

フェルラ酸誘導体を
基盤とする新規 MALDI マトリックスの開発

加藤 洋介

目次

緒言	5
本論	9
第1章 MALDI matrix としての FA 誘導体の合成並びに有効な構造の探索	9
第1節 効率的な合成法の確立およびペプチドイオン化試験	10
第2節 置換基効果に着目した分子設計および合成	18
第3節 芳香環上の置換基効果の検討	22
第2章 MALDI matrix としての FA 誘導体の評価	29
第1節 PMF 法における matrix としての評価	29
第2節 MS/MS ion search における matrix としての評価	32
第3節 Matrix としての FA 誘導体の構造最適化に向けた検討	35
第3章 FA 誘導体のプロテオーム解析への応用	46
第1節 MS/MS ion search によるプロテオーム解析への応用	46
第2節 PMF 法によるプロテオーム解析への応用	49
結論	52
謝辞	54
実験の部	55
引用文献	90

略語

Ac	Acetyl
ACTH (18-39)	Adrenocorticotropic hormone fragment 18-39
ANG II	Angiotensin II
Auto2D	Fully automated two-dimensional chip gel electrophoresis
BDK (1-7)	Bradykinin 1-7
6BFA	6-Bromoferulic acid
Bn	Benzyl
BSA	Bovine serum albumin
CHCA	α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
CI	Chemical ionization
CID	Collision-induced dissociation
Cl-CCA	4-Chloro- α -cyanocinnamic acid
CRF	Corticotropin releasing factor (Ovine)
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]-7-undecene
2-DE	Two-dimensional gel electrophoresis
DHB	2,5-Dihydroxybenzoic acid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamine
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EI	Electron impact
FA	Ferulic acid
[Gly ¹⁴]-HN	[Gly ¹⁴]-humanin
GRP	Glucose regulated protein

HOMO	Highest occupied molecular orbital
HPLC	High performance liquid chromatography
HWE	Horner-Wadsworth-Emmons
Insulin B	Insulin oxidized B chain
IR	Infrared spectroscopy
IRL 1620	suc-[Glu ⁹ , Ala ^{11, 15}]-Endothelin-1 (8-21)
LC	Liquid chromatography
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionization
MOM	Methoxymethyl
MOMCl	Chloromethyl methyl ether
mRNA	messenger Ribonucleic acid
NMR	Nuclear magnetic resonance
OXT	Oxytocin
(PPG) ₁₀	(Pro-Pro-Gly) ₁₀ ·xH ₂ O
PMF	Peptide mass fingerprinting
Pv	Pivaloyl
pI	Isoelectric point
QIT	Quadrupole ion trap
SA	Sinapinic acid
SUB P	Substance P
TF	Transferrin
TFA	Trifluoroacetic acid
THF	Tetrahydrofuran
TOF-MS	Time of flight mass spectrometry

緒言

ゲノム研究の飛躍的な発展により、疾病に関与する遺伝子とタンパク質の特定が可能となり、タンパク質研究が質的に大きく変化してきている。従来の病態に関するタンパク質研究では健康時と疾病時の生体の状態を比較し、相違点を示すタンパク質を特定することに力が注がれてきたが、近年ではそのタンパク質の機能とそれ以外のタンパク質との関連性を解明する分野が発展した。プロテオミクスが疾病に関与するタンパク質の機能解析に重点を置いているに対し、プロテオーム解析は疾病に関与するタンパク質の同定とそれらと相互作用するタンパク質を同定することを目的としている¹⁾。特に病態に関するプロテオーム解析は疾病の原因解明に繋がることから医学および薬学分野において注目されており、診断ツールとなる新たなバイオマーカー、タンパク性医薬品、分子標的薬、低分子薬の創薬標的を見出すのに有意義な情報を提供するものと期待されている²⁻⁵⁾。しかし、ヒトの遺伝子に対応するタンパク質は2~3万種類も存在するとされており、mRNAの選択的スプライシングや翻訳後修飾などにより、実際にはそれ以上のタンパク質が体内に存在すると考えられている⁵⁾。このために、プロテオミクス並びにプロテオーム解析を遂行するためには、ハイスループットなタンパク質同定法を用いてタンパク質を同定すること、その機能およびタンパク質間における相互作用を迅速に明らかにすることなどが必要である。

質量分析法 (MS) では、タンパク質の同定法としてペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) 法⁶⁾ や MS/MS ion search⁷⁾ などのデータベース検索が用いられており、マスペクトル自体がタンパク質データベースの極めて重要な情報を構成している。これらの方法では、プロテアーゼ前処理によりタンパク質をペプチド断片の混合物とし、次いで PMF 法ではペプチドの質量数、MS/MS ion search ではフラグメントイオンによる部分アミノ酸情報を収集する方法が取られている。ペプチド断片の混合物の質量分析は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と MS を組み合わせた液体クロマトグラフィー (LC-MS)、並びにマトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI-MS) の大きく二つに分類される。LC-MS は

LCでペプチドを分離後、MS/MS ion searchによりタンパク質を同定する方法であるが、標的タンパク質が特定されているプロテオミクスでは、正確で再現性のある有用な方法である。しかし、プロテオーム解析のように多数のタンパク質を短時間で同定することを目的とする場合は、時間的コストの点から非効率であり、適切な方法ではない。また、多数の未知タンパク質を同定する場合もペプチドを分離するLC測定条件の設定が複雑であり、簡便な方法とは言えない。一方、MALDI-MSは生体組織からタンパク質を抽出後、二次元電気泳動による分離、インゲル消化した後、matrixと混合し、プレートに乗せるだけで測定が可能であり、1検体の測定から同定まで数分以内に完了する。特にハイスループットなMALDI-飛行時間型質量分析装置(TOFMS)は、短時間で簡便に多数のタンパク質の解析が可能なプロテオーム解析に適した質量分析方法である。また、MALDI-四重極イオントラップ(QIT-TOFMS)は、他のタンデムマスと比較して低エネルギーの衝突誘起解離(CID)により、アミノ酸配列の解析に有利なフラグメントイオンを優先的に生成する⁸⁾。そのため、MS/MS ion searchの測定が可能であり、PMF法で同定困難なタンパク質のペプチド断片からアミノ酸配列情報を収集することでタンパク質同定を行い、PMF法を補完している。

MALDIは電子衝突(EI)や化学イオン化(CI)などの質量分析法と異なり、タンパク質やペプチドのフラグメンテーションを起こし難いソフトなイオン化法である。また、MALDIの最大の特徴は他の質量分析装置と異なりmatrixと呼ばれる低分子有機化合物を用いる点にある。matrixは、測定試料がレーザー光から直接照射されるのを防ぐ保護作用、凝集を防ぐ分散剤、イオン化促進させるイオン化補助剤の働きをしている。これまで1000種類以上の化合物が、matrixとして検討されている⁹⁾。しかし、2,5-ジヒドロキシ安息香酸(DHB)、シナピン酸(SA)、および α -シアノ-4-ヒドロキシケイヒ酸(CHCA)の古典的な3種類が、感度、イオン化能、夾雑物存在下での許容性が高く、スタンダードなmatrixとして汎用されている(Figure 1)。また、プロテオーム解析では、これら3種類のmatrixをタンパク質やペプチドの種類や質量分析装置に応じて適切に使い分けられている。MALDI-TOFMSにお

ける PMF 法では、タンパク質同定の場合、CHCA か SA が用いられる。特に CHCA はペプチドに対する感度が良好であり、N 末端にアルギニンを含むペプチドに感受性が高いことが知られている¹⁰⁾。従って、タンパク質をトリプシン処理し、生成した N 末端がアルギニンやリジンであるペプチドに対するゴールドスタンダードな matrix として使用されている。MALDI-QIT-TOFMS おける MS/MS ion search 法では、DHB のみがアミノ酸配列の解析に使用可能である。DHB は、唯一 QIT の CID によるフラグメンテーション由来のフラグメントピークが検出可能な matrix であり、PMF 法で解析不可能なタンパク質を同定することが可能である。しかし、これら代表的な matrix は万能ではなく、各々のペプチドに対するイオン化効率や感度が大きく異なり、イオン化できない、またはイオン化し難いペプチドも存在する。このため、一般的には PMF 法と MS/MS ion search 法を組み合わせるタンパク質を同定する方法がおこなわれているが、測定試料ごとに CHCA と DHB を用いて 2 種類の試料を調整しなければならないという問題点がある。この 2 種類の試料を用いる方法では、微量な試料の消費量の増大や matrix 変更による解析結果の不一致などが起こり、MALDI によるプロテオーム解析の効率化を妨げる主要な要因の一つとなっている。

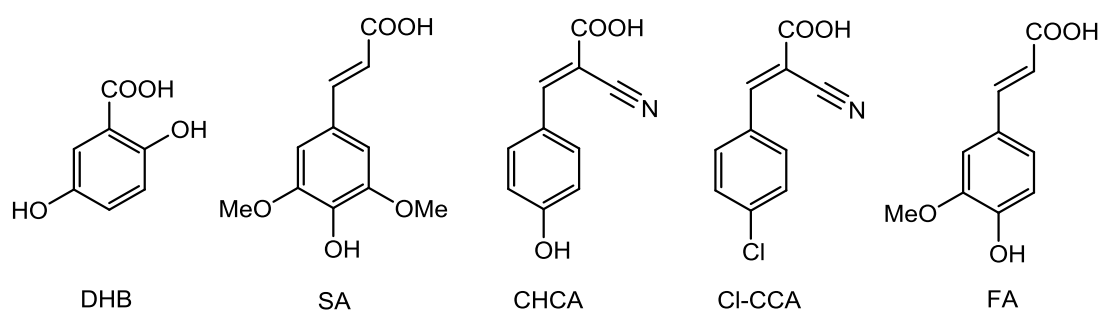


Figure 1. Chemical structures of typical matrices.

Matrix は低分子有機化合物であり、様々な化合物が候補として検討されてきた。当初はニコチン酸やバニリン酸が matrix として良く使用されていたが、現在ではケイヒ酸系化合物の CHCA、SA、安息香酸系化合物の DHB が汎用されている¹¹⁻¹⁴⁾。また、最新の matrix 研

究では、さらにこれらに改良を加えた 4-クロロ- α -シアノケイヒ酸 (Cl-CCA)¹⁵⁻²¹⁾ などが報告されている (Figure 1)。しかし、これらスタンダードな matrix は構造情報に基づく合理的な設計を基盤として開発されたのではなく、経験則に基づいた探索により見出された化合物である。従って、matrix としての化学構造上の意義は不明であり、PMF 法および MS/MS ion search の両者でタンパク質の同定が可能な matrix の体系的な開発に至っていない。

新規 matrix の開発の最大の問題点は、matrix の化学構造と測定試料のイオン化機構の相関が不明瞭であり、論理的な分子設計ができない点にある。代表的な matrix において、化学構造を基盤に誘導体が検討されているのは DHB のみであり、Schlunegger ら²²⁾ は DHB のヒドロキシ基の 2 位と 5 位の置換位置が測定試料のイオン化に重要であると報告している。この知見は他の matrix においても置換基と置換位置が matrix の機能に大きな影響を与える可能性があることを示唆しており、既存の matrix を基本骨格として化学構造を変換した誘導体の網羅的探索は、matrix 開発に有益な情報を与えるかと推測した。

網羅的探索の対象となる基本骨格は matrix の機能を有し、化学的な修飾位置の多いものが適していると考えられる。ケイヒ酸型 matrix のフェルラ酸 (FA) はスタンダードな matrix として使用されてはいないが、これまでに微生物の同定に用いられた例が有り²³⁾、合成原料となるバニリン誘導体が数多く存在することから網羅的探索の基本骨格に適していると思われる (Figure 1)。そこで、本研究は FA を基本骨格として誘導体を網羅的に化学合成し、MALDI-TOFMS、MALDI-QIT-TOFMS の両者に適応可能なタンパク質同定に適した実用性の高い matrix の開発を目的とした。

本編

第 1 章 MALDI matrix としての FA 誘導体の合成並びに有効な構造の探索

これまで、理論的な分子設計に基づいて開発された matrix は存在しない。化学合成された matrix は報告されているが、ヒドロキシ基のアルキル化など部分的な化学修飾に留まり系統的な探索例は皆無である^{24, 25)}。本研究では FA の化学構造に注目し、FA の化学構造を化学修飾することによって系統的に matrix の機能の改善並びに化学構造との相関を明らかにすることを目的とした。最初に matrix の機能に大きな影響を与えていると考えられる芳香環に新たに置換基を導入することを検討した。一般的に matrix の構造には芳香環が必ず存在し、レーザー光の吸収と熱エネルギー等の変換に関与しているとされている²⁶⁾。しかし、レーザー光吸収の 1 つの指標である吸光度と matrix の機能との関連性や最適値の存在は明らかではなく、吸光度から matrix を分子設計することはできない。そこで、合成した FA 誘導体を matrix としてペプチド混合物の測定に使用し、それらのイオンの強度を評価することによって最適な置換基と置換位置の情報収集をおこなった。

第 1 節では、ケイヒ酸構造を母核とする matrix の 1 つである FA の誘導体の効率的な合成法を確立し、matrix としてのペプチドイオン化能を評価した。

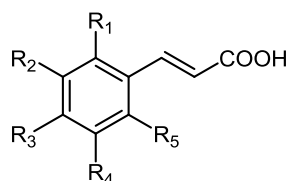
第 2 節では、前節の結果を参考にして芳香環上の置換基効果を詳細に検討するため、FA 誘導体を設計し、それらの合成方法について検討した。

第 3 節では、ペプチドに対する検出感度を示す S/N を指標として、合成した FA 誘導体の matrix の機能を評価した。

第1節 効率的な合成法の確立およびペプチドイオン化試験

既存の matrix の構造と置換基の種類を参考にして、ハロゲンと電子供与性基を導入した FA 誘導体 **1-14** を設計し、Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) 反応^{27, 28)} 並びに Heck 反応^{29, 30)} を鍵反応として、平均収率 25% で各々の誘導体を合成した (Scheme 1-3, Table 1)。

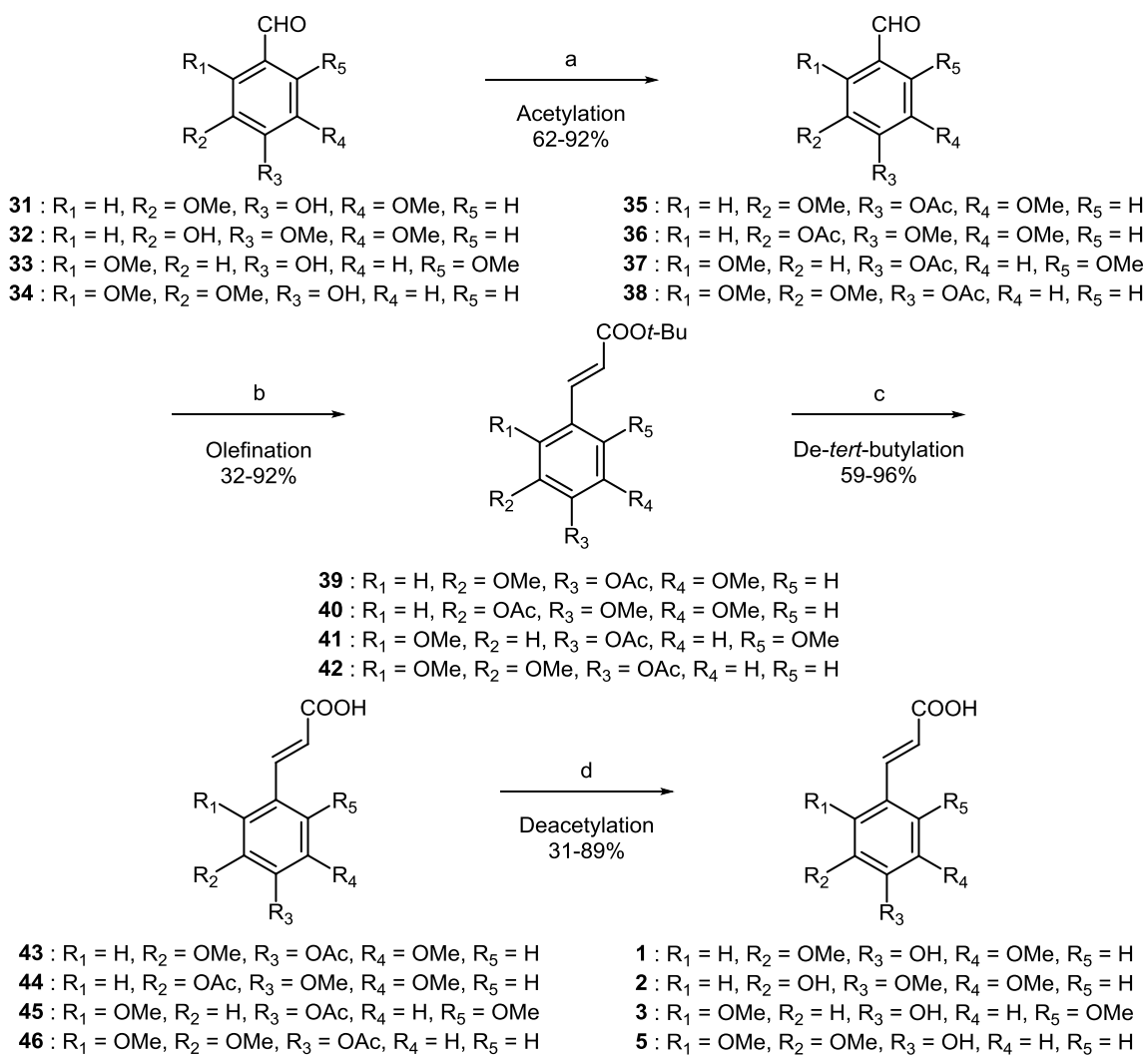
Table 1. Newly designed FA derivatives as a matrix.



compd	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	mp (°C) ^{a)}
1 ^{b)}	H	OMe	OH	OMe	H	193-195 (203-205) ³¹⁾
2	H	OH	OMe	OMe	H	160-161 (143-144) ³²⁾
3	OMe	H	OH	H	OMe	171 ^{c)}
4	H	OH	OH	OMe	H	(182) ²⁷⁾
5	OMe	OMe	OH	H	H	242 ^{c)}
6	H	OMe	OH	F	H	228-232 ^{c)}
7	H	OMe	OH	H	F	224-228 ^{c)}
8	H	OMe	OH	Br	H	253-255 (243-244) ³³⁾
9	H	OMe	OH	H	Br	245-248 (229-230) ³³⁾
10	H	OMe	OH	Cl	H	241-243 (229-231) ³⁴⁾
11	H	OCF ₃	OH	H	H	182-184 ^{c)}
12	H	Me	OH	Me	H	215 (196) ³⁵⁾
13	Me	H	OH	H	Me	203-205 ^{c)}
14	H	OMe	OH	I	H	255-258 (259-263) ³⁶⁾
15	NO ₂	OMe	OH	H	H	242 (200-202) ³⁴⁾
16	H	OMe	OH	NO ₂	H	236 (249) ³⁷⁾
17	H	OMe	OH	H	NO ₂	245 ^{c)}
18	H	OMe	OH	H	I	240-241 ^{c)}
19	Br	OMe	OH	H	H	218-219 (202-203) ³³⁾
20	I	OMe	OH	H	H	195 ^{c)}
21	H	OMe	OH	H	OMe	193 (178-180) ³⁸⁾

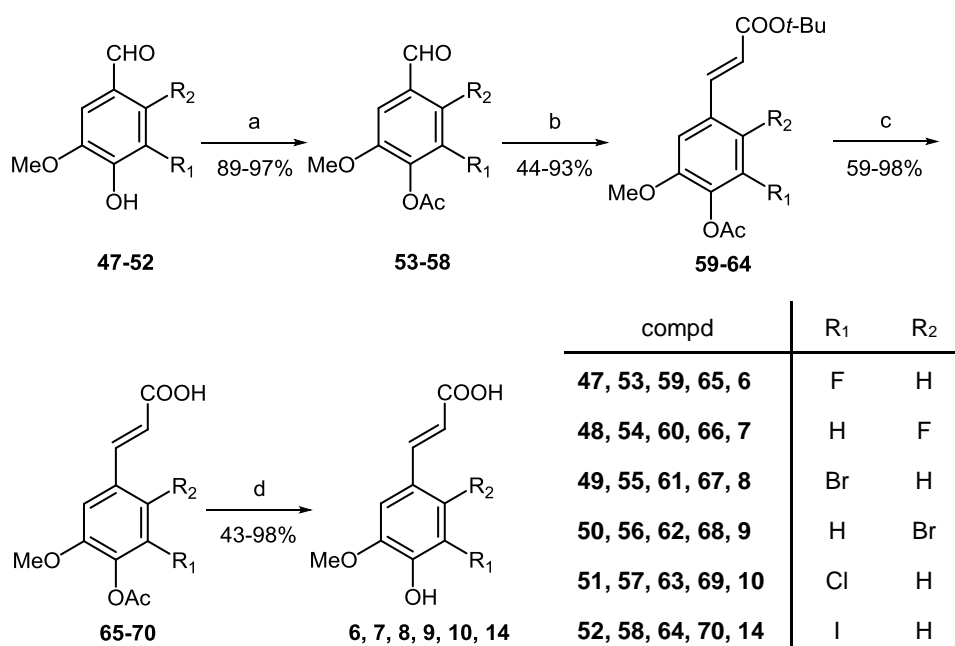
^{a)}The values within parenthesis were reported previously. ^{b)}Sinapinic acid. ^{c)}New compounds.

Scheme 1. Syntheses of FA derivatives using HWE reaction.



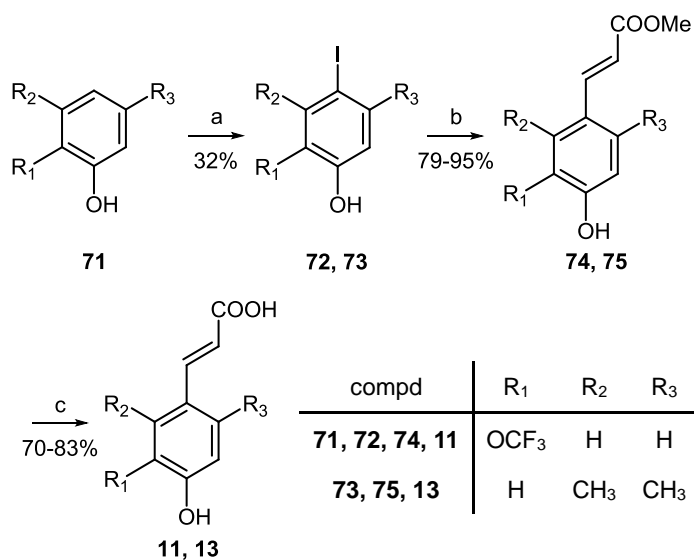
Reagents and conditions; (a) Ac₂O, pyridine, room temperature, 3 h; (b) LiCl, 1,3-diazabicyclo-[5,4,0]undec-7-ene (DBU), (EtO)₂POCH₂CO₂*t*-Bu, 45 °C then room temperature, 1 h; (c) TFA, room temperature, 3 h; (d) K₂CO₃, MeOH, 70 °C, 1 h.

Scheme 2. Syntheses of halogenated FA derivatives using HWE reaction.



Reagents and conditions; (a) Ac₂O, pyridine, room temperature, 3 h; (b) LiCl, DBU, (EtO)₂POCH₂CO₂*t*-Bu, 45 °C then room temperature, 1 h; (c) TFA, room temperature, 3 h; (d) K₂CO₃, MeOH, 70 °C, 1 h.

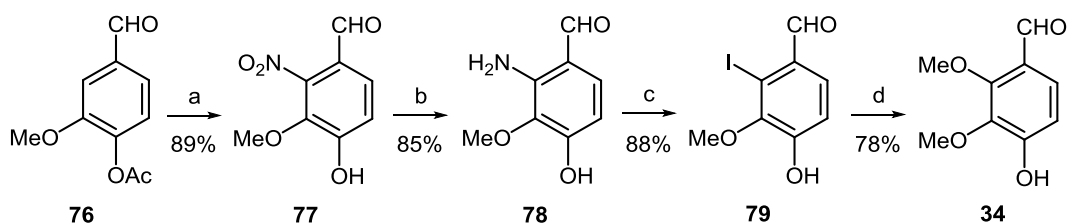
Scheme 3. Syntheses of FA derivatives using Heck reaction.



Reagents and conditions; (a) H₅IO₆, Na₂SO₃, MeOH, 0 °C, 10 h; (b) methyl acrylate, Pd(OAc)₂, CH₃CN, 100 °C, 5 h; (c) 20% NaOH, THF, room temperature, 3 h.

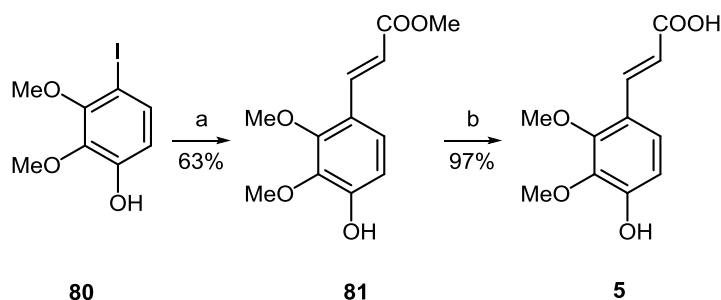
誘導体の合成例として、FA 誘導体 **5** では合成原料のバニリン誘導体 **34** の 4 工程を含めると 9 工程を必要とし、全収率も 18% と低下した (Scheme 1, 4)。そこで、ヨードフェノール体 **80** を出発原料に変更し、Heck 反応を用いて合成した結果、工程数は 3 工程に短縮され、全収率も 45% に改善した (Scheme 5)。このように、FA 誘導体の合成では鍵反応の HWE 反応と Heck 反応を目的とする構造に応じて使い分けることによって、簡便で網羅的な誘導体合成が可能となった。

Scheme 4. Synthesis of 2-methoxyvaniline as an aromatic moiety for **5**.



Reagents and conditions; (a) fuming nitric acid, CH_2Cl_2 , $-30\text{ }^\circ\text{C}$, 3 h, 10% NaOH, reflux, 3 h; (b) Fe, $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O} = 3:1$, $100\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h; (c) NaNO_2 , KI, 20% HCl, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 3 h; (d) CuCl_2 , CH_3ONa , DMF, $100\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h.

Scheme 5. Improved synthesis of 2-methoxyferulic acid (**5**) using Heck reaction.



Reagents and conditions; (a) methyl acrylate, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, CH_3CN , $100\text{ }^\circ\text{C}$, 5 h; (b) 20% NaOH, THF, room temperature, 3 h.

次いで、FA 誘導体 **1-14** を matrix、測定試料を Angiotensin II (ANG II) として MALDI-TOFMS の測定をおこない、誘導体 **1-14** のペプチドイオン化能を評価した。1 種類のペプチドの測定結果ではあるが、誘導体 **1, 8, 9, 14** を matrix として用いた場合に強度のある分子イオンピークが観測された。そこで、誘導体 **1, 8, 9, 14** を基に、FA 誘導体の matrix としての特徴と置換基効果を検討した。

これまで、一般性のある matrix 評価法は報告されていないが、実際のプロテオーム解析ではタンパク質を酵素処理したペプチド混合物を測定試料とする。酵素処理はアミノ酸配列に依存しており、個々のタンパク質によって様々な質量をもつペプチドが生成される。この状態に近い評価系で FA 誘導体を matrix として評価するため、8 種類の市販ペプチドの混合物を作製して測定試料とした (Table 2)。その際、ペプチドの質量数の違いに着目し、分子量 1000 以下の低分子から 2000 以上の高分子の範囲のものを使用した。この評価系を用いて、**1, 8, 9, 14** を matrix としてペプチドの質量数とイオン化の傾向について検討した。

Table 2. Preparation of peptide mix.

Abbreviation	Peptide amino acid composition	MW
BDK (1-7) ^a	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro	756.8
OXT ^b	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly	1000.7
ANG II ^a	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe	1046.1
SUB P ^b	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂	1347.6
ACTH (18-39) ^a	Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe	2464.2
(PPG) ₁₀ ^b	(Pro-Pro-Gly) ₁₀	2530.8
[Gly ¹⁴]-HN	Met-Ala-Pro-Arg-Gly-Glu-Ile-Asp-Leu-Pro-Val-Lys-Arg-Arg-Ala	2657.2
Insulin B ^a	Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys(SO ₃ H)-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Cys(SO ₃ H)-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala	3495.9

^aCommercial product from Sigma-Aldrich.: BDK (1-7), bradykinin 1-7; ANG II, angiotensin II; ACTH (18-39), acth fragment 18-39; Insulin B, insulin oxidized B chain. ^bCommercial product from Peptide Institute, Inc.: OXT, oxytocin; SUB P, substance P; [Gly¹⁴]-HN, [Gly¹⁴]-humanin; (PPG)₁₀, (Pro-Pro-Gly)₁₀·xH₂O. Concentration of each peptide : 10 pmol/μL, in H₂O 0.1% TFA.

MALDI-TOFMS の場合、誘導体 **1, 8, 9, 14** を matrix として使用すると、ペプチドの分子イオンピークを 5 から 7 個検出することが可能であり、ペプチドの混合状態においてもイオン化が確認された。特に、誘導体 **9** は代表的な matrix である CHCA と比較しても遜色なく、7 種類のペプチドを検出することが可能であった (Figure 2 A, B)。縦軸は相対強度のため、基準ピークに対する割合で個々のピークの強度が表されており、高さによりイオン化効率の違いを示している。誘導体 **9** のマススペクトルでは、低分子の BDK (1-7)、ANG II、SUB P より高分子の (PPG)₁₀、Insulin B の方が高いピークを示し、高分子ペプチドをイオン化する傾向が見られた (Figure 2 A)。また、(PPG)₁₀ と ACTH (18-39) は近い質量数を持つが、誘導体 **9** と CHCA のマススペクトルを比較するとイオンピークの高さが逆転している (Figure 2 A, B)。(PPG)₁₀ はプロリンを数多く含む特殊なアミノ酸配列を持つペプチドである。そのため、誘導体 **9** は CHCA と異なるアミノ酸配列に対するイオン化能力を有することが示唆された。

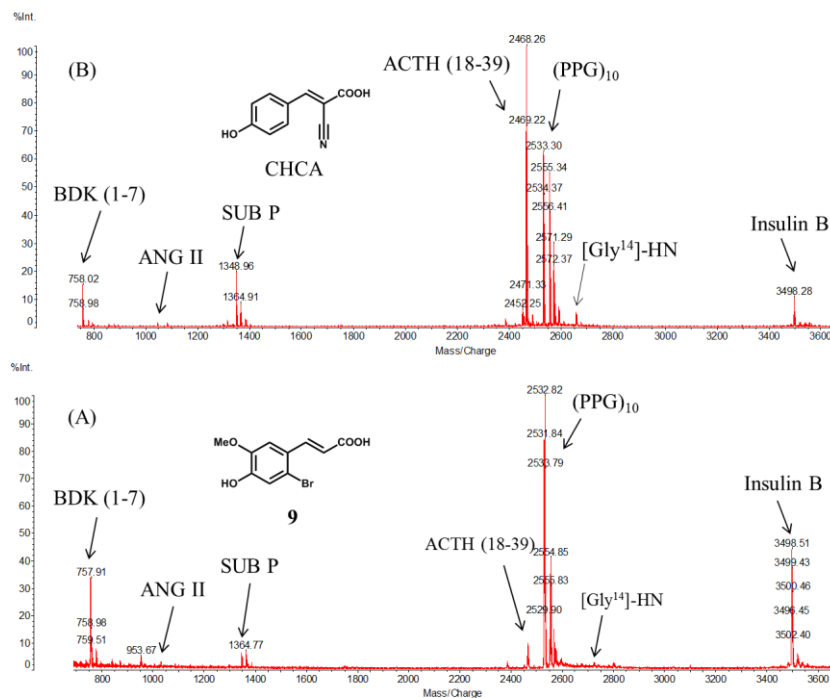


Figure 2. Spectra of peptide mix using (A) **9** and (B) CHCA as a matrix.

FA 誘導体 **1**, **8**, **14** は、**9** と同様に高分子ペプチドのイオン化が容易であったが、個々のペプチドに対するイオン化の傾向は異なることが明らかになった (Figure 3)。質量数 2000 を超える高分子ペプチドの中で、[Gly¹⁴]-HN は共通して低いイオン化傾向を示した。また、ハロゲンを含む誘導体 **8** と **14** は、(PPG)₁₀ と Insulin B を高く検出する傾向を示した (Figure 3 B, C)。一方、**1** は高分子側で (PPG)₁₀ より ACTH (18-39) が高く CHCA と似た傾向を示した (Figure 4 A)。このことから、ハロゲンの置換基効果はプロリンを含むペプチドに対するイオン化効率を高めることが示唆された。以上、matrix の基本骨格が等しくても置換基と置換位置が少しでも異なれば、ペプチドイオン化能に大きな影響を与えることが明らかとなった。

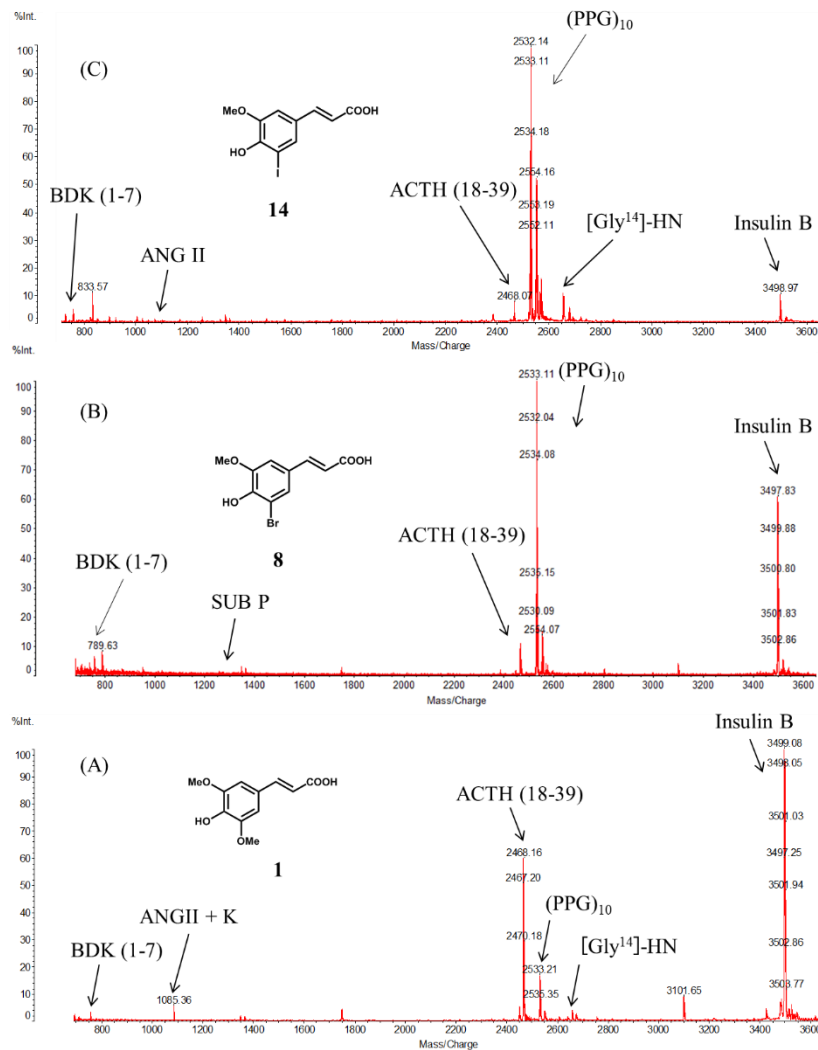


Figure 3. Spectra of peptide mix using (A) **1**, (B) **8** and (C) **14** as a matrix.

