

学位論文 博士（理学）

高度に水酸化されたカルバサイクル類の
化学－酵素複合合成

2010 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

濱田 学

目次

第一章 序論	1
第二章 高度に水酸化された多環性カルボン酸エステルのエステラーゼを用いた速度論的分割	
1. 緒言	6
2. 三環性エポキシエステルの鏡像選択的加水分解	9
2-1. 酵素のスクリーニング	9
2-2. 反応性向上を目指したエステルの分子設計と評価	10
2-3. エステル側鎖の極性が反応性に与える影響	12
2-4. 絶対立体配置の決定	14
2-5. 基質の大量調製法確立	15
3. 関連する生物活性物質への展開	17
3-1. オセルタミビル中間体への誘導	17
3-2. 3-エピシキミ酸エステルへの誘導	18
第三章 リパーゼを活用した、シクリトール類の位置・鏡像選択的変換	
1. 緒言	20
2. リパーゼを用いたシクリトール類に対する立体選択的反応	21
2-1. 3-エピシキミ酸エステルに対する位置・鏡像選択的アシル化の試み	21
2-2. C-5 位水酸基に TBS 基を導入した基質の調製	22
2-3. リパーゼを用いた遊離水酸基の位置・鏡像選択的アシル化の試み	23
2-4. リパーゼを用いた位置・鏡像選択的エステル交換	25
2-5. 絶対立体配置の決定	28
3. 生物活性をもつシクリトール類の合成にむけて	28
3-1. 分離した鏡像異性体をどう活用するか	28
3-2. 立体・位置選択的水酸化と脱水で新しい有用物質へ	29

第四章 化学的不斉合成および酵素触媒反応を活用した NF- κ B 活性化阻害剤、

(2*S*,3*S*,4*S*)-DHMEQ の合成

1. 緒言	31
2. 逆合成解析	36
3. 不斉エポキシ化	37
3-1. キノンモノアセタールの調製	37
3-2. 不斉エポキシ化の試み	39
3-3. 不斉エポキシ化に供する新たな基質、bis-Boc 体の調製	40
3-4. Bis-Boc 体を用いた不斉エポキシ化	41
4. (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-DHMEQ の純粋な鏡像異性体合成	43
4-1. ジアシル化 DHMEQ への誘導	43
4-2. (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-体にエンリッチされた前駆体 (79.8% ee) に対する リパーゼの反応	47
第五章 総括	49
実験の部	53
引用文献	76
謝辞	79

第一章 序論

天然には人類にとって有益な、高度に水酸化されたカルバサイクル類¹⁾が数多く知られ、糖質を含めそれをモチーフとした医薬が創成されている (Figure 1)。例えば、インフルエンザ治療薬として用いられる oseltamivir、強力な α -グリコシダーゼ阻害活性を示す voglibose、抗 MRSA 薬として用いられるアミノグリコシド系抗生物質の arbekacin 等があげられる。それらの生物活性発現は、分子内に多数存在する不斉中心の立体化学に大きく影響されることから、出発原料から適切に誘導し、立体選択的に合成する技法が要求される。

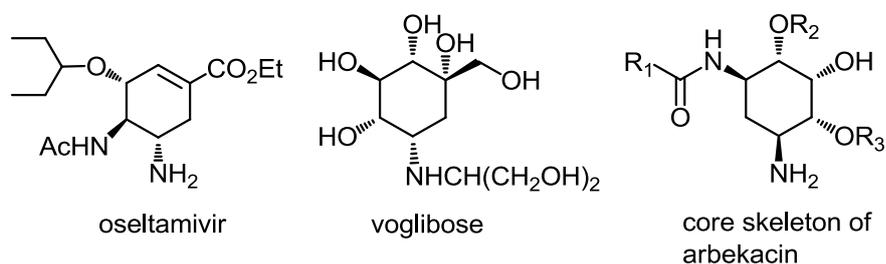
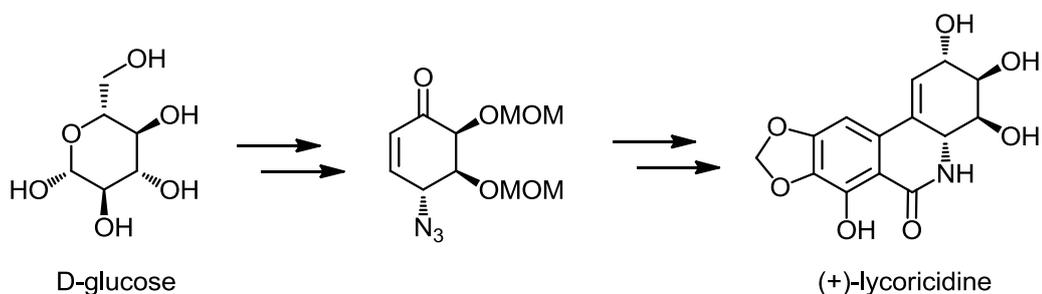


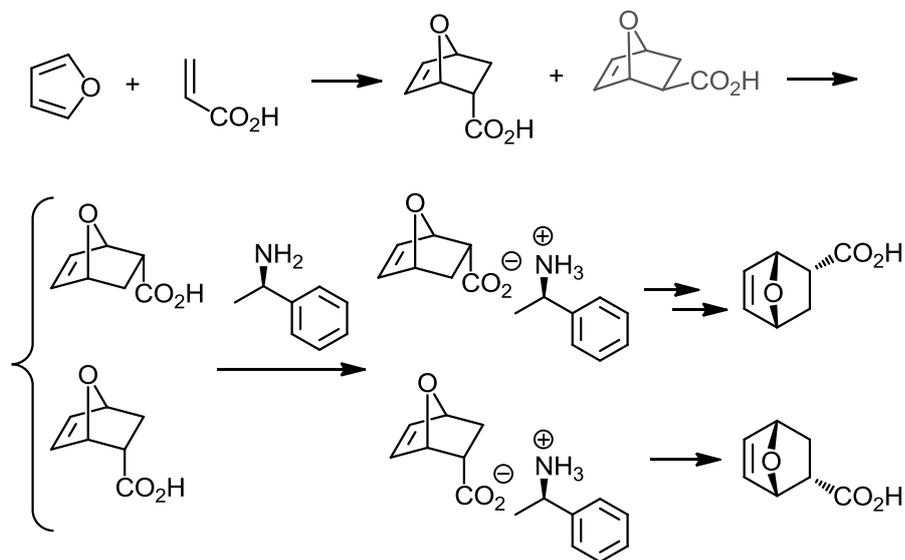
Figure 1

これらの化合物の合成には、1) 天然に豊富な糖質やカルバサイクル類から出発する「キラルプール法」2) 汎用性の高い前駆体をラセミ体として合成、鏡像異性体を分離する方法 (光学分割) がこれまで主として用いられてきた。1) の例として、千田・小川は、D-glucose からフェリエ環化を利用してカルバサイクルを形成、このものから (+)-lycoridine の合成を報告している (Scheme 1)²⁾。しかし、鍵となる炭素-炭素および炭素-窒素結合形成以外に、位置選択的保護・脱保護・立体反転などの工程が多い。



Scheme 1

一方、2) 光学分割の例としては、フランとアクリル酸の Diels-Alder 反応で得られるエンド体のカルボン酸（ラセミ体）をメチルベンジルアミン塩とし、分別再結晶を経て純粋な鏡像異性体を得る小川らの方法（詳細は第二章に示す）³⁾などがあげられるが、一般的には一度の晶析では目的物は純粋に得られず、分別再結晶を多数繰り返す必要があり、さらに当量の分割剤を必要とする（Scheme 2）。

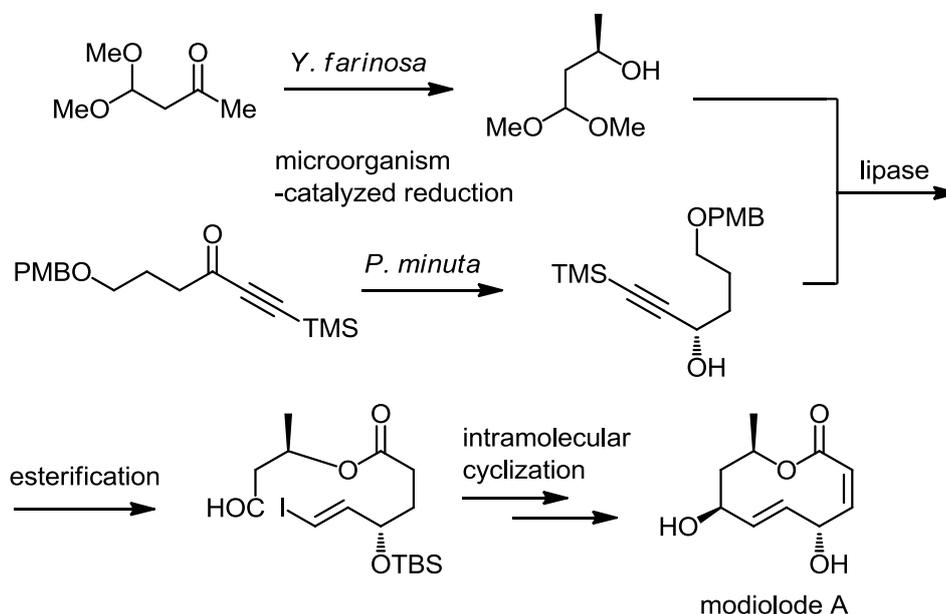


Scheme 2

著者はこのような状況下、不斉合成や酵素反応を駆使し、出発原料として魅力ある物質の創成、およびそれを応用する有用物質の合成を試みることにした。本研究で中心的ツールとして用いる酵素は、長い進化の過程でアミノ酸の三次元配置が精密に制御され、温和な条件下、高度に選択的な能力を発揮する触媒である。各酵素原子が L-体アミノ酸

から構成されており、反応場自体が不斉な環境にあることから、鏡像選択的反応が行える。これらを活かし、1) 高い立体選択性を利用した純粋な鏡像異性体の調製、2) 官能基と反応点を見分ける能力を活用した、化学的手法では困難な位置選択的な反応も可能である。さらに、常温常圧で進行しエネルギー消費が少ないことから環境調和型の手法といえる。

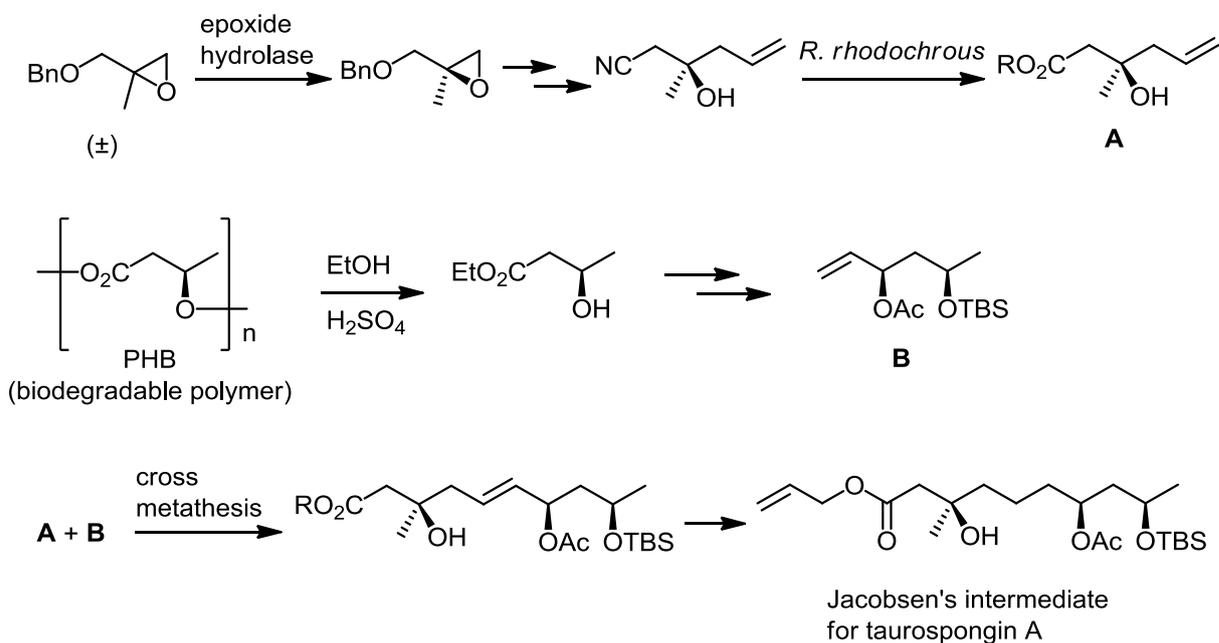
しかし、このような不斉合成や酵素反応を合成の鍵段階に用いようとするならば、合成全体の効率化をもたらす、合理的なルートが求められる。化学-酵素法を相補的・相乗的に活用し、さまざまな生物活性化合物を合成した例として二つ紹介する。松田らは、アセタールケトンとプロパルギルケトンを出発し、酵母菌を用いた不斉還元、リパーゼを用いたアセチル化を活用し、光学活性なアルコール **A** および **B** を調製、分子内環化により **modiolide A** の合成を達成している (Scheme 3)⁴⁾。



Scheme 3

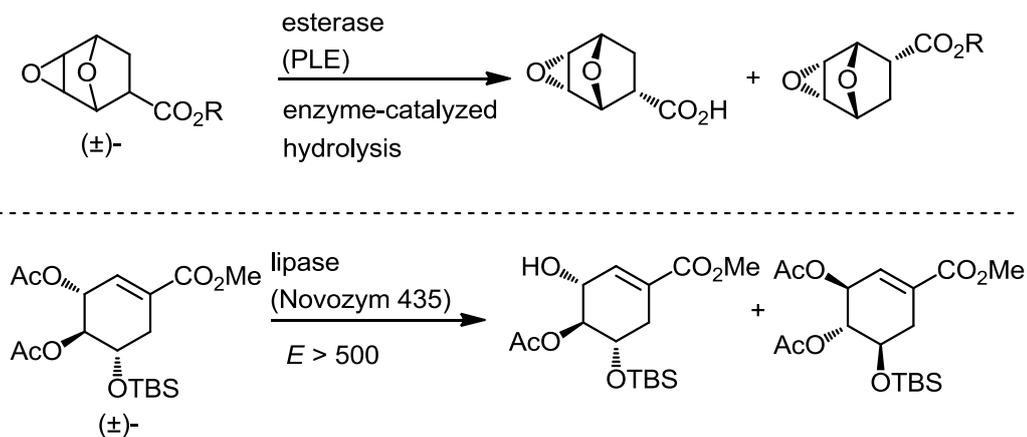
藤野らは、ラセミ体エポキシドをエポキシドヒドロラーゼで光学分割、放線菌を用い一段階でニトリル基をカルボン酸へと変換、キラルシントン **A** を調製している。一方、*syn*-ジオールのキラルシントン **B** は、PHB から調製した光学活性 β -ヒドロキシエステル

から出発し、増炭、リパーゼを用いた速度論的光学分割によって導いている。ビニルアルコール **A** とアリル基を有するジオール **B** のクロスメタセシスによって、Jacobsen's らによって報告されている化合物まで誘導し、taurospongins A の形式全合成を達成している (Scheme 4) ⁵⁾。



Scheme 4

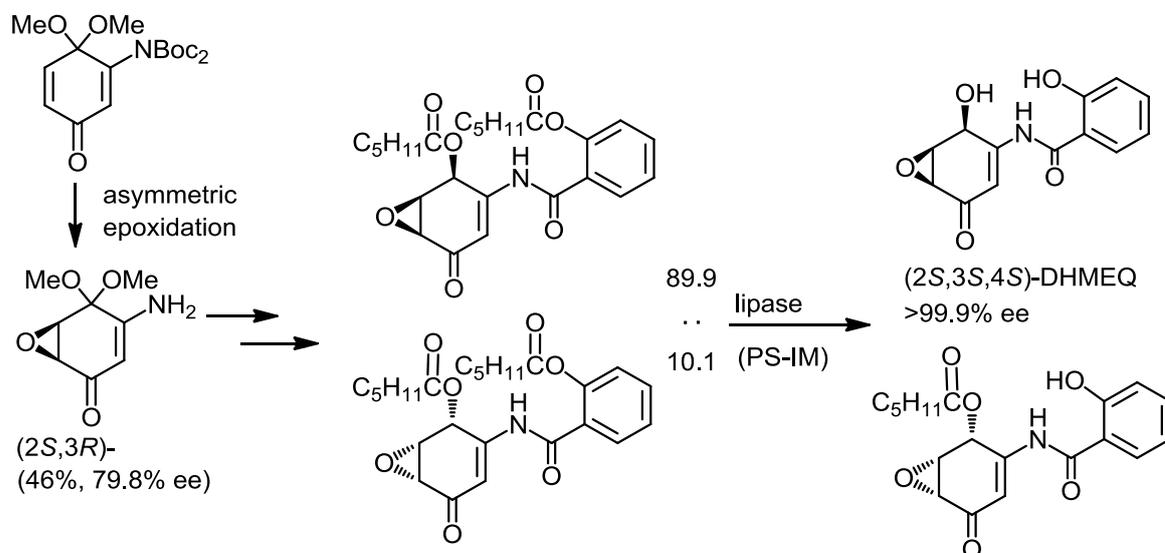
本研究は、第二章～第四章に示す標的物質すなわち、三環性エポキシエステル、シクリトール類、キノンモノアセタールを対象としてさまざまに試行錯誤・検討した結果、それぞれ効果的な「化学-酵素相補的・相乗的合成」を達成した。



Scheme 5

第二章では、ラセミ体多環性エステルの速度論的光学分割において、酵素の触媒中心モデルと反応論にもとづいて基質分子を設計、生成物を有用物質へと効率的に変換した（前ページ Scheme 5, 上段）。第三章では、ラセミ体が化学合成で大量供給可能な3-エピシキミ酸エステルという基質にはじめて着目、高い位置選択性・鏡像選択的な反応を一挙に行う酵素的変換を見出した（前ページ Scheme 5, 下段）。

第四章では、NF- κ B 活性化阻害剤、DHMEQ の合成では、エノンの不斉エポキシ化を鍵段階とする First synthesis を達成した。この際、不斉合成で避けて通ることのできない、不要な鏡像体の除去という問題を、リパーゼを用いる速度論的加水分解と分別結晶を組みあわせる手法で解決した（Scheme 6）。



Scheme 6

以下にその成果を述べる。

第二章 高度に水酸化された多環性カルボン酸エステルのエステラーゼを用いた速度論的分割

1. 緒言

Figure 2 に示す三環性エポキシエステル **1** は、その合成等価体であるヨードラクトン **2** も含め、小川らにより carba-Neu-5Ac・carba-KDO や各種グリコシダーゼ阻害活性を有するカルバ糖類の合成原料として、その骨格や立体化学が利用されてきた⁶⁾。同じ化合物は、寺島らによってタミフル合成における中間体⁷⁾として用いられ、近年では、庄司・林らによって血管新生抑制活性を有する epoxyquinol A⁸⁾や RKTS-34⁹⁾などの中間体として活用されるなど、一層注目を集めている。

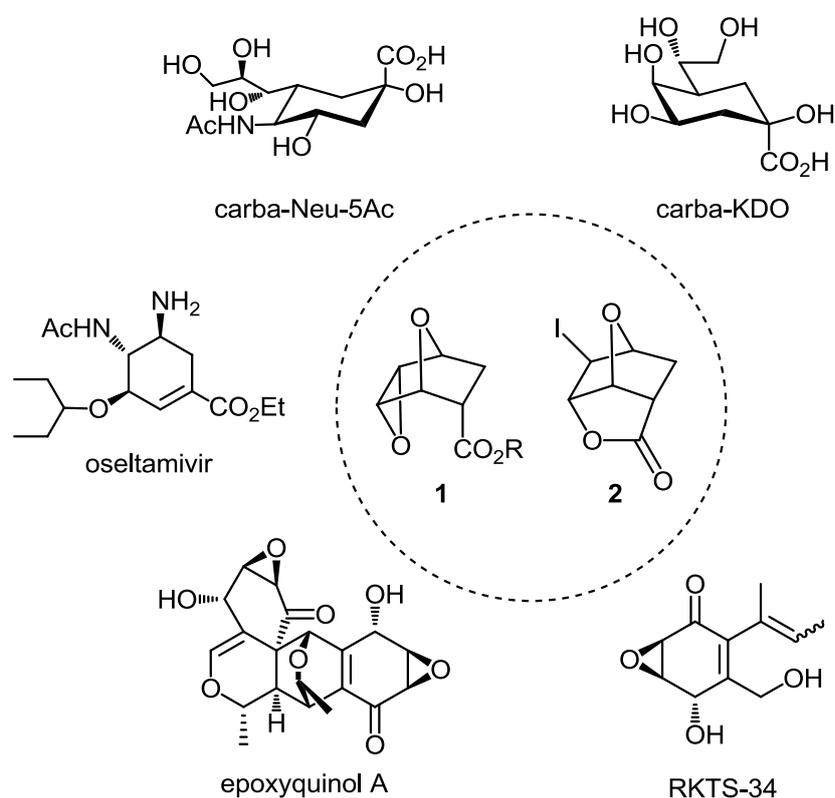
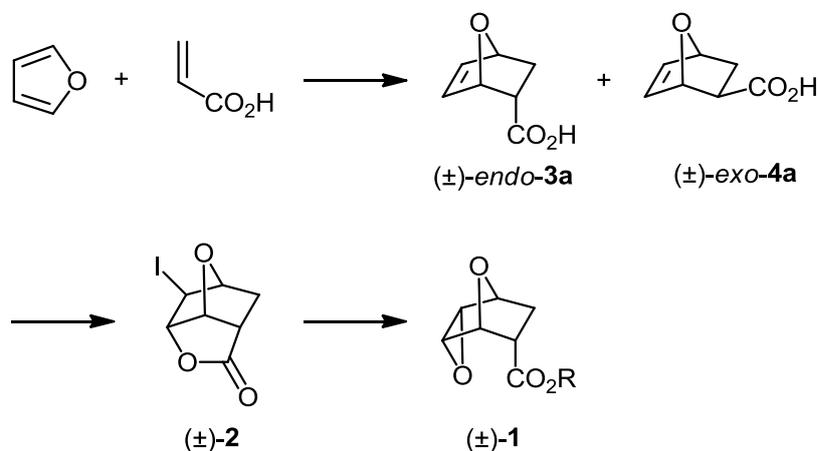


Figure 2

ラセミ体のエポキシエステル **1** はヨードラクトン **2** を経由し、フランとアクリル酸という非常に安価な原料を用い、Diels-Alder 反応を鍵段階として調製可能である。すなわち付加体 **3a** は **4a** との立体異性体の混合物のまま、ヨードラクトン化によりラクトン **2**

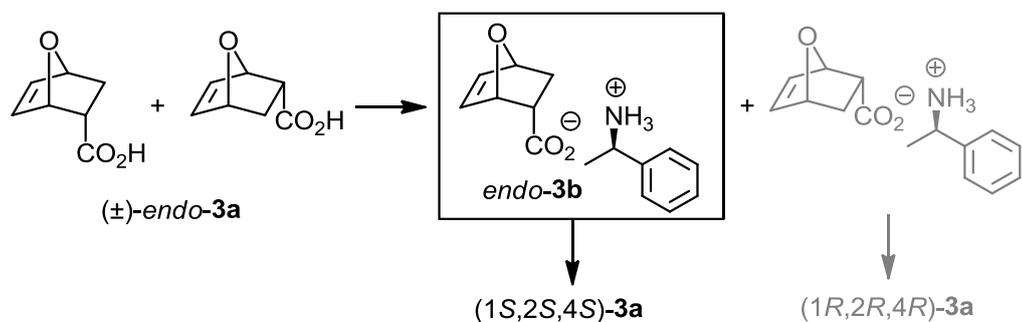
へと変換、ついで、アルカリ条件下、化合物 **2** の加水分解、引き続くヨードヒドリンからエポキシ環への閉環まで、分離精製することなく行える。最後にカルボン酸塩をアルキル化することによって、ラセミ体のエポキシエステル **1** へと導いている (Scheme 7)。



Scheme 7

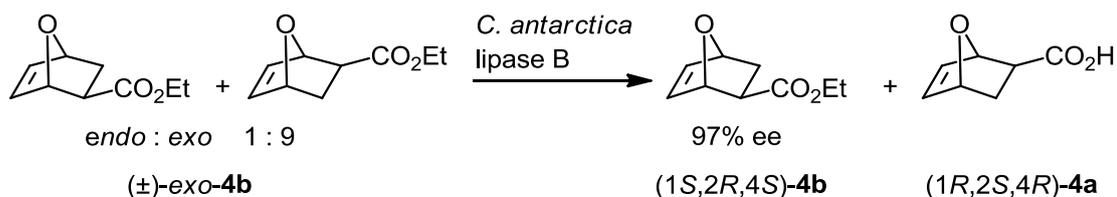
エポキシエステル **1** の鏡像異性体分離、すなわち光学分割する試みは、その前駆体 **3** を主たる対象として、これまで三例報告されている。

Diels-Alder 反応の段階で優先的に生成、結晶として析出してくる *endo*-**3a** のラセミ体に対し、(*R*)-メチルベンジルアミンを作用させ、**3b** のジアステレオマー混合物とする。ここから、両者の溶解性の差を利用し、分別再結晶を用いる分割は、小川らによって精力的に検討された³⁾。これが現状では唯一実用に供されている方法である。しかし、純粋な鏡像異性体を得るには、分別再結晶を何度も繰り返す必要があり、しかもこのままでは、(1*S*,2*S*,4*S*)-体しか純粋に得られない。母液に残る(1*R*,2*R*,4*R*)-体は一たん遊離のカルボン酸とした後、鏡像関係にある(*S*)-メチルベンジルアミン塩として再結晶を繰り返す必要がある (Scheme 8)。



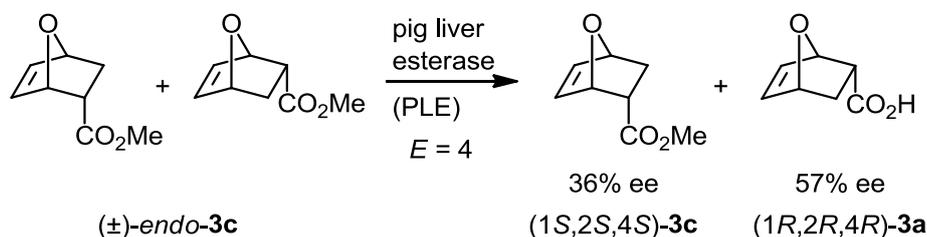
Scheme 8

一方、酵素を用いた速度論的光学分割が *endo-3a* に対しエピマーの関係にある *exo-4b* を対象として検討されている。ロシュ社のグループによりタミフル合成の鍵段階として、*exo-4b* のラセミ体に対し、*Candida antarctica* lipase B を用いる鏡像選択的加水分解が報告された¹⁰⁾。しかしラセミ体 *exo-4b* を合成しようとしても、その立体化学を完全に *exo*-型に制御することは極めて困難なため、実際に工業的スケールでは用いられなかった (Scheme 9)。



Scheme 9

これに対し Crout らは、*endo-3c* のラセミ体を基質とする酵素分割を試みた¹¹⁾。ラセミ体 *3c* に対し、ブタ肝臓エステラーゼが最も有効であったものの両鏡像異性体間の「切れ味」を定量的に示す *E* 値は 4 と満足できる結果は得られていない (Scheme 10)。



Scheme 10

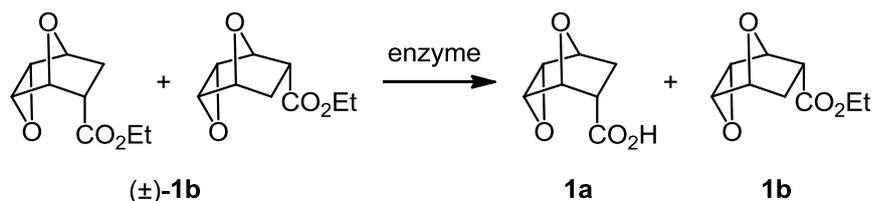
2. 三環性エポキシエステルの鏡像選択的加水分解

2-1. 酵素のスクリーニング

前述の Crout らの報告¹¹⁾を参考に、三環性エポキシエステル **1** の速度論的光学分割を試みることにした。著者は、基質の反応点近傍を立体的にかさ高くすることにより、遅い鏡像異性体の反応速度がより低下、その結果、両鏡像異性体間に速度差が生じ、鏡像選択性も向上すると考えた。以上からエポキシエステル **1** を基質として選抜、このものに対し鏡像選択的加水分解を試みた。

しかし、**3c**に含まれるオレフィンをわずかに **1b** のエポキシドに変換したことにより、予想以上に反応性は低下、多くの種類の加水分解酵素を試みたにもかかわらず、ほとんどの酵素は全く作用しなかった。その中で唯一、ブタ肝臓エステラーゼが効果的であることがわかった (Table 1)。

Table 1

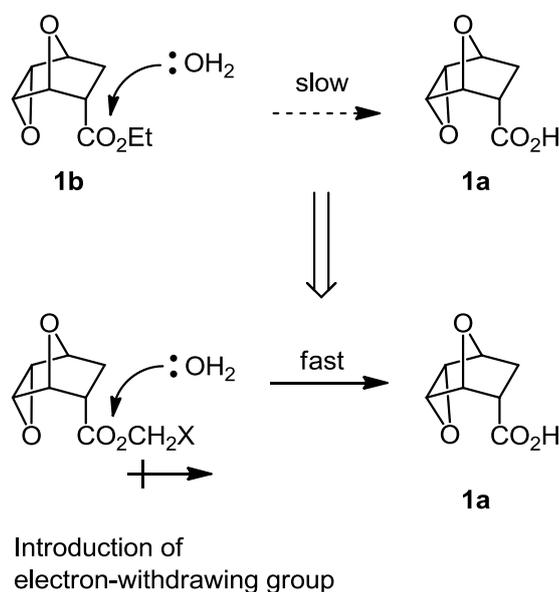


entry	enzyme	time (h)	conv (%)	
1	protease	<i>A. melleus</i> XP-488	20	N. R.*
2		<i>R. delemar</i> XP-415	24	N. R.
3	esterase	<i>K. oxytoca</i> SNSM-87	24	N. R.
4		pig liver	24	33
5	lipase	<i>C. antarctica</i> B	72	N. R.
6		<i>C. rugosa</i>	72	N. R.
7		pig pancreas	72	N. R.

