

海洋シアノバクテリア由来ポリケチド-アミノ酸・
ペプチドハイブリッド化合物の構造と生物活性

2018 年度

澄本慎平

学位論文 博士（理学）

海洋シアノバクテリア由来ポリケチド-アミノ酸・
ペプチドハイブリッド化合物の構造と生物活性

2018 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

澄本慎平

目次

第1章 序論	1
第2章 糸状シアノバクテリア同定方法の確立	4
第1節 背景	4
第2節 同定方法の確立	6
第3章 Kanamienamide の構造と生物活性	7
第1節 海洋シアノバクテリアの採集と単離	7
第2節 Kanamienamide の単離	10
第3節 Kanamienamide の平面構造	11
第4節 Kanamienamide の絶対立体配置	14
第5節 Kanamienamide の生物活性	16
第6節 Kanamienamide 生合成遺伝子取得の試み	18
第7節 考察	20
第4章 Minnamide A の構造と生物活性	23
第1節 海洋シアノバクテリアの採集と単離	23
第2節 Minnamide A の単離	26
第3節 Minnamide A の平面構造	27
第4節 Minnamide A の絶対立体配置	33
第1項 天然物を用いた絶対立体配置の決定	33
第2項 合成による絶対立体配置の決定	40
第5節 Minnamide A の生物活性	50
第6節 考察	54
第5章 総括	57
第6章 実験方法	59
第1項 一般操作	59
第2項 Kanamienamide の構造と生物活性	61
第3項 Minnamide 類の構造と生物活性	74
参考文献	243
謝辞	247

略語表

ADC	antibody-drug conjugate
BAIB	bis(acetoxy)iodobenzene
BODIPY	boron-dipyrromethene
bp	base pair
CoA	coenzyme A
COSY	correlation spectroscopy
CDTA	cyclohexanediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid monohydrate
DDBJ	DNA data bank of Japan
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano- <i>p</i> -benzoquinone
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis
DMAP	<i>N,N</i> -dimethyl-4-aminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSA	dimercaptosuccinic acid
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	deoxynucleotide triphosphates
dsDNA	double-stranded deoxyribonucleic acid
E.COSY	exclusive correlation spectroscopy
EDTA	ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
EMBL	european molecular biology laboratory
ER	endoplasmic reticulum
Et ₂ O	diethyl ether
EtOAc	ethyl acetate
EtOH	ethanol
FDA	food and drug administration
FDLA	<i>N</i> ^α -(5-fluoro-2,4-dinitrophenyl)-L-leucinamide
gDNA	genomic deoxyribonucleic acid
HMBC	heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	heteronuclear multiple quantum correlation
HPLC	high performance liquid chromatography
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
¹ PrMgBr	isopropylmagnesium bromide

ITS	internal transcribed spacer
Leu	leucine
Me	methyl
MeCN	acetonitrile
MeMgBr	methylmagnesium bromide
MeOH	methanol
ML	maximum likelihood
MOM	methoxymethyl
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide
NMR	nuclear magnetic resonance
NOESY	nuclear Overhauser effect spectroscopy
NRPS	nonribosomal peptide synthetase
ODS	octadecylsilane
PCR	polymerase chain reaction
PKS	polyketide synthetase
PLC	preparative layer chromatography
PMB	<i>p</i> -methoxybenzyl
rDNA	ribosomal deoxyribonucleic acid
ROESY	rotating frame nuclear Overhauser effect spectroscopy rRNA ribosomal ribonucleic acid
TBAF	tetrabutylammonium fluoride
TBDPS	<i>tert</i> -butyldiphenylchlorosilane
<i>t</i> -BuLi	<i>tert</i> -butyllithium
TEMPO	2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl
THF	tetrahydrofuran
TOCSY	total correlation spectroscopy

第1章 序論

シアノバクテリアは酸素発生型光合成を行う原核生物である。シアノバクテリアが光合成能を獲得したのは25から26億年前と推定されている¹。地球上では23.3億年前に大気中の酸素が急増 (Great Oxygenation Event) したことが知られているが²、これは光合成を行うシアノバクテリアによるものと考えられている。現在、シアノバクテリアは1つの門を構成するほど多様な種が存在しており、自然界では海水や淡水、温泉、砂漠、南極、高塩分、強アルカリといった様々な環境に生育している。また、シアノバクテリアは抗腫瘍活性や殺細胞活性、抗菌活性、抗真菌活性、抗マalaria活性など多様な生物活性を示す二次代謝産物を生産することでも知られている^{3,4}。シアノバクテリアの生産する二次代謝産物のうち代表的な例として dolastatin 10 があげられる。Dolastatin 10 は抗腫瘍活性を示すペプチドであり、1987年に Pettit らによって海洋軟体動物タツナミガイ *Dolabella auricularia* から単離報告された⁵。同化合物は2001年に海洋シアノバクテリア *Symploca* sp. より単離され⁶、dolastatin 10 の真の生産者はシアノバクテリアであると考えられている。Dolastatin 10 は細胞骨格タンパク質チューブリンの重合を阻害することにより、G2/M期において細胞周期を停止させることが知られており^{7,8}、これにより腫瘍細胞の増殖を抑えると考えられている。臨床試験の結果、dolastatin 10 自体は Phase II で開発が止まってしまったが、その抗体薬物複合体 (ADC) として実用化された。ホジキンリンパ腫の細胞表面に存在するタンパク質 CD30 を標的とした抗体に、dolastatin 10 の類縁体である monomethyl auristatin E を結合させた ADC である brentuximab vedotin がホジキンリンパ腫の治療薬として研究が進められ、アメリカ食品医薬局 (FDA) に認可された⁹ (Figure 1-1)。

シアノバクテリアの生産する二次代謝産物が幅広い生物活性を示す要因の一つとして、その多様な化学構造があげられる。シアノバクテリアの生産する二次代謝産物の多くはペプチドやリポペプチド、ポリケチドであり、そのほとんどが非リボソーム型ペプチド合成酵素 (NRPS) とポリケチド合成酵素 (PKS) 及びそれらが複合した酵素 (NRPS/PKS) によって生合成されている^{4,10}。これら二次代謝産物の構造多様性はシアノバクテリア特有の修飾酵素と生合成遺伝子の gene shuffling によるものであることが Calteau らによって説明されている¹¹。現在までに様々な構造を持つシアノバクテリア由来の天然物が生合成

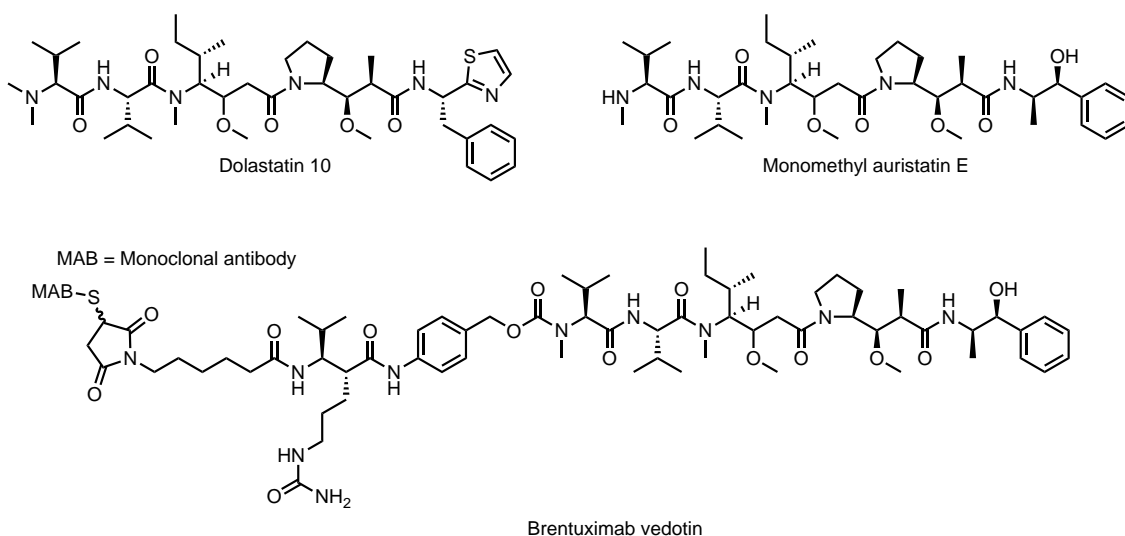


Figure 1-1. Dolastatin 10 とその誘導体

遺伝子とともに明らかとなっている (Figure 1-2)。Jamaicamide B に含まれる末端アルキンは生合成酵素に導入された末端アルケンが不飽和化酵素である JamB によりアルキンへ変換されることで生合成される¹²。また、apratoxin A に含まれる *t*-ブチル基は、アセチル-CoA が *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) によりメチル化されることで生合成されると考えられている¹³。Curacin A に含まれるシクロプロパンは、ER ドメインにより生成されたエノラートが求核置換し、塩素

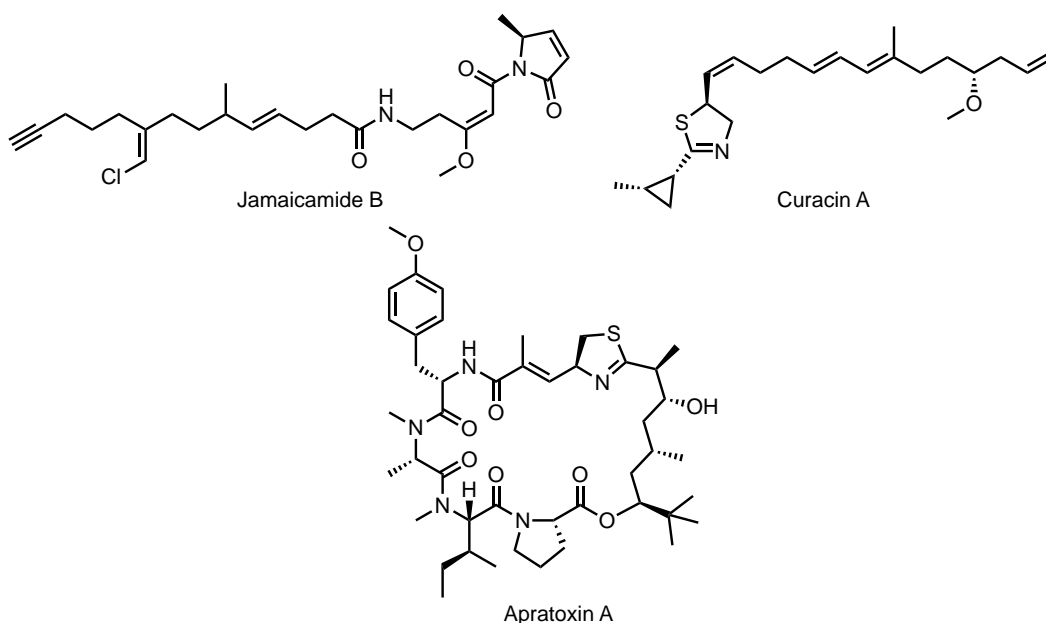


Figure 1-2. 生合成遺伝子が明らかとなっているシアノバクテリア由来天然物

原子が脱離することで生合成される¹⁴。実際に本研究室でも海洋シアノバクテリアから末端アルキンを有する kurahyne¹⁵ や jahanyne¹⁶、*t*-ブチル基を有する janadolide¹⁷、シクロプロパンを有する hoshinolactam¹⁸ が単離されている (Figure 1-3)。これらの天然物はその生物活性も興味深く、kurahyne はヒト子宮頸がん細胞由来の HeLa 細胞に対してアポトーシスを誘導すること及び小胞体に存在する Ca²⁺ポンプを阻害し、小胞体ストレスを誘導することが明らかにされている¹⁵。また、janadolide と hoshinolactam はヒト正常細胞である MRC-5 に対する毒性を示さずに抗トリパノソーマ活性を有する^{17,18}。

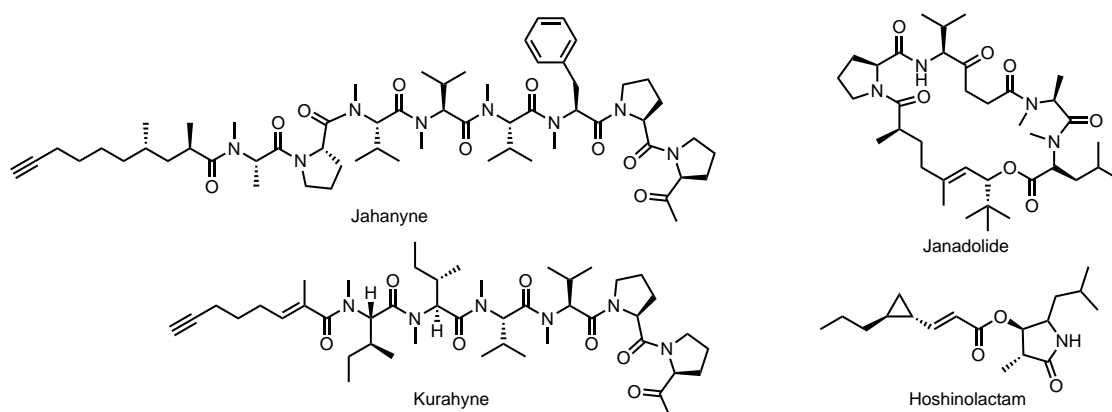


Figure 1-3. 本研究室で単離されたシアノバクテリア由来天然物

近年は遺伝子工学の分野が発展し、微生物に生合成遺伝子を導入して天然物を合成する技術が確立されてきている^{19,20}。さらに、特定の修飾酵素を欠損もしくは挿入したり生合成遺伝子のドメインを変換したりすることで非天然型の誘導体を合成する (コンビナトリアル生合成) 研究も行われてきている²¹⁻²³。実際に、このような技術は、比較的簡単な構造改変による大規模ライブラリー作成にも応用されており、創薬研究に役立っている²⁴⁻²⁷。現在の技術では複雑な構造改変を行うことは困難であるが、将来的には望みの化合物を意のままに生合成できることが期待されている。このためには様々な種類の生合成遺伝子情報の蓄積が必須であり、シアノバクテリアの生産する特異な修飾酵素を収集することが必要である。このため、シアノバクテリアから他に例を見ない構造の天然物を発見し、その生合成遺伝子を明らかにすることは重要な意味を持つ。

以上の理由で本研究はシアノバクテリアから特異な活性と構造を持つ天然物の単離を目的とした。

第2章 糸状シアノバクテリア同定方法の確立

第1節 背景

シアノバクテリアは、光合成色素としてフィコシアニンやフィコエリトリンを持ち、酸素発生型光合成を行うために藍藻とも呼ばれる。また、このような特徴から以前は植物の一種として認識されてきた。しかしながら 1977 年に行われた詳細な微細構造の観察によって真正細菌に属する生物であることが明らかとなった²⁸。このような背景から、シアノバクテリアの分類は国際細菌命名規約と国際藻類・菌類・植物命名規約の両方を適用することができるが、実際にはどちらか片方の命名規約を用いて未記載種の報告がなされている。これら二つの命名規約はその内容が大きく異なっており、国際細菌命名規約では培養株の保存と生物の化学的・遺伝学的な特徴が重視されるのに対し、国際植物命名規約では標本の保存と形態的特徴が重視される。現在までに記載されているシアノバクテリアの大部分は、植物として認識されていた時期に報告された。そのため、ほとんどのシアノバクテリアは国際植物命名規約に則り、形態的特徴により分類されている。このような背景から、現在報告されているシアノバクテリア種の大部分は、標本としてのスケッチが残されているのみで培養株が保存されておらず、遺伝子情報による分子系統学的研究も行われていない。近年の分子分類学の発展により、一部の分類群の単系統性が認められたが大部分のシアノバクテリアは多系統であることが判明し、従来の形態による分類と実際の系統関係が異なることが明らかとなった^{29,30}。このため、現在ではシアノバクテリアの分類と系統関係を明確にするため、形態学と系統解析を組み合わせた再分類を行い、整理が進められている³¹。シアノバクテリアの再分類には培養株を用いた形態観察と系統解析が必要となる。しかしながら、上述のように多くの記載種で培養株の保存がされていないため、再分類を行う際に問題となっている。このため現在のシアノバクテリアの分類は混乱している状態である。

シアノバクテリアは分類が混乱していることに加えて、系統解析で広く利用される 16S rRNA 遺伝子は、一般的に属を判別する程度の分解能しかないため、正確な種同定には形態観察と系統解析を組み合わせる必要がある。本研究で生物活性物質の探索源として用いている海洋シアノバクテリアは、その多くが培養困難であるため、種同定を行うためには環境サンプルから形態情報と遺伝情報の両方を得る必要がある。現在、環境サンプルから遺伝情報を取得する方法としては、クローニングと変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE) が一般的である。

これらの方法は、環境サンプルから得られた DNA 抽出物を PCR 増幅したのちに PCR 産物を分離・精製して解析するものである。このため、環境サンプル中に存在する生物相の理解には有用であるが、環境サンプル中に存在する特定のシアノバクテリアの種同定への適用には問題がある。以上の理由から、生物活性物質の生産者である海洋シアノバクテリアの正確な種同定を行うために新たな同定方法を確立することとした。

第2節 同定方法の確立

本研究で対象とする海洋シアノバクテリアは、細胞が一行に連なった糸状の細胞形態（糸状体）を示しており、複数の糸状体が互いに絡まりあってコロニーを形成している。糸状体の表面は多糖類で構成された鞘に覆われており、多数のバクテリアや他のシアノバクテリアが付着していることが多い（Figure 2-1）。このため、サンプル中に優占するシアノバクテリア種の単一の糸状体を顕微鏡下で分離して破碎することで粗 DNA 抽出物を作成し、これをテンプレートとして通常の PCR 法を行う（single filament PCR）ことで 16S rRNA 遺伝子を得ることとした。

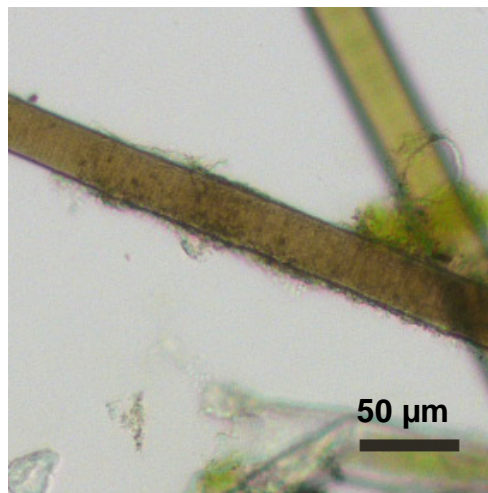


Fig.2-1. 環境サンプル中の海洋シアノバクテリア

Single filament PCR は以下の方法で行った。糸状体を鞘から取り除くために 0.1% (w/v) *N*-ラウロイルサルコシナトリウム（界面活性剤）海水溶液で処理し、顕微鏡下でピペット洗浄法³²により単糸状体を単離した。単離した単糸状体を顕微鏡下で破碎し、DNA 粗抽出物を作成した。得られた DNA 粗抽出物をテンプレートとして PCR を行い、得られた 16S rDNA 配列の系統解析を行った。さらに、形態観察による結果を組み合わせることで海洋シアノバクテリアの種同定を行った。

第3章 Kanamienamide の構造と生物活性

第1節 海洋シアノバクテリアの採集と単離

採集は2014年6月に鹿児島県徳之島の金見崎にて行った (Figure 3-1)。干潮の時間帯に潮間帯を徒歩で移動しながら同一な特徴を持つコロニーを複数採集した。

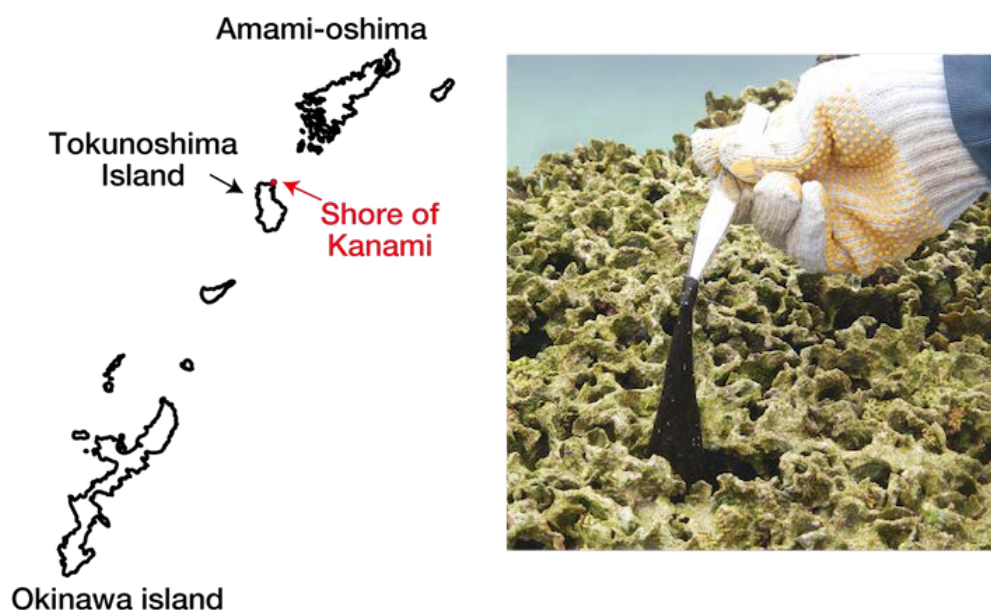


Figure 3-1. 海洋シアノバクテリアの採集 (sample no. 1406-23)

採集した海洋シアノバクテリア (sample no. 1406-23) は冷凍して研究室に持ち帰った。種同定に用いる海洋シアノバクテリアサンプルは、採集時に RNAlater® (Qiagen, Germany) で固定した。固定したサンプルは室温で研究室に持ち帰り、-30 °C で保存した。

保存した固定サンプルを用いて single filament PCR を行った。得られた 16S rDNA は最尤(ML)法とベイズ法を用いて系統解析を行った。系統解析の結果、海洋シアノバクテリア 1406-23 は *Moorea* 属とともにクレードを形成した (Figure 3-2)。細胞は幅 $31.2 \pm 1.9 \mu\text{m}$ 、長さ $5.5 \pm 1.3 \mu\text{m}$ であり (Figure 3-3 A)、コロニーは赤みがかった黒色の蜘蛛の巣状のマットで周辺のサンゴに付着していた (Figure 3-3 B)。また、コロニーはテッポウエビの巣として利用されていた。系統解析と形態的特徴の結果から、採集した海洋シアノバクテリア 1406-23 は *Moorea bouillonii* と同定した。

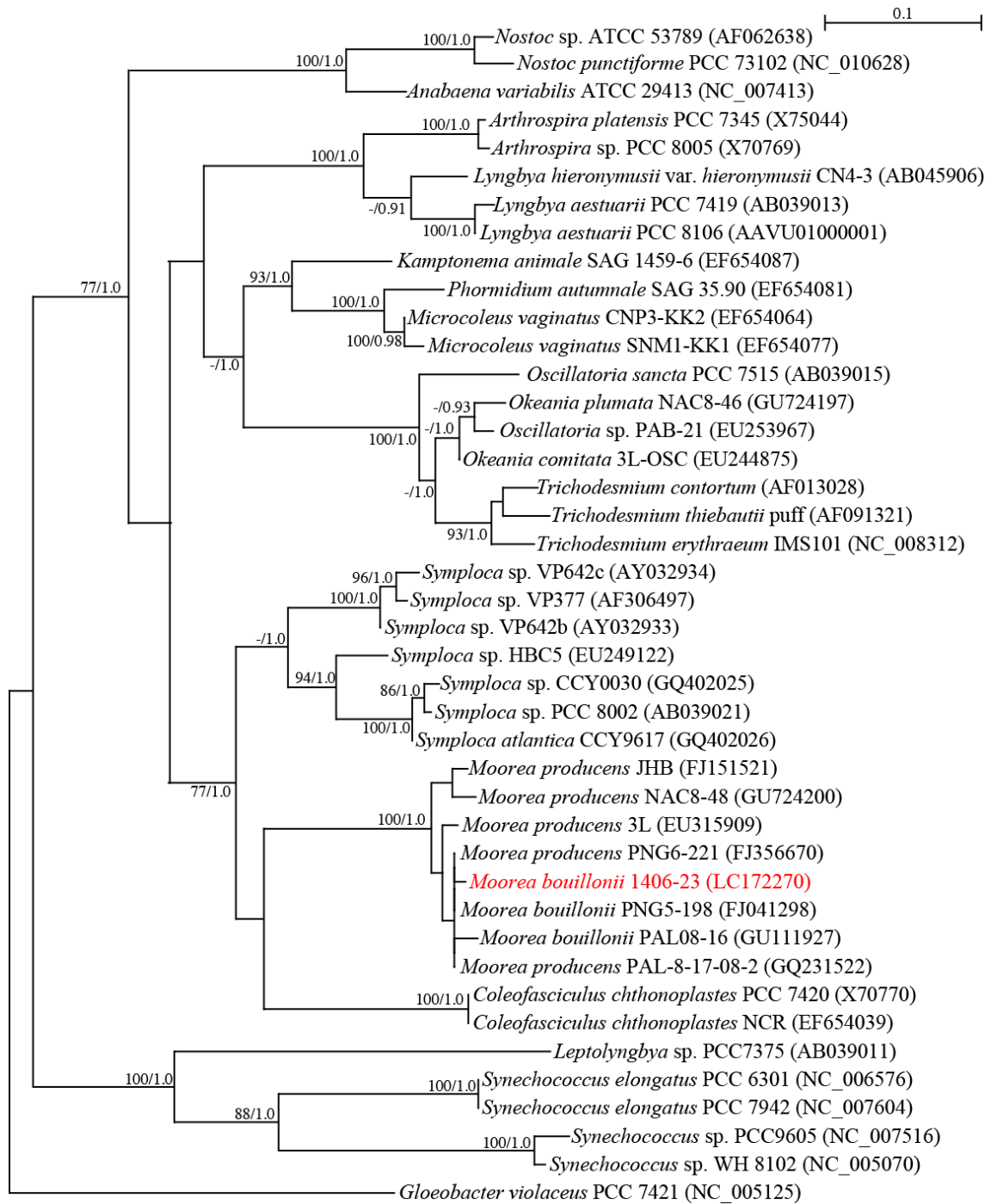


Figure 3-2. ML 法により 16S rDNA から作成した系統樹。アウトグループには *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 を用いた。Node に示した数値はブートストラップ値 (70%以下は示していない) と事後確立 (0.9 以下は示していない) で ML/Bayes 法により算出した。

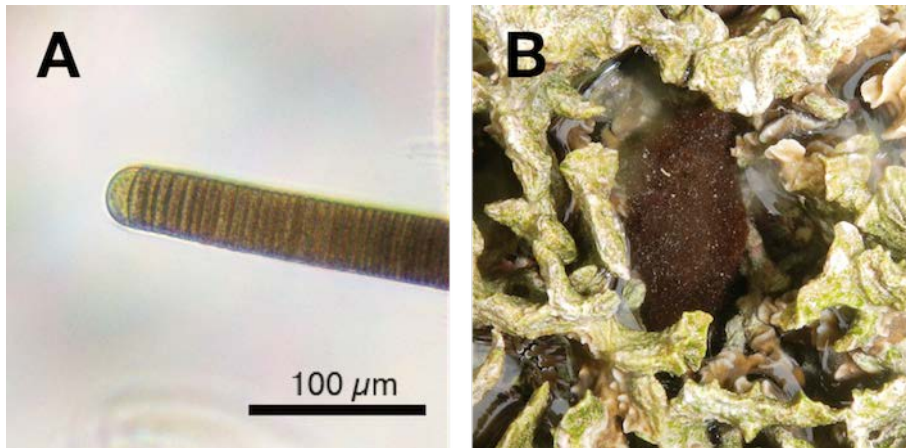


Figure 3-3. *Moorea bouillonii* 1406-23 の形態写真: (A) 光学顕微鏡による観察、(B) 採集時のコロニーの特徴

第2節 Kanamienamide の単離

採集した *Moorea bouillonii* 1.0 kg (湿重量) を MeOH による抽出と濾過後、濾液を減圧下で濃縮した(Figure 3-4)。得られた MeOH 抽出物を EtOAc と水で分配した。EtOAc 層を減圧濃縮し、90% MeOH 水溶液とヘキサンにて分配した。HeLa 細胞 (ヒト子宮頸がん細胞) に対する増殖阻害活性を指標にして、得られた 90% MeOH 水溶液層を ODS シリカゲルカラムクロマトグラフィーと HPLC によって精製した。その結果、HeLa 細胞に対して増殖阻害活性を示す kanamienamide (1) 9.2 mg を無色油状物として得た。

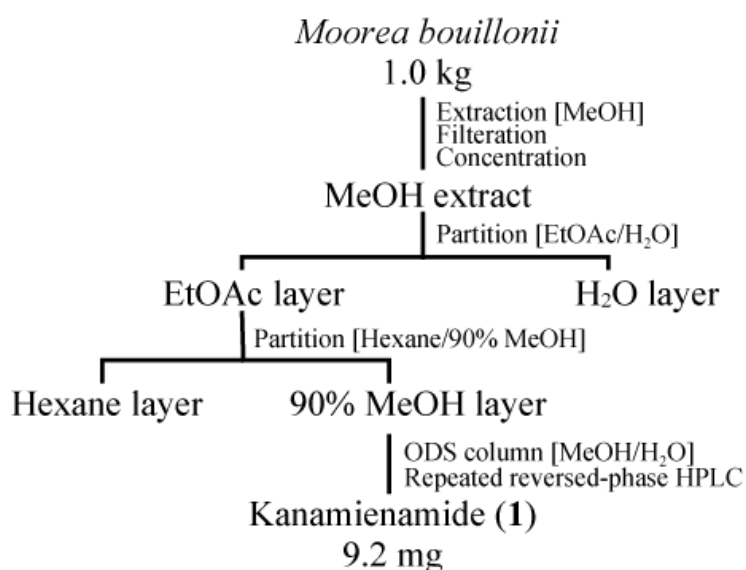


Figure 3-4. Kanamienamide (1)の分離精製

第3節 Kanamienamide の平面構造

高分解能質量スペクトルの結果から kanamienamide の分子式を $C_{28}H_{48}N_2O_5$ と決定した (m/z 493.3622, calcd for $C_{28}H_{49}N_2O_5$ $[M+H]^+$ 493.3641)。 1H NMR スペクトルにより kanamienamide (**1**) は炭素に結合した第一級メチルが1つ (δ_H 1.32) と第二級メチルが4つ (δ_H 1.04, 0.91, 0.76, 0.74)、窒素に結合したメチルが2つ (δ_H 3.02, 2.81)、酸素に結合したメチルが1つ (δ_H 3.14) 存在することが示された。さらに、アミノ酸の α 位のメチン水素 (δ_H 4.40) とオレフィン (δ_H 5.92, 5.21, 4.88) に相当するシグナルが観測された (Figure 3-5)。

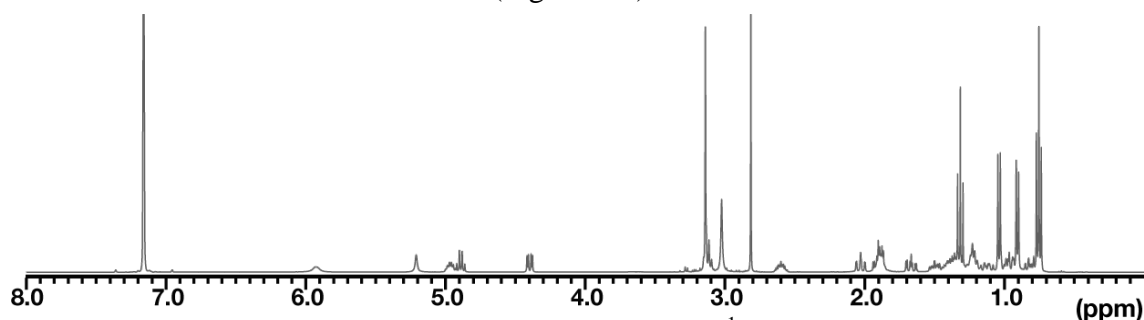


Figure 3-5. Kanamienamide (**1**) の 1H NMR

Kanamienamide (**1**) の部分構造は 1D NMR と 2D NMR によって決定した (Figure 3-6)。COSY スペクトルにより得られた相関により C'2 から C'6 までの炭素-炭素結合が確認され [H-2' (δ_H 4.40)-H-3a' and b' (δ_H 1.90 and 1.67)-H-4' (δ_H 1.36)-H-5' and 6' (δ_H 0.74 and 0.76)]、HMBC にて確認された2つの相関 [H-7' (δ_H 2.81)/C2' (δ_C 58.4) and H-2' (δ_H 4.40)/C1' (δ_C 172.7)] と組み合わせることで *N*-Me-Leu の存在が明らかとなった。もう一方の *N*-Me 水素 (H-20, δ_H 3.02) から、アミドカルボニル (C13, δ_C 166.6) とオレフィン炭素 (C12, δ_C 131.0) に対して HMBC 相関が見られ、*N*-Me エナミドの存在が明らかとなった。さらに、COSY の相関により第一級メチルが低磁場のメチレン (δ_H 3.12) に結合することが判明し、HMBC による相関 [H-17 (δ_H 1.32)/C15 (δ_C 174.7), H-21 (δ_H 3.14)/C15 (δ_C 174.7), and H-14 (δ_H 5.21)/C15 (δ_C 174.7)] からメチルエノールエーテルの存在が明らかとなった。さらなる 1H NMR、 ^{13}C NMR、COSY、HMQC、HMBC スペクトルの相関により *N*-Me-Leu、7-hydroxy-2,4-dimethyl-12-(methylamino)-dodec-11-enoic acid、3-methoxy-2-pentenoic acid の3つの部分構造により構成されることが判明した。C11-C12 と C14-C15 の2つのオレフィン は NOESY の相関 (H-11/H-12, H-14/H-21) によりそれぞれ *Z* 体と *E* 体であると決定した。H-11/H-12 の結合定数 (7.5 Hz) によっても C11-C12 間のオレフィンが *Z* 体であることが支持された。なお、

H-12 は非常にブロードなシグナルとして観測された。C12—C13 位間に存在するアミド結合の回転が制限されていることに由来すると考えられる。

それぞれの部分構造の連結は HMBC と NOESY によって決定した (Figure 3-6 and Table 3-1)。3つの HMBC による相関 (H-7'/C1、H-18/C1、H-7/C1') から 11 員環構造が決定された。H-7 位の化学シフト (δ 4.96) からも、C7 に結合する酸素原子がアシル化されていることが推定され、11 員環構造を支持した。さらに 2 つの HMBC による相関 (H-20/C-12、H-20/C-13) と NOESY による相関 (H-12/H-14) から、kanamienamide (1)の平面構造を Figure 3-6 に示す通りに決定した。

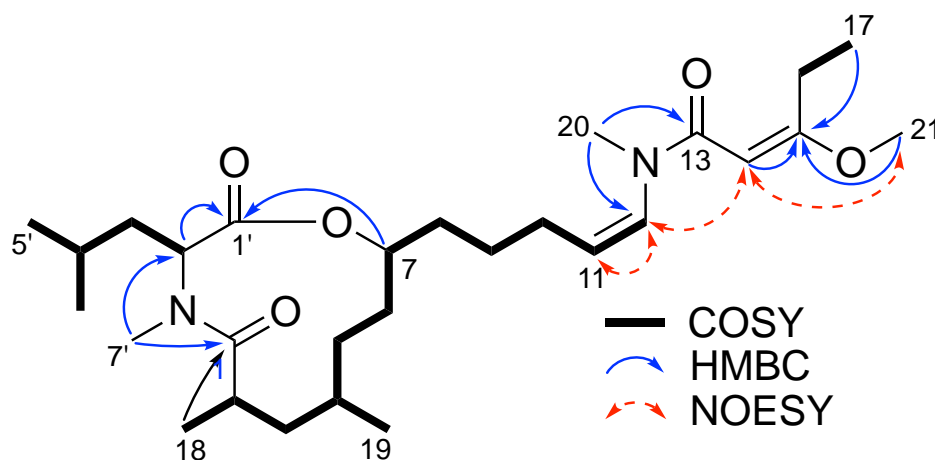


Figure 3-6. Kanamienamide (1)の平面構造

Table3-1. Kanamienamide (**1**)の NMR スペクトルデータ (溶媒: C₆D₆)

position	δ_C^a	δ_H^b (J in Hz)	COSY	HMBC (H→C)	selected NOESY
1'	172.7, C				
2'	58.4, CH	4.40, dd (4.2, 11.6)	3a, 3b	1', 3', 7'	2
3a'	38.5, CH ₂	1.90, ddd (4.2, 10.9, 14.8)	2', 3b', 4'		
3b'		1.67, ddd (3.6, 11.6, 14.8)	2', 3a', 4'	2', 5'	
4'	24.7, CH	1.36, m	3a', 3b', 5', 6'		
5'	20.8, CH ₃	0.74, d (6.9)	4'	3', 4', 6'	
6'	23.3, CH ₃	0.76, d (7.1)	4'	3', 4', 5'	
7'	28.7, CH ₃	2.81, s		2', 1	
1	177.8, C				
2	33.7, CH	2.60, dqd (3.1, 6.8, 11.6)	3a, 3b, 18		2', 5a
3a	43.6, CH ₂	2.03, ddd (1.9, 11.6, 13.2)	2, 3b, 4	2, 4, 18, 19	18, 19
3b		0.94, ddd (3.1, 11.1, 13.2)	2, 3a, 4	1, 19	
4	34.6, CH	1.36, m	3a, 3b, 5a, 5b,		6b
5a	30.8, CH ₂	0.99, dddd (1.4, 2.1, 9.0, 14.5)	4, 5b, 6a, 6b	6, 7	2, 7
5b		0.80, dddd (1.0, 9.5, 10.4, 14.5)	4, 5a, 6a, 6b	6, 7	
6a	31.8, CH ₂	1.49, dddd (1.4, 5.2, 9.5, 14.6)	5a, 5b, 6b, 7	4	8b
6b		1.13, dddd (1.0, 9.0, 10.8, 14.6)	5a, 5b, 6a, 7	5, 7	4
7	76.8, CH	4.96, dddd (5.2, 6.9, 10.8, 12.0)	6a, 6b, 8a, 8b	1'	5a
8a	35.4, CH ₂	1.39, m	7, 8a, 9		
8b		1.24, m	7, 8b, 9		6a
9	25.0, CH ₂	1.20, m	8a, 8b, 10		
10	27.1, CH ₂	1.87, m	9, 11		
11	125.9, CH	4.88, td (7.5, 7.5)	10, 12	9, 10, 12	12
12	131.0, CH	5.92, m	11		11, 14
13	166.6, C				
14	91.4, CH	5.21, s		15, 16	12, 21
15	174.7, C				
16	25.9, CH ₂	3.12, q (7.6)	17	14, 15, 17	
17	12.6, CH ₃	1.32, t (7.6)	16	15, 16	
18	19.1, CH ₃	1.04, d (6.8)	2	1, 2, 3	3a
19	22.6, CH ₃	0.91, d (6.6)	4	3, 4, 5	3a
20	34.9, CH ₃	3.02, s		12, 13	
21	54.5, CH ₃	3.14, s		15	14

第4節 Kanamienamideの絶対立体配置

Kanamienamide (1)の相対立体配置はNOESYと結合定数を解析することで決定した (Figure 3-7)。 ^1H - ^1H 結合定数は ^1H NMR、 J -resolved、E.COSYスペクトル解析によって決定した。観測されたNOESY相関 (H-2'/H-2、H-2/H-5a、H-5a/H-7)により4つのプロトン (H-2'、H-2、H-5a、H-7)が同じ方向に配置 (α 配置)していることが明らかとなった。大きな結合定数 ($J_{\text{H6b-H7}} = 10.8$ Hz、 $J_{\text{H7-H8b}} = 12.0$ Hz)とNOESYの相関 (H-6a/H-8a)からH-6bとH-7、H-7とH-8bがそれぞれantiの向きに位置することが明らかとなった。また、4

つの結合定数 ($J_{\text{H5a-H6a}} = 1.4$ Hz、 $J_{\text{H5a-H6b}} = 9.0$ Hz、 $J_{\text{H5b-H6a}} = 9.5$ Hz、 $J_{\text{H5b-H6b}} = 1.0$ Hz)とNOESY相関 (H-4/H-6b、H-5a/H-7、H-5b/H-6a)からH-5bとH-6aがシンペリプラナーであると決定した。大きな結合定数 ($J_{\text{H2-H3a}} = 11.6$ Hz、 $J_{\text{H3b-H4}} = 11.1$ Hz、 $J_{\text{H4-H5b}} = 10.4$ Hz)とNOESY相関 (H-2/H-5a、H-3a/H-18、H-3a/H-19)によりH-5a/Me-4、H-5b/H-4、H-4/H-3bが互いに反する向きに位置することが明らかとなった。これらのデータからH-2、H-3a、H-5a、H-6b、H-7がアキシカルに位置することが明らかとなった。以上の解析結果からkanamienamide (1)の相対立体配置を $2'S^*$ 、 $3R^*$ 、 $4S^*$ 、 $7S^*$ であると決定した (Figure 3-7)。

Kanamienamide (1)の絶対立体配置を決定するために*N*-Me-Leu残基の立体化学を決定した。Kanamienamide (1)を6 M HCl中、60 °Cで3時間攪拌することで酸加水分解物を調製した。酸加水分解物を逆相HPLCにて精製し、*N*-Me-Leuを得た。キラルカラムを用いてkanamienamide (1)由来の*N*-Me-Leuを標品とその保持時間を比較した。その結果、kanamienamide (1)由来の*N*-Me-LeuはL体の標品と一致を示した (t_R : 19.6 min)がD体のものとは一致しなかった (t_R : 11.4 min)

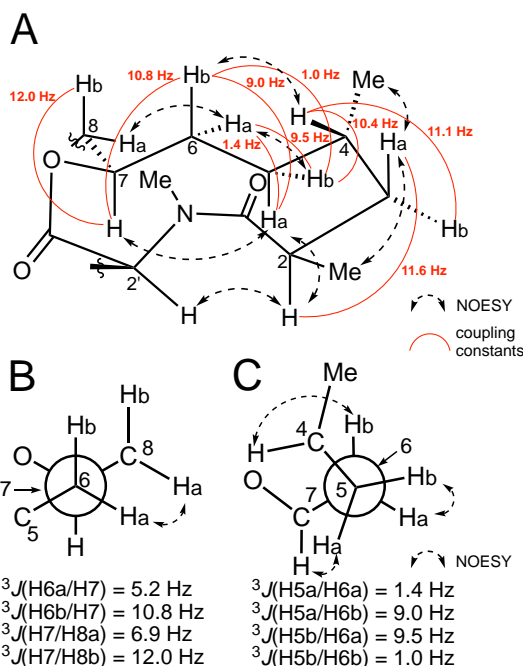


Figure 3-7. (A) Kanamienamide (1)の相対立体配置、(B) C5-C6部分のNOESYスペクトルの相関および結合定数、(C) C4-C7部分のNOESYスペクトルの相関および結合定数。

(Figure 3-8)。このことからkanamienamide (1)中の*N*-Me-LeuはL体であると決定した。以上の結果からkanamienamide (1)の絶対立体配置をFigure 3-9に示す通りに決定した。

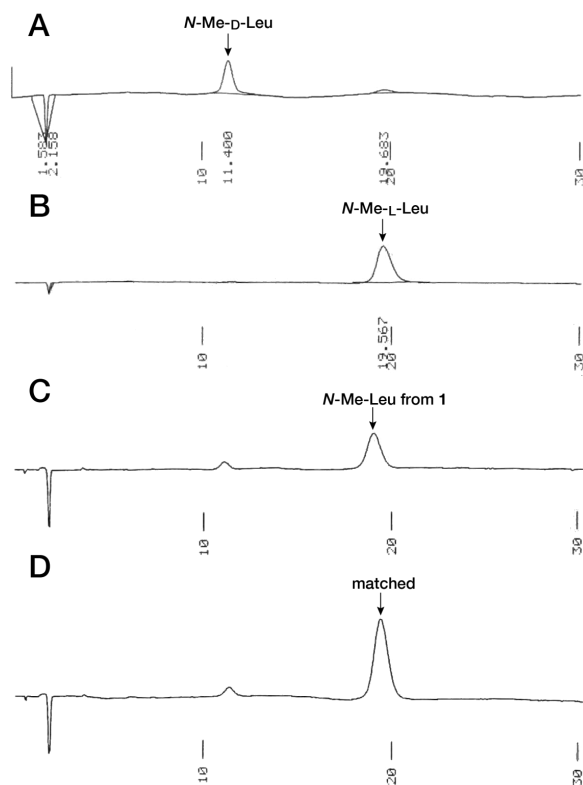


Figure 3-8. Kanamienamide (1)由来Leuのキラルカラム分析
 (A) *N*-Me-D-Leuの標品、(B) *N*-Me-L-Leuの標品、(C) Kanamienamide (1) 由来の*N*-Me-Leu、(D) *N*-Me-L-Leuとkanamienamide (1) 由来の*N*-Me-Leuとの共注

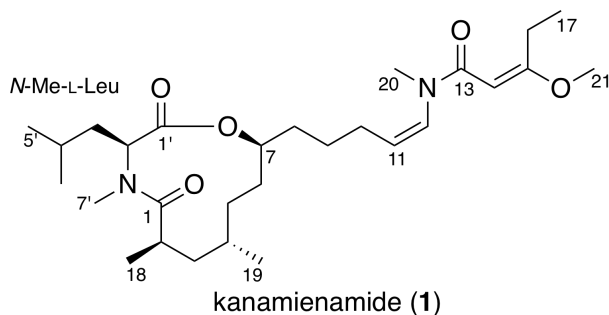


Figure 3-9. Kanamienamide (1)の絶対立体配置

第5節 Kanamienamideの生物活性

Kanamienamide (1)のHeLa細胞に対する増殖阻害活性をMTT³³アッセイにより評価した。その結果、kanamienamide (1)はHeLa細胞に対してIC₅₀ 2.5 μM (50%増殖阻害濃度)で増殖阻害を示した。次に、kanamienamide (1)の殺細胞活性をトリパングルーアッセイにより評価した (Figure 3-10 A)。その結果、kanamienamide (1)の濃度依存的にHeLa細胞の細胞死が誘導された。また、kanamienamide (1)の誘導する細胞死は、細胞膜のblebbingと細胞の収縮を伴うことが位相差顕微鏡による観察で確認された。Kanamienamide (1) が誘導する細胞死に確認された形態変化はアポトーシスの特徴³⁴と一致した (Figure 3-10 B)。次に、アポトーシスの阻害剤として知られるZ-VAD-FMK (caspase阻害剤) とkanamienamide (1)との併用処理による細胞死に対する影響を評価した (Figure 3-10A)。その結果、低濃度 (10 μM)のkanamienamide (1) 処理ではZ-VAD-FMKの併用処理による細胞死の阻害が確認されたが、高濃度 (30 μM) のkanamienamide (1) 処理ではZ-VAD-FMK併用処理で細胞死が阻害されないことが明らかとなった (Figure 3-10 A)。この矛盾した結果からkanamienamide (1)の誘導する細胞死は、複数の経路が存在するかcaspaseによらない経路であることが示唆された。しかしながら、当研究室の小島らがkanamienamide (1)の全合成を達成し、合成品の活性試験を行ったところ、上述のような活性は見られずHeLa細胞に対してIC₅₀ 32 μMでの増殖阻害、ネクローシス様の細胞死を誘導したと報告した³⁵。この報告により天然品のkanamienamide (1)中には活性の強い何らかの生物活性物質が極微量コンタミしており、その影響で本来とは異なる結果が得られたことが明らかとなった。なお、Reddyらがkanamienamideの初の全合成を達成しており³⁶、当研究室の全合成は2例目の報告である。

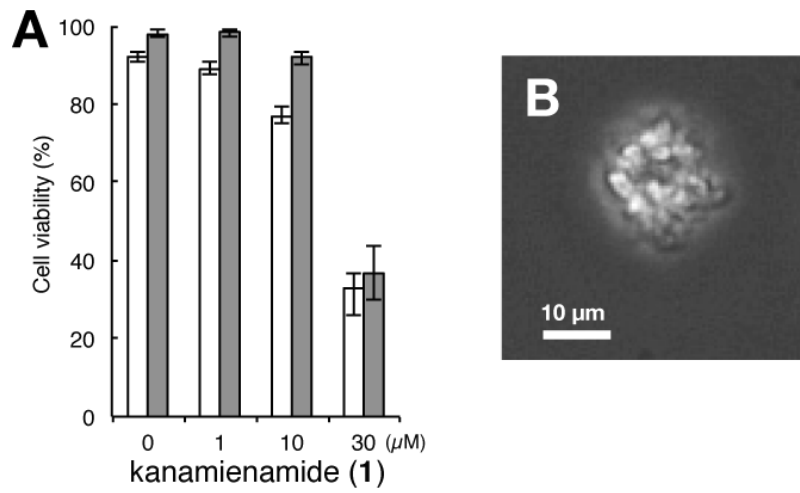


Figure 3-10. 単離時に確認されたKanamienamide (1)のHeLa細胞に対する細胞死:
 (A) トリパンプブルー色素排除実験による評価。白は単独処理、黒は50 μMのZ-VAD-FMKを併用。
 (B) Kanamienamide (1) 30 μM処理により誘導された細胞死。

第6節 Kanamienamide生合成遺伝子取得の試み

Kanamienamide (1) の生合成遺伝子を明らかにするために生産シアノバクテリア *M. bouillonii* のゲノム解読を行った。ゲノム解読を行うためには純度の高い gDNA が一定量必要となる。このため、一般的には単菌化された純粋培養株を大量培養して得られた gDNA を用いてゲノム解読を行う。しかしながら生物活性物質の単離源とされる海洋シアノバクテリアは、培養株を確立することが困難である場合が多く、kanamienamide (1) 生産シアノバクテリアも同様に培養株を確立することができなかった。このため、環境サンプルから高純度の gDNA を得る必要があった。近年、全ゲノム増幅を行うことで1細胞から高純度の gDNA を調製した報告例が増えてきている^{13,36}。本研究ではこの方法を kanamienamide (1) 生産シアノバクテリアに適用することでゲノム解読に必要な量の gDNA を調製することとした。滅菌した三つ穴スライドガラスと滅菌海水を用いてピペット洗浄法³²により、単一の糸状体を分離した(Figure 3-11 A)。分離した糸状体を滅菌蒸留水に浸したところ、浸透圧により細胞膜が破砕された(Figure 3-11 B) ため、これを粗DNA抽出物として全ゲノム増幅の鋳型とした。

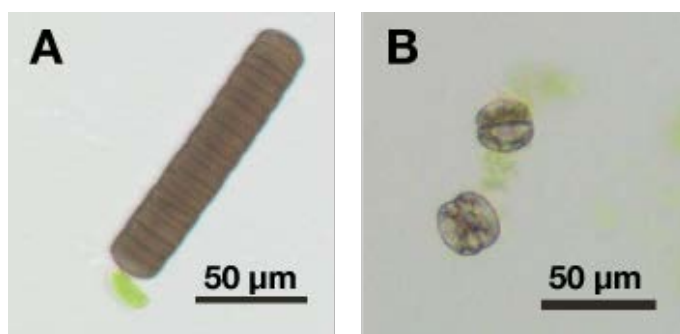


Figure 3-11. kanamienamide (1)生産シアノバクテリア: (A) 顕微鏡下で単離した糸状体、(B) 細胞膜の破砕

全ゲノム増幅はREPLI-g UltraFast Mini Kit (Qiagen, Germany) により行った。全ゲノム増幅により得られた gDNA の純度は、電気泳動と 16S rDNA のユニバーサルプライマーによる PCR とシーケンスを用いて評価した。電気泳動の結果から gDNA は主に 10 kbp 程度の鎖長で増幅されていることが確認された (Figure 3-12)。また、シーケンスにより得られた配列は単一で kanamienamide (1) 生産シアノバクテリアである *M. bouillonii* と一致したため、純度に問題ないことが確認された。全ゲノム増幅産物は QuantiFluor® ONE dsDNA System (Promega, USA) により定量した。その結果、得られた増幅産物は 1.6 μg であった。目的の gDNA 量である 5 μg に満たなかったため、さらに複数回増幅を行い、得られた増幅産物を合わせて次世代シーケンサー PacBio RS II によるゲノム解読を行った。

PacBio RS IIによるゲノム解読とアセンブルはTAKARA BIO社に委託した。得られたドラフトゲノムは総塩基配列数16.5 Mbpであった。近縁なシアノバクテリア種から推定されるゲノムサイズは約8 Mbpであるため、目的のシアノバクテリア以外のゲノムがコンタミしていた可能性が示唆された。ゲノム解析を行ったところ2種類のよく似たコンティグにより構成されていたため、1). 種内変異により生じた2種類のゲノムがコンタミしていた、もしくは2). ゲノム解読時のミスリーディングによりアセンブルが正確に行えず2種類のコンティグが生成された、といった2つの可能性が示唆された。これらの問題を解決するためには 1). より増幅効率のよい全ゲノム増幅kitを用いることで単一クローン (単一糸状体) からgDNAを調製する、もしくは 2). MiSeqなどの異なる次世代シーケンサーによるゲノム解読を行い得られた配列を今回得られた配列と組み合わせてアセンブル精度を高める、といった2つの方法が望まれる。全ゲノム解析には至らなかったものの、得られたドラフトゲノムは生合成遺伝子クラスターを探索するのに十分な鎖長であったので、kanamienamide (1) 生合成遺伝子クラスターを探索することとした。Kanamienamide (1) 生合成遺伝子クラスターはN-Me-Leuを合成するNRPSが1つと複数のPKSから構成されていると考えられるため、この特徴に一致するものを探索した。ドラフトゲノム中に複数の生合成遺伝子クラスターと断片的な生合成遺伝子クラスターが確認されたが、kanamienamide (1) 由来と思われるものは確認されなかった。生合成遺伝子クラスター探索の成否はドラフトゲノムの質に大きく依存する。ゲノム解読では主にMiSeq、HiSeq、PacBio、MinIONといったシーケンサーが用いられる。これらのシーケンサーの中でもPacBioとMinIONは長鎖の配列が得られる利点があるものの、得られる配列の精度はそれほど高くない。これに対してMiSeqとHiSeqは得られる配列は短いものの精度が高いといった特徴を持つ。このためMiSeqもしくはHiSeqによりゲノムの再解読を行い今回得られたドラフトゲノムの精度を向上させる必要がある。

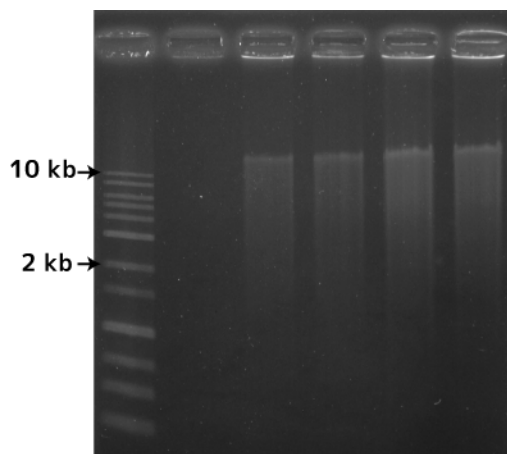


Figure 3-12. 全ゲノム増幅産物の電気泳動写真 (各レーンは独立に増幅を行ったものをアプライした)

第7節 考察

Kanamienamide (1) は *N*-Me エナミドとエノールエーテルが隣接した特徴的な部分構造を持つ。このような部分構造は天然物において例がなく初の報告となる。

現在までに barbamide³⁸ や jamaicamide A³⁹ などメチルエノールエーテルを含む様々な天然物が海洋シアノバクテリアより単離されている (Figure 3-13)。

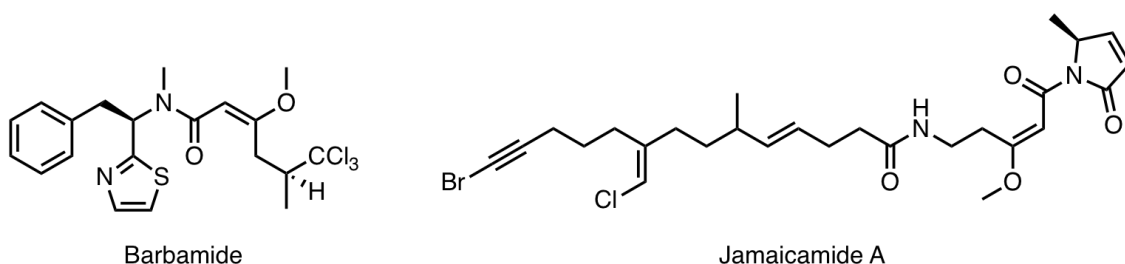


Figure 3-13. メチルエノールエーテル構造を含む天然物

Barbamide と jamaicamide A のメチルエノールエーテルを生成する生合成経路は、 β -ケトチオエステルのエノール型互変異性体がメチルトランスフェラーゼによりメチル化されることで説明されている^{39,40}。Kanamienamide (1) は barbamide、jamaicamide A と同じく海洋シアノバクテリア *Moorea* 属由来の NRPS/PKS 生成物であり、kanamienamide (1) に含まれるメチルエノールエーテルも同様の経路で合成されると考えられる。また、エナミドの生合成経路はペプチドの microcystin LR^{41,42} とペプチジルヌクレオシドの pacidamycin 類⁴³ にて報告されている (Figure 3-14)。Microcystin LR におけるエナミド構造はセリンの側

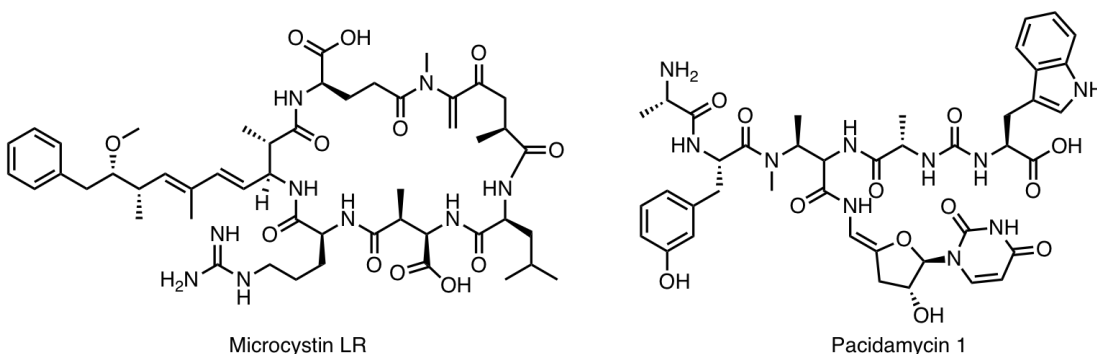


Figure 3-14. エナミド構造を含む天然物

鎖が脱水されることにより形成される⁴⁴。Pacidamycin 類におけるエナミド構造はウリジンの酸化と脱水、アミノ基転移反応、オレフィンの異性化、ペプチドとの縮合によって形成されると推測されている⁴⁵。しかしながら、これらの生

合成経路で生成されるエナミド構造はkanamienamide (1) におけるエナミド構造とは由来が異なる。また、シアノバクテリアよりいくつかのエナミド含有ポリケチドが報告されているが⁴⁶⁻⁴⁸ (Figure 3-15)、その生合成経路は明らかとなつて

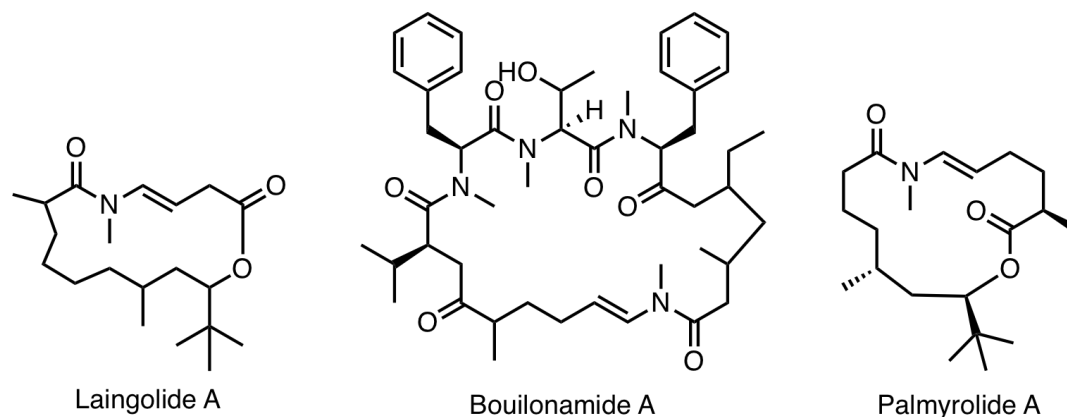


Figure 3-15. エナミド構造を含むシアノバクテリア由来天然物

いない。興味深いことに他の生物種に比べ比較的多数のエナミド含有ポリケチドが*M. bouillonii*から単離されている。このことは*M. bouillonii*がエナミドを合成する酵素を複数保有していることを支持し、*M. bouillonii*はポリケチドにおける*N*-Meエナミドの生合成機構を解明するのに適した生物種であると考えられる。Kanamienamide (1) 生産シアノバクテリアのゲノム解読を行い、kanamienamide (1) 生合成遺伝子クラスターの探索を行ったが目的の生合成遺伝子クラスターの発見には至らなかった。近年、kanamienamide (1) 生産シアノバクテリアと同種である*M. bouillonii* PNG5-198株のドラフトゲノムが報告されている⁴⁹。本研究で得られた環境サンプル由来のドラフトゲノムと*M. bouillonii* PNG5-198株由来のドラフトゲノムの質をTable 3-2にまとめた。総塩基配列数

Table3-2. ドラフトゲノムの比較

	<i>M. bouillonii</i> PNG5-198 ⁴¹	<i>M. bouillonii</i> 1406-23
総コンティグ数	339	547
総塩基配列数	8,319,104	16,522,888
コンティグN50	43,237	57,386

に違いはあるがその他の項目にあまり違いはなく、本研究で行った全ゲノム増幅によるゲノム解読が十分に有効であることを示した。現在、海洋シアノバクテリアから単離される生物活性物質の生合成研究はあまり進んでいない。これは多くの生物活性物質を生産する海洋シアノバクテリアの培養が困難であるこ

とが原因である。今回ゲノム解読に用いた手法は培養株の確立を必要としないため、海洋シアノバクテリアの生合成研究の発展に貢献できるものとする。

第4章 Minnamide Aの構造と生物活性

第1節 海洋シアノバクテリアの採集と単離

採集は2013年12月に沖縄県水納島にて琉球大学の須田彰一郎教授により行われた(Figure 4-1)。採集した海洋シアノバクテリア (sample no. 1504-41) は冷凍して保存した。また、海洋シアノバクテリアは種同定に用いるために一部解凍したものを RNAlater® (Qiagen, Germany) で固定し、-30 °C にて保存した。



Figure 4-1. シアノバクテリアの採集 (sample no. 1504-41)

保存した固定サンプルを用いて single filament PCR を行った。得られた 16S rDNA と 16S-23S ITS 領域は最尤 (ML) 法とベイズ法を用いて系統解析を行った。系統解析の結果、海洋シアノバクテリア 1504-41 は *Okeania* 属とともにクレードを形成した (Figure 4-2)。海洋シアノバクテリア 1504-41 (Figure 4-3) と *Okeania* 属の形態的特徴を Table 4-1 にまとめた。海洋シアノバクテリア 1504-41 の形態は *Okeania hirsuta* とよく一致した。これらの結果から採集した海洋シアノバクテリア 1406-23 は *Okeania hirsuta* と同定した。

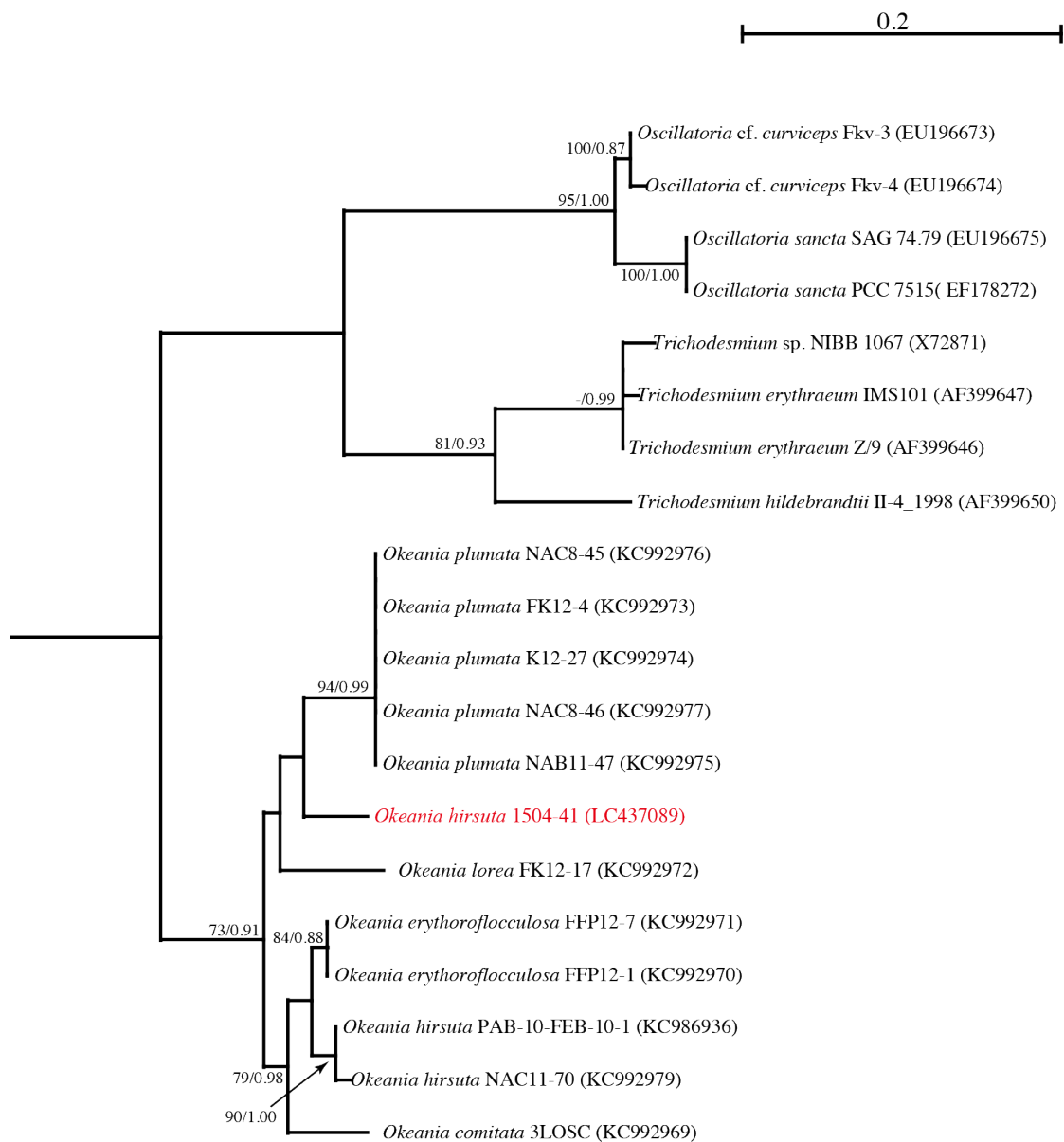


Figure 4-2. ML 法により 16S -23S ITS 領域から作成した系統樹。アウトグループには *Moorea producens* 3L と *M. bouillonii* PNG5-198 を用いた。Node には ML/Bayes 法により算出したブートストラップ値 (70%以下は示していない) と事後確立 (0.9 以下は示していない) を示した。

Table 4-1. 採集したシアノバクテリア 1504-41 と *Okeania* 属⁵⁰ の形態比較

Characteristics	<i>Okeania comitata</i>	<i>Okeania erythroflocculosa</i>	<i>Okeania lorea</i>	<i>Okeania plumata</i>	<i>Okeania hirsuta</i>	1504-41 (this study)
Color	Black	Dark-red	Copper-brown	Black	Black to dark-brown	Dark-brown
Filament width (μm)	11-13	32-42	14-16	20-25	25-47	38.2 ± 2.8
Cell width (μm)	10-12	32-35	13-15	20-23	24-45	30.4 ± 1.7
Cell length (μm)	1.5-2.5	2-3	1.5-2.5	1.5-2	2-3	4.1 ± 1.0



Figure 4-3. *Okeania hirsuta*1504-41 の光学顕微鏡による形態写真

第2節 Minnamide A の単離

採集した *Okeania hirsuta* 1.75 kg (湿重量) を MeOH による抽出と濾過後、濾液を減圧下で濃縮した。得られた MeOH 抽出物を EtOAc と水で分配した。EtOAc 層を減圧濃縮し、90% MeOH 水溶液とヘキサンにて分配した。HeLa 細胞 (ヒト子宮頸がん細胞) に対する増殖阻害活性を指標にして、得られた 90% MeOH 水溶液層を ODS シリカゲルカラムクロマトグラフィーと HPLC によって精製した。その結果、HeLa 細胞に対して増殖阻害活性を示す minnamide A (2) 188.2 mg を無色油状物として得た (Figure 4-4)

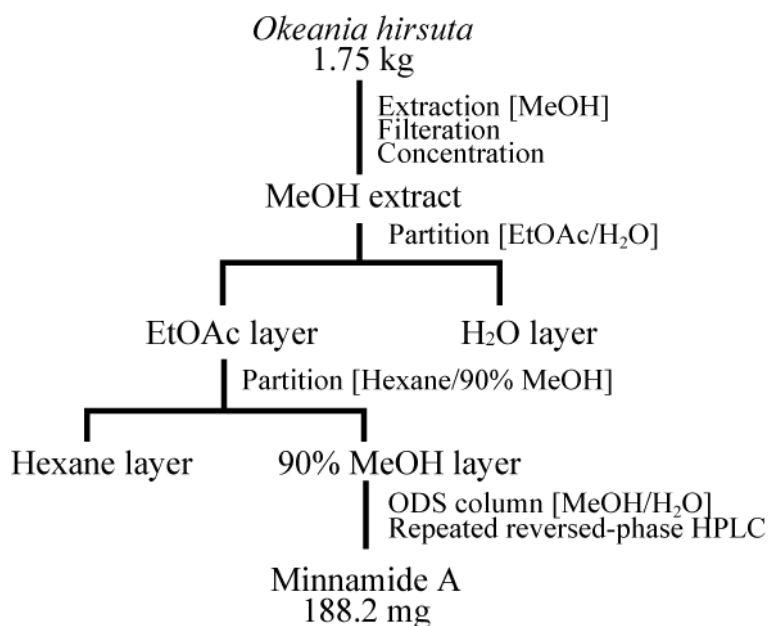


Figure 4-4. Minnamide A (2) の精製分離

第3節 Minnamide A の平面構造

高分解能質量スペクトルの結果から minnamide A (2) の分子式を $C_{74}H_{132}N_{10}O_{18}$ と決定した (m/z , calcd for $C_{74}H_{132}N_{10}O_{18}Na [M+Na]^+$ 1471.9619)。 1H NMR (Figure 4-5)、 ^{13}C NMR、COSY、HMBC、HMQC スペクトルから 10 のカルボニル基 (δ_C 176-170) (Table 4-2)、アミノ酸の α -水素と考えられるシグナルが 8 つ (δ_H/δ_C 5.64/56.7, 5.58/59.0, 5.41/51.8, 5.28/61.4, 5.28/49.1, 5.27/48.9, 5.21/56.0, 5.15/62.4)、4 つの *N*-メチル基 (δ_H/δ_C 3.34/30.9, 3.33/31.1, 3.32/30.7, 3.25/31.1)、1 つの *O*-メチル基 (δ_H/δ_C 3.69/55.2)、4 つのオキシメチン (δ_H/δ_C 4.57/66.8, 4.19/66.4, 4.12/66.4, 3.98/68.4)、2 つの第一級メチル基 (δ_H/δ_C 0.92/14.6, 0.85/23.2)、12 個の第二級メチル基 (δ_H/δ_C 1.14/19.6, 1.12/19.6, 1.08/20.7, 1.05/20.1, 1.00/19.7, 0.98/18.6, 0.97/22.1, 0.94/22.0, 0.85/23.2, 0.81/14.9, 0.80/19.0, 0.78/23.3) の存在が確認された。COSY、TOCSY、HMQC、HMBC スペクトルを詳細に検討することにより *N*-methylglutamine (*N*-Me-Gln)、2 つの *N*-methylvaline (*N*-Me-Val)、2 つの serine (Ser)、2 つの leucine (Leu)、*N*-methylisoleucine (*N*-Me-Ile)、2-amino-3-(4-methoxyphenyl)propan-1-ol (AMP)、3,7,11,15-tetrahydroxy-5,9,13-trimethyloctadecanoic acid (Fatty acid) の部分構造が明らかとなった。

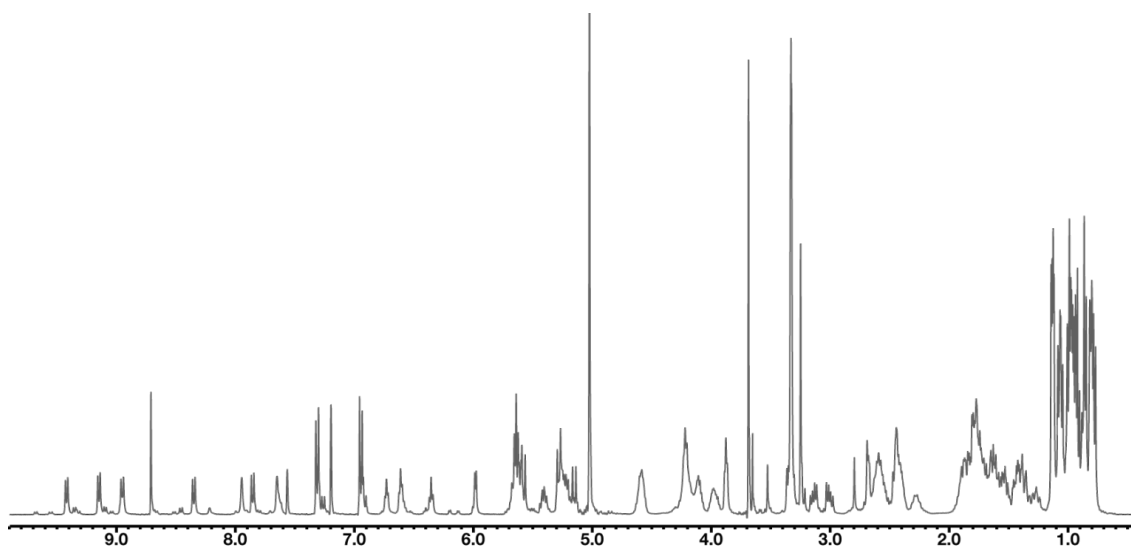


Figure 4-5. Minnamide A (2) の 1H NMR (400 MHz, C_5D_5N)

Minnamide A (2)の平面構造は HMBC と ROESY により決定した (Figure 4-6、Table 3-2)。HMBC の相関 [NH (AMP)/C1 (Gln)、*N*-Me (*N*-Me-Gln)/C1 (*N*-Me-Val1)、*N*-Me (*N*-Me-Val1)/C1 (Ser1)、NH (Ser1)/C1 (*N*-Me-Val2)、NMe (*N*-Me-Val2)/C1 (Leu1)、NH (Leu1)/C1 (Ser2)、NH (Ser2)/C1 (*N*-Me-Ile)、*N*-Me (*N*-Me-Ile)/C1 (Leu2)、

NH (Leu2)/C1 (Fatty acid)] と ROESY の相関 [NH (AMP)/H-2 (*N*-Me-Gln)、*N*-Me (*N*-Me-Val2)/H-2 (Leu2)、NH (Ser2)/H-2 (*N*-Me-Ile)] から minnamide A (2) の平面構造を Figure 4-5 に示した通りに決定した。

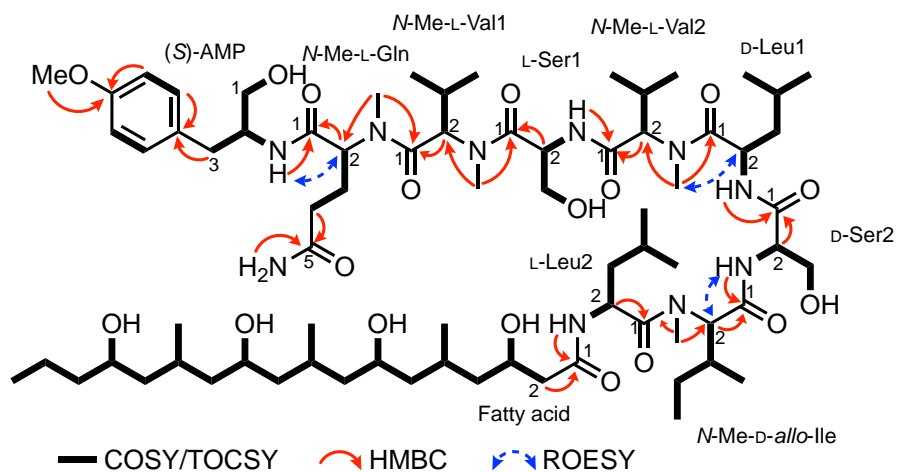


Figure 4-6. Minnamide A (2) の平面構造

Table4-2. Minnamide A (2) NMR スペクトルデータ (溶媒: C₅D₅N)

residue	positio n	δ_C^a , type	δ_H^b , mult (<i>J</i> in Hz)	COSY	selected TOCSY ^c	selected HMBC ^d (H->C)	selected ROESY
AMP	1	62.8, CH ₂	3.88, m	2, OH			
	2	53.2, CH	4.59, m	1, 3a, 3b, 12- NH			
	3a	36.9, CH ₂	3.13, dd (6.7, 13.7)	2, 3b		4, 5/9	
	3b		3.00, dd (7.4, 13.7)	2, 3a		4, 5/9	
	4	131.3, C					
	5/9	130.5, CH	7.32, d (8.3)	6/8		4	
	6/8	114.3, CH	6.95, d (8.3)	5/9		7	
	7	158.7, C					
	10	55.2, CH ₃	3.69, s			7	
	OH		6.61, d (5.0)	1			
	NH		7.86, d (8.5)	2		1 (<i>N</i> -Me- Gln)	2 (<i>N</i> - Me-Gln)
<i>N</i> -Me- Gln	1	170.6, C					
	2	56.7, CH	5.64, m	3a, 3b		1	
	3a	24.7, CH ₂	2.58, m	2, 3b, 4a, 4b			
	3b		2.41, m	2, 3a, 4a, 4b			
	4a	32.3, CH ₂	2.46, m	3a, 3b, 4b			
	4b		2.60, m	3a, 3b, 4a			
	5	175.1, C					
	NMe	31.1, CH ₃	3.25, s			2, 1 (<i>N</i> - Me-Val1)	
	NH ₂		7.95, m	NH ₂		5	
NH ₂		7.65, m	NH ₂		5		
<i>N</i> -Me- Val1	1	171.7, C					
	2	59.0, CH	5.58, d (10.8)	3		1	
	3	27.5, CH	2.54, m	2, 4, 5			
	4	20.1, CH ₃	1.05, d (6.7)	3			
	5	18.6, CH ₃	0.98, d (6.8)	3			
	NMe	30.7, CH ₃	3.32,			2, 1 (Ser1)	

Ser1	1	172.7, C				
	2	51.8, CH	5.41, m	3a, 3b, NH		1
	3a	62.9, CH ₂	4.24, m	2, 3b, OH		
	3b		4.10, m	2, 3a, OH		
	OH		6.73, t (4.9)	3a, 3b		
	NH		8.95, d (8.1)	2		1 (<i>N</i> -Me-Val2)
<i>N</i> -Me-Val2	1	170.4, C				
	2	62.4, CH	5.15, d (11.0)	3		1
	3	27.1, CH	2.41, m	2, 4, 5		
	4	19.7, CH ₃	1.00, d (6.1)	3		
	5	19.0, CH ₃	0.80, d (6.4)	3		
	NMe	30.9, CH ₃	3.34, s			2, 1 2 (Leu1) (Leu1)
Leu1	1	174.5, C				
	2	48.9, CH	5.27, m	3a, 3b, NH		
	3a	41.6, CH ₂	1.72, m	2, 3b, 4		
	3b		1.62, m	2, 3a, 4		
	4	25.0, CH	1.87, m	3a, 3b, 5, 6		
	5	22.0, CH ₃	0.94, d (6.3)	4		
	6	23.3, CH ₃	0.78, d (6.7)	4		
	NH		9.42, d (7.6)	2		1 (Ser2)
Ser2	1	171.6, C				
	2	56.0, CH	5.21, m	3, NH		1
	3	62.9, CH ₂	4.22, m	2, OH		
	OH		6.35, d (6.1)	3		
	NH		8.35, d (8.1)	2		1 (<i>N</i> -Me-Ile) 2 (<i>N</i> -Me-Ile)
<i>N</i> -Me-Ile	1	170.6, C				
	2	61.4, CH	5.28, d (10.8)	3		1
	3	32.9, CH	2.27, m	2, 4a, 6		
	4a	26.5, CH ₂	1.78, m	3, 4b, 5		

	4b		1.10, m	4a,	
	5	11.6, CH ₃	0.87, d (7.4)	4a	
	6	14.9, CH ₃	0.81, d (6.6)	3	
	NMe	31.1, CH ₃	3.33, s		2, 1 (Leu2)
Leu2	1	175.1, C			
	2	49.1, CH	5.28, m	3a, 3b, NH	1
	3a	41.4, CH ₂	1.81, m	2, 3b, 4	
	3b		1.69, m	2, 3a, 4	
	4	25.2, CH	1.89, m	3a, 3b, 5, 6	
	5	22.1, CH ₃	0.97, d (6.7)	4	
	6	23.2, CH ₃	0.85, d (6.7)	4	
	NH		9.15, d (7.6)	2	1 (Fatty acid)
Fatty acid	1	173.1, C			
	2	44.6, CH	2.68, m	3	1
	3	66.8, CH	4.57, m	2, 4a, 4b, 3-OH	5, 19
	4a	46.5, CH ₂	1.72, m	3, 4b	
	4b		1.59, m	3, 4a, 5	
	5	26.7, CH	2.41, m	4b, 6b, 19	3, 7
	6a	46.1, CH ₂	1.87, m	6b, 7	
	6b		1.26, m	5, 6a	
	7	66.4, CH	4.12, m	6b, 8a, 8b, 7-OH	5, 9, 19, 20
	8a	46.9, CH ₂	1.76, m	7, 8b, 9	
	8b		1.35, m	7, 8a, 9	
	9	26.6, CH	2.60, m	8a, 8b, 10b, 20	7, 11
	10a	48.0, CH ₂	1.80, m	10b, 11	
	10b		1.43, m	9, 10a, 11	
	11	66.4, CH	4.19, m	10a, 10b, 12a, 12b, 11-OH	9, 13, 20, 21
	12a	48.0, CH ₂	1.80, m	11, 12b, 13	
	12b		1.43, m	11, 12a, 13	

13	26.6, CH	2.62, m	12a, 12b, 11, 15, 18, 14b, 21	21	
14a	46.9, CH ₂	1.76, m	14b, 15		
14b		1.38, m	13, 14a, 15		
15	68.4, CH	3.98, m	14a, 14b, 16a, 16b, 15- OH		
16a	41.4, CH ₂	1.64, m	15, 16b		
16b		1.54, m	15, 16a		
17a	19.6, CH ₂	1.65, m	17b, 18		
17b		1.53, m	17a, 18		
18	14.6, CH ₃	0.92, t (6.7)	17a, 17b	13	16, 17
19	20.7, CH ₃	1.08, d (6.7)	5	3, 7	
20	19.6, CH ₃	1.12, d (6.3)	9	7, 11	
21	19.6, CH ₃	1.14, d (6.3)	13	11, 13	
3-OH		5.98, d (4.5)	3		
7-OH		5.61, m	7		
11-OH		5.65, m	11		
15-OH		5.64, m	15		

^aMeasured at 100 MHz. ^bMeasured at 400 MHz. ^cMixing time = 10 ms or 50 ms. ^d $J_{\text{CH}} = 8 \text{ Hz}$.