同様に、FA 誘導体 **1**, **8**, **9**, **14** の MALDI-QIT-TOFMS によるペプチドのフラグメントイオン生成に与える影響についてペプチド混合物を用いて検討した。MALDI-QIT-TOFMS は DHB を用いて測定するのが一般的であり、CHCA ではなく DHB を基準の matrix としてフラグメントイオンの強度を比較検討した。1 回目の質量分析により、DHB と誘導体 **1**, **8**, **9**, **14** の間で共通して検出された m/z 2337 を親イオンとして MS/MS をおこなった。

DHB と FA 誘導体 **1**, **8**, **9**, **14** による MS/MS のフラグメントイオンの強度を比較すると、メトキシ基置換体 **1** 以外のハロゲン化 FA 誘導体 **8**, **9**, **14** において DHB より高い強度が検出された (Figure 4 A, C, D, E)。ハロゲン化 FA 誘導体の同じ置換位置のブロモ基置換体 **8** とヨード基置換体 **14** を比較した場合、**14** が高いイオン強度を示した (Figure 4 D, E)。また、ブロモ基置換体 **9** は、ハロゲン化 FA 誘導体のなかで最も良好であり、**14** と比べ 1.3 倍、DHB と比べると 5 倍のイオンの強度を示した (Figure 4 C, D, E)。

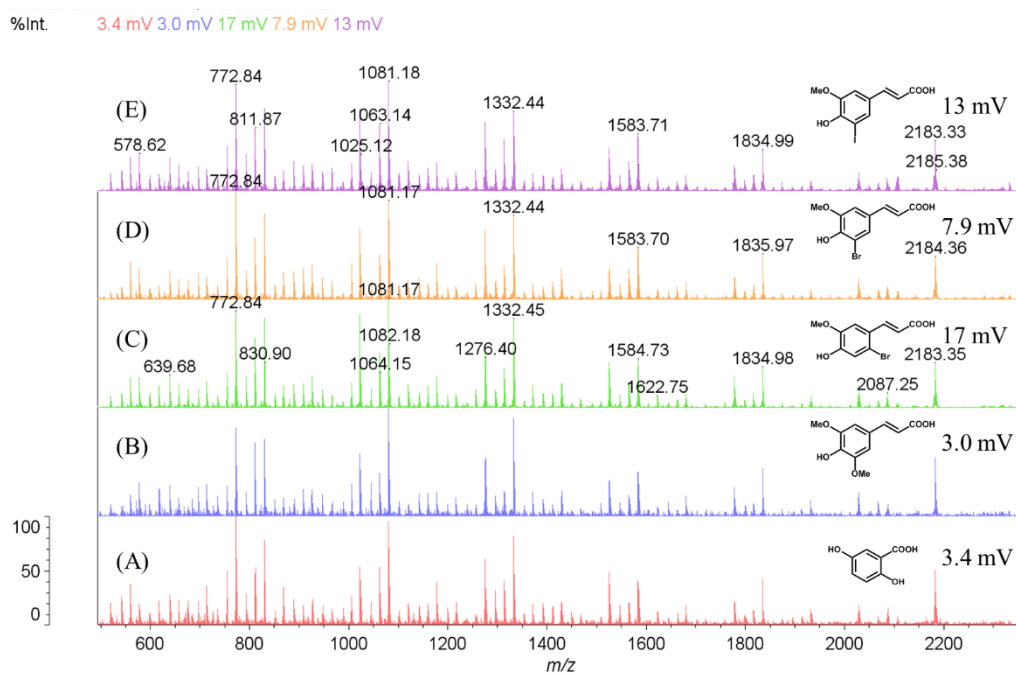
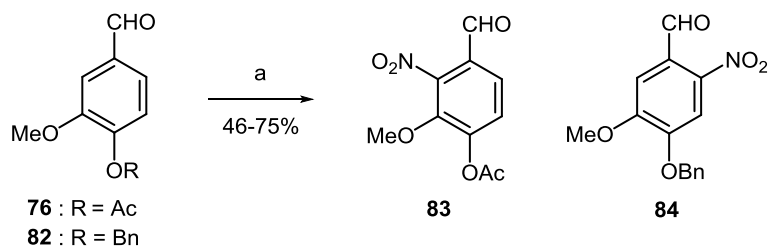


Figure 4. Results of MS/MS analysis using (A) DHB, (B) **1**, (C) **9**, (D) **8** and (E) **14**.

第2節 置換基効果に着目した FA 誘導体の分子設計および合成

Matrix としての FA 誘導体では、官能基の種類および官能基の置換位置の相違がペプチドに対するイオン化の傾向とフラグメントイオンに大きな影響を与えることが明らかとなった。このことから、芳香環上の官能基と置換位置に着目して FA 誘導体を設計し、それらの合成方法を検討した。誘導体 **18-21** は、前節においてペプチドのイオン化を確認した誘導体の構造異性体であり、置換位置の効果を検討するため合成した。また、ハロゲンや電子供与性基以外の置換基効果を検討するため、電子求引性基のニトロ基を含む誘導体 **15-17** を合成した (Table 1)。誘導体 **15-17** を合成するには、合成原料であるバニリンやヨードフェノールに選択的な置換反応を行う必要がある。バニリンはフェノール性ヒドロキシ基の保護基の種類によって位置選択的にニトロ化が進行することが報告されており³⁹⁻⁴¹⁾、この方法を応用した (Scheme 6)。

Scheme 6. Nitration reaction.



Reagents and conditions; (a) fuming nitric acid, CH₂Cl₂, -30 °C, 3 h.

ニトロ基は還元後、Sandmeyer 反応⁴²⁻⁴⁴⁾を用いることでハロゲンや他の置換基に変換が可能であるため、有用な合成中間体の置換基として使用できる。

しかし、本反応の位置選択性に関する知見が無いいため、Gaussian09⁴⁵⁾ (DFT-B3LYP/6-311G**) を用いて化合物 **76** および **82** の Highest occupied molecular orbital (HOMO) と部分電荷を解析した (Figure 5)。Figure 5 に示す解析結果より、アセチル化バニリン **76** は、2 位が最も部分電荷が低く軌道の広がりがあるため、反応が選択的に進行したと推測される。また、ベンジル化バニリン **82** は、5 位が最も電荷が低く軌道も存在するが、ベンジル基の立体障害によって 6 位に選択的に反応が進行したと推測した。この反応を用いてバニリン誘導体を合成後、HWE 反応により、FA 誘導体 **15**, **16**, **17**, **19**, **20**, **21** を合成した (Scheme 7-9)。また、バニリンのフェノール性ヒドロキシ基をピバロイル基 (Pv) **89** で保護すると、選択的に 6 位がヨード化されるため⁴⁶⁾、この方法用いてバニリン誘導体を合成し、HWE 反応により FA 誘導体 **18** に変換した (Scheme 8, 10)。

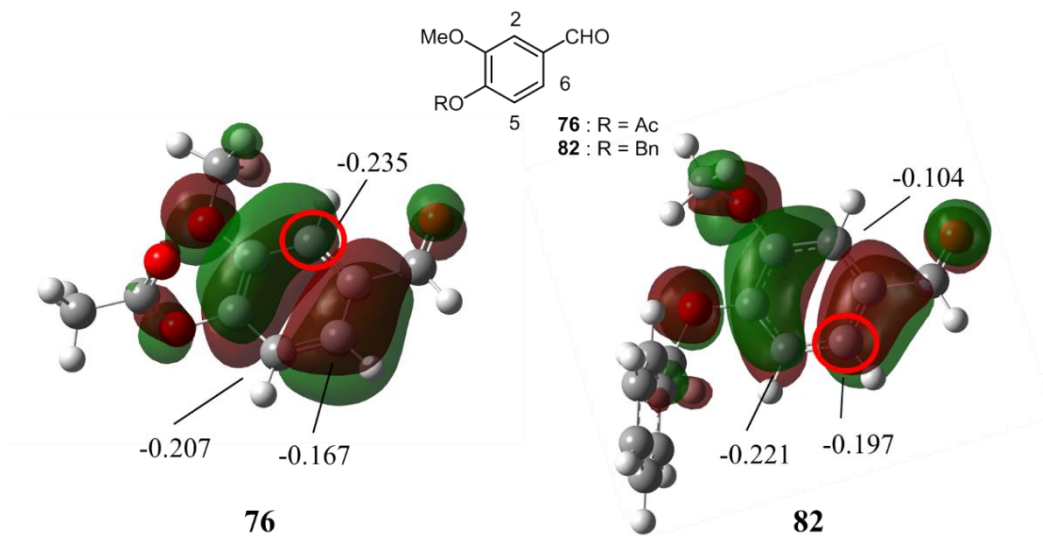
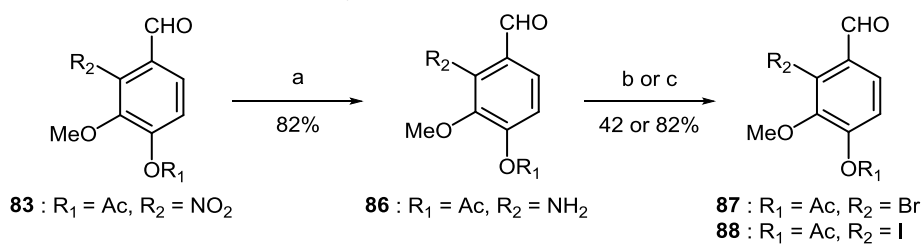


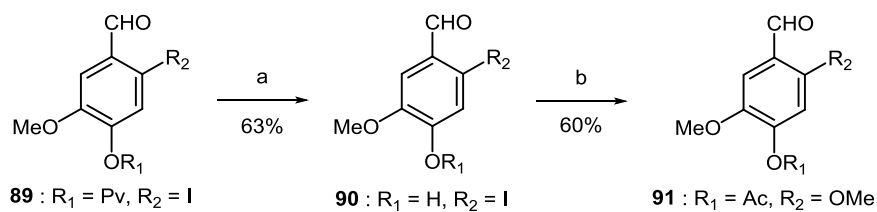
Figure 5. HOMO of **76** and **82**.

Scheme 7. Synthesis of 2-halovaniline acetate.



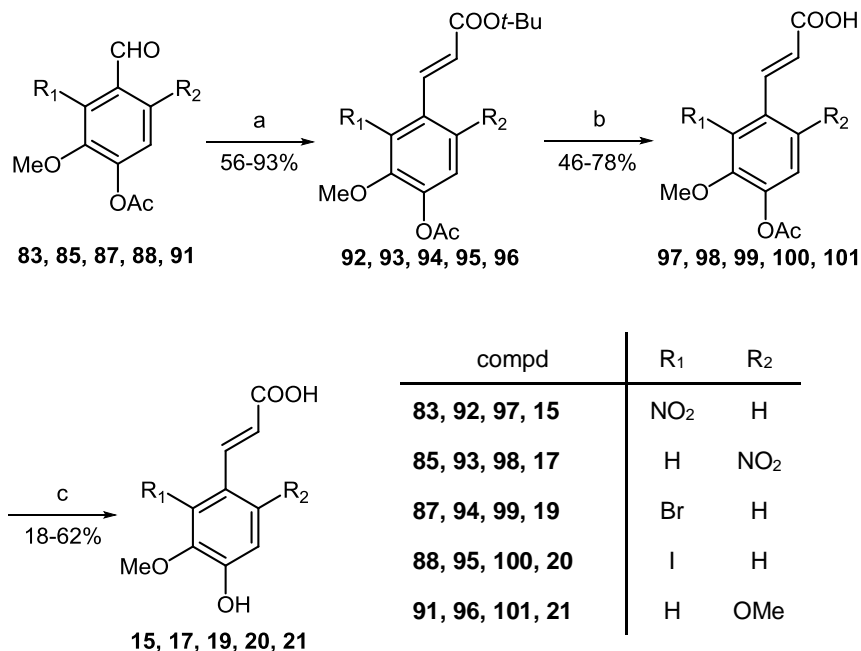
Reagents and conditions; (a) Fe, FeSO₄·H₂O, EtOH:H₂O = 3:1, 100 °C, 2 h; (b) NaNO₂, KBr, 20% HCl, 0 °C, 3 h; (c) NaNO₂, KI, 20% HCl, 0 °C, 3 h.

Scheme 8. Synthesis of 6-methoxyvaniline acetate.



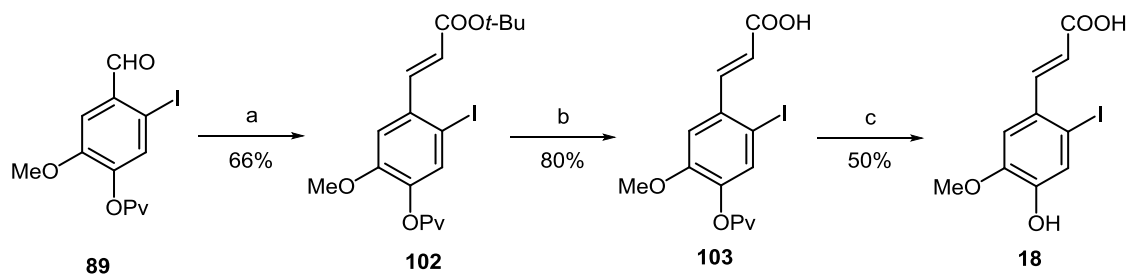
Reagents and conditions; (a) K₂CO₃, MeOH, 70 °C, 1 h; (b) CuCl₂, CH₃ONa, DMF, 100 °C, 2 h, Ac₂O, pyridine, room temperature, 3 h.

Scheme 9. Syntheses of FA derivatives **15**, **17**, **19**, **20**, **21**.



Reagents and conditions; (a) LiCl, DBU, (EtO)₂POCH₂CO₂*t*-Bu, 45 °C, then room temperature, 1 h; (b) TFA, room temperature, 3 h; (c) K₂CO₃, MeOH, room temperature, 3 h.

Scheme 10. Synthesis of FA derivative **18**.



Reagents and conditions; (a) LiCl, DBU, (EtO)₂POCH₂CO₂*t*-Bu, 45 °C, then room temperature, 1 h; (b) TFA, room temperature, 3 h; (c) K₂CO₃, MeOH, room temperature, 3 h.

第3節 芳香環上の置換基効果の検討

FA 誘導体は、matrix としてペプチドと混和させるために、アセトニトリルを用いて過飽和溶液を作製した。この溶液を Table 3 に示すペプチド混合物 (5 pmol/μL) と 1 μL:1 μL (1:1) で混和させて共結晶を形成したのち MALDI-TOFMS によって測定した。用いたペプチド混合物は、第1節より広範囲の質量数とし、酸塩性を示す等電点 (pI) も考慮して新たに選択して使用し、matrix の特徴をより詳しく検討できるようにした。芳香環に対する置換基効果を検討するため、官能基の種類と位置に着目し合成した FA 誘導体を matrix として用いた (Figure 6)。また、評価方法は、各々の誘導体を matrix として、測定試料の検出感度を示す S/N 比を比較することで評価した。

Table 3. Composition of peptide mixture.

Abbreviation	Peptide amino acid composition	MW	pI ^c
BDK (1-7) ^a	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro	756.8	9.75
ANG II ^a	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe	1046.1	6.74
SUB P ^b	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂	1347.6	11.05
IRL 1620 ^b	Suc-Asp-Glu-Glu-Ala-Val-Tyr-Phe-Ala-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp	1820.9	4.36
ACTH (18-39) ^a	Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe	2464.2	6.57
(PPG) ₁₀ ^b	(Pro-Pro-Gly) ₁₀	2530.8	6.47
Insulin B ^a	Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys(SO ₃ H)-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Cys(SO ₃ H)-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala	3495.9	4.88
CRF ^b	Ser-Gln-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Asp-Ile-Ala-NH ₂	4670.3	6.97

^aCommercial product from Sigma-Aldrich.: BDK (1-7), bradykinin 1-7; ANG II, angiotensin II; ACTH (18-39), acth fragment 18-39; Insulin B, insulin oxidized B chain. ^bCommercial product from Peptide Institute, Inc.: SUB P, substance P; IRL 1620, suc-[Glu⁹, Ala^{11, 15}]-Endothelin-1 (8-21); (PPG)₁₀, (Pro-Pro-Gly)₁₀·xH₂O; CRF, CRF (Ovine); Concentration of each peptide: 5 pmol/μL, in H₂O 0.1% TFA. ^cCalculation by <http://www.mhhe.com/physsci/chemistry/carey5e/Ch27/ch27-1-4-2.html>.

FA 誘導体のペプチドに対する検出感度を Table 4 に示す。S/N 比が 50 以上を示すペプチドは感度良好として **Very strong** と表記し、3 以下は感度不良として **None** で表記した。ペプチドに対する **Very strong** の数で誘導体の優劣を判定した。置換基効果を比較すると、2 位置換体はメトキシ基置換体 **5** > ブロモ基置換体 **19** > ヨード基置換体 **20** > ニトロ基置換体 **15**、5 位置換体はメトキシ基置換体 **1** > ブロモ基置換体 **8** > ニトロ基置換体 **16** > ヨード基置換体 **14**、6 位置換体はメトキシ基置換体 **21** > ブロモ基置換体 **9** > ヨード基置換体 **18** > ニトロ基置換体 **17** の順であった。メトキシ基置換体とブロモ基置換体は置換位置に関係なく、ヨード基置換体とニトロ基置換体より高いペプチドの検出感度を示した。メトキシ基置換体とブロモ基置換体の置換位置によるペプチド感度を比較すると、メトキシ基置換体は 6 位置換体 **21** > 5 位置換体 **1** > 2 位置換体 **5**、ブロモ基置換体は 5 位置換体 **8** > 6 位置換体 **9** > 2 位置換体 **19** の順を示した。置換位置の 5 位と 6 位の優劣は置換基ごとに異なるが、2 位が置換された誘導体はペプチドに対して低い感度を示した。そのため、FA の 2 位は **matrix** として不適切な置換位置であり、機能を向上させるには 5 位と 6 位に置換基を導入することが適切であることが明らかになった。

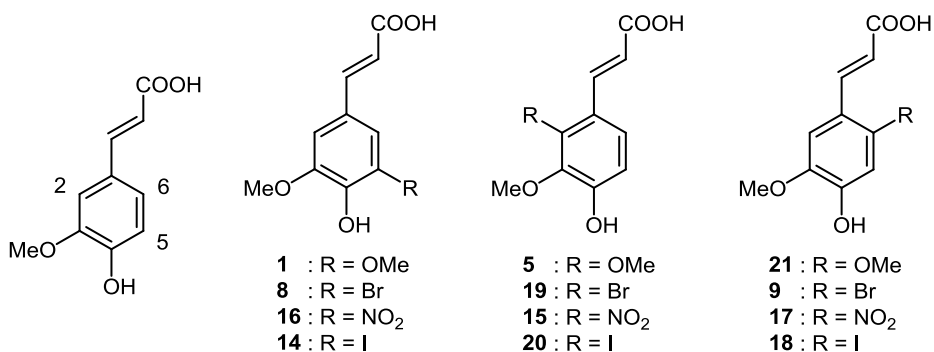


Figure 6. Chemical structures of FA derivatives.

Table 4. Comparison of S/N rate.

compd			BDK (1-7)	ANG II	SUB P	IRL 1620
substituent	position	derivatives				
OMe	2	5	Weak	None	None	Very strong
	5	1	None	None	None	Very strong
	6	21	Medium	Medium	Weak	Very strong
Br	2	19	Strong	Medium	Medium	Medium
	5	8	Weak	Weak	Weak	Weak
	6	9	Medium	Medium	Weak	Very strong
I	2	20	Medium	Weak	Weak	None
	5	14	Medium	Weak	Weak	Strong
	6	18	Strong	Medium	Weak	None
NO ₂	2	15	None	None	None	None
	5	16	Very strong	Strong	Strong	Strong
	6	17	Strong	Strong	Weak	Medium
compd			ACTH (18-39)	(PPG) ₁₀	Insulin B	CRF
substituent	position	derivatives				
OMe	2	5	Strong	Very strong	Very strong	Strong
	5	1	Strong	Very strong	Very strong	Very strong
	6	21	Strong	Very strong	Very strong	Very strong
Br	2	19	Medium	Medium	Medium	Strong
	5	8	None	Very strong	Very strong	Very strong
	6	9	Medium	Very strong	Strong	Very strong
I	2	20	None	Weak	Weak	Weak
	5	14	Weak	Strong	Weak	Strong
	6	18	Weak	Very strong	Weak	Weak
NO ₂	2	15	None	None	None	None
	5	16	None	Very strong	None	None
	6	17	None	Strong	None	Weak

None = Signal to Noise Ratio (S/N) ≤ 3 . Weak = S/N $3 < 10$. Medium = S/N $10 \leq 20$. Strong = S/N $20 < 50$. Very strong = S/N $50 \leq$.

メトキシ基置換体 **21** は、ペプチドを良好な感度で検出し、Very strong が多い。また、不良の None が少ないことから、MALDI-TOFMS の結果を CHCA と比較した。Figure 7 ではペプチドの分子イオンピークに質量数と S/N 比の値を表記している。S/N 比の比較において、10 倍以上の差があるペプチドの場合、赤が高く、青は低い関係を示している。**21** は、高分子ペプチドの CRF、Insulin B、(PPG)₁₀ を CHCA より感度良く検出した。また、最も顕著な感度の差を示したのは IRL 1620 であり、14 倍以上の良好な感度示した (Figure 7 A, B)。一方、ANG II、SUB P の検出感度を比較すると、10 倍以上、CHCA の方が良好であった (Figure 7 A, B)。CHCA より **21** が低感度を示した BDK (1-7)、ANG II、SUB P、ACTH (18-39) は、N 末端領域にアルギニンなどの塩基性アミノ酸が含まれていた。一方、**21** が CHCA より高感度を示した IRL 1620 は、N 末端領域にアスパラギン酸、グルタミン酸が含まれており、ペプチドの N 末端領域の違いにより異なる感度を示した。

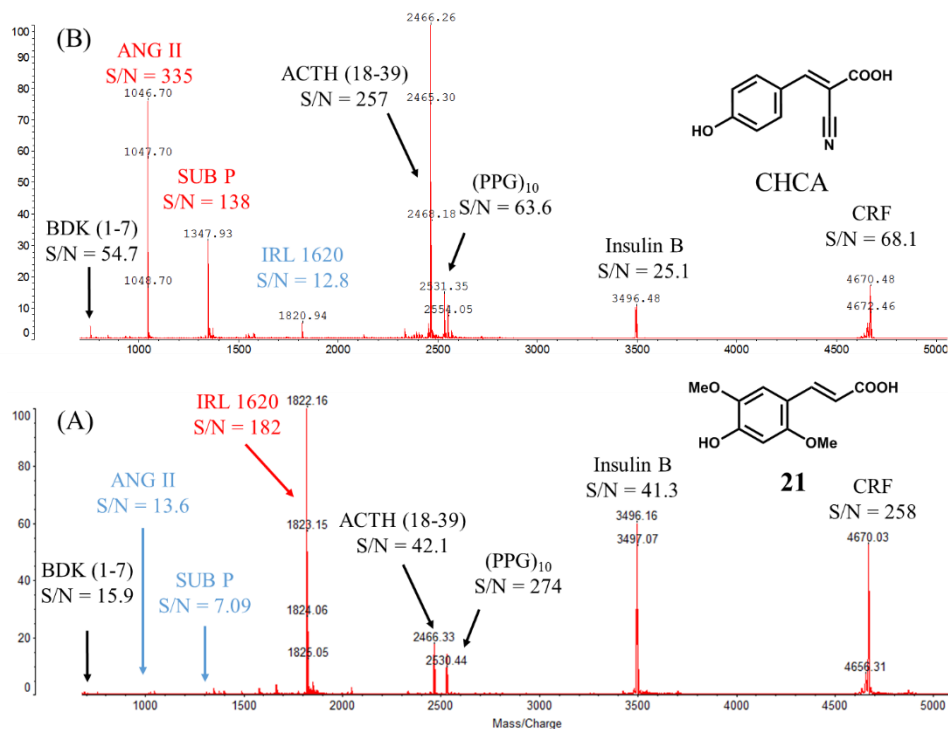


Figure 7. MALDI-TOFMS spectra of peptide mixture using (A) **21** and (B) CHCA.

その他の FA 誘導体のペプチドに対する検出感度の傾向は、誘導体 **15** を除き、(PPG)₁₀ を検出していたが、それ以上にペプチドの質量数やペプチドの酸塩基性などの物性に関する検出傾向を見出すことはできなかった。しかし、ブロモ基置換体 **9** はメトキシ基置換体 **21** とマススペクトルを比較すると、ACTH (18-39) に対する感度は劣るものの、類似したペプチドの検出傾向が見られた。メトキシ基置換体 **21** は、N 末端領域にアルギニンなどの塩基性アミノ酸が含まれている BDK (1-7)、ANG II、SUB P、が CHCA より感度が低下する傾向があり、ブロモ基置換体 **9** も同様の傾向が見られた (Figure 8 A, B)。また、IRL 1620 のように N 末端領域にアスパラギン酸、グルタミン酸が含まれるペプチドを CHCA より高感度で検出する傾向も示した (Figure 8 A, B)。

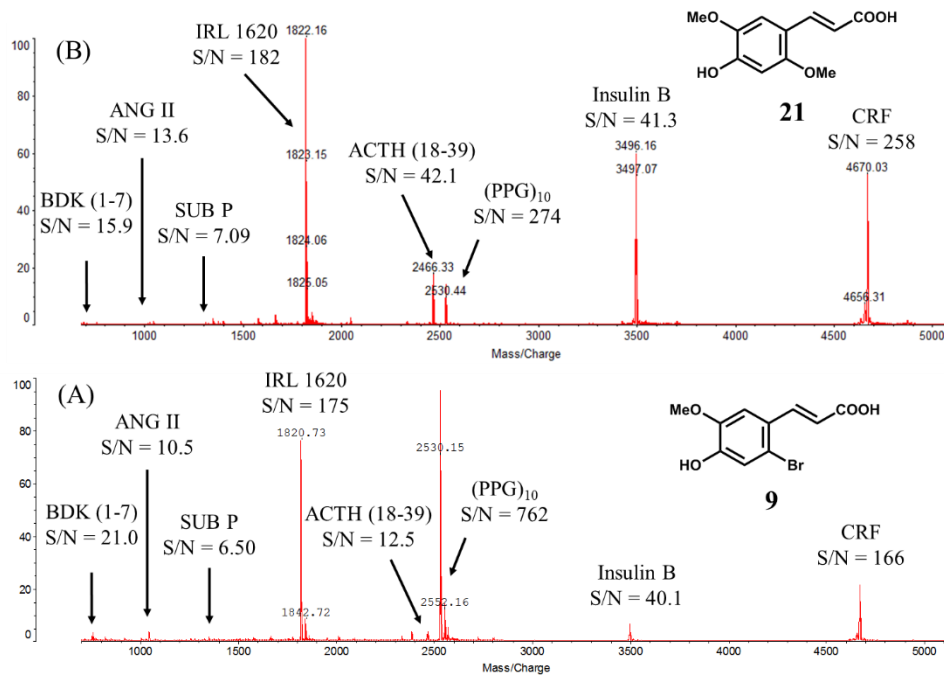


Figure 8. MALDI-TOFMS spectra of peptide mixture using (A) **9** and (B) **21**.

次に、Figure 6 に示す誘導体の MALDI-QIT-TOFMS によるフラグメントイオン生成に与える影響について、Table 3 のペプチド混合物を用いて検討した。FA 誘導体とペプチド混合物の調製は前述の方法でおこない、共結晶化させた。親イオンは、生成されるフラグメントイオンの強度を比較するため、誘導体 **15** を除く全ての誘導体が共通して検出可能なペプチドの (PPG)₁₀ を用いた。MS/MS 解析した結果、ブロモ基置換体 **9** は 19 mV のフラグメントイオンの強度を示したのに対して、メトキシ基置換体 **5**, **21** は、0.2 mV と 0.5 mV のフラグメントイオンの強度しか検出できないことから、ブロモ基置換体 **9** より劣る結果を示した (Figure 9 A, B, C)。その他の誘導体 **1**, **8**, **15**, **16**, **17**, **19** は、親イオンをフラグメント化ができず、フラグメントイオンを検出することができなかった。また、誘導体 **9** は DHB より検出したイオンの強度が良好であることから、MS/MS 解析に適していると考えられる。

MALDI-QIT-TOFMS によるフラグメントイオンの生成に与える影響を検討した結果、ブロモ基置換体 **9** が DHB より高い強度を示したのに対して、MALDI-TOFMS のペプチド測定において良好な感度を示したメトキシ基置換体 **21** は、フラグメントイオン強度が低かった。

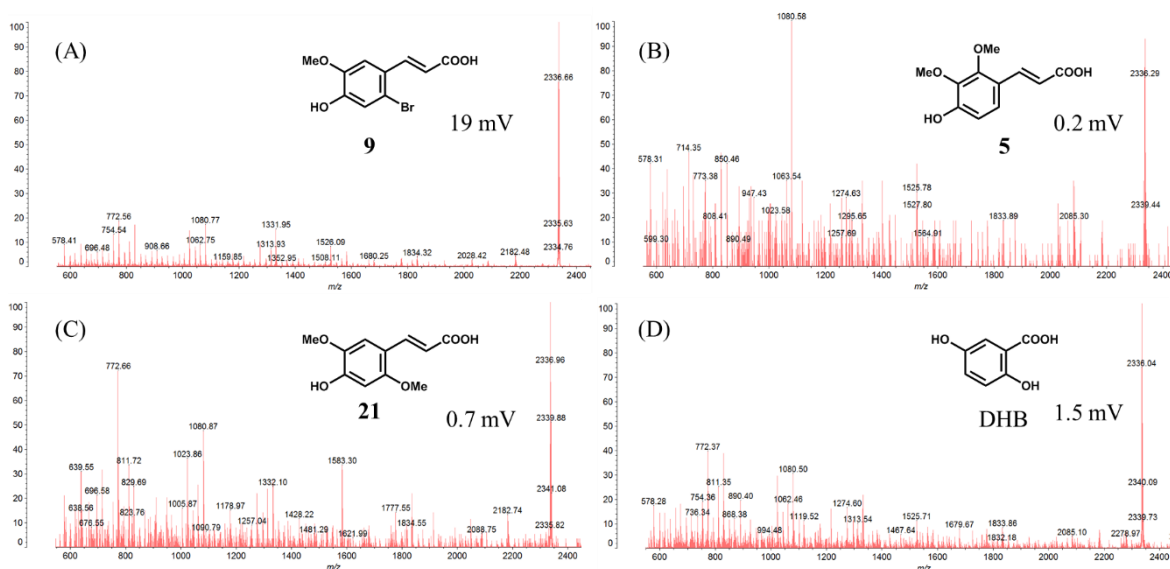


Figure 9. Comparison between (A) **9**, (B) **5**, (C) **21** and (D) DHB in MS/MS spectra.

