図 1)。一方、シアノバクテリンおよびエピシアノバクテリンには、ほとんど成長抑制活性が認められなかった (Table 12, 図 1)。

培養 5 日目の藻体を用いて同様の実験を行った。その結果、培養 3 日目の藻体を用いた場合と同様、DCMU には成長抑制活性が認められた。しかし、この場合、成長速度が対照区の 50%以下に抑制されたのは  $5 \times 10^{-5}$  mg/ml の実験区のみで、成長速度を対照区の 50%に抑制するためには約  $3 \times 10^{-5}$  mg/ml が必要と推定された (Table 13, 図 2)。シアノバクテリンにも成長抑制活性が認められた。しかし、濃度の最も高い実験区でも成長速度を対照区の 50%以下に抑制することはできなかった。エピシアノバクテリンには、この場合にもほとんど成長抑制活性が認められなかった。

**Table 12.** ヒラアオノリに対する成長抑制活性 (1)

培養 3 日目の藻体に試料を添加し、試料添加時および処理 2 日後に任意の 20 個体の細胞数を測定し、平均を求めた。各細胞数欄の ( ) 内はサンプル溶液を加えた直後の細胞数を示している。

濃度 ( $\times 10^{-3}$ mg/ml)	細胞数 (mean $\pm$ S.D.)		
	DCMU	cyanobacterin	epicyanobacterin
5	1.8 $\pm$ 0.4* (1.9 $\pm$ 0.4)	4.4 $\pm$ 1.0 (1.9 $\pm$ 0.5)	5.9 $\pm$ 1.6 (2.0 $\pm$ 0.6)
	**		
1	1.8 $\pm$ 0.6 (1.8 $\pm$ 0.4)	4.8 $\pm$ 1.4 (1.8 $\pm$ 0.4)	5.9 $\pm$ 1.7 (1.9 $\pm$ 0.6)
0.2	1.9 $\pm$ 0.4 (1.8 $\pm$ 0.5)	4.4 $\pm$ 1.4 (1.9 $\pm$ 0.5)	5.5 $\pm$ 1.7 (1.9 $\pm$ 0.6)
0.04	1.8 $\pm$ 0.6 (1.8 $\pm$ 0.5)	5.1 $\pm$ 1.5 (1.9 $\pm$ 0.4)	5.3 $\pm$ 1.8 (1.9 $\pm$ 0.5)
0 (メタノール添加)	5.2 $\pm$ 1.3 (1.7 $\pm$ 0.5)	-	-
0 (培養液のみ)	4.4 $\pm$ 1.0 (1.8 $\pm$ 0.4)	-	-

\* 処理 2 日後

\*\* 処理直前

**Table 13. ヒラアオノリに対する成長抑制活性（2）**

培養5日目の藻体に試料を添加し，試料添加時および処理1日後に任意の20個体の細胞数を測定し，平均を求めた。各細胞数欄の（ ）内はサンプル溶液を加えた直後の細胞数を示している。

濃度 ( $\times 10^{-3}$ mg/ml)	細胞数 (mean $\pm$ S.D.)		
	DCMU	cyanobacterin	epicyanobacterin
5	5.5 $\pm$ 1.6* (4.8 $\pm$ 1.4) **	8.1 $\pm$ 2.6 (6.5 $\pm$ 1.2)	9.8 $\pm$ 3.8 (5.2 $\pm$ 1.9)
1	7.3 $\pm$ 1.9 (5.3 $\pm$ 1.3)	9.0 $\pm$ 3.1 (5.3 $\pm$ 1.7)	9.8 $\pm$ 3.3 (5.2 $\pm$ 1.3)
0.2	8.1 $\pm$ 2.1 (4.9 $\pm$ 1.5)	8.8 $\pm$ 2.0 (5.3 $\pm$ 1.1)	10.2 $\pm$ 3.1 (5.6 $\pm$ 1.7)
0.04	8.9 $\pm$ 1.8 (5.1 $\pm$ 1.2)	9.1 $\pm$ 2.7 (5.4 $\pm$ 1.3)	10.1 $\pm$ 2.4 (5.1 $\pm$ 1.0)
0 (メタノール添加)	8.4 $\pm$ 2.2 (5.8 $\pm$ 2.0)	-	-
0 (培養液のみ)	8.6 $\pm$ 2.4 (5.3 $\pm$ 1.1)	-	-

\* 処理1日後

\*\* 処理直前

これらのアッセイの結果、シアノバクテリンにはDCMUほどではないが、ヒラアオノリに対する成長抑制活性を有するが、そのエピ体は全く活性を持たないことが解った。DCMUに対する比活性を求めるには、もっと高濃度の実験区を設定する必要がある。また、成長抑制活性はアッセイに用いる藻体の培養齢に影響されるため、DCMUに対する比活性を求める際には注意が必要である。