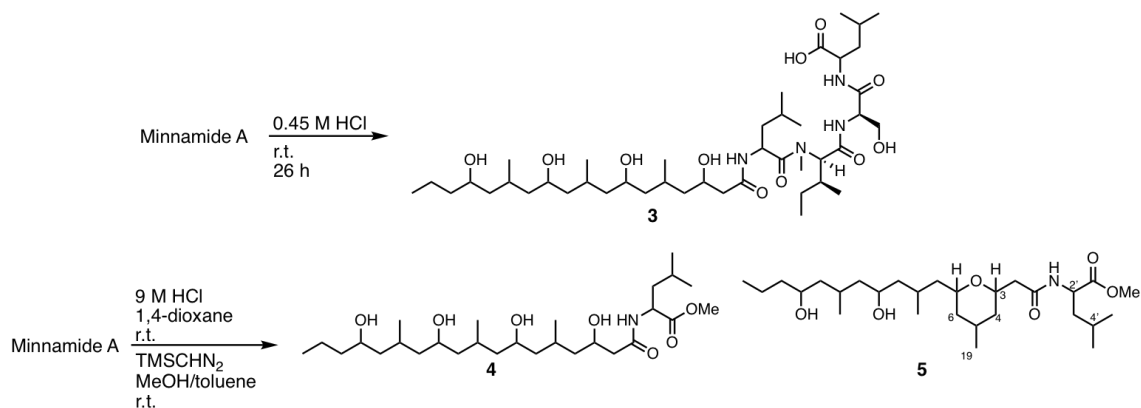
第4節 Minnamide A の絶対立体配置

第1項 天然物を用いた絶対立体配置の決定

Minnamide A (2) 構成アミノ酸の絶対立体配置を決定するためにキラルカラム HPLC 分析と Marfey 法⁵¹による分析を行った (第6章)。初めに Minnamide A (2) を 6M HCl 中で 110 °C、24 時間攪拌することで酸加水分解物を調製した。得られた酸加水分解物は逆相 HPLC により精製し、各構成アミノ酸と AMP を得た。*N*-Me-Gln は酸加水分解により *N*-methylglutamic acid (*N*-Me-Glu) として得られた。得られたアミノ酸のうち *N*-Me-Glu、*N*-Me-Val、Leu についてキラルカラム HPLC を用いて標品との保持時間を比較した。その結果、*N*-Me-Glu は L 体、*N*-Me-Val は L 体であることが明らかとなった。また、Leu は L 体と D 体の混合物 (1:1) として検出されたため、Minnamide A (2) を構成する Leu1 と Leu2 はどちらか片方が L 体でもう片方が D 体であると考えられた。さらに、Marfey 法の結果から AMP は S 体であることが明らかとなり、Ser は L 体と D 体の混合物 (1:1) 検出されたため、Minnamide A (2) を構成する Ser1 と Ser2 はどちらか片方が L 体でもう片方が D 体であると考えられた。*N*-Me-Ile については、逆相 HPLC にて *N*-Me-L-Ile と *N*-Me-D-*allo*-Ile とその保持時間を比較した。その結果、minnamide A (2) 由来の *N*-Me-Ile の保持時間は、*N*-Me-D-*allo*-Ile 標品のものと一致したため、*N*-Me-*allo*-Ile であることが判明した。さらに *N*-Me-Ile が D-*allo* 体であるのか L-*allo* 体であるのかを決定するため、標品と minnamide A (2) 由来の *N*-Me-*allo*-Ile を Marfey 試薬により FDLA [*N*^α-(5-fluoro-2,4-dinitrophenyl)-leucinamide] 体へ誘導した。標品の *N*-Me-D-*allo*-Ile-L-FDLA と *N*-Me-D-*allo*-Ile-D-FDLA を、minnamide A (2) 由来の *N*-Me-*allo*-Ile-L-FDLA と逆相 HPLC で比較したところ *N*-Me-D-*allo*-Ile-L-FDLA と一致した。このことから、*allo*-Ile は *allo*-D 体であると決定した。以上の結果より minnamide A (2) に含まれる Ser と Leu を除く構成アミノ酸と AMP の絶対立体配置を決定した。

次に、minnamide A (2) を構成する Leu と Ser の L 体と D 体の位置を明らかにするために、minnamide A (2) を室温下で異なる 2 つの塩酸濃度により酸加水分解した (Scheme 4-1)。穏やかな条件で酸加水分解を行った結果、minnamide A (2) の部分酸加水分解物 3 と 4 をそれぞれ得た。部分酸加水分解物 3 を 6M HCl、110 °C、24 時間の条件で完全に酸加水分解し、逆相 HPLC による精製で Ser2 を得た。Ser2 に対して Marfey 法を適用したところ D 体であることが判明した。また、部分加水分解物 4 についても同様の操作を行い、得られた Leu2 に対してキラルカ

Scheme 4-1. Minnamide A (2) の部分加水分解



ラム HPLC 分析をしたところ L 体の標品と一致した。したがって、Ser1, Leu1 はそれぞれ L 体、D 体であることが分かった。これらの結果より minnamide A (2) に含まれるアミノ酸の絶対立体配置を Figure 4-7 に示す通りに決定した。

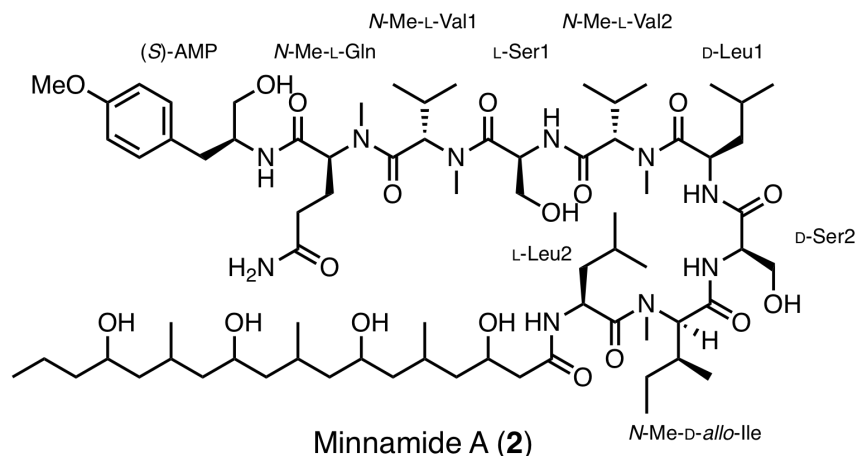


Figure 4-7. Minnamide A (2) の絶対立体配置

Fatty acid 部位に含まれる 4 つの水酸基の絶対立体配置は改良 Mosher 法⁵² により決定した。はじめに部分酸加水分解物 6 に対して過剰量の (*R*)- α -methoxy- α -trifluoromethylphenylacetic acid (MTPA) chloride もしくは (*S*)-MTPA chloride を作用させ、MTPA エステル 7 と 8 を調製した (Scheme4-2)。得られた MTPA エステルの化学シフトを比較したところ、化学シフトの差 ($\Delta\delta$ 値) に多数の異常値が確認されたため水酸基の絶対立体配置決定には至らなかった (Figure 4-8)。

Scheme 4-2. MTPA エステル 8 と 9 の作成

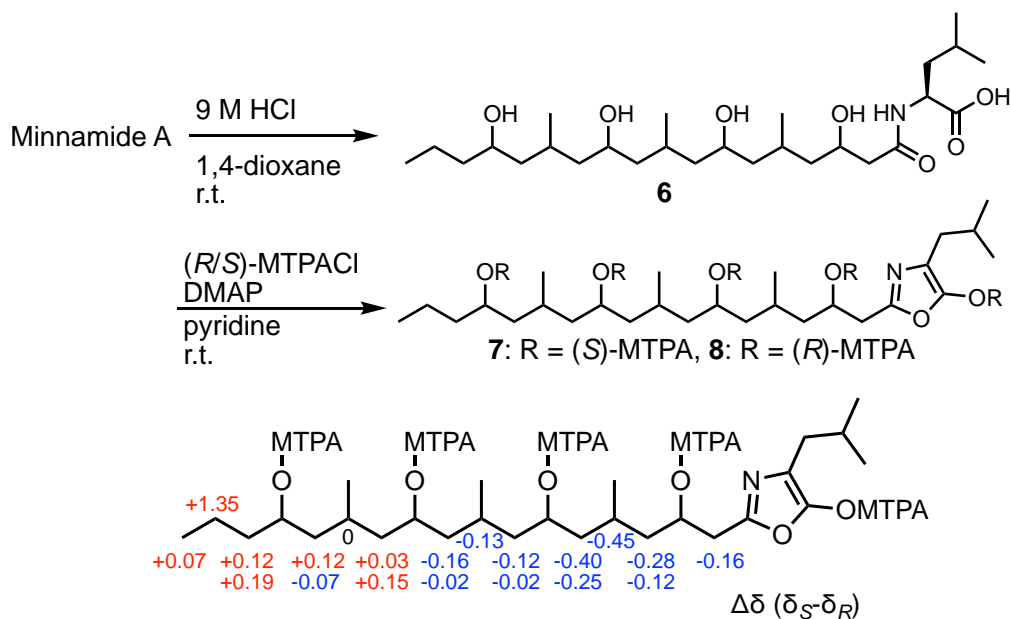
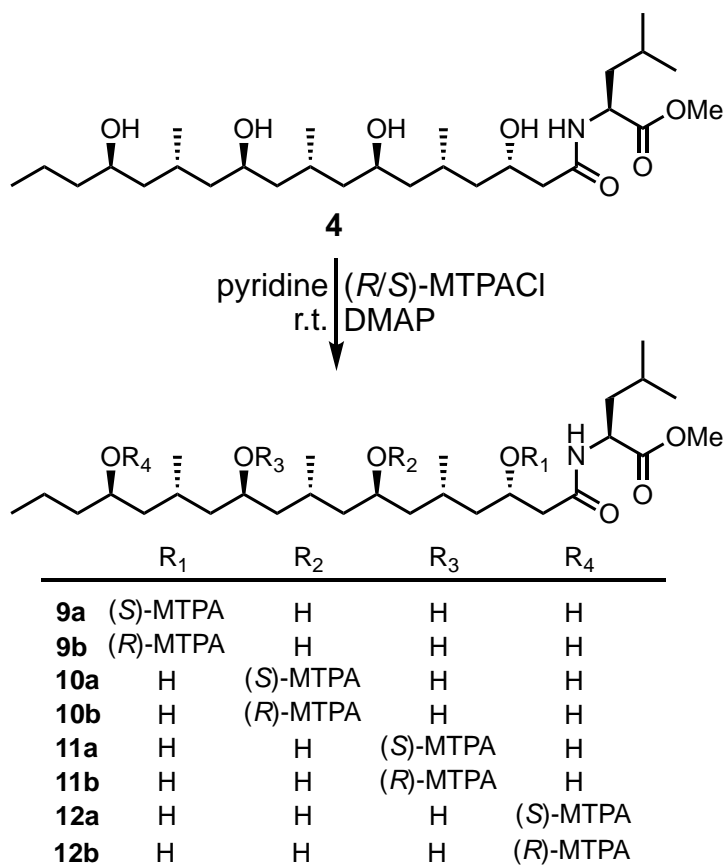


Figure 4-8. MTPA エステル 7 と 8 に対する改良モッシャー法の適応

そこで、部分酸加水分解物 **4** に対して 0.4 mol 等量の (*R*)-MTPA chloride もしくは (*S*)-MTPA chloride を作用させることで 8 種類のモノ MTPA エステル **9a-12b** を得た (Scheme 4-3)。得られた MTPA エステルの化学シフトを比較した結果、C3、C7、C11、C15 の周辺において $\Delta\delta (\delta_S - \delta_R)$ 値の正負が分かれたため、Fatty acid 部位に含まれる 4 つの水酸基の絶対立体配置は 3*S*、7*R*、11*R*、15*R* であると決定した (Figure 4-9)。

Scheme 4-3. 脂肪酸部位の MTPA エステル化



つぎに、部分酸加水分解により得られた環状エーテル **5** (Scheme 4-1) を用いて脂肪酸部位に含まれる C5 位の絶対立体配置を決定した。環状エーテル **5** はカルボニル基の β 位の水酸基が脱水し、引き続きオキシマイケル付加により生成されたものと思われる。環状エーテル **5** の立体化学を NOESY の相関と結合定数により決定した。得られた NOESY の相関 (H-3/H-19、H-19/H-6b、H-4a/H-7) (Figure 4-10) によりエーテル環に存在する 3 つの水素 (H-3、H-19、H-6b) と 2 つの水素 (H-4a、H-7) がそれぞれ同じ面に配置することが示された。また、結合定数 ($J_{H5-H6a} = 11.0 \text{ Hz}$ 、 $J_{H4a-H5} = 3.0 \text{ Hz}$) と NOESY の相関 (H-4a、H-7) により H-5 と H-6a はシンペリプラナーの関係にあることが判明した。これらの結果により環状エーテル **5** の 6 員環のコンフォメーションがツイストボートであることが明らかとなり、相対立体配置を Figure 4-9 に示す通りに決定した。環状エーテル **5** の相対立体配置と先に決定した fatty acid の C7 位の絶対立体配置に基づき、fatty acid の C5 位の絶対立体配置を *S* と決定した。

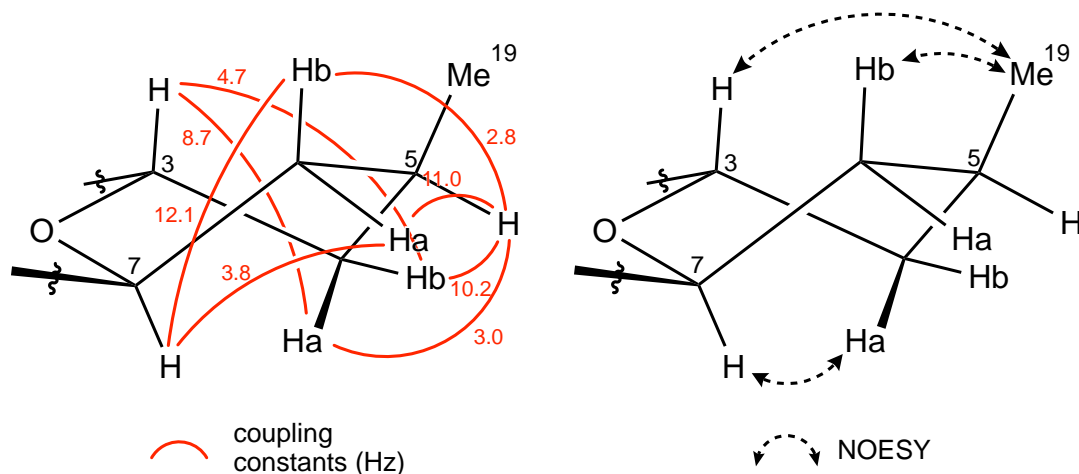


Figure 4-10. 環状エーテル **5** におけるエーテル環部位の相対立体配置

残る C13 位の絶対立体配置を決定するために部分酸加水分解物 **4** のモノメシル化を行った (Scheme 4-4)。反応混合物中には複数の生成物が確認されたが、不安定なために、モノメシル体 **13** のみが PLC にて分離可能であった。モノメシル体 **13** は自発的に環化し環状エーテル **14** が得られた。環状エーテル **14** の立体化学は NOESY の相関と結合定数により決定した。大きな値の結合定数 ($J_{H11-H12b} = 12.1 \text{ Hz}$ 、 $J_{H12b-H13} = 12.1 \text{ Hz}$ 、 $J_{H13-H14b} = 12.3 \text{ Hz}$) と NOESY の相関 (H-11/H-13、H-12b/H-14b) により H-11 と H-12b、H-13、H-14b はアキシカルに位置することが示された。これらの結果から環状エーテル **14** の立体配置を Figure 4-11 に示す通りに決定した。環状エーテル **14** の生成は C15 の立体配置反転を

伴うことから、fatty acid の C11 の絶対立体配置を *S* と決定した。

Scheme 4-4. 部分酸加水分解物 **4** のメシル化と環状エーテル化

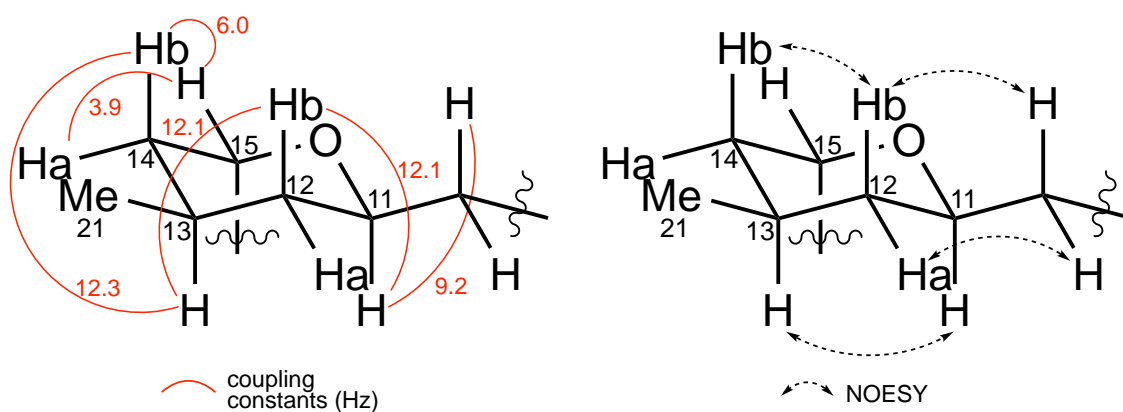
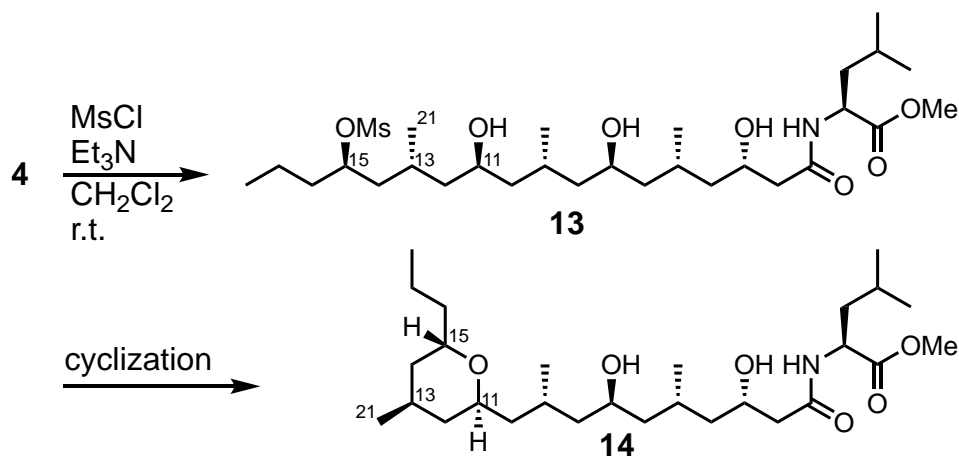


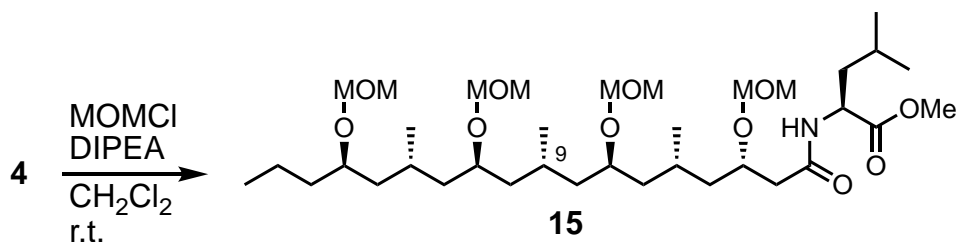
Figure 4-11. 環状エーテル **14** におけるエーテル環部位の相対立体配置

残された未決定の絶対立体配置 C9 は化学合成により決定することとした。

第2項 合成による絶対立体配置の決定

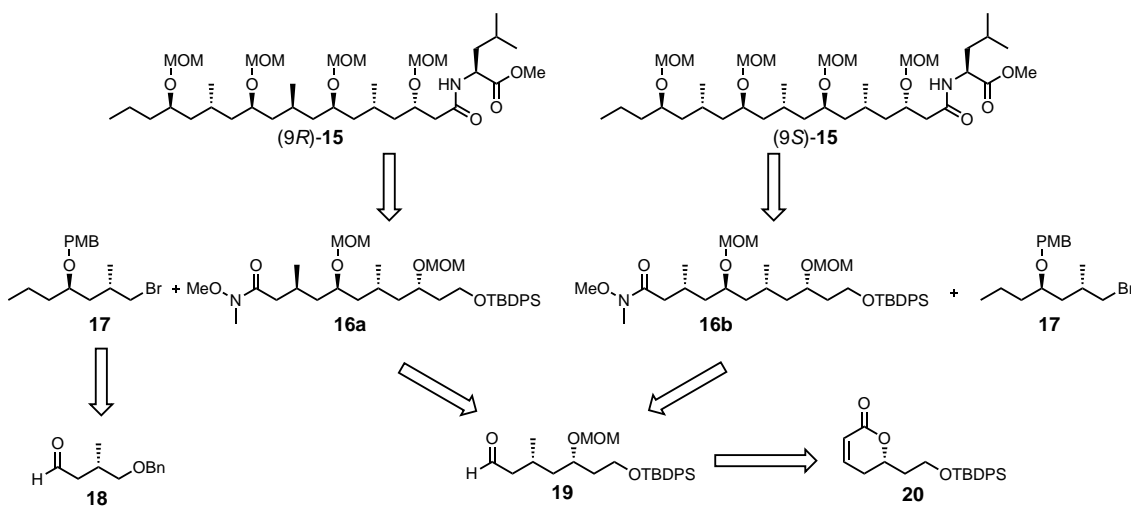
Fatty acid 中の C9 の絶対立体配置を決定するために、部分酸加水分解物 **4** を MOM エーテル **15** へと誘導し (Scheme 4-5)、その可能な2つの立体異性体 (9R)-**15** と (9S)-**15** を合成し、NMR データを比較することとした。

Scheme 4-5. 部分酸加水分解物 **4** の誘導反応



逆合成解析を Scheme 4-6 に示す。2つの立体異性体 (9R)-**15** と (9S)-**15** は、Weinreb アミド **16a** と **16b** から臭化物 **17** とのカップリング反応によりそれぞれ合成することとした。臭化物 **17** は (R)-ロシュエステルから5段階で誘導される既知のアルデヒド **18** より調製できる⁴⁵⁻⁴⁷。Weinreb アミド **16a** と **16b** はアルデヒド **19** より得られる。アルデヒド **19** は L-アスパラギン酸より6段階で合成される既知の α,β -不飽和ラクトン **20** より誘導することとした⁴⁸。

Scheme 4-6. (9R)-**15** と (9S)-**15** の逆合成解析

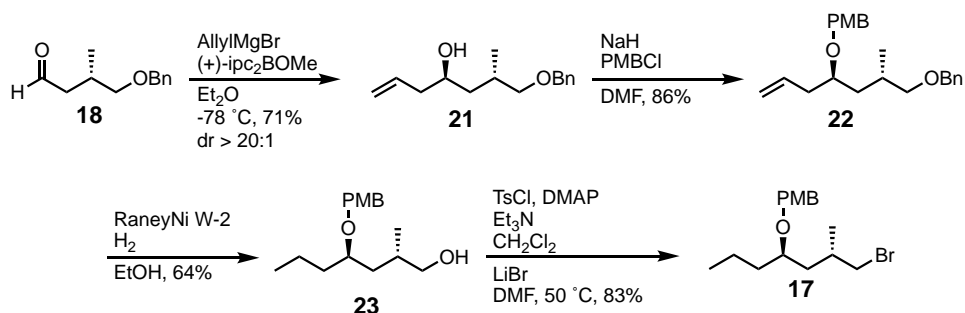


臭化物 **17** の合成 (Scheme 4-7)

既知の方法⁵³⁻⁵⁵で調製したアルデヒド **18** に対して Brown のアリル化⁵⁶を行うことで立体選択的にアルコール **21** を得た。アルコール **21** の水酸基を PMB で保護し、オレフィンの接触還元とベンジル基の選択的除去を H₂/RaneyNi W-2 により行い、アルコール **23** を得た。アルコール **23** は *p*-toluenesulfonyl chloride によ

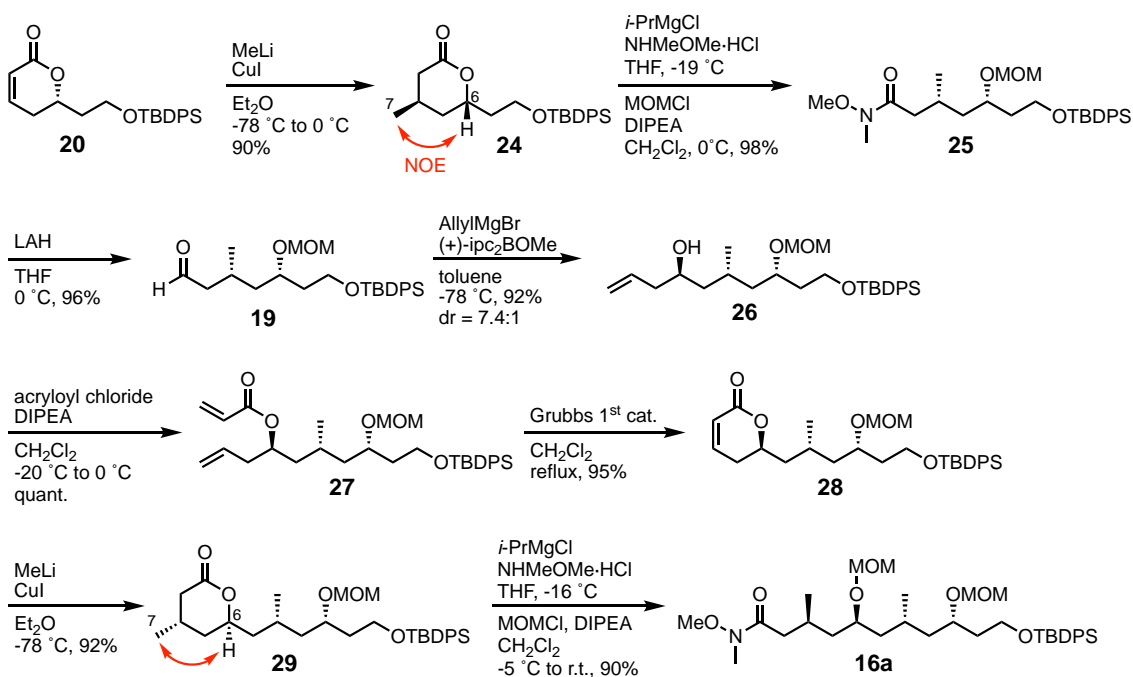
り活性化し、LiBr と反応させることで臭化物 **17** を合成した。

Scheme 4-7. 臭化物 **17** の合成



Weinreb アミド **16a** の合成 (Scheme 4-8)

Scheme 4-8. Weinreb アミド **16a** の合成



既知の方法⁵⁷で調製した α,β -不飽和ラクトン **20** に対し、ギルマン試薬を作用させることで立体選択的にラクトン **24** を合成した。ラクトン **24** で新たに形成したメチル基の立体配置は結合定数と NOESY の相関により決定した (Figure 4-12)。ラクトン **24** は *N,O*-dimethyl hydroxylamine hydrochloride と *i*-PrMgBr により開環し、引き続き MOM 保護により Weinreb アミド **25** を得た。Weinreb アミド **25** は LAH 還元によりアルデヒド **19** とし、Brown のアリル化⁵⁶によりホモアリルアルコール **26** (ジアステレオマー比 7.4:1) を得た。得られたホモアリルアルコール **26** に改良 Mosher 法⁵²を適用することで新たに形成した水酸基の立体配

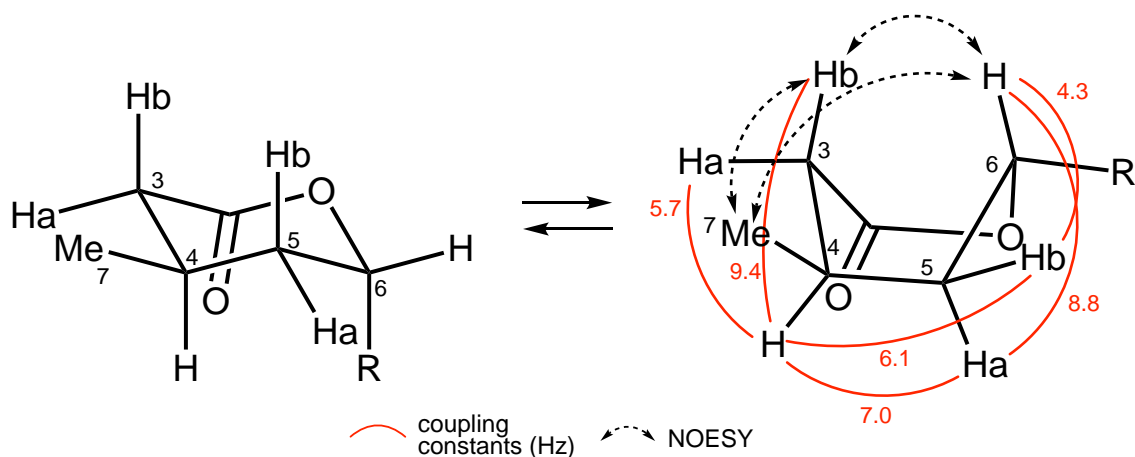


Figure 4-12. ラクトン **24** におけるメチル基の絶対立体配置を決定した (Figure 4-13)。



^1H NMR chemical shifts of **26**-Mosher ester

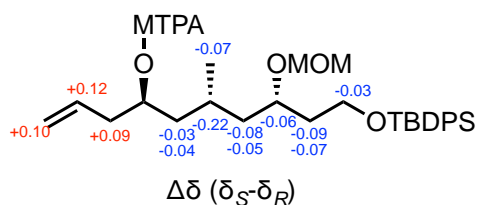


Figure 4-13. ホモアリルアルコール **26** の水酸基の立体配置の決定

ホモアリルアルコール **26** は acryloyl chloride によりアシル化し、第一世代 Grubbs 触媒により閉環メタセシスを行い α,β -不飽和ラクトン **28** を得た。 α,β -不飽和ラクトン **28** に対し、ギルマン試薬を作用させることで立体選択的にラクトン **29** を合成した。ラクトン **29** で新たに形成したメチル基の立体配置は結合定数と NOESY の相関により決定した (Figure 4-14)。ラクトン **29** は *N,O*-dimethyl hydroxylamine hydrochloride と $i\text{PrMgBr}$ により開環し、引き続き MOM 保護により Weinreb アミド **16a** を得た。

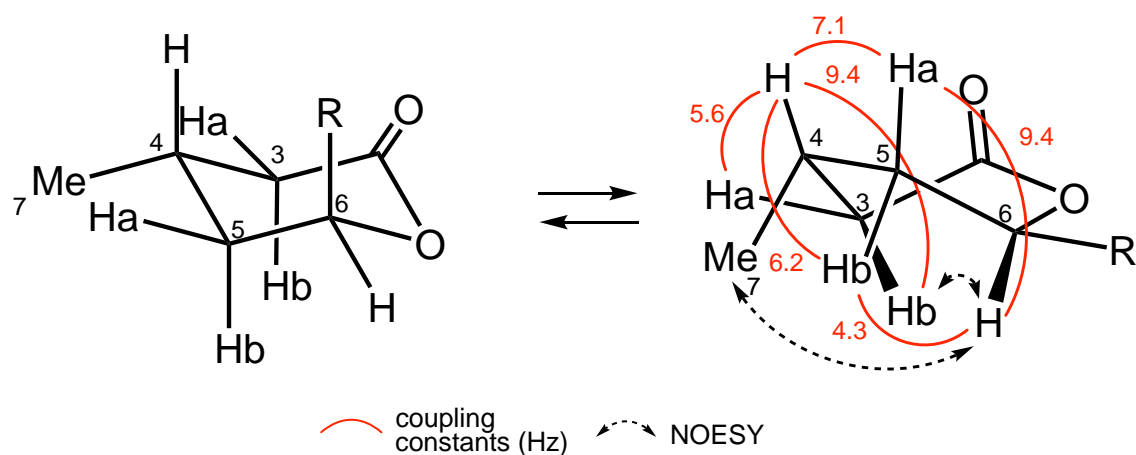
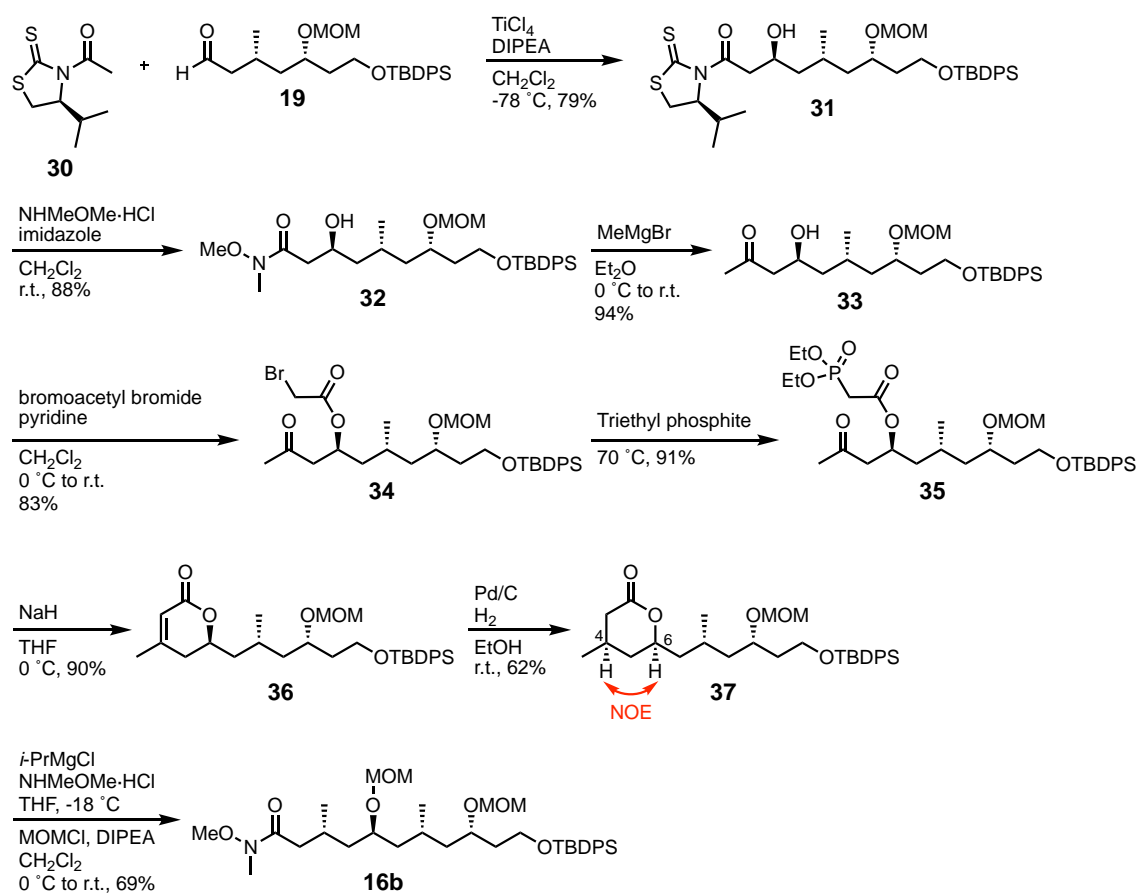


Figure 4-14. ラクトン **29** におけるメチル基の絶対立体配置

Weinreb アミド **16b** の合成 (Scheme 4-9)

Scheme 4-9. Weinreb アミド **16b** の合成



チオチアゾリジン **30** は既知の方法により合成した⁵⁸。チオチアゾリジノン **30** のチタンエノラートに対しアルデヒド **19** を作用させることでアミド **31** が単一

の異性体として得られた。得られたアミド **31** に改良 Mosher 法⁵² を適用することで新たに形成した水酸基の立体配置を決定した (Figure 4-15)。

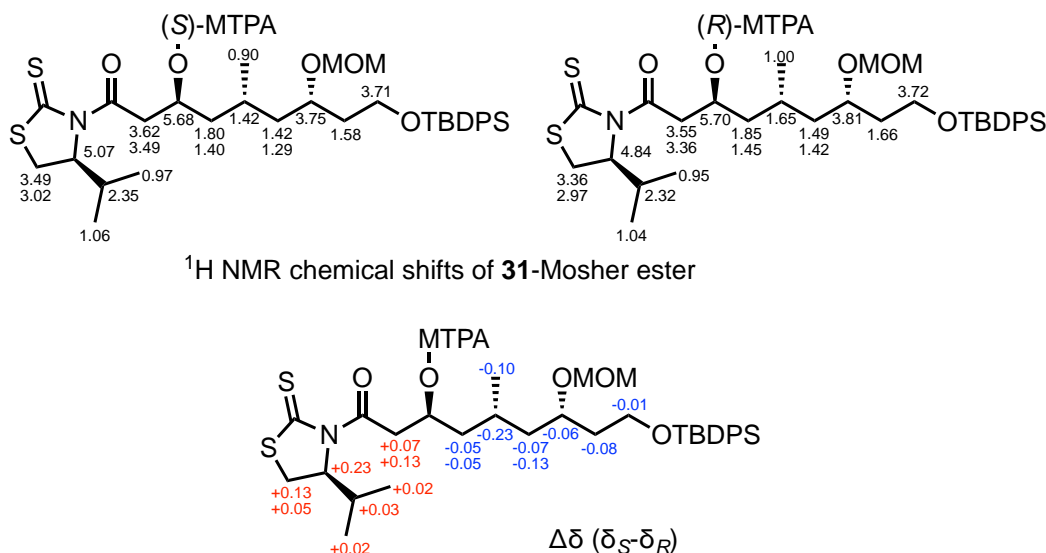


Figure 4-15. アミド **31** の水酸基の立体配置の決定

アミド **31** を Weinreb アミド **32** へ変換し、MeMgBr を作用させることで β -ヒドロキシケトン **33** を得た。 β -ヒドロキシケトン **33** のブロモアセチル化を行い、Michaelis-Arduzov 反応を行うことでホスホン酸エステル **35** を得た。ホスホン酸エステル **35** に対して分子内 Horner-Wadsworth-Emmons 反応を行うことで α,β -不飽和ラクトン **36** を得た。 α,β -不飽和ラクトン **36** に対して水素添加を行うことで立体選択的にラクトン **37** を得た。ラクトン **37** で新たに形成したメチル基の立体化学は結合定数と NOESY の相関により決定した (Figure 4-16)。ラクトン **37** は *N,O*-dimethyl hydroxylamine hydrochloride と ⁱPrMgBr により開環し、引き続き MOM 保護により Weinreb アミド **16b** を得た。

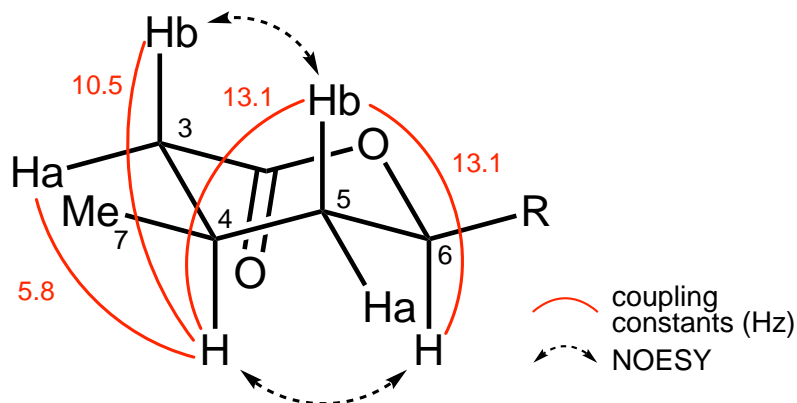
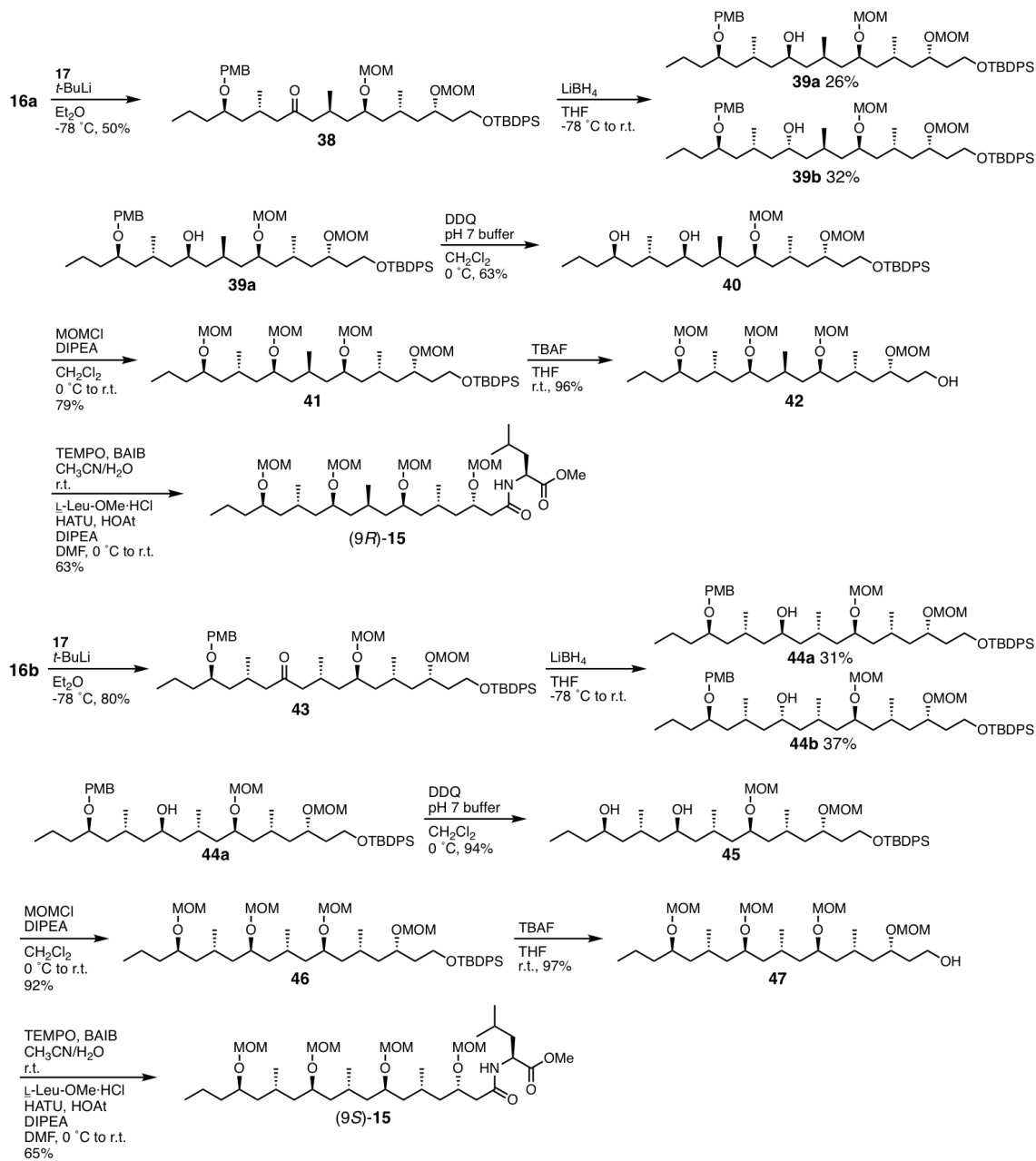


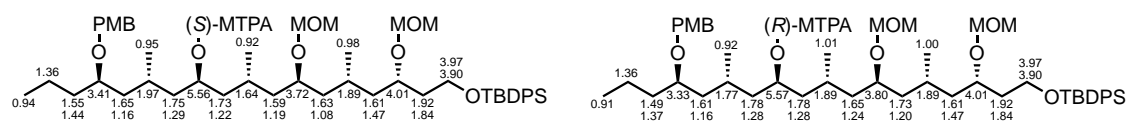
Figure 4-16. ラクトン **29** におけるメチル基の絶対立体配置

目的物 (9R)-15 と (9S)-15 の合成 (Scheme 4-10)

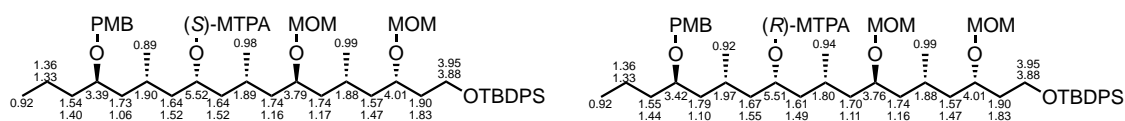
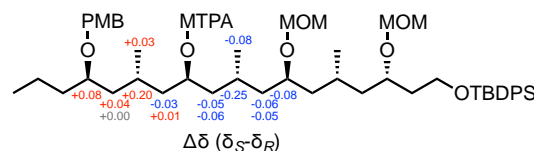
臭化物 **22** を *t*-BuLi で処理し Weinreb アミド **16a** と反応させることでケトン **38** を得た。ケトン **38** を LiBH₄ で還元することで2つのジアステレオマー**39a** と **39b** を得た。2つのジアステレオマー**39a** と **39b** は HPLC により分離した。得られたアルコール **39a** と **39b** の立体配置は、改良 Mosher 法⁵²を適用することで決定した (Figure 4-17)。アルコール **39a** の PMB 基を除去し、MOM 保護を行うことで MOM 保護体 **40** を得た。MOM 保護体 **40** の TBDPS 基を除去することでアルコール **42** へと変換した。アルコール **42** に対して TEMPO 酸化を行い、得られた粗カルボン酸と L-Leu-OMe·HCl を縮合することで目的とする (9R)-15 を合成した。もう一方の立体異性体である (9S)-15 は **16b** を原料として同様の反応により合成した。アルコール **44a** と **44b** の立体配置は改良 Mosher 法⁵²にて決定した (Figure 4-18)。

Scheme 4-10. 目的物 (9*R*)-15 と (9*S*)-15 の合成





¹H NMR chemical shifts of **39a**-Mosher ester



¹H NMR chemical shifts of **39b**-Mosher ester

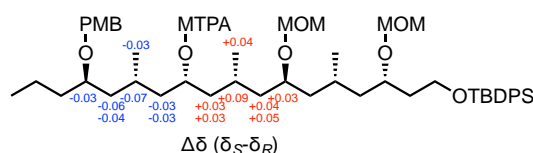
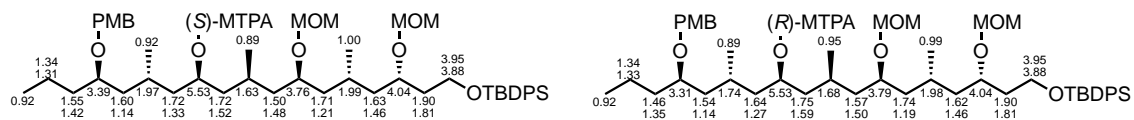
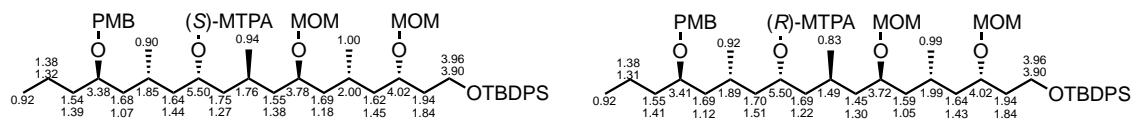
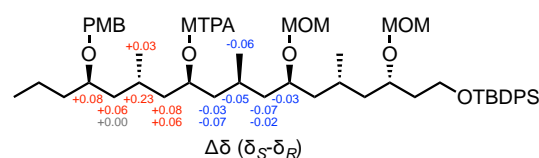


Figure 4-17. アルコール **39a** と **39b** の水酸基の立体配置の決定



¹H NMR chemical shifts of **44a**-Mosher ester



¹H NMR chemical shifts of **44b**-Mosher ester

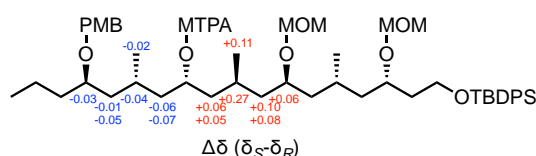


Figure 4-18. アルコール **44a** と **44b** の水酸基の立体配置の決定

合成した (9*R*)-**15** と (9*S*)-**15** の ¹H NMR スペクトルを天然物由来の **15** と比較した結果、(9*S*)-**15** と一致し、(9*R*)-**15** とは一致しなかった (Figure 4-19)。このため、

fatty acid の C9 位の絶対立体配置を *S* と決定した。

以上の結果より minnamide A (2) の絶対立体配置を以下に示す通りに決定した。

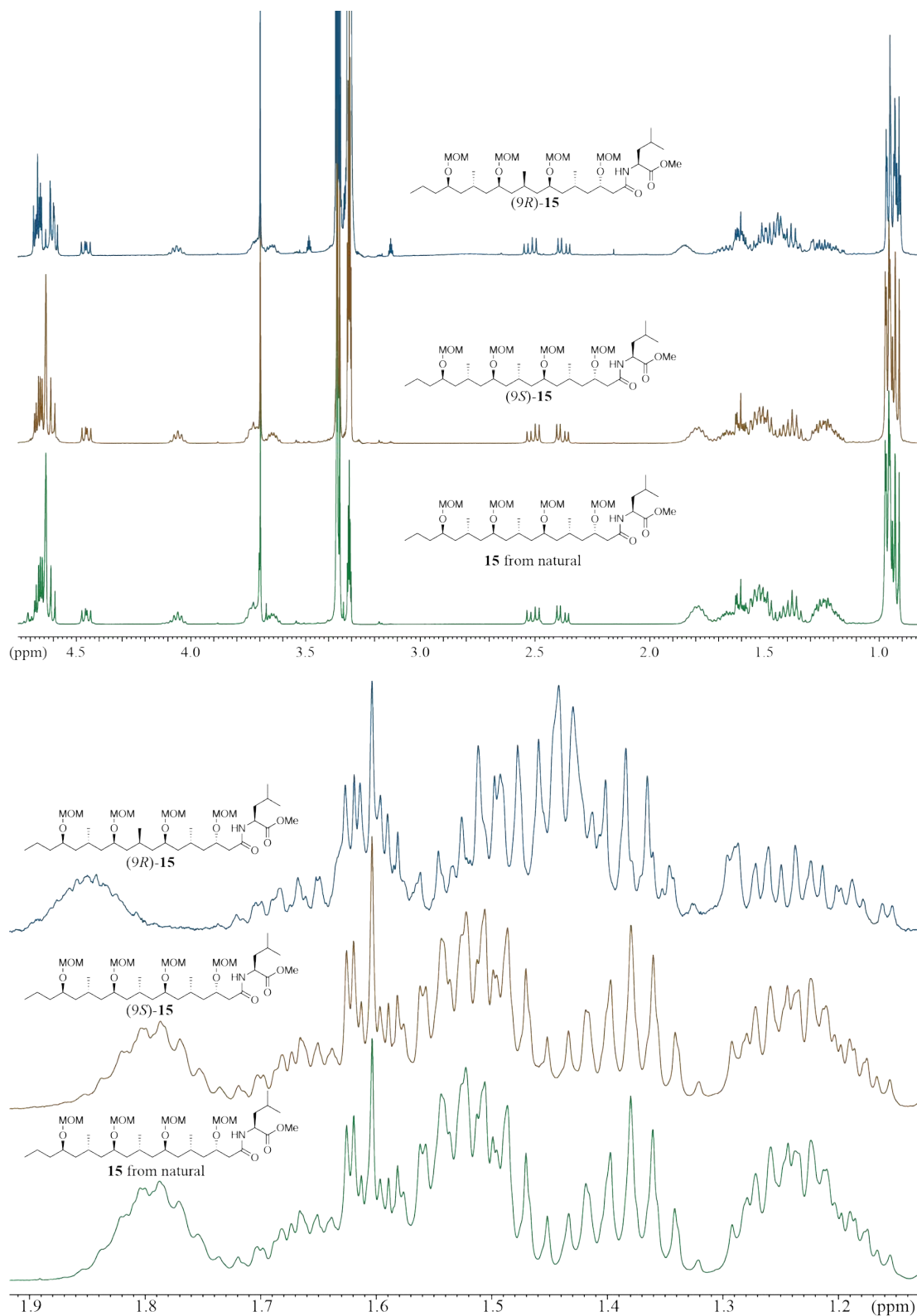
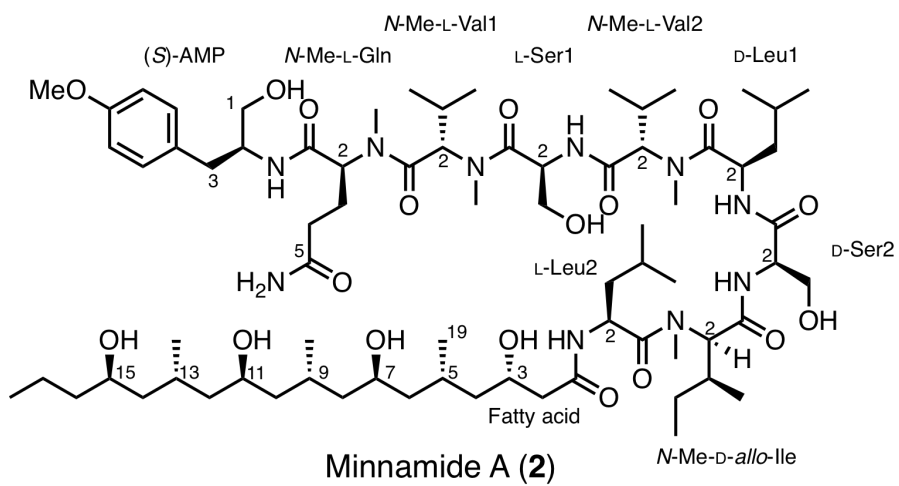


Figure4-19. 天然由来品と合成品の ^1H NMR の比較



第5節 Minnamide A の生物活性

Minnamide A (2) の HeLa 細胞に対する増殖阻害活性を MTT アッセイ³³ により評価した。その結果、minnamide A (2) の 50%増殖阻害濃度(IC₅₀) は 0.17 μM であった。また、HeLa 細胞を高濃度 (2 μM) の minnamide A (2) で処理することで細胞死が素早く誘導されることが確認された (Figure 4-20)。この時に誘導された細胞死の形態的特徴はネクローシスと類似していた³⁴ (Figure 4-20F)。

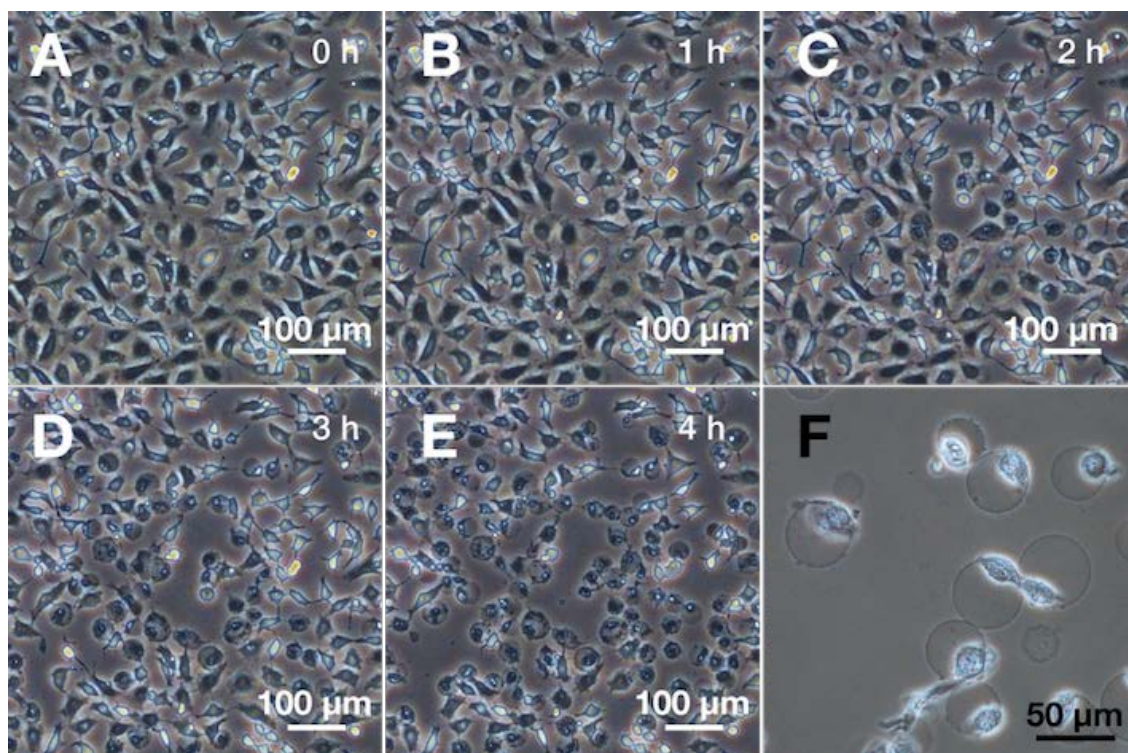


Figure 4-20. 2 μM の minnamide A により誘導された HeLa 細胞の細胞死 (A-E) Minnamide A 処理における各時間経過後の HeLa 細胞、(F) Minnamide A により誘導された細胞死

次に阻害剤となり得る種々の物質を添加して minnamide A (2) の誘導する細胞死への影響を評価した (Figure 4-21)。その結果、minnamide A (2) の誘導する細胞死は、抗酸化剤 (α -tocopherol: Toc, coenzyme Q₁₀: CoQ₁₀, *N*-acetyl-L-cysteine: NAC, thiourea: TU) と銅キレーター (bathocuproinedisulfonic acid: BCPS、ammonium tetrathiomolybdate: TTM)、鉄キレーター (deferoxamine: DFOM)、金属キレーター (EDTA、CDTA、DMSA) により阻害されることが明らかとなった。これらの結果は minnamide A (2) の誘導する細胞死に活性酸素種 (ROS) と複数種類の金属イオンが関与することを示した。

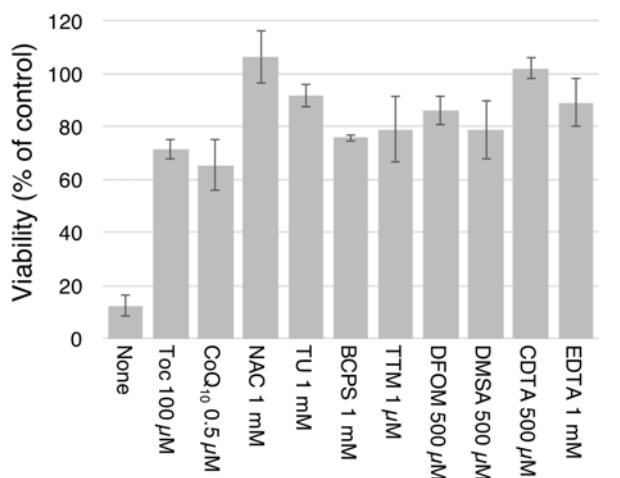


Figure 4-21. 阻害剤による前処理を行った HeLa 細胞に対して 2 μM の minnamide A 処理における細胞生存率 (エラーバーは標準誤差を示す)

Minnamide A (2) の誘導する細胞死に対する金属イオンの特異性を調べるために、種々の金属イオンを minnamide A と併用処理することで評価した(Figure 4-22)。その結果、銅イオンとマンガンイオンは、顕著に minnamide A (2) の誘導する細胞死を促進した。また、鉄イオン、亜鉛イオン、クロムイオン、鉛イオンは弱いながらも細胞死を促進した。これに対してマグネシウムイオン、コバルトイオンについては minnamide A (2) の誘導する細胞死を促進しなかった。生体内での酸化還元に関与する亜セレン酸塩は minnamide A (2) の誘導する細胞死を促進しなかった (Figure 4-22)。

現在までに、いくつかの細胞死において金属イオンの関与により、細胞内の lipid ROS (Reactive Oxygen Species) が増加することが報告されている⁵⁹⁻⁶¹。このため、minnamide A (2) の誘導する細胞死でも金属イオンと lipid ROS が関連していると考え、細胞内の lipid ROS を蛍光プローブ C11-BODIPY により定量した (Figure 4-23)。その結果、HeLa 細胞内の lipid ROS は minnamide A (2) の濃度依存的に増加した。このことから minnamide A (2) が HeLa 細胞に対して lipid ROS の蓄積を誘導することが明らかとなった。また、minnamide A (2) による lipid ROS の増加は、抗酸化剤である α-tocopherol により抑制された。銅キレーターである BCPS も同様に minnamide A (2) による lipid ROS の増加を抑えた。これらの結果から、詳細な機構は不明であるが、銅イオンが細胞内の lipid ROS 蓄積に関与していることが明らかとなった。金属イオンと lipid ROS の蓄積に関する詳細は 6 節にて考察を行う。

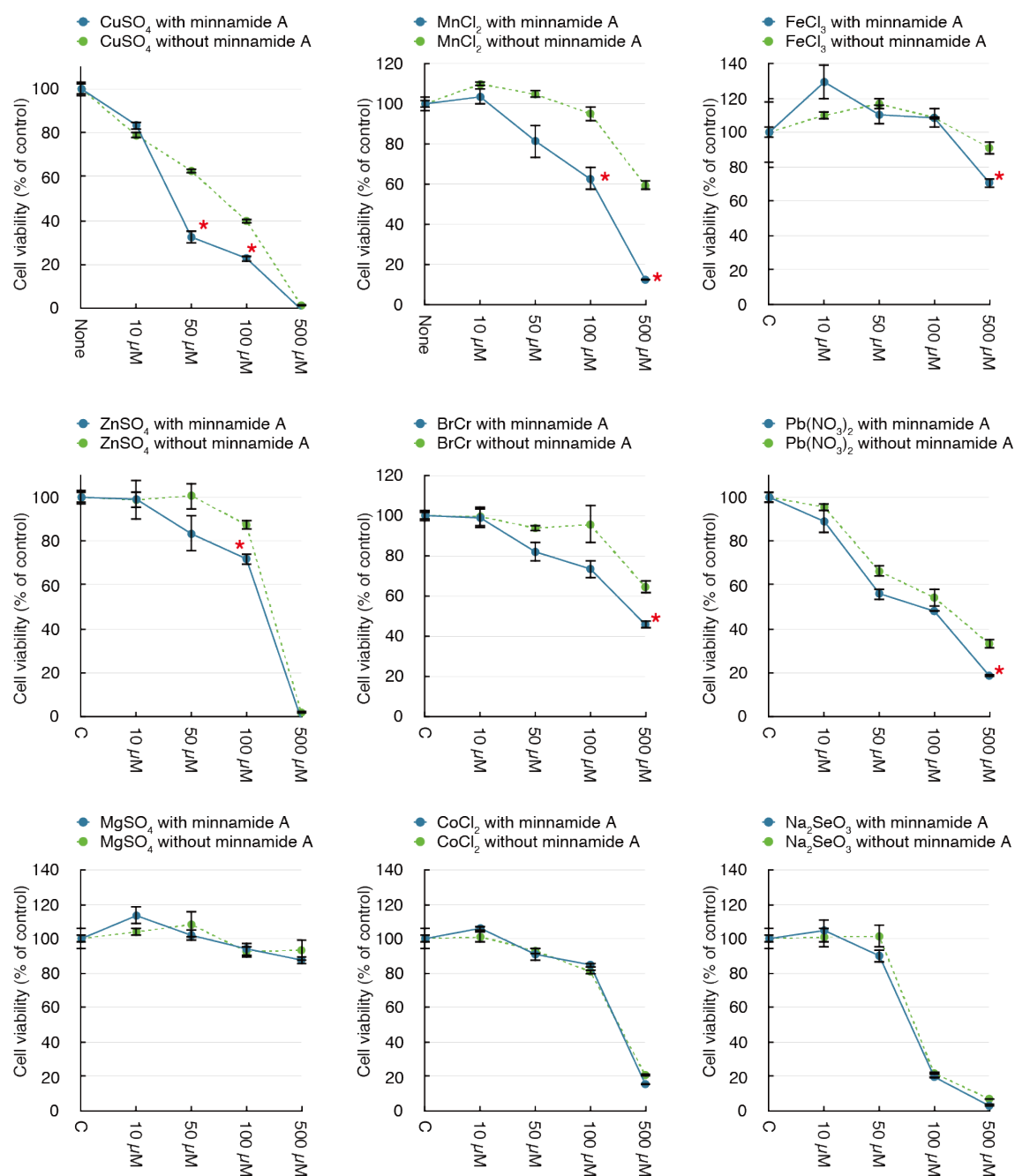


Figure 4-22. 金属塩または亜セレン酸塩による前処理を行った HeLa 細胞に対して 0.9 μM の minnamide A (2) を処理した際の細胞生存率、エラーバーは標準誤差を示す

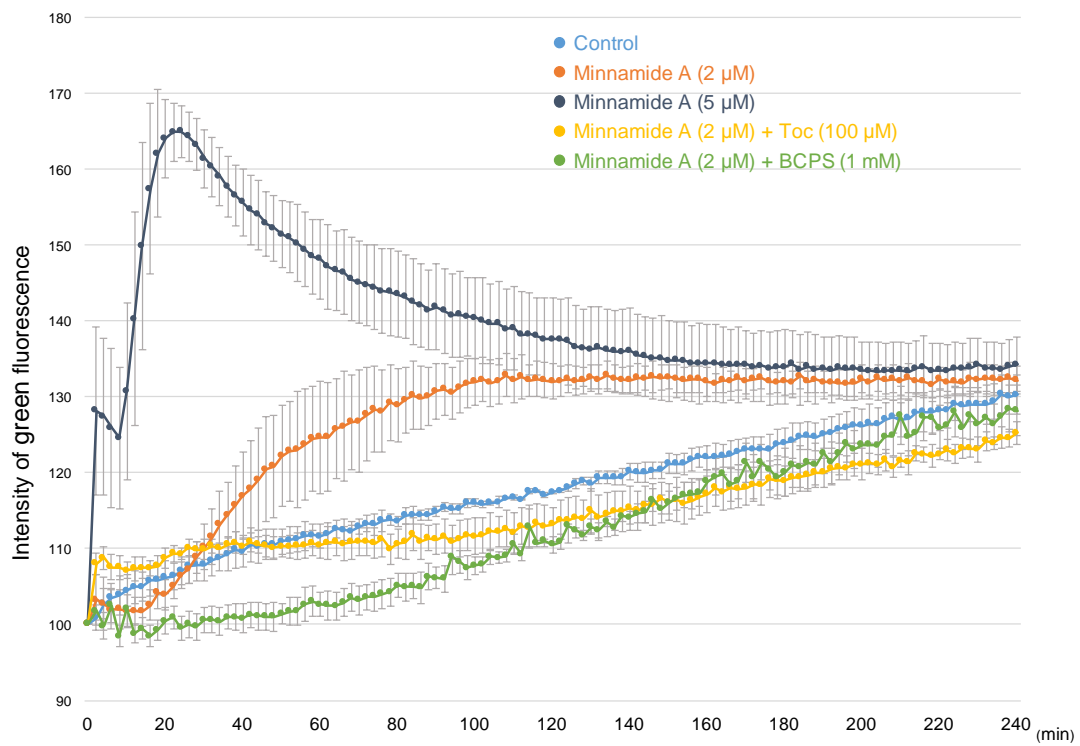


Figure 4-23. HeLa 細胞における細胞内 lipid ROS の定量

第6節 考察

Minnamide A (2) は海洋シアノバクテリア *O. hirsuta* より単離された鎖状リポペプチドである。Minnamide A (2) に含まれる fatty acid 部位は水酸基と β -branch 型のメチル基による特徴的な繰り返し構造を持つ。ポリケチドの生合成において、 β -branch は 1). β -ケトンから還元と脱水により生成された α,β -不飽和カルボニルに対するマイケル付加 (Figure 4-24A)、2). β -ケトンに対するアルドール反応 (Figure 4-24B) の 2 種類の生合成経路により形成されることが報告されている⁶²。Apratoxin A⁶³ (Figure 4-25) は β -branch 型のメチル基を含む海洋シアノバクテリア由来の NRPS/PKS 化合物であり、その β -branch 型のメチル基はアルドール反応と引き続き脱水と脱炭酸、二重結合の還元により形成されると考えられている¹³。このため、minnamide A (2) の β -branch 型のメチル基も同様の生合成経路で合成されていると推測される。しかしながら、minnamide A (2) の持つ特徴的な繰り返し構造は他の天然物において例がなく、その生合成機構は興味を持たれる。

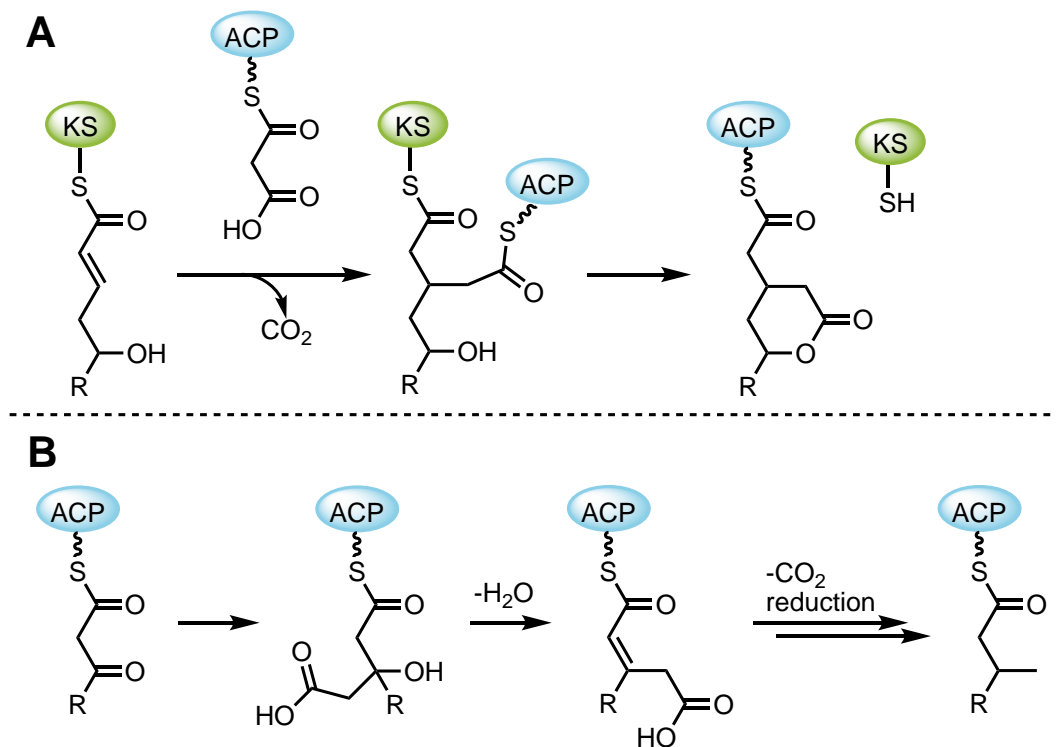


Figure 4-24. β -branch の生合成機構

(A) マイケル付加による β -branch の形成、(B) アルドール反応による β -branch の形成

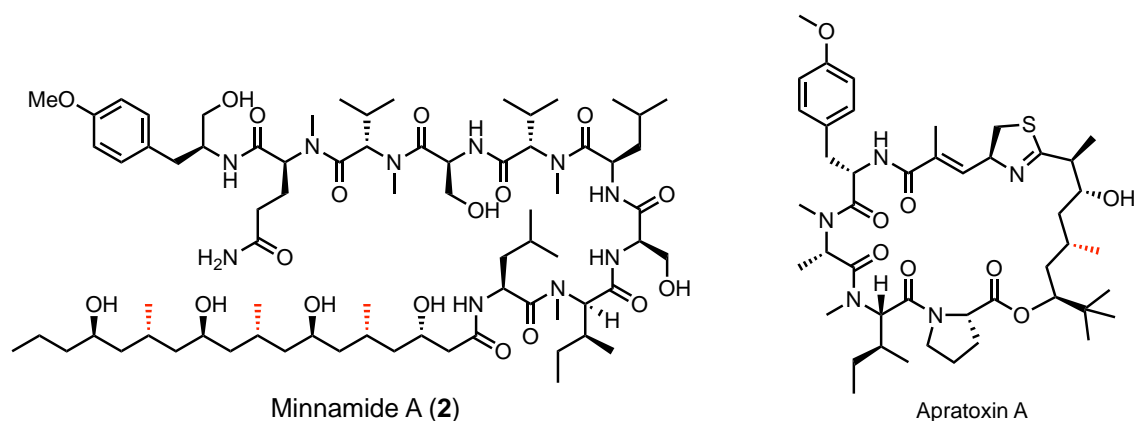


Figure 4-25. Minnamide A と Apratoxin A の構造
 それぞれの化合物に含まれる β -branch 型のメチル基を赤で示した

Minnamide A (2) が誘導する HeLa 細胞の細胞死は、銅イオンが関与する lipid ROS の蓄積により引き起こされると推測される。金属イオンが関与する lipid ROS の蓄積により誘導される細胞死は、現在までにいくつか報告例がある⁵⁹⁻⁶¹。その中でも研究が進んでいるのが ferroptosis⁶¹ と呼ばれる細胞死であり、鉄イオンが関与する lipid ROS の蓄積により細胞死が誘導されることが明らかとなっている。このため、ferroptosis は鉄イオンに着目した抗がん剤の創薬研究や、アルツハイマーなどの鉄イオンと活性酸素が関与する神経病の生理学的研究に利用されている。Ferroptosis は 1). 抗酸化剤および鉄キレーターにより阻害され、2). lipid ROS の蓄積を促進し、3). lipid ROS の蓄積が抗酸化剤と鉄キレーターにより抑制される、といった 3 点において minnamide A (2) の誘導する細胞死とよく類似している。また、Ferroptosis は詳細な作用機序が知られており (Figure 4-26)、生体内の酸化ストレスに対する応答機構が破綻することにより引き起こされることが明らかとされている。Ferroptosis の初期の段階は生体内に存在する抗酸化酵素であるグルタチオンペルオキシターゼ 4 (GPx4) の働きが低下することで引き起こされる。Ferroptosis の誘導剤として有名な erastin は system x_c^- と呼ばれるシスチン・グルタミンアンチポーターを阻害する⁵³。その結果、細胞内のシスチン及びシステインが減少し、システインから誘導されるグルタチオンが減少する。生体内で GPx4 が ROS を還元するためにはグルタチオンが必要となるため、結果として GPx4 の働きが低下する。また、他の ferroptosis の誘導剤である RSL3 は GPx4 の働きを直接阻害する⁶⁴。そこへ Fe^{2+} を介して ROS が発生すると、GPx4 による還元が正常に働かないため細胞内に

ROS が蓄積し、細胞は死にいたる。Minnamide A (2)の誘導する細胞死は多くの点で類似しているため ferroptosis と類似した作用機序を持つと推測される。Ferroptosis で発生する lipid ROS が鉄依存的であるのに対し、minnamide A (2) の誘導する lipid ROS の上昇は銅キレーターにより完全に抑えられることが本研究で確認された。2つの細胞死において、lipid ROS に関与する金属イオンの種類が異なるという点は、興味深い。しかしながら、本研究で用いた使用した培養細胞と ferroptosis 研究でよく使用される培養細胞はその系列がことなるため、関与する金属イオンの違いが作用機序によるものなのか細胞系列の特徴によるものなのかは定かではない。今後は同じ培養細胞を用いた詳細な比較実験が望まれる。

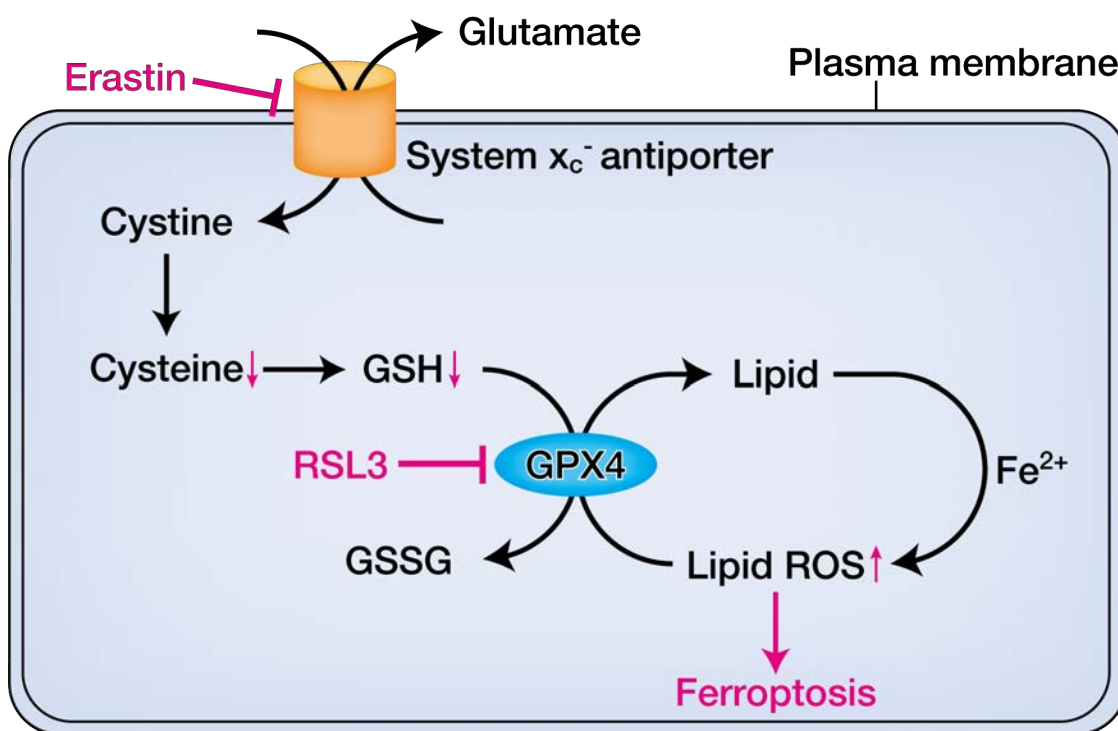


Figure 4-26. Ferroptosis の作用機序

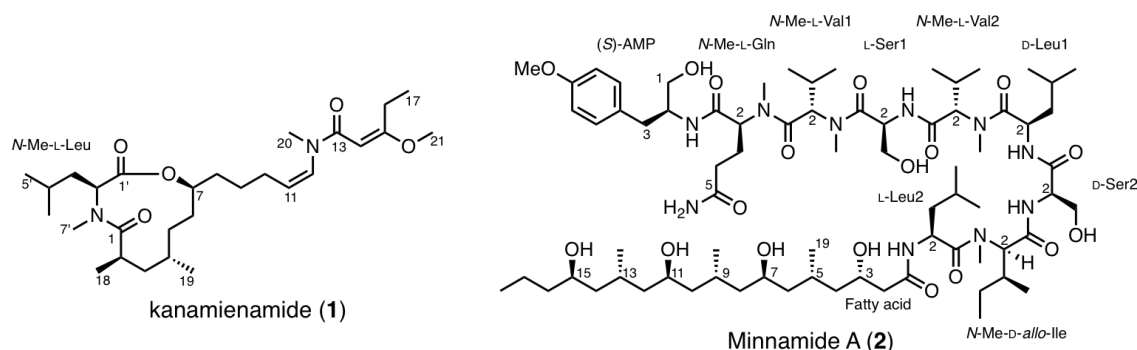
Ferroptosis の誘導剤と細胞内で引き起こされる変化について赤字で示す

細胞内の銅イオン濃度上昇が確認されるがん細胞⁶⁵と銅イオンにより誘導される ROS の生産が関与する神経変性疾患^{59,60,66}が現在までにいくつか報告されている。Minnamide A (2) の誘導する細胞死の詳細な作用機序を解明することで、銅イオンに着目した抗がん剤の開発や神経変性疾患のメカニズム解明に貢献できることを期待する。

第5章 総括

本研究で生物活性物質を生産する海洋シアノバクテリアの種同定方法(single filament PCR)を確立した。本手法は培養株を確立する必要がなく、形態観察と系統解析を組み合わせて議論できるため迅速かつ正確な種同定を可能とする。

本研究で海洋シアノバクテリア *M. bouillonii* より kanamienamide (1) を *O. hirsuta* より Minnamide A (2) をそれぞれ単離した。



Kanamienamide (1) は *N*-Me-エナミドに隣接したエノールエーテル構造を有するエナミドであり、この部分構造を持つ天然物は初の報告例となる。Kanamienamide (1) のもつエノールエーテル構造は、近縁な海洋シアノバクテリアでの報告例^{39,40}により生合成系路が推測できる。一方、*N*-Me-エナミド構造の生合成経路はいくつかの生物種において報告^{44,45}されているが、kanamienamide (1)の有する *N*-Me-エナミドとは構造的特徴が異なる。このため、kanamienamide (1) の *N*-Me-エナミド構造は、既知の生合成経路とは異なる経路で形成されると考えられる。Kanamienamide (1) 生産シアノバクテリアのゲノム解析を通じて新たな生合成酵素の発見が期待される。

Minnamide A (2) は水酸基と β -branch 型メチル基の繰り返し構造からなる脂肪酸を有する直鎖リポペプチドであり、この繰り返し構造は天然物で初の報告例となる。Minnamide A (2) は HeLa 細胞の増殖を阻害し、その 50%増殖阻害濃度 IC_{50} は $0.17 \mu\text{M}$ であった。また、minnamide A (2) は HeLa 細胞に対してネクローシス様の細胞死を誘導した。さらに、Minnamide A (2) の誘導する細胞死について 1). 抗酸化剤および金属イオンのキレーターによる阻害、2). Minnamide A (2)の濃度依存的な lipid ROS の増加、3). 抗酸化剤 α -tocopherol もしくは銅キレーター-BCPS による lipid ROS の増加抑制、が確認された。これらの事実から、minnamide A (2) の誘導する細胞死は銅イオンによる lipid ROS の増加によると推定される。Minnamide A (2) の誘導する細胞死の作用機序を明らかにすること

によって、銅イオンの関わる抗がん剤の開発や神経変性疾患のメカニズム解明への貢献が期待される。

第 6 章 実験方法

第 1 項 一般操作

General

Chemicals and solvents were best grade available and used as received from commercial sources. All NMR spectral data were recorded of a JEOL JNM-ECX-400 spectrometer or JNM-A400 for ^1H (400 MHz) and ^{13}C (100 MHz). ^1H NMR chemical shifts (referenced to residual $\text{C}_5\text{HD}_4\text{N}$ observed at δ_{H} 8.71, CHD_2OD observed at δ_{H} 3.31, CHCl_3 observed at δ_{H} 7.26 and C_6HD_5 observed at δ_{H} 7.16) were assigned using a combination of data from COSY, TOCSY and HMQC experiments. Similarly, ^{13}C NMR chemical shifts (referenced to residual $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ observed at δ_{C} 149.9, CD_3OD observed at δ_{C} 49.00 and CDCl_3 observed at δ_{H} 77.16 and C_6D_6 observed at δ_{C} 128.06) were assigned based on HMBC and HMQC experiments. ESI mass spectra were obtained on an LCT premier EX spectrometer (Waters). Optical rotations were measured with a JASCO DIP-1000 polarimeter. IR spectra were recorded on a JASCO RT/IR-4200 instrument. Chromatographic analyses were performed using an HPLC system consisting of a pump (model PU-2080, Jasco) and a UV detector (model UV-2075 or MD-2010, Jasco). Semipreparative HPLC was performed on a Cosmosil series (Nacalai Tesque, Japan). Reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC), and spots were visualized with UV detection (254 nm) or through staining with phosphomolybdic acid solution or $\text{KMnO}_4/\text{K}_2\text{CO}_3$. TLC analysis was conducted on E. Merck precoated silica gel 60 F254. Chromatographic purification of products was performed using Silica Gel 60, spherical, neutral (Nacalai Tesque, Japan). Organic reagents for nonaqueous reaction were distilled from the following drying agents: Et_2O (Na-benzophenone), EtOH (calcium hydride) and pyridine (calcium hydride). Anhydrous THF, CH_2Cl_2 and DMF were used as obtained from commercial supplies. All moisture sensitive reactions were performed with standard syringe in septa techniques and starting materials were azeotropically dried with toluene before use. Commercially available reagents were used without further purification unless otherwise noted.

Culturing conditions of HeLa cells

HeLa cells were cultured at 37 °C with 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (Nissui) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 0.25 µg/mL amphotericin, 300 µg/mL L-glutamine and 2.25 mg/mL NaHCO₃.

Evaluation of inhibitory activity against HeLa cells

HeLa cells were seeded at 4×10^3 cells/well in 96-wells plates (Iwaki, Japan) and cultured for 12 h. Then, several concentrations of compounds were added and the cells were incubated for 72 h. Cell proliferation was measured by the MTT assay³³.

第 2 項 Kanamienamide の構造と生物活性

Collection of marine cyanobacteria

The marine cyanobacterium *Moorea bouillonii* was collected at shore of Kanami in Tokunosima island, Kagoshima Prefecture, Japan, in June 2014. Collected sample was stored at -30 °C and small pieces of collected marine cyanobacteria were preserved for genetic analysis in RNAlater[®] (Qiagen, Hilden, Germany).

16S rDNA sequence analysis.

To remove the cyanobacterial sheaths, the cyanobacterial sample was treated with 0.1% (w/v) sarkosyl solution before isolation of single filament. The single filament of marine cyanobacteria was isolated by pipette-washing method³² under light microscope. The isolated single filament was crushed with pipette on slide glass under light microscope and dissolved in 10 µl of sterilized water. The sterilized water containing the broken filament was used as DNA template for the PCR amplification. The 16S rRNA genes were PCR amplified using the primer set CYA 106F⁶⁷, a cyanobacterial specific primer, and 16S1541R⁶⁸, a universal primer. The PCR reaction contained 10 µL of DNA template, 0.5 µL of KOD-Multi & Epi- (TOYOBO, Osaka, Japan), 12.5 µL of 2 × PCR buffer for KOD-Multi & Epi- (TOYOBO, Osaka, Japan), 1.0 µL of each primer (10 pM). The PCR reaction was carried out with a T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA) as follows: one cycle of 10 min at 94°C; 40 cycles of 10s at 98°C, 10s at 60°C, and 1 min at 68 °C; and a final elongation step of 7 min at 68 °C. PCR products were analyzed on agarose gel (1%) in TBE buffer, visualized by ethidium bromide staining, and purified by a PCR Advanced PCR clean up system (VIOGENE, New Taipei City, Taiwan). Sequences were determined with CYA 106F and 16S 1541R primers by a commercial firm (Macrogen Japan Corp., Kyoto, Japan). These sequences are available in the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number LC172270.

Phylogenetic analysis

The nucleotide sequence of 16S rRNA gene obtained in this study was used for phylogenetic analysis with the sequences of related cyanobacterial 16S rRNA gene that has been previously. All sequences were aligned by SINA web service (version 1.2.11)⁶⁹

with default settings. The poorly aligned positions and divergent regions were removed by Gblocks Server (version 0.91b)^{70,71}, implementing the options for a less stringent selection, including the ‘Allow smaller final blocks’, ‘Allow gap positions within the final blocks’ and ‘Allow less strict flanking positions’ options. The obtained 1201 nucleotide positions have been used for phylogenetic analysis. JModeltest (version 2.1.7)^{72,73} with default settings was used to select the best model of DNA substitution for the Maximum Likelihood (ML) analysis and Bayesian analysis according to the Akaike information criterion (AIC). The ML analysis was conducted by PhyML (version 20131016)⁷³, using the GTR+I+G model with a gamma shape parameter of 0.5610, a proportion of invariant sites of 0.5820 and nucleotide frequencies of $F(A) = 0.2416$, $F(C) = 0.2341$, $F(G) = 0.3189$, $F(T) = 0.2054$. Bootstrap resampling was performed on 1,000 replicates. The ML tree was visualized with Njplot (version 2.3)⁷⁴. The Bayesian analysis was conducted by MrBayes (version 3.2.5)⁷⁵ using the GTR+I+G model. The Markov chain Monte Carlo process was set at 2 chains, and 1,000,000 generations were conducted. Sampling frequency was assigned at every 500 generations. After analysis, the first 100,000 trees were deleted as burn-in, and the consensus tree was constructed. The Bayesian tree was visualized with FigTree (version 1.4.0, <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

Morphological characterization

Morphological observation was performed using a phase contrast microscopy ECLIPSE Ti-S (Nicon, Tokyo, Japan). The mean cell size and standard deviation of 30 cells were measured.

Extraction and isolation

Stored sample was thawed and the cyanobacterium sample (1000 g, wet weight) was extracted two times with 3L MeOH for one week. The extracts were combined, filtered, concentrated and partitioned between ethyl acetate (3×0.3 L) and water (0.3 L). The material obtained from the organic layer was partitioned 90% aqueous methanol (0.3 L) and hexane (3×0.3 L). The 90% aqueous methanol layer (1.1 g) was fractionated by flash column chromatography on ODS (12 g) using a solvent gradient: 40, 60, 80, 100% methanol and $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1). The 80% methanol fraction (305 mg) was subjected to HPLC [Cosmosil 5C₁₈AR-II ($\phi 20 \times 250$ mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV 215

nm; solvent 80% MeOH] in ten batches to give a fraction that contained kanamienamide (40 mg, $t_R = 47.2$ min). This fraction was further separated by HPLC [Cosmosil 5C₁₈AR-II ($\phi 20 \times 250$ mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV 215 nm; solvent 75% MeOH; room temperature] to give kanamienamide (**1**) (9.2 mg, $t_R = 52.1$ min, total yield 0.00092% based on wet weight).

kanamienamide (**1**): colorless oil; $[\alpha]_D^{26.8} -47$ (c 0.15, CHCl₃); IR (film) 2954, 2931, 2868, 1716, 1646, 1610, 1457 cm⁻¹; ¹H NMR, ¹³C NMR, COSY, HMBC and NOESY data, see Table S1; HRESIMS m/z 493.3622 [M+H]⁺ (calcd for C₂₈H₄₉N₂O₅, 493.3641).

Acid hydrolysis of **1**

To a solution of kanamienamide (**1**) (0.5 mg, 1.0 μ mol) in 1,4-dioxane (50 μ l) was added 12M HCl (50 μ L). After the reaction was stirred at 60 °C for 3 h, the reaction mixture was evaporated to dryness. *N*-Me-Leu was isolated from this acid hydrolysate by using HPLC. [Conditions for HPLC separation: column, Cosmosil 5C₁₈-PAQ ($\phi 4.6 \times 250$ mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent H₂O; room temperature. Retention time of the component: *N*-Me-Leu ($t_R = 6.1$ min)]

Chiral-phase HPLC analysis of amino acid components, *N*-Me-Leu

The fraction contained *N*-Me-Leu was dissolved in H₂O and analyzed by chiral HPLC, and the retention time was compared to those of authentic standards.

[DAICEL CHIRALPAK (MA+) ($\phi 4.6 \times 50$ mm); flow rate, 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent 2.0 mM CuSO₄; room temperature] The retention time of *N*-Me-Leu in the hydrolysate matched that of *N*-Me-L-Leu ($t_R = 11.4$ min), but not *N*-Me-D-Leu ($t_R = 19.6$ min).

Trypan blue dye exclusion assay

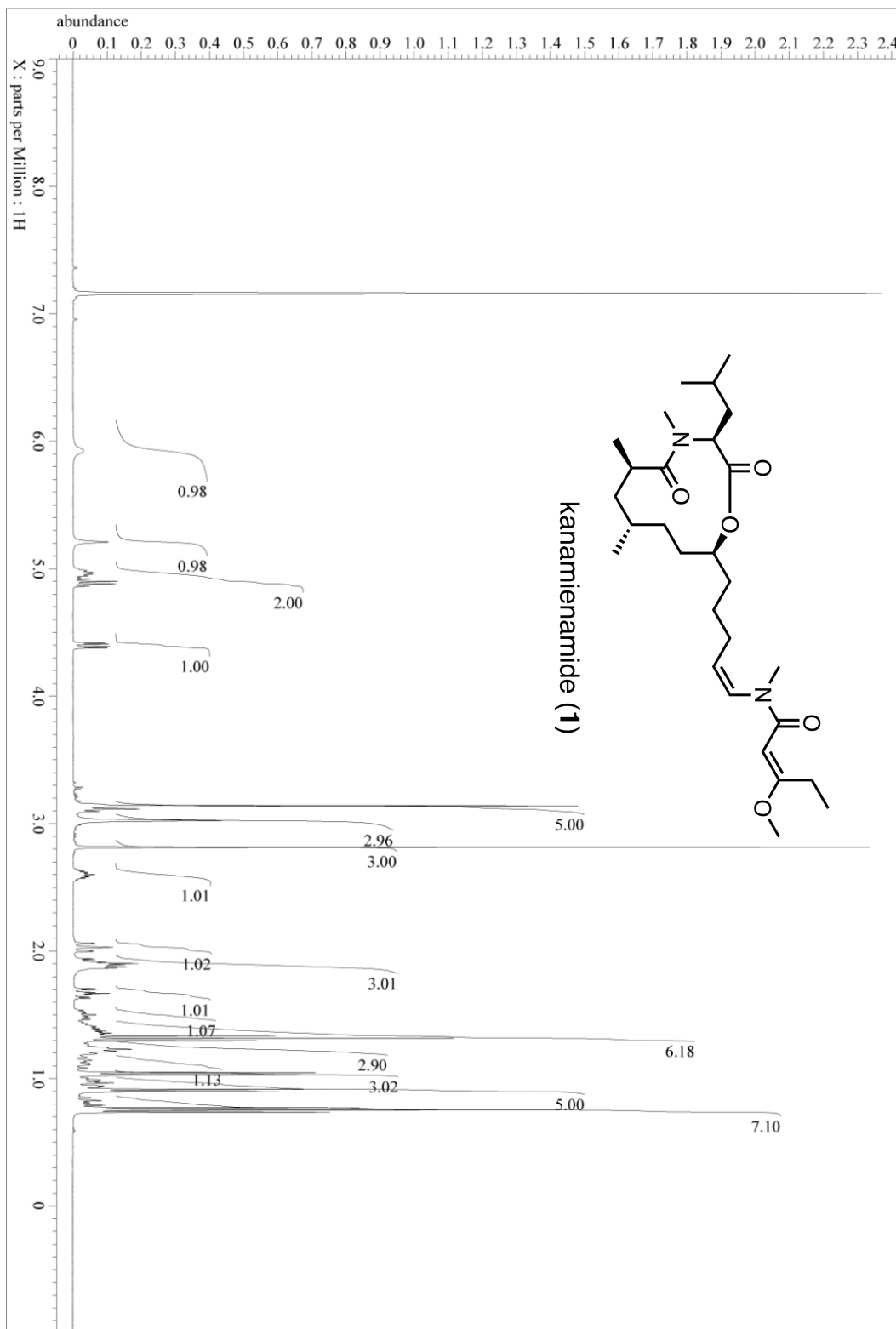
Cell viability and effect of Z-VAD-FMK were estimated by the trypan blue dye exclusion assay as described previously¹⁶.

Whole genome amplification

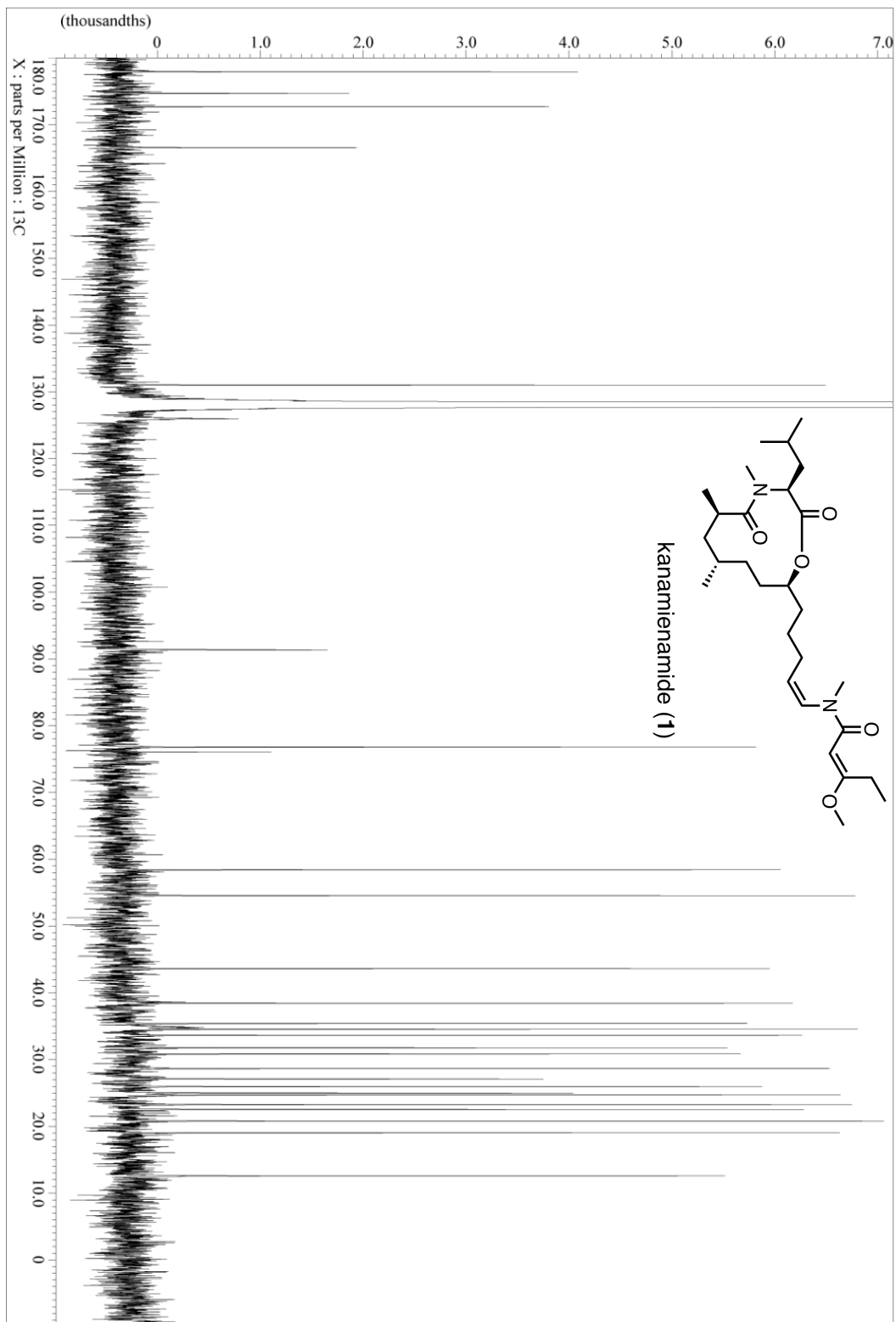
Freshly collecting sample was used for whole genome amplification. Single filament of

marine cyanobacteria was isolated by pipette-washing method³² under light microscope. The isolated single filament was crushed with pipette on slide glass under light microscope and dissolved in 1.5 µl of sterilized TE buffer. The TE buffer containing the broken filament was used as DNA template for the whole genome amplification. Whole genome amplification was performed using REPLI-g UltraFast Mini Kit (Qiagen, Germany). Amplified gDNA were analyzed on agarose gel (1%) in TBE buffer, visualized by ethidium bromide staining. Amplified gDNA were quantified by QuantiFluor® ONE dsDNA System (Promega, USA).

