

シソのフェニルプロペン型精油成分  
生合成に関する研究

2020

馬場 まり子

## [目次]

緒言	1
第1章 ディラピオール生合成に関わるシトクロム P450 のクローニングと機能解析	4
第1節 ディラピオール生合成に関わるシトクロム P450 のクローニングと発現解析	4
1. ディラピオール生成系統で発現量の多い P450 配列の全長配列決定	4
2. <i>Pf-49487</i> の発現確認	6
第2節 <i>Pf-49487</i> のタンパク質発現と機能解析	7
1. 酵母を用いた <i>Pf-49487</i> のタンパク質発現	7
2. <i>Pf-49487</i> の機能解析	8
第3節 考察	12
第2章 ノトアピオール生合成に関わるシトクロム P450 のクローニングと機能解析	16
第1節 ノトアピオール生合成に関わるシトクロム P450 のクローニングと発現解析	16
1. ノトアピオール生成系統で発現量の多い P450 配列の全長配列決定	16
2. <i>Pf-18428</i> の発現確認	18
第2節 <i>Pf-18428</i> のタンパク質発現と機能解析	19
1. 酵母を用いた <i>Pf-18428</i> のタンパク質発現	19
2. <i>Pf-18428</i> の機能解析	20
第3節 考察	23
第4節 <i>Pf-49487</i> と <i>Pf-18428</i> のアミノ酸配列比較	26
結語	28
実験の部	29
参考文献	51
謝辞	56

## 緒 言

シソ (*Perilla frutescens* Britton var. *crispa* W. Deane) は東アジアから東南アジアで一般的に食される香味野菜である。主要な精油成分にモノテルペン (MT) 型化合物であるペリルアルデヒドを含むシソは中国や日本で薬用とされており、日本薬局方に収載される生薬「蘇葉」として漢方処方にも配合されている。

シソの精油の成分組成は多様であり、主成分によって十数種類の精油型に分類される[1]。精油型は主成分の生合成経路を考慮すると MT 型とフェニルプロペン (PP) 型の二つに大きく分けることができる[2]。シソの精油の生合成経路は遺伝的に制御されており[3,4]、それぞれの生合成遺伝子の働きは、酵素遺伝子のクローニングにより決定されてきている。MT 型精油成分の生合成に関与する酵素としてリモネン合成酵素やペリルアルデヒド合成酵素などの遺伝子がクローニングされているが[5, 6]、PP 型精油成分については生合成酵素遺伝子のクローニングの報告はなかった。

シソの PP 型精油成分にはエレミシン、ミリスチシン、ディラピオール、ノトアピオールがあり (図 1)、このようなフェニルプロパノイド骨格をもつ精油成分は他の植物精油中にも含まれる。例えば、ミリスチシンはナツメグの、ディラピオールはディルの主成分であり、他にもフェネルに含まれるアネトールやパセリに含まれるアピオールなど、図 2 に示すような化合物があり、これらはアルケニルベンゼンとも呼ばれる。このような構造の化合物は医薬品や香料に用いられる一方で、遺伝毒性や発がん性が指摘され、暴露マージンを用いたリスク評価がされるなど、薬理効果や毒性についてはよく研究されている[7]。しかし、これらの化合物の生合成研究は限られている。

フェニルプロパノイド骨格をもつ精油成分は、シキミ酸経路を経て L-フェニルアラニンから生合成されると予想され、メチルオイゲノールまでの生合成遺伝子のクローニングはバジルなどで報告されているが[8]、位置や数の異なる様々な置換基を形成する経路は明らかになっていない。これらの生合成酵素を明らかにすることは、植物の二次代謝産物の多様性が形成されてきた仕組みを理解するうえで重要であり、遺伝子組換えなどによる植物中の有用化合物の人工的な生産制御や、遺伝子を微生物で異種発現させて得られる酵素を利用する合成生物学的な物質生産にも寄与することができる。

シソのうちで、MT 型精油成分のペリルアルデヒドを主成分とするものが薬用とされる

が、中国から輸入されるシソのなかには、ペリルアルデヒドを含まず、PP 型精油成分と類似した構造をもつ(*E*)-アサロン (図 2) を含むものが見つかっている。また、(*E*)-アサロンの幾何異性体である(*Z*)-アサロンは毒性をもつことが報告されており[9]、(*E*)-アサロンも発がん性をもつ可能性があるため[10]、人体には好ましくない成分と考えられる。(*E*)-アサロンはペリルアルデヒドを主成分とするシソには含まれないことがこれまでの研究でわかっており[11]、現在の日本薬局方ではペリルアルデヒドと(*E*)-アサロンを分離して HPLC で定量する方法が定められている。(*E*)-アサロンの構造は、PP 型精油成分の構造と類似しているが、炭素鎖の二重結合の位置が異なる。したがって、(*E*)-アサロンが PP 型精油成分の生合成過程で生成する可能性はあるが、その詳細は不明である。シソの PP 型精油成分の生合成研究は、(*E*)-アサロンの生成機構の解明にもつながると考えられ、生薬としてのシソの安全性評価においての応用も期待される。

シソの PP 型精油成分の生合成経路は、自家受粉を繰り返して確立したシソ純系の交配実験と GC による精油成分詳細分析から図 1 のように推定されている[2,12]。生合成反応ではメトキシ基やメチレンジオキシ基が付加されると推定され、他植物におけるアルカロイドなどの生合成遺伝子の報告から、このような構造に形成にはシトクロム P450 (P450) による水酸基導入や環化反応が関与すると予想される[13]。P450 は、酸化や水酸化、エポキシ化、脱アルキル化などの様々な反応を触媒する酵素ファミリーであり、植物では多くの二次代謝産物の生合成に関与している。シロイヌナズナなどのゲノム解析から、植物遺伝子の約 1%が P450 をコードすると予想されている[14]。機能が同定されている植物 P450 の分子種は、CYP51 から CYP99 と CYP700 番台に分布しているが、多くのものの働きについては研究途中である。

本研究では、シソ純系を用いて作製した発現遺伝子配列断片 (EST) ライブラリーをもとに、それぞれの精油型のシソに特徴的に発現する P450 類似配列を選抜し、PP 型精油成分であるディラピオールとノトアピオールの生合成に関わる遺伝子をそれぞれクローニングした。また、生合成反応の中間体と予想される化合物を合成して標品として用い、PP 型のシソ系統の精油成分分析の結果と併せて生合成経路について考察した。

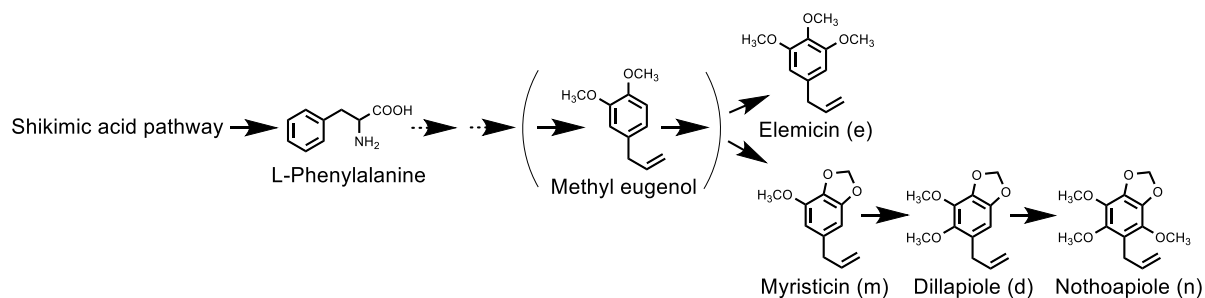


図 1. シソの PP 型精油成分の推定生合成経路

以降の本文中で、PP 型の精油型は PP-em,、PP-m、PP-md、PP-emd、PP-mdn と表記する。この表記は、それぞれの系統が主成分にエレミシンとミリスチシン、ミリスチシン、ミリスチシンとディラピオール、エレミシンとミリスチシンとディラピオール、ミリスチシンとディラピオールとノトアピオールを含むことを表す。

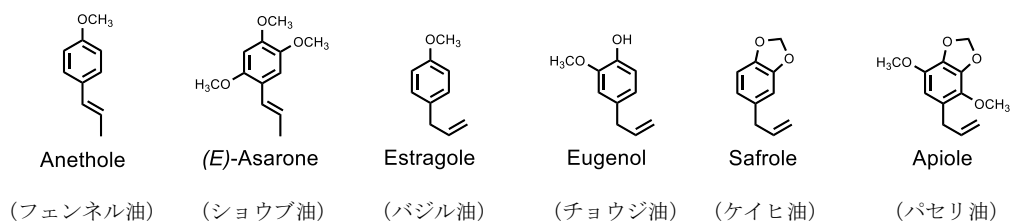


図 2. フェニルプロパノイド骨格をもつ精油成分の化学構造の例  
( ) 内はそれぞれの成分を含有する植物精油の例。

# 第1章 ディラピオール生合成に関わるシトクロム P450 のクローニングと機能解析

## 第1節 ディラピオール生合成に関わるシトクロム P450 のクローニングと発現確認

シソの PP 型精油成分の生合成には P450 の関与が予想される。そこで、作製した EST ライブラリーから P450 類似配列を選抜し、精油型の異なる系統間で発現量を比較することにより、ディラピオールを精油中に含むシソ系統で発現量が多く、ディラピオールの生合成に関与することが予想される配列を探索した。

### 1. ディラピオール生成系統で発現量の多い P450 配列の全長配列決定

BLAST 検索によって、EST ライブラリーから P450 類似配列と予測されるコンティグを選抜した。選抜したコンティグの発現量について、reads per kilobase of exon per million mapped read (RPKM) 値を用いて精油型の異なる系統間で比較した。ディラピオールを含む精油型の系統 (No. 16、25、5316) と含まない精油型の系統 (No. 10、12、5717) との間で RPKM 値の差が最も大きく、ディラピオールを含む精油型の系統内での RPKM 値の大小関係と精油中のディラピオールの相対含量の大小関係に相関が見られたコンティグ 49487 を標的とした (表 1)。そこで、No. 5316 のシソから抽出した RNA を用いて rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法によりコンティグ 49487 を含む cDNA の全長配列を決定し、決定した全長配列を *Pf-49487* (GenBank Accession No. LC476554) と名付けた。*Pf-49487* は全長 505 アミノ酸 (57 kDa) からなるタンパク質をコードし、このタンパク質には P450 に特徴的なプロリンリッチ領域や酸素結合ポケット、ヘム結合部位が保存されていた [15] (図 3)。BLAST 検索の結果、*Pf-49487* はゴマ (*Sesamum indicum*) 由来推定プレムナスピロジエンオキシゲナーゼ (GenBank Accession No. JP653840) と最も相同性が高く、アミノ酸レベルで 56%の相同性を示した。クローニングされているヒヨス (*Hyoscyamus muticus*) 由来プレムナスピロジエンオキシゲナーゼ (GenBank Accession No. EF569601) は CYP71D55 に分類される P450 であり、セスキテルペンの環を酸化することが報告されている [16] (図 4)。*Pf-49487* は CYP71D55 とはアミノ酸レベルで 49%の相同性を示した (図

3)。Pf-49487 は David R. Nelson 教授による体系的な分類法に基づき CYP71D558 と番号付けられた。

表 1. コンティグ 49487 の系統ごとの RPKM 値

Contig	Strain (Oil Type)					
	10 (PP-em)	12 (PP-m)	16 (PP-md)	25 (PP-emd)	5316 (PP-mdn)	5717 (C)
49487	0.0824	0.0968	68.4	23.7	56.7	0.325

C は MT 型精油成分であるシトラールを主に含む精油型を表す。No. 16、25、5316 のシソ精油中のディラピオール<sup>1</sup>の相対含量はそれぞれ 53.2%、9.0%、21.1%[4,12]。

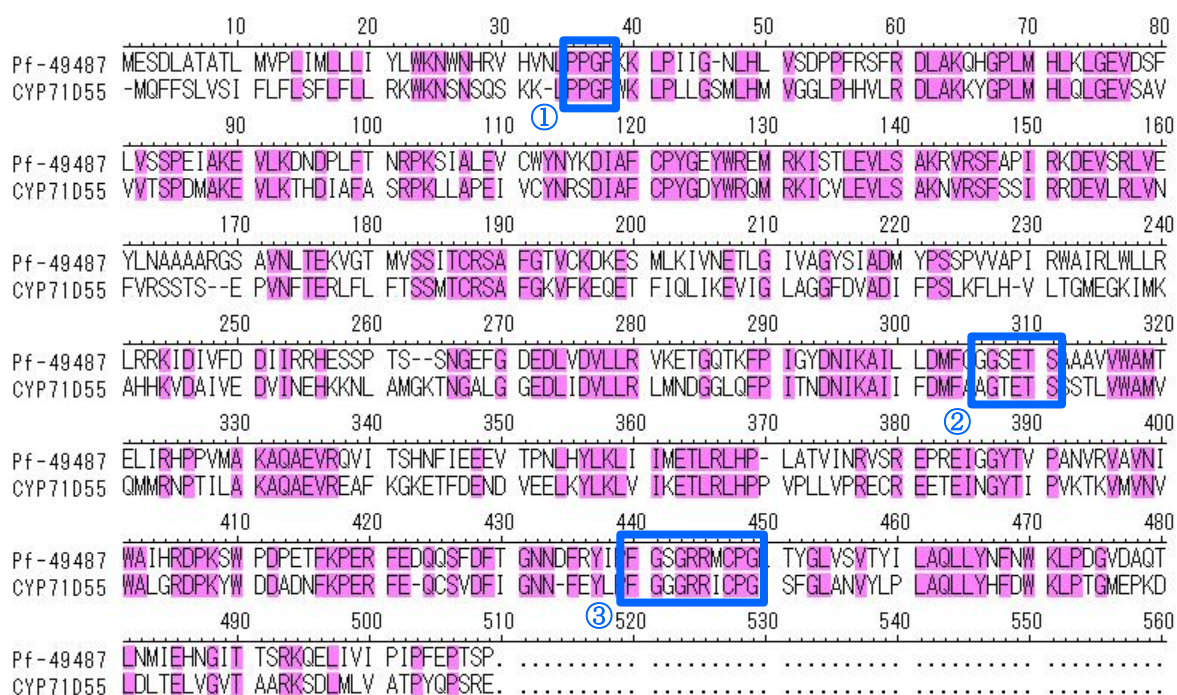


図 3. Pf-49487 のアミノ酸配列アラインメント

CYP71D55: ヒヨス (*Hyoscyamus muticus*) 由来プレムナスピロジエンオキシゲナーゼ (GenBank Accession No. EF569601)。ピンク色の背景は二つの配列のアミノ酸が一致することを示す。青色四角囲み①②③は P450 に特徴的な配列領域で、①プロリンリッチ領域、②酸素結合ポケット、③ヘム結合部位。

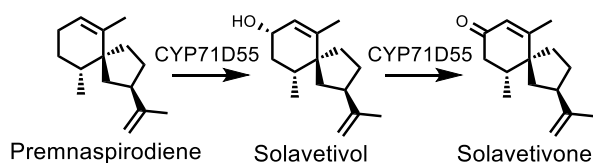


図 4. ヒヨス由来プレムナスピロジエンオキシゲナーゼが触媒する生合成反応

## 2. *Pf-49487* の発現確認

*Pf-49487* 転写物の植物中での存在を確認し、シソ系統間で発現量を比較するために、No. 12 (PP-m)、25 (PP-emd)、5316 (PP-mdn) のシソに関して逆転写リアルタイム PCR 解析を行った。No. 5316 での発現量を 1 としたとき、No. 12、25 での相対発現量はそれぞれ 0、0.32 となった(図 5)。この大小関係は EST ライブラリーの RPKM 値 (No. 12: 0.0968、25: 23.7、5316: 56.7) や精油中のディラピオール の相対含量 (No. 12: 0%、25: 9.0%、5316: 21.1%) に対応していた [4,12]。