*N. R. : no reaction

2-2. 反応性向上を目指したエステルの分子設計と評価

基質 **1b** に対し、酵素加水分解の転換率は、最も活性の高かった豚肝臓エステラーゼを用いても 30%程度であった。酵素光学分割により得られる両鏡像異性体を活用するためには、酵素反応の「選択性をあげる」ことは言うまでもないが、たとえ酵素が切れ味良く働いても、速い異性体が 50%を超える転換率をもって反応しなければ、未反応回収原料を高い鏡像体過剰率で得ることはできない。そこで、反応条件や基質を変え転換率の向上を試みた。まず、添加する酵素を増やし、反応時間を 2 倍程度まで延長したものの、転換率はわずか 33%までにしか上がらなかった。そこで、当初用いていた単純なアルキルエステルのエステル部位に、電子求引性置換基を導入するとした (Scheme 11)。エステル部位に電子求引性置換基を導入すれば、加水分解を受けやすい鏡像異性体の反応性が増し、結果として両鏡像異性体間の反応速度の差が広がれば、鏡像選択性が向上するのではないかと期待した。

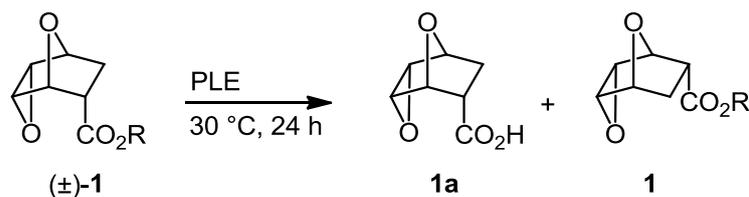


Scheme 11

このような観点から、クロロメチルエステル **1d**、カルバモイルメチルエステル **1e**¹²⁾、クロロエチルエステル **1f**¹³⁾、トリフルオロエチルエステル **1g** を合成、ブタ肝臓エステラーゼを用い加水分解を試みた。クロロメチルエステル **1d** は非常に不安定で、緩衝溶液

中で攪拌するのみで自発的に加水分解してしまい、酵素反応の選択性を評価できなかった (entry 3)。塩素原子をカルバミル基にかえた化合物 **1e** では、安定性は大幅に増し酵素反応の基質として十分に機能したが、期待に反し、当初用いたアルキルエステル **1b** および **1c** に比べ反応性、選択性ともに低下してしまった (entry 4, $E = 5$)。これに対し、クロロメチルエステル **1d** に一つメチレン基を挿入したクロロエチルエステル **1f** は、緩衝液中でも十分に安定であり、期待通り反応速度は上昇、転換率は 50% に達した (entry 5)。さらに、鏡像選択比 E 値は 51 と、メチルエステル **1c** ($E = 6.5$) やエチルエステル **1b** ($E = 11$) などを基質にした場合に比べ、非常に高い値であった (Table 2)。これらの知見から、クロロエチルエステル **1f** より、さらに求電子性の高いエステルを基質として用いれば反応性がより向上、つまり鏡像異性体間の差がより大きくなるのではないかと期待し、トリフルオロエチルエステル **1g** を調製した。しかし、酵素反応を試みたところクロロメチル基と同様、緩衝液中で攪拌するのみで一部分加水分解が進行してしまい、それを含めた見かけの E 値は 9 であった。

Table 2



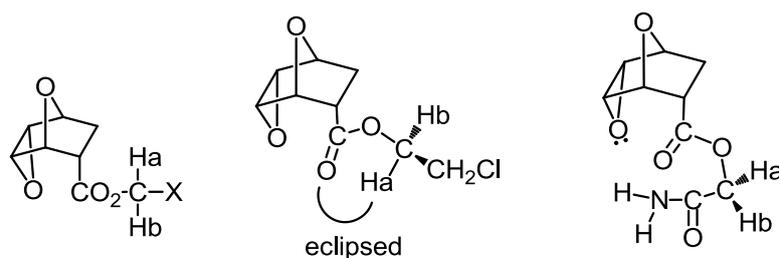
entry	substrate	R	conv. (%)	E value
1	1c	CH ₃	32	6.5
2	1b	CH ₂ CH ₃	33	11
3	1d	CH ₂ Cl*		
4	1e	CH ₂ CONH ₂	26	5
5	1f	CH ₂ CH ₂ Cl	50	51
6	1g	CH ₂ CF ₃	50	9

*Suffered from non-enzymatic hydrolysis.

2-3. エステル側鎖の極性が反応性に与える影響

同じ電子求引性置換基を導入したにもかかわらず、カルバミルメチルエステル **1e** とクロロエチルエステル **1f** では対照的な結果を示した (Table 2, entry 4, 5)。ここで、**1e** および **1f** のエステル部位のプロトン **Ha** および **Hb** に着目、NMR スペクトルの化学シフトと結合定数からエステル部位の構造の自由度を比較した (Table 3)。NMR スペクトルの化学シフトから **Ha**、**Hb** に示す2つのプロトンは、エチルエステル **1b**、カルバミルメチルエステル **1e**、クロロエチルエステル **1f** いずれの化合物でも、非等価な環境に位置することがわかった。このことから、*endo*-型エステル **1** は、エポキシドの立体障害のため自由回転が阻害されており、従ってエステル部位近傍は立体障害が非常に大きい。さらに注目すべき点は、プロトン **Ha** および **Hb** の化学シフトの差である。酵素反応で反応性が低かったエチルエステル **1b** およびカルバミルメチルエステル **1e** に比べて、良好であったクロロエチルエステル **1f** やトリフルオロエチルエステル **1g** では、化学シフトの差が非常に大きかった。これらのエステル **1f** では、プロトン **Ha** がプロトン **Hb** に比べ著しく低磁場に位置していることから、プロトン **Ha** とカルボニル酸素原子とがエクリップスの関係にあることが示唆される (entry 3)。一方、カルバミルメチルエステル **1e** ではプロトン **Ha** と **Hb** の差が小さいことから、**Ha**-酸素と **Hb**-酸素の二面角の大きさは比較的近いと考えられる (entry 1, 2)。以上の知見から、クロロエチルエステル **1f** とカルバミルメチルエステル **1e** では最安定配座に大きな違いがあると結論した。

Table 3



entry	substrate	X	δ (ppm, CDCl ₃)		$\Delta\delta$ (Ha - Hb)	J _{ab} (Hz)
			Ha	Hb		
1	1b	CH ₃	4.22	4.16	0.06	10.8
2	1e	CONH ₂	4.69	4.62	0.07	15.7
3	1f	CH ₂ Cl	4.44	4.32	0.12	11.9
4	1g	CF ₃	4.58	4.44	0.14	12.5

1980年代からブタ肝臓エステラーゼを用いた加水分解の研究が精力的に行われ、さまざまな基質を用いた鏡像選択的反応の検討から、Jonesらによりブタ肝臓エステラーゼの活性中心モデルが提唱されている¹⁴⁾。今回際立った反応性の差を示した、親水性基であるカルバミルメチルエステル **1e** と疎水性置換基を有するクロロエチルエステル **1f** の反応性の高い鏡像異性体を、この酵素の活性中心モデルにあてはめた。酵素加水分解は、活性中心に存在するセリン残基が基質のカルボニル基を攻撃することによって起こる。この酵素モデルでは、基質の疎水性部分が収容される2つの大小の疎水的空間 (H_L と H_S) と、基質の親水性部分と相互作用する2つの親水的空間 (P_F と P_B) が提示されている。前述したクロロエチルエステル **1f** は安定コンホマーのまま、2つの疎水的空間にカルボニル基・クロロエチルエステル両方の部位がうまくフィットできる。一方、カルバミルメチルエステル **1e** は、親水的空間である P_B がカルバミルの窒素を強く引き寄せ、その結果反応中心からエステルカルボニル基が遠ざかるため、反応性が低下したと推察できる (Figure 3)。

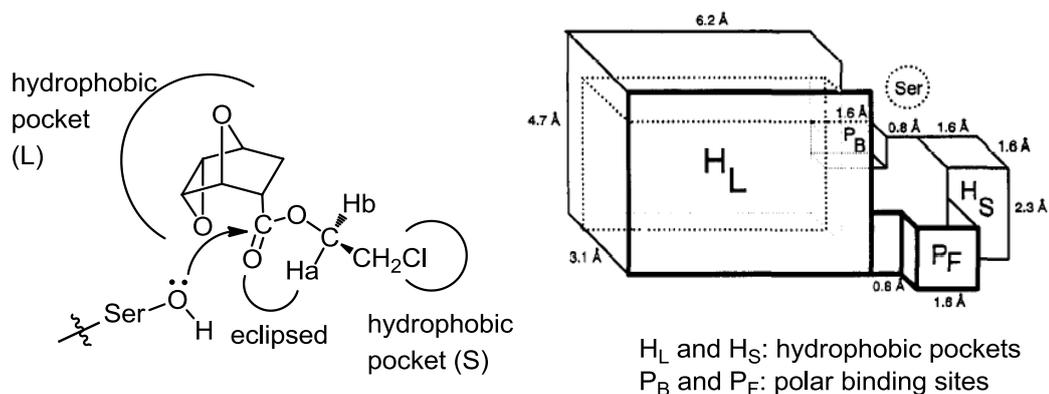
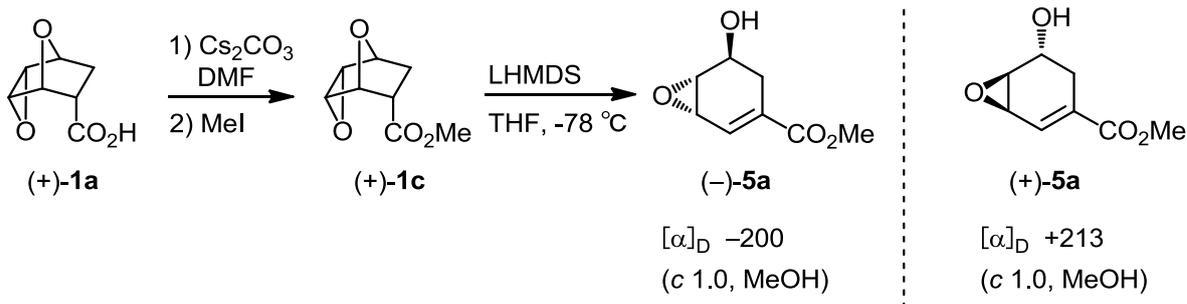


Figure 3

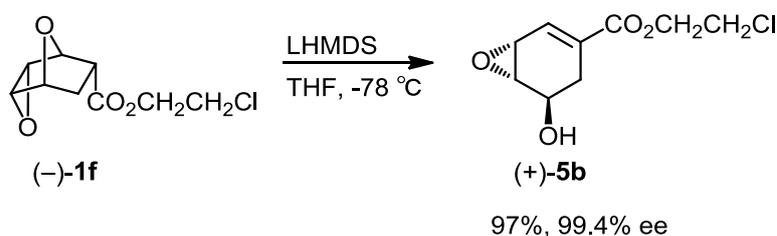
2-4. 絶対立体配置の決定

酵素加水分解によって生じたカルボン酸(+)-**1a**の絶対立体配置および鏡像体過剰率は、既知化合物(+)-**5a**⁸⁾との比較により決定した。カルボン酸(+)-**1a**を定法によりメチル化した後、 α,β -不飽和エステル**5a**へ誘導したところ、負の旋光性を示したことから、カルボン酸(+)-**1a**は、Scheme 12に示す絶対立体配置であるとわかった (Scheme 12)。



Scheme 12

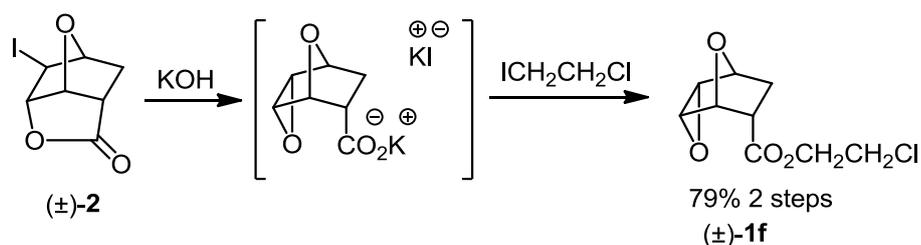
一方、未反応回収原料(-)-**1f**の鏡像体過剰率は、前述のように α,β -不飽和エステル(+)-**5b**とし、HPLC分析により99.4% eeであることを確認した (Scheme 13)。



Scheme 13

2-5. 基質の大量調製法確立

ここまでの研究により、クロロエチルエステル **1f**を良好な基質として選抜することができた。本酵素反応を大量スケールで実施するためには、基質の大量調製法の確立が求められる。当初、基質合成の鍵段階のクロロエチル化には、クロロヨードエタンという非常に高価なアルキル化剤を使用しクロロエチルエステル **1f**を調製していた (Scheme 14)。

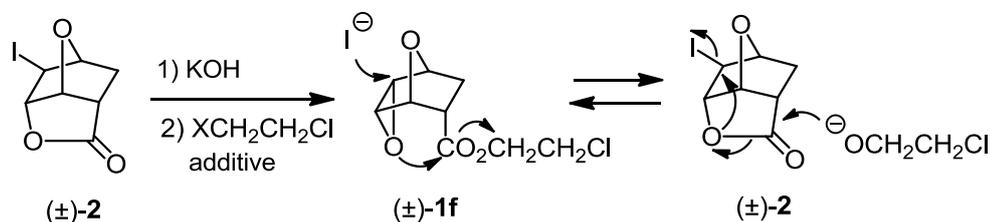


Scheme 14

しかしこの方法では、アルキル化剤が非常に高価なため大量合成は望めない。そこで、ジクロロエタンを反応溶媒兼アルキル化剤として、クロロエチル化を試みたが、ヨウ素原子に比べ脱離能が低い塩素原子にかえると反応時間を延長しても低い収率でしか目的物 **1f**は得られなかった (entry 2)。そこで、反応系内でクロロヨードエタンを発生させようとヨウ化カリウムを添加したが、予想外にもかえって収率が低下してしまった

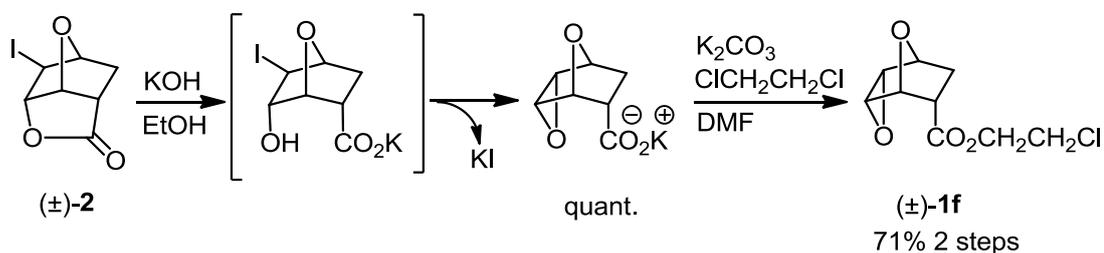
(entry 3)。その原因を徹底的に検討したところ、ヨードラクトン **2** の加水分解によって生じてくるヨウ化物イオンが目的物のクロロエチルエステルのエポキシドに対し求核攻撃、再び原料であるヨードラクトン **2** が副生してくることがわかった。

Table 4



entry	XCH ₂ CH ₂ Cl	additive	time (h)	yield (%)
1	I	-	3	79
2	Cl	-	120	35
3	Cl	KI	120	3

そこで、反応中間体のカルボン酸を単離、部分精製したのち、ジクロロエタンと炭酸カリウムを添加するというヨウ化物フリーの条件で反応を試みたところ、目的とするクロロエチルエステル **1f** を 71% という収率で得ることができるようになった (Scheme 15)。

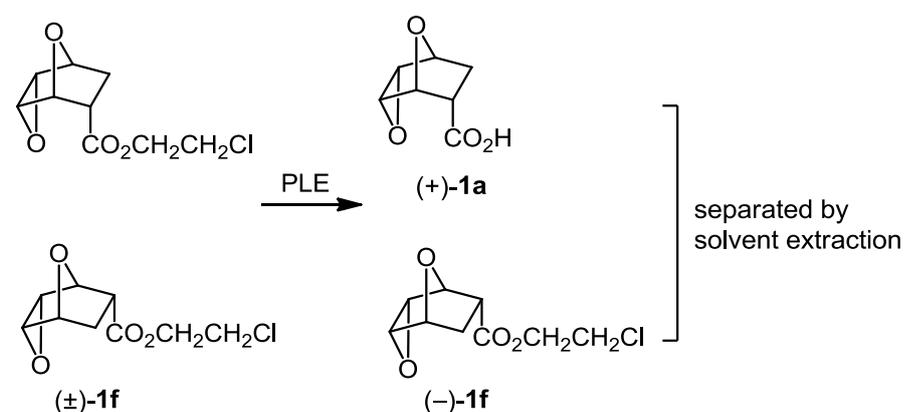


Scheme 15

このようにして、大量調製が可能になったクロロエチルエステル **1f** を基質とし、予備的実験 (entry 1) からスケールを上げ酵素反応を試みたところ、転換率、鏡像選択性ともに再現よく進行した (entry 3)。大量合成ではコスト削減や廃棄物の問題から、精製過程においてカラムクロマトグラフィーを用いないことが望ましく、スケールアップ時に

は pH を変え分別抽出するのみでカルボン酸とエステルを分離した。まず、反応系をいったん酸性にして酵素を失活させた後、炭酸水素ナトリウムを加え弱アルカリ性とし未反応原料であるエステルを有機溶媒により抽出、再び水相の pH を酸性に戻し溶媒抽出により反応生成物であるカルボン酸を回収することに成功、実用的にも価値の高い方法を確立することができた (Table 5)。

Table 5



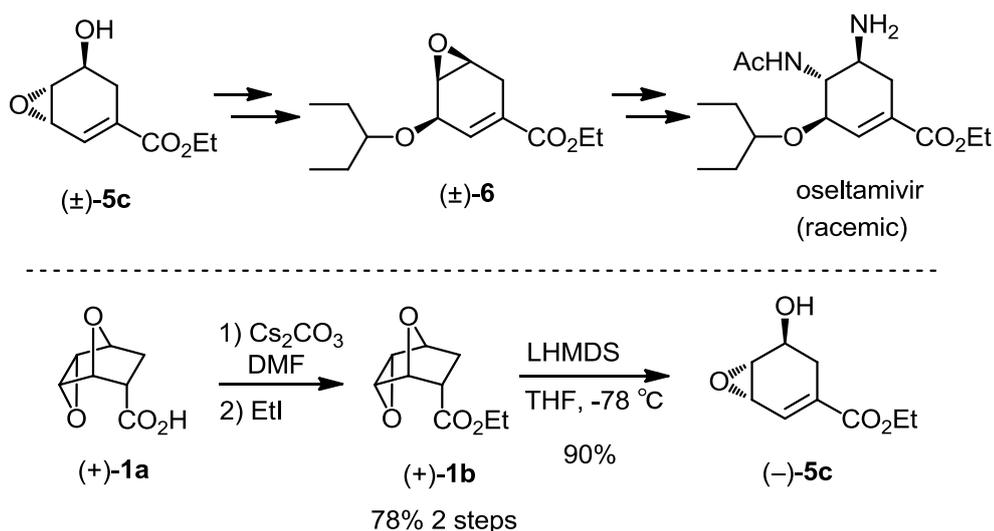
entry	sub. (mmol)	conv. (%)	(+)-1a ee (P) (%)	(-)-1f ee (S) (%)	<i>E</i> value
1	0.2	50	89.0	—	51
2	1.7	52	90.6	99.4	116
3	4.6	56	77.3	99.9	53

3. 関連する生物活性物質への展開

3-1. オセルタミビル中間体への誘導

寺島らは、ヨードラクトン **2** から出発し、不飽和エポキシエステル **5c** を経由するタミフル中間体 **6** の合成を報告⁷⁾しているが、その時点ではラセミ体から出発していた (Scheme 16、上段)。もし、エポキシエステル **5** を純粋な鏡像異性体として大量に供給できれば、新しい合成法として期待される。そこで酵素反応で得られたカルボン酸(+)-**1a** をエチル化し、かさ高い塩基である LHMDS を用いたβ-脱離によりエポキシドを開環すると同時に、オレフィンを構築、鍵化合物である不飽和エポキシエステル(-)-**5c** までを

3工程、総収率70%で得ることができた (Scheme 16、下段)。



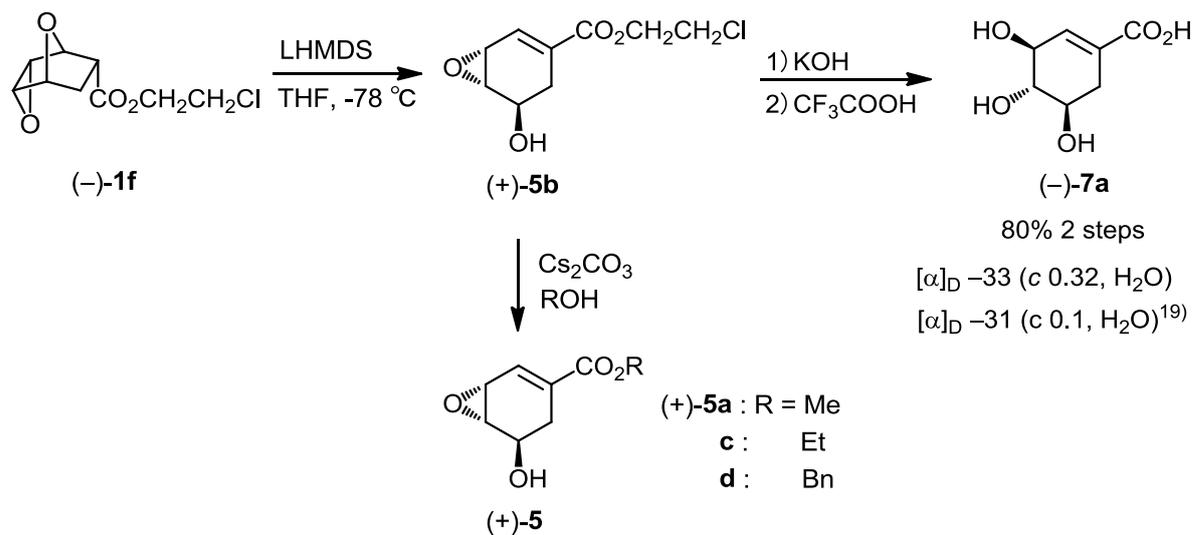
Scheme 16

3-2. 3-エピシキミ酸エステルへの誘導

酵素加水分解の未反応回収原料であるクロロエチルエステル(-)-**1f** (>99.9% ee)は、vitamin D₃の前駆体¹⁵⁾、reserpineの原料¹⁶⁾や天然有機化合物の合成原料¹⁷⁾として有望な3-エピシキミ酸(-)-**7a**へと誘導することとした (Scheme 17)。このものはシキミ酸経路による生合成では供給することができない物質で、シキミ酸から調製するにはC-3位のみ立体化学を反転しなければならない。これまでの合成例では、いずれも総収率や反応の選択性等に問題点が残されていた¹⁸⁾。

エステルのβ-部位に塩素原子をもつ基質(-)-**1f**に対してもLHMDSを用いた開環は進行、副生成物を生じることなく良好な収率で目的物(+)-**5b**へと変換できた。本基質に導入したクロロエチル基は反応性が高く、エポキシ環を全く損なうことなくアルカリ加水分解によりカルボン酸とすることができた。一方、炭酸セシウムを塩基とするエステル交換により、さまざまな不飽和エステルへ誘導することも可能だった。最後に、加水分解で得られたカルボン酸に含まれるエポキシ環の位置選択的な開環は、触媒量のトリフルオロ酢酸存在下¹⁹⁾、反応性の高いアリル位に対し立体反転を伴いながら位置選択的に水酸基の導入に成功、3-エピシキミ酸(-)-**7a**を高い収率で得た。

本手法により、高度に酸素官能基化され、合成上価値の高いカルバサイクルが純粋な鏡像異性体として、短工程かつ高い選択性で供給可能になった。



Scheme 17

第三章 リパーゼを活用した、シクリトール類の位置・鏡像選択的変換

1. 緒言

天然に豊富で高度に水酸化されたシクリトール類として、シキミ酸、キナ酸などが広く知られている (Figure 4)²⁰⁾。これらの骨格や立体化学を活かして生物活性物質の合成、あるいはイノシトール関連物質に一炭素増炭を試みようとする際、つねに問題になるのは、多数隣接して存在する水酸基を位置選択的に保護・脱保護する工程である²¹⁾。

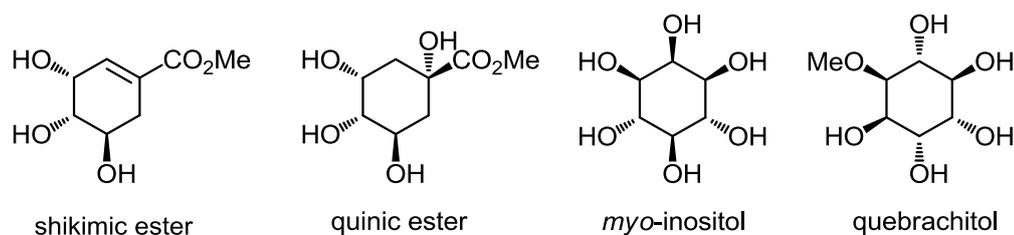
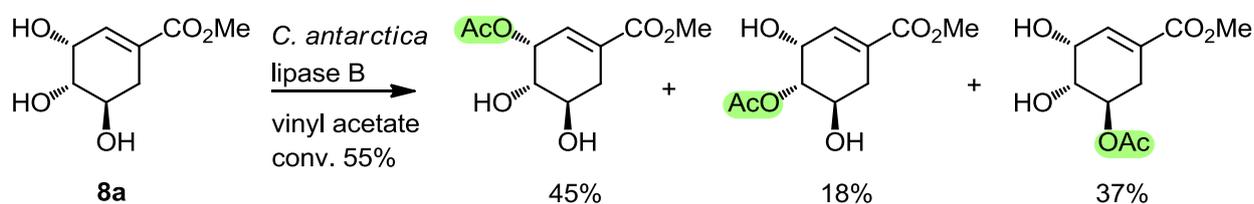


Figure 4

このような課題に対し、2002年に Gotor らはシキミ酸エステル **8a** に対しリパーゼを作用させ、位置選択的アセチル基導入を試みた²²⁾。アセチル化は立体障害の影響が少ない C-3 位および C-5 位に対し優先的に進行したが、収率は低いものの立体的にかさ高い C-4 位までもがアセチル化されてしまい、位置選択性は十分とは言えなかった (Scheme 18)。



Scheme 18

著者は、これまでカテコール、ヒドロキノン類など芳香族ポリオール類の位置選択的酵素反応に成果をあげており^{23,24)}、Gotor らが報告したシキミ酸エステル **8a** の 1 か所だ

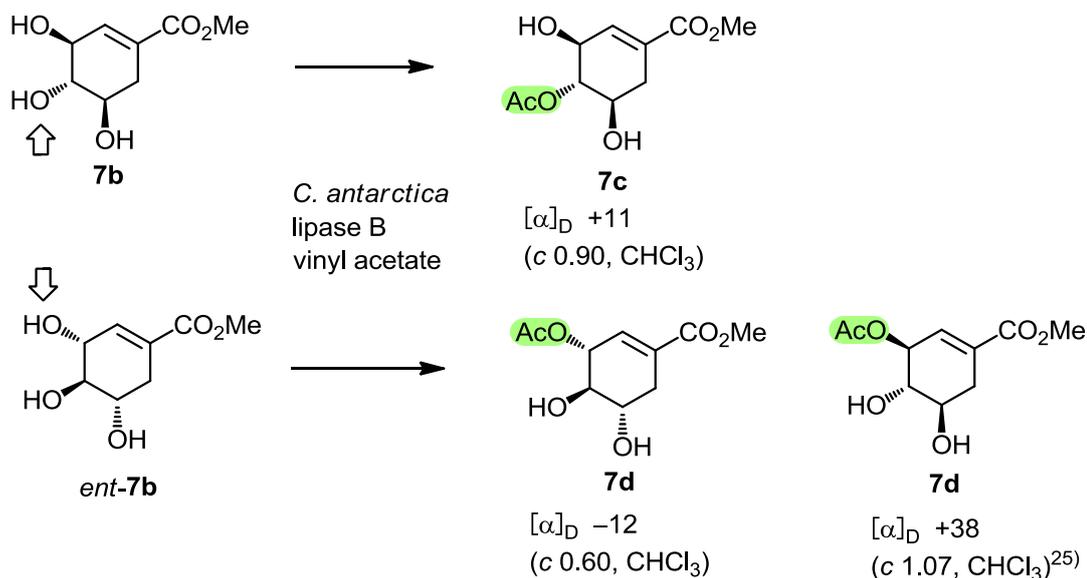
け立体化学が反転した 3-エピシキミ酸エステル **7b** に対し、酵素を用いた位置選択的エステル化に興味を持ち検討することとした。