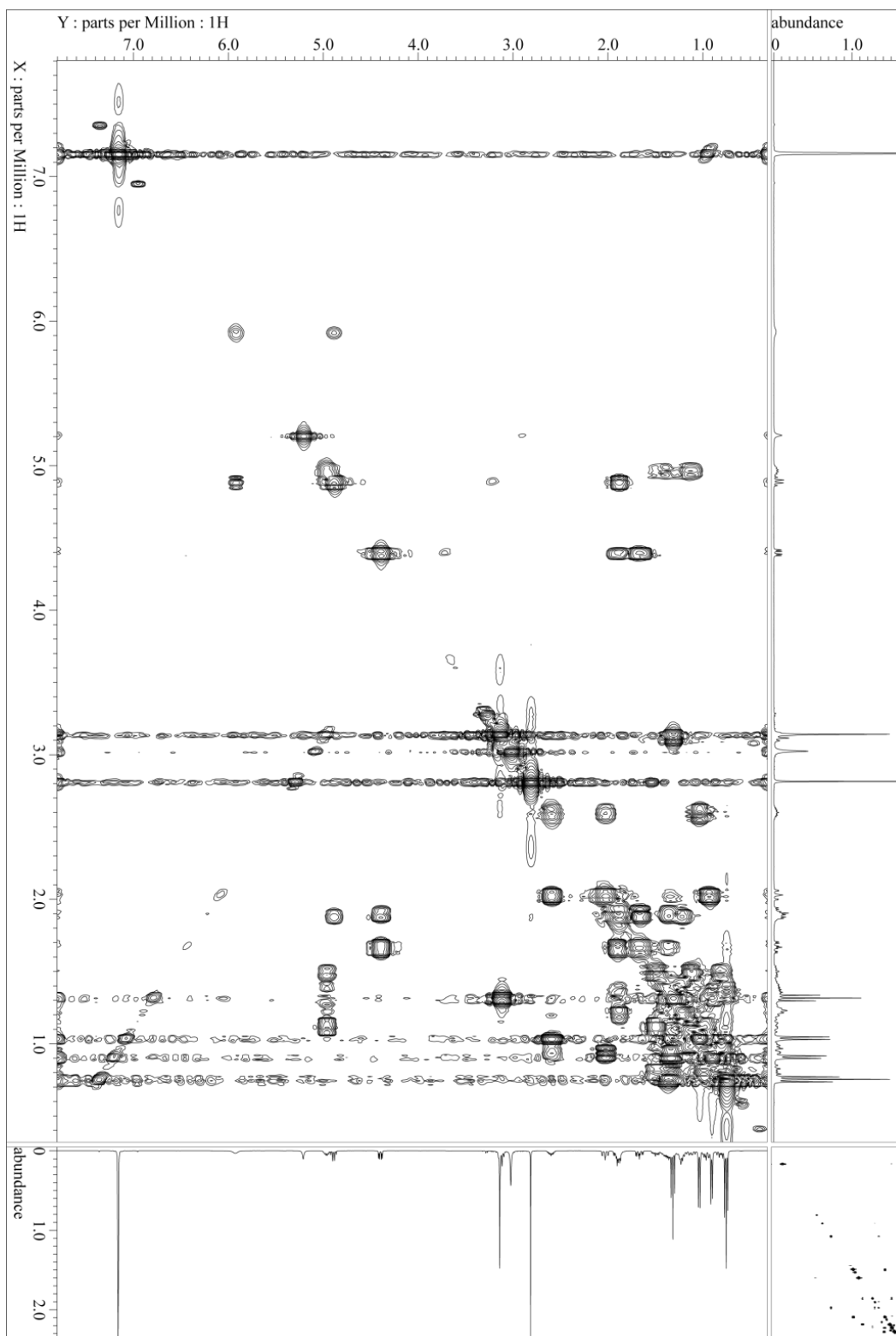
^1H NMR (400 MHz, C_6D_6) spectrum of kanamienamide (1)



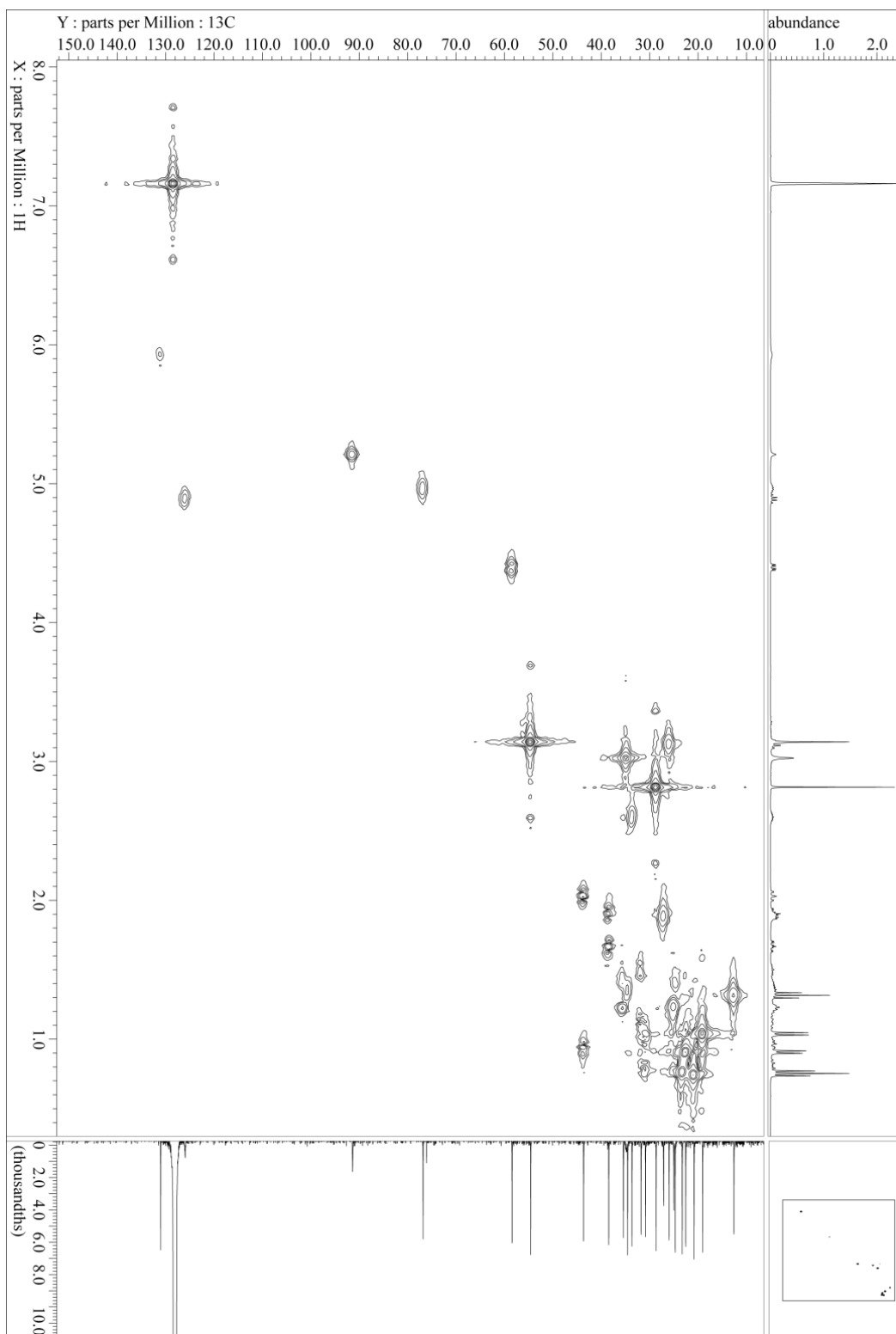
^{13}C NMR (100 MHz, C_6D_6) spectrum of kanamienamide (1)



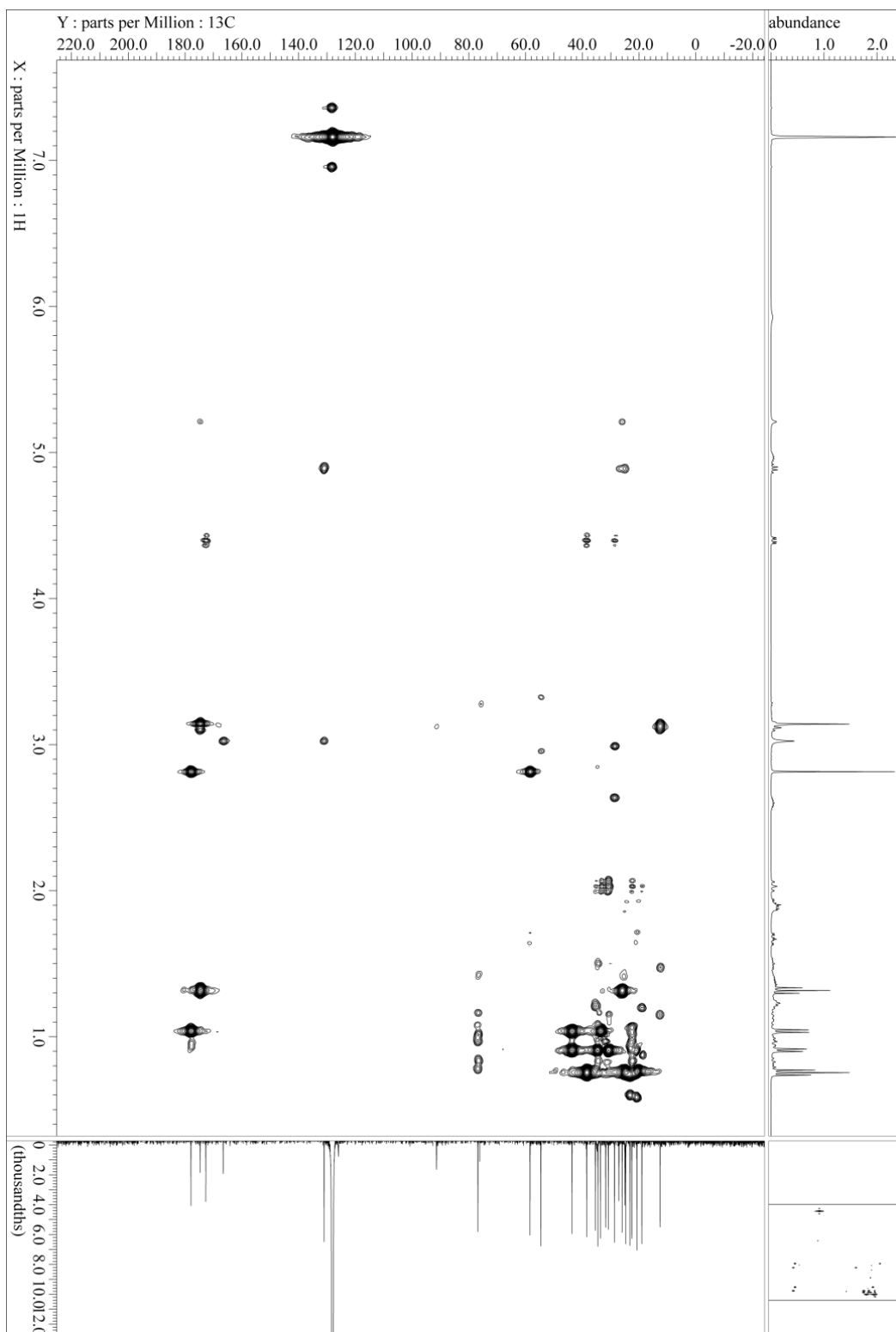
COSY (400 MHz, C₆D₆) spectrum of kanaminiamide (1)



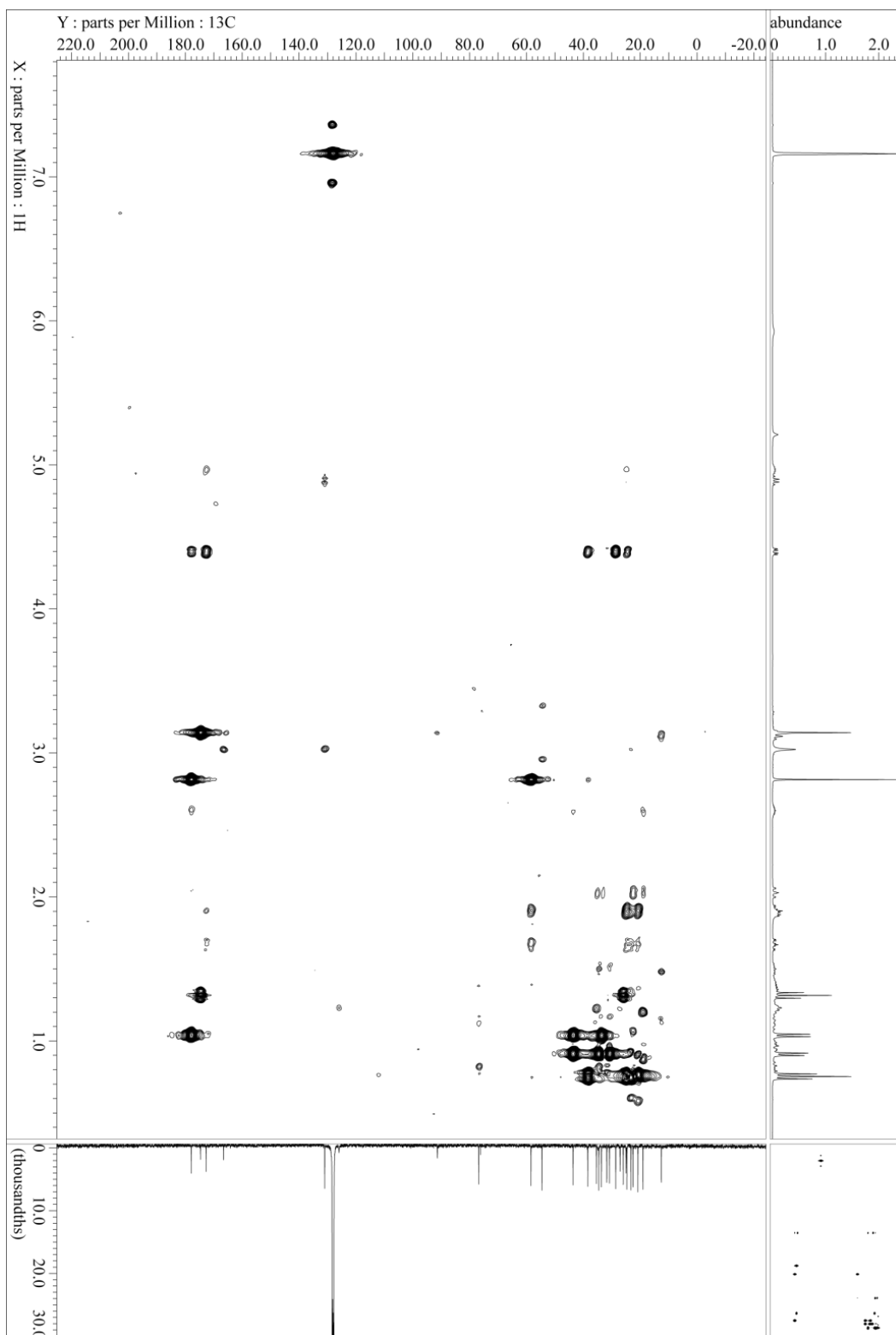
HMQC (400 MHz, C₆D₆) spectrum of kamamienamide (1)



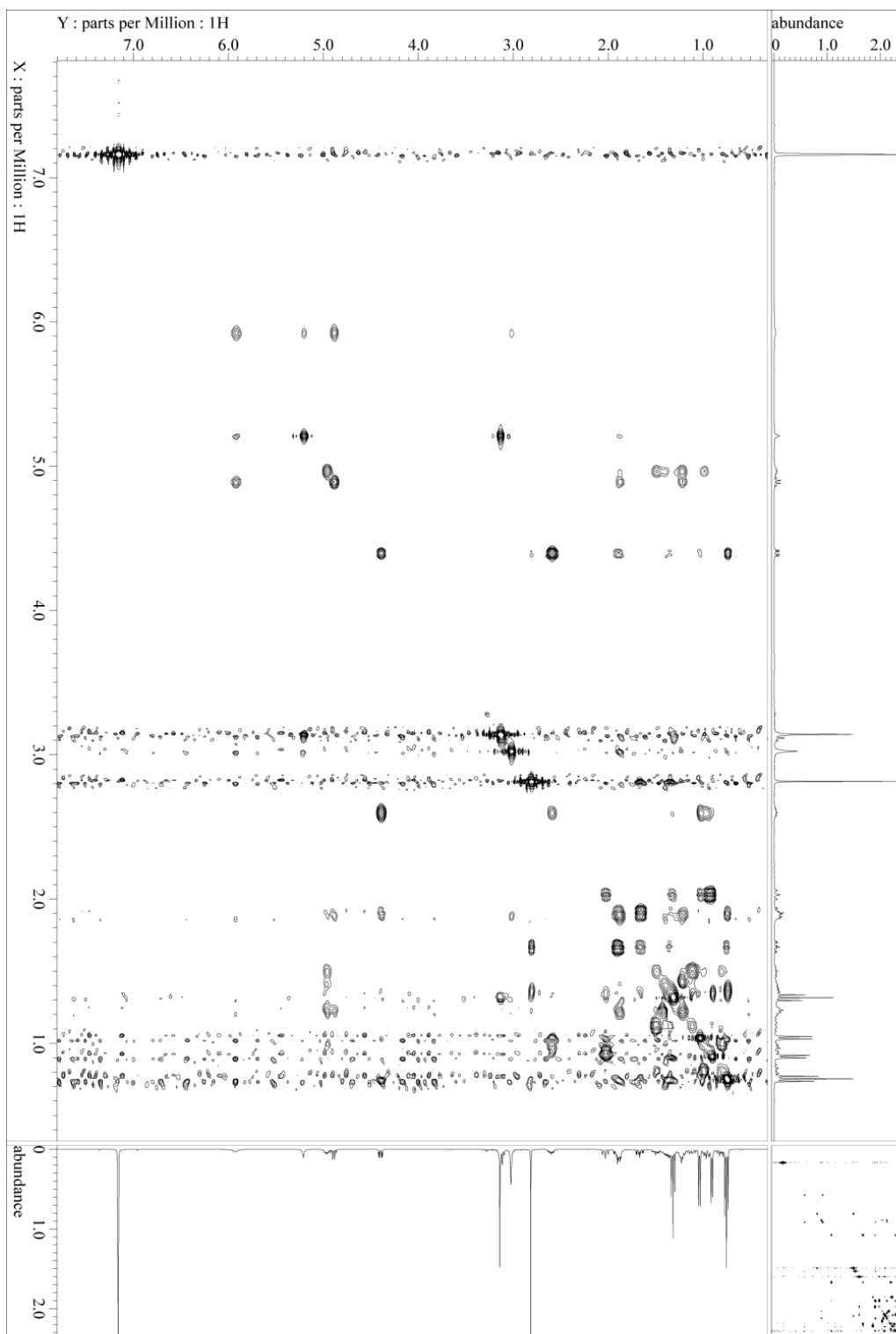
HMBC (400 MHz, C₆D₆) spectrum of kanamienamide (1) optimized for $J_{CH} = 8$ Hz



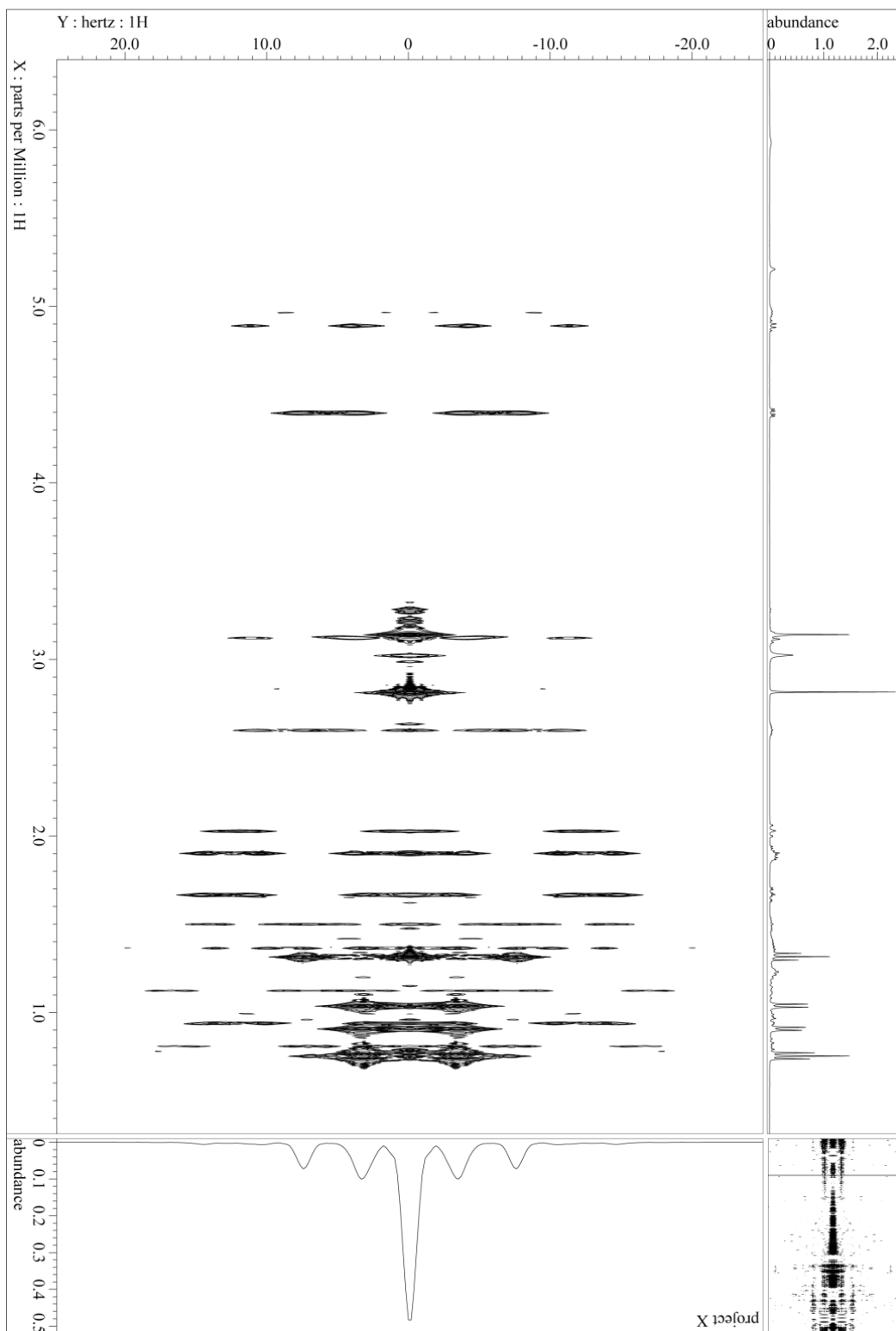
HMBC (400 MHz, C₆D₆) spectrum of Kanamienamide (1) optimized for $J_{CH} = 4$ Hz



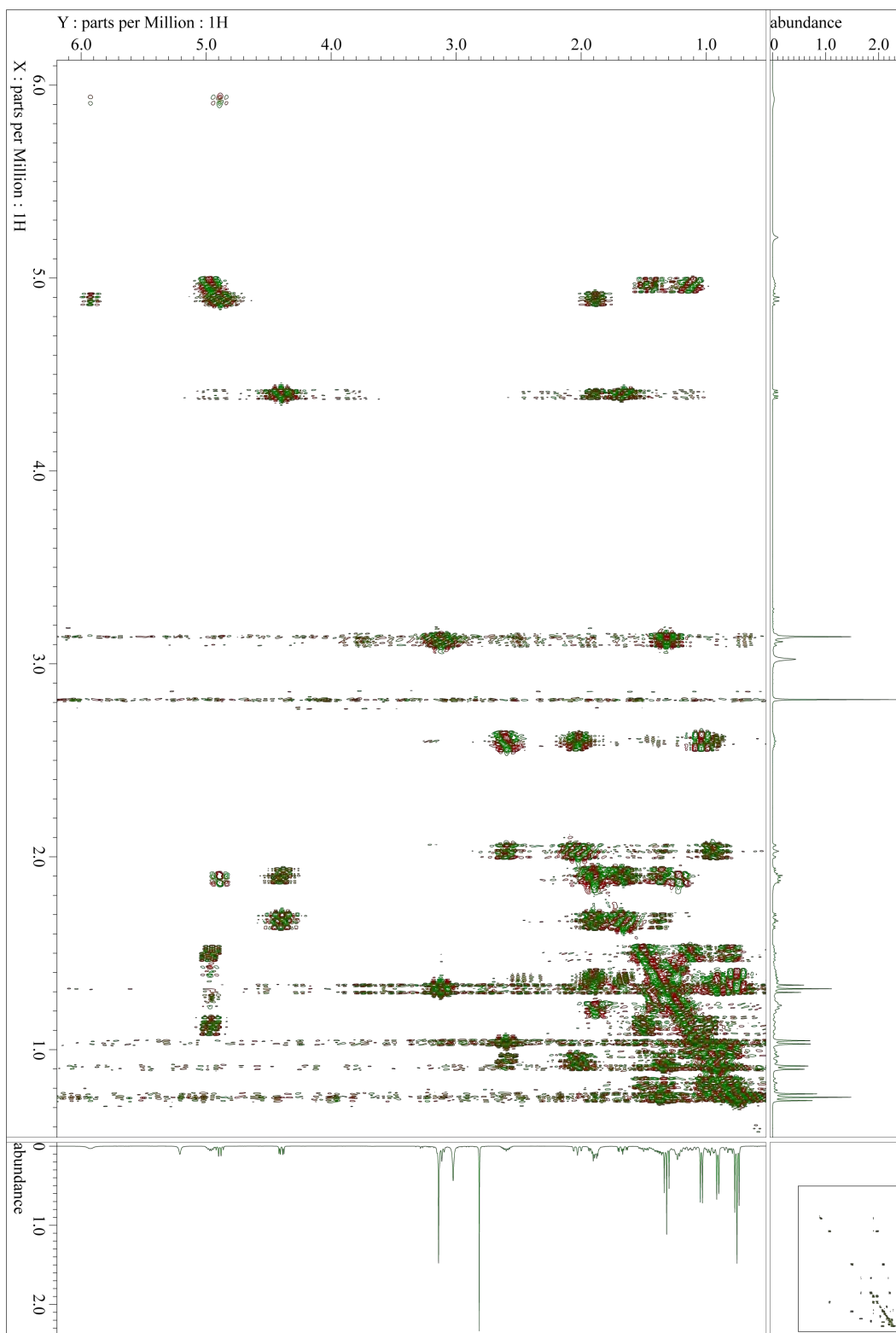
NOESY (400 MHz, C₆D₆) spectrum of kanaminiamide (1)



J-resolved (400 MHz, C₆D₆) spectrum of kanamienamide (1)



E-COSY (400 MHz, C₆D₆) spectrum of Kanamienamide (1)



第3項 Minnamide 類の構造と生物活性

Collection of cyanobacteria

The marine cyanobacterium *Okeania hirsuta* (sample no. 1504-41) was collected at shore of Minna island in Okinawa Prefecture, Japan, in December 2013. Collected sample was stored at -30 °C and small pieces of collected marine cyanobacteria were preserved for genetic analysis in RNAlater[®] (Qiagen, Hilden, Germany).

16S rDNA sequence analysis

Small pieces of collected marine cyanobacteria were preserved for genetic analysis in RNAlater[®] (Qiagen, Hilden, Germany). Single filament PCR was performed as described above, with slight change. In brief, to remove the cyanobacterial sheaths, the cyanobacterial sample was vortexed before isolation of single filament. The single filament was isolated by pipette-washing method³² under light microscope. The isolated single filament was crushed using pipette on slide glass under light microscope and dissolved in 5 µL of sterilized water. The sterilized water containing the broken filament was used as DNA template for the PCR amplification. The 16S rRNA genes and 16S-23S ITS regions were amplified using the primer set CYA106⁶⁷ and 23S30R⁷⁶. The PCR reaction contained 5 µL of the DNA template, 0.5 µL of KOD FX Neo (TOYOBO, Osaka, Japan), 12.5 µL of 2× PCR buffer, 5 µL of dNTPs and 1.0 µL of each primers (10 pM). The PCR reaction was carried out with a T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA) as follows: one cycle of 10 min at 94 °C; 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 57 °C, 1 min at 72 °C; and a final elongation step of 7 min at 72 °C. PCR products were analyzed on agarose gel (1%) in TBE buffer, visualized by ethidium bromide staining, and purified by a PCR Advanced PCR clean up system (VIOGENE, New Taipei City, Taiwan). Sequences were determined with CYA106F⁶⁷, 16S1541R⁶⁸ and 23S30R⁷⁶ primers by commercial firm (Macrogen Japan Corp., Kyoto, Japan). These sequences are available in DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number LC437089.

Morphological characterization

Morphological observation was performed using a phase contrast microscopy ECLIPSE Ti-S (Nikon, Tokyo, Japan). The mean cell size and standard deviation of 30 cells were measured. The morphological characteristics were summarized in Table 4-1.

Extraction and isolation

The marine cyanobacterium *Okeania hirsuta* (sample no. 1504-41) was collected at shore of Minna island in Okinawa Prefecture, Japan, in December 2013. Collected sample was stored at -30 °C. After thawing, the cyanobacterium sample (1.75 kg, wet weight) was extracted two times with 3L MeOH for one week. The extracts were combined, filtered, concentrated and partitioned between EtOAc (3 × 0.3 L) and water (0.3 L). The organic layer was concentrated and partitioned 90% aqueous MeOH (0.3 L) and hexane (3 × 0.3 L). The 90% aqueous MeOH layer (1.2 g) was fractionated by flash column chromatography on ODS (12 g) using a solvent gradient: 40, 60, 80, 100% aqueous MeOH and CHCl₃/MeOH (1:1). The 80% aqueous MeOH fraction (944.8 mg) was subjected to HPLC [Cosmosil 5C₁₈MS-II (φ20 × 250 mm); flow rate 5mL/min; detection, UV215 nm; solvent 65% aqueous MeCN] to give a fraction that contained Minnamide A (**1**) ($t_R = 43.4$ min). This fraction was further separated by HPLC [Cosmosil 5PE-MS (φ20 × 250 mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV 215 nm; solvent 55% aqueous MeCN; room temperature] to give minnamide A (**2**) (188.2 mg, $t_R = 34.3$ min, total yield 0,01% based on wet weight).

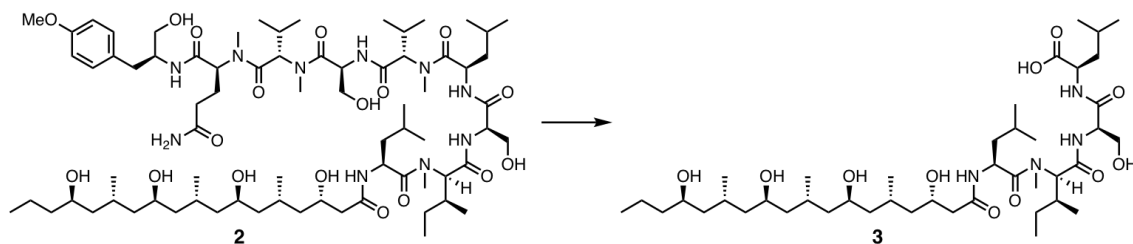
Minnamide A (**2**): colorless oil; HRESIMS m/z 1471.9594 [M+Na]⁺ (calcd for C₇₄H₁₃₂N₁₀O₁₈Na, 1471.9619); [α]_D^{23.0} -72 (c 1.0, CHCl₃); IR (film) 3306, 2959, 1632, 1512, 1412, 1246, 1049, 755 cm⁻¹; ¹H NMR, ¹³C NMR, COSY, TOCSY, HMBC and ROESY data, see Table 4-2.

Acid hydrolysis of **2**

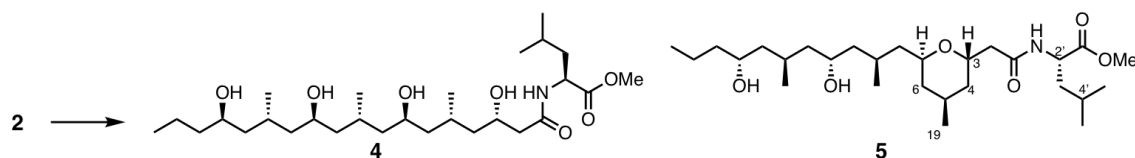
Minnamide A (**2**) (0.2 mg) was dissolved in 6 M aqueous HCl (700 μL) in a sealed tube. The solution was stirred at 110 °C for 24 h. The reaction mixture was evaporated to dryness. The crude product was purified by HPLC. The retention times of components were as follows: AMP ($t_R = 4.4$ min) [Conditions for HPLC separation: column, Cosmosil 5C₁₈-PAQ (φ4.6 × 250 mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent 40%

MeOH] and *N*-Me-Glu ($t_R = 3.8$ min), *N*-Me-Val ($t_R = 5.5$ min), Ser ($t_R = 3.0$ min), Leu ($t_R = 11.2$ min) [Conditions for HPLC separation: column, Cosmosil 5C₁₈-PAQ ($\phi 4.6 \times 250$ mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent H₂O with 0.1% TFA] and *N*-Me-Ile ($t_R = 5.1$ min) [Conditions for HPLC separation: column, Cosmosil 5C₁₈-PAQ ($\phi 4.6 \times 250$ mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent H₂O].

Partial hydrolysis of **2**



Minnamide A (**2**) (1.9 mg, 1.3 μ mol) was dissolved in 1,4-dioxane (190 μ L) and 9 M aqueous HCl (10 μ L). The solution was stirred at room temperature for 26 h. The reaction mixture was evaporated to dryness. The residue was purified by HPLC [Cosmosil 5C₁₈MS-II ($\phi 20 \times 250$ mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV215 nm; solvent 85% MeOH with 0.1% TFA; $t_R = 38.8$ min] to give **3** (0.2 mg, 0.2 μ mol). **3**: ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ_H 4.53-4.40 (m, 2H), 4.09 (m, 1H), 3.86-3.71 (m, 4H), 3.65 (m, 1H), 3.09 (s, 3H), 2.44-2.25 (m, 2H), 2.08 (m, 1H), 2.01-1.82 (m, 3H), 1.81-1.68 (m, 2H), 1.68-1.58 (m, 2H), 1.58-1.27 (m, 14H), 1.26-1.06 (m, 6H), 1.02-0.89 (m, 27H), 0.82 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H); HRESIMS m/z 831.6045 [M+H]⁺ (calcd for C₄₃H₈₃N₄O₁₁, 831.6058).



Minnamide A (**2**) (9.2 mg, 6.3 μ mol) was dissolved in 1,4-dioxane (400 μ L) and 12 M aqueous HCl (800 μ L). The solution was stirred at room temperature for 4 days. The reaction mixture was diluted with H₂O (5 mL). The diluted mixture was applied to ODS-silica gel column then washed repeatedly with H₂O until filtrate became neutral, then eluted with MeOH. The MeOH eluent was concentrated under reduced pressure. The crude product was used without purification in the next step.

The crude product was dissolved in MeOH (600 μ L) and toluene (600 μ L). To the solution was added a 0.6 M solution of trimethylsilyldiazomethane in hexane (200 μ L, 120 μ mol) and stirred at room temperature for 45 min. The reaction mixture was evaporated to

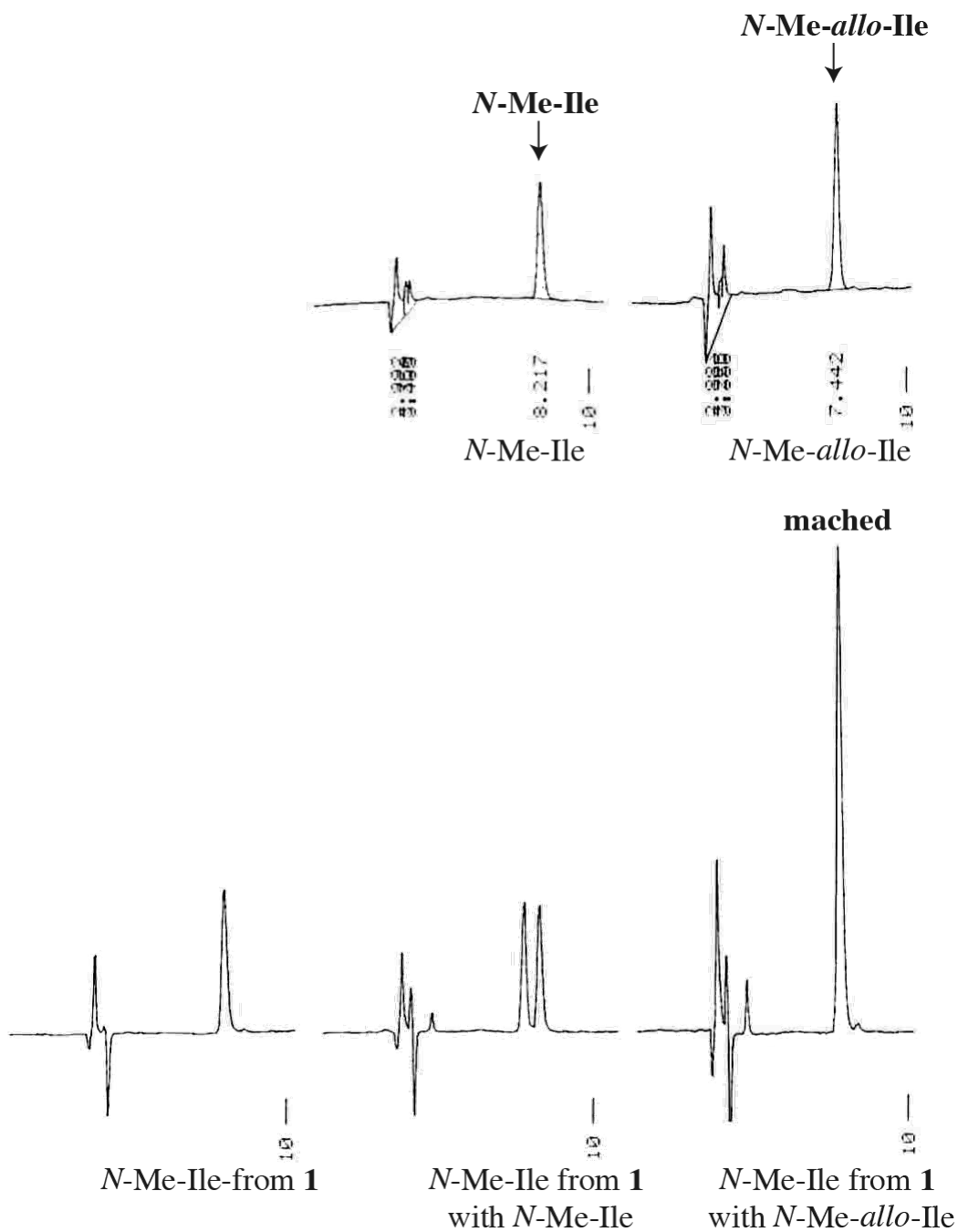
dryness. The residue was purified by HPLC to give **4** (1.0 mg, 1.9 μmol) [Cosmosil 5C₁₈MS-II ($\phi 20 \times 250$ mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV215 nm; solvent 80% MeOH; $t_{\text{R}} = 30.1$ min] and **5** (0.1 mg, 0.2 μmol) [Cosmosil 5C₁₈MS-II ($\phi 20 \times 250$ mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV215 nm; solvent 85% MeOH; $t_{\text{R}} = 45.4$ min].

4: ¹H NMR (CD₃ OD, 400 MHz): δ_{H} 4.47 (dd, $J = 9.0, 6.1$ Hz, 1H), 4.09 (m, 1H), 3.84-3.72 (m, 2H), 3.71 (s, 3H), 3.66 (m, 1H), 2.36 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.04-1.82 (m, 3H), 1.68 (m, 1H), 1.64-1.50 (m, 3H), 1.50-1.27 (m, 10H), 1.25-1.15 (m, 4H), 1.09 (m, 1H), 0.96 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.96 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.95 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.94 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.93 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.92 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H); HRESIMS m/z 518.4058 [M+H]⁺ (calcd for C₂₈H₅₆NO₇, 518.4057).

5: ¹H NMR (C₆D₆, 400 MHz): δ_{H} 7.50 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, NH), 4.93 (m, 1H, H2'), 4.55 (br s, 1H, OH), 4.41 (dddd, $J = 9.3, 8.7, 4.7, 2.5$ Hz, 1H, H3), 4.09 (m, 1H, H7), 3.63 (m, 1H, H15), 3.38 (m, 1H, H11), 3.29 (s, 3H, H6'), 2.60 (dd, $J = 15.5, 2.5$ Hz, 1H, H2a), 2.43 (dd, $J = 15.5, 9.3$ Hz, 1H, H2b), 2.26 (m, 1H, H13), 1.86 (ddd, $J = 13.1, 8.7, 3.0$ Hz, 1H, H4a), 1.85 (ddd, $J = 14.6, 12.1, 2.8$ Hz, 1H, H6b), 1.72 (ddddq, $J = 11.0, 10.2, 3.0, 2.8, 7.0$ Hz, 1H, H5), 1.71 (m, 1H, H4'), 1.60 (m, 2H, H3'), 1.51 (m, 1H, H9), 1.47 (m, 1H, H12a), 1.47 (m, 1H, H17a), 1.45 (ddd, $J = 13.1, 10.2, 4.7$ Hz, 1H, H4b), 1.33 (m, 1H, H17b), 1.32 (m, 1H, H16a), 1.27 (m, 1H, H8a), 1.27 (m, 1H, H4a), 1.27 (m, 1H, H16b), 1.24 (m, 1H, H10a), 1.14 (m, 1H, H8b), 1.06 (m, 1H, 14b), 0.99 (m, 1H, H12b), 0.92 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H19), 0.91 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H5'), 0.90 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H18), 0.89 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H, H21), 0.87 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H, H6'), 0.80 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H20), 0.79 (m, 1H, H10b), 0.70 (ddd, $J = 14.6, 11.0, 3.8$ Hz, 1H, H6a); HRESIMS m/z 500.3941 [M+H]⁺ (calcd for C₂₈H₅₄NO₆, 500.3951).

HPLC analysis of amino acid components

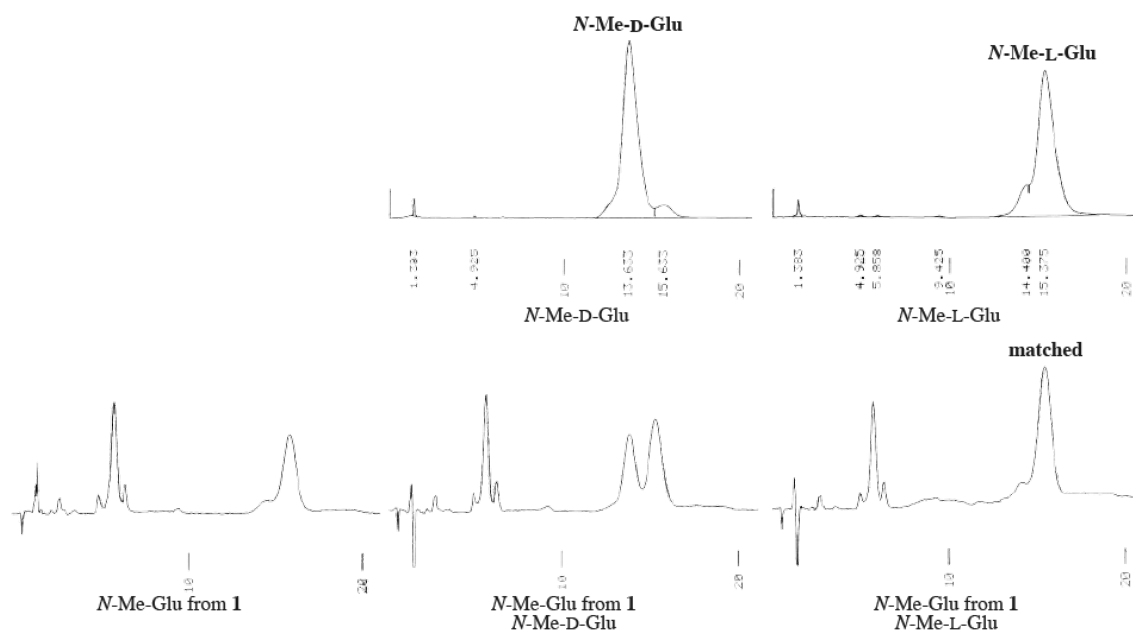
A fraction that contained *N*-Me-Ile was dissolved in H₂O (50 μL) and analyzed by HPLC, and the retention times were compared to those of authentic standards. The retention time of *N*-Me-Ile in the hydrolysate matched the retention time of *N*-Me-*allo*-Ile ($t_{\text{R}} = 7.4$ min), but not *N*-Me-Ile ($t_{\text{R}} = 8.2$ min) [Conditions for HPLC separation: column, Cosmosil PBR ($\phi 4.6 \times 250$ mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 215 nm; solvent 5% MeCN with 0.1% TFA]



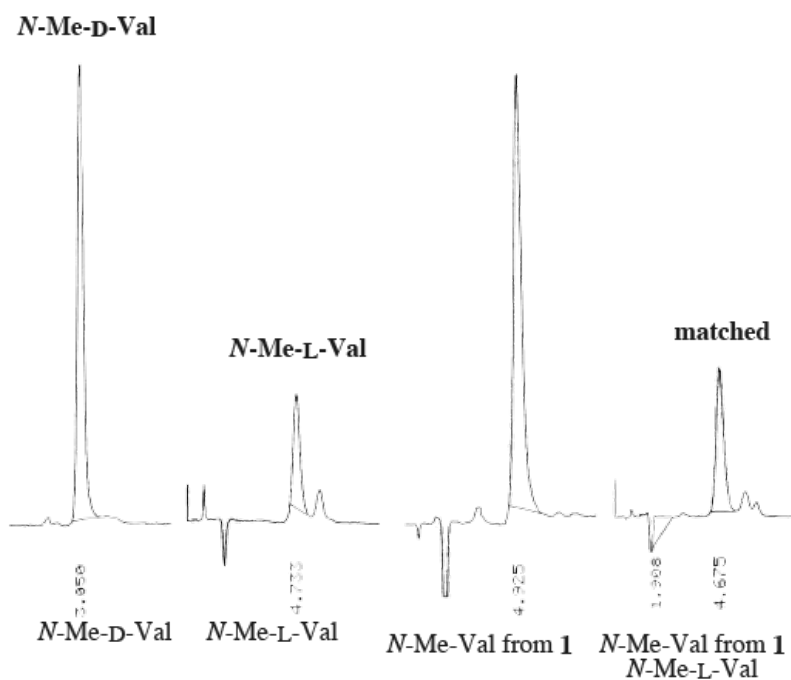
Chiral-phase HPLC analysis

Each fraction that contained amino acids except for Ser and *N*-Me-*allo*-Ile were dissolved in H₂O (50 μL) and analyzed by chiral-phase HPLC, and the retention times were compared to those of authentic standards.

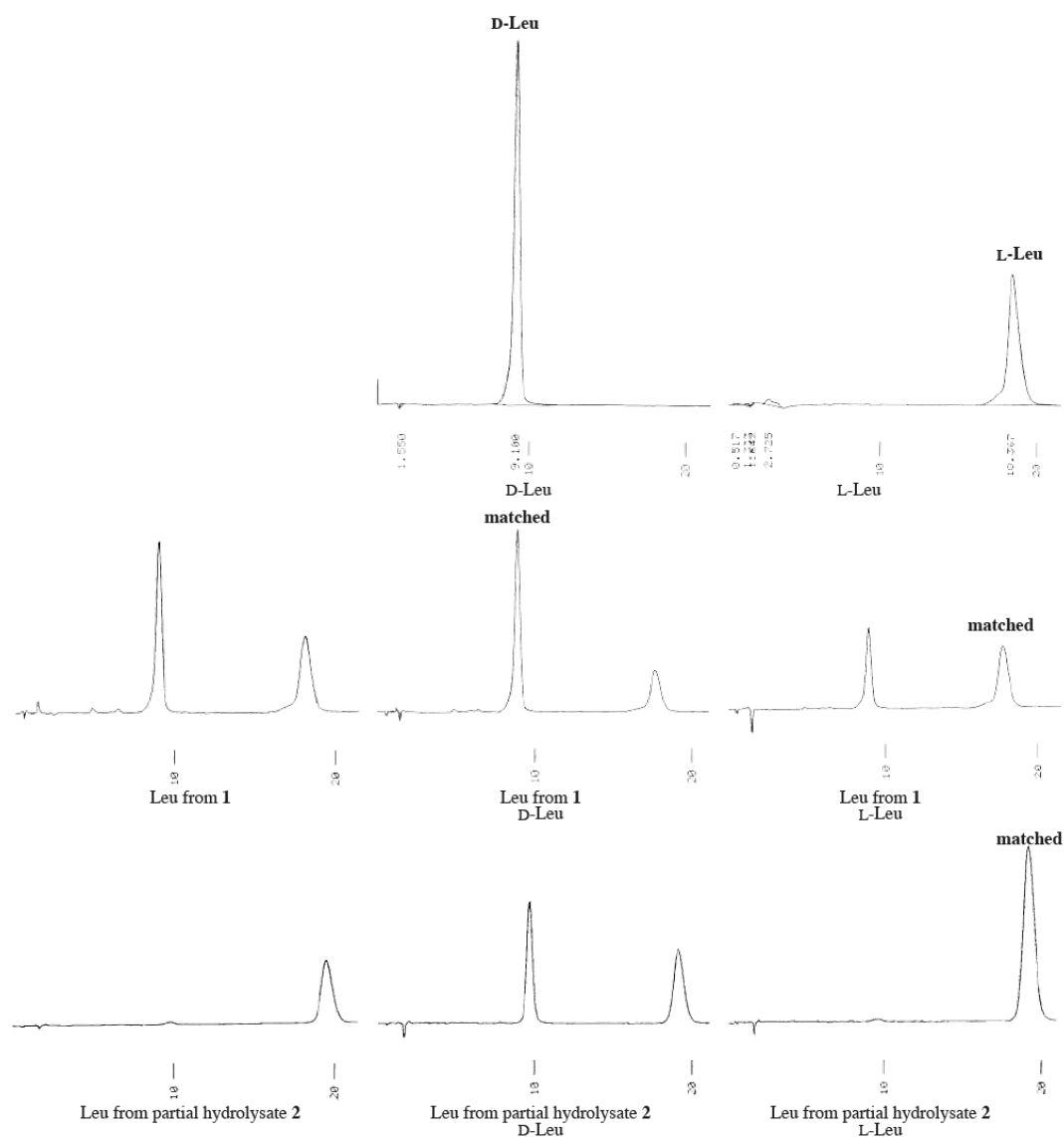
Glu: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) (ϕ 4.6 \times 50 mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent 2.0 mM aqueous CuSO₄. t_R : *N*-Me-D-Glu (13.6 min), *N*-Me-L-Glu (15.4 min)



N-Me-Val: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) (ϕ 4.6 \times 50 mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent 2.0 mM aqueous CuSO₄. t_R : *N*-Me-D-Val (3.1 min), *N*-Me-L-Val (4.7 min)



Leu: column, DAICEL CHIRALPAK (MA+) (ϕ 4.6 \times 50 mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 254 nm; solvent 2.0 mM aqueous CuSO₄. t_R : D-Leu (9.1 min), L-Leu (10.4 min)



Marfey's Analysis

The fractions containing AMP, Ser or *N*-Me-*allo*-Ile were dissolved in H₂O (50 μ L). Marfey's reagent (0.1% 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-leucinamide) solution in acetone (100 μ L) and 50 μ L of 1 M aqueous NaHCO₃ were added to the solution. The mixture was warmed to 80 $^{\circ}$ C for 3 min, then cooled to room temperature. The reaction was quenched with 6 M aqueous HCl (6 μ L) and the mixture was concentrated under reduced

pressure. The residue was resuspended in 50% aqueous MeCN and the solution was analyzed by reversed-phase HPLC.

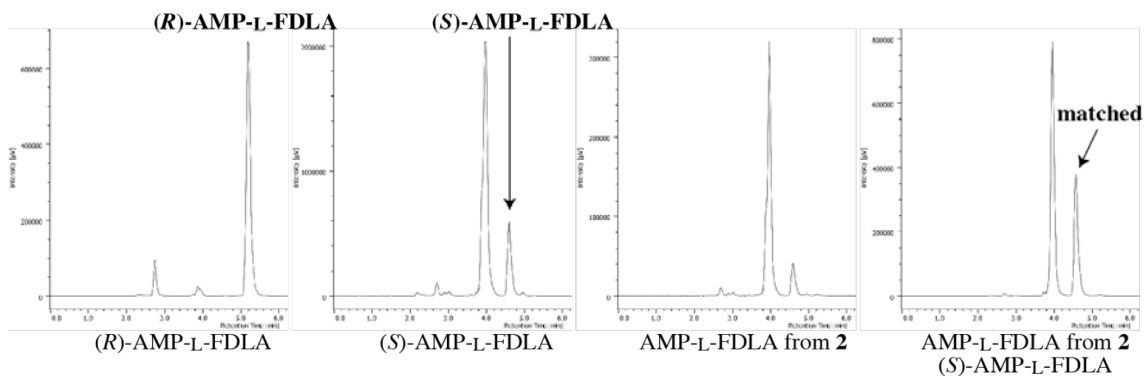
The retention time of the derivatized AMP in the hydrolysate of **1** matched that of the Marfey's derivative of the (*S*)-AMP authentic sample ($t_R = 5.2$ min), but not Marfey's derivative of the (*R*)-AMP authentic sample ($t_R = 4.6$ min) [Conditions for HPLC separation: column, Cosmosil Cholester ($\phi 4.6 \times 250$ mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 340 nm; solvent 70% MeCN with 0.1% TFA].

The retention time of the derivatized Ser in the hydrolysate of **1** matched that of the Marfey's derivative of the D-Ser authentic sample ($t_R = 18.1$ min) and Marfey's derivative of the L-Ser authentic sample ($t_R = 16.4$ min) [Conditions for HPLC separation: column, Cosmosil PBr ($\phi 4.6 \times 250$ mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 340 nm; solvent 40% MeCN with 0.1% TFA] (D/L = 42:58).

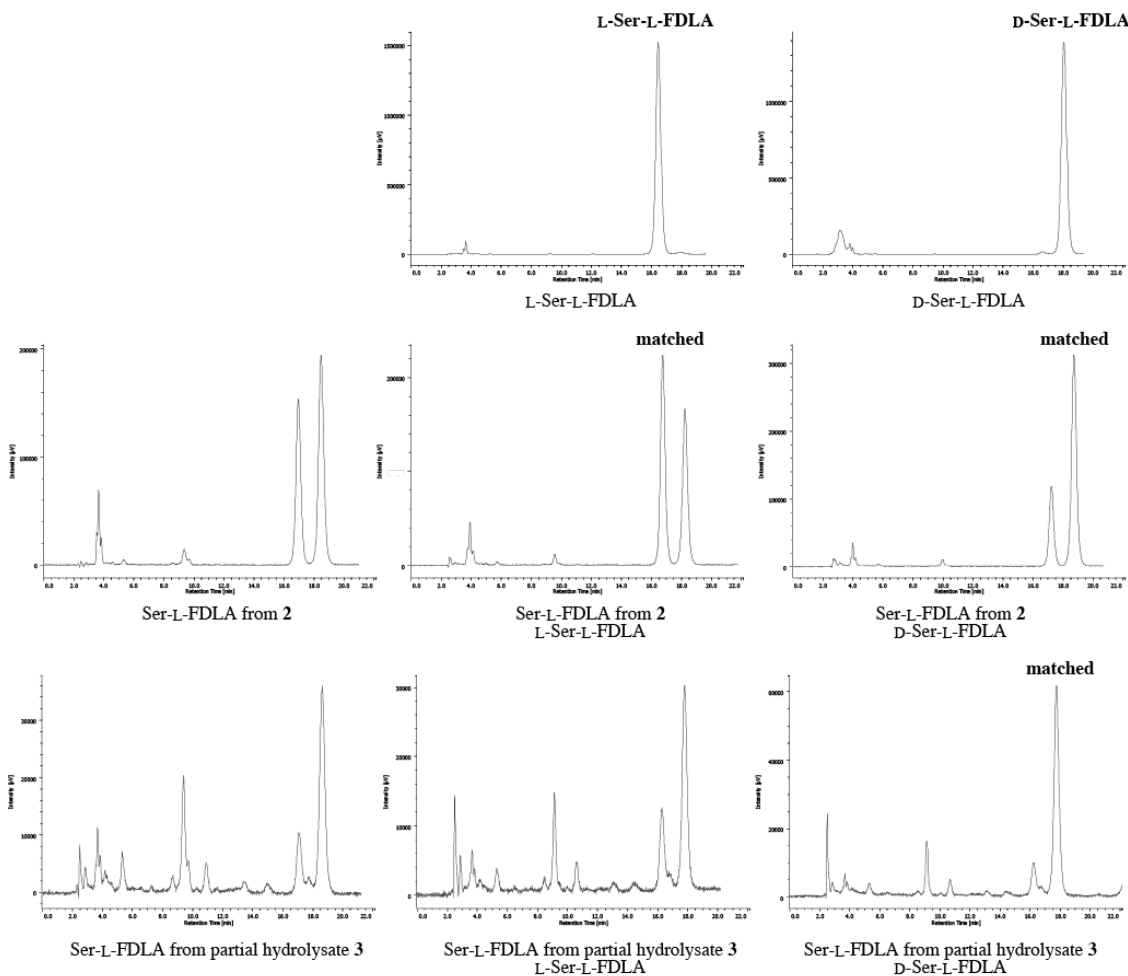
The retention time of the derivatized Ser in the hydrolysate of **S25** matched that of the Marfey's derivative of the D-Ser authentic sample ($t_R = 18.1$ min), but not Marfey's derivative of the L-Ser authentic sample ($t_R = 16.4$ min) [Conditions for HPLC separation: column, Cosmosil PBr ($\phi 4.6 \times 250$ mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 340 nm; solvent 40% MeCN with 0.1% TFA].

The retention time of the derivatized *N*-Me-*allo*-Ile in the hydrolysate of **1** matched that of the Marfey's derivative of the D-*allo*-Ile-L-FDLA authentic sample ($t_R = 10.8$ min), but not Marfey's derivative of the D-*allo*-Ile-D-FDLA authentic sample ($t_R = 7.1$ min) [Conditions for HPLC separation: column, Cosmosil 5C₁₈MS-II ($\phi 4.6 \times 250$ mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 340 nm; solvent 80% MeOH with 0.1% TFA].

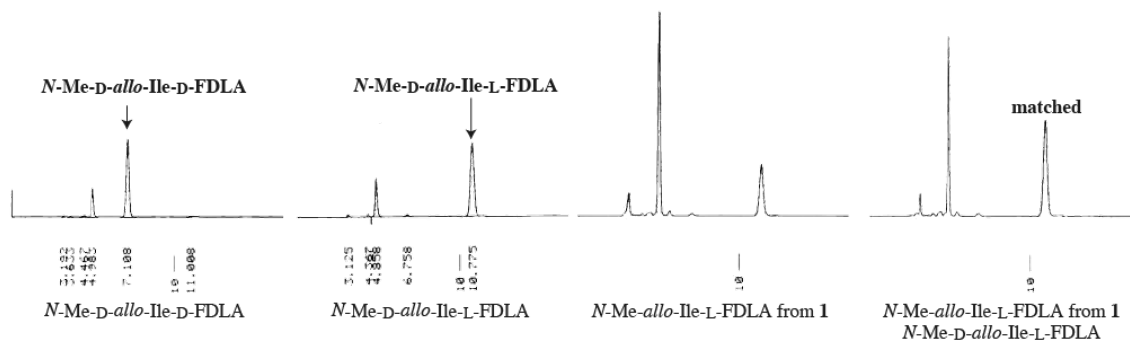
AMP: column, Cosmosil Cholester; ($\phi 4.6 \times 250$ mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 340 nm; solvent 70% MeCN with 0.1% TFA. t_R : (R)-AMP-L-FDLA (5.2 min), (S)-AMP-L-FDLA (4.6 min)



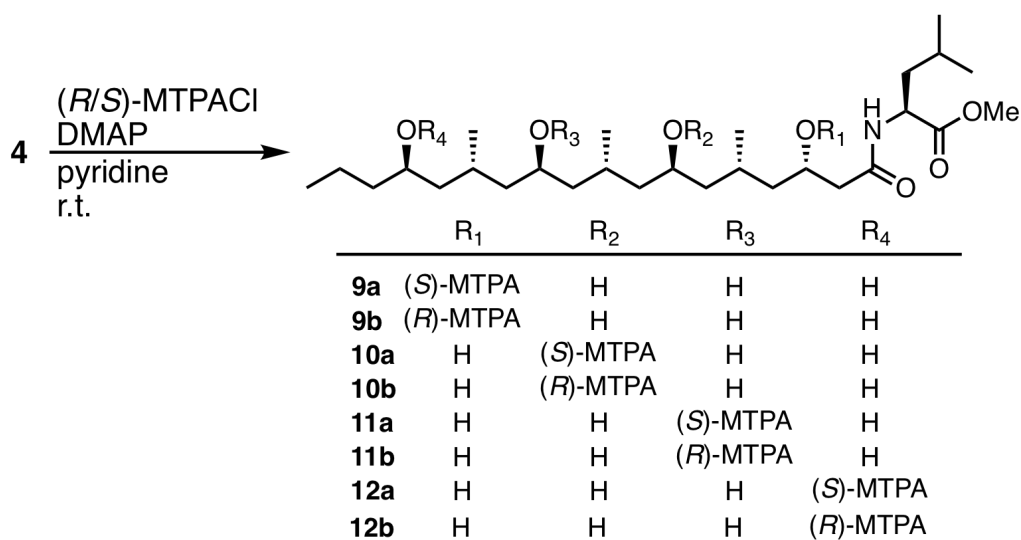
Ser: column, Cosmosil PBr ($\phi 4.6 \times 250$ mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 340 nm; solvent 40% MeCN with 0.1% TFA. t_R : L-Ser-L-FDLA (16.4 min), D-Ser-L-FDLA (18.1 min)



N-Me-*allo*-Ile: column, Cosmosil 5C₁₈MS-II (ϕ4.6 × 250 mm); flow rate 1.0 mL/min; detection at 340 nm; solvent 80% MeCN with 0.1% TFA. t_R : *N*-Me-*L*-*allo*-Ile-*D*-FDLA (7.1 min), *N*-Me-*L*-*allo*-Ile-*L*-FDLA (10.8 min)



Preparation of MTPA esters and determination of the absolute configuration of hydroxy groups in fatty acid of **2**



To a solution of **4** (7.7 mg, 11 μmol) and 4-(dimethylamino)pyridine (1.0 mg, 8.2 μmol) in dry pyridine (70 μL) was added (*R*)-MTPACl (1.0 μL, 5.3 μmol) at room temperature and the mixture was stirred for 2 h. The reaction was diluted with EtOH (20 mL) and washed with 1 M HCl aq. (3 × 3 mL) and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by HPLC to give **9a** (0.3 mg, 0.4 μmol, t_R = 34.3 min), **10a** (0.3 mg, 0.4 μmol, t_R = 32.5 min), **11a** (0.2 mg, 0.3 μmol, t_R = 26.4 min) and **12a** (0.4 mg, 0.5 μmol, t_R = 42.9 min). Starting material **4** (6.5 mg, 9.4 μmol, t_R = 19.6 min) was recovered. [Cosmosil 5C₁₈MS-II (ϕ20

× 250 mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV215 nm; solvent 85% MeOH].

9a: ^1H NMR (C_6D_6 , 400 MHz): δ_{H} 7.79 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.30-7.00 (m, 3H, overlapped with solvent signal), 6.92 (m, 1H, NH), 5.77 (m, 1H, H3), 4.83 (m, 1H, H2'), 3.72 (m, 1H, H7), 3.70 (m, 1H, H11), 3.58 (m, 1H, H15), 3.56 (s, 3H), 3.26 (s, 3H), 2.27 (dd, $J = 14.4, 7.6$ Hz, 1H, H2), 2.17 (dd, $J = 14.4, 5.2$ Hz, 1H, H2), 2.00 (m, 1H, H13), 1.78 (m, 1H, H5), 1.66-1.00 (m, 7H), 1.57 (m, 2H, H4'), 1.55 (m, 1H, H4), 1.54 (m, 1H, H3'a), 1.49 (m, 1H, H6a), 1.45 (m, 1H, H8a), 1.41 (m, 1H, H3'b), 1.40 (m, 1H, H17a), 1.29 (m, 1H, H17b), 1.11 (m, 1H, H8b), 1.06 (m, 1H, H6b), 0.96 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H20), 0.94 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, H21), 0.90 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, H18), 0.88 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, 5H'), 0.86 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H19), 0.84 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, 6H'); HRESIMS m/z 734.4476 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{63}\text{F}_3\text{NO}_9$, 734.4455).

10a: ^1H NMR (C_6D_6 , 400 MHz): δ_{H} 7.81 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.30-7.00 (m, 3H, overlapped with solvent signal), 6.02 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, NH), 5.54 (m, 1H, H7), 4.78 (m, 1H, H2'), 4.09 (m, 1H, H3), 3.73 (m, 1H, H11), 3.58 (m, 1H, H15), 3.56 (s, 3H), 3.29 (s, 3H), 1.99 (m, 2H, H2), 1.99 (m, 1H, H9), 1.97 (m, 1H, H13), 1.83 (m, 1H, H6a), 1.74 (m, 1H, H8a), 1.77 (m, 1H, H5), 1.54 (m, 1H, H4'), 1.52 (m, 1H, H12a), 1.51 (m, 1H, H3'a), 1.48 (m, 1H, H10a), 1.46 (m, 1H, H8b), 1.44 (m, 1H, H14a), 1.43 (m, 1H, H17a), 1.35 (m, 1H, H4a), 1.32 (m, 1H, H3'b), 1.32 (m, 2H, H16), 1.32 (m, 1H, H17b), 1.29 (m, 1H, H6b), 1.18 (m, 1H, H4b), 1.14 (m, 1H, H10b), 1.12 (m, 1H, H14b), 1.09 (m, 1H, H12b), 0.96 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H20), 0.92 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H21), 0.91 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H18), 0.87 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H, H19), 0.85 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H5'), 0.81 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H6'); HRESIMS m/z 734.4444 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{63}\text{F}_3\text{NO}_9$, 734.4455).

11a: ^1H NMR (C_6D_6 , 400 MHz): δ_{H} 7.80 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.30-7.00 (m, 3H, overlapped with solvent signal), 6.15 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, NH), 5.56 (m, 1H, H11), 4.81 (m, 1H, H2'), 4.15 (m, 1H, H3), 3.62 (m, 1H, H7), 3.56 (s, 3H), 3.52 (m, 1H, H15), 3.27 (s, 3H), 2.10 (m, 2H, H2), 1.98 (m, 1H, H5), 1.98 (m, 1H, H13), 1.78 (m, 1H, H9), 1.74 (m, 1H, H12a), 1.73 (m, 1H, H10a), 1.55 (m, 1H, H4'), 1.53 (m, 1H, H3'a), 1.53 (m, 1H, H14a), 1.51 (m, 1H, H4a), 1.48 (m, 1H, H6a), 1.48 (m, 1H, H8a), 1.44 (m, 1H, H10b), 1.44 (m, 1H, H12b), 1.35 (m, 1H, H17a), 1.33 (m, 1H, H3'b), 1.29 (m, 2H, H16), 1.27 (m, 1H, H17b), 1.21 (m, 1H, H4b), 1.02 (m, 1H, H8b), 1.02 (m, 1H, H14b), 0.98 (m, 1H, H6b), 0.92 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, H21), 0.90 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H19), 0.89 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H18), 0.89 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, H20), 0.85 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H, H5'), 0.81 (d, $J = 6.3$

Hz, 3H, H6'); HRESIMS m/z 734.4450 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{38}H_{63}F_3NO_9$, 734.4455).

12a: 1H NMR (C_6D_6 , 400 MHz): δ_H 7.77 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.30-7.00 (m, 3H, overlapped with solvent signal), 6.40 (m, 1H, NH), 5.33 (m, 1H, H15), 4.81 (m, 1H, H2'), 4.22 (m, 1H, H3), 3.78 (m, 1H, H7), 3.68 (m, 1H, H11), 3.49 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 2.13 (m, 1H, H2a), 2.19 (m, 1H, H2b), 2.02 (m, 1H, H5), 2.02 (m, 1H, H9), 1.63 (m, 1H, H14a), 1.61 (m, 1H), 1.60 (m, 1H, H4'), 1.56 (m, 1H, H16a), 1.55 (m, 1H, H4a), 1.53 (m, 1H, H3'a), 1.51 (m, 1H), 1.43 (m, 1H), 1.41 (m, 1H, H16b), 1.38 (m, 1H, H3'), 1.35 (m, 1H), 1.27 (m, 2H, H17), 1.24 (m, 1H, H4b), 1.18, (m, 1H), 1.12 (m, 1H, H14b), 1.10 (m, 1H), 1.09 (m, 1H), 1.07 (m, 1H), 0.95 (d, $J =$, 3H, H19), 0.95 (d, $J =$, 3H, H20), 0.87 (d, $J =$, 3H, H21), 0.86 (d, $J =$, 3H, H5'), 0.82 (d, $J =$, 3H, H6'), 0.81 (t, $J =$, 3H, H18); HRESIMS m/z 734.4449 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{38}H_{63}F_3NO_9$, 734.4455).

To a solution of **4** (8.2 mg, 12 μ mol) and 4-(dimethylamino)pyridine (0.7 mg, 5.8 μ mol) in dry pyridine (40 μ L) was added (*S*)-MTPACI (1.0 μ L, 5.3 μ mol) at room temperature and the mixture was stirred for 4.5 h. The reaction was diluted with EtOH (20 mL) and washed with 1 M HCl aq. (3 \times 3 mL) and brine. The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by HPLC to give **9b** (0.3 mg, 0.4 μ mol, $t_R = 39.6$ min), **10b** (0.3 mg, 0.4 μ mol, $t_R = 35.9$ min), **11b** (0.2 mg, 0.3 μ mol, $t_R = 37.4$ min) and **12b** (0.4 mg, 0.5 μ mol, $t_R = 50.7$ min). Starting material **4** (6.5 mg, 9.4 μ mol, $t_R = 20.8$ min) was recovered. [Cosmosil 5C₁₈MS-II (ϕ 20 \times 250 mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV215 nm; solvent 85% MeOH].

9b: 1H NMR (C_6D_6 , 400 MHz): δ_H 7.73 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.30-7.00 (m, 3H, overlapped with solvent signal), 5.76 (m, 1H, H3), 5.64 (m, 1H, NH), 4.75 (m, 1H, H2'), 3.79, (m, 1H, H11), 3.75 (m, 1H, H7), 3.58 (m, 1H, H15), 3.50 (s, 3H), 3.27 (s, 3H), 2.30 (dd, $J = 15.3, 6.3$ Hz, 1H), 2.07 (dd, $J = 15.3, 5.8$ Hz), 2.03 (m, 1H, H9), 2.01, (m, 1H, H13), 1.92 (m, 1H, H5), 1.70-1.06 (10H), 1.67 (m, 1H, H4a), 1.64 (m, 1H, H4b), 1.59 (m, 1H, H6a), 1.56 (m, 1H, H4'), 1.53 (m, 1H, H3'a), 1.47 (m, 1H, H8a), 1.32 (m, 1H, H3'b), (m, 1H, H8b), 1.12 (m, 1H, H6b), 0.96 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, H20), 0.92 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, H18), 0.92 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, H21), 0.90 (d, $J = 7.4$ Hz, 3H, H19), 0.88 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H5'), 0.82 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H6'); HRESIMS m/z 734.4474 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{38}H_{63}F_3NO_9$, 734.4455).

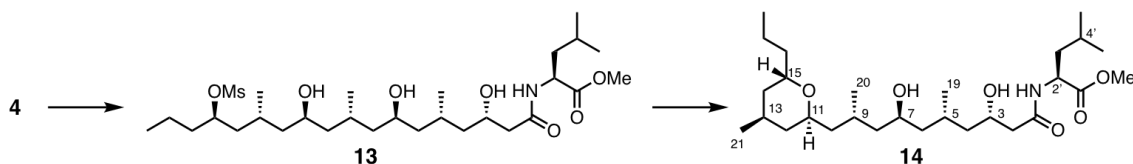
10b: 1H NMR (C_6D_6 , 400 MHz): δ_H 7.81 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.30-7.00 (m, 3H, overlapped with solvent signal), 5.96 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, NH), 5.56 (m, 1H, H7), 4.79 (m,

1H, H2'), 4.14 (m, 1H, H3), 3.67 (m, 1H, H11), 3.59 (s, 3H), 3.57 (m, 1H, H15), 3.28 (s, 3H), 2.04 (m, 2H, H2), 2.01 (m, 1H, H5), 1.96 (m, 1H, H13), 1.91 (m, 1H, H6a), 1.72 (m, 1H, H9), 1.66 (m, 1H, H8a), 1.56-1.17 (m, 5H), 1.55 (m, 1H, H4'), 1.52 (m, 1H, H3'a), 1.44 (m, 1H, H4a), 1.42 (m, 1H, H10a), 1.42 (m, 1H, H17a), 1.32 (m, 1H, H8b), 1.31 (m, 1H, H3'b), 1.30 (m, 1H, H17b), 1.25 (m, 1H, H6b), 1.21 (m, 1H, H4b), 1.16-1.04 (m, 1H), 1.04 (m, 1H, H10b), 1.01 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H19), 0.91 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, H21), 0.90 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H18), 0.88 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H20), 0.85 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H, H5'), 0.81 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H6'); HRESIMS m/z 734.4437 [M+H]⁺ (calcd for C₃₈H₆₃F₃NO₉, 734.4455).

11b: ¹H NMR (C₆D₆, 400 MHz): δ_H 7.80 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.30-7.00 (m, 3H, overlapped with solvent signal), 6.01 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, NH), 5.56 (m, 1H, H11), 4.80 (m, 1H, H2'), 4.14 (m, 1H, H3), 3.66 (m, 1H, H7), 3.56 (s, 3H), 3.48 (m, 1H, H15), 3.26 (s, 3H), 2.06 (m, 2H, H2), 2.00 (m, 1H, H9), 1.95 (m, 1H, H5), 1.76 (m, 1H, H10a), 1.76 (m, 1H, H13), 1.66 (m, 1H, H12a), 1.54 (m, 1H, H4'), 1.54 (m, 1H, H8a), 1.52 (m, 1H, H6a), 1.51 (m, 1H, H4a), 1.46 (m, 1H, H10b), 1.46 (m, 1H, H14a), 1.37 (m, 1H, H12b), 1.37 (m, 1H, H17a), 1.31 (m, 2H, H3'), 1.28 (m, 2H, H16), 1.25 (m, 1H, H17b), 1.21 (m, 1H, H4b), 1.04 (m, 1H, H8b), 1.02 (m, 1H, H6b), 1.01 (m, 1H, H14b), 0.97 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H20), 0.90 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, H19), 0.88 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H18), 0.86 (d, $J = 5.6$ Hz, 3H, H21), 0.84 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H, H5'), 0.80 (d, $J = 5.8$ Hz, 3H, H6'); HRESIMS m/z 734.4436 [M+H]⁺ (calcd for C₃₈H₆₃F₃NO₉, 734.4455).

12b: ¹H NMR (C₆D₆, 400 MHz): δ_H 7.78 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.30-7.00 (m, 3H, overlapped with solvent signal), 6.26 (m, 1H, NH), 5.37 (m, 1H, H15), 4.82 (ddd, $J = 9.9$, 8.5, 5.2 Hz, 1H), 4.21 (m, 1H, H3), 3.75 (m, 1H, H11), 3.73 (m, 1H, H7), 3.56 (s, 3H), 3.28 (s, 3H), 2.15 (m, 2H, H2), 2.01 (m, 1H, H5), 2.00 (m, 1H, H9), 1.92 (m, 1H, H13), 1.70 (m, 1H, H14a), 1.64-1.25 (4H), 1.59 (m, 1H, H4'), 1.53 (m, 1H, H4a), 1.51 (m, 1H, H3'), 1.48 (m, 1H, H16a), 1.40 (m, 1H, H16b), 1.35 (m, 1H, H3'b), 1.25-1.04 (4H), 1.23 (m, 1H, H4b), 1.18 (m, 1H, H14b), 1.15 (m, 2H, H17), 0.96 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H20), 0.95 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H19), 0.95 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H21), 0.86 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H5'), 0.81 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H6'), 0.76 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, H18); HRESIMS m/z 734.4438 [M+H]⁺ (calcd for C₃₈H₆₃F₃NO₉, 734.4455).

Synthesis of cyclic ether **14**

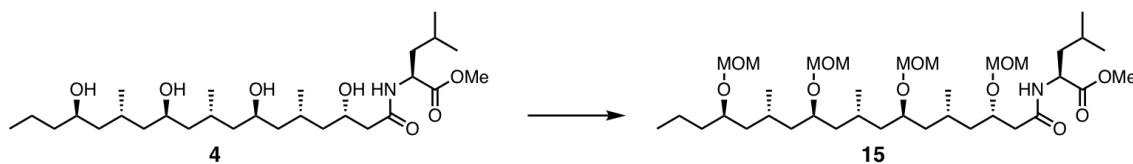


To a solution of **4** (3.2 mg, 6.2 μmol) and Et_3N (0.86 μL , 6.2 μmol) in dry CH_2Cl_2 (200 μL) was added methanesulfonyl chloride (0.49 μL , 6.2 μmol) at room temperature and the mixture was stirred for 30 min. The reaction mixture was directly purified by PLC (2:2:10:10:1 hexane/benzene/EtOAc/Et₂O/MeOH) to give **13** (0.7 mg, 1.2 μmol , 19%) as a colorless oil. The mesylate **13** was spontaneously cyclized at room temperature to give ether **14**.

13: $^1\text{H NMR}$ (C_6D_6 , 400 MHz): δ_{H} 6.21 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, NH), 4.87 (m, 1H, H15), 4.84 (m, 1H, H2'), 4.21 (m, 1H, H3), 3.78 (m, 1H, H7), 3.76 (m, 1H, H11), 3.29 (s, 3H), 2.35 (s, 3H), 2.15 (m, 2H, H2), 2.03 (m, 1H, H5), 2.01 (m, 2H, H-9 and H-13), 1.72 (m, 1H, H14b), 1.70 (m, 1H), 1.64-1.46 (m, 3H), 1.58 (m, 1H, H4'), 1.55 (m, 1H, H4a), 1.54 (m, 1H, H3a'), 1.43-1.03 (m, 6H), 1.36 (m, 1H, H3'b), 1.29 (m, 2H, H17), 1.24 (m, 1H, H4b), 1.19 (m, 1H, H14a), 0.97 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H21), 0.96 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H20), 0.95 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H19), 0.86 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H5'), 0.82 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H, H6'), 0.81 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H18); HRESIMS m/z 596.3832 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{58}\text{NO}_9\text{S}$, 596.3832).

14: $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz): δ_{H} 4.47 (dd, $J = 8.9, 6.2$ Hz, 1H, H2'), 4.09 (m, 1H, H3), 3.89 (m, 1H, H15), 3.76 (m, 1H, H7), 3.71 (s, 3H, H7'), 3.68 (m, 1H, H11), 2.36 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H, H2), 1.90 (m, 1H, H16a), 1.68 (m, 1H, H4'), 1.61 (m, 1H, H3'a), 1.60 (m, 1H, H12a), 1.57 (m, 1H, 3'b), 1.53 (m, 1H, H6a), 1.52 (m, 1H, H14a), 1.44 (m, 1H, H10a), 1.42 (m, 1H, H17a), 1.41 (m, 1H, H4a), 1.41 (m, 1H, H8a), 1.34 (m, 1H, H4b), 1.34 (m, 1H, H17b), 1.32 (m, 1H, H16b), 1.30 (ddd, $J = 13.7, 12.3, 6.0$ Hz, 1H, H14b), 1.14 (ddd, $J = 13.5, 9.2, 4.4$ Hz, 1H, H8b), 1.14 (ddd, $J = 13.5, 9.2, 3.6$ Hz, 1H, H10b), 1.08 (ddd, $J = 13.2, 9.9, 2.9$ Hz, 1H, H6b), 0.96 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H5'), 0.95 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, H19), 0.95 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, H18), 0.92 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H6'), 0.92 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H20), 0.90 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H21), 0.79 (ddd, $J = 12.1, 12.1, 12.1$ Hz, 1H, H12b); HRESIMS m/z 500.3952 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{54}\text{NO}_6$, 500.3951).

Preparation of MOM ether derived from **4**

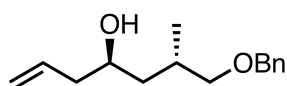


To a solution of **4** (0.2 mg, 0.4 μmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (150 μL , 870 μmol) in dry CH_2Cl_2 (300 μL) was added chloromethyl methyl ether (60 μL , 756 μmol) at 0 $^\circ\text{C}$. The mixture was warmed to room temperature and stirred for h. The reaction was diluted with EtOAc (10 mL) and washed with 1 M HCl aq. (3×3 mL) and brine. The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by HPLC to give **15** (0.2 mg, 0.3 μmol , $t_{\text{R}} = 49.3$ min). [Cosmosil 5C₁₈MS-II ($\phi 20 \times 250$ mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV215 nm; solvent 85% MeOH].

15: ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ_{H} 4.75-4.55 (m, 8H), 4.46 (dd, $J = 8.9, 6.2$ Hz, 1H), 4.06 (m, 1H), 3.81-3.67 (m, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.64 (m, 1H), 3.363 (s, 6H), 3.361 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 2.51 (dd, $J = 13.9, 6.7$ Hz, 1H), 2.38 (dd, $J = 13.9, 5.8$ Hz, 1H), 1.87-1.71 (m, 3H), 1.71-1.44 (m, 12H), 1.45-1.32 (m, 4H), 1.31-1.13 (m, 5H), 1.04-0.86 (m, 18H); HRESIMS m/z 694.5087 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{72}\text{NO}_{11}$, 694.5105).

Synthesis of (9R)-**15** and (9S)-**15**

(4R,6S)-7-(Benzyloxy)-6-methylhept-1-en-4-ol (**21**)

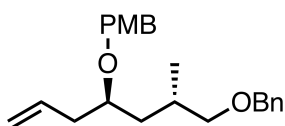


AllylMgBr (1.0 M solution in Et_2O , 5.1 mL, 5.1 mmol) was added to solution of (+)-*B*-methoxydiisopinocampheylborane (1.98 g, 6.3 mmol) in dry Et_2O (6.0 mL) under argon cooled at -78 $^\circ\text{C}$ and the mixture was stirred for 5 min. The solution was warmed to room temperature, stirred for additional 1h, and cooled -78 $^\circ\text{C}$ again. To the solution was added **18** (491.6 mg, 2.6 mmol) in dry Et_2O (2.0 mL) by cannula (washed with 2×2.0 mL of Et_2O) and stirred at -78 $^\circ\text{C}$ for 11.5 h. To the reaction mixture were added 1 M NaOH aq. (12 mL) and 30% H_2O_2 (12 mL), and the mixture was warmed to room temperature and stirred for 9 h. The layers were separated and the aqueous layer was extracted with Et_2O (3×15 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure. Isopinocampheol was

distilled under reduced pressure (30.0 torr) at room temperature. The residue was purified by chromatography on silica gel (4:1 hexane/EtOAc) to give **21** (427.9 mg, 1.83 mmol, 71 %, diastereomer ratio > 20:1) as a colorless oil. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were identical to known enantiomer.⁷⁷

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 7.42-7.25 (m, 5H), 5.85 (m, 1H), 5.17-5.04 (m, 2H), 4.53 (s, 2H), 3.73 (m, 1H), 3.38 (dd, $J = 9.2, 5.2$ Hz, 1H), 3.30 (dd, $J = 9.2, 7.6$ Hz, 1H), 2.94 (br s, 1H, OH), 2.31-2.15 (m, 2H), 2.00 (m, 1H), 1.49 (ddd, $J = 14.2, 9.4, 6.3$, 1H), 1.41 (ddd, $J = 14.2, 6.6, 2.9$ Hz, 1H), 0.94 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ_{C} 138.1, 135.3, 128.5, 127.8, 127.8, 117.6, 76.6, 73.2, 69.5, 42.8, 42.7, 31.7, 18.0; HRESIMS m/z 257.1512 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{Na}$, 257.1518); $[\alpha]^{25.9}_{\text{D}} -12.0$ (c 2.00, CHCl_3); IR (film) 3430, 2929, 1454, 1363, 1095, 913, 735, 697 cm^{-1} .

(4*R*,6*S*)-7-(Benzyloxy)-4-(4-methoxybenzyloxy)-6-methylhept-1-ene (22)

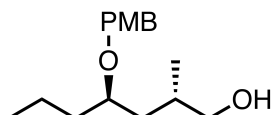


To a stirred suspension of NaH (60% in paraffin liquid, 64.8 mg, 1.62 mmol) in DMF (1.0 mL) was added a solution of **21** (228.1 mg, 0.97 mmol) in DMF (2 mL) by cannula under nitrogen at 0 °C and the mixture was stirred for 15 min. To the mixture was added 4-methoxybenzyl chloride (0.2 mL, 1.46 mmol) and warmed to room temperature. After additional 16 h, the reaction was quenched with H_2O (2 mL) and layers were separated. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 \times 5 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (15:1 hexane/EtOAc) to give **22** (298.0 mg, 0.84 mmol, 86 %) as a colorless oil.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 7.38-7.18 (m, 7H), 6.88 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 5.83 (dddd, $J = 17.1, 10.1, 7.0, 7.0$ Hz, 1H), 5.08 (d, $J = 17.1$ Hz, 1H), 5.06 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 4.54 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.48 (s, 2H), 4.37 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.54 (m, 1H), 3.34 (dd, $J = 9.0, 5.6$ Hz, 1H), 3.22 (dd, $J = 9.0, 7.0$ Hz, 1H), 2.41-2.25 (m, 2H), 2.02 (m, 1H), 1.65 (ddd, $J = 14.4, 9.7, 4.7$ Hz, 1H), 1.23 (ddd, $J = 14.4, 9.4, 4.0$ Hz, 1H), 0.90 (d,

$J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ_{C} 159.2, 138.9, 135.0, 131.0, 129.5, 128.4, 127.6, 127.5, 117.2, 113.8, 76.4, 75.9, 73.0, 70.5, 55.4, 38.8, 38.5, 30.1, 17.2; HRESIMS m/z 355.2263 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{O}_3$, 355.2273); $[\alpha]_{\text{D}}^{29.0} -22.2$ (c 1.00, CHCl_3); IR (film) 2854, 1511, 1246, 1089, 916, 819, 739, 697 cm^{-1} .

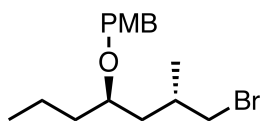
(2S,4R)-4-(4-Methoxybenzyloxy)-2-methylheptan-1-ol (23)



To a stirred suspension of Raney Ni-W2 (in dry EtOH, 12.0 g prepared according to ref 78) in dry EtOH (70 mL) was added a solution of **22** (922 mg, 2.6 mmol) in dry EtOH (8 mL) by cannula (washed with 2×3.5 mL of dry EtOH) under argon. The reaction mixture was degassed, charged with hydrogen 3 times, and stirred vigorously at room temperature under a hydrogen atmosphere for 14 h. The reaction mixture was filtered and washed with EtOH, and the filtrate and washing were concentrated. The residual oil was purified by chromatography on silica gel (1:4:1 hexane/benzene/Et₂O) to give **23** (443 mg, 1.7 mmol, 64%) as a colorless oil.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 7.26 (br d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.87 (br d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.53 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 4.35 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.48 (dd, $J = 10.8, 5.4$ Hz, 1H), 3.47 (m, 1H), 3.40 (dd, $J = 10.8, 6.1$ Hz, 1H), 1.80 (m, 1H), 1.66-1.55 (m, 2H), 1.50 (m, 1H), 1.44-1.34 (m, 2H), 1.32 (ddd, $J = 16.8, 6.7, 3.1$ Hz, 1H), 0.93 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 0.90 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ_{C} 159.3, 130.6, 29.7, 113.9, 77.4, 70.3, 68.6, 55.4, 39.0, 36.2, 33.7, 18.3, 17.7, 14.5; HRESIMS m/z 267.1956 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{O}_3$, 267.1960); $[\alpha]_{\text{D}}^{26.3} -40.0$ (c 1.00, CHCl_3); IR (film) 3422, 2931, 1512, 1247, 1035, 819 cm^{-1} .

(2S,4R)-1-Bromo-4-(4-methoxybenzyloxy)-2-methylheptane (17)

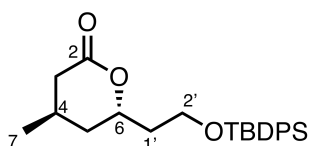


To a solution of **23** (212.5 mg, 0.80 mmol), Et₃N (320 μL, 2.3 mmol) and DMAP (9.3 mg, 76.1 μmol) in dry CH₂Cl₂ (1.6 mL) was added *p*-toluenesulfonyl chloride (301.7 mg, 1.58 mmol) at 0 °C under nitrogen. The mixture was stirred at 0 °C for 20 min and the cooling bath was removed. After additional 3 h, the reaction was quenched with H₂O (5 mL) and layers were separated. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 5 mL). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NH₄Cl and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (5:1 hexane/EtOAc) to give crude product. The crude product was used without further purification in the next step.

LiBr (699.1 mg, 8.05 mmol) was added to a solution of the crude product in dry DMF (8.0 mL) at room temperature under nitrogen. The mixture was warmed to 50 °C and stirred for 3 h. The reaction was cooled to 0 °C and quenched with saturated aqueous NH₄Cl (5 mL) and H₂O (5 mL). The layers were separated and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 5 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (20:1 hexane/EtOAc) to give **17** (216.9 mg, 0.66 mmol, 83% in 2 steps) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ_H 7.26 (br d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.88 (br d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.50 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 4.36 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.44 (m, 1H), 3.43 (dd, *J* = 9.9, 4.5 Hz, 1H), 3.33 (dd, *J* = 9.9, 6.1 Hz, 1H), 2.04 (m, 1H), 1.69 (ddd, *J* = 14.1, 9.0, 4.7 Hz, 1H), 1.59 (m, 1H), 1.47 (m, 1H), 1.41-1.34 (m, 2H), 1.32 (ddd, *J* = 14.1, 8.8, 3.8 Hz, 1H), 0.97 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.92 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ_C 159.2, 131.0, 129.5, 113.9, 76.1, 70.4, 55.4, 42.8, 39.9, 36.4, 31.8, 18.7, 18.6, 14.5; HRESIMS *m/z* 351.0935 [M+Na]⁺ (calcd for C₁₆H₂₅⁷⁹BrO₂Na, 351.0936); [α]_D^{24.9} -20.2 (*c* 1.00, CHCl₃); IR (film) 2957, 1613, 1512, 1463, 1248, 1037, 820 cm⁻¹.

(4*R*,6*S*)-6-[2-(*tert*-Butyldiphenylsiloxy)ethyl]-4-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-one
(24)

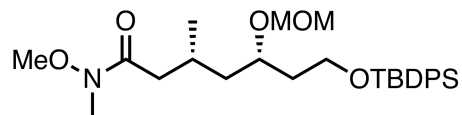


A 3.1 M solution in Et₂O of methyllithium (14.3 mL, 44 mmol) was added to a suspension of CuI (4.23 g, 22 mmol) in dry Et₂O (80 mL) under nitrogen at 0 °C, and the mixture was stirred at 0 °C for 25 min. To the mixture a solution of **20** (4.25 g, 11 mmol) in Et₂O (8 mL) was slowly added by cannula (wash with 3 × 4 mL of Et₂O) at -78 °C. The resultant mixture was stirred -78 °C for 15 min and warm to 0 °C. After additional 25 min, saturated NH₄Cl aq. was added and the mixture was stirred until precipitate was dissolved. The layers were separated and the aqueous layer was extracted by Et₂O (3 × 100 mL). The combined organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (7:1 hexane/EtOAc) to give **24** (3.99 g, 10.0 mmol, 90%) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ_H 7.67-7.61 (m, 4H), 7.46-7.35 (m, 6H), 4.65 (m, 1H), 3.87 (ddd, *J* = 10.6, 8.1, 4.9 Hz, 1H), 3.77 (ddd, *J* = 10.6, 3.7, 3.7 Hz, 1H), 2.55 (m, 1H), 2.21-2.09 (m, 2H), 1.95 (m, 1H), 1.83-1.72 (m, 2H), 1.59 (m, 1H), 1.08 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 1.04 (s, 9H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ_C 172.5, 135.6, 133.7, 133.6, 129.9, 127.8, 74.3, 59.9, 38.4, 37.6, 35.2, 27.0, 23.9, 21.6, 19.3; HRESIMS *m/z* 419.2008 [M+H]⁺ (calcd for C₂₄H₃₃O₃Si, 419.2018); [α]_D^{28.9} +45.7 (*c* 1.00, CHCl₃); IR (film) 2956, 1739, 1427, 1232, 1110, 822, 702, 612 cm⁻¹.

¹H NMR (C₆D₆, 400 MHz): δ_H 7.82-7.72 (m, 4H), 7.32-7.19 (m, 6H), 4.29 (dddd, *J* = 8.8, 8.1, 4.5, 4.3 Hz, 1H, H6), 3.81 (ddd, *J* = 10.3, 8.1, 5.2 Hz, 1H, H2'a), 3.67 (ddd, *J* = 10.3, 5.8, 5.2 Hz, 1H, H2'b), 2.17 (dd, *J* = 16.3, 5.7 Hz, 1H, H3a), 1.66 (dddd, *J* = 12.9, 8.2, 5.2, 4.5 Hz, 1H, H1'a), 1.65 (dd, *J* = 16.3, 9.4 Hz, 1H, H3b), 1.48 (dddd, *J* = 4.5, 5.2, 8.2, 12.9 Hz, 1H, H1'b), 1.46 (ddddq, *J* = 9.4, 7.0, 6.1, 5.7, 7.0 Hz, 1H, H4), 1.16 (ddd, *J* = 13.9, 8.8, 7.0 Hz, 1H, H5a), 1.16 (s, 9H), 0.91 (ddd, *J* = 13.9, 6.1, 4.3 Hz, 1H, H5b), 0.51 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, H7).

(3*R*,5*S*)-7-(*tert*-Butyldiphenylsiloxy)-*N*-methoxy-5-(methoxymethoxy)-*N*,3-dimethylheptanamide (25)

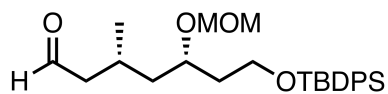


A 2.0 M solution of *i*-PrMgCl in THF (19 mL, 38 mmol) was added to a suspension of **24** (3.99 g, 10.1 mmol) and *N,O*-dimethylhydroxylamine hydrochloride (1.99 g, 20.0 mmol) in dry THF (42 mL) under nitrogen at -19 °C and the mixture was stirred for 1 h. The reaction was quenched with saturated NH₄Cl aq. and the layers were separated. The aqueous layer was extracted by EtOAc (3 × 50 mL). The combined organic layers were washed with brine and dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was used without purification in the next step.

N,N-Diisopropylethylamine (3.8 mL, 22 mmol) was added to a solution of the crude product (5.00 g) in dry CH₂Cl₂ (10 mL) under nitrogen at 0 °C. To the mixture was added chloromethyl methyl ether (1.6 mL, 20 mmol) and the mixture was stirred at 0 °C for 1h, and warmed to room temperature. After additional 4 h, the mixture was diluted by EtOAc (20 mL) and washed with 1 M HCl aq. (3 × 20 mL), saturated NaHCO₃ aq. (20 mL) and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (5:1 to 2:1 hexane/EtOAc) to give **25** (4.96 g, 9.9 mmol, 98% in 2 steps) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ_H 7.69-7.63 (m, 4H), 7.45-7.34 (m, 6H), 4.62 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.59 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.86 (m, 1H), 3.81-3.70 (m, 2H), 3.65 (s, 3H), 3.31 (s, 3H), 3.18 (s, 3H), 2.45 (dd, *J* = 14.7, 4.9 Hz, 1H), 2.28 (m, 1H), 2.17 (m, 1H), 1.82 (m, 1H), 1.68 (m, 1H), 1.56-1.41 (m, 2H), 1.04 (s, 9H), 0.97 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ_C 173.9, 135.7, 133.98, 133.94, 129.7, 127.8, 95.8, 73.0, 61.3, 60.5, 55.7, 42.4, 39.1, 37.6, 32.2, 27.0, 26.6, 20.4, 19.3; HRESIMS *m/z* 524.2800 [M+Na]⁺ (calcd for C₂₈H₄₃NO₅SiNa, 524.2808); [α]_D^{28.8} +0.2 (*c* 1.00, CHCl₃); IR (film) 2932, 1664, 1427, 1110, 1036, 703 cm⁻¹.

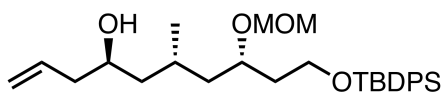
(3*R*,5*S*)-7-(*tert*-Butyldiphenylsiloxy)-5-(methoxymethoxy)-3-methylheptanal (19**)**



A 2.0 M solution of lithium aluminum hydride in THF (4.4 mL, 8.8 mmol) was added to solution of **25** (4.40 g, 8.8 mmol) in THF (88 mL) under nitrogen cooled at 0 °C and the mixture was stirred at 0 °C for 2 h. The reaction was quenched with saturated Rochelle's salt aq. (150 mL) and warmed to room temperature. The mixture was stirred for 2 h and the layers were separated. The aqueous layer was extracted by EtOAc (3 × 150 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (10:1 hexane/EtOAc) to give **19** (3.73 g, 8.4 mmol, 96%) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ_H 9.73 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.68-7.63 (m, 4H), 7.46-7.35 (m, 6H), 4.62 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.56 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.83 (dt, *J* = 12.2, 6.3 Hz, 1H), 3.81-3.69 (m, 2H), 3.31 (s, 3H), 2.50 (ddd, *J* = 19.5, 7.8, 1.5 Hz, 1H), 2.25-2.14 (m, 2H), 1.80-1.65 (m, 2H), 1.53 (dt, *J* = 13.7, 6.8 Hz, 1H), 1.42 (dt, *J* = 13.7, 6.4 Hz, 1H), 1.05 (s, 9H), 0.97 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ_C 202.8, 135.7, 133.9, 129.8, 127.8, 95.8, 72.9, 60.4, 55.8, 50.8, 42.1, 37.6, 27.0, 24.8, 20.6, 19.3; HRESIMS *m/z* 465.2428 [M+Na]⁺ (calcd for C₂₆H₃₈O₄SiNa, 465.2437); [α]^{22.9}_D -2.2 (*c* 1.00, CHCl₃); IR (film) 2932, 2857, 1725, 1428, 1110, 1037, 702 cm⁻¹.

(4*R*,6*S*,8*S*)-10-(*tert*-Butyldiphenylsioxy)-8-(methoxymethoxy)-6-methyldec-1-en-4-ol (26**)**

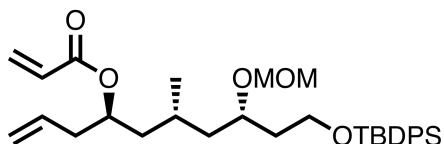


AllylMgBr (1.0 M solution in Et₂O, 1.8 mL, 1.8 mmol) was added to solution of (+)-*B*-Methoxydiisopinocampheylborane (1.34 g, 4.2 mmol) in dry toluene (3.0 mL) under argon at -78 °C and the mixture was stirred for 20 min. The solution was warmed to room temperature, stirred for additional 55 min, and cooled -78 °C again. To the solution was added **19** (398 mg, 0.90 mmol) in dry toluene (1.0 mL) by cannula (washed with 3 × 0.3 mL of toluene) and stirred at -78 °C for 18 h. To the reaction mixture were added 1 M NaOH aq. (4 mL) and 30% H₂O₂ (6 mL), and the mixture was warmed to room

temperature and stirred for 3 h. The layers were separated and the aqueous layer was extracted with Et₂O (3 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (15:1 to 10:1 hexane/EtOAc) to give **26** (402 mg, 0.83 mmol, 92%, diastereomer ratio = 7.4:1) as a colorless oil. The product mixture was used without further purification in the next step because separation of the diastereomer was difficult.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ_H 7.69-7.63 (m, 4H), 7.45-7.34 (m, 6H), 5.82 (m, 1H), 5.12 (br d, *J* = 15.1 Hz, 1H), 5.12 (br d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 4.62 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.60 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.87 (br quint, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.80-3.69 (m, 3H), 3.32 (s, 3H), 2.28-2.12 (m, 2H), 1.82 (m, 1H), 1.78-1.64 (m, 2H), 1.54-1.37 (m, 2H), 1.38-1.11 (m, 2H), 1.05 (s, 9H), 0.93 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ_C 135.7, 135.1, 134.0, 129.7, 127.8, 118.0, 96.3, 73.7, 68.5, 60.6, 55.7, 44.2, 43.3, 43.1, 38.1, 27.0, 26.0, 20.1, 19.3; HRESIMS *m/z* 507.2896 [M+Na]⁺ (calcd for C₂₉H₄₄O₄SiNa, 507.2907); [α]^{28.6}_D -13.3 (*c* 1.00, CHCl₃); IR (film) 3473, 2930, 1427, 1110, 1036, 916, 823, 737, 701, 610 cm⁻¹.

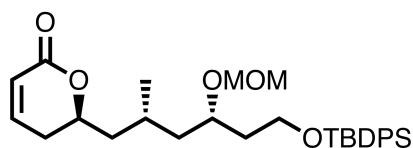
(4*R*,6*R*,8*S*)-10-(*tert*-Butyldiphenylsiloxy)-8-(methoxymethoxy)-6-methyldec-1-en-4-yl acrylate (27**)**



Freshly distilled acryloyl chloride (0.2 mL, 2.46 mmol) was added to the solution of **26** (613.0 mg, 1.26 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (0.6 mL, 3.48 mmol) in dry CH₂Cl₂ (3.0 mL) under nitrogen at -20 °C. The solution was warmed to 0 °C and stirred for 1.5 h. The reaction was quenched with H₂O and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (10 mL). The combined organic layers were washed with 1 M HCl and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (10:1 hexane/EtOAc) to give **27** (706.9 mg, 1.31 mmol, quant.) as a colorless oil.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 7.69-7.62 (m, 4H), 7.45-7.34 (m, 6H), 6.38 (dd, $J = 17.3$, 1.4 Hz, 1H), 6.08 (dd, $J = 17.3$, 10.6 Hz, 1H), 5.79 (dd, $J = 10.6$, 1.4 Hz, 1H), 5.75 (ddt, $J = 17.1$, 10.1, 7.2 Hz, 1H), 5.14 (m, 1H), 5.06 (br d, $J = 17.1$ Hz, 1H), 5.05 (br d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 4.60 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.58 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 3.83 (dt, $J = 12.6$, 6.3 Hz, 1H), 3.78-3.70 (m, 2H), 3.30 (s, 3H), 2.33 (br t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.76 (ddd, $J = 14.1$, 10.3, 3.8 Hz, 1H), 1.74-1.67 (m, 2H), 1.62 (m, 1H), 1.47 (m, 1H), 1.35 (m, 1H), 1.25 (ddd, $J = 14.1$, 10.1, 2.9 Hz, 1H), 1.05 (s, 9H), 0.91 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ_{C} 166.0, 135.7, 134.0, 133.7, 130.6, 129.7, 128.9, 127.8, 118.0, 95.9, 73.1, 71.4, 60.6, 55.7, 43.2, 41.0, 39.8, 37.8, 27.0, 26.0, 19.9, 19.3; HRESIMS m/z 561.3001 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{O}_5\text{Si}$, 561.3012); $[\alpha]^{26.3}_{\text{D}} +12.8$ (c 1.00, CHCl_3); IR (film) 2930, 1722, 1404, 1269, 1193, 1269, 1193, 1110, 1040, 916, 736, 701 cm^{-1} .

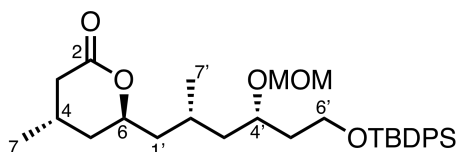
(S)-6-[(2R,4S)-6-(*tert*-Butyldiphenylsiloxy)-4-(methoxymethoxy)-2-methylhexyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one (28)



Grubbs I catalyst (96.9 mg, 0.12 mmol) was added to solution of **27** (2.09 g, 3.9 mmol) in dry CH_2Cl_2 (130 mL) under nitrogen and the mixture was refluxed for 10 h. The mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (4:1 to 1:1 hexane/EtOAc) to give **28** (1.90 g, 3.7 mmol, 95%) as a pale black oil.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 7.69-7.63 (m, 4H), 7.45-7.35 (m, 6H), 6.86 (dt, $J = 9.8$, 3.9 Hz, 1H), 6.02 (dt, $J = 9.8$, 2.0 Hz, 1H), 4.63 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.59 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.52 (m, 1H), 3.86 (qd, $J = 6.8$, 4.8 Hz, 1H), 3.81-3.69 (m, 2H), 3.32 (s, 3H), 2.32-2.26 (m, 2H), 2.02-1.87 (m, 2H), 1.77 (m, 1H), 1.67 (m, 1H), 1.49 (m, 1H), 1.38 (dt, $J = 13.7$, 6.8 Hz, 1H), 1.29 (ddd, $J = 13.7$, 9.8, 2.9 Hz, 1H), 1.05 (s, 9H), 0.95 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ_{C} 164.6, 145.1, 135.7, 133.9, 129.7, 127.8, 121.6, 95.9, 75.6, 72.9, 60.5, 55.8, 43.0, 42.5, 37.6, 30.3, 27.0, 25.3, 19.5, 19.3; HRESIMS m/z 533.3692 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_5\text{SiNa}$, 533.2699); $[\alpha]^{26.3}_{\text{D}} +33.1$ (c 1.00, CHCl_3); IR (film) 2930, 1721, 1427, 1245, 1106, 1035, 821, 701 cm^{-1} .

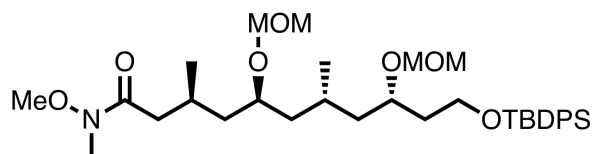
(4*S*,6*S*)-6-[(2*R*,4*S*)-6-((*tert*-Butyldiphenylsiloxy)-4-(methoxymethoxy)-2-methylhexyl)-4-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-one (29**)**



A 3.1 M solution of methyllithium in Et₂O (4.8 mL, 15 mmol) was added to a suspension of CuI (1.41 g, 7.4 mmol) in dry Et₂O (30 mL) under nitrogen at 0 °C, and the mixture was stirred at 0 °C for 25 min and cooled to -78 °C. A solution of **28** (1.90 g, 3.7 mmol) in Et₂O (4 mL) was slowly added by cannula (wash with 2 × 2 mL of Et₂O) and the mixture was stirred at -78 °C for 1 h. The reaction was quenched with saturated NH₄Cl aq. (100 mL), and the mixture was warmed to room temperature and stirred until precipitate was dissolved. The layers were separated and the aqueous layer was extracted by Et₂O (3 × 100 mL). The combined organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (4:1 to 3:1 hexane/EtOAc) to give **29** (1.81 g, 3.4 mmol, 92%) as a colorless oil.

