

利用し易い光反応基ジアジリンを目指して

定 金 豊

Endeavors to Make the Photophore, Diazirine Easy to Use

Yutaka SADAKANE

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University of Health and Welfare,
1714-1 Yoshino-cho, Nobeoka City 882-8508, Japan*

(Received June 7, 2007)

Photoaffinity labeling enables the direct probing of a target protein through a covalent bond between a ligand and its binding protein. We used carbene-generating phenyldiazirine as a photophore because practical examinations had shown that the phenyldiazirine functioned as the powerful barb on the hook. This review describes improvements of synthetic strategies of the photoaffinity ligands bearing diazirine. First, we dramatically improved the direct formylation of phenyldiazirine, which was a practical diazirine source, to obtain a versatile diazirine unit. Second, we established “the photoreactive unit technique” for a one-step introduction of phenyldiazirine into peptides, proteins, DNAs, and sugars. Since the photoreactive units can be easily integrated into physiological ligands by chemoselective reaction, the biochemists, who are not familiar with organic synthesis, can prepare the photoaffinity ligands using their interested ligands. Our improvements would promote the utilization of phenyldiazirine for analyzing biological interfaces, and extend the potential of photoaffinity labeling as a sensitive means of rapidly elucidating protein structures and proteomic profiling.

Key words—diazirine; chemical proteomics; Friedel–Crafts reaction; chemoselective reaction; calmodulin-binding peptide

1. はじめに

生命現象の様々なフェーズで、受容体はリガンドを鍵穴の鍵のごとく特異的に認識し生命システムを保っている。リガンド-受容体の個々の組み合わせを明らかにし、それらの相互作用機構を解明していくことは、生命の仕組みを明らかにすることに役立つだけでなく、新薬の開発にも大きく貢献する。その意味でリガンドと受容体とのマッチングを効率よく解析する技術開発は、chemical proteomicsの1つのゴールであると言える。光反応基はリガンドと受容体とのマッチング及び相互作用機構の解明に最適な化学的性質を有しており、それを利用した光アフィニティーラベル法は、スクリーニング実験、受容体の構造解析において効果的に利用され、これまでに数多くの成果を挙げてきた。¹⁻³⁾ この総説では、

光アフィニティーラベル法の優れた特徴を紹介し、生命現象の解明に最適な性質を持つ光反応基ジアジリンの化学合成法と利用法について紹介する。

2. 光反応基は「離さない」そして「選ぶ」という性質を持つ

光反応基は、光照射で容易に分解し、最寄りの分子と共有結合を形成する性質がある (Fig. 1)。光反応基(A)は、紫外領域の光を照射することで、非常に反応性の高い中間体(B)を生じる。この中間体は最寄りの分子と電子のやり取りをし、安定な状態に戻る。その結果として光反応基と最寄り分子と間に共有結合(C)が形成される。このように光照射のみで共有結合を作る性質は、変性し易い生体高分子を取り扱う上で都合がよい。

光反応基の利点を「釣り」に例えて説明する。「リガンド」という餌で「受容体」という魚を釣り上げる場合を考えてみる。リガンドは親和性を頼りに特異的な受容体と結合する。ちょうど、リガンドという餌に受容体という魚が寄り付き、この餌を最も好む魚(高い親和性を持つ受容体)が釣り針に食

九州保健福祉大学薬学部 (〒882-8508 延岡市吉野町 1714-1)