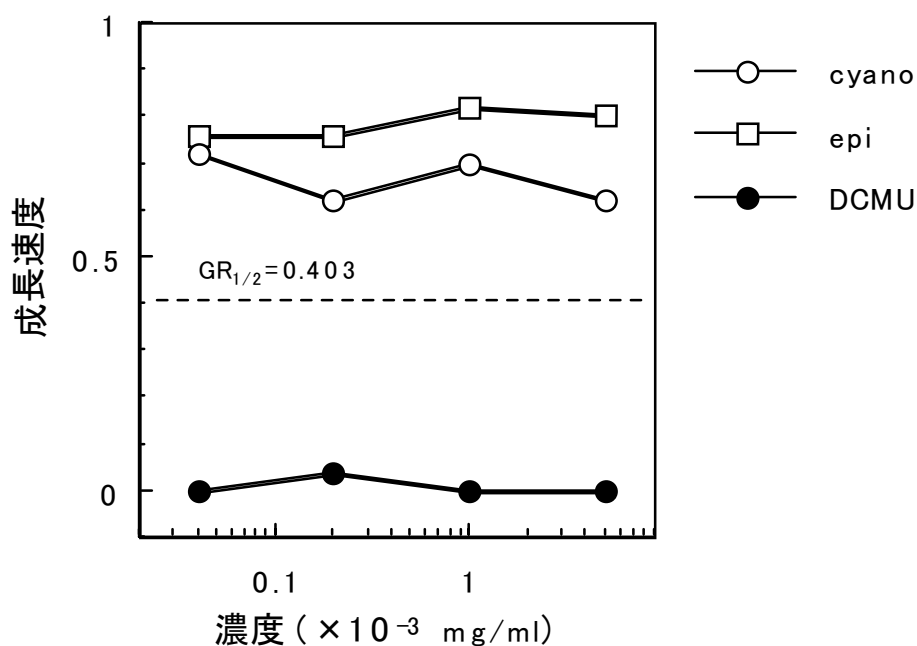


図1 ヒラアオノリに対する成長抑制活性(1)

培養3日目の藻体に各試料を添加した。試料添加時および添加2日後の個体あたり平均細胞数から成長速度を求めた。

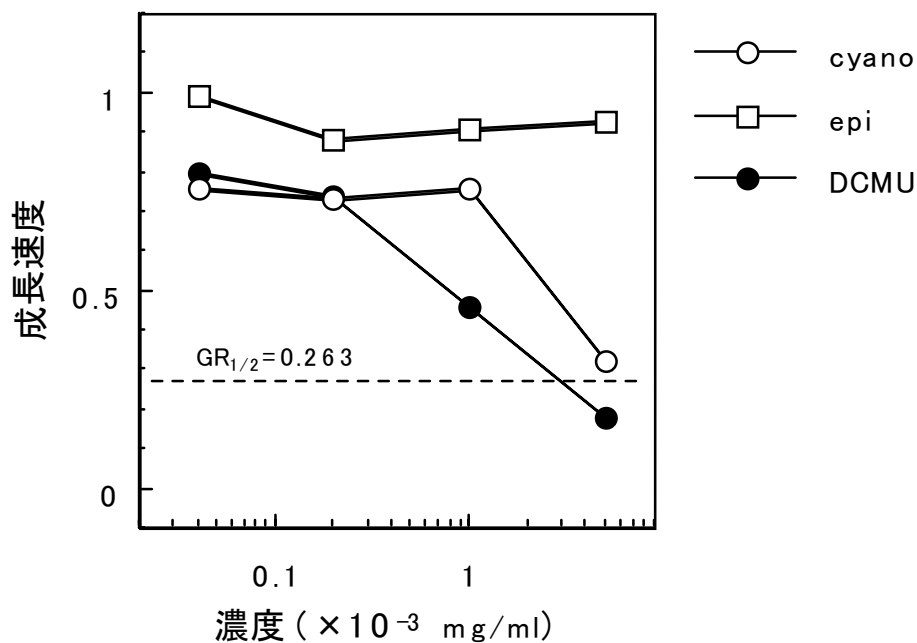


図2 ヒラアオノリに対する成長抑制活性(2)

培養5日目の藻体に各試料を添加した。試料添加時および添加1日後の個体あたり平均細胞数から成長速度を求めた。

## 7. 結論と考察

著者は、ブテノリド(**4R**)-**2** をキラルシントンとして用いる光学活性なシアノバクテリンの新規合成ルートの開発に成功した。本法の利点は、(1)合成原料の調製が容易なこと、(2)反応工程は全6段階であり簡便な合成法であること、(3)誘導体や鏡像異性体の合成にも適応可能であること等があげられるが、(1)最終段階の3位の水酸化反応の立体制御、(2)光学純度の向上、(3)*E*体オレフィン **5b** から望みの*Z*体への異性化、(4)個々の反応の収率の向上などが未解決であり、今後改善を要する。

生理活性試験においては、エピシアノバクテリンは、*Heterocapsa circularisquama* や *Chattonella marina* のような渦鞭毛藻に対して DCMU をしのぐ殺藻活性を示すのに対し、ヒラアオノリに対しては、殺藻活性、成長阻害活性ともにほとんど示さず、藻類の種間に高い選択性を示した。また、シアノバクテリンにも同様の傾向がみられた。従って、これらの化合物は高選択的な赤潮防除物質のリード化合物として期待できる。今後さらに構造改変を行うことにより、より高活性・高選択的な物質が見いだされる可能性が十分にあり、新しいタイプの赤潮防除技術への展開が期待される。

## 8. 実験の項

融点(mp)は柳本微量融点測定器で計測し、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, あるいは Gemini 500 核磁気共鳴装置を用い、テトラメチルシラン(TMS)を内部標準として測定した。質量分析(MS)スペクトルは JOEL Automass II 四重極質量分析装置(QMS)を用い測定した。旋光度は JASCO DIP-370 旋光計を用い測定した。