¹H NMR (C₆D₆, 400 MHz): δ_H 7.85-7.74 (m, 4H), 7.31-7.21 (m, 6H), 4.67 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.62 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.09 (m, 1H, H₆), 3.98 (tt, *J* = 6.1, 6.1 Hz, 1H, H_{4'}), 3.91 (dt, *J* = 10.1, 7.0 Hz, 1H, H_{6'a}), 3.83 (dt, *J* = 10.1, 6.1 Hz, 1H, H_{6'b}), 3.28 (s, 3H), 2.21 (dd, *J* = 15.9, 5.6 Hz, 1H, H_{3a}), 2.03 (m, 1H, H_{2'}), 1.79 (m, 2H, H_{5'}), 1.71 (ddd, *J* = 13.7, 9.9, 4.3 Hz, 1H, H_{1'a}), 1.67 (dd, *J* = 15.9, 9.4 Hz, 1H, H_{3b}), 1.55 (m, 1H, H_{3'a}), 1.55 (m, 1H, H₄), 1.34 (dt, *J* = 13.5, 6.7 Hz, 1H, H_{3'b}), 1.19 (ddd, *J* = 14.1, 9.4, 7.1 Hz, 1H, H_{5a}), 1.20 (s, 9H), 0.91 (ddd, *J* = 14.1, 6.2, 4.3 Hz, 1H, H_{5b}), 0.88 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, H_{7'}), 0.84 (ddd, *J* = 13.7, 9.7, 3.4 Hz, 1H, H_{1'b}), 0.54 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, H₇); ¹³C NMR (C₆D₆, 100 MHz): δ_C 170.5, 136.1, 136.0, 134.3, 134.3, 130.0, 128.6, 96.0, 73.9, 72.9, 61.0, 55.6, 43.5, 43.2, 38.1, 37.6, 35.9, 27.2, 25.8, 24.0, 21.2, 19.9, 19.5; HRESIMS *m/z* 549.3010 [M+H]⁺ (calcd for C₃₁H₄₆O₅SiNa, 549.3012); [α]_D^{26.2} -20.4 (*c* 1.00, CHCl₃); IR (film) 2952, 1736, 1427, 1109, 1035, 701 cm⁻¹.

(3*S*,5*S*,7*S*,9*S*)-11-(*tert*-Butyldiphenylsiloxy)-*N*-methoxy-5,9-bis(methoxymethoxy)-*N*,3,7-trimethylundecanamide (16a**)**

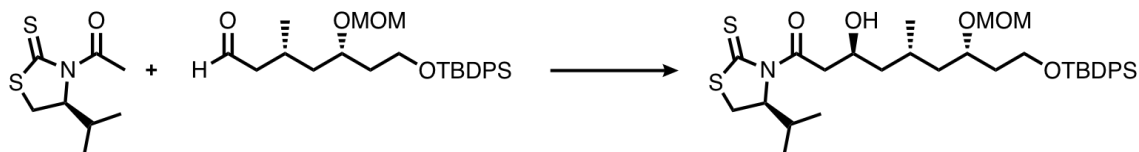


A 2.0 M solution of *i*-PrMgCl in THF (6.8 mL, 13.6 mmol) was added to a suspension of **29** (1.81 g, 3.4 mmol) and *N,O*-dimethylhydroxylamine hydrochloride (672 mg, 6.9 mmol) in dry THF (7.0 mL) under nitrogen at -16 °C and stirred for 1 h. The reaction was quenched with saturated NH₄Cl aq. and the layers were separated. The aqueous layer was extracted by EtOAc (3 × 20 mL). The combined organic layers were washed with brine and dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was used in the next step without purification.

N,N-Diisopropylethylamine (1.5 mL, 8.7 mmol) was added to a solution of the crude product in dry CH₂Cl₂ (3.5 mL) under nitrogen at -5 °C. To the mixture was added chloromethyl methyl ether (0.56 mL, 7.1 mmol) and the mixture was stirred for 10 min at that temperature and warm to room temperature. After additional 12 h, the mixture was diluted by EtOAc (5 mL) and washed with 1 M HCl aq. (3 × 10 mL), saturated NaHCO₃ aq. (10 mL) and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (3:1 to 2:1 hexane/EtOAc) to give **16a** (1.96 g, 3.1 mmol, 90% in 2 steps) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ_H 7.70-7.61 (m, 4H), 7.46-7.33 (m, 6H), 4.67 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.64-4.55 (m, 3H), 3.83 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 3.80-3.72 (m, 2H), 3.67 (m, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.36 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 3.17 (s, 3H), 2.41 (dd, *J* = 15.4, 5.1 Hz, 1H), 2.28 (dd, *J* = 15.4, 8.0 Hz, 1H), 2.11 (m, 1H), 1.86-1.70 (m, 2H), 1.64 (m, 1H), 1.56-1.31 (m, 5H), 1.26 (m, 1H), 1.04 (s, 9H), 0.95 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.92 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ_C 173.8, 135.7, 134.0, 129.7, 127.7, 95.9, 95.4, 73.5, 73.1, 61.3, 60.6, 55.8, 55.6, 43.5, 42.7, 42.6, 39.5, 37.8, 32.2, 27.0, 26.7, 26.0, 20.1, 19.6, 19.3; HRESIMS *m/z* 654.3797 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₅H₅₇NO₇Si, 654.3802); [α]_D^{25.7} -7.3 (*c* 1.00, CHCl₃); IR (film) 2932, 1666, 1428, 1109, 1095, 1038, 702 cm⁻¹.

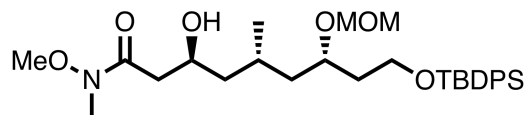
(3*S*,5*S*,7*S*)-9-(tert-Butyldiphenylsiloxy)-3-hydroxy-1-[(*S*)-4-isopropyl-2-thioxothiazolidin-3-yl]-7-(methoxymethoxy)-5-methylnonan-1-one (31)



To a solution of **20** (822.2 mg, 4.04 mmol) in dry CH₂Cl₂ (28 mL) cooled at 0 °C under nitrogen was added TiCl₄ (520 μL, 4.68 mmol), and the mixture was stirred for 10 min. The mixture was cooled to -78 °C, and *N,N*-diisopropylethylamine (900 μL, 5.22 mmol) was added. The mixture was stirred at -78 °C for 2 h, and then a solution of aldehyde **19** (1.22 g, 2.76 mmol) in dry CH₂Cl₂ (3 mL) was added by cannula (wash with 2 × 1.5 mL of CH₂Cl₂). After the resulting mixture was stirred at -78 °C for 2 h, the reaction was quenched with H₂O (10 mL) and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with EtOAc (2 × 20 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (4:1 to 2:1 to 1:1 hexan/EtOAc) to give **31** (1.38 g, 2.13 mmol, 79%) as a yellow oil.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ_H 7.70-7.62 (m, 4H), 7.46-7.34 (m, 6H), 5.16 (dt, *J* = 0.9, 6.7 Hz, 1H), 4.62 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.60 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.24 (tt, *J* = 9.7, 2.5 Hz, 1H), 3.86 (m, 1H), 3.80-3.70 (m, 2H), 3.60-3.47 (m, 2H), 3.31 (s, 3H), 3.17 (dd, *J* = 17.5, 9.2 Hz, 1H), 3.03 (dd, *J* = 11.4, 0.9 Hz, 1H), 2.37 (m, 1H), 1.88 (m, 1H), 1.83-1.43 (m, 4H), 1.36 (m, 1H), 1.15 (ddd, *J* = 13.0, 9.4, 2.7 Hz, 1H), 1.07 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.05 (s, 9H), 0.99 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.95 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ_C 173.3, 135.7, 134.0, 129.7, 127.8, 95.9, 73.5, 71.5, 66.1, 60.6, 55.7, 51.0, 45.9, 44.1, 42.1, 37.6, 31.0, 30.7, 27.0, 26.3, 21.0, 19.3, 19.2, 18.0; HRESIMS *m/z* 668.2858 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₄H₅₁NO₅S₂SiNa, 668.2876); [α]_D^{26.5} -70.0 (*c* 1.00, CHCl₃); IR (film) 3464, 2931, 1686, 1471, 1362, 1110, 1038, 703 cm⁻¹.

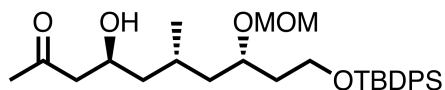
(3*S*,5*S*,7*S*)-9-(*tert*-Butyldiphenylsiloxy)-3-hydroxy-*N*-methoxy-7-(methoxymethoxy)-*N*,5-dimethylnonanamide (32)



Imidazole (752.5 mg, 11.1 mmol) was added to a solution of **31** (1.38 g, 2.13 mmol) and *N,O*-dimethylhydroxylamine hydrochloride (643.6 mg, 6.60 mmol) in dry CH₂Cl₂ (10 mL) at room temperature and the mixture was stirred for 18 h. The reaction was quenched with saturated aqueous NH₄Cl (10 mL) and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with EtOAc (2 × 20 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (3:1 to 1:2 hexane/EtOAc) to give **32** (1.02 g, 1.87 mmol, 88%) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ_H 7.74-7.62 (m, 4H), 7.35-7.44 (m, 6H), 4.60 (s, 2H), 4.12 (m, 1H), 3.86 (m, 1H), 3.74-3.81 (m, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 3.20 (s, 3H), 2.65 (br d, *J* = 16.8 Hz, 1H), 2.42 (dd, *J* = 16.8, 9.6 Hz, 1H), 1.72-1.90 (m, 2H), 1.66 (m, 1H), 1.35-1.55 (m, 4H), 1.04 (s, 9H), 0.95 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ_C 174.0, 135.7, 134.0, 134.0, 129.7, 127.7, 95.8, 73.4, 66.0, 61.3, 60.5, 55.6, 44.3, 42.2, 38.6, 37.7, 32.0, 27.0, 26.4, 20.8, 19.3; HRESIMS *m/z* 568.3065 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₀H₄₇NO₆SiNa, 568.3070; [α]_D^{28.9} -5.9 (*c* 0.93, CHCl₃); IR (film) 3467, 2932, 1647, 1472, 1387, 1110, 1037, 703 cm⁻¹.

(4*S*,6*S*,8*S*)-10-(*tert*-Butyldiphenylsiloxy)-4-hydroxy-8-(methoxymethoxy)-6-methyldecan-2-one (33)

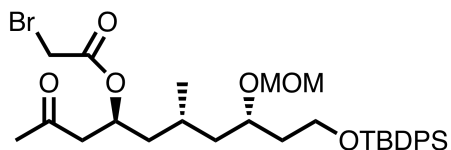


A 3 M solution in Et₂O of MeMgBr (3.8 mL, 11.4 mmol) was added to a solution of **32** (1.02 g, 1.87 mmol) in dry Et₂O (10 mL) cooled at 0 °C under nitrogen. The mixture was warmed to room temperature and stirred for 1 h. The reaction was quenched with saturated aqueous NH₄Cl (20 mL) at 0 °C and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with EtOAc (2 × 20 mL). The combined organic layers were washed

with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (3:1 hexane/EtOAc) to give **33** (880.1 mg, 1.76 mmol, 94%) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ_H 7.64-7.68 (m, 4H), 7.36-7.44 (m, 6H), 4.61 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.59 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.13 (m, 1H), 3.85 (m, 1H), 3.77 (m, 2H), 3.30 (s, 3H), 3.04 (br s, 1H), 2.60 (dd, *J* = 17.6, 2.8 Hz, 1H), 2.50 (dd, *J* = 17.6, 8.9 Hz, 1H), 2.17 (s, 3H), 1.79 (m, 1H), 1.60-1.74 (m, 2H), 1.49 (m, 1H), 1.24-1.43 (m, 3H), 1.05 (s, 9H), 0.94 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ_C 210.0, 135.7, 134.0, 129.7, 127.8, 95.9, 73.5, 65.6, 60.5, 55.7, 50.3, 44.2, 42.1, 37.6, 30.9, 27.0, 26.3, 21.0, 19.3; HRESIMS *m/z* 523.2847 [M+Na]⁺ (calcd for C₂₉H₄₄O₅SiNa, 523.2856); [α]^{28.9}_D -6.0 (*c* 1.00, CHCl₃); IR (film) 3469, 2930, 1712, 1428, 1110, 1037, 703 cm⁻¹.

(4*S*,6*R*,8*S*)-10-(tert-Butyldiphenylsiloxy)-8-(methoxymethoxy)-6-methyl-2-oxodecan-4-yl 2-bromoacetate (34**)**

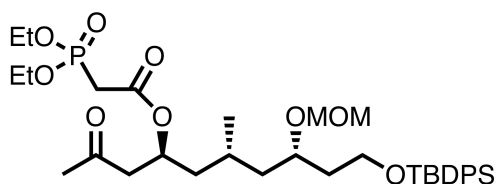


Bromoacetyl bromide (400 μL, 4.52 mmol) was added to a solution of **33** (880.1 mg, 1.76 mmol) and pyridine (420 μL, 5.21 mmol) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) cooled at 0 °C under nitrogen. The mixture was warmed to room temperature and stirred for 1 h. The reaction was quenched with H₂O (10 mL) and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with EtOAc (2 × 10 mL). The combined organic layers were washed with 1 M aqueous HCl, saturated aqueous NaHCO₃ and brine, and dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (5:1 hexane/EtOAc) to give **34** (903.4 mg, 1.45 mmol, 83%) as a yellow oil.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ_H 7.64-7.67 (m, 4H), 7.36-7.44 (m, 6H), 5.37 (m, 1H), 4.61 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.58 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.82 (m, 1H), 3.70-3.79 (m, 2H), 3.74 (s, 2H), 3.31 (s, 3H), 2.74 (dd, *J* = 16.6, 7.4 Hz, 1H), 2.65 (dd, *J* = 16.6, 5.0 Hz, 1H), 2.16 (s, 3H), 1.50-1.77 (m, 6H), 1.43 (m, 1H), 1.05 (s, 9H), 0.96 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ_C 205.2, 166.7, 135.7, 133.9, 129.8, 127.8, 96.0, 73.2, 71.1, 60.5,

55.7, 47.7, 42.2, 41.4, 37.7, 30.7, 27.0, 26.6, 26.0, 20.3, 19.3; HRESIMS m/z 643.2065 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{31}H_{45}^{79}BrO_6SiNa$, 643.2066); $[\alpha]^{29.7}_D -3.0$ (c 1.20, $CHCl_3$); IR (film) 2929, 1736, 1428, 1278, 1110, 1037, 703 cm^{-1} .

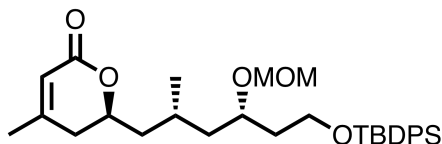
(4*S*,6*R*,8*S*)-10-(tert-Butyldiphenylsiloxy)-8-(methoxymethoxy)-6-methyl-2-oxodecan-4-yl 2-(diethoxyphosphoryl)acetate (35)



Triethyl phosphite (1.0 mL, 5.6 mmol) was added to **34** (903.4 mg, 1.45 mmol) at room temperature under nitrogen. The mixture was warmed to 70 °C and stirred for 4 h. The resulting mixture was directly purified by short chromatography on ODS gel (50% aqueous MeOH to MeOH), followed by chromatography on silica gel (5:1 to 2:1 to 1:2 hexane/EtOAc to EtOAc) to give **35** (896.2 mg, 1.32 mmol, 91%) as a colorless oil.

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ_H 7.63-7.67 (m, 4H), 7.36-7.44 (m, 6H), 5.36 (m, 1H), 4.58 (s, 2H), 4.16 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.14 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.70-3.84 (m, 3H), 3.29 (s, 3H), 2.901 (d, $J = 21.5$ Hz, 1H), 2.895 (d, $J = 21.5$ Hz, 1H), 2.74 (dd, $J = 16.6, 7.2$ Hz, 1H), 2.61 (dd, $J = 16.6, 5.2$ Hz, 1H), 2.16 (s, 3H), 1.69-1.78 (m, 2H), 1.48-1.67 (m, 3H), 1.43-1.46 (m, 2H), 1.33 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 1.04 (s, 9H), 0.95 (d, $J = 5.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ_C 205.4, 165.2 (d, $J_{CP} = 5.6$ Hz), 135.7, 133.9, 129.8, 127.8, 96.0, 73.3, 70.5, 62.9, 62.8, 62.7, 60.5, 55.7, 47.8, 42.3, 41.6, 37.7, 34.5 (d, $J_{CP} = 133.4$ Hz), 30.6, 27.0, 26.7, 20.2, 19.3, 16.5 (d, $J_{CP} = 6.6$ Hz); HRESIMS m/z 701.3256 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{35}H_{55}O_9PSiNa$, 701.3251); $[\alpha]^{28.3}_D -37.7$ (c 0.40, $CHCl_3$); IR (film) 2929, 1736, 1268, 1110, 1031, 703 cm^{-1} .

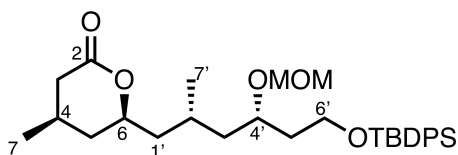
(S)-6-[(2R,4S)-6-(tert-Butyldiphenylsiloxy)-4-(methoxymethoxy)-2-methylhexyl]-4-methyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one (36)



NaH (60% in paraffin liquid, 63.0 mg, 1.58 mmol) was slowly added to a solution of **35** (896.2 mg, 1.32 mmol) in dry THF (53 mL) cooled at 0 °C under nitrogen. The mixture was warmed to room temperature and stirred for 7.5 h. The reaction was carefully quenched with saturated aqueous NH₄Cl (100 mL) at 0 °C and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with EtOAc (2 × 50 mL). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO₃ and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (5:1 to 2:1 hexane/EtOAc) to give **36** (621.7 mg, 1.18 mmol, 90%) as a yellowish oil.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ_H 7.64-7.68 (m, 4H), 7.36-7.44 (m, 6H), 5.80 (s, 1H), 4.61 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.58 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.45 (m, 1H), 3.85 (m, 1H), 3.70-3.80 (m, 2H), 3.30 (s, 3H), 2.26 (dd, *J* = 17.6, 11.9 Hz, 1H), 2.17 (dd, *J* = 17.6, 4.2 Hz, 1H), 1.97 (s, 3H), 1.73-1.84 (m, 2H), 1.58-1.71 (m, 3H), 1.46 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.04 (s, 9H), 0.96 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ_C 165.4, 157.0, 135.7, 133.9, 133.9, 129.8, 127.8, 116.7, 96.0, 75.8, 73.4, 60.5, 55.7, 42.4, 37.7, 35.0, 29.9, 27.0, 26.3, 23.1, 20.5, 19.3; HRESIMS *m/z* 547.2860 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₁H₄₄O₅SiNa, 547.2856); [α]_D^{28.2} -146.7 (*c* 0.19, CHCl₃); IR (film) 2928, 1723, 1428, 1247, 1110, 1037, 703 cm⁻¹.

(4R,6S)-6-[(2R,4S)-6-(tert-Butyldiphenylsiloxy)-4-(methoxymethoxy)-2-methylhexyl]-4-methyltetrahydro-2H-pyran-2-one (37)



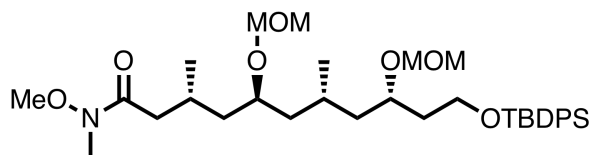
To a solution of **36** (591.4 mg, 1.13 mmol) in EtOH was added 5 % Pd/C (59.7 mg) under nitrogen. The reaction mixture was degassed, charged with hydrogen 3 times, and stirred vigorously at room temperature under a hydrogen atmosphere for 17 h. The reaction

mixture was filtered and washed with MeOH, and the filtrate and washings were concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (10:1 to 5:1 hexane/EtOAc) to give **37** (369.0 mg, 0.70 mmol, 62%) as a colorless oil.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 7.70-7.60 (m, 4H), 7.49-7.34 (m, 6H), 4.61 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.59 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.34 (m, 1H), 3.85 (m, 1H), 3.80-3.68 (m, 2H), 3.31 (s, 3H), 2.67 (m, 1H), 2.09-1.95 (m, 2H), 1.90 (m, 1H), 1.84-1.71 (m, 2H), 1.69-1.53 (m, 3H), 1.45 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.14 (m, 1H), 1.05 (s, 9H), 1.02 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ_{C} 171.6, 135.7, 134.0, 133.9, 129.8, 127.8, 96.0, 79.1, 73.3, 60.5, 55.7, 43.8, 42.4, 38.2, 37.7, 37.4, 29.9, 27.0, 26.9, 26.2, 21.9, 20.4, 19.3; HRESIMS m/z 549.3000 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_5\text{SiNa}$, 549.3012); $[\alpha]_{\text{D}}^{29.5} +64.8$ (c 0.27, CHCl_3); IR (film) 2929, 1736, 1428, 1239, 1110, 1037, 822, 702 cm^{-1} .

^1H NMR (C_6D_6 , 400 MHz): δ_{H} 7.89-7.75 (m, 4H), 7.33-7.22 (m, 6H), 4.63 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.58 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 3.97 (m, 2H, H6'), 3.91 (m, 1H, H4'), 3.88 (m, 1H, H6), 3.20 (s, 3H), 2.27 (ddd, $J = 17.4, 5.8, 1.9$ Hz, 1H), 1.87 (m, 1H, H3'a), 1.82 (m, 1H, H2'), (m, 1H, H3'b), 1.58 (dd, $J = 17.4, 10.5$ Hz, 1H), 1.48 (m, 2H, H5'), 1.42 (dt, $J = 13.9, 6.7$ Hz, 1H, H1'a), 1.29 (ddd, $J = 13.9, 6., 5.6$ Hz, 1H, H1'b), 1.23 (m, 1H, H4), 1.20 (m, 1H, H5a), 1.20 (s, 9H), 0.90 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, H7'), 0.58 (ddd, $J = 13.1, 13.1, 13.1$ Hz, 1H, H5b), 0.48 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H7).

(3R,5S,7S,9S)-11-(tert-Butyldiphenylsiloxy)-N-methoxy-5,9-bis(methoxymethoxy)-N,3,7-trimethylundecanamide (16b)



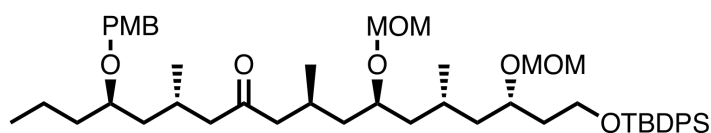
A 2.0 M solution of *i*-PrMgCl in THF (1.2 mL, 2.4 mmol) was added to a suspension of **37** (369.0 mg, 700.5 μmol) and *N,O*-dimethylhydroxylamine hydrochloride (136.8 mg, 1.4 mmol) in dry THF (3.0 mL) under nitrogen cooled at -18 $^{\circ}\text{C}$ and stirred for 15 min. The reaction was quenched with saturated NH_4Cl aq. (10 mL) and the layers were separated. The aqueous layer was extracted by EtOAc (2×10 mL). The combined organic

layers were washed with brine and dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was used in the next step without purification.

To a solution of the crude product in dry CH₂Cl₂ (1.5 mL) under nitrogen cooled at 0 °C were added *N,N*-Diisopropylethylamine (430 μL, 2.5 mmol) and chloromethyl methyl ether (120 μL, 1.5 mmol) successively, and the mixture was warmed to room temperature and stirred for 12 h. The mixture was diluted by EtOAc (5 mL) and washed with 1 M HCl aq. (2 × 10 mL), saturated NaHCO₃ aq. (10 mL) and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (3:1 to 2:1 to 1:1 hexane/EtOAc) to give **16b** (305.8 mg, 483.9 μmol, 69% in 2 steps) as a colorless oil.

¹H NMR (CD₃Cl, 400 MHz): δ_H 7.71-7.61 (m, 4H), 7.48-7.32 (m, 6H), , 4.65 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.63 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), , 4.60 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.59 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.84 (m, 1H), 3.80-3.72 (m, 2H), 3.70 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.37 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 3.18 (s, 3H), 2.38 (dd, *J* = 14.6, 5.4 Hz, 1H), 2.34-2.12 (m, 2H), 1.78 (m, 1H), 1.73-1.53 (m, 4H), 1.51-1.34 (m, 2H), 1.34-1.16 (m, 2H), 1.04 (s, 9H), 0.97 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.93 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): 173.8, 135.7, 134.0, 129.7, 127.8, 95.8, 95.4, 73.4, 73.1, 61.3, 60.6, 55.8, 55.7, 43.3, 43.1, 43.0, 39.5, 37.7, 32.2, 27.0, 26.7, 26.2, 20.5, 19.9, 19.3; HRESIMS *m/z* 654.3813 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₅H₅₇NO₇Si, 654.3802); [α]_D^{27.5} +1.8 (*c* 0.98, CHCl₃); IR (film) 2932, 1665, 1428, 1095, 1039, 703 cm⁻¹.

(4*R*,6*S*,10*S*,12*S*,14*S*,16*S*)-18-(*tert*-Butyldiphenylsiloxy)-4-(4-methoxybenzyloxy)-12,16-bis(methoxymethoxy)-6,10,14-trimethyloctadecan-8-one (38)

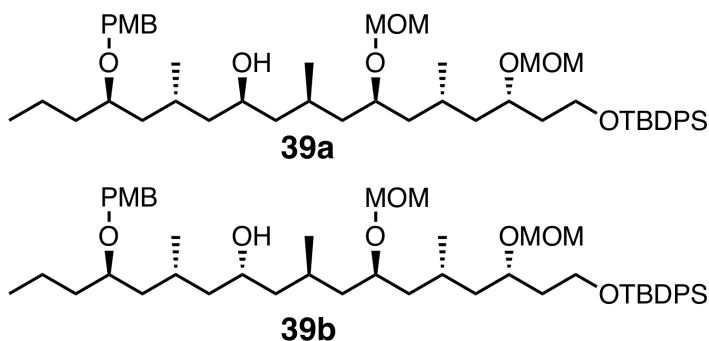


To a solution of bromide **17** (138 mg, 0.42 mmol) in dry Et₂O (2.2 mL) under nitrogen cooled at -78 °C was added *t*-BuLi (1.62 M in pentane, 0.52 mL, 0.84 mmol) and the mixture was stirred -78 °C for 20 min. The mixture was warmed to 0 °C, stirred for 15 min and cooled to -78 °C again. A solution of amide **16a** (139 mg, 0.22 mmol) in dry Et₂O (0.5 mL) was added to the mixture by cannula (washed with 2 × 0.5 mL of Et₂O)

and the mixture was stirred -78 °C for 30 min. The reaction was quenched with saturated NH₄Cl aq. (2 mL) and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 5 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica (5:1 to 1:1 hexane/EtOAc) to give **38** (90.7 mg, 0.11 mmol, 50%) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ_H 7.69-7.63 (m, 4H), 7.45-7.34 (m, 6H), 7.26 (br d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.86 (br d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.65 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.62-4.58 (m, 2H), 4.57 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.48 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 4.36 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 3.84 (m, 1H), 3.81-3.70 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.70 (m, 1H), 3.42 (m, 1H), 3.35 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 2.41-2.30 (m, 2H), 2.25-2.14 (m, 3H), 2.09 (m, 1H), 1.85-1.70 (m, 2H), 1.64 (m, 1H), 1.60-1.41 (m, 6H), 1.42-1.28 (m, 4H), 1.28-1.18 (m, 2H), 1.04 (s, 9H), 0.92 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.91 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.87 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.85 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ_C 210.2, 159.2, 135.7, 134.0, 131.2, 129.7, 129.5, 127.8, 113.9, 95.9, 95.4, 76.4, 73.4, 73.1, 70.3, 60.6, 55.8, 55.7, 55.4, 51.7, 50.8, 43.4, 42.7, 42.4, 41.9, 37.8, 36.5, 27.0, 26.2, 26.0, 25.8, 20.0, 19.6, 19.3, 18.6, 14.5; HRESIMS *m/z* 821.5398 [M+H]⁺ (calcd for C₄₉H₇₇O₈Si, 821.5388); [α]_D^{28.3} -10.7 (*c* 1.04, CHCl₃); IR (film) 2955, 1710, 1513, 1463, 1247, 1091, 1038, 916, 823, 702 cm⁻¹.

(4*R*,6*R*,8*R*,10*R*,12*R*,14*S*,16*S*)-18-(*tert*-Butyldiphenylsiloxy)-4-(4-methoxybenzyloxy)-12,16-bis(methoxymethoxy)-6,10,14-trimethyloctadecan-8-ol (39a) and (4*R*,6*R*,8*S*,10*R*,12*R*,14*S*,16*S*)-18-(*tert*-Butyldiphenylsiloxy)-4-(4-methoxybenzyloxy)-12,16-bis(methoxymethoxy)-6,10,14-trimethyloctadecan-8-ol (39b)

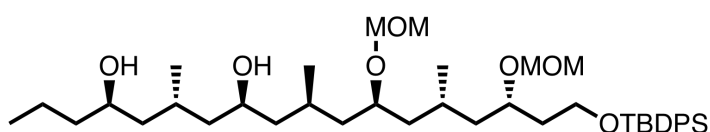


A 4 M solution in THF of LiBH₄ (60 μL, 240 μmol) was added to a solution of **38** (32.3 mg, 39 μmol) in dry THF (200 μL) at -78 °C under nitrogen and the mixture was warmed to room temperature. The mixture was stirred at same temperature for 1 h. The reaction was quenched with saturated aqueous Rochelle's salt (5 mL). The layers were separated and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 5 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by PLC (2:1 hexane/EtOAc) to give **39a** (8.8 mg, 11 μmol, 28%) and **39b** (10.2 mg, 12.4 μmol, 32%) as a colorless oil.

39a: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ_H 7.64-7.68 (m, 4H), 7.31-7.44 (m, 6H), 7.26 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.86 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.67 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.62 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.59 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.58 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.48 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 4.37 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 3.85 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.66-3.77 (m, 4H), 3.46 (m, 1H), 3.36 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 1.73-1.86 (m, 3H), 1.44-1.71 (m, 8H), 1.31-1.42 (m, 7H), 1.14-1.27 (m, 3H), 1.04 (s, 9H), 0.93 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.914 (t, *J* = 7.2, 3H), 0.912 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.88 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ_C 159.2, 135.7, 134.0, 131.3, 129.7, 129.5, 127.8, 113.9, 95.9, 95.4, 73.8, 73.1, 70.5, 67.4, 60.6, 55.7, 55.7, 55.4, 46.7, 46.1, 43.4, 42.9, 42.6, 42.2, 37.8, 36.6, 27.0, 26.3, 26.2, 26.0, 21.0, 19.8, 19.6, 19.3, 18.6, 14.5; HRESIMS *m/z* 823.5535 [M+H]⁺ (calcd for C₄₉H₇₉O₈Si, 823.5544); [α]_D^{27.4} +18.4 (*c* 0.50, CHCl₃); IR (film) 3447, 2930, 1512, 1247, 1091, 1037, 823, 703 cm⁻¹.

39b: ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 7.64-7.67 (m, 4H), 7.34-7.43 (m, 6H), 7.25 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.86 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 4.67 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.62 (d, $J = 7.0$ Hz), 4.59 (d, $J = 7.0$ Hz), 4.58 (d, $J = 7.0$ Hz), 4.50 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.36 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 3.84 (m, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.73-3.77 (m, 4H), 3.69 (m, 1H), 3.44 (m, 1H), 3.35 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 2.03 (br s, 1H, OH), 1.75-1.83 (m, 4H), 1.53-1.69 (m, 5H), 1.31-1.52 (m, 8H), 1.08-1.29 (m, 4H), 1.04 (s, 9H), 0.92 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.92 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H), 0.90 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.87 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ_{C} 159.2, 135.7, 134.0, 131.1, 129.7, 129.6, 127.8, 113.9, 95.8, 74.1, 73.1, 70.5, 66.9, 60.6, 55.7, 55.7, 55.4, 46.6, 45.5, 43.8, 43.5, 43.1, 41.4, 37.8, 36.6, 27.0, 26.4, 26.0, 26.0, 20.9, 19.8, 19.7, 19.3, 18.6, 14.5; HRESIMS m/z 823.5541 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{49}\text{H}_{79}\text{O}_8\text{Si}$, 823.5544); $[\alpha]_{\text{D}}^{27.9} -6.0$ (c 0.50, CHCl_3); IR (film) 3452, 2930, 1513, 1247, 1092, 1038, 821, 702 cm^{-1} .

(4R,6S,8R,10R,12R,14S,16S)-18-(tert-Butyldiphenylsiloxy)-12,16-bis(methoxymethoxy)-6,10,14-trimethyloctadecane-4,8-diol (40)

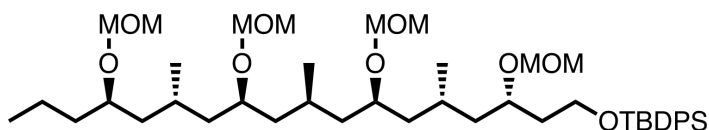


To a solution of **39a** (26.4 mg, 32.1 μmol) in CH_2Cl_2 (200 μL) was added pH 7 phosphate buffer solution (50 μL) under nitrogen. To the mixture was added DDQ (14.3 mg, 63 μmol) at 0 $^\circ\text{C}$ and the mixture was stirred for 1.5 h. The reaction was quenched with saturated aqueous NaHCO_3 (5 mL) and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 \times 5 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (1:1 hexane/EtOAc) to give **40** (14.2 mg, 20.2 μmol , 63%) as a colorless oil.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 7.71-7.61 (m, 4H), 7.47-7.32 (m, 7H), 4.67 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.62 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.59 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.58 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 3.86 (m, 1H), 3.83-3.64 (m, 5H), 3.36 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 1.91 (m, 1H), 1.85-1.73 (m, 2H), 1.73-1.58 (m, 4H), 1.58-1.31 (m, 11H), 1.29-1.17 (m, 3H), 1.04 (s, 9H), 0.98-0.88 (m, 12H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ_{C} 135.7, 134.0, 129.7, 127.8, 95.9, 95.4, 73.9, 73.1,

69.8, 67.7, 60.6, 55.8, 55.7, 46.6, 46.2, 45.9, 43.4, 42.6, 42.2, 40.7, 37.8, 27.0, 26.5, 26.2, 26.0, 21.2, 19.7, 19.6, 19.3, 19.0, 14.3; HRESIMS m/z 703.4968 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{41}H_{71}O_7Si$, 703.4969); $[\alpha]^{27.2}_D -5.9$ (c 0.25, $CHCl_3$); IR (film) 3307, 2929, 1428, 1039, 700 cm^{-1} .

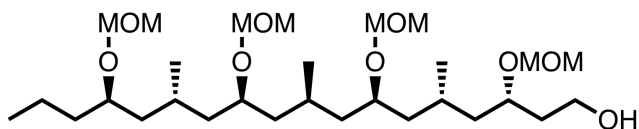
(3*S*,5*S*,7*R*,9*R*,11*R*,13*S*,15*R*)-1-(*tert*-Butyldiphenylsiloxy)-3,7,11,15-tetrakis(methoxymethoxy)-5,9,13-trimethyloctadecan (41)



N,N-Diisopropylethylamine (90 μ L, 522 μ mol) was added to a solution of the **40** (7.3 mg, 10.4 μ mol) in dry CH_2Cl_2 (300 μ L) under nitrogen at 0 $^\circ$ C. To the mixture was added chloromethyl methyl ether (30 μ L, 378 μ mol) and the mixture was stirred at 0 $^\circ$ C for 35 min, and warmed to room temperature. After additional 3.5 h, the reaction was quenched with 1M aqueous HCl (5 mL) and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3 \times 5 mL). The combined organic layers were washed with 1M aqueous HCl, saturated aqueous $NaHCO_3$ and brine and dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (5:1 to 5:2 hexane/ EtOAc) to give **41** (6.5 mg, 8.2 μ mol, 79%) as a colorless oil.

1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ_H 7.69-7.62 (m, 4H), 7.45-7.33 (m, 6H), 4.72-4.64 (m, 3H), 4.64-4.55 (m, 5H), 3.85 (m, 1H), 3.81-3.72 (m, 2H), 3.72-3.58 (m, 3H), 3.366 (s, 3H), 3.358 (s, 6H), 3.30 (s, 3H), 1.92-1.70 (m, 3H), 1.65 (m, 1H), 1.53-1.27 (m, 13H), 1.28-1.13 (m, 4H), 1.04 (s, 9H), 0.92 (d, J = 6.5 Hz, 6H), 0.91 (t, J = 7.4, 3H), 0.89 (d, J = 6.3 Hz, 3H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ_C 135.7, 134.0, 129.7, 127.8, 95.9, 95.5, 75.3, 73.8, 73.6, 73.1, 60.6, 55.7, 55.7, 43.4, 43.3, 43.1, 43.1, 42.9, 37.8, 37.3, 27.0, 26.4, 26.0, 25.8, 19.9, 19.5, 19.3, 18.5, 14.4; HRESIMS m/z 813.5305 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{45}H_{78}O_9SiNa$, 813.5313); $[\alpha]^{29.5}_D +1.8$ (c 0.10, $CHCl_3$); IR (film) 2918, 1461, 1378, 1125, 1074, 703 cm^{-1} .

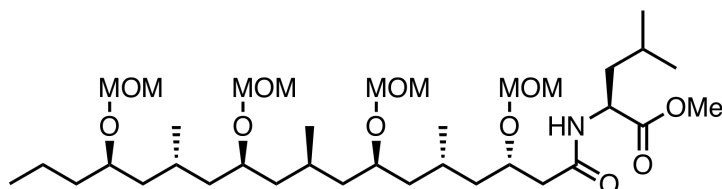
(3*S*,5*S*,7*R*,9*R*,11*R*,13*S*,15*R*)-3,7,11,15-Tetrakis(methoxymethoxy)-5,9,13-trimethyloctadecan-1-ol (42)



A 1 M solution in THF of TBAF (40 μ L, 40 μ mol) was added to a solution of **41** (16.3 mg, 20.2 μ mol) in dry THF (290 μ L) and the mixture was stirred at room temperature for 5 h. The reaction was quenched with H₂O (5 mL) and the aqueous layer was extracted EtOAc (3 \times 5 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (20:10:1 hexane/EtOAc/MeOH) to give **42** (10.7 mg, 19.4 μ mol, 96%) as a colorless oil.

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ_{H} 4.72-4.63 (m, 5H), 4.63-4.55 (m, 3H), 3.79 (m, 1H), 3.76-3.69 (m, 2H), 3.69-3.60 (m, 3H), 3.38 (s, 3H), 3.37 (s, 6H), 3.36 (s, 3H), 1.93-1.32 (m, 18H), 1.32-1.17 (m, 3H), 0.95 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.92 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ_{C} 96.8, 96.5, 96.4, 96.4, 76.6, 75.1, 75.0, 74.9, 74.6, 59.5, 56.1, 56.0, 56.0, 44.4, 44.3, 44.2, 44.2, 44.0, 43.7, 38.8, 38.3, 27.6, 27.0, 26.9, 20.6, 20.3, 20.1, 19.4, 14.6; HRESIMS m/z 575.4130 [M+Na]⁺ (calcd for C₂₉H₆₀O₉Na, 575.4135); [α]_D^{26.2} +17.1 (c 0.70, CHCl₃); IR (film) 3491, 2930, 1463, 1377, 1147, 1096, 1039, 916 cm⁻¹.

Methyl [(3*S*,5*S*,7*R*,9*R*,11*R*,13*S*,15*R*)-3,7,11,15-tetrakis(methoxymethoxy)-5,9,13-trimethyloctadecanoyl]leucinate [(9*R*)-15]



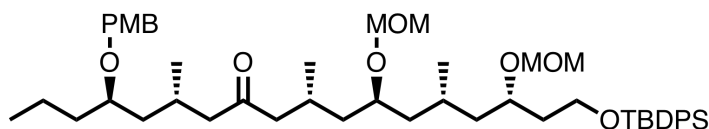
To a solution of **42** (2.1 mg, 3.8 μ mol) in CH₃CN (200 μ L) and H₂O (50 μ L) was added BAIB (20.3 mg, 63.0 μ mol), followed by TEMPO (3.3 mg, 21.1 μ mol) at room temperature and the mixture was stirred for 2.5 h. The reaction was quenched with saturated aqueous Na₂S₂O₃, (2 mL) followed by 1 M aqueous HCl (2 mL) and the layers

were separated. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 5 mL). The combined organic layers were washed with 1 M aqueous HCl, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (5:1 hexane/EtOAc to 5:1 CHCl₃/MeOH) to give crude carboxylic acid, which was used in the next step without further purification.

To a solution of the crude carboxylic acid and L-Leu-OMe·HCl (3.3 mg, 18.2 μmol) in dry DMF (300 μL) were added HOAt (5.2 mg, 38.2 μmol), *N,N*-diisopropylethylamine (20 μL, 116 μmol), and HATU (20.3 mg, 53.4 μmol) at 0 °C, and the mixture was warmed to room temperature and stirred for 11 h. The reaction was quenched with 1 M aqueous HCl (5 mL) and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 5 mL). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO₃ and brine and dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified with PLC (10:10:1 hexane/EtOAc/MeOH), followed by HPLC [Cosmosil 5C₁₈MS-II (φ20 × 250 mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV215 nm; solvent 85% MeOH; *t*_R = 66.3 min] to give (9R)-**15** (1.7 mg, 2.4 μmol, 63% in 2 steps) as a colorless oil.

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ_H 4.70-4.58 (m, 8H), 4.46 (dd, *J* = 9.0, 6.0 Hz, 1H), 4.06 (m, 1H), 3.76-3.68 (m, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.65 (m, 1H), 3.37 (s, 3H), 3.364 (s, 3H), 3.361 (s, 3H), 3.355 (s, 3H), 2.52 (dd, *J* = 13.9, 6.6 Hz, 1H), 2.37 (dd, *J* = 13.9, 6.0 Hz, 1H), 1.92-1.77 (m, 2H), 1.75-1.56 (m, 5H), 1.55-1.33 (m, 11H), 1.33-1.14 (m, 4H), 1.00-0.87 (m, 18H); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ_C 174.6, 173.6, 97.0, 96.4, 96.4, 96.4, 76.6, 75.1, 75.0, 74.5, 56.1, 56.1, 55.9, 52.6, 52.1, 44.6, 44.3, 44.2, 44.2, 44.0, 43.2, 42.9, 41.4, 38.3, 27.6, 26.9, 26.9, 26.0, 23.3, 21.8, 20.5, 20.4, 20.0, 19.4, 14.6; HRESIMS *m/z* 694.5086 [M+H]⁺ (calcd for C₃₆H₇₂NO₁₁, 694.5105); [α]^{26.1}_D -6.8 (*c* 0.10, CHCl₃); IR (film) 3322, 2929, 1746, 1653, 1538, 1464, 1374, 1147, 1096, 1039, 916 cm⁻¹.

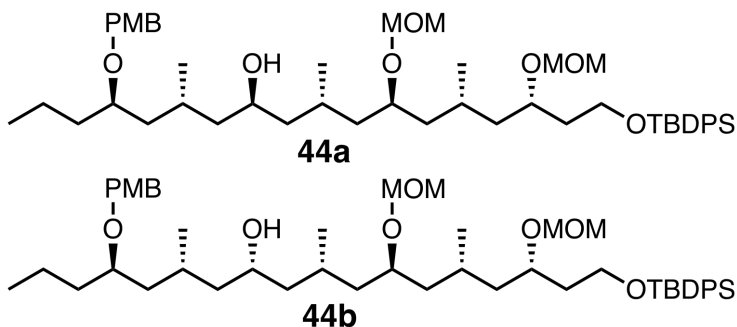
(4*R*,6*S*,10*R*,12*S*,14*S*,16*S*)-18-(*tert*-Butyldiphenylsiloxy)-4-(4-methoxybenzyloxy)-12,16-bis(methoxymethoxy)-6,10,14-trimethyloctadecan-8-one (43)



To a solution of bromide **17** (211 mg, 0.64 mmol) in dry Et₂O (3.6 mL) under nitrogen cooled at -78 °C was added *t*-BuLi (1.62 M in pentane, 0.8 mL, 1.30 mmol) and the mixture was stirred at -78 °C for 10 min. The mixture was warmed to 0 °C, stirred for 20 min and cooled to -78 °C again. A solution of amide **16b** (101.3 mg, 0.16 mmol) in dry Et₂O (2.0 mL) was added to the mixture by cannula and the mixture was stirred at -78 °C for 30 min. The reaction was quenched with saturated NH₄Cl aq. (10 mL) and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica (5:1 to 1:1 hexane/EtOAc) to give **43** (105.0 mg, 0.13 mmol, 80%) as a colorless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ_H 7.66 (m, 4H), 7.48-7.33 (m, 6H), 7.27 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, 2H), 6.87 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 4.68-4.56 (m, 4H), 4.48 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 4.37 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 3.84 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.81-3.70 (m, 2H), 3.65 (m, 1H), 3.43 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 2.45-2.27 (m, 2H), 2.27-2.08 (m, 4H), 1.79 (m, 1H), 1.72-1.31 (m, 11H), 1.29-1.14 (m, 3H), 1.05 (s, 9H), 0.92 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.91 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.91 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.87 (d, *J* = 5.9 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ_C 210.3, 159.2, 135.7, 134.0, 131.2, 129.7, 129.5, 127.8, 113.9, 95.8, 95.5, 76.4, 73.4, 73.1, 70.3, 60.6, 55.8, 55.7, 55.4, 51.5, 51.0, 43.4, 43.1, 42.9, 41.8, 37.7, 36.5, 27.0, 26.3, 26.2, 26.0, 20.3, 20.1, 20.0, 19.3, 18.6, 14.5; HRESIMS *m/z* 843.5227 [M+H]⁺ (calcd for C₄₉H₇₆O₈SiNa, 843.5207); [α]_D^{26.0} +2.3 (c 0.14, CHCl₃); IR (film) 2929, 1712, 1513, 1462, 1247, 1092, 1038, 916, 821, 701 cm⁻¹.

(4*R*,6*R*,8*R*,10*S*,12*R*,14*S*,16*S*)-18-(*tert*-Butyldiphenylsiloxy)-4-(4-methoxybenzyloxy)-12,16-bis(methoxymethoxy)-6,10,14-trimethyloctadecan-8-ol (44a) and (4*R*,6*R*,8*S*,10*S*,12*R*,14*S*,16*S*)-18-(*tert*-Butyldiphenylsiloxy)-4-(4-methoxybenzyloxy)-12,16-bis(methoxymethoxy)-6,10,14-trimethyloctadecan-8-ol (44b)



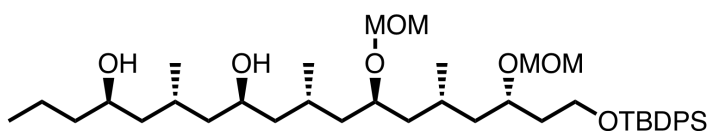
A 4 M solution of LiBH₄ in THF (60 μL, 240 μmol) was added to a solution of **43** (28.6 mg, 34.8 μmol) in dry THF (200 μL) cooled at -78°C under nitrogen. A cooling bath was removed and the mixture was stirred at room temperature for 2.5 h. The reaction was quenched with saturated aqueous Rochelle's salt (5 mL). The layers were separated and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 5 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by HPLC [Cosmosil 5C₁₈MS-II (φ20 × 250 mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV215 nm; solvent 95% MeOH] to give **44a** (8.9 mg, 11 μmol, 31%, *t_R* = 64.7 min) as a colorless oil and **44b** (10.5 mg, 12.7 μmol, 37%, *t_R* = 68.9 min) as a colorless oil, respectively.

44a: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ_H 7.70-7.61 (m, 4H), 7.45-7.32 (m, 6H), 7.26 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.86 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.66-4.54 (m, 4H), 4.48 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 4.37 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 3.84 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.78-3.72 (m, 3H), 3.69 (m, 1H), 3.46 (m, 1H), 3.36 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 1.92-1.73 (m, 3H), 1.73-1.50 (m, 7H), 1.48-1.30 (m, 6H), 1.30-1.07 (m, 5H), 1.04 (s, 9H), 0.93 (d, *J* = 5.9 Hz, 3H), 0.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.91 (d, *J* = 5.4 Hz, 3H), 0.89 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ_C 159.2, 135.7, 134.0, 131.3, 129.7, 129.5, 127.8, 113.9, 95.8, 95.5, 73.7, 73.1, 70.5, 67.6, 60.6, 55.8, 55.7, 55.4, 46.7, 46.3, 43.9, 43.3, 43.1, 42.8, 37.7, 36.6, 27.0, 26.4, 26.2, 20.1, 20.0, 19.9, 19.3, 18.6, 14.5; HRESIMS *m/z* 823.5528 [M+H]⁺ (calcd for C₄₉H₇₉O₈Si,

823.5544); $[\alpha]^{26.0}_{\text{D}} -18.6$ (c 0.38, CHCl_3); IR (film) 3456, 2929, 1513, 1247, 1110, 1038, 822, 702 cm^{-1} .

44b: ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 7.69-7.63 (m, 4H), 7.45-7.34 (m, 6H), 7.26 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.86 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 4.63 (s, 2H), 4.61 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 4.59 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.51 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.37 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 3.89-3.72 (m, 4H), 3.88 (s, 3H), 3.69 (m, 1H), 3.44 (m, 1H), 3.35 (s, 3H), 3.30 (s, 4H), 1.98-1.72 (m, 5H), 1.70-1.54 (m, 5H), 1.52-1.23 (m, 9H), 1.22-1.07 (m, 2H), 1.04 (s, 9H), 0.93 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 0.92 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.92 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.89 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ_{C} 159.2, 135.7, 134.0, 131.0, 129.7, 129.6, 127.8, 113.9, 95.8, 95.6, 74.3, 73.1, 70.6, 66.7, 60.6, 55.8, 55.7, 55.4, 45.7, 43.6, 43.0, 42.6, 41.2, 37.7, 36.5, 27.0, 26.4, 26.3, 21.1, 20.1, 19.3, 18.6, 14.5; HRESIMS m/z 823.5553 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{49}\text{H}_{79}\text{O}_8\text{Si}$, 823.5544); $[\alpha]^{28.0}_{\text{D}} -41.1$ (c 0.45, CHCl_3); IR (film) 3446, 2929, 1512, 1247, 1108, 1038, 819, 701 cm^{-1} .

(4R,6S,8R,10S,12R,14S,16S)-18-(tert-Butyldiphenylsiloxy)-12,16-bis(methoxymethoxy)-6,10,14-trimethyloctadecane-4,8-diol (45)

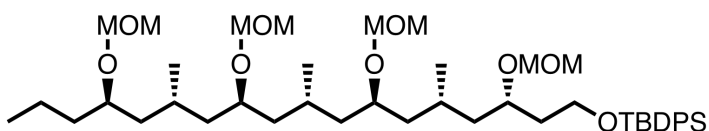


To a solution of **44a** (31.2 mg, 37.9 μmol) in CH_2Cl_2 (200 μL) was added pH 7 phosphate buffer solution (60 μL) under nitrogen. To the mixture was added DDQ (14.5 mg, 63.9 μmol) at 0 $^\circ\text{C}$ and the mixture was stirred for 15 min. The reaction was quenched with saturated aqueous NaHCO_3 (5 mL) and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3×5 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (2:1 to 1:1 to 1:2 hexane/EtOAc) to give **45** (25.0 mg, 35.6 μmol , 94%) as a colorless oil.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 7.71-7.56 (m, 4H), 7.48-7.31 (m, 6H), 4.67 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.62 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.59 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.58 (d, $J = 7.0$ Hz), 3.86 (m, 1H), 3.83-3.63 (m, 5H), 3.36 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 1.89 (m, 1H), 1.83-1.72 (m, 2H), 1.72-

1.58 (m, 4H), 1.58-1.30 (m, 11H), 1.29-1.17 (m, 3H), 1.04 (s, 9H), 0.93 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H), 0.92 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.92 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ_{C} 135.7, 134.0, 129.7, 127.8, 95.9, 95.4, 73.9, 73.1, 69.8, 67.7, 60.6, 55.8, 55.7, 46.6, 46.2, 45.9, 43.4, 42.6, 42.2, 40.7, 37.8, 27.0, 26.5, 26.2, 26.0, 21.2, 19.7, 19.6, 19.3, 19.0, 14.3; HRESIMS m/z 703.4962 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{41}\text{H}_{71}\text{O}_7\text{Si}$, 703.4969); $[\alpha]_{\text{D}}^{23.7} +0.1$ (c 0.19, CHCl_3); IR (film) 3316, 2930, 1428, 1039, 701 cm^{-1} .

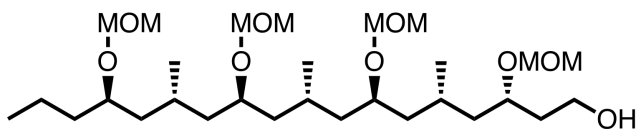
(3*S*,5*S*,7*R*,9*S*,11*R*,13*S*,15*R*)-1-(*tert*-Butyldiphenylsiloxy)-3,7,11,15-tetrakis(methoxymethoxy)-5,9,13-trimethyloctadecan (46)



To a solution of the **45** (22.5 mg, 32.0 μmol) in dry CH_2Cl_2 (300 μL) under nitrogen at 0 $^\circ\text{C}$ were added *N,N*-Diisopropylethylamine (90 μL , 522 μmol) and chloromethyl methyl ether (30 μL , 378 μmol) successively, and the mixture was stirred at 0 $^\circ\text{C}$ for 5 min and warmed to room temperature. After additional 3 h, the reaction was quenched with 1M aqueous HCl (5 mL) and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3×5 mL). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO_3 and brine and dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (5:1 to 5:2 hexane/ EtOAc) to give **46** (23.3 mg, 29.4 μmol , 92%) as a colorless oil.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 7.71-7.59 (m, 4H), 7.47-7.31 (m, 6H), 4.72-4.62 (m, 3H), 4.62-4.53 (m, 5H), 3.85 (m, 1H), 3.81-3.72 (m, 2H), 3.72-3.56 (m, 3H), 3.36 (s, 3H), 3.36 (s, 6H), 3.30 (s, 3H), 1.82 (m, 4H), 1.65 (m, 2H), 1.55-1.28 (m, 12H), 1.28-1.15 (m, 3H), 1.04 (s, 9H), 0.92 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H), 0.91 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.88 (d, $J = 5.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ_{C} 135.7, 134.0, 129.7, 127.8, 95.9, 95.5, 75.3, 73.8, 73.6, 73.1, 60.6, 55.7, 55.7, 43.4, 43.3, 43.1, 43.1, 42.9, 37.8, 37.3, 27.0, 26.4, 26.0, 25.8, 19.9, 19.5, 19.3, 18.5, 14.4; HRESIMS m/z 813.5324 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{45}\text{H}_{78}\text{O}_9\text{SiNa}$, 813.5313); $[\alpha]_{\text{D}}^{26.0} +3.4$ (c 0.20, CHCl_3); IR (film) 2930, 1460, 1378, 1143, 1095, 1039, 703 cm^{-1} .

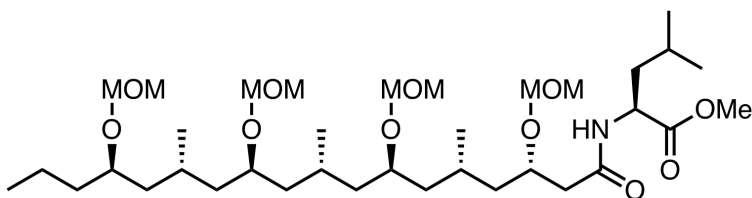
(3*S*,5*S*,7*R*,9*S*,11*R*,13*S*,15*R*)-3,7,11,15-Tetrakis(methoxymethoxy)-5,9,13-trimethyloctadecan-1-ol (47)



A 1 M solution in THF of TBAF (50 μ L, 50 μ mol) was added to a solution of **46** (21.4 mg, 27.0 μ mol) in dry THF (300 μ L), and the mixture was stirred at room temperature for 4.5 h. The reaction was quenched with H₂O (5 mL) and the aqueous layer was extracted EtOAc (3 \times 5 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (20:10:1 hexane/EtOAc/MeOH) to give **47** (14.6 mg, 26.1 μ mol, 97%) as a colorless oil.

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ_{H} 4.80-4.64 (m, 8H), 3.88 (m, 1H), 3.85-3.78 (m, 2H), 3.78-3.68 (m, 3H), 3.46 (s, 3H), 3.45 (s, 6H), 3.45 (s, 3H), 1.99-1.81 (m, 3H), 1.81-1.40 (m, 13H), 1.40-1.23 (m, 5H), 1.06 (d, $J = 5.8$ Hz, 3H), 1.05 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.04 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H), 1.01 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ_{C} 96.8, 96.5, 96.4, 76.6, 74.9, 74.8, 74.6, 59.5, 56.1, 56.0, 44.6, 44.4, 44.3, 44.2, 43.7, 38.7, 38.4, 27.2, 27.1, 27.0, 20.7, 20.7, 20.4, 19.4, 14.6; HRESIMS m/z 575.4120 [M+Na]⁺ (calcd for C₂₉H₆₀O₉Na, 575.4135); $[\alpha]_{\text{D}}^{26.2} +16.7$ (c 0.50, CHCl₃); IR (film) 3494, 2931, 1464, 1378, 1212, 1145, 1096, 1040, 916 cm⁻¹.

Methyl [(3*S*,5*S*,7*R*,9*S*,11*R*,13*S*,15*R*)-3,7,11,15-tetrakis(methoxymethoxy)-5,9,13-trimethyloctadecanoyl]leucinate [(9*S*)-15]



To a solution of **47** (5.0 mg, 9.0 μ mol) in CH₃CN (200 μ L) and H₂O (50 μ L) were added TEMPO (2.4 mg, 15.4 μ mol) and BAIB (22.2 mg, 68.9 μ mol) at room temperature, and the mixture was stirred for 2.0 h. The reaction was quenched with saturated aqueous Na₂S₂O₃ (2 mL), followed by 1 M aqueous HCl (2 mL) and the layers were separated.

The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 5 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography on silica gel (5:1 hexane/EtOAc to 5:1 CHCl₃/MeOH) to give crude product as a CHCl₃/MeOH layer. The crude product was concentrated under reduced pressure and used in the next step without further purification.

To a solution of the crude product and L-Leu-OMe·HCl (3.7 mg, 20 μmol) in dry DMF (300 μL) were added HOAt (6.0 mg, 44 μmol), *N,N*-diisopropylethylamine (30 μL, 174 μmol), and HATU (22.2 mg, 58.4 μmol) successively at 0 °C, and the mixture was warmed to room temperature and stirred for 8 h. The reaction was quenched with 1 M aqueous HCl (5 mL) and the layers were separated. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 5 mL). The combined organic layers were washed with 1 M aqueous HCl, saturated aqueous NaHCO₃ and brine and dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified with PLC (10:10:1 hexane/EtOAc/MeOH), followed by HPLC [Cosmosil 5C₁₈MS-II (φ20 × 250 mm); flow rate 5 mL/min; detection, UV215 nm; solvent 85% MeOH; *t*_R = 55.7 min] to give (9S)-**15** (4.1 mg, 5.9 μmol, 65% in 2 steps) as a colorless oil.

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ_H 4.76-4.61 (m, 8H), 4.51 (dd, *J* = 8.9, 6.2 Hz, 1H), 4.11 (m, 1H), 3.83-3.76 (m, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.69 (m, 1H), 3.413 (s, 6H), 3.411 (s, 3H), 3.40 (s, 3H), 2.56 (dd, *J* = 14.0, 7.0 Hz, 1H), 2.43 (dd, *J* = 14.0, 5.9 Hz, 1H), 1.94-1.78 (m, 3H), 1.78-1.50 (m, 12H), 1.50-1.37 (m, 4H), 1.37-1.18 (m, 5H), 1.07-0.95 (m, 18H); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ_C 174.6, 173.6, 97.0, 96.5, 96.4, 76.6, 74.9, 74.8, 74.6, 56.1, 56.0, 52.6, 52.1, 44.7, 44.6, 44.4, 44.3, 43.9, 43.7, 42.9, 41.4, 38.4, 27.2, 27.0, 26.0, 23.3, 21.8, 20.9, 20.8, 20.4, 19.4, 14.6; HRESIMS *m/z* 694.5087 [M+H]⁺ (calcd for C₃₆H₇₂NO₁₁, 694.5105); [α]^{25.9}_D -10.8 (*c* 0.32, CHCl₃); IR (film) 3313, 2931, 1747, 1654, 1535, 1439, 1376, 1148, 1096, 1039, 916 cm⁻¹.

Evaluation of inhibitors for minnamide A induced cell death

HeLa cells were seeded at 4×10^3 cells/well in 96-well plates (Iwaki, Japan) and cultured for 12 h. Then various concentrations of inhibitors in 2 μ L of MeOH or H₂O were added to each well. After additional 12 h, a 200 μ M solution of minnamide A in MeOH (2 μ L, final concentration of 2 μ M) was added to each well and the cells were incubated for 4 h. Then the culture media were replaced with fresh media. Cell viability was measured by MTT assay.³³ The assays were performed in triplicate, and the experiments were repeated three times. Data are presented as mean \pm standard error (SE).

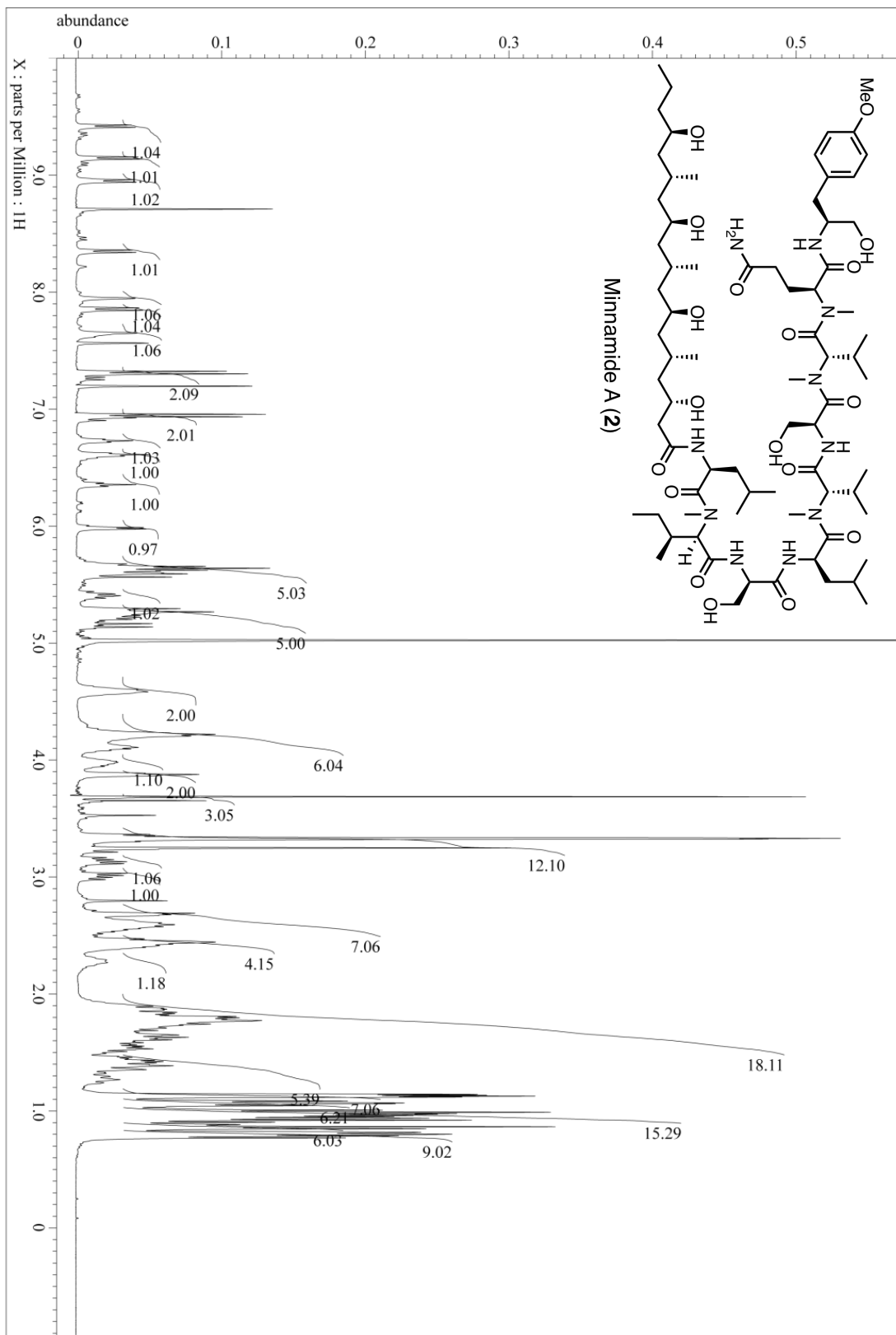
Evaluation of metal ions for minnamide A induced cell death

HeLa cells were seeded at 2×10^3 cells/well in 96-well plates (Iwaki, Japan) and cultured for 12 h. Then various concentrations of metal salts in 2 μ L of H₂O were added to each well. After additional 12 h, a 90 μ M solution of minnamide A in MeOH (2 μ L, final concentration of 0.9 μ M) or 2 μ L of MeOH without minnamide A (as a control) was added to each well and the cells were incubated for 48 h. Then the culture media were replaced with fresh media. Cell viability was measured by MTT assay.³³ The assays were performed in triplicate, and the experiments were repeated three times. Data are presented as mean \pm SE. Statistical comparisons between experimental groups were analyzed by Welch two sample t test. Statistical analyses were performed by R software (version 3.3.3, <https://www.r-project.org>).

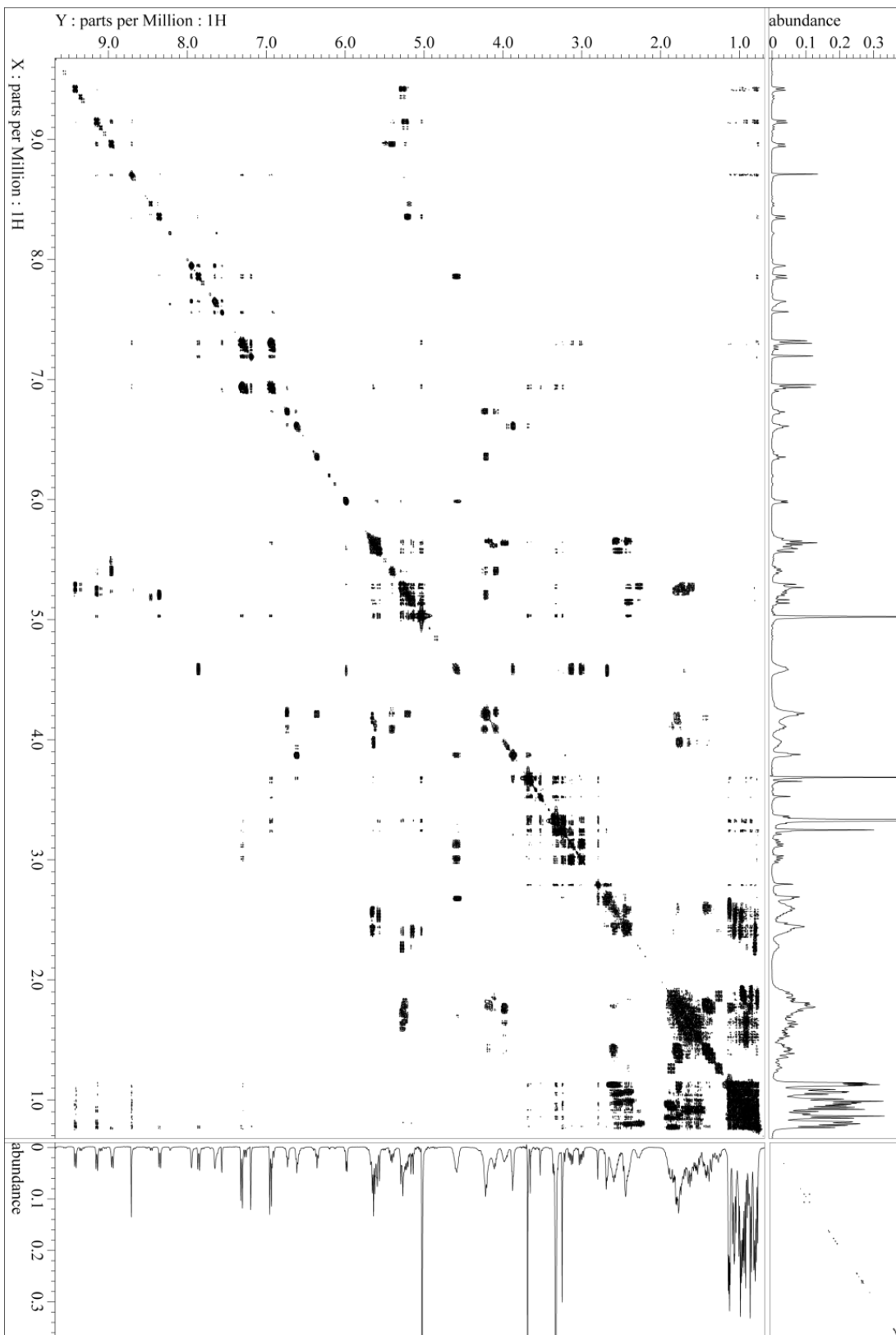
Analysis of reactive oxygen species production

HeLa cells were seeded at 20×10^4 cells/well in 6-well plates (Iwaki, Japan) and cultured for 12 h. The media were replaced with 3 mL of fresh media with or without inhibitors. After 12 h, The media were removed and each wells were washed with PBS (-) (2 \times 1.0 mL). Then the cells were trypsinized with 0.05%-Trypsin/0.53 mM-EDTA solution (Nacalai Tesque, Japan). The trypsinized cells were transferred to microtubes and centrifuged at 1,500 g for 2 min under room temperature. The supernatants were removed and the pellets were suspended with 1 mL of Hanks Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco) by pipetting gently. A 2 mM of solution in DMSO of C11-BODIPY (1 μ L) to the suspensions (final concentration of 2 μ M) and the suspensions were vortexed for 1 s. The suspensions were incubated for 10 min at 37 °C in a tissue culture incubator under dark

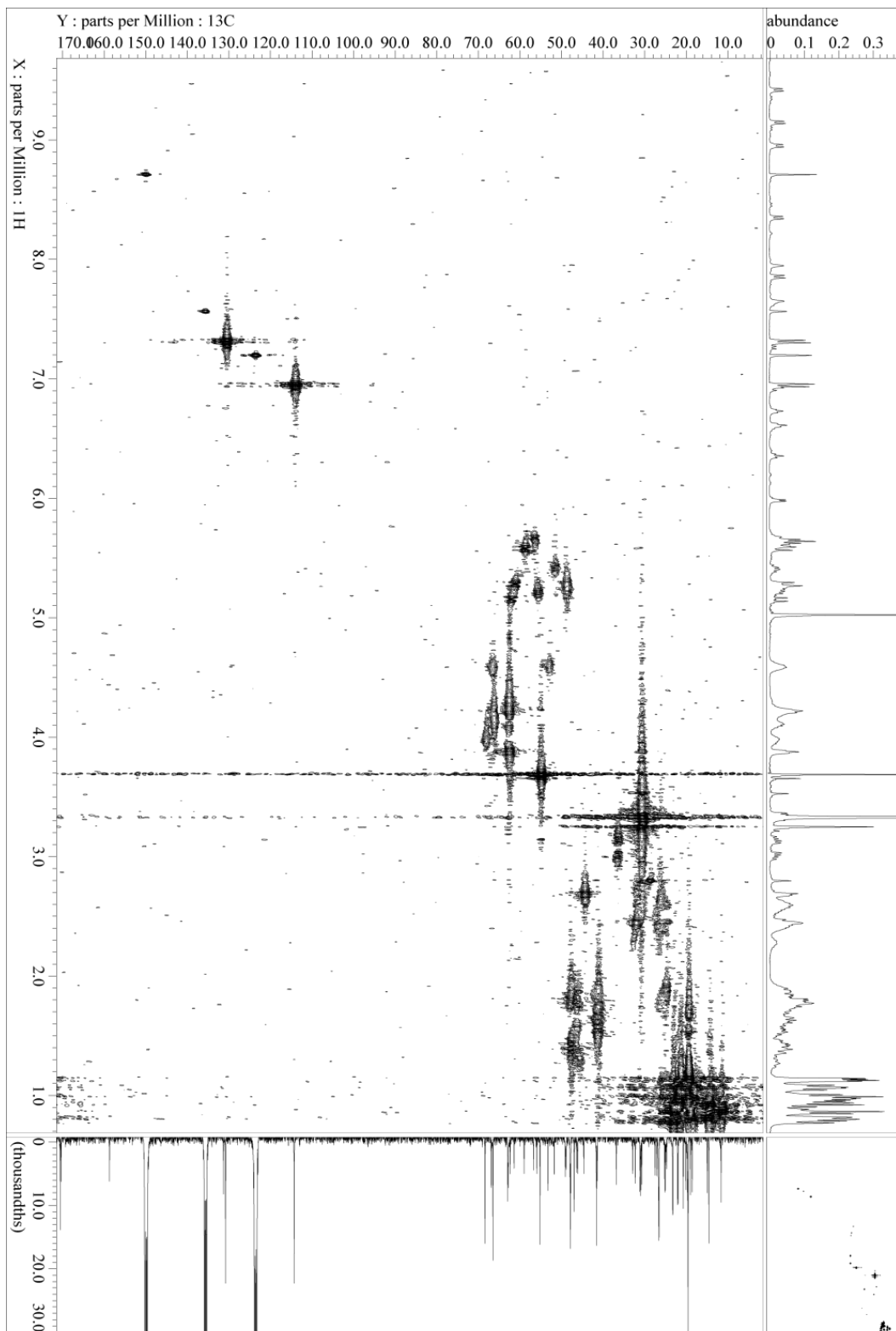
condition. The suspensions were centrifuged at 1,500 g for 1 min under room temperature, removed supernatants and resuspended in 1 mL of fresh HBSS under dark conditions. The centrifuging, removing supernatants and resuspension were again with same conditions. The suspensions were centrifuged at 1,500 g for 1 min under room temperature, removed supernatants and resuspended in 430 μ L of fresh HBSS under dark conditions. A 400 μ L of the cell suspension were used for fluorescence measurements. Fluorescence measurements were carried out at room temperature using a FP-8300 spectrofluorometer (JASCO, Japan). To the stirred suspensions were added 1 μ L of minnamide A in MeOH and fluorescence of C11-BODIPY was measured by simultaneous acquisition of the green (ex/em 485/520 nm) and red signals (ex/em 581/595 nm). The experiment of control groups was performed by same methods described above without inhibitors and minnamide A. These experiments were performed three times, independently. Data are presented as mean \pm SE.

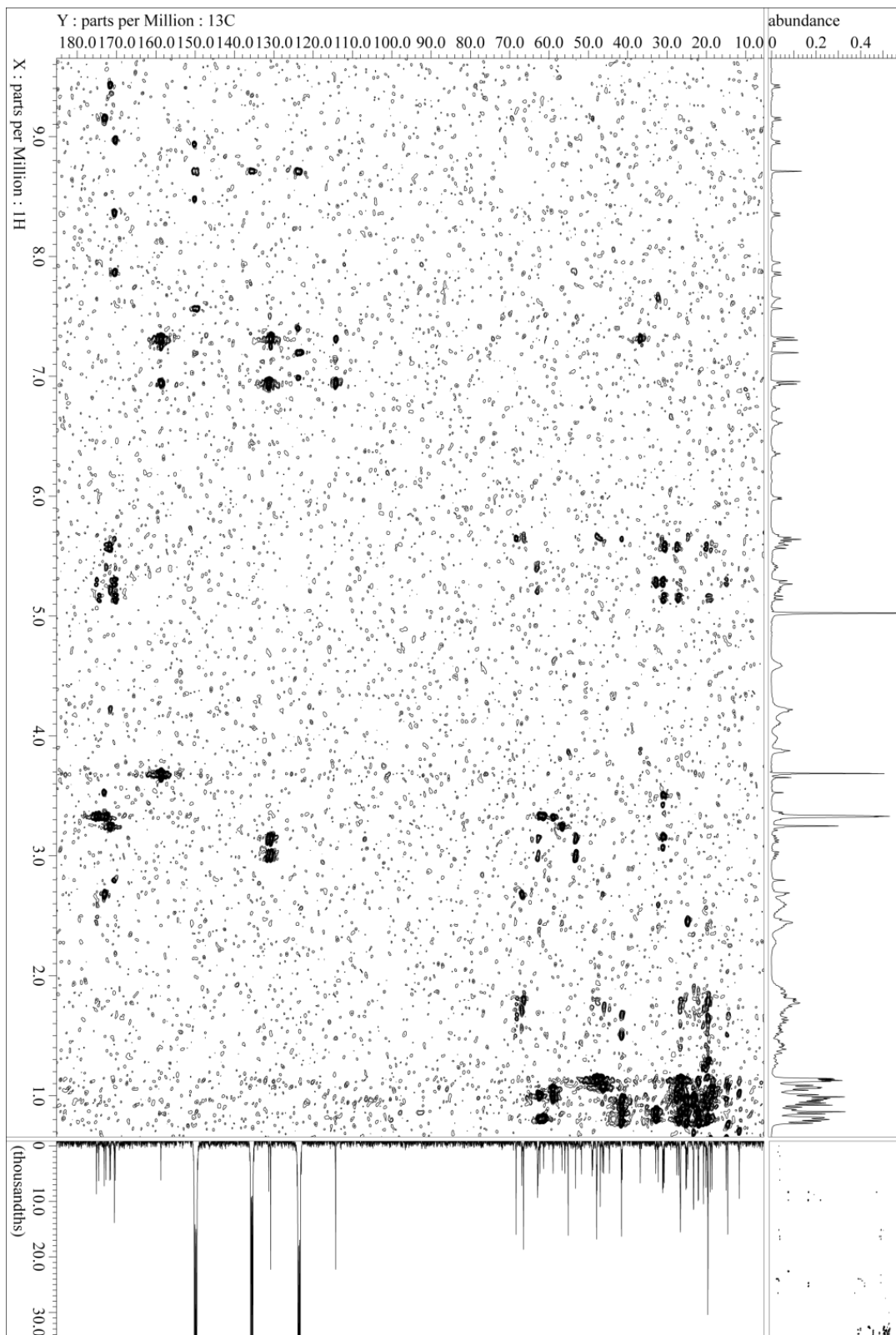


COSY (400 MHz, C₃D₅N) spectrum of minnamide A (2)

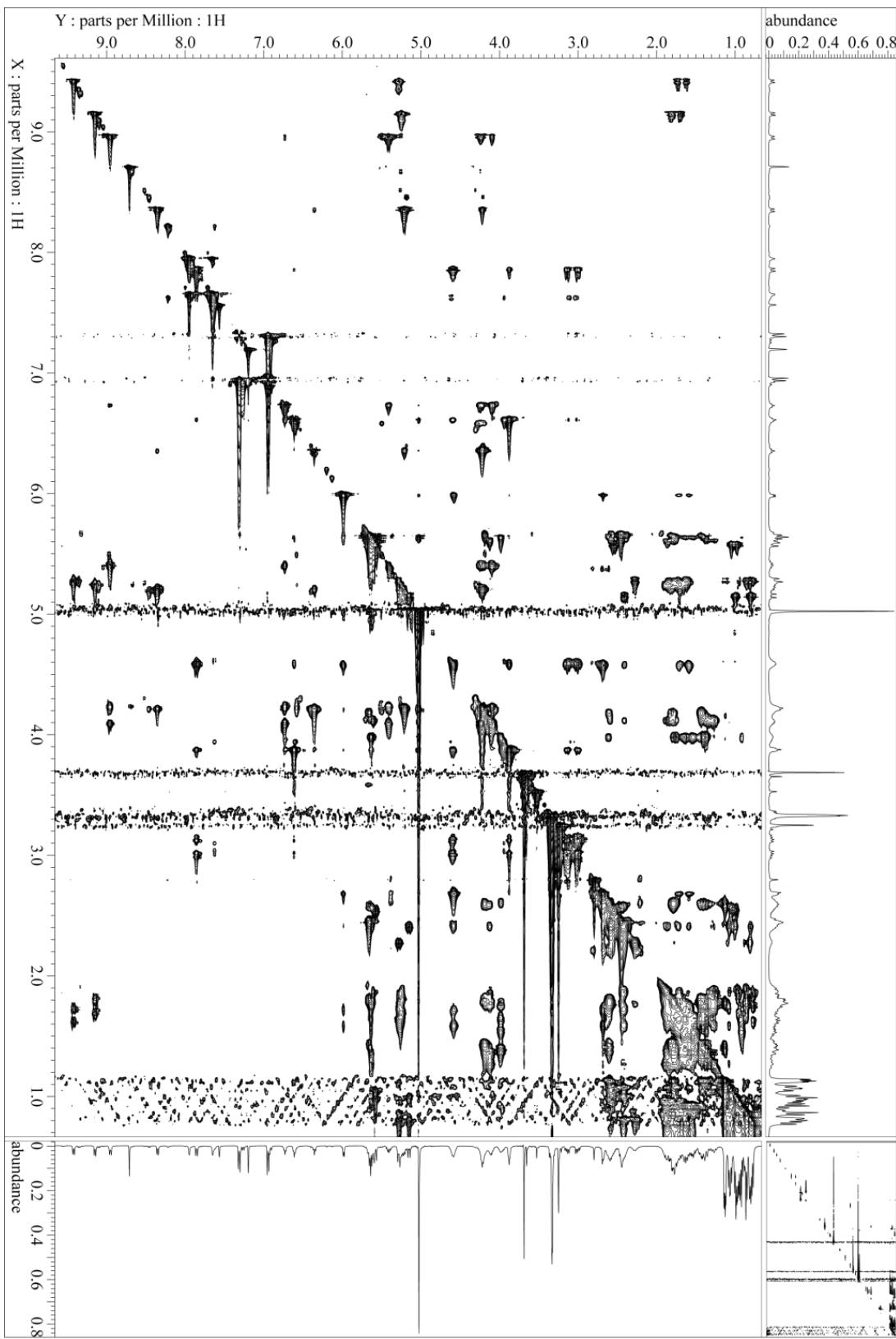


HMQC (400 MHz, C₅D₅N) spectrum of minamide A (2)

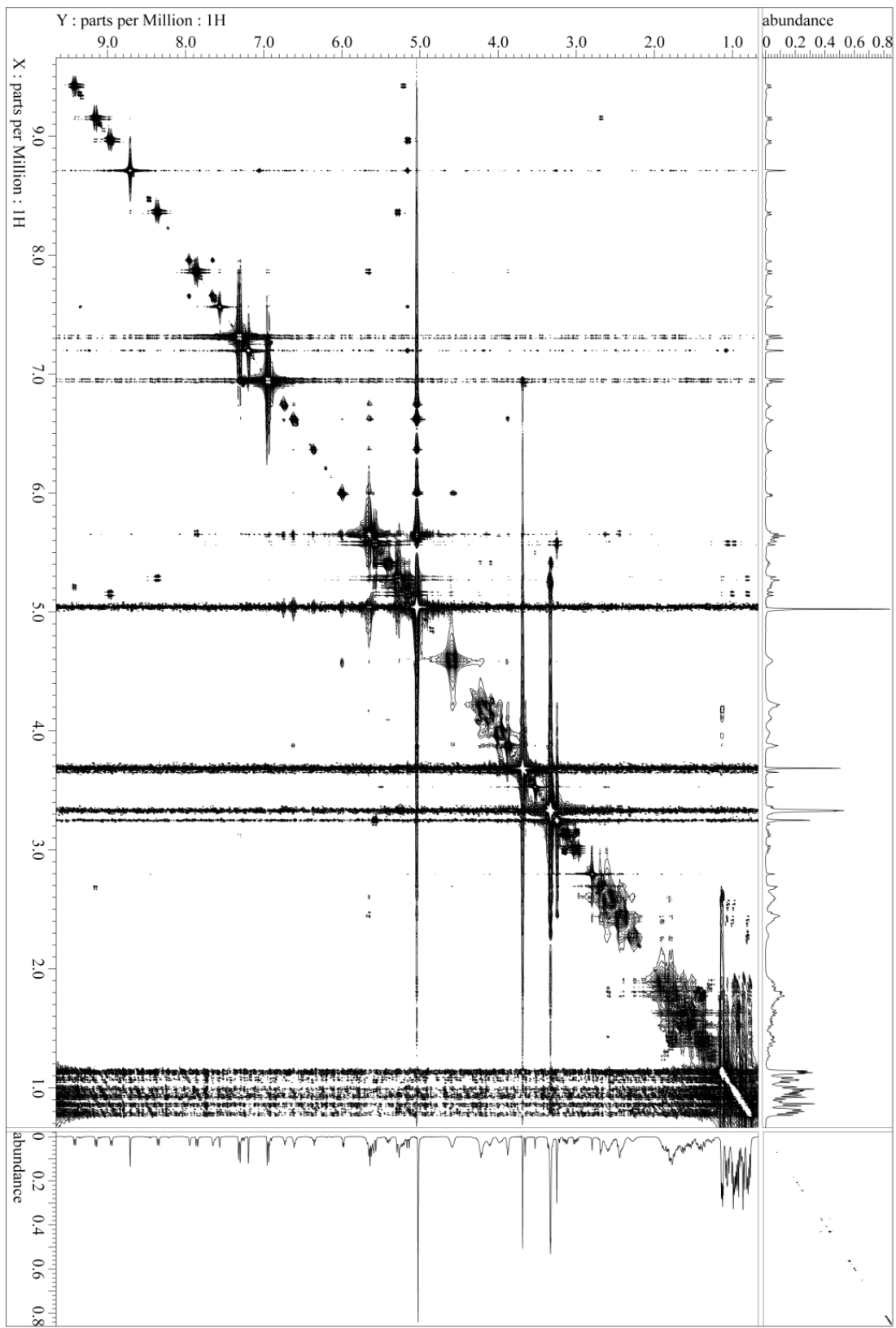




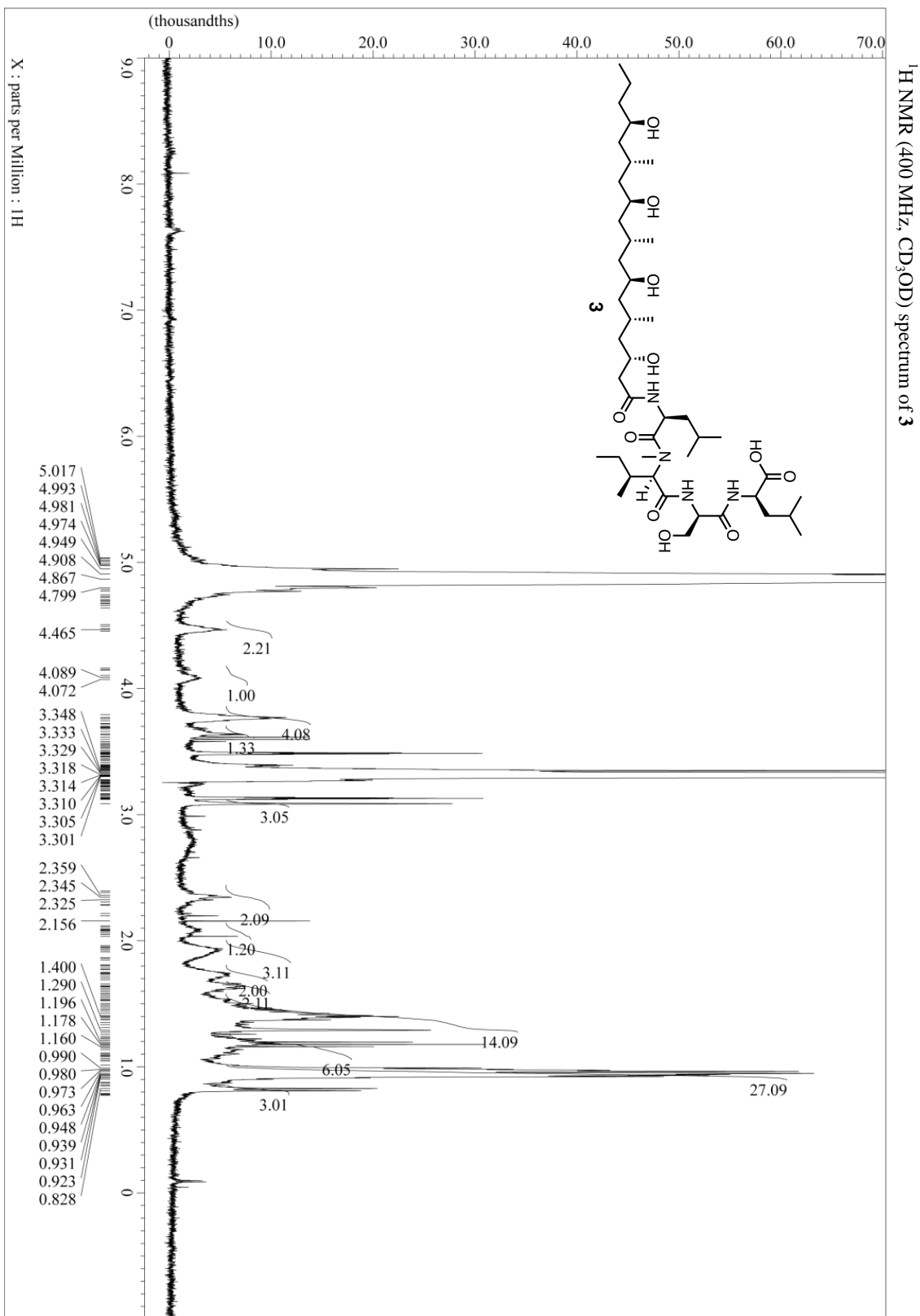
HMBC (400 MHz, $\text{C}_6\text{D}_6\text{N}$) spectrum of minnamide A (2) optimized for $J_{\text{CH}} = 8 \text{ Hz}$



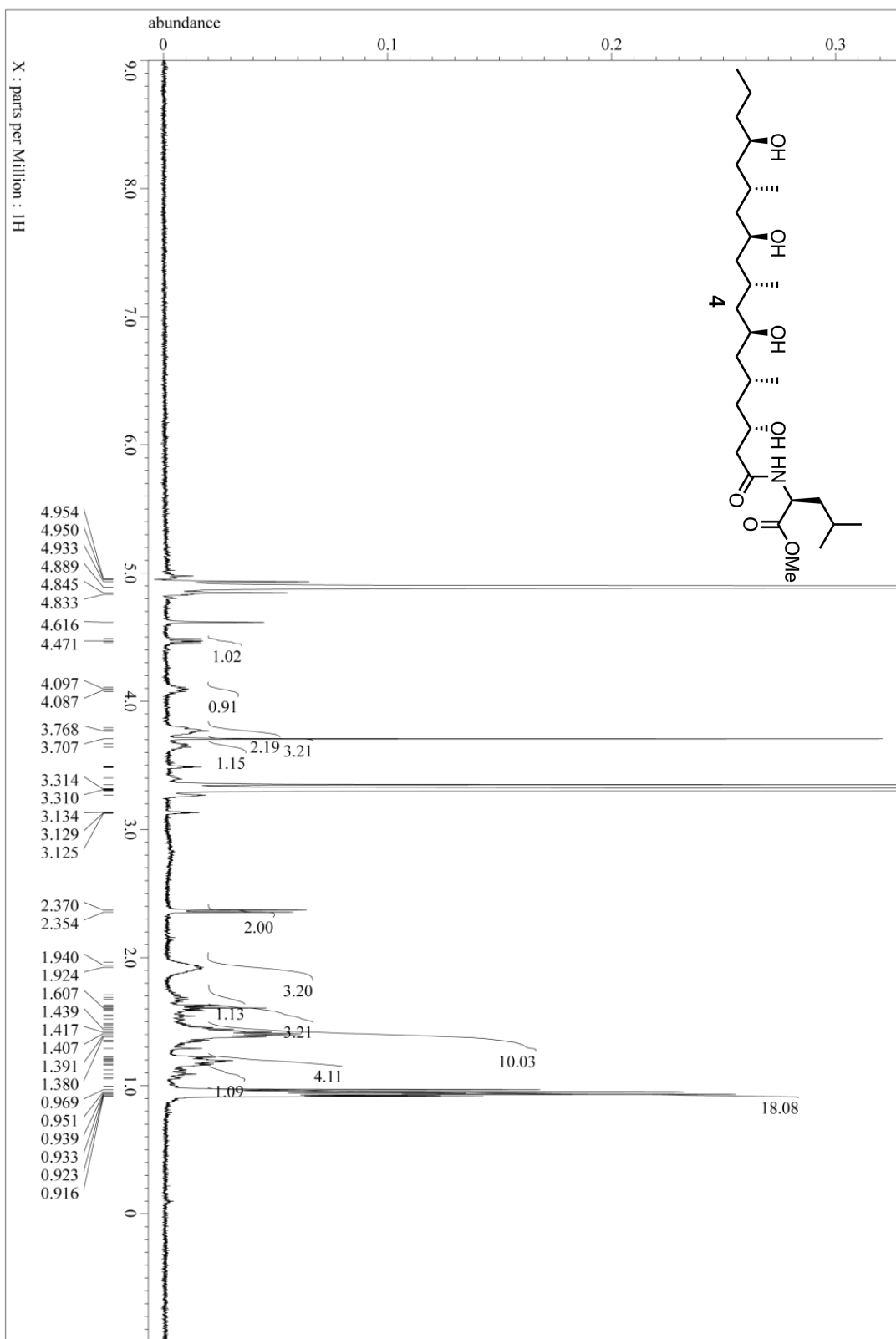
TOCSY (400 MHz, C_5D_5N , mixing time = 50 ms) spectrum of minnamide A (2)

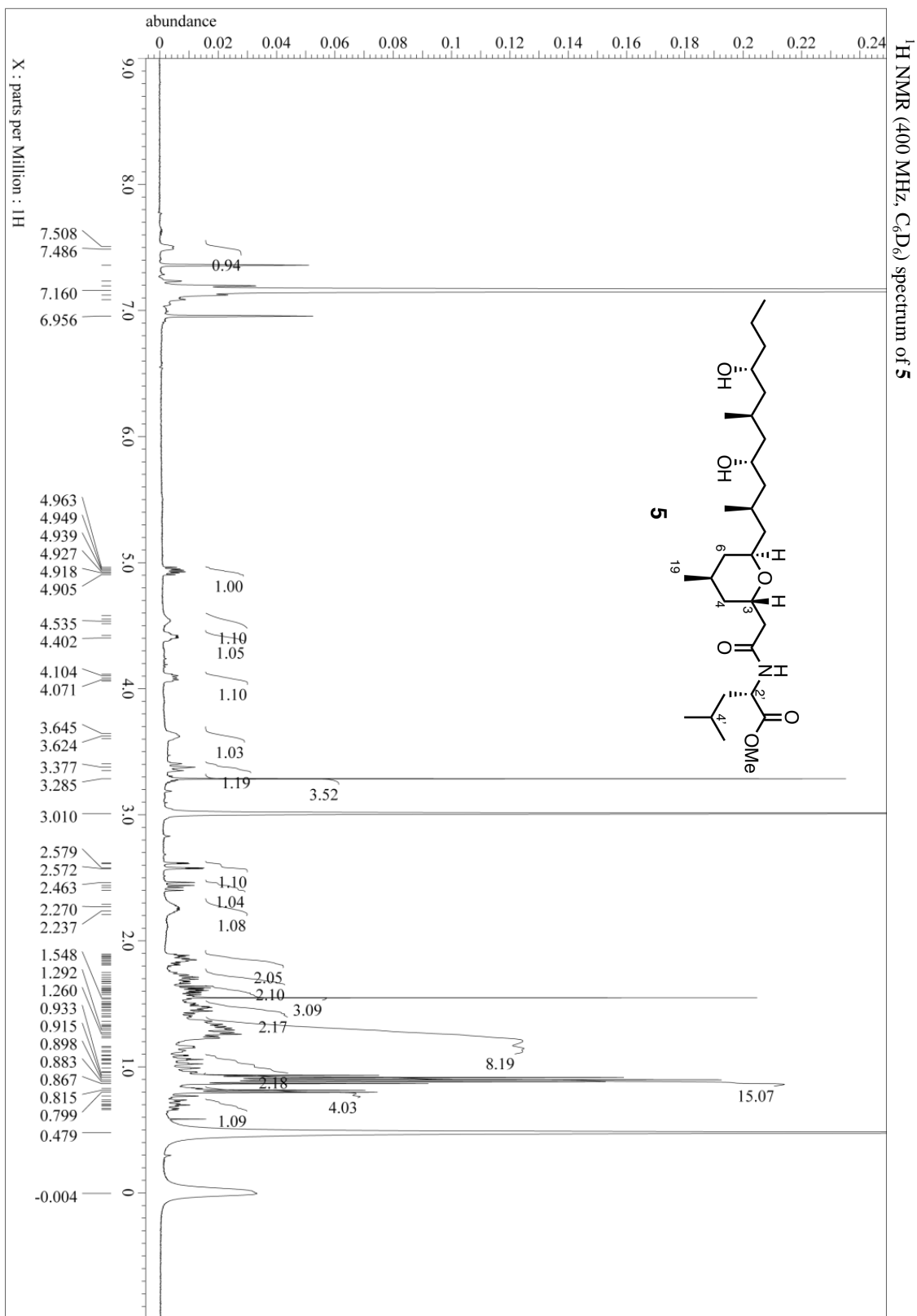


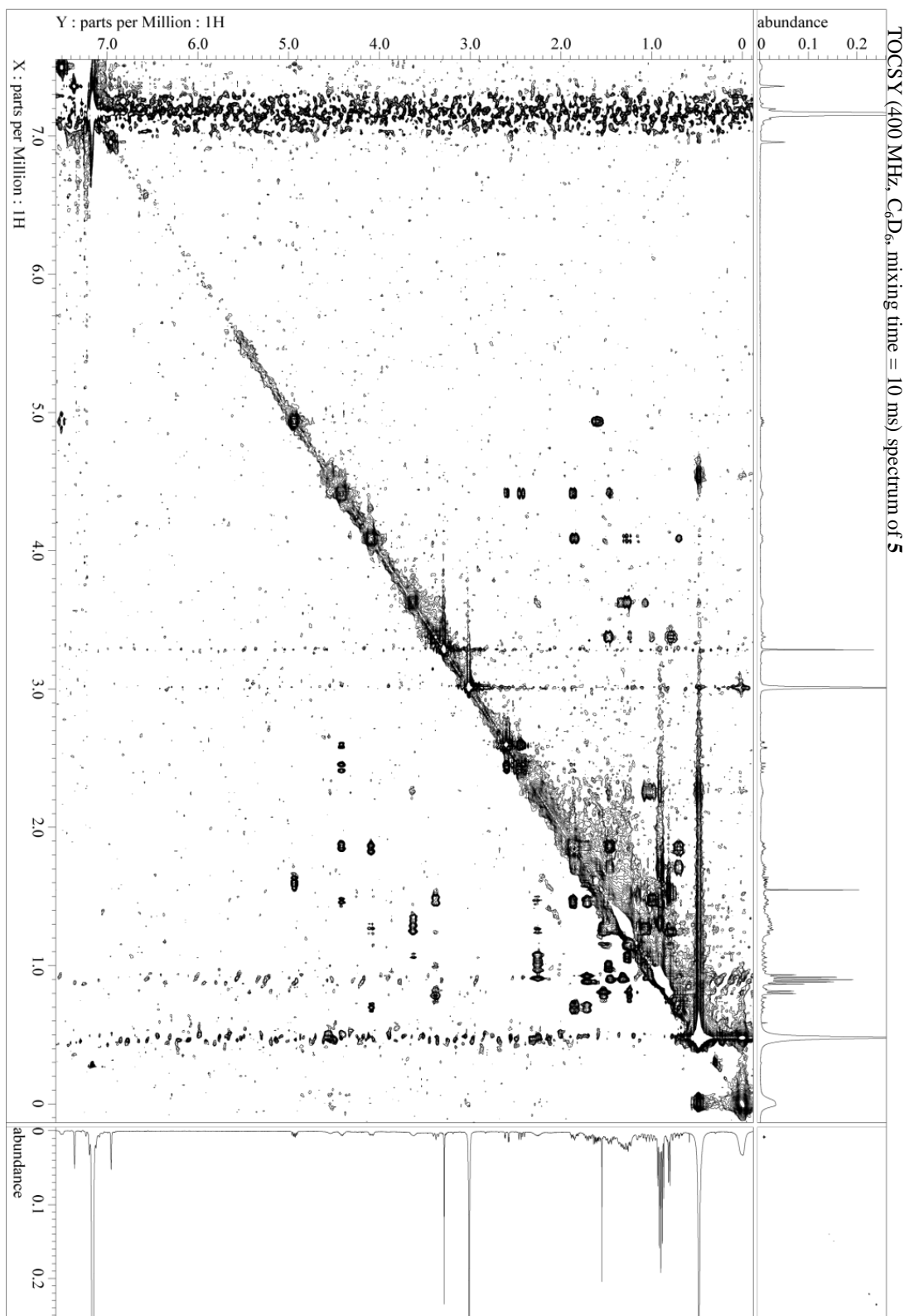
ROESY (400 MHz, C₅D₅N) spectrum of minnamide A (2)