e-mail: sadapon@phoenix.ac.jp

本総説は、平成18年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

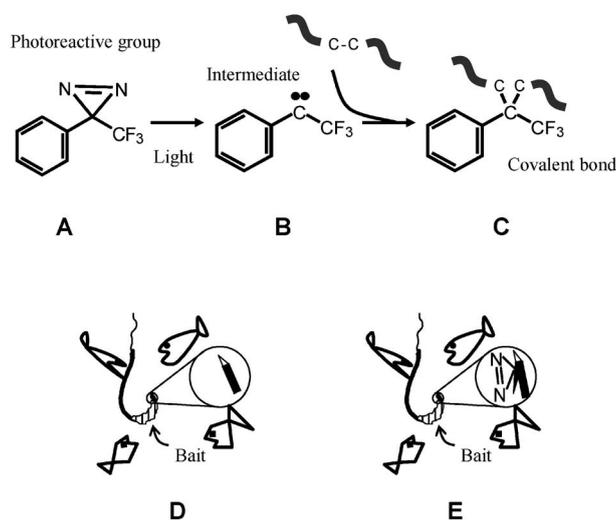


Fig. 1. Photoaffinity Labeling

いついた状況に例えることができる (Fig. 1(D)). しかしながら、リガンドと受容体との結合はほとんどが解離可能な可逆的結合であり、これは、「かえし」(針の向きとは逆向きに伸びた引っかかり部分)がない釣り針での釣りをしている状況に例えられる。かえしのない釣り針で、魚を取り逃がさずに釣り上げるのは難しい。研究者は何度もの試行錯誤の末に熟練した技術を身に付け、親和性だけで結合している受容体を取り逃がさずに獲得できるようになるのである。

光反応基は、例えば釣り針のかえしに相当し、光照射によりリガンドと受容体とを共有結合で結び付けること(クロスリンク)ができる。釣り針のかえしのように働くので、食い付いた魚を放すことなく容易に釣り上げることができる (Fig. 1(E)). このように光反応基を利用することで経験の浅い研究者でも、容易に目的の受容体を釣り上げることができるようになる。

光反応性リガンドを使用した光アフィニティーラベル法は、捕らえた受容体を取り逃すことなく、効率的なスクリーニング実験が実施できる方法である。光反応性リガンドを使用する利点は2つあると言える。第一の利点は、上記で紹介したように狙った獲物は「離さない」という性質である。例えば、受容体を変性させても、リガンドと受容体とは離れることがない (Fig. 2(A)). リガンドとの結合には受容体分子の適切な高次構造が保たれている必要があるため、受容体を変性させると解離してしまう。

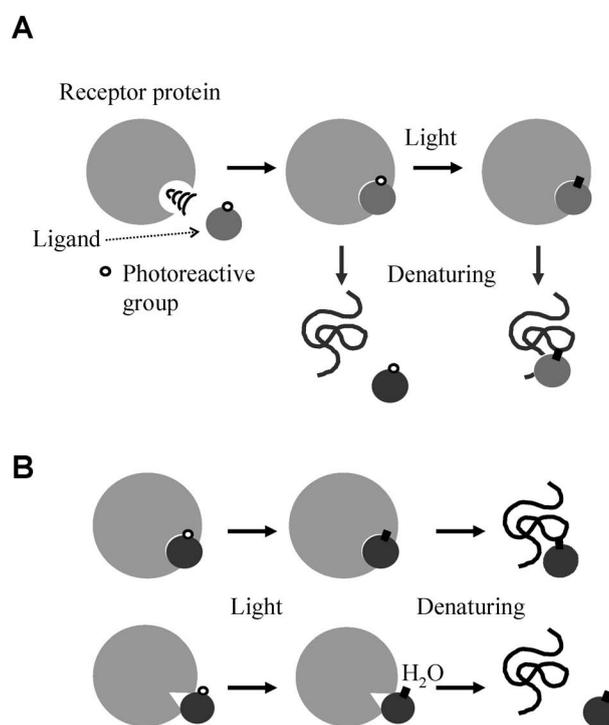


Fig. 2. Advantages of Photoaffinity Labeling

光アフィニティーラベル法を用いれば、結合分析やスクリーニングにおいて、受容体の高次構造を保持しておくという制約がなくなる。光反応性リガンドを使用する第二の利点は、獲物を「選ぶ」という性質である。光反応基から生じる中間体は非常に反応性が高いため、その近傍に存在する分子と共有結合を形成し易い。リガンドと受容体との結合が特異的であれば、リガンドの最寄り分子は受容体であるが、本来結合すべきでない受容体に非特異的にリガンドが結合すると、最寄り分子は他の分子であることが多くなる。その結果、リガンドと受容体の間で共有結合を形成できず、受容体を変性させるとリガンドは解離する (Fig. 2(B)). この仕組みにより、特異的に結合する獲物を「選ぶ」ことができるのである。この光アフィニティーラベル法の「離さない」と「選ぶ」という性質は、分析の高感度化、スクリー