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ものをを用いた。他の溶媒は市販品をそのまま用いた。リチウムジイソプロピルアミド(LDA)は Aldrich Chemical 製 2M heptane-THF-ethylbenzene 溶液を用いた。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(TLC)には Merck TLC plate silica gel 60 F<sub>254</sub> (0.50 or 0.25 mm layer thickness)を用いた。

### 5-Hydroxy-2(5H)-furanone (8)

蒸留精製したフルフラール (30.0 g, 0.312 mol)とメタノール (300 ml) に溶かし光酸化装置で酸素気流下 11 時間光照射を行った。ローズベンガルは色が薄くなってきたら随時追加した。反応後溶媒を除去し、クロロホルムで再結晶を行い白色結晶 **8** を得た。収量 25.90 g (0.240 mol, 83%) mp 52.0 °C <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.03 (1H, br-s, OH), 6.22 (1H, s), 6.24 (1H, dd, J=2.0, 7.6 Hz), 7.32 (1H, dd, J=1.2, 5.6 Hz)

### (5R)-5-(*l*-Menthylloxy)-2(5H)-furanone (4R-2)

ラクトール **8** (10.00 g, 0.0999 mol)と (1R,2S,5R)-(-)-menthol をトルエンに溶かし触媒として *p*-TsOH を少量加え、水分離器を用い水分を除去しながら 7 時間加熱した。溶液を濃縮後、残渣を減圧蒸留し、得られた半結晶をさらにヘキサンで数回再結晶し白色結晶 **4R-2** を得た。収量 10.72 g (0.04500 mol, 45%)。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.80 (3H, d, J=6.9 Hz), 0.88 (3H, d, J=7.1 Hz), 0.95 (3H, d, J=6.6 Hz), 0.9-1.1 (4H, m), 1.3-1.5 (1H, m), 1.6-1.73 (2H, m), 2.03-2.19 (2H, m), 3.6-3.71 (1H, dt, J=4.2, 10.5 Hz), 6.08 (1H, s), 6.21 (1H, d, J=6.0 Hz), 7.18 (1H, d,

J=6.0 Hz)

*Anal.* Calcd. For C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub> : C, 70.56; H, 9.30. Found : C, 70.07; H, 9.11

#### 5-Methoxy-2(5H)-furanone (9)

メタノール (5 ml) に溶かしたラクツール **8** (1.09 g, 10.8 mmol) とオルトギ酸メチル (5 ml) に、パラトルエンスルホン酸 (少量) を加え室温で3時間かくはんした。トリエチルアミンを1滴加え反応を停止し、溶媒を留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル=3 : 1) で精製し目的物を無色液体として得た。収量 0.89 g (6.98 mmol, 65%) : <sup>1</sup>H NMR (200MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.59 (3H, s), 5.87 (1H, s), 6.25 (1H, dd, J=1.2, 5.7 Hz), 7.22 (1H, dd, J=1.2, 5.7 Hz)

*Anal.* Calcd. For C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub> : C, 52.63; H, 5.30. Found : C, 52.18; H, 5.46

#### 4-Isopropyl-5-methoxydihydro-2(3H)-furanone (10)

アルゴン気流下、Mg 粉末 (1.61 g, 37.5 mmol) の乾燥 THF 溶液 (70 ml) にイソプロピルブロミド (7.55 g, 61.3 mmol) の乾燥 THF 溶液を滴下し40分加熱環流を行いグリニャー試薬を調製した。この試薬に HMPA (18.4 ml, 105 mmol) 及び、CuBr · (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S (0.47 g, 2.3 mmol) を滴下し、さらに(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SiCl (9.50 ml, 87.6 mmol) 及び、**9** (5.00 g, 39.1 mmol) の乾燥 THF 溶液を-78°Cで滴下し、3時間かくはんした。トリエチルアミン (4.0 ml) を加え反応を停止し、有機層を分離してヘキサンで抽出し、水で洗った後、乾燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濃縮した。残留物を蒸留精製した (bp 63 °C/2 mmHg)。収量 4.84 g (30.61 mmol, 収率 78%) : <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.94 (6H, dd, J=6.5, 9.0 Hz), 1.73 (1H, sep, J=6.8 Hz), 2.08 – 2.20 (1H, m), 2.27 (1H, dd, J=5.5, 17.7 Hz), 2.71 (1H, dd, J=9.0, 18.0 Hz), 3.50 (3H, s), 5.16 (1H, s).