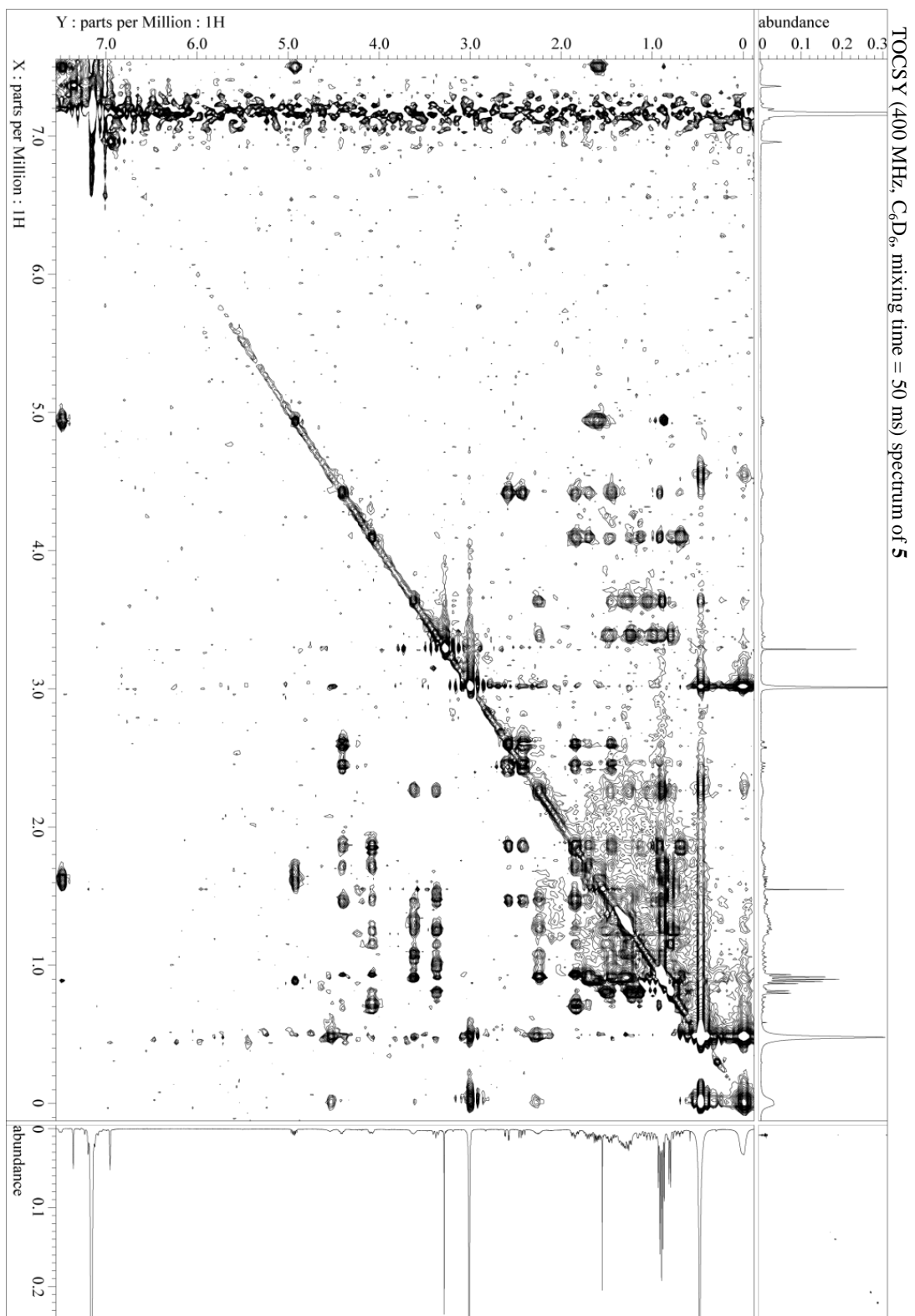


¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) spectrum of **4**

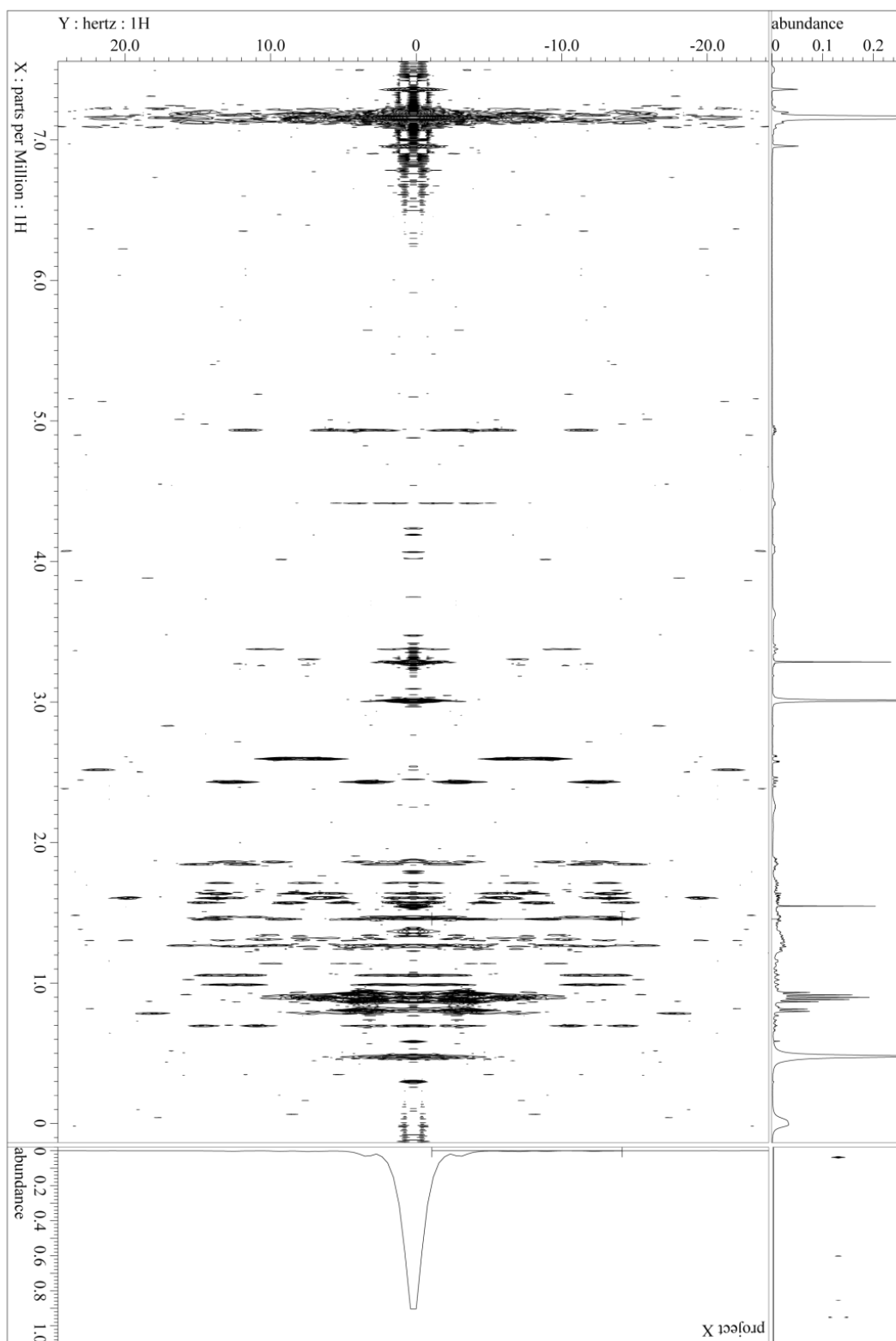




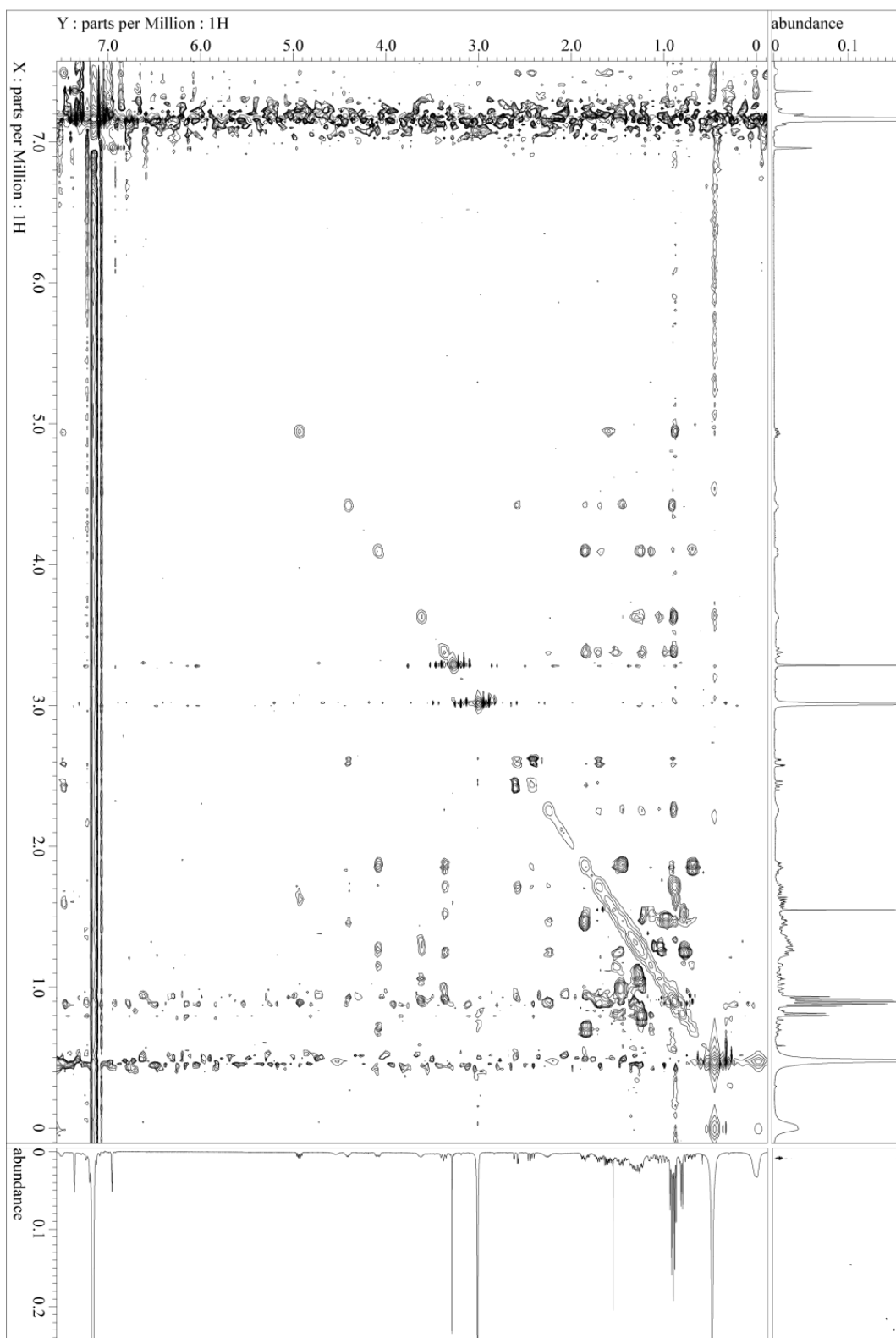




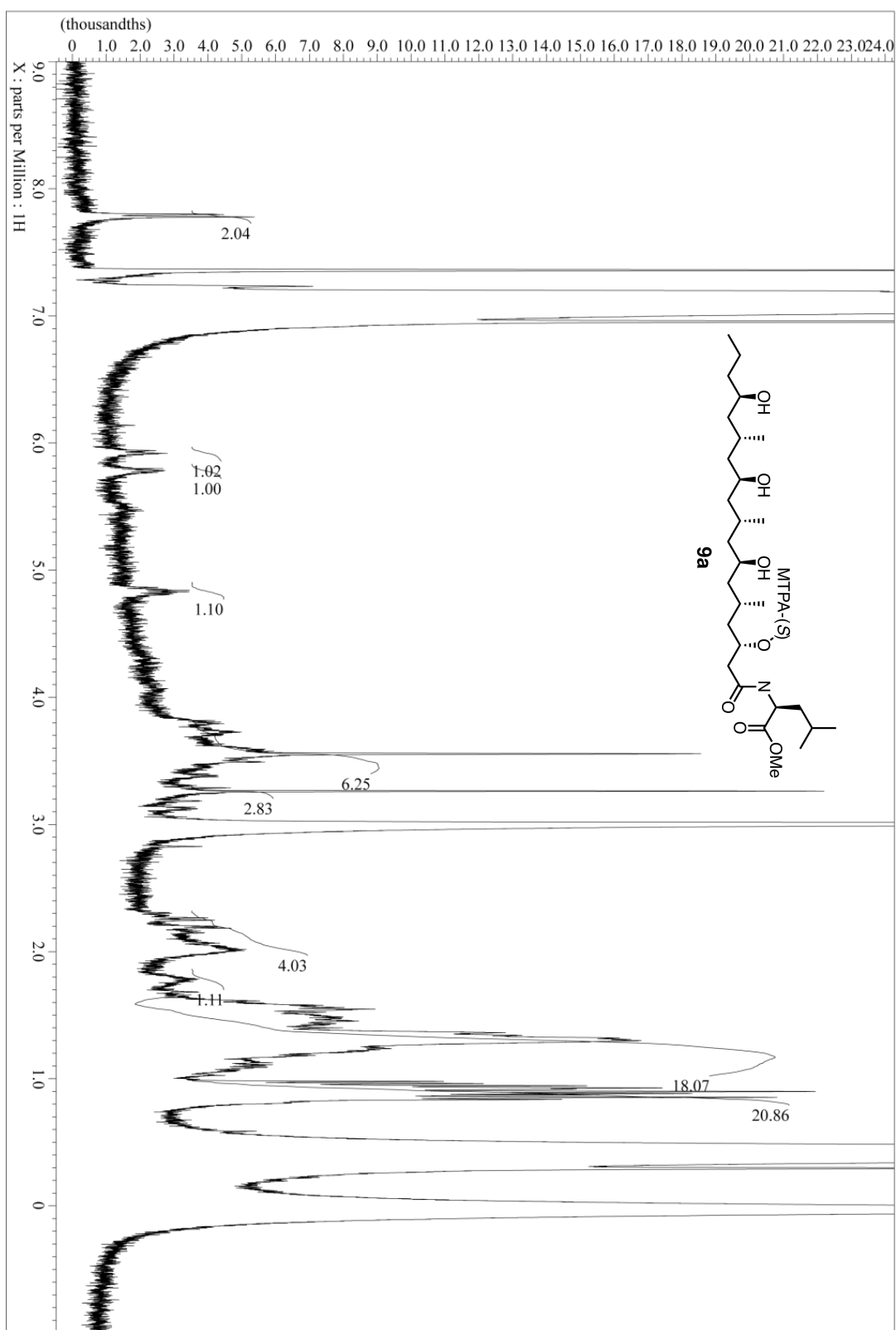
J-resolved (400 MHz, C₆D₆) spectrum of **5**



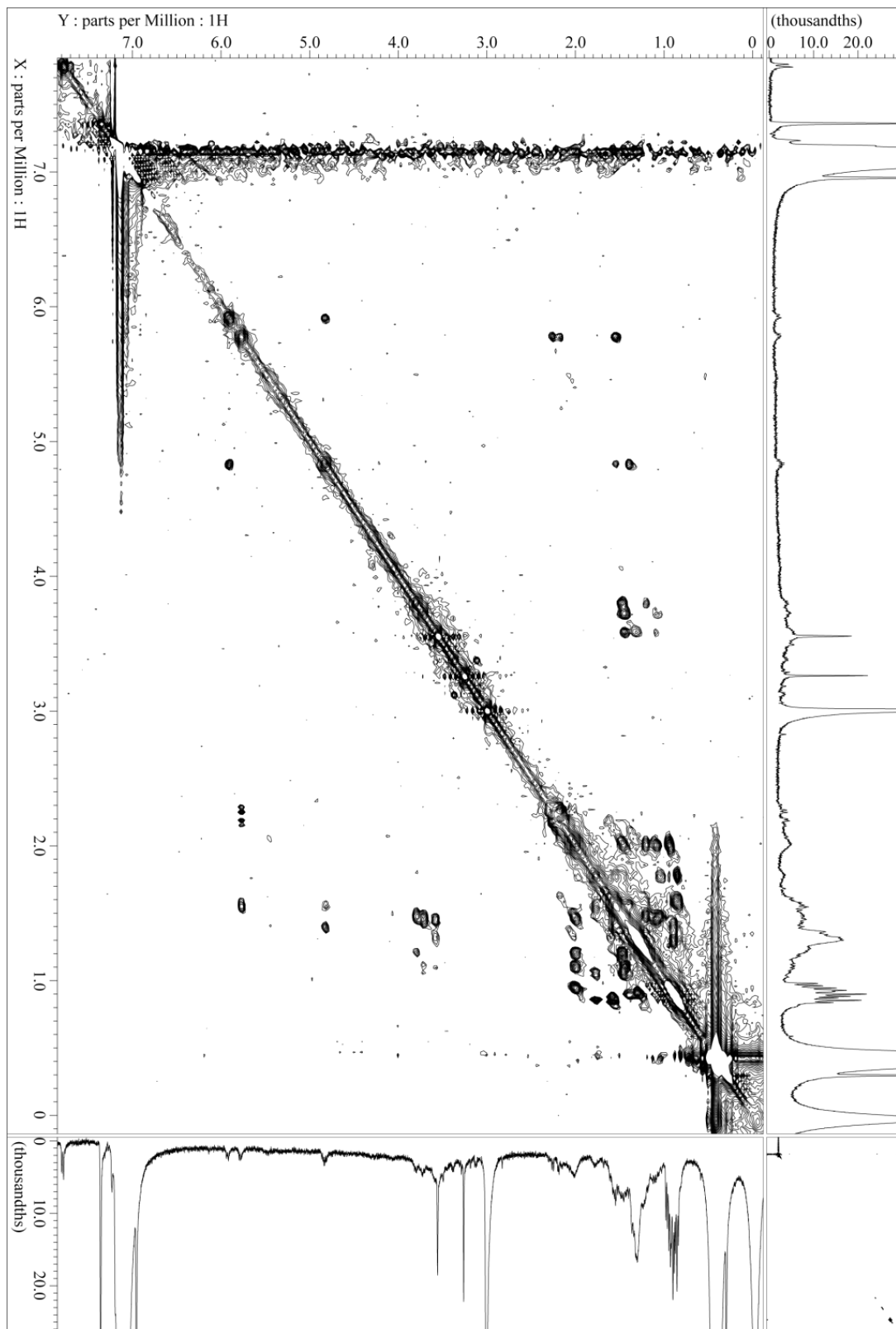
NOESY (400 MHz, C₆D₆) spectrum of **5**



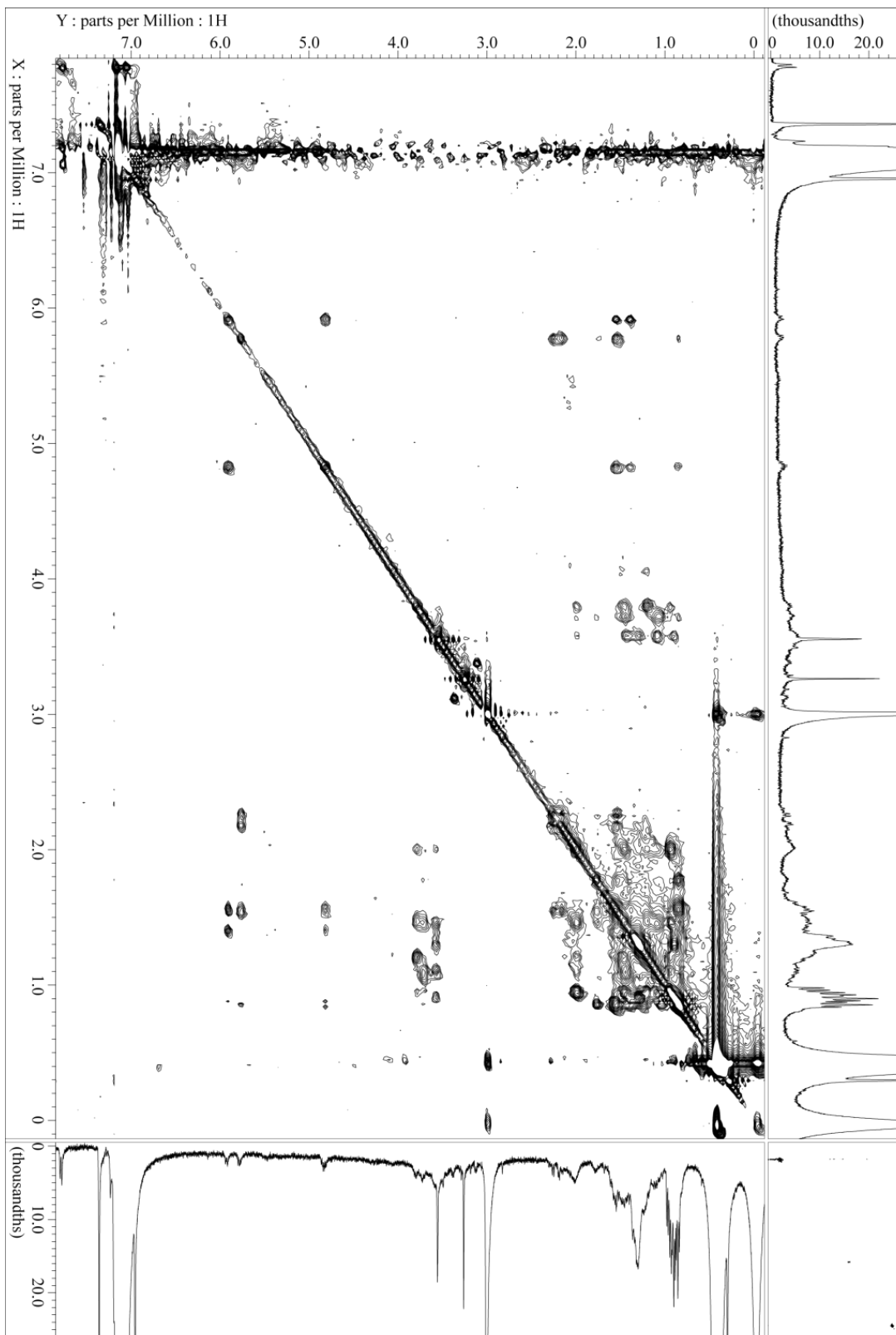
^1H NMR (400 MHz, C_6D_6) spectrum of **9a**



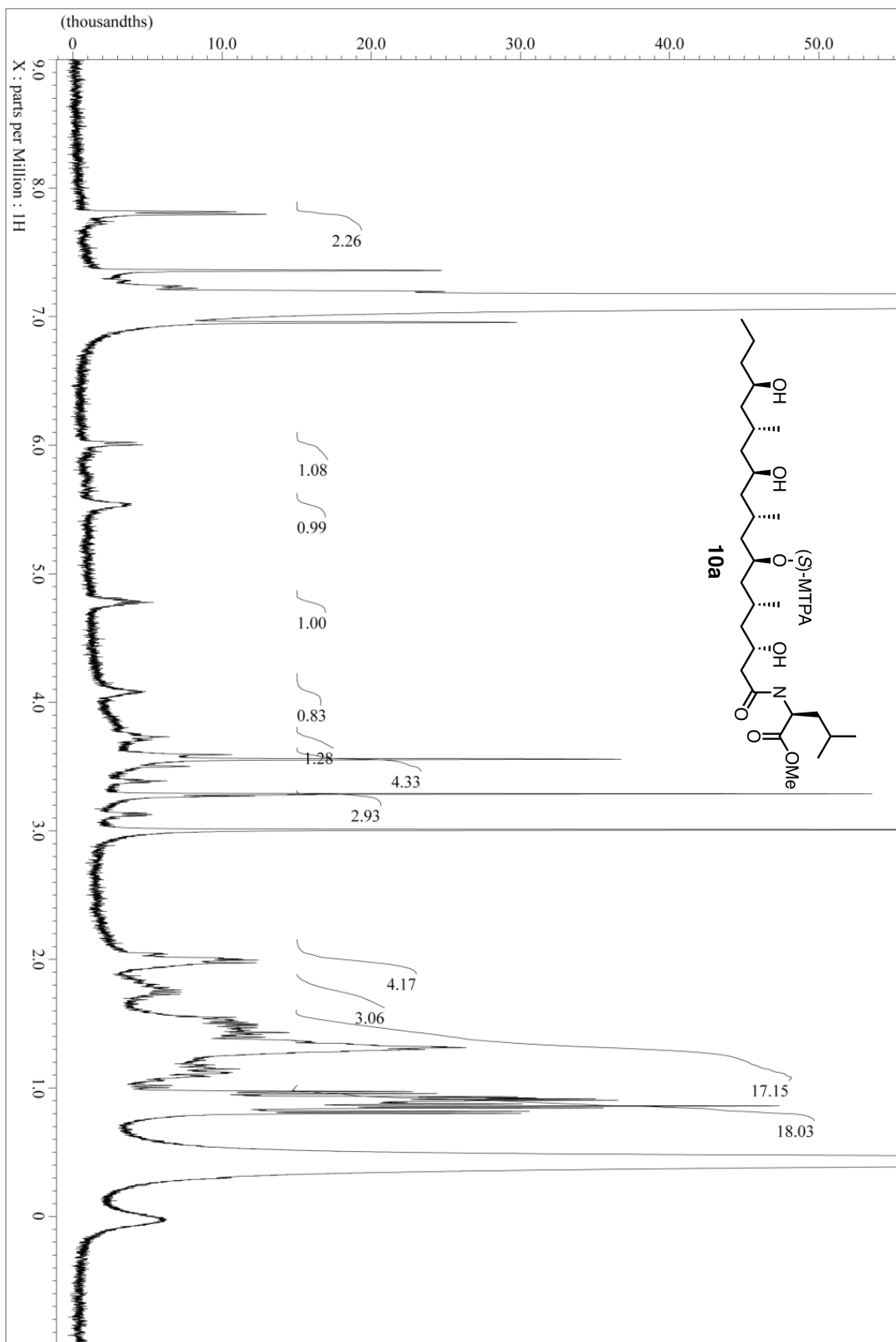
TOCSY (400 MHz, C₆D₆, mixing time = 10 ms) spectrum of 9a



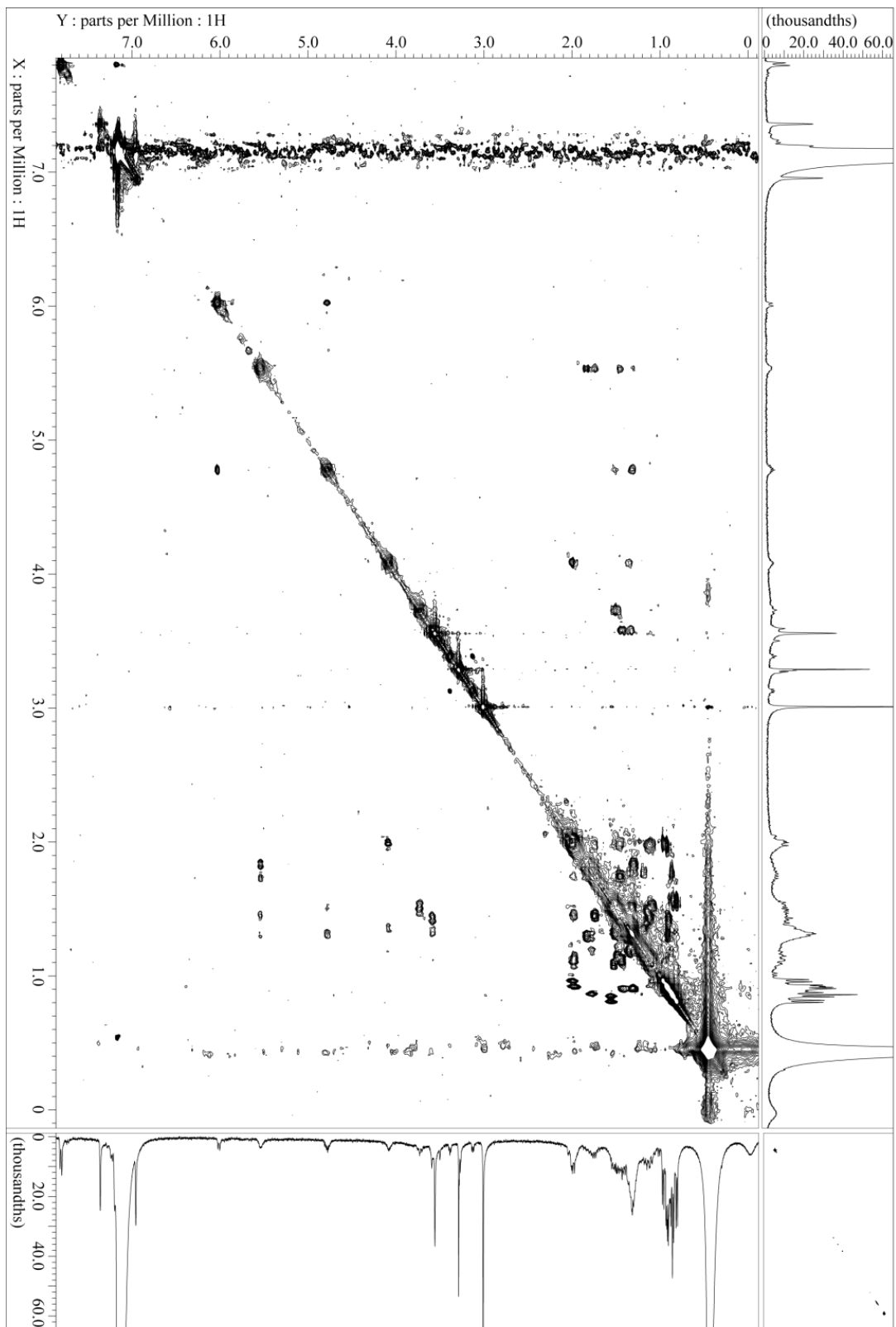
TOCSY (400 MHz, C_6D_6 , mixing time = 50 ms) spectrum of **9a**



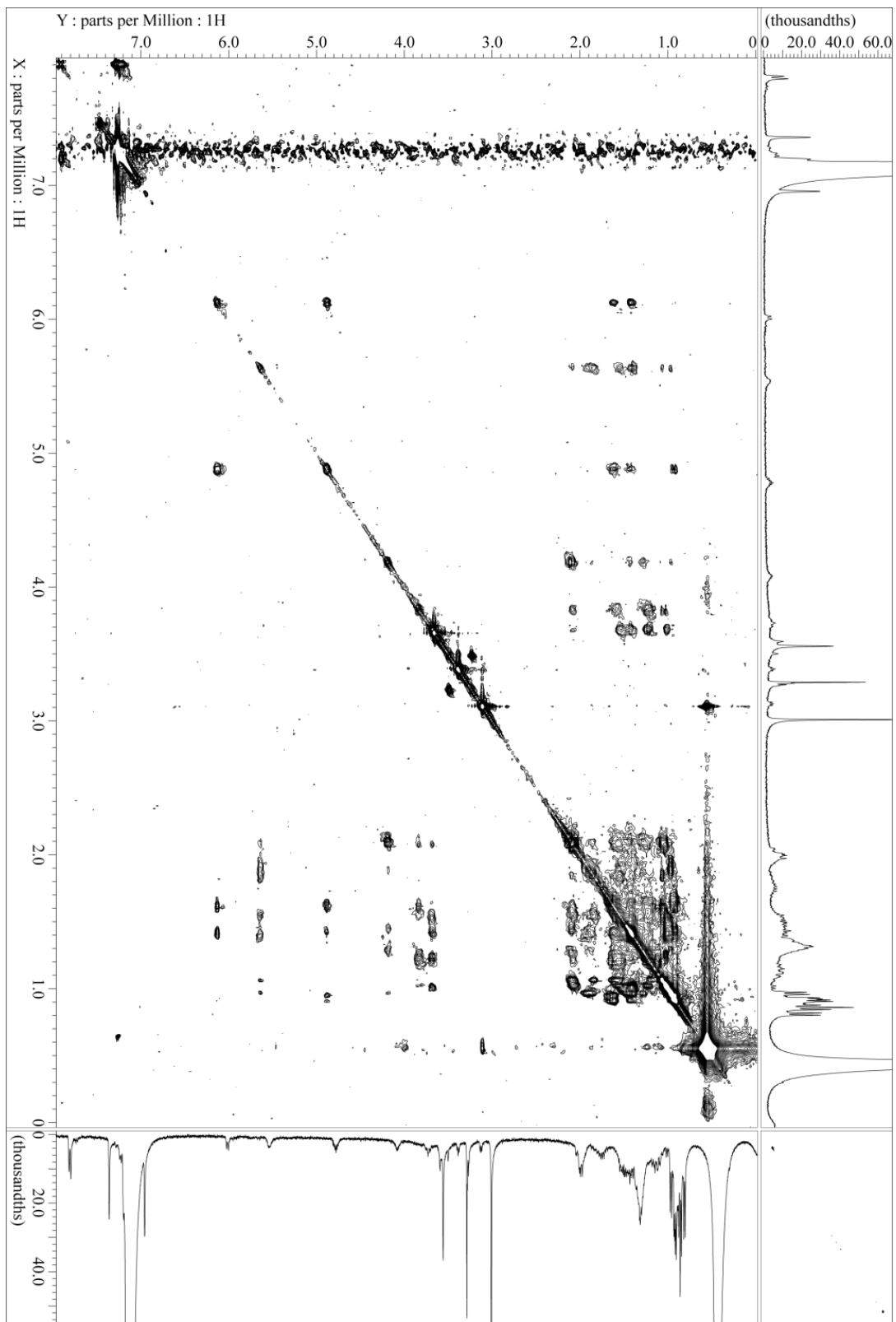
¹H NMR (400 MHz, C₆D₆) spectrum of **10a**



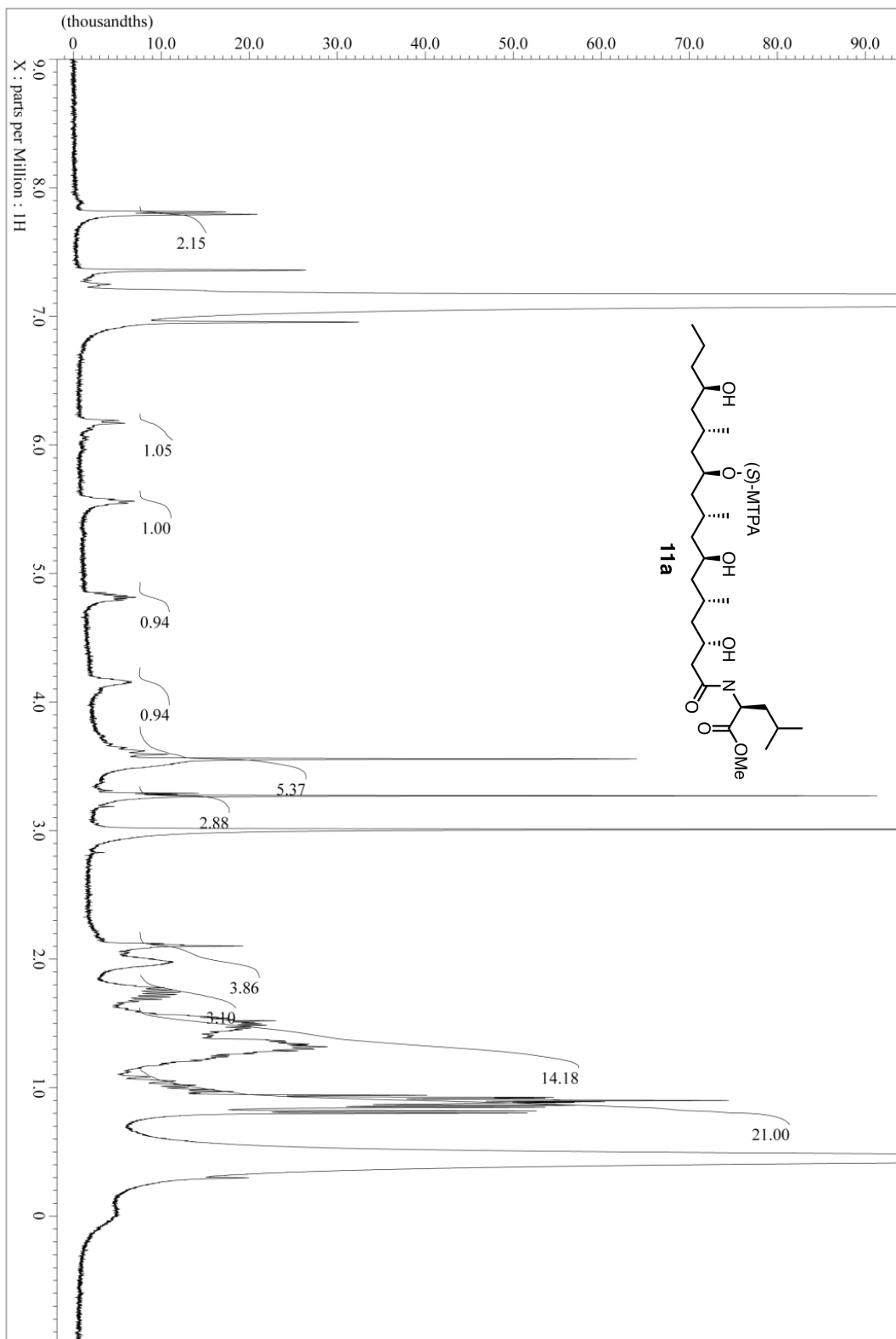
TOCSY (400 MHz, C₆D₆, mixing time = 10 ms) spectrum of **10a**



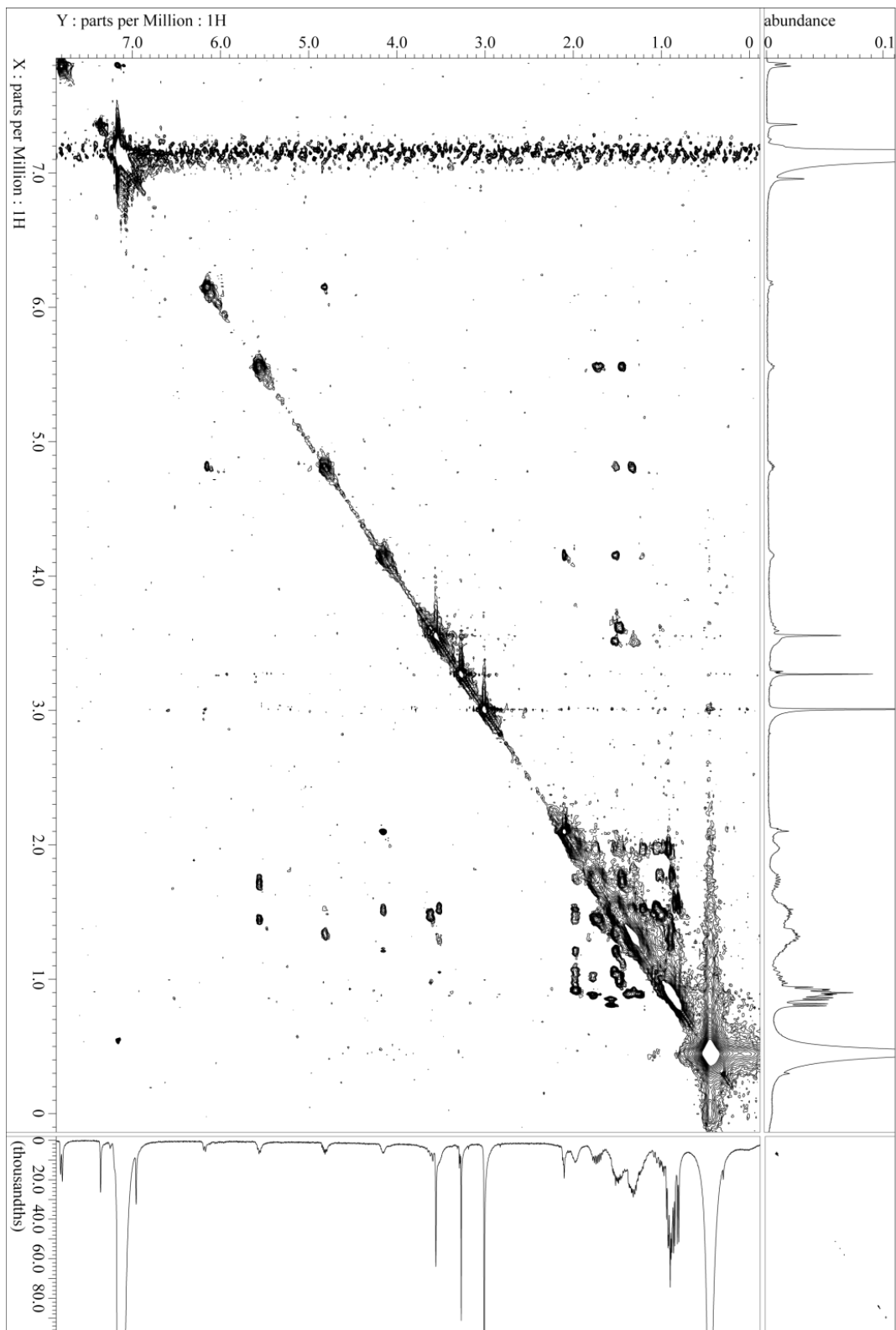
TOCSY (400 MHz, C₆D₆, mixing time = 50 ms) spectrum of 10a



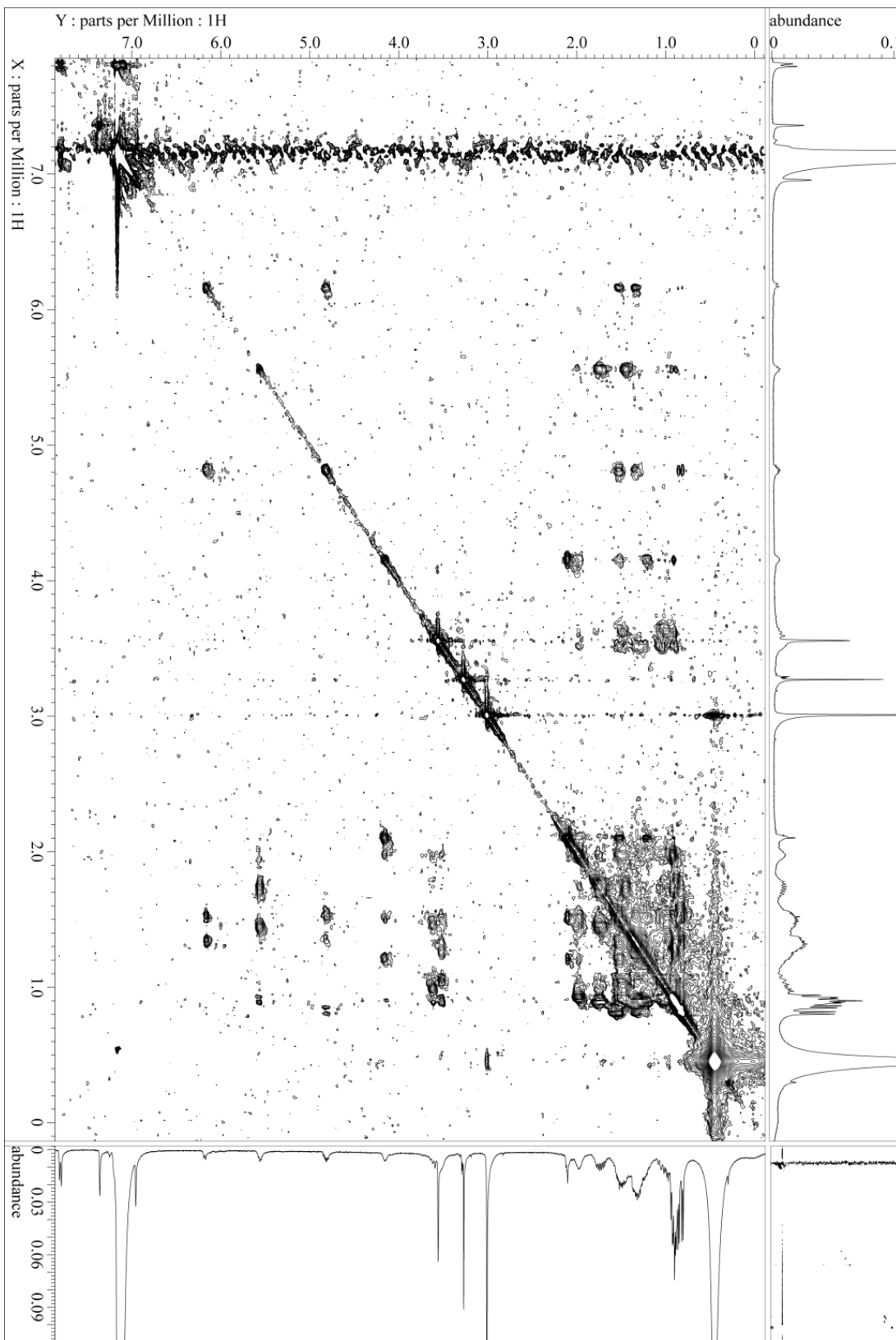
¹H NMR (400 MHz, C₆D₆) spectrum of **11a**



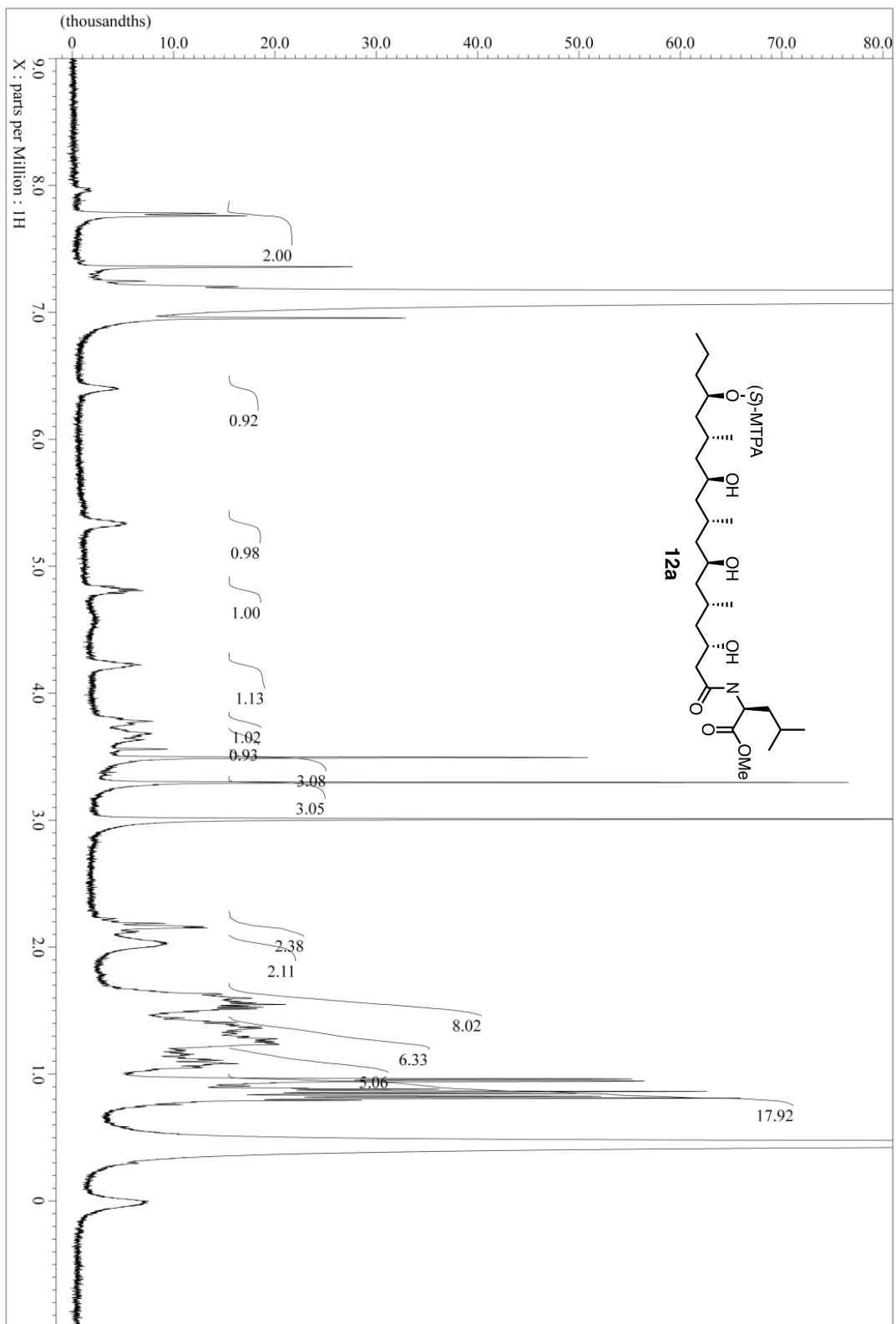
TOCSY (400 MHz, C₆D₆, mixing time = 10 ms) spectrum of **11a**



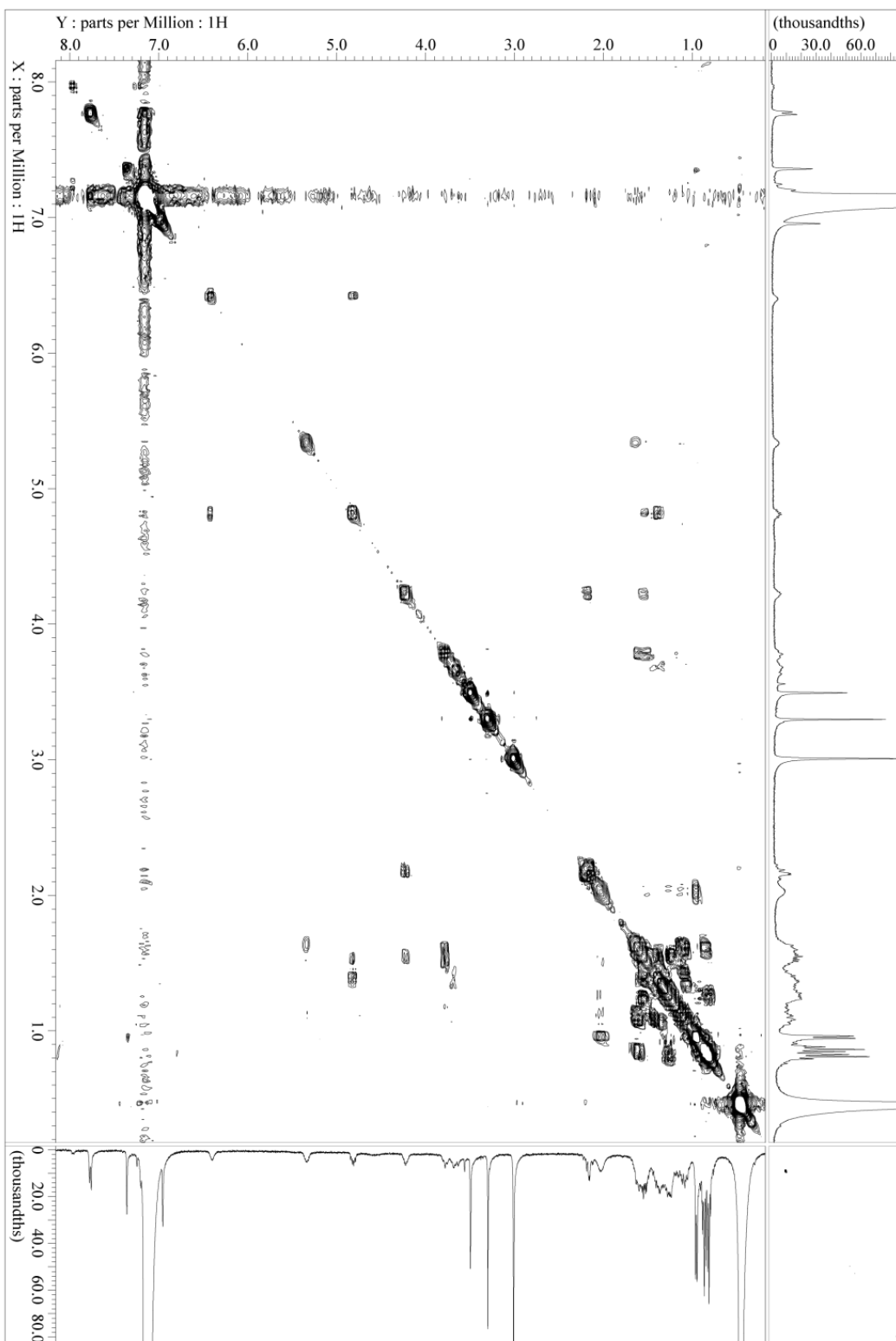
TOCSY (400 MHz, C₆D₆, mixing time = 50 ms) spectrum of 11a



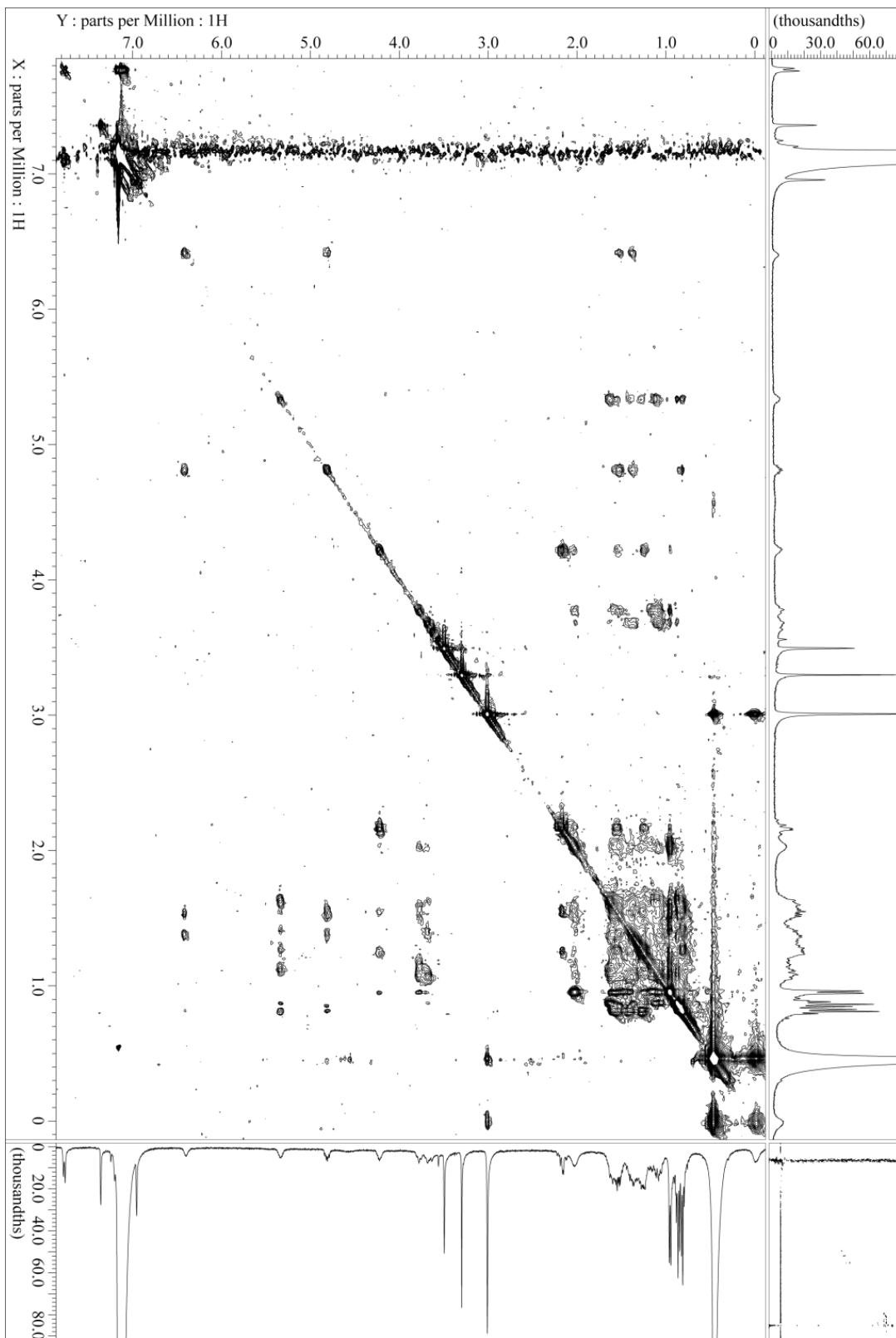
¹H NMR (400 MHz, C₆D₆) spectrum of **12a**



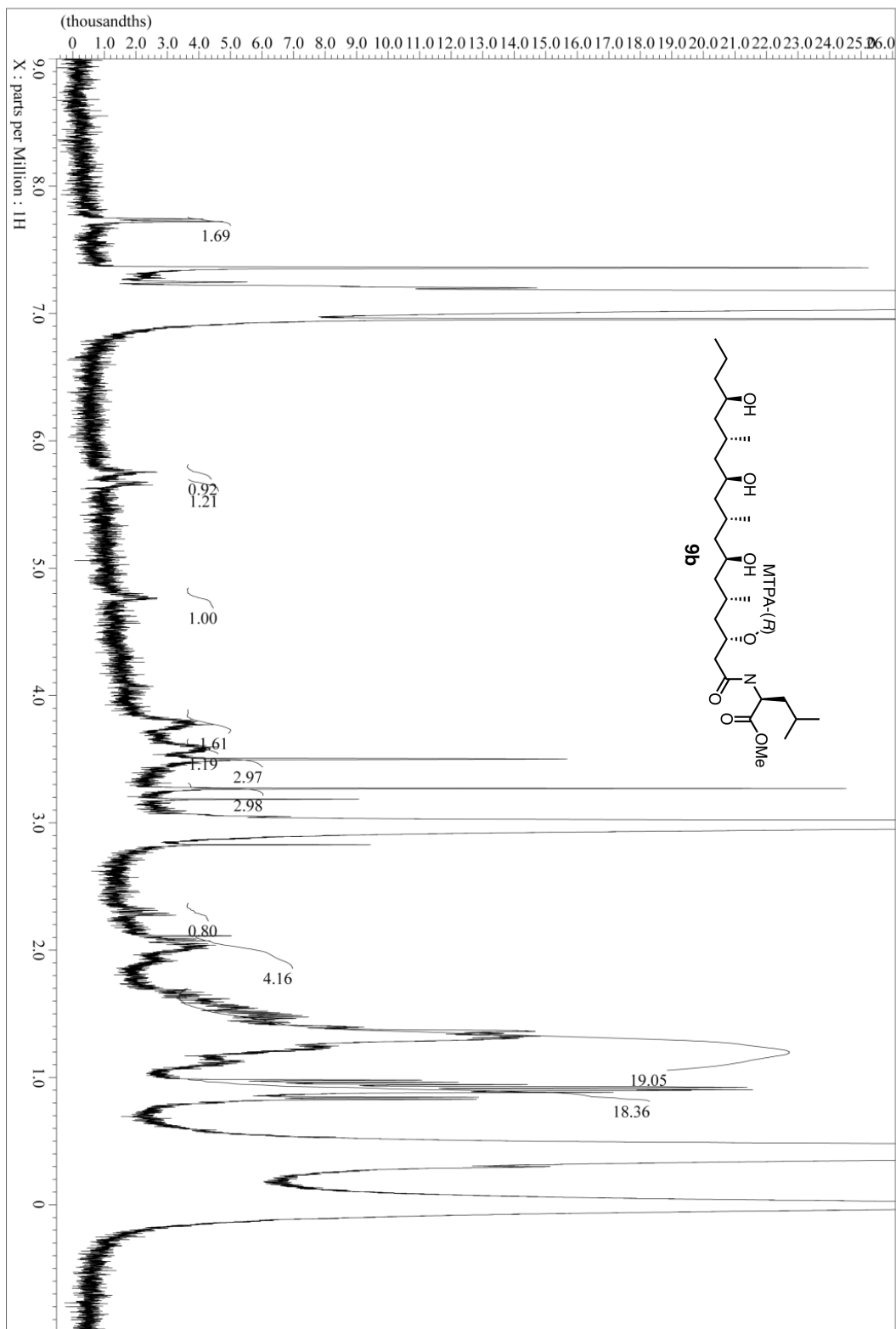
COSY (400 MHz, C₆D₆) spectrum of 12a



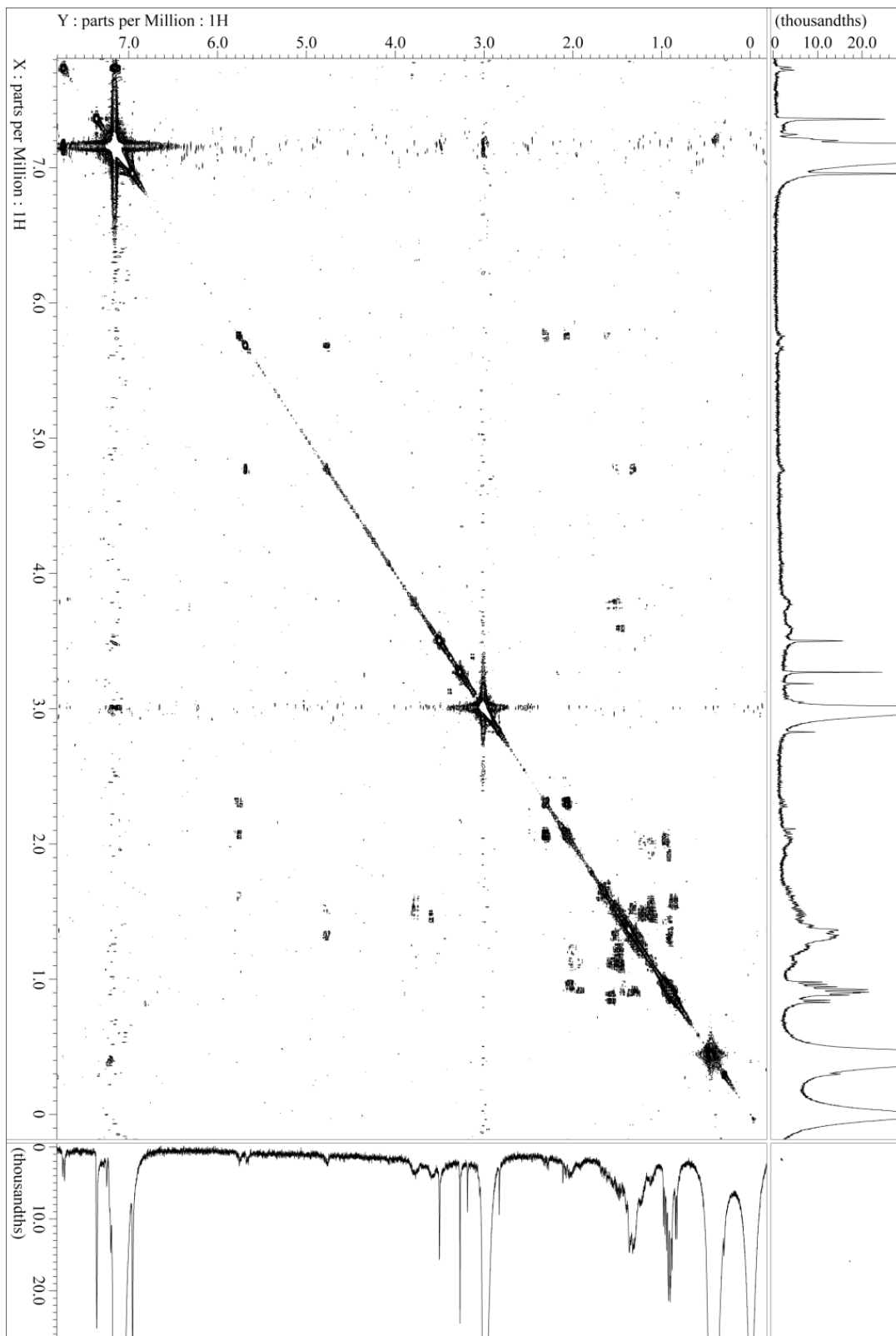
TOCSY (400 MHz, C₆D₆, mixing time = 50 ms) spectrum of **12a**



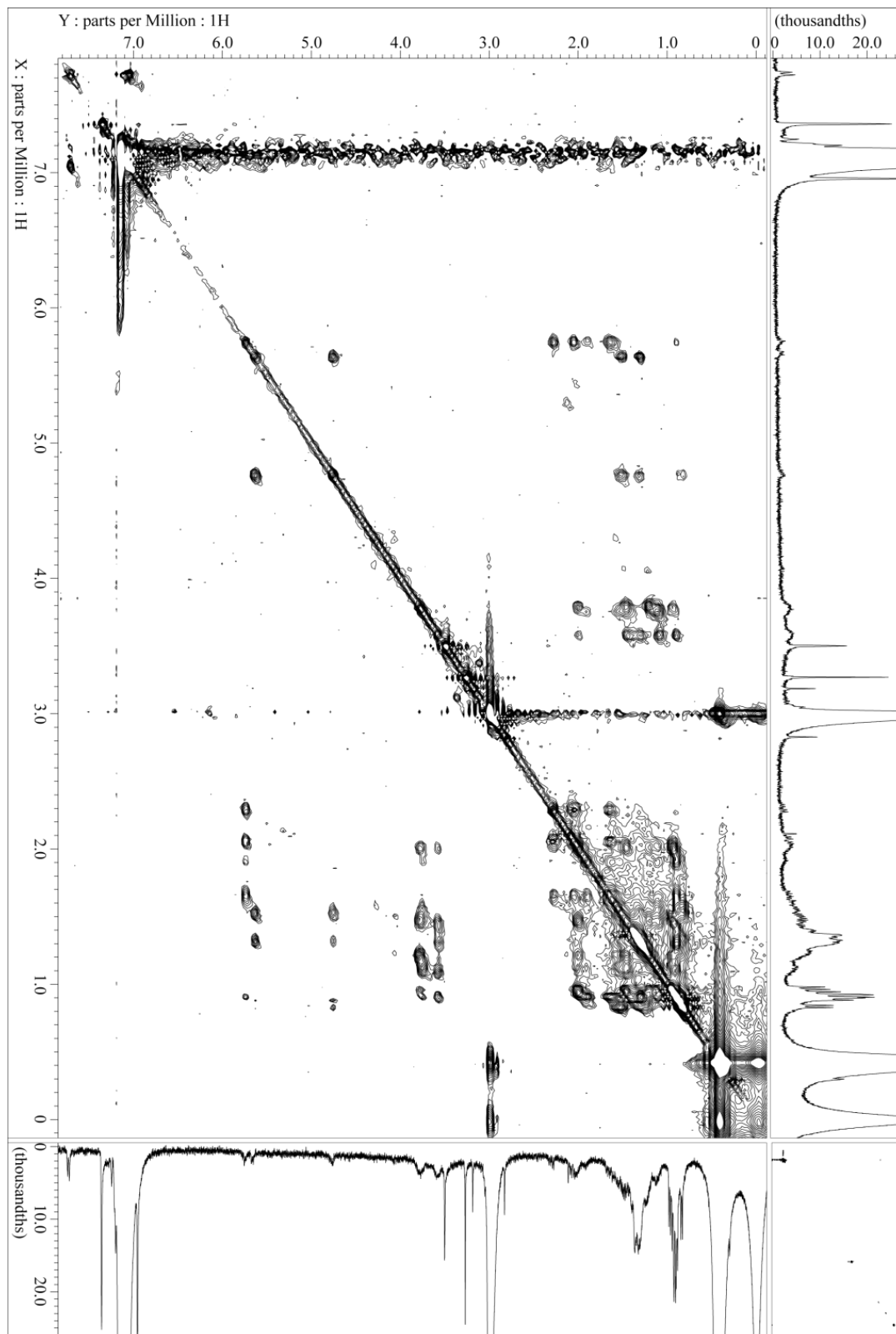
¹H NMR (400 MHz, C₆D₆) spectrum of **9b**



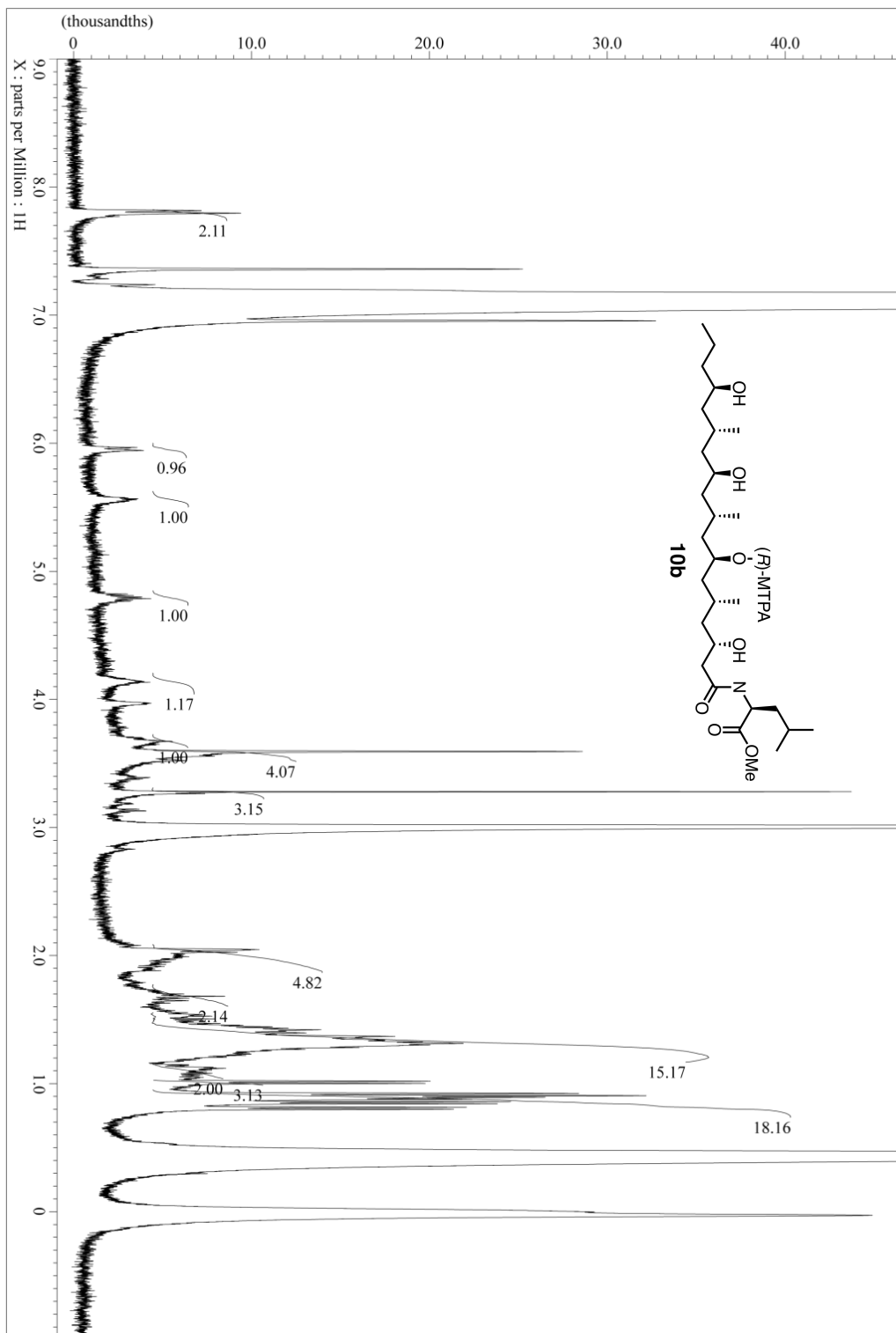
COSY (400 MHz, C₆D₆) spectrum of 9b



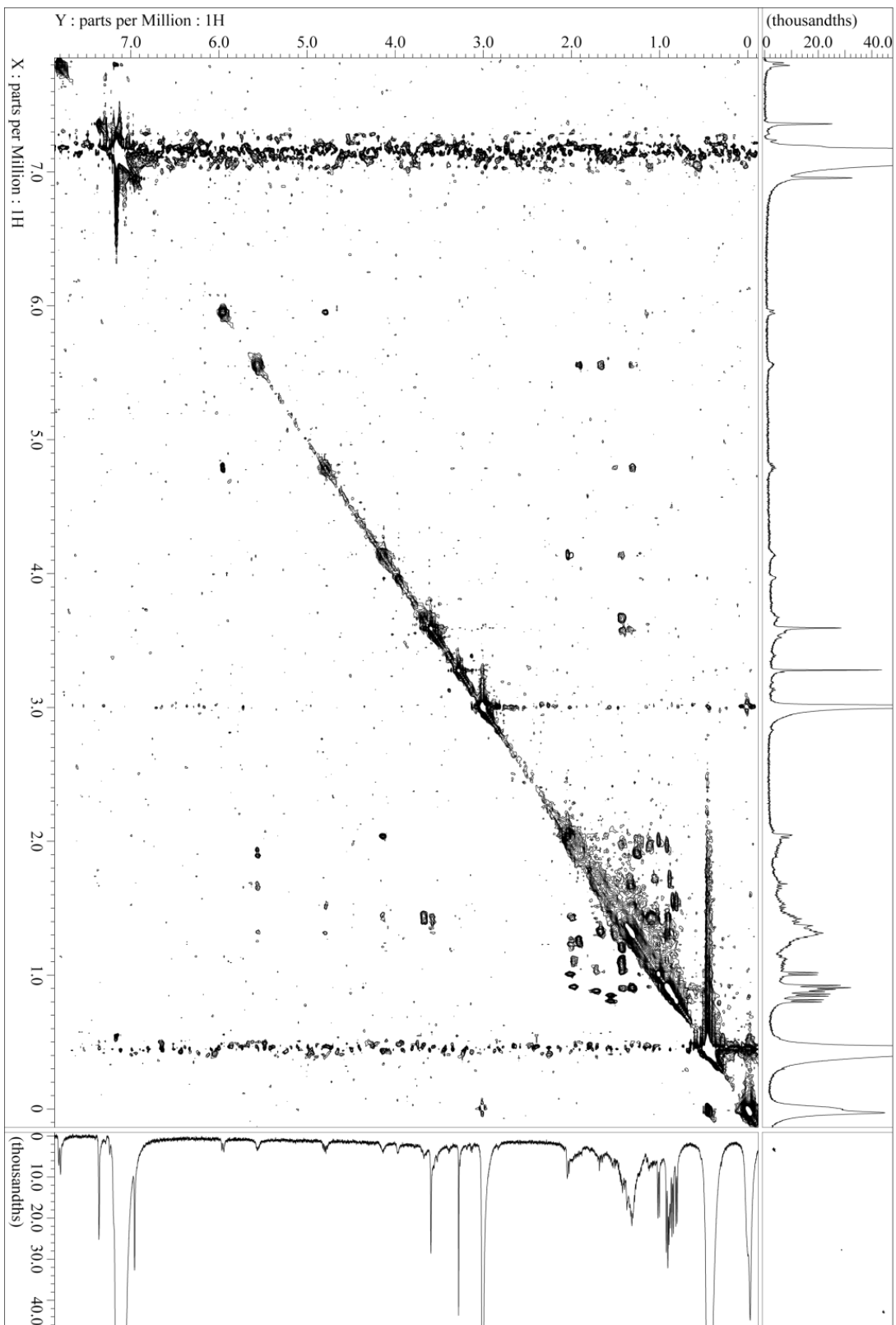
TOCSY (400 MHz, C_6D_6 , mixing time = 50 ms) spectrum of **9b**



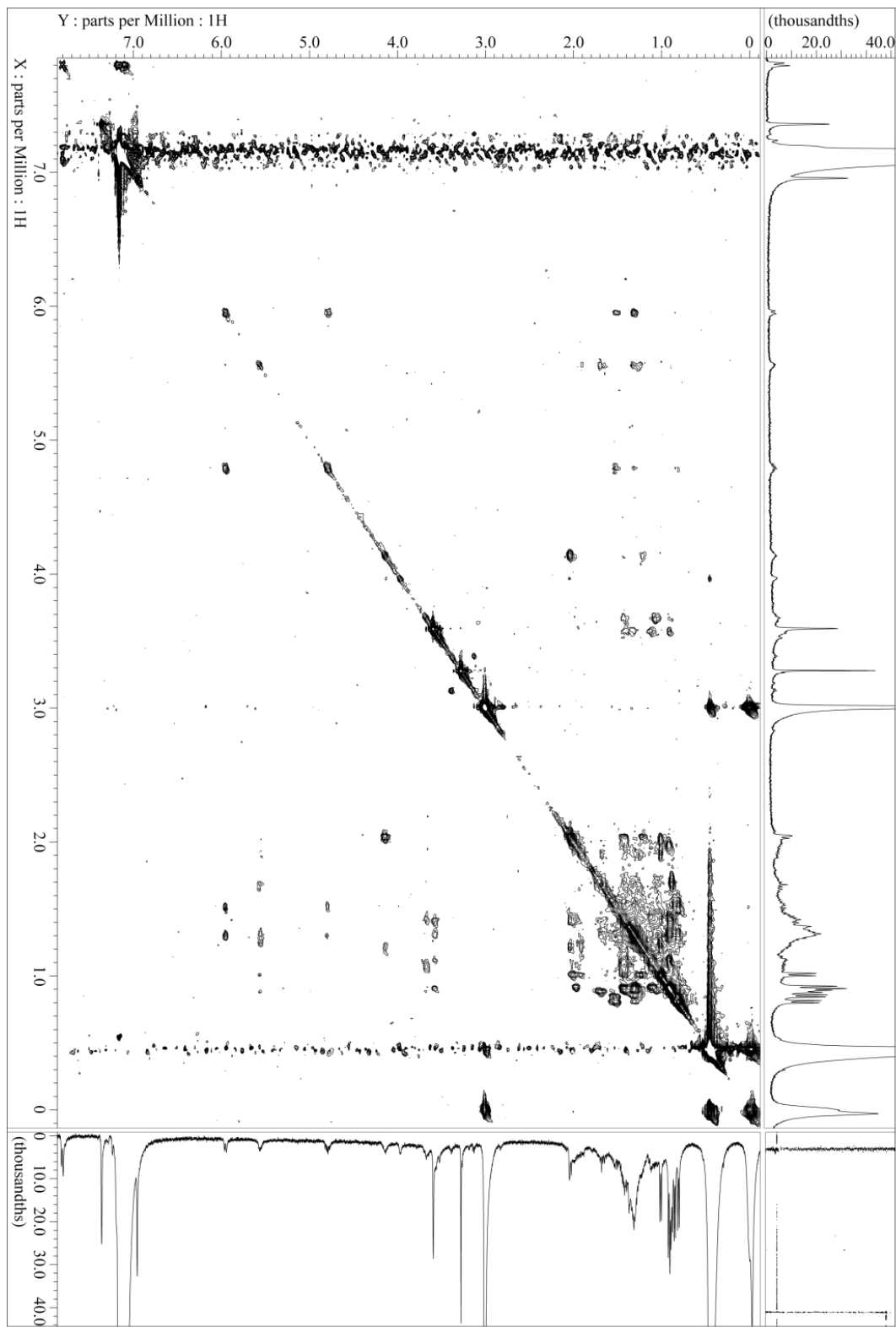
^1H NMR (400 MHz, C_6D_6) spectrum of **10b**



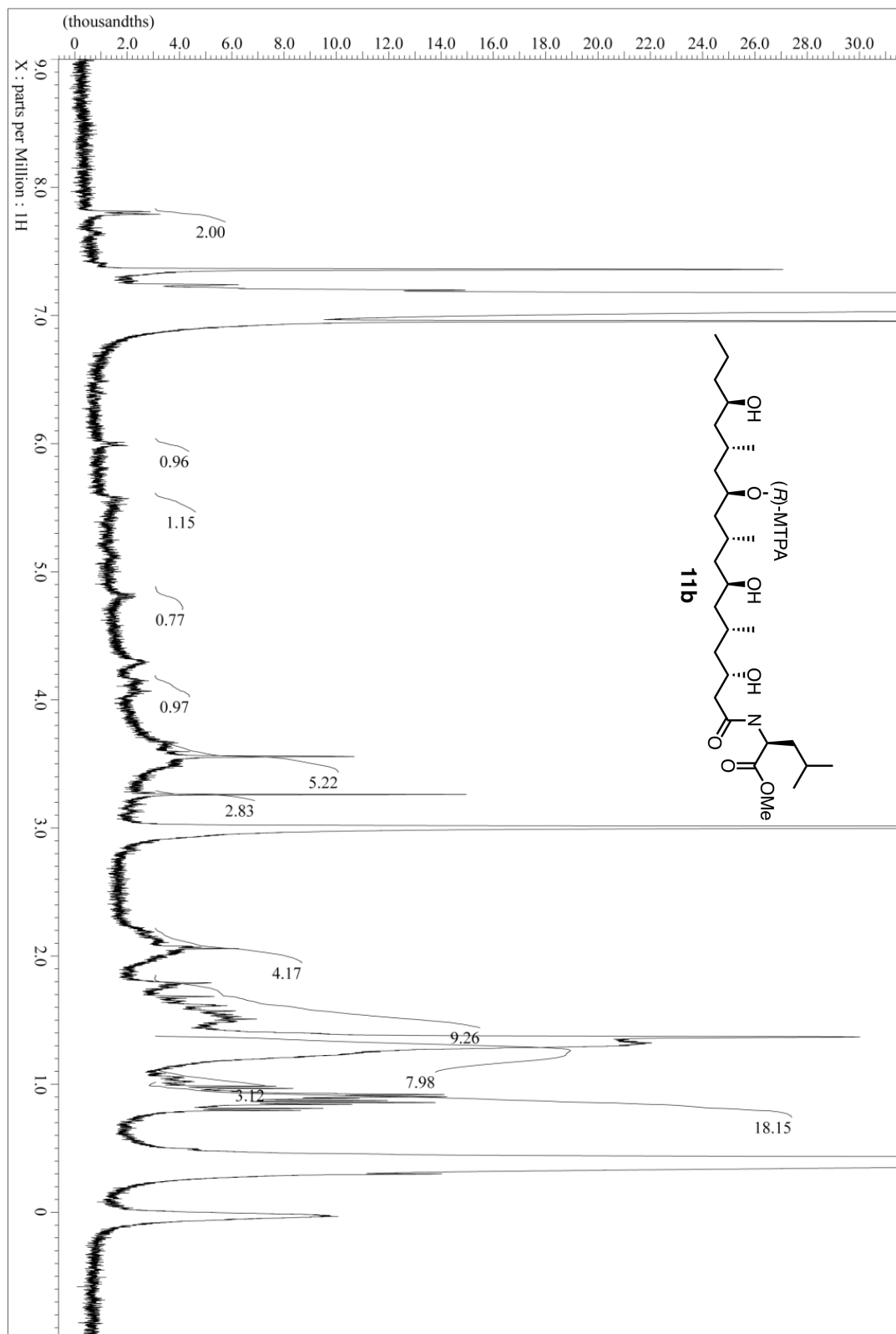
TOCSY (400 MHz, C₆D₆, mixing time = 10 ms) spectrum of **10b**



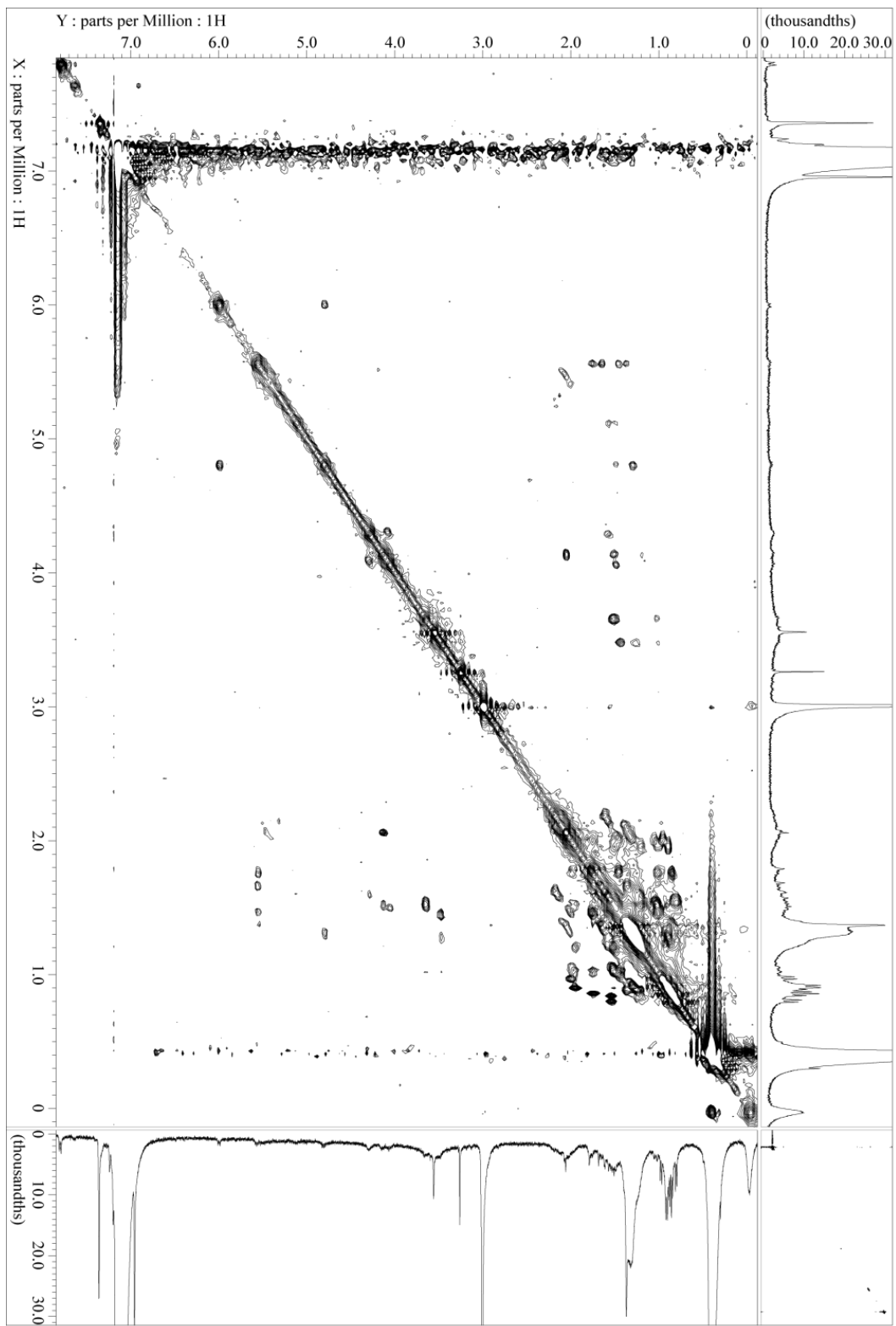
TOCSY (400 MHz, C₆D₆, mixing time = 50 ms) spectrum of **10b**



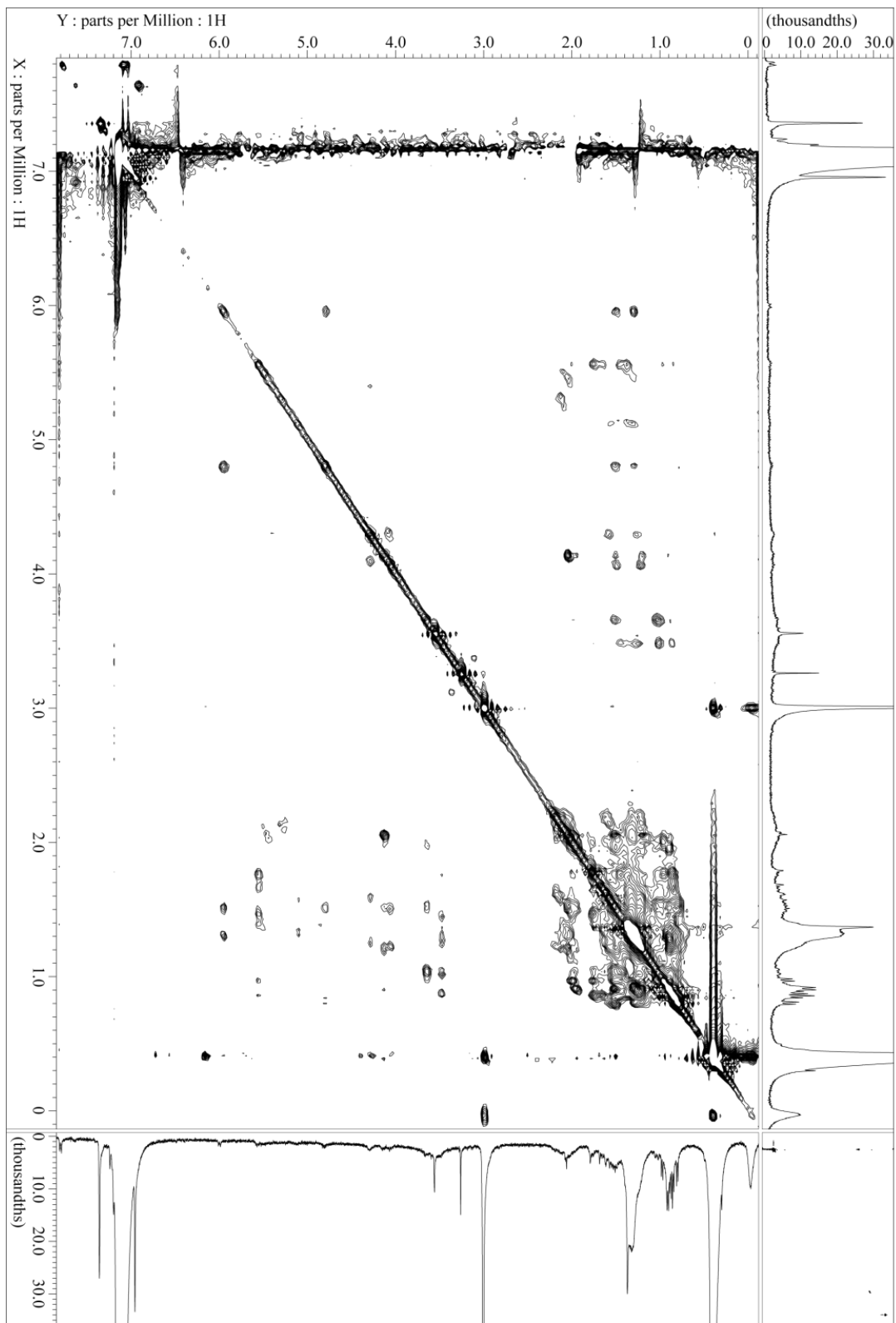
¹H NMR (400 MHz, C₆D₆) spectrum of **11b**



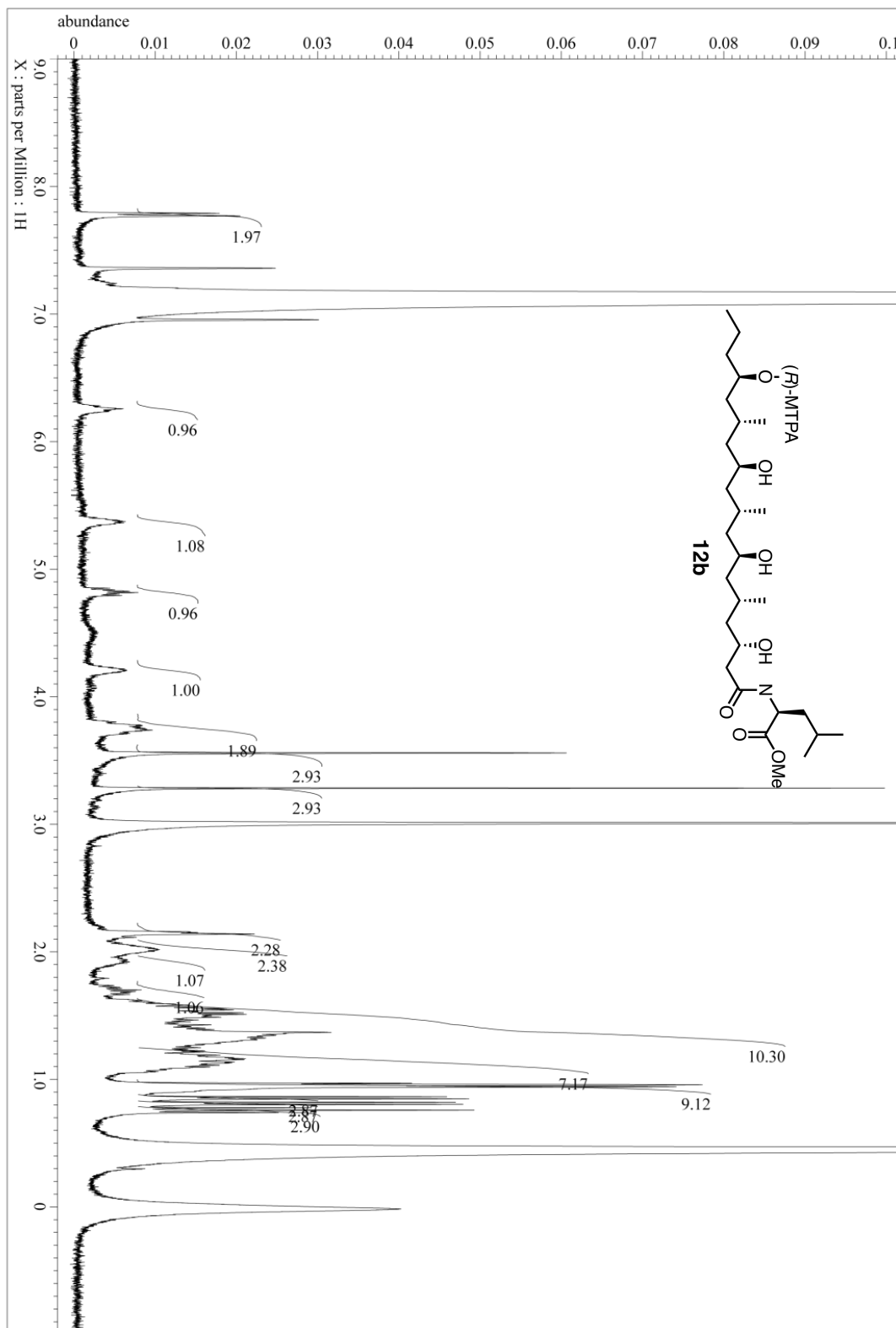
TOCSY (400 MHz, C₆D₆, mixing time = 10 ms) spectrum of **11b**