定金 豊

島根県出身、静岡大学理学部卒業、山口大学理学研究科修士課程終了、岡山大学自然科学研究科博士課程終了、通産省工業技術院(現産業総合研究所)NEDO特別研究員、富山医科薬科大学薬学部助手を経て、2004年4月より九州保健福祉大学薬学部講師、博士(理学)、専門は分析化学、分子生物学

ニングの高感度化及び効率化に役立つだけではなく、これまで適応できなかった分析技術を使用することも可能にする。

3. 生命現象の解明に最適な光反応基ジアジリン

1962年に Westheimer らがジアゾアセチル基を光反応基として利用して以来,⁴⁾ 様々な光反応基が報告されてきた。現在、生命現象の解明に広く使用されている代表的な光反応基を Fig. 3 にまとめた。^{3,5)} 比較的合成が容易であり、市販の誘導体が多い光反応基アジド (azide) は、他に比べその使用例は群を抜いている。しかも、他の光反応基に比べて小さな構造であり、修飾によるリガンドの構造変化を小さくできる利点がある。アジドは 300 nm 付近の光を吸収し、反応性の高い中間体ニトレン (nitrene) を生じる。また、ジアジリン (diazirine) も古くから使用されている光反応基であり、360 nm 付近の光を吸収し反応性の高い中間体カルベン (carbene) を生じる。光反応基ベンゾフェノンに代表されるカルボニル基 (C=O) は、360 nm 付近の光でラジカル性の強い励起三重項状態になり、主に相手分子の炭素上の水素原子を引き抜いた結果生じた炭素ラジカル対と共有結合を形成する。このようにアジドやジアジリンとは反応機構が異なり、反応する相手がないときには基底状態に戻る可逆的な反応であるため、一般的に反応効率が高いと言われている。

光反応によって高い反応性を持つ中間体を生じるアジドとジアジリンの化学的性質を比較してみると、ジアジリンの方が次に示す点で優れている。光反応基ジアジリンは様々な有機合成条件下でも安定であり、例えば、ニトロ化や Friedel-Crafts 反応の条件に耐えることができ、固相ペプチド合成反応に

においても無保護で取り扱うことが可能である。⁶⁾ また、アジドよりも長波長の光で光反応が起こる。生体高分子をターゲットに実験を行うときに、長波長の光で実験が行えるのは都合がよい。また、アジドとジアジリンから生じる反応性の高い反応種である、ニトレンとカルベンを比較しても、カルベンの方がより高い反応性を示し、炭素原子上に共有結合を形成するのでクロスリンクの安定性においても優れている。⁷⁾ ニトレンでのクロスリンクはアミノ酸配列を決めるための分解反応により切断されてしまうことが報告されており、⁸⁾ 機能部位解析に重要なクロスリンク部位の決定が困難である。

ベンゾフェノンは、アジド、ジアジリンとは異なるコンセプトを持つ光反応基である。⁹⁻¹¹⁾ ベンゾフェノンの光反応は、ジアジリンと同様にアジドよりも長波長の光で起こり、生体高分子をターゲットとするのに都合がよい。水と反応することはなく、光分解せずに繰り返し光反応できる性質を持つため、高いクロスリンク効率が期待できる反面、反応する相手をえり好みすることが指摘されている。最寄りの分子と共有結合するのではなく特定の分子と共有結合する性質を持つため、前節で述べた「獲物を選ぶ」という光反応性リガンドの第二の利点が発揮され難い。このように光反応基の化学的性質を比較した結果から、生命現象を解析するツールとして光反応基ジアジリンが優れているといえる。