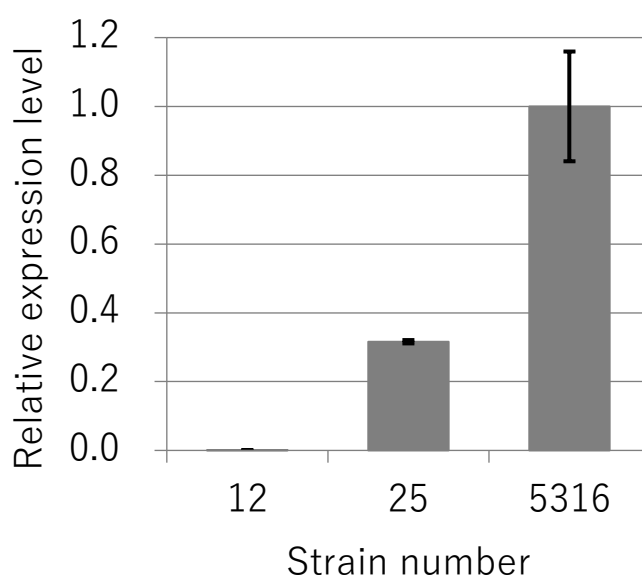


図 5. No. 12、25、5316 における *Pf-49487* 転写物の相対的な発現量



## 第2節 Pf-49487 のタンパク質発現と機能解析

第1節で得られた P450 類似タンパク質をコードする Pf-49487 について、酵母を用いた発現実験を行うことでその機能を調べた。

### 1. 酵母を用いた Pf-49487 のタンパク質発現

Pf-49487 を発現用ベクター (pGYR-SpeI) に組み込み、出芽酵母 AH22 株に形質転換した[13]。pGYR-SpeI は P450 還元酵素が共発現するように設計されており、P450 の発現に適している。発現タンパク質 (Pf-49487) を 100 mM HEPES/NaOH (pH 7.5) に懸濁させたマイクロソーム画分として調製した。P450 は一酸化炭素と結合すると 450 nm 付近に極大をもつ吸収スペクトルを示すため、得られたマイクロソーム画分の CO 差スペクトルを測定することで P450 が発現していることを確認した。その結果、Pf-49487 を発現させた酵母のマイクロソーム画分は、448 nm に吸収極大を示し P450 の特徴をもつことが示された (図 6)。

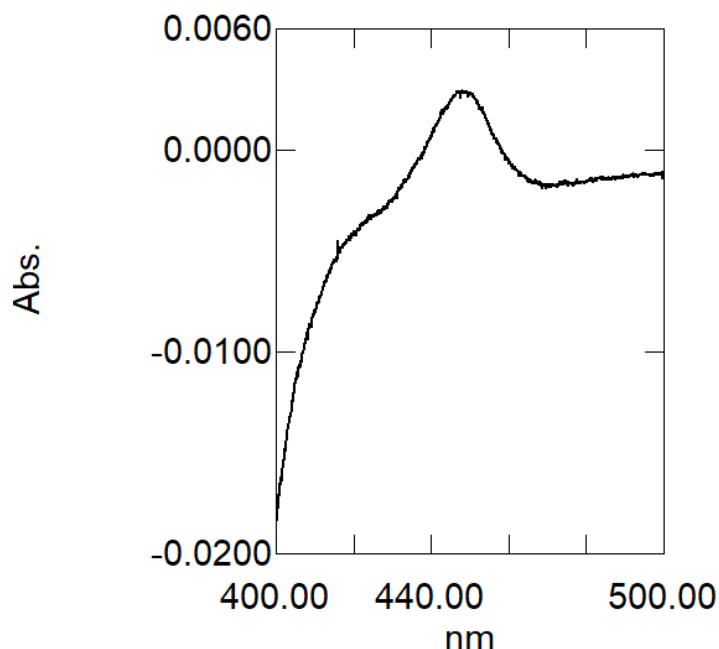


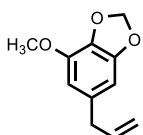
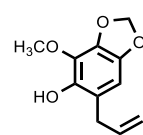
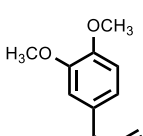
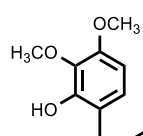
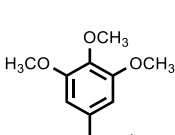
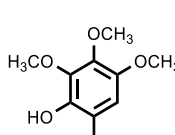
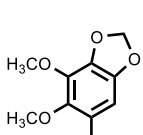
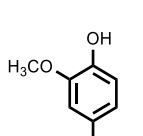
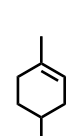
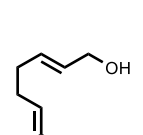
図 6. Pf-49487 を発現させた酵母のマイクロソーム画分を用いた CO 差スペクトル

## 2. Pf-49487 の機能解析

Pf-49487 を発現させた酵母のマイクロソーム画分 (Pf-49487 を含む) を用いて、表 2 に示す 7 種類の化合物をそれぞれ基質として酵素反応を行ったのちに、酵素反応生成物を GC-FID と GC-MS で解析した。基質にミリスチシン、メチルオイゲノール、エレミシンを用いたときに、それぞれ基質の一水酸基付加体である化合物 20、5、31 が生成した (図 7)。ディラピオール、オイゲノール、リモネン、ゲラニオールを基質としたときには生成物は見られなかった。生成物として予想される一水酸基付加体の同定には、表 3 に示す化合物を合成して用いた。ミリスチシン、メチルオイゲノールの一水酸基付加体には位置異性体が存在するが、Pf-49487 の酵素反応生成物に位置異性体は検出されなかった。内部標準としてオイゲノールを用いた GC-FID の相対感度から求めた相対生成物量 (表 2) は、ミリスチシンを基質としたときが最も高く、エレミシンを基質としたときは低かった。

次に、ミリスチシンを基質とした Pf-49487 の酵素反応の反応速度定数を求めた。マイクロソーム画分の P450 の濃度は CO 差スペクトルから求め 1.03  $\mu\text{M}$  だった。 $K_m$ 、触媒効率  $k_{\text{cat}}/K_m$  はそれぞれ 9.1  $\mu\text{M}$ 、 $1.65 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$  と計算された。Pf-49487 とアミノ酸配列の相同性が高いヒヨスのプレムナスピロジエンオキシゲナーゼ (CYP71D55) は、プレムナスピロジエンを基質としたときの水酸基付加反応の  $K_m$  値が 14  $\mu\text{M}$  であり、Pf-49487 のミリスチシンに対する  $K_m$  はこれと近い値となった[16]。Pf-49487 の至適 pH は約 7.5 であり (図 8)、プレムナスピロジエンオキシゲナーゼの反応と類似していた[16]。

表 2. Pf-49487 の酵素反応で得られた生成物

Substrate	Product	Relative product amount (%)
 Myristicin	 Compound 20	100
 Methyl eugenol	 Compound 5	91
 Elemicin	 Compound 31	22
 Dillapiole	-	-
 Eugenol	-	-
 Limonene	-	-
 Geraniol	-	-

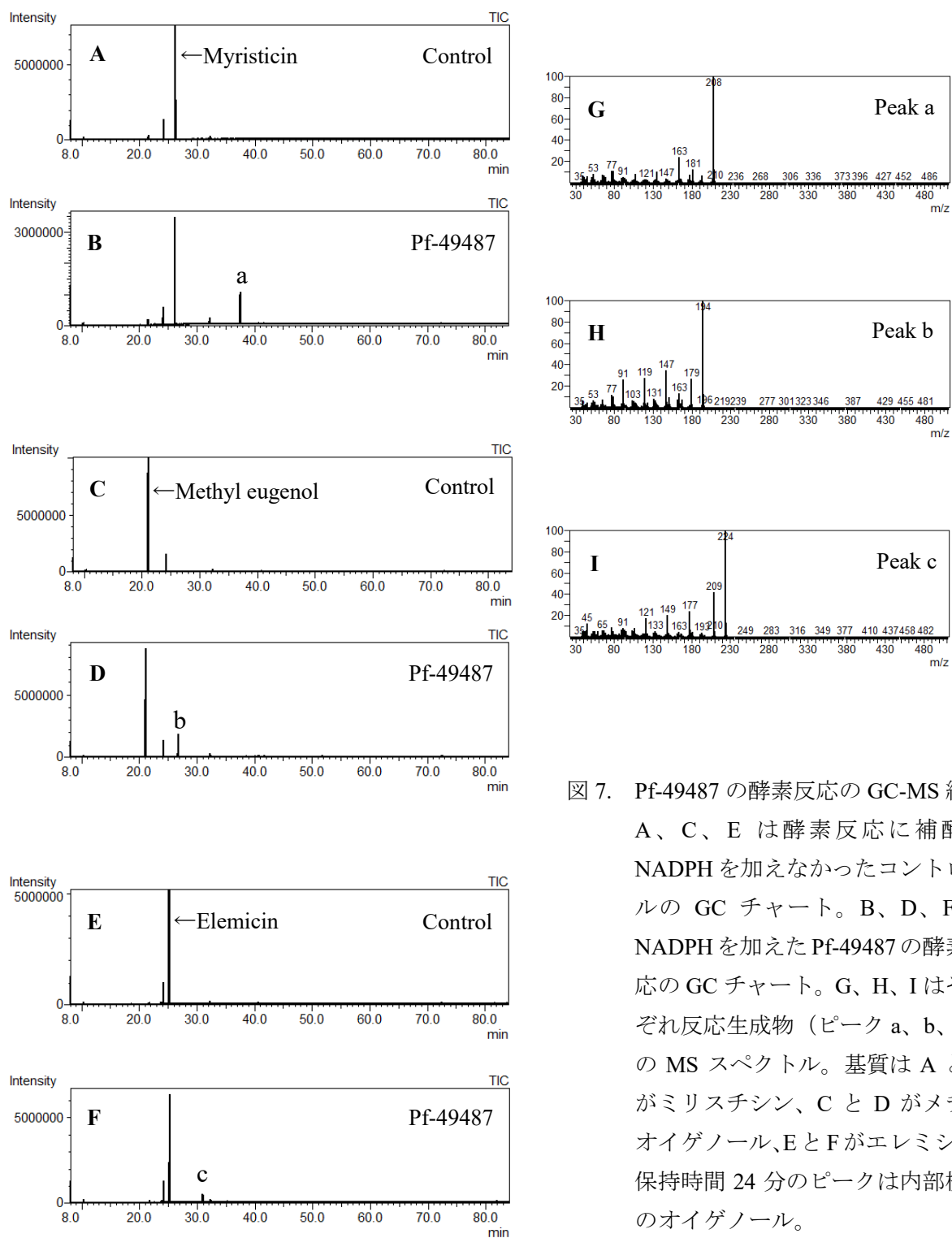


図 7. Pf-49487 の酵素反応の GC-MS 結果  
 A、C、E は酵素反応に補酵素 NADPH を加えなかったコントロールの GC チャート。B、D、F は NADPH を加えた Pf-49487 の酵素反応の GC チャート。G、H、I はそれぞれ反応生成物（ピーク a、b、c）の MS スペクトル。基質は A と B がミリスチシン、C と D がメチルオイゲノール、E と F がエレミシン。保持時間 24 分のピークは内部標準のオイゲノール。

表 3. 合成したアリルフェノール

Formula (Compound Number)	Mass Spectra	Retention Time <sup>※1</sup> (min)
		26
		50
		29
		37
		66
		77 [75] <sup>※2</sup>
		31
		50

※1 GCMS-QP2020 NX, Shimadzu で測定したときの値

※2 測定は 6850GC/5975MSD, Agilent Technologies または GCMS-QP2020 NX, Shimadzu を用いて同条件で行ったが、化合物 30 については保持時間にずれが見られた。6850GC/5975MSD, Agilent Technologies での保持時間を [ ] 内に示す。

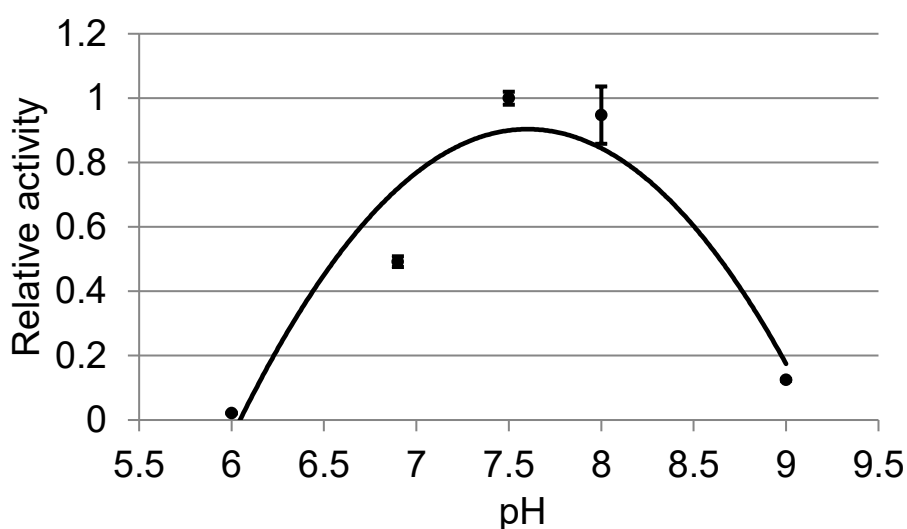


図 8. Pf-49487 の酵素反応の pH 依存性  
 基質にミリスチシン (0.2 mM) を用い、pH 7.5 のときの生成物量を 1 とした相対生成物量を、相対活性とした。

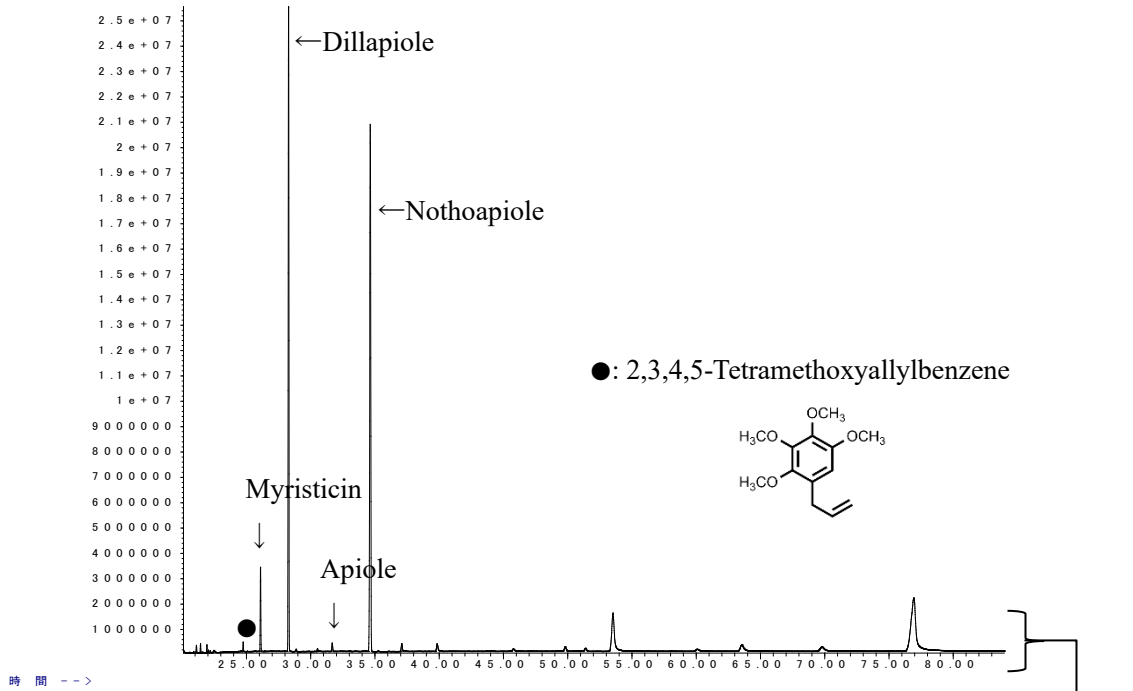
### 第 3 節 考察

Pf-49487 は、ミリスチシン、メチルオイゲノール、エレミシンを基質として、位置特異的に一水酸基を付加できる酵素であることが示された。シソ精油中には、ミリスチシンやエレミシンの一水酸基付加体 (化合物 20、31) (表 2) が少量存在するのに対して、メチルオイゲノールやメチルオイゲノールを基質に一水酸基が付加した生成物 (化合物 5) (表 2) は存在しないことから (図 9)、メチルオイゲノールから化合物 5 への変換は植物中で Pf-49487 が実際に触媒する反応ではないと考えられる。エレミシンも、これを基質とした酵素反応生成物がミリスチシンを基質としたときよりも相対的に少ないことや、エレミシンがメトキシ化された成分 (2,3,4,5-Tetramethoxyallylbenzene) は精油中に存在するが、その精油中の含量と Pf-49487 の発現量には相関がない (No. 16、25、5316 のシソ精油中の 2,3,4,5-Tetramethoxyallylbenzen の相対含量はそれぞれ 0.14%、3.24%、0.43%[4,12]) ことから、主要な基質ではないと考えられる。したがって、Pf-49487 が植物中で触媒する主要な反応はミリスチシンへの水酸基付加であり、この反応によってディラピオールへの中間体