2. リパーゼを用いたシクリトール類に対する立体選択的反応

2-1. 3-エピシキミ酸エステルに対する位置・鏡像選択的アシル化の試み

この 3-エピシキミ酸エステル **7b** はフランとアクリル酸の Diels-Alder 反応を出発段階とし、ラセミ体、すなわち鏡像異性体の等量混合物が容易かつ大量に調製可能な物質である (第二章参照)。そこで、あえてラセミ体を基質として用いることとした。このようにすると、シキミ酸エステル **8a** と比べ立体化学を 1 か所のみ変えた 3-エピシキミ酸エステル **7b** では、1) 位置選択性にどのような違いが生じるか、という問題に加え、2) 鏡像異性体間の反応性、選択性の差という問題が新たに生じ、さらに興味深い。

早速、ラセミ体の 3-エピシキミ酸エステル **7b** を基質とし、数種のリパーゼを触媒として酢酸ビニルを作用させるアセチル化を検討、TLC 分析により *Candida actarctica* lipase **B** が有効であることがわかった。Gotor らが用いたシキミ酸エステル **8a** では位置選択性が乏しいのに対し、わずか C-3 位のみ立体化学が異なる化合物 **7b** では、対照的な結果が得られた (Scheme 19)。TLC 上、新たに生じた 2 つのスポットを単離、精製したところ、C-3 位と C-4 位のみそれぞれアセチル化が進行した、モノアセタート **7c** と **7d** が得られたことが判明した。優先的にアシル化された鏡像異性体の絶対立体配置は、以下のように決定した。C-3 位にアセチル化が起こったモノアセタート **7d** が、負の旋光性を示し、既知物質の旋光性²⁵⁾との比較から Scheme 19 に示すように(3*R*,4*R*,5*S*)-**7d** という絶対立体配置であることがわかった。



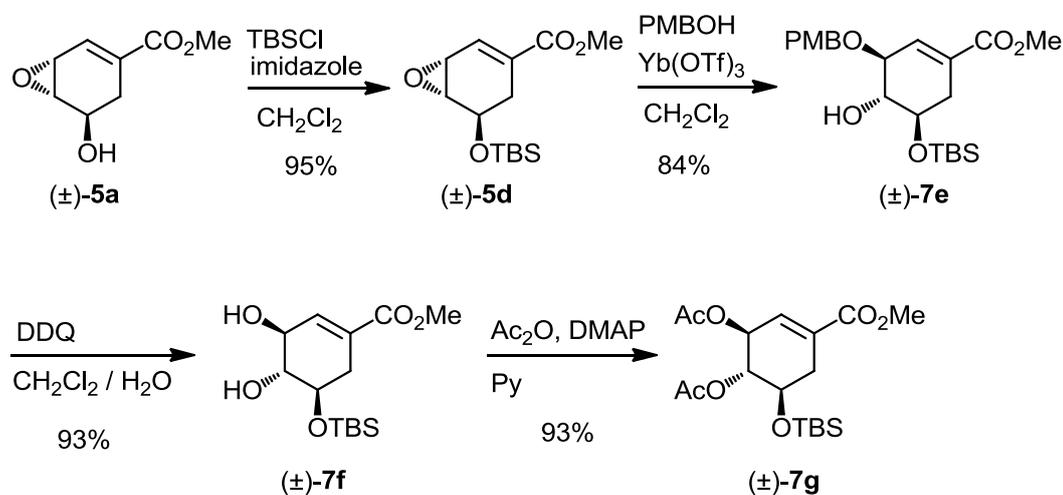
Scheme 19

このように、定量的な速度論という観点からは十分とはいえないものの、鏡像異性体を識別しながら位置選択的な反応が起こっているという、興味深い結果が得られた。しかし、トリオール **7b** を基質とした場合、生成してくる化合物 **7c** と **7d** は、いずれもモノアセチル体のため、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いる分離は極めて困難であり、しかも **7d** は隣接する *trans*-ジオールの構造を有するので、合成化学上 2 つの水酸基の区別は難しい。トリオール **7b** を用いた反応で得られた大きな知見は、両鏡像異性体ともに C-5 位の水酸基の反応性が低いという事実で、ここに何らかのかさ高い置換基を導入しても、反応全体には大きな影響を与えないと考えられる。そのような基質を合成し、さらに酵素反応を検討することとした。

2-2. C-5 位水酸基に TBS 基を導入した基質の調製

以上の観点から、新たな基質として C-5 位の遊離の水酸基を TBS 基で保護したラセミ体ジオール **7f** を合成した。まず既法により調製可能なエポキシエステル **5a**⁸⁾ の水酸基に TBS 基を導入した。ついで、10% トリフルオロ酢酸水溶液によってエポキシド **5d** の開環を試みたが、原料は消失したものの TBS 基までが脱落してしまい複雑な混合物になって

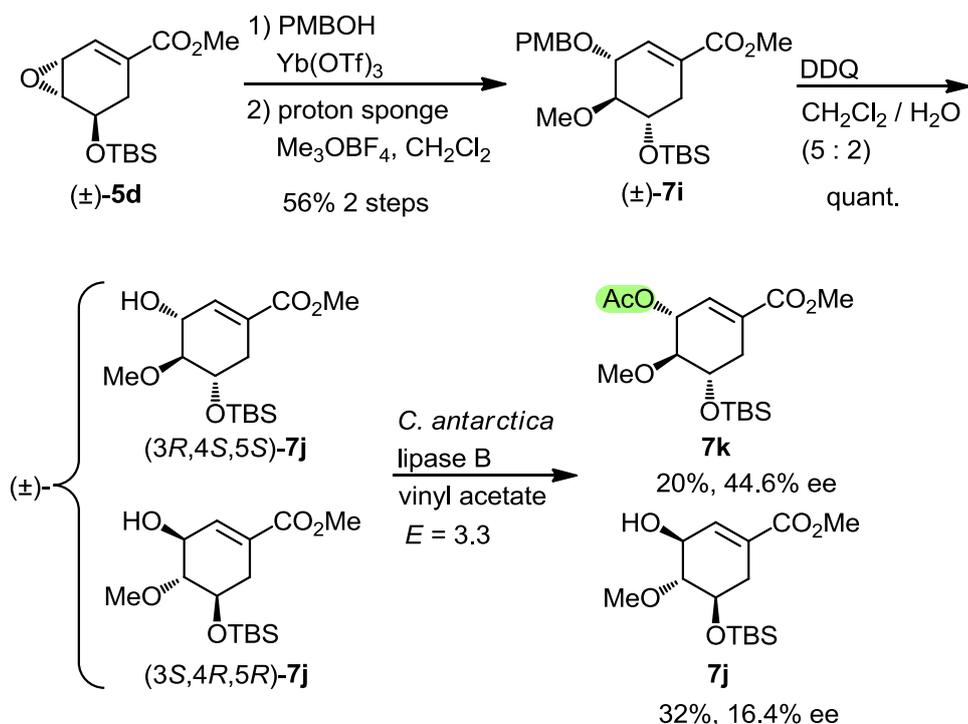
しまった。そこで、エポキシド **5d** に対し、イッテルビウムカチオンをルイス酸として用い、アリル位選択的²⁶⁾にエポキシドを立体反転で開環、引き続き DDQ を用いた酸化脱保護によって、アシル化の基質となるジオール **7f** を調製した。さらに、ピリジンを溶媒として、触媒量の DMAP 存在、無水酢酸でアセチル化、エステル交換に供しうるジアセタート **7g** を高い収率で得ることができた (Scheme 20)。



Scheme 20

2-3. リパーゼを用いた遊離水酸基の位置・鏡像選択的アシル化の試み

本章の 2-1 節で述べたジオール **7f** に対し、改めて *Candida antarctica* lipase B (Novozym[®] 435) を用い、酢酸ビニルを作用させるアセチル化を試みた (Scheme 21)。C-5 位にかさ高い置換基を導入した基質 **7f** では、C-5 位の立体反発を避け、C-4 位がアセチル化された化合物が生じることなく、期待通り C-3 位のアリルアルコールに対してのみ位置選択的にアセチル基を導入することができた。未反応回収原料 **7f** および反応生成物 **7h** の鏡像体過剰率は、それぞれ 77.6% ee と 75.4% ee と両鏡像異性体間に明らかな速度差が見出され、鏡像選択比 *E* 値は 16.6 であった。



Scheme 22

2-4. リパーゼを用いた位置・鏡像選択的エステル交換

メトキシ基を導入した化合物 **7j** の場合、C-3 位水酸基の立体障害が増大し、このことがアシル化の際、酢酸ビニルと触媒中心のセリンから形成されるアシル酵素複合体に対する「求核剤」としての作用が弱まったと考えられる。そこで、新しい基質としてジアセタート **7g** を設定した。このものは C-4 位に置換基が導入されているものの、C-3 位もエステルで、直接ここにセリン水酸基が攻撃する。すなわち、この基質は「求電子剤」として機能することになる。ジアセタートの場合、C-4 位に電子求引性基が導入されているので、C-3 位アセタートは一層求核剤の攻撃を受けやすくなり、その結果、反応性の向上が期待される (Figure 5)。このような基質に対し、酵素を用いたエステル交換を試みることにした。

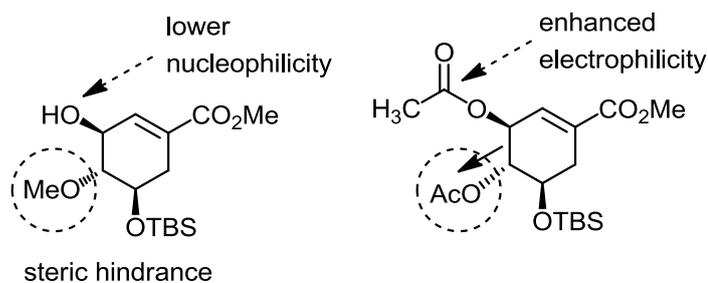
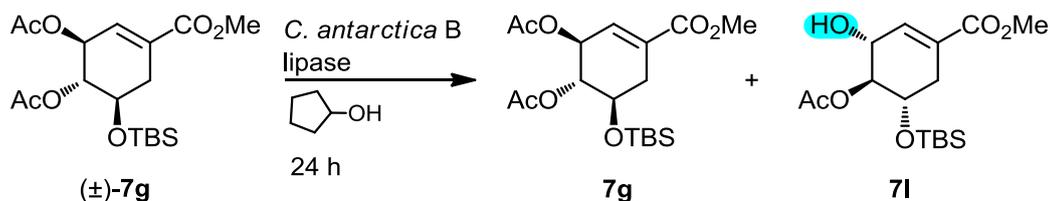


Figure 5

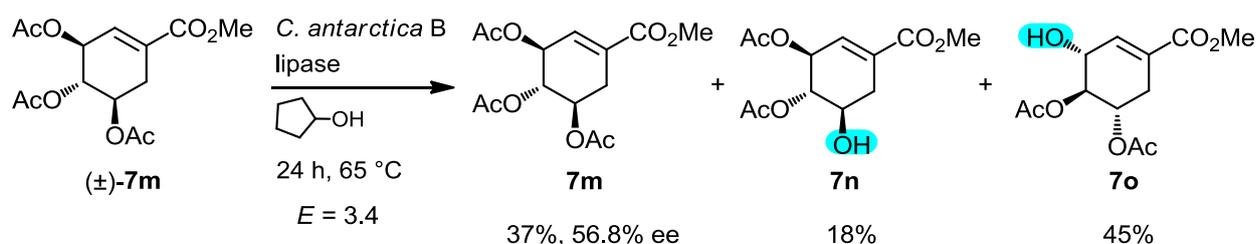
ところで、酵素触媒を用いるエステル交換は可逆反応であり、反応の終期では副生する酢酸エステルに対する逆反応により、速度論的分割が見かけ上ある一定の比率に達したところで、それ以上進行しなくなってしまう恐れがある。そこで、エステル交換で用いるアルコールを、上述の逆反応が起こりにくいシクロペンタノールとし、ジアセタート **7g** に対するエステル交換を試みた (Table 6)²⁸。シクロペンタノールが作用して副生するシクロペンチルアセタートは、酵素触媒中心のセリン水酸基から求核攻撃を受けにくいため、生成したアセタートが再び「求電子剤」として働く逆反応も起こりにくいからである。未反応回収原料 **7g** および反応生成物 **7i** の鏡像体過剰率はそれぞれ 54.2% ee と 98.4% ee で、これまでのアシル化に比べ鏡像選択比 *E* 値は 200 以上と非常に高くなった (entry 1)。しかしこの条件では、転換率はわずか 36% と未反応回収物の中に不要な鏡像異性体が残っているので、実用的な分割とはいえない。そこで、反応温度をあげたところ、期待通り反応速度は高くなり結果として、鏡像異性体間の選択性も非常によく、転換率も大幅に改善できた (entry 2, 3)。

Table 6



entry	temp. (°C)	conv. (%)	7g (% ee)	7l (% ee)	<i>E</i> value
1	r.t.	36	54.2	98.4	214
2	50	45	81.8	> 99.9	>500
3	65	47	87.6	> 99.9	>500

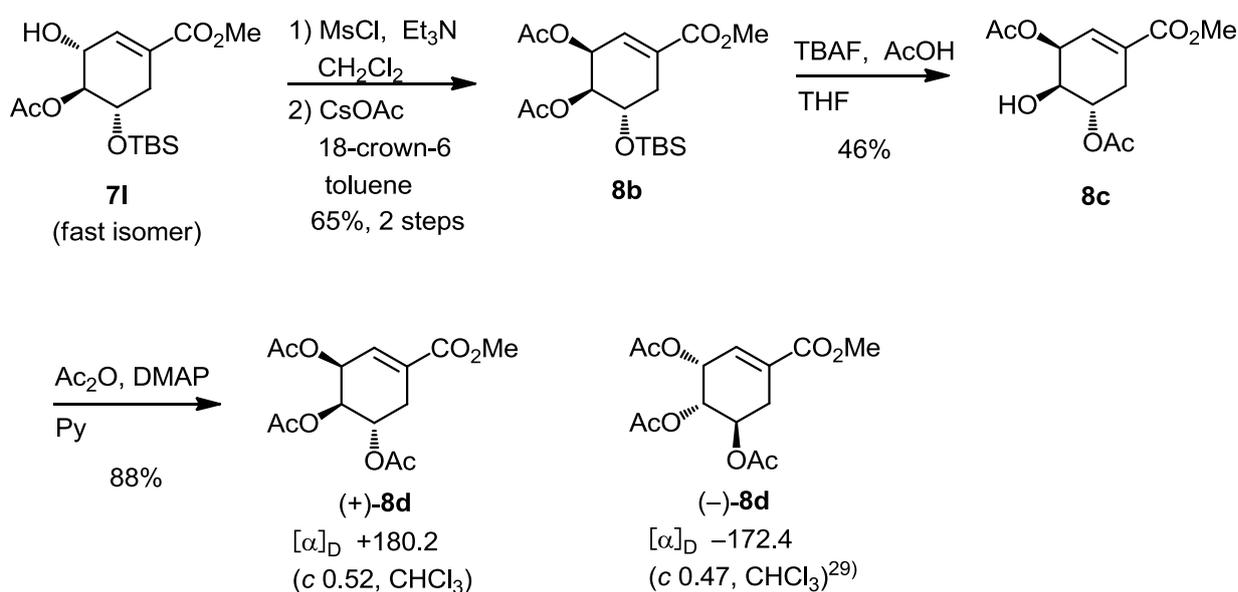
このとき、C-5 位に導入した TBS 基の立体障害の影響は決定的であった。なぜなら C-5 位の保護基をアセチル基にかえたトリアセタート **7m** を別途調製、同様にエステル交換を試みたところ (Scheme 23)、これまで全く反応しなかった C-5 位の水酸基に対してもエステル交換が進行、ジアセタート **7n** が生じてしまったからである。さらに、未反応回収原料 **7m** の鏡像体過剰率は 56.8% ee であり、転換率から算出される鏡像異性体選択比 *E* 値は 3.4 程度と鏡像選択性も低下した。以上の結果より、3-エピシキミ酸エステル **7** に対する酵素反応には、1) C-5 位に対しかさ高い TBS 基を導入、2) C-4 位のアセチル基が有する電子求引性の誘起効果を利用した、エステル交換が効果的であると結論した。



Scheme 23

2-5. 絶対立体配置の決定

位置選択的なエステル交換、立体選択的な酵素光学分割を同時に行う方法を見出したものの、両生成物の絶対立体配置が不明のままでは有用物質への展開も不可能である。そこで、エステル交換で得られたアリルアルコール **71** のアリル位の立体化学を反転し、シキミ酸型の相対立体配置を有する既知物質 **8d** に誘導して物性を比較した²⁹⁾。まず、アリルアルコール **71** の C-3 位の遊離水酸基に対しメシル基を導入、酢酸セシウムを用いて求核攻撃により立体反転しジアセタート **8b** を得た。ついで、TBS 基を除去、そのまま定法によりアセチル化しトリアセタート **8d** へ誘導した。このものの旋光性はプラスの符号を示し、天然型のシキミ酸エステル(3*R*,4*R*,5*R*)-**8d** の旋光性との比較により非天然型シキミ酸(3*S*,4*S*,5*S*)-**8d** と確定した (Scheme 24)。このものは、天然生物活性物質合成に供する新しい出発原料として期待される。



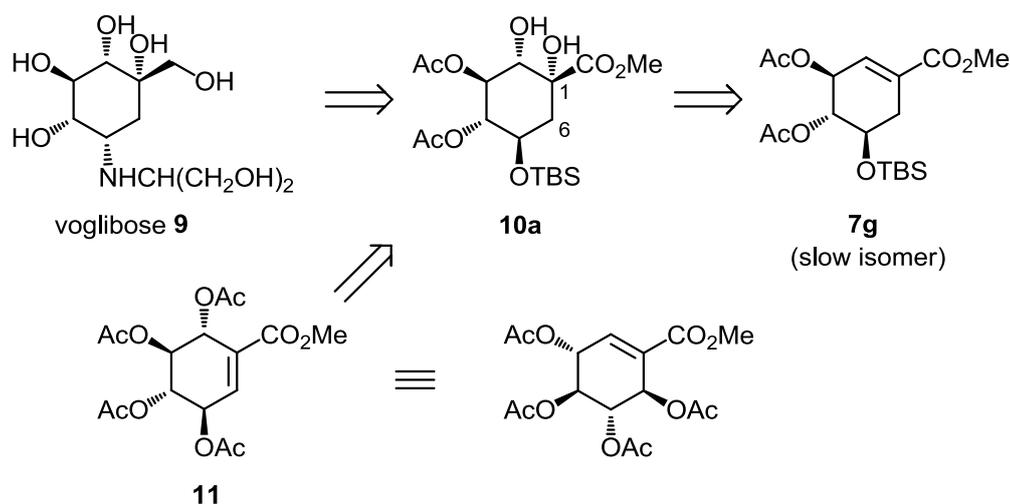
Scheme 24

3. 生物活性をもつシクリトール類の合成にむけて

3-1. 分離した鏡像異性体をどう活用するか

2-4 節では、酵素反応における生成物 **71** すなわち反応性の高い鏡像異性体から出発、

官能基の特徴を活かして立体化学を反転し、非天然型シキミ酸エステル **8d** を合成したものの、ラセミ体を出発する鏡像異性の分離という手段にもとづく限り、両鏡像異性体ともに効果的に活用する手法の開拓は必須である。そこで、酵素反応後に未反応原料として回収される **7g** からカルバ糖骨格の中でも強力な α -グリコシダーゼ阻害活性を示す voglibose **9**³⁰⁾を標的とし、その前駆体として期待されるジオール **10a** への変換を検討することとした。このジオール **10a** から C-6 位方向に第三級アルコールを脱水して、オレフィン **11** が得られ、もとのジアセタート **7g** を裏返した型の新しい立体化学をもつ化合物群へ大きく展開できる (Scheme 25)³¹⁾。



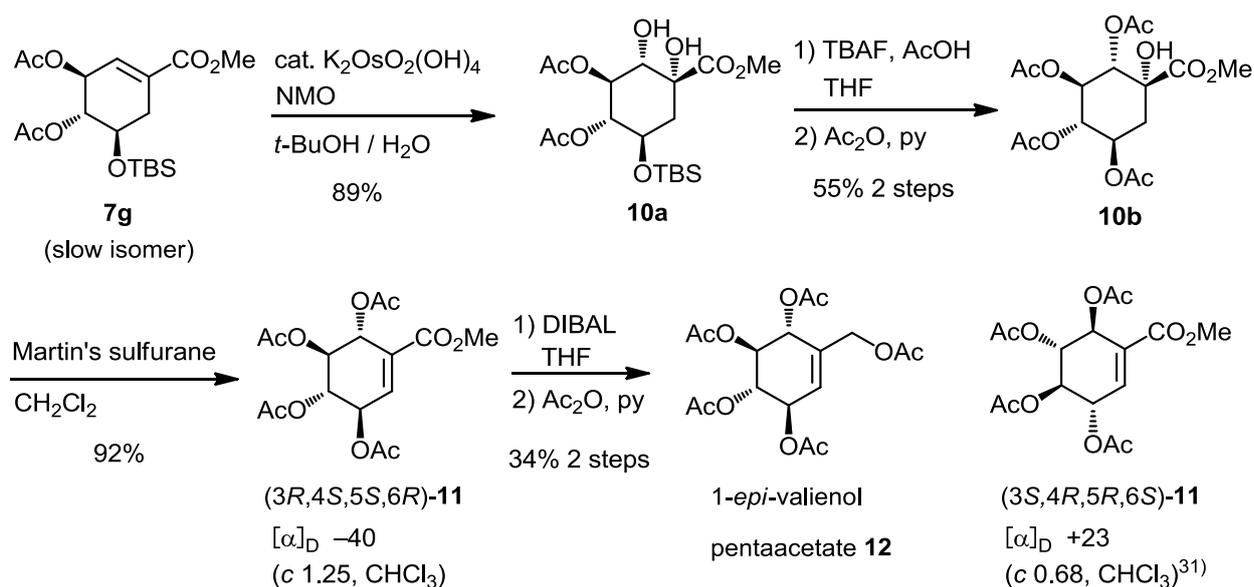
Scheme 25

3-2. 立体・位置選択的水酸化と脱水で新しい有用物質へ

酵素反応の段階で未反応回収原料として得られてくる **7g** を voglibose (**9**) に誘導するとなれば、C-5 位は窒素求核剤で容易に立体反転できるため、オレフィンから C-1 と C-2 位に対して、新たにジオールを α -配向に導入することが大きな課題である。この問題に対し、反応系内で四酸化オスミウムを触媒量生成するオスミウム酸カリウム二水和物に、*N*-メチルモルホリン-*N*-オキシドを再酸化剤として加えるという条件下、ジヒドロキシ化を試みた。期待通り C-3 位に導入した β -配向のアセトキシ基が立体障害として効果的に働き、C-1 および C-2 位に α -配向でジヒドロキシ化が進行、目的とするジオール **10a** が

生じてきた。この際、 β -配向のジオールは全く生成していなかった。ジオール **10a** の TBS 基を温和な条件下で脱保護した後、2 か所の第二級アルコールのみ選択的にアセチル化、テトラアセタート **10b** を得た。

ジヒドロキシ化における水酸基の配向は、以下既知物質への誘導することにより確かめている。まず、テトラアセタート **10b** に対し、非常に温和な条件で反応が進行する Martin's sulfurane を用い脱水、オレフィン **11** を良好な収率で得た。この変換に際しては、C-5 位水酸基の立体障害の影響が大きく、かさ高い TBS 基からアセチル基へと変えた **10b** にすることが不可欠であった。オレフィン **11** は負の旋光性を示し、既知物質の (3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-**11** の旋光性との比較により、(3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-**11** という絶対立体配置であることがわかった³¹⁾。最後に、DIBAL を用い α,β -不飽和エステルを還元、いったん遊離となった全ての水酸基をアセチル化し既知物質 **12** へと誘導、立体化学を含む全構造を改めて確認している (Scheme 26)³²⁾。



Scheme 26

第四章 化学的不斉合成および酵素触媒反応を活用した NF- κ B 活性化阻害剤、(2*S*,3*S*,4*S*)-DHMEQ の合成

1. 緒言

NF- κ B は、1986 年に Baltimore らによって B 細胞の免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子のエンハンサー領域に結合する核タンパク質として同定された³³⁾。さらに、lipopolysaccharide (LPS) 刺激により NF- κ B が活性化³⁴⁾することが示され、現在ではマクロファージをはじめ多くの細胞で発現していることが判明されている。NF- κ B は、DNA アフィニティカラムにより精製され、主な NF- κ B は 65kD のタンパク質 (p65, RelA, gene: 11q13) と 50kD のタンパク質 (p50, NF- κ B1) のサブユニットからなる二量体である³⁵⁾。

これらのタンパク質が、N 末端側の約 300 アミノ酸領域 (rel homology domain: RHD) において、*c-rel* や *v-rel* の特定領域で相同性を示すことにより、”rel / NF- κ B family”と呼ばれている。NF- κ B を構成する因子は、Rel A (p65)³⁶⁾, p50³⁷⁾, RelB³⁸⁾, p52³⁹⁾, c-Rel⁴⁰⁾ の 5 つが報告され、これらがホモあるいはヘテロダイマーを形成することにより転写因子としての機能を発揮する。NF- κ B 活性化には主として 2 種類の経路が存在し、1) p65, p50 を介した canonical (classical) NF- κ B 経路、2) RelB, p52 を介した non-canonical (alternative) NF- κ B 経路である (Figure 6)⁴¹⁾。

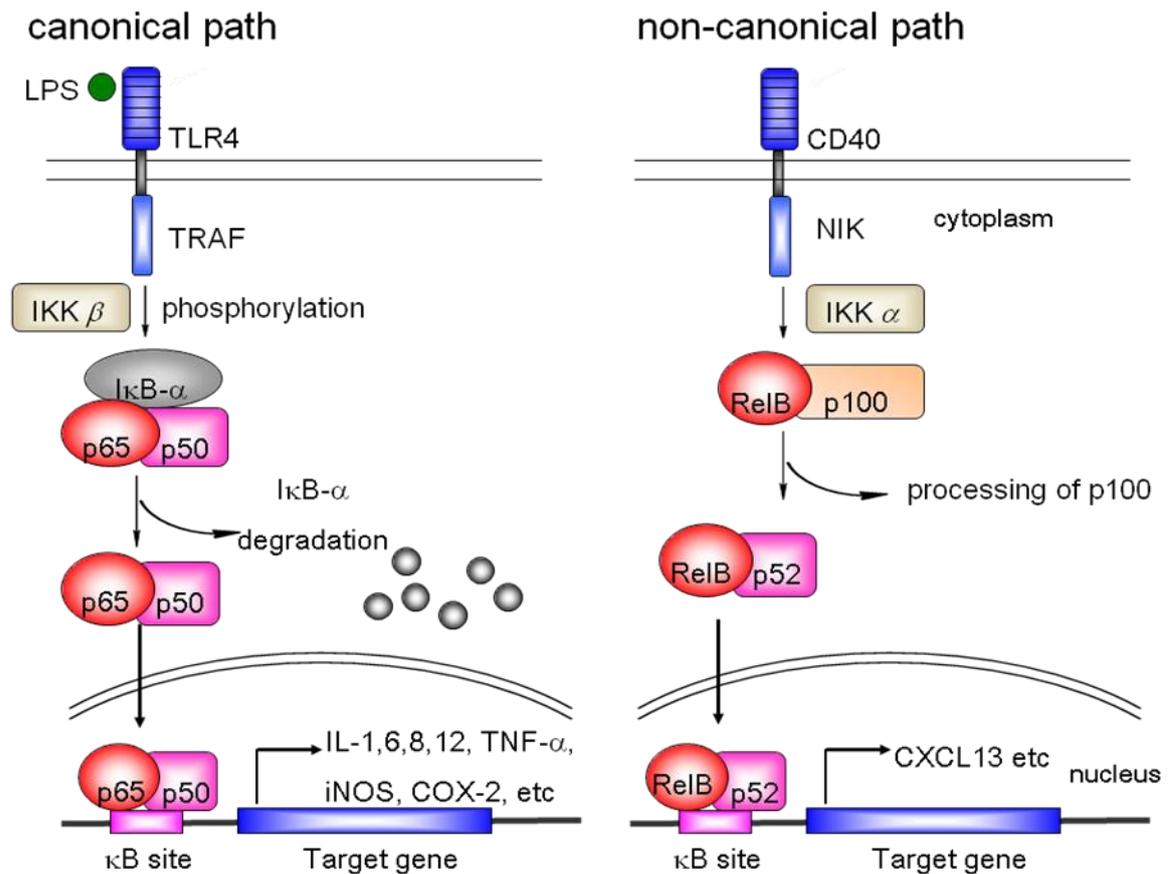


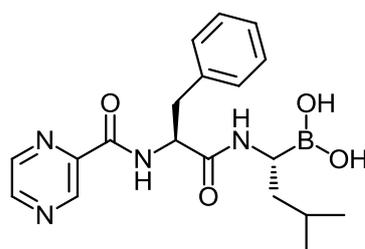
Figure 6

Canonical (classical) NF-κB 経路では、inhibitor of kappa B (IκB)の制御ユニットと結合することにより NF-κB はコントロールされている。しかし、TNFαや IL-1 によって NF-κB が活性化されると IKK βにより IκB-βがリン酸化⁴²⁾され、IκB-α / IκB-β / NEMO の複合体がプロテアソームにより分解され遊離の IκB-αが細胞質から核内に移行⁴³⁾、炎症性サイトカインや抗アポトーシスタンパクなどを制御することにより、癌の悪性化、免疫やアポトーシス抑制に関与することがわかった⁴⁴⁾。