実際に光アフィニティーラベル実験を行って、これらの光反応基の有用性を比較した報告からも、ジアジリンが優れた光反応基であることが示されている。グルコーストランスポーターを標的タンパク質として、アジド、ジアジリン、ベンゾフェノンの光反応性糖鎖で解析した実験、¹²⁾ 標的分子に様々な光反応基を装着した光反応性ペプチド¹³⁾ 及び光反応性 DNA^{14,15)} で光アフィニティーラベルを行った実験において、光反応基ジアジリンが好成績を納めている。光分解しないためにクロスリンク効率が高いと言われているベンゾフェノンであるが、われわれの実験¹⁵⁾ を含めいくつかの実験において、ベンゾフェノンを装着した光反応性リガンドで、ジアジリンと同じクロスリンク効率を得るためには長時間の光反応を行う必要があることが示されている。長時間の光照射は生体高分子にダメージを与え、よい結果が得られないことも報告されている。¹²⁾

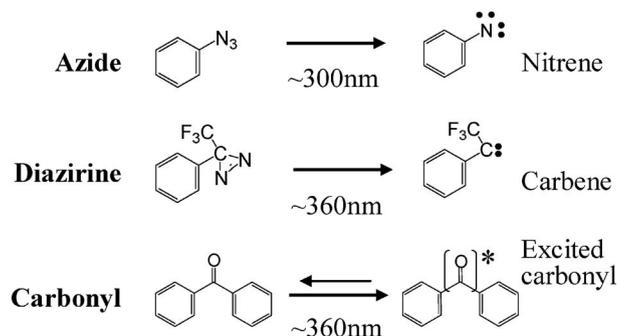


Fig. 3. Photoreactive Groups Used in Biochemical Researches

4. 光反応性リガンドを製作するための出発化合物の改良合成法

光反応基ジアジリンは生命現象の解明に優れた特性を持つことを紹介した。しかしながら、アジドやベンゾフェノンなどの他の光反応基に比べ、これまで利用範囲が限定されていた。その理由は、光反応性リガンドを製作するための、適切に修飾されたジアジリン誘導体が存在しないためと推察する。生命現象の解明に没頭する生化学者にとって、光反応性リガンドを容易に準備できない状況は好ましくない。事実、アジドやベンゾフェノンの光反応基の場合、光反応性リガンドを製作するための様々な誘導体が試薬メーカーから販売されており、生命現象の解明に利用されている。

これまでアルコキシル基で置換したフェニルジアジリンが、光反応リガンドを合成する出発物質として唯一の有用な合成ユニットであった。^{16,17)} われわれは、それに代わる出発材料として、最もシンプルなジアジリン化合物である 3-phenyl-3-trifluoromethyl-3H-diazirine **2** に注目した (Fig. 4)。市販品 2,2,2-trifluoro-1-phenyl-ethanone **1** から **2** を数百グラム単位で容易に大量合成できる方法が確立されており、¹⁸⁾ 大量の出発材料を得ることができる。しかしながら、フェニルジアジリン **2** のベンゼン環上に適当な置換基を導入する方法が確立されていないことから、光反応性リガンドの出発化合物として広く利用されることはなかった。そこで、われわれは種々の光反応性リガンドを合成する足掛かりとなる置換基を導入する合成方法の確立を目指して研究を進めた。

ベンゼン環への置換基導入の手掛かりとしてホルミル基を選び、ルイス酸として三塩化ガリウム (GaCl_3) を使用し、トリフルオロ酢酸 (TFA) の存在下、**2** の $\text{Cl}_2\text{CHOCH}_3$ による Friedel-Crafts 反