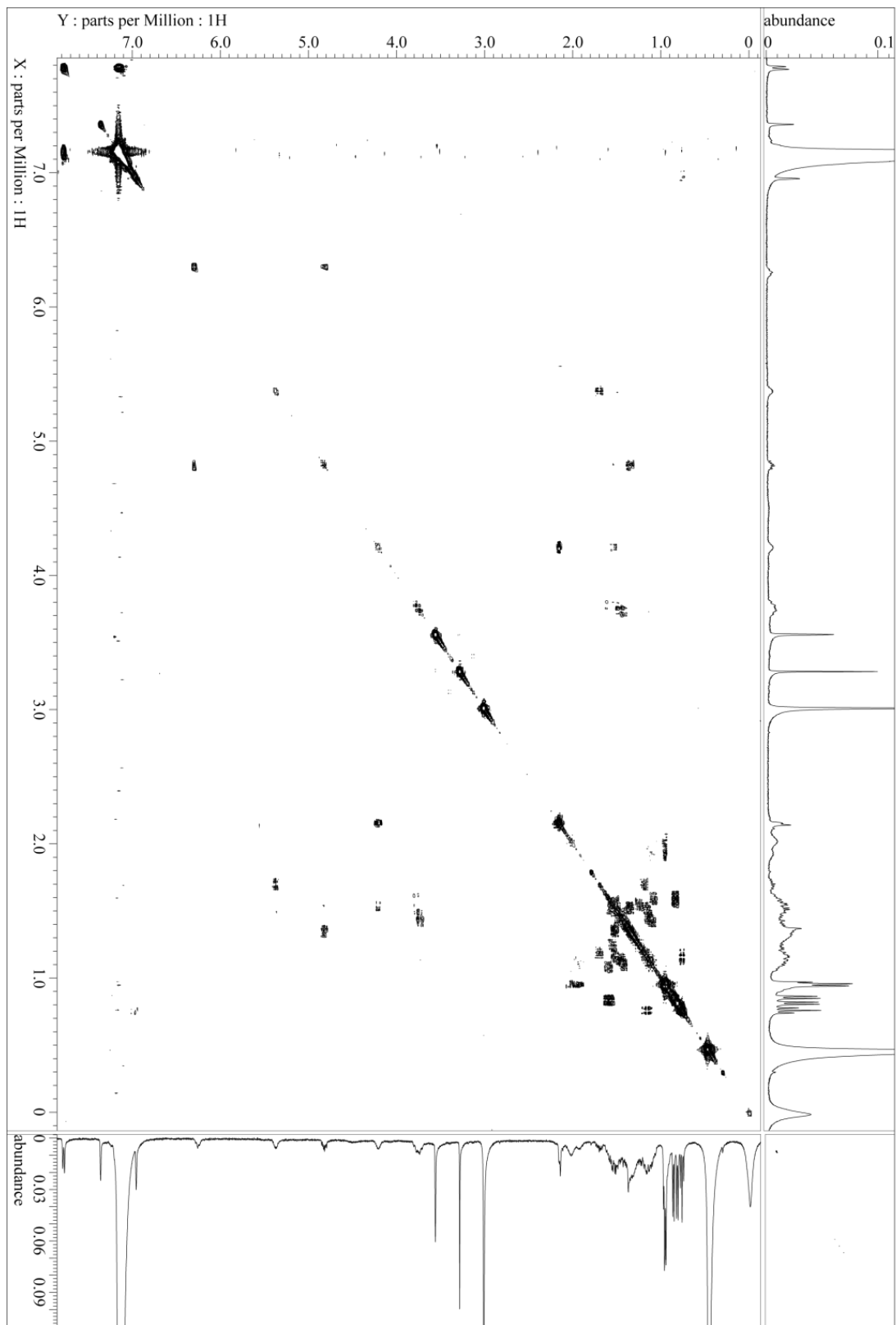
TOCSY (400 MHz, C₆D₆, mixing time = 50 ms) spectrum of 11b



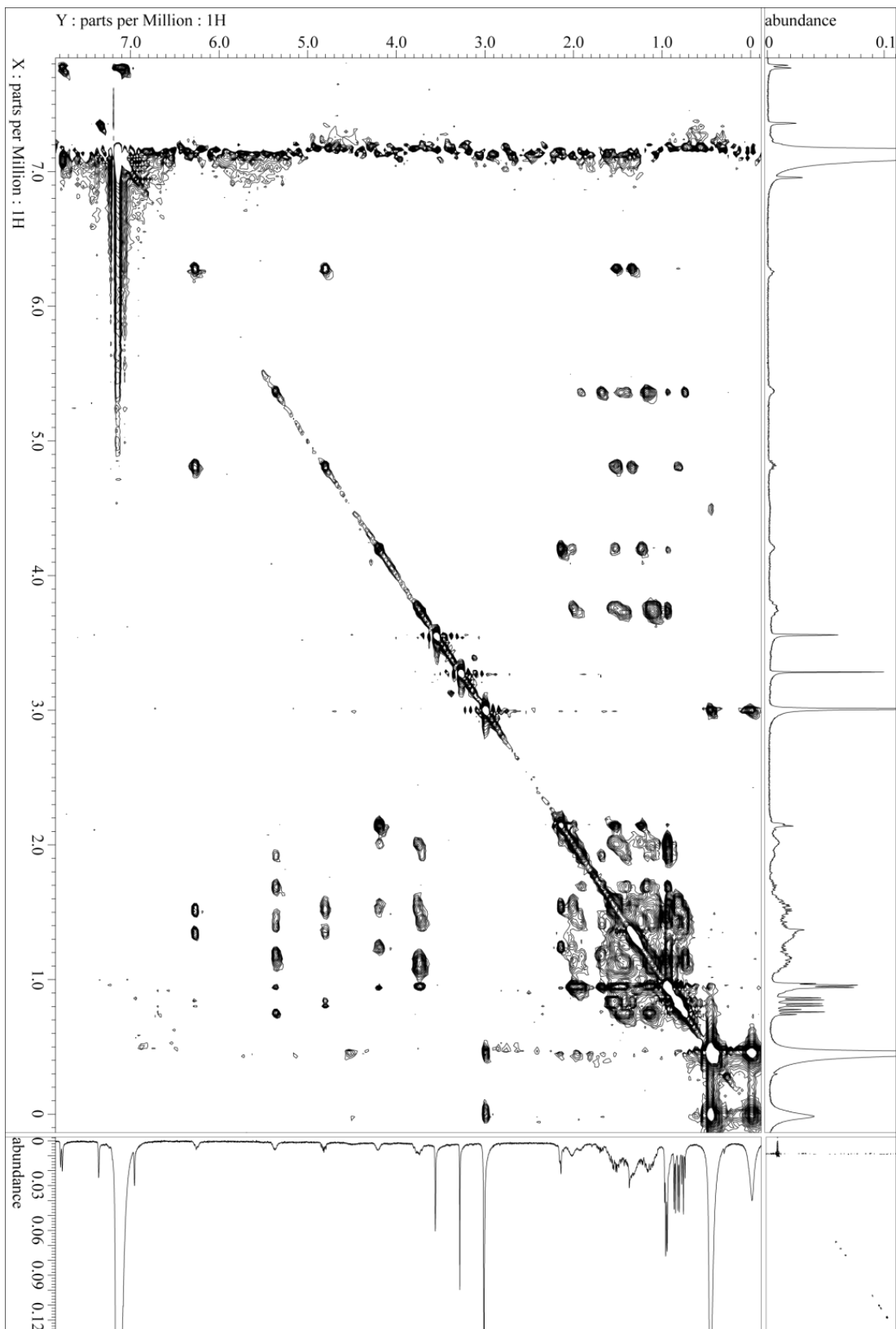
¹H NMR (400 MHz, C₆D₆) spectrum of **12b**



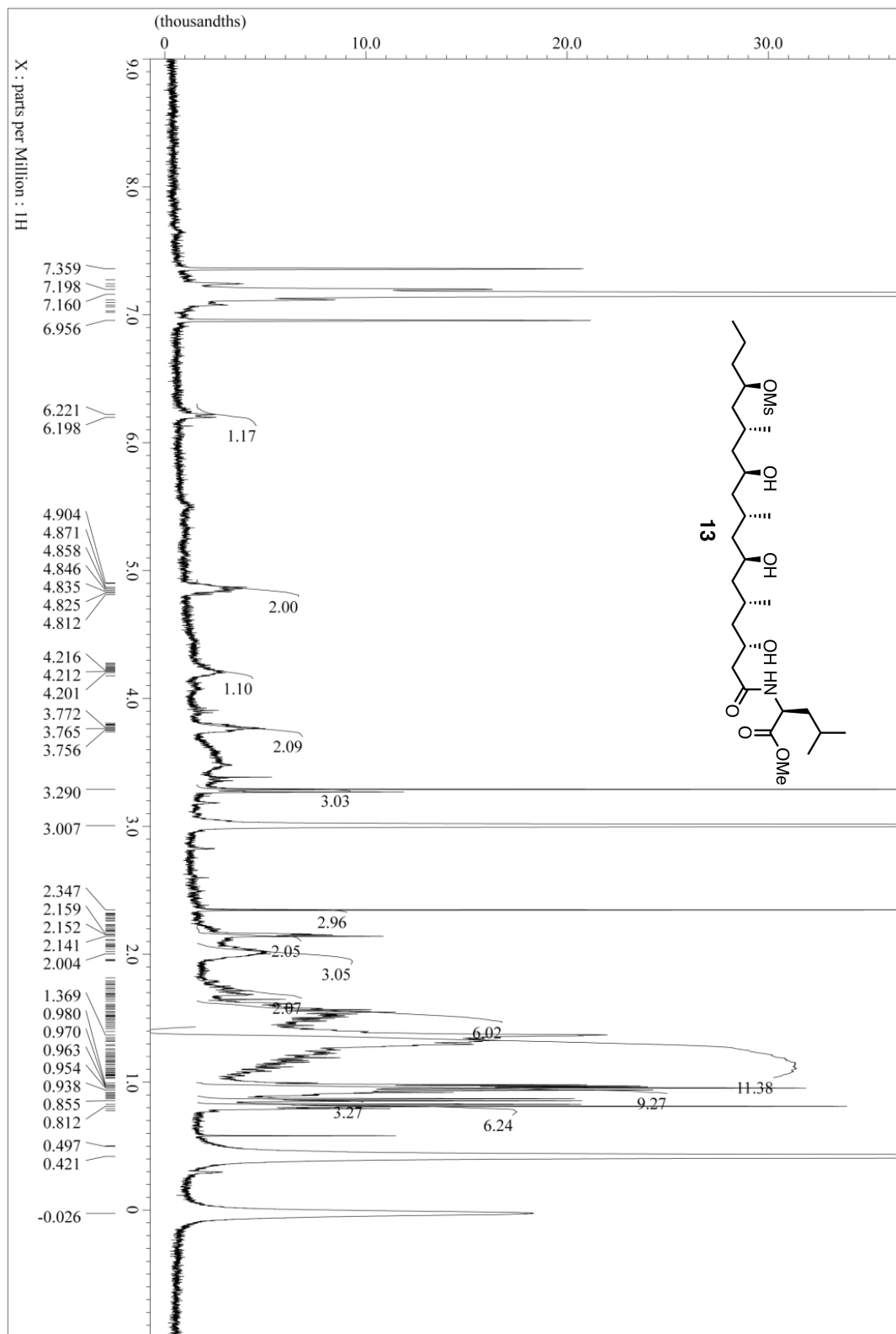
TOCSY (400 MHz, C₆D₆, mixing time = 10 ms) spectrum of **12b**



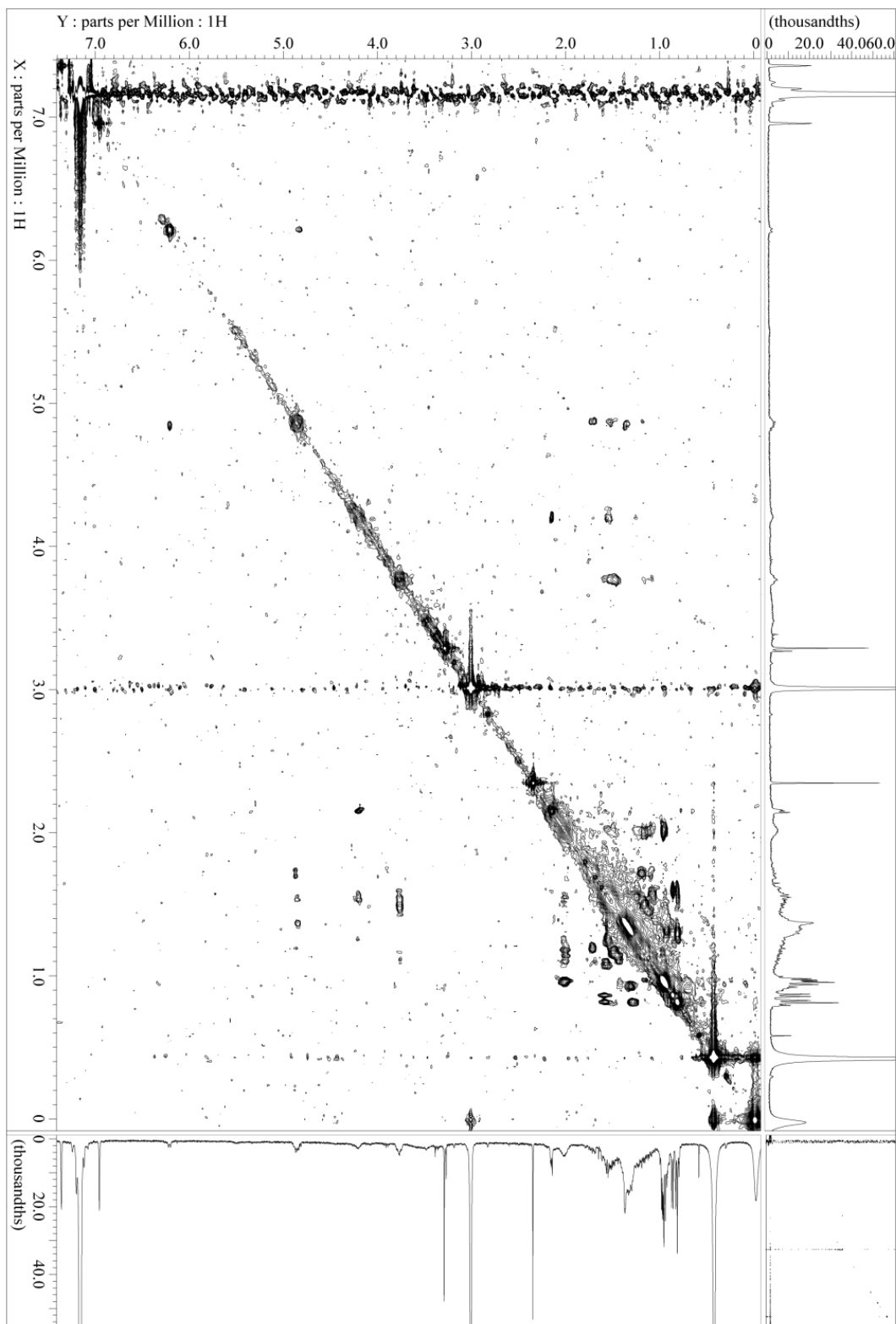
TOCSY (400 MHz, C₆D₆, mixing time = 50 ms) spectrum of **12b**



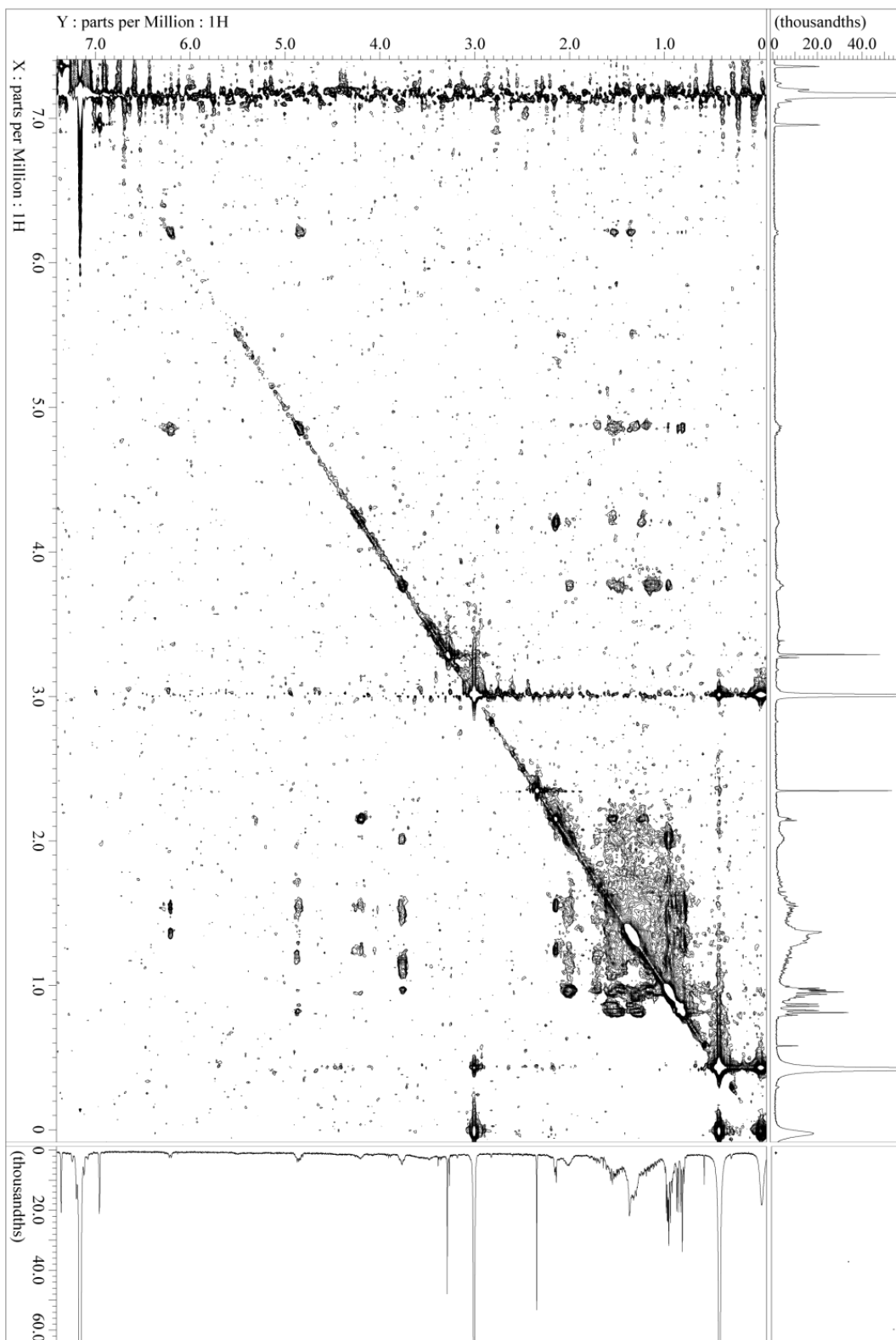
¹H NMR (400 MHz, C₆D₆) spectrum of **13**



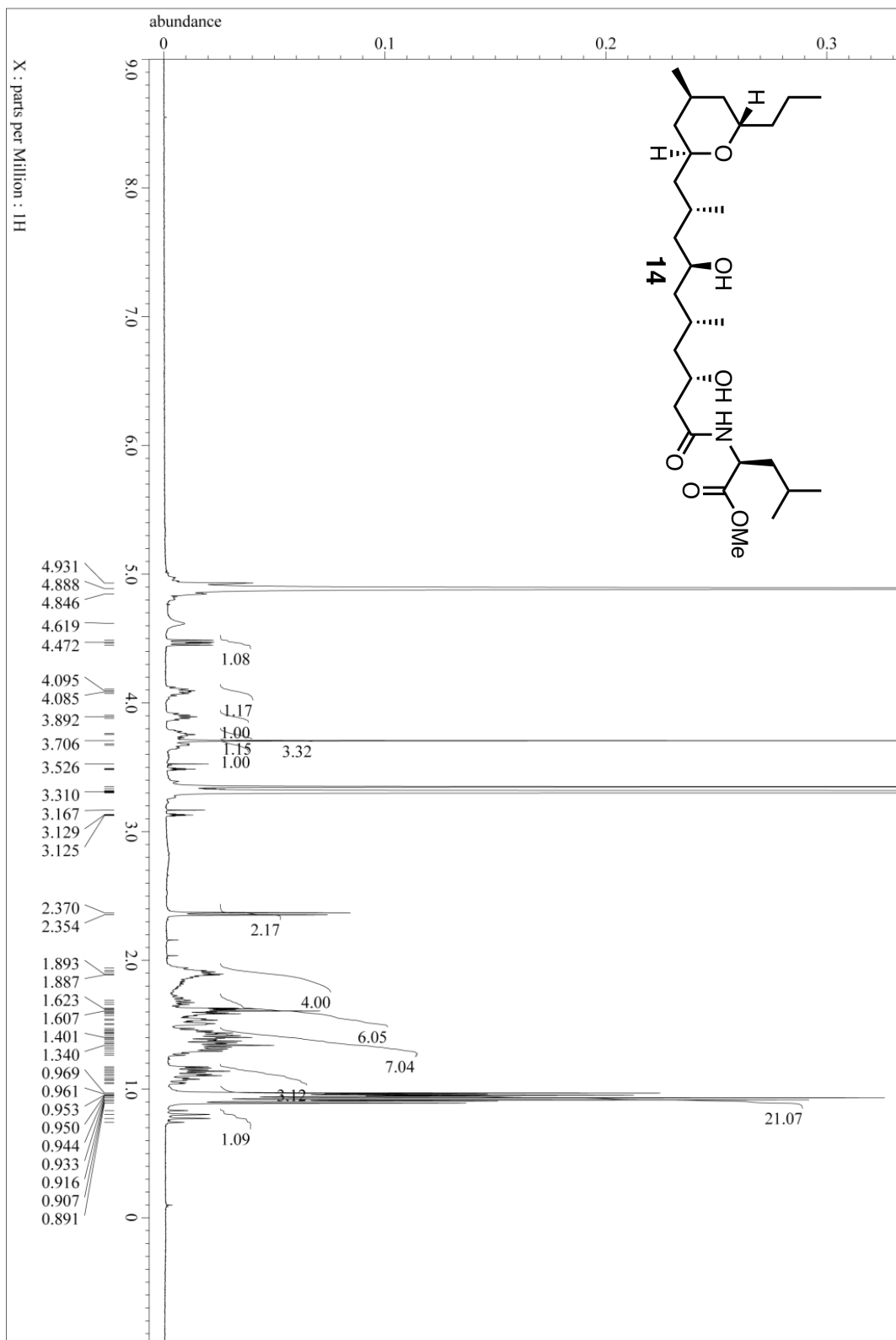
TOCSY (400 MHz, C₆D₆, mixing time = 10 ms) spectrum of **13**



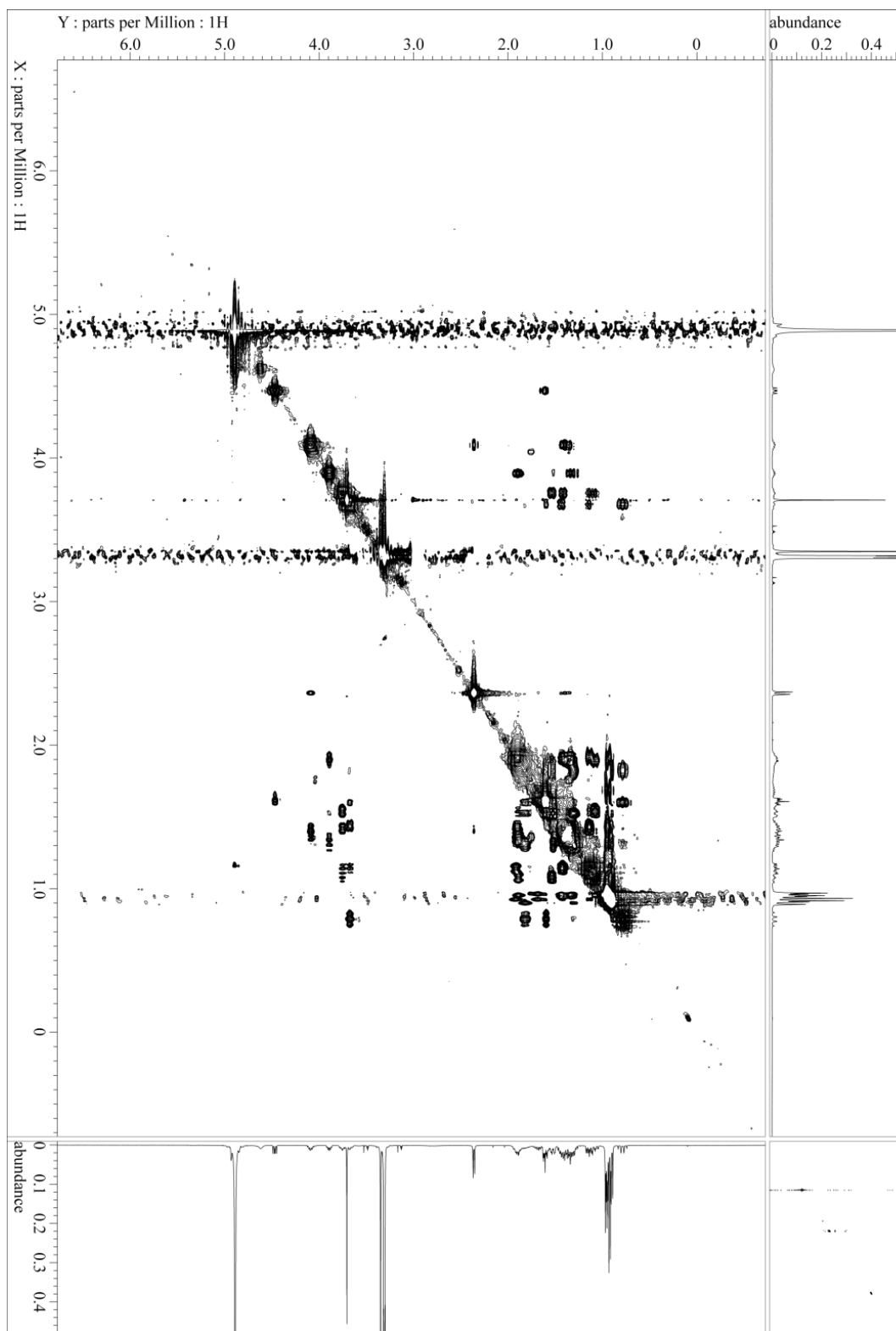
TOCSY (400 MHz, C_6D_6 , mixing time = 50 ms) spectrum of **13**



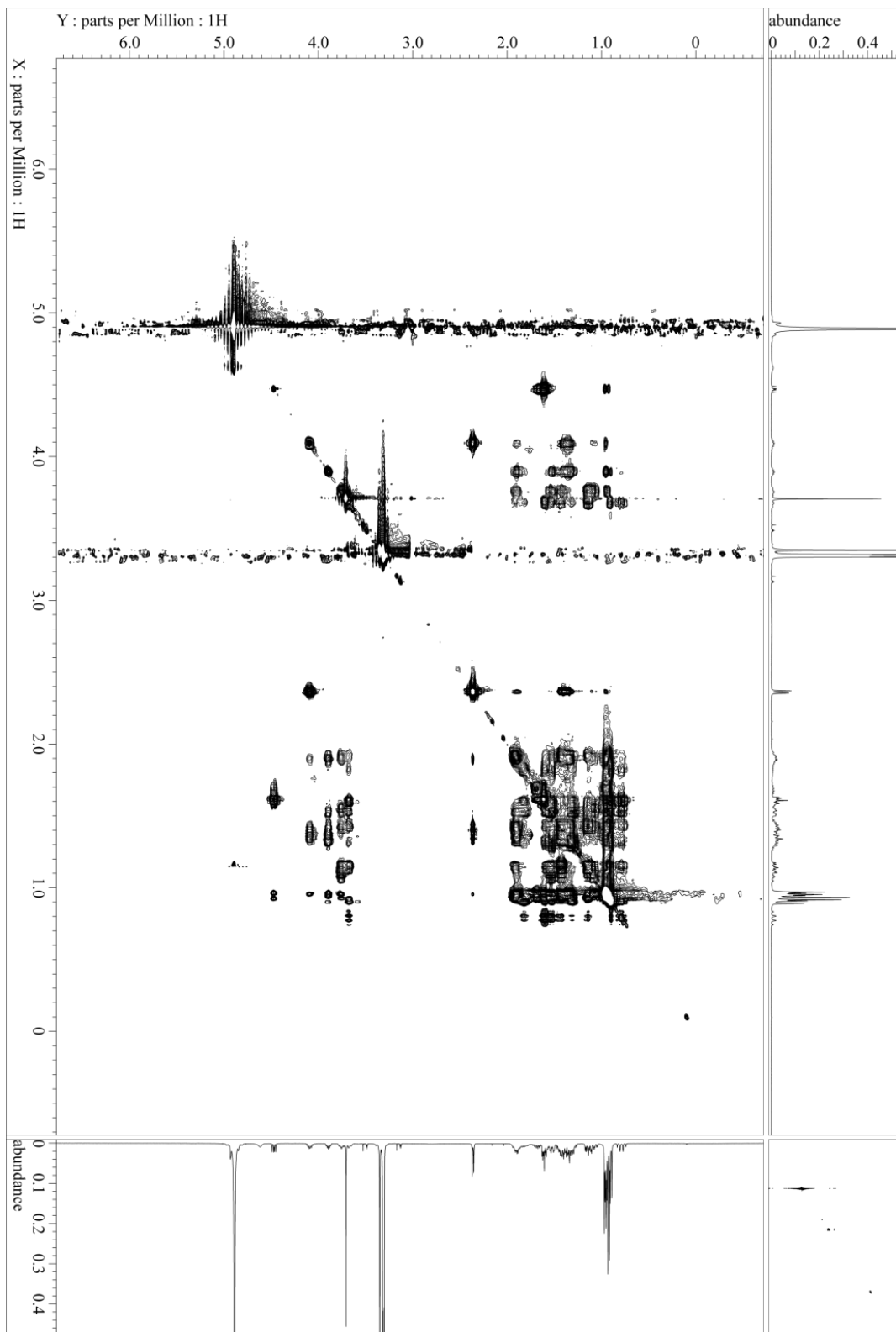
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) spectrum of **14**



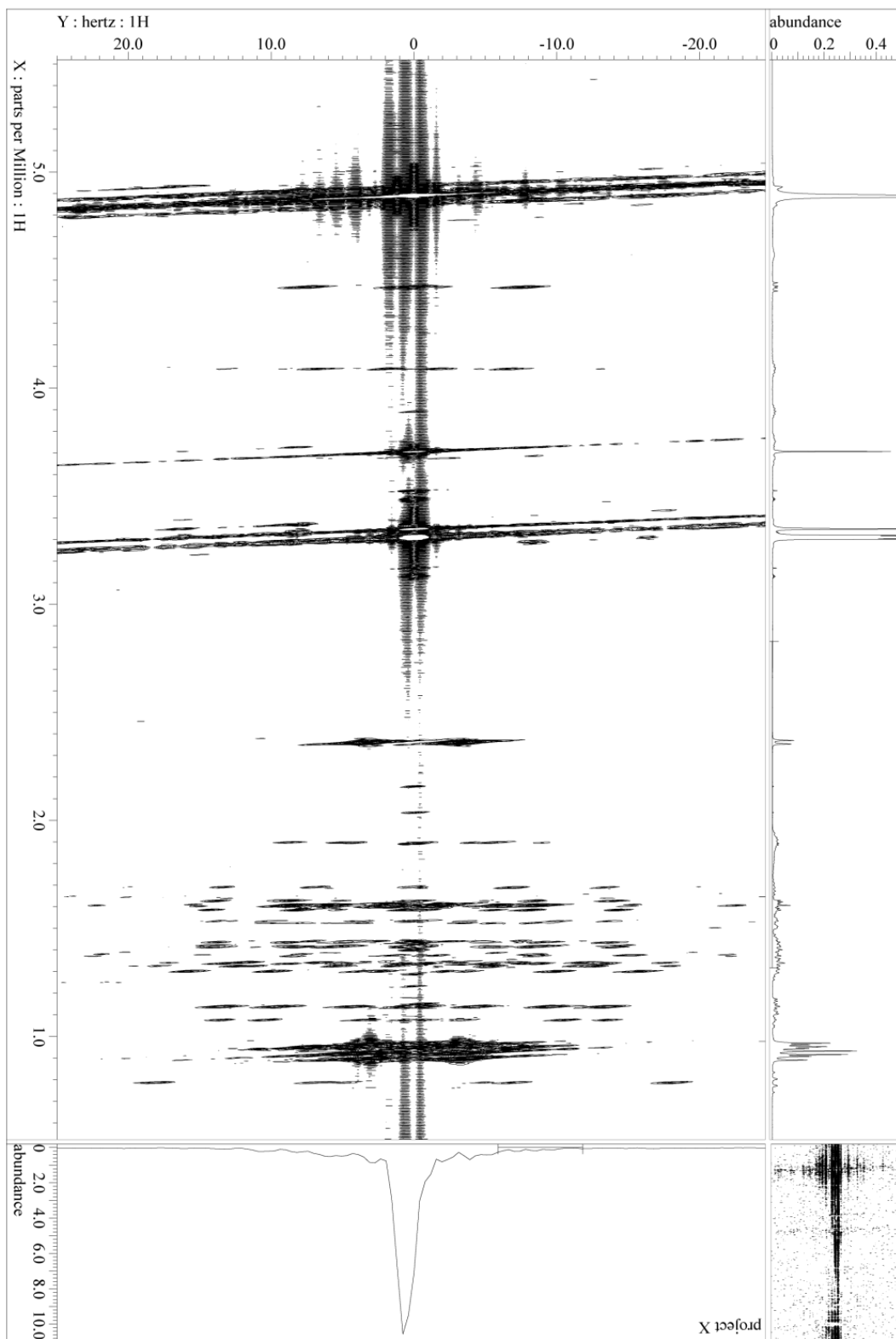
TOCSY (400 MHz, CD₃OD, mixing time = 10 ms) spectrum of **14**



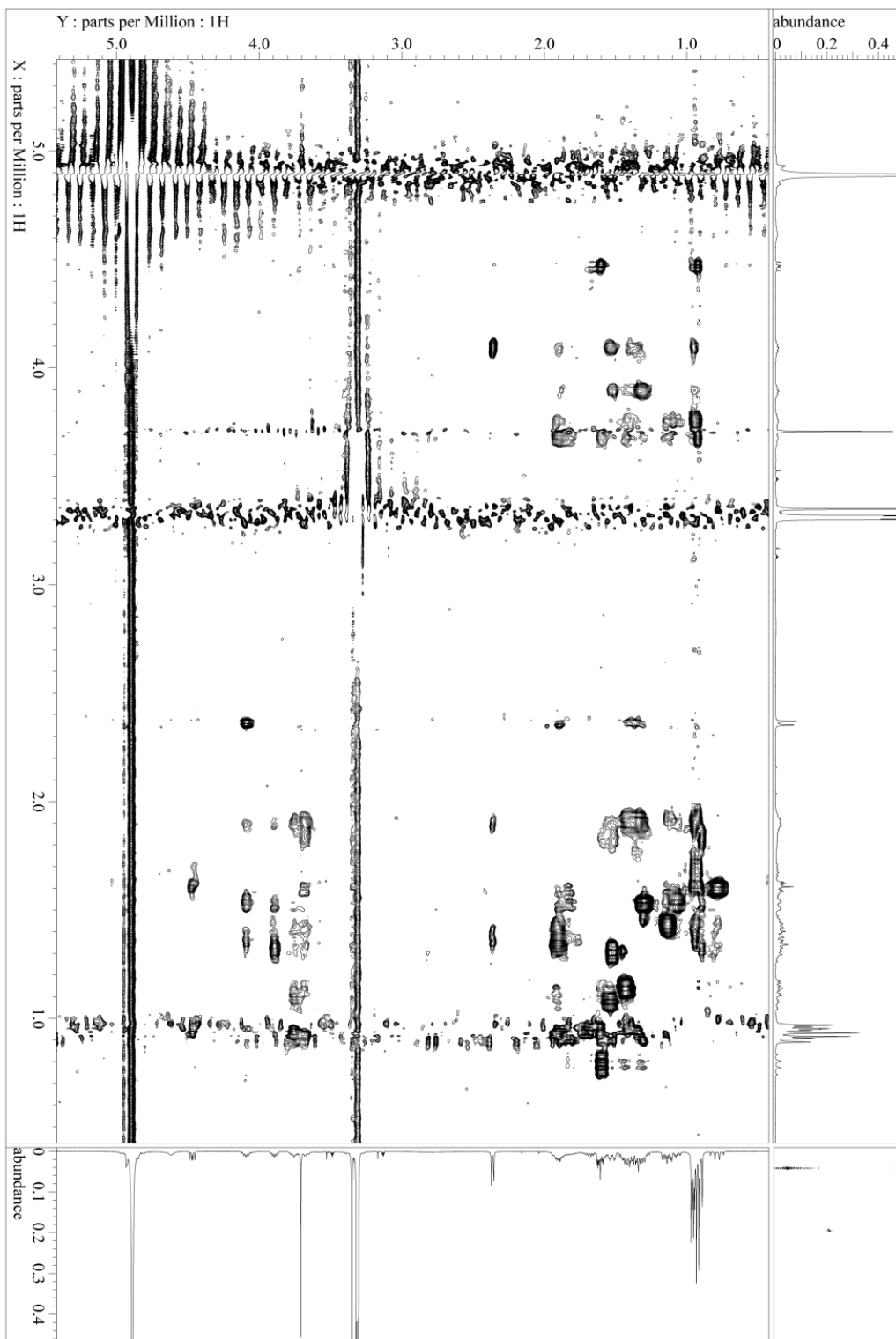
TOCSY (400 MHz, CD₃OD, mixing time = 50 ms) spectrum of 14



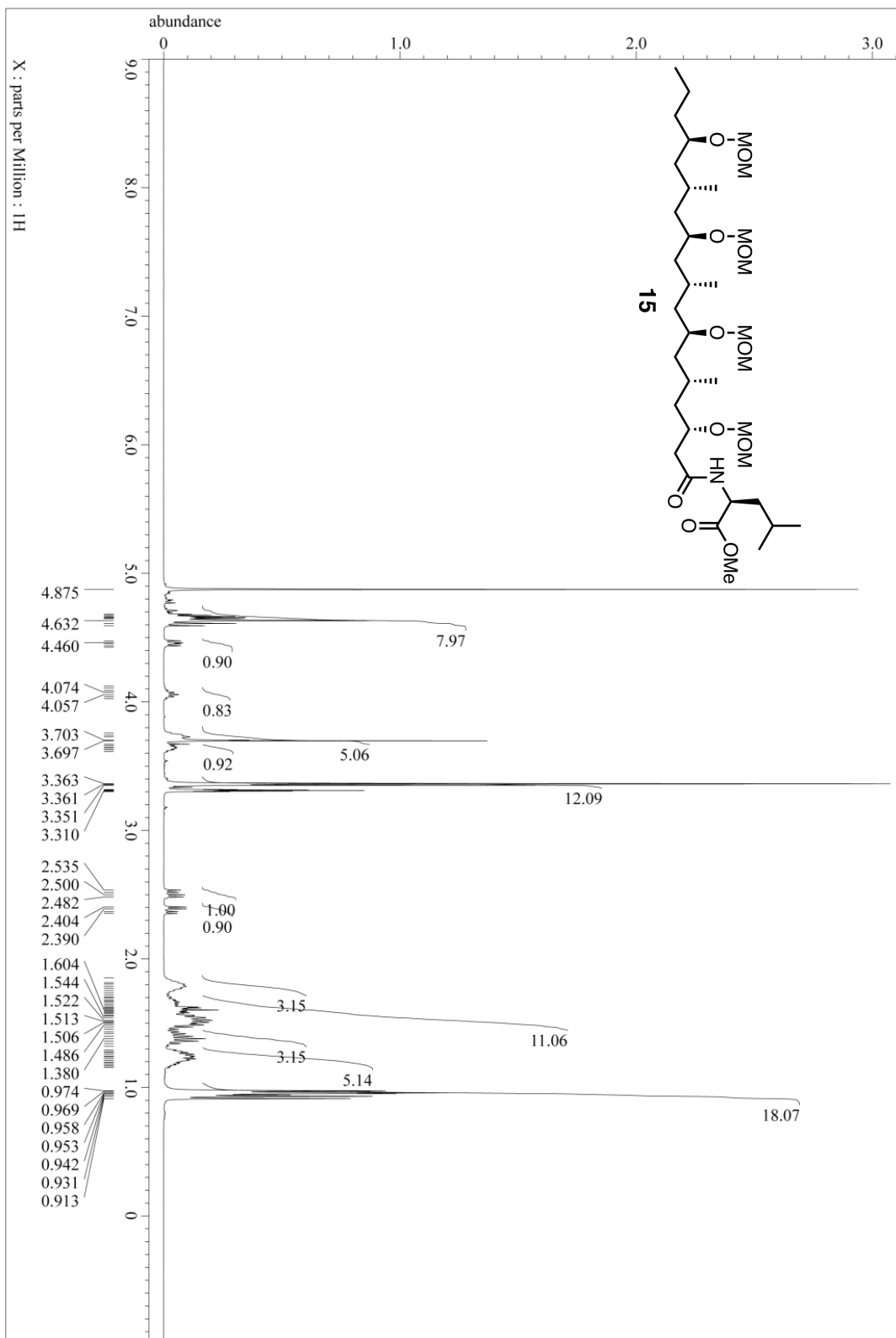
J-resolved (400 MHz, CD₃OD) spectrum of 14



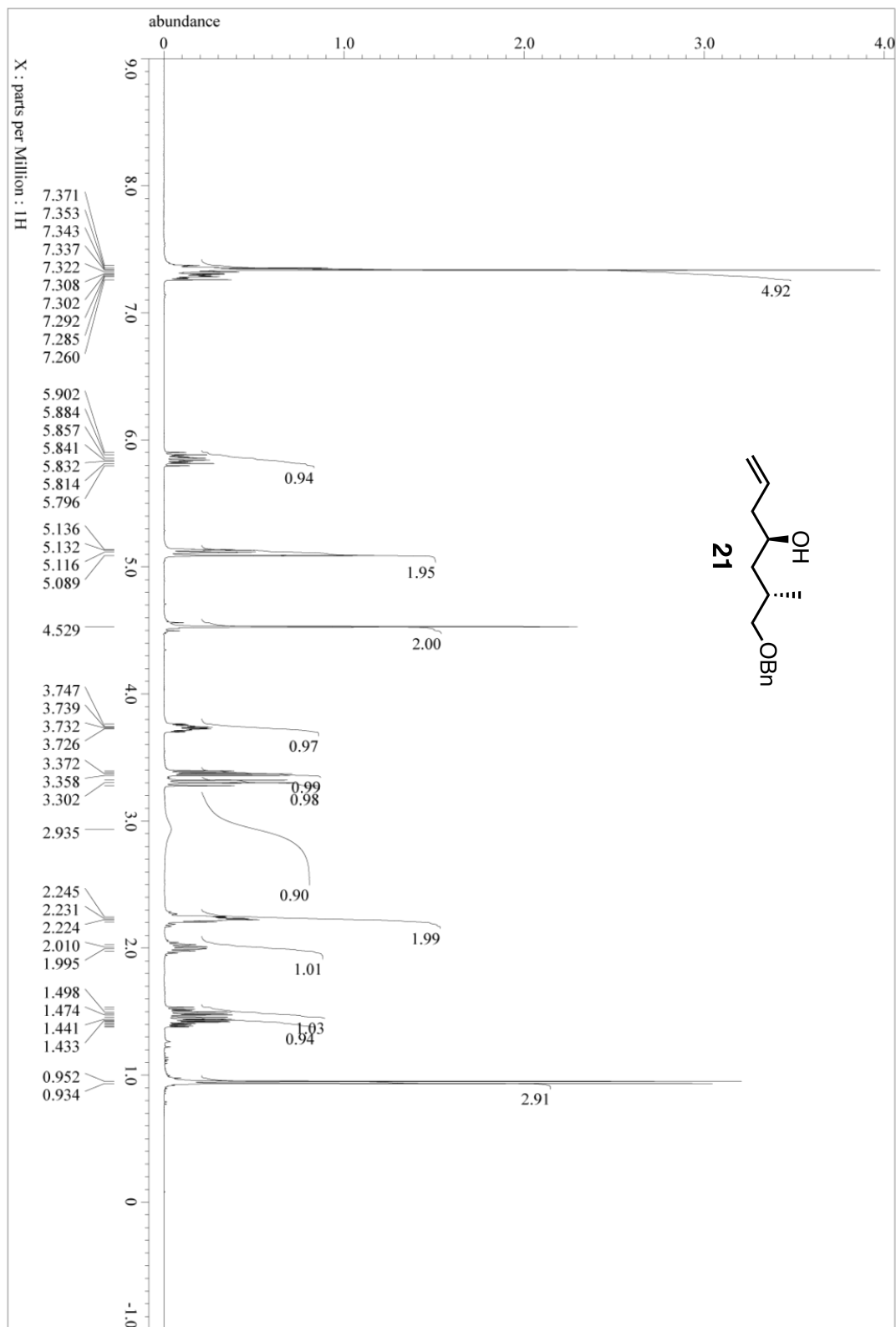
NOESY (400 MHz, CD₃OD) spectrum of 14



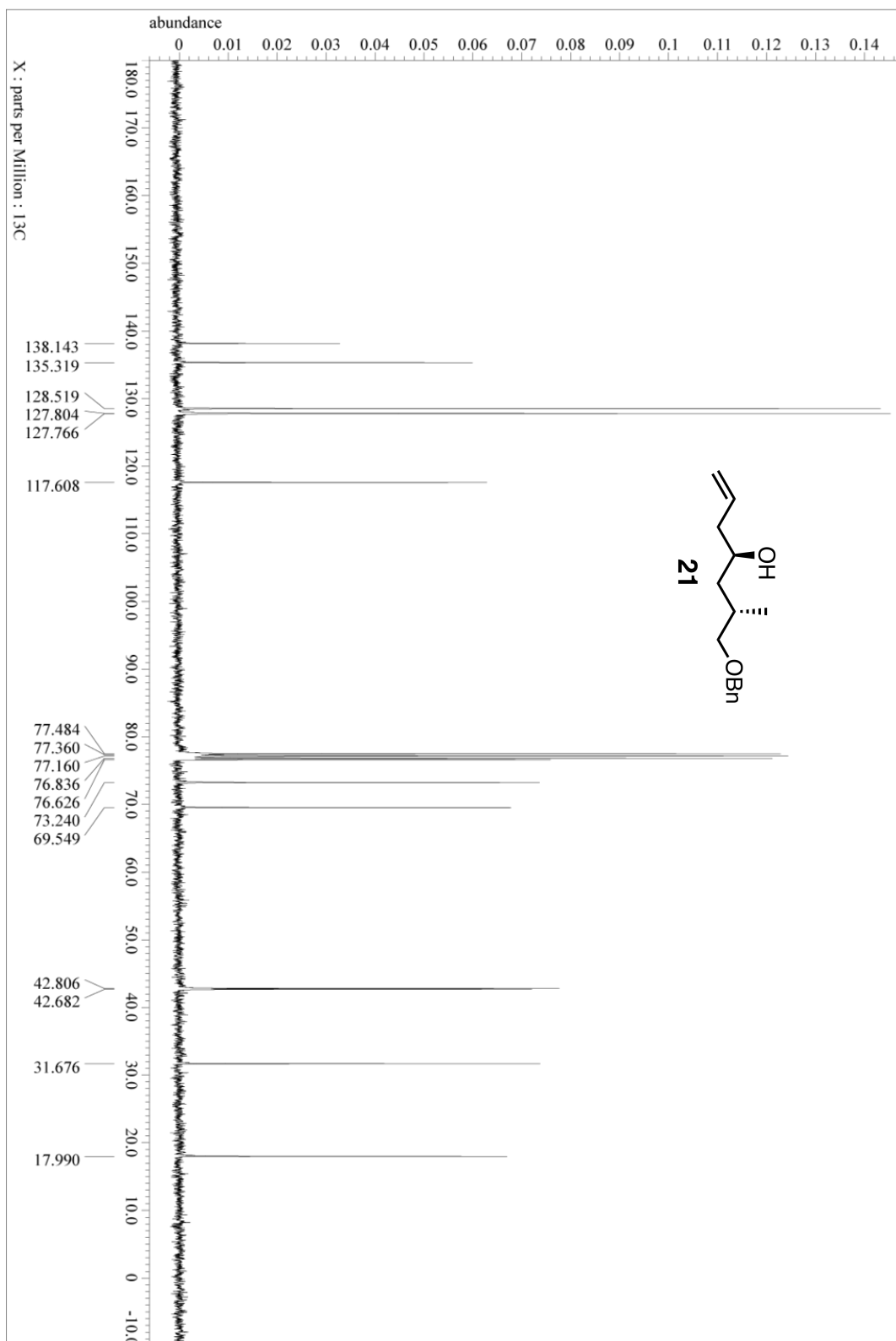
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) spectrum of **15**



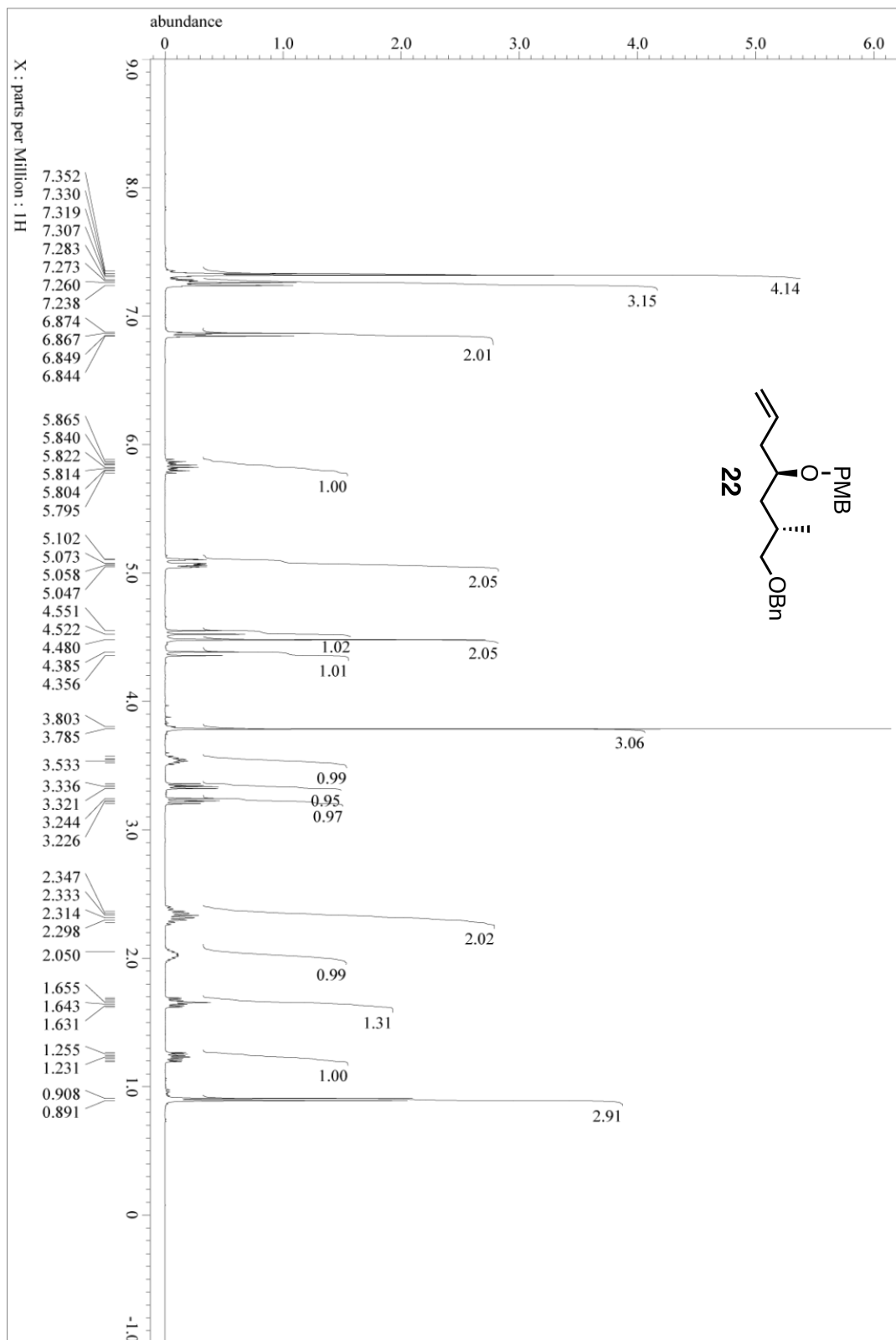
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **21**



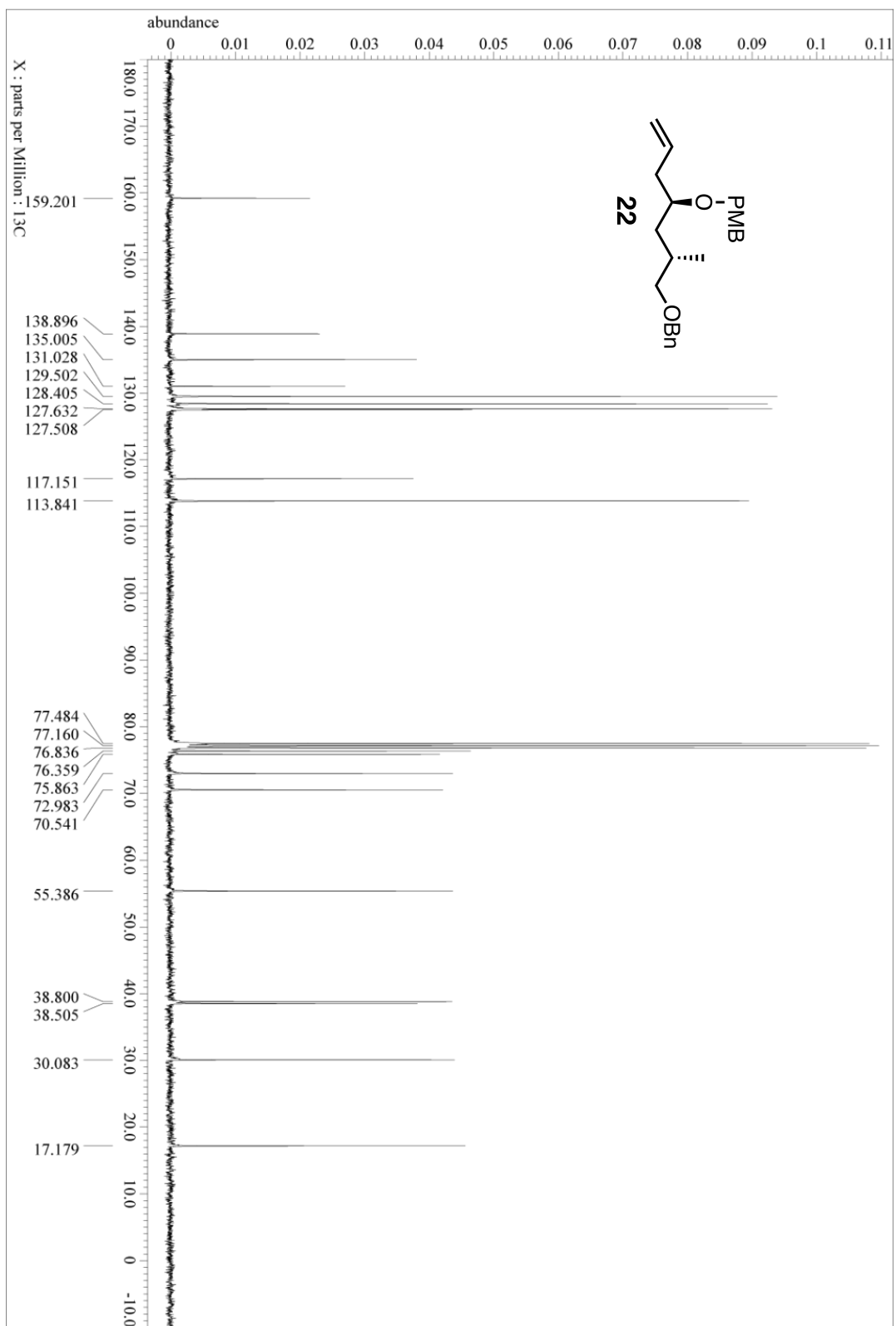
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum of **21**



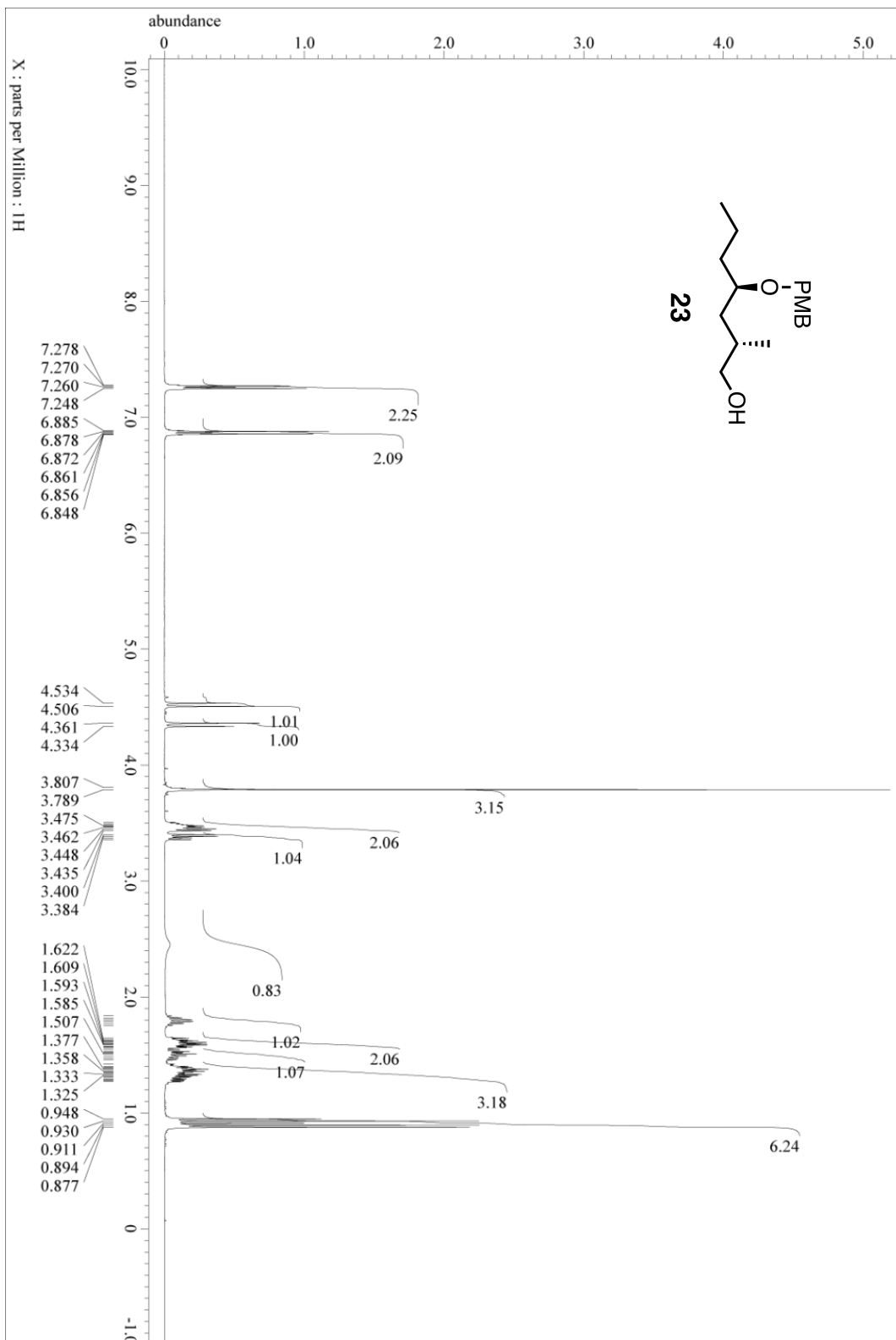
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **22**



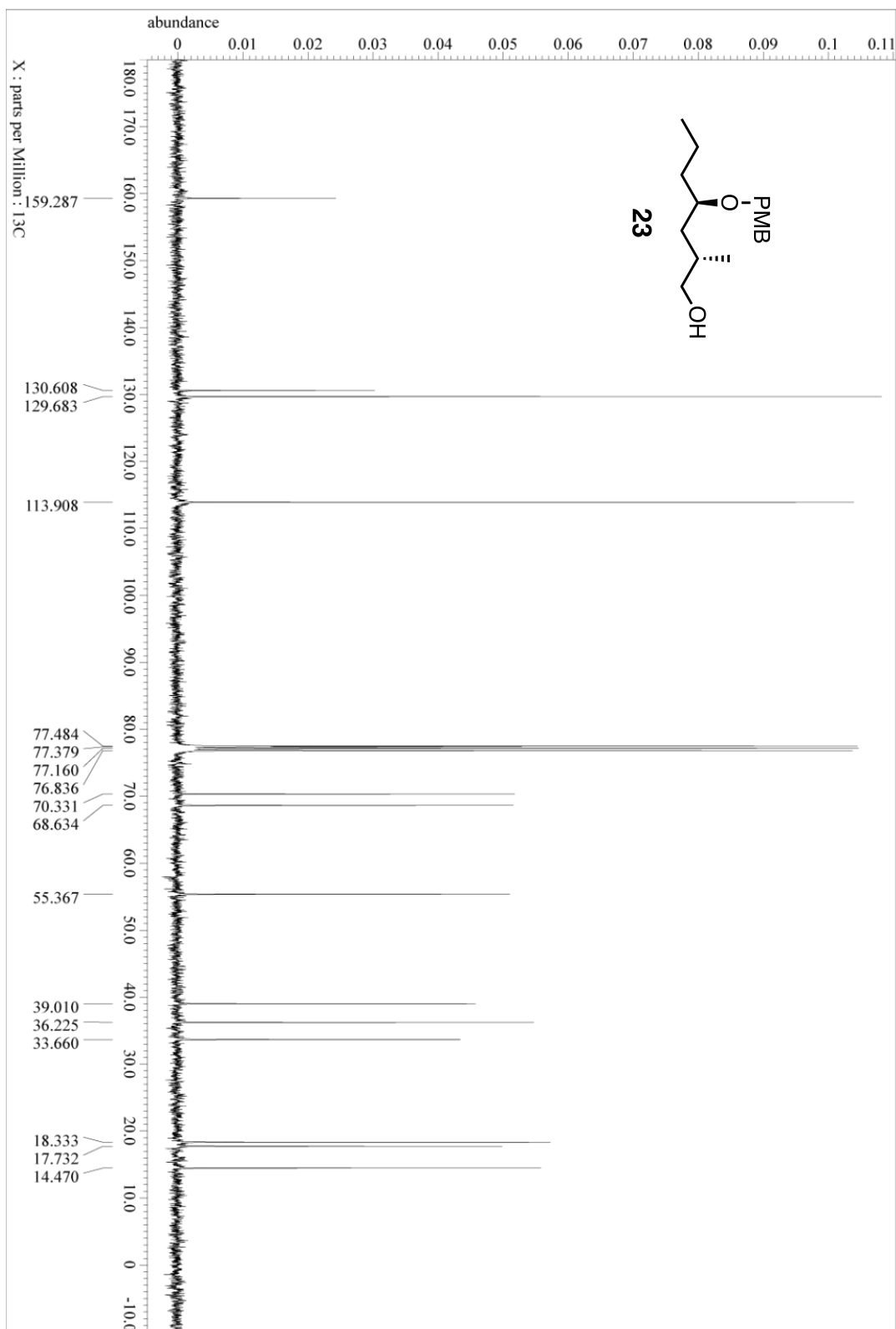
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum of **22**



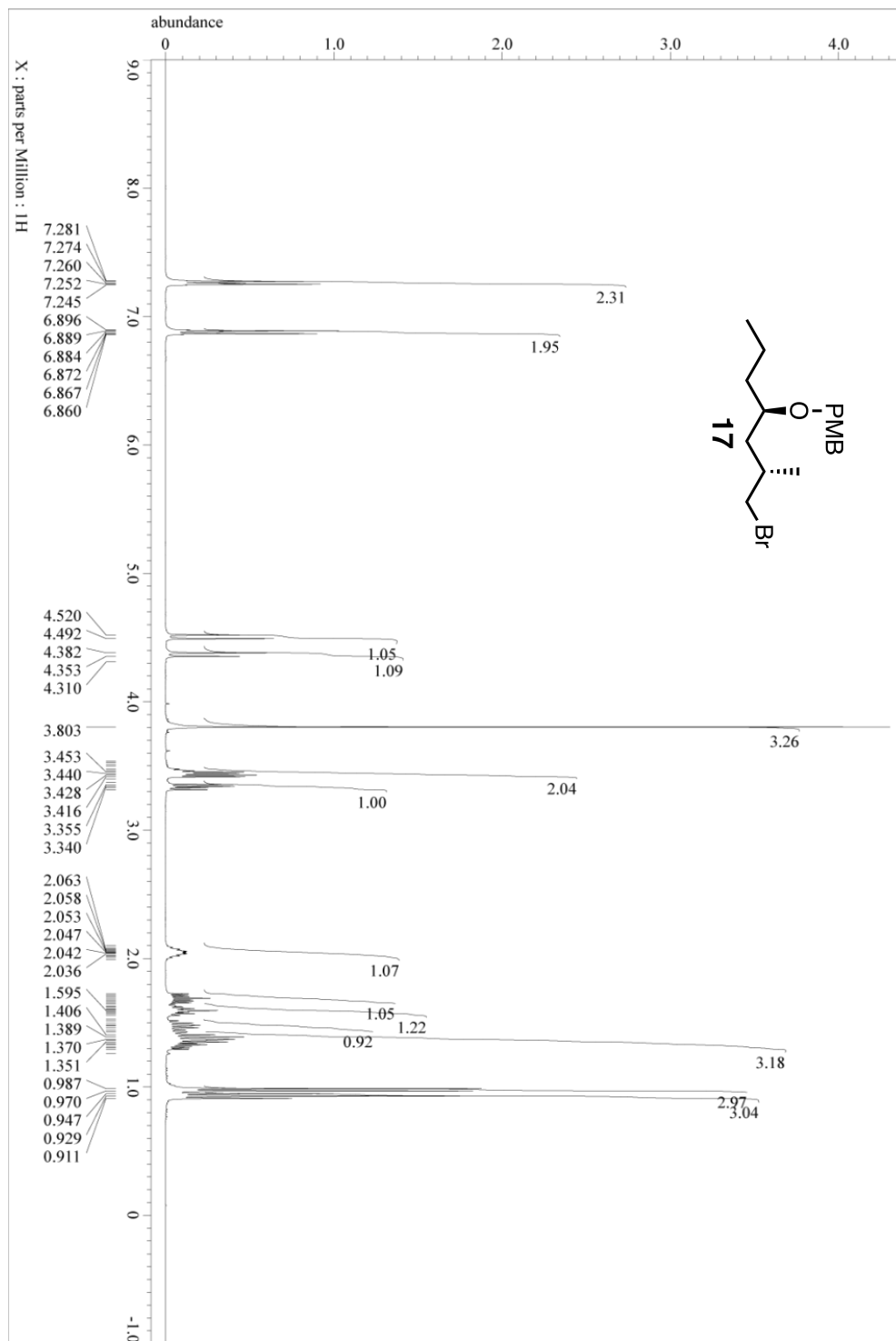
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **23**



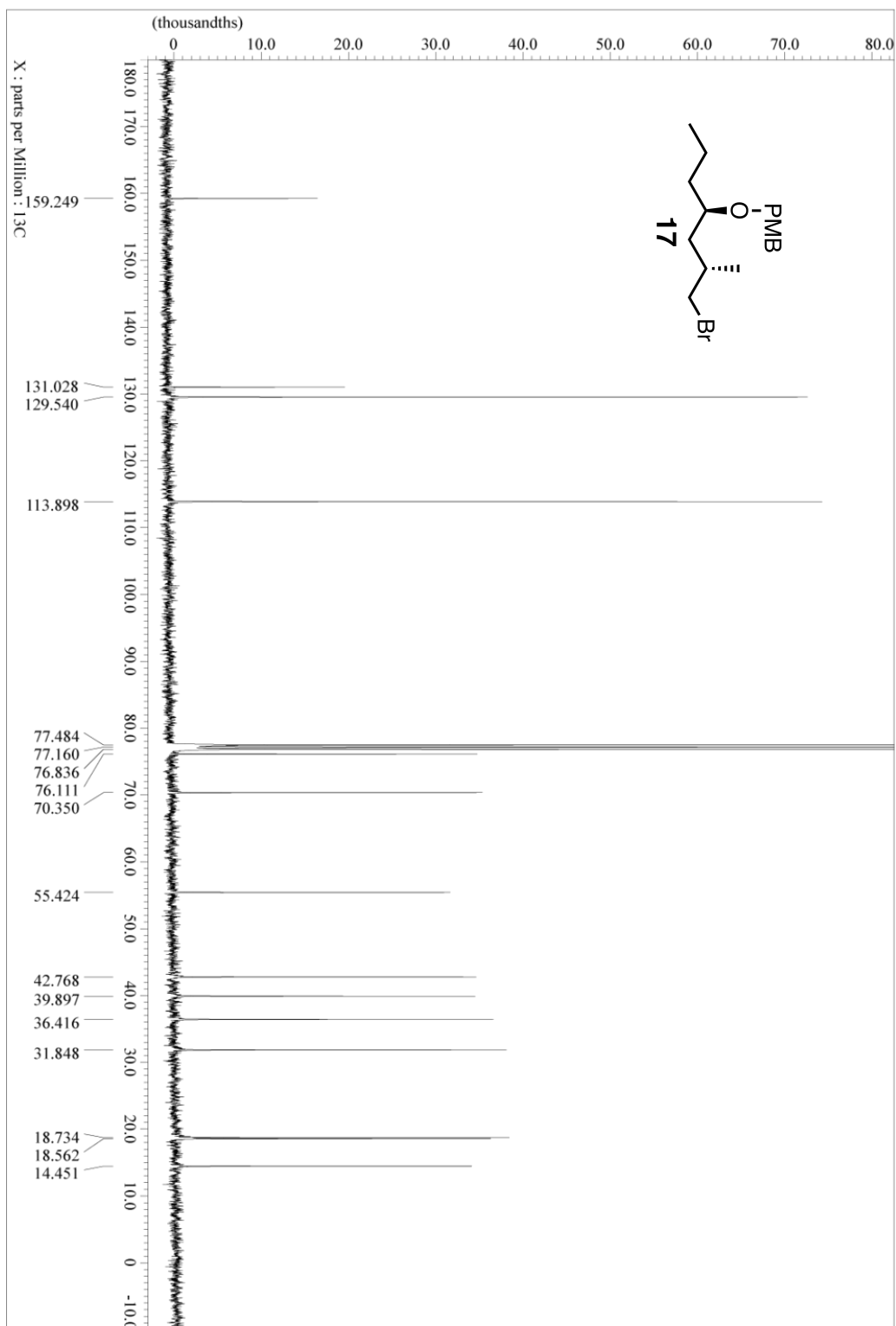
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum of **23**



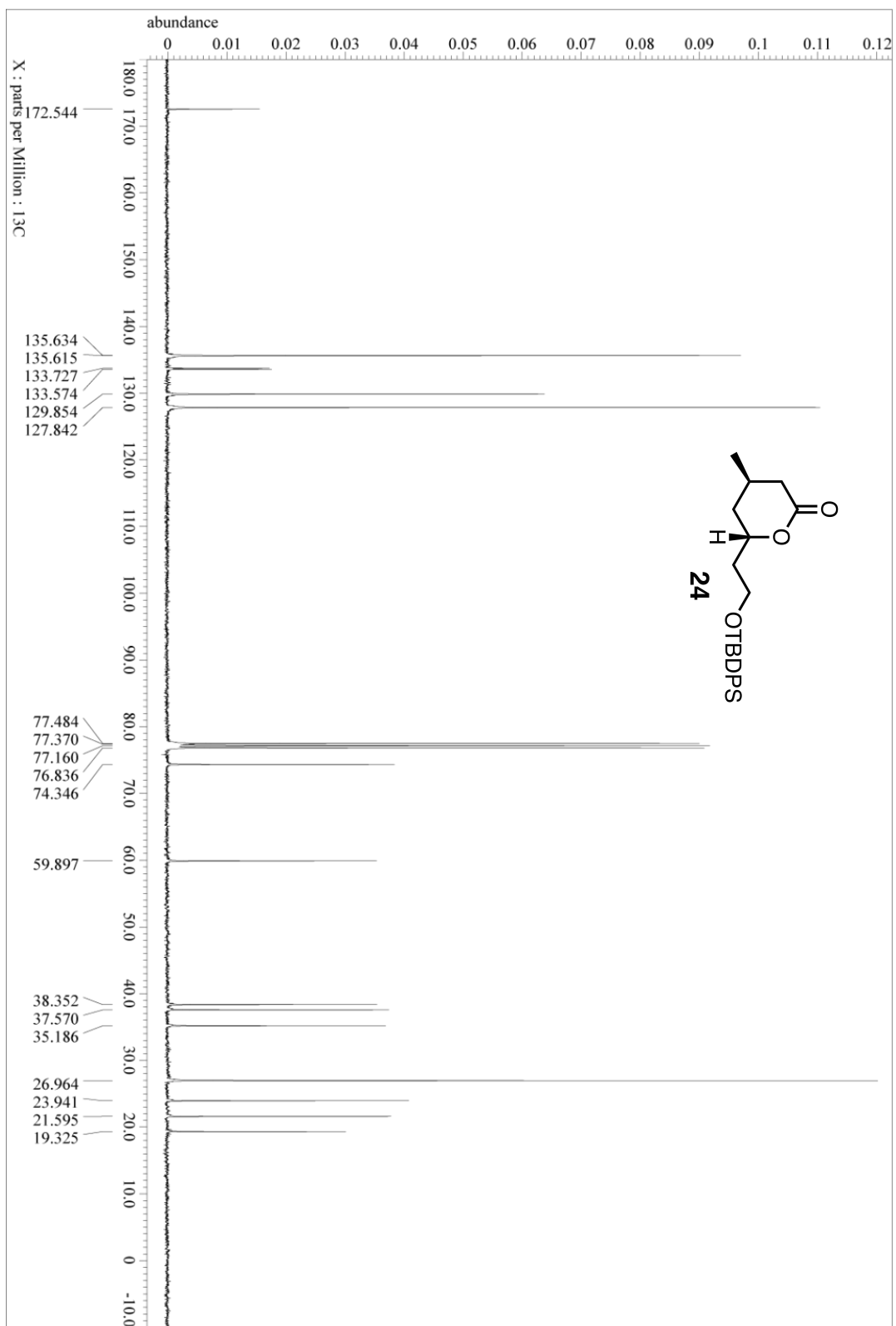
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of 17



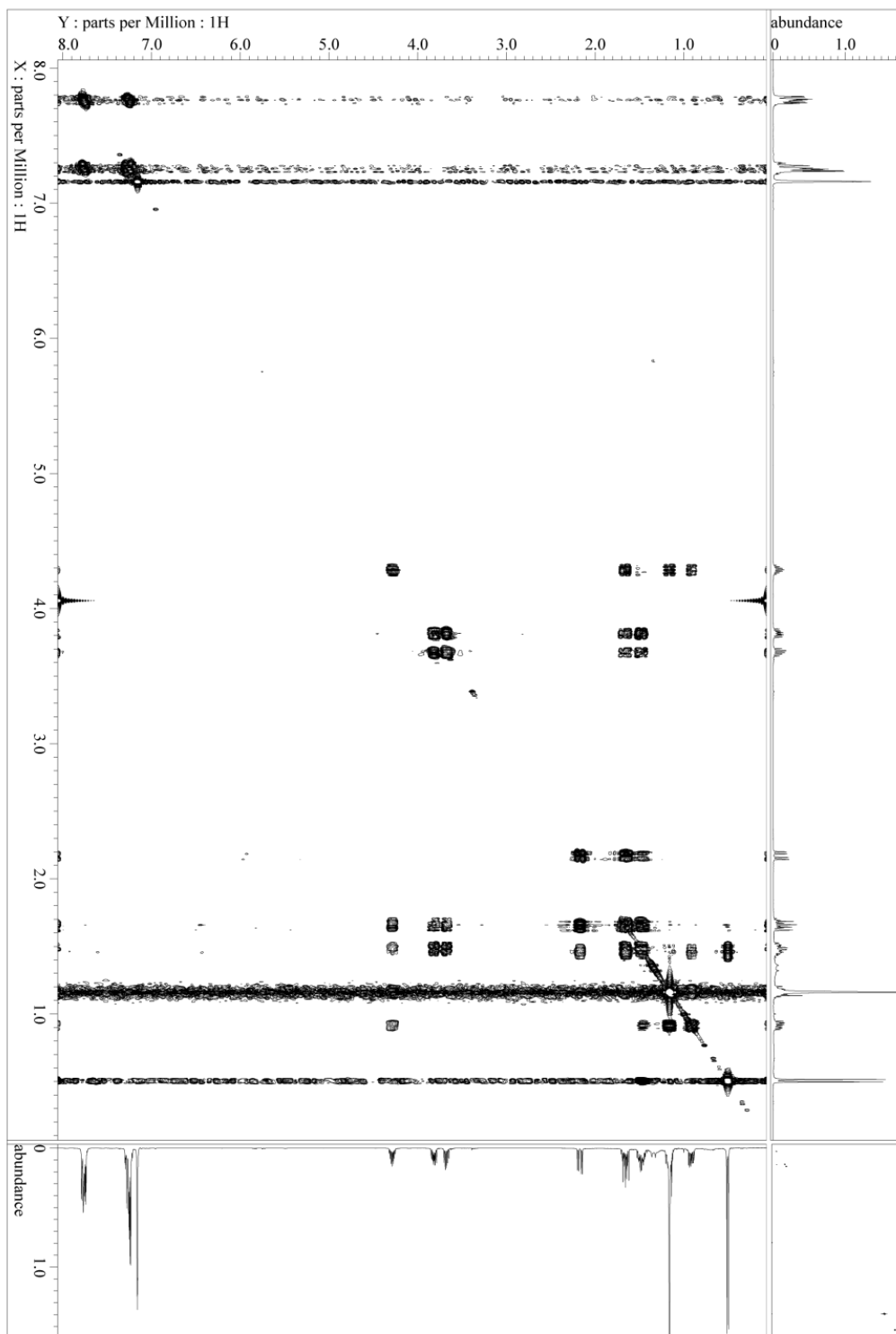
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum of **17**



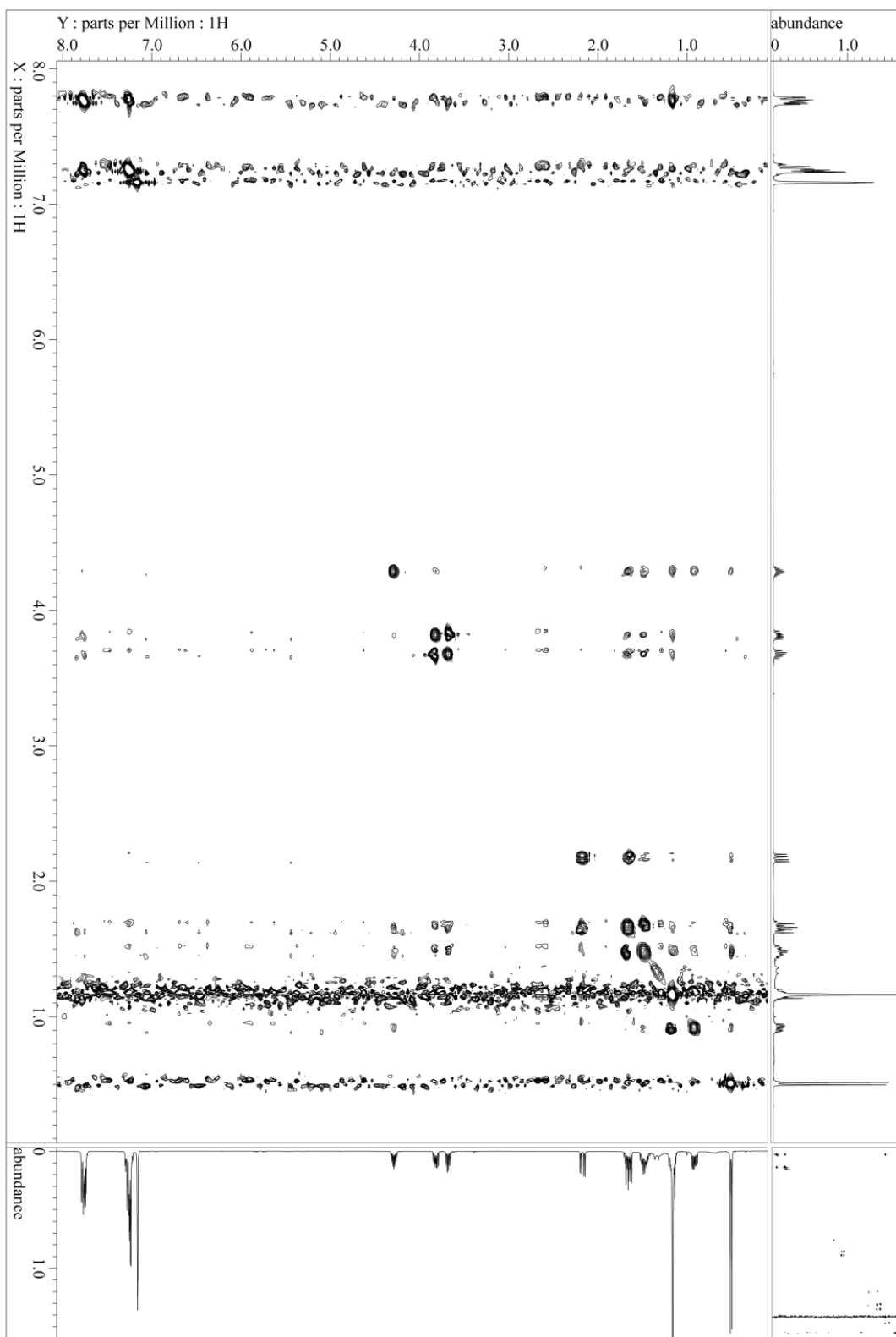
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum of **24**

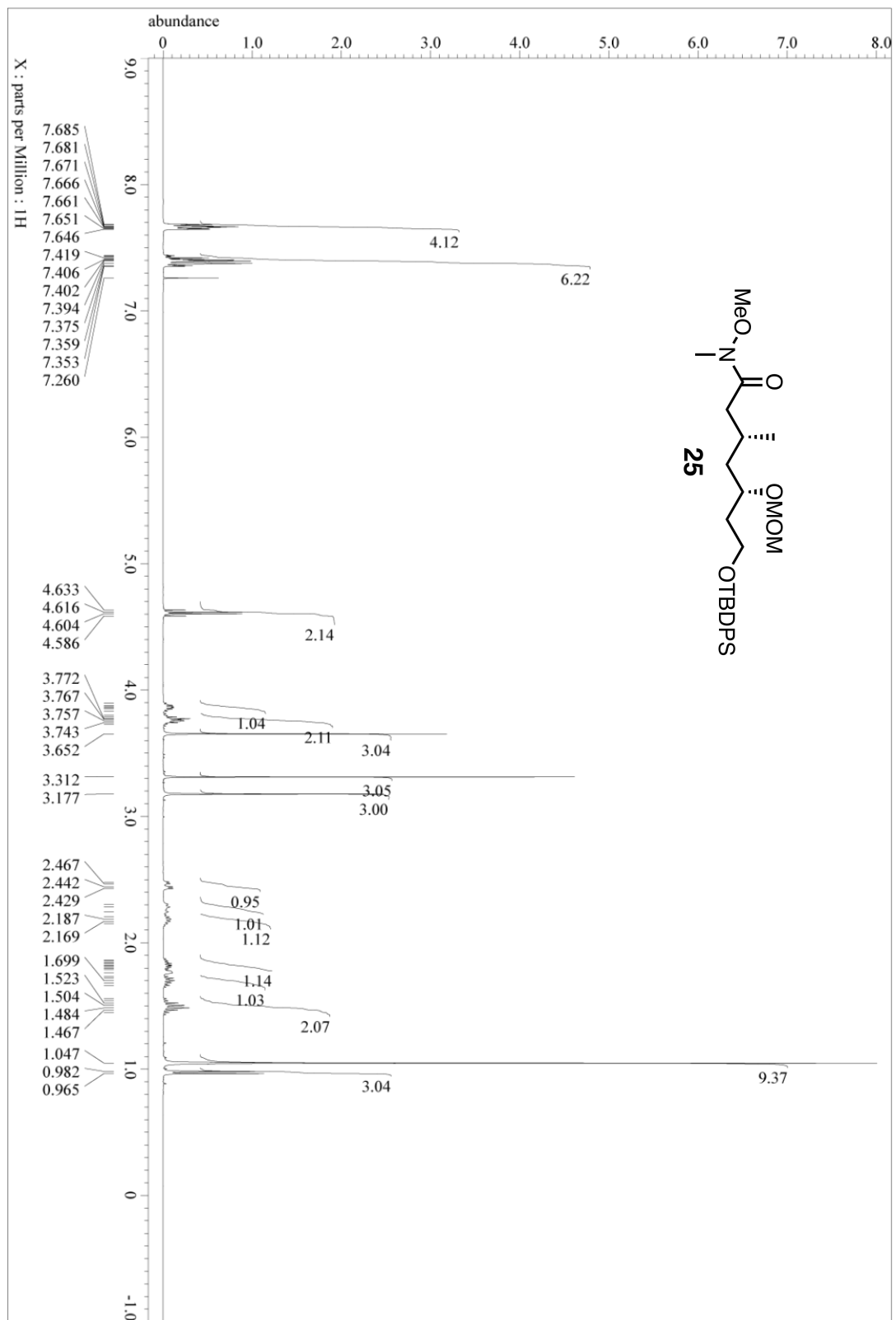


COSY (400 MHz, C₆D₆) spectrum of **24**

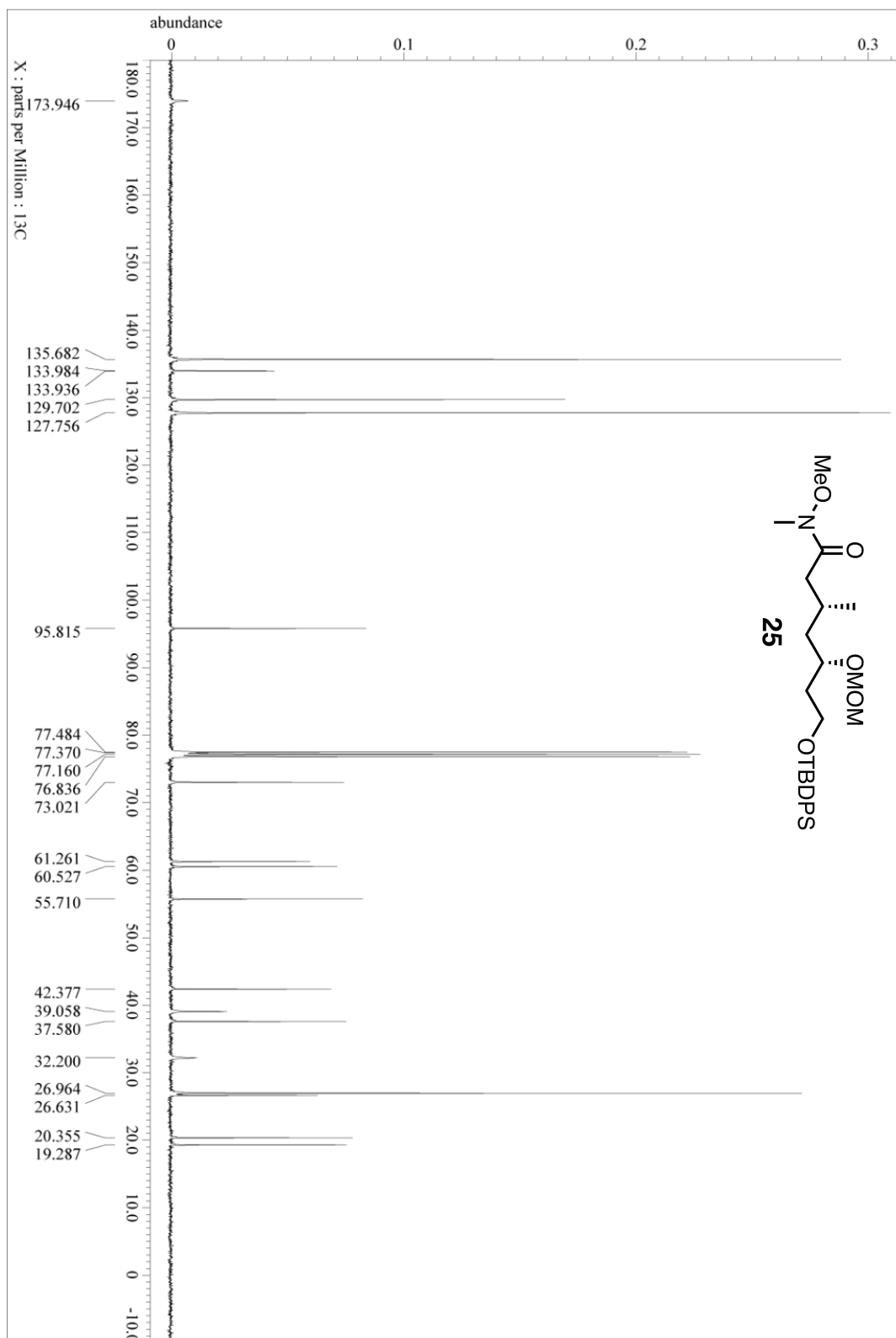


NOESY (400 MHz, C₆D₆) spectrum of **24**

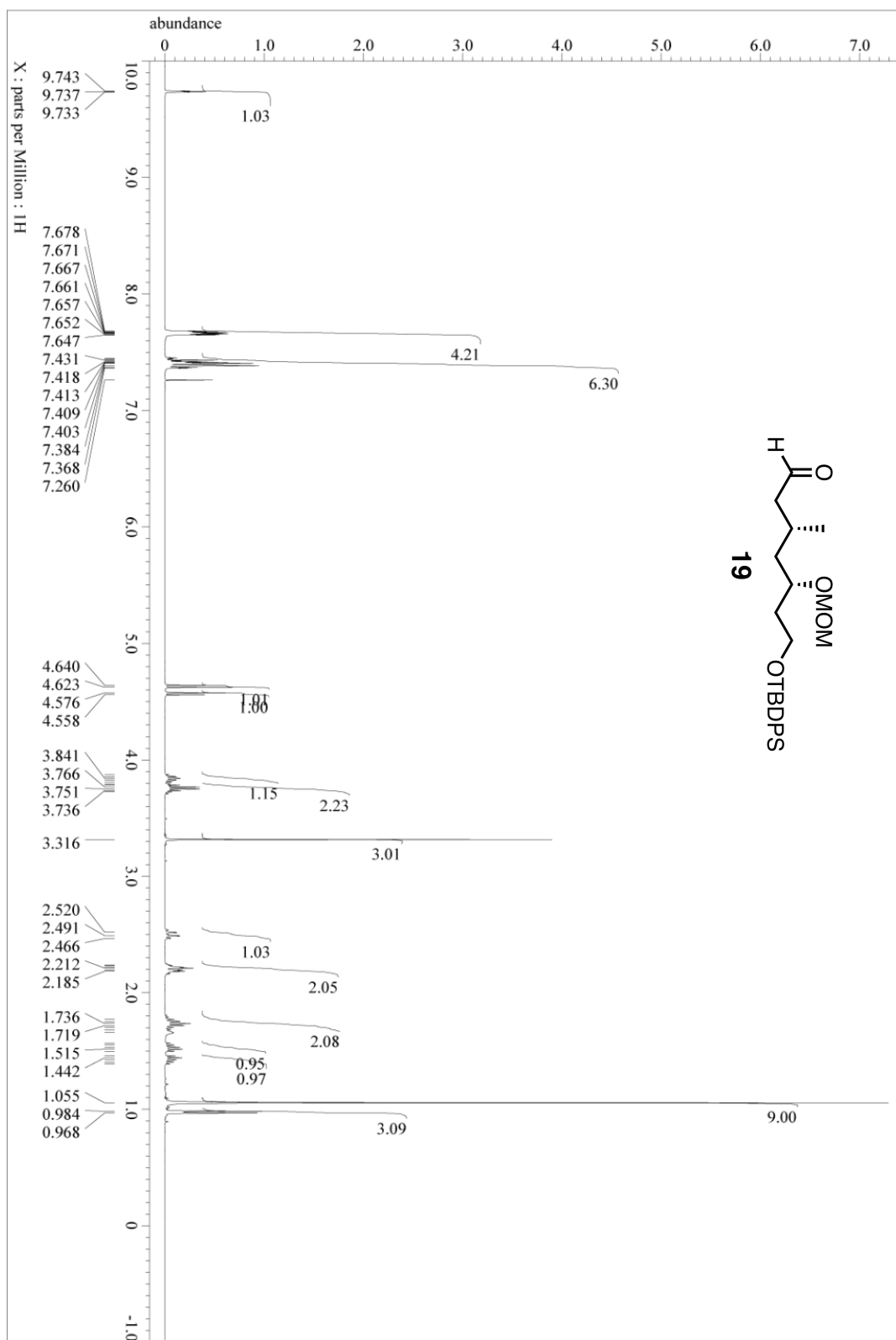




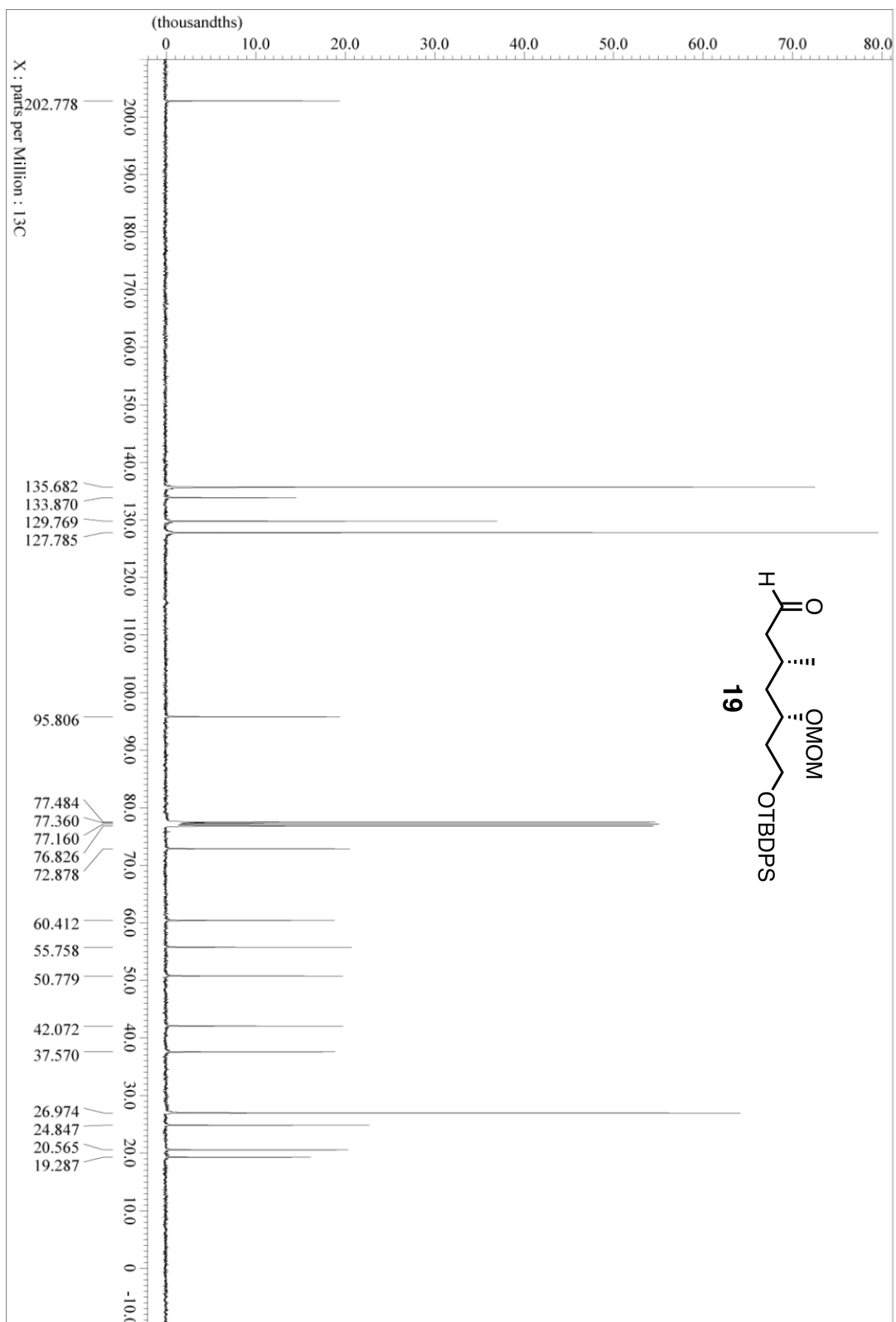
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum of **25**