一方、non-canonical NF-κB 経路では、NIK を介し IKK αにより RelB の相手側の p100 のプロセッシングが NF-κB の活性化を制御している。p100 は、canonical の IκB-βに相当し、刺激のない状態では RelB の活性を抑制している。しかしながら、NIK からシグナルを受けると p100 は、1) IKK αによるリン酸化⁴⁵⁾、2) p100 のプロセッシング、3) p100 が NF-κB 構成因子である p52 となり、4) RelB とのヘテロダイマーを形成、κB 細胞の活

活性化が過剰に行われた場合には自己免疫疾患、AIDS などの原因の一つになると報告されている⁴⁴⁾。

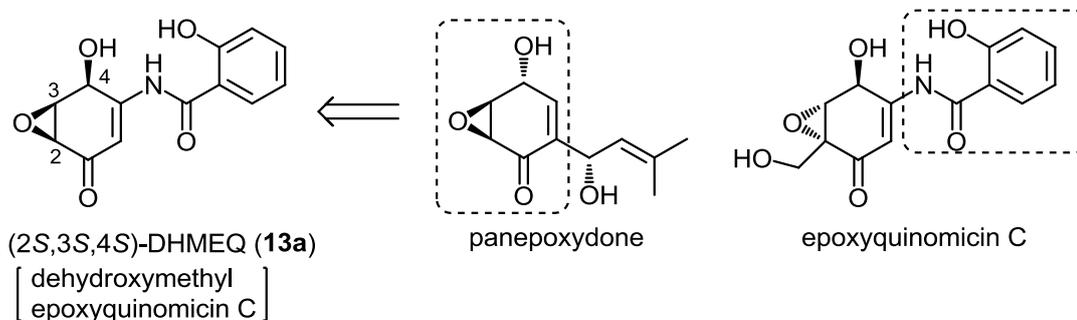
NF- κ B の活性化は、癌の抗癌耐性、炎症、免疫反応などに深い関連があることがわかってきた。したがって、NF- κ B 活性化阻害剤は、抗癌剤や抗炎症剤として有効に働くと考えられ、さまざまなグループによって精力的に探索研究が行われてきた⁴⁶⁾。たとえば、プロテアソームを阻害するベルケード[®] (Figure 7)⁴⁷⁾は、I κ B- β の分解を抑制することにより、I κ B- α の核内移行を制御、その結果、炎症性サイトカインなどを発現することなく骨髄腫細胞をアポトーシス (細胞自滅) へ導くと考えられている。しかしながら、I κ B- β の分解や抑制はシグナル伝達の上流部に相当し、下流部に位置する DNA やタンパク質を通じ、副作用が懸念される。このため、プロテアソーム阻害剤⁴⁸⁾よりも副作用低減が期待できる薬剤の開発が求められ、とくに κ B 細胞を標的とした分子標的治療薬の開発は急務である。



Velcade

Figure 7

当研究室では、 κ B 細胞の活性化を選択的に抑制できる薬剤として、細胞毒性の低い NF- κ B 活性化阻害剤 DHMEQ (13a)を発見した⁴⁹⁾。DHMEQ は、担子菌類の一種 *Lentinus crinitus* から単離され NF- κ B 活性化阻害作用を有する panepoxydone のエポキシヒドロキノン部位を基本骨格とし、*Amicolatopsis* 属の不完全菌類から単離された抗生物質の一種 epoxyquinomicin C のサリチルアミド部分を置換した構造をもち、強い NF- κ B 活性化阻害作用を示す合成化合物である (Scheme 27)⁵⁰⁾。



Scheme 27

さて DHMEQ (**13a**)には 2,3,4-位の三か所に不斉中心を有するが、エポキシ環構造のため、実際には 4 種類の立体異性体のみが可能である。前駆体のエポキシエノン還元の際、反応が立体選択的に進行し主生成物として得られてきた(2*R**,3*R**,4*R**)-異性体が生物活性を指標に選抜されてきた。両鏡像異性体間で活性の差異を調べる目的で、キラル固定相を有する HPLC 分取クロマトグラフィーにより鏡像異性体を分離したところ、負の旋光性を示す(2*S*,3*S*,4*S*)-**13a** の生物活性が(2*R*,3*R*,4*R*)-**13a** と比較して 10 倍以上高いことがわかった⁴⁹⁾。

さらに、DHMEQ の NF-κB 活性化抑制に対する作用機構は、従来までに報告されているプロテオーム阻害剤であるベルケード[®]や、IKK をターゲットとする panepoxydone とは異なり、NF-κB タンパクに含まれるシステイン残基と結合し核移行を阻害することがわかった⁵¹⁾。具体的には、NF-κB 構成因子である p65 の DNA 結合ドメインに隣接した Cys38 に直接共有結合することが、タンパク-DHMEQ 複合体の TOF-MS により確認されており、これを通じ p65 の DNA 結合活性を阻害する (Figure 8)。

Structure of p65/p50-DNA complex

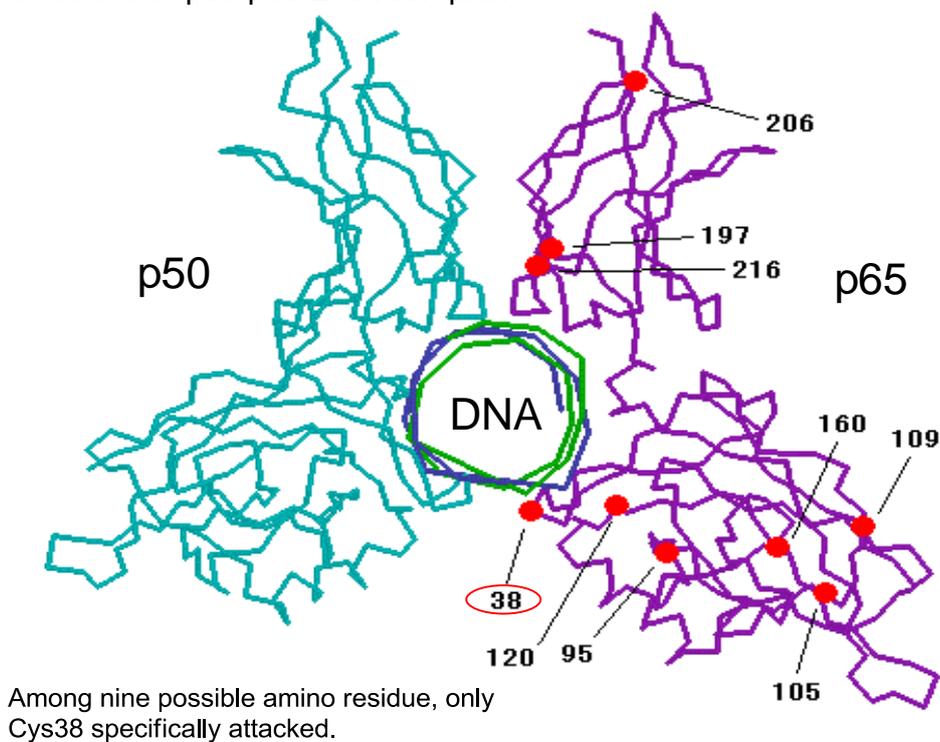
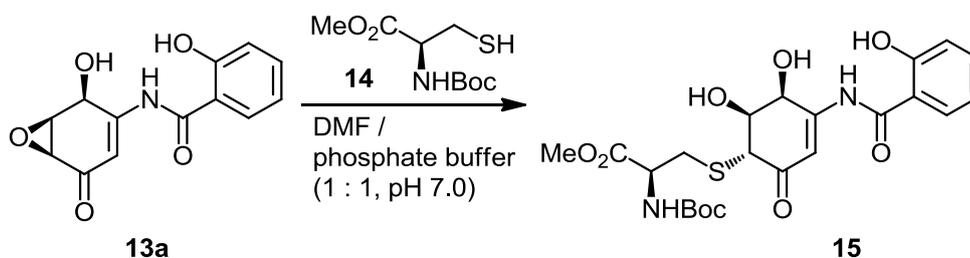


Figure 8

モデル反応として、DHMEQ (**13a**)とシステインの誘導体 **14** を作用させたところ、反応性の高いエポキシ環のつけ根炭素に対し、スルフヒドリル基の求核攻撃が起こって開環した化合物 **15** が単離、構造確認されている (Scheme 28)⁵²⁾。さらに、canonical path における p65 のみならず、DHMEQ は、non-canonical path の p50、c-Rel および RelB にも共有結合することが示唆されている。



Scheme 28

このように優れた生物活性をもつ DHMEQ は、全く毒性を発現することなく多くの疾患の動物モデルで強力な抗炎症活性、抗癌活性を示した (Figure 9)⁵³。以上のことから、(2*S*,3*S*,4*S*)-DHMEQ を効率的かつ大量に合成する新しい手法が求められている。著者は DHMEQ の(2*S*,3*S*,4*S*)-体の不斉合成を検討することにした。

Antitumor and anti-inflammatory activities of DHMEQ *in vivo*

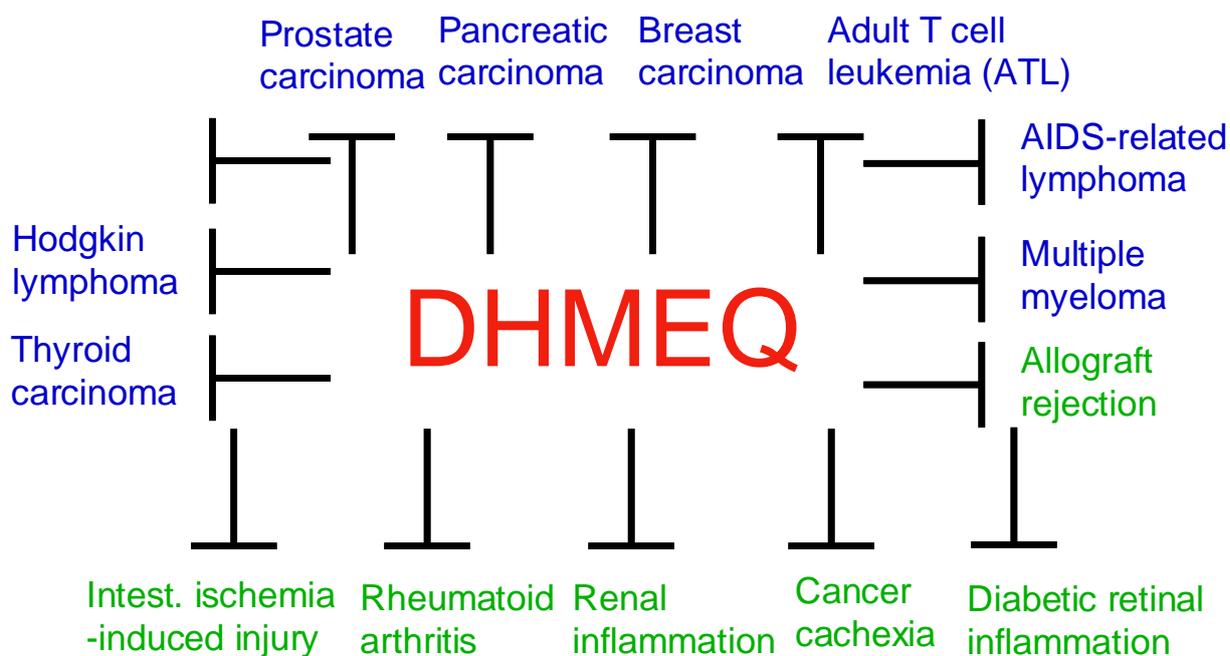
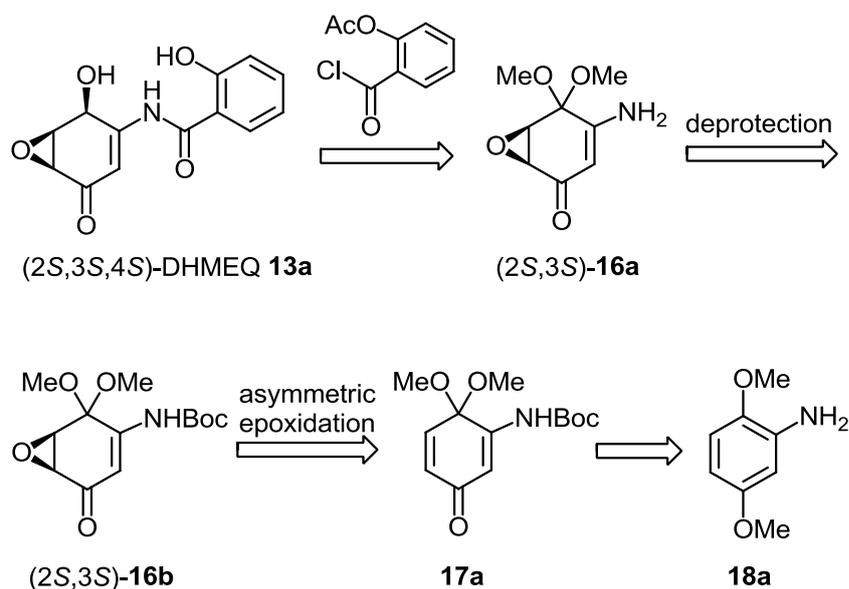


Figure 9

2. 逆合成解析

著者は以下に示すように(2*S*,3*S*,4*S*)-DHMEQ (**13a**)の合成経路を立案した (Scheme 29)。まず、ラセミ体合成の報告に従い⁵⁴、サリチルアミド部位は合成の最終段階で導入構築することとし、前駆体のエナミン **16a** を、Taylor らによって報告されたキノンモノアセタール **17a** の不斉エポキシ化⁵⁵、ひきつづく脱保護により誘導する。モノアセタール **17a** は市販で入手容易な 2,5-ジメトキシアニリン **18a** から調製することとした⁵⁶。



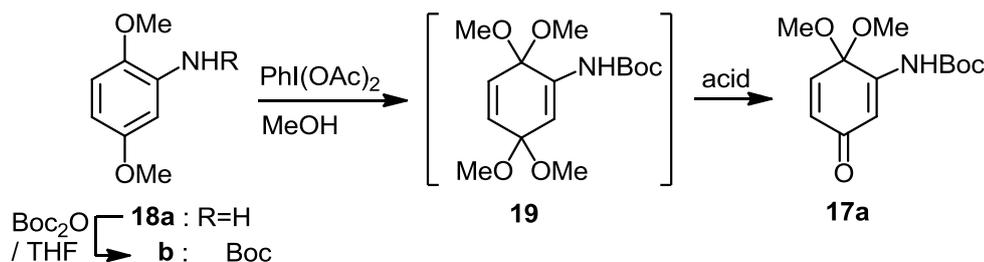
Scheme 29

3. 不斉エポキシ化

3-1. キノンモノアセタールの調製

まず、遊離アミノ基を **Boc** 基により保護したアニリン誘導体 **18b** に対し、ヨードベンゼンジアセタートを用いた脱水素によるモノアセタール **17a** への変換を試みた (Table 7)。この際、目的とするモノアセタール **17a** に加えもう一方のカルボニル基までもがアセタール化されたビスアセタール **19** が副生していた。このものは酸処理により位置選択的に脱保護が可能で、モノアセタール **17a** へ収束することが当研究室の先行研究で知られている⁵⁴⁾。そこで、既法に従い塩酸を用いる脱アセタール化を、**17a** と **19** の混合物に対し試みた。しかし、モノアセタール **17a** がさらに加水分解され、キノンにまで脱保護された化合物が副生してしまい、肝腎のモノアセタール **17a** の収率はわずか 21%にとどまった (entry 1)。そこで、加水分解に用いる塩酸をより弱いクエン酸にかえ、反応温度も下げ再度試みたところ、当初実施していた条件下と比較し収率は 48%と約 2 倍にまで向上、さらに 10 倍にスケールアップしても反応の再現性は良好であった (entry 3)。

Table 7

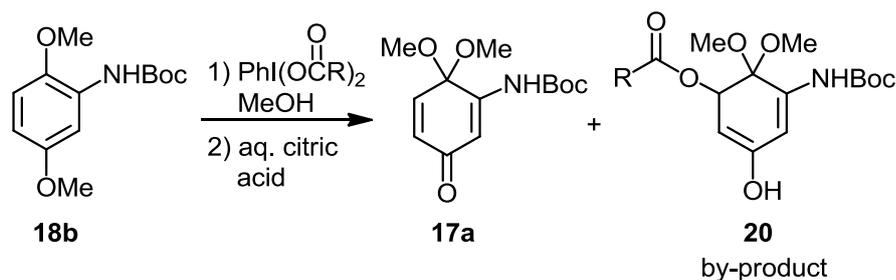


entry	scale (mmol)	acid	temp. (°C)	time (h)	yield (%)
1	0.4	HCl	r.t.	5	21
2	0.4	citric acid	0	24	47
3	4.0	citric acid	0	24	48

このヨードベンゼンジアセタートを用いる脱水素では、反応時間延長、温度を変えるなどさまざま試みたにもかかわらず、それ以上の収率向上を見出すことができなかった。前述の工程で常に生じてくる副生成物の一つを NMR 分析により構造解析したところ、予想外にも試薬に由来する酢酸イオンが目的物のモノアセタール **17a** に対し 1,4-付加したアセタート **20** が生じていた (Table 8, entry 1)。そこで、酸化剤を構成するカウンターイオンを変えて検討を試みた (Table 8)。ヨードベンゼントリフロオロアセタートではかえって、複雑な混合物になってしまったが (entry 2)、この原因としては、反応に伴い必ず当量以上生じてくるトリフルオロ酢酸の強い酸性に問題があると考え、酸化剤をヨードベンゼンピバラートに変えた。このアイディアは成功、反応に伴い生じてくるピバラートイオンは、カウンターイオンとしてアセタートやトリフルオロイオンと比べ、立体的にかさ高いため、基質に含まれるアセタールエノンに近づく際、立体反発により 1,4-付加体 **20** が副生することなくモノアセタール **17a** を良好な収率で得ることができた (entry 3)。ここでさらに反応の様子を TLC により詳細に追跡したところ、水の影響と思われる極性の高いスポットがわずかに生じていた。そこで、モレキュラーシーブス 4A を加え反応系内を徹底的に脱水したところ、上述の副生成物を全く生じることなく、モ

ノアセタール **17a** を 80% という高い収率で得ることができるようになった (entry 4)。

Table 8



entry	R	additive	temp. (°C)	yield (%)
1	CH ₃	—	0	48
2	CF ₃	—	-10	complex mixture
3	C(CH ₃) ₃	—	0	71
4	C(CH ₃) ₃	MS 4A	0	86

3-2. 不斉エポキシ化の試み

冒頭に述べた、Taylor が不斉エポキシ化の基質として用いたモノアセタール **17a** が大量調製可能になったので、ベンジルシンコニジニウムクロリドというキラル第四級アンモニウム塩を不斉源とし、ヒドロペルオキシドの不斉 1,4-付加-脱離を利用する、川口・井上の不斉エポキシ化^{55,57,58})を試みた (Table 9)。ところが、いざ反応を試みたところ、Taylor によって報告されていた結果を再現することはできず、目的とするエポキシド **16b** の収率はわずか 30%、しかも鏡像体過剰率は 49.9% ee でしか得られてこなかった (entry 1)。反応時間を延長、温度も原報に記載された 0 °C から室温にまで上げ不斉エポキシ化を再度試みたが、転換率は向上しなかった。さらに、後処理の段階で、第四級アンモニウム塩が界面活性剤として働き、水相と有機相の間に分離に強く抵抗するエマルジョンが生じ、抽出が困難になるという実験的障害が起こってしまった (entry 1, 2)。反応時使用する溶媒を原報のトルエンからクロロホルムにかえたところ、第四級アンモニウム塩の有機相への分配が高まり、その結果乳化は抑制、後処理時の問題は解決できたものの、

残念ながら収率改善にはつながらなかった (entry 3)。

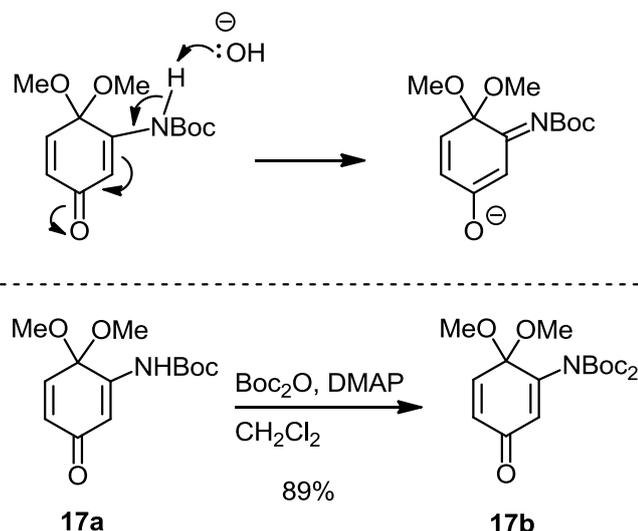
Table 9

Reaction scheme showing the conversion of **17a** to **16b** using *N*-benzylcinchonidinium chloride (1.3 eq.), TBHP (4 eq.), aq NaOH (6 M), and a co-solvent.

entry	scale (mmol)	temp. (°C)	co-solvent	time (d)	yield (%)	ee (%)
1	0.2	-9	toluene	1	30	49.9
2	0.2	r.t.	toluene	2	40	52.3
3	4.0	25	CHCl ₃	1	36	52.9

3-3. 不斉エポキシ化に供する新たな基質、bis-Boc 体の調製

収率が低い原因の一つとして、塩基により基質のプロトンが引き抜かれ、エノラートを形成することにより求電子性が低下、そのためヒドロペルオキシドの 1,4-付加も起こらなくなっているのではないかと考えた (Scheme 30)。そこで、遊離のプロトンを持たない基質、具体的には、アミノ基のプロトンをさらに Boc 基で保護した bis-Boc 体 **17b** へと誘導することにした。実際、モノアセタール **17a** に対し、触媒量の DMAP 存在下 Boc₂O を作用させたところ、bis-Boc 体 **17b** を収率 89% で得ることができた。



Scheme 30

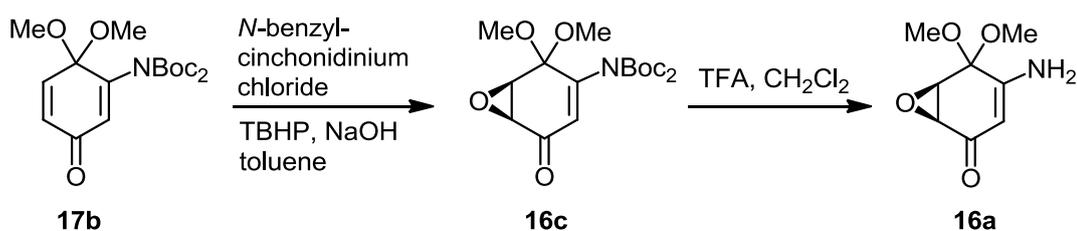
3-4. Bis-Boc 体を用いた不斉エポキシ化

このような方法で調製した bis-Boc 体 **17b** に対し、前述の第四級アンモニウム塩を不斉源として用いる条件で反応を試みた (Table 10)。ところが、生成物の鏡像体過剰率は 85.7% ee まで向上したものの、収率は 20% と低いうえ、再現性が極めて低かった (entry 1, 2)。

生成物の鏡像体過剰率や収率が変動する原因として、第四級アンモニウム塩によるキラルヒドロペルオキシドがアキラルなナトリウムヒドロペルオキシドと競合していると考えた。そこで、キラルヒドロペルオキシドに平衡を傾けようとシンコニジン塩および求核剤の当量を増し反応を再度試みたが、収率、生成物の鏡像体過剰率のいずれも改善することはできなかった (entry 3, 4)。

あらためて収率および鏡像体過剰率の変動の要因を考える中、反応に伴い常に副生する水が大きな要因ではないかと仮定した。そこで、系内に存在する水分を完全に除去しようとモレキュラーシーブス **4A** を添加して反応を試みたところ、鏡像体過剰率は 74.7% ee に向上し、この点については再現性も良かったが、収率はかえって低下してしまった (entry 5, 6)。

Table 10



entry	quaternary ammonium salt (eq.)	TBHP (eq.)	NaOH (eq.)	MS 4A	yield (%)	ee (%)
1	2	5	1	-	20	85.7
2	2	5	1	-	33	56.1
3	6	15	3	-	58	58.9
4	6	15	3	-	58	46.1
5	6	15	3	+	34	74.7
6	6	15	3	+	40	75.7

エポキシド **16c** を再現性よく、高い鏡像体過剰率で得ることができるようになったものの、この反応には一つ大きな問題がある。前述の条件 (Table 10, entry 1~6) では基質に対し、高価なシンコニジン塩を 6 当量も使うという点で、このままでは実用的とはいえない。ここで、不斉エポキシ化について想定される反応機構に基づき、シンコニジン塩の当量低減を模索した。具体的には、反応系内に存在するアキラルなヒドロペルオキシドを抑制する目的として、ナトリウムイオンの捕捉である (Figure 10、上段)。そこで、15-クラウンエーテルを 1.1 当量添加したところ、期待通り平衡をキラルヒドロペルオキシドに傾けることに成功、高価なシンコニジン塩を 2 当量にまで減らすことができた。さらにこの条件では、シンコニジン塩の当量を抑えたにもかかわらず、不斉エポキシ化の収率は 57% まで向上、生成物の鏡像体過剰率は 79.8% ee と、再現性良く得ることができるようになった (Figure 10、下段)。

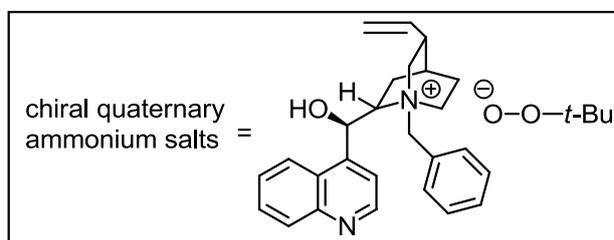
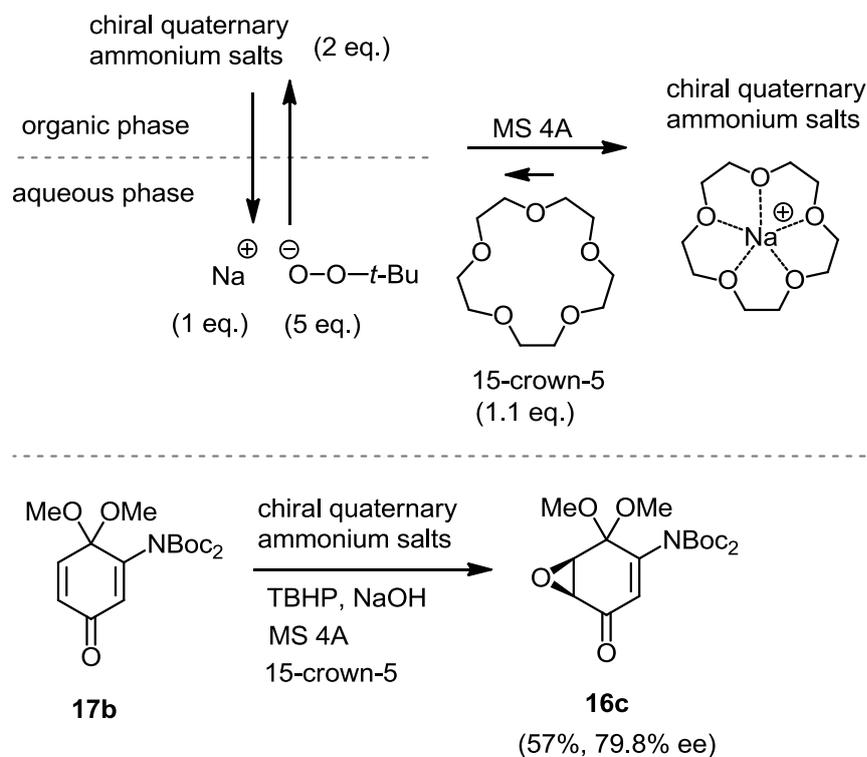
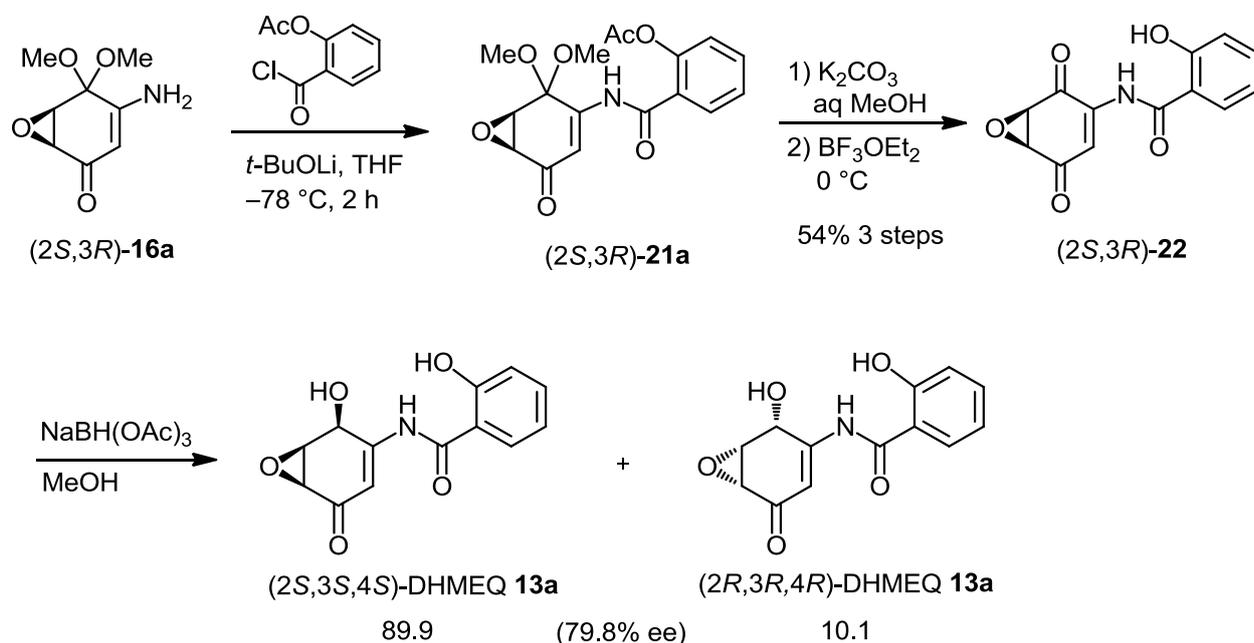