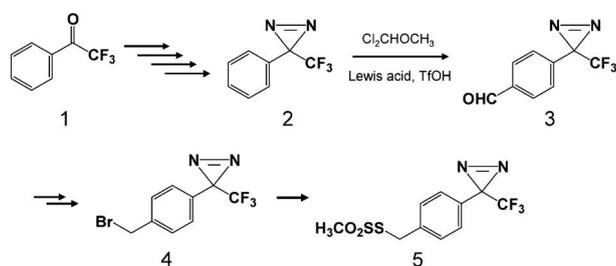


Fig. 4. Synthesis of Phenyl Diazirine Derivatives

応により、パラ位がアルデヒド置換されたフェニルジアジリンアルデヒド **3** を合成することに成功した。¹⁹⁾ ここに種々の誘導体への手掛かりとなる官能基を持つ **3** の合成に成功した。しかし、収率面で問題が残された。ところで、トリフルオロメタンスルホン酸 (TfOH) は $\text{Cl}_2\text{CHOCH}_3$ を安定化し、ホルミル化の収率を向上できるとの報告がある。²⁰⁾ フェニルジアジリンでの反応においても、実際、TFA を TfOH に置き換えることにより収率は 30% まで向上した。さらにルイス酸について検討したところ、三塩化鉄 (FeCl_3) を使用すると約 50%、五フッ化アンチモン (SbF_5) 及び四塩化チタン (TiCl_4) で約 80% の収率で **3** を得ることに成功した。²¹⁾ なお、四塩化チタンを用いた反応は吸熱反応であり、冷却操作をする必要がないため大量合成に適している。こうして、数百グラム単位で合成したフェニルジアジリン **2** をアルデヒド体 **3** に変換することが可能になった。アルデヒド **3** から容易にかつ高収率でエステル ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$)、アルコール ($-\text{CH}_2\text{OH}$)、臭化物 **4** ($-\text{CH}_2\text{Br}$)、メタンチオ硫酸化合物 **5** ($-\text{CH}_2\text{SSO}_3\text{CH}_3$) に変換可能である。本合成法の確立により、光反応性リガンドを製作するための出発材料を簡便にしかも大量に供給することができるようになった。

5. 誰もが使い易い光反応基ジアジリンを目指した光反応ユニット化技術

生体高分子は特異的に反応する官能基を持っており、その官能基を狙い有用な化合物を結合させることができる。例えば、タンパク質中のシステイン残基のチオール基や糖鎖末端のアルデヒド基は官能基選択的な反応に使用され、蛍光物質やビオチンなどを特異的に結合することができる。また、生体高分子は単位構造物が多数結合した構造を持つため、特定部位に特異的に反応する官能基を導入することも容易である。例えば、DNA のリン酸基の 1 つを、官能基選択的な反応に利用できるチオリン酸基に置き換えて合成することも容易である。生体高分子が保有する、又は、合成時に導入した特異的官能基を利用して、光反応基ジアジリンを導入できれば、混合するだけで光反応性の生体高分子リガンドを製作する技術が確立できる。そのためには光反応基ジアジリンを官能基特異的に反応する構造にする必要があり、誰にでも使い易い光反応基を目指して光反応

ユニット化技術を開発した (Fig. 5).

チオール基と特異的に反応するユニット **5** は、中性付近でシステイン残基を持ったペプチドやタンパク質に混ぜるだけで、チオール基特異的に導入することができる。²²⁾ この反応は特異性、収率ともに非常に高く、簡単に光反応性ペプチドやタンパク質を製作することができる。フェニルジアジリンの臭化物であるユニット **4** は、光反応性 DNA を製作する試薬である。DNA のリン酸基の一部をチオリン酸基で置き換えて合成した S 化 DNA に、ユニット **4** を水又は有機溶媒中で混合するだけで簡単に光反応性 DNA を作成することができる。¹⁵⁾ また、アミノオキシ基を持つフェニルジアジリン **7** はアルデヒド基と特異的に反応する性質を持ち、還元末端を持つ糖鎖及びペプチドアルデヒドと特異的に結合する。²³⁾ このように光反応ユニット **4**, **5**, **7** の開発により、単に混ぜるだけでタンパク質、ペプチド、DNA、糖鎖を光反応性リガンドにすることができるようになった。反応後に光反応性リガンドをカラムなどで精製する必要があるものの、ほとんどの場合 1 日以内に反応から精製までのステップを終えることができる。

ペプチド固相自動合成機を使用して光反応性ペプチドを製作することを考え、ジアジリンを持った光反応性アミノ酸の合成法についても検討した。光反応性アミノ酸として既に、アジド,²⁴⁾ ベンゾフェノン,¹⁰⁾ ジアジリン²⁵⁾ を導入したフェニルアラニン (Phe) 誘導体が知られている。例えば、ジアジリンを導入した Phe アナログの光学活性体は、ラセ