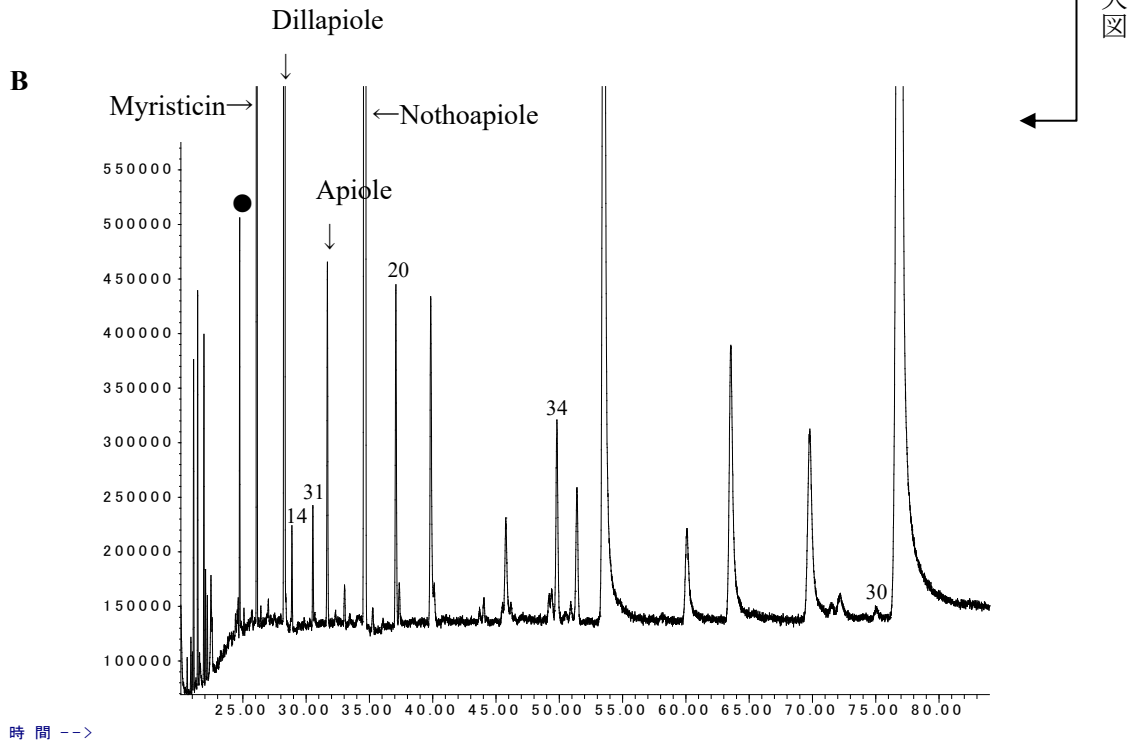
が生成すると考えられる。Pf-49487 は MT 型精油成分であるリモネンやゲラニオールは基質とせず、フェニルプロパノイド骨格をもっているでもディラピオールやオイゲノールは基質としなかった。しかし、フェニルプロパノイド骨格をもち構造が類似している三つの化合物（ミリスチシン、メチルオイゲノール、エレミシン）を基質としたとき、ベンゼン環についてのメトキシ基とアリル基の間の炭素原子のみを水酸化したことから、基質特異性はあまり高くないが、高い位置特異性で水酸化反応を触媒することが示唆された。Pf-49487 と同じ CYP71D に分類される酵素にも位置特異性が高いものはあり、CYP71D13 に分類されるリモネン水酸化酵素はリモネンの 3 位の炭素原子を特異的に水酸化する[17]。

シソの PP 型精油成分の生合成経路は、エレミシン、ミリスチシン、ディラピオール、ノトアピオールを主成分に含む純系のシソの交配実験から、エレミシン、ディラピオール、ノトアピオールのそれぞれの生成を制御する遺伝子がメンデルの法則に従って存在するという結果が得られたために、図 1 のように推定されている[12]。メチルオイゲノールまでの生合成酵素遺伝子は他の植物でクローニングされていることから[8]、化学構造を考慮するとメチルオイゲノールが PP 型精油成分の前駆体である可能性は予想できる。しかし、本研究で、Pf-49487 が *in vitro* ではミリスチシンを基質とした場合と同等の高い活性でメチルオイゲノールを基質として水酸基を付加するにもかかわらず、シソ精油中にはミリスチシンやミリスチシンの水酸基付加体が存在するのに対して、メチルオイゲノールやメチルオイゲノールの水酸基付加体は存在しないことから、他の化合物が前駆体となる可能性も示唆された。

A



B



次ページに続く



C

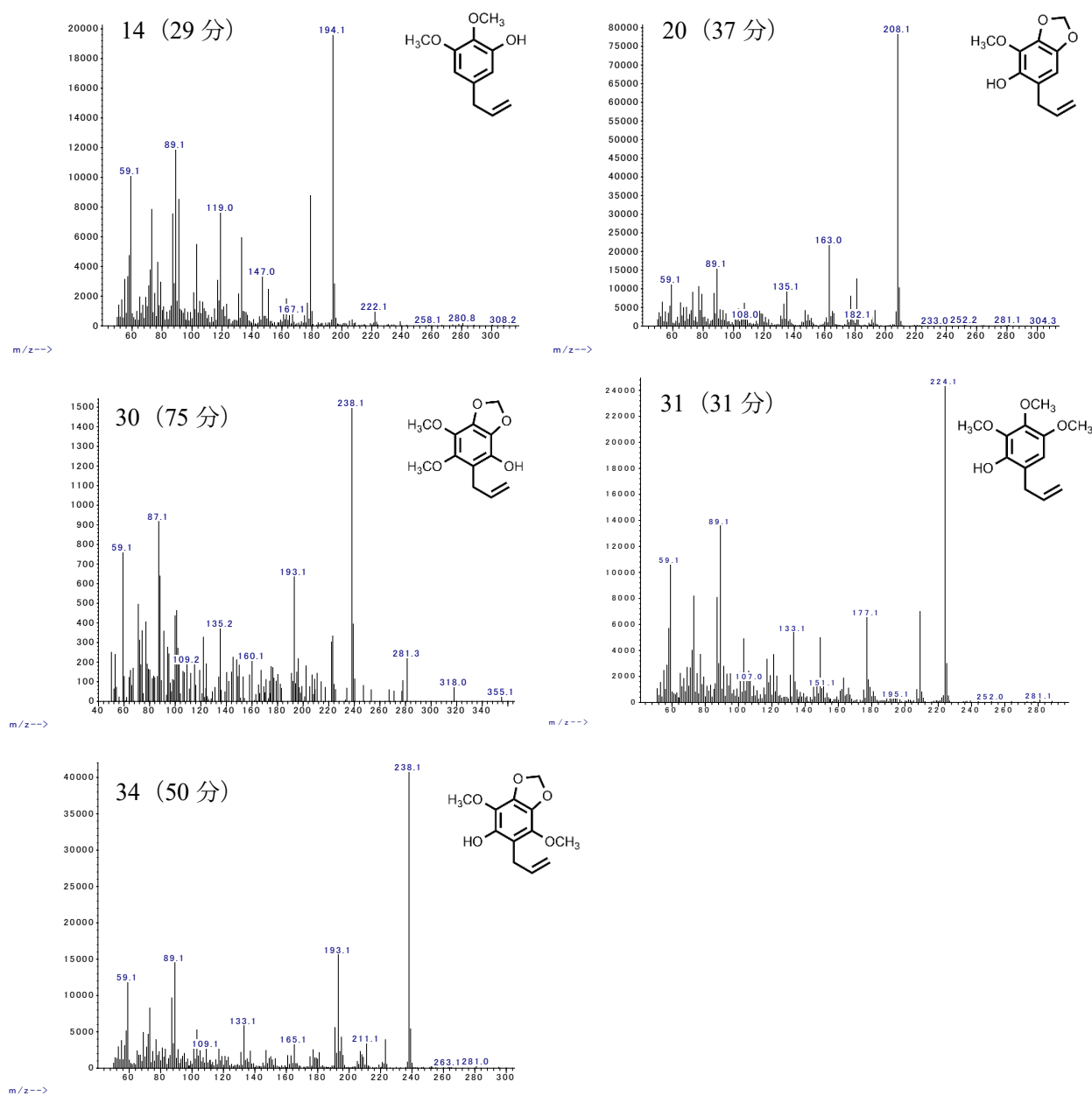


図 9. No. 5316 (PP-mdn) のシソの精油の GC-MS 分析

A は No. 5316 のシソの精油の GC チャート。B は A の拡大図。黒丸 (●) は 2,3,4,5-Tetramethoxyallylbenzene のピーク。ピーク上の数字は各ピークが示す一水酸基付加体の化合物番号。C は B の一水酸基付加体のピークの MS スペクトルで、それぞれ ( ) は保持時間を示す。化合物 30 のピークはバックグラウンドを減算した MS スペクトルを示す。測定は 6850GC/5975MSD, Agilent Technologies で行い、一水酸基付加体は表 3 に示す標品との比較で同定した。

## 第2章 ノトアピオール生合成に関わるシトクロム P450 のクローニングと機能解析

### 第1節 ノトアピオール生合成に関わるシトクロム P450 のクローニングと発現確認

第1章では、ディラピオールを精油中に含むシソ系統に着目した *Pf-49487* のクローニングについて述べた。本章では、ノトアピオールを精油中に含むシソ系統に着目して同様の方法で行ったノトアピオール生合成に関わる配列の探索について述べる。

#### 1. ノトアピオール生成系統で発現量の多い P450 配列の全長配列決定

EST ライブラリーから、精油中にノトアピオールを含む系統 (No. 5316) のみで RPKM 値が高く、発現量の多い P450 類似配列であるコンティグ 18428 を選抜した(表4)。No. 5316 のシソから抽出した RNA を用いて RACE 法によりコンティグ 18428 を含む cDNA の全長配列を決定し、この全長配列を *Pf-18428* (GenBank Accession No. LC596386) と名付けた。*Pf-18428* は全長 506 アミノ酸 (57 kDa) からなるタンパク質をコードし、このタンパク質には P450 に特徴的な領域が保存されていた[15] (図 10)。BLAST 検索の結果、*Pf-18428* はアミノ酸レベルで *Pf-49487* と最も高い相同性(77%)を示し、次にゴマ (*Sesamum indicum*) 由来推定プレムナスピロジエンオキシゲナーゼ (GenBank Accession No. JP653840) と高い相同性 (59%) を示した。クローニングされているヒヨス (*Hyoscyamus muticus*) 由来プレムナスピロジエンオキシゲナーゼ[16] (CYP71D55: GenBank Accession No. EF569601) とはアミノ酸レベルで 50%の相同性を示した (図 10)。*Pf-18428* は David R. Nelson 教授による体系的な分類法に基づき CYP71D623 と番号付けられた。

表 4. コンティグ 18428 の系統ごとの RPKM 値

Contig	Strain (Oil Type)					
	10 (PP-em)	12 (PP-m)	16 (PP-md)	25 (PP-emd)	5316 (PP-mdn)	5717 (C)
18428	0.272	0.399	0.359	0.183	36.0	0.116

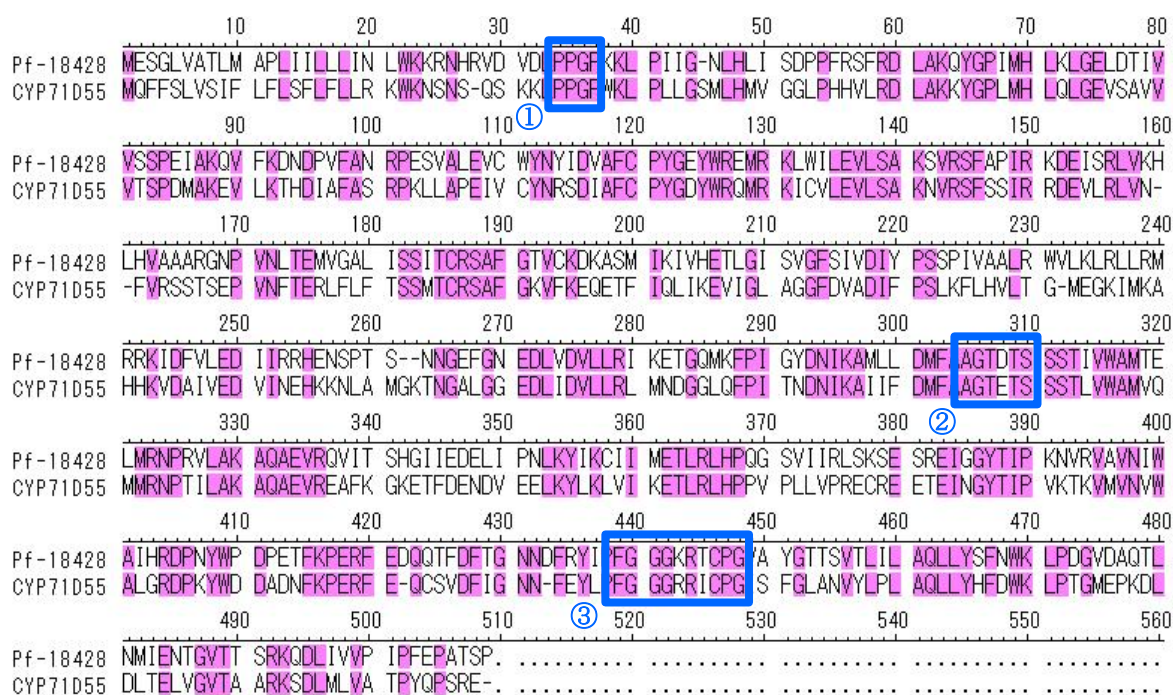


図 10. Pf-18428 のアミノ酸配列アラインメント

CYP71D55: ヒヨス (*Hyoscyamus muticus*) 由来プレムナスピロジェンオキシゲナーゼ (GenBank Accession No. EF569601)。ピンク色の背景は二つの配列のアミノ酸が一致することを示す。青色四角囲み①②③は P450 に特徴的な配列領域で、①プロリンリッチ領域、②酸素結合ポケット、③ヘム結合部位。

## 2. *Pf-18428* の発現確認

No. 16 (PP-md)、25 (PP-emd)、32 (PA (MT 型精油成分であるペリルアルデヒドを主に含む精油型))、5254 (C)、5316 (PP-mdn) のシソに関して、逆転写リアルタイム PCR 解析を行い、*Pf-18428* 転写物の発現をシソ系統ごとに確認した。*Pf-18428* の転写物は精油中にノトアピオールを含むシソ系統 No. 5316 でのみ特異的に発現しており、他の PP 型の系統 (No. 16、25) や MT 型の系統 (No. 32、5254) では全く検出されなかった (図 11)。ノトアピオールを精油中に含むシソ系統は No. 5316 の一系統しか見つかっていないため、ノトアピオールを含むシソ系統間で発現を比較することはできないが、*Pf-18428* がノトアピオール生合成において重要な役割を担っている可能性が示された。

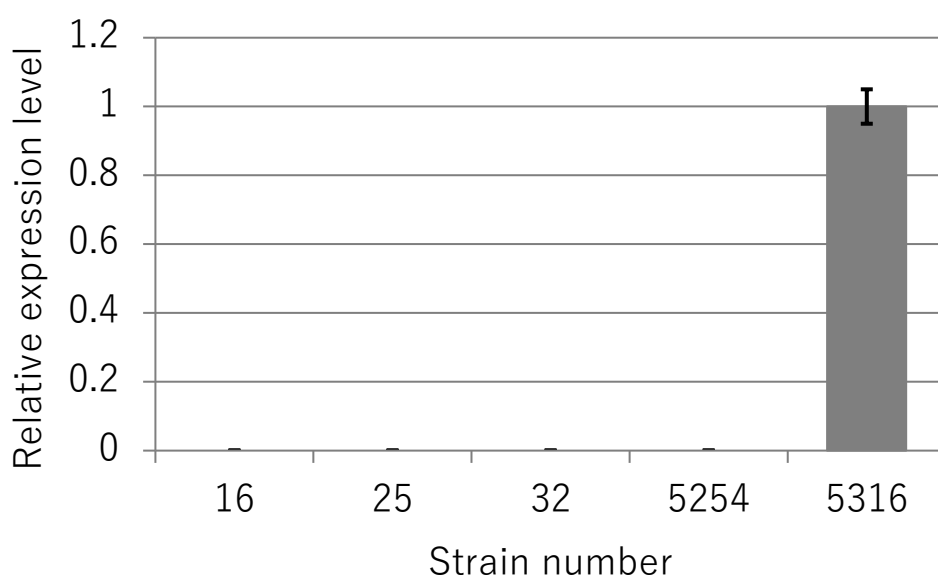


図 11. No. 16、25、32、5254、5316 における *Pf-18428* 転写物の相対的な発現量

## 第2節 Pf-18428 のタンパク質発現と機能解析

### 1. 酵母を用いた Pf-18428 のタンパク質発現

第1章と同様の方法で Pf-18428 を酵母で発現させ、発現タンパク質 (Pf-18428) を 100 mM HEPES/NaOH (pH 7.5) に懸濁させたマイクロソーム画分として調製した。得られたマイクロソーム画分の CO 差スペクトルを測定したところ、447 nm に吸収極大を示し、P450 としての特徴をもつことが示された (図 12)。