Figure 10

4. (2*S*,3*S*,4*S*)-DHMEQ の純粋な鏡像異性体合成

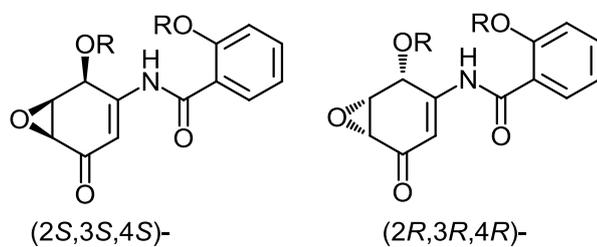
4-1. ジアシル化 DHMEQ への誘導

前項で調製した 79.8% ee のエポキシエナミン **16a** には、不要な鏡像異性体が 10%ほど混入した状態にある。このものを再結晶したところ、純粋な鏡像異性体を得ることはできたものの、目的とする鏡像異性体までもが母液に残ってしまい、結晶の回収率はわずか 8%であった。そこで、すでに確立しているラセミ体合成ルート⁵⁴⁾を参考に、サリチル酸部位との縮合、加水分解、還元などを経て DHMEQ (**13a**)へと誘導した (Scheme 31)。



Scheme 31

このサンプルには、不斉エポキシ化で生じそのまま誘導された(2R,3R,4R)-体が10%程度混入している。DHMEQ (13a)がもつ第二級アルコールを手がかりに、酵素を作用させる鏡像選択的な反応により、不要な鏡像異性体を分離することとした。具体的には、平岡・小澤により見出された、ラセミ体ジアシル DHMEQ の酵素分割法⁵⁹⁾を適用することにした。以下、平岡・小澤の方法を示す。DHMEQ (13a)は水にも有機溶媒にも難溶性な化合物であり、化学・酵素法いずれでも速度論的分割は非常に困難である。そこで、二カ所の遊離の水酸基に対しアシル基を導入した。このエステルのカルボニル基に対し、酵素が作用し速度論的な差をもって鏡像選択的に加水分解が進行することを期待した (Figure 11)。



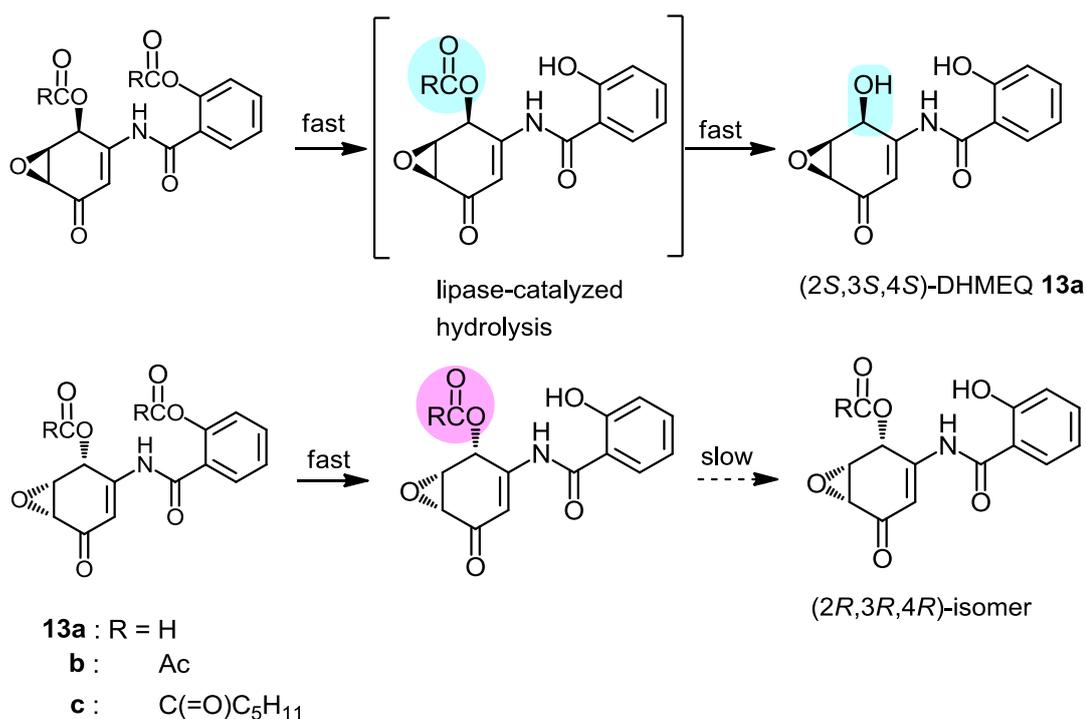
13a : R = H

b : Ac

c : C(=O)C₅H₁₁

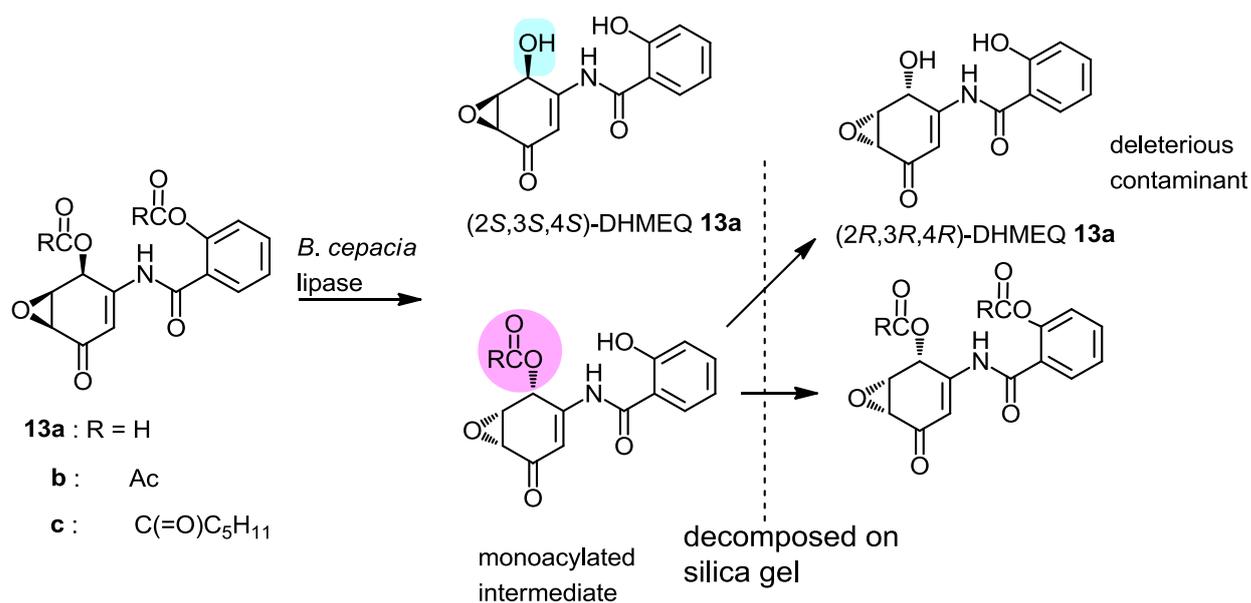
Figure 11

エステルの酵素加水分解の際、アシル鎖長を変えると選択性が変わるケースが報告されており⁶⁰⁾、基質全体の疎水性も鎖長に依存するので物性の変化も予想される。そこで、鎖長が短いアセチル基、長いヘキサノイル基をもつアシル体2種類を調製した。これらのジアシル体に対し、平岡は酵素加水分解を種々試み、*Burkholderia cepacia* lipase (Amano PS-IM)を選抜した。この加水分解では、フェノール部位がアシル基は両鏡像異性体とも速やかに反応、生成物はジオール **13a** とモノアシル体であった (Scheme 32)。



Scheme 32

この方法は、反応自体は、スムーズに進行かつ操作も簡便であったものの生成物の分離精製に大きな問題があることがわかった。モノアシル体がシリカゲル酸性に対し不安定で、ジアシル体とジオールに不均化してしまい、その結果としてシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分離は困難である (Scheme 33)。分解して副生してくるジオールは目的とする(2*S*,3*S*,4*S*)-体の鏡像異性体なので、これが目的物に混入するのでは基質を分割した意味が失われてしまう。



Scheme 33

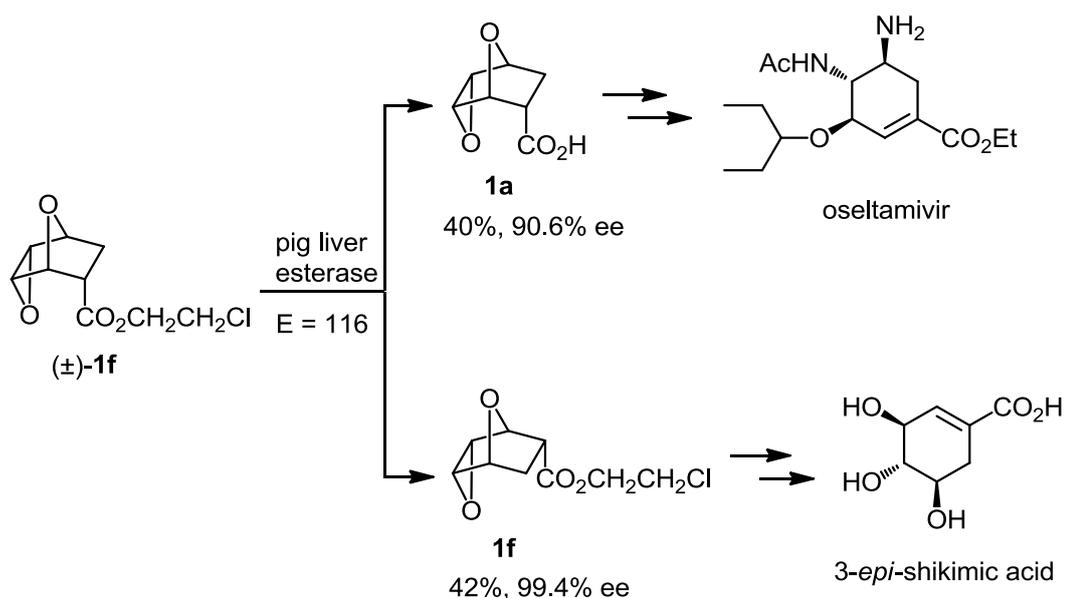
平岡は、溶媒に対する溶解性の差を利用する、いわゆる分別結晶により、ジオール **13a** とモノアシル体の分離を試みた。この分離精製において、アシル基の鎖長が分離の容易さと基質の安定性の両面に対し大きく影響した。アセチル基の場合、ジオール **13a** とモノアセタートの有機溶媒への溶解性の差は十分とはいえず、一回の結晶化では分離できなかった。これに対しヘキサノイル基の場合、ジオール **13a** とモノアシル体 **13d** の溶解度の差は十分で、反応の粗生成物に対しジイソプロピルエーテル中から、分別結晶するのみで、ジオール **13a** とモノヘキサノイル体 **13d** を分離することに成功した。得られたジオール **13a** は、取り扱いが容易かつ安定なジヘキサノイル体 **13c** へと再度誘導、キラル固定相を有する HPLC 分析により純粋な(2*S*,3*S*,4*S*)-DHMEQ (**13a**)であることを確認し

う、化学-酵素法を相乗的に活用するルートにより、(2*S*,3*S*,4*S*)-DHMEQ を 11 工程、総収率 9%により得た。

第五章 総括

本研究では、高度に酸素官能基化されたカルバサイクル類の合成を志向し、化学-酵素法を相補・相乗的に活用する効率的な手法によって、以下の成果を挙げた。

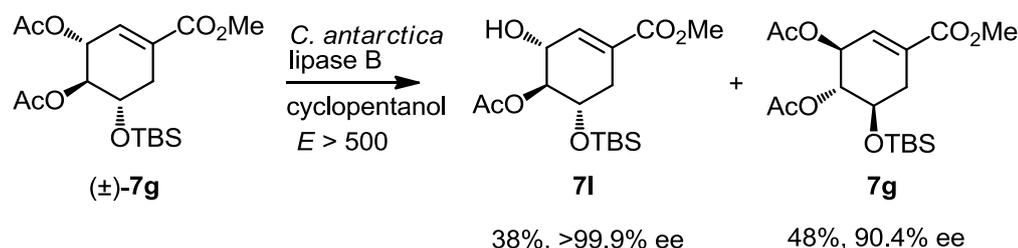
まず、シアル酸やグリコシダーゼ阻害剤に関連するカルバ糖・エポキシキノール類などの合成原料として有用な三環性エポキシエステル **1** の純粋な鏡像異性体を調製するため、酵素を用いた速度論的光学分割を検討した。酵素のスクリーニングから、ブタ肝臓エステラーゼが効果的であることがわかった。反応性の高い”fast isomer”に関し、エステルを構成するクロロエチル基は、エステラーゼの触媒中心モデルの疎水性ポケットによく適合する形をとり、反応速度・鏡像選択性ともに向上、鏡像異性体比は($E > 100$)に達した。酵素加水分解によって得られるカルボン酸 **1a** とエステル **1f** は、pH を中性・酸性に変え有機溶媒でそれぞれ抽出する「分別抽出」のみで分離できるという点で、実用的に優れている。カルボン酸 **1a** はオセルタミビルの出発原料として有用であり、一方、エステル **1f** は 3-エピシキミ酸へと導いた (Scheme 35)。



Scheme 35

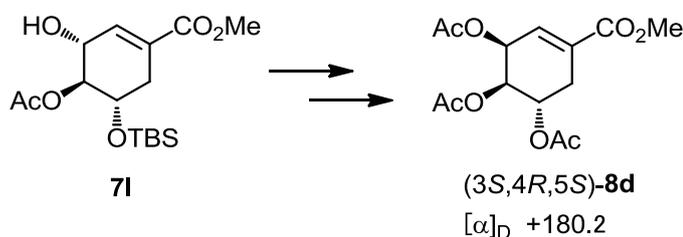
ところで、天然にはシキミ酸やキナ酸あるいはイノシトールやケブラキトールなど比較的豊富に供給できるカルバサイクル類が多数知られている。しかし、これらを合成原

料として用いようとした際、常に問題となるのは、分子内でほとんど同じ環境下に存在する水酸基を位置・立体選択的に保護・脱保護する工程である。本章ではそのような問題に対し新しい切り札になる酵素反応を開拓すべく、ラセミ体が容易に調製可能な 3-エピシキミ酸エステル誘導体 **7g** を基質とし、リパーゼを用いた位置・鏡像選択的反応を検討した。その過程で、図に示すシクロペンタノール中、*Candida antarctica* lipase B を用いたエステル交換が効果的であることを見出した。この際、C-5 位に導入した立体的にかさ高い TBS 基が効果的に機能し C-4 位の反応を抑制、C-3 位のみ位置選択的に脱アセチル化した化合物 **71** が得られ、鏡像体選択比は非常に高い値 ($E > 500$) を示した (Scheme 36)。



Scheme 36

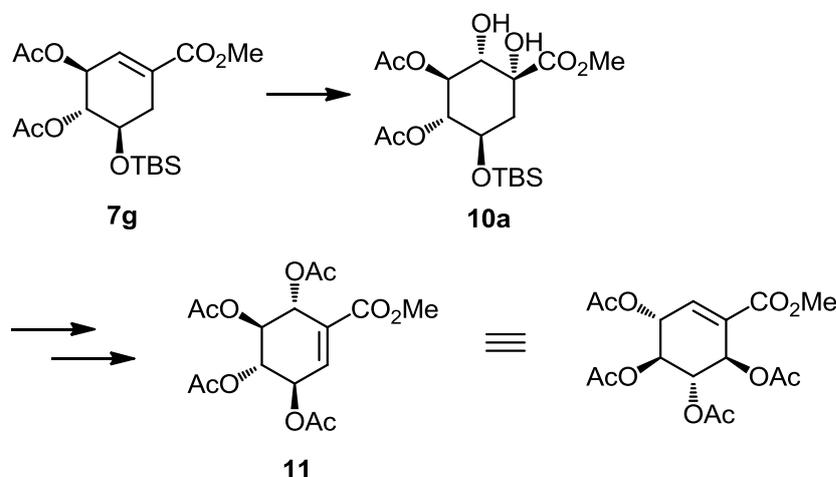
上述のエステル交換において反応性がより高い鏡像異性体 **71** は、C-3 位のみ選択的に脱保護されており、これを活用しメシラートを経由する立体反転によって、非天然型シキミ酸エステル **8d** へと誘導することができた (Scheme 37)。



Scheme 37

一方、未反応原料として回収されるジアセタート **7g** は立体選択的な α -配向ジヒドロキシ化により、さらに酸化度を上げたジオール **10a** に変換することができた。このもの

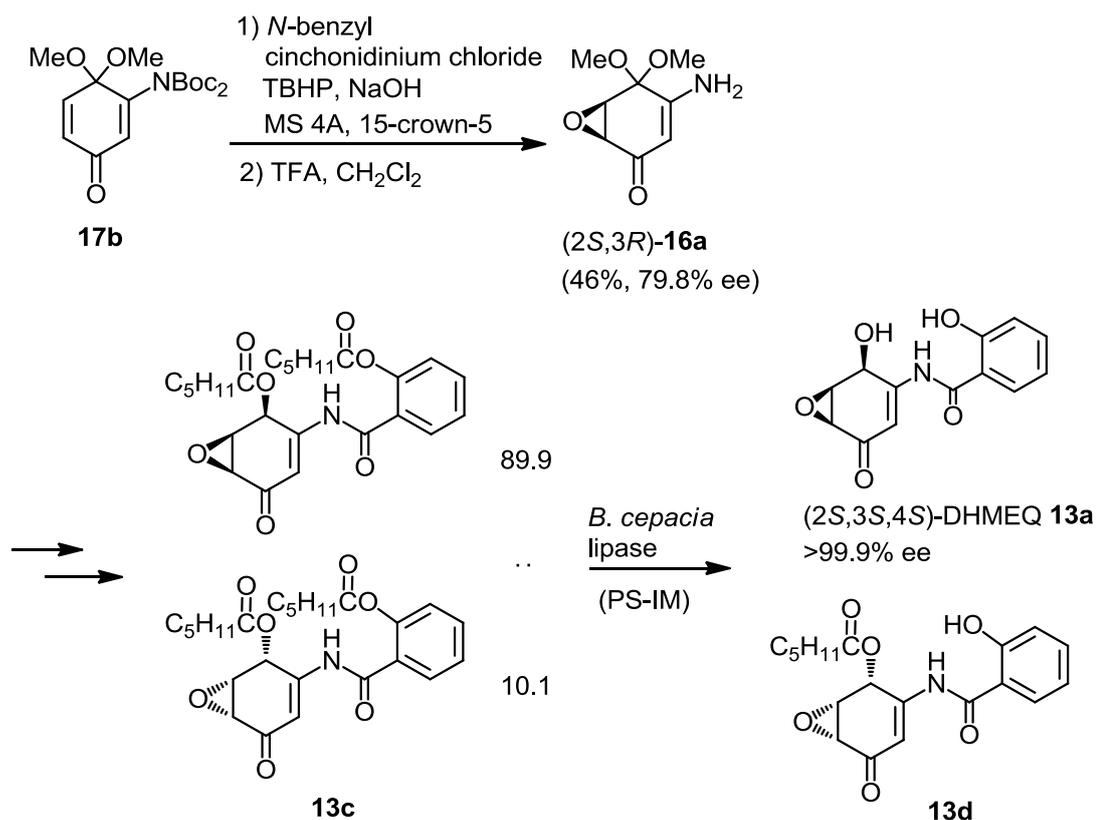
は、強力な α -グリコシダーゼ阻害活性を示す voglibose の前駆体として活用が期待される。さらに、C-6 位方向に第三級アルコールを脱水することにより、オレフィン **11** が得られた。もとのエステル **7f** を裏返した型の立体化学をもつ化合物群へ大きく展開できる (Scheme 38)。



Scheme 38

最後に、カルバサイクルの骨格を有する NF- κ B 活性化阻害剤、DHMEQ (**13a**) の合成研究を行った。生物活性本体である (2*S*,3*S*,4*S*)-体の不斉合成にむけ、キノンモノアセタール **17** に対し、ベンジルシンコニジン塩酸塩を不斉源とするエノンの不斉エポキシ化を徹底的に検討したところ、望みの立体化学を有する (2*S*,3*R*)-**16a** を収率 46%、鏡像体過剰率は 79.8% ee で調製できるようになった。基質を遊離のプロトンを持たない bis-Boc 体 **17b** へと積極的に変換したことが、収率改善には有効であった。不要な鏡像異性体の分離には、DHMEQ が有する第二級アルコールを手がかりとした酵素速度論的加水分解を活用した。いったんジヘキサノイル体 **13c** とし、このものに *Burkholderia cepacia* lipase (Amano PS-IM) を作用させたところ、目的とする (2*S*,3*S*,4*S*)-体が速やかに加水分解され DHMEQ **13a** へと変換された。一方、(2*R*,3*R*,4*R*)-体はモノアシル体 **13d** としてとどまり、ジイソプロピルエーテルからわずか一回分別結晶するのみで分離できた。この際、アシル基の鎖長が基質の安定性、生成物の分離に大きく影響を与えていることがわかった

(Scheme 39)。



Scheme 39

以上、Diels-Alder 付加体やヒドロキノンから短工程で大量に供給できる化合物を鍵物質として選び、エステラーゼを用いた速度論的光学分割、リパーゼを用いた位置・鏡像選択的な官能基変換、不斉エポキシ化を検討した。その結果、立体化学や官能基を適切に制御し、汎用性が高い高度に酸素官能基化されたカルバサイクル類の新しい調製法を確立、生物活性物質合成へと応用した。このような「化学-酵素相補的・相乗的」な物質の設計図と新しく開発したツールが、有用物質合成のルート設計の一助になれば幸いである。

実験の部

Materials and Methods

Merck silica gel 60 F₂₅₄ thin-layer plates (1.05744, 0.5 mm thickness) and silica gel 60 (spherical and neutral; 100-210 μm, 37560-79) from Kanto Chemical Co. were used for preparative thin-layer chromatography and column chromatography, respectively. The commercial PLE preparation was purchased from Sigma.

Analytical Methods

All melting points were uncorrected. IR spectra were measured ATR on a JEOL FT-IR SPX60 spectrometer. ¹H NMR spectra were measured in CDCl₃ unless otherwise stated at 270 MHz on a JEOL JNM EX-270 or at 400 MHz on a JEOL JNM GX-400 spectrometer or at 400 MHz on a VARIAN 400-MR spectrometer, and ¹³C NMR spectra were measured in CDCl₃ unless otherwise stated at 100 MHz on a JEOL GX-400 spectrometer or at 100 MHz on a VARIAN 400-MR spectrometer. High resolution mass spectra were recorded on a JEOL JMS-700 MStation spectrometer. HPLC data were recorded on Jasco MD-2010 multi-channel detectors and SHIMADZU SPD-M20A diode array detector. Optical rotation values were recorded on a JASCO P-1010 polarimeter. Silica gel 60 (spherical, 100-210 μm, 37558-79) of Kanto Chemical Co. was used for column chromatography. Preparative TLC was performed with E. Merck silica gel 60 F₂₅₆ plates (0.5 mm thickness, No. 1.05744).

(±)-7-endo-Oxabicyclo[2.2.1]hept-5-carboxylic acid (3a)

The known procedure⁶ was slightly modified in regard to the reaction temperature. Furan (250 mL) and acrylic acid (250 mL) were mixed and kept for 6 days at room temperature, for 17 days at 4 °C, and then for 28 days at 7 °C. The precipitated solids were recovered by filtration to give carboxylic acid (±)-**3a** (41.7 g, *endo:exo* = 8:2) as colorless solid, m.p. 95-96 °C, lit.⁸ m.p. 97-100 °C. To the above mentioned filtrate was added furan and acrylic acid and kept for one month at 7 °C to give another crop of crystal. The NMR spectrum was identical with that reported previously.⁶

(±)-(1R*,2R*,3R*,6R*,7S*)-2-Iodo-4,8-dioxatricyclo[4.2.1.0^{3,7}]nonan-5-one (2)

To a solution of the acid (±)-**3a** (20.0 g, 142 mmol) in saturated NaHCO₃ aq. solution (300 mL) was added dropwise a solution of I₂ (40.0 g, 157 mmol) in THF (80 mL) under ice-cooling, and the mixture was stirred for 68 h at room temperature. To the mixture was added saturated

Na₂S₂O₃ aq. solution, the precipitates were collected in filtration to give crude iodolactone (±)-**2** (25.1 g). The filtration was extracted with EtOAc (three times). The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated in *vacuo*, to give another crop of iodolactone (±)-**2** (2.00 g) as the sample for NMR measurement. Its NMR spectrum was identical with that reported previously.⁶ The combined yield of above-mentioned (±)-**2** (27.0 g) was 71%, and this was employed for the next step without further purification.

Screening of hydrolytic enzymes

The screening of hydrolytic enzymes was performed as follows. A 2 mL sample tube was charged with an appropriate amount of racemic ethyl ester **1b** (10.0 mg) and potassium phosphate buffer (0.2 M, pH 7.0; 0.25 mL) at room temperature for 24 h in the presence of several lipases and protease at an amount of 80-100 mg/mL of phosphate buffer, in the case of pig liver esterase 0.2 mg/mL of phosphate buffer. The progress of the reaction was monitored by silica gel TLC, developed with hexane-EtOAc (1:1). The reaction mixture was quenched with citric acid to pH 2, and was extracted with EtOAc. The combined organic phases were dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. Among seven enzymes tested, only a pig liver esterase showed the progress of hydrolysis.

PLE-catalyzed hydrolysis of esters **1b-1g**

The hydrolysis of each substrate was carried out under the same conditions as described for the screening of enzymes with ethyl ester **1b**. The *E*-value of the each substrate was uniformly calculated from the conversion and ee (P) as follows. The conversion was determined by ¹H NMR analysis of crude reaction mixture. Ee (P) was determined by the HPLC analysis at the stage of **5a**, after methylation of hydrolyzate and following β-elimination as described later.

(±)-3,8-Dioxatricyclo[3.2.1.0^{2,4}]octane-6-carboxylic acid (**1a**)

To a solution of iodolactone (±)-**2** (1.01 g, 3.80 mmol) in DMF (15 mL) was added KOH (0.54 g, 9.98 mmol) and stirred for 24 h at room temperature. After removal of water *in vacuo*, the residue was added 1 M HCl to pH 2. The organic materials were extracted with EtOAc (ten times), and the combined organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography with CHCl₃-MeOH (6:1) to afford carboxylic acid (±)-**1a** (193 mg, 34%) as colorless solid, m.p. 153-154 °C. Its NMR spectrum was identical with that reported previously.⁷

Ethyl (±)-3,8-dioxatricyclo[3.2.1.0^{2,4}]octane-6-carboxylate (1b)

To a solution of iodolactone (±)-**2** (0.51 g, 1.87 mmol) in DMF (10 mL) was added with KOH (0.37 g, 6.60 mmol) and stirred for 24 h at room temperature. After removal of water *in vacuo*, the residue was dissolved DMF. The mixture was added EtI (0.96 g, 6.56 mmol) at 40 °C, and stirred for 6 h. After removal of volatile materials *in vacuo*, the reaction was quenched with saturated NH₄Cl aq. solution, and extracted with EtOAc (three times). The combined organic phases were washed with brine and dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography with hexane-EtOAc (2:1) to afford ethyl ester (±)-**1b** (316 mg, 92%) as colorless solid, m.p. 52-53 °C. Its NMR spectrum was identical with that reported previously.⁷

Methyl (±)-3,8-dioxatricyclo[3.2.1.0^{2,4}]octane-6-carboxylate (1c)

In a similar manner as described for **1b**, a solution of iodolactone (±)-**2** (0.80 g, 3.01 mmol) in DMF (10 mL) was treated with KOH (0.40 g, 7.13 mmol) and MeI (1.28 g, 6.56 mmol) to give methyl ester (±)-**1c** (390 mg, 78%) as colorless solid; m.p. 75 °C. Its NMR spectrum was identical with that reported previously.⁸

Carbamylmethyl (±)-3,8-dioxatricyclo[3.2.1.0^{2,4}]octane-6-carboxylate (1e)

In a similar manner as described for **1b**, a solution of iodolactone (±)-**2** (0.80 g, 3.01 mmol) in DMF (5 mL) was treated with KOH (0.40 g, 7.13 mmol) and ClCH₂CONH₂ (0.84 g, 8.98 mmol), gave carbamylmethyl ester (±)-**1e** (423 mg, 66%) as a colorless solid. Further purification by recrystallization from EtOAc afford (±)-**1e**: m.p. 131.0-133.0 °C: ¹H NMR (400 MHz): δ = 2.03 (ddd, *J* = 4.6, 11.2, 11.6 Hz, 1H, H-7_{exo}), 2.09 (dd, *J* = 4.3, 11.6 Hz, 1H, H-7_{endo}), 3.02 (dt, *J* = 4.6, 11.2 Hz, 1H, H-6), 4.11 (dd, *J* = 1.9, 4.4 Hz, 1H, H-4), 4.18 (dd, *J* = 2.2, 4.4 Hz, 1H, H-2), 4.55 (dt, *J* = 2.2, 4.6 Hz, 1H, H-5), 4.62 (d, *J* = 15.6 Hz, CHHCONH₂, 1H, Ha in Fig. 3), 4.69 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, CHHCONH₂, Hb in Fig. 3), 4.77 (dt, *J* = 1.9, 4.4 Hz, 1H, H-1), 5.81 (br s, 1H, NH₂), 6.69 (br s, 1H, NH₂); ¹³C NMR (100 MHz): δ = 29.6, 44.7, 62.8, 67.0, 67.7, 77.4, 78.1, 169.9, 170.4; IR ν_{max} 3400, 3190, 2958, 1753, 1680, 1417, 1306, 1197 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₉H₁₁NO₅: C 50.70, H 5.20, N 6.57; found: C 50.53, H 5.15, N 6.47.