第1章 小括

第1節では、14種類のFA誘導体を合成し、それらのMALDI-TOFMSにおけるペプチドのイオン化能とMALDI-QIT-TOFMSによるフラグメントイオンの生成能に与える影響について検討をおこなった。その結果、FA誘導体**1, 8, 9, 14**において、MALDI-TOFMSとMALDI-QIT-TOFMSにおいて得られる各々のマススペクトルが大きく異なるため官能基の種類と位置がmatrixの機能に重要であることが示された。

第2節および第3節では、FAの芳香環に対する置換基効果を詳細に検討するため、前節でイオン化を確認したメトキシ基およびハロゲンの他、ニトロ基の置換位置を考慮して誘導体を合成し、ペプチドの検出感度を示すS/N比を指標として評価をおこなった。MALDI-TOFMSの場合、置換基の種類はメトキシ基置換体 > ブロモ基置換体 > ヨード基置換体 > ニトロ基置換体の順にペプチドへの感度が高い傾向を示した。一方、置換位置を検討したところ、6位と5位は置換基の種類により感度の優劣が変化した。2位は共通して低い傾向を示した。次いで、MALDI-QIT-TOFMSによるペプチドのフラグメントイオンの強度を用いて各誘導体を評価した。その結果、MALDI-TOFMSで高い感度を示したメトキシ基置換体**21**では、フラグメントイオンの生成が一般的なmatrixであるDHBより低かったが、ブロモ基置換体**9**は極めて良好な値を示した。

以上の結果から、MALDI-TOFMSとQIT-TOFMSの両方の質量分析装置でペプチドの分子とフラグメントイオンを検出可能な誘導体として、6-ブロモフェルラ酸(6BFA)**(9)**を見出した。従来のMALDI-TOFMSとMALDI-QIT-TOFMSの質量分析は、質量分析装置毎に測定試料とmatrixを調製しなければならない。一方、6BFA**9**では同じ調製方法により両方の質量分析装置で分析が可能であり、一回の調製で済む。この特徴は、測定試料の消費量の軽減や簡便な実験操作につながり、よりハイスループットなプロテオーム解析を可能にする。そこで、第2章では6BFA**9**をmatrixとして、MALDIによるタンパク質の同定に応用した。

第2章 FA 誘導体の matrix としての評価

プロテオーム解析において、MALDI matrix の重要な役割はタンパク質の同定に有益なペプチドの分子イオンとフラグメントイオンを生成させることである。そこで、本章では bovine serum albumin (BSA) および transferrin (TF) のトリプシン処理した消化物を測定試料とし、PMF および MS/MS ion search に matrix によるタンパク質同定法に matrix として 6BFA 9 を応用し、評価をおこなった。

第1節 PMF 法における matrix としての FA 誘導体の評価

Matrix を評価するときに用いられる代表的なタンパク質である BSA と TF を常法に従いトリプシン処理し⁴⁷⁾、生じた消化物を用いて 6BFA 9 の PMF 法におけるタンパク質同定能を代表的な matrix と比較して評価した。PMF 法は既知タンパク質をプロテアーゼにより処理し、生成するペプチドの質量数の理論値とマススペクトルの実測値を比較する方法であり、一致した質量数は同じアミノ酸配列を持つペプチドと判断される。そのため、PMF 法では理論値と同じ質量数のペプチドを数多く検出し、測定試料のアミノ酸配列を明らかにした割合を増やすことがタンパク質を同定するために必要である。最終的に解析結果は、スコアの値で表され、タンパク質の処理方法や検索条件で決定される閾値を超えた場合に、タンパク質の同定が可能である。

PMF 法の検索条件から、閾値は BSA が 76、TF は 76 である。PMF 法で汎用されている matrix の CHCA では BSA と TF のスコアは 100 と 144 を示した。一方、6BFA 9 では BSA と TF のスコアは 120 と 144 を示し、CHCA と同等かそれ以上のスコア結果を示した。CHCA と 6BFA 9 の BSA を解析したマススペクトルを比較すると、ペプチド断片の感度に違いを確認した (Figure 10)。図中において、スペクトル上の数値が記載されているピークはタン

パク質の同定に有効なペプチドであり、*印をつけたピークは同定に役立たなかった未知ペプチドである。6BFA 9 は、CHCA と比べ m/z 1567.0 の感度が良好であった (Figure 10 A)。このペプチドは BSA のアミノ酸配列 347-359 (DAFLGSFLYEYSR) の断片であり、N 末端にアスパラギン酸 D を含むことから、N 末端領域に酸性アミノ酸を含むペプチドに感度が良好な 6BFA 9 の傾向を反映していた。また、6BFA 9 では CHCA が検出できなかった m/z 1889.1 (アミノ配列 89-105, SLHTLFGDELCKVASLR) を検出することができた (Figure 10 A)。このピークは、N 末端領域にアスパラギン酸 D とグルタミン酸 E を含んでいたために検出されたものと思われる。

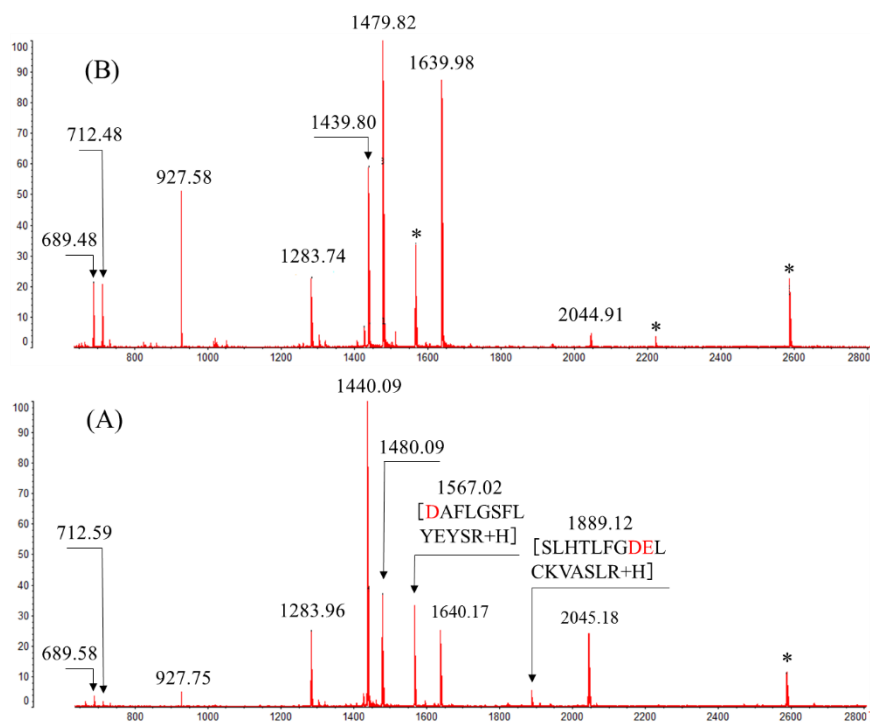


Figure 10. MALDI-TOFMS spectra from tryptic digest of BSA using (A) 6BFA 9 and (B) CHCA.

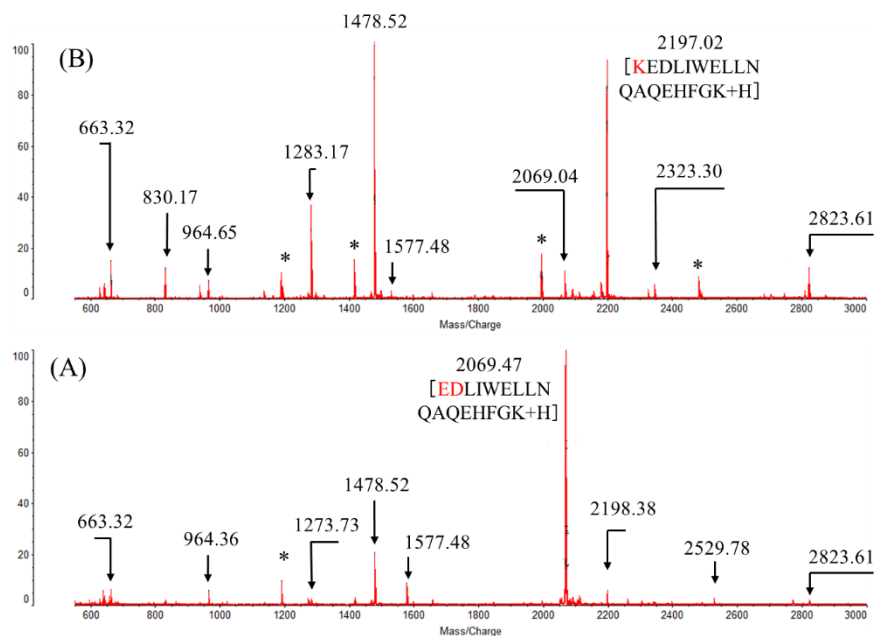


Figure 11. MALDI-TOFMS spectra from tryptic digest of TF using (A) 6BFA **9** and (B) CHCA.

TF の場合には、6BFA **9** と CHCA のスコアの値は同じ値を示したが、強度が逆転しているピークが存在した (Figure 11 A, B)。6BFA **9** は、 m/z 2069.5 (アミノ酸配列 235-251, EDLIWELLNQAQEHFGK) の感度が良く、これまでの傾向と同じく、N 末端領域に酸性アミノ酸が含まれている (Figure 11 A)。CHCA は、 m/z 2197.0 の強度が高く m/z 2069.5 は低い強度を示した (Figure 11 B)。 m/z 2197.0 は、データベース検索により、理論値の質量数と一致しない未知ピークであることが明らかになった。このピークのアミノ酸配列を調べるため MS/MS 解析をおこなった結果、 m/z 2069.0 のフラグメントイオンが検出され、親イオンとの質量数の差はリジン K の質量数に対応した。この結果から、 m/z 2197.0 はトリプシン消化がリジンの C 末端側ではなく N 末端側で起こり、 m/z 2070.0 にリジンが結合した誤消化されたペプチド (アミノ酸配列 234-251, KEDLIWELLNQAQEHFGK) と判断した。そのため、 m/z 2070.0 のピークと比較すると、N 末端側にも塩基性アミノ酸のリジンが存在し、CHCA は 6BFA **9** より m/z 2197.0 のピークを高く検出したと思われる。総合的には 6BFA **9** のスコアは CHCA と遜色のないスコア値であるため、PMF 法に応用できることが明らかになった。また、CHCA とペプチドの検出感度を比較すると、 m/z 2069.5 と m/z 2197.0 の塩基性アミノ

酸のリジン 1 個の違いによりピークのイオン強度が大きく変化している。この結果は **6BFA 9** のペプチド感度が N 末端側のアミノ酸配列に影響されることを示している⁴⁸⁾。

第 2 節 MS/MS ion search における matrix としての評価

MS/MS ion search は高感度質量分析装置による MS/MS 解析とデータベース解析によってタンパク質を同定する技術であり、フラグメントイオンの質量数の理論値と実測値を比較し、アミノ酸配列の予測によるスコア評価によりおこなわれる。理論値は、アミノ酸配列の予測が容易なペプチド結合の開裂によるフラグメントイオンに基づいて計算される。そのため、ペプチド結合の開裂由来のフラグメントイオンを多く検出するとアミノ酸配列の予測が正確となり、信頼度の高いタンパク質同定結果が得られる。ペプチド結合の開裂によるフラグメントイオンは、N 末端側のイオンを *b* イオン、C 末端側を *y* イオンと呼び MS/MS ion search のタンパク質同定では重要視されている。

これまでに、**6BFA 9** はペプチド混合物のフラグメントイオンに関して高い強度を与えている。一般的に MS/MS 解析は分解物によるノイズピークが多く、フラグメントイオンピークと区別するためにイオンの強度が高いことは有利である。しかし、データベース解析に基づくタンパク質同定の MS/MS ion search では、*b* イオン、*y* イオンによるアミノ酸配列の予測結果が同定の精度に大きな影響を与える。そこで、**6BFA 9** の matrix として MS/MS ion search におけるタンパク質同定の有用性を確かめるために、PMF 法と同様、BSA と TF の消化物を用いて、*b* イオンと *y* イオンの検出を DHB と比較検討した。

BSA と TF を用いて、MALDI-QIT-TOFMS の代表的な matrix である DHB と 6BFA 9 の MS/MS ion search の同定結果をスコア値で比較し、評価した。BSA の場合、MS/MS 解析は DHB と 6BFA 9 で共通して検出された m/z 2044.5 を親イオンとしておこなった。MS/MS ion search のデータベース検索条件により、BSA を同定するための閾値は、6BFA 9 がスコア 49、DHB がスコア 47 以上である。検索結果より、6BFA 9 はスコア 49 が得られ BSA を同定したが、DHB はスコア 25 のため同定することはできなかった。6BFA 9 が高いスコア値を与えた理由として、DHB と比べてより多くの b イオン、 y イオンを生成した結果、アミノ酸配列の解析が容易になり、スコアが向上したと考えられる (Figure 12 A, B)。

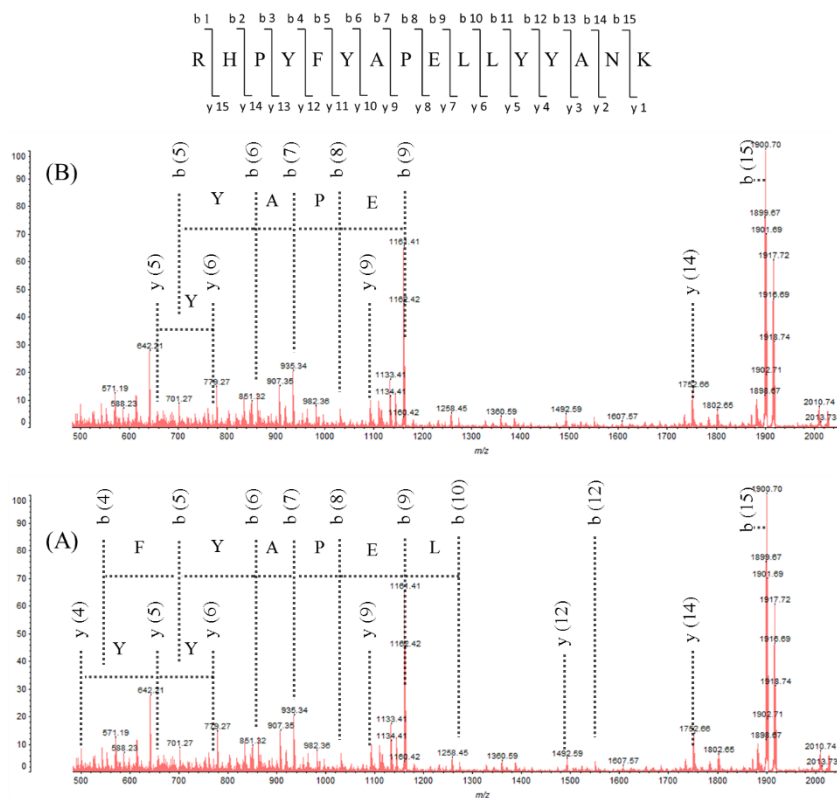


Figure 12. MS/MS spectra of tryptic digest of BSA using (A) 6BFA 9 and (B) DHB.

TF の場合、 m/z 2070.1 を親イオンとして選択し解析した結果、6BFA **9** はスコア 89 で TF を同定した。6BFA **9** による MS/MS ion search の検索条件では、TF を同定するための閾値は 43 であるため、6BFA **9** は高い精度で TF を同定できることが明らかになった。一方、DHB はスコア 40 であり、検索条件により閾値が 35 のため、同定は可能だが、その精度は 6BFA **9** より低い。両者の MALDI-QIT-TOFMS スペクトルを比較すると、BSA と同様、6BFA **9** は DHB と比べて b イオン、 y イオンが多く、アミノ酸配列の解析が容易になり、スコアが向上したと思われる (Figure 13 A, B)。

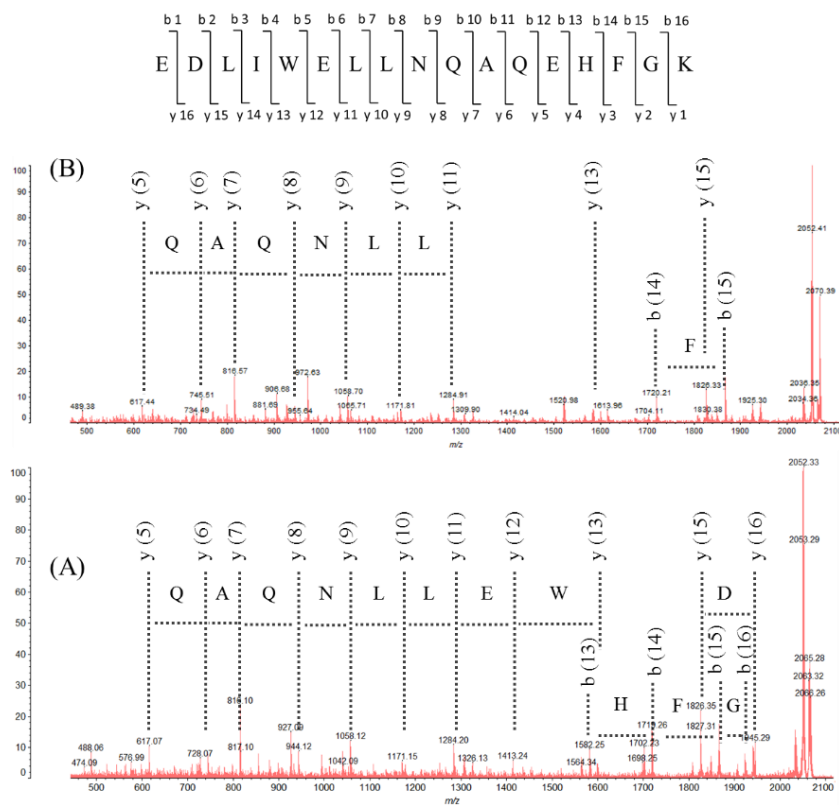


Figure 13. MS/MS spectra of tryptic digest of TF using (A) 6BFA **9** and (B) DHB.

第3節 Matrix としての FA 誘導体の構造最適化に向けた検討

これまでに、FA の芳香環上の置換基効果の評価により MALDI-TOFMS と MALDI-QIT-TOFMS の両質量分析装置でタンパク質の同定が可能な誘導体を探索した。その結果、6BFA **9** が代表的な matrix と遜色ないスコア結果を示すことが明らかとなった。誘導体の化学合成による網羅的な探索により 6BFA **9** を見出したが、CHCA と比較して N 末端側の塩基性アミノ酸を含むペプチドに対して感度が低いという問題点も残っており、万能な matrix とは言えない。そこで、ペプチドに対する感度の改善を目的として誘導体を分子設計し、6BFA **9** を基本骨格として、詳細に構造と matrix の機能の相関性を明らかにする検討をおこなった。

これまで、既存の Matrix の化学構造と測定試料のイオン化機構に関して、僅かながら研究されている⁴⁹⁾。SA と FA の化学構造に関して、フェノール性ヒドロキシ基はラジカルカチオンを経由してプロトンを供給すると報告されているが⁵⁰⁾、ペプチドの検出感度との関連性は不明である。そこで、6BFA **9** の置換基とペプチドの検出感度について検討した。最初に、6BFA **9** のフェノール性ヒドロキシ基とメトキシ基の置換基効果の評価するため、誘導体 **22-25** (Figure 14) を合成した。

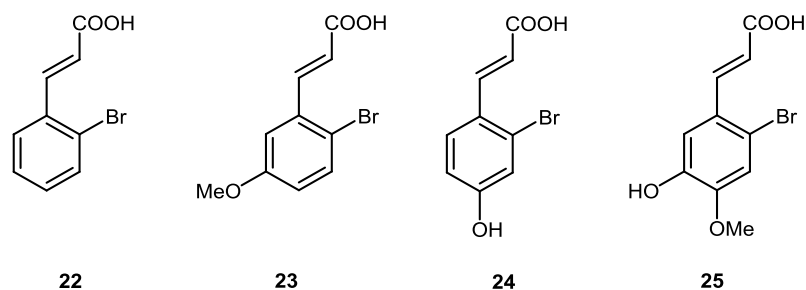
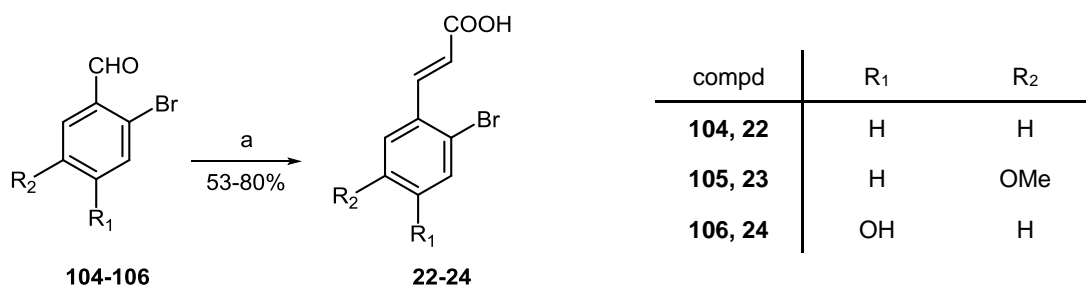


Figure 14. Chemical structures of FA derivatives **22-25**.

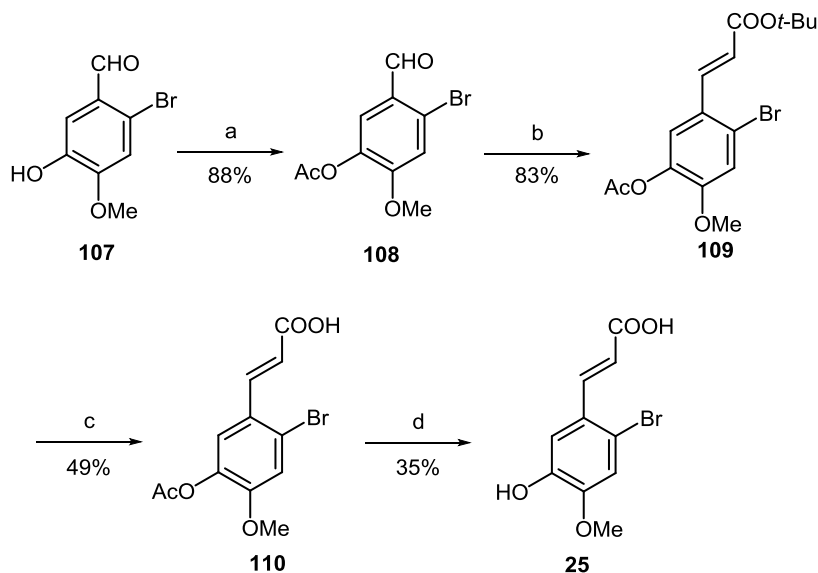
誘導体 **22-24** は既知化合物であり、Knoevenagel 反応を用いて合成した (Scheme 11)。新規化合物の誘導体 **25** は、バニリン誘導体 **109** を出発原料として HWE 反応を用いて合成した (Scheme 12)。

Scheme 11. Synthesis of FA derivatives **22-24** using Knoevenagel reaction.



Reagents and conditions; (a) malonic acid, piperidine, pyridine, reflux 24 h.

Scheme 12. Synthesis of FA derivative **25**.



Reagents and conditions; (a) Ac₂O, pyridine, room temperature, 3 h; (b) LiCl, DBU, (EtO)₂POCH₂CO₂t-Bu, 45 °C then room temperature, 1 h; (c) TFA, room temperature, 3 h; (d) K₂CO₃, MeOH, room temperature, 3 h.

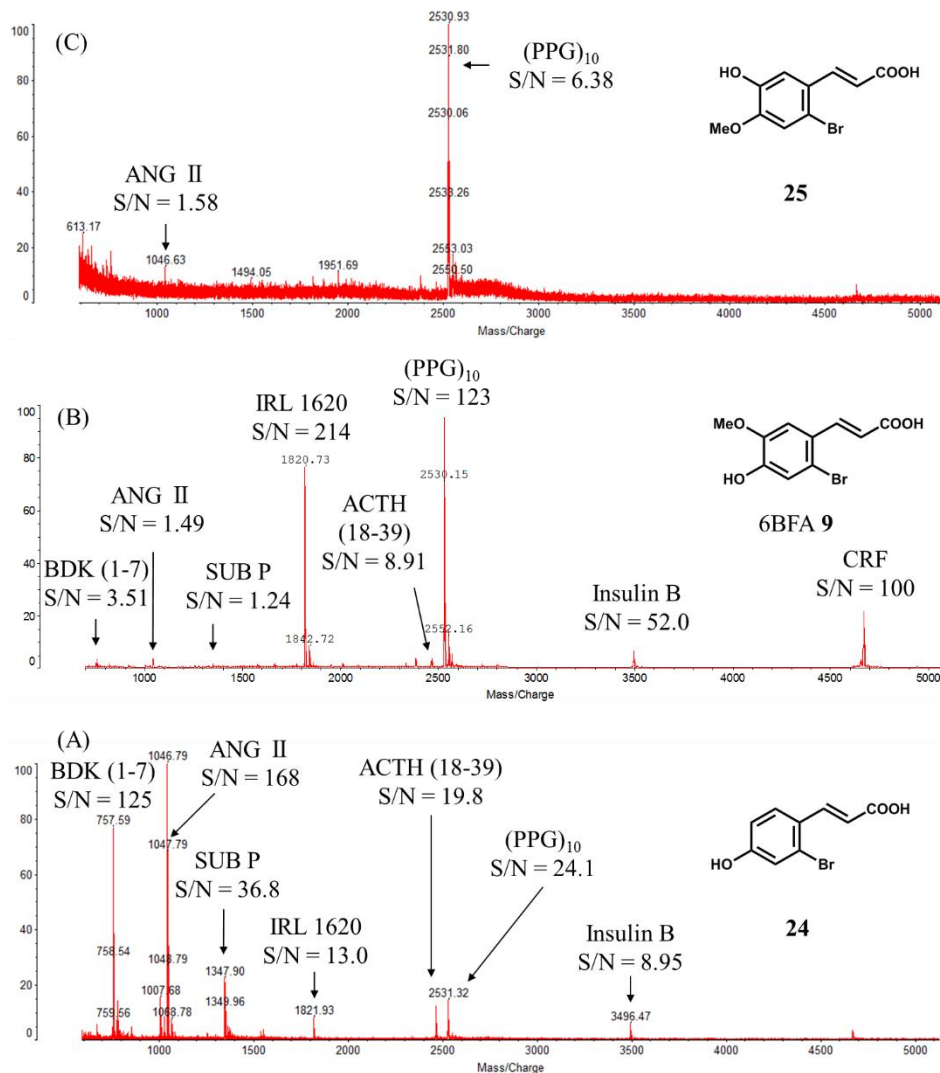


Figure 15. MALDI-TOFMS spectra of peptide mix using (A) **24**, (B) **6BFA 9** and (C) **25**.

合成した誘導體 **22-25** はアセトニトリルを用いて溶液を作製後、matrix として ACTH (18-37) のイオン化試験により測定条件を検討した。その結果、**22, 23** は ACTH (18-37) をイオン化できず、イオン化能力が低いと言える。誘導體 **22, 23** は共通してフェノール性ヒドロキシ基が無いことから、FA 誘導體を matrix とする場合にヒドロキシ基の役割が重要であると考えられる。**24, 25** については Table 3 のペプチド混合物を用いて置換基とペプチドの検出感度の関連性について検討した。**24** は **22, 23** と異なり、ペプチドのイオン化が確認できた (Figure 15 A)。また、メトキシ基が含まれる **6BFA 9** と比較すると高分子ペプチドの CRF、Insulin B と (PPG)₁₀ の感度は低下したが、低分子ペプチドの BDK (1-7)、ANG II と SUB P

は向上した (Figure 15 A, B)。そのため、メトキシ基はペプチドのイオン化に必須である官能基ではないが、測定可能なペプチドの質量範囲に影響を与えることが示唆された。また、**25** は **6BFA 9** と比較するとフェノール性ヒドロキシ基の位置が異なることで、イオン化能が大きく劣るため、フェノール性ヒドロキシ基の置換位置が **matrix** として重要であることが明らかとなった (Figure 15 B, C)。

次に、 α,β -不飽和カルボン酸の官能基としての役割を明らかにするため、**6BFA 9** の二重結合とカルボキシ基を変更した誘導体 **26-30** を合成した (Figure 16, Scheme 13-16)。

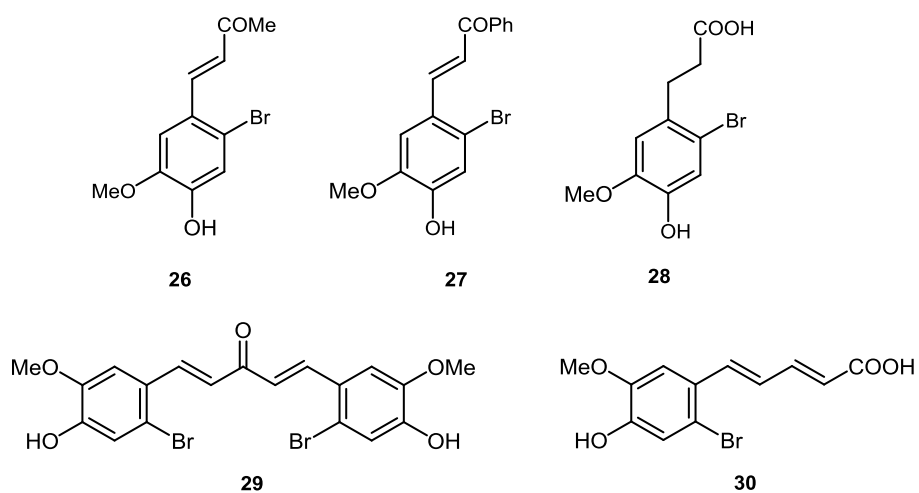
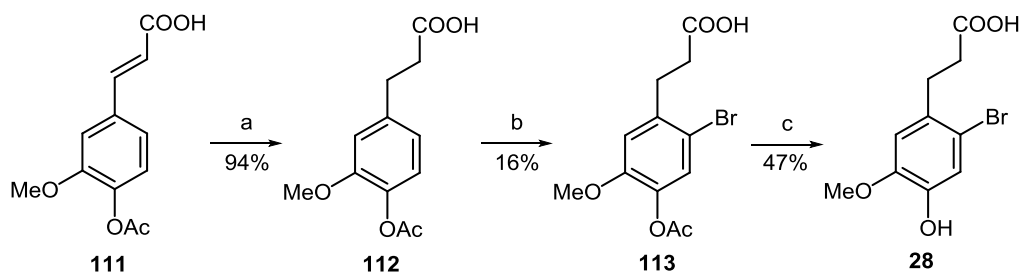


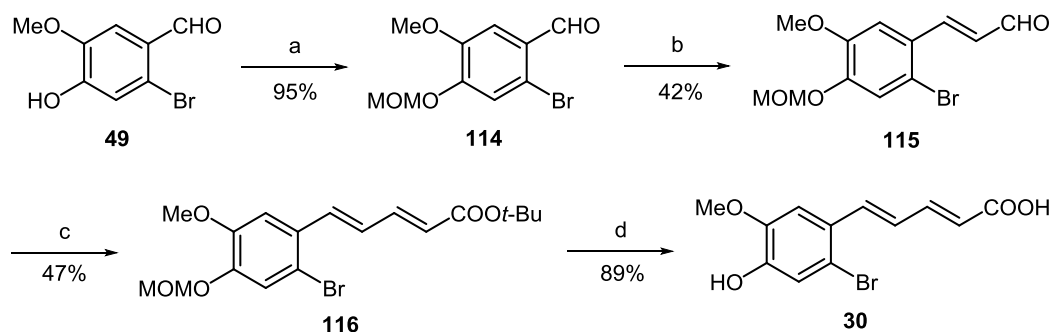
Figure 16. Chemical structures of FA derivatives **26-30**.

Scheme 13. Synthesis of FA derivative **28**.



Reagents and conditions; (a) H₂, Pd/C, EtOAc, room temperature, 3 h; (b) Br₂, AcOH, room temperature, 1 h; (c) K₂CO₃, MeOH, room temperature, 2 h.

Scheme 14. Synthesis of FA derivative **30**.



Reagents and conditions; (a) MOMCl, DIPEA, dry CH₂Cl₂, room temperature, 3 h; (b) (Ph)₃P=CHCHO, toluene, 85 °C, 1 h; (c) LiCl, DBU, (EtO)₂POCH₂CO₂*t*-Bu, 45 °C, then room temperature, 1 h; (d) TFA, room temperature, 3 h.

6BFA **9** の α,β -不飽和カルボン酸の二重結合部分の効果を確かめるため、共役系を1つ増やした **30** と二重結合を還元した **28** のペプチドイオン化能を Table 3 のペプチドを用いて検討した。その結果、**30** は僅かながらペプチドのイオン化が確認できたが、**28** はペプチドをイオン化することができなかった (Figure 17 A, B, C)。このことから、FA の構造において二重結合はイオン化に必要であり、数は1つが最適であることが明らかとなった。

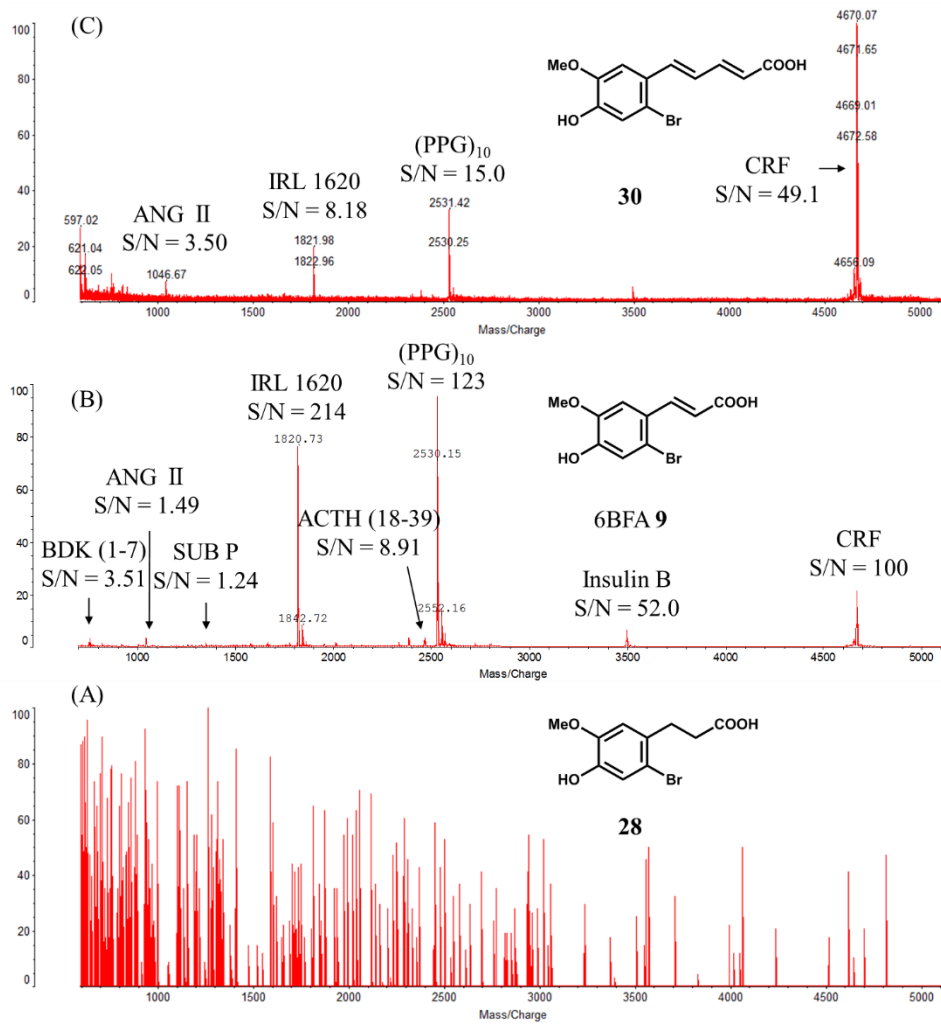
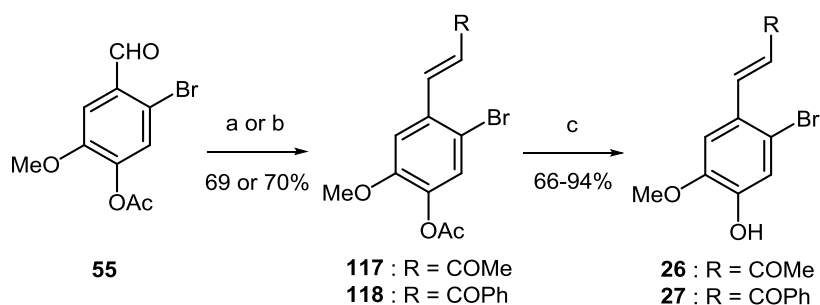


Figure 17. MALDI-TOFMS spectra of peptide mix using (A) **28**, (B) **6BFA 9** and (C) **30**.