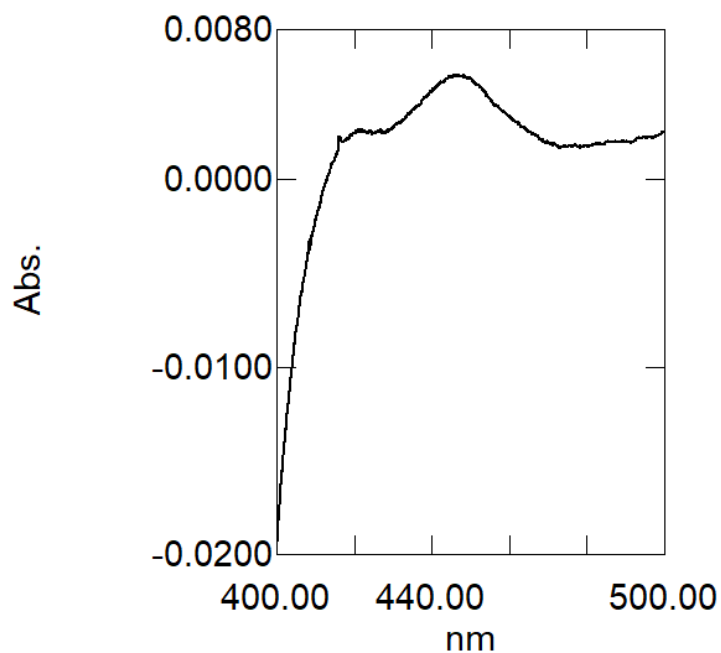
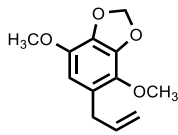
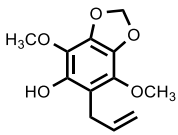
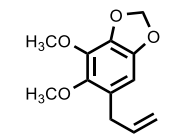
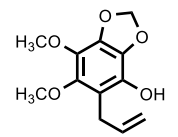
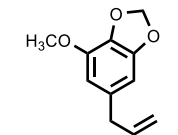
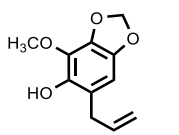
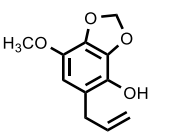
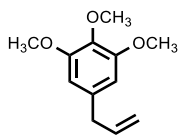
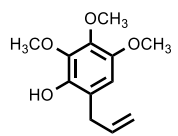
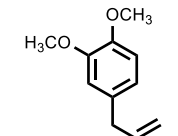
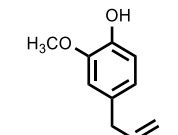
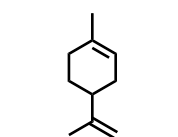
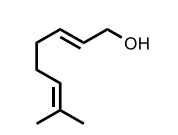


図 12. Pf-18428 を発現させた酵母のマイクロソーム画分を用いた CO 差スペクトル

## 2. Pf-18428 の機能解析

*Pf-18428* を発現させた酵母のマイクロソーム画分 (*Pf-18428* を含む) を用いて、表 5 に示す 8 種類の化合物をそれぞれ基質として酵素反応を行ったのちに、酵素反応生成物を GC-FID と GC-MS で解析した。生成物の同定には表 3 の化合物を用いた。基質にアピオール、ディラピオール、ミリスチシン、エレミシンを用いたときに生成物が見られ (図 13)、メチルオイゲノール、オイゲノール、リモネン、ゲラニオールを基質としたときには生成物が見られなかった。内部標準としてオイゲノールを用いた GC-FID の相対感度から求めた相対生成物量を表 5 に示す。アピオール、ディラピオールには、それぞれベンゼン環に置換基が付加していない炭素原子が一つずつあり、その位置に水酸基が付加した化合物が生成したが (化合物 34、30)、相対生成物量はアピオールを基質としたときの方が多かった。ミリスチシン、エレミシンにはベンゼン環上で置換されていない炭素原子が二つずつあり、ミリスチシンではどちらに水酸基が導入されるかにより位置異性体となるが、メトキシ基とアリル基の間の炭素原子の水酸化による生成物の方が多く生成した (化合物 20)。位置異性体となるメチレンジオキシ基とアリル基の間の炭素原子の水酸化 (化合物 23) やエレミシンの水酸化 (化合物 31) による生成物は微量だった。

表 5. Pf-18428 の酵素反応で得られた生成物

Substrate	Product	Relative product amount (%)
 Apiole	 Compound 34	100
 Dillapiole	 Compound 30	47
 Myristicin	  Compound 20    Compound 23	Compound 20; 53 Compound 23; 3
 Elemicin	 Compound 31	1
 Methyl eugenol	-	-
 Eugenol	-	-
 Limonene	-	-
 Geraniol	-	-

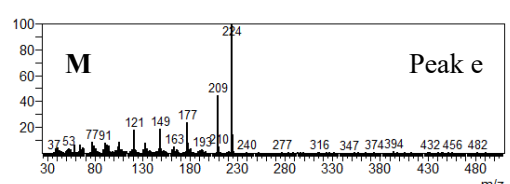
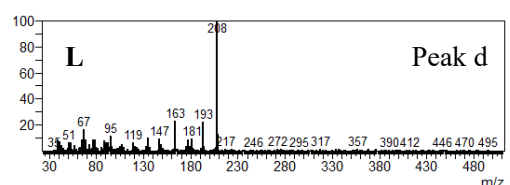
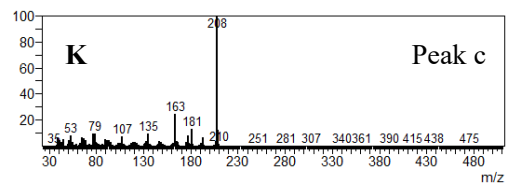
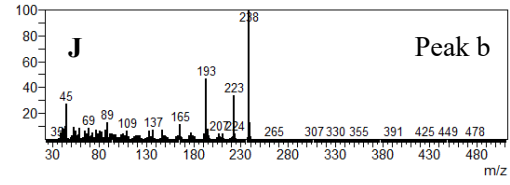
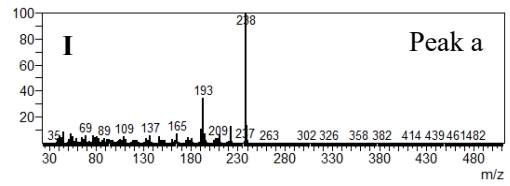
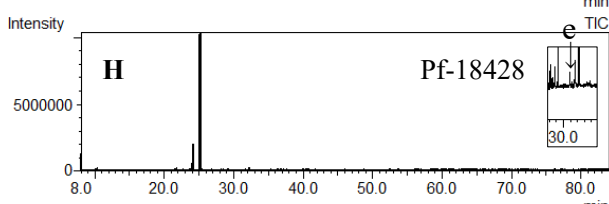
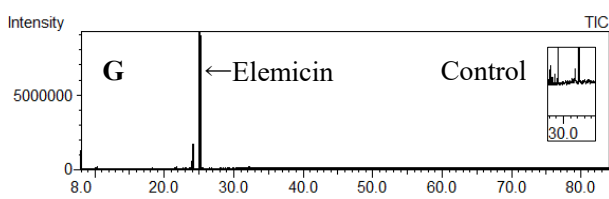
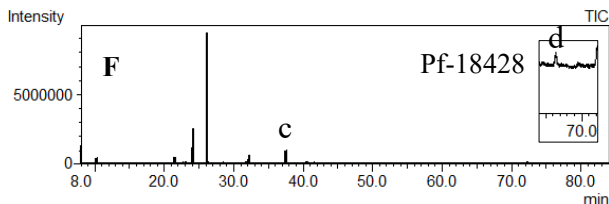
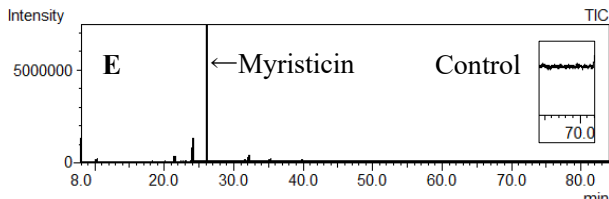
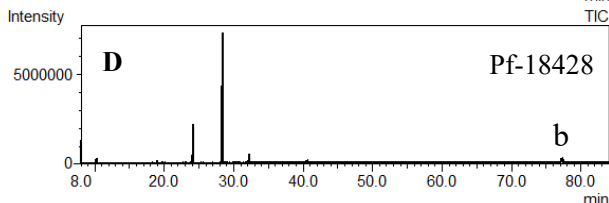
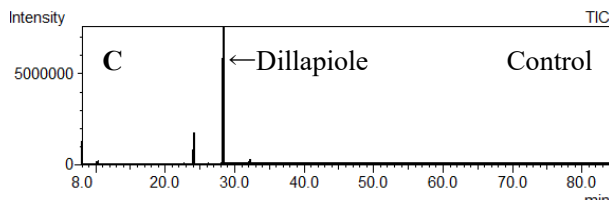
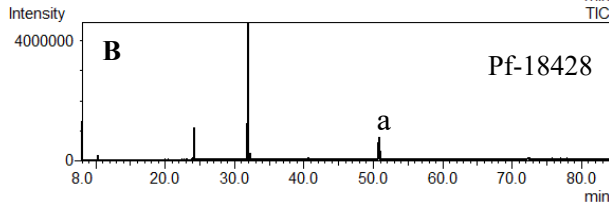
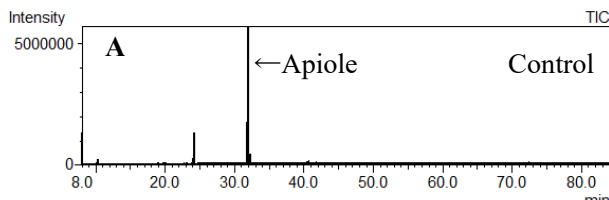




図 13. Pf-18428 の酵素反応の GC-MS 結果

A、C、E、G は酵素反応に補酵素 NADPH を加えなかったコントロールの GC チャート。B、D、F、H は NADPH を加えた Pf-18428 の酵素反応の GC チャート。E と F、G と H の右上の囲みはそれぞれ保持時間 66 分付近と 31 分付近の拡大図。I、J、K、L、M はそれぞれ反応生成物（ピーク a、b、c、d、e）の MS スペクトル。L と M（ピーク d と e）はバックグラウンドを減算した MS スペクトル。基質は A と B がアピオール、C と D がディラピオール、E と F がミリスチシン、G と H がエレミシン。保持時間 24 分のピークは内部標準のオイゲノール。

### 第 3 節 考察

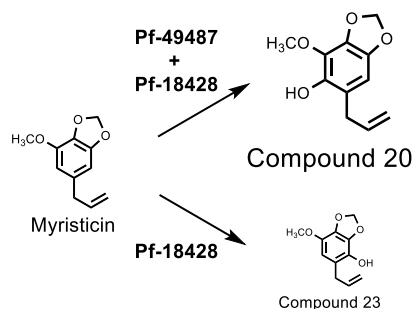
Pf-18428 は、アピオール、ディラピオール、ミリスチシン、エレミシンを基質として一水酸基を付加した。しかし、水酸基導入の位置特異性は Pf-49487 ほど厳密ではなく、ミリスチシンを基質にしたときに微量の位置異性体を生成することが示された。Pf-18428 と同じ CYP71D に分類される P450 には、Pf-49487 (CYP71D558) やリモネン 3-水酸化酵素 (CYP71D13) のように位置特異性の高いものもあるが、Pf-18428 のように微量の異性体を生成するものもある。ヒヨス由来プレムナスピロジエンオキシゲナーゼ (CYP71D55) は、プレムナスピロジエンを基質にすると位置特異的に水酸化するが、5-エピ-アリストロケン を基質にすると少量の位置異性体を生成することが報告されている[16]。

エレミシンを基質にしたときに生じた微量の水酸基付加体（化合物 31）は No. 5316 の精油中に存在し、この水酸基がメトキシ基に変換された化合物も精油成分として存在することから（図 9） [12]、植物中でも Pf-18428 がエレミシンを基質とする可能性はある。しかし、エレミシンにメトキシ基が付加した化合物はノトアピオールを含まずディラピオールを含む系統である No. 16 (PP-md) や 25 (PP-emd) にも存在するが[4]、これらの系統に Pf-18428 は発現していないことから、エレミシンに水酸基を付加する反応に主に寄与するのは Pf-18428 ではないと考えられる。したがって、Pf-18428 が植物中で主に触媒する反応はアピオール、ディラピオール、ミリスチシンの一水酸化と考えられ、酵素反応の相対生成物量からは、アピオールを基質とする反応が最も進行しやすい可能性が示された。

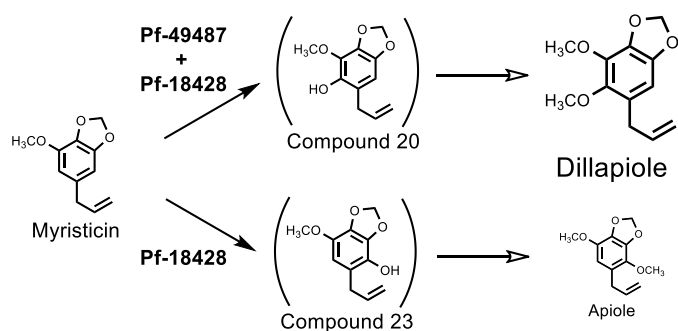
また、ノトアピオールを含む系統である No. 5316 の精油中には、ノトアピオールよりも多量のディラピオールが含まれていることが報告されており[12]、本研究の No. 5316 の精油の GC-MS 分析の結果からはアピオールも少量含まれていることが示された (図 9)。これらを考慮すると、Pf-18428 はノトアピオールの生合成に関わる水酸化酵素であるが、その原料となる基質はディラピオールとアピオールの両方であり、図 14 に示すように、ミリスチシンから分岐してノトアピオールに至る二つの生合成経路に関与すると考えられる。

ミリスチシンは Pf-49487 により位置特異的に水酸化されてディラピオールへの中間体 (化合物 20) となるが、Pf-18428 もこの反応を触媒して化合物 20 を生成し、さらに Pf-18428 は位置異性体 (化合物 23) も少量生成してアピオールへの中間体を生成すると推測される (図 14-1)。これらの水酸基付加体は *O*-メチル基転移酵素の働きによりディラピオールやアピオールへと変換されると予想されるが、水酸基付加体の生成量を考えるとディラピオールの方がアピオールより多く生成すると考えられる (図 14-2)。ディラピオールとアピオールはどちらも Pf-18428 の基質となるが、ディラピオールはあまり基質として消費されずに精油中に蓄積するのに対して、アピオールはより多く基質として消費されることから精油中の含量としては少なくなると予測される。このように Pf-18428 の基質特異性の特徴から、No. 5316 の精油の成分含量は GC-MS 分析で得られたような結果になると考えられる (図 9、図 14-3)。化合物 20、30、34 は No. 5316 の精油中に確認できることから (図 9)、ノトアピオールがこのような二つの経路を経由して生合成されることが示唆される。化合物 23 が精油中に検出されなかった理由としては、その生成量が微量であることや、生成するとすぐにアピオールに変換されて検出限界以下となることが考えられる。

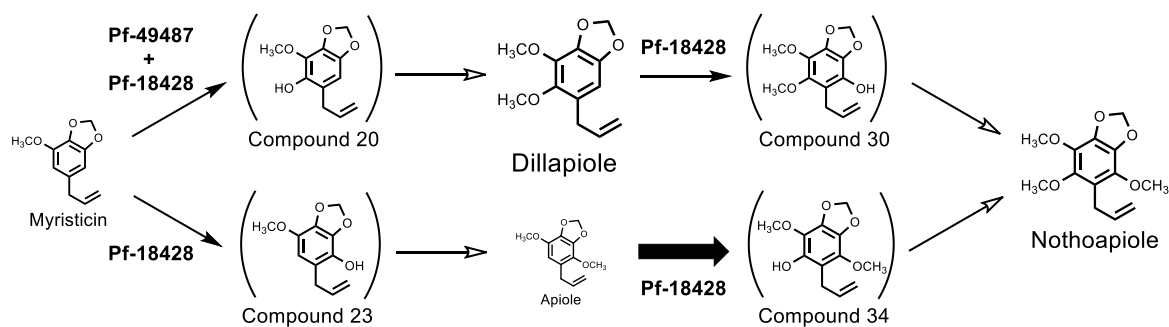
精油の成分組成は植物によって様々であり、ノトアピオールを含むがミリスチシンを含まないという報告もあることから[18]、精油を構成する成分の種類のみでは生合成経路の特定はできない。したがって、今後 PP 型精油成分の生合成解明に向けて、予想される *O*-メチル基転移酵素のシソからのクローニングや、異なる植物における Pf-18428 に類似した P450 の探索を通して、それらの酵素の基質や位置の特異性や反応性について詳細に解析、比較することが重要となると考えられる。