ミ体を酵素による限定分解により L 体のみを得る方法²⁵⁾ と、キラルなニッケル複合体存在下で不斉合成する方法²⁶⁾ で行われていた。前者の方法では煩雑な酵素処理が必要であり、後者の方法では高価なキラルな複合体を等量用いる必要があることから、いずれも大量合成に適していない。そこでわれわれは、シンコニジン誘導体を用いた触媒的不斉アルキル化により、**4** から **6** (ee 97%) への変換に成功した (Fig. 6)。²¹⁾ ここに、ジアジリンを導入した光反応性アミノ酸 **6** を高収率で大量合成できる方法を確立した。上記のように光反応性リガンドを簡便に製作することができる光反応ユニットの大量供給が可能となった。

6. 光反応ユニットを利用した光アフィニティーラベル実験

ここでは、光反応ユニット **5** 及び **6** を利用した光反応性カルモジュリンペプチドの作成と光アフィニティーラベル実験について紹介する (Fig. 7)。カルモジュリン結合ペプチドとして、17 残基のアミノ酸から構成される人工配列を使用した。この配列の N 末端から 3 残基目のトリプトファン (Trp) 残基がタンパク質との結合に重要であることが報告されている。²⁷⁾ ここで 3 残基目の Trp 残基を Cys 残基に置き換えたペプチドを合成すれば、光反応ユニット **5** を Trp 残基の位置に導入することができる。また、ペプチド自動合成機で Phe アナログの光反応ユニット **6** を含んだ光反応性ペプチドを作ることができる。2 種類の光反応性ペプチドを使用して、カルモジュリンタンパク質の光アフィニティーラベ