次にカルボキシ基の効果について検討をおこなった。これまでの報告において、カルボキシ基はプロトン供給源として代表的な matrix にはすべて含まれている。しかしながら、SA のメチルエステル体ではペプチドのイオン化能が確認された報告があり⁴⁹⁾、カルボキシ基が必須構造であるかは明らかではない。そこで、ケトン体 **26** を合成し、ペプチドのイオン化試験をおこなった (Scheme 15)。その結果、**26** では 6BFA **9** と比較して大幅にペプチドのイオン化能が改善された (Figure 16 B, 17 A)。6BFA **9** では感度の低い BDK (1-7)、ANG II と SUB P のペプチドにおいても S/N 比が 45 を超え、良好な感度を示した (Figure 18 A)。

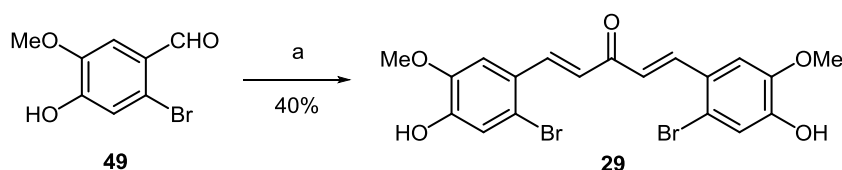
Scheme 15. Syntheses of FA derivatives **26**, **27**.



Reagents and conditions; (a) LiCl, DBU, (EtO)₂POCH₂COCH₃, 45 °C then room temperature, 1 h; (b) LiCl, DBU, (EtO)₂POCH₂COPh, 45 °C, then room temperature, 1 h; (c) K₂CO₃, MeOH, room temperature, 1 h.

さらに、ケトン構造の効果を確認するためフェニルケトン体 **27** を合成した (Scheme 15)。

Scheme 16. Synthesis of FA derivatives **29** using Aldol reaction.



Reagents and conditions; (a) acetone, c. HCl, EtOH, 70 °C, 20 h.

また、6BFA **9** の芳香環部分から二重結合までの機能を確認するため、誘導體 **29** をアルドール反応により 1 工程で合成し⁵¹⁾、イオン化試験をおこなった (Scheme 16)。

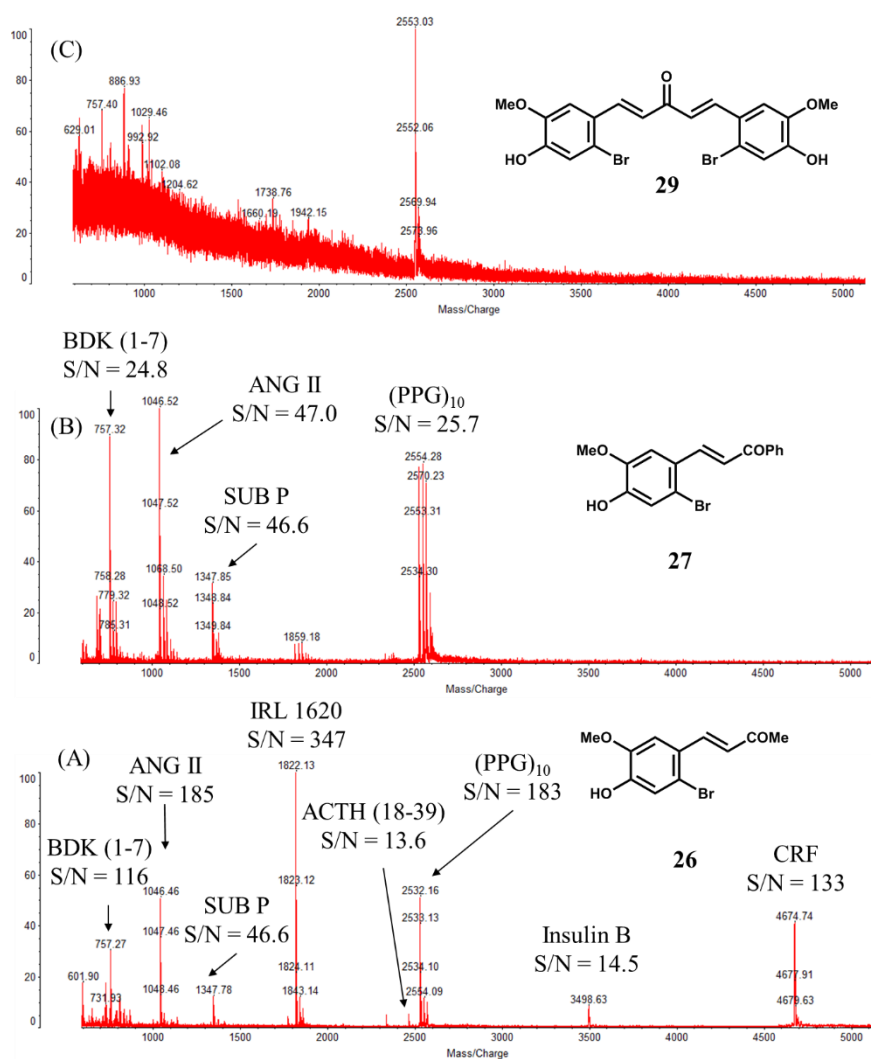


Figure 18. MALDI-TOFMS spectra of peptide mix using (A) **26**, (B) **27** and (C) **29**.

その結果、**27** では、ペプチドのイオン化を僅かに確認できたが、検出可能なピーク数が少なく、matrix の機能としては大きく低下した (Figure 18 B)。また、**29** は **29** 由来のイオンが多く、ペプチドの分子イオンを検出することはできなかった (Figure 18 C)。

ケトン構造を有する誘導体 **26-29** は、**26** 以外に **6BFA 9** より良好なペプチドの検出感度を示すことはできなかった。これまでに、カルボキシ基が無い化合物を matrix に応用させた例に、クルクミンが報告されている⁵²⁾。クルクミンのカルボニル基は、ケト型とエノール型に相互変換が可能で、エノール型の時にプロトン供給源として働いていると考えられている。**26** は、今回合成したケトン構造を有する誘導体の中で、唯一エノールへの相互異性が

可能であり、NMR 上でもエノールのプロトンも確認されている。そのため、ペプチドの検出感度との関連性は不明だが、**26** はエノール型によるプロトン供給が可能な化学構造のため、イオン化が可能であると考えている。

以上の結果より、matrix としての FA 誘導体の化学構造の特徴は、**6BFA 9** と **28, 30** のペプチドのイオン化試験の比較から、二重結合は必須であり、その数は 1 個が適切であることが明らかとなった。また、**22-25** の結果から、フェノール性ヒドロキシ基もペプチドのイオン化に必須であり、二重結合に対して 4 位置換体の強度が大幅に高くなるため、置換位置も重要であることが明らかとなった。

今回、新たに合成したケトン体 **26** は、**6BFA 9** と比較して、N 末端に塩基性アミノ酸を含むペプチドに対して感度が良好であった。そこで、TF の PMF 法と MS/MS ion search によるタンパク質同定に応用した。しかしながら、**26** は PMF 法による TF のタンパク質同定はできなかった (Figure 19)。これは、**6BFA 9** と比較して、ペプチドの検出数が少なくタンパク質の一次構造を解析することができなかったことが原因である。また、MS/MS ion search においても、TF を同定タンパク質の候補として挙げることはできたが、フラグメント数が少なく完全な同定までには至らなかった (Figure 20)。**26** は合成ペプチドのイオン化試験では良好な結果を示したが、タンパク質の消化物では感度が低下した。MALDI matrix は、測定試料の純度により感度が増減するため、測定試料の調整方法が検討されている⁵³⁾。ペプチドのイオン化試験は高純度の市販のペプチドをそのまま使用しているが、TF はトリプシン処理の過程を経ているため、ペプチド試験と比べれば純度が低下していると考えられる。そのため、カルボキシ基は、プロトン供給源の働きだけでなく、夾雑物の許容性にも影響を与えていると考えられる。

6BFA 9 の構造と機能の相関性を明らかにすることによって、**6BFA 9** よりタンパク質同定に優れた誘導体の合成を試みたが、これを超える誘導体を見出すことはできなかった。

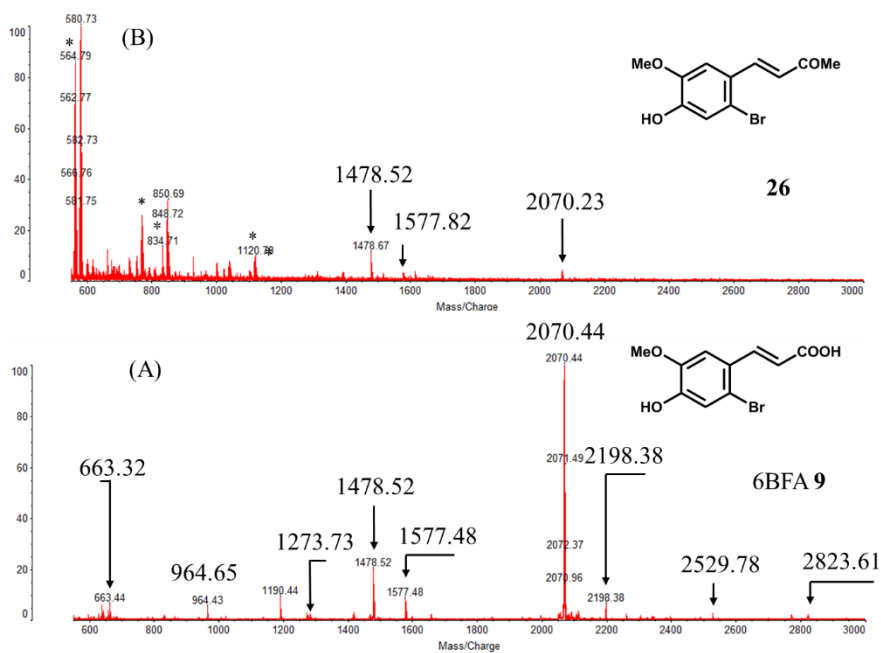


Figure 19. MALDI-TOFMS spectra from tryptic digest of TF using (A) 6BFA 9 and (B) 26.

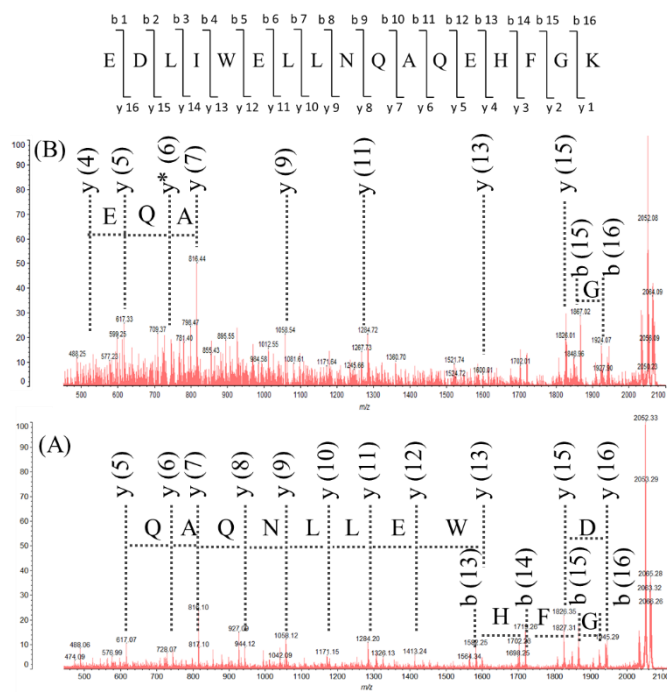


Figure 20. MALDI-QIT-TOFMS spectra from tryptic digest of TF using (A) 6BFA 9 and (B) 26.

第2章 小括

第1章より、**6BFA 9**はMALDI-TOFMSとMALDI-QIT-TOFMSの両方の質量分析装置でペプチド由来のイオンを検出できるmatrixであることが明らかとなった。そこで、第2章では、**6BFA 9**をPMF法およびMS/MS ion searchによるタンパク質同定に応用した。

第1節では、MALDI-TOFMSのタンパク質同定法であるPMF法に**6BFA 9**を応用し、PMF法に汎用されているCHCAと比較検討した。測定試料には、matrixの評価に汎用されているBSAとTFをトリプシン処理したペプチド混合物を用いた。その結果、**6BFA 9**はタンパク質同定の精度を示すスコア評価においてCHCAと遜色ない値でBSAとTFを同定し、PMF法に応用できることを明らかにした⁴⁸⁾。

第2節では、MALDI-QIT-TOFMSのMS/MS ion searchによるタンパク質同定に**6BFA 9**を応用し、BSAとTFのスコア値をDHBと比較した。その結果、**6BFA 9**はDHBと比較してアミノ酸配列の解析に有効な*b*, *y*フラグメントイオンを多数検出し、**6BFA 9**を用いたスコアはDHBを用いた場合より良好な値を示した。

第3節は、matrixの機能向上を目的として**6BFA 9**に含まれる官能基であるフェノール性ヒドロキシ基、メトキシ基、二重結合、およびカルボキシ基の効果を検討した。その結果、matrixとしては、ペプチドのイオン化に1個の二重結合、4位のヒドロキシ基が必須であり、基本骨格としてFAが優れていることを明らかにした。また、ケトン体**26**, **27**, **29**の結果から、ケトン構造はエノール化が可能な場合に限り、ペプチドをイオン化できることが明らかになった。一方、ペプチドのイオン化試験において比較すると、純度の低いタンパク質のトリプシン消化物を測定した場合に感度が低下した。結果的に、**6BFA 9**を母核とし、**6BFA 9**より優れたタンパク質の同定能力を持つ誘導体を探索したが、見出すことはできなかった。

以上より、**6BFA 9**がFA誘導体のうちでPMF法とMS/MS ion searchによるタンパク質同定に優れた能力を持つ化合物であると判断し、次章において実際のプロテオーム解析に応用した。

第3章 FA 誘導体のプロテオーム解析への応用

第1節 MS/MS ion search によるプロテオーム解析への応用

前章において、6BFA 9 は PMF 法と MS/MS ion search の両方において、タンパク質同定に
応用可能な matrix であることを明らかにした。特に MALDI-QIT-TOFMS のフラグメントイ
オンの検出数と強度が良好なため、アミノ酸配列の解析が容易であり、MS/MS ion search に
よるタンパク質同定に優れていた。同じケイヒ酸構造を持つ代表的 matrix である CHCA と
SA では、QIT によるペプチドのフラグメントイオンの生成が困難であることから、この特
徴は matrix として有利な点であると言える。しかし、これまでの評価では、6BFA 9 の matrix
としての特徴を探索するため、高純度の市販のペプチドおよびタンパク質が用いられている。
そのため、実際のプロテオーム解析に対する matrix としての実用性は明らかでない。そこ
で、6BFA 9 を matrix として、ラット副腎のプロテオーム解析に応用し、タンパク質同定能
を DHB と比較検討した。

ラット副腎の組織中に含まれているタンパク質を抽出後、二次元電気泳動で分離したタン
パク質の中で同定に用いたスポットを S1-S8 で表記した (Figure 21)。これらのスポットは、
トリプシン処理により生成したペプチド混合物を測定試料とし、matrix として DHB と 6BFA
9 を用いて MALDI-QIT-TOFMS による MS/MS をおこなった。MS/MS は、DHB と 6BFA 9
のフラグメントイオンを比較するため、できるだけ共通に検出した親イオンを選択した。
MS/MS に基づいた MS/MS ion search の結果、DHB は S2、S3 のタンパク質を同定できな
かったのに対し、6BFA 9 は Figure 21 に示したタンパク質 S1-8 を同定または候補を一つに絞
ることに成功した。この結果から 6BFA 9 は MS/MS ion search の matrix として実際のプロテ
オーム解析に応用できることが明らかになった。特に S3 と S7 の解析結果が、6BFA 9 と DHB
では大きく異なるため、詳細な結果を示す。

S7のタンパク質は、 m/z 2586.5を共通の親イオンとして、DHBと6BFA 9を用いてMS/MSをおこなった。MS/MS ion searchのタンパク質同定結果は、DHBと6BFA 9がスコア18と54の値でTFを示した。スコアの値は14以上で候補タンパク質との関連性が強く、33以上で同定される。DHBと6BFA 9のフラグメントイオンを比較した場合、6BFA 9はDHBより多くの解析に有用な**b**イオンと**y**イオンを検出したため、スコアが向上したものと思われる(Figure 22)。S3の解析では、DHBと6BFA 9は共通した親イオンを選択できず、異なるイオンでMS/MSをおこなった(Figure 23)。6BFA 9は m/z 2149.0を親イオンとした分析が可能であり、 m/z 1934.0のDHBより高分子量のイオンを親イオンとして選択することができた。一般的にMS/MSでは、高分子量の親イオンはフラグメントイオンを多く生成し、低分子量の親イオンと比較するとアミノ酸配列情報が多く、タンパク質同定に優位に働くことが知られている。6BFA 9はタンパク質の同定に有意なスコア43を示し、S3を78 kDa Glucose regulated protein (GRP)と同定した。一方、DHBはスコア5で、S3のタンパク質としてGRPは候補にも挙げられなかった。DHBの場合、他の親イオンを選択することでS3を同定できる可能性はあるが、6BFA 9がDHBより高分子量の親イオンでタンパク質を同定できたことは、アミノ酸配列情報を得るために有益な特徴を有していると言える。以上の様に、6BFA 9を実際のプロテオーム解析に応用させた結果、matrixとしてタンパク質の同定が可能であることを明らかにした。

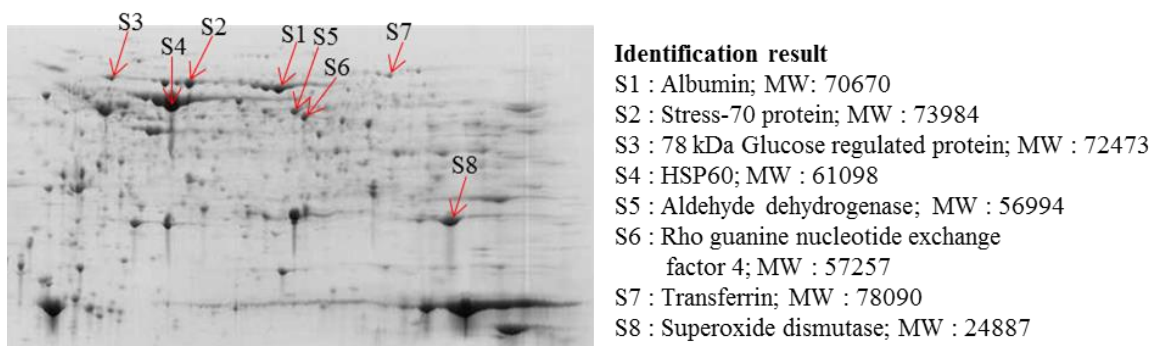


Figure 21. Protein identification using 6BFA 9 and DHB.

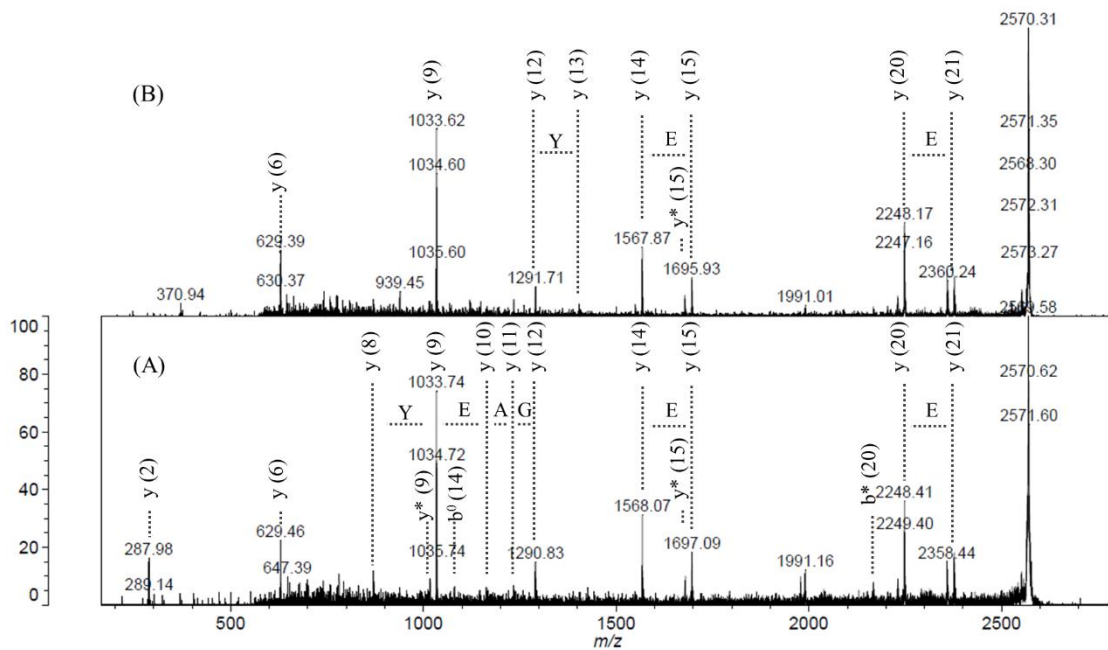


Figure 22. S7 identification using (A) 6BFA 9 and (B) DHB.

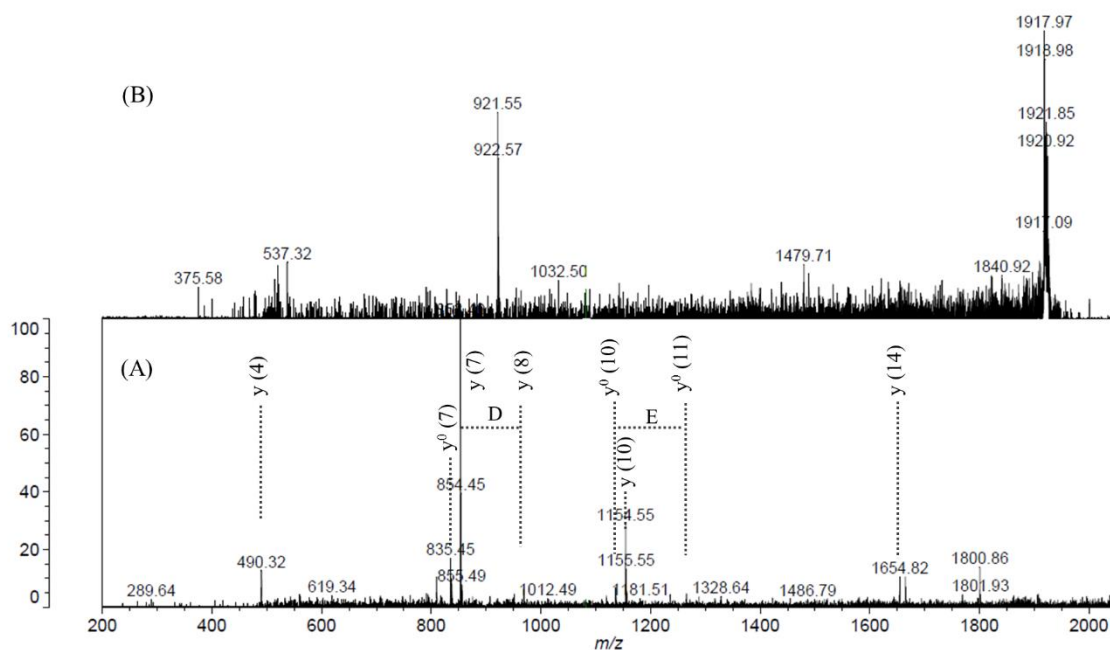


Figure 23. S3 identification using (A) 6BFA 9 and (B) DHB.

第2節 PMF 法によるプロテオーム解析への応用

PMF 法は、MALDI-TOFMS によるプロテオーム解析において、最も代表的なタンパク質同定方法である。さらに、近年のプロテオーム解析発展により、効率的な PMF 法の検討もされている。matrix では、CHCA のペプチドに対する感度をより高めた CI-CCA が報告された¹⁸⁾。また、ハイスループットな分離法としては、タンパク質を低濃度、短時間で分離する全自動二次元電気泳動装置 (Auto2D) が開発された⁵⁴⁾。そこで、Auto2D によって分離したラット大脳皮質のタンパク質の同定に 6BFA 9 を用いて、その実用性を評価した。

常法に従って、ラット大脳皮質からタンパク質を抽出した後⁴⁷⁾、Auto2D で分離し、トリプシン消化により生成したペプチド混合物を測定試料とした (Figure 24)。Auto2D は、MALDI と組み合わせた報告例はほとんどない。そのため、質量分析をする際の微量な測定試料に対する調整方法が確立されておらず、良好な MALDI-TOFMS スペクトルは S6 のみにおいて得ることができた。

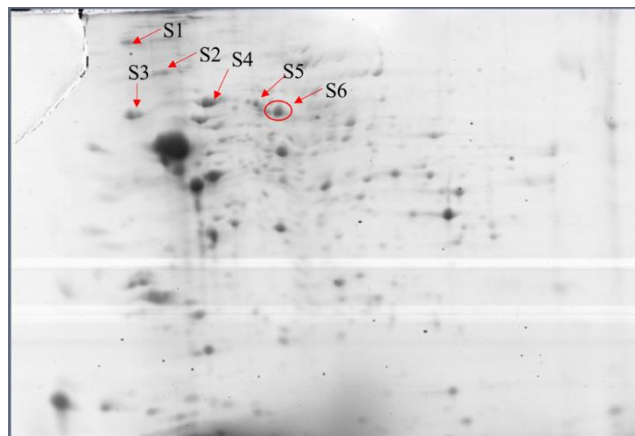


Figure 24. 2D-PAGE of the rat cerebral cortex by Auto2D.

6BFA 9 と CHCA の MALDI-TOFMS のマススペクトルを Figure 25 に示す。質量数を記載したピークはタンパク質由来のピークであり、*印のピークは PMF 法においてタンパク質同定と関連がない未知ピークを示している。タンパク質由来のピーク数は、6BFA 9 が 7 本、

CHCA が 6 本とピーク数には差が見られなかった。6BFA 9 と CHCA により得られたマスペクトルを PMF 法によって解析した結果、6BFA 9 ではタンパク質が Heat shock protein70K であると同定できた。一方、CHCA では候補を示すことはできたが、同定するには至らなかった。詳細に解析結果を検討すると、6BFA 9 はタンパク質同定を優位にするアミノ酸配列情報を多く含む高分子量のペプチドを CHCA より多く検出し、同定することに成功したと思われる。また、6BFA 9 のみで検出されたピークの一つに、N 末端領域側に酸性アミノ酸を多く含むペプチドもあり、これまで明らかとした特徴を反映した結果であると思われる (Figure 25)。

以上の結果より、6BFA 9 は、Auto2D による低濃度での PMF 法においてもタンパク質の同定が可能であり、実用性の高い matrix であることが明らかとなった。

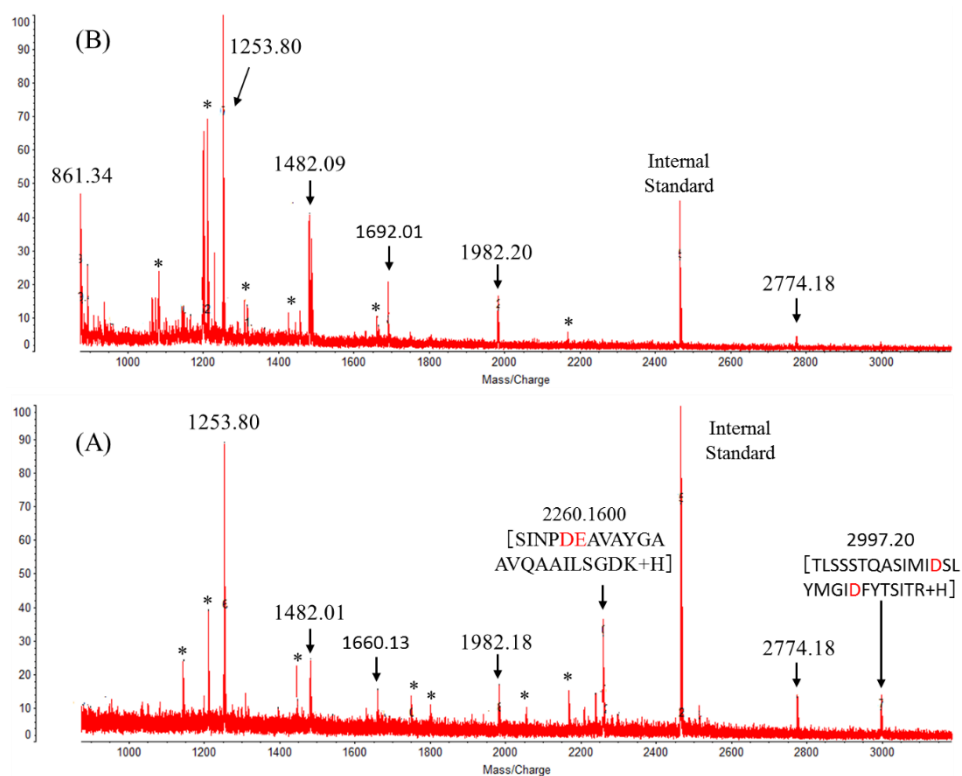


Figure 25. Comparison of obtained spectra by using (A) 6BFA 9 and (B) CHCA in S6.