#### 4-Isopropyl-5-methoxy-(R)-3[3-chloro-(4,5-methylenedioxyphenyl)methyl]dihydro-2(3H)-furanone (11a)

アルゴン気流下-78°Cで乾燥 THF (10 ml) に溶かした **10** (1.43 g, 9.00 mmol) の溶液に 2M LDA 溶液を滴下し、1時間かくはんした。ピペロニルブロミド (2.69

g, 10.8 mmol) 及び HMPA の乾燥 THF 溶液 (10 ml) を滴下した。1 時間かくはん後、10% 塩化アンモニウム水溶液 (20 ml) を加え反応を停止し、酢酸エチルで 2 回抽出後、乾燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) した。溶媒を留去し、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、目的物を得た。収量 1.66 g (5.08 mmol, 56%) : <sup>1</sup>H NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.75-0.81 (6H, dd, J=6.5, 12.0 Hz), 1.63 (1H, m), 1.91-1.94 (1H, m), 2.52 (1H, qui, J=5.0 Hz), 2.80 (1H, d, J=5.5 Hz), 3.06 (1H, dd, J=10.0, 19.0 Hz), 3.51 (3H, s), 5.09 (1H, d, J=3.5 Hz), 6.01 (2H, s), 6.61 (1H, d, J=2.5 Hz), 6.68 (1H, d, J=2.5 Hz)

#### 4-Isopropyl-5-methoxy-(R)-3[3-chloro-(4,5-methylenedioxyphenyl)-methyl]dihydro-2(3H)-furanone (11a) のエピ化反応

アルゴン気流下 -78 °C で乾燥 THF (25 ml) に溶かした **11a** (1.50 g, 4.60 mmol) の溶液に 2M LDA 溶液を滴下し、30 分かかくはんした。2-メチル 2-プロパノール (10 等量) を溶解した乾燥 THF 溶液 (10 ml) を滴下し、10 分かかくはんした。10% 塩化アンモニウム水溶液 (20 ml) を加え反応を停止し、酢酸エチルで 2 回抽出後、乾燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) した。溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ベンゼン : 酢酸エチル = 50 : 1) で精製し、**11a** と **11b** の混合物を得た 収量 0.61g (**11a**:**11b**=89:11, NMR により)。

#### 4-Isopropyl-5-menthoxydihydro-2(3H)-furanone (12)

アルゴン気流下、Mg 粉末 (1.53 g, 63.6 mmol) の乾燥 THF (25 ml) けんだく液にイソプロピルブロミド (0.52 ml, 5.54 mmol) の乾燥 THF (25 ml) 溶液を滴下し 40 分加熱環流を行いグリニャー試薬を調製した。この試薬に HMPA (17.7 ml, 102 mmol) 及び、CuBr · (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S (0.44 g, 2.1 mmol) の THF 溶液 (3 ml) を滴下し、さらに (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SiCl (8.06 g, 63.6 mmol) 及び、**4R-2** (10.1 g, 42.4 mmol) の乾燥 THF 溶液 (30 ml) を -78°C で滴下し、3 時間かくはんした。10% 塩化アンモニウム水溶液 (10 ml) を加え反応を停止し、有機層を分離してヘキサンで抽出し、水で洗った後、乾燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濃縮した。濃縮物をカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 9 : 1 - 20 : 1) により精製し **12** を無色液体として得た。収量 4.09 g (14.48 mmol, 34%) : <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.76-0.96 (15H,



m), 0.77-1.30 (4H, m), 1.30-1.48 (1H, m), 1.59-1.83 (3H, m), 2.02-2.19 (3H, m), 2.27 (1H, dd, J=5.4, 17.8 Hz), 2.73 (1H, dd, J=8.8, 18.0 Hz), 3.52 (1H, dt, J=4.2, 10.5 Hz), 5.44 (1H, d, J=2.76 Hz).

#### **4-Isopropyl-5-menthoxy-3[3-chloro-(4,5-methylenedioxyphenyl)-methyl]dihydro-2(3H)-furanone (4a,4b)**

乾燥 THF (70 ml) に溶かした **12** (4.3347 g, 15.35 mmol) に、アルゴン気流下 -78 °C で 2M LDA 溶液 (10.00 ml, 20.00 mmol) を滴下した。1 時間攪拌した後、ブロミド **3** (4.2413 g, 17.00 mmol) の乾燥 THF 溶液 (40 ml) を滴下した。1 時間攪拌後、HMPA (5.30 ml, 30.00 mmol) を加え、さらに -78 °C で 1 時間攪拌した。10% 塩化アンモニウム水溶液 (100 ml) を加え反応を停止し、tert-ブチルメチルエーテルで 2 回抽出後、乾燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) した。溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:EtOAc=9:1) で精製し、**4a** と **4b** の混合物 (4.74 g, 10.53 mmol, 69%) を得た。これらは中圧液体クロマトグラフィー (column: Merck LiChroprep Si60, solvent: benzene:EtOAc=50:1) で分離可能であった (**4a**:**4b**=90:10)。

**4a**, <sup>1</sup>H NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.77-0.94 (15H, m), 0.93-1.00 (4H, m), 1.34-1.39 (1H, m), 1.61-1.69 (2H, m), 1.87-1.90 (1H, m), 1.98-2.04 (1H, m), 2.08-2.12 (1H, m), 2.52 (1H, qui, J=5.00), 2.84-2.89 (1H, m), 3.03 (1H, dd, J=5.5, 13.5), 3.51 (1H, dd, J=4.52, 10.53 Hz), 5.41 (1H, s), 6.02 (2H, s), 6.60 (1H, d, J=1.53 Hz), 6.67 (1H, d, J=1.53 Hz)

**4b**, <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.79-0.98 (15H, m), 0.93-1.29 (4H, m), 1.34-1.45 (1H, m), 1.65-1.72 (2H, m), 1.87-1.91 (1H, m), 1.99-2.05 (1H, m), 2.10-2.14 (1H, m), 2.56 (1H, m), 2.85-2.91 (1h, m), 3.07 (1H, dd, J=5.5, 13.5 Hz), 3.51 (1H, dd, J=4.52, 10.53 Hz), 5.41 (1H, s), 6.03 (2H, s), 6.58 (1H, d, J=1.53 Hz), 6.65 (1H, d, J=1.53 Hz).