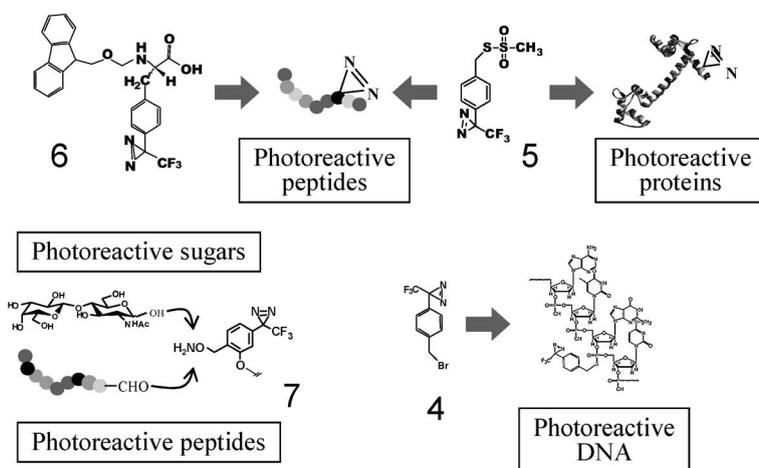


Fig. 5. Photoreactive Units for Preparing Photoaffinity Probes

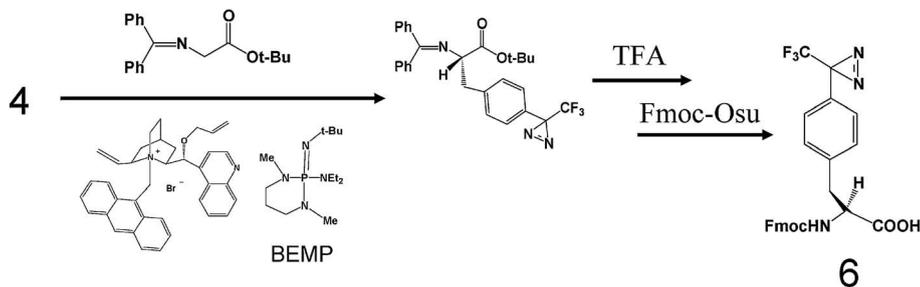


Fig. 6. Asymmetric Synthesis of Photoreactive Amino Acid

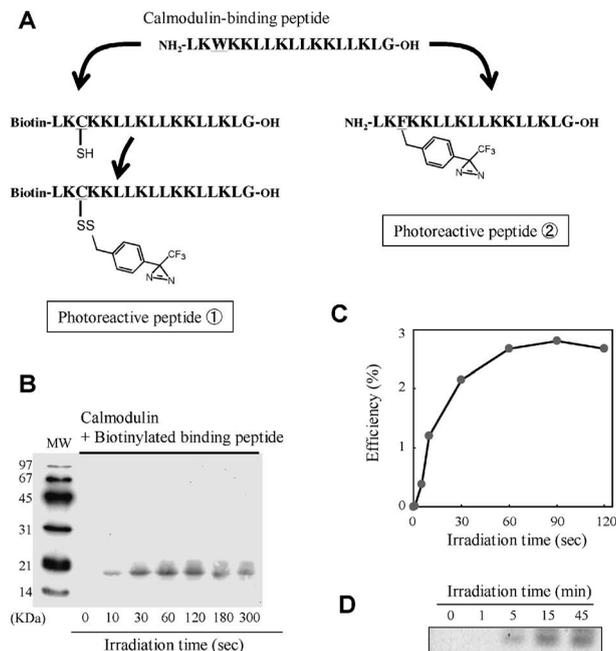


Fig. 7. Photoaffinity Labeling of Calmodulin Protein

(A) Preparation of photoreactive calmodulin-binding peptides. The peptide ① was prepared with photoreactive unit of phenyldiazirine thiosulfonate 5, and the peptide ② was synthesized with photoreactive amino acid 6. (B) Effect of irradiation time for the photoaffinity labeling of calmodulin protein with the photoreactive peptide ①. The mixtures of calmodulin and the peptide were irradiated by 360-nm light and the crosslinked complexes were visualized by chemiluminescence of biotin-avidin system. (C) Cross-linking efficiency of the photoreactive peptide ② to calmodulin protein. The efficiency was determined by HPLC. (D) Effect of irradiation time for photoaffinity labeling of calmodulin protein by the photoreactive peptide bearing benzophenone. The procedures were same as in B.

ル実験を行った (Fig. 7(A)). 反応ユニット 5 で製作した光反応性ペプチド①で行った実験では、光照射時間が長くなるにつれてクロスリンクした複合体 (20 kDa 付近のバンド) の量が増加していることが分かる (Fig. 7(B)). 2 分間の光照射で複合体の量は最大になった。光反応ユニット 6 で製作した光反応性ペプチド②で行った実験でも、クロスリンクした複合体の量は 2 分間で最大になった (Fig. 7 (C)). ベンゾフェノンを導入した光反応性カルモ

ジュリン結合ペプチドを製作した実験では、ジアジリンと同等のクロスリンク効率を得るためには 45 分間の光照射が必要であることが示された (Fig. 7 (D)). この結果からも、ジアジリンの方がベンゾフェノンよりも優れた光反応基であることが分かる。

クロスリンクした複合体は、質量分析の解析から、カルモジュリンタンパク質と光反応性ペプチドとが 1:1 で結合した複合体であること、また、カルモジュリンの特異的阻害剤であるトリフルオペラジンにより複合体形成が阻害されることを確認しており、²¹⁾ 光反応性リガンドは特異的にカルモジュリンタンパク質に結合していることを明らかにした。このように、光反応ユニットで製作した光反応性リガンドは、元のリガンドと同様の性質を保持しているため、受容体のスクリーニングや構造解析の実験で活用することができる。

7. まとめ

光反応基ジアジリンは生命現象の解明に優れた性質を持ちながらも、光アフィニティーラベル実験を行うための光反応性リガンドの製作が困難であったために広く利用されていなかった。われわれが達成した改良合成により、光反応性リガンドを製作するための出発化合物を簡便に、しかも大量に合成できるようになった。さらに、この出発材料を原料に、生体高分子と混ぜるだけで光反応性リガンドにできる光反応ユニットを製作し、タンパク質、ペプチド、DNA、糖鎖を簡便に光反応性リガンドにすることができるようになった。この光反応ユニット化技術を利用し、一例として光反応性カルモジュリン結合ペプチドを製作し、カルモジュリンタンパク質に対して特異的にクロスリンクしていることを確認した。これに限らず、興味ある対象リガンドを即座に光反応性リガンドにすることが可能であり、受容体タンパク質のスクリーニングや構造解析において、