第3章 小括

前章において、6BFA 9 は PMF 法および MS/MS ion search によるタンパク質同定法に、応用可能な matrix であることが明らかになった。本章では、6BFA 9 が実際のプロテオーム解析においても、両方のタンパク質同定法に応用可能な matrix であるかを検討した。

MS/MS ion search の場合、6BFA 9 は matrix として、ラット副腎のプロテオーム解析に応用させた。その結果、6BFA 9 はタンパク質同定に用いた S1-S8 のタンパク質を同定もしくは候補を一つに絞る事に成功し、実際のプロテオーム解析に応用できることを明らかにした。この結果は、6BFA 9 が DHB と比較した場合に、より多くの *b,y* フラグメントイオンを検出しアミノ酸配列の解析が容易なためと考えられる。また、6BFA 9 は DHB と比べより高分子の親イオンを用いて MS/MS 解析が可能であり、測定試料のアミノ酸配列情報をより多く解析できる利点もある。

PMF 法の場合、6BFA 9 は matrix として、Auto2D を用いたラット大脳皮質のプロテオーム解析に応用させた。その結果、6BFA 9 は CHCA と異なりタンパク質を同定する事に成功し、PMF 法によるプロテオーム解析に応用できることが明らかになった。今回使用した Auto2D は、低濃度の試料を短時間で分離可能な分析装置である。しかし、MALDI を用いたプロテオーム解析に応用した報告例はほとんどなく測定方法が確立していない現状である。このような条件下で、6BFA 9 は低濃度のタンパク質を PMF 法によって同定を可能としたため、実際のプロテオーム解析に対する実用性が明らかになった。

以上より、6BFA 9 は MS/MS ion search および PMF 法によるタンパク質同定法に matrix として応用させた結果、タンパク質を同定できたため、実際のプロテオーム解析に応用できることが明らかになった。

結論

MALDI-TOFMS と MALDI-QIT-TOFMS は、プロテオーム解析において、強力なタンパク質同定手段として用いられている。しかし、両質量分析装置でタンパク質同定が可能な matrix が存在しないため、貴重な測定試料の消費量や実験操作の複雑性が増し、非効率なプロテオーム解析が行われている。そこで、MALDI-TOFMS と MALDI-QIT-TOFMS の両質量分析装置でタンパク質同定が可能な matrix を開発するために、網羅的な FA 誘導体の合成による新規 matrix の探索をおこなった。

FA 誘導体の網羅的な合成のため、代表的な合成方法の Knoevenagel 反応より、反応条件が緩和な HWE 反応と合成原料の入手が容易な Heck 反応で検討した。HWE 反応は Knoevenagel 反応より緩和な反応条件で誘導体の合成を可能とした。また、Heck 反応は HWE 反応では入手困難な合成原料の場合に、収率良く誘導体の合成に成功した。そのため、HWE 反応と Heck 反応による合成方法は、目的とする FA 誘導体の構造に応じて使い分けることにより、簡便且つ網羅的に誘導体合成が可能となった。

MALDI-TOFMS と MALDI-QIT-TOFMS の両質量分析装置で、ペプチドの分子イオンとフラグメントイオンを検出可能な FA 誘導体を探索するために、計 21 種類の誘導体を合成し matrix としてペプチドのイオン化試験に応用させた。ニトロ基置換体とヨード基置換体は、MALDI-TOFMS と MALDI-QIT-TOFMS の質量分析装置において、イオンの強度が低く matrix として不適切だった。メトキシ基置換体は、MALDI-TOFMS によるペプチドの感度が誘導体の中で優れていたが、MALDI-QIT-TOFMS ではフラグメントイオンを検出することはできなかった。一方、6 位のブロモ基置換体 **9** (6BFA **9**) は、MALDI-TOFMS のペプチド感度はメトキシ基置換体よりは劣っていたが、その他の誘導体より良好な感度を示した。また、6BFA **9** は MALDI-QIT-TOFMS によるペプチドのフラグメントイオンの強度を評価すると、メトキシ基置換体および DHB より高い強度を示した。そのため、6BFA **9** が MALDI-TOFMS

および MALDI-QIT-TOFMS においてペプチドの分子イオンおよびフラグメントイオンを検出できることが明らかになった。

次に、6BFA 9 を介して生成されるペプチドの分子イオンおよびフラグメントイオンの有用性を確認するため、matrix として PMF 法と MS/MS ion search による市販のタンパク質同定に応用した。PMF 法では、6BFA 9 は CHCA と異なるペプチドに対して感度を示したが、タンパク質同定の精度を示すスコア評価は同等かそれ以上の結果が得られた。また、MS/MS ion search における 6BFA 9 はアミノ酸配列の解析に優位なフラグメントイオンを DHB より多く検出し、高いスコアでタンパク質を同定した。これらの結果より、6BFA 9 は PMF 法と MS/MS ion search によるタンパク質同定法に有用なイオンを生成することが明らかになった。また、matrix としての機能向上の目的のために、6BFA 9 を基本骨格とした新たな誘導体を合成し化学構造と matrix の機能の相関性について検討した。しかし、6BFA 9 を上回る誘導体を見出すことはできなかったが、その過程で FA 誘導体の matrix として、ペプチドのイオン化に関する化学構造上の特徴を明らかにし、今後の matrix の改善のために有効な情報を多く得ることができた。

最後に、6BFA 9 が実際のプロテオーム解析においても、両方のタンパク質同定法に応用可能な matrix であるかを検討した。その結果、6BFA 9 は MS/MS ion search と PMF 法の両方でタンパク質の同定に成功し、実際のプロテオーム解析に応用できることが明らかになった。また、6BFA 9 は Auto2D を用いた低濃度のプロテオーム解析にも応用できたことから、実用性があると考えられる。

以上より、網羅的な誘導体の合成による新規 matrix の開発によって、PMF 法と MS/MS ion search によるタンパク質同定に応用可能な matrix の開発に成功した。また、Auto2D を用いた低濃度のプロテオーム解析にも応用可能なため、貴重な測定試料に対して効率的にタンパク質を同定できる実用的な matrix である。

謝辞

本研究の実施にあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました城西大学薬学部医薬品化学講座 坂本武史 教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、数々の有益かつ適切な御助言、御指導を賜りました埼玉医科大学中央研究施設機能部門 坂本安 教授、廣澤成美 助教ならびに鈴木悠子 助手に心より感謝致します。

本研究に対しまして、客観的な御助言、御指導を賜りました城西大学薬学部 新津勝 教授、生体分析化学講座 古地壯光 教授、医薬品安全性講座 金本郁男 教授に心より感謝致します。

本学位論文の作成にあたり、御閲覧と御教示を賜りました主査 城西大学薬学部 薬剤学講座 関俊暢 教授、副査 生物有機化学講座 杉田義昭 教授ならびに副査 有機薬化学講座 山ノ井孝 教授に深く感謝致します。

実験遂行にあたり、終始ご協力頂いた城西大学薬学部医薬品化学講座 高山淳 准教授ならびに玄美燕 助手に感謝すると共に、NMR スペクトル、EI-MS および元素分析の測定の手をとりました城西大学実験センターの諸氏に深く感謝いたします。

研究生活を通じて共に励ましあい、公私にわたり有益な御助言とご協力をいただきました城西大学薬学部の博士課程の同期ならびに医薬品化学講座諸氏に心より感謝致します。

最後に、研究をおこなうことに理解いただき、最後まで暖かく見守り、支援して頂いた家族に感謝致します。

実験の部

試薬及び溶媒は市販品を生成することなく使用し、特に記載しない限り、単離した化合物の収率を記載した。カラムクロマトグラフィーによる生成、分離にはシリカゲル (mesh 40-50 μm) を用いた。NMR スペクトルは、アジレントテクノロジー (Agilent) Varian 400-MR 型および Varian NMR System 700 型を使用した。 ^1H NMR スペクトルは 400 MHz、700 MHz、 ^{13}C NMR スペクトルは 175 MHz、100MHz、 ^{19}F NMR スペクトルは 376 MHz で測定した。重クロロホルム溶媒の場合はテトラメチルシラン、重メタノール溶媒の場合はメタノール、重ジメチルスルホキシド溶媒の場合はジメチルスルホキシドを内部標準として測定し、ppm 単位で記載した。赤外吸収 (IR) スペクトルの測定は、島津製作所フーリエ変換赤外分光光度計 IRAffinity-1 を用いて測定した。質量スペクトルは、日本電子高分解能磁場セクター型質量分析装置 JMS-700 を用いて測定した。元素分析は、有機化合物構造解析システム (CHN コーダーMT-6) を用い、融点は微量融点測定装置を用いて測定した。MALDI-TOFMS は島津製作所の AXIMA-CFR、MALDI-QIT-TOFMS は島津製作所の AXIMA-QIT を用いて測定した。

第 1 章の実験

第 1 節 効率的な合成法の確立およびペプチドイオン化試験

1. 化合物合成

本節で合成したFA誘導体のうち、(2E)-3-(3,4-dihydroxy-5-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid (**4**)²⁷, (2E)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethylphenyl)prop-2-enoic acid (**12**)⁵⁵ は文献既知の方法で合成した。

合成原料のバニリン誘導体とヨードフェノール誘導体、4-hydroxy-2,3-dimethoxybenzaldehyde (**34**)⁴¹, 2-fluoro-4-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde (**48**)⁵⁶, 4-hydroxy-3-methoxy-2-nitrobenzaldehyde (**77**)⁴¹, 2-amino-4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (**78**)³³, 2-iodo-4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (**79**)⁴¹, 4-Iodo-2,3-dimethoxyphenol (**80**)⁵⁷ は文献既知の方法で合成した。

それぞれの原料となる化合物、4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde (**31**), 3-hydroxy-4,5-dimethoxybenzaldehyde (**32**), 4-hydroxy-2,6-dimethoxybenzaldehyde (**33**), 3-fluoro-4-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde (**47**), 3-bromo-4-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde (**49**), 2-bromo-4-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde (**50**), 3-chloro-4-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde (**51**), 3-iodo-4-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde (**52**), 2-(trifluoromethoxy)phenol (**71**), 4-iodo-3,5-dimethylphenol (**73**), 4-acetoxy-3-methoxybenzaldehyde (**76**) は市販品を使用した。

Horner-Wadsworth-Emmons Olefination (一般操作法)

LiCl (1.5 当量), 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) (1.2 当量), *tert*-butyl diethyl phosphonoacetate (1.2 当量) を含む dry CH₂Cl₂ 溶液をアルゴン気流下、45 °C で 10 分間攪拌した。次いで、反応溶液を室温に戻した後、バニリン誘導体を加え、アルゴン気流下で 1 時間攪拌した。反応終了後、EtOAc で希釈し、有機層を飽和 NH₄Cl 溶液、飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

Heck reaction (一般操作法)

ヨードフェノール誘導体 (1.0 当量) Et₃N (4.0 当量) PPh₃ (0.4 当量) を含む CH₃CN の混合溶液に Pd(OAc)₂ を加え、アルゴン気流下 100 °C で 6 時間攪拌した。反応終了後、EtOAc を反応溶液に加え、セライトろ過した。次いで、10% HCl、飽和食塩水で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

4-Acetoxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde (35). バニリン誘導体 **31** (2.50 g, 13.7 mmol) の pyridine (10 mL) 溶液に Ac₂O (1.39 mL, 14.7 mmol) を加え、2 時間加熱還流した。反応終了後、10% HCl (100 mL) を反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (100 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 1) で精製し、化合物 **35** (2.64 g, 86%) を得た。白色固形物。IR (KBr) 1759, 1690, 1605, 1335, 1211, 1134 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.56 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 7.16 (s, 2H), 9.92 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.4, 56.3, 106.0, 134.3, 152.9, 168.1, 191.0; EI-MS *m/z* 224 (M⁺, 2.44), 183 (10.5), 182 (100), 181 (31.7); HRMS (EI) for C₁₁H₁₂O₅ calcd 224.0685 (M⁺), Found 224.0670.

***tert*-Butyl (2E)-3-[4-(acetoxy)-3,5-dimethoxyphenyl]prop-2-enoate (39).** 化合物 **35** (204 mg, 0.910 mmol), LiCl (61 mg, 1.43 mmol), DBU (0.17 mL, 1.14 mmol), *tert*-butyl diethyl phosphonoacetate (0.27 mL, 1.14 mmol), dry CH₃CN (5 mL) を用い、Horner-Wadsworth-Emmons olefination の一般操作法に従った。40 分間攪拌した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 2) で精製し、化合物 **39** (261 mg, 90%) を得た。白色固形物。mp 166-169 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1759, 1697, 1597, 1465, 1204, 1126 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.54 (s, 9H), 2.35 (s, 3H), 3.85 (s, 6H), 6.33 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.75 (s, 2H), 7.53 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.4, 28.2, 56.2, 80.7, 104.5, 120.5, 133.0, 143.2, 152.3, 166.0, 168.5; EI-MS *m/z* 322 (M⁺, 1.55), 280 (31.6), 225 (11.9), 224 (100); *Anal.* Calcd for C₁₇H₂₂O₆: C, 63.34; H, 6.88. Found: C, 63.34; H, 6.94.

(2E)-3-[4-(Acetoxy)-3,5-dimethoxyphenyl]prop-2-enoic acid (43). 化合物 **39** (100 mg, 0.310 mmol) を含む CH₂Cl₂ (1 mL) 溶液に TFA (0.49 mL, 6.59 mmol) を加え、室温で 1.5 時間攪拌

した。反応終了後、H₂O (50 mL) を加え EtOAc (50 mL x 2) で抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 1) で精製し、化合物 **43** (49 mg, 59%) を得た。白色固形物。mp 146-149 °C (EtOAc); IR (KBr) 2947, 1767, 1682, 1597, 1420, 1134 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.35 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 6.34 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.6, 56.1, 60.8, 109.7, 115.6, 117.1, 129.4, 143.2, 144.1, 145.9, 153.7, 169.0, 172.2; EI-MS *m/z* 266 (M⁺, 1.64), 225 (1.64), 224 (100); *Anal.* Calcd for C₁₃H₁₄O₆: C, 58.64; H, 5.30. Found: C, 58.75; H, 5.36.

(2E)-3-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid (1). 化合物 **43** (84 mg, 0.332 mmol) と K₂CO₃ (96 mg, 0.697 mmol) を含む MeOH (5 mL) 溶液を室温で 3 時間攪拌させた。反応終了後 10% HCl (50 mL) を氷冷下で反応溶液に加え pH 3 に中和し、水層を EtOAc (50 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Et₂O : hexane = 3 : 1) で精製し、化合物 **1** (23 mg, 31%) を得た。白色固形物。mp 193-195 °C (文献既知³¹⁾: 203-205 °C).

3-Acetoxy-4,5-dimethoxybenzaldehyde (36). バニリン誘導体 **32** (1.00 g, 5.49 mmol) の pyridine (4 mL) 溶液に Ac₂O (0.56 mL, 5.87 mmol) を加え、2 時間加熱還流した。反応終了後 10% HCl (100 mL) を反応溶液に加え pH 3 に中和し、水層を EtOAc (100 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 2) で精製し、化合物 **36** (1.14 g, 92%) を得た。白色固形物。mp 54-56 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1751, 1697, 1589, 1389, 1219, 1088 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.33 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 7.20 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 9.80 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.5, 56.1, 60.8, 109.0, 118.5, 131.4, 143.9, 146.5, 153.9, 168.7, 190.1; EI-MS *m/z* 224 (M⁺, 9.69), 183 (10.1), 182 (100), 167 (40.3), 139 (13.2); *Anal.* Calcd for C₁₁H₁₂O₅: C, 58.93; H, 5.39. Found: C, 59.12; H, 5.43.

tert-Butyl (2E)-3-[3-(acetoxy)-4,5-dimethoxyphenyl]prop-2-enoate (40). 化合物 **36** (500 mg, 2.23 mmol), LiCl (140 mg, 3.35 mmol), DBU (0.40 mL, 2.68 mmol), *tert*-butyl diethyl phosphonoacetate (0.63 mL, 2.68 mmol), dry CH₃CN (3 mL) を用い、Horner-Wadsworth-Emmons olefination の一般操作法に従った。1 時間攪拌した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 6) で精製し、化合物 **40** (515 mg, 87%) を得た。黄色油状物。IR (neat) 1767, 1697, 1504, 1281, 1211, 1149 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.53 (s, 9H), 2.32 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 6.28 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 6.94 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.7, 28.2, 56.1, 60.8, 80.6, 109.2, 115.2, 120.1, 130.2, 142.4, 142.8, 144.1, 153.6, 166.1, 169.0; EI-MS *m/z* 322 (M⁺, 17.5), 225 (11.6),

224 (100), 209 (39.2), 207 (13.7); HRMS (EI) for $C_{17}H_{22}O_6$ calcd 322.1416 (M^+), Found 322.1397.

(2E)-3-[3-(Acetoxy)-4,5-dimethoxyphenyl]prop-2-enoic acid (44). 化合物 **40** (200 mg, 0.62 mmol) を含む CH_2Cl_2 (5 mL) 溶液に TFA (0.92 mL, 12.4 mmol) を加え、室温で 23 時間攪拌した。反応終了後、 H_2O (50 mL) を加え、EtOAc (50 mL x 2) で抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮後した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 1) で精製し、化合物 **44** (158 mg, 96%) を得た。白色固形物。mp 146-149 °C (EtOAc); IR (KBr) 1697, 1636, 1504, 1427, 1312, 1088 cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.35 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 6.34 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.91 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 20.6, 56.1, 60.8, 109.7, 115.6, 117.1, 129.4, 143.2, 144.1, 145.9, 153.7, 169.0, 172.2; EI-MS m/z 266 (M^+ , 20.0), 225 (11.8), 224 (100), 209 (56.1); Anal. Calcd for $C_{13}H_{14}O_6$: C, 58.64; H, 5.30. Found: C, 58.75; H, 5.36.

(2E)-3-(3-Hydroxy-4,5-dimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid (2). 化合物 **44** (150 mg, 0.56 mmol) と K_2CO_3 (164 mg, 1.18 mmol) を含む MeOH (9 mL) 溶液を室温で 23 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (50 mL) を氷冷下で反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (50 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 2 : 1) で精製し、化合物 **2** (65 mg, 52%) を得た。白色固形物。mp 161 °C (文献値³²): 143-144 °C).

4-Acetoxy-2,6-dimethoxybenzaldehyde (37). バニリン誘導体 **33** (1.00 g, 5.49 mmol) を含む pyridine (4 mL) 溶液に Ac_2O (0.56 mL, 5.87 mmol) を加え、2 時間加熱還流した。反応終了後、10% HCl (100 mL) を反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (100 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 1) で精製し、化合物 **37** (1.14 g, 92%) を得た。白色結晶。mp 61-64 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1759, 1689, 1589, 1465, 1203, 1134, 1018 cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.32 (s, 3H), 3.88 (s, 6H), 6.37 (s, 2H), 10.43 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 21.1, 56.2, 98.0, 112.0, 156.7, 163.0, 168.5, 188.2; EI-MS m/z 224 (M^+ , 42.7), 183 (11.3), 182 (100), 181 (73.9), 166 (19.7), 165 (79.7), 164 (44.6), 153 (24.5), 151 (10.2), 149 (11.6), 138 (10.3), 137 (25.7), 136 (32.2), 135 (10.8), 125 (15.3); HRMS (EI) for $C_{11}H_{12}O_5$ calcd 224.0896 (M^+), Found 224.0683; Anal. Calcd for $C_{11}H_{12}O_5$: C, 58.93; H, 5.39. Found: C, 58.84; H, 5.38.

tert-Butyl (2E)-3-[4-(acetoxy)-2,6-dimethoxyphenyl]prop-2-enoate (41). 化合物 **37** (500 mg, 2.23 mmol), LiCl (140 mg, 3.35 mmol), DBU (0.40 mL, 2.68 mmol), *tert*-butyl diethyl phosphonoacetate (0.63 mL, 2.68 mmol), dry CH_3CN (5 mL) を用い、Horner-Wadsworth-Emmons olefination の一般操作法に従った。1 時間攪拌した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー

一 (EtOAc : hexane = 1 : 4) で精製し、化合物 **41** (313 mg, 44%) を得た。白色固形物。mp 127-129 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1759, 1705, 1597, 1466, 1327, 1219, 1142 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.53 (s, 9H), 2.31 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 6.32 (s, 2H), 6.75 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 8.00 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 21.1, 28.2, 55.8, 79.8, 97.8, 110.1, 122.1, 133.7, 152.8, 160.2, 168.0, 169.1; EI-MS m/z 322 (M^+ , 23.7), 280 (32.2), 249 (15.3), 225 (11.8), 224 (100), 207 (18.6), 193 (26.3), 165 (49.1), 164 (10.3); Anal. Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_6$: C, 63.34; H, 6.88. Found: C, 63.23; H, 6.89.

(2E)-3-[4-(Acetoxy)-2,6-dimethoxyphenyl]prop-2-enoic acid (45). 化合物 **41** (100 mg, 0.310 mmol) を含む CH_2Cl_2 (5 mL) 溶液に TFA (0.49 mL, 0.53 mmol) を加え、室温で 1.5 時間攪拌した。反応終了後、 H_2O (50 mL) を加え EtOAc (50 mL x 2) で抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 2) で精製し、化合物 **45** (73 mg, 88%) を得た。白色固形物。mp 214-217 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 2940, 1767, 1682, 1581, 1203, 1111 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2.32 (s, 3H), 3.88 (s, 6H), 6.35 (s, 2H), 6.88 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 8.19 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 21.2, 55.9, 97.9, 109.8, 119.2, 137.0, 153.6, 160.7, 169.0, 173.4; EI-MS m/z 266 (M^+ , 28.1), 226 (14.7), 224 (100), 193 (31.5), 165 (52.3), 137 (14.3); Anal. Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_6$: C, 58.64; H, 5.30. Found: C, 58.41; H, 5.30.

(2E)-3-(4-Hydroxy-2,6-dimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid (3). 化合物 **45** (100 mg, 0.376 mmol) と K_2CO_3 (110 mg, 0.796 mmol) を含む MeOH (5 mL) 溶液を室温で 1 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (50 mL) を氷冷下で反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (50 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 2 : 1) で精製し、化合物 **3** (59 mg, 70%) を得た。白色固形物。mp 171 °C (EtOAc-hexane); ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 3.79 (s, 6H), 6.12 (s, 2H), 6.51 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 56.8, 93.1, 104.2, 117.5, 136.1, 162.0, 162.5, 170.5; EI-MS m/z 224 (M^+ , 100), 193 (45.1), 166 (12.4), 165 (78.2), 164 (23.2), 163 (11.1), 149 (12.7), 137 (33.7), 107 (28.0); HRMS (EI) for $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5$ calcd 224.0685 (M^+), Found 224.0660.

4-Acetoxy-2,3-dimethoxybenzaldehyde (38). バニリン誘導体 **34** (645 mg, 3.54 mmol) を含む pyridine (3 mL) 溶液に Ac_2O (0.36 mL, 3.79 mmol) を加え、2 時間加熱還流した。反応終了後、10% HCl (100 mL) を反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (100 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 1) で精製し、化合物 **38** (494 mg, 62%) を得た。黄色油状物。IR (neat) 1775, 1697, 1589, 1466, 1273, 1196 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2.36 (s,

3H), 3.89 (s, 3H), 4.03 (s, 3H), 6.93 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 10.34 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 20.6, 62.1, 118.6, 123.0, 128.0, 145.2, 149.7, 157.1, 168.3, 188.8; EI-MS m/z 224 (M^+ , 12.6), 183 (11.4), 182 (100), 181 (17.8), 167 (43.7), 165 (21.4), 151 (11.3), 149 (40.1), 139 (22.4), 137 (11.4), 136 (22.3), 135 (11.5), 133 (15.8), 123 (14.8), 121 (15.2); HRMS (EI) for $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5$ calcd 224.0685 (M^+), Found 224.0664.

***tert*-Butyl (2*E*)-3-[4-(acetoxy)-2,3-dimethoxyphenyl]prop-2-enoate (42).** 化合物 **38** (200 mg, 0.892 mmol), LiCl (57 mg, 1.34 mmol), DBU (0.16 mL, 1.07 mmol), *tert*-butyl diethyl phosphonoacetate (0.25 mL, 1.07 mmol), dry CH_3CN (5 mL) を用い、Horner-Wadsworth-Emmons olefination の一般操作法に従った。1 時間攪拌した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 6) で精製し、化合物 **42** (70 mg, 32%) を得た。黄色油状物。IR (neat) 1767, 1705, 1466, 1281, 1157, 1065, 1026 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.54 (s, 9H), 2.34 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 6.40 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.83 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.28 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 20.6, 28.1, 60.7, 61.2, 80.4, 118.3, 121.3, 122.1, 127.3, 137.5, 145.3, 145.6, 153.0, 166.3, 168.8; EI-MS m/z 322 (M^+ , 6.54), 280 (50.9), 249 (16.1), 224 (100), 207 (23.1), 193 (57.5), 192 (11.7), 177 (14.6), 165 (28.9), 164 (13.0), 163 (15.7), 149 (13.7), 147 (14.1), 133 (30.4), 121 (10.2); HRMS (EI) for $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_6$ calcd 322.1416 (M^+), Found 322.1432.

(2*E*)-3-[4-(Acetoxy)-2,3-dimethoxyphenyl]prop-2-enoic acid (46). 化合物 **42** (431 mg, 1.34 mmol) を含む CH_2Cl_2 (5 mL) 溶液に TFA (2.0 mL, 26.7 mmol) を加え、室温で 1.5 時間攪拌した。反応終了後、 H_2O (50 mL) を加え、EtOAc (50 mL x 2) で抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 1) で精製し、化合物 **46** (283 mg, 80%) を得た。白色固形物。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2.35 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 6.51 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.05 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 20.6, 60.7, 61.3, 118.4, 122.6, 126.6, 141.1, 144.4, 145.4, 146.2, 153.4, 168.8, 172.5; HRMS (EI) for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_6$ calcd 224.0790 (M^+), Found 224.0792.

(2*E*)-3-(4-Hydroxy-2,3-dimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid (5). 化合物 **46** (100 mg, 0.376 mmol) と K_2CO_3 (110 mg, 0.79 mmol) を含む MeOH (9 mL) 溶液を室温で 2 時間反応させた。反応終了後、10% HCl (50 mL) を氷冷下で反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (50 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 3 : 2) で精製し、化合物 **5** (71 mg, 84%) を得た。白色固形物。mp 242 °C (EtOAc-hexane); ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 3.74 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 6.27 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.77

(d, $J = 15.6$ Hz, 1H).

4-Acetoxy-3-fluoro-5-methoxybenzaldehyde (53). バニリン誘導体 **47** (600 mg, 3.53 mmol) の pyridine (2.46 mL) 溶液に Ac_2O (2.46 mL, 17.6 mmol) を加え、室温で2時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (100 mL) を反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (100 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 3) で精製し、化合物 **53** (720 mg, 97%) を得た。白色固形物。mp 70-72 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1764, 1697, 1599, 1468, 1095 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2.38 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 7.29-7.31 (m, 2H), 9.90 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 20.2, 56.5, 111.0 (d, $J = 22.5$ Hz), 134.3 (d, $J = 2.0$ Hz), 153.5, 153.6, 154.1, 156.6, 167.4, 189.9; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -130.3 (q); EI-MS m/z 212 (M^+ , 5.92), 171 (9.30), 170 (100), 169 (63.5); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{FO}_4$: C, 56.61; H, 4.28. Found: C, 56.72; H, 4.30.

tert-Butyl (2E)-3-[4-(acetoxy)-3-fluoro-5-methoxyphenyl]prop-2-enoate (59). 化合物 **53** (720 mg, 3.40 mmol), LiCl (216 mg, 4.08 mmol), DBU (0.61 mL, 4.08 mmol), *tert*-butyl diethyl phosphonoacetate (0.96 mL, 4.08 mmol), dry CH_3CN (8 mL) を用い、Horner-Wadsworth-Emmons olefination の一般操作法に従った。1時間攪拌した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 8) で精製し、化合物 **59** (313 mg, 44%) を得た。白色固形物。mp 132-135 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1765, 1710, 1640, 1511, 1427 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.53 (s, 9H), 2.35 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 6.32 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 6.95 (dd, $J = 11.6$ and 1.6 Hz, 1H), 7.49 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 20.2, 28.1, 56.3, 80.9, 110.7, 111.5 (d, $J = 26.3$ Hz), 120.4, 122.5, 135.4, 141.4, 147.8, 153.6, 156.1, 165.9, 168.4; ^{19}F -NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -127.9 (d); EI-MS m/z 310 (M^+ , 0.97), 268 (31.1), 213 (11.1), 212 (100), 195 (15.3); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{FO}_5$: C, 61.93; H, 6.17. Found: C, 61.71; H, 6.03.

(2E)-3-[4-(Acetoxy)-3-fluoro-5-methoxyphenyl]prop-2-enoic acid (65). 化合物 **59** (962 mg, 3.10 mmol) を含む CH_2Cl_2 (6 mL) 溶液に TFA (4.74 mL, 62.0 mmol) を加え、室温で2.5時間攪拌した。反応終了後、 H_2O (50 mL) を加え、EtOAc (50 mL x 2) で抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (EtOAc-hexane) で精製し、化合物 **65** (565 mg, 71%) を得た。白色固形物。mp 132-135 °C; IR (KBr) 2951, 1758, 1688, 1635, 1512, 1431 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 2.37 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 6.72 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 7.42 (dd, $J = 8.8$ and 1.6 Hz, 1H), 7.62 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 12.6 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 20.9, 57.6, 110.7, 111.5 (d, $J = 26.3$ Hz), 120.4, 122.5, 135.4, 141.4, 147.8, 153.6, 156.1, 165.9, 168.4; ^{19}F NMR (376 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ -129.2 (d); EI-MS m/z 254 (M^+ , 2.72), 213 (10.5), 212 (100), 197 (7.92), 195 (7.67); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{FO}_5$: C, 56.70; H, 4.36. Found: C,

56.70; H, 4.39.

(2E)-3-(3-Fluoro-4-hydroxy-5-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid (6). 化合物 **65** (565 mg, 2.22 mmol) と K_2CO_3 (1.53 g, 11.1 mmol) を含む MeOH (8 mL) 溶液を室温で 2 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (50 mL) を氷冷下で反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (50 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (EtOH) で精製し化合物 **6** (201 mg, 43%) を得た。白色固形物。mp 228-232 °C; IR (KBr) 3420, 1694, 1632, 1608, 1521, 1437 cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.89 (s, 3H), 6.51 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.25 (dd, $J = 12.4$ and 1.2 Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 20.2, 28.1, 80.1, 110.7, 111.5 (d, $J = 26.3$ Hz), 120.4, 122.5, 135.4, 141.4, 147.8, 153.6, 156.1, 165.9, 168.4; ^{19}F -NMR (376 MHz, DMSO- d_6) δ -135.6 (d); EI-MS m/z 212 (M^+ , 100), 197 (12.1), 195 (13.5), 151 (10.3); Anal. Calcd for $C_{10}H_9FO_4$: C, 56.61; H, 4.28. Found: C, 56.76; H, 4.36.

4-Acetoxy-2-fluoro-5-methoxybenzaldehyde (54). バニリン誘導体 **48** (900 mg, 5.29 mmol) と pyridine (3.70 mL) を含む CH_2Cl_2 (10 mL) 溶液に Ac_2O (3.70 mL, 26.5 mmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (100 mL) を反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (100 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 3) で精製し、化合物 **54** (1.08 g, 96%) を得た。白色固形物。mp 57-58 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1754, 1697, 1615, 1505, 1474 cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.34 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 6.96 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 10.30 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 20.5, 56.7, 109.4, 112.1, 145.7, 148.4, 157.8, 160.4, 167.8, 186.0; ^{19}F NMR (376 MHz, $CDCl_3$) δ -130.3 (q); EI-MS m/z 212 (M^+ , 5.12), 171 (9.44), 170 (100), 169 (49.3), 155 (14.7); Anal. Calcd for $C_{10}H_9FO_4$: C, 56.61; H, 4.28. Found: C, 56.48; H, 4.40.

tert-Butyl (2E)-3-[4-(acetoxy)-2-fluoro-5-methoxyphenyl]prop-2-enoate (60). 化合物 **54** (900 mg, 5.29 mmol), LiCl (337 mg, 7.94 mmol), DBU (0.99 mL, 6.35 mmol), *tert*-butyl diethyl phosphonoacetate (1.49 mL, 6.35 mmol), dry CH_3CN (10 mL) を用い、Horner-Wadsworth-Emmons olefination の一般操作法に従った。1 時間攪拌した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 5) で精製し、化合物 **60** (1.02 g, 62%) を得た。白色固形物。mp 121-123 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1767, 1701, 1509, 1455, 1369 cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.51 (s, 9H), 2.31 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 6.36 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 7.03 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 28.1, 56.3, 80.1, 110.7, 111.5 (d, $J = 26.3$ Hz), 120.4, 122.5, 135.4, 141.4, 147.8, 153.6, 156.1, 165.9, 168.4; ^{19}F NMR (376 MHz, $CDCl_3$) δ -122.4 (q); EI-MS m/z 310 (M^+ , 2.22), 268

(16.4), 213 (10.5), 212 (100), 195 (16.1), 192 (9.67), 177 (15.9); *Anal.* Calcd for C₁₆H₁₉FO₅: C, 61.93; H, 6.17. Found: C, 61.98; H, 6.23.

(2E)-3-[4-(Acetoxy)-3-fluoro-5-methoxyphenyl]prop-2-enoic acid (66). 化合物 **60** (1.00 g, 3.23 mmol) を含む CH₂Cl₂ (10 mL) 溶液に TFA (4.94 mL, 64.6 mmol) を加え、室温で 3 時間攪拌させた。反応終了後、H₂O (100 mL) を加え、EtOAc (100 mL x 2) で抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (EtOH-EtOAc) で精製し、化合物 **66** (593 mg, 72%) を得た。白色固形物。mp 209-212 °C; IR (KBr) 2922, 1768, 1687, 1631, 1507, 1417 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.31 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 6.76 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 12.6 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 21.3, 57.5, 112.4, 120.7, 122.9, 136.0, 142.2, 149.0, 153.8, 156.2, 168.3, 169.1; ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆) δ -124.5 (q); EI-MS *m/z* 254 (M⁺, 3.36), 213 (10.8), 212 (100), 177 (31.3), 164 (12.8), 149 (8.68); *Anal.* Calcd for C₁₂H₁₁FO₅: C, 56.70; H, 4.36. Found: C, 56.66; H, 4.40.

(2E)-3-(2-Fluoro-4-hydroxy-5-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid (7). 化合物 **66** (298 mg, 1.17 mmol) と K₂CO₃ (809 mg, 5.85 mmol) を含む MeOH (10 mL) 溶液を室温で 2 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (50 mL) を氷冷下で反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (100 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (EtOH) で精製し、化合物 **7** (122 mg, 49%) を得た。白色固形物。mp 224-228 °C; IR (KBr) 3481, 1686, 1617, 1511, 1448, 1295 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.84 (s, 3H), 6.53 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.72 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 10.2 (br s, 1H), 12.3 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 57.2, 104.1 (d, *J* = 25.2 Hz), 111.5, 120.7, 112.7, 118.8, 137.0, 145.9, 151.4, 155.4, 157.8, 168.8; ¹⁹F-NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆) δ -124.0 (q); EI-MS *m/z* 212 (M⁺, 100), 197 (11.2), 195 (10.0), 177 (46.1), 164 (14.3), 149 (16.3), 121 (11.0), 69 (12.8); *Anal.* Calcd for C₁₀H₉FO₄: C, 56.61; H, 4.28. Found: C, 56.64; H, 4.32.

4-Acetoxy-3-bromo-5-methoxybenzaldehyde (55). バニリン誘導体 **49** (999 mg, 4.32 mmol) を含む pyridine (1.32 mL) 溶液に Ac₂O (0.82 mL, 9.66 mmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (100 mL) を反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (50 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 4) で精製し、化合物 **55** (1.08 g, 91%) を得た。白色固形物。mp 79-82 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1769, 1692, 1579, 1469, 1389 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.39 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 7.43 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 9.89 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.3, 56.4, 109.8, 118.0, 127.6, 135.2, 142.8, 153.1, 167.2, 189.7; EI-MS *m/z* 274 (M⁺+2, 3.21), 272 (M⁺, 3.20), 233 (11.0), 232 (97.4), 231 (53.1),

230 (100), 229 (41.9); *Anal.* Calcd for C₁₀H₉BrO₄: C, 43.98; H, 3.32. Found: C, 43.85; H, 3.33.

***tert*-Butyl (2*E*)-3-[4-(acetoxyl)-3-bromo-5-methoxyphenyl]prop-2-enoate (61).** 化合物 **55** (500 mg, 1.83 mmol), LiCl (116 mg, 2.75 mmol), DBU (0.33 mL, 2.20 mmol), *tert*-butyl diethyl phosphonoacetate (0.327 mL, 2.20 mmol), dry CH₃CN (5 mL) を用い、Horner-Wadsworth-Emmons olefination の一般操作法に従った。1 時間攪拌した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 6) で精製し、化合物 **61** (629 mg, 93%) を得た。白色固形物。mp 157-159 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1763, 1699, 1636, 1489, 1393 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.53 (s, 9H), 2.36 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 6.33 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.00 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.4, 28.2, 56.3, 80.9, 110.1, 117.7, 121.7, 124.3, 134.2, 139.0, 141.5, 152.6, 165.7, 167.8; EI-MS *m/z* 372 (M⁺ + 2, 0.37), 370 (M⁺, 0.40), 330 (21.5), 275 (10.3), 274 (98.0), 272 (100), 257 (14.3), 255 (10.5); *Anal.* Calcd for C₁₆H₁₉BrO₅: C, 51.77; H, 5.16. Found: C, 52.02; H, 5.08.