#### **5-Hydroxy-4-isopropyl-3[3-chloro-(4,5-methylenedioxyphenyl)-methyl]dihydro-2(3H)-furanone (13)**

ラクトン **4a** (1.00 g, 2.38 mmol) の THF 溶液に 1 M 水酸化カリウム水溶液 (5 ml) とメタノール (30ml) の混合溶液を加え 3 時間放置した。濃塩酸を用い酸

性にし、ジクロロメタンで抽出し、有機層を水で洗浄し、抽出液を乾燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 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、**13** を油状物質として得た。収量 0.64 g (2.05 mmol, 86%) :  $^1\text{H NMR}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.82-0.87 (6H, m), 1.53-1.75 (1H, m), 1.85-1.97 (1H, m), 2.60 (1H, qui,  $J=4.4$  Hz), 2.88-2.95 (1H, m), 3.09 (1H, dd,  $J=5.2, 13.7$  Hz), 3.87 (1H, br-s, OH), 5.61 (1H, s), 6.04 (2H, s), 6.65 (1H, d,  $J=1.4$  Hz), 6.72 (1H, d,  $J=1.4$  Hz).

#### **1-Methyl-4-phenylselenomethylbenzene (14)**

ジフェニルジセレニド(2.50 g, 8.01 mmol)の乾燥 THF 溶液(15 ml)に、室温、窒素気流下、細かく切ったナトリウム(0.40 g, 18 mmol)を少量ずつ加えた。この反応混合物を 3 時間加熱還流した後、室温で一夜放置した。この時点でナトリウムは完全に消失し、ナトリウム塩の橙色の結晶が生成した。この混合物を 3 時間加熱還流した後、*p*-methoxybenzyl chloride (2.60 g, 16.0 mmol)および HMPA (3.07 mmol, 17.6 mmol)を加え、さらに 4.5 時間還流を続けた。水を加え反応を停止した後、ジクロロメタンで 2 回抽出し、有機層を乾燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : ジクロロメタン = 9 : 1 ~ 1 : 1) で精製し、セレニドを白色結晶として得た。収量 3.55 g (12.8 mmol, 80%) :  $^1\text{H NMR}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.78 (3H, s), 4.08 (2H, s), 6.78 (2H, d,  $J=8.5$  Hz), 7.13 (1H, d,  $J=8.5$  Hz), 7.22-7.30 (3H, m), 7.42-7.49 (2H, m).

#### **4-Isopropyl-5-[(4-methoxyphenyl)phenylselenomethyl]-3-[3-chloro-[(4,5-methylene dioxyphenyl)methyl]dihydro-2(3H)-furanone (15)**

セレニド **14** (1.30 g, 4.50 mmol) の乾燥 THF 溶液 (20 ml) に 2M LDA 溶液を  $-78^\circ\text{C}$  で滴下した後、1 時間かくはんした。さらに乾燥 THF (10 ml) に溶かした **13** (0.64 g, 2.1 mmol) を滴下し 1 時間かくはんした後、1M 塩酸溶液 (20 ml) を加えて反応を停止した。有機層を分離し、水層を酢酸エチルで抽出した後、乾燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、濃縮した。残渣をベンゼン (50 ml) に溶かし少量のパラトルエンスルホン酸を加え、30 分間加熱後濃縮した。残渣を 2 回シリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 5 : 1 その後トルエン) で精製し、**15** をジア

ステレオマー混合物として得た。これらは精製することなく次の反応に用いた。

#### 4-Isopropyl-5-[(4-methoxyphenyl)methylene]-3-[3-chloro(4,5-methylenedioxyphenyl)methyl]dihydro-2(3H)-furanone (5a, 5b)

粗 **15** のジクロロメタン溶液 (30 ml) に 30%過酸化水素水 (30 ml) を加え、かくはんしながら 0°C から室温まで 2 時間かけて昇温した。10%Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 水溶液 (30 ml) と 5%NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 (30 ml) の混合物を加え反応を停止し、有機層を分離した後、水層をジクロロメタンで抽出した。抽出液を乾燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濃縮後、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、**5** を *E* 体と *Z* 体の混合物として得た [0.27 g, 6.65 mmol, 32% overall yield from **13**, *E*:*Z*=42:58 (NMR により)]。この幾何異性体はシリカゲル薄層クロマトグラフィー (ベンゼン : 酢酸エチル = 50 : 1) で *E* 体と *Z* 体それぞれに分離可能であった。収量 0.27 g (0.65 mmol, 32%)。

**5a**: <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.78-0.88 (6H, m), 1.79-1.89 (1H, m), 2.70-2.79 (2H, m), 2.90-3.05 (1H, m), 3.12-3.25 (1H, m), 3.81 (3H, s), 5.42 (1H, s), 6.02 (2H, s), 6.59 (1H, d, J=1.44 Hz), 6.67 (1H, d, J=1.44 Hz), 6.85 (2H, d, J=2.01 Hz), 7.49 (2H, d, J=2.01 Hz).