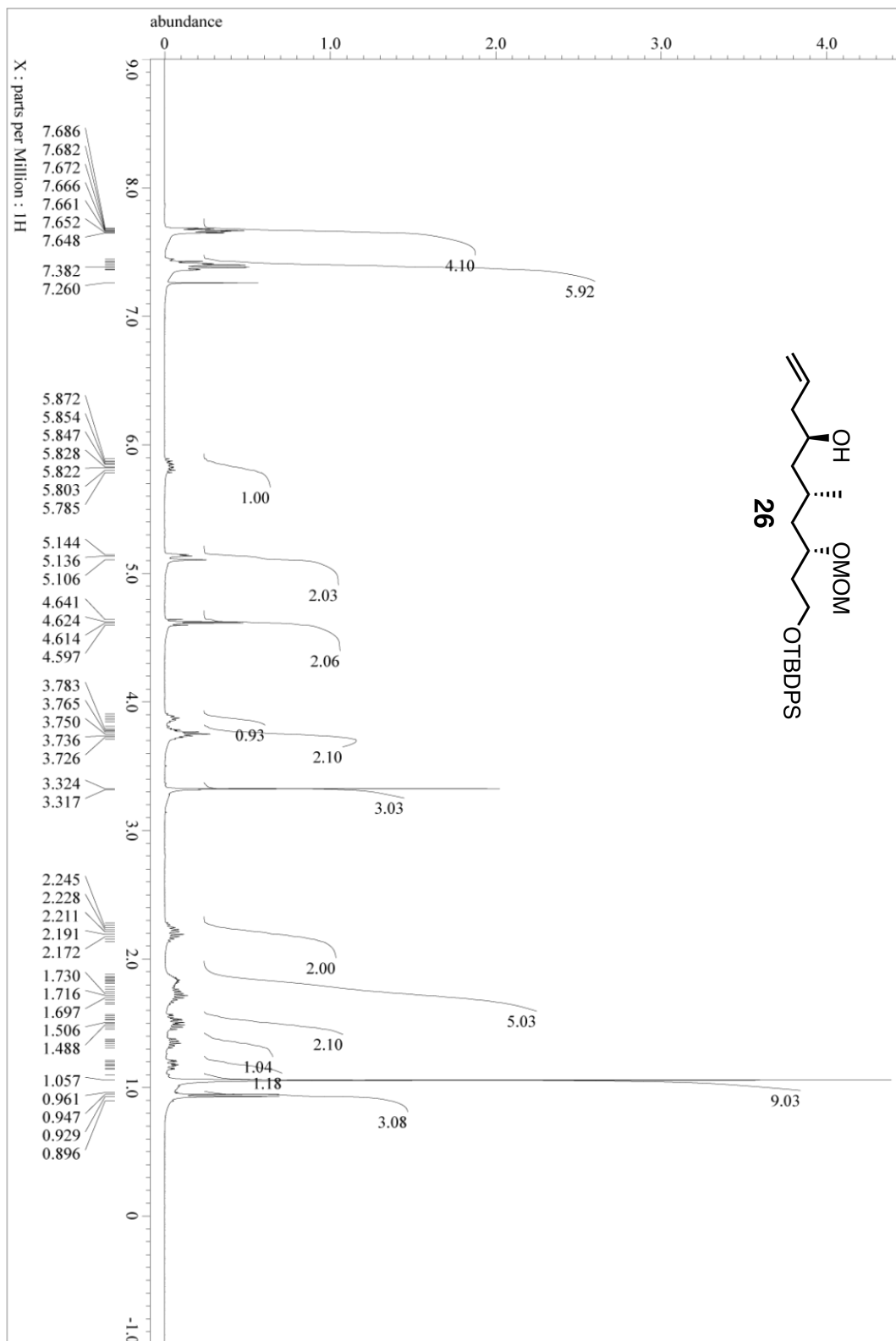
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **19**



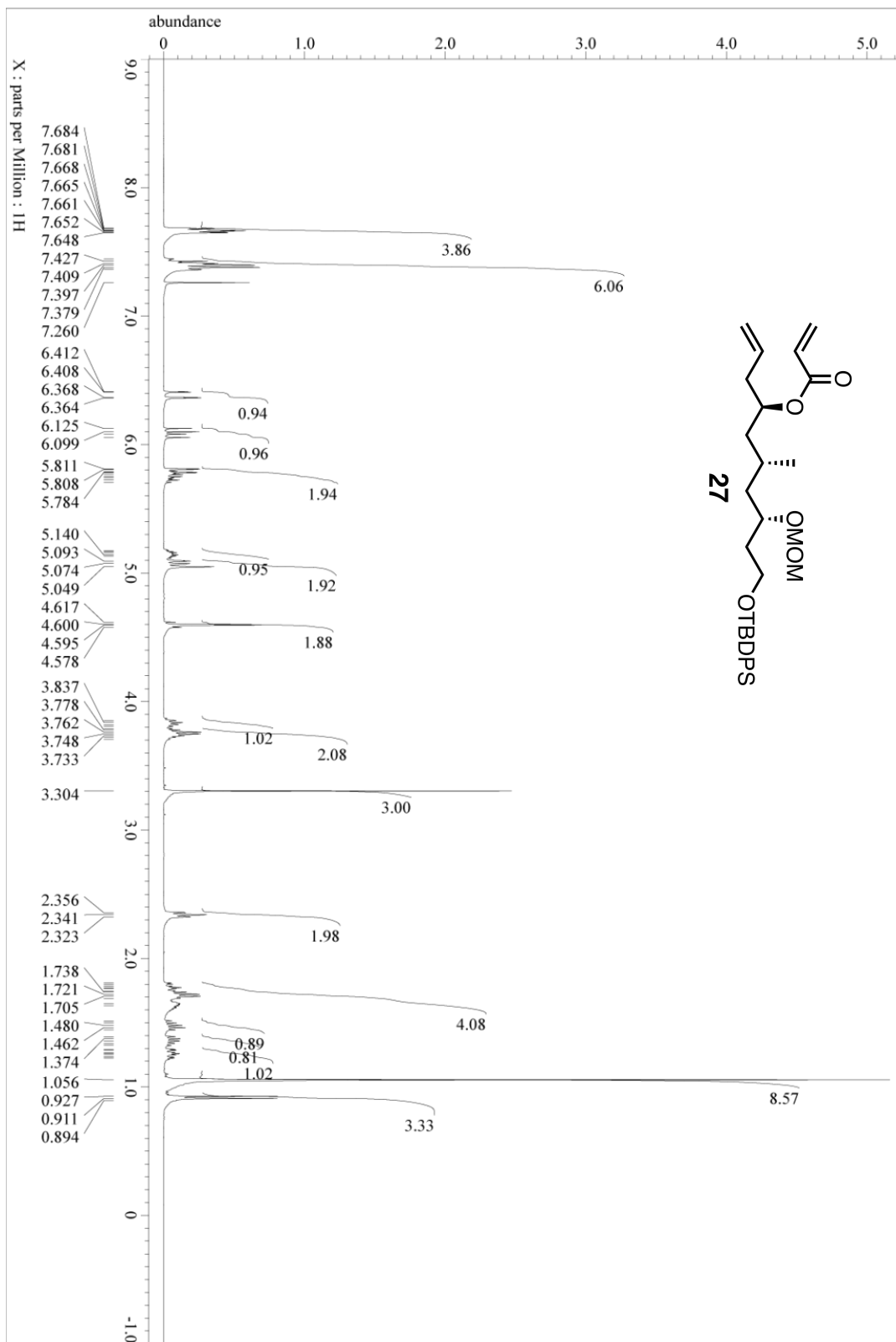
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum of **19**



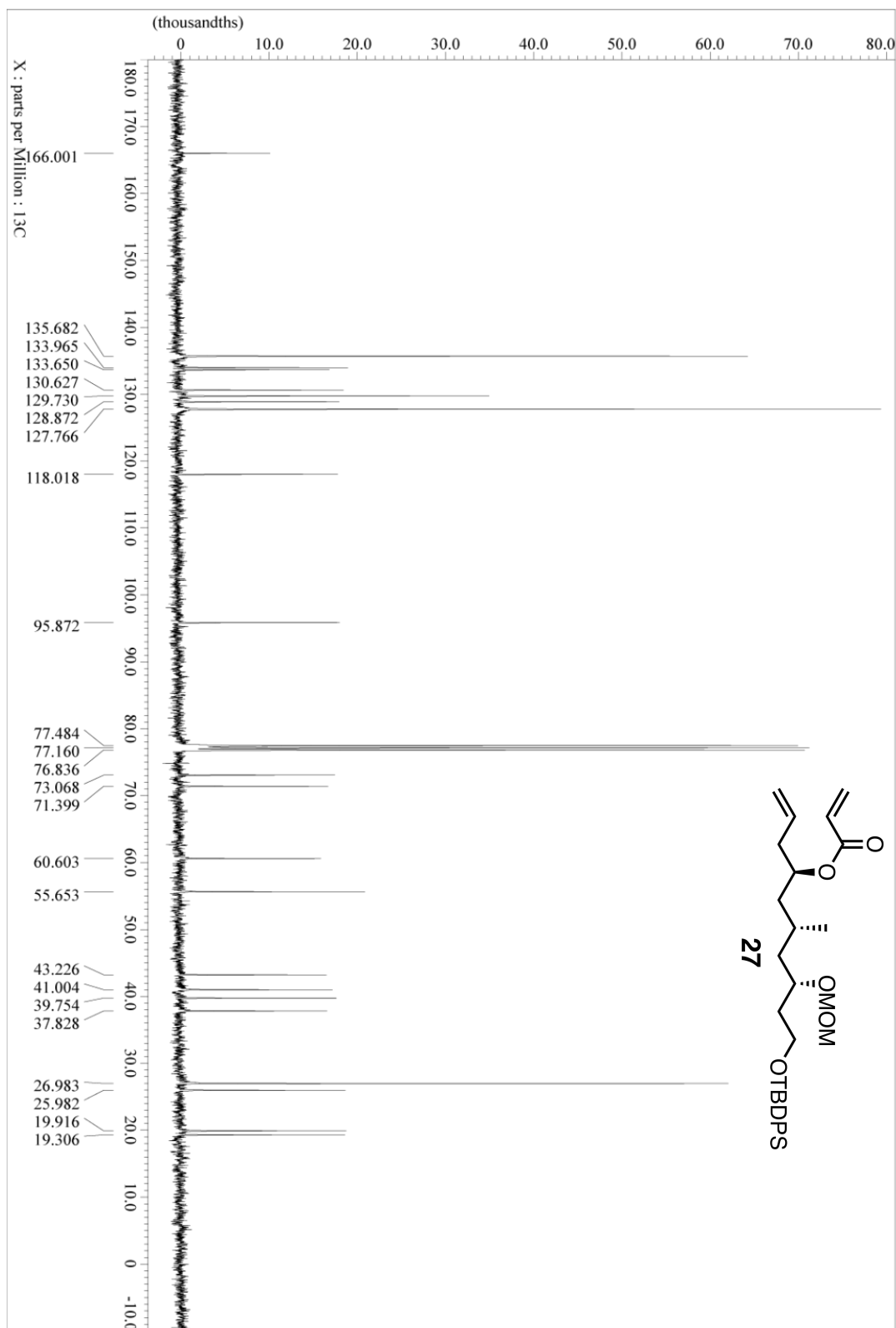
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **26**



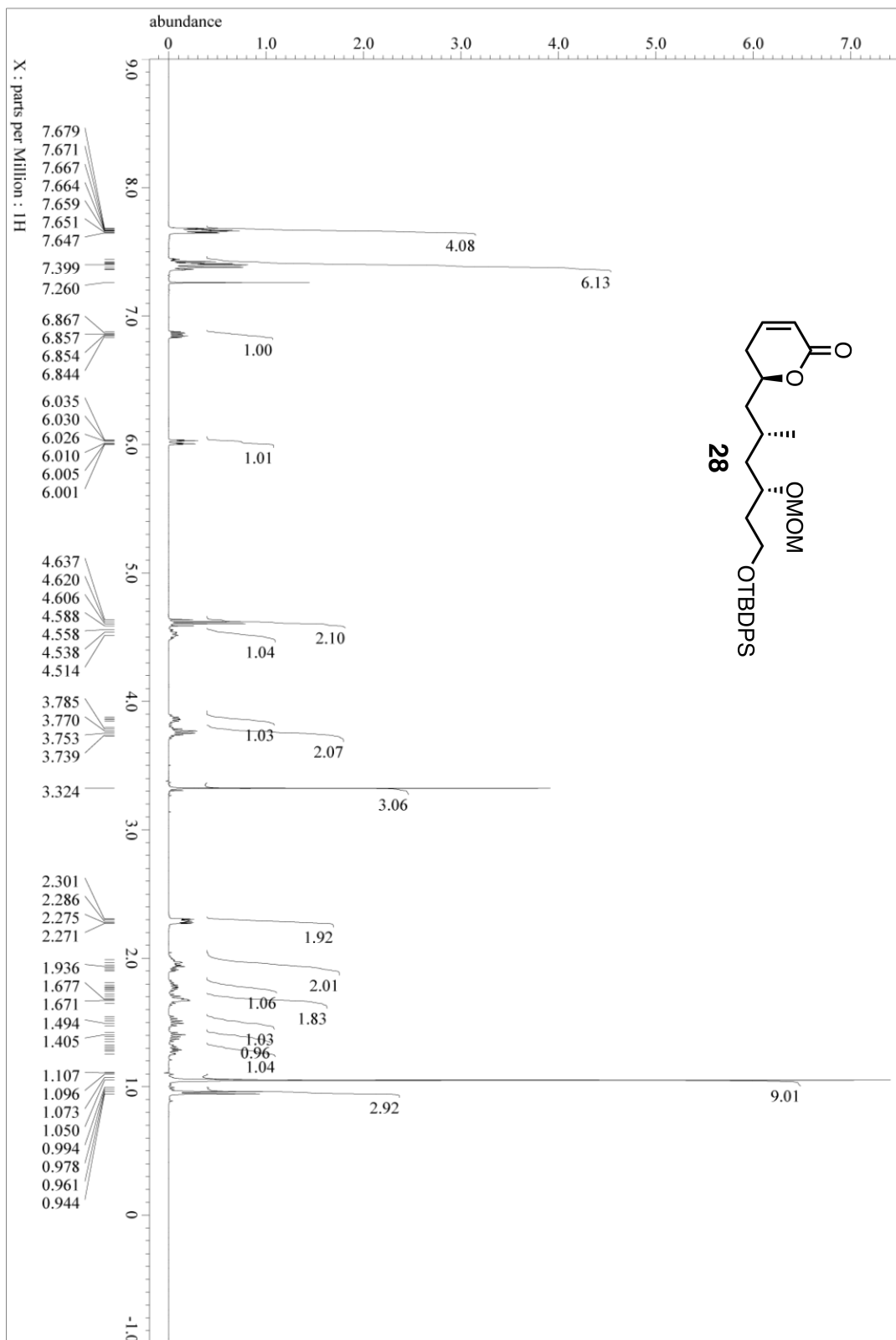
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **27**



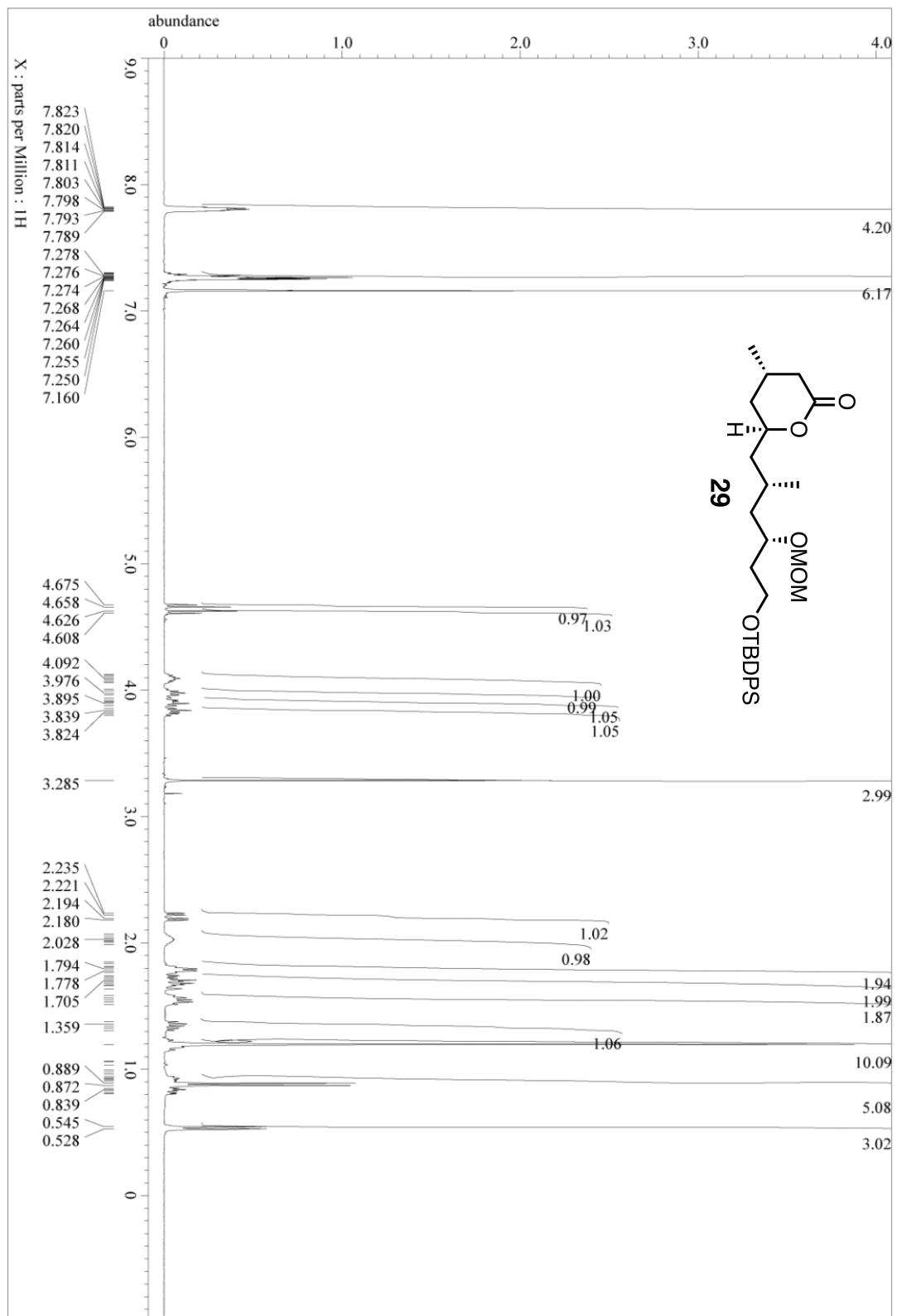
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **27**



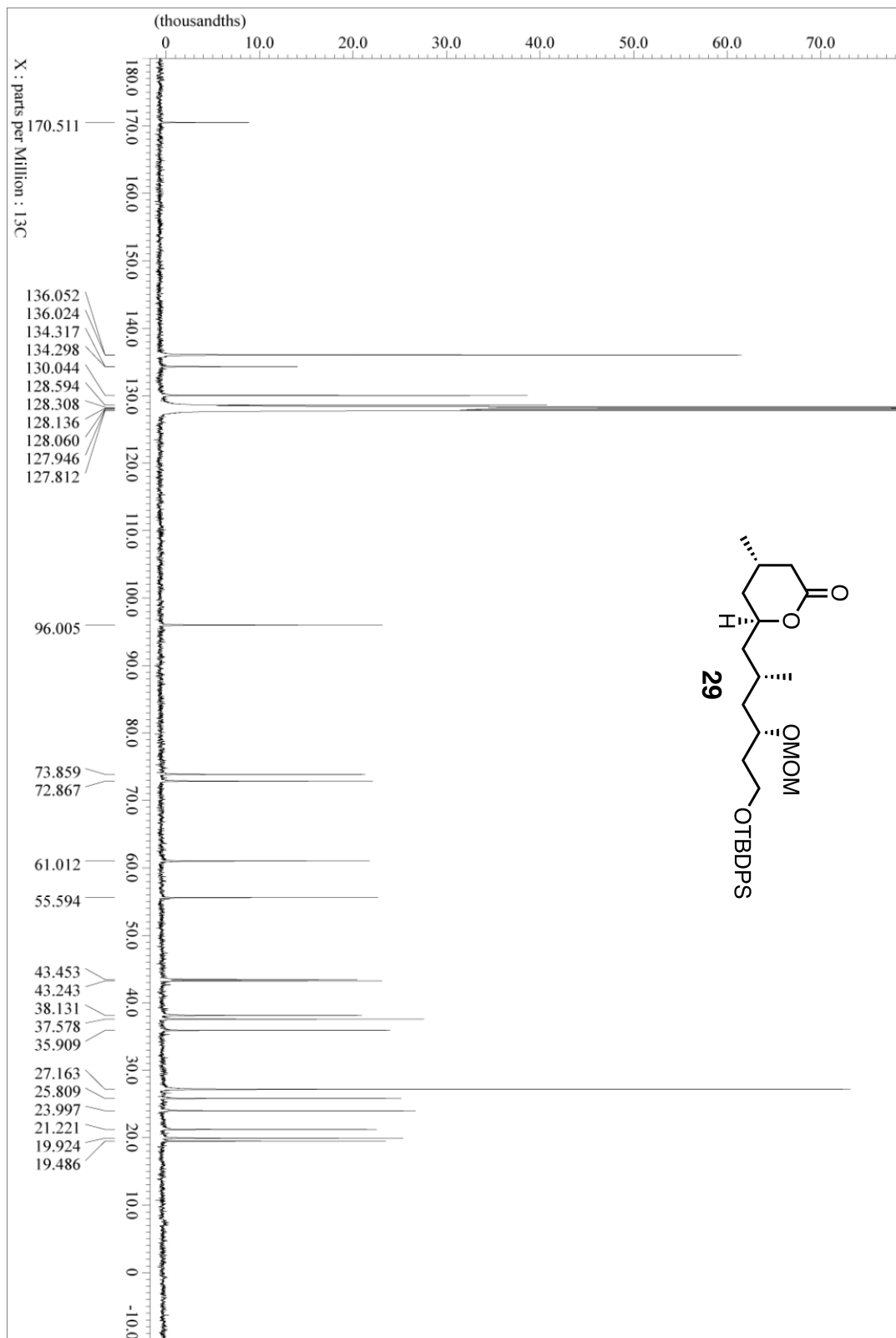
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **28**



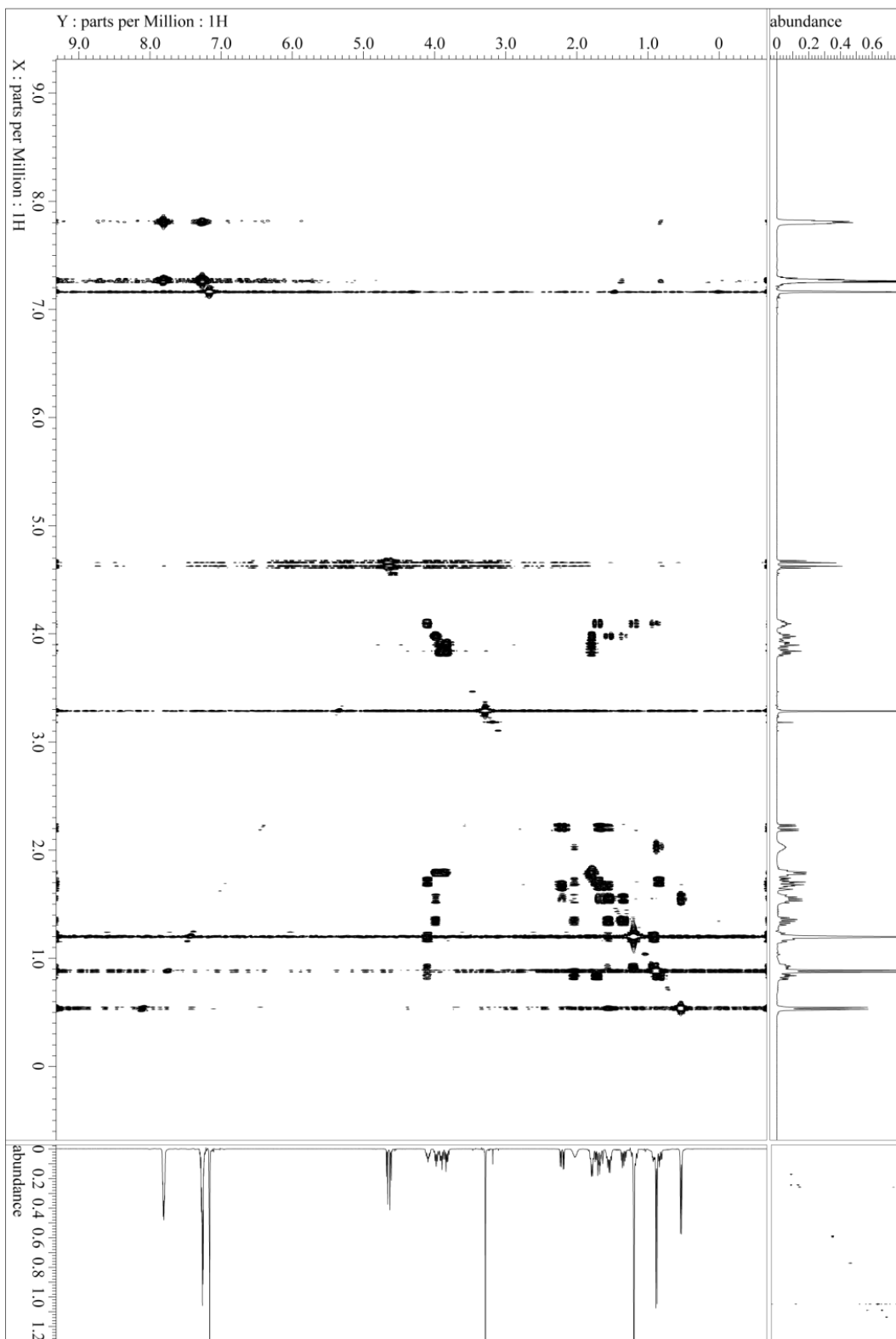
¹H NMR (400 MHz, C₆D₆) spectrum of **29**



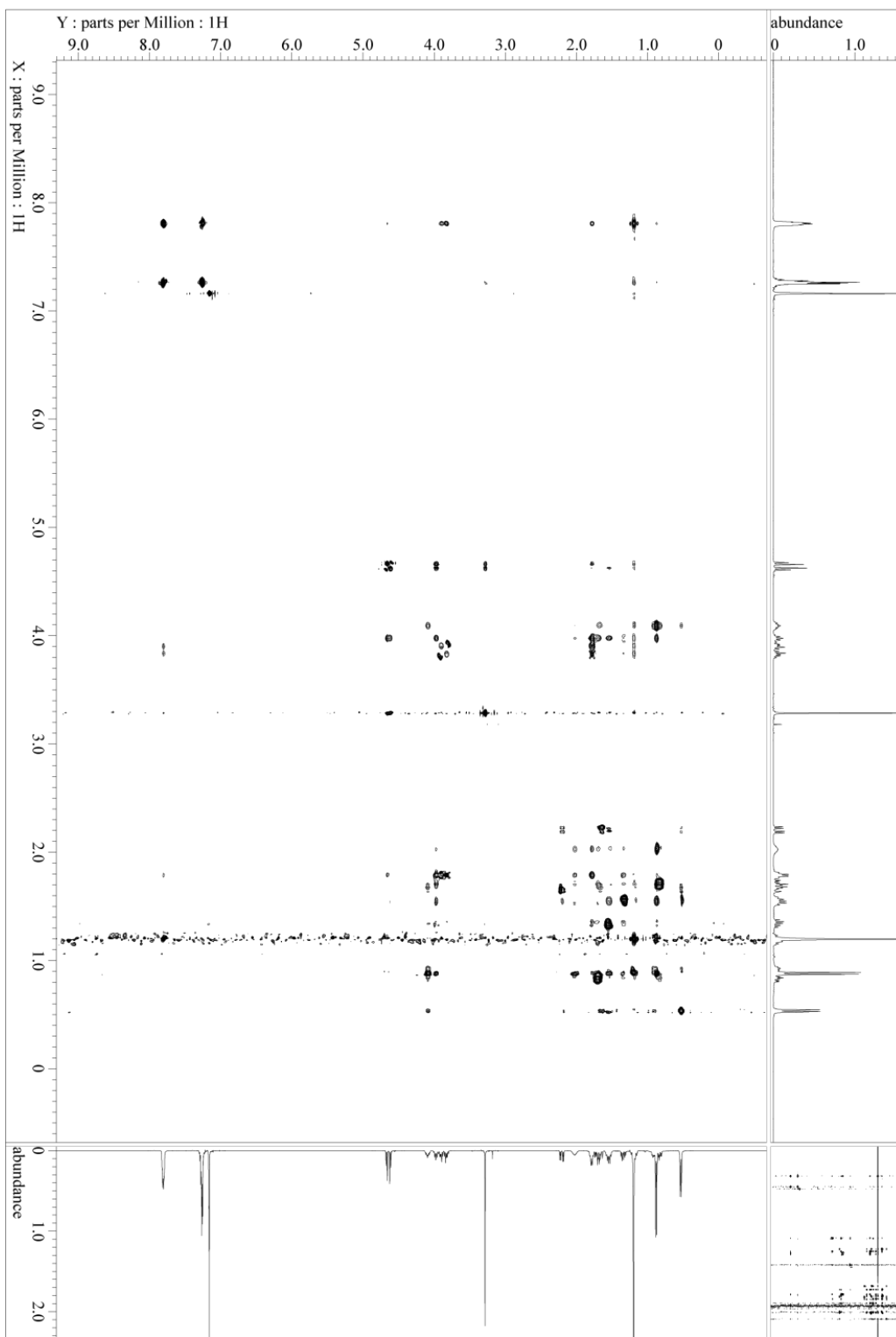
^{13}C NMR (100 MHz, C_6D_6) spectrum of **29**



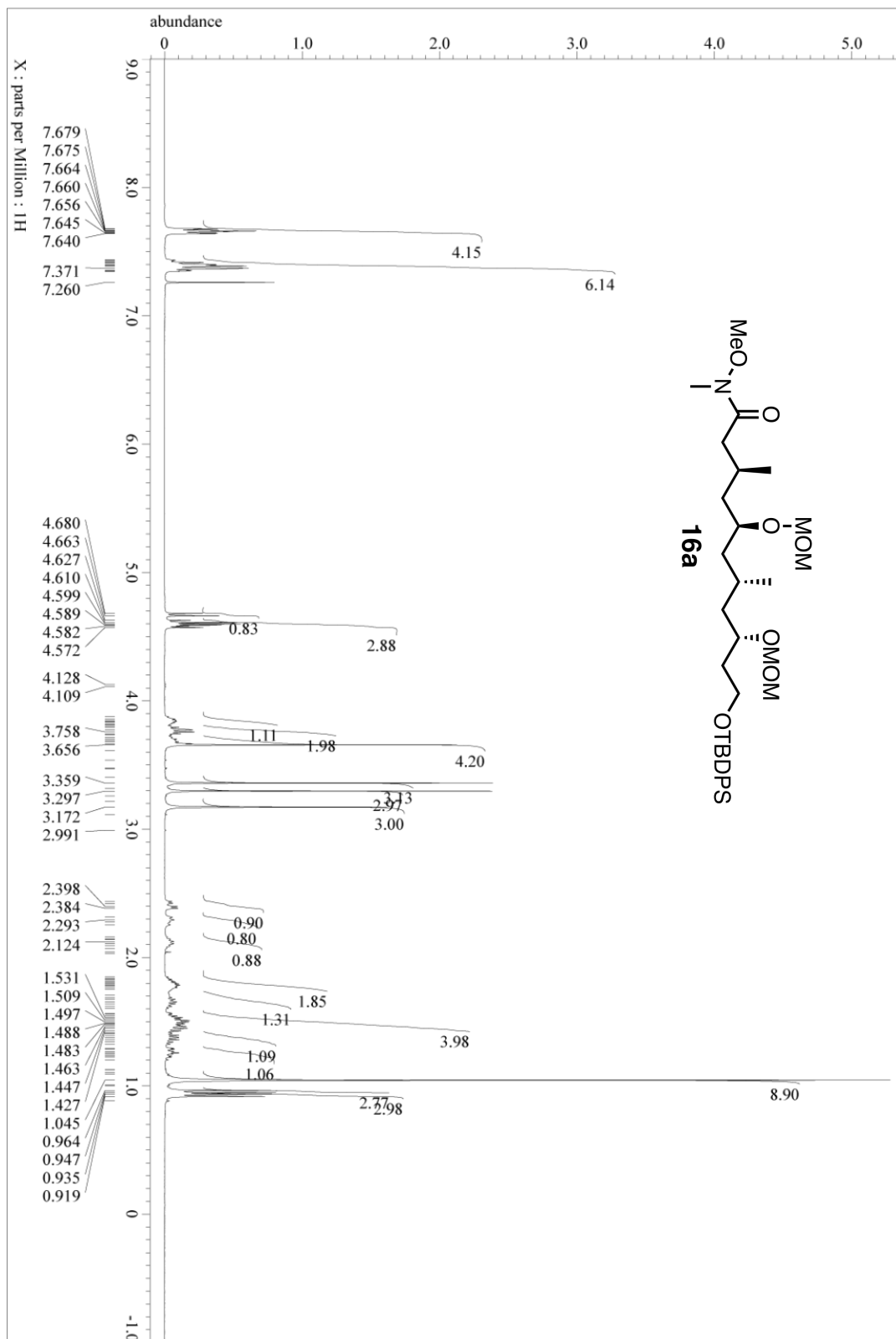
COSY (400 MHz, C₆D₆) spectrum of **29**



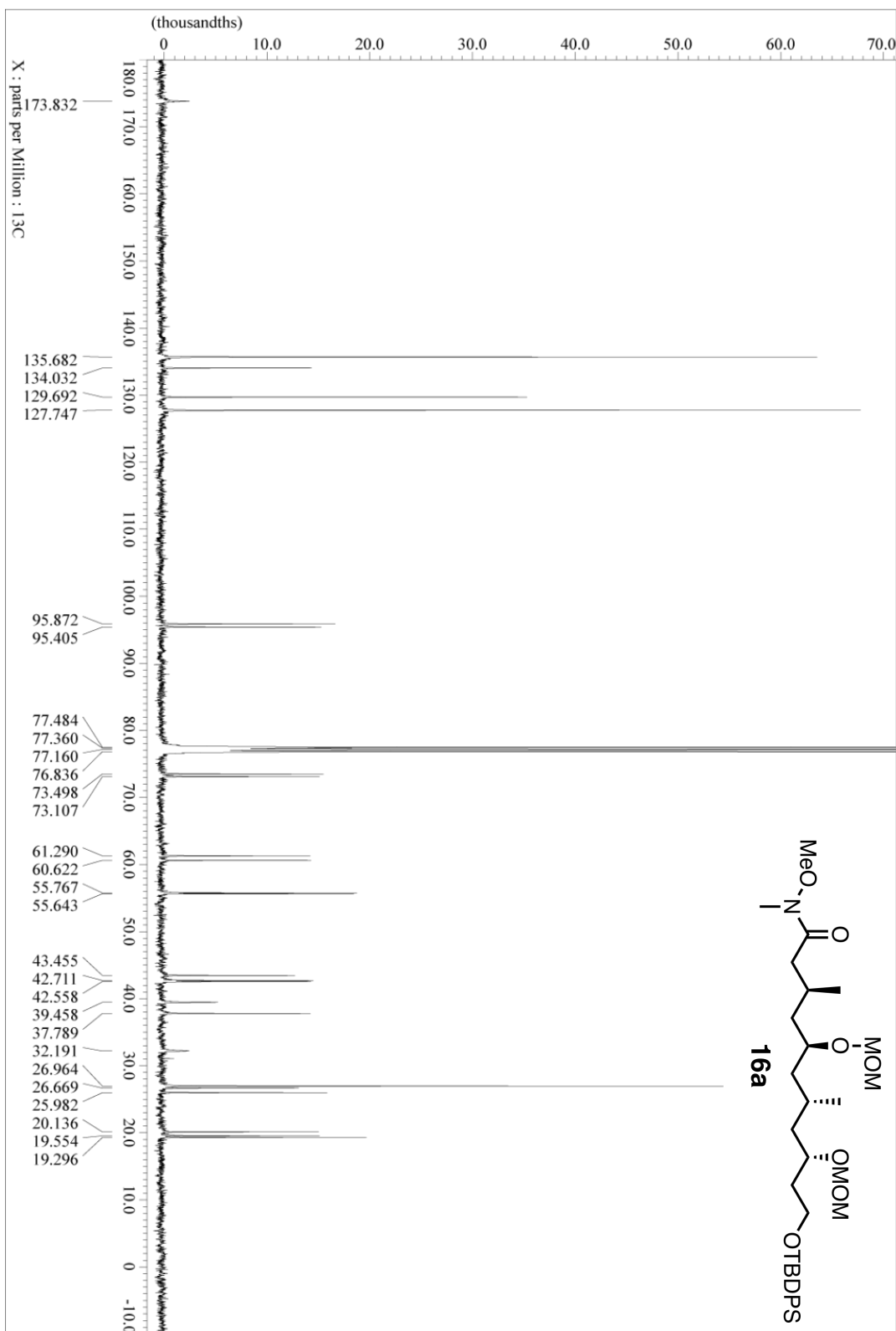
NOESY (400 MHz, C₆D₆) spectrum of **29**



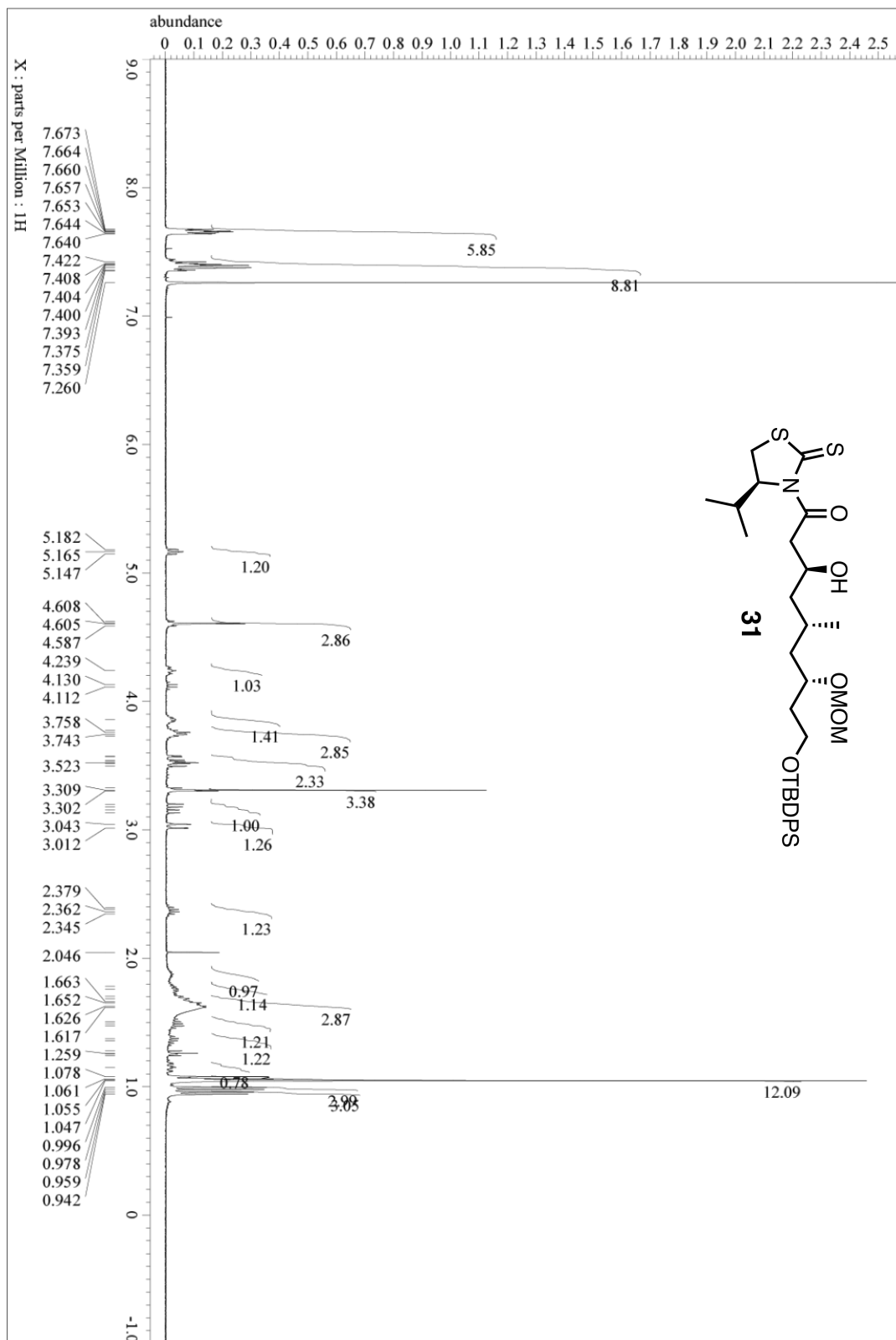
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **16a**



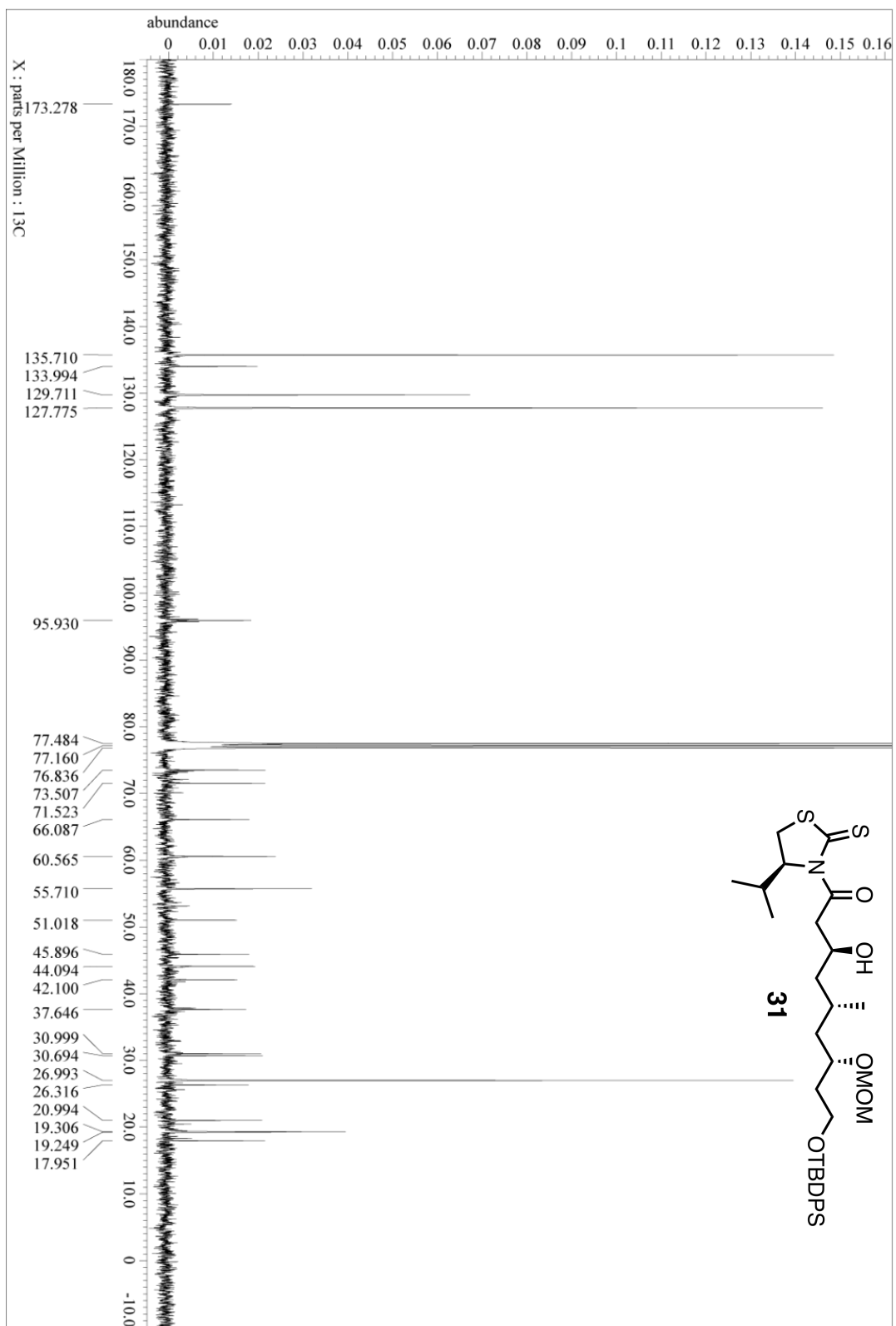
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum of **16a**



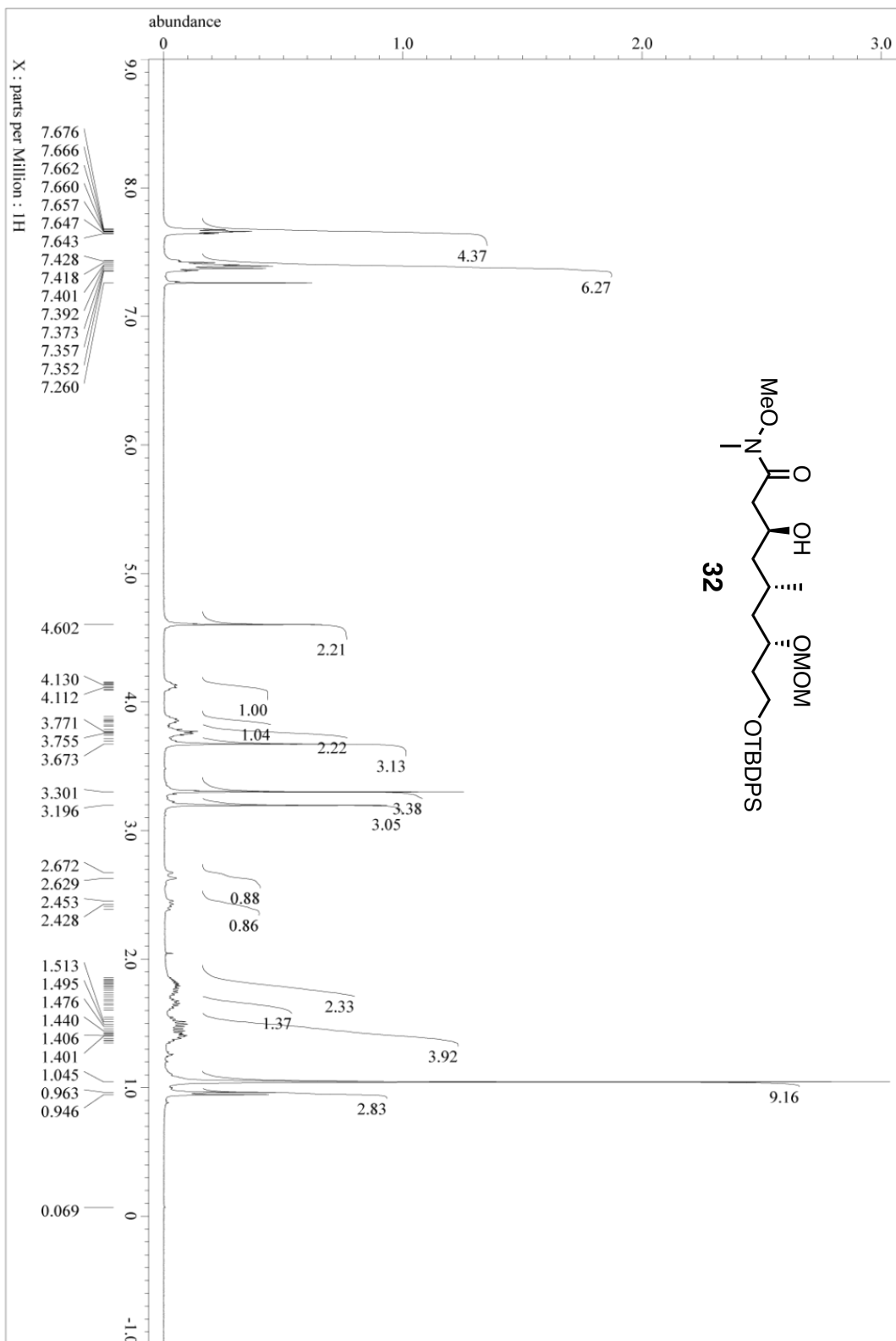
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **31**



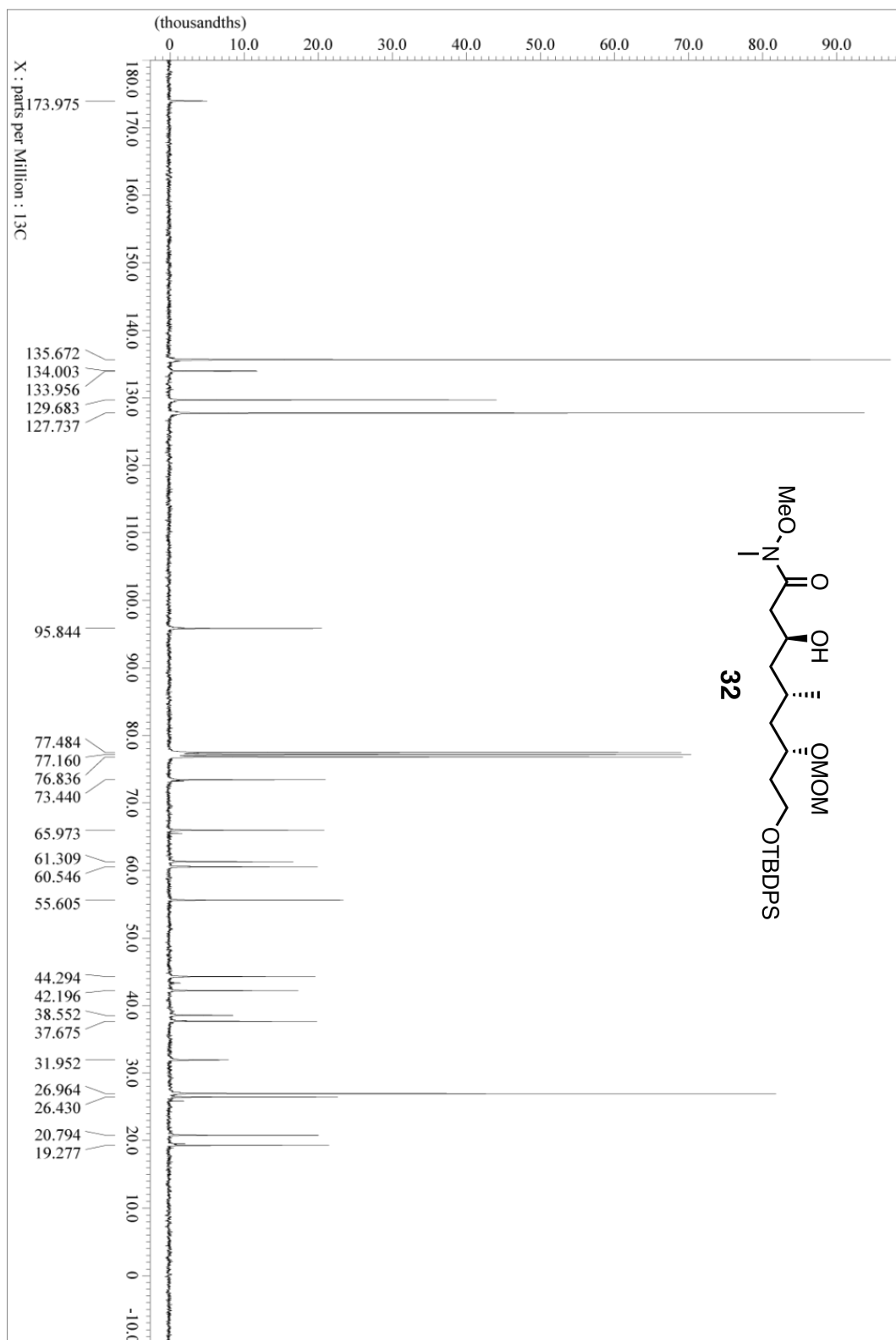
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum of **31**

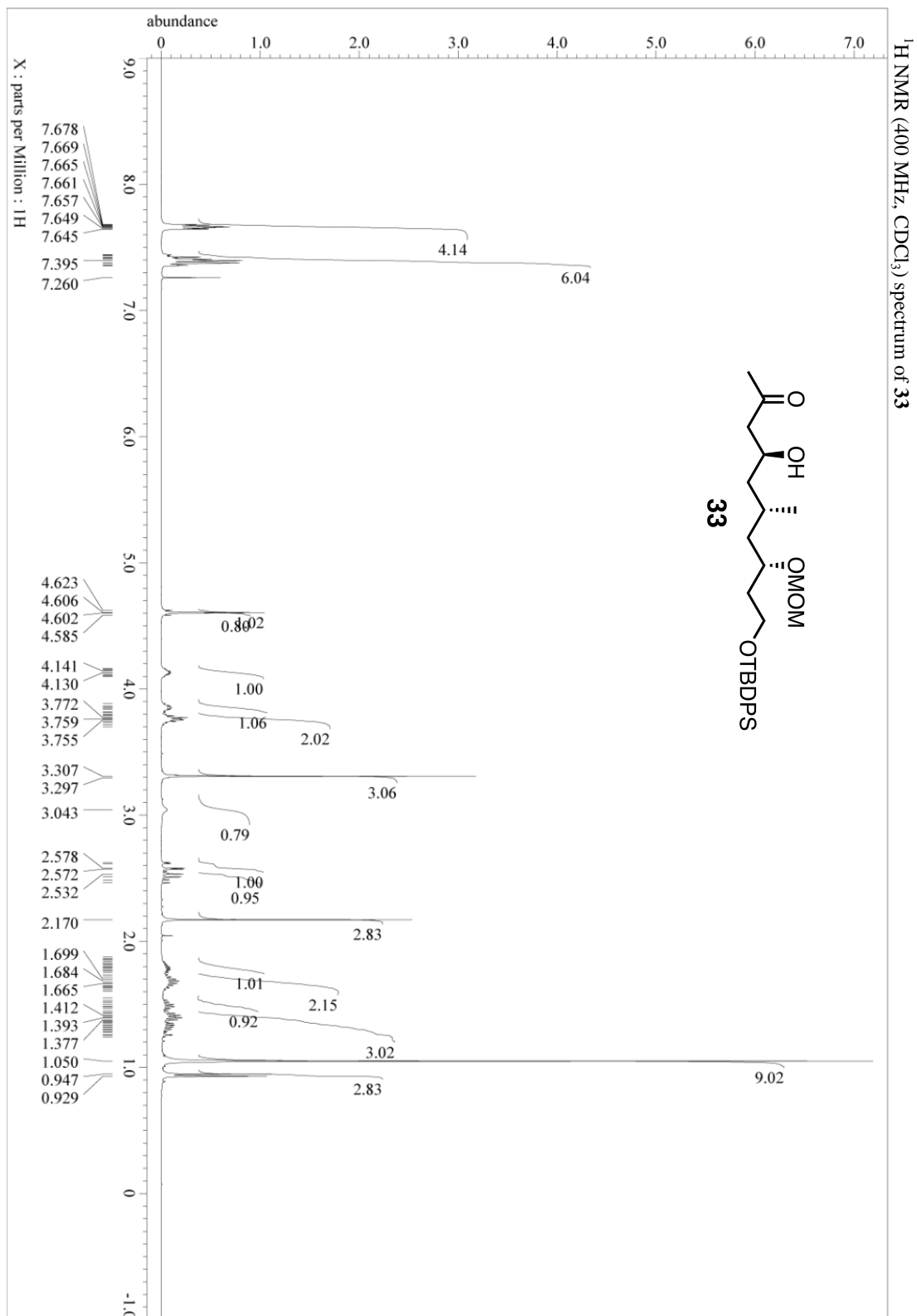


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **32**

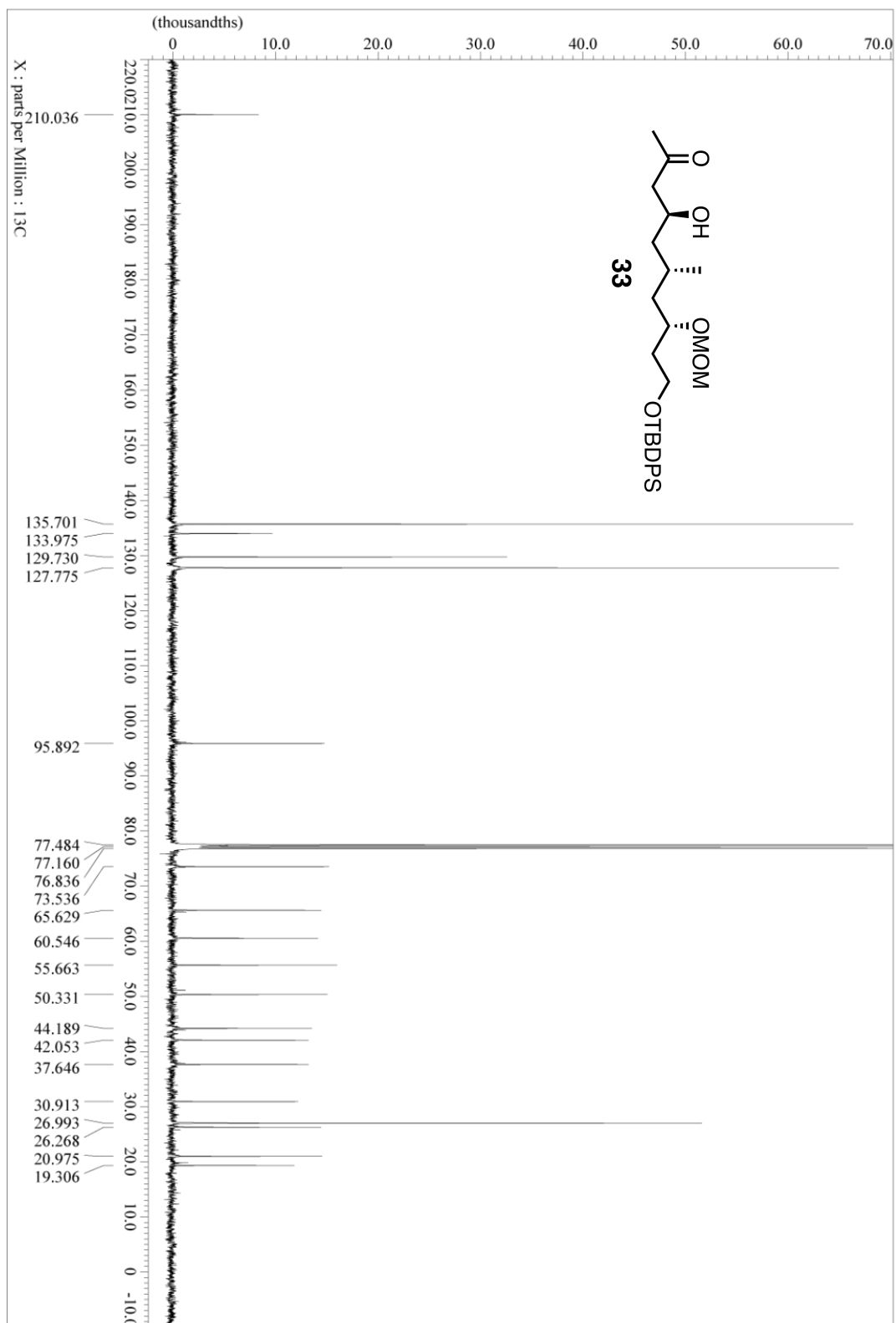


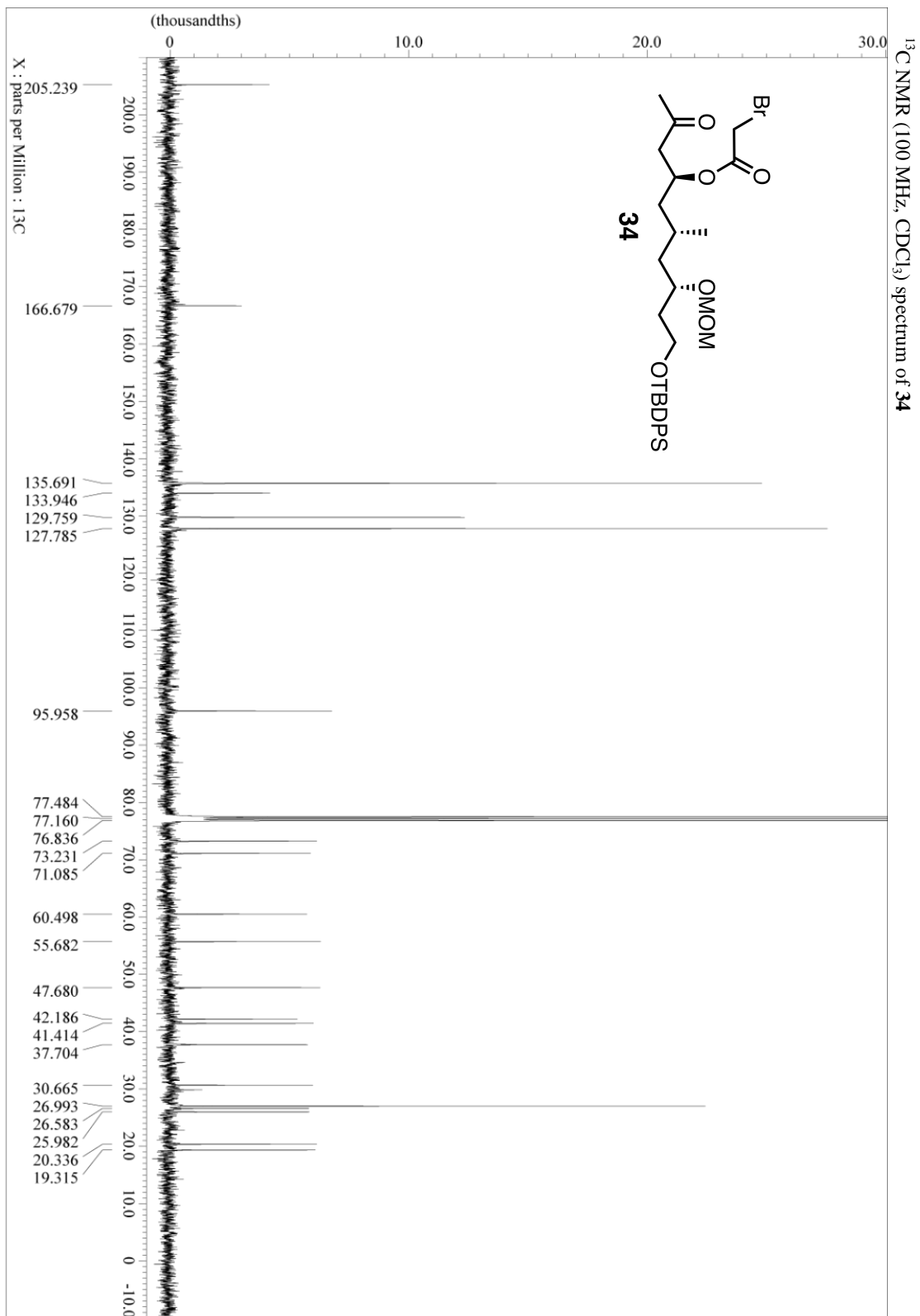
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum of **32**

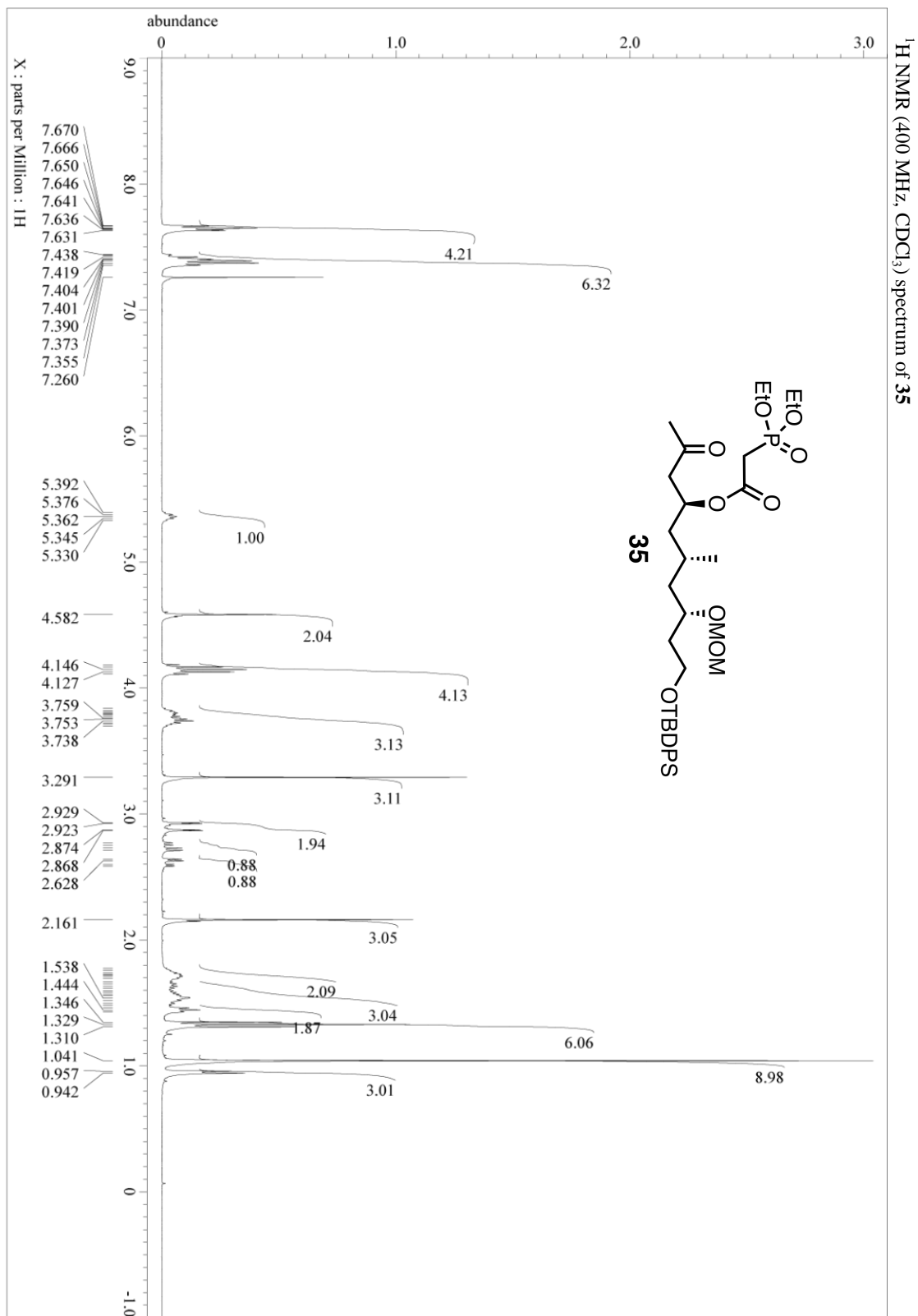


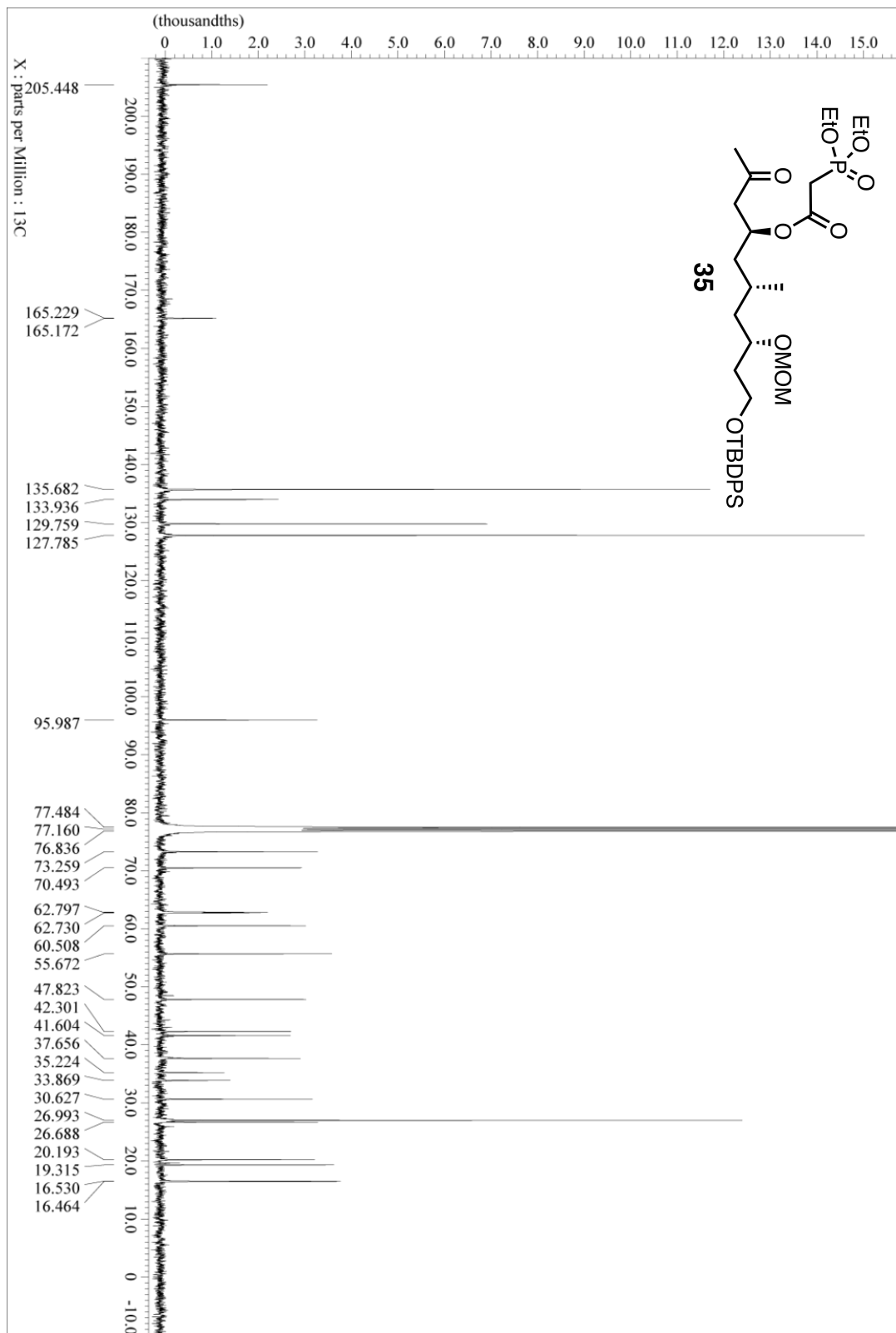


¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum of **33**

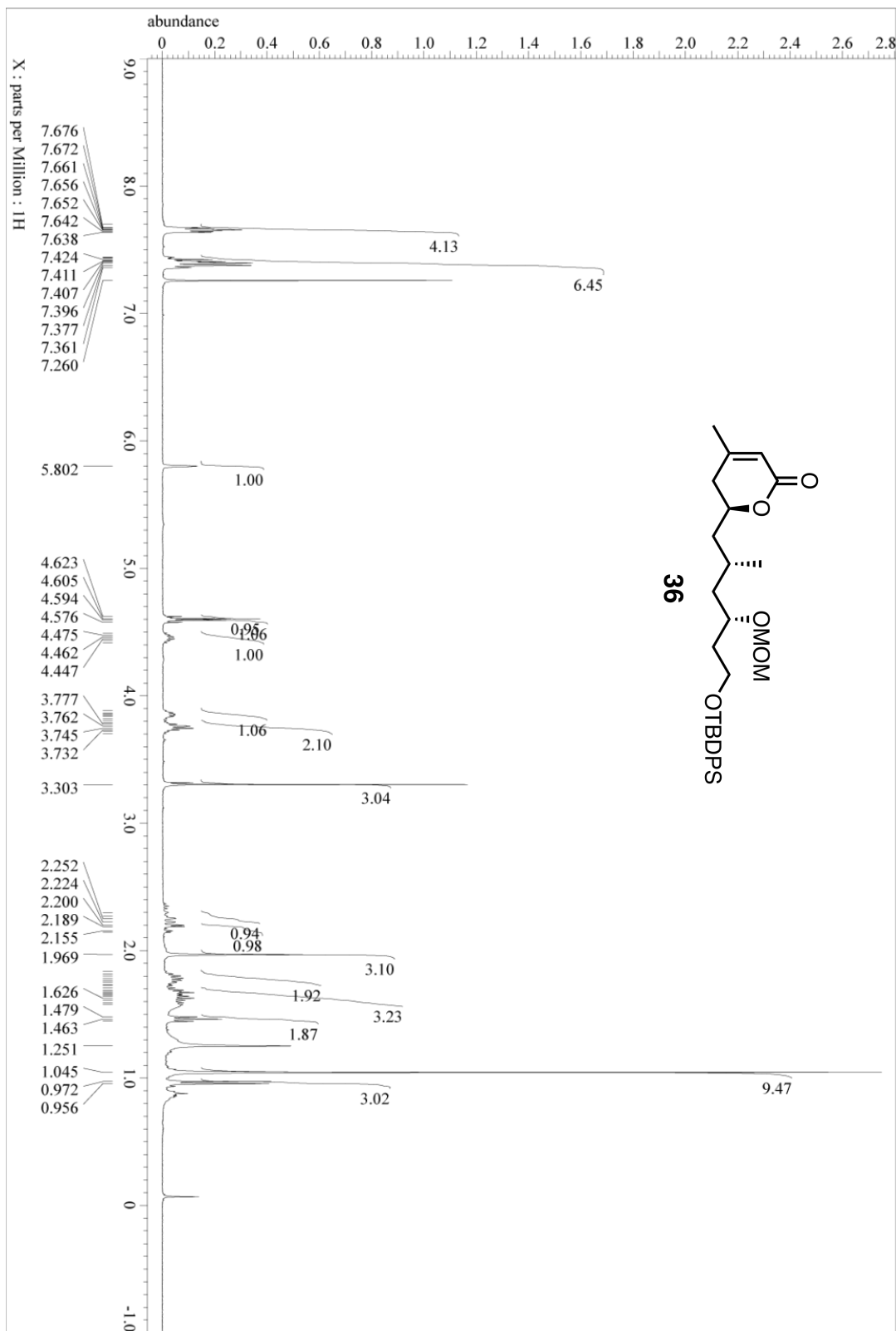


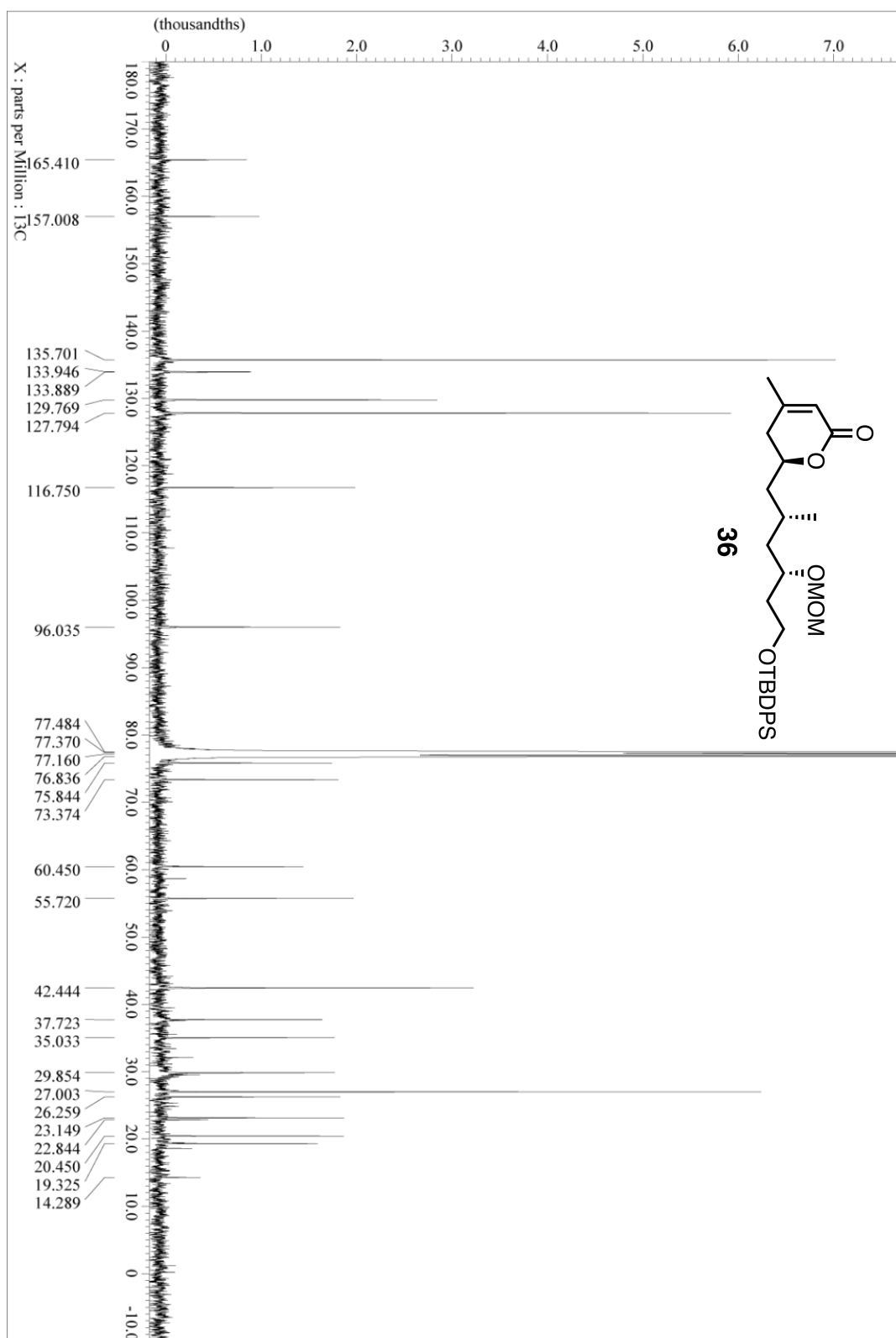




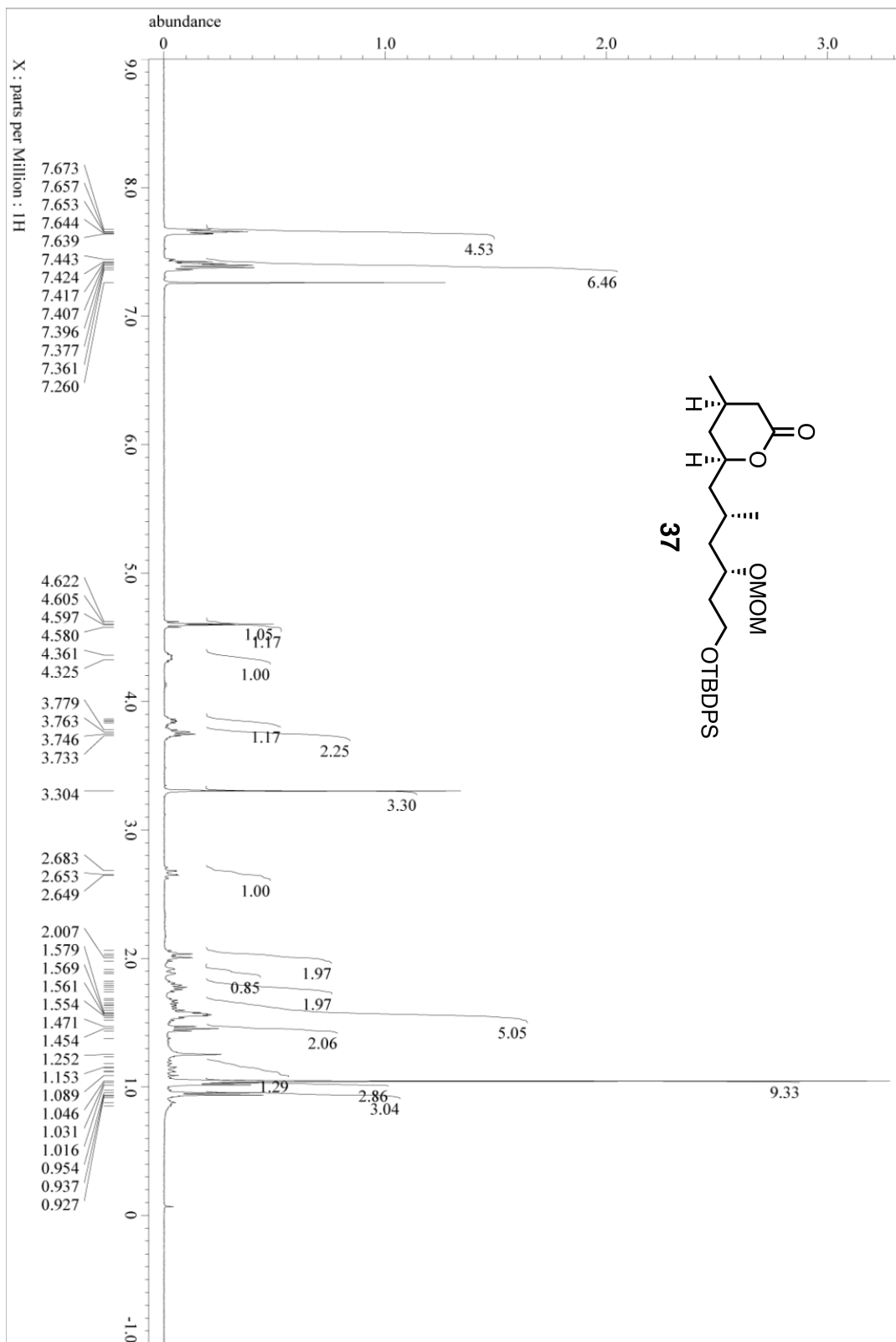


¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum of **35**

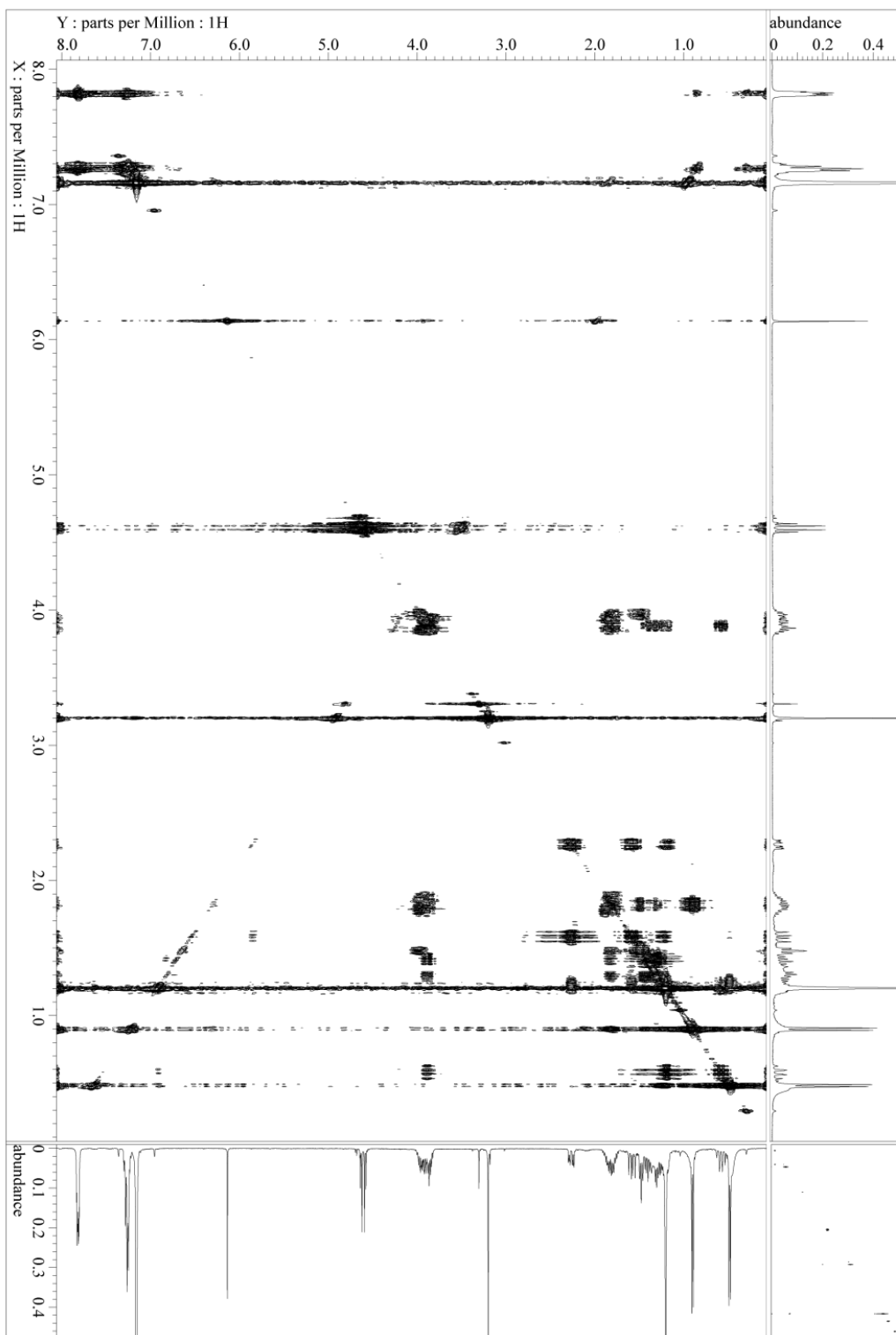




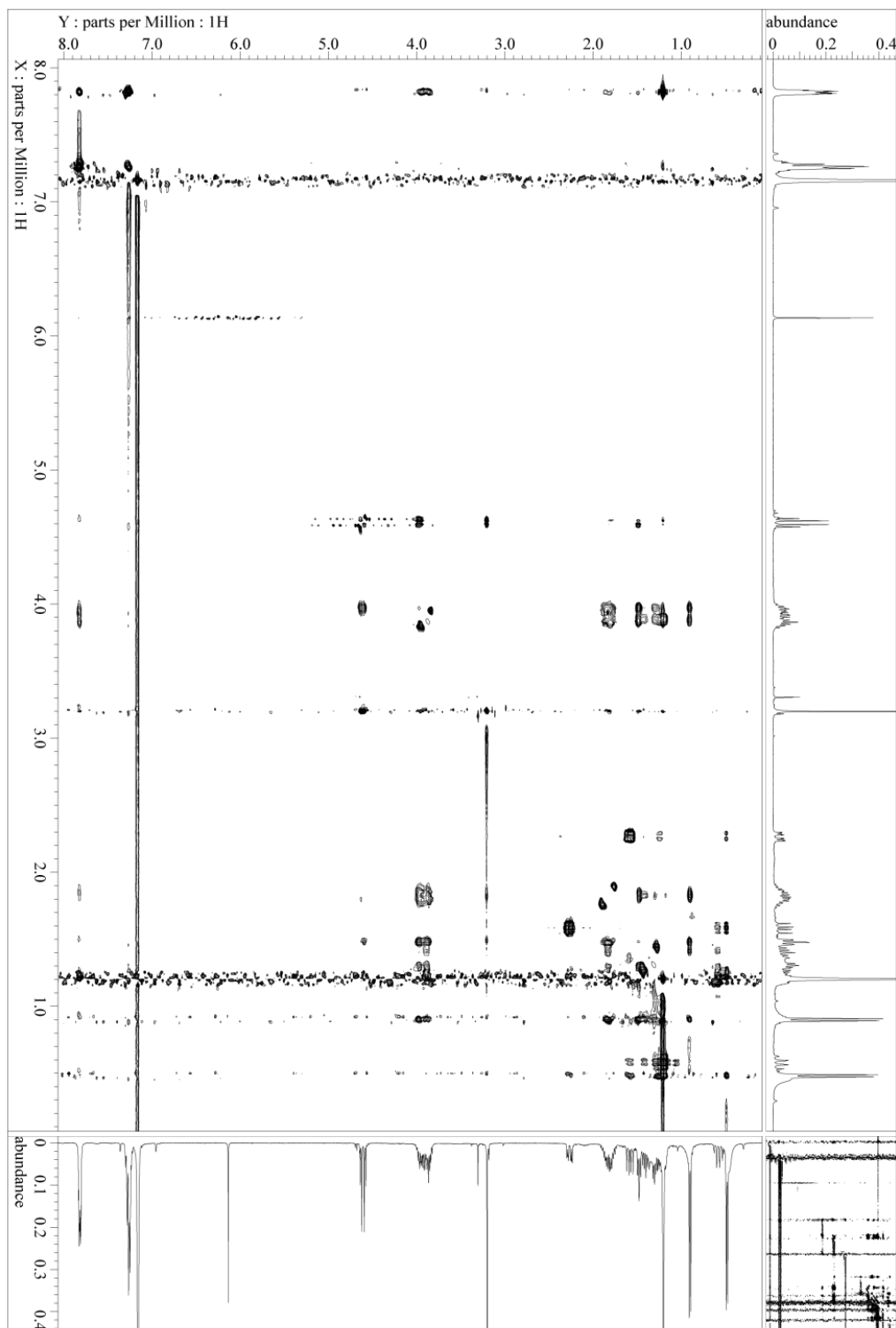
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **37**

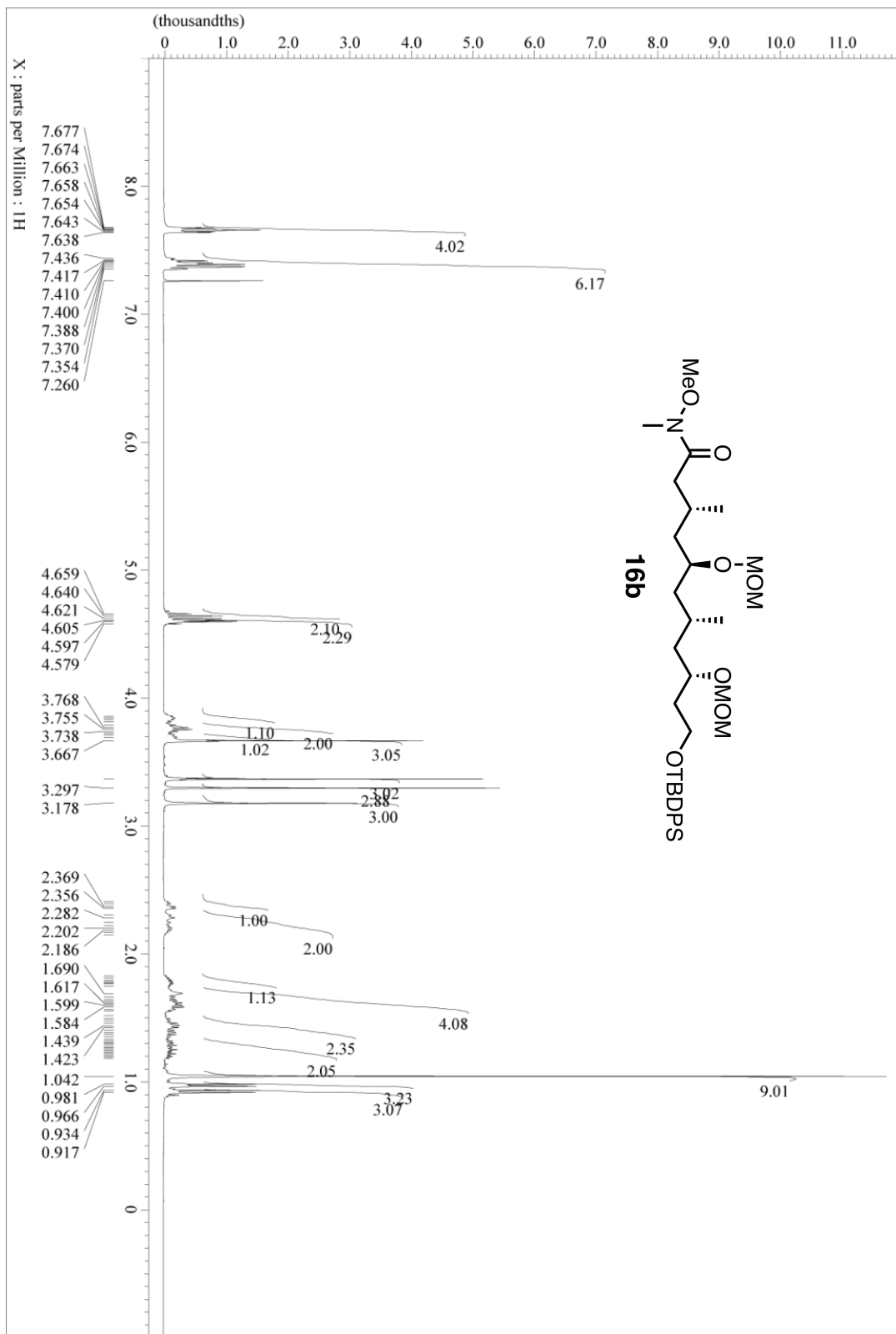


COSY (400 MHz, C₆D₆) spectrum of 37

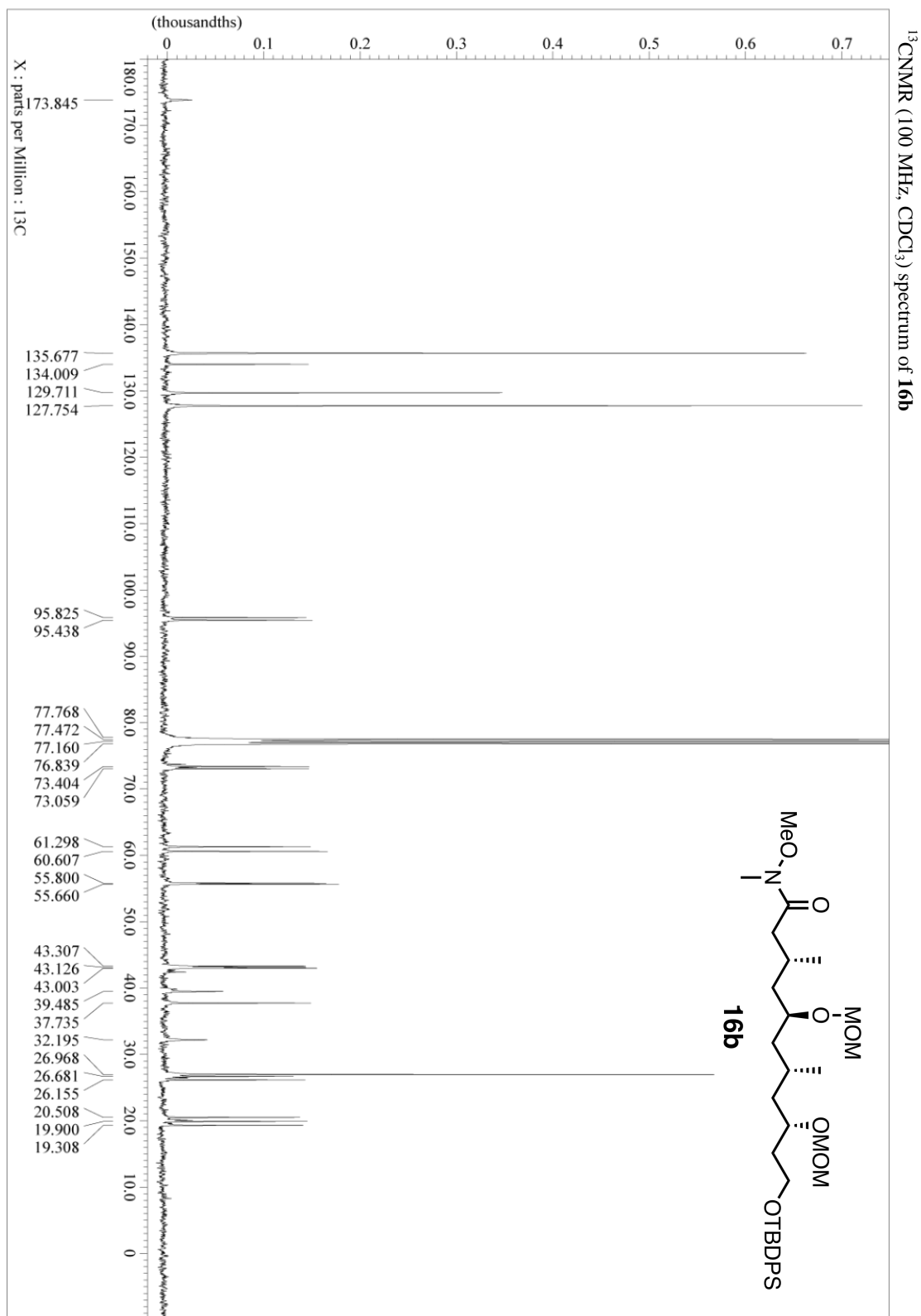


NOESY (400 MHz, C₆D₆) spectrum of 37

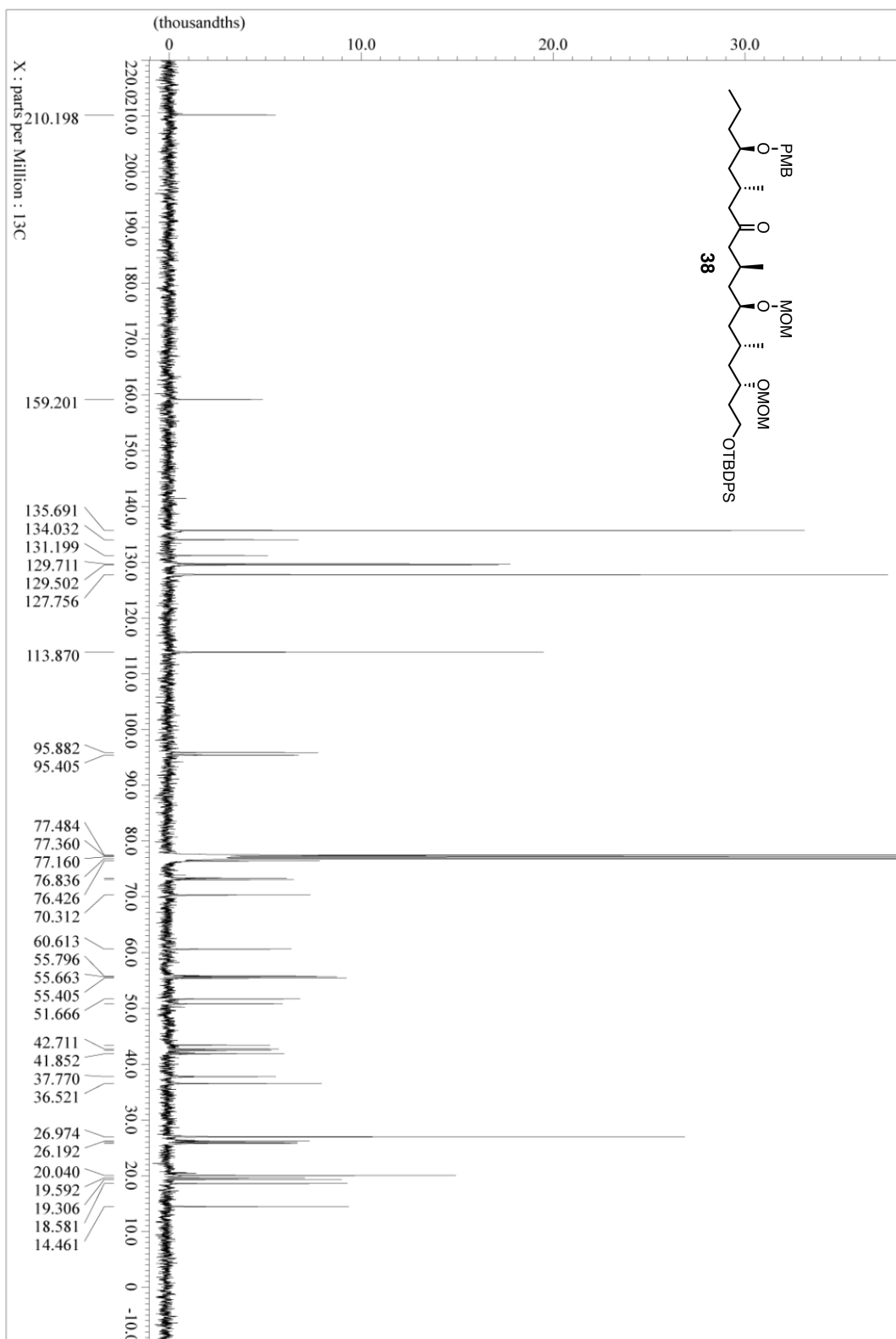




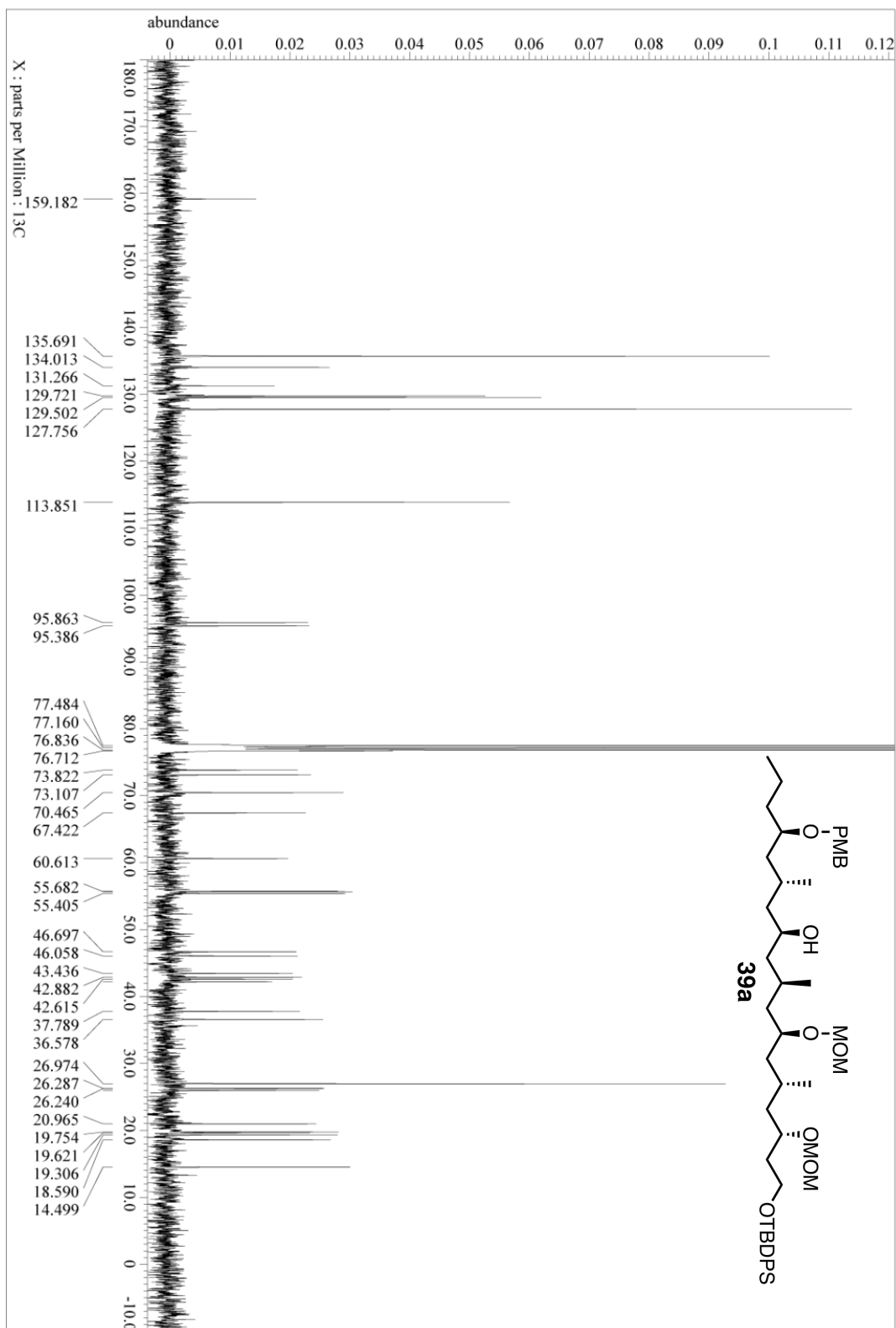
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **16b**