(2*E*)-3-[4-(Acetoxyl)-3-bromo-5-methoxyphenyl]prop-2-enoic acid (67). 化合物 **61** (500 mg, 1.53 mmol) を含む CH₂Cl₂ (2 mL) 溶液に TFA (2.3 mL, 30.6 mmol) を加えて、室温で 1.5 時間攪拌した。反応終了後、H₂O (50 mL) を加え、EtOAc (50 mL x 2) で抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 4) で精製し、化合物 **67** (416 mg, 98%) を得た。白色固形物。mp 231-232 °C (MeOH-EtOAc); IR (KBr) 3001, 1761, 1689, 1637, 1467, 1411 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.31 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 6.68 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 20.6, 57.0, 111.7, 117.3, 121.6, 124.7, 134.8, 138.7, 142.4, 152.8, 167.8, 168.0; EI-MS *m/z* 316 (M⁺+2, 0.08), 314 (M⁺, 0.08), 275 (10.8), 274 (99.8), 272 (100), 257 (8.48); *Anal.* Calcd for C₁₂H₁₁BrO₅: C, 45.74; H, 3.52. Found: C, 45.67; H, 3.55.

(2*E*)-3-(3-Bromo-4-hydroxy-5-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid (8). 化合物 **67** (337 mg, 1.07 mmol) と K₂CO₃ (310 mg, 2.25 mmol) を含む MeOH (6 mL) 溶液を室温で 2 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (50 mL) を氷冷下で反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (100 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (EtOAc) で精製し、化合物 **8** (287 mg, 98%) を得た。白色固形物。mp 253-255 °C; IR (KBr) 3272, 1654, 1620, 1503, 1419 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.87 (s, 3H), 6.49 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 9.75 (br s, 1H), 12.2 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 56.4, 109.4, 110.0, 117.5, 125.7, 126.7, 143.1, 145.8, 148.5, 167.8; EI-MS *m/z* 274 (M⁺+2, 98.6), 272 (M⁺, 100), 259 (11.3), 257 (16.6), 178 (20.1), 150 (10.9); *Anal.* Calcd for C₁₀H₉BrO₄: C, 43.98; H, 3.32. Found: C, 44.12; H, 3.38.

4-Acetoxy-2-bromo-5-methoxybenzaldehyde (56). バニリン誘導体 **50** (560 mg, 2.42 mmol) を含む pyridine (3.03 mL) 溶液に Ac₂O (3.03 mL, 32.1 mmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (100 mL) を反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (50 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 4) で精製し、化合物 **56** (606 mg, 92%) を得た。白色固形物。mp 109-110 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1759, 1689, 1597, 1496, 1388 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.34 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 7.36 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 10.3 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.5, 56.3, 112.1, 117.9, 128.0, 131.6, 145.0, 151.2, 167.9, 190.8; EI-MS *m/z* 274 (M⁺+2, 6.51), 272 (M⁺, 6.59), 232 (98.3), 231 (54.7), 230 (100), 229 (46.8); *Anal.* Calcd for C₁₀H₉BrO₄: C, 43.98; H, 3.32. Found: C, 43.95; H, 3.33.

tert-Butyl (2E)-3-[4-(acetoxy)-2-bromo-5-methoxyphenyl]prop-2-enoate (62). 化合物 **56** (2.00 g, 7.32 mmol), LiCl (466 mg, 11.0 mmol), DBU (1.29 mL, 8.78 mmol), *tert*-butyl diethyl phosphonoacetate (2.06 mL, 8.78 mmol), dry CH₃CN (50 mL) を用い、Horner-Wadsworth-Emmons olefination の一般操作法に従った。1 時間攪拌した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 8) で精製し、化合物 **62** (2.44 g, 90%) を得た。白色固形物。mp 110-111 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1759, 1705, 1635, 1496, 1388 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.54 (s, 9H), 2.30 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 6.24 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.86 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.5, 28.1, 56.1, 80.9, 110.6, 115.3, 122.8, 127.3, 132.9, 141.3, 141.5, 150.7, 165.5, 168.4; EI-MS *m/z* 373 (M⁺+2, 0.07), 371 (M⁺, 0.08), 232 (12.1), 230 (12.4), 193 (100), 178 (15.9), 133 (11.6); *Anal.* Calcd for C₁₆H₁₉BrO₅: C, 51.77; H, 5.16. Found: C, 51.75; H, 5.17.

(2E)-3-[4-(Acetoxy)-3-bromo-5-methoxyphenyl]prop-2-enoic acid (68). 化合物 **62** (2.44 g, 6.57 mmol) を含む CH₂Cl₂ (15 mL) 溶液に TFA (14.9 mL, 131.0 mmol) を加え、室温で 3 時間攪拌した。反応終了後、H₂O (50 mL) を加え、EtOAc (50 mL x 2) で抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (MeOH-EtOAc) で精製し、化合物 **68** (1.63 g, 79%) を得た。白色固形物。mp 222-224 °C; IR (KBr) 2978, 1759, 1689, 1627, 1496, 1388 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.25 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 6.73 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 20.4, 56.4, 111.8, 114.2, 122.9, 127.2, 132.0, 140.7, 141.2, 150.9, 167.3, 168.2; EI-MS *m/z* 316 (M⁺+2, 1.03), 314 (M⁺, 1.08), 193 (100), 178 (15.9), 133 (11.6); *Anal.* Calcd for C₁₂H₁₁BrO₅: C, 45.74; H, 3.52. Found: C, 45.83; H, 3.58.

(2E)-3-(2-Bromo-4-hydroxy-5-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid (9). 化合物 **68** (1.63 g, 5.19

mmol) と K_2CO_3 (2.16 g, 15.6 mmol) を含む MeOH (40 mL) 溶液を室温で 3 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (150 mL) を氷冷下で反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (100 mL x 3) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (MeOH) で精製し、化合物 **9** (1.00 g, 71%) を得た。白色固形物。mp 245-248 °C; IR (KBr) 3387, 1666, 1604, 1504, 1411 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.82 (s, 3H), 6.52 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.75 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 10.1 (br s, 1H), 12.3 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 56.0, 110.7, 116.2, 118.9, 119.0, 124.0, 141.7, 147.9, 148.0, 167.7; EI-MS m/z 274 ($\text{M}^+ + 2$, 5.4), 272 (M^+ , 5.5), 193 (100), 178 (25.9), 133 (18.6); Anal. Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{BrO}_4$: C, 43.98; H, 3.32. Found: C, 43.86; H, 3.33.

4-Acetoxy-3-chloro-5-methoxybenzaldehyde (57). バニリン誘導体 **51** (600 mg, 3.22 mmol) を含む pyridine (1.35 mL) 溶液に Ac_2O (1.35 mL, 9.66 mmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (100 mL) を反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (50 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 3) で精製し、化合物 **57** (703 mg, 95%) を得た。白色固形物。mp 49-50 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 2946, 1676, 1589, 1295, 1161 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2.39 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 7.39 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 9.89 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 20.2, 56.4, 109.2, 124.7, 129.0, 134.7, 141.6, 153.3, 167.2, 189.8; EI-MS m/z 230 ($\text{M}^+ + 2$, 1.93), 228 (M^+ , 5.48), 188 (32.6), 187 (25.0), 186 (100), 185 (49.4); Anal. Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{ClO}_4$: C, 52.53; H, 3.97. Found: C, 52.45; H, 3.95.

tert-Butyl (2E)-3-[4-(acetoxy)-3-chloro-5-methoxyphenyl]prop-2-enoate (63). 化合物 **57** (703 mg, 3.07 mmol), LiCl (234 mg, 5.53 mmol), DBU (0.69 mL, 4.61 mmol), *tert*-butyl diethyl phosphonoacetate (1.08 mL, 4.61 mmol), dry CH_3CN (5 mL) を用い、Horner-Wadsworth-Emmons olefination の一般操作法に従った。1 時間攪拌した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 3) で精製し、化合物 **63** (733 mg, 73%) を得た。白色固形物。mp 148-150 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1764, 1710, 1639, 1492, 1367 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.54 (s, 9H), 2.37 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 6.34 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.97 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 20.3, 28.1, 56.2, 80.9, 109.3, 121.4, 121.6, 128.5, 133.7, 137.7, 141.6, 152.7, 165.7, 167.8; EI-MS m/z 328 ($\text{M}^+ + 2$, 0.17), 326 (M^+ , 0.47), 284 (20.3), 230 (31.7), 229 (11.4), 228 (100), 211 (11.1); Anal. Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{ClO}_5$: C, 58.81; H, 5.86. Found: C, 58.53; H, 5.98.

(2E)-3-[4-(Acetoxy)-3-chloro-5-methoxyphenyl]prop-2-enoic acid (69). 化合物 **63** (500 mg, 1.53 mmol) を含む CH₂Cl₂ (2 mL) 溶液に TFA (2.3 mL, 30.6 mmol) を加え、室温で 1.5 時間攪拌した。反応終了後、H₂O (50 mL) を加え EtOAc (50 mL x 2) で抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (EtOAc) で精製し、化合物 **69** (318 mg, 77%) を得た。白色固形物。mp 213-214 °C; IR (KBr) 2918, 1766, 16387, 1635, 1594, 1185 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.35 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 6.71 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 20.4, 57.0, 111.2, 121.6, 121.8, 127.6, 134.2, 137.4, 142.5, 153.0, 167.9, 168.1; EI-MS *m/z* 272 (M⁺+2, 0.48), 270 (M⁺, 1.49), 230 (32.3), 229 (12.0), 228 (100), 213 (8.08); *Anal.* Calcd for C₁₂H₁₁ClO₅: C, 53.25; H, 4.10. Found: C, 52.97; H, 4.27.

(2E)-3-(3-Chloro-4-hydroxy-5-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid (10). 化合物 **69** (68.8 mg, 0.25 mmol) と K₂CO₃ (74 mg, 0.53 mmol) を含む MeOH (6 mL) 溶液を室温で 2 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (50 mL) を氷冷下で反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (100 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 10 : 1) で精製し、化合物 **10** (49 mg, 86%) を得た。白色固形物。mp 241-243 °C (EtOH); IR (KBr) 3413, 1667, 1626, 1605, 1507, 1424 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.91 (s, 3 H), 6.54 (d, *J* = 16.2 Hz, 1 H), 7.35 (s, 2 H), 7.53 (d, *J* = 16.2 Hz, 1 H), 9.99 (br s, 1 H), 12.3 (br s, 1 H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 57.3, 110.4, 118.5, 120.9, 123.7, 126.9, 144.2, 145.7, 149.7, 168.7; EI-MS *m/z* 230 (M⁺ + 2, 33.1), 229 (13.2), 228 (M⁺, 100), 213 (16.0), 211 (9.00), 167 (9.42); *Anal.* Calcd for C₁₀H₉ClO₄: C, 52.53; H, 3.97. Found: C, 52.50; H, 4.02.

4-Acetoxy-3-iodo-5-methoxybenzaldehyde (58). バニリン誘導体 **52** (1.00 g, 3.60 mmol) を含む pyridine (5 mL) 溶液に Ac₂O (5.03 mL, 36.0 mmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (100 mL) を反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (50 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 7) で精製し、化合物 **58** (1.02 g, 89%) を得た。白色固形物。mp 104-107 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1767, 1690, 1582, 1466, 1389 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.39 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 7.44 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 9.88 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.8, 56.4, 92.1, 110.7, 133.9, 136.0, 145.9, 152.4, 167.2, 189.7; EI-MS *m/z* 320 (M⁺, 3.52), 279 (10.7), 278 (100), 277 (30.9); *Anal.* Calcd for C₁₀H₉IO₄: C, 37.52; H, 2.83. Found: C, 37.48; H, 2.78.

tert-Butyl (2E)-3-[4-(acetoxy)-3-iodo-5-methoxyphenyl]prop-2-enoate (64). 化合物 **58** (568 mg, 1.78 mmol), LiCl (113 mg, 2.67 mmol), DBU (0.31 mL, 2.13 mmol), *tert*-butyl diethyl

phosphonoacetate (0.50 mL, 2.13 mmol), dry CH₃CN (5 mL) を用い、Horner-Wadsworth-Emmons olefination の一般操作法に従った。1 時間攪拌した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 3) で精製し、化合物 **64** (600 mg, 81%) を得た。白色固形物。mp 158-159 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1763, 1699, 1636, 1508, 1393 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.53 (s, 9H), 2.37 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 6.32 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.02 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.8, 28.2, 56.2, 80.9, 92.1, 111.1, 121.6, 130.2, 135.0, 141.3, 142.0, 151.7, 165.7, 167.7; EI-MS *m/z* 418 (M⁺, 0.60), 376 (33.1), 321 (11.2), 320 (100), 303 (9.30), 149 (11.6); *Anal.* Calcd for C₁₆H₁₉IO₄: C, 45.95; H, 4.58. Found: C, 45.77; H, 4.41.

(2E)-3-[4-(Acetoxy)-3-iodo-5-methoxyphenyl]prop-2-enoic acid (70). 化合物 **64** (400 mg, 0.96 mmol) を含む CH₂Cl₂ (10 mL) 溶液に TFA (1.46 mL, 19.2 mmol) を加え、室温で 3 時間攪拌した。反応終了後、H₂O (50 mL) を加え、EtOAc (50 mL x 2) で抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (EtOAc-hexane) で精製し、化合物 **70** (204 mg, 59%) を得た。白色固形物。mp 225-228 °C; IR (KBr) 2986, 1766, 1681, 1628, 1466, 1419 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 2.31 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 6.52 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 20.6, 56.8, 112.5, 121.0, 131.4, 136.3, 143.7, 144.0, 153.3, 169.2, 169.6, 169.9; EI-MS *m/z* 362 (M⁺, 0.92), 321 (10.8), 320 (100); *Anal.* Calcd for C₁₂H₁₁IO₄: C, 39.80; H, 3.06. Found: C, 39.72; H, 3.09.

(2E)-3-(4-Hydroxy-3-iodo-5-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid (14). 化合物 **70** (200 mg, 0.55 mmol) と K₂CO₃ (152 mg, 15.6 mmol) を含む MeOH (40 mL) 溶液を室温で 3 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (150 mL) を氷冷下で反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (100 mL x 3) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (MeOH-EtOAc) で精製し、化合物 **14** (115 mg, 67%) を得た。白色固形物。mp 255-258 °C; IR (KBr) 3375, 1643, 1614, 1495, 1416 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.84 (s, 3H), 6.44 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.02 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 10.0 (br s, 1H), 12.2 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 56.3, 84.5, 110.6, 117.2, 127.7, 131.5, 143.0, 147.2, 148.4, 167.8; EI-MS *m/z* 320 (M⁺, 100), 178 (9.92), 150 (6.04), 122 (3.33); *Anal.* Calcd for C₁₀H₉IO₄: C, 37.52; H, 2.83. Found: C, 37.41; H, 2.88.

Methyl (2E)-3-(4-hydroxy-2,6-dimethylphenyl)prop-2-enoate (75). ヨードフェノール誘導体 **73** (500 mg, 2.02 mmol), Et₃N (1.12 mL, 8.06 mmol), PPh₃ (221 mg, 0.801 mmol), Pd(OAc)₂ (90.5 mg, 0.403 mmol), CH₃CN (5 mL) を用い、Heck reaction の一般操作法に従った。14 時間加熱還流した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 4) で精製し、

化合物 **75** (396 mg, 95%) を得た。白色固形物。mp 137 °C (EtOAc); IR (KBr) 3318, 1651, 1589, 1427, 1273, 1150 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2.33 (s, 6H), 3.81 (s, 3H), 6.06 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 6.57 (s, 2H), 7.85 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 21.4, 51.7, 115.3, 121.6, 126.3, 139.4, 143.1, 155.6, 167.9; EI-MS m/z 206 (M^+ , 51.0), 191 (16.8), 176 (12.9), 175 (100), 174 (13.5), 132 (17.7), 131 (29.7); Anal. Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_3$: C, 69.88; H, 6.84. Found: C, 69.98; H, 6.92.

(2E)-3-(4-Hydroxy-2,6-dimethylphenyl)prop-2-enoic acid (13). 化合物 **75** (437 mg, 2.12 mmol) と 2M NaOH (4.24 mL, 8.24 mmol) 水溶液を含む THF (3 mL) 混合溶液を室温で9時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (100 mL) を反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (100 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 1) で精製し、化合物 **13** (339 mg, 83%) を得た。白色固形物。mp 203-205 °C (EtOH-EtOAc); IR (KBr) 3302, 1690, 1597, 1442, 1311, 1204, 1150 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 2.23 (s, 6H), 5.95 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 6.50 (s, 2H), 7.67 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 9.55 (s, 1H), 12.3 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 21.3, 115.4, 121.6, 124.0, 138.8, 141.8, 157.5, 167.8; EI-MS m/z 192 (M^+ , 100), 177 (39.3), 175 (37.9), 174 (15.9), 147 (50.6), 146 (60.9), 145 (19.4), 133 (11.7), 132 (21.9), 131 (42.2); Anal. Calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3$: C, 68.74; H, 6.29. Found: C, 68.73; H, 6.25.

4-Iodo-2-(trifluoromethoxy)phenol (72). フェノール誘導体 **71** (1.00 g, 5.62 mmol) とオルト過ヨウ素酸 (1.34 g, 5.90 mmol) を含む MeOH (8 mL) 溶液に、 H_2O (30 mL) で溶解させた Na_2SO_3 (1.64 g, 13.0 mmol) 水溶液を氷冷下で加えた後、室温で10時間攪拌した。反応終了後、飽和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 水溶液 (100 mL) を反応溶液に加え、EtOAc (100 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 30) で精製し、化合物 **72** (547 mg, 32%) を得た。無色油状物。IR (neat) 3480, 2926, 2359, 1456, 1261, 758 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.70 (s, 1H), 6.73 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.21-7.23 (m, 1H), 7.64 (dd, $J = 1.6$ and 8.0 Hz, 1H); ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -58.1 (s); EI-MS m/z 304 (M^+ , 100), 284 (52.5), 218 (27.0); HRMS (EI) for $\text{C}_7\text{H}_4\text{F}_3\text{IO}_2$ calcd 303.9208 (M^+), Found 303.9210.

Methyl (2E)-3-[4-hydroxy-3-(trifluoromethoxy)phenyl]prop-2-enoate (74). ヨードフェノール誘導体 **72** (561 mg, 1.85 mmol), Et_3N (1.02 mL, 7.38 mmol), PPh_3 (194 mg, 0.738 mmol), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (41.4 mg, 0.185 mmol), CH_3CN (5 mL) を用い、Heck reaction の一般操作法に従った。5時間加熱還流した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 8) で精製し、化合物 **74** (384 mg, 79%) を得た。白色固形物。mp 127 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 3277, 1699, 1479, 1339, 1271, 1150 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.84 (s, 3H), 6.64 (d, $J = 16.0$ Hz,

1H), 6.92 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.24-7.29 (m, 1H), 7.45 (dd, $J = 1.3$ and 8.0 Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 8.20 (d, $J = 16.0$ Hz, 1 H); ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -58.1 (s); EI-MS m/z 262 (M^+ , 23.4), 231 (18.9), 230 (100), 211 (20.2), 202 (80.0), 133 (10.6), 117 (13.2); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{F}_3\text{O}_4$: C, 50.39; H, 3.46. Found: C, 50.39; H, 3.52.

(2E)-3-[4-Hydroxy-3-(trifluoromethoxy)phenyl]prop-2-enoic acid (11). 化合物 **74** (430 mg, 1.64 mmol) と 2M NaOH (3.28 mL, 6.56 mmol) 水溶液を含む THF (15 mL) 混合溶液を室温で 10 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (100 mL) を反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (100 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (EtOAc-hexane) で精製し、化合物 **11** (285 mg, 70%) を得た。白色固形物。mp 182-184 °C; IR (KBr) 3055, 1674, 1626, 1233, 1155 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 6.61 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.92 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.25-7.28 (m, 1H), 7.53 (dd, $J = 1.2$ and 7.9 Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 21.4, 51.7, 115.3, 121.6, 126.3, 139.4, 143.1, 155.6, 167.9; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) δ -59.9 (s); EI-MS m/z 248 (M^+ , 33.9), 230 (75.4), 202 (100), 133 (19.5), 105 (11.1); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{F}_3\text{O}_4$: C, 48.40; H, 2.84. Found: C, 48.62; H, 2.91.

Methyl (2E)-3-(4-hydroxy-2,3-dimethoxyphenyl)prop-2-enoate (81). ヨードフェノール誘導体 **80** (100 mg, 0.357 mmol), Et_3N (0.2 mL, 1.43 mmol), PPh_3 (37.5 mg, 0.143 mmol), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (8.02 mg, 0.036 mmol), CH_3CN (3 mL) を用い、Heck reaction の一般操作法に従った。5 時間加熱還流した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 3) で精製し、化合物 **81** (53.4 mg, 63%) を得た。白色固形物。mp 128 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 3341, 1697, 1605, 1327, 1165, 1003 cm^{-1} ; ^1H NMR (700 MHz, CDCl_3) δ 3.80 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 6.49 (s, 1H), 6.51 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.58 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.85 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 51.5, 55.8, 61.0, 104.0, 105.0, 116.6, 125.0, 135.4, 140.2, 149.3, 153.7, 168.3; EI-MS m/z 238 (M^+ , 58.7), 207 (33.6), 206 (100), 192 (13.6), 191 (29.5), 163 (40.4); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_5$: C, 60.50; H, 5.92. Found: C, 60.64; H, 5.87.

(2E)-3-(4-Hydroxy-2,3-dimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid (5). 化合物 **81** (200 mg, 0.839 mmol) と 2M NaOH (0.84 mL, 1.68 mmol) 水溶液を含む THF (2 mL) 混合溶液を室温で 3 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (50 mL) を反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (50 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 3 : 2) で精製し、化合物 **5** (217 mg, 97%) を得た。白色固形物。mp 242 °C (EtOH-EtOAc); IR (KBr) 3420, 1608, 1294, 1261, 1209, 1096 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 3.69 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 6.44 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.59 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.74 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 9.58 (br s, 1H), 12.1 (br

s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 49.0, 56.2, 60.7, 104.4, 115.8, 116.7, 124.6, 136.6, 140.2, 150.5, 155.0, 168.7; EI-MS m/z 224 (M^+ , 91.0), 207 (16.3), 206 (100), 191 (39.0), 180 (19.0), 178 (12.4), 149 (12.5); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5$: C, 58.99; H, 5.39. Found: C, 58.93; H, 5.39.

2. 質量分析

ペプチド混合物. SUB P、OXT、BDK (1-7)、ANG II、ACTH (18-39)、(PPG) $_{10}$ 、Insulin B を 0.1% TFA に溶解させ、各々のペプチドが 10 pmol/ μL になるように混合溶液を調製した。

Matrix. 各々の FA 誘導体、CHCA と DHB (Sigma-Aldrich) は 3 mg ずつ採取しアセトニトリル 300 μL を溶媒として懸濁溶液を調製した。これら溶液を 1 μL とペプチド混合溶液 (10 pmol/ μL) 1 μL をプレート上で混合し、自然乾燥させた後 MALDI-TOFMS と MALDI-QIT-TOFMS で測定した。

MALDI. MALDI-TOFMS (AXIMA-CFR : Shimadzu) の測定は、ACTH (18-39) の分子イオンを用いてキャリブレーションした後、リフレクトロンモードにより積算回数 500 でおこなった。MALDI-QIT-TOFMS (AXIM-QIT: Shimadzu) は、ACTH (18-39) と BDK (1-7) の分子イオンを用いてキャリブレーションした後、MS/MS 測定を積算回数 500 でおこなった。親イオンは、共通して検出された m/z 2337.9 のピークを用いておこなった。

第 2 節 置換基効果に着目した FA 誘導体の分子設計および合成

1. 量子化学計算

化合物 **76** および **82** の構造最適化は、Gaussian09 プログラムを用いて、DFT-B3LYP/6-311G** レベルで計算をおこなった。

2. 化合物合成

本節で合成した FA 誘導体のうち、(2E)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-5-nitrophenyl)prop-2-enoic acid (**16**)³⁷ は文献既知の方法で合成した。バニリン誘導体誘導体とその合成原料、4-benzyloxy-3-methoxybenzaldehyde (**82**)³⁹, 4-acetoxy-3-methoxy-2-nitrophenyl acetate (**83**)⁴⁰, 4-benzyloxy-5-methoxy-2-nitrobenzaldehyde (**84**)³⁹, 4-acetoxy-5-methoxy-2-nitrobenzaldehyde (**85**)⁵⁸, 4-formyl-5-iodo-2-methoxyphenyl-2,2-dimethylpropanoate (**89**)⁴⁶, は文献既知の方法で合成した。4-Acetoxy-2-methoxybenzaldehyde (**76**) は市販品を使用した。

Horner-Wadsworth-Emmons olefination (一般操作)

第 1 節と同様におこなった。

4-Acetoxy-2-amino-3-methoxybenzaldehyde (86). 化合物 **83** (500 mg, 4.18 mmol), iron(II) sulfate heptahydrate (125 mg, 0.450 mmol), iron powder (1.25 g, 22.8 mmol) を含む EtOH : H₂O (3 : 1, 4 mL) 混合溶液を 100 °C で 3 時間攪拌した。反応終了後、鉄をろ過し、溶媒を減圧留去し濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 3) で精製

し、化合物 **86** (357 mg, 82%) を得た。白色固形物。mp 92-94 °C (Hexane); IR (KBr) 3472, 3347, 1757, 1661, 1557, 1254 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2.35 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 6.46 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.27 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 9.83 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 20.9, 60.2, 77.3, 110.8, 117.7, 131.2, 138.0, 145.2, 168.3, 193.0; EI-MS m/z 209 (M^+ , 64.7), 167 (100), 152 (41.8), 139 (45.2), 124 (53.3); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_4$: C, 57.41; H, 5.30. Found: C, 57.14; H, 5.38.

4-Acetoxy-2-bromo-3-methoxybenzaldehyde (87). 化合物 **86** (100 mg, 0.478 mmol), 48% HBr (0.90 mL) の溶液に NaNO_2 (44 mg, 0.637 mmol) の水溶液 (2.5 mL) を加え、45 °C で 30 分間攪拌した。さらに、CuBr (35 mg, 0.244 mmol) を加え、70 °C で 1.5 時間攪拌した。反応終了後、固形物がなくなるまで EtOAc を加え、さらに飽和 NaHCO_3 水溶液 (20 mL) と飽和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 水溶液 (20 mL) を加え攪拌した。EtOAc で抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 5) で精製し、化合物 **87** (55 mg, 42%) を得た。白色固形物。mp 75-77 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1771, 1694, 1584, 1474, 1371 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2.35 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 7.52 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 10.32 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 20.7, 61.3, 123.1, 123.3, 125.5, 132.5, 149.4, 149.9, 168.1, 190.2; EI-MS m/z 274 (M^{+2} , 5.30), 272 (M^+ , 5.29), 232 (97.2), 231 (55.5), 230 (100), 229 (46.7); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{BrO}_4$: C, 43.98; H, 3.32. Found: C, 43.88; H, 3.36.

4-Acetoxy-2-iodo-3-dimethoxybenzaldehyde (88). 化合物 **86** (800 mg, 3.82 mmol), 20% HCl (8 mL) の溶液に NaNO_2 (290 mg, 4.20 mmol) の水溶液 (3 mL) を加え、0 °C で 15 分間攪拌した。さらに、KI (4.76 g, 28.7 mmol) を溶かした水溶液を 0 °C で 30 分間かけて滴下し、室温で 3 時間攪拌した。反応終了後、固形物が消失するまで EtOAc を加え、さらに飽和 NaHCO_3 水溶液 (50 mL) と飽和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 水溶液 (50 mL) を加え攪拌した。EtOAc で抽出後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 9) で精製し、化合物 **88** (1.11 g, 80%) を得た。白色固形物。mp 64 °C (Hexane); IR (KBr) 1767, 1690, 1578, 1472, 1368 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2.37 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 7.21 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 10.1 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 20.8, 61.2, 100.2, 124.1, 126.4, 134.3, 148.4, 152.2, 168.0, 194.9; EI-MS m/z 320 (M^+ , 10.6), 278 (100), 277 (23.0); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{IO}_4$: C, 37.52; H, 2.83. Found: C, 37.52; H, 2.93.

4-Hydroxy-2-iodo-5-methoxybenzaldehyde (90). 化合物 **89** (2.12 g, 5.84 mmol) と K_2CO_3 (1.21 g, 8.76 mmol) を含む MeOH (20 mL) 溶液を室温で 3 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (100 mL) を氷冷下で反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (100 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (EtOAc) で精

製し、化合物 **90** (1.41 g, 87%) を得た。白色固形物。mp 208 °C; IR (KBr) 3063, 1659, 1558, 1396, 1281, 1157 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.80 (s, 3H), 7.31 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 9.70 (s, 1H), 10.7 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 56.1, 93.7, 112.5, 126.3, 127.0, 148.9, 154.1, 194.3; EI-MS *m/z* 278 (M⁺, 100), 277 (32.1), 150 (12.9), 122 (10.2); HRMS (EI) for C₈H₇IO₃ calcd 277.9440 (M⁺), Found 277.9439.

4-Acetoxy-2,5-dimethoxybenzaldehyde (91). バニリン誘導体 **90** (212 mg, 0.899 mmol), NaOMe (583 mg, 10.8 mmol), と CuCl₂ (60.5 mg, 0.450 mmol) を含む DMF (3 mL) 溶液を 2 時間加熱還流した。反応終了後、10% HCl (100 mL) を反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (100 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣を pyridine (1 mL) に溶解させた後、氷冷下で Ac₂O (1 mL) 滴下し 1 時間室温で攪拌した。反応終了後、10% HCl (100 mL) を反応溶液に加え pH 3 に中和し、水層を EtOAc (100 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 8) で精製し、化合物 **91** (121 mg, 60%) を得た。白色固形物。mp 89 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 2940, 1775, 1690, 1520, 1335, 1288 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.29 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 6.65 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.97 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 12.7 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.8, 57.5, 113.0, 120.9, 124.8, 130.8, 139.7, 139.8, 140.6, 155.7, 167.4, 168.4; EI-MS *m/z* 281 (M⁺, 5.10), 239 (30.1), 194 (16.7), 193 (100), 178 (10.9), 166 (41.2), 138 (17.3); *Anal.* Calcd for C₁₁H₁₂O₅: C, 58.93; H, 5.39. Found: C, 58.84; H, 5.36.

tert-Butyl (2E)-3-[4-(acetoxy)-3-methoxy-2-nitrophenyl]prop-2-enoate (92). 化合物 **83** (1.00 g, 4.18 mmol), LiCl (266 mg, 6.27 mmol), DBU (0.752 mL, 5.02 mmol), *tert*-butyl diethyl phosphonoacetate (1.18 mL, 5.02 mmol), dry CH₃CN (15 mL) を用い、Horner-Wadsworth-Emmons olefination の一般操作法に従った。1 時間攪拌した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 5) で精製し、化合物 **92** (789 mg, 56%) を得た。黄色油状物。IR (neat) 1773, 1709, 1639, 1537, 1499, 1283 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.51 (s, 9H), 2.38 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 6.36 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.8, 28.1, 62.7, 81.4, 122.2, 125.7, 125.8, 125.9, 134.5, 144.1, 144.8, 164.7, 168.0; EI-MS *m/z* 337 (M⁺, 1.69), 295 (18.5), 264 (19.8), 239 (25.3), 222 (27.0), 221 (51.5), 194 (17.5), 193 (75.5), 178 (21.2), 176 (46.2), 175 (27.4), 166 (56.7), 164 (13.1), 163 (28.7), 151 (11.3), 149 (11.2); HRMS (EI) for C₁₆H₁₉NO₇ Calcd 337.1162 (M⁺), Found 337.1170.

(2E)-3-[4-(Acetoxy)-3-methoxy-2-nitrophenyl]prop-2-enoic acid (97). 化合物 **92** (600 mg, 1.78 mmol) を含む CH₂Cl₂ (10 mL) 溶液に TFA (2.72 mL, 35.6 mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌

した。反応終了後、H₂O (50 mL) を加え、EtOAc (50 mL x 2) で抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (EtOAc) で精製し、化合物 **97** (250 mg, 50%) を得た。黄色固形物。mp 178 °C; IR (KBr) 3007, 1761, 1703, 1535, 1362, 1204 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.37 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 6.70 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 12.9 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 21.0, 63.2, 123.4, 125.0, 125.5, 127.6, 134.5, 143.8, 144.9, 145.3, 166.9, 168.8; EI-MS *m/z* 281 (M⁺, 6.50), 240 (10.6), 239 (94.9), 222 (29.2), 221 (89.7), 194 (22.0), 193 (100), 179 (10.4), 178 (30.2), 176 (14.5), 175 (44.0), 164 (21.8), 163 (44.5), 151 (18.7), 150 (16.3), 149 (22.0), 148 (16.7); *Anal.* Calcd for C₁₂H₁₁NO₇: C, 51.25; H, 3.94; N, 4.98; Found: C, 51.13; H, 4.03; N, 4.70.

(2E)-3-(4-Hydroxy-3-methoxy-2-nitrophenyl)prop-2-enoic acid (15). 化合物 **97** (200 mg, 0.712 mmol) と K₂CO₃ (296 mg, 2.14 mmol) を含む MeOH (5 mL) 溶液を室温で 3 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (50 mL) を氷冷下で反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (50 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (EtOH) で精製し、化合物 **15** (100 mg, 59%) を得た。黄色固形物。mp 242 °C; IR (KBr) 3443, 1694, 1624, 1489, 1440 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.82 (s, 3H), 6.48 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 11.1 (br s, 1H), 12.6 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 61.8, 116.9, 119.5, 121.6, 123.7, 135.4, 139.0, 146.2, 153.4, 167.4; EI-MS *m/z* 239 (M⁺, 48.8), 222 (10.2), 194 (10.8), 193 (100), 178 (46.9), 166 (44.0), 164 (22.0), 163 (12.8), 151 (27.2), 150 (32.9), 149 (37.2), 148 (15.3), 138 (12.1), 137 (11.7), 136 (15.6), 135 (18.9), 134 (15.0), 133 (30.1), 132 (20.5), 131 (11.0), 123 (17.0), 122 (24.2), 120 (19.9), 119 (13.6), 118 (12.8), 110 (16.5), 109 (14.1), 108 (11.3), 107 (18.3); *Anal.* Calcd for C₁₀H₉NO₆: C, 50.22; H, 3.79; N, 5.86; Found: C, 50.11; H, 3.84; N, 5.86.

tert-Butyl (2E)-3-[4-(acetoxy)-5-methoxy-2-nitrophenyl]prop-2-enoate (93). 化合物 **85** (956 mg, 4.00 mmol), LiCl (254 mg, 6.00 mmol), DBU (0.704 mL, 4.80 mmol), *tert*-butyl diethyl phosphonoacetate (1.13 mL, 4.80 mmol), dry CH₃CN (5 mL) を用い、Horner-Wadsworth-Emmons olefination の一般操作法に従った。1 時間攪拌した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 8) で精製し、化合物 **93** (815 mg, 61%) を得た。黄色固形物。mp 135-137 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1775, 1713, 1527, 1342, 1157 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.54 (s, 9H), 2.34 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 6.23 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 8.14 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.5, 28.1, 56.6, 81.3, 111.6, 120.7, 125.3, 131.6, 139.7, 139.9, 140.2, 155.4, 164.9, 168.1; EI-MS *m/z* 337 (M⁺, 1.15), 235 (12.1), 194 (17.2), 193 (77.7), 178 (32.0); *Anal.* Calcd for C₁₆H₁₉NO₇: C, 56.97; H, 5.68; N, 4.15. Found: C, 51.75; H, 4.17; N, 4.07.