**5b**: <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.71 (6H, dd, J=6.90, 22.62 Hz), 1.90-2.04 (1H, m), 2.75-2.77 (2H, m), 2.95-3.09 (1H, m), 3.16-3.27 (1H, m), 3.80 (3H, s), 6.01 (2H, s), 6.25 (1H, s), 6.65 (1H, d, J=1.59 Hz), 6.69 (1H, d, J=1.59 Hz), 6.87 (2H, d, J=0.85 Hz), 7.00 (2H, d, J=8.85 Hz).

#### 4-Hydroxy-4-isopropyl-5-[(4-methoxyphenyl)methylene]-3-[3-chloro-(4,5-methylenedioxyphenyl)methyl]dihydro-2(3H)-furanone (1a, 1b)

ラクトン **5** (59 mg, 0.142 mmol) および二酸化セレン (57 mg, 0.510 mmol) をジオキサン (15 ml) に溶かし、80°C で 1 時間加熱した。水を加え反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を水で洗い、乾燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) した。抽出液を濃縮後、残渣をシリカゲル薄層クロマトグラフィーで精製し、**1a** (3.0 mg, 0.0023 mmol, 5%) および **1b** (21.6 mg, 0.0523 mmol, 36%) を得た。

**1a**: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>27</sup> +67.2° (c 0.25, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.91 (3H, d, J=5.83

Hz), 1.09 (3H, d, J=5.83 Hz), 1.85 (1H, s), 2.18 (1H, qui, J=6.64 Hz), 2.89 (1H, dd, J=13.85, 6.06 Hz), 3.10 – 3.18 (2H, m), 3.82 (3H, s), 5.71 (1H, s), 6.02 (2H, s), 6.77 (1H, d, J=1.60 Hz), 6.82 (1H, d, J=1.60 Hz), 6.88 (2H, d, J=8.80 Hz), 7.53 (2H, d, J=8.80 Hz).

**1b**:  $[\alpha]_D^{27} -22.8^\circ$  (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.44 (6H, d, J=6.6 Hz), 1.95 (1H, s, OH), 2.00 (1H, m), 2.82-2.88 (2H, m), 3.10 (1H, m), 5.71 (1H, s), 5.96 (2H, d, J=1.2 Hz), 5.99 (2H, d, J=1.2 Hz), 6.69 (1H, d, J=1.5 Hz), 6.76 (1H, d, J=1.5 Hz), 6.88 (2H, d, J=8.7 Hz), 7.52 (2H, d, J=8.7 Hz).

#### **4-Isopropyl-5-methoxy-3[1-[3-chloro-(4,5-methylenedioxyphenyl)]-1hydroxymethyl]dihydro-2(3H)-furanone (16)**

ラクトン **10** (4.00 g, 0.02529 mol)の乾燥 THF (125 ml)溶液に、2M LDA 溶液 (15.00 ml, 0.0300 mol)を-78℃で滴下した。1時間攪拌した後、3-chloro-4,5-methylenedioxybenzaldehyde (4.20 g, 0.02276 mol)の THF (50 ml)溶液を滴下し、-78℃でさらに3時間攪拌した。10%NH<sub>4</sub>Cl 水溶液を加え反応を停止し、t-BuOMe で2回抽出した。抽出液を乾燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)後濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:EtOAc=3:1-2:1) で精製し、縮合物 **16** (7.07 g, 0.0206 mol, 91%)を得た。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.71 (3H, d, J=6.6 Hz), 0.74 (3H, d, J=6.9 Hz), 1.52 (1H, m), 1.57 (1H, s, OH), 1.88 (1H, m), 2.51 (1H, dd, J=9.0, 3.6 Hz), 3.53 (3H, s), 4.75 (1H, d, J=8.7 Hz), 5.12 (1H, d, J=1.5 Hz), 6.05 (2H, s), 6.83 (1H, d, J=1.5 Hz), 6.88 (1H, d, J=1.5 Hz).

#### **4-Isopropyl-5-methoxy-3[3-chloro-(4,5-methylenedioxyphenyl)benzylidene]dihydro-2(3H)-furanone (17)**

氷水で冷却したアルコール **17** (2.16 g, 6.30 mmol)およびトリエチルアミン (1.76 ml, 12.60 mmol)の乾燥ジクロロメタン(25 ml)溶液に、メシルクロリド(0.73 ml, 9.45 mmol)のジクロロメタン(5 ml)溶液を滴下した。室温で4時間攪拌した後、1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) (2.38 ml, 15.75 mmol)を加え、さらに20時間攪拌した。反応混合物をエーテルで希釈し、4M 塩酸(100 ml)、5%NaHCO<sub>3</sub> 水溶液で順次洗浄し、乾燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)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 (hexane:EtOAc=4:1) で精製し、脱水物 **17** (1.9145 g, 5.90 mmol, 94%) を幾何異性体の混合物として得た。NMR から求めた存在比は *Z-17*:*E-17*=68:32 であった。