光反応基ジアジリンがより広く活用されるための基盤技術を確立した。

謝辞 本研究は主に、富山大学薬学部生体認識化学研究室で行われたものであり、畑中保丸教授、友廣岳則准教授の御指導に深く感謝いたします。また、一緒に夜遅くまで研究を行ってくれた研究室の学生の皆さんに心より感謝申し上げます。これらの研究の一部は、科学研究費補助金 奨励研究、萌芽研究、基盤研究 B、C 及び文部科学省特定研究の助成の下に行われました。

REFERENCES

- 1) Dormán G., Prestwich G. D., *Trends Biotech.*, **18**, 64–77 (2000).
- 2) Dormán G., *Top. Curr. Chem.*, **211**, 169–225 (2000).
- 3) Hatanaka Y., Sadakane Y., *Curr. Top. Med. Chem.*, **2**, 271–288 (2002).
- 4) Singh A., Thornton E. R., Westheimer F. H., *J. Biol. Chem.*, **237**, PC3006–3008 (1962).
- 5) Sadakane Y., Hatanaka Y., “Chemical Genomics,” eds. by Darvas F., Guttman A., Dorman G., Marcel Dekker Inc., New York, 2004, pp199–214.
- 6) Hatanaka Y., Nakayama H., Kanaoka Y., *Rev. Heteroatom Chem.*, **14**, 213–243 (1996).
- 7) Hatanaka Y., *Yakugaku Zasshi*, **114**, 619–636 (1994).
- 8) Maliarik M. J., Goldstein I. J., *J. Biol. Chem.*, **263**, 11274–11279 (1988).
- 9) Galaray R. E., Craig L. C., Printz M. P., *Nat. New. Biol.*, **242**, 127–128 (1973).
- 10) Kauer J. C., Erickson-Viitanen S., Wolfe Jr. H. R., DeGrado W. F., *J. Biol. Chem.*, **261**, 10695–10700 (1986).
- 11) O’Neil K. T., Erickson-Viitanen S., DeGrado W. F., *J. Biol. Chem.*, **264**, 14571–14578 (1989).
- 12) Yang J., Clark A. E., Kozka I. J., Cushman S. W., Holman G. D., *J. Biol. Chem.*, **267**, 10393–10399 (1992).
- 13) Weber P. J. A., *J. Pept. Res.*, **49**, 375–383 (1997).
- 14) Tate J. J., Persinger J., Bartholomew B., *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1421–1426 (1998).
- 15) Sadakane Y., Takagi T., Tomohiro T., Tsurusawa K., Konoha K., Kawahara M., Hatanaka Y., *Photomed. Photobiol.*, **26**, 35–40 (2004).
- 16) Hatanaka Y., *J. Synth. Org. Chem. Jpn.*, **56**, 581–590 (1998).
- 17) Hatanaka Y., Hashimoto M., Kurihara H., Nakayama H., Kanaoka Y., *J. Org. Chem.*, **59**, 383–387 (1994).
- 18) Brunner J., Senn H., Richards F. M., *J. Biol. Chem.*, **255**, 3313–3318 (1980).
- 19) Kempin U., Kanaoka Y., Hatanaka Y., *Heterocycles*, **49**, 465–468 (1998).
- 20) Kobayashi S., Iwamoto S., *Tetrahedron Lett.*, **39**, 4697–4700 (1998).
- 21) Nakashima H., Hashimoto M., Sadakane Y., Tomohiro T., Hatanaka Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 15092–15093 (2006).
- 22) Kaneda M., Sadakane Y., Hatanaka Y., *Bioconjug. Chem.*, **14**, 849–852 (2003).
- 23) Hatanaka Y., Kempin U., Park J.-J., *J. Org. Chem.*, **65**, 5639–5643 (2000).
- 24) Schwyer R., Caviezel M., *Helv. Chim. Acta*, **54**, 1395–1400 (1971).
- 25) Nassal M., *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 7540–7545 (1984).
- 26) Fishwick C. W. G., Sanderson J. M., Findlay J. B. C., *Tetrahedron Lett.*, **35**, 4611–4614 (1994).
- 27) O’Neil K. T., Wolfe Jr. H. R., Erickson-Viitanen S., DeGrado W. F., *Science*, **236**, 1454–1456 (1987).