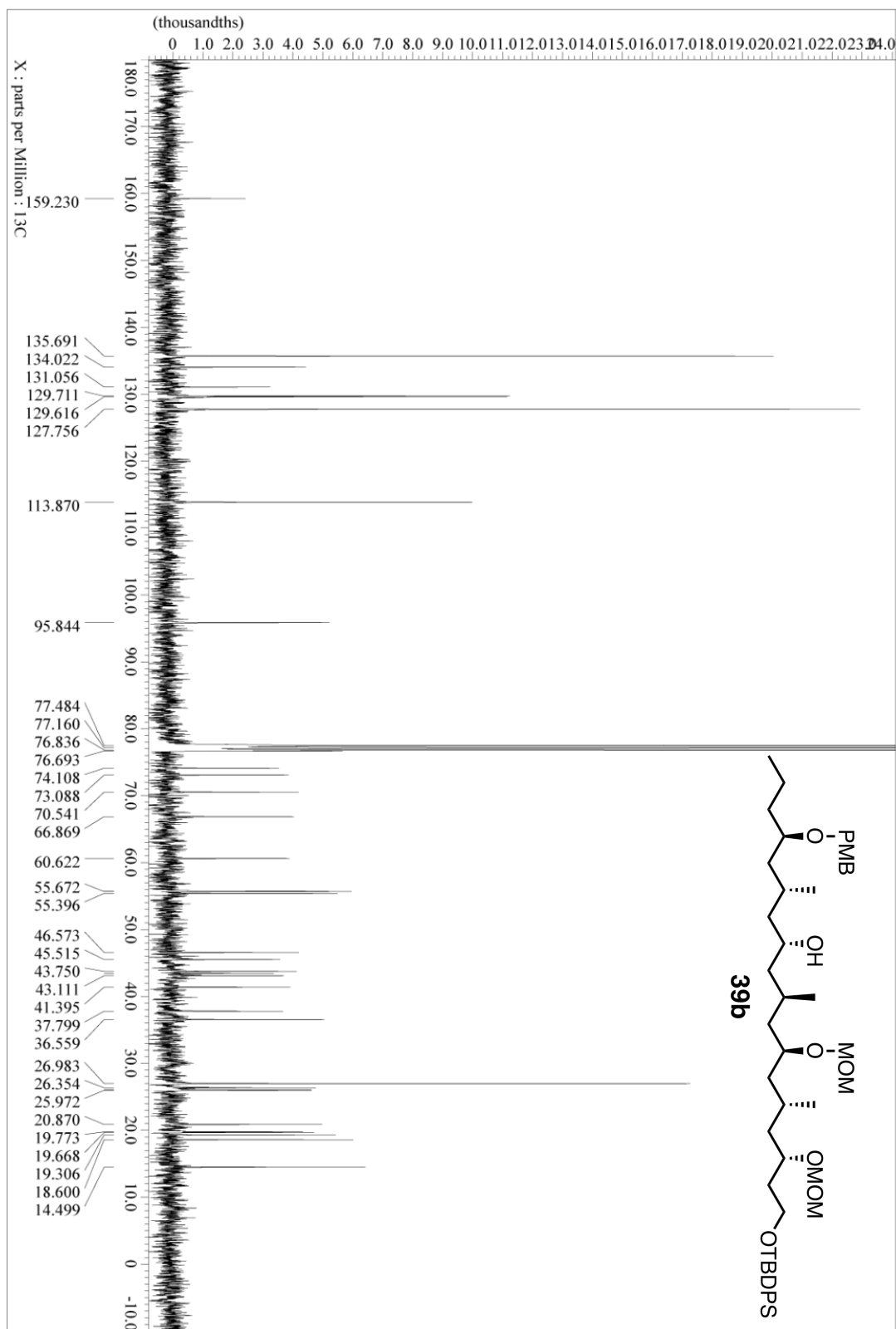
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of 38

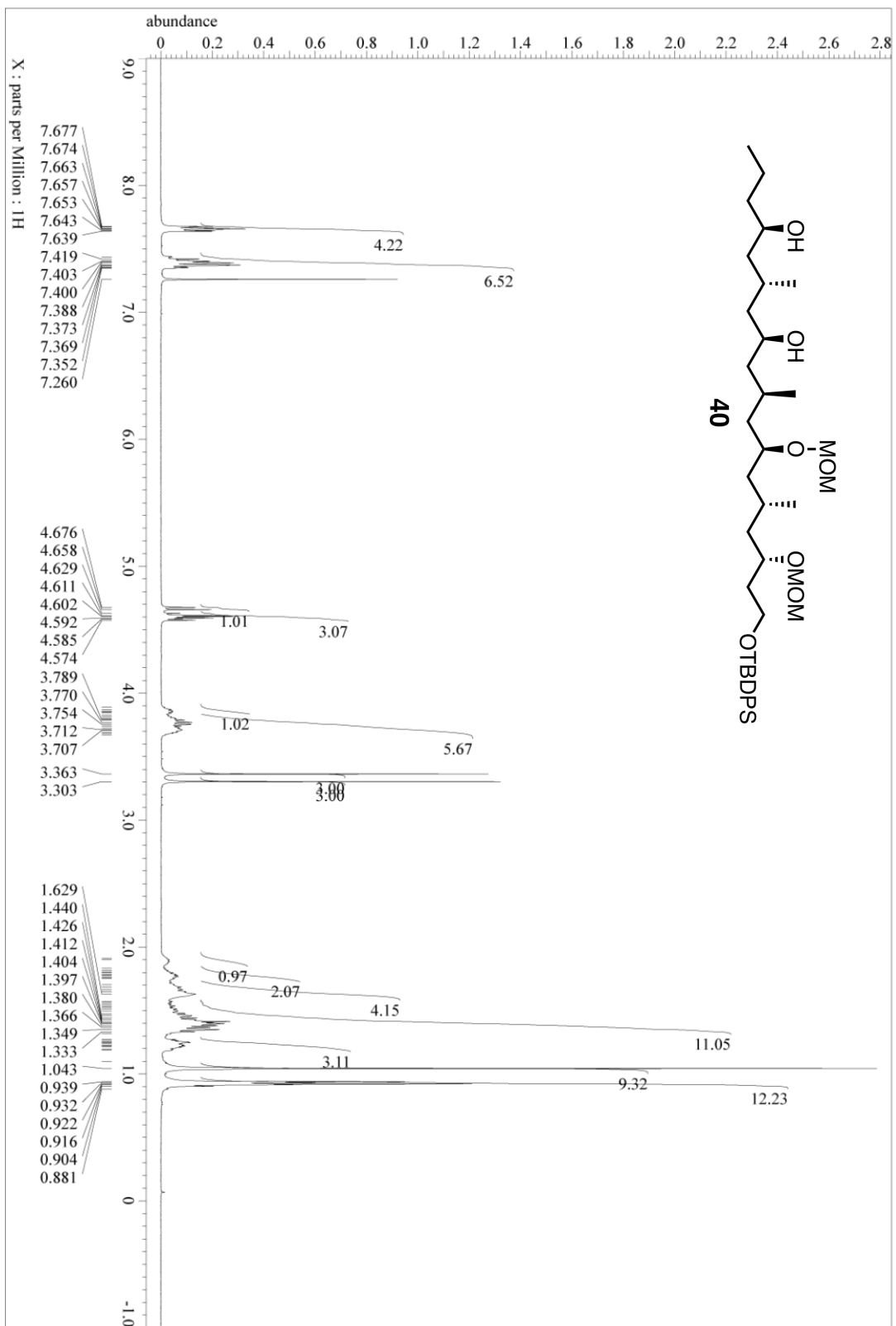


¹³CNMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum of **39a**

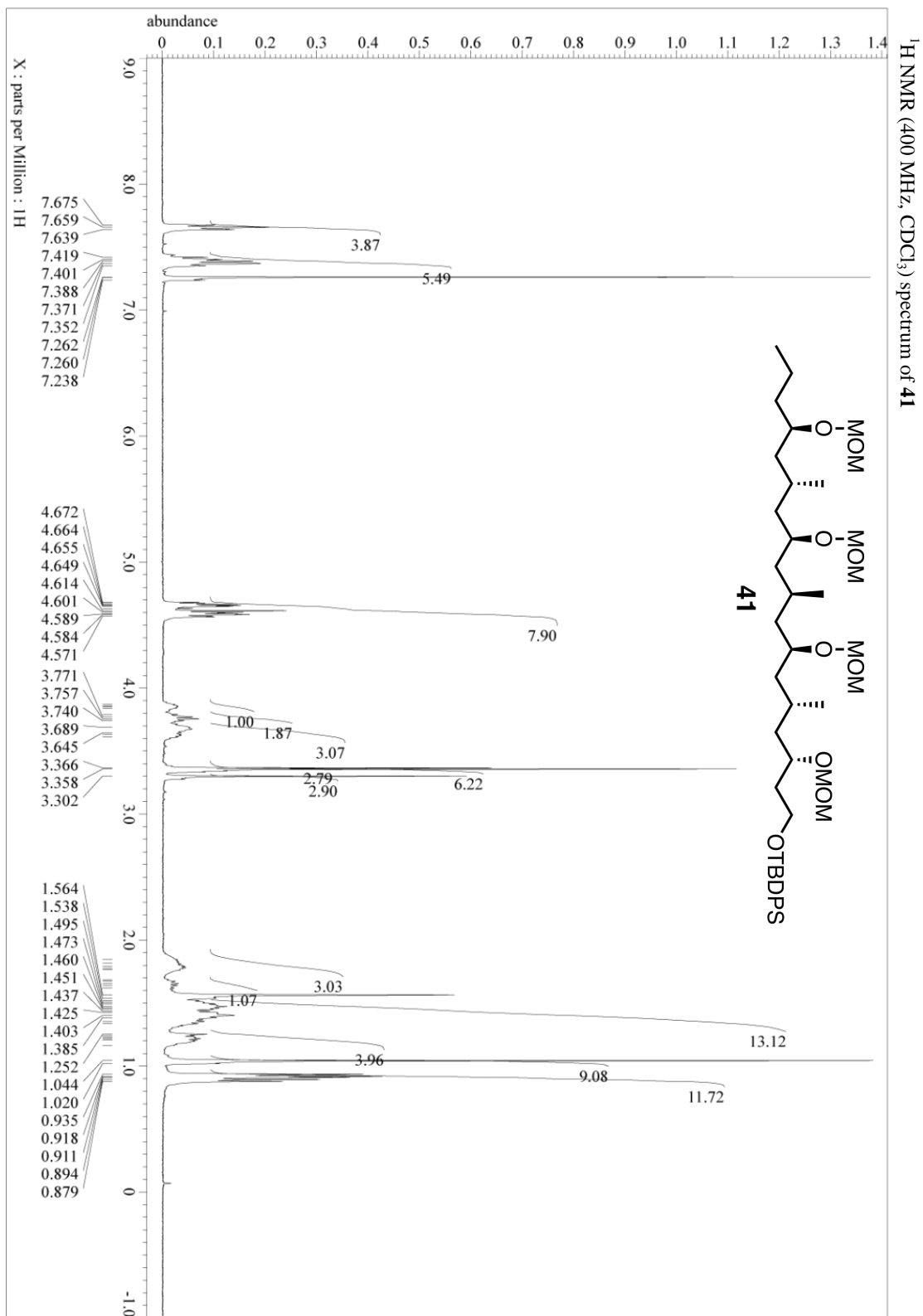


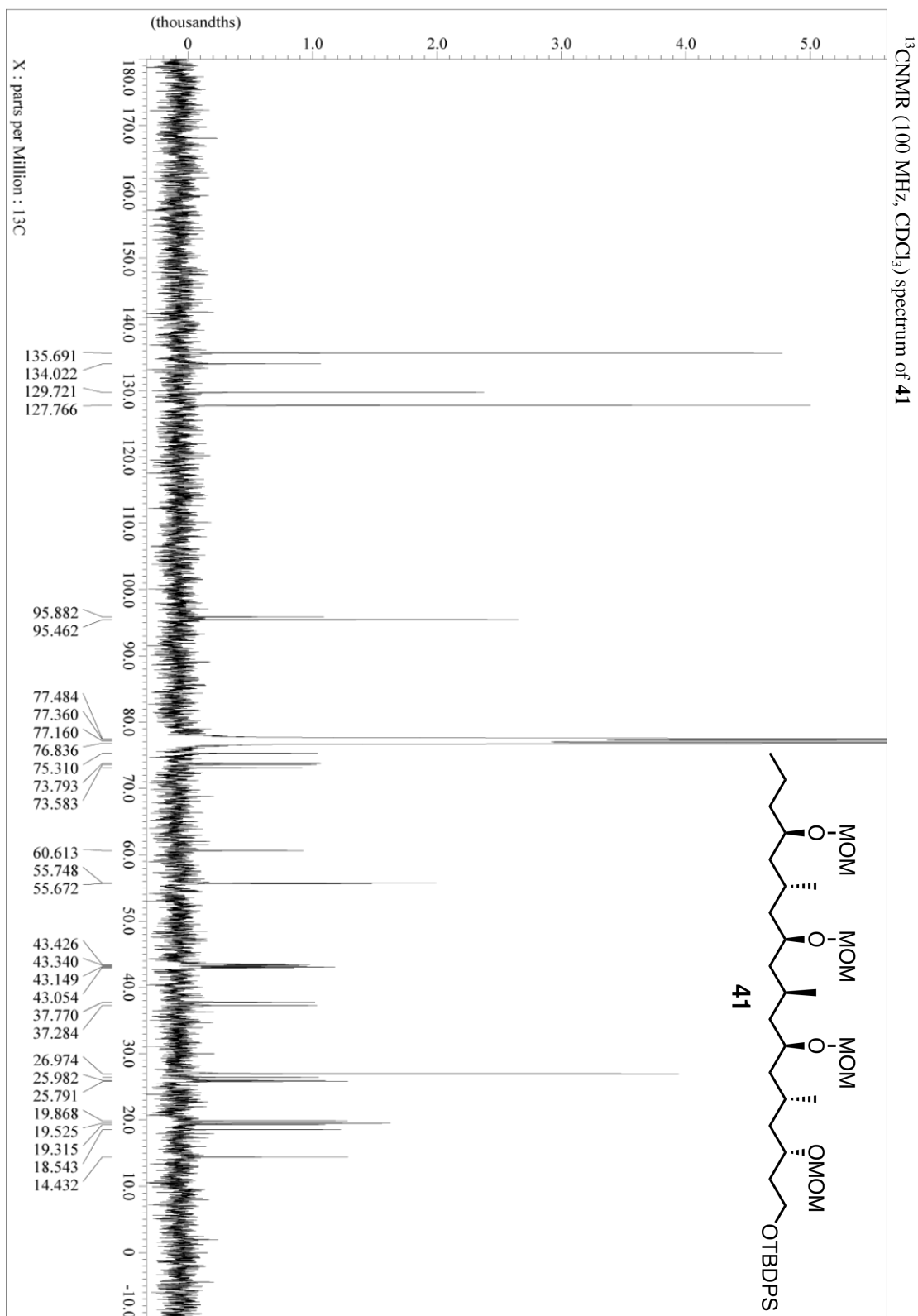
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum of **39b**



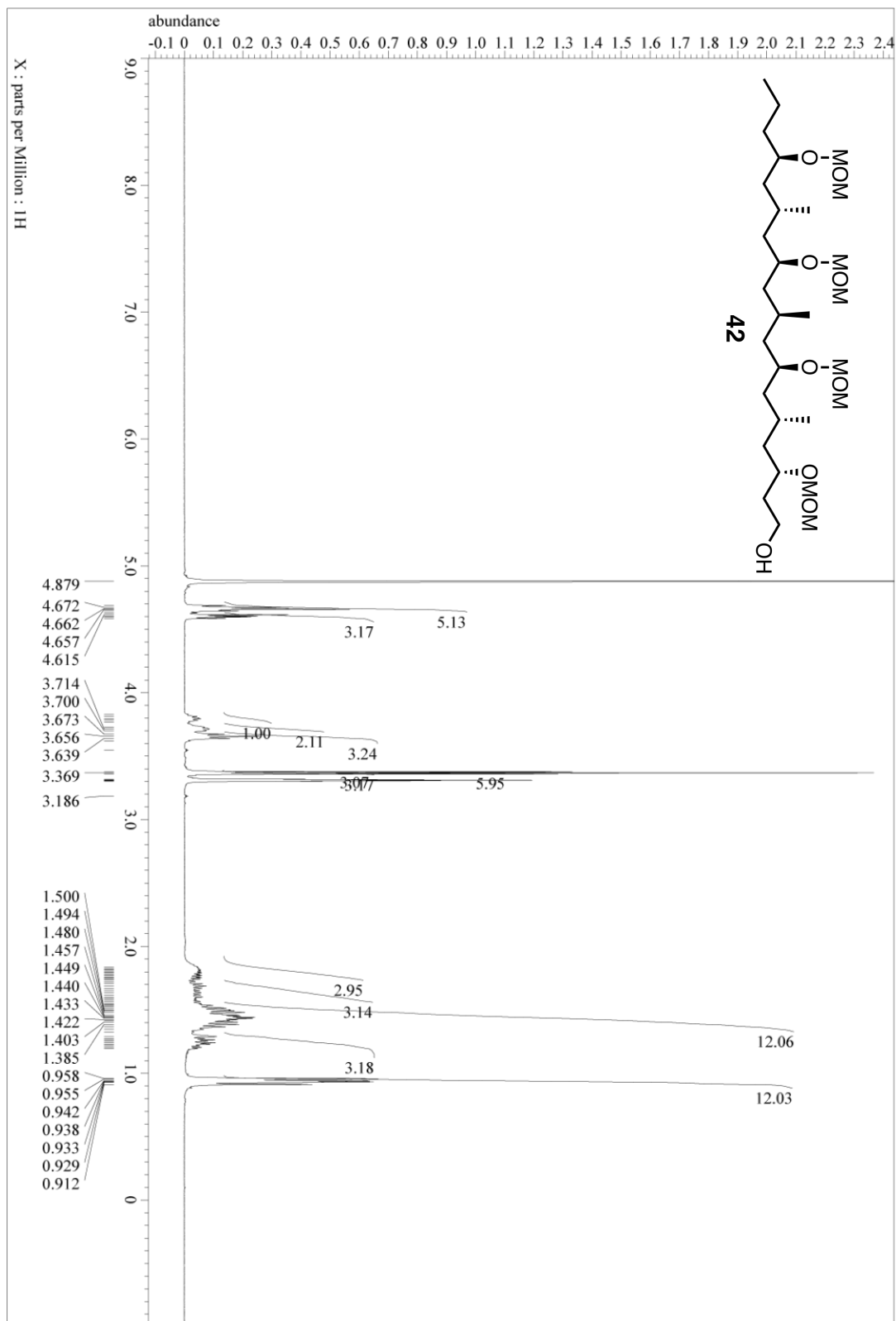


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **40**

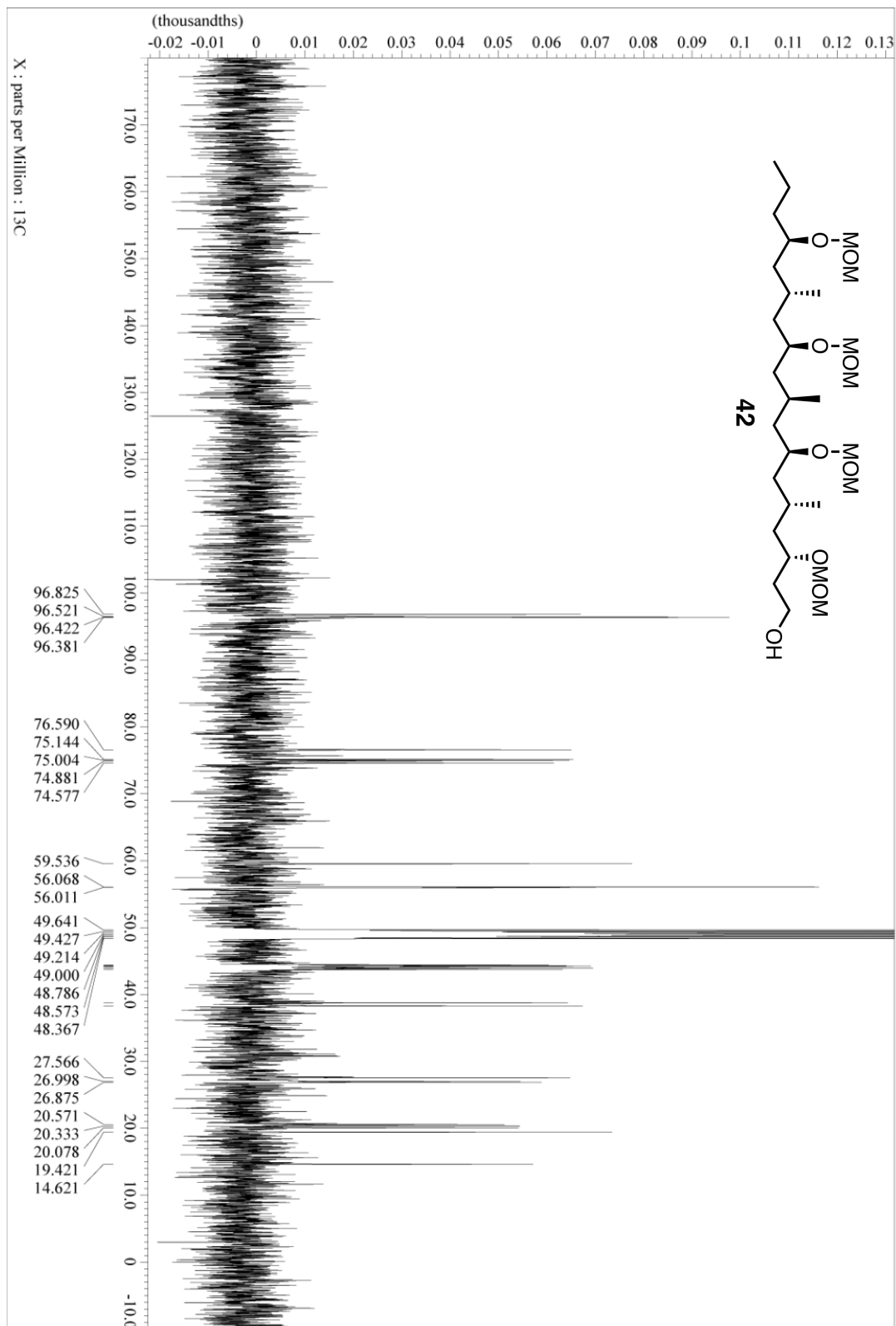


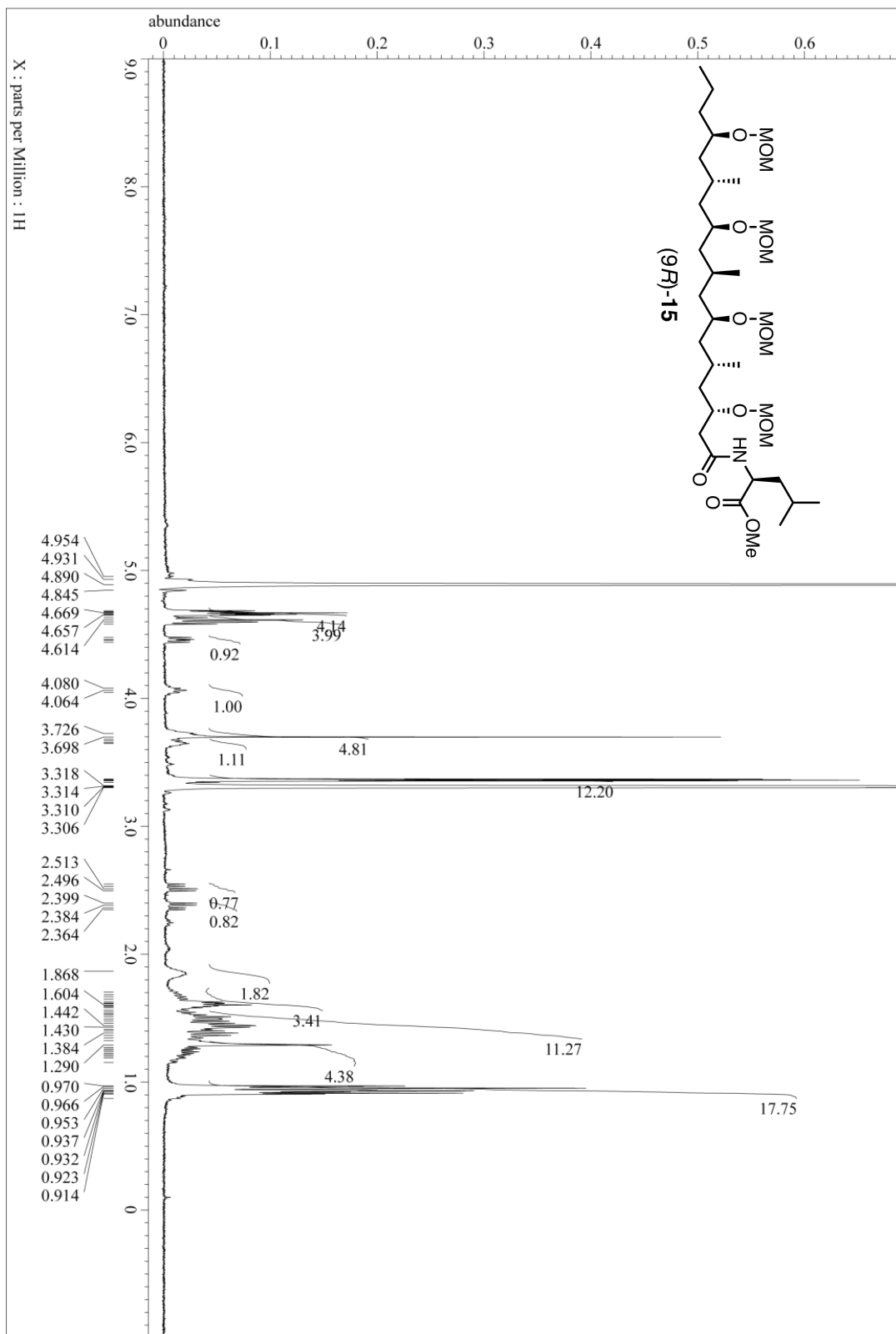


¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) spectrum of **42**

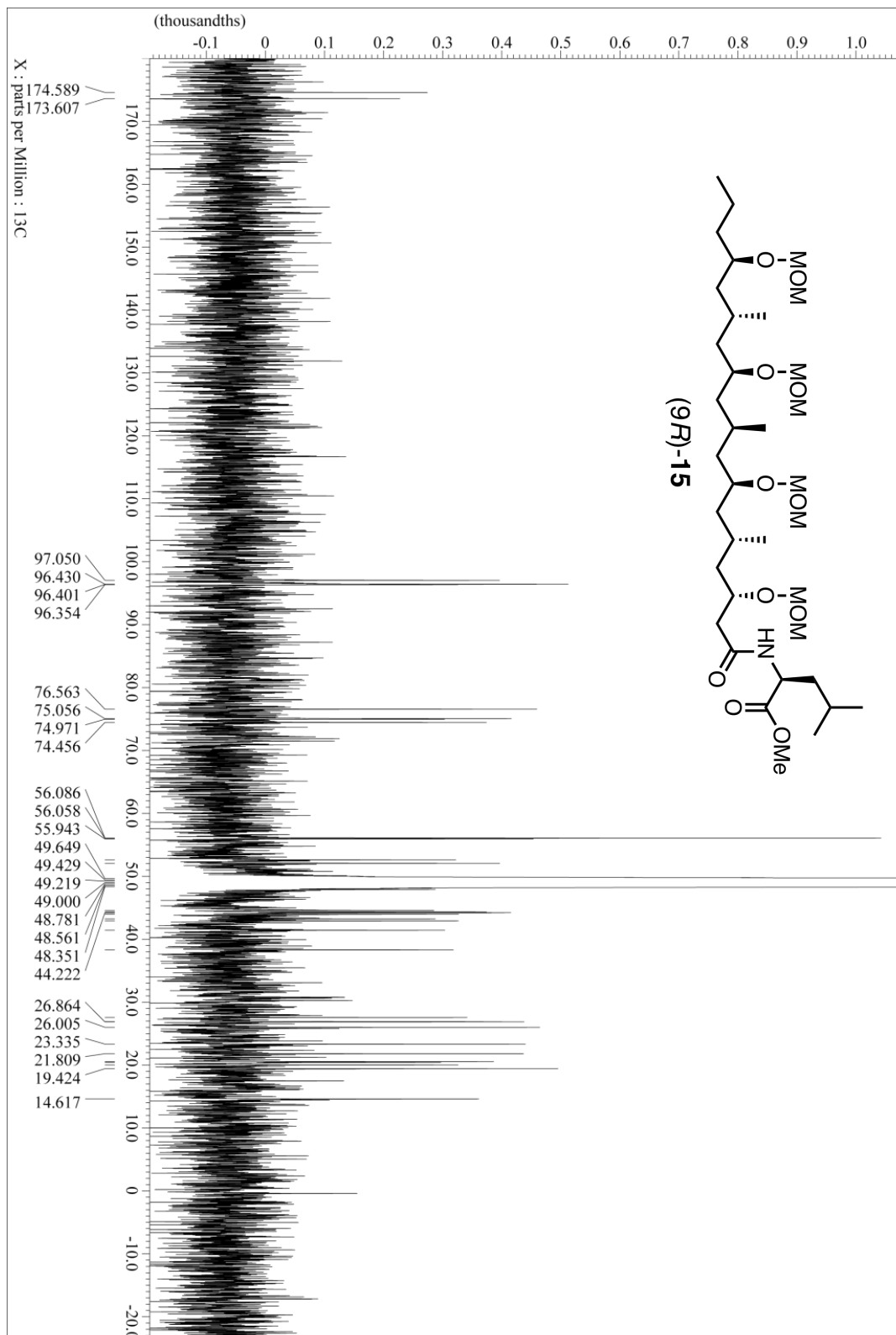


¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) spectrum of **42**



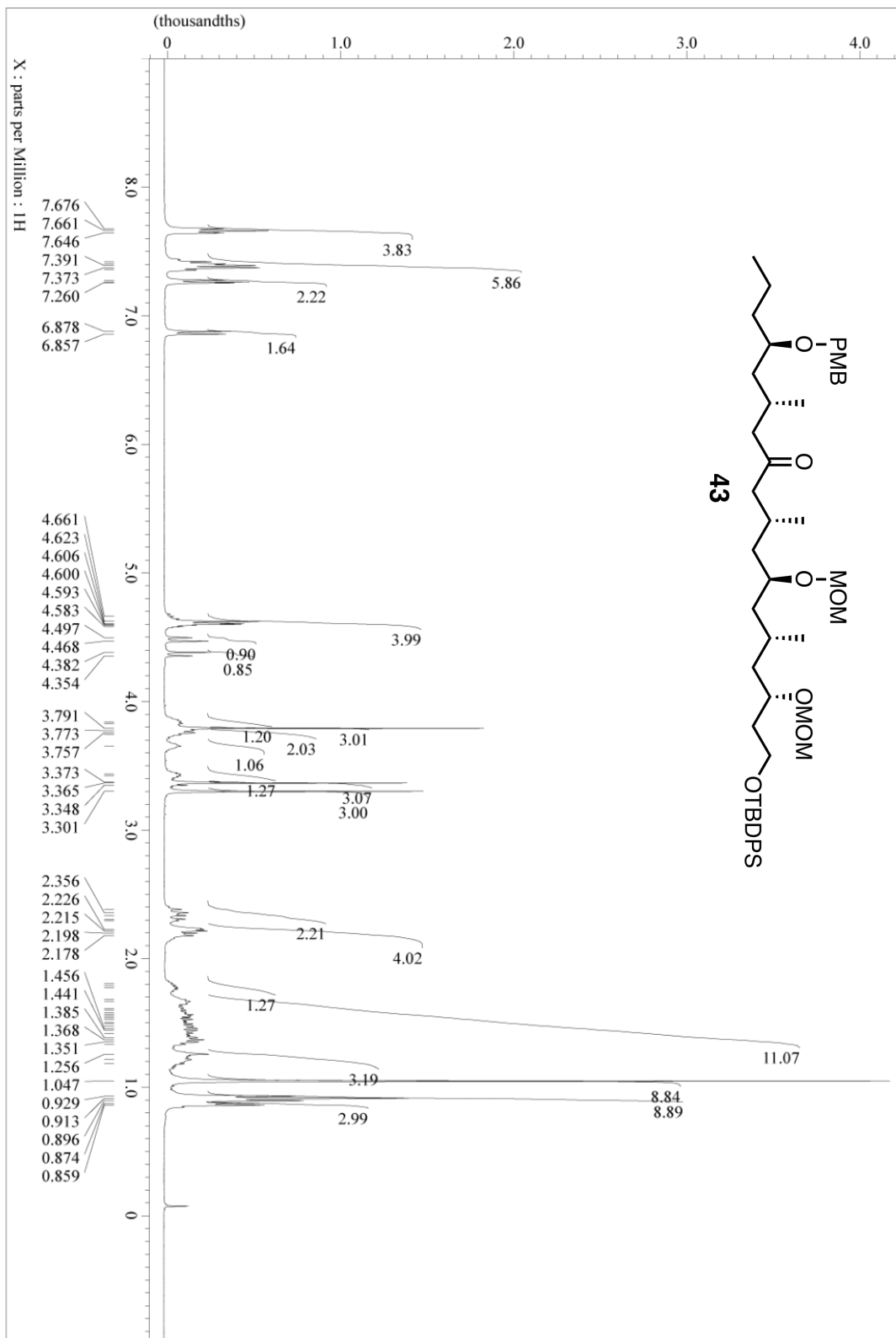


¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) spectrum of (9R)-15

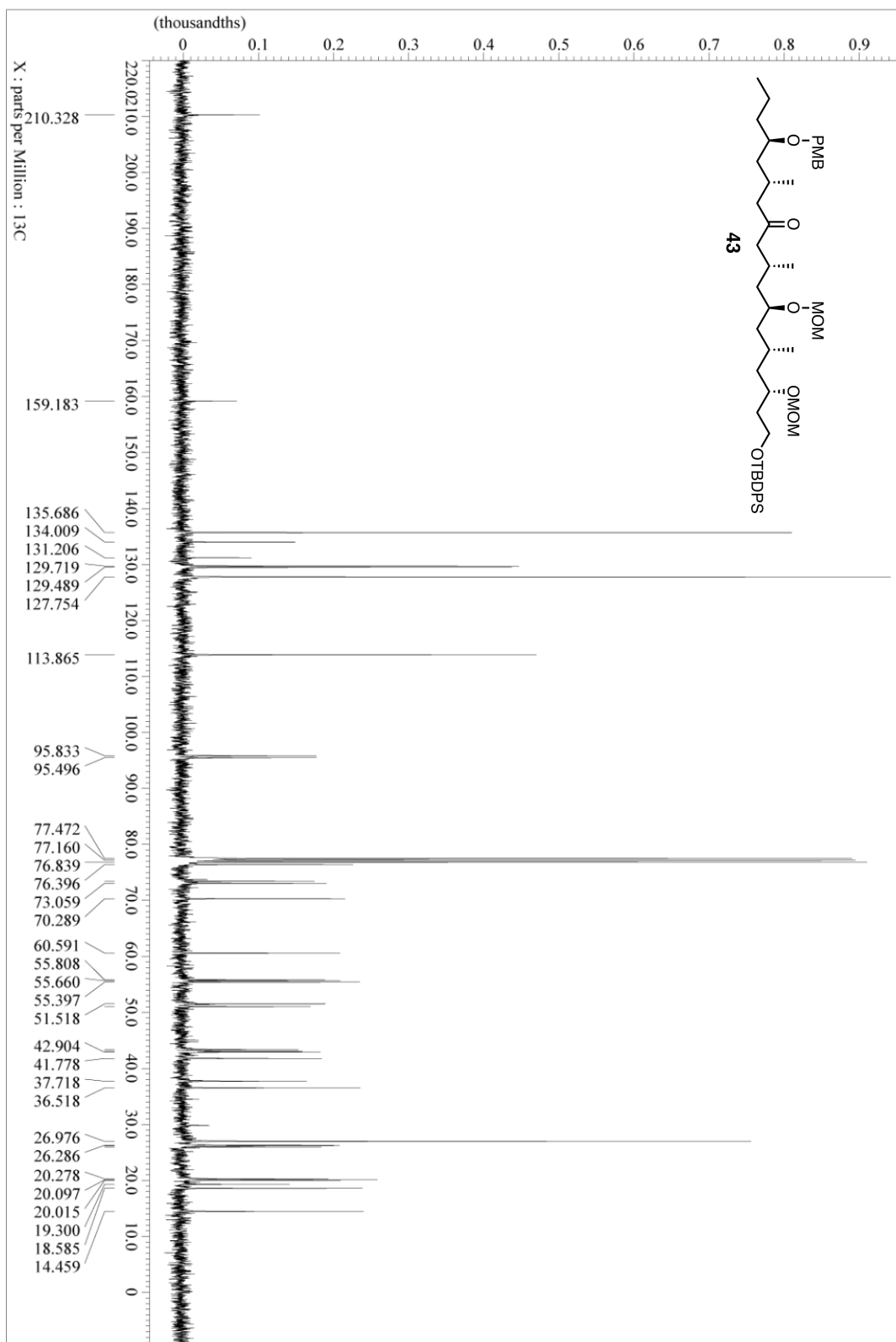


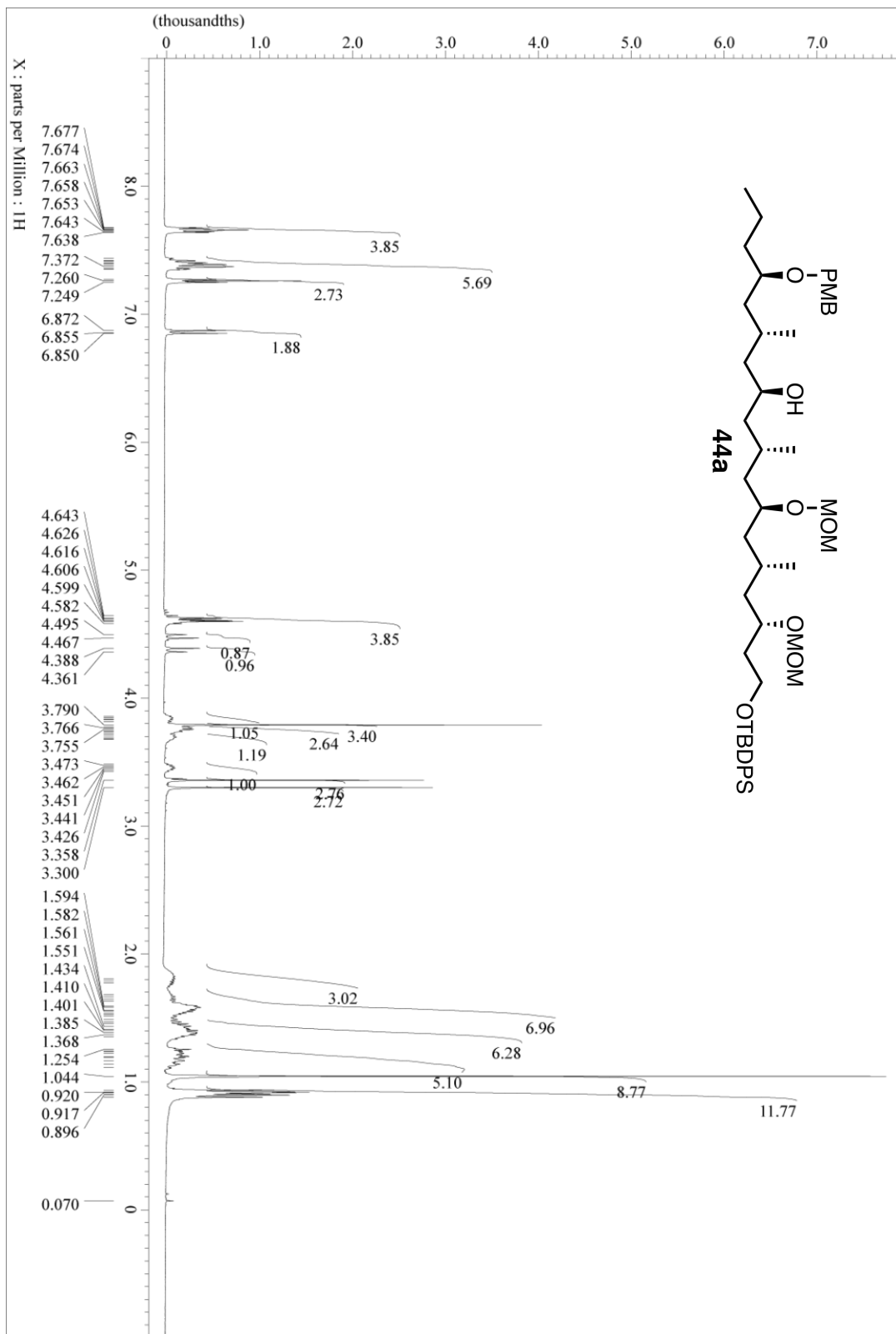
¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) spectrum of (9*R*)-15

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **43**



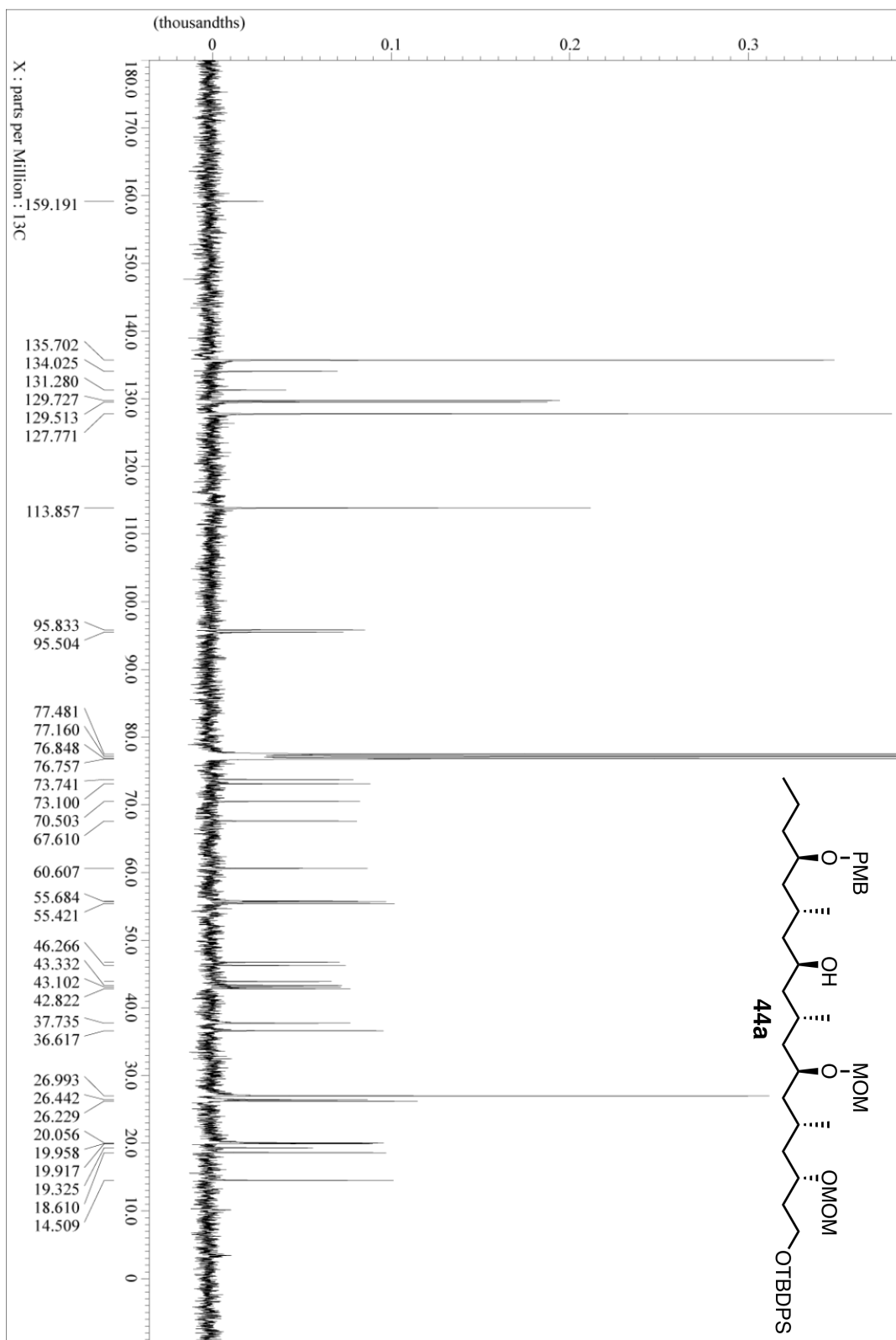
¹³CNMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum of **43**

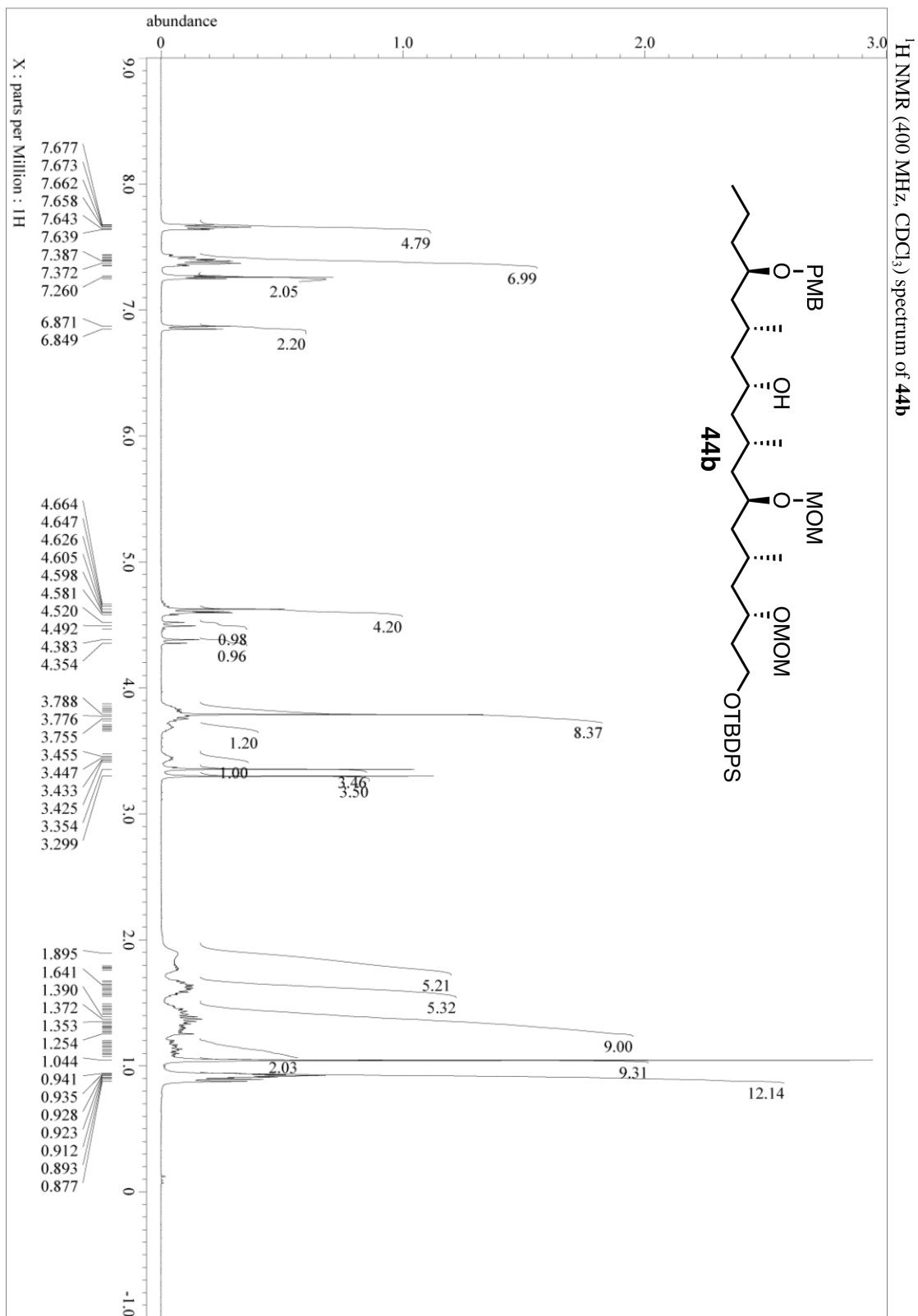


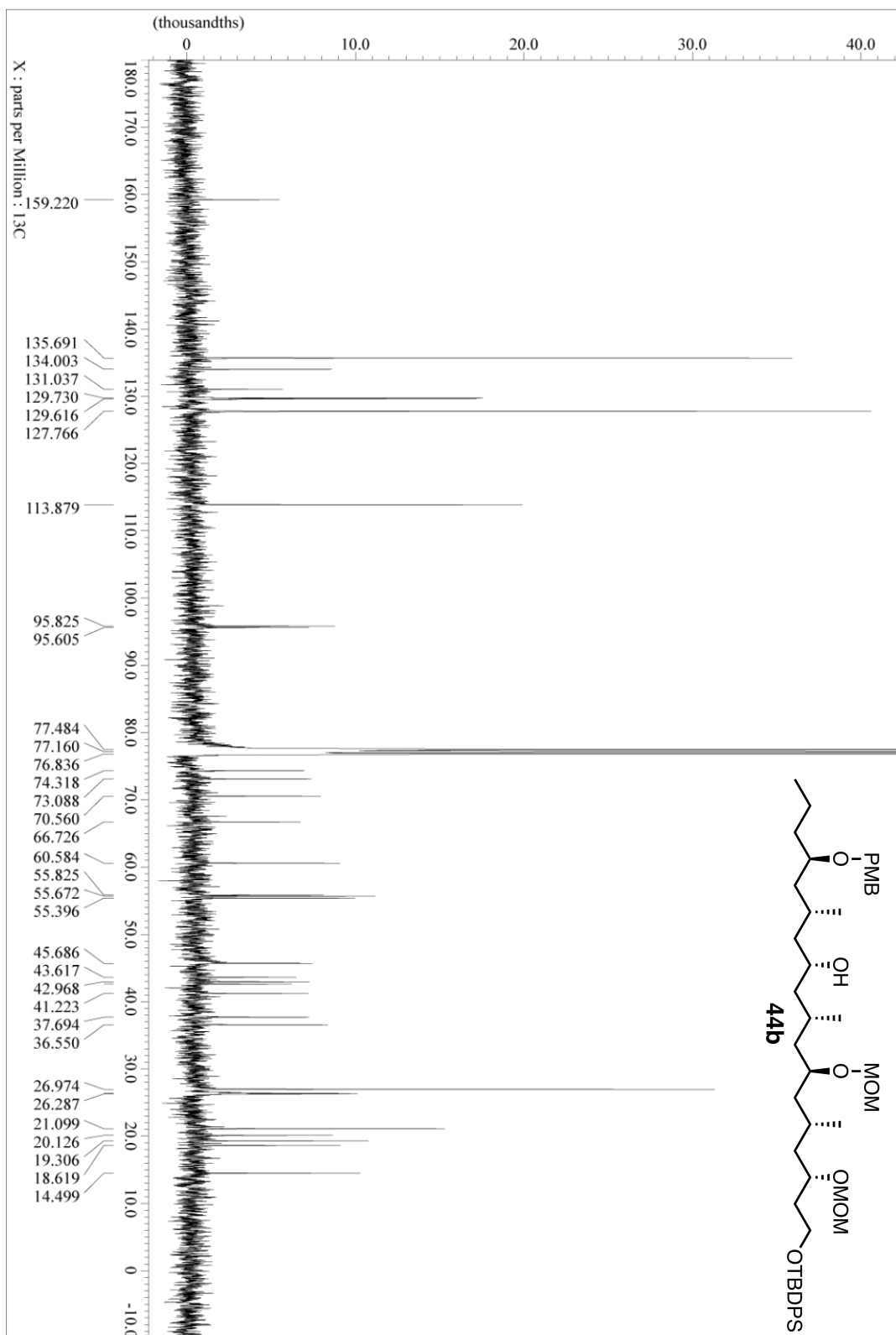


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **44a**

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum of **44a**

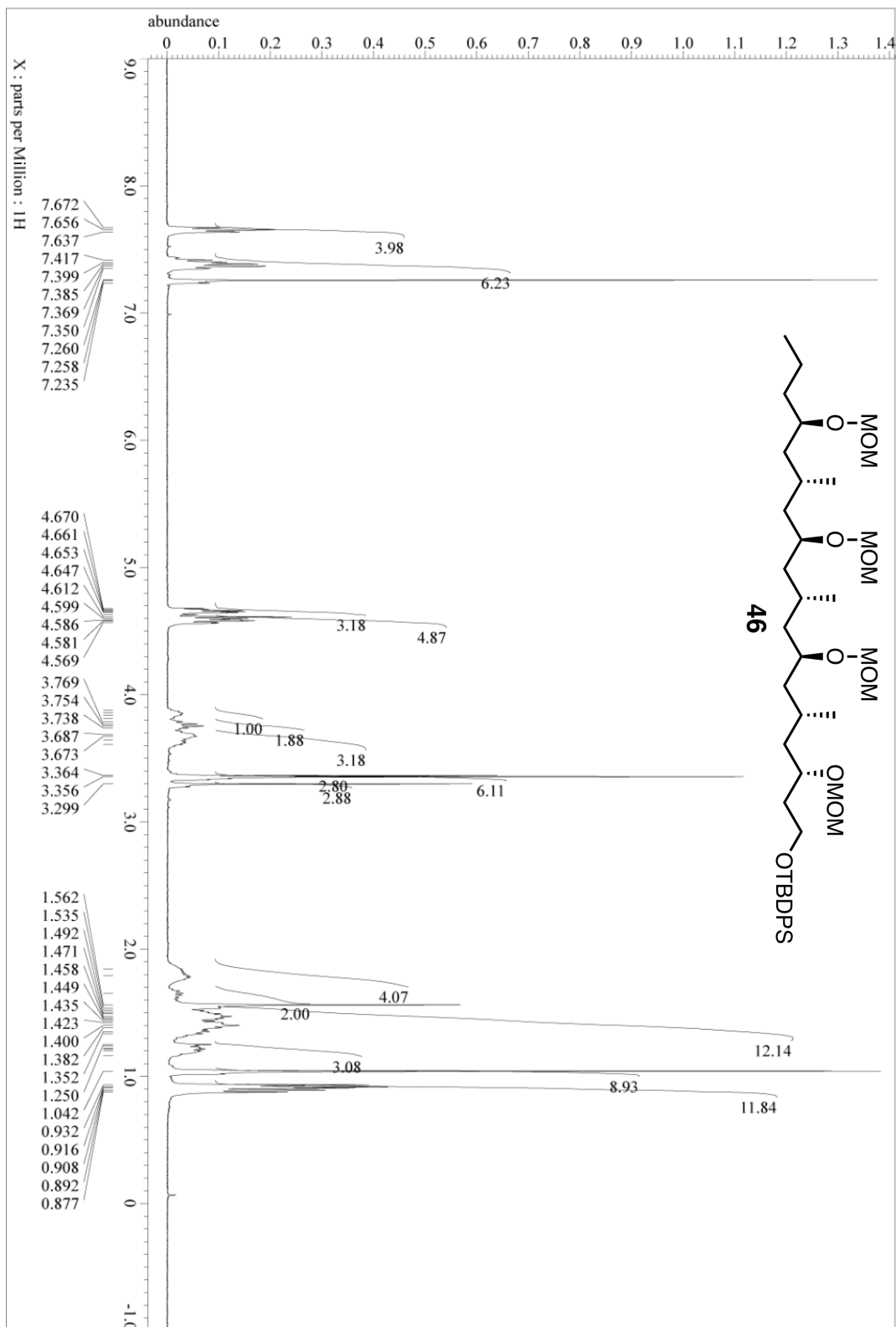




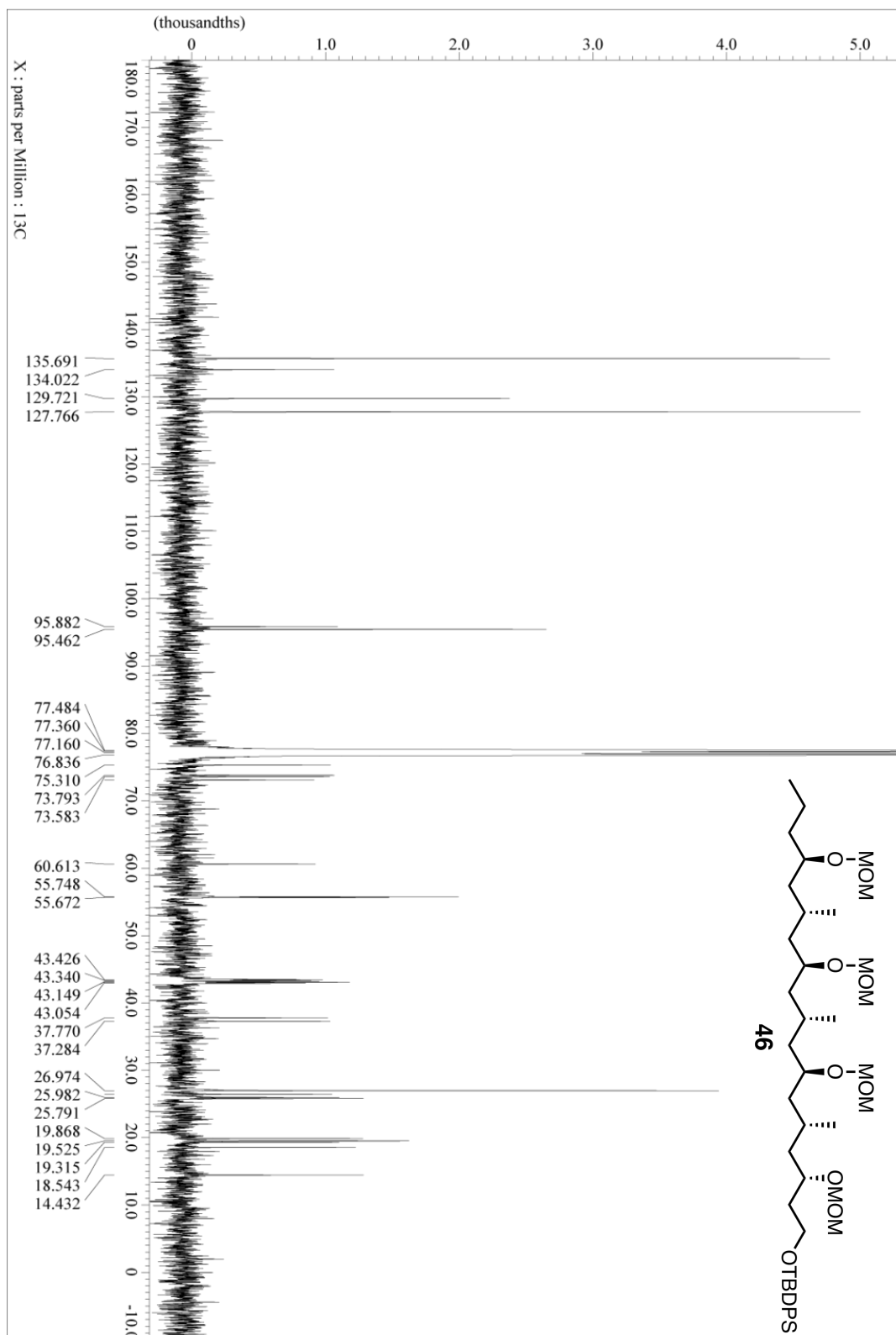


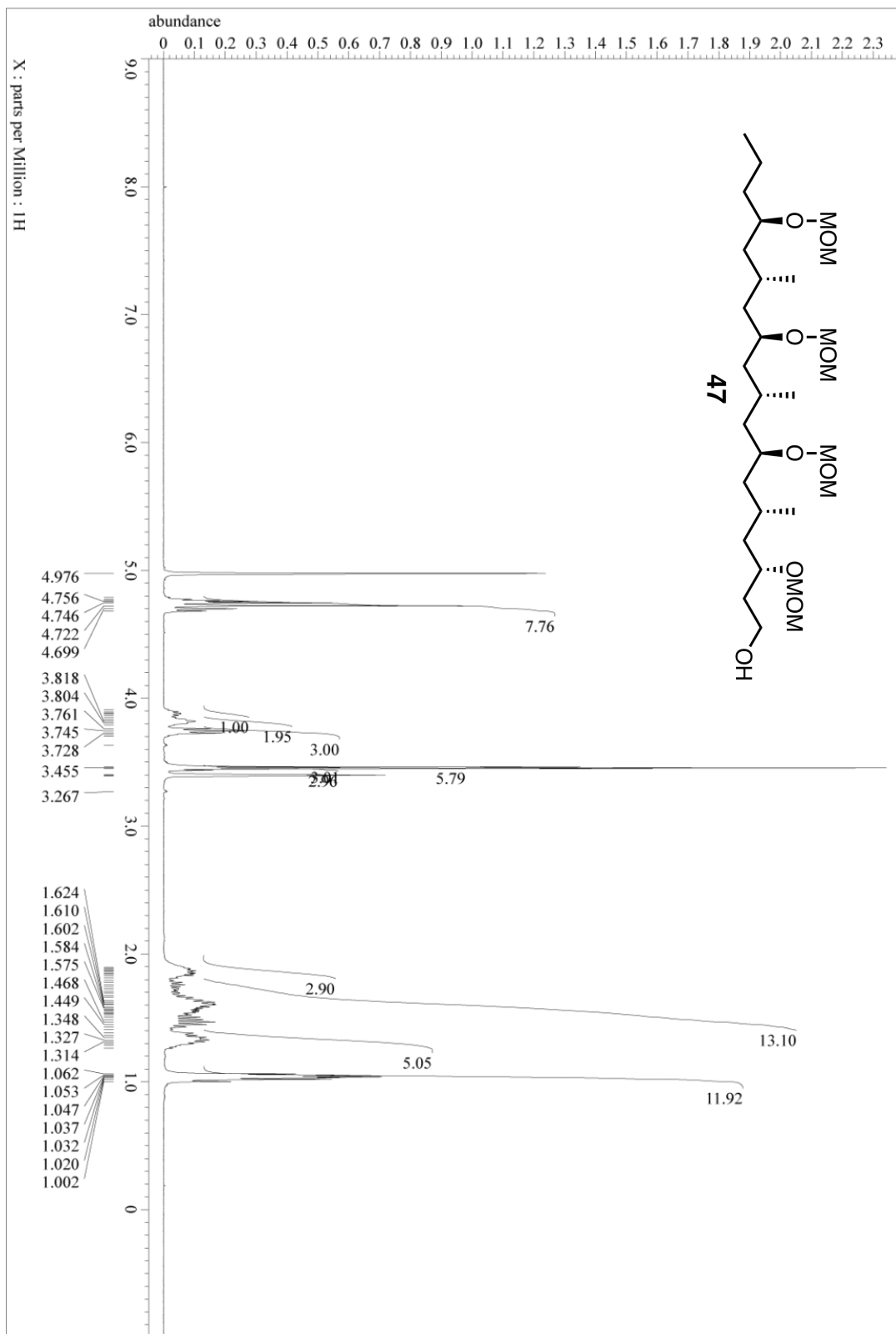
¹³CNMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum of **44b**

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **46**

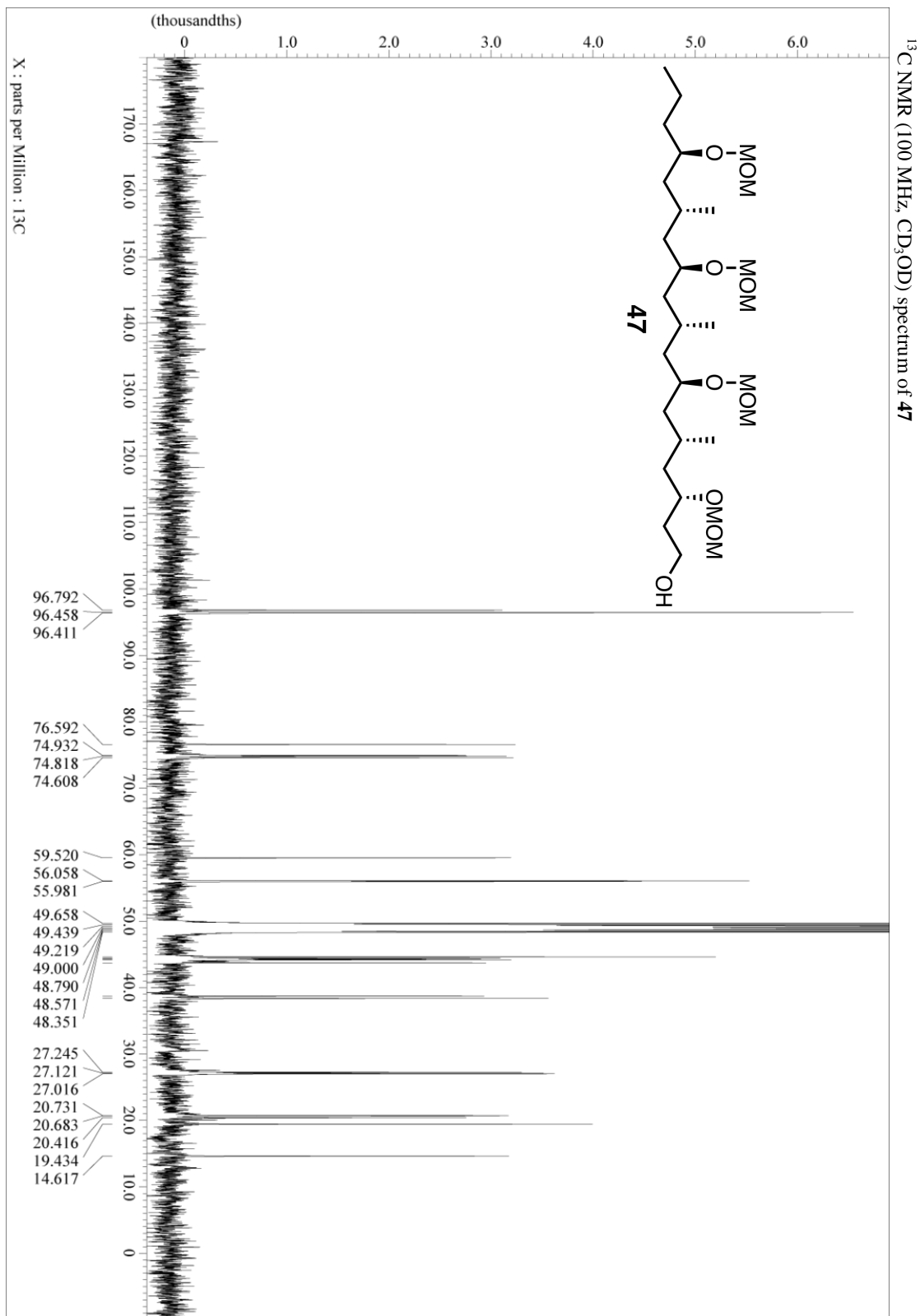


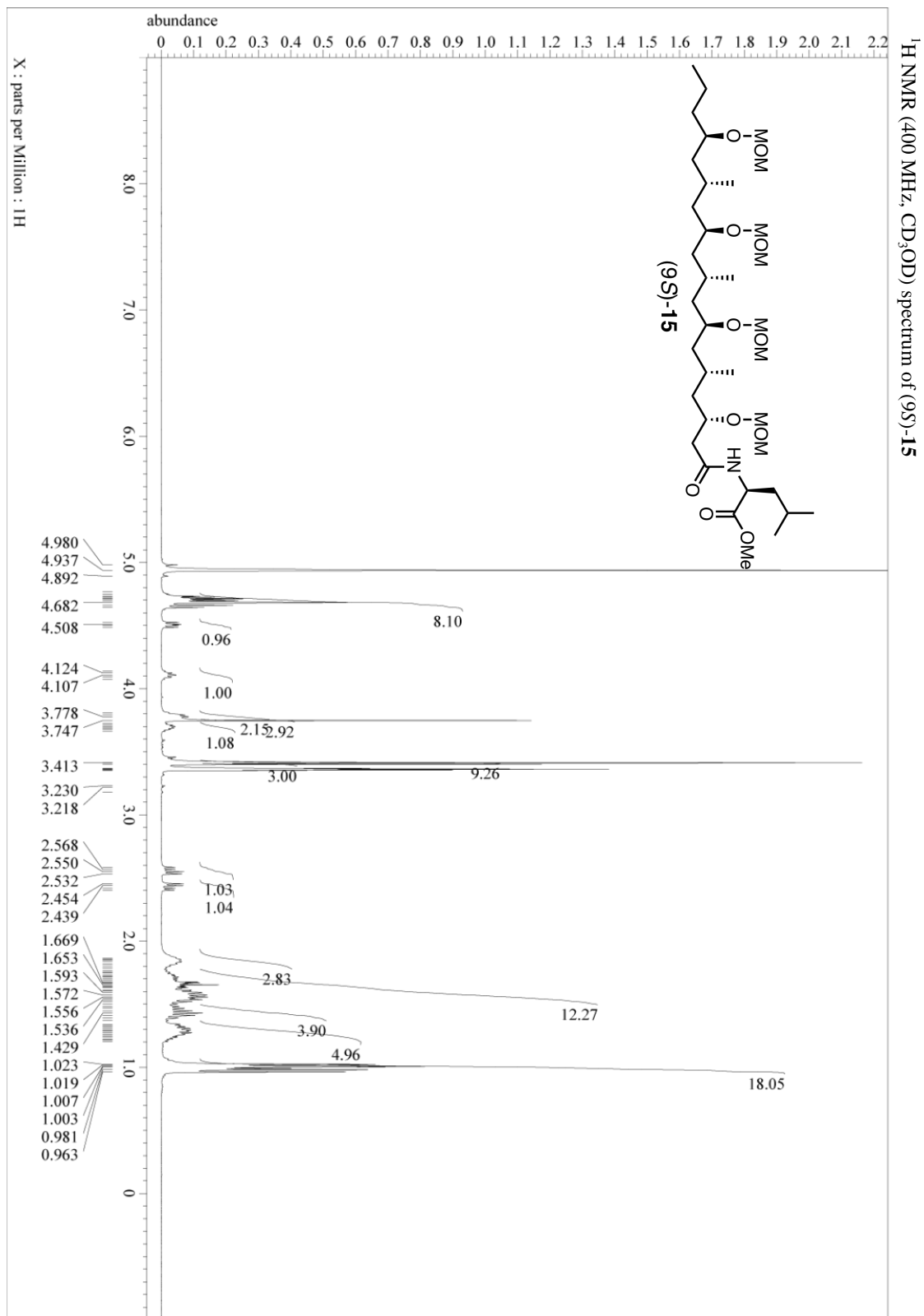
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) spectrum of **46**

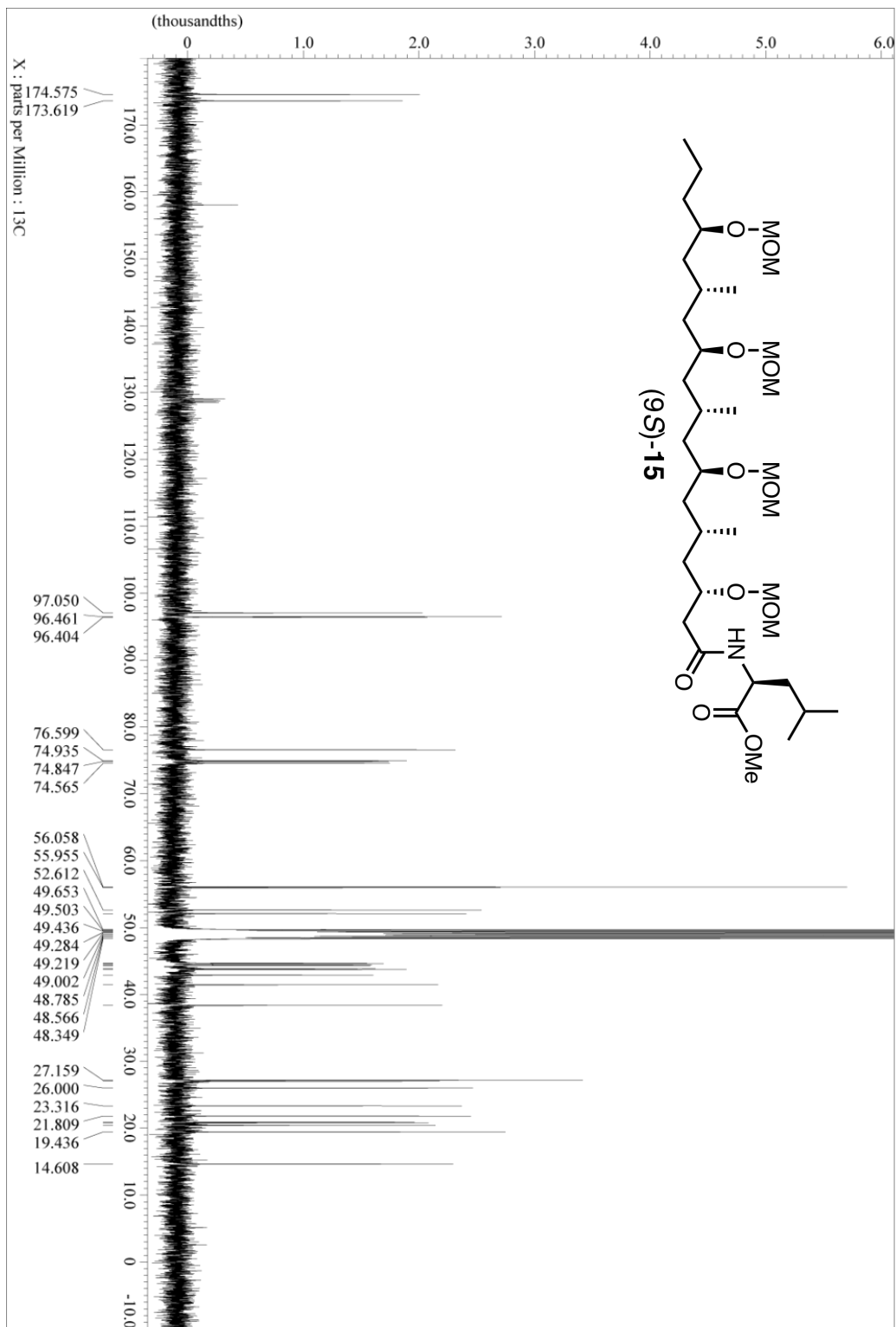




¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) spectrum of **47**







¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) spectrum of (9S)-15

参考文献

- (1) Shih, P. M.; Hemp, J.; Ward, L. M.; Matzke, N. J.; Fisher, W. W. *Geobiology* **2017**, *15*, 19-29.
- (2) Luo, G.; Ono, S.; Beukes, N. J.; Wang, D. T.; Xie, S.; Summons, R. E. *Sci. Adv.* **2016**, *2*, e1600134.
- (3) Burja, A. M.; Banaigs, B.; Abou-Mansour, E.; Burgess, J. G.; Wright, P. C. *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 9347-9377.
- (4) Dittmann, E.; Gugger, M.; Sivonen, K.; Fewer, D. P. *Trends Microbiol.* **2015**, *23*, 642-652.
- (5) Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Herald, C. L.; Tuinman, A. A.; Boettner, F. E.; Kizu, H.; Schmidt, J. M.; Baczynskyj, L.; Tomer, K. B.; Bontems, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6883-6885.
- (6) Luesh, H.; Moore, R. E.; Paul, V. J.; Mooberry, S. L.; Corbett, T. H. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 907-910.
- (7) Bai, R.; Petti, G. R.; Hamel, E. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *39*, 1941-1949.
- (8) Turner, T.; Jackson, W. H.; Pettit, G. R.; Wells, A.; Kraft, A. *Prostate* **1998**, *34*, 175-181.
- (9) Katz, J.; Janik, J. E.; Younes, A. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *15*, 6428-6436.
- (10) Shah, S. A. A.; Akhter, N.; Auckloo, B. N.; Khan, I.; Lu, Y.; Wang, K.; Wu, B.; Guo, Y. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 354.
- (11) Calteau, A.; Fewer, D. P.; Latifi, A.; Coursin, T.; Laurent, T.; Jokela, J.; Kerfeld, C. A.; Sivonen, K.; Piel, J.; Gugger, M. *BMC Genomics* **2014**, *15*, 977.
- (12) Edwards, D. J.; Marquez, B. L.; Nogle, L. M.; McPhail, K.; Goeger, D. E.; Roberts, M. A.; Gerwick, W. H. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 817-833.
- (13) Grindberg, R. V.; Ishoey, T.; Brinza, D.; Esquenazi, E.; Coates, R. C.; Liu, W. T.; Gerwick, L.; Dorrestein, P. C.; Pevzner, P.; Lasken, R.; Gerwick, W. H. *PLoS One* **2011**, *6*, e18565.
- (14) Gu, L.; Wang, B.; Kulkarni, A.; Geders, T. W.; Grindberg, R. V.; Gerwick, L.; Hakansson, K.; Wipf, P.; Smith, J. L.; Gerwick, W. H. and Sherman, D. H. *Nature* **2009**, *459*, 731-735.
- (15) Iwasaki, A.; Ohno, O.; Sumimoto, S.; Suda, S.; Suenaga, K. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 12840-12843.
- (16) Iwasaki, A.; Ohno, O.; Sumimoto, S.; Ogawa, H.; Kim, A. N.; Suenaga, K. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 652-655.
- (17) Ogawa, H.; Iwasaki, A.; Sumimoto, S.; Iwatsuki, M.; Ishiyama, A.; Hokari, R.; Otoguro, K.; Omura, S.; Suenaga, K. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 1862-1866.
- (18) Ogawa, H.; Iwasaki, A.; Sumimoto, S.; Iwatsuki, M.; Ishiyama, A.; Hokari, R.; Otoguro, K.; Omura, S.; Suenaga, K. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 890-893.
- (19) Van de Bittner, K. C.; Nicholson, M. J.; Bustamante, L. Y.; Kessans, S. A.; Ram, A.; van Dolleweerd, C. J.; Scott, B.; Parker, E. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 582-585.
- (20) Liu, X.; Liu, D.; Xu, M.; Tao, M.; Bai, L.; Deng, Z.; Pfeifer, B. A.; Jiang, M. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 72-77.
- (21) Sun, H.; Liu, Z.; Zhao, H.; Ang, E. L. *Drug Des., Dev. Ther.* **2015**, *9*, 823.
- (22) Weissman, K. J.; Leadlay, P. F. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 925-936.

- (23) Rix, U.; Fischer, C.; Remsing, L. L.; Rohr, J. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 542-580.
- (24) Khosla, C.; Zawada, R. J. X. *Trends Biotechnol.* **1996**, *14*, 335 – 341.
- (25) Courtois, S.; Cappellano, C. M.; Ball, M.; Francou, F. X.; Normand, P.; Helynck, G.; Martinez, A.; Kolvek, S. J.; Hopke, J.; Osburne, M. S. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 49-55.
- (26) Lam, K. S. *Trends Microbiol.* **2007**, *15*, 279-289.
- (27) Hutchinson, C. R. *Curr. Opin. Microbiol.* **1998**, *1*, 319 – 329.
- (28) Stanier, R. Y.; Cohen-Bazire, G. *Annu. Rev. Microbiol.* **1977**, *31*, 225-274.
- (29) Castenholz, R. W. *J. Phycol.* **1992**, *28*, 737-745.
- (30) Castenholz, R. W. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn.* Springer: New York. **2001**, 473–600.
- (31) Komárek, J. *Hydrobiologia* **2010**, *639*, 245-259.
- (32) Pringsheim, E. G. *Pure Cultures of Algae*, Cambridge University Press: London, **1949**.
- (33) Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55-63.
- (34) Rello, S.; Stockert, J. C.; Moreno, V.; Gámez, A.; Pacheco, M.; Juarranz, A.; Cañete, M.; Villanueva, A. *Apoptosis* **2005**, *10*, 201-208.
- (35) Ojima, D.; Iwasaki, A.; Suenaga, K. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 12503-12510.
- (36) Reddy, D. S.; Zhang, N.; Yu, Z.; Wang, Z.; He, Y. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 11262-11268.
- (37) Rodrigue, S.; Malmstrom, R. R.; Berlin, A. M.; Birren, B. W.; Henn, M. R.; Chisholm, S. W. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6864.
- (38) Orjala, J.; Gerwick, W. H. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 427-430.
- (39) Edwards, D. J.; Marquez, B. L.; Nogle, L. M.; McPhail, K.; Goeger, D. E.; Roberts, M. A.; Gerwick, W. H. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 817-833.
- (40) Chang, Z.; Flatt, P.; Gerwick, W.; Nguyen, V.; Willis, C.; Sherman, D. *Gene* **2002**, *296*, 235-247.
- (41) Botes, D. P.; Wessels, P. L.; Kruger, H.; Runnegar, M. T. C.; Santikarn, S.; Smith, R. J.; Barna, J. C. J.; Williams, D. H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1985**, *1*, 2747-2748.
- (42) W.W. Carmichael, W. W.; Beasley, V.R.; Bunner, D.L.; Eloff, J.N.; Falconer, I.; Gorham, P.; Harada, K.-I.; Krishnamurthy, T.; Yu, M-J.; Moore, R.E.; Rinehart, K.; Runnegar, M.; Skulberg, O.M.; Watanabe M.F. *Toxicon* **1988**, *26*, 971-973.
- (43) Chen, R. H., Buko, A. M., Whittern, D. N., and McAlpine, J. B. *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 512-520.
- (44) Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Döhren, H., Börner, T., and Neilan, B. A. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 753-764.
- (45) Zhang, W.; Ostash, B.; Walsh, C. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 16828-16833.
- (46) Tan, L. T.; Okino, T.; Gerwick, W. H. *Mar. Drugs.* **2013**, *11*, 3015-3024.
- (47) Klein, D., Braekman, J. C., and Dalozze, D. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7519-7520.
- (48) Pereira, A. R.; Cao, Z.; Engene, N.; Soria-Mercado, I. E.; Murray, T. F.; Gerwick, W. H. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4490-4493.

- (49) Leao, T.; Castela, G.; Korobeynikov, A.; Monroe, E. A.; Podell, S.; Glukhov, E.; Allen, E. E.; Gerwick, W. H.; Gerwick, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, 3198-3203.
- (50) Engene, N.; Paul, V. J.; Byrum, T.; Gerwick, W. H.; Thor, A.; Ellisman, M. H. *J. phycol.* **2013**, *49*, 1095-1106.
- (51) Marfey, P. *Carlsberg Res. Commun.* **1984**, *49*, 591 – 596.
- (52) Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092-4096.
- (53) Keck, G. E.; Palani, A.; McHardy, S. F. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3113-3122.
- (54) Ghosh, A. K.; Liu, C. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 635-638.
- (55) Ghosh, A. K.; Wang, Y. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2319-2322.
- (56) Brown, H. C.; Jadhav, P. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2092-2093
- (57) Grove, C. I.; Fetting, J. C.; Shaw, J. T. *Synthesis* **2012**, *44*, 362-371.
- (58) Chen, N.; Jia, W.; Xu, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *33*, 5841-5846.
- (59) Cheignon, C.; Jones, M.; Atrián-Blasco, E.; Kieffer, I.; Faller, P.; Collin, F.; Hureau, C. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 5107-5118.
- (60) Lan, A. P.; Chen, J.; Chai, Z. F.; Hu, Y. *Biometals* **2016**, *29*, 665-678.
- (61) Dixon, S. J.; Lemberg, K. M.; Lamprecht, M. R.; Skouta, R.; Zaitsev, E. M.; Gleason, C. E.; Patel, D. N.; Bauer, A. J.; Cantley, A. M.; Yang, W. S.; Morrison, B.; Stockwell, B. R. *Cell* **2012**, *149*, 1060-1072.
- (62) Calderone, C. T. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 845-853.
- (63) Luesch, H.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Paul, V. J.; Corbett, T. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5418-5423.
- (64) Yang, W. S.; SriRamaratnam, R.; Welsch, M. E.; Kenichi, S.; Skouta, R.; Viswanathan, V. S.; Cheah, J. H.; Clemons, P. A.; Shamji, A. F.; Clish, C. B.; Brown, L. M.; Girotti, A. W.; Cornish, V. W.; Schreiber, S. L.; Stockwell, B. R. *Cell* **2014**, *156*, 317-331.
- (65) Gupte, A.; Mumper, R. J. *Cancer Treat. Rev.* **2009**, *35*, 32-46.
- (66) Ahuja, A.; Dev, K.; Tanwar, R. S.; Selwal, K. K.; Tyagi, P. K. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2015**, *29*, 11-23.
- (67) Nübel, U.; Garcia-Pichel, F.; Muyzer, G. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 3327-3332.
- (68) Embley, T. M. *Lett. Appl. Microbiol.* **1991**, *13*, 171-174.
- (69) Pruesse, E.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 1823-1829.
- (70) Talavera, G.; Castresana, J. *Syst. Biol.* **2007**, *56*, 564-577.
- (71) Castresana, J. *Mol. Biol. Evol.* **2000**, *17*, 540-552.
- (72) Darriba D.; Taboada G. L.; Doallo R.; Posada D. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 772.
- (73) Guindon, S.; Gascuel, O. *Syst. Biol.* **2003**, *52*, 696-704.
- (74) Perrière, G.; Gouy, M. *Biochimie* **1996**, *78*, 364-369.
- (75) Ronquist, F.; Teslenko, M.; van der Mark, P.; Ayres, D. L.; Darling, A.; Höhna, S.; Larget, B.; Liu, L.; Suchard, M. A.; Huelsenbeck, J. P. *Syst. Biol.* **2012**, *61*, 539–542.

- (76) Lepère, C.; Wilmotte, A.; Meyer, B. *Syst. Geogr. Plants* **2000**, 70, 275-283.
- (77) Ghosh, A. K.; Wang, Y.; Kim, J. T. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 8973-8982.
- (78) Mozingo, R. *Org. Synth.* **1955**, 3, 181.

謝辞

本研究は、慶應義塾大学理工学研究科 天然物化学研究室において、末永聖武教授のご指導のもとに行ったものである。

生物系の分野出身であり、有機化学の知識の全くなかった私を快く受け入れ、いつもあたたかくご指導して下さった末永聖武教授に心より感謝申し上げます。構造決定や有機合成で困った時に的確なご助言をいただき、厚く御礼申し上げます。

学部、修士課程に渡って研究のご指導くださった琉球大学理学部 須田彰一郎教授に心より感謝申し上げます。シアノバクテリアの培養や種同定、分子実験に至るまでシアノバクテリア研究の基礎をご指導いただき、厚く御礼申し上げます。

本論文を作成するにあたり、貴重なお時間を割いてご指導くださいました慶應義塾大学理工学部 藤本ゆかり教授、犀川陽子准教授、高橋大介准教授に心より感謝申し上げます。

常にあたたかい笑顔で励まし、ご指導とご助言くださいました慶應義塾大学理工学部 大野修助教 (現工学院大学先進工学部 准教授) に心より感謝申し上げます。

構造決定や論文作成にあたってご指導とご助言くださいました慶應義塾大学理工学部 岩崎有紘助教に心より感謝申し上げます。

海洋シアノバクテリアの採集、サンプルの提供をして頂きました琉球大学理学部 須田彰一郎教授、琉球大学教育学部 照屋俊明教授に心より感謝申し上げます。

構造決定に関して、800 MHz による NMR 測定にご協力くださいました岐阜大学生命科学総合研究支援センター 犬塚俊康助教に心より感謝申し上げます。

ゲノム解読に関してご協力くださいました東京工業大学理学部 工藤史貴准教授に心より感謝申し上げます。

同年度に研究室に入り、共に学び、時には励ましあい、よき相談者となってくれた小川英俊氏、岡本慎一朗氏に心より感謝申し上げます。実験がうまくいかず、泥沼にはまってしまった時にも彼らに支えていただいたおかげで楽しく研究を続けることができました。厚く御礼申し上げます。

Minnamide A 脂肪酸部の合成に協力していただいた四宮誠一氏、小林正幸氏、佐藤理央氏に心より感謝いたします。実験がうまくいかない時もくじけず常に頑張ってくれた三人の協力なくしては構造決定には至りませんでした。厚く御礼申し上げます。

Minnamide A 脂肪酸部の合成に着手した時に、有機合成について右も左も分からなかった私に、困った時に助言や相談に多くの時間を割いていただいた小

島大輔氏に心より感謝いたします。合成ルートや反応機構についての相談にのって頂いたおかげで、無事に合成を完了することができました。厚く御礼申し上げます。

同じ単離構造決定・作用機序解明班であり、多くの時間を過ごしよき話し相手となって頂いた小川英俊氏、蓼沼隆人氏、金森祐紀氏、塩田育万氏、岩崎慶太郎氏、保科静香氏、牧久美子氏に心より感謝いたします。彼らのおかげで楽しい研究生生活を送ることができました。厚く御礼申し上げます。

また、塩田育万氏とともに明るい研究室の雰囲気を作っていたいただいた佐藤美帆氏に心より感謝いたします。

Minnamide A 脂肪酸部の合成に着手してからよき話し相手となり相談相手となって頂いた合成班の小島大輔氏、藤村遥氏、小林正幸氏、鄭丞宰氏、松下宇志氏、大友啓介氏、佐藤理央氏に心より感謝いたします。彼らのおかげで楽しい研究生生活を送ることができました。厚く御礼申し上げます。

また、お昼ご飯をともに食べ、多くの楽しい時間をともにした研究室の皆様へ心より感謝いたします。

最後に、

常に私のそばで、ともに歩み、笑い、いかなる時でも励まし、様々な形で支援してくれた妻 陽子に心より感謝いたします。常に私の味方で辛い時も支えてくれ、研究を続けることができました。改めて厚く御礼申し上げます。

長きにわたる研究生生活において私を信じ、惜しみなく支援し、励ましてくれた父 泰、母 由美子に心から感謝いたします。研究生生活を送る上で大きな精神的支えとなりました。改めて厚く御礼申し上げます。

澄本慎平