**3*E*-4-Isopropyl-5-methoxy-3[3-chloro-(4,5-methylenedioxyphenyl)benzylidene]dihydro-2(3H)-furanone (*E-17*)**

オレフィン **17** の幾何異性体の混合物 (1.9145 g, 5.90 mmol)、チオフェノール (0.100 g, 0.91 mmol)、カリウム *tert*-ブトキシド (150 mg, 1.36 mmol) を乾燥メタノール (50 ml) と THF (35 ml) の混合溶媒に溶かし、室温で 20 時間攪拌した。酢酸 (1 ml) を加え反応を停止した後、減圧下約 2 / 3 容の溶媒を留去した。この溶液にメタノール (30 ml) を加え、析出した結晶を濾別し、*E*体のオレフィンを白色結晶として得た (1.1719 g)。さらに、濾液を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:EtOAc=5:1) で精製し、*E-17* (0.5617 g) を得た。合計 1.7336 g, 91%。  
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.82 (3H, d, J=6.9 Hz), 1.08 (3H, d, J=6.9 Hz), 2.13 (1H, m), 3.28 (1H, m), 3.53 (3H, s), 5.26 (1H, s), 6.11 (2H, s), 6.88 (1H, d, J=1.5 Hz), 7.04 (1H, d, J=1.2 Hz), 7.44 (1H, d, J=1.2 Hz).

**Methyl 2-(3-chloro-4,5-methylenedioxyphenyl)methyl-3-formyl-3-isopropylpropionate (**20a**, **20b**)**

エステル **19** (1.61 g, 7.88 mmol) の乾燥 THF (25 ml) 溶液に、2M LDA 溶液 (5.90 ml, 11.82 mmol) を -78°C で滴下した。30 分間攪拌した後、3-chloro-4,5-methylene—dioxybenzyl bromide (2.16 g, 8.67 mmol) の THF (10 ml) 溶液を滴下し、-78°C でさらに 3 時間攪拌した。10% NH<sub>4</sub>Cl 水溶液を加え反応を停止し、酢酸エチルで 2 回抽出した。抽出液を乾燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 後濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:EtOAc=5:1) で精製し、縮合物 **20a** (0.6463 g, 1.98 mmol, 25%) および **20b** (1.5341 g, 4.69 mmol, 60%) を得た。

**20a**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.95 (3H, d, J=6.9 Hz), 1.03 (3H, d, J=6.9 Hz), 2.17-2.28 (1H, m), 2.32 (1H, dd, J=16.3, 3.9 Hz), 2.73 (1H, dd, J=16.3, 9.6 Hz), 2.80-2.90 (1H, m), 3.32 (1H, m), 3.68 (3H, s), 6.02 (1H, s), 6.06 (1H, s), 6.62 (1H, s), 6.81 (1H, s), 9.77 (1H, s).

**20b:**  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.17 (3H, d,  $J=6.6$  Hz), 1.33 (3H, d,  $J=6.9$  Hz), 2.05-2.20 (1H, m), 2.82-2.92 (3H, m), 3.25-3.38 (1H, m), 3.80 (3H, s), 6.21 (2H, s), 6.76 (1H, s), 6.82 (1H, s), 10.02 (1H, d,  $J=2.7$  Hz).

## 赤潮原因植物性プランクトンに対する殺藻活性試験

### 植物性プランクトンの培養液

生理活性試験に用いるアカシオモの培養液には次の EV 培養液を用いた。海水 (800 ml)、蒸留水(200 ml)、soil extract (50 ml)の混合溶液に、 $\text{NaNO}_3$  (1 ml)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1 ml)、Vitamin  $\text{B}_{12}$  と thiamine の混合溶液(1 ml)を加えた。この溶液に、スターラーで攪拌下 NTA(100 mg) およびトリスアミノメタン(100 ml)を加え、1 M NaOH 水溶液で pH=8.0 に調整した。

この EV 培養液を 100 ml 丸底フラスコに分注し、オートクレーブ(120 °C, 2 気圧) で滅菌した。この培養液は、冷却の後一週間放置した後使用した。

### 植物性プランクトンの培養条件

上記 EV 培養液へ接種したアカシオモ(*Heterosigma akashiwo*)等の赤潮原因植物性プランクトンは、20 °C、明期 (光強度 37  $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}^{-1}$ ) 12 時間・暗期 12 時間の条件下で五日間培養し、生理活性試験に用いた。

### 植物性プランクトンに対する毒性試験

で、以下の方法に沿って行った。ただし精製度が高くなるとアカシオモが死にやすくなるため、その都度サンプル濃度は検討した。

上記培養液を海水で希釈し、細胞密度が 0.11 ~ 0.33  $\times 10^5$  cells/ml になるように調整 (Thoma 血球計算盤使用) した植物性プランクトン培養液を、IWAKI 製 26 穴 (直径 16 mm.) 平底マイクロプレート 1 well につき 1 ml ずつ分注し、所定濃度に調整したサンプルのメタノール溶液を、1 well あたり 2  $\mu\text{l}$  加えた。

2 時間ないし 4 時間培養（温度 20 °C、光強度 37  $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}^{-1}$ ）後、ランダムに 20 細胞を選び顕微鏡観測下（x 20）生細胞数と死細胞数を計測した。計測は 1 well につき 3 回行い平均化した。殺藻活性率は以下の式を用いて算出した。

$$\text{活性率(\%)} = [(\text{サンプル区の死細胞数}/20) - (\text{コントロールの死細胞数}/20)] \times 100$$

## ヒラアオノリに対する殺藻および成長抑制活性

### 培養株と培養法

材料として研究室に凍結保存してあるヒラアオノリ（MGEC-1 株）を用いた。藻体から放出させた配偶子を採取し、PES 培養液で希釈することで  $5 \times 10^3$  cells/ml の配偶子懸濁液を調整した。24 穴プレートの各穴に直径 12 mm の丸型カバーグラスを入れ、そこに配偶子懸濁液を 2.0 ml ずつ接種し、21°C、60  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ 、14 時間明期：10 時間暗期で培養した。