2-Chloroethyl (±)-3,8-dioxatricyclo[3.2.1.0^{2,4}]octane-6-carboxylate (1f)

In a similar manner as described for **1b**, a solution of iodolactone (±)-**2** (266 mg, 1.00 mmol) in

DMF (3 mL) was treated with KOH (132 mg, 2.35 mmol, 2.4 eq.) and ClCH₂CH₂I (300 mg, 1.58 mmol, 1.6 eq.), to give 2-chloroethyl ester (±)-**1f** (171 mg, 79%) as colorless oil: ¹H NMR (400 MHz): δ = 1.97 (ddd, *J* = 4.9, 11.3, 11.3 Hz, 1H, H-7_{exo}), 2.07 (dd, *J* = 4.9, 11.3 Hz, 1H, H-7_{endo}), 2.93 (dt, *J* = 4.9, 11.3 Hz, 1H, H-6), 3.69 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH₂Cl), 4.01 (dd, *J* = 2.4, 4.3 Hz, 1H, H-4), 4.11 (dd, *J* = 2.2, 4.3 Hz, 1H, H-2), 4.32 (dt, *J* = 5.7, 11.3 Hz, 1H, CHHCH₂Cl, Ha in Fig. 3), 4.44 (dt, *J* = 5.7, 11.3 Hz, CHHCH₂Cl, 1H, Hb in Fig. 3), 4.50 (dt, *J* = 2.2, 4.9 Hz, 1H, H-5), 4.70 (dt, *J* = 2.2, 4.9 Hz, 1H, H-1); ¹³C NMR (100 MHz): δ = 29.5, 41.8, 44.7, 64.1, 66.6, 66.7, 77.5, 78.2, 171.0; IR ν_{max} 3006, 2962, 2358, 1732, 1449, 1334, 1207, 1176, 883 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₉H₁₁ClO₄: C 49.44, H 5.07; found: C 49.19, H 5.04.

This ester was also able to be prepared by the action of ClCH₂CH₂Cl. To a solution of the acid (±)-**1a** (15.6 mg, 0.10 mmol) in anhydrous DMF was added K₂CO₃ (55.2 mg, 0.40 mmol) and ClCH₂CH₂Cl (59.4 mg, 0.60 mmol), and the mixture was stirred at 40 °C for 24 h. The same workup as above provided (±)-**1f** (16.5 mg, 76%).

Scaled-up and preparative synthesis of **1f**

A solution of iodolactone (±)-**2** (3.20 g, 12.0 mmol) in EtOH (20 mL) was added KOH (2.00 g, 35.6 mmol, 2.9 eq.) and the mixture was stirred for 5 h at 70 °C. After removal of volatile materials *in vacuo*, the residue was re-dissolved in MeOH. To the mixture was added silica gel (50 g), and stirred for 30 min. After concentration *in vacuo*, the residual solid was charged on a glass column, and that was eluted with ethanol to give carboxylic acid (±)-**1a** (86.4 mg) as a colorless solid. Further elution with MeOH afforded potassium salt (±)-**1a** (2.40 g).

To a solution of the above potassium salt (±)-**1a** (2.07 g) in DMF (10 mL) was added ClCH₂CH₂Cl (5.28 g, 53.4 mmol, 4.5 eq.), and the mixture was stirred at 60 °C for 24 h. The same workup provided (±)-**1f** (1.55 g, 71%).

2,2,2-Trifluoroethyl (±)-3,8-dioxatricyclo[3.2.1.0^{2,4}]octane-6-carboxylate (**1g**)

A mixture of carboxylic acid (±)-**1a** (156 mg, 1.00 mmol), DMAP (245 mg, 2.00 mmol), EDC-Cl (384 mg, 2.00 mmol), CF₃CH₂OH (150 mg, 1.50 mmol), and triethylamine (202 mg, 2.00 mmol) in DMF (1 mL) was stirred at room temperature under argon. The reaction was monitored by silica gel TLC, developed with hexane-EtOAc (1:4). After stirring for 10 h at room temperature, the mixture was quenched by the addition of EtOAc-water. The organic materials were extracted with EtOAc, and the combined organic phases were washed with brine and dried over Na₂SO₄. The organic phase was concentrated *in vacuo*. The residue was

purified by silica gel column chromatography with hexane-EtOAc (1:1) to afford trifluoroethyl ester (\pm)-**1g** (192 mg, 81%) as colorless oil; ^1H NMR (270 MHz): δ = 1.93 (ddd, J = 4.6, 11.3, 11.6 Hz, 1H, H-7_{exo}), 2.04 (dd, J = 4.3, 11.6 Hz, 1H, H-7_{endo}), 2.94 (dt, J = 4.6, 11.3 Hz, 1H, H-6), 3.98 (dd, J = 2.4, 4.6 Hz, 1H, H-4), 4.05 (dd, J = 2.2, 4.6 Hz, 1H, H-2), 4.44 (dddd, J = 8.4, 12.7 Hz, 1H, CH₂CF₃), 4.53 (dt, J = 1.9, 4.9 Hz, 1H, H-5), 4.58 (dddd, J = 8.4, 12.7 Hz, 1H, CH₂CF₃), 4.69 (dt, J = 1.9, 4.9 Hz, 1H, H-1); ^{13}C NMR (100 MHz): δ = 29.5, 44.4, 60.2, 60.6, 66.5, 66.6, 77.4, 77.5, 121.5, 124.3, 169.7; IR ν_{max} 3010, 2969, 2368, 2337, 1747, 1411, 1276, 1155, 879 cm^{-1} . HRMS (EI): calcd for C₉H₉F₃O₄: [M⁺]: 238.0453; found: m/z = 238.0453.

PLE-catalyzed hydrolysis of 2-chloroethyl ester (**1f**)

To a stirred solution of 2-chloroethyl ester (\pm)-**1f** (373.3 mg, 1.71 mmol) in a phosphate buffer (0.2 M, pH 7.0; 8.5 mL), PLE (Sigma, E2884, 850 μL) was added and the mixture was stirred for 24 h at room temperature. The reaction was quenched with 1 M HCl to pH 2, and extracted with EtOAc (ten times). The combined organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*, and the ratio between unreacted recovery **1f** and hydrolyzate **1a** was determined by ^1H NMR measurement. The above mentioned crude mixture was washed with saturated NaHCO₃ aq. solution. The organic layer was washed with brine and dried over Na₂SO₄, concentrated *in vacuo* to give (-)-**1f** (159.3 mg, 0.73 mmol) as the unreacted recovery. The aqueous layer was acidified to pH 3 and extracted with EtOAc (ten times). The extract was dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo* to give (+)-**1a** (145.4 mg, 0.93 mmol, m.p. 107-108 °C). These samples were employed for the next step without further purification.

Ester (-)-**1f**: $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ -5.3 (c 1.0, CHCl₃), 99.4% ee as shown below. Its IR and NMR spectra were in good accordance with those of racemic sample. Acid (+)-**1a**: $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ +12 (c 1.0, MeOH), 90.6% ee as shown below. This was further purified by recrystallization from EtOAc to give (+)-**1a** (93.6 mg, 71%, m.p. 114-115 °C) $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ +14 (c 0.75, MeOH). The sample obtained by recrystallization as above (15.0 mg) was treated with CH₂N₂ to give (+)-**1c** (15.6 mg, 96%); m.p. 63-64 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ +12 (c 0.75, MeOH). This was further converted to (-)-**5a** (11.1 mg, 74%, 95.6% ee); $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ -207 (c 0.55, MeOH). HPLC analysis was performed in the same manner: t_{R} (min) = 15.1 (97.8%), 33.1 (2.2%).

The further recrystallization provided a sample of (+)-**1a** (49% recovery, m.p. 112-113 °C), $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ +16 (c 0.76, MeOH). This sample was revealed to be 96.4% ee by the HPLC analysis at the subsequent stage of **5a** as below, and we concluded that the enantiomeric excess of the acid **1a** reaches constant value by repetition of the recrystallization from EtOAc.

The scaled-up experiment by applying (\pm)-**1f** (1.00 g, 4.59 mmol) worked well in a reproducible manner to give ($-$)-**1f**: (230 mg, 23%) $[\alpha]_D^{24} -5.3$ (*c* 1.0, CHCl₃); 99.7% ee after derivatization to **5b** and its HPLC analysis. Acid (+)-**1a**: (428 mg, 60%) $[\alpha]_D^{24} +11$ (*c* 1.0, MeOH); 77.3% ee by HPLC analysis of corresponding **5a**.

Methyl (1S,2R,4S,5R,6S)-3,8-dioxatricyclo[3.2.1.0^{2,4}]octane-6-carboxylate (1c)

To a solution of the acid (+)-**1a** (30.6 mg, 0.20 mmol) as above in anhydrous DMF was added Cs₂CO₃ (163 mg, 0.50 mmol) and CH₃I (85.1 mg, 0.60 mmol). The mixture was stirred at 50 °C for 24 h. After concentration to dryness *in vacuo*, the residue was extracted with EtOAc (three times), and the combined organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC with hexane-EtOAc (1:1) to afford methyl ester (+)-**1c** (20.1 mg, 59%) as colorless solid. m.p. 67-68 °C, $[\alpha]_D^{23} +12$ (*c* 0.57, MeOH). Its IR and NMR spectra were identical with that of the authentic specimen.⁸

Methyl (3S,4R,5S)-5-hydroxy-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-1-en-carboxylate (5a)

To a solution of lithium hexamethyldisilazide [(TMS)₂NLi, 0.20 mL, 0.20 mmol] was added in THF (0.20 mL) at -78 °C. To a solution of methyl ester ($-$)-**1c** (20.1 mg, 0.13 mmol) in THF (0.20 mL) was added the LHMDS solution above dropwise at -78 °C, and the mixture was stirred for 1 h at that temperature. The reaction was quenched with saturated NH₄Cl aq. solution, and extracted with EtOAc. The combined organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC with hexane-EtOAc (1:1) to afford methyl ester ($-$)-**5a** (14.0 mg, 70%, 90.6% ee) as a colorless solid. $[\alpha]_D^{23} -200$ (*c* 0.70, MeOH) [lit.⁸: $[\alpha]_D +213$ (*c* 0.56, MeOH), for (3R,4S,5R)-**6a**]. The product ($-$)-**6a** was analyzed by HPLC [column, Daicel CHIRALCEL[®] OD-H, 0.46 cm x 25 cm; hexane-2-propanol (5:1); flow rate 0.5 mL/min; detected at 230 nm]: *t*_R (min) = 15.1 (95.3%), 33.1 (4.7%).

Enantiomerically enriched acid (+)-**1a** (15.6 mg, 0.10 mmol) by recrystallization in twice was treated with CH₂N₂ to give (+)-**1c** (15.7 mg, 89%); m.p. 63-64 °C, $[\alpha]_D^{23} +12$ (*c* 0.75, MeOH). This was converted to ($-$)-**5a** (11.1 mg, 74%, 96.4% ee); $[\alpha]_D^{23} -207$ (*c* 0.55, MeOH). HPLC analysis was performed in the same manner: *t*_R (min) = 15.1 (98.2%), 33.1 (1.8%).

2-Chloroethyl (3R,4S,5R)-5-hydroxy-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-1-en-carboxylate (5b)

In a similar manner as described for ($-$)-**5a**, 2-chloroethyl ester ($-$)-**1f** (47.2 mg, 0.21 mmol) in

THF (0.30 mL) was added with a solution of lithium hexamethyldisilazide [(TMS)₂NLi, 0.31 ml, 0.31 mmol] in THF (0.30 mL), gave (+)-**5b** (36.4 mg, 77%, 99.4% ee: [α]_D²³ +233 (*c* 1.08, MeOH); The product (+)-**5b** was analyzed by HPLC analysis [CHIRALCEL[®] OD-H, 0.46 cm x 25 cm; hexane-2-propanol (5:1); flow rate 0.5 mL/min; detected at 230 nm]: *t*_R (min) = 18.0 (0.3 %), 38.0 (99.7%); ¹H NMR (400 MHz): δ = 2.32 (ddd, *J* = 3.3, 5.2, 1H, 17.6 Hz, H-6 β), 2.80 (dt, *J* = 2.1, 17.6 Hz, 1H, H-6 α), 3.48 (t, *J* = 3.9 Hz, 1H, H-3), 3.57 (ddd, *J* = 2.1, 2.8, 3.9 Hz, 1H, H-4), 3.69 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH₂Cl), 4.38 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, CO₂CH₂), 4.57 (br m, 1H, H-5), 7.19 (dd, *J* = 3.3, 3.9 Hz, 1H, H-2); ¹³C NMR (100 MHz): δ = 29.3, 41.5, 46.2, 56.1, 63.5, 64.5, 130.3, 134.4, 165.5; IR *v*_{max} 3425, 2964, 1709, 1641, 1417, 1392, 1250, 1099, 918 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₉H₁₁ClO₄: C 49.44, H 5.07; found: C 49.43, H 5.36.

(3S,4S,5R)-3,4,5-Trihydroxy-1-cyclohexene-1-carboxylic acid (7a)

To a solution of (+)-**5b** (55.0 mg, 0.25 mmol) in THF and water (1:1, 4 mL) was added KOH (21.2 mg, 0.38 mmol). After stirring for 1 h at 50 °C, the mixture was neutralized with 1 M HCl to pH 3, and concentrated *in vacuo*. The solid was dissolved in water (1 mL) and trifluoroacetic acid (400 μ L, 5.39 mmol) was added to the solution with stirring. The mixture was stirred for 3 h at 50 °C. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* to remove volatile materials. The residue was purified by silica gel column chromatography with CHCl₃-MeOH (10:1) to afford carboxylic acid (-)-**7a**: [α]_D²⁵ - 33 (*c* 0.32, H₂O) [lit.¹⁹: [α]_D -31 (*c* 0.10, H₂O)]; ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 2.06 (dddd, *J* = 2.8, 4.0, 10.0, 16.8 Hz, 1H, H-6 β), 2.61 (ddd, *J* = 1.6, 6.0, 16.8 Hz, 1H, H-6 α), 3.33 (dd, *J* = 8.4, 10.0 Hz, 1H, H-4), 3.62 (dt, *J* = 6.0, 10.0, 10.0 Hz, 1H, H-5), 4.11 (dddd, *J* = 1.6, 2.4, 4.0, 8.4 Hz, 1H, H-3), 6.51 (dd, *J* = 2.4, 2.8 Hz, 1H, H-2); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ = 31.7, 68.6, 71.5, 76.2, 128.2, 139.2, 169.7; IR *v*_{max} 3261, 1556, 1409, 1072 cm⁻¹. Its ¹H-NMR spectrum was identical with that reported previously.¹⁹ As this product **7a** is a trihydroxy acid and shows highly hydrophilic property and is susceptible to an irreversible adsorption on silica gel, the yield was estimated to be 80%, at the stage just before the final purification, based on ¹H-NMR with an internal standard [methyl β -D-glucoside, Tokyo Kasei Co., M709, analytically pure grade, standard signal at δ = 4.23 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H)].

C. antarctica lipase B-catalyzed acetylation of methyl

(3R*,4R*,5S*)-3,4,5-trihydroxy-1-cyclohexenecarboxylate (7b)

To a solution of (\pm)-**7b** (50.3 mg, 0.27 mmol) in vinyl acetate (1.25 mL) was added *C. antarctica* lipase B (Novozym[®] 435, 75 mg). The mixture was stirred for 24 h at 30 °C. The reaction

was monitored by silica gel TLC, developed with hexane-EtOAc (1:2). After removal of insoluble materials by filtration with a pad of Celite, the filtrate was concentrated *in vacuo* to give a mixture of (3*S*,4*S*,5*R*)-**7c** and (3*R*,4*R*,5*S*)-**7d** (total 65.0 mg). The conversion was determined to be 100% by ¹H NMR analysis of crude mixture. The residue was purified by silica gel column chromatography (2 g). Elution with hexane-EtOAc (1:2) afforded (3*S*,4*S*,5*R*)-**7c** (18.0 mg, 29%) and (3*R*,4*R*,5*S*)-**7d** (12.0 mg, 19%) as colorless oil.

(3*S*,4*S*,5*R*)-**7c**: $[\alpha]_{\text{D}}^{23} +11$ (*c* 0.90, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz): $\delta = 2.13$ (s, 3H, Ac), 2.28 (ddd, *J* = 3.2, 10.0, 17.6 Hz, 1H, H-6 β), 2.59 (br s, 1H, OH), 2.83 (dd, *J* = 6.0, 17.6 Hz, 1H, H-6 α), 3.74 (s, 3H, Me ester), 3.99 (ddd, *J* = 6.0, 10.0, 10.0 Hz, 1H, H-5), 4.33 (ddd, *J* = 2.4, 7.2 Hz, 1H, H-3), 4.86 (dd, *J* = 7.2, 10.0 Hz, 1H, H-4), 6.59 (dd, *J* = 2.4, 3.2 Hz, 1H, H-2); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 21.1, 31.6, 52.2, 69.5, 74.8, 75.0, 130.5, 134.4, 166.0, 171.5$; IR ν_{max} 3406, 2354, 1714, 1655, 1431, 1371, 1228, 1061, 1026, 960 cm⁻¹.

(3*R*,4*R*,5*S*)-**7d**: $[\alpha]_{\text{D}}^{23} -12$ (*c* 0.60, CHCl₃) [lit.²⁵: $[\alpha]_{\text{D}} +38$ (*c* 1.07, CHCl₃), for (3*S*,4*S*,5*R*)-**7d**]; ¹H NMR (400 MHz): $\delta = 2.15$ (s, 3H, Ac), 2.39 (ddd, *J* = 2.2, 6.8, 14.4 Hz, 1H, H-6 β), 2.83 (dd, *J* = 4.4, 14.4 Hz, 1H, H-6 α), 3.67 (dd, *J* = 7.2, 10.0 Hz, 1H, H-4), 3.75 (s, 3H, Me ester), 3.83 (ddd, *J* = 4.4, 6.8, 10.0 Hz, 1H, H-5), 5.40 (ddd, *J* = 3.2, 7.2 Hz, 1H, H-3), 6.78 (dd, *J* = 2.2, 3.2 Hz, 1H, H-2); ¹³C NMR (100 MHz): $\delta = 21.1, 31.7, 52.2, 67.3, 69.5, 69.9, 75.0, 128.3, 137.2, 166.4, 172.2$; IR ν_{max} 3490, 3405, 3232, 2859, 1699, 1650, 1427, 1372, 1238, 1184, 1144, 1059, 999 cm⁻¹. Its NMR spectra were identical with those reported previously.²⁵

Methyl

(3*R**,4*R**,5*R**)-5-(*tert*-butyldimethyl)silyloxy-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-1-en-carboxylate (**5d**)

To a solution of **5a** (2.95 g, 17.3 mmol) in CH₂Cl₂ (20 mL) were added *tert*-butyldimethylsilyl chloride (TBSCl, 3.13 g, 20.8 mmol, 1.2 eq.) and imidazole (1.42 g, 20.8 mmol, 1.2 eq.) with stirring at 10 °C under argon atmosphere. The reaction was monitored by silica gel TLC, developed with hexane-EtOAc (6:1). The mixture was stirred for 24 h, with gradually raising the reaction temperature to 25 °C, then the reaction was quenched by adding saturated NH₄Cl aqueous solution. The organic materials were extracted with EtOAc several times, and the combined extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (100 g). Elution with hexane-EtOAc (7:1) afforded (±)-**5d** (4.73 g, 96%) as colorless oil. ¹H NMR (400 MHz): $\delta = 0.06$ (s, 3H, SiCH₃), 0.08 (s, 3H, SiCH₃), 0.84 (s, 9H, *tert*-butyl), 2.22 (ddd, *J* = 3.2, 4.8, 17.2 Hz, 1H, H-6 β), 2.67 (ddd, *J* = 2.0, 2.4, 17.2 Hz, 1H, H-6 α), 3.40 (ddd, *J* = 2.0, 4.0, 4.4 Hz, 1H, H-4), 3.43 (dd, *J*

= 4.0, 4.0 Hz, 1H, H-3), 3.74 (s, 3H, Me ester), 4.50 (ddd, $J = 2.4, 4.4, 4.8$ Hz, 1H, H-5), 7.07 (dd, $J = 3.2, 4.0$ Hz, 1H, H-2); ^{13}C NMR (100 MHz): $\delta = -4.8, 18.1, 25.7, 29.4, 46.7, 51.9, 56.4, 64.0, 131.0, 133.0, 166.6$; IR ν_{max} 2963, 2924, 2893, 2868, 1720, 1473, 1259, 1203, 1095 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{Si}$: C 59.12, H 8.51; found: C 59.17, H 8.55.

Methyl (3*R,4*S**,5*S**)-5-(*tert*-butyldimethyl)silyloxy**

-4-hydroxy-3-(*p*-methoxy)benzyloxy-1-cyclohexenecarboxylate (7e)

To a solution of **5d** (1.77 g, 6.22 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (18 mL), $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ (0.39 g, 0.62 mmol, 0.1 eq.) and *p*-methoxybenzyl alcohol (2.33 mL, 18.7 mmol, 3.0 eq.) were added with stirring. The reaction was monitored by silica gel TLC, developed with hexane-EtOAc (5:1). The mixture was stirred for 24 h at room temperature, then the reaction was quenched by adding water. The organic materials were extracted with EtOAc, and the combined extracts were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (100 g). Elution with hexane/EtOAc = 6:1 afforded (\pm)-**7e** (2.13 g, 81%) as colorless oil. ^1H NMR (400 MHz): $\delta = 0.11$ (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.90 (s, 9H, *tert*-butyl), 2.20 (ddd, $J = 2.8, 4.8, 14.8$ Hz, 1H, H-6 β), 2.67 (ddd, $J = 2.0, 4.0, 14.8$ Hz, 1H, H-6 α), 3.67 (m, 2H, H3, H4), 3.72 (s, 3H, Me ester), 3.78 (s, 3H, OCH_3), 4.10 (ddd, $J = 2.0, 4.8, 6.4$ Hz, 1H, H-5), 4.67 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, Bn-CH), 4.74 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, Bn-CH), 6.73 (dd, $J = 2.4, 2.8$ Hz, 1H, H-2), 6.86 (dd, $J = 2.4, 6.8$ Hz, 2H, Ar-H), 7.30 (d, $J = 2.4, 6.8$ Hz, 2H, Ar-H); ^{13}C NMR (100 MHz): $\delta = -4.23, -4.76, 18.0, 25.8, 33.0, 52.0, 55.3, 71.1, 72.1, 78.2, 113.8, 128.6, 129.5, 130.3, 137.0, 159.3, 166.5$; IR: 3473, 3417, 2954, 2908, 2862, 1686, 1446, 1365, 1254, 1086, 1030 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_6\text{Si}$: C 62.53, H 8.11; found: C 62.71, H 8.01.

Methyl

(3*R,4*S**,5*S**)-5-(*tert*-butyldimethyl)silyloxy-3,4-dihydroxy-1-cyclohexenecarboxylate (7f)**

To a mixture of **7e** (2.05 g, 4.85 mmol) in CH_2Cl_2 (40 mL) and water (16 mL) was added 2,3-dichloro-5,6-dicyano-*p*-benzoquinone (DDQ, 1.32 g, 5.82 mmol, 1.2 eq.). The reaction was monitored by silica gel TLC, developed with hexane-EtOAc (2:1). The organic materials were stirred for 12 h at 20 °C, then the reaction was quenched with water. The aqueous layer was extracted with CHCl_3 , and the combined extracts were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (40 g). Elution with hexane-EtOAc (3:1) afforded (\pm)-**7f** (1.36 g, 93%) as colorless needles. Mp

99.5-100 °C; ¹H NMR (400 MHz): δ = 0.10 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.89 (s, 9H, *tert*-butyl), 2.23 (ddd, *J* = 2.8, 6.4, 17.6 Hz, 1H, H-6β), 2.69 (br s, 2H, OH), 2.70 (dd, *J* = 5.6, 17.6 Hz, 1H, H-6α), 3.55 (dd, *J* = 7.6, 9.2 Hz, 1H, H-4), 3.73 (s, 3H, Me ester), 3.74 (ddd, *J* = 5.6, 6.4, 9.2 Hz, 1H, H-5), 4.27 (ddd, *J* = 2.4, 7.6 Hz, 1H, H-3), 6.73 (dd, *J* = 2.4, 2.8 Hz, 1H, H-2); ¹³C NMR (100 MHz): δ = -4.80, -4.32, 18.0, 25.8, 32.9, 52.0, 70.4, 71.2, 128.2, 138.0, 166.6; IR ν_{max} 3423, 2947, 2929, 2852, 1714, 1662, 1432, 1257, 1074, 1025, 985 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₁₄H₂₆O₅Si: C 55.60, H 8.67; found: C 55.68, H 8.65.

C. *antarctica* lipase B-catalyzed acetylation of (±)-7f

In a similar manner as described for the acylation of (±)-7b, a solution of (±)-7f (90.1 mg, 0.31 mmol) was treated with Novozym[®] 435 (90 mg) in vinyl acetate (900 μL) to give (3*R*,4*S*,5*S*)-7h (51.0 mg, 48%, 75.4% ee) and (3*S*,4*R*,5*R*)-7f (30.2 mg, 34%, 77.6% ee) as colorless oil.

(3*R*,4*S*,5*S*)-7h: [α]_D²³ -15.3 (*c* 1.45, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz): δ = 0.10 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.88 (s, 9H, *tert*-butyl), 2.10 (s, 3H, Ac), 2.23 (ddd, *J* = 2.8, 10.4, 17.6 Hz, 1H, H-6β), 2.63 (br s, 1H, OH), 2.75 (ddd, *J* = 1.2, 5.2, 17.6 Hz, 1H, H-6α), 3.55 (dd, *J* = 8.0, 10.0 Hz, 1H, H-4), 3.72 (s, 3H, Me ester), 3.74 (ddd, *J* = 5.2, 10.0, 10.4 Hz, 1H, H-5), 4.27 (ddd, *J*_{2,3} = 1.2, 2.4, 8.0 Hz, 1H, H-3), 6.73 (dd, *J* = 2.8 Hz, 1H, H-2); ¹³C NMR (100 MHz): δ = -4.83, -4.31, 18.0, 21.0, 25.7, 32.9, 52.1, 70.8, 73.4, 74.5, 129.9, 134.9, 166.1, 170.6; IR ν_{max} 2950, 2917, 2863, 1728, 1444, 1363, 1227, 1097, 968 cm⁻¹. HPLC [CHIRALCEL[®] AD-H, 0.46 cm x 25 cm; hexane-isopropyl alcohol (70:1); flow rate 0.5 mL/min; detected at 216 nm]: *t*_R (min) = 27.9 (87.7%), 33.4 (12.3%). The authentic specimen of (±)-7h was prepared by the acetylation of (±)-7f.

(3*S*,4*R*,5*R*)-7f: [α]_D²³ -40.0 (*c* 1.50, CHCl₃). HPLC [CHIRALCEL[®] AD-H, 0.46 cm x 25 cm; hexane-isopropyl alcohol (15:1); flow rate 0.5 mL/min; detected at 216 nm]: *t*_R (min) = 22.3 (88.8%), 23.9 (11.2%).

Methyl

(3*R**,4*S**,5*S**)-5-(*tert*-butyldimethyl)silyloxy-3-(*p*-methoxy)benzyloxy-4-methoxy-1-cyclohexenecarboxylate (7i)

To a solution of 7e (75.0 mg, 0.18 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (3 mL), Proton Sponge[®] (91.3 mg, 0.43 mmol, 2.4 eq.) and Me₃OBF₄ (32.0 mg, 0.22 mmol, 1.2 eq.) were added with stirring. The reaction was monitored by silica gel TLC, developed with hexane-EtOAc (5:1). The mixture was stirred for 14 h at 0 °C under argon atmosphere, then the reaction was quenched with water.