(2E)-3-[4-(Acetoxy)-5-methoxy-2-nitrophenyl]prop-2-enoic acid (98). 化合物 **93** (660 mg, 1.96 mmol) を含む CH₂Cl₂ (5 mL) 溶液に TFA (3 mL, 39.2 mmol) を加え、室温で 0.5 時間攪拌した。反応終了後、H₂O (50 mL) を加え、EtOAc (50 mL x 2) で抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (MeOH-EtOH) で精製し、化合物 **98** (300 mg, 55%) を得た。黄色固形物。mp 233 °C; IR (KBr) 2940, 1775, 1690, 1520, 1335, 1288 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.29 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 6.65 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.97 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 12.7 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 20.8, 57.5, 113.0, 120.9, 124.8, 130.8, 139.7, 139.8, 140.6, 155.7, 167.4, 168.4; EI-MS *m/z* 281 (M⁺, 5.10), 239 (30.1), 194 (16.7), 193 (100), 178 (10.9), 166 (41.2), 138 (17.3); *Anal.* Calcd for C₁₂H₁₁NO₇: C, 51.25; H, 3.94; N, 4.98. Found: C, 51.07; H, 4.00; N, 4.86.

(2E)-3-(4-Hydroxy-5-methoxy-2-nitrophenyl)prop-2-enoic acid (17). 化合物 **98** (200 mg, 0.71 mmol) と K₂CO₃ (296 mg, 2.14 mmol) を含む MeOH (5 mL) 溶液を室温で 3 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (50 mL) を氷冷下で反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (50 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (EtOAc) で精製し、化合物 **17** (80 mg, 47%) を得た。黄色固形物。mp 245 °C; IR (KBr) 3406, 1689, 1669, 1523, 1419 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.94 (s, 3H), 6.55 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.92 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 10.5 (br s, 1H), 12.5 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 56.9, 111.3, 111.7, 122.3, 122.7, 139.8, 141.6, 148.5, 152.6, 167.8; EI-MS *m/z* 239 (M⁺, 15.4), 194 (15.5), 193 (100), 178 (20.5), 166 (44.2), 150 (17.1), 138 (25.7), 123 (15.7), 122 (21.4), 111 (13.6); *Anal.* Calcd for C₁₀H₉NO₆: C, 50.22; H, 3.79; N, 5.86. Found: C, 50.19; H, 3.69; N, 6.00.

tert-Butyl (2E)-3-[4-(acetoxy)-2-bromo-3-methoxyphenyl]prop-2-enoate (94). 化合物 **87** (500 mg, 1.83 mmol), LiCl (139 mg, 3.29 mmol), DBU (0.40 mL, 2.75 mmol), *tert*-butyl diethyl phosphonoacetate (0.64 mL, 2.20 mmol), dry CH₃CN (5 mL) を用い、Horner-Wadsworth-Emmons olefination の一般操作法に従った。1 時間攪拌した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 9) で精製し、化合物 **94** (486 mg, 72%) を得た。白色固形物。mp 62-64 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1763, 1714, 1636, 1479, 1396 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.53 (s, 9H), 2.34 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 6.26 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.7, 28.2, 61.0, 80.9, 121.1, 122.6, 123.0, 123.3, 134.2, 141.4, 145.3, 149.8, 165.6, 168.6; EI-MS *m/z* 372 (M⁺+2, 0.22), 370 (M⁺, 0.23), 194 (11.0), 193 (100), 178 (20.1); *Anal.* Calcd for C₁₆H₁₉BrO₅: C, 51.77; H, 5.16. Found: C, 51.80; H, 5.12.

(2E)-3-[4-(Acetoxy)-2-bromo-3-methoxyphenyl]prop-2-enoic acid (99). 化合物 **94** (390 mg, 1.05 mmol) を含む CH₂Cl₂ (2 mL) 溶液に TFA (1.6 mL, 21 mmol) を加え、室温で 1.5 時間攪拌した。反応終了後、H₂O (50 mL) を加え、EtOAc (50 mL x 2) で抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (MeOH) で精製し、化合物 **99** (166 mg, 50%) を得た。白色固形物。mp 214-216 °C; IR (KBr) 3017, 1753, 1690, 1628, 1483, 1421 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.32 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 6.52 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 12.4 (br s, 1H); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 21.0, 61.3, 120.7, 123.2, 124.0, 124.1, 133.4, 141.4, 145.7, 149.8, 167.5, 169.0; EI-MS *m/z* 316 (M⁺+2, 1.14), 314 (M⁺, 1.12), 274 (14.8), 272 (14.9), 194 (10.9), 193 (100), 178 (25.7); *Anal.* Calcd for C₁₂H₁₁BrO₅: C, 45.74; H, 3.52. Found: C, 45.49; H, 3.49.

(2E)-3-(3-Bromo-4-hydroxy-5-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid (19). 化合物 **99** (360 mg, 1.14 mmol) と K₂CO₃ (800 mg, 6.06 mmol) を含む MeOH (6 mL) 溶液を室温で 3 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (50 mL) を氷冷下で反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (100 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (EtOAc) で精製し、化合物 **19** (193 mg, 62%) を得た。白色固形物。mp 218-219 °C; IR (KBr) 3244, 1690, 1676, 1595, 1423 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.72 (s, 3H), 6.33 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 10.4 (br s, 1H), 12.4 (br s, 1H); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 60.2, 116.9, 119.4, 121.3, 124.4, 125.5, 142.4, 145.4, 153.5, 167.9; EI-MS *m/z* 274 (M⁺+2, 7.09), 272 (M⁺, 7.30), 194 (11.1), 193 (100), 178 (50.4); *Anal.* Calcd for C₁₀H₉BrO₄: C, 43.98; H, 3.32. Found: C, 43.90; H, 3.43.

tert-Butyl (2E)-3-[4-(acetoxy)-2-iodo-3-methoxyphenyl]prop-2-enoate (95). 化合物 **88** (225 mg, 0.703 mmol), LiCl (44.7 mg, 1.05 mmol), DBU (0.125 mL, 0.844 mmol), *tert*-butyl diethyl phosphonoacetate (0.197 mL, 0.844 mmol), dry CH₃CN (5 mL) を用い、Horner-Wadsworth-Emmons olefination の一般操作法に従った。1 時間攪拌した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 10) で精製し、化合物 **95** (234 mg, 80%) を得た。白色固形物。mp 56 °C (Hexane); IR (KBr) 1765, 1709, 1634, 1476, 1368 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.54 (s, 9H), 2.35 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 6.21 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.8, 28.2, 61.0, 80.9, 100.0, 123.1, 123.4, 123.7, 137.6, 144.0, 146.2, 152.0, 165.5, 168.6; EI-MS *m/z* 418 (M⁺, 0.66), 320 (10.3), 235 (13.2), 194 (11.6), 193 (100), 178 (14.5); *Anal.* Calcd for C₁₆H₁₉IO₅: C, 45.95; H, 4.58. Found: C, 45.85; H, 4.57.

(2E)-3-[4-(Acetoxy)-2-iodo-3-methoxyphenyl]prop-2-enoic acid (100). 化合物 **95** (100 mg, 0.239

mmol) を含む CH_2Cl_2 (2 mL) 溶液に TFA (0.365 mL, 4.78 mmol) を加え、室温で 1.5 時間攪拌した。反応終了後、 H_2O (50 mL) を加え、EtOAc (50 mL x 2) で抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥濃縮した。残渣を再結晶 (EtOAc) で精製し、化合物 **100** (52.9 mg, 61%) を得た。白色固形物。mp 203-208 °C; IR (KBr) 2984, 1755, 1683, 1636, 1474, 1207 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 2.32 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 6.44 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H) 7.25 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.63 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 12.7 (br s, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 21.0, 61.1, 101.3, 122.9, 124.1, 124.8, 136.8, 144.4, 146.6, 152.2, 167.5, 169.0; EI-MS m/z 362 (M^+ , 5.36), 320 (44.0), 194 (12.7), 193 (100), 178 (30.6); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{IO}_5$: C, 39.80; H, 3.06. Found: C, 39.65; H, 3.01.

(2E)-3-(2-Iodo-4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid (20). 化合物 **100** (288 mg, 0.794 mmol) と K_2CO_3 (549 mg, 3.97 mmol) を含む MeOH (6 mL) 溶液を室温で 3 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (50 mL) を氷冷下で反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (100 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (EtOAc) で精製し、化合物 **20** (40 mg, 18%) を得た。白色固形物。mp 195 °C; IR (KBr) 3381, 1682, 1620, 1474, 1439 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 3.69 (s, 3H), 6.27 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.76 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 10.3 (br s, 1H), 12.3 (br s, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 59.9, 102.2, 117.6, 119.3, 124.4, 128.8, 147.6, 147.9, 152.3, 167.9; EI-MS m/z 320 (M^+ , 13.4), 194 (11.2), 193 (100), 178 (44.3); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{IO}_4$: C, 37.52; H, 2.83. Found: C, 37.37; H, 2.89.

tert-Butyl (2E)-3-[4-(acetoxy)-2,5-dimethoxyphenyl]prop-2-enoate (96). 化合物 **91** (287 mg, 1.19 mmol), LiCl (81.4 mg, 1.92 mmol), DBU (0.230 mL, 1.54 mmol), *tert*-butyl diethyl phosphonoacetate (0.361 mL, 1.54 mmol), dry CH_3CN (3 mL) を用い、Horner-Wadsworth-Emmons olefination の一般操作法に従った。1 時間攪拌した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 5) で精製し、化合物 **96** (385 mg, 93%) を得た。白色固形物。mp 135 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1762, 1696, 1512, 1410, 1374, 1283 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.53 (s, 9H), 2.32 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 6.38 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.65 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.88 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 20.7, 56.1, 56.5, 80.4, 107.1, 112.1, 120.5, 121.5, 138.1, 141.7, 145.0, 152.6, 166.6, 168.7; EI-MS m/z 322 (M^+ , 11.4), 280 (37.8), 225 (12.0), 224 (100), 209 (14.6), 207 (10.9), 177 (15.9); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_6$: C, 63.34; H, 6.88. Found: C, 63.26; H, 6.86.

(2E)-3-[4-(Acetoxy)-2,5-dimethoxyphenyl]prop-2-enoic acid (101). 化合物 **96** (385 mg, 1.19 mmol) を含む CH_2Cl_2 (10 mL) 溶液に TFA (1.82 mL, 23.8 mmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。反応終了後、 H_2O (50 mL) を加え、EtOAc (50 mL x 2) で抽出し、有機層を飽和食塩

水で洗浄した後、Na₂SO₄で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (EtOAc) で精製し、化合物 **101** (145 mg, 46%) を得た。白色固形物。mp 200 °C; IR (KBr) 2940, 1767, 1684, 1616, 1508, 1410, 1298 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.25 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 6.60 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.92 (s, 3H), 7.42 (s, 3H), 7.47 (s, 1H), 7.81 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 12.3 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 20.9, 56.8, 108.2, 112.5, 119.8, 120.7, 138.2, 142.2, 145.5, 152.4, 168.4, 168.7; EI-MS *m/z* 266 (M⁺, 11.4), 225 (11.9), 224 (100), 209 (15.9), 177 (28.5); *Anal.* Calcd for C₁₃H₁₄O₆: C, 58.64; H, 5.30. Found: C, 58.43; H, 5.34.

(2E)-3-(4-Hydroxy-2,5-dimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid (21). 化合物 **101** (145 mg, 0.55 mmol) と K₂CO₃ (151 mg, 1.09 mmol) を含む MeOH (3 mL) 溶液を室温で 3 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (50 mL) を氷冷下で反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (50 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (EtOH-EtOAc) で精製し、化合物 **21** (74.4 mg, 61%) を得た。白色固形物。mp 193 °C; IR (KBr) 3449, 2963, 1663, 1589, 1522, 1285 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.73 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 6.36 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 9.69 (br s, 1H), 12.0 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 56.3, 56.8, 100.7, 112.2, 113.2, 115.5, 139.2, 142.4, 151.0, 153.9, 168.8; EI-MS *m/z* 224 (M⁺, 100), 209 (20.2), 177 (42.3), 149 (15.5); *Anal.* Calcd for C₁₁H₁₂O₅: C, 58.93; H, 5.39; Found: C, 58.81; H, 5.34.

tert-Butyl (2E)-3-{4-[(2,2-dimethylpropanoyl)oxy]-2-iodo-5-methoxyphenyl}prop-2-enoate (102). 化合物 **89** (600 mg, 1.66 mmol), LiCl (105 mg, 2.49 mmol), DBU (0.30 mL, 1.99 mmol), *tert*-butyl diethyl phosphonoacetate (0.47 mL, 1.99 mmol), dry CH₃CN (5 mL) を用い、Horner-Wadsworth-Emmons olefination の一般操作法に従った。1 時間攪拌した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 20) で精製し、化合物 **102** (507 mg, 66%) を得た。白色固形物。mp 156-158 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1751, 1705, 1636, 1489, 1373 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.35 (s, 9H), 1.55 (s, 9H), 3.82 (s, 3H), 6.22 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 27.1, 28.2, 39.1, 56.0, 80.9, 110.4, 122.8, 133.4, 136.0, 141.9, 146.3, 151.8, 165.5, 176.1; EI-MS *m/z* 460 (M⁺, 6.98), 404 (11.4), 302 (31.2), 194 (11.9), 193 (100), 85 (16.5), 57 (78.7); *Anal.* Calcd for C₁₉H₂₅IO₅: C, 49.58; H, 5.47. Found: C, 49.38; H, 5.36.

(2E)-3-{4-[(2,2-Dimethylpropanoyl)oxy]-2-iodo-5-methoxyphenyl}prop-2-enoic acid (103). 化合物 **102** (350 mg, 0.76 mmol) を含む CH₂Cl₂ (5 mL) 溶液に TFA (1.16 mL, 15.2 mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応終了後、H₂O (50 mL) を加え、EtOAc (50 mL x 2) で抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (EtOAc-hexane) で精製し、化合物 **103** (247 mg, 80%) を得た。白色固形物。mp 204-206 °C; IR (KBr) 2970, 1751,

1690, 1635, 1489, 1381 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.27 (s, 9H), 1.55 (s, 1H), 2.30 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 6.64 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.67 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 27.2, 56.8, 90.4, 111.9, 123.0, 133.3, 135.6, 142.0, 146.3, 152.0, 167.6, 175.9; EI-MS m/z 404 (M^+ , 17.5), 302 (25.6), 194 (12.2), 193 (100), 178 (10.4), 85 (17.6), 57 (86.7); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{IO}_5$: C, 44.57; H, 4.24. Found: C, 44.36; H, 4.27.

(2E)-3-(4-Hydroxy-2-iodo-3-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid (18). 化合物 **103** (200 mg, 0.495 mmol) と K_2CO_3 (144 mg, 1.04 mmol) を含む MeOH (5 mL) 溶液を室温で 3 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (50 mL) を氷冷下で反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (50 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (MeOH-EtOAc) で精製し化合物 **18** (78.4 mg, 50%) を得た。白色固形物。mp 240-241 $^\circ\text{C}$; IR (KBr) 3248, 1674, 1558, 1497, 1404 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 3.81 (s, 3H), 6.44 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.62 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 56.3, 92.9, 110.9, 119.4, 125.7, 127.8, 147.1, 149.0, 150.3, 168.1; EI-MS m/z 320 (M^+ , 8.67), 276 (100), 261 (38.5), 193 (44.7), 178 (11.0), 134 (18.8); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{IO}_4$: C, 37.52; H, 2.83. Found: C, 37.48; H, 2.91.

第 3 節 芳香環上の置換基効果の検討

質量分析

ペプチド混合物. SUB P, BDK (1-7), ANG II, IRL 1620, ACTH (18-39), (PPG)₁₀, Insulin B, CRF は、0.1% TFA に溶解させ、各々が 5 pmol/ μL になるようにペプチド混合溶液を調製した。

Matrix. Matrix としての FA 誘導体の調整方法は、ACTH (18-39) を測定試料とし、検討した条件のなかで最も高い分子イオンの強度を検出した条件でおこなった。

各々の FA 誘導体は、全て 3 mg を計量し、有機溶媒に溶解させた。誘導体 **1** は、33% アセトニトリル水溶液 300 μL で懸濁溶液を調製後、100 μL を取り出し 3 倍希釈した溶液を測定に用いた。誘導体 **5** は、60% アセトニトリル水溶液 (500 μL) を用いて懸濁溶液を調製後、100 μL を取り出し 3 倍希釈した溶液を測定に用いた。誘導体 **21** は、誘導体 **5** と同様に懸濁溶液を調製後、6 倍希釈した溶液を測定に用いた。誘導体 **19** は、アセトニトリル (300 μL) で懸濁溶液を調製後、100 μL 取り出し 3 倍希釈した溶液を測定に用いた。誘導体 **8** は、アセトニトリル (400 μL) と MeOH (80 μL) により懸濁溶液を調製後、10 倍希釈した溶液を測定に用いた。誘導体 **9** は、アセトニトリル (600 μL) で懸濁溶液調製後、100 μL 取り出しアセトニトリル 200 μL で 3 倍希釈した溶液を使用した。誘導体 **20** は、誘導体 **9** と同様に調製した。誘導体 **14** は、アセトニトリル (600 μL) で懸濁溶液を調製後、100 μL を取り出し 9 倍希釈した溶液を測定に用いた。誘導体 **18** は、誘導体 **9** と同様に調製した。誘導体 **15** は、アセトニトリル (300 μL) と MeOH (20 μL) で懸濁溶液を調製後、100 μL を取り出し 5 倍希

積した溶液を測定に用いた。誘導体 **16** は、アセトニトリル (300 μL) と MeOH (100 μL) で過飽和溶液を調製後、100 μL を取り出し 5 倍希釈した溶液を測定に用いた。誘導体 **17** は、アセトニトリル (300 μL) で過飽和溶液を調製後、100 μL を取り出し、3 倍希釈した溶液を測定に用いた。

CHCA (島津ジーエルシー) は 5 mg を 0.1% TFA (300 μL)、アセトニトリル (200 μL) を用いて懸濁溶液を調製し使用した。DHB (島津ジーエルシー) は 5 mg を 0.1% TFA (344 μL)、アセトニトリル (166 μL) を用いて懸濁溶液を調製した

MALDI. 上記の条件で調整したペプチド混合物 (5 pmol/ μL) と Matrix を 1 μL ずつ測りとり、サンプルチューブ内で混合させ、全量を MALDI プレートに置き、自然乾燥させた。

MALDI-TOFMS (AXIMA-CFR : Shimadzu) の測定は、ACTH (18-39) の分子イオンを用いてキャリブレーションした後、リフレクトロンモードにより積算回数 500 でおこなった。

MALDI-QIT-TOFMS (AXIM-QIT: Shimadzu) は、ACTH (18-39) と BDK (1-7) の分子イオンを用いてキャリブレーションした後、MS/MS 測定を積算回数 500 でおこなった。親イオンは、(PPG)₁₀ の分子イオン m/z 2531 を用いておこなった。

第 2 章の実験

第 1 節 PMF 法における matrix としての評価

質量分析

トリプシン消化物. チューブ内で BSA (87 nmol, 6.1 mg) または TF (87 nmol, 7.0 mg) を水 806 μl で溶解させた後、100 $^{\circ}\text{C}$ の水浴で 3 分間温めた。酢酸 20 μL (50 mM) を sequencing grade trypsin vial (20 g of trypsin/vial) に加え、よく混合させた後 30 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間静止させた。各々のタンパク質溶液をトリプシンが含まれる容器に加え、さらに 1 M 重炭酸水素アンモニウム緩衝溶液 44 μl を加えた溶液は 37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩放置後、水を用いて 3 倍希釈した。この溶液を 10 μl ずつ分注し乾燥した後、0.1% TFA を 33 μL で 10 pmol/ μl 溶液を調製した。

Matrix. 誘導体 **9** は 3 mg をアセトニトリル 600 μL で懸濁溶液調製後、100 μL 取り出しアセトニトリル 200 μL で 3 倍希釈した溶液を使用した。CHCA と DHB は第 1 章の第 3 節と同様に調製した。

MALDI. 各々の Matrix 溶液 1 μL とトリプシン消化物 (10 pmol/ μL) 1 μL をチューブ内で混合させ、全量を MALDI プレートにのせて自然乾燥させた後、質量分析をおこなった。

MALDI-TOFMS (AXIMA-CFR : Shimadzu) の測定は、ACTH (18-39) の分子イオンを用いてキャリブレーションした後、リフレクトロンモードにより積算回数 500 でおこなった。

MALDI-QIT-TOFMS (AXIM-QIT: Shimadzu) は、ACTH (18-39) と BDK (1-7) の分子イオンを用いてキャリブレーションした後、MS/MS 測定を積算回数 500 でおこなった。親イオンは、TF : m/z 2069 (279-295 : EDLIWELLNQAQEHFGK)、BSA : m/z 2044 (168-183 : RHPYFYAPELlyYANK) を選択して質量分析をおこなった。

データベース検索. Matrix Science protein database の Mascot で以下の条件で検索した。

MALDI-TOFMS (PMF)

TF の場合、消化酵素 (Enzyme) : Trypsin, 許容する未消化サイト数 (Maximum Missed Cleavages) : 1, 質量許容差 (Peptide Mass Tolerance) : ± 0.5 Da.

BSA の場合、消化酵素 (Enzyme) : Trypsin, 許容する未消化サイト数 (Maximum Missed Cleavages) : 1, 質量許容差 (Peptide Mass Tolerance) : ± 0.5 Da.

MALDI-QIT-TOFMS (MS/MS ion search)

TF の場合、消化酵素 (Enzyme) : Trypsin, 許容する未消化サイト数 (Maximum Missed Cleavages) : 1, ペプチドの質量許容差 (Peptide Mass Tolerance) : ± 1.2 (誘導体 **9**), ± 0.4 (DHB), フラグメントの質量許容差 (Fragment Mass Tolerance) : ± 1 (誘導体 **9**, DHB).

BSA の場合、消化酵素 (Enzyme) : Trypsin, 許容する未消化サイト数 (Maximum Missed Cleavages) : 1, ペプチドの質量許容差 (Peptide Mass Tolerance) : ± 0.6 (誘導体 **9**), ± 0.2 (DHB), フラグメントの質量許容差 (Fragment Mass Tolerance) : ± 1 (誘導体 **9**), ± 0.2 (DHB).

第3節 Matrix としての FA 誘導体の構造最適化に向けた検討

1. 化合物合成

2-Bromobenzaldehyde (**104**), 2-Bromo-5-methoxybenzaldehyde (**105**), 2-Bromo-5-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (**107**), は市販品を使用した。2-Bromo-4-hydroxybenzaldehyde (**106**)⁵⁹, (2*E*)-3-[4-(Acetoxy)-3-methoxyphenyl]prop-2-enoic acid (**111**)⁶⁰, 3-[4-(Acetyloxy)-3-methoxyphenyl]propanoic acid (**112**)⁶¹ は文献の方法で合成した。

Horner-Wadsworth-Emmons olefination (一般操作)

第1章の第1節と同様におこなった。

Knoevenagel Condensation (一般操作)

ベンズアルデヒド誘導体 (1.0 当量), malonic acid (1.2 当量), piperidine (0.12 当量) を含む pyridine の混合溶液を 23 時間加熱還流した。反応終了後 10% HCl を反応溶液に加え pH 3 に中和し、水層を EtOAc で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーまたは再結晶で精製した。

(2*E*)-3-(2-Bromophenyl)prop-2-enoic acid (**22**). ベンズアルデヒド誘導体 **104** (1.52 g, 8.22 mmol), malonic acid (1.03 g, 9.86 mmol), piperidine (0.098 mL, 0.986 mmol), pyridine (10 mL) を用いて、Knoevenagel Condensation の一般操作法に従った。残渣を再結晶 (EtOAc) で精製し、化合物 **22** (1.49 g, 80%) を得た。白色固形物。mp 223 °C; IR (KBr) 2924, 1690, 1620, 1419, 1219, 1018 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6.57 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.31-7.36 (m, 1H), 7.44 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.71 (dd, *J* = 1.4 and 7.8 Hz, 1H), 7.84 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.90 (dd, *J* = 1.4 and 7.8

Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 122.8, 125.0, 128.7, 128.8, 132.3, 133.6, 134.0, 141.8, 167.6; EI-MS m/z 228 (M^{+2} , 9.26), 226 (M^+ , 9.51), 147 (100), 103 (25.7), 102 (17.4); *Anal.* Calcd for $\text{C}_9\text{H}_7\text{BrO}_2$: C, 47.61; H, 3.11. Found: C, 47.62; H, 3.04.

(2E)-3-(2-Bromo-5-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid (23). ベンズアルデヒド誘導体 **105** (1.00 g, 4.65 mmol), malonic acid (580 mg, 5.58 mmol), piperidine (0.055 mL, 0.56 mmol), pyridine (7 mL) を用いて、Knoevenagel Condensation の一般操作法に従った。残渣を再結晶 (EtOAc) で精製し化合物 **23** (836 mg, 70%) を得た。白色固形物。mp 200 °C; IR (KBr) 2832, 1682, 1566, 1466, 1288 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 3.80 (s, 3H), 6.66 (dd, $J = 2.8$ and 16.0 Hz, 1H), 7.42 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 56.1, 113.2, 115.5, 119.0, 123.1, 134.3, 134.7, 141.8, 159.4, 167.6; EI-MS m/z 259 (M^{+2} , 2.11), 258 (19.3), 257 (M^+ , 2.17), 256 (19.7), 178 (10.2), 177 (100), 134 (10.2), 121 (17.0); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{BrO}_3$: C, 46.72; H, 3.53. Found: C, 46.67; H, 3.45.

(2E)-3-(2-Bromo-4-hydroxyphenyl)prop-2-enoic acid (24). ベンズアルデヒド誘導体 **106** (240 mg, 1.19 mmol), malonic acid (148 mg, 1.43 mmol), piperidine (0.118 mL, 1.19 mmol), pyridine (5 mL) を用いて、Knoevenagel Condensation の一般操作法に従った。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 1) で精製し、化合物 **24** (153 mg, 53%) を得た。白色固形物。mp 230-234 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 3379, 2970, 1667, 1597, 1427, 1265, 1204 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 6.38 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 6.83 (dd, $J = 2.4$ and 8.6 Hz, 1H), 7.06 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.77 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 116.3, 119.0, 119.8, 124.6, 126.0, 129.8, 141.8, 160.5, 168.0; EI-MS m/z 244 (M^{+2} , 5.23), 242 (M^+ , 5.34), 163 (100), 118 (12.6), 107 (18.2); *Anal.* Calcd for $\text{C}_9\text{H}_7\text{BrO}_2$: C, 47.61; H, 3.11. Found: C, 47.62; H, 3.04.

5-Acetoxy-2-bromo-4-methoxybenzaldehyde (108). バニリン誘導体 **107** (1.00 g, 4.33 mmol) を含む pyridine (1.21 mL) 溶液に Ac_2O (1.21 mL, 8.66 mmol) を加え、2 時間室温で攪拌した。反応終了後、10% HCl (100 mL) を反応溶液に加え pH 3 に中和し、水層を EtOAc (50 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 8) で精製し、化合物 **108** (1.04 g, 88%) を得た。白色固形物。mp 104 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1759, 1682, 1504, 1281, 1188 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2.32 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 7.17 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 10.2 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 20.5, 56.6, 116.8, 123.7, 125.6, 126.8, 139.6, 156.4, 168.4, 190.0; EI-MS m/z 274 (M^{+2} , 4.42), 272 (M^+ , 4.43), 232 (98.2), 231 (60.8), 230 (100), 229 (53.2); *Anal.* Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{BrO}_4$: C, 43.98; H, 3.32. Found: C, 44.07; H, 3.31.

***tert*-Butyl (2*E*)-3-[5-(acetoxo)-2-bromo-4-methoxyphenyl]prop-2-enoate (109).** 化合物 **108** (713 mg, 2.61 mmol), LiCl (166 mg, 3.92 mmol), DBU (0.129 mL, 3.13 mmol), *tert*-butyl diethyl phosphonoacetate (0.736 mL, 3.13 mmol), dry CH₃CN (30 mL) を用い、Horner-Wadsworth-Emmons olefination の一般操作法に従った。1 時間攪拌した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 8) で精製し、化合物 **109** (801 mg, 83%) を得た。白色固形物。mp 135 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1775, 1713, 1605, 1504, 1281, 1142 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.52 (s, 9H), 2.30 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 6.21 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.5, 28.2, 56.3, 80.7, 116.8, 121.4, 122.8, 127.2, 139.3, 140.8, 152.7, 165.8, 168.5; EI-MS *m/z* 373 (M⁺+2, 0.28), 371 (M⁺, 0.27), 235 (11.2), 194 (10.7), 193 (100); *Anal.* Calcd for C₁₆H₁₉BrO₅: C, 51.77; H, 5.16. Found: C, 51.90; H, 5.06.

(2*E*)-3-[5-(Acetoxo)-3-bromo-4-methoxyphenyl]prop-2-enoic acid (110). 化合物 **109** (801 mg, 2.16 mmol) を含む CH₂Cl₂ (15 mL) 溶液に TFA (4.48 mL, 58.6 mmol) を加え、室温で 3 時間攪拌した。反応終了後、H₂O (100 mL) を加え EtOAc (100 mL x 2) で抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (EtOAc) で精製し、化合物 **110** (332 mg, 49%) を得た。白色固形物。mp 213 °C; IR (KBr) 2955, 1775, 1690, 1605, 1497, 1273 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.25 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 6.47 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.76 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 12.5 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 20.8, 57.0, 117.4, 121.1, 122.6, 122.8, 139.7, 140.9, 153.4, 167.7, 168.7; EI-MS *m/z* 317 (M⁺+2, 0.46), 315 (M⁺, 0.49), 274 (10.6), 272 (10.8), 194 (11.1), 193 (100), 178 (12.6); *Anal.* Calcd for C₁₂H₁₁BrO₅: C, 45.74; H, 3.52. Found: C, 45.54; H, 3.49.

(2*E*)-3-(2-Bromo-5-hydroxy-4-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid (25). 化合物 **110** (332 mg, 1.05 mmol) と K₂CO₃ (726 mg, 15.6 mmol) を含む MeOH (10 mL) 溶液を室温で 3 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (50 mL) を氷冷下で反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (50 mL x 3) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (EtOAc) で精製し、化合物 **25** (95 mg, 35%) を得た。白色固形物。mp 252-254 °C; IR (KBr) 3387, 2839, 1690, 1612, 1504, 1427 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.81 (s, 3H), 6.26 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.18 (s, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.73 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 9.51 (br s, 1H), 12.4 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 56.5, 114.0, 114.8, 116.3, 119.6, 125.9, 142.0, 146.9, 151.0, 167.8; EI-MS *m/z* 274 (M⁺+2, 9.26), 272 (M⁺, 9.51), 194 (10.9), 193 (100), 178 (25.5), 133 (18.0). *Anal.* Calcd for C₁₀H₉BrO₄: C, 43.98; H, 3.32. Found: C, 43.92; H, 3.30.

3-[4-(Acetoxy)-2-bromo-5-methoxyphenyl]propanoic acid (113). 化合物 **112** (1.25 g, 5.25 mmol) を含む AcOH (8 mL) 溶液に Br₂ (840 mg, 5.25 mmol) を氷冷下で加え、室温で 1 時間攪拌した。反応終了後、水を加え、析出した。固形物を吸引ろ取し、再結晶 (EtOAc) で精製し、化合物 **113** (270 mg, 16%) を得た。mp 125-127 °C; IR (KBr) 2951, 1713, 1497, 1263, 1213, 1157 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.24 (s, 3H), 2.57 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.92 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.76 (s, 3H), 7.16 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 12.3 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.8, 31.2, 34.1, 56.5, 112.9, 115.0, 126.8, 138.6, 138.7, 150.8, 168.9, 173.8; EI-MS *m/z* 318 (M⁺+2, 10.3), 316 (M⁺, 10.5), 277 (10.0), 275 (10.5), 274 (100), 217 (77.2), 215 (79.6), 195 (92.7); *Anal.* Calcd for C₁₂H₁₃BrO₅: C, 45.45; H, 4.13. Found: C, 45.57; H, 4.12.

3-(2-Bromo-4-hydroxy-5-methoxyphenyl)propanoic acid (28). 化合物 **113** (158 mg, 0.493 mmol) と K₂CO₃ (137 mg, 0.996 mmol) を含む MeOH (8 mL) 溶液を室温で 2 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (50 mL) を氷冷下で反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (100 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (EtOAc) で精製し、化合物 **28** (64 mg, 47%) を得た。白色固形物。mp 143 °C; IR (KBr) 3404, 1686, 1508, 1271, 1203 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.49 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.82 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 6.91 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 9.31 (s, 1H), 12.3 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 30.8, 34.6, 56.2, 113.5, 114.5, 119.2, 130.3, 146.5, 147.7, 174.0; EI-MS *m/z* 277 (M⁺+2, 4.53), 276, (43.9), 275 (M⁺, 4.93), 274 (45.1), 217 (96.6), 215 (100), 195 (71.3), 153 (21.0); *Anal.* Calcd for C₁₀H₁₁BrO₄: C, 43.66; H, 4.03. Found: C, 43.89; H, 3.98.