1. Pf-49487とPf-18428により化合物20が生成し、Pf-18428により化合物23も少量生成する。



2. 生合成中間体となる水酸基付加体の生成量から、ディラピオールとアピオールの生成量はディラピオール>アピオールと推定される。



3. 生成量はディラピオール>アピオール、Pf-18428による消費量はディラピオール<アピオールであることから、精油中の含量はディラピオール>>アピオールと予想され、これは実際の成分含量と一致する。

図 14. 推定されるノトアピオールの生合成経路

白抜き矢印は *O*-メチル基転移酵素の関与が予想される反応。

## 第4節 Pf-49487 と Pf-18428 のアミノ酸配列比較

本研究でクローニングした Pf-49487 (CYP71D558) と Pf-18428 (CYP71D623) は 77% の相同性を示したが、基質特異性や水酸基導入の位置特異性は異なっていた。そこで、二つのアミノ酸配列を比較して、特異性への関与が推測される部位について考察した。

二つの配列間でアミノ酸の違いは 113 か所あり、それらは P450 に保存的な領域を含め配列全体に分布していた (図 15)。Pf-49487 や Pf-18428 と同じ CYP71D に分類されるペパーミント (*Mentha × piperita*) 由来リモネン 3-水酸化酵素 (CYP71D15) とスペアミント (*Mentha spicata*) 由来リモネン 6-水酸化酵素 (CYP71D18) も、互いに 70% の相同性を示すが反応の位置特異性は異なる。位置特異性に関与する部位としては、リモネン 6-水酸化酵素において推定基質認識部位-5 [19] の Phe363 を Ile に置換すると、リモネンの 3 位を水酸化するように位置特異性が変化することが報告されている [20] (図 15 赤三角)。また、ヒヨス由来プレムナスピロジエンオキシゲナーゼ (CYP71D55) は、セスキテルペンシンターゼであるタバコ由来 5-エピ-アリストロケンジヒドロキシラーゼの配列をもとにクローニングされたが、これらについて基質認識部位-5 の対応するアミノ酸を入れ替え、プレムナスピロジエンオキシゲナーゼの Val367 を Ser に置換すると、反応の位置特異性は変わらず反応効率が変化する [16] (図 15 赤三角)。よって、Pf-49487 と Pf-18428 の対応するアミノ酸が基質の認識に影響を与える可能性はある。

また、酸素結合ポケットを含む推定基質認識部位-4 [19] で、Pf-49487 では Ala が三つ連続しているのに対して Pf-18428 では Ser-Ser-Thr となっており、アミノ酸側鎖の極性に顕著な違いが見られた (図 15 赤丸)。

P450 については、一次構造上の配列や結晶構造に共通する特徴が報告されてはいるが、基質と相互作用して反応の特異性を決定するアミノ酸は、サブファミリーや基質によって大きく異なる。したがって、Pf-49487 と Pf-18428 の基質や水酸基導入位置の特異性を決定づけるアミノ酸を明らかにするためには、今後、ドメインスワッピング法やアミノ酸の部位特異的変異導入法を用いた検討が必要であると考えられる。

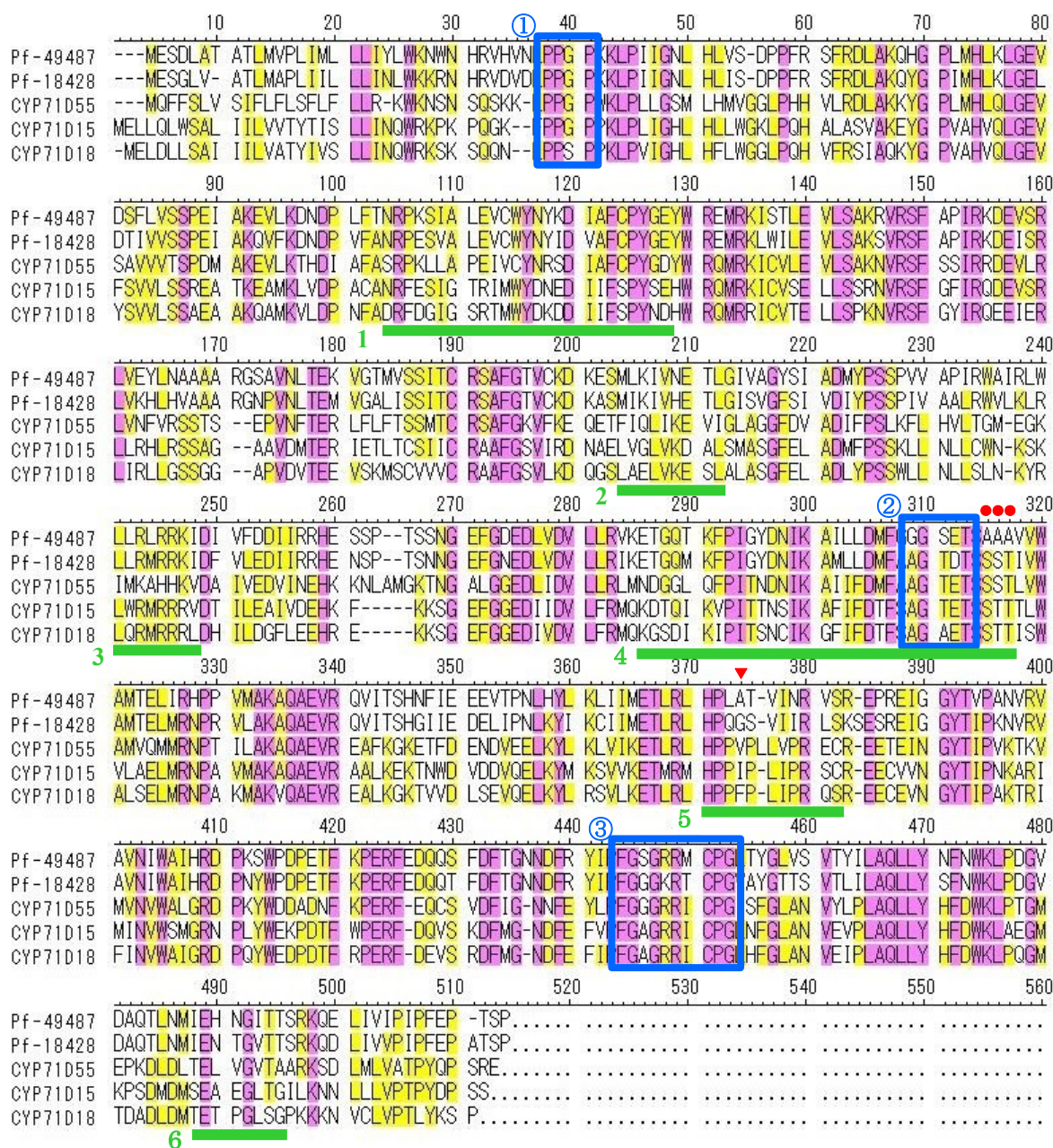


図 15. クローニングした配列と CYP71D のアミノ酸配列アラインメント

CYP71D55: ヒヨス (*Hyoscyamus muticus*) 由来プレムナスピロジエンオキシゲナーゼ (GenBank Accession No. EF569601)、CYP71D15: ペパーミント (*Mentha × piperita*) 由来リモネン 3-水酸化酵素 (GenBank Accession No. AF124817)、CYP71D18: スペアミント (*Mentha spicata*) 由来リモネン 6-水酸化酵素 (GenBank Accession No. AF124815)。ピンク色と黄色の背景は五つの配列でそれぞれアミノ酸が 100%、50%以上一致することを示す。青色四角囲み①②③は P450 に特徴的な配列領域で、①プロリンリッチ領域、②酸素結合ポケット、③ヘム結合部位。緑色下線は推定基質認識部位 1~6。赤丸 (●) と赤三角 (▼) は反応の特異性への関与が推測される箇所。

## 結 語

本研究では、シソの PP 型精油成分であるディラピオールやノトアピオールの生合成に関与する水酸化酵素である P450 をクローニングし、その反応の基質特異性や位置特異性などの特徴を明らかにした。また、シソ精油中の生合成中間体の存在も確認し、フェニルプロパノイド骨格をもつ精油成分の側鎖が付加される機構について新たな知見を得た。

Pf-49487 は、ミリスチシンに水酸基を位置特異的に付加することでディラピオールへの中間体を生成する P450 であり、メチルオイゲノールやエレミシンも位置特異的に水酸化した。しかし、メチルオイゲノールについてはメチルオイゲノールやこれを基質とした酵素反応生成物が精油中に検出されないことから、またエレミシンについては成分含量と発現量に相関がなく反応性も低いことから、Pf-49487 の植物中での主要な基質ではないと考えた。

Pf-18428 は、アピオールやディラピオールに水酸基を付加することでノトアピオールへの中間体を生成する P450 であると考えられるが、Pf-49487 よりも低い位置特異性でミリスチシンを基質として反応し、微量の位置異性体を生成した。シソの精油の成分含量も考慮すると、ノトアピオールは Pf-18428 が触媒する反応によってミリスチシンから分岐する二つの経路を介して生合成される可能性が示された。

二つの P450 のアミノ酸配列の相同性は 77% であり、配列の比較から基質特異性決定への関与が予想される部位が示された。

以上、本研究では、フェニルプロパノイド骨格をもつ精油成分の生合成経路解明の一助となる知見を得た。これは植物が作る有用二次代謝産物の人工的な生産制御にも寄与できると考えられる。また、本研究でクローニングした配列がコードする酵素は、触媒する水酸基導入反応に関して高い位置特異性と低い基質特異性を示したことから、反応の位置や基質の特異性についてより詳細に検討することで、医薬品や香料となり得る複雑な構造をもつ化合物の、合成生物学的手法による選択的かつ効率的な合成法開発への応用も期待される。

## 実験の部

### <植物材料>

本研究で用いたすべてのシソは、京都大学大学院薬学研究科で自家受粉を繰り返し、純系を維持しながら栽培した[21]。使用したシソの系統番号とそれぞれの精油型は表 6 の通り。

表 6. 実験に用いたシソ系統と精油型

系統番号	精油型
10	エレミシン+ミリスチシン (PP-em)
12	ミリスチシン (PP-m)
16	ミリスチシン+ディラピオール (PP-md)
25	エレミシン+ミリスチシン+ディラピオール (PP-emd)
32	ペリルアルデヒド (PA、MT 型)
5254	シトラール (C、MT 型)
5316	ミリスチシン+ディラピオール+ノトアピオール (PP-mdn)
5717	シトラール (C、MT 型)

### <P450 類似配列のクローニング>

EST ライブラリーはかずさ DNA 研究所に委託し先行研究で作製したものをを用いた[6]。EST ライブラリーから BLAST 検索により P450 類似配列を選抜し、それらの発現量を RPKM 値を用いて系統間で比較した。ディラピオールを含む系統 (No. 16、25、5316) とそれ以外の系統で RPKM 値に最も大きな差が見られたコンティグ 49487 と、ノトアピオールを含む系統 (No. 5316) のみで RPKM 値が大きいコンティグ 18428 を標的とした (表 1、表 4)。

標的とした配列はシソ新鮮葉から得た cDNA を鋳型に RACE 法によりクローニングした。以下の実験に用いたプライマーは表 7 に示す通り。cDNA は No. 5316 のシソ新鮮葉か



ら RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)で抽出した RNA を RevTra Ace (Toyobo) と add2 プライマーで逆転写して得た。PCR に用いたプライマーは 49487-f1、49487-r1、18428-f1、18428-r1 で、EST ライブラリーの情報をもとに設計した。コンティグ 49487 については、反応液組成 : 0.2  $\mu$ M プライマー、0.2 mM dNTPs、0.025 U/ $\mu$ l Blend Taq (Toyobo)、温度プログラム : 94°C 30 s  $\rightarrow$  (51°C 30 s、72°C 60)  $\times$  30 サイクル  $\rightarrow$  72°C 60 s。コンティグ 18428 については、反応液組成 : 0.3  $\mu$ M プライマー、0.2 mM dNTPs、0.05 U/ $\mu$ l r Taq (Toyobo)、温度プログラム : 94°C 120 s  $\rightarrow$  (94°C 45 s、57.7°C 45 s、72°C 60 s)  $\times$  35 サイクル  $\rightarrow$  72°C 60 s。アガロースゲルを用いた電気泳動の結果、EST データベースから得られた配列の長さの情報と一致するバンドが確認された。全長配列を得るために、コンティグ 49487 については 3'-RACE と 5'-RACE を、コンティグ 18428 については 3'-RACE を行った。コンティグ 49487 の 3'-RACE ではプライマーに add2 と 49487-f2、nested PCR のプライマーに amm と 49487-f3 を用いた。PCR 反応液組成 : 0.2  $\mu$ M プライマー、0.2 mM dNTPs、0.025 U/ $\mu$ l Blend Taq (Toyobo)。温度プログラム : 94°C 100 s  $\rightarrow$  (94°C 30 s、55°C 30 s、72°C 60 s)  $\times$  30 サイクル  $\rightarrow$  72°C 60 s。nested PCR の温度プログラム : 94°C 100 s  $\rightarrow$  (94°C 30 s、52°C 30 s、72°C 60 s)  $\times$  30 サイクル  $\rightarrow$  72°C 60 s。コンティグ 18428 の 3'-RACE ではプライマーに add2 と 18428-f2、nested PCR のプライマーに amm2 と 18428-f3 を用いた。PCR 反応液組成 : 0.2  $\mu$ M プライマー、0.2 mM dNTPs、0.025 U/ $\mu$ l Blend Taq (Toyobo)。温度プログラム : 94°C 100 s  $\rightarrow$  (94°C 30 s、66°C 30 s、72°C 120 s)  $\times$  30 サイクル  $\rightarrow$  72°C 120 s。nested PCR の温度プログラム : 94°C 100 s  $\rightarrow$  (94°C 30 s、58.5°C 30 s、72°C 90 s)  $\times$  30 サイクル  $\rightarrow$  72°C 90 s。PCR 生成物はアガロースゲルで電気泳動し、NucleoSpin Gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel) で精製後 pTA2 ベクター (Toyobo) に組み込み、配列を解析した。コンティグ 49487 については続いて 5'-RACE を行った。プライマーに 49487-r2 または 49487-r3 を用いて同様に逆転写し NucleoSpin Gel and PCR clean-up で精製した。0.6 U/ $\mu$ L TdT (Invitrogen)、0.2 mM dCTP (Toyobo) でポリ C 付加後、プライマーに 5ann と 49487-r3 または 49487-r4、nested PCR のプライマーに amm と 49487-r4 を用いた。PCR 反応液組成は 3'-RACE と同様。温度プログラム : 94°C 100 s  $\rightarrow$  (94°C 30 s、50°C 30 s、72°C 60 s)  $\times$  25 サイクル  $\rightarrow$  72°C 60 s。nested PCR の温度プログラム : 94°C 100 s  $\rightarrow$  (94°C 30 s、50.5°C 30 s、72°C 60 s)  $\times$  30 サイクル  $\rightarrow$  72°C 60 s。コンティグ 49487、18428 をもとに得られた全長配列をそれぞれ *Pf-49487*、*Pf-18428* とする。



表 7. 実験に用いたプライマーとその配列

プライマー名	配列
add2	5'-CCACGCGTCGACTACTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
amm	5'-GGCCACGCGTCGACTAC-3'
amm2	5'-CCACGCGTCGACTAC-3'
5ann	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGG(I)(I)GGG(I)(I)GGG(I)(I)G-3'
49487-f1	5'-TCCGTTCCGTTTCCTTCAGAGATCTCGCG-3'
49487-r1	5'-GGATGCCTTATCAGTTCAGTCATTGCC-3'
49487-f2	5'-AGAAGGTCCGGCACAATGGTCAGCTCCATC-3'
49487-f3	5'-TGTAGGTCTGCGTTCGGCACGGTGTGCAAG-3'
49487-r2	5'-GTAATTGTACCAGCAGACCTCTAGG-3'
49487-r3	5'-GGATCATTGTCTTTGAGGACTTCCTTC-3'
49487-r4	5'-CGATGACACGAGGAACGAGTCGAC-3'
49487-f4	5'-ACTAGTATGGAGTCCGATCTCGCAACTG-3'
49487-r5	5'-ACTAGTTCACGGTGATGTTCGGTTCAAATGG-3'
49487-f	5'-TGGTGCCTCTCATAATGCTG-3'
49487-r	5'-TCTGAAGGAACGGAACGGAG-3'
18428-f1	5'-GTCTTGTAGCCACTCTGATGG-3'
18428-r1	5'-ATCGACGAGGTCTTCATTGC-3'
18428-f2	5'-CGTTGCCCTAGAGGTCTGCTGGTA-3'
18428-f3	5'-TCTCGTCTCGTCAAACACCTCCAC-3'
18428-f4	5'-ACTAGTATGGAGTCCGGTCTTGTAGCCAC-3'
18428-r2	5'-ACTAGTTCATGGTGATGTTCGCGGGTTC-3'
18428-f	5'-GCACGAAACTCTGGGAATAAG-3'
18428-r	5'-GCATCCTCAACAACCTCAGC-3'
Histone-f	5'-TCACGAACAAGCCTTTGGAA-3'
Histone-r	5'-AAGCCTCACCGTTACCGTC-3'