The organic materials were extracted with EtOAc, and the combined extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (4 g). Elution with hexane-EtOAc (5:1) afforded (±)-**7i** (54.2 mg, 69%) as colorless oil. ¹H NMR (400 MHz): δ = 0.07 (s, 3H, SiCH₃), 0.09 (s, 3H, SiCH₃), 0.89 (s, 9H, *tert*-butyl), 2.23 (ddd, *J* = 3.2, 9.6, 18.0 Hz, 1H, H-6β), 2.65 (dd, *J* = 6.0, 18.0 Hz, 1H, H-6α), 3.22 (dd, *J* = 7.6, 9.6 Hz, 1H, H-4), 3.60 (s, 3H, OCH₃), 3.72 (s, 3H, Me ester), 3.73 (ddd, *J* = 6.0, 9.6, 9.6 Hz, 1H, H-5), 3.79 (s, 3H, ArOCH₃), 4.06 (ddd, *J* = 2.4, 7.6 Hz, 1H, H-3), 4.64 (s, 2H, Bn-CH₂), 6.72 (dd, *J* = 2.4, 3.2 Hz 1H, H-2), 6.87 (dd, *J* = 2.0, 6.8 Hz, 2H, Ar-*H*), 7.28 (d, *J* = 2.0, 6.8 Hz, 2H, Ar-*H*); ¹³C NMR (100 MHz): δ = -4.84, -4.63, 18.1, 25.8, 34.0, 51.9, 55.2, 61.1, 70.7, 71.4, 72.2, 79.4, 86.0, 113.7, 113.8, 129.4, 130.3, 132.0, 136.9, 159.1, 159.2, 166.6; IR ν_{max} 2941, 2858, 1714, 1605, 1522, 1444, 1246, 1068, 1034, 827 cm⁻¹. This was employed for the next step without further purification.

Methyl

(3*R**,4*S**,5*S**)-5-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-3-hydroxy-4-methoxy-1-cyclohexenecarboxylate (**7j**)

In a similar manner as described for the deprotection of (±)-**7e**, treatment of (±)-**7i** (35.2 mg, 0.08 mmol) with DDQ (20.4 mg, 0.09 mmol, 1.2 eq.) in CH₂Cl₂ (700 μL) and water (280 μL) gave (±)-**7j** (25.5 mg, quant.) as colorless oil. ¹H NMR (400 MHz): δ = 0.08 (s, 3H, SiCH₃), 0.11 (s, 3H, SiCH₃), 0.87 (s, 9H, *tert*-butyl), 2.23 (dddd, *J* = 1.6, 2.0, 6.4, 18.0 Hz, 1H, H-6β), 2.54 (ddd, *J* = 2.0, 4.4, 18.0 Hz 1H, H-6α), 2.82 (br s, 1H, OH), 3.36 (dd, *J* = 4.8, 6.4 Hz, 1H, H-4), 3.49 (s, 3H, OCH₃), 3.74 (s, 3H, Me ester), 4.12 (m, 2H, H-3, H-5), 6.86 (dd *J* = 2.0 Hz, 1H, H-2); ¹³C NMR (100 MHz): δ = -5.04, -4.88, 18.0, 25.8, 30.7, 51.9, 59.2, 67.6, 68.4, 81.9, 127.6, 136.8, 167.2. Its NMR spectra were identical with those reported previously.¹⁶

C. *antarctica* lipase B-catalyzed acetylation of (±)-**7j**

In a similar manner as described for the acetylation of (±)-**7b**, treatment of (±)-**7j** (12.3 mg, 0.04 mmol) with Novozym[®] 435 (20 mg) and vinyl acetate (200 μL) gave (3*R*,4*S*,5*S*)-**7k** (2.8 mg, 20%, 44.6% ee) and (3*S*,4*R*,5*R*)-**7j** (4.0 mg, 32%, 16.4% ee) as colorless oil.

(3*R*,4*S*,5*S*)-**7k**: ¹H NMR (400 MHz): δ = 0.07 (s, 3H, SiCH₃), 0.08 (s, 3H, SiCH₃), 0.89 (s, 9H, *tert*-butyl), 2.10 (s, 3H, Ac), 2.29 (ddd, *J* = 2.8, 8.4, 18.0 Hz, 1H, H-6β), 2.68 (ddd, *J* = 1.2, 6.0, 18.0 Hz, 1H, H-6α), 3.27 (dd, *J* = 7.2, 8.8 Hz, 1H, H-4), 3.50 (s, 3H, OCH₃), 3.73 (s, 3H, Me ester), 3.84 (ddd, *J* = 6.0, 8.4, 8.8 Hz, 1H, H-5), 5.39 (ddd, *J* = 1.2, 2.0, 7.2 Hz 1H, H-3), 6.86

(dd, $J = 2.0, 2.8$ Hz 1H, H-2). Its ee was determined by the HPLC analysis at the stage of **7i**, after the hydrolysis of acetate. HPLC [CHIRALCEL[®] AD-H, 0.46 cm x 25 cm; hexane-isopropyl alcohol (50:1); flow rate 0.5 mL/min; detected at 220 nm]: t_R (min) = 26.0 (27.7%), 36.7 (72.3%).
(3*S*,4*R*,5*R*)-**7j**: HPLC: t_R (min) = 26.0 (58.2%), 36.7 (41.8%).

Methyl

(3*R**,4*S**,5*S**)-3,4-diacetoxy-5-(*tert*-butyldimethyl)silyloxy-1-cyclohexenecarboxylate (**7g**)

To a solution of **7f** (203 mg, 0.67 mmol) in pyridine (2 mL) were added Ac₂O (204 mg, 2.00 mmol, 3.0 eq.) and 4-*N,N*-dimethylaminopyridine (DMAP, 41.5 mg, 0.34 mmol, 0.5 eq.) under argon atmosphere. The reaction was monitored by silica gel TLC, developed with hexane-EtOAc (5:1). The mixture was stirred for 2 h at room temperature, then the reaction was quenched with water. The organic materials were extracted with EtOAc, and the combined extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (12 g). Elution with hexane-EtOAc (5:1) afforded (±)-**7g** (241 mg, 93%) as colorless oil. ¹H NMR (400 MHz): $\delta = 0.04$ (s, 3H, SiCH₃), 0.07 (s, 3H, SiCH₃), 0.84 (s, 9H, *tert*-butyl), 2.03 (s, 3H, Ac), 2.04 (s, 3H, Ac), 2.34 (ddd, $J = 3.2, 9.2, 18.0$ Hz, 1H, H-6 β), 2.68 (ddd, $J = 1.2, 5.6, 18.0$ Hz 1H, H-6 α), 3.74 (s, 3H, Me ester), 3.91 (ddd, $J = 5.6, 9.2, 9.6$ Hz, 1H, H-5), 5.11 (dd, $J = 7.6, 9.6$ Hz, 1H, H-4), 5.53 (ddd, $J = 1.2, 2.0, 7.6$ Hz, 1H, H-3), 6.58 (dd, $J = 2.0, 3.2$ Hz, 1H, H-2); ¹³C NMR (100 MHz): $\delta = -5.00, -4.69, 17.7, 20.8, 21.0, 25.5, 33.2, 52.1, 67.9, 71.5, 74.4, 130.2, 134.1, 165.9, 169.9, 170.3$; IR ν_{\max} 2958, 2933, 2863, 2362, 1745, 1724, 1437, 1232, 1124, 1052, 1014 cm⁻¹. Its ¹H NMR spectra was identical with that reported previously.⁶¹ Anal. Calcd for C₁₈H₃₀O₇Si: C 55.93, H 7.82; found: C 55.62, H 7.77.

C. antarctica lipase B-catalyzed transesterification of (±)-**7g**

Bisacetate **7g** (186 mg, 0.48 mmol) was treated with cyclopentanol (3.7 mL) in the presence of Novozym[®] 435 (370 mg) was added to the solution with stirring. The mixture was stirred for 24 h at 65 °C. After removal of insoluble materials, the filtrate was concentrated *in vacuo* to give a mixture of (3*R*,4*S*,5*S*)-**7i** and (3*S*,4*R*,5*R*)-**7g** (total 195 mg). The conversion was determined by ¹H NMR analysis of crude reaction mixture. The residue was purified by silica gel column chromatography (2 g). Elution with hexane-EtOAc (4:3) afforded (3*R*,4*S*,5*S*)-**7i** (60.3 mg, 38%, >99.9% ee) and (3*S*,4*R*,5*R*)-**7g** (89.0 mg, 48%, 90.4% ee) as colorless oil.

(3*R*,4*S*,5*S*)-**7l**: $[\alpha]_{\text{D}}^{23} +19.4$ (*c* 0.75, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz): δ = 0.08 (s, 3H, SiCH₃), 0.09 (s, 3H, SiCH₃), 0.86 (s, 9H, *tert*-butyl), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.41 (ddd, *J* = 2.4, 6.0, 18.0 Hz, 1H, H-6 β), 2.58 (ddd, *J* = 1.6, 4.8, 18.0 Hz 1H, H-6 α), 3.76 (s, 3H, Me ester), 4.08 (ddd, *J* = 4.8, 6.0, 7.2 Hz, 1H, H-5), 4.19 (ddd, *J* = 1.6, 4.8 Hz, 1H, H-3), 4.92 (dd, *J* = 4.8, 7.2 Hz, 1H, H-4), 6.84 (dd, *J* = 1.6, 2.4 Hz, 1H, H-2); ¹³C NMR (100 MHz): δ = -5.02, -4.83, 17.9, 21.1, 25.6, 31.3, 52.1, 67.0, 68.8, 75.4, 127.8, 136.8, 166.8, 171.0; IR: 2933, 2854, 2366, 2326, 1714, 1518, 1252, 1115, 1047, 1007 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₁₆H₂₈O₆Si: C 55.79, H 8.19; found: C 55.68, H 8.42. HPLC [CHIRALCEL[®] OD-H, 0.46 cm x 25 cm; hexane-isopropyl alcohol (30:1); flow rate 0.5 mL/min; detected at 216 nm]: *t*_R (min) = 30.0 (single peak). The retention time of the antipode was confirmed to be 24.0 min, by the analysis of an authentic specimen of (±)-**7l**. This was prepared as follows: a solution of (±)-**7e** (55.8 mg, 0.13 mmol) was treated with DMAP (7.2 mg, 0.07 mmol, 0.5 eq.) and Ac₂O (17.0 mg, 0.17 mmol, 1.2 eq.) in pyridine (200 μ L) to give the acetate. Removal of (*p*-methoxy)benzyl group provided (±)-**7l** (18.8 mg, 68% over two steps) as colorless oil.

(3*S*,4*R*,5*R*)-**7g**: $[\alpha]_{\text{D}}^{23} +19.1$ (*c* 1.55, CHCl₃). HPLC [CHIRALCEL[®] OD-H, 0.46 cm x 25 cm; hexane-isopropyl alcohol (150:1); flow rate 0.5 mL/min; detected at 216 nm]: *t*_R (min) = 18.8 (4.8%), 22.7 (95.2%).

Methyl (3*R,4*R**,5*S**)-3,4,5-triacetoxy-1-cyclohexenecarboxylate (7m)**

To a solution of **5b** (320 mg, 1.88 mmol) in THF (2 mL) were added water (1 mL) and trifluoroacetic acid (300 μ L). After stirring for 40 h at room temperature, the mixture was concentrated *in vacuo*, and the residue was dissolved in pyridine (2 mL). To the mixture were added Ac₂O (1.15 g, 11.3 mmol, 6.0 eq.) and DMAP (24.4 mg, 0.20 mmol, 0.1 eq.). The reaction was monitored by silica gel TLC, developed with hexane-EtOAc (4:1). The mixture was stirred for 4 h at room temperature, then the reaction was quenched with water. The organic materials were extracted with EtOAc, and the combined extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (30 g). Elution with hexane-EtOAc (4:1) afforded (±)-**7m** (334 mg, 56%) as colorless oil. ¹H NMR (400 MHz): δ = 2.00 (s, 3H, Ac), 2.01 (s, 3H, Ac), 2.02 (s, 3H, Ac), 2.37 (ddd, *J* = 2.8, 9.2, 18.0 Hz, 1H, H-6 β), 2.94 (dd, *J* = 6.0, 18.0 Hz, 1H, H-6 α), 3.71 (s, 3H, Me ester), 5.11 (ddd, *J* = 6.0, 9.2, 9.2 Hz, 1H, H-5), 5.25 (dd, *J* = 7.6, 9.2 Hz 1H, H-4), 5.55 (ddd, *J* = 2.4, 7.6 Hz, 1H, H-3), 6.62 (dd, *J* = 2.4, 2.8 Hz, 1H, H-2); ¹³C NMR (100 MHz): δ = 20.7, 20.8, 29.3, 52.3, 68.3, 70.9, 71.3, 129.7, 133.9, 165.5, 169.9, 170.0, 170.1; IR ν_{max} 2962, 2362, 1734,

1708, 1437, 1363, 1227, 1039, 968 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₁₄H₁₈O₈: C 53.50, H 5.77; found: C 53.73, H 5.79.

C. antarctica lipase B-catalyzed transesterification of (±)-7m

In a similar manner as described for the transesterification of (±)-7g, a solution of (±)-7m (150 mg, 0.48 mmol) was treated with Novozym[®] 435 (300 mg) in cyclopentanol (3 mL) to give (3R,4R,5S)-7o and (3S,4S,5R)-7n (70.8 mg) and (3S,4S,5R)-7m (50.8 mg, 34%, 56.8% ee) as colorless oil.

Through ¹H NMR measurement of the mixture of 7o to 7n, the following signals were assigned for each component, respectively. (3R,4S,5S)-7o (400 MHz): δ = 2.03 (s, 3H, Ac), 2.09 (s, 3H, Ac), 2.39 (ddd, *J* = 2.8, 8.8, 17.6 Hz, 1H, H-6β), 2.89 (ddd, *J* = 1.2, 5.6, 17.6 Hz, 1H, H-6α), 3.74 (s, 3H, Me ester), 4.40 (ddd, *J* = 1.2, 3.2, 6.8 Hz, 1H, H-3), 5.02 (dd, *J* = 6.8, 10.0 Hz, 1H, H-4), 5.12 (ddd, *J* = 5.6, 8.8, 10.0 Hz 1H, H-5), 6.78 (dd, *J* = 2.8, 3.2 Hz, 1H, H-2); (3S,4S,5R)-7n: δ = 2.05 (s, 3H, Ac), 2.09 (s, 3H, Ac), 2.36 (ddd, *J* = 3.2, 9.6, 18.0 Hz, 1H, H-6a), 2.94 (ddd, *J* = 1.2, 5.2, 18.0 Hz, 1H, H-6b), 3.74 (s, 3H, Me ester), 3.93 (ddd, *J* = 5.2, 9.6, 9.6 Hz, 1H, H-5), 5.06 (dd, *J* = 7.6, 9.6 Hz, 1H, H-4), 5.56 (ddd, *J* = 1.2, 2.8, 7.6 Hz 1H, H-3), 6.78 (dd, *J* = 2.8, 3.2 Hz 1H, H-2).

(3S,4S,5R)-7m: [α]_D²³ +28.3 (*c* 2.50, CHCl₃). HPLC [CHIRALCEL[®] AD-H, 0.46 cm x 25 cm; hexane-isopropyl alcohol (30:1); flow rate 0.5 mL/min; detected at 216 nm]: *t*_R (min) = 20.6 (21.6%), 21.9 (78.4%).

Methyl (3S,4S,5S)-3,4-diacetoxy-5-(tert-butyl dimethylsilyloxy)-1-cyclohexenecarboxylate (8b)

To a solution of 7l (50.0 mg, 0.14 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (420 μL) were added Et₃N (44.6 mg, 0.44 mmol, 3.1 eq.) and MsCl (65.6 mg, 0.44 mmol, 3.1 eq.) under argon atmosphere, and stirred for 10 min at 0 °C. The reaction was quenched with water, and the organic materials were extracted with EtOAc. The combined extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in toluene (500 μL) and to that were added 18-crown-6 (73.9 mg, 0.18 mmol, 1.3 eq.) and CsOAc (84.5 mg, 0.44 mmol, 3.1 eq.) at 10 °C under argon atmosphere. The mixture was stirred for 48 h at 25 °C, then the reaction was quenched with water. The organic materials were extracted with EtOAc, and the combined extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (2 g). Elution with hexane-EtOAc (5:1)

afforded **8b** (35.2 mg, 65% over two steps) as colorless oil. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz): δ = 0.07 (s, 3H, SiCH_3), 0.08 (s, 3H, SiCH_3), 0.86 (s, 9H, *tert*-butyl), 2.02 (s, 3H, Ac), 2.05 (s, 3H, Ac), 2.32 (ddd, J = 1.6, 4.8, 18.4 Hz, 1H, H-6 β), 2.65 (ddd, J = 2.0, 4.4, 18.4 Hz, 1H, H-6 α), 3.75 (s, 3H, Me ester), 4.14 (ddd, J = 4.4, 4.8, 6.8 Hz, 1H, H-5), 5.08 (dd, J = 4.0, 6.8 Hz, 1H, H-4), 5.75 (ddd, J = 2.0, 3.6, 4.0 Hz, 1H, H-3), 6.69 (dd, J = 1.6, 3.6 Hz, 1H, H-2); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz): δ = -4.96, -4.87, 17.9, 20.9, 25.6, 31.3, 52.1, 65.9, 66.9, 70.2, 131.0, 133.2, 166.5, 170.0, 170.1; IR ν_{max} 3419, 2952, 2345, 1718, 1446, 1375, 1238, 1041, 927, 843 cm^{-1} . Its $^1\text{H NMR}$ spectra was identical with that reported previously.⁶¹

Methyl (3*S*,4*R*,5*S*)-3,4,5-triacetoxy-1-cyclohexenecarboxylate (8d)

To a solution of **8b** (35.2 mg, 0.09 mmol) in THF (1 mL) were added acetic acid (13.2 mg, 0.22 mmol, 2.4 eq.) and tetra-*n*-butylammonium fluoride (TBAF, 1M solution in THF, 11 μL , 0.11 mmol, 1.2 eq.). The mixture was stirred for 40 h at 20 $^\circ\text{C}$, then the reaction was quenched with water. The organic materials were extracted with EtOAc, and the combined extracts were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (2 g). Elution with hexane-EtOAc (3:1) afforded diacetate **8c** (11.2 mg) as colorless oil. This residue was employed for next step without further purification.

This was dissolved in pyridine (300 μL) were added Ac_2O (4.6 mg, 0.45 mmol, 1.2 eq.) and DMAP (2.3 mg, 0.20 mmol, 0.5 eq.). The reaction was monitored by silica gel TLC, developed with hexane-EtOAc (2:1). The mixture was stirred for 2 h at room temperature, and the reaction was quenched with water. The organic materials were extracted with EtOAc, and the combined extracts were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC with hexane-EtOAc (2:1) to afford **8d** (10.2 mg, 36% over two steps) as colorless oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ +180 (c 0.52, CHCl_3) [lit.²⁹: $[\alpha]_{\text{D}}$ -174 (c 1.07, CHCl_3), for (3*R*,4*S*,5*R*)-**1f**]; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz): δ = 2.03 (s, 3H, Ac), 2.05 (s, 3H, Ac), 2.06 (s, 3H, Ac), 2.41 (ddd, J = 2.0, 5.2, 18.0 Hz, 1H, H-6 β), 2.58 (ddd, J = 1.6, 4.8, 18.0 Hz, 1H, H-6 α), 3.75 (s, 3H, Me ester), 5.25 (dd, J = 4.8, 8.0 Hz, 1H, H-4), 5.27 (ddd, J = 4.8, 5.2, 8.0 Hz, 1H, H-5), 5.71 (ddd, J = 1.6, 3.6, 4.8 Hz, 1H, H-3), 6.74 (dd, J = 2.0, 3.6 Hz, 1H, H-2); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz): δ = 20.7, 20.8, 21.0, 52.2, 66.0, 66.8, 67.7, 131.2, 132.7, 165.9, 169.9, 170.0; IR ν_{max} 1745, 1714, 1439, 1371, 1216, 1036 cm^{-1} . Its NMR spectra were identical with those reported previously.²⁹

Methyl

(1R,2S,3S,4R,5R)-3,4-diacetoxy-5-(tert-butyldimethyl)silyloxy-1,2-dihydroxy-cyclohexanecarboxylate (10a)

Diacetate **7g** (259.4 mg, 0.67 mmol) was dissolved in *tert*-BuOH (1.3 mL) and H₂O (1.3 mL). To this, K₂OsO₂(OH)₄ (12.5 mg, 0.034 mmol, 0.05 eq.) and *N*-methylmorpholine *N*-oxide (NMO, 102.2 mg, 0.87 mmol 1.3 eq.) were added with stirring. The reaction was monitored by silica gel TLC, developed with hexane-EtOAc (2:1). The mixture was stirred for 2 h at 40 °C, then the reaction was quenched with water. The organic materials were extracted with EtOAc, and the combined extracts were washed with saturated aqueous Na₂S₂O₃, brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (10 g). Elution with hexane-EtOAc (2:1) afforded **10a** (249.4 mg, 89%) as white solid. Mp 59.5-60.5 °C; ¹H NMR (400 MHz): δ = 0.02 (s, 3H, SiCH₃), 0.03 (s, 3H, SiCH₃), 0.82 (s, 9H, *tert*-butyl), 1.88 (dd, *J* = 10.8, 13.6, 1H, H-6β), 1.96 (dd, *J* = 5.2, 13.6 Hz, 1H, H-6α), 2.02 (s, 3H, Ac), 2.05 (s, 3H, Ac), 3.59 (br s, 1H, OH), 3.83 (s, 3H, Me ester), 3.92 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H-2), 4.02 (ddd, *J* = 5.2, 9.2, 10.8 Hz, 1H, H-5), 5.02 (dd, *J* = 9.2, 9.8 Hz, 1H, H-4), 5.10 (dd, *J* = 9.6, 9.8 Hz 1H, H-3); ¹³C NMR (100 MHz): δ = -4.95, -4.68, 17.8, 20.8, 21.0, 25.5, 39.2, 53.6, 67.7, 73.6, 74.0, 75.1, 169.8, 171.5, 173.9; IR *v*_{max} 2954, 2860, 2368, 2324, 1736, 1517, 1240, 1039 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₁₈H₃₂O₉Si: C 51.41, H 7.67; found: C 51.64, H 7.56.

Methyl (1R,2S,3S,4R,5R)-2,3,4,5-tetraacetoxy-1-hydroxycyclohexanecarboxylate (10b)

To a solution of **10a** (68.6 mg, 0.15 mmol) in THF (700 μL) were added acetic acid (18 mg, 0.30 mmol, 2 eq.) and TBAF (1 M in THF, 300 μL, 0.30 mmol, 2 eq.). The mixture was stirred for 2 d at room temperature, then the reaction was quenched with water. The organic materials were extracted with EtOAc and the combined extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was treated with pyridine (100 μL) and Ac₂O (35 μL, 0.33 mmol, 2.2 eq.) for 12 h at room temperature to afford **10b** (32.0 mg, 55%) as white solid. Mp 141-142 °C; ¹H NMR (400 MHz): δ = 1.96 (s, 3H, Ac), 1.98 (s, 3H, Ac), 1.99 (s, 3H, Ac), 2.00 (s, 3H, Ac), 2.06 (ddd, *J* = 2.4, 4.8, 13.6 Hz, 1H, H-6β), 2.27 (dd, *J* = 4.8, 13.6 Hz, 1H, H-6α), 3.54 (br s, 1H, OH), 3.73 (s, 3H, Me ester), 5.25 (m, 3H), 5.43 (dd, *J* = 9.6, 10.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 20.4, 20.5, 20.6, 20.8, 34.6, 53.6, 68.6, 70.6, 72.8, 73.6, 169.4, 169.6, 169.7, 169.9, 172.2; IR *v*_{max} 3469, 1741, 1380, 1230, 1034, 956 cm⁻¹. This was employed for the next step without further purification.

Methyl (3R,4S,5S,6R)-3,4,5,6-tetraacetoxy-1-cyclohexanecarboxylate (11)

To a solution of **10b** (29.2 mg, 0.075 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (600 μL) was added Martin's sulfurane (75.7 mg, 0.11 mmol, 1.5 eq.). The mixture was stirred for 4 h at room temperature, then the reaction was quenched with water. The organic materials were extracted with EtOAc, and the combined extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (2 g). Elution with hexane-EtOAc (3:1) afforded **6** (25.0 mg, 90%) as colorless needles. Mp 121-122 °C [lit.³¹ mp 122-124 °C]; [α]_D²³ -39.5 (c 1.25, CHCl₃) [lit.³¹: [α]_D +23 (c 0.68, CHCl₃), for (3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-**11**]; ¹H NMR (400 MHz): δ = 1.99 (s, 3H, Ac), 2.01 (s, 3H, Ac), 2.02 (s, 3H, Ac), 2.06 (s, 3H, Ac), 3.74 (s, 3H, Me ester), 5.29 (dd, *J* = 7.6, 10.4 Hz, 1H, H-5), 5.30 (dd, *J* = 10.4, 10.4 Hz, 1H, H-4), 5.66 (dd, *J* = 2.0, 7.6 Hz, 1H, H-6), 5.99 (dd, *J* = 2.8, 10.4 Hz 1H, H-3), 6.74 (dd, *J* = 2.0, 2.8 Hz 1H, H-2); ¹³C NMR (100 MHz): δ = 20.5, 20.6, 20.6, 20.7, 52.4, 68.9, 69.9, 70.2, 71.7, 130.1, 137.8, 163.9, 169.5, 169.6, 169.8, 169.9; IR ν_{max} 1734, 1367, 1273, 1223, 1026, 970 cm⁻¹. Its ¹³C NMR spectra was identical with that reported previously.³¹

(3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5,6-tetraacetoxy-1-cyclohexylmethyl acetate (12)

To a solution of **11** (14.3 mg, 0.04 mmol) in anhydrous THF (140 μL) was added DIBAL (300 μL, 0.30 mmol, 7.8 eq.) at 0 °C. The mixture was stirred for 10 h at room temperature, then the reaction was quenched with water (600 μL) and NaOH aqueous solution (10%, 300 μL). After removal of insoluble materials by filtration with a pad of Celite, the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was treated with pyridine (100 μL) and Ac₂O (10 μL, 0.33 mmol, 8.3 eq.) for 12 h at room temperature. Conventional workup and purification afforded **12** (5.4 mg, 34%) as colorless oil. [α]_D²⁶ -61.3 (c 0.24, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz): δ = 1.95 (s, 3H, Ac), 1.96 (s, 3H, Ac), 1.98 (s, 3H, Ac), 1.99 (s, 3H, Ac), 2.00 (s, 3H, Ac), 4.32 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 4.61 (dd, *J* = 1.2, 10.4 Hz, 1H), 5.25 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H), 5.30 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H), 5.52 (dd, *J* = 1.2, 5.6 Hz, 1H), 5.69 (br s, 1H), 5.72 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz): δ = 20.5, 20.6, 20.7, 20.8, 62.4, 70.2, 70.7, 71.9, 72.0, 126.2, 133.6, 169.8, 170.0, 170.2, 170.3; IR ν_{max} 1745, 1433, 1371, 1209, 1024, 958, 920 cm⁻¹. Its ¹³C NMR spectra was identical with that reported previously.³²

***N*-tert-Butoxycarbonyl-2,5-dimethoxyaniline (18b)**

A solution of **18a** (5.01 g, 32.6 mmol) and di-*tert*-butyl dicarbonate (8.55 g, 39.2 mmol, 1.2 eq.) in THF (20 mL) was heated under reflux for 2 d. After removal of volatile materials *in vacuo*, the residue was purified by silica gel column chromatography (100 g) with hexane-EtOAc (10:1)

to afford **18b** (8.16 g, 99%) as colorless oil. ¹H NMR (400 MHz): δ = 1.51 (s, 9H, *t*-butyl), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 6.47 (dd, *J* = 3.2, 9.2 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.08 (br s, 1H, NH), 7.77 (br s, 1H, NH). Its NMR spectra was identical with that reported previously.⁶¹

3-*tert*-Butoxycarbonylamino-4,4-dimethoxycyclohexa-2,5-dien-1-one (17a)

To a solution of **18b** (3.20 g, 12.6 mmol) in anhydrous MeOH (45 mL) at 0 °C under N₂ were added MS 4A (1.2 g), and then portionwise PhI(OPiv)₂ (6.16 g, 15.2 mmol, 1.2 eq.). The mixture was stirred for 24 h at 0 °C. The mixture was diluted with EtOAc (25 mL) and saturated citric acid aq. solution (10 mL) was added to organic layer. After stirring for 30 min, the mixture was extracted with EtOAc, and the combined organic layer was washed with saturated NaHCO₃ aq. solution, water and brine. The organic phase was dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by recrystallization from hexane-EtOAc to give **17a** (1.90 g, 60%) as colorless needles. The residue from mother liquor was further purified by silica gel column chromatography (90 g) with hexane-EtOAc (1:1) to afford **17a** (0.63 g, 20%). Mp 130-131 °C [lit.⁵⁶ mp 130-131 °C]. ¹H NMR (400 MHz): δ = 1.49 (s, 9H, *t*-butyl), 3.25 (s, 6H, (OCH₃)₂), 6.39 (dd, *J* = 2.0, 10.0 Hz, 1H, H-2), 6.50 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, H-3), 6.81 (br s, 1H, NH), 6.99 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-6). Its NMR spectra was identical with that reported previously.⁵⁶

(2*S*,3*R*)-5-*tert*-Butoxycarbonylamino-2,3-epoxy-4,4-dimethoxycyclohexa-5-en-1-one (16b)

According to the reported procedure,⁵⁸ **17a** (50.0 mg, 0.19 mmol) was treated with *N*-benzylcinchonidinium chloride (117 mg, 0.28 mmol, 1.5 eq.), *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP, 32 μ L, 0.30 mmol, 1.6 eq.), and NaOH aq. solution (6 M, 15 μ L) in toluene (3 mL) for 1 h at -10 °C, and then allowed to warm to room temperature and stirred for further 48 h to afford **16b** (21.2 mg, 40%, 52.4% ee) as colorless needle. Mp 118-119 °C [lit.⁵⁸ mp 116-117 °C]; [α]_D²⁴ -103.1 (*c* 0.92, CHCl₃) [lit.⁵⁸: [α]_D -189.4 (*c* 1.0, CHCl₃), for (2*S*,3*R*)-**16b**]. ¹H NMR (400 MHz): δ = 1.47 (s, 9H, *t*-butyl), 3.29 (s, 3H, OCH₃), 3.49 (dd, *J* = 2.2, 4.2 Hz, 1H, H-2), 3.62 (s, 3H, OCH₃), 3.79 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H, H-3), 6.74 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-6), 7.01 (br s, 1H, NH). Its NMR spectra was identical with that reported previously.⁵⁸ The product **16b** was analyzed by HPLC [CHIRALCEL[®] OD-H, 0.46 cm x 25 cm; hexane-2-propanol (15:1); flow rate 0.5 mL/min; detected at 300 nm]: *t*_R (min) = 18.8 (76.2%), 28.8 (23.8%).