2-Bromo-5-methoxy-4-(methoxymethoxy)benzaldehyde (114). バニリン誘導体 **49** (1.12 g, 4.86 mmol) と DIPEA (1.22 mL, 7.17 mmol) を含む dry CH₂Cl₂ (5 mL) 溶液に MOMCl (0.680 mL, 7.17 mmol) を氷冷下で加え、室温で 1 時間攪拌した。反応終了後、飽和 NaHCO₃ 水溶液を加え、EtOAc で抽出し有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 8) で精製し、化合物 **114** (1.28 g, 95%) を得た。白色固形物。mp 65 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1688, 1589, 1502, 1385, 1267 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.52 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 5.31 (s, 2H), 7.38 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 10.2 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 56.2, 56.7, 95.2, 110.9, 119.4, 119.9, 127.5, 149.3, 190.9; EI-MS *m/z* 276 (M⁺+2, 98.1), 274 (M⁺, 100), 246 (17.5), 245 (15.8), 244 (18.6), 243 (14.7), 229 (11.2); *Anal.* Calcd for C₁₀H₉BrO₄: C, 43.66; H, 4.03. Found: C, 43.56; H, 4.01.

(2E)-3-[2-Bromo-5-methoxy-4-(methoxymethoxy)phenyl]acrylaldehyde (115). 化合物 **114** (1.18 g, 4.29 mmol) と (formylmethylene)triphenylphosphorane (2.35 g, 7.72 mmol) を含む toluene (5 mL) 溶液を 85 °C で 2 時間加熱還流した。反応溶液を濃縮後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 8) で精製し、化合物 **115** (540 mg, 42%) を得た。白色

固形物。mp 96 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1672, 1597, 1506, 1267, 1128 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.52 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 5.27 (s, 2H), 7.38 (s, 1H), 6.61 (dd, *J* = 7.6 and 16.0 Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.84 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 9.75 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 56.1, 56.6, 95.3, 109.8, 117.7, 119.9, 127.1, 129.0, 149.3, 149.6, 150.5, 193.5; EI-MS *m/z* 302 (M⁺+2, 7.26), 300 (M⁺, 7.29), 222 (12.8), 221 (100), 191 (48.7), 175 (11.2), 105 (11.9); *Anal.* Calcd for C₁₂H₁₃BrO₄: C, 47.86; H, 4.35. Found: C, 47.75; H, 4.36.

***tert*-Butyl (2*E*,4*E*)-5-[2-bromo-5-methoxy-4-(methoxymethoxy)phenyl]penta-2,4-dienoate (116).**

化合物 **115** (540 mg, 1.79 mmol), LiCl (114 mg, 2.69 mmol), DBU (0.322 mL, 2.15 mmol), *tert*-butyl diethyl phosphonoacetate (0.505 mL, 2.15 mmol), dry CH₃CN (8 mL) を用い、Horner-Wadsworth-Emmons olefination の一般操作法に従った。1 時間攪拌した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 10) で精製し、化合物 **116** (333 mg, 47%) を得た。黄色固形物。mp 105 °C (EtOAc); IR (KBr) 1693, 1618, 1495, 1261, 1128 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.51 (s, 9H), 3.50 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 5.22 (s, 2H), 5.95 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 6.72 (dd, *J* = 11.2 and 15.2 Hz, 1H), 7.07 (s, 1H), 7.18 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.40 (dd, *J* = 11.2 and 15.6 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 28.2, 56.1, 56.4, 80.4, 95.4, 109.1, 115.7, 120.0, 123.8, 127.2, 129.5, 137.8, 143.2, 147.7, 149.2, 166.2; EI-MS *m/z* 400 (M⁺+2, 33.9), 398 (M⁺, 33.5), 345 (15.1), 344 (99.4), 343 (15.6), 342 (100), 327 (17.1), 325 (17.2), 314 (12.2), 312 (13.4), 298 (11.1), 282 (38.2), 280 (37.4), 261 (12.9), 259 (13.0), 201 (25.9), 189 (12.8), 188 (16.5), 174 (13.3), 115 (13.4), 102 (12.4); *Anal.* Calcd for C₁₈H₂₃BrO₅: C, 54.15; H, 5.81. Found: C, 54.30; H, 5.91.

(2*E*,4*E*)-5-(2-Bromo-4-hydroxy-5-methoxyphenyl)penta-2,4-dienoic acid (30).

化合物 **116** (252 mg, 0.631 mmol) を含む CH₂Cl₂ (5 mL) 溶液に TFA (1.00 mL, 13.1 mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応溶液に H₂O (100 mL) を加え、10 分間攪拌後、EtOAc (100 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (EtOH-EtOAc) で精製し、化合物 **30** (168 mg, 89%) を得た。黄色固形物。mp 241 °C; IR (KBr) 3308, 2961, 1663, 1568, 1506, 1277, 1200 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.82 (s, 3H), 5.98 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 6.99 (s, 1H), 7.07 (dd, *J* = 9.2 and 15.4 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.38 (dd, *J* = 9.2 and 15.2 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 56.3, 110.3, 115.5, 119.4, 122.3, 126.3, 127.2, 138.0, 144.9, 148.3, 149.3, 168.0; EI-MS *m/z* 300 (M⁺+2, 98.0), 298 (M⁺, 100), 239 (17.3), 237 (16.5), 223 (15.3), 221 (15.0), 201 (24.9), 175 (53.4), 174 (43.6), 160 (42.1), 159 (29.3), 144 (18.2), 132 (14.0), 131 (39.3), 115 (32.3), 103 (15.3), 102 (22.2); *Anal.* Calcd for C₁₂H₁₁BrO₄: C, 48.18; H, 3.71. Found: C, 47.99; H, 3.74.

5-Bromo-2-methoxy-4-[(1E)-3-oxo-3-phenylprop-1-enyl]phenyl acetate (118). 化合物 **55** (213 mg, 0.78 mmol), LiCl (59.3 mg, 1.40 mmol), DBU (0.175 mL, 1.17 mmol), diethyl phenacylphosphonate (0.26 mL, 1.17 mmol), dry CH₃CN (3 mL) を用い、Horner-Wadsworth-Emmons olefination の一般操作法に従った。1 時間攪拌した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 8) で精製し、化合物 **118** (205 mg, 70%) を得た。黄色固形物。mp 145-148 °C (EtOAc-hexane); IR (KBr) 1751, 1667, 1605, 1489, 1211 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.33 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 7.25 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.35 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.50-7.53 (m, 2H), 7.59-7.62 (m, 1H), 7.99-8.01 (m, 2H), 8.05 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.6, 56.2, 110.8, 116.0, 125.3, 127.7, 128.7, 133.0, 133.4, 137.8, 141.7, 142.9, 150.9, 168.4, 190.7; EI-MS *m/z* 377 (M⁺+2, 0.44), 375 (M⁺, 0.45), 254 (18.5), 253 (100), 238 (18.9), 77 (10.2); *Anal.* Calcd for C₁₈H₁₅BrO₄: C, 57.62; H, 4.03. Found: C, 57.67; H, 4.09.

(2E)-3-(2-Bromo-4-hydroxy-5-methoxyphenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one (27). 化合物 **118** (291 mg, 0.78 mmol) と K₂CO₃ (322 mg, 2.33 mmol) を含む MeOH (10 mL) 溶液を室温で 1 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (50 mL) を氷冷下で反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (50 mL x 3) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥後濃縮した。残渣を再結晶 (EtOAc-hexane) で精製し、化合物 **27** (171 mg, 66%) を得た。黄色固形物。mp 176 °C; IR (KBr) 3310, 1651, 1566, 1504, 1373, 1280 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.90 (s, 3H), 7.07 (s, 1H), 7.55-7.59 (m, 2H), 7.64-7.69 (m, 2H), 7.85 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 8.13-8.15 (m, 2H), 10.3 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 56.7, 111.6, 118.2, 119.6, 121.8, 124.8, 129.0, 129.2, 133.6, 138.1, 142.5, 148.4, 151.0, 189.4; EI-MS *m/z* 335 (M⁺+2, 0.40), 333 (M⁺, 0.53), 254 (17.2), 253 (100), 238 (20.9), 77 (11.8); *Anal.* Calcd for C₁₆H₁₃BrO₃: C, 57.68; H, 3.93. Found: C, 57.55; H, 3.88.

5-Bromo-2-methoxy-4-[(1E)-3-oxobut-1-en-1-yl]phenyl acetate (117). 化合物 **55** (309 mg, 1.13 mmol), LiCl (72.0 mg, 1.70 mmol), DBU (0.203 mL, 1.36 mmol), dimethyl acetylphosphonate (0.187 mL, 1.36 mmol), dry CH₃CN (5 mL) を用い、Horner-Wadsworth-Emmons olefination の一般操作法に従った。1 時間攪拌した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 1 : 4) で精製し、化合物 **117** (244 mg, 69%) を得た。黄色固形物。mp 151 °C (EtOAc-hexane). IR (KBr) 3038, 1765, 1672, 1489, 1368, 1211 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.25 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 7.02 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.69 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.8, 28.5, 56.8, 79.6, 112.1, 115.1, 127.7, 130.4, 132.9, 139.8, 141.8, 151.4, 168.7, 198.1; EI-MS *m/z* 314 (M⁺+2, 2.18), 312 (M⁺, 2.14), 192 (11.7), 191 (100), 176 (28.6); *Anal.* Calcd for C₁₃H₁₃BrO₄: C, 49.86; H, 4.18. Found: C, 49.58; H, 4.19.

(3E)-4-(2-Bromo-4-hydroxy-5-methoxyphenyl)but-3-en-2-one (26). 化合物 **117** (440 mg, 1.41

mmol) と K_2CO_3 (293 mg, 2.12 mmol) を含む MeOH (7 mL) 溶液を室温で 1 時間攪拌した。反応終了後、10% HCl (50 mL) を氷冷下で反応溶液に加え、pH 3 に中和し、水層を EtOAc (50 mL x 3) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (MeOH : CH_2Cl_2 = 1 : 25) で精製し、化合物 **26** (357 mg, 94%) を得た。黄色固形物。mp 167 °C (EtOAc); IR (KBr) 3113, 1630, 1587, 1497, 1285, 1206 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.29 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 6.87 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 7.03 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.67 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 10.2 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 28.4, 56.4, 111.1, 117.3, 119.5, 124.4, 127.1, 140.7, 148.3, 150.7, 197.9; EI-MS m/z 272 (M^{+2} , 4.50), 270 (M^+ , 4.54), 192 (11.1), 191 (100), 176 (46.1), 148 (10.4); Anal. Calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{BrO}_3$: C, 48.73; H, 4.09. Found: C, 48.65; H, 4.01.

(1E,4E)-1,5-Bis(2-bromo-4-hydroxy-5-methoxyphenyl)penta-1,4-dien-3-one (29). バニリン誘導体 **49** (250 mg, 1.08 mmol), acetone (0.040 mL, 0.54 mmol), EtOH (4 mL), と 37% HCl (0.09 mL) を含む混合溶液を 70 °C で 21 時間加熱還流した。反応終了後、 H_2O (10 mL) を加え、EtOAc (10 mL x 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (acetone : hexane = 1 : 9) で精製し、化合物 **29** (105 mg, 40%) を得た。黄色固形物。mp 247-255 °C (acetone- H_2O); IR (KBr) 3534, 1636, 1562, 1504, 1412, 1281 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.86 (s, 6H), 7.07 (s, 1H), 7.26 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.47 (s, 2H), 7.85 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 10.3 (br s, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 56.0, 110.6, 117.3, 119.2, 124.4, 126.0, 140.3, 147.9, 150.4, 187.5; EI-MS m/z 486 (M^{+4} , 3.18), 484 (M^{+2} , 6.23), 482 (M^+ , 3.39), 406 (19.4), 405 (96.7), 404 (20.8), 403 (100), 176 (10.7), 133 (12.2); Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{O}_5$: C, 47.14; H, 3.33. Found: C, 47.10; H, 3.35.

2. 質量分析

ペプチド混合物. 第 1 章の第 3 節と同様の方法を用いて、調整した。

Matrix. Matrix としての FA 誘導体の調整方法は、ACTH (18-39) を測定試料とし、検討した条件のなかで最も高い分子イオンの強度を検出した条件でおこなった。各々の FA 誘導体は、全て 3 mg を計量し、有機溶媒に溶解させた。

誘導体 **22-24** は、アセトニトリル 300 μL で調製した懸濁溶液を測定に用いた。誘導体 **25** は、アセトニトリル (300 μL) と MeOH (100 μL) を用いて懸濁溶液を調製後、100 μL を取り出し 3 倍希釈した溶液を測定に用いた。

誘導体 **26** は、誘導体 **22** と同様に懸濁溶液を調製後、7 倍希釈した溶液を測定に用いた。誘導体 **27** は、アセトニトリル (300 μL) と MeOH (20 μL) で懸濁溶液を調製後、100 μL 取り出し 3 倍希釈した溶液を測定に用いた。誘導体 **28** は、アセトニトリル (140 μL) により懸濁溶液を調製後、測定に用いたがペプチドのイオン化は確認できなかった。誘導体 **29** は、アセトニトリル (100 μL) と MeOH (100 μL) で懸濁溶液調製後、100 μL 取り出し 3 倍希釈

した溶液を使用した。誘導体 **30** は、誘導体 **22** と同様に懸濁溶液を調製後、5 倍希釈した溶液を測定に使用した。CHCA と DHB は第 1 章の第 3 節と同様に調製した。

トリプシン消化物. 第 1 章の第 3 節と同様に調製した。

MALDI. 第 1 章の第 3 節と同様におこなった。

第 3 章の実験

第 1 節 MS/MS ion search によるプロテオーム解析への応用

質量分析

ラット副腎の 2 次元電気泳動条件 (2-DE). 副腎組織全体の細胞溶液は、Ready Prep Reagent 3 (5 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 2% *n*-decyl-*N,N*-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate) の存在下、4 °C で Polytron homogenizer を用いて粉碎した後、混合溶液を 20 秒間超音波処理した。粉碎物は 24000×g の条件下で 20 分間遠心分離した。粉碎化されたタンパク質の総量は、DC Protein Assay kits (Bio-Rad, USA) を用いて定量した。粉碎物は 8 M urea, 2% CHAPS, 2% IPG buffer, 0.3% DTT と少量の bromophenol blue dye 粒子を含む状態で混合した後、高速回転させた。IEF strips と SDS-polyacrylamide gel for 2-DE は Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA) から調達した。2-DE は pre-cast pH 3-10 nonlinear (NL) IPG strips (24 cm) を使用した Multiphor electrophoresis apparatus (Amersham Pharmacia Biotech) の測定条件で 1 次元目の電気泳動をおこなった。続けて、12-14% gradient polyacrylamide gels (245×180×0.5 mm) を使用して 2 次元目の電気泳動をおこなった。IEF は、15 °C で 500 V, 1 mA, 5 W を 1 分間、500 V, 1 mA, 5 W を 300 分間、3500 V, 1 mA, 5 W を 980 分間の条件でおこなった。IPG strips は 0.2% DTT を含む 平衡化緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS) 下で 15 分間インキュベートした。続けて、DTT の代わりに 4% iodoacetamide, bromophenol blue instead を含んでいる同じ緩衝溶液で平衡を続けた。IPG strip は SDS gel の上方の gel 側に置き、次の条件下で 2-DE をおこなった。1000 V, 20 mA, 40 W を 40 分間; 1000 V, 40 mA, 40 W を 5 分間; 1000 V, 40 mA, 40 W を 160 分間。

トリプシン処理. 2-DE を終了後、S1-8 のゲルをゲルスロットピッカー (1.8 φ : Anatech) を用いて切り取りサンプルチューブに入れた。ゲルの洗浄をおこなうため、50% MeOH 水溶液を 100 μL 加え、10 分間超音波処理した。50% MeOH 水溶液を捨て、同じ操作を 4 回繰り返した。次に、ゲル内の脱水操作をするため、50% アセトニトリル水溶液を加え、室温で 10 分間放置後、溶媒を捨てた。100% アセトニトリルで同様の操作をおこなった。脱水したゲルを膨潤させるため、50 mM 重炭酸水素アンモニウム水溶液を 100 μL を加えて室温で 10 分間放置後、溶媒を捨て、100% アセトニトリルを用いて脱水操作をおこなった。50 mM 重炭酸水素アンモニウム水溶液と 50% アセトニトリル水溶液を用いて、膨潤と脱水操作を再度繰り返した。その後、100% アセトニトリルを用いて、脱水操作を 2 回繰り返し、溶媒を捨て 1 時間風乾した。乾燥後、トリプシン (20 μg / 50 mM 重炭酸水素アンモニウム水溶

液 800 μL) を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩インキュベートした。トリプシン処理後、45%アセトニトリル 0.1% TFA 水溶液を 10 μL 加え、超音波処理後、溶液のみ回収する操作を 2 回繰り返し、凍結乾燥させた。

Matrix. DHB は第 1 章の第 3 節と同様におこなった。誘導体 **9** (1 mg) は、アセトニトリル 100 μL を用いて懸濁溶液を調製した。

MALDI. トリプシン消化物は 0.1% TFA を用いて溶液を調製。これら溶液と調整した matrix をチューブ内で 1 μL ずつ混和させた後、ピペットを用いて target plate ($\mu\text{Focus MALDI plate 600}\mu\text{m}$, Bruker & Shimadzu, Shimadzu GLC Ltd.) に全量のせ自然乾燥させた。質量分析は MALDI-QIT-TOFMS (AXIM-QIT: Shimadzu) を用いて、リフレクトロンモードにより MS/MS 測定をおこなった。測定前は BDK (1-7) と ACTH (18-39) の分子イオンを用いてキャリブレーションし質量校正した。

データベース検索. Matrix Science protein database の Mascot で以下の条件で検索した。

消化酵素 (Enzyme) : Trypsin, 許容する未消化サイト数 (Maximum Missed Cleavages) : 2, 化学的修飾 (Fixed Modification) : Carbamidomethyl (C), 可変修飾 : Oxidation (M), ペプチドの質量許容差 (Peptide Mass Tolerance) : ± 0.5 Da, フラグメントの質量許容差 (Fragment Mass Tolerance) : ± 0.5 Da.

第 2 節 PMF 法によるプロテオーム解析への応用

質量分析

ラット大脳皮質の 2 次元電気泳動条件 (2-DE). ラット大脳皮質の細胞溶液からタンパク質抽出は、第 3 章の第 1 節と同様におこなった。2-DE は、Auto2D (sharp/simadzu) を用いて、全自動で分離をおこなった。測定条件は、1 次元目は pI 範囲: 3-11、2 次元目は 10% gradient polyacrylamide gels でおこなった。

トリプシン処理. 2-DE を終了後、S1-6 のゲルをゲルスポットピッカー (1.8 ϕ : Anatech) を用いて切り取りサンプルチューブに入れた。その後の操作は、第 3 章の第 1 節と同様におこなった。

Matrix. CHCA と誘導体 **9** は、第 1 章の第 3 節と同様におこなった。

MALDI. トリプシン消化物は 0.1% TFA を用いて溶液を調製。これら溶液と調整した matrix をチューブ内で 1 μL ずつ混和させた後、ピペットを用いて target plate ($\mu\text{Focus MALDI plate 600}\mu\text{m}$, Bruker & Shimadzu, Shimadzu GLC Ltd.) に全量のせ自然乾燥させた。質量分析は MALDI-TOFMS (AXIM: Shimadzu) を用いて、リフレクトロンモードにより測定をおこなった。測定前は ACTH (18-39) の分子イオンを用いてキャリブレーションし質量校正した。

データベース検索. Matrix Science protein database の Mascot で以下の条件で検索した。

消化酵素 (Enzyme) : Trypsin, 許容する未消化サイト数 (Maximum Missed Cleavages) : 1, 化学的修飾 (Fixed Modification) 未選択、可変修飾 未選択、ペプチドの質量許容差 (Peptide Mass Tolerance) : ± 0.3 Da.

引用文献

1. James, P. Protein identification in the post-genome era : the rapid rise of proteomics. *Rev. Biophys.* **1997**, *30*, 279-331.
2. Jun, S.; Hironori, I.; Shinichi, K.; Hideshi, S.; Setsuko, Y.; Masaharu, K. Proteomic analysis of rat heart in ischemia and ischemia-reperfusion using fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics* **2003**, *3*, 1318-1324.
3. Naoki, K.; Akinori, N.; Yukihiro, W.; Takashi, K.; Takashi, S.; Yutaka, A.; Masahiko, B.; Akinori, T.; Shumpei, N.; Kengo, I.; Kenji, T.; Koichi, T.; Katsuhiko, Y. Novel plasma biomarker surrogating cerebral amyloid deposition. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **2014**, *90*, 353-364.
4. Perkins, D. N.; Pappin, D. J.; Creasy, D. M.; Cottrell, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3551-3567.
5. Flatley, B.; Malone, P.; Cramer, R. MALDI mass spectrometry in prostate cancer biomarker discovery. *BBA*. **2014**, *1844*, 940-949.
6. Henzel, W. J.; Watanabe, C. Protein Identification: The origins of peptide mass Fingerprinting. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14*, 931-942.
7. Eng, K. J.; McCormack, A. L.; Yates, J. R. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, *5*, 976-989.
8. Miyashita, M. Fundamental and practical aspects of *de novo* peptide sequencing. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **2017**, *65*, 231-238.
9. Yasuda, A.; Ishimaru, T.; Nishihara, S.; Saki, M.; Kawasaki, H.; Arakawa, R.; Shigeri, Y. A thiophene-containing compound as a matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and the electrical conductivity of matrix crystals. *Eur. J. Mass. Spectrom.* **2013**, *19*, 29-37.
10. Eberhard, K.; Holger, W.; Peter, R. J. The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4160-4165.
11. Karas, M.; Baxhamann, D.; Hillenkamp, F. Influence of the wavelength in high-Irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2935-2939.
12. Beavis, R. C.; Chait, B. T. Cinnamic acid derivatives as matrixes for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1989**, *3*, 432-435.
13. Beavis, R. C.; Chaudhary, T.; Chait, B. T. α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* **1992**, *27*, 157-158.

14. Strupat, K.; Karas, M.; Hillenkamp, F. 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1991**, *111*, 89-102.
15. Thorsten, W. J.; Wolf, D. L.; Michael, K. 4-Chloro- α -cyanocinnamic acid is an advanced, rationally designed MALDI matrix. *PNAS*. **2008**, *105*, 12200-12205.
16. Kanjana, W.; Rainer, C. Sample Preparation: A crucial factor for the analytical performance of rationally designed MALDI matrices. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 1485-1488.
17. Thorsten, W. J.; Dimitrios, G. P.; Michael, K. Comparison between the matrices α -cyano-4-hydroxycinnamic acid and 4-chloro- α -cyanocinnamic acid for trypsin, chymotrypsin, and pepsin digestions by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 3588-3597.
18. Mark, W. T.; John, E. M.; Rainer, C. Introduction of 4-chloro- α -cyanocinnamic acid liquid matrices for high sensitivity UV-MALDI MS. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 1931-1940.
19. John, D. L. Evaluation of the new MALDI matrix 4-chloro- α -cyanocinnamic acid. *JBT*. **2010**, *21*, 81-91.
20. Dimitrios, G. P.; Thorsten, W. J.; Stavroula, M.; Dominic, B.; Michael, K.; Bjoern, M. Peptide mass fingerprinting after less specific in-gel proteolysis using MALDI-LTQ-Orbitrap and 4-chloro- α -cyanocinnamic acid. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 2619-2629.
21. Calvano, C. D.; Ventura, G.; Palmisano, F.; Cataldi, T. R.-I. 4-Chloro- α -cyanocinnamic acid is an efficient soft matrix for cyanocobalamin detection in foodstuffs by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI MS). *J. Mass Spectrom.* **2016**, *51*, 841-848.
22. Joern, K.; Markus, S.; Urs, P.S. Studies on the selection of new matrices for ultraviolet Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 1927-1933.
23. Meetani, M. A.; Voorthees, K. J. MALDI mass spectrometry analysis of high molecular weight proteins from whole bacterial cells: pretreatment of samples with surfactants. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 1422-1426.
24. Norris, J. L.; Poter, N. A.; Caprioll, R. M. Combination detergent/MALDI matrix: functional cleavable detergents for mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 5036-5040.
25. Fukuyama, Y.; Tanimura, R.; Maeda, K.; Watanabe, M.; Kawabata, S.-I.; Iwamoto, S.; Izumi, S.; Tanaka, K. Alkylated dihydroxybenzoic acid as a MALDI matrix additive for hydrophobic peptide analysis. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 4237-4243.
26. Zenobi, R.; Knochenmuss, R. Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, *17*, 337-366.
27. Florent, A.; Sophie, M.; Paul-Henri, D. Straightforward total synthesis of 2-*O*-feruloyl-L-malate, 2-*O*-sinapoyl-L-malate and 2-*O*-5-hydroxyferuloyl-L-malate. *Synthesis* **2009**, *21*, 3571-3578.

28. Tobias, R.; Pablo, Z.; Erick M. C. Diastereoselective phenol para-alkylation: access to a cross-conjugated cyclohexadienone en route to resiniferatoxin. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4371-4374.
29. Carl, B. Z. Jr.; Richard, F. H. Palladium-catalyzed vinylic substitution with highly activated aryl halides. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2941-2946.
30. Battistuzzi, G.; Cacchi, S.; Salve, I. D.; Fabrizi, G.; Parisi, L. M. Synthesis of coumarins in a molten *n*-Bu₄NOAc/*n*-Bu₄NBr mixture through a domino Heck reaction/cyclization process. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 308-312.
31. Cowles, R.S.; Miller, J.R.; Hollingworth, R.M.; Abdel-aal, M.T.; Szurdoki, F.; Bauer, K.; Matolcsy, G. Cinnamyl derivatives and monoterpenoids as nonspecific ovipositional deterrents of the onion fly. *J. Chem. Ecol.* **1990**, *16*, 2401-2428.
32. Gable, R. W.; Parker, K. J.; Tsanaktisidis, J. Selective bromochlorination of endo-1,4-dibromotricyclo[5.2.1.0^{2,6}]deca-3,8-diene-5,10-dione 10-Ethylene acetal at the conjugated carbon-carbon double bond. *Aust. J. Chem.* **1994**, *47*, 963-968.
33. Webster, V. S. Preparation and oxidation of substituted cinnamic acid. *Amer. J. Pharm.* **1940**, *112*, 291-296.
34. Xia, C.-N.; Li, H.-B.; Liu, F.; Hu, W.-X. Synthesis of trans-caffeate analogues and their bioactivities against HIV-1 integrase and cancer cell lines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 6553-6557.
35. Wittmann, H.; Uragg, H. Cleavage reactions with diazonium compounds and quinone imide chloride. IX. 4-Hydroxystyryl ketones. *Monatsh. Chem.* **1966**, *97*, 891-895.
36. Ahmed, R.; Schreiber, F. G.; Stevenson, R.; Williams, J. R.; Yeo, H. M. Oxidative coupling of bromo- and iodo-ferulic acid derivatives: synthesis of (±)-veraguensin. *Tetrahedron* **1976**, *32*, 1339-1344.
37. Carvalho, S. A.; Feitosa, L. O.; Soares, M.; Costa, T.-M.; Henriques, M. G.; Salomão, K.; Castro, S.-d.; Kaiser, M.; Brun, R.; Wardell, J. L.; Wardell, S.-V.; Trossini, G.-G. Andricopulo, A. D.; Silva, E.-d.; Fraga, C.-M. Design and synthesis of new (*E*)-cinnamic *N*-acylhydrazones as potent antitrypanosomal agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *54*, 512-521.
38. Luong, M. D.; Saebj, J.; Fombasso, P. 280. Contribution à la phytochimie du genre *Gentiana*. XXVI.¹⁾ Identification d'une nouvelle di-*O*-glucosyl cinnamoyl-*C*-glucosylflavone extradite des feuilles de *Gentiana X maecailhouana* R_Y. *Helv. Chim. Acta.* **1981**, *64*, 2741-2745.
39. Kevin, C.; Jeyaratnam, P. J.; Hitoshi, F.; Masaya, I.; Tatsuya, S.; Richard, J. B.; Stephen, D. E. A mild photoactivated hydrophilic/hydrophobic switch. *Langmuir* **2005**, *21*, 4554-4561.
40. Li, H.-H.; Huang, H.; Zhang, H.-H.; Luo, X.-M.; Lin, L.-P.; Jiang, H.-L.; Ding, J.; Chen, K.-X.; Liu, H. Discovering novel 3-nitroquinolines as a new class of anticancer agents. *Acta. Pharmacol. Sin.* **2008**, *29*, 1529-1538.
41. Nimgirawath, S.; Udomputtimekakul, P.; Taechowisan, T.; Wanbanjob, A.; Shen, Y. First total

- syntheses of (±)-isopiline, (±)-preocoteine, (±)-oureguattidine and (±)-3-methoxynordomesticine and biological activities of (±)-3-methoxynordomesticine. *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, *57*, 368-376.
42. Mo, F.; Qiu, D.; Zhang, Y.; Wang, J. Renaissance of Sandmeyer-type reactions: conversion of aromatic C-N bonds into C-X bonds (x = B, Sn, P, or CF₃). *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 496-506.
 43. Kishimoto, S.; Nishimura, S.; Hatano, M.; Igarashi, M.; Kakeya, H. Total synthesis and antimicrobial activity of chlorocatechelin A. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 6076-6082.
 44. Haggam, R. A. Cu (I)-catalyzed intramolecular cyclizations of substituted 2-iodobenzophenones under thermal and microwave conditions. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 6488-6494.
 45. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, M. J.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09*, Revision C.01, Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009.
 46. Appendino, G.; Bacchiega, S.; Minassi, A.; Cascio, M. G.; Petrocellis, L. D.; Marzo, V. D. The 1,2,3-triazole ring as a peptido- and olefinomimetic element: discovery of click vanilloids and cannabinoids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9312-9315.
 47. Hirose, N.; Yano, K.; Suzuki, Y.; Sakamoto, Y. Endocrine disrupting effect of di-(2-ethylhexyl)phthalate on female rats and proteome analyses of their pituitaries. *Proteomics* **2006**, *6*, 958-971.
 48. Kato, Y.; Hirose, N.; Sakamoto, T.; Moriguchi, T.; Takayama, J.; Xuan, M.; Okazaki, M.; Suzuki, Y.; Hoshi, A.; Sakamoto, Y. Characterization of 6-bromoferulic acid as a novel common-use matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* *34*(7), <https://doi.org/10.1002/rcm.8636> (2020).
 49. Grigorean, G.; Robert, I.; Jonathan, A. Studies of exchangeable protons in the matrix-assisted laser desorption/ionization process. *Eur. Mass Spectrom.* **1996**, *2*, 139-143.
 50. Yassin, F. H.; Marynick, D. S. A computational study of the thermodynamic properties of sinapic and ferulic acid and their corresponding radical cations. *THEOCHEM* **2006**, *766*,

137-141.

51. Li, Q.; Chen, J.; Luo, S.; Xu, J.; Huang, Q.; Liu, T. Synthesis and assessment of the antioxidant and antitumor properties of asymmetric curcumin analogues. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *93*, 461-469.
52. Francese, S.; Bradshaw, R.; Flinders, B.; Mitchell, C.; Bleay, S.; Cicero, M. R.; Clench, M. R. Curcumin: A multipurpose matrix for MALDI mass spectrometry imaging applications. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 5240-5248.
53. Jiménez, C. R.; Huang, L.; Qiu, Y.; Burlingame, A. L. Sample preparation for MALDI mass analysis of peptides and proteins. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **Unit 16**, **3**, 10.1002/0471140864.ps1603s14 [Online] 1 May 2001.
54. Iwamoto, M.; Miura, Y.; Tsumoto, H.; Tanaka, Y.; Morisawa, H.; Endo, T.; Toda, T. Antioxidant effects of carnitine supplementation on 14-3-3 protein isoforms in the aged rat hippocampus detected using fully automated two-dimensional chip gel electrophoresis. *Free Radical Research* **2014**, *48*, 1409-1416.
55. Agnes, B. Preparation of carbolines as potent and selective inhibitors of cyclic guanosin 3, 5-monophosphate specific phosphodiesterase (cGMP-specific PDE). US 2001/6306870 B1, **2001**.
56. Sabina, H.-R. S.; Jan, G.-H. P. D.; Thomas, M. M.; Corey, A.; Joseph, P.; Adam, K. E.; Djamel, N. M. M.; Frieman, B. A.; Jason, M.; Franklin, W. J.; Vijayalaksmi, A.; Johnny, U. Y. Nleple, H.-G.; Richard, B. B. Benzoxazines as modulators of ion channel. WO 2013/067248 A1, **2013**.
57. Khalilzadeh, M. A.; Hosseini, A.; Shokrollahzadeh, M.; Halvagar, M. R.; Ahmadi, D.; Mohammazadeh, F.; Tajbakhsh, M. HIO₄/Al₂O₃ as a new system for iodination of activates aromatics and 1,3-dicarbonyl compounds. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 3525-3528.
58. Rogers, C. B.; Blum, C. A.; Murphy, B. P.; Improved Syntheses of 6-hydroxy-5-methoxy- and 5-hydroxy-6-methoxyindoles and their O-acetates, analogs of natural eumelanin precursors. *J. Heterocyclic Chem.* **1987**, *24*, 99-110.
59. Gaul, M.; Kuo, G.-H.; Xu, G.; Zhao, B.-P. Dual sglt1/sglt2 inhibitors. US 2014/0256657 A1, **2014**.
60. Jill, K.; Hwang, W.-M.; Hwang, H.-S.; Bakota, E.-L.; Palmquist, D. A. Synthesis of steryl ferulates with various sterol structures and comparison of their antioxidant activity. *Food Chemistry* **2015**, *169*, 92-101.
61. Taj, R.; Sorensen, J. L. Synthesis of actinomycetes natural products JBIR-94, JBIR-125, and related analogues. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 7108-7111.