#### <酵母での標的配列の発現>

*Pf-49487*、*Pf-18428* は酵母 NADPH-P450 還元酵素と *SpeI* クローニングサイトを含む酵母発現用のベクターである pGYR-*SpeI*[13]に組み込んだ。*Pf-49487* はプライマーに 49487-f4 と 49487-r5、*Pf-18428* はプライマーに 18428-f4 と 18428-r2 を用いて全長配列を増幅した。PCR反応液組成:0.3  $\mu$ M プライマー、0.2 mM dNTPs、0.02 U/ $\mu$ l KOD-Plus (Toyobo)。*Pf-49487* についての温度プログラム: 94°C 100 s  $\rightarrow$  (94°C 15 s、52.7°C 30 s、68°C 90 s) $\times$ 25 サイクル  $\rightarrow$  68°C 90 s。*Pf-18428* についての温度プログラム: 94°C 100 s  $\rightarrow$  (94°C 15 s、55.3°C 30 s、68°C 92 s) $\times$ 25 サイクル  $\rightarrow$  68°C 92 s。PCR 産物は pTA2 ベクターに組み込み配列を確認後、酵母 AH22 株に LiCl 法で導入した。組換え酵母は先行研究[22]の通りに培養しマイクロソーム画分を調製した。マイクロソーム画分は 100 mM HEPES/NaOH (pH 7.5)に懸濁し、使用するまで-80°C で保存した。得られたマイクロソーム画分は紫外可視分光高度計 UV1800 (Shimadzu)で CO 差スペクトルを測定し、450 nm に吸収極大が観察されたものを酵素反応に用いることで P450 としての活性を確認した[23]。

#### <酵素反応と GC-FID、GC-MS 分析>

酵素反応はねじ口試験管で 1 ml の反応液中で行った。反応液の組成は 50 mM HEPES/NaOH (pH 7.5)、0.5 mM NADPH、0.2 mM の基質、2.0(Pf-49487)または 2.6(Pf-18428) mg/ml の酵素液。30°C で 15 分間インキュベート後、内部標準として 12 nmol のオイゲノールを加え 2 ml のペンタンで 3 回抽出した。ペンタン層は合わせて MgSO<sub>4</sub> で脱水後、窒素で濃縮し GC-FID (G5000, Hitachi)と GC-MS (6850GC/5975MSD, Agilent Technologies または GCMS-QP2020 NX, Shimadzu)で DB-WAX カラム (60 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m, Agilent Technologies)を用いて分析した。GC-FID 条件: 注入口温度 180°C、検出器温度 220°C、カラム温度 100°C  $\rightarrow$  (5°C/min)  $\rightarrow$  220°C (85 min hold)、キャリアガスはヘリウム、カラム流量は 1 ml/min。GC-MS 条件: 注入口温度 180°C、検出器温度 220°C、カラム温度 100°C  $\rightarrow$  (5°C/min)  $\rightarrow$  220°C (60 min hold)、キャリアガスはヘリウム、カラム流量は 1 ml/min。GC-FID で得られたピークの相対感度をもとに相対生成物量を算出し、GC-MS で得られた保持時間やマススペクトルを標品や MS データライブラリー (NIST11 または NIST17; National Institute of Standards and Technology) と比較することで化合物を同定した。

*Pf-49487* の反応速度定数の測定のための酵素反応は、0.2~10  $\mu$ M のミリスチシンと 0.8

mg/ml の酵素液を含む 1 ml の反応液中で行った。上と同様に処理し、GC-FID で InertCap WAX カラム (60 m × 0.25 mm × 0.25 μm, GL Sciences) を用いて分析した。GC-FID 条件 : 注入口温度 180°C、検出器温度 220°C、カラム温度 100°C → (5°C/min) → 220°C (40 min hold)、キャリアガスはヘリウム、カラム流量は 1 ml/min。測定は各点 3 回ずつ行った。ミクロソーム中の P450 の濃度は CO 差スペクトルの結果から吸光係数 91 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> を用いて求めた[22]。

Pf-49487 の至適 pH の測定 (pH 6.0~9.0) のための酵素反応は、1.7 mg/ml の酵素液を含む 1 ml の反応液中で行った。上と同様に処理し、GC-FID で InertCap WAX カラムまたは DB-WAX カラムを用いて分析した。GC-FID 条件は反応速度定数の測定のとおり同様。測定は各点 3 回ずつ行った。

#### <定量リアルタイム PCR>

精油型の違いによる発現量の違いを確かめるため、逆転写リアルタイム PCR 解析を行った。Pf-49487 については No. 12、25、5316 のシソ新鮮葉から、Pf-18428 については No. 16、25、32、5254、5316 のシソ新鮮葉から、上記と同様に RNA を抽出し 1 μg のトータル RNA を RevTra Ace と oligo(dT)プライマー(Takara)を用いて逆転写し NucleoSpin Gel and PCR Clean-up で精製した。THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo)を用いてプロトコルに沿って反応液 (20 mL) を調製し StepOnePlus (Applied Biosystems)で定量リアルタイム PCR を行った。温度プログラム : 95°C 60 s → (95°C 15 s、60°C 60 s)×40 サイクル。プライマーは Pf-49487 については 49487-f と 49487-r、Pf-18428 については 18428-f と 18428-r を用いた。内在性コントロールとしてのヒストンの増幅にはプライマーに Histone-f と Histone-r を用い、2<sup>-ΔΔCT</sup>法で定量を行った。RNA 抽出は 2 回行いそれぞれ 3 回ずつ分析を行った。

#### <精油成分分析>

No. 5316 のシソ新鮮葉各約 300 g をジエチルエーテルで一晩 4°C で抽出した。精油は濃縮、脱水し、上記の方法で GC-MS 分析した。この分析は、水酸基の付加した少量の中間体の有無を調べるためであるため、精油を高濃度に濃縮して中間体化合物に着目して測定を行った。精油の成分組成はすでに報告のある通り[12]。

<標品合成>

化合物 5、8、14、20、23、30、34 は以下の方法で合成した (図 16)。化合物 31 は先行研究の通りに合成した[24]。

All melting points were uncorrected. Silica gel was used for column chromatography.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR was recorded at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shifts ( $\delta$ ) and coupling constants ( $J$ ) are presented in parts per million relative to tetramethylsilane and hertz, respectively. Abbreviations are as follows: s, singlet; d, doublet; t, triplet; m, multiplet; br, broad.  $^{13}\text{C}$  peak multiplicity assignments were made based on DEPT data. The wave numbers of maximum absorption peaks of IR spectroscopy are presented in  $\text{cm}^{-1}$ . Commercially available solvents and reagents were purchased and used without purification.

Synthesis of 6-Allyl-2,3-dimethoxyphenol (5).

2-Benzenesulfonyl-1,3-dibromopropane [219500-61-5] (1): The title compound was prepared according to the reported procedure as colorless needles [25,26] of mp 93–94 °C (EtOAc/hexane).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.57 (tt,  $J = 6.5, 4.5$  Hz, 1H), 3.82 (dd,  $J = 11.0, 6.5$  Hz, 2H), 3.90 (dd,  $J = 11.0, 4.0$  Hz, 2H), 7.62 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 7.74 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.95 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  26.2 ( $\text{CH}_2$ ), 65.9 (CH), 129.2 (CH), 129.6 (CH), 134.8 (CH), 137.3 (C).

1-(2-Benzenesulfonylallyloxy)-2,3-dimethoxybenzene (2): 2,3-Dimethoxyphenol (262 mg, 1.70 mmol) was dissolved in dry acetone (17 mL), and to the solution was added  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (705 mg, 5.10 mmol). The resulting suspension was stirred at room temperature for 10 min, and 2-benzenesulfonyl-1,3-dibromopropane (1) (640 mg, 1.87 mmol) and KI (7 mg, 0.04 mmol) were added to the suspension. After 3 h, the mixture was filtered through Celite, and the residue was successively washed with EtOAc. The combined filtrate and washings were concentrated in vacuo and purified by column chromatography (hexane/EtOAc 4:1) to give 2,3-dimethoxyphenol (45 mg, 17%) and the title compound (453 mg, 80%) as pale-yellow oils.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.74 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 4.77 (s, 2H), 6.20 (s, 1H), 6.30 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 6.54 (s, 1H), 6.58 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 6.87 (t,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.57 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 7.66 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.93 (d,

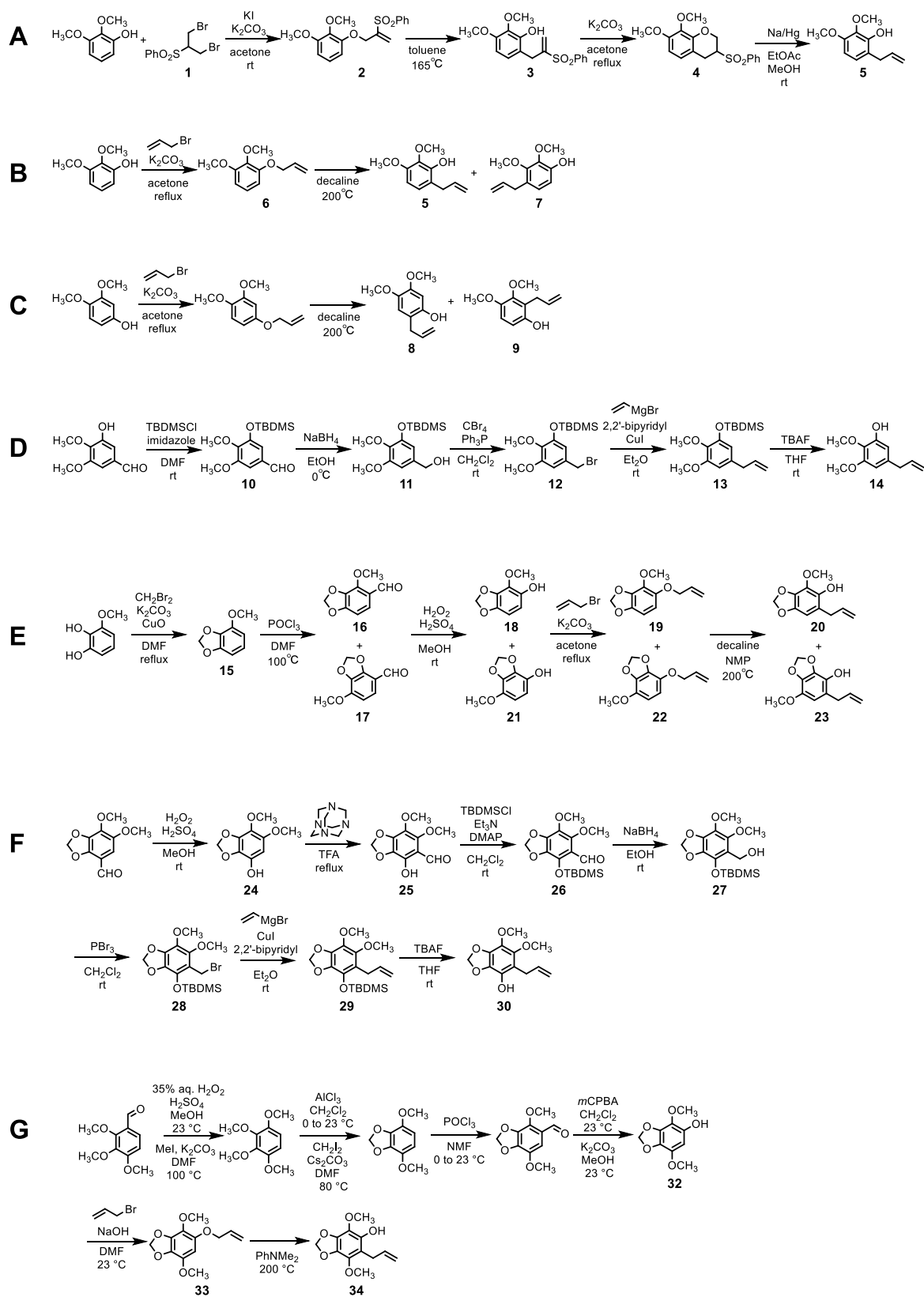


図 16. アリルフェノールの合成スキーム

A: 6-Allyl-2,3-dimethoxyphenol (5) (選択的に合成)、B: 6-Allyl-2,3-dimethoxyphenol (5)、  
C: 2-Allyl-4,5-dimethoxyphenol (8)、D: 5-Allyl-2,3-dimethoxyphenol (14)、E: 6-Allyl-4-methoxy-1,3-benzodioxol-5-ol (20) and 5-Allyl-7-methoxy-1,3-benzodioxol-4-ol (23)、  
F: 5-Allyl-6,7-dimethoxy-1,3-benzodioxol-4-ol (30)、G: 6-Allyl-4,7-dimethoxy-1,3-benzodioxol-5-ol (34)。

$J = 7.5$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  55.9 ( $\text{CH}_3$ ), 60.7 ( $\text{CH}_3$ ), 65.3 ( $\text{CH}_2$ ), 106.2 (CH), 107.0 (CH), 123.6 (CH), 125.7 ( $\text{CH}_2$ ), 128.0 (CH), 129.3 (CH), 133.7 (CH), 138.5 (C), 138.8 (C), 146.1 (C), 151.2 (C), 153.6 (C). IR (neat): 2928, 2855, 1682, 1597, 1467, 1474, 1447, 1319, 1254, 1200, 1142, 1111, 1080, 1007, 991, 910, 837, 775, 737  $\text{cm}^{-1}$ . EIMS ( $m/z$ ): 336 ( $M + 2$ ), 335 ( $M + 1$ ), 334 ( $M^+$ ), 193 ( $M - \text{PhSO}_2$ ), 192 ( $M - \text{PhSO}_2\text{H}$ ), 177 ( $M - \text{PhSO}_2\text{H} - \text{Me}$ ), 153 ( $M - \text{CH}_2\text{CH}(\text{SO}_2\text{Ph})\text{CH}_2$ ), 125, 110, 95, 93. HRMS-FAB ( $m/z$ ):  $[M + H]^+$  calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{S}$ , 335.0953; found, 335.0945.

6-(2-Benzenesulfonylallyl)-2,3-dimethoxyphenol (3):

1-(2-Benzenesulfonylallyloxy)-2,3-dimethoxybenzene (2) (436 mg, 1.30 mmol) was dissolved in toluene (1 mL) and heated at 165 °C for 12 h under microwave irradiation. The mixture was concentrated *in vacuo* and purified by column chromatography (hexane/EtOAc 7:3) to give the title compound (398 mg, 92%) as a pale-yellow solid: mp 108–109 °C (EtOAc/hexane).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.52 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 5.50 (s, 1H), 5.70 (s, 1H), 6.36 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 6.38 (s, 1H), 6.66 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.52 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 7.61 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.89 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  29.7 ( $\text{CH}_2$ ), 55.7 ( $\text{CH}_3$ ), 60.9 ( $\text{CH}_3$ ), 103.5 (CH), 115.0 (C), 124.6 ( $\text{CH}_2$ ), 125.3 (CH), 128.1 (CH), 128.9 (CH), 133.2 (CH), 135.3 (C), 139.0 (C), 147.4 (C), 149.1 (C), 151.4 (C). IR (neat): 3426, 3001, 2940, 2909, 2839, 1616, 1470, 1447, 1431, 1304, 1242, 1219, 1204, 1161, 1130, 1096, 1080, 1038, 972, 953, 910, 745  $\text{cm}^{-1}$ . EIMS ( $m/z$ ): 336 ( $M + 2$ ), 335 ( $M + 1$ ), 334 ( $M^+$ ), 192 ( $M - \text{PhSO}_2\text{H}$ ), 177 ( $M - \text{PhSO}_2\text{H} - \text{Me}$ ). HRMS-FAB ( $m/z$ ):  $[M + H]^+$  calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{S}$ , 335.0953; found, 335.0954.

3-Benzenesulfonyl-7,8-dimethoxychromane (4): To a solution of 6-(2-benzenesulfonylallyl)-2,3-dimethoxyphenol (3) (144 mg, 0.430 mmol) in dry acetone (4 mL), was added  $K_2CO_3$  (89 mg, 0.64 mmol), and the mixture was heated under reflux for 5 h. The mixture was diluted with EtOAc and washed with  $H_2O$ . The aqueous layer was extracted with EtOAc, and the combined organic layers were washed with brine, dried over  $Na_2SO_4$ , and concentrated *in vacuo* to give the title compound as a white solid (140 mg). The crude product was used in the next step without further purification. The title compound was characterized after recrystallization from EtOAc/hexane, which gave colorless needles of mp 132–134 °C.  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  3.02 (dd,  $J = 16.0, 5.0$  Hz, 1H), 3.19 (dd,  $J = 16.0, 11.0$  Hz, 1H), 3.60 (dddd,  $J = 11.0, 10.5, 5.0, 3.0$  Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 4.12 (t,  $J = 10.5$  Hz, 1H), 4.59 (dd,  $J = 10.5, 3.0$  Hz, 1H), 6.19 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 6.73 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.59 (dd,  $J = 8.0, 7.0$  Hz, 2H), 7.69 (t,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 7.93 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H).  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  24.5 ( $CH_2$ ), 56.1 ( $CH_3$ ), 57.6 (CH), 60.9 ( $CH_3$ ), 63.9 ( $CH_2$ ), 105.5 (CH), 112.3 (C), 123.7 (CH), 128.7 (CH), 129.4 (CH), 134.2 (CH), 137.1 (C), 137.2 (C), 147.1 (C), 152.0 (C). IR (neat): 3017, 2940, 2836, 1612, 1582, 1501, 1462, 1447, 1308, 1288, 1227, 1200, 1150, 1111, 1072, 1049, 968, 791, 756  $cm^{-1}$ . EIMS ( $m/z$ ): 336 ( $M + 2$ ), 335 ( $M + 1$ ), 334 ( $M^+$ ), 192 ( $M - PhSO_2H$ ), 177 ( $M - PhSO_2H - Me$ ). HRMS–FAB ( $m/z$ ): [ $M + H$ ] $^+$  calcd for  $C_{17}H_{19}O_5S$ , 335.0953; found, 335.0945.

6-Allyl-2,3-dimethoxyphenol [450357-58-1] (5): To a solution of the crude 3-benzenesulfonyl-7,8-dimethoxychromane (4) (140 mg) in EtOAc/MeOH (2:1, 4.5 mL), was added 5% sodium amalgam (0.93 g, 2.0 mmol) at room temperature, and the mixture was stirred for 4 h. The reaction was quenched by the addition of solid citric acid (0.39 g), and the mixture was diluted with EtOAc, washed with saturated aqueous  $NaHCO_3$ , dried over  $Na_2SO_4$ , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (hexane/EtOAc 9:1) to give the title compound (65 mg, 78% over 2 steps) as a pale-yellow oil.  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  3.35 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 5.04 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H), 5.09 (d,  $J = 17.0$  Hz, 1H), 5.86 (s, 1H), 5.99 (ddt,  $J = 17.0, 10.0, 6.5$  Hz, 1H), 6.43 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 6.79 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H).  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  33.5 ( $CH_2$ ), 55.7 ( $CH_3$ ), 60.8 ( $CH_3$ ), 103.4 (CH), 115.2 ( $CH_2$ ), 119.1 (C), 124.1 (CH), 135.3 (C), 136.9 (CH), 147.2 (C), 150.7 (C). IR (neat):

3507, 3078, 3001, 2974, 2939, 2835, 2909, 1639, 1616, 1589, 1504, 1466, 1431, 1315, 1277, 1219, 1161, 1096, 1038, 995, 972, 910, 791, 737  $\text{cm}^{-1}$ . EIMS ( $m/z$ ): 194 ( $\text{M}^+$ ), 179 ( $\text{M} - \text{CH}_3$ ), 163 ( $\text{M} - \text{OCH}_3$ ), 147, 119, 91.

#### Alternative Synthesis of 6-Allyl-2,3-dimethoxyphenol (5).

1-(Allyloxy)-2,3-dimethoxybenzene [380621-78-3] (6): The title compound was prepared from 2,3-dimethoxyphenol (982 mg, 6.37 mmol) according to the reported procedure [27]. After purification by column chromatography (hexane/EtOAc 9:1), the title compound (1.11 g, 90%) was obtained as a colorless oil.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.86 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 4.60 (d,  $J = 5.0$  Hz, 2H), 5.27 (dd,  $J = 10.5, 1.5$  Hz, 1H), 5.41 (dd,  $J = 17.0, 1.5$  Hz, 1H), 6.07 (ddt,  $J = 17.0, 10.5, 5.0$  Hz, 1H), 6.58 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 6.96 (t,  $J = 8.5$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  56.0 ( $\text{CH}_3$ ), 60.7 ( $\text{CH}_3$ ), 69.8 ( $\text{CH}_2$ ), 105.4 (CH), 107.1 (CH), 117.4 ( $\text{CH}_2$ ), 123.4 (CH), 133.4 (CH), 138.6 (C), 152.4 (C), 153.6 (C). IR (neat): 3086, 2997, 2936, 2889, 2832, 1593, 1493, 1474, 1300, 1258, 1177, 1103, 1007, 914, 775, 733  $\text{cm}^{-1}$ . EIMS ( $m/z$ ): 194 ( $\text{M}^+$ ), 179 ( $\text{M} - \text{Me}$ ), 153, 125, 110, 95, 91.  $^1\text{H}$  NMR is in consistent with that reported [28].

6-Allyl-2,3-dimethoxyphenol [450357-58-1] (5) and 4-Allyl-2,3-dimethoxyphenol [29445-64-5] (7): A solution of 1-allyloxy-2,3-dimethoxybenzene (6) (528 mg, 2.72 mmol) in decaline (0.5 mL) was heated at 200  $^\circ\text{C}$  under microwave irradiation for 10 h. After cooled to ambient temperature, the solution was directly purified by column chromatography (hexane/EtOAc 9:1) to give 6-allyl-2,3-dimethoxyphenol (103 mg, 20%) as a pale-yellow oil and a 63:37 mixture of 6-allyl- (5) and 4-allyl-2,3-dimethoxyphenol (7) (367 mg, 44% and 26%, respectively) as a pale-yellow oil. 4-Allyl-2,3-dimethoxyphenol (7) was characterized as a mixture with the other isomer.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.32 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 5.03 (d,  $J = 16.5$  Hz, 1H), 5.06 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H), 5.63 (s, 1H), 5.95 (ddt,  $J = 16.5, 10.0, 6.5$  Hz, 1H), 6.67 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 6.78 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  33.6 ( $\text{CH}_2$ ), 60.5 ( $\text{CH}_3$ ), 60.7 ( $\text{CH}_3$ ), 110.2 (CH), 115.2 ( $\text{CH}_2$ ), 124.7 (CH), 125.2 (C), 137.7 (CH), 139.7 (C), 148.0 (C), 150.7 (C).

#### Synthesis of 2-Allyl-4,5-dimethoxyphenol (8).



2-Allyl-4,5-dimethoxyphenol [59893-87-7] (8) and 2-Allyl-3,4-dimethoxyphenol [66967-26-8] (9): 4-allyloxy-1,2-dimethoxybenzene [29] (515 mg, 2.65 mmol) was dissolved in decaline (0.5 mL) and heated at 200 °C under microwave irradiation for 12 h. After cooled to ambient temperature, the solution was directly purified by column chromatography (hexane/EtOAc 3:1) to give 2-allyl-4,5-dimethoxyphenol (8) (68 mg, 13%) as a pale-yellow solid along with a 91:9 mixture of the title compounds (411 mg, 73% and 7%, respectively) as a pale-yellow oil. 2-Allyl-3,4-dimethoxyphenol (9) was partially separated as a pale-yellow oil from the mixture by another column chromatography (hexane/EtOAc 3:1) for characterization. 2-Allyl-4,5-dimethoxyphenol: mp 35–36 °C (Et<sub>2</sub>O/hexane) (lit. 42–42.5 °C) [30].

2-Allyl-4,5-dimethoxyphenol [59893-87-7] (8): <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.35 (dt, *J* = 6.5, 1.5 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 4.72 (s, 1H), 5.14–5.20 (m, 2H), 6.00 (ddt, *J* = 17.5, 9.5, 6.5 Hz, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.62 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 34.6 (CH<sub>2</sub>), 55.8 (CH<sub>3</sub>), 56.5 (CH<sub>3</sub>), 101.2 (CH), 113.8 (CH), 115.9 (C), 116.1 (CH<sub>2</sub>), 136.6 (CH), 142.8 (C), 148.0 (C), 148.3 (C). IR (neat): 3445, 3078, 3001, 2936, 2913, 2835, 1639, 1616, 1520, 1450, 1412, 1292, 1238, 1200, 1111, 1030, 995, 914, 845, 756, 733 cm<sup>-1</sup>. EIMS (*m/z*): 194 (M<sup>+</sup>), 179 (M – Me), 123, 91.

2-Allyl-3,4-dimethoxyphenol [66967-26-8] (9): <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.48 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 4.97 (br s, 1H), 5.08–5.14 (m, 2H), 6.01 (ddt, *J* = 17.5, 10.0, 6.0 Hz, 1H), 6.56 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.70 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 28.3 (CH<sub>2</sub>), 56.3 (CH<sub>3</sub>), 61.0 (CH<sub>3</sub>), 110.5 (CH), 111.2 (CH), 115.7 (CH<sub>2</sub>), 120.3 (C), 136.3 (CH), 147.0 (C), 147.7 (C), 148.7 (C). IR (neat): 3387, 3074, 3001, 2940, 2832, 1697, 1639, 1601, 1493, 1470, 1427, 1339, 1254, 1215, 1177, 1111, 1080, 1042, 995, 968, 910, 853, 799, 764, 737 cm<sup>-1</sup>. EIMS (*m/z*): 194 (M<sup>+</sup>), 179 (M – Me), 147, 119, 91.

#### Synthesis of 5-Allyl-2,3-dimethoxyphenol (14).

3-*tert*-Butyldimethylsiloxy-4,5-dimethoxybenzaldehyde [122271-47-0] (10): To a solution of 3-hydroxy-4,5-dimethoxybenzaldehyde (500 mg, 2.74 mmol) in dry N,N-dimethylformamide (DMF) (3 mL), were added *tert*-butylchlorodimethylsilane (496 mg, 3.29 mmol) and imidazole

(466 mg, 6.84 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 16 h, diluted with EtOAc, washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The resulting pale yellow oil, containing mainly the title compound, was used for the next step without further purification. The <sup>1</sup>H NMR was consistent with that reported [31].

3-*tert*-Butyldimethylsiloxy-4,5-dimethoxybenzenemethanol [111394-55-9] (11): To a solution of the crude 3-*tert*-butyldimethylsiloxy-4,5-dimethoxybenzaldehyde (10) in EtOH (24 mL) cooled in an ice–water bath, was portion-wise added NaBH<sub>4</sub> (104 mg, 2.75 mmol). After 15 min, water was added to the mixture, and most of EtOH was removed from the mixture by evaporation. The mixture was extracted three times with EtOAc, and the combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The resulting residue was purified by column chromatography (hexane/EtOAc 3:1) to give the title compound (563 mg, 69% over 2 steps) as a white solid. Recrystallization from hexane gave colorless needles of mp 57–58 °C. The <sup>13</sup>C NMR was identical to that reported, while all the <sup>1</sup>H NMR chemical shifts differed by 0.18 ppm from the reported values [32]. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.18 (s, 6H), 1.01 (s, 9H), 1.57 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 4.58 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 6.50 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.59 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H). IR (neat): 3426, 2951, 2932, 2859, 1585, 1501, 1454, 1427, 1342, 1231, 1115, 1003, 837 cm<sup>-1</sup>. The IR was in good agreement with that reported.

3-*tert*-Butyldimethylsiloxy-4,5-dimethoxybenzyl Bromide [111394-56-0] (12): To a solution of 3-*tert*-butyldimethylsiloxy-4,5-dimethoxybenzenemethanol (11) (315 mg, 1.06 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) cooled in an ice–water bath, were added CBr<sub>4</sub> (420 mg, 1.27 mmol) and Ph<sub>3</sub>P (333 mg, 1.27 mmol). The cooling bath was removed, and the mixture was stirred at room temperature for 20 min. Volatile materials were removed from the mixture by evaporation, and the residue was purified by column chromatography (hexane to hexane/EtOAc 97:3) to give the title compound (305 mg, 80%) as a pale yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.18 (s, 6H), 1.00 (s, 9H), 3.78 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 4.41 (s, 2H), 6.54 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.58 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -4.8 (CH<sub>3</sub>), 18.1 (C), 25.5 (CH<sub>3</sub>), 33.9 (CH<sub>2</sub>), 55.8 (CH<sub>3</sub>), 60.2 (CH<sub>3</sub>), 106.1 (CH), 114.8 (CH), 132.8 (C), 140.4 (C), 149.2 (C), 153.6 (C). IR (neat): 2955, 2932, 2889,

2859, 1585, 1501, 1454, 1427, 1346, 1234, 1211, 1126, 1111, 1007, 910, 837, 783, 737  $\text{cm}^{-1}$ . EIMS ( $m/z$ ): 362 ( $M+2$ ), 360 ( $M^+$ ), 347 ( $M+2 - \text{Me}$ ), 345 ( $M - \text{Me}$ ), 305 ( $M+2 - t\text{-Bu}$ ), 303 ( $M - t\text{-Bu}$ ), 281 ( $M - \text{Br}$ ), 209.

5-Allyl-1-*tert*-butyldimethylsiloxy-2,3-dimethoxybenzene (13): To a mixture of 3-*tert*-butyldimethylsiloxy-4,5-dimethoxybenzyl bromide (12) (396 mg, 1.10 mmol), CuI (21 mg, 0.11 mmol), and 2,2'-bipyridine (17 mg, 0.11 mmol) in Et<sub>2</sub>O (1 mL) cooled in an ice-water bath, was dropwise added a 1.0 M tetrahydrofuran (THF) solution of vinylmagnesium bromide (1.6 mL, 1.6 mmol). The cooling bath was removed, and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction was quenched by the addition of saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl and then 28% aqueous NH<sub>3</sub>. After stirred for 30 min, the whole was extracted three times with Et<sub>2</sub>O. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (hexane/EtOAc 49:1) to give the title compound (266 mg, 78%) as a pale yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.17 (s, 6H), 1.00 (s, 9H), 3.28 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 5.05–5.11 (m, 2H), 5.94 (ddt,  $J = 17.0, 10.0, 7.0$  Hz, 1H), 6.34 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 6.37 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  -4.7 (CH<sub>3</sub>), 18.3 (C), 25.7 (CH<sub>3</sub>), 40.1 (CH<sub>2</sub>), 55.8 (CH<sub>3</sub>), 60.3 (CH<sub>3</sub>), 105.6 (CH), 114.1 (CH), 115.7 (CH<sub>2</sub>), 135.4 (C), 137.3 (CH), 138.5 (C), 149.2 (C), 153.5 (C). IR (neat): 2955, 2932, 2897, 2859, 1585, 1501, 1454, 1427, 1342, 1234, 1115, 1011, 910, 887, 783  $\text{cm}^{-1}$ . EIMS ( $m/z$ ): 308 ( $M^+$ ), 251 ( $M - t\text{-Bu}$ ), 236 ( $M - t\text{-Bu} - \text{Me}$ ). HRMS-FAB ( $m/z$ ): [ $M + H$ ]<sup>+</sup> calcd for C<sub>17</sub>H<sub>29</sub>O<sub>3</sub>Si, 309.1886; found, 309.1888.

5-Allyl-2,3-dimethoxyphenol [76773-99-4] (14): To a stirred solution of 5-allyl-1-*tert*-butyldimethylsiloxy-2,3-dimethoxybenzene (13) (74 mg, 0.24 mmol) in THF (1 mL), was added a 1.0 M THF solution of tetrabutylammonium fluoride (TBAF) (0.24 mL, 0.24 mmol). After 30 min, 0.5 M aqueous citric acid (1 mL) was added to the mixture, and the whole was extracted three times with EtOAc. The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (hexane/EtOAc 9:1) to give the title compound (43 mg, 91%)

as a pale yellow solid of mp 38–40 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.29 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 5.07 (d, *J* = 10 Hz, 1H), 5.10 (d, *J* = 17.0 Hz, 1H), 5.70 (s, 1H), 5.94 (ddt, *J* = 17.0, 10.0, 7.0 Hz, 1H), 6.30 (s, 1H), 6.45 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 40.2 (CH<sub>2</sub>), 55.7 (CH<sub>3</sub>), 60.9 (CH<sub>3</sub>), 104.3 (CH), 108.1 (CH), 115.9 (CH<sub>2</sub>), 133.7 (C), 136.3 (C), 137.1 (CH), 149.1 (C), 152.2 (C). IR (neat): 3456, 3075, 3005, 2936, 2909, 2839, 1593, 1508, 1462, 1431, 1350, 1234, 1200, 1065, 1138, 1107, 995, 914, 821, 775 cm<sup>-1</sup>. EIMS (*m/z*): 194 (M<sup>+</sup>), 179 (M – Me), 119, 91. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR were identical to those reported [33].

#### Synthesis of 6-Allyl-4-methoxy-1,3-benzodioxol-5-ol (20).

4-Methoxy-1,3-benzodioxole [1817-95-4] (15): The title compound was prepared from 3-methoxycatechol according to the reported procedure [34] in 85% yield as colorless blocks of mp 41–42 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.90 (s, 3H), 5.96 (s, 2H), 6.53 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.79 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 56.2 (CH<sub>3</sub>), 100.9 (CH<sub>2</sub>), 102.1 (CH), 107.2 (CH), 121.8 (CH), 135.0 (C), 143.9 (C), 148.5 (C). IR (neat): 2955, 2940, 2920, 2905, 2835, 1636, 1504, 1462, 1350, 1285, 1254, 1180, 1088, 1034, 961, 926, 833, 756, 710 cm<sup>-1</sup>. EIMS (*m/z*): 152 (M<sup>+</sup>), 151 (M – H), 137 (M – CH<sub>3</sub>), 107. The mp, <sup>1</sup>H NMR, and IR are in good agreement with those reported [34,35,36].

4-Methoxy-1,3-benzodioxole-5-carbaldehyde [5779-99-7] (16) and 7-Methoxy-1,3-benzodioxole-4-carbaldehyde [23731-55-7] (17): Dry DMF (0.64 mL, 8.3 mmol) and freshly distilled POCl<sub>3</sub> (0.77 mL, 8.3 mmol) were mixed at 100 °C for 2 h. To the mixture, was added 4-methoxy-1,3-benzodioxole (15) (500 mg, 3.29 mmol), and the mixture was heated at 100 °C. After 2 h, the reaction was quenched by the addition of ice, and the whole was extracted three times with Et<sub>2</sub>O. The combined organic layers were washed with water, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>, and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo* to give a crude mixture of the title compounds (3:2) as a pale brown solid. The two isomers were separated by column chromatography (hexane/Et<sub>2</sub>O 4:1, *R<sub>f</sub>* = 0.24 and 0.12, respectively). 4-Methoxy-1,3-benzodioxole-5-carbaldehyde (16): 44% yield. Colorless needles of mp 107–108 °C (EtOH). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.13 (s, 3H), 6.04 (s, 2H), 6.60 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H),

7.47 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 10.23 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  60.0 ( $\text{CH}_3$ ), 101.8 ( $\text{CH}_2$ ), 103.1 (CH), 122.6 (C), 124.1 (CH), 135.8 (C), 146.0 (C), 154.6 (C), 188.0 (CH). IR (neat): 3001, 2943, 2916, 2859, 2789, 1663, 1612, 1597, 1470, 1408, 1346, 1277, 1242, 1223, 1076, 1038, 926, 806, 787  $\text{cm}^{-1}$ . EIMS ( $m/z$ ): 180 ( $\text{M}^+$ ), 164, 151 ( $\text{M} - \text{CHO}$ ). The mp,  $^1\text{H}$  NMR, and IR are in good agreement with those reported [37,38]. 7-Methoxy-1,3-benzodioxole-4-carbaldehyde (17): 29% yield. Colorless needles of mp 85–86 °C (EtOH).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.99 (s, 3H), 6.15 (s, 2H), 6.63 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 7.31 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 9.99 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  56.7 ( $\text{CH}_3$ ), 102.8 ( $\text{CH}_2$ ), 107.7 (CH), 114.3 (C), 123.5 (CH), 135.5 (C), 148.2 (C), 150.2 (C), 186.9 (C). IR (neat): 3093, 3021, 2978, 2913, 2843, 2727, 1686, 1632, 1504, 1447, 1400, 1292, 1261, 1231, 1207, 1173, 1111, 1099, 1026, 957, 914, 787, 764, 737  $\text{cm}^{-1}$ . EIMS ( $m/z$ ): 180 ( $\text{M}^+$ ), 151 ( $\text{M} - \text{CHO}$ ). The mp,  $^1\text{H}$  NMR, and IR are in good agreement with those reported [35,36].

4-Methoxy-1,3-benzodioxol-5-ol [23504-78-1] (18): To a solution of 4-methoxy-1,3-benzodioxole-5-carbaldehyde (16) (100 mg, 0.555 mmol) in MeOH (1 mL), were added conc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0.01 mL, 0.2 mmol) and 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.085 mL, 0.83 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 2.5 h, and saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  was added to the mixture. The whole was extracted three times with EtOAc, and the combined organic layers were washed with brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and concentrated *in vacuo*. The residual solid was purified by column chromatography (hexane/EtOAc 9:1) to give the title compound (72 mg, 78%) as a white solid:  $R_f = 0.29$  (hexane/EtOAc 4:1). Colorless plates of mp 58–59 °C ( $\text{Et}_2\text{O}$ /hexane).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4.05 (s, 3H), 5.31 (s, 1H), 5.89 (s, 2H), 6.38 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 6.41 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  59.9 ( $\text{CH}_3$ ), 101.1 ( $\text{CH}_2$ ), 101.8 (CH), 106.0 (CH), 131.4 (C), 136.2 (C), 142.1 (C), 142.7 (C). IR (neat): 3445, 2986, 2947, 2889, 2846, 2778, 1643, 1620, 1493, 1466, 1447, 1404, 1269, 1238, 1200, 1169, 1042, 988, 964, 918, 791, 737  $\text{cm}^{-1}$ . EIMS ( $m/z$ ): 168 ( $\text{M}^+$ ), 167 ( $\text{M} - \text{H}$ ), 153 ( $\text{M} - \text{Me}$ ), 123, 121, 199, 97, 95.

5-Allyloxy-4-methoxy-1,3-benzodioxole [23731-59-1] (19): A mixture of 4-methoxy-1,3-benzodioxol-5-ol (18) (67 mg, 0.40 mmol),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (111 mg, 0.800 mmol), and

allyl bromide (0.05 mL, 0.6 mmol) in dry acetone (4 mL) was heated under reflux for 4.5 h, and water was added to the mixture. The whole was extracted three times with EtOAc, and the combined organic layers were washed with 15% aqueous NaOH twice and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (hexane/EtOAc 95:5) to give the title compound (71.6 mg, 86%) as a pale-yellow oil:  $R_f = 0.25$  (hexane/EtOAc 19:1). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.01 (s, 3H), 4.51 (d,  $J = 5.5$  Hz, 2H), 5.26 (dd,  $J = 10.5, 1.5$  Hz, 1H), 5.38 (dd,  $J = 17.5, 1.5$  Hz, 1H), 5.91 (s, 2H), 6.06 (ddt,  $J = 17.5, 10.5, 5.5$  Hz, 1H), 6.36 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 6.42 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 60.2 (CH<sub>3</sub>), 71.1 (CH<sub>2</sub>), 101.1 (CH), 101.2 (CH<sub>2</sub>), 107.0 (CH), 117.5 (CH<sub>2</sub>), 133.5 (CH), 134.8 (C), 138.0 (C), 143.3 (C), 146.1 (C). IR (neat): 3078, 2997, 2940, 2886, 2778, 1632, 1493, 1462, 1234, 1065, 926, 779, 737 cm<sup>-1</sup>. EIMS ( $m/z$ ): 208 (M<sup>+</sup>), 167 (M – C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>), 137, 111, 109, 107, 94.

6-Allyl-4-methoxy-1,3-benzodioxol-5-ol [23731-60-4] (20): A solution of 5-allyloxy-4-methoxy-1,3-benzodioxole (19) (58 mg, 0.28 mmol) in a 1:2 mixture of N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) and decaline (1.5 mL) was heated at 200 °C under microwave irradiation for 8 h. After cooled to ambient temperature, the mixture was diluted with EtOAc, washed three times with water and with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (hexane/EtOAc 9:1) to give the title compound (46 mg, 78%) as a pale-yellow oil:  $R_f = 0.44$  (hexane/EtOAc 4:1). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.31 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 4.04 (s, 3H), 5.04 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H), 5.06 (d,  $J = 17.0$  Hz, 1H), 5.40 (s, 1H), 5.85 (s, 2H), 5.95 (ddt,  $J = 17.0, 10.0, 6.5$  Hz, 1H), 6.33 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 33.7 (CH<sub>2</sub>), 59.9 (CH<sub>3</sub>), 100.9 (CH<sub>2</sub>), 102.8 (CH), 115.3 (CH<sub>2</sub>), 117.5 (C), 131.1 (C), 134.2 (C), 136.7 (CH), 139.8 (C), 141.6 (C). IR (neat): 3499, 3075, 3005, 2978, 2947, 2886, 2873, 2774, 1636, 1485, 1466, 1435, 1416, 1285, 1246, 1200, 1177, 1072, 1049, 984, 914, 837, 775, 733 cm<sup>-1</sup>. EIMS ( $m/z$ ): 208 (M<sup>+</sup>), 193 (M – Me), 181 (M – C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>), 177 (M – OMe), 163. HRMS–FAB ( $m/z$ ): [M]<sup>+</sup> calcd for C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>, 208.0736; found, 208.0731.

#### Synthesis of 5-Allyl-7-methoxy-1,3-benzodioxol-4-ol (23).

7-Methoxy-1,3-benzodioxol-4-ol [23812-54-6] (21): To a solution of

7-methoxy-1,3-benzodioxole-4-carbaldehyde (17) (100 mg, 0.555 mmol) in MeOH (1 mL), were added conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.01 mL, 0.2 mmol) and 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.085 mL, 0.83 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 6 h, and saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> was added to the mixture. The whole was extracted three times with EtOAc, and the combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residual solid was purified by column chromatography (hexane/EtOAc 3:1) to give the title compound (85 mg, 92%) as a white solid: *R*<sub>f</sub> = 0.13 (hexane/EtOAc 4:1). Colorless needles of mp 104–105 °C (CHCl<sub>3</sub>/hexane). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.85 (s, 3H), 4.58 (s, 1H), 5.99 (s, 2H), 6.41 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.43 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 57.0 (CH<sub>3</sub>), 101.7 (CH<sub>2</sub>), 107.9 (CH), 110.1 (CH), 134.2 (C), 135.4 (C), 136.3 (C), 138.3 (C). IR (neat): 3291, 3082, 3051, 3009, 2963, 2909, 2839, 1616, 1520, 1504, 1470, 1420, 1400, 1342, 1246, 1177, 1165, 1088, 1053, 1015, 961, 918, 791, 779, 733 cm<sup>-1</sup>. EIMS (*m/z*): 168 (M<sup>+</sup>), 153 (M – Me), 123, 97, 95. The mp and <sup>1</sup>H NMR are in agreement with those reported [39].

4-Allyloxy-7-methoxy-1,3-benzodioxole [23731-70-6] (22): A mixture of 7-methoxy-1,3-benzodioxol-4-ol (21) (82 mg, 0.49 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (135 mg, 0.977 mmol), and allyl bromide (63 μL, 0.73 mmol) in dry acetone (2.5 mL) was heated under reflux for 3 h, and water was added to the mixture. The whole was extracted three times with EtOAc, and the combined organic layers were washed with 15% aqueous NaOH twice and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (hexane/EtOAc 95:5) to give the title compound (83.7 mg, 82%) as a pale-yellow oil: *R*<sub>f</sub> = 0.20 (hexane/EtOAc 19:1). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.86 (s, 3H), 4.58 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 5.27 (dd, *J* = 10.5, 1.5 Hz, 1H), 5.39 (dd, *J* = 17.0, 1.5 Hz, 1H), 5.99 (s, 2H), 6.05 (ddt, *J* = 17.0, 10.5, 5.5 Hz, 1H), 6.42 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.46 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 56.7 (CH<sub>3</sub>), 70.8 (CH<sub>2</sub>), 101.6 (CH<sub>2</sub>), 107.0 (CH), 109.2 (CH), 117.8 (CH<sub>2</sub>), 133.3 (CH), 136.5 (C), 137.1 (C), 137.5 (C), 139.0 (C). IR (neat): 3082, 3009, 2955, 2936, 2889, 2839, 2778, 1647, 1609, 1512, 1462, 1346, 1265, 1173, 1096, 1076, 1060, 1030, 976, 961, 922, 775, 737 cm<sup>-1</sup>. EIMS (*m/z*): 208 (M<sup>+</sup>), 167 (M – C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>), 137, 111, 109, 107, 94.

5-Allyl-7-methoxy-1,3-benzodioxol-4-ol [76773-99-4] (23): A solution of 4-allyloxy-7-methoxy-1,3-benzodioxole (22) (82 mg, 0.39 mmol) in a 1:4 mixture of NMP and decaline (1 mL) was heated at 200 °C under microwave irradiation for 8 h. After cooled to ambient temperature, the mixture was diluted with EtOAc, washed three times with water and with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (hexane/EtOAc 4:1) to give the title compound (68 mg, 84%) as a pale-yellow solid: *R<sub>f</sub>* = 0.24 (hexane/EtOAc 4:1). Colorless needles of mp 84–85 °C (EtOAc/hexane). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.34 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 4.53 (s, 1H), 5.11 (dd, *J* = 10.0, 1.5 Hz, 1H), 5.13 (dd, *J* = 17.0, 1.5 Hz, 1H), 5.97 (s, 2H), 5.98 (ddt, *J* = 17.0, 10.0, 6.5 Hz, 1H), 6.29 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 34.2 (CH<sub>2</sub>), 57.0 (CH<sub>3</sub>), 101.8 (CH<sub>2</sub>), 108.7 (CH), 115.9 (CH<sub>2</sub>), 121.0 (C), 132.4 (C), 134.7 (C), 135.8 (C), 136.6 (CH), 137.6 (C). IR (neat): 3337, 3075, 3005, 2978, 2947, 2886, 2873, 2774, 1628, 1516, 1454, 1350, 1231, 1200, 1123, 1042, 953, 914, 822, 741, 710 cm<sup>-1</sup>. EIMS (*m/z*): 208 (M<sup>+</sup>), 193 (M – Me), 181 (M – C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>), 177 (M – OMe), 163, 147, 135, 119, 107, 91. HRMS–FAB (*m/z*): [M]<sup>+</sup> calcd for C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>, 208.0736; found, 208.0734.

Synthesis of 5-Allyl-6,7-dimethoxy-1,3-benzodioxol-4-ol (30).

6,7-Dimethoxy-1,3-benzodioxol-4-ol [22934-71-0] (24): A mixture of 6,7-dimethoxy-1,3-benzodioxole-4-carbaldehyde (368 mg, 1.75 mmol), 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.27 mL, 2.6 mmol), and conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.12 mL, 2.3 mmol) in MeOH (3.5 mL) was stirred at room temperature for 3 h. After addition of saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>, the whole was extracted three times with EtOAc, and the combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residual pale-yellow solid (1.38 g, 78%) was used as a crude title compound without further purification to the next step.: *R<sub>f</sub>* = 0.22 (hexane/EtOAc 2:1). Colorless needles of mp 111–112 °C (EtOAc/hexane). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.79 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 4.57 (s, 1H), 5.92 (s, 2H), 6.08 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 56.7 (CH<sub>3</sub>), 60.7 (CH<sub>3</sub>), 95.1 (CH), 101.6 (CH<sub>2</sub>), 127.9 (C), 128.7 (C), 133.6 (C), 139.3 (C), 147.7 (C). IR (neat): 3375, 2940, 2909, 2889, 2839, 1709, 1651, 1636, 1512, 1466, 1234, 1092, 941, 910, 737 cm<sup>-1</sup>. EIMS (*m/z*): 198 (M<sup>+</sup>), 183 (M – Me), 125, 121, 119, 95. The mp is in good agreement with those reported [40].



4-Hydroxy-6,7-dimethoxy-1,3-benzodioxol-5-carbadehyde (25): A mixture of 6,7-dimethoxy-1,3-benzodioxol-4-ol (24) (589 mg, 2.97 mmol) and hexamethylenetetramine (834 mg, 5.94 mmol) in refluxing trifluoroacetic acid (TFA) (3 mL) was stirred for 24 h [41]. H<sub>2</sub>O was added, and the solution was stirred for further 30 min at 60 °C. After being cooled to room temperature, the whole was extracted three times with EtOAc, and the combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residual solids were purified by column chromatography (hexane/EtOAc 7:1) to give the title compound (546 mg, 81%) as a pale-yellow solid: *R<sub>f</sub>* = 0.25 (hexane/EtOAc 7:1). Colorless powder of mp 85–87 °C (EtOAc/hexane). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.92 (s, 3H), 3.98 (s, 3H), 6.07 (s, 2H), 10.1 (s, 1H), 11.5 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 60.9, 62.8, 103.0, 110.3, 130.1, 130.3, 141.2, 147.9, 152.1, 193.6. IR (neat): 1667, 1624, 1604, 1489, 1469, 1427, 1400, 1292, 1091, 1049, 959 cm<sup>-1</sup>. EIMS (*m/