Direct approach to (2*S*,3*R*)-5-amino-2,3-epoxy-4,4-dimethoxycyclohexa-5-en-1-one (16a)

In a similar manner as described above, to a solution of **17a** (2.50 g, 9.50 mmol), *N*-benzylcinchonidinium chloride (5.85 g, 14.7 mmol, 1.5 eq.) and TBHP (1.6 mL, 15.0 mmol, 1.6 eq.) in toluene (150 mL), was added NaOH aq. solution (6 M, 750 μ L) at -10 °C. The similar workup as above yielded a mixture of (–)-**16b** and **17a** (total 2.71 g) as yellow oil.

Then, it was treated with TFA (25 mL, 27.0 mmol, 2.8 eq.) according to the reported procedure⁵⁸ to give **16a** (528 mg, 30%, 43.8% ee) as dark brown oil. This was further purified by recrystallization from EtOAc to give (–)-**16a** (141 mg, 8.0%, 99.0% ee) as colorless needles. Mp 162-163 °C [lit.⁶² mp 161-162 °C]; $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ -105.9 (*c* 0.6, MeOH) [lit.⁶²: $[\alpha]_{\text{D}}$ -91.0 (*c* 1.0, MeOH), for (2*S*,3*R*)-**16a**]. IR ν_{max} 3398, 3331, 3149, 2946, 1660, 1592, 1554, 1425, 1392, 1199, 1126, 1052 cm^{-1} ; ¹H NMR (400 MHz): δ = 3.33 (s, 3H, OCH₃), 3.43 (dd, *J* = 2.0, 4.0 Hz, 1H, H-2), 3.60 (s, 3H, OCH₃), 3.75 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, H-3), 5.02 (br s, 2H, NH₂), 5.15 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-6). Its IR and NMR spectra were identical with those reported previously.⁶² The product **16a** was analyzed by HPLC [CHIRALCEL[®] OD-H; hexane-2-propanol (2:1); flow rate 0.5 mL/min; detected at 300 nm]: *t*_R (min) = 17.1 (99.5%), 28.2 (0.5%).

3-*N,N*-Bis-(*tert*-butoxycarbonyl)amino-4,4-dimethoxycyclohexa-2,5-dien-1-one (17b)

To a solution of **17a** (538 mg, 2.0 mmol) in anhydrous THF (6 mL) were added DMAP (122 mg, 1.0 mmol, 0.5 eq.) and di-*tert*-butyl dicarbonate (874 mg, 4.0 mmol, 2.0 eq.) at 25 °C. The mixture was stirred at 70 °C under argon atmosphere for 6 h. The reaction was quenched by the addition of water, and then extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (10 g). Elution with hexane-EtOAc (4:1) afforded **17b** (561 mg, 89%) as white solid. Mp 117-118 °C; IR ν_{max} 2981, 1753, 1718, 1674, 1340, 1234, 1122 cm^{-1} ; ¹H NMR (400 MHz): δ = 1.47 (s, 18H, [C(CH₃)₃]₂), 3.29 (s, 6H, (OCH₃)₂), 6.28 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.36 (dd, *J* = 2.4, 10.4 Hz, 1H, H-2), 6.80 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H, H-3); ¹³C NMR (100 MHz): δ = 27.8, 51.3, 83.3, 94.8, 130.6, 130.8, 142.1, 149.4, 150.8, 185.7; MS (FAB): *m/e* (% relative intensity) 370.30 (33) [M+1]⁺, 392.29 (22) [M+23]⁺; HRMS (FAB): calcd for C₁₈H₂₇NO₇: [M+1]⁺: 370.1866; found: *m/z* = 370.1864.

Asymmetric epoxidation of 17b:

(2*S*,3*R*)-5-*N,N*-bis-(*tert*-butoxycarbonyl)amino-2,3-epoxy-4,4-dimethoxycyclohexa-6-en-1-one (16c)

To a mixture of *N*-benzylcinchonidinium chloride (30.0 g, 70.5 mmol, 2.0 eq.) and MS 4A (20.0 g) in anhydrous toluene (130 mL), were added TBHP (2 M in toluene, 88 mL, 176 mmol, 5.0 eq.), NaOH (1.40 g, 35.2 mmol, 1.0 eq.), and 15-crown-5 (9.50 g, 8.50 mL, 39.0 mmol, 1.1 eq.) at 10 °C. The resulting suspension was stirred for 30 min, and then to the mixture was added **17b** (13.0 g, 35.2 mmol) at 10 °C under argon atmosphere. After stirring for 24 h, the mixture was quenched with saturated Na₂S₂O₃ aq. solution. MS 4A and other insoluble materials were removed by filtration, and the filtrate was extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo* to give a mixture of **16c** and **17b** (total 10.3 g) as oil. As the product **16c** and the starting material **17b** showed same R_fs on silica gel, the yield was estimated to be 57%, based on ¹H NMR with an internal standard [ethyl benzoate, Tokyo Kasei Co., B0069, analytically pure grade, standard signal at δ = 4.36 (dd, *J* = 6.8, 7.2 Hz, 2H, CH₂CH₃)].

Then, the crude product in CH₂Cl₂ (120 mL) was treated with TFA (30 mL, 32.4 mmol, 0.9 eq.) and anisole (12 mL), to give epoxide (–)-**16a** (2.90 g, 46% over two steps, 79.8% ee) as solid. HPLC analysis was performed in the same manner as above: *t*_R (min) = 17.1 (89.9%), 28.1 (10.1%).

(2*S*,3*R*)-5-*N*-[(2-Acetoxybenzoyl)amino]-2,3-epoxy-4,4-dimethoxycyclohexa-6-en-1-one
(21a)

To a solution of (–)-**16a** (2.80 g, 15.1 mmol) in THF (140 ml) at –78 °C were added the lithium *tert*-butoxide (Aldrich, 398185, 16.6 mL, 16.6 mmol, 1.1 eq.), and subsequently acetylsalicyloyl chloride (3.50 g, 18.1 mmol, 1.2 eq.) in portionwise. After stirring for 1 h at –78 °C, the mixture was quenched with saturated NH₄Cl aq. solution and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (240 g). Elution with hexane-EtOAc (2:1) afforded **21a** (3.50 g) as white solid. Mp 84-85 °C; IR ν_{max} 3367, 2920, 2848, 1772, 1670, 1597, 1495, 1456, 1363, 1273, 1234, 1178, 1109, 1045 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz): δ = 2.37 (s, 3H, Ac), 3.29 (s, 3H, OCH₃), 3.55 (dd, *J* = 2.0, 4.4 Hz, 1H, H-2), 3.67 (s, 3H, OCH₃), 3.83 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-3), 7.15 (dd, *J* = 1.2, 8.4 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.31 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-6), 7.33 (ddd, *J* = 1.2, 7.6, 8.4 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.54 (ddd, *J* = 1.6, 7.6, 8.0 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.85 (dd, *J* = 1.6, 8.0 Hz, 1H, Ar-*H*), 8.73 (br s, 1H, NH); ¹³C NMR (100 MHz): δ = 20.9, 50.8, 51.5, 51.6, 52.1, 95.7, 109.7, 123.5, 126.9, 130.5, 133.2, 145.1, 148.0, 164.1, 168.7, 192.7. This was employed for the next step without further purification.

(2S,3R)-2,3-Epoxy-5-N-[(2-hydroxybenzoyl)amino]-4,4-dimethoxycyclohexa-6-en-1-one (21b)

To a solution of **21a** (3.50 g) in MeOH (42 mL) and H₂O (14 mL) was added K₂CO₃ (1.40 g, 10.1 mmol, 0.67 eq.). After stirring for 30 min at room temperature, the mixture was diluted with H₂O (20 mL), and then extracted with EtOAc. The organic layer was washed with saturated NaHCO₃ aq. solution and brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo* to afford **21b** (3.10 g, 67% over two steps) as white solid. Mp 117-118 °C; IR ν_{max} 3211, 2948, 1739, 1656, 1516, 1464, 1281, 1203, 1051 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz) δ = 3.31 (s, 3H, OCH₃), 3.41 (dd, *J* = 2.4, 4.4 Hz, 1H, H-2), 3.61 (s, 3H, OCH₃), 3.99 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H-3), 6.92 (ddd, *J* = 1.2, 7.6, 7.6 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.01 (dd, *J* = 1.2, 7.6 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.20 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-6), 7.36 (dd, *J* = 1.6, 8.0 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.94 (ddd, *J* = 1.6, 7.6, 8.0 Hz, 1H, Ar-*H*). Its IR and NMR spectra were identical with those reported previously.⁵⁴ This was employed for the next step without further purification.

(2S,3R)-2,3-Epoxy-5-N-[(2-hydroxybenzoyl)amino]-cyclohexa-6-en-1,4-dione (22)

According to the reported procedure,⁵⁴ ketal **21b** (2.90 g, 9.50 mmol) was treated with BF₃·OEt₂ (3.74 mL, 29.0 mmol, 3.0 eq.) in CH₂Cl₂ (15 mL) for 1 h at -20 °C, and then allowed to warm to room temperature and stirred for further 7 h to afford **22** (1.03 g, 42%) as yellow solid. ¹H NMR (400 MHz): δ = 3.88 (dd, *J* = 2.0, 3.6 Hz, 1H, H-2), 3.98 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H-3), 6.96 (ddd, *J* = 1.2, 7.6, 8.0 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.03 (dd, *J* = 1.2, 8.0 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.48 (ddd, *J* = 1.2, 7.6, 8.4 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.50 (dd, *J* = 1.2, 8.4 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.62 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-6), 8.83 (br s, 1H, NH), 11.1 (br s, 1H, OH). Its NMR spectrum was identical with that reported previously.⁵⁴ This was employed for the next step without further purification.

(2S,3S,4S)-2,3-Epoxy-4-hexanoyloxy-5-N-[(2-hexanoyloxybenzoyl)amino]-cyclohexa-6-en-1-one (dihexanoyl DHMEQ, 13c)

According to the reported procedure,⁵⁴ diketone **22** (1.0 g, 3.90 mmol) was treated with NaBH(OAc)₃ (1.70 g, 7.80 mmol, 2.0 eq.) in MeOH (100 mL) for 20 min at 0 °C, and then the mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for further 4 h to afford crude mixture (2.7 g) containing **13a**.

The residue was suspended in THF (100 mL) and to that were added hexanoic anhydride (2.80 mL) and DMAP (16.0 mg). After stirring for 30 min at room temperature, the mixture was

quenched with ice-water (20 mL), then stirred for 20 min at room temperature and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with 0.5 M HCl, saturated NaHCO₃ aq. solution and brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (190 g) with hexane-EtOAc (4:1) to afford (–)-**13c** (1.30 g, 72%, 79.8% ee) as yellow oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ –82.0 (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H NMR (270 MHz): δ = 0.85 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 0.91 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.30 (m, 4H, C₂H₄CH₃), 1.34 (m, 4H, C₂H₄CH₃), 1.70 (m, 4H, (CH₂C₃H₅)₂), 2.53 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, COCH₂), 2.56 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, COCH₂), 3.50 (dd, *J* = 2.0, 3.9 Hz, 1H, H-2), 3.91 (dd, *J* = 2.9, 3.9 Hz, 1H, H-3), 5.85 (dd, *J* = 1.5, 2.9 Hz, 1H, H-4), 7.02 (dd, *J* = 1.5, 2.0 Hz, 1H, H-6), 7.10 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.35 (dd, *J* = 7.8, 7.8 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.54 (ddd, *J* = 1.5, 7.8, 7.8 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.67 (dd, *J* = 1.5, 7.8 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.99 (br s, 1H, NH); ¹³C NMR (100 MHz): δ = 13.8, 13.9, 22.3, 24.5, 31.2, 34.0, 34.2, 52.8, 66.5, 109.9, 123.5, 126.6, 127.9, 129.6, 133.0, 147.7, 164.3, 172.3, 173.3, 192.2; IR ν_{max} 3372, 3284, 3256, 3217, 3148, 3102, 3043, 2956, 2930, 2871, 1752, 1699, 1642, 1520, 1282, 1241, 1214, 1155, 1099, 1033, 905, 781 cm⁻¹; Anal. Calcd for C₂₅H₃₁NO₇: C, 65.6; H, 6.83; N, 3.06. Found: C, 65.6; H, 6.73; N, 3.10. The product **13c** was analyzed by HPLC [CHIRALCEL[®] AD-H, 0.46 cm x 25 cm; hexane-2-propanol (7:1); flow rate 0.5 mL/min; detected at 290 nm]: *t*_R (min) = 28.3 (10.1%), 30.9 (89.9%).

Burkholderia cepacia lipase-catalyzed hydrolysis of (–)-**13c**

To a solution of (–)-**13c** (46.0 mg, 79.8% ee, 0.10 mmol) in acetone (0.7 mL) and water (0.7 mL) was added *Burkholderia cepacia* lipase (Amano PS-IM, 70 mg). After stirring for 24 h at room temperature, the mixture was concentrated *in vacuo* for 1 h to dryness and then mixed with THF (10 mL). Ultrasonic vibration (200 W) was applied for the resulted suspension for 10 min, and the mixture was filtered through a pad of Celite to remove insoluble materials. The filtrate was concentrated *in vacuo* and the residue was mixed with *i*-Pr₂O (10 mL). To the mixture was again applied the ultrasonic vibration (200 W) for 10 min, to wash out monohexanoyl DHMEQ **13d**. After filtration, the residue on the filter paper was charged on a silica gel column (300 mg), and the elution with THF afforded (2*S*,3*S*,4*S*)-**13a** (18.0 mg, 69%, >99.9% ee) as white solid. Mp 187 °C [lit.⁵⁴ mp 185 °C]. As the solubility of DHMEQ was very low in methanol, the comparison of the sign of rotations between that of present sample and authentic datum seemed not to be reliable enough, then the ee as well as of the absolute configuration of the present DHMEQ was confirmed by derivation to the corresponding dihexanoate (2*S*,3*S*,4*S*)-**1c** again. Colorless oil; $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ –126.0 (*c* 0.66, CHCl₃). HPLC analysis was performed in the

same manner as above: t_R (min) = 38.0 (single peak), and this was in good accordance with that of an authentic specimen.

引用文献

1. (a) Arjona, O.; Gómez, A. M.; López J. C.; Plumet J. *Chem.Rev.* **2007**, *107*, 1919-2036. (b) Sears, P.; Wong, C.-H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2300-2324. (c) Boysen, M. M. K. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 8648-8659. (d) Shibasaki, M.; Kanai, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 1839–1850.
2. Chida, N.; Ohtsuka, M.; Ogawa, S. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4441-4447.
3. Ogawa, S.; Iwasawa, Y.; Nose, T.; Suami, T.; Ohba, S.; Ito, M.; Saito, Y. *J. Chem. Soc. Perkin I* **1985**, 903-906.
4. Matsuda, M.; Yamazaki, T.; Fuhshuku, K.; Sugai, T. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 8752-8760.
5. Fujino, A.; Sugai, T. *Adv. Synth. Catal.*, **2008**, *350*, 1712-1716.
6. Ogawa, S.; Yoshikawa, M.; Taki, T.; Yokoi, S.; Chida, N. *Carbohydr. Res.* **1995**, *269*, 53-78.
7. Terashima, S.; Ujita, K.; Kuwayama, T.; Sugioka, T.; Shimizu, K.; Kanehira, K. WO 2000-JP8348 20001127 (CA 135:76775) **2001**.
8. Shoji, M.; Imai, H.; Mukaida, M.; Sakai, K.; Kakeya, H.; Osada, H.; Hayashi, Y. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 79-91.
9. Kakeya, H.; Miyake, Y.; Shoji, M.; Kishida, S.; Hayashi, Y.; Kataoka, T.; Osada, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3743-3746.
10. Abrecht, S.; Harrington, P.; Iding, H.; Karpf, M.; Trussardi, R.; Wirz, B.; Zutter, U. *Chimia* **2004**, *58*, 621-629.
11. Tran, C. H.; Crout, D. H. G. *J. Chem. Soc., Perkin I* **1998**, 1065-1068.
12. Hirose, Y.; Kariya, K.; Sasaki, I.; Kurono, Y.; Achiwa, K. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5915-5918.
13. Fotakopoulou, I.; Barbayianni, E.; Constantinou-Kokotou, V.; Bornscheuer, U. T.; Kokotos, G. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 782-786.
14. Provencher, L.; Jones, J. B. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2729-2732.
15. Sánchez-Abella, L.; Fernández, S.; Verstuyf, A.; Verlinden, L.; Ferrero, M.; Gotor, V. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 4193-4202.
16. Huang, J.; Chen, F. –E. *Helv. Chim. Acta.* **2007**, *90*, 1366-1372.
17. (a) Zhang, Y.; Liu, A.; Ye, Z. G.; Lin, J.; Xu, L. Z.; Yang, S. L. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*, 1459-1461. (b) Tan, D. S.; Foley, M. A.; Shair, M. D.; Schreiber, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8565-8566.
18. Adachi, O.; Ano, Y.; Toyama, T.; Matsushita, K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70*, 2579-2582.
19. Brettle, R.; Cross, R.; Frederickson, M.; Haslam, E.; MacBeath, F. S.; Davies, G. M. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 10547-10556.
20. (a) Ferrier, R. J. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2779-2831. (b) Jiang, S.; Singh, G. *Tetrahedron* **1998**,

- 54, 4697-4753. (c) Kiddle, J. J. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2189-2202.
21. Wong, C.-H.; Ye, X.-S.; Zhang, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7137-7138.
 22. Armesto, N.; Ferrero, M.; Fernández, S.; Gotor, V. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4978-4981.
 23. Miyazawa, T.; Hamada, M.; Morimoto, R.; Murashima, T.; Yamada, T. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8334-8337.
 24. Miyazawa, T.; Hamada, M.; Morimoto, R.; Murashima, T.; Yamada, T. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 175-178.
 25. Armesto, N.; Fernández, S.; Ferrero, M.; Gotor, V. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5401-5410.
 26. Kohrt, J. T.; Gu, J.; Johnson, C. R. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5088-5093.
 27. Diem, M. J.; Burow, D. F.; Fry, J. L. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 1801-1802.
 28. Kitsuda, K.; Calveras, J.; Nagai, Y.; Higashi, T.; Sugai, T. *J. Mol. Catal. B: Enz.* **2009**, *59*, 197-200.
 29. Liu, S.; Shi, X.; Xu, Y.; Xu, W.; Dong, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 78-83.
 30. Zhang, H.; Sun, C.; Ishurd, O.; Pan, Y.; Ding, L. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 2027-2030.
 31. Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Llamas, N. M.; Malone, J. F.; O'Dowd, C. R.; Allen, C. C. R. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1953-1963.
 32. Toyokuni, T.; Ogawa, S.; Suami, T. *Bull. Chem. Soc., Jpn.* **1983**, *56*, 1161-1170.
 33. Sen R.; Baltimore, D. *Cell* **1986**, *46*, 705-716.
 34. Baeuerle, P. A.; Baltimore, D. *Science* **1988**, *242*, 540-546.
 35. Li, Q.; Verma, I. M. *Nature Reviews* **2002**, *2*, 725-734.
 36. Takada, Y.; Singh, S.; Aggarwal, B. B. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 15096-15104.
 37. Bours, V.; Burd, P. R.; Brown, K.; Villalobos, J.; Park, S.; Ryseck, R. P.; Bravo, R.; Kelly, K.; Siebenlist, U. *Mol. Cell. Biol.* **1992**, *12*, 685-695.
 38. Ryseck, R.-P.; Bull, P.; Takamiya, M.; Bours, V.; Siebenlist, U.; Dobrzanski, P.; Bravo, R. *Mol. Cell. Biol.* **1992**, *12*, 674-684.
 39. Fusco, A. J.; Huang, D.-B.; Miller, D.; Wang, V. Y.-F.; Vu, D.; Ghosh, G. *EMBO reports* **2009**, *10*, 152-159.
 40. Chen, I. S. Y.; Wihelmsen, K. C.; Temin, H. M. *J. Virol.* **1983**, *45*, 104-113.
 41. Brown, K. D.; Claudio, E.; Siebenlist, U. *Arthritis Res. Ther.* **2008**, *10*, 1-14.
 42. Adli, M.; Merkhofer, E.; Cogswell, P.; Baldwin, A. S. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e9428.
 43. Ge, J.; Xu, H.; Li, T.; Zhou, Y.; Zhang, Z.; Li, S.; Liu, L.; Shao, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2009**, *106*, 13725-13730.
 44. Yang, S.-R.; Yao, H.; Rajendrasozhan, S.; Chung, S.; Edirisinghe, I.; Valvo, S.; Fromn, G.; McCabe Jr., M. J.; Sime, P. J.; Phipps, R. P.; Li, J.-D.; Bulger, M.; Rahman, I. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2009**, *40*, 147-158.
 45. Huang, W.-C.; Ju, T.-K.; Hung, M.-C.; Chen C.-C. *Molecular Cell* **2007**, *26*, 75-87.
 46. Prawan, A.; Saw, C. L. L.; Khor, T. O.; Keum, Y.-S.; Yu, S.; Hu, L.; Kong, A.-N. *Chem. Biol. Interact.* **2009**, *179*, 202-211.

47. Kane, R. C.; Bross, P. F.; Farrell, A. T.; Pazdur, R. *The Oncologist* **2003**, *8*, 508-513.
48. Adams, J.; Palombella, V. J.; Sausville, E. A.; Johnson, J.; Destree, A.; Lazarus, D. D.; Maas, J.; Pien, C. S.; Prakash, S.; Elliott, P. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 2615-2622.
49. Matsumoto, N.; Ariga, A.; To-e, S.; Nakamura, H.; Agata, N.; Hirano, S.; Inoue, J.; Umezawa, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 865-869.
50. Chaicharoenpong, C.; Kato, K.; Umezawa, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3933-3939.
51. Yamamoto, M.; Horie, R.; Takeiri, M.; Kozawa, I.; Umezawa, K. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5780-5788.
52. Kozawa, I.; Kato, K.; Teruya T.; Suenaga, K.; Umezawa, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5380-5382.
53. Umezawa, K. *Cancer Sci.* **2006**, *97*, 990-995.
54. Suzuki, Y.; Sugiyama, C.; Ohno, O.; Umezawa, K. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 7061-7066.
55. Macdonald, G.; Alcaraz, L.; Lewis, N. J.; Taylor, R. J. K. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5433-5436.
56. Taylor, R. J. K., Alcaraz, L., Kapfer-Eyer, I., Macdonald, G., Wei, X., Lewis, N. *Synthesis*, **1998**, 775-790.
57. Baba, N.; Oda, J.; Kawaguchi, M. *Agric. Biol. Chem.* **1986**, *50*, 3113-3117.
58. Alcaraz, L.; Macdonald, G.; Ragot, J. P.; Lewis, N.; Taylor, R. J. K. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3526-3527.
59. (a) 平岡千尋, 慶應義塾大学理工学研究科修士論文, 平成19年度; (b) Hamada, M.; Niitsu, Y.; Hiraoka, C.; Kozawa, I.; Higashi, T.; Shoji, M.; Umezawa, K.; Sugai, T. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 7083-7087.
60. Ema, T.; Maeno, S.; Takaya, Y.; Sakai, T.; Utaka, M. *Tetrahedron Asymmetry* **1996**, *7*, 625-628.
61. Zamir, L. O.; Luthe, C. *Can. J. Chem.* **1984**, *62*, 1169-1175.
62. Alcaraz, L.; Macdonald, G.; Ragot, J.; Lewis, N. J.; Taylor, R. J. K. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 3707-3716.

謝辞

DHMEQ というすばらしいテーマを御供与、各種の合成法や生物学的意見について御教示、また各種標品を御供与いただくなど、終始、御指導および御高配を賜りました、慶應義塾大学理工学部教授 梅澤 一夫博士に心から感謝いたします。

本論文の執筆にあたり、副査として有益な御指導、御助言を賜りました、慶應義塾大学理工学部教授松村 秀一博士、西山 繁博士に深く感謝いたします。

有機合成・立体化学・酵素反応に広くまたがる研究テーマとプロジェクト、そして研究を実施する場を御提供いただき、研究活動全般にわたり、きびしい御指導を賜り、さらに、多大なるご迷惑とご心配もおかけしました元・慶應義塾大学理工学部准教授、現・薬学部教授 須貝 威博士に心より感謝いたします。

カルバサイクル・カルバ糖の世界と可能性を御教示いただき、化合物の取り扱いから命名法、文献に至るまで快くあらゆる知識や技術を賜りました、慶應義塾大学名誉教授 小川 誠一郎博士に心から感謝いたします。

本博士論文研究における共同研究者の方々に感謝申し上げます。第二章では、慶應義塾大学薬学研究科 井波 義和学士、第三章では、同理工学研究科 平岡 千尋修士、薬学研究科 新津 幸洋学士、シグナルクリエーション社 小澤 郁子修士に御礼申し上げます。

本研究を行なうにあたり、有益な御助言、御激励を賜りました、静岡県立大学薬学部教授 赤井 周司博士、岡山大学工学部准教授 依馬 正博士、元・京都大学化学研究所 中村 薫博士、帝人ファーマ 黒川 真行博士に深く感謝いたします。

本研究に際し各種酵素を御恵与いただきました各社に感謝いたします。*Candida antarctica* リパーゼ B (Novozym[®] 435) : ノボザイムズジャパン株式会社、*Burkholderia cepacia* リパーゼ (Amano PS-IM) : 天野エンザイム株式会社、*Candida rugosa* リパーゼ (Meito OF) : 名糖産業株式会社、*Aspergillus melleus* プロテアーゼ(XP-488)、*Rhizopus delemar* プロテアーゼ(XP-415)、*Klebsiella oxytoca* エステラーゼ(SNSM-87) : 長瀬産業 R&D センターに厚く御礼申し上げます。

本研究を行なうにあたり、研究に対する根本的な取り組み方、たびたび遭遇した難所において最も適切な御助言を教示いただき、終始温かい姿勢で接して頂き、慶應義塾大学薬学部 准教授 庄司 満博士に心より感謝いたします。

本研究の共同研究者として、また、さまざまな場面で常に親身に励ましの御言葉、御

討論を賜った上、研究室生活全般で本当にお世話になりました、慶應義塾大学薬学部助教 東 利則修士に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、有益なディスカッションを頂き、また、研究活動全般にわたり、切磋琢磨しあった慶應義塾大学訪問研究員 Jordi Calveras 博士、同理工学研究科永井康仁修士、馬場 悠史修士、藤野 彩修士、松田 晶子修士に深く感謝いたします。

本研究を行なうにあたり、常に温かく見守り、励まし続けて下さいました、元・慶應義塾大学薬学部 専任講師、現・東京理科大学 稲見 圭子博士、慶應義塾大学研究員小川 洋子学士、同理工学研究科 阿部 智香修士、橘田 和憲修士、内藤 雄修士、同薬学研究科 辰巳 裕紀修士、中込 温子修士、植村 公一修士、坂本 真希修士に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、共に研究生活を歩み、応援して下さいました、東北大学理学系研究科 鈴木 恵理子修士、慶應義塾大学薬学研究科 伊藤 節学士、植田 裕二学士、栗原 徹学士、清水 賢一学士に心より感謝致します。

皆様の笑顔と活気が、毎日の研究生活を明るく照らして下さいました、慶應義塾大学薬学部 大橋 乃梨子学士、桂山 曜学士、小崎 悠香学士、野口 敦子学士、小牧 洋子氏、銭場 愛彦氏、徳田 妙子氏、二宮 恵子氏、古田 未有氏、武富 昇平氏、千島 伸之氏、町田 卓也氏、同大学特別交換留学生 黄 杭沆氏に心より感謝いたします。

申請書・報告書作成や論文執筆等を引き受け、著者を含め全ての院生が実験・研究に集中できる環境づくりにお力を尽くし、いつも研究室に笑顔をもたらして下さいました、鳥海 千夏子様、黒川 みゆき様に心より感謝致します。

卒業論文から修士論文研究において、きびしい御指導、御鞭撻により、研究の基本的能力を涵養していただき、著者が慶應義塾大学に移って以降も公私ともに温かく見守って下さいました、恩師 甲南大学理工学部教授 宮澤 敏文博士に深く感謝いたします。

本研究を行なうにあたり、奨学金を御給与頂き、経済面で御援助頂きました、慶應義塾大学大学院奨学金、ならびに藤原奨学金に感謝いたします。

本研究を行なうにあたり、奨学金を御貸与頂き、経済面で御援助頂きました、日本学生支援機構に感謝いたします。

本研究の一部は、慶應義塾先端科学技術研究センター(KLL)の研究助成金によって実施されたものであり、感謝いたします。

最後に、研究をスタートして、博士課程に至るまで常に健康を気遣い、温かく見守り続けてくれた、父博喜、母日出子、妹愛に本論文を捧げます。

平成 22 年 9 月