### 試料の希釈シリーズの調整

cyanobacterin, epicyanobacterin, DCMU とも、濃度 1 mg/ml のメタノール溶液を原液とし、メタノールで希釈することで 1/5 希釈シリーズを作成した。

### 殺藻活性試験

培養 3 日目または 5 日目の藻体に試料を 10  $\mu\text{l}$  ずつ添加した。培養 3 日目の藻体では 2 日後に、培養 5 日目の藻体では翌日に、藻体の生死判定を行うため藻体の着生したカバーグラスを 0.05% エリスロシン海水溶液に 20 分間浸し、その後顕微鏡下で観察した。

藻体が衰弱すると着生基質からはがれ落ちる可能性がある。そこで試料添加の前後でカバーグラス状の藻体密度に変化があるかどうか検討した。倒立顕微鏡を用いてカバーグラス中央を上端から下端まで観察し、視野に入ってくる全ての藻体を数えた。観察には倍率 20 倍の対物レンズと倍率 10 倍の接眼レンズを用いた。この場合、観察面積は  $10.6 \text{ mm}^2$  であった。

### 成長抑制活性試験

培養3日目または5日目の藻体に試料を10 $\mu$ lずつ添加し、試料添加の前後の個体あたりの細胞数を比較することで成長速度を比較した。いずれについても任意の20個体の細胞数を顕微鏡下で測定した。成長速度は以下の式から求めた。

$$r = \frac{\log_{10} \left( \frac{N_t}{N_0} \right)}{0.301 t}$$

この時、

r=成長速度（細胞分裂率）、

t=試料添加後の培養日数

N<sub>0</sub>=試料添加直前の個体あたりの平均細胞数、

N<sub>t</sub>=試料添加からt日後の個体あたりの平均細胞数、

である。



## 参考文献

- 1) C. P. Mason, R. H. Smith, and F. K. Gleason, *J. Phycol. Suppl.* **27** (1980).
- 2) C.P.Mason, K.R.Edwards, R.E. Carlson, J. Pignatello, F. K. Gleason, and J. M. Wood, *Science*, **215**, 400 (1982).
- 3) J. J. Pignatello, J. Porwoll, R. E. Carlson, A. Xavier, F. K. Gleason, and J. M. Wood. *J.Org. Chem.*, **48**, 4035 (1983).
- 4) Karl. S, T.Clark. H. Schaller, P. r. Schleyer. *J. Org. Chem.*, **49**, 735 (1984).
- 5) F. K. Gleason and J. L. Paulson. *Arch Microbiol.*, **138** : 273 (1984).
- 6) W.J. Thoma and F. K. Glason. *Biochemistry.* **26**, 2510 (1987).
- 7) Janet L. Carlson, T. A. Leaf and F. K. Gleason. *ACS. Symposium Series*, **355**, 141 (1987).
- 8) Jong. T.-T.; Williard, P. G.; Porwoll, J. P. *J. Org. Chem.*, **49**, 735 (1984).
- 9) B. L. Feringa, B. de Lange, J. F. G. A. Jansen, J. C. de Jong, M. Lubben, W. Faber, E. P. Schudde, *Pure & Appl. Chem.*, **64**, 1865 (1992).
- 10) J. C. de Jong, F. v. Bolhuis, B.L. Feringa. *Tetrahedron: Asymmetry.*, **12**, 1247 (1991).
- 11) J. H. Clark, H. L. Holland and J. M. Miller, *Tetrahedron Lett.*, **38**, 3361 (1976).
- 12) A. P. Bashzll and J. F. Collins, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 3489 (1975).
- 13) K. Heusler, J. Kebrle, C. Meystre, H. Ueberwasser, P. Wieland, G. Anner und A. Wettstein., *Helv. Chem. Acta*, **42**, 223 (1959).
- 14) Y. Horiguchi, S. Matsuzawa, E. Nakamura and I. Kuwajima., *Tetrahedron Lett.*, **27**, 34, 4025 (1986).
- 15) J. L. Luche and C. Allavena, *Tetrahedron Lett.*, **29**, 5369 (1988).
- 16) D. Liotta, P. B. Paty, J. Johnston and G. Zima., *Tetrahedron Letters*, 5091 (1978).
- 17) D. Liotta. W. Markiewicz and H. Santiesteban., *Tetrahedron Letters.*, 4365( 1977).
- 18) 実験化学講座、日本化学会編、第4版、20巻、pp 35.
- 19) J. March “*Advanced Organic Chemistry*” 4th Ed., Chap 14., pp 697-698.
- 20) (a) D. M. Brestensky and J. M. Stryker, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 5677 (1989); (b) W. S. Mahoney, D. M. Brestensky and J. M. Stryker, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 291 (1988).

- 21) (a) E. Keinan and N. Greenspoon, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 7314 (1986); (b) I. Ojima and T. Kogure, *Tetrahedron Lett.*, 5085 (1972); (c) T. Rosen and C. H. Heathcock, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 3731 (1985).
- 22) J. S. Swenton and P. W. Reynolds, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 6188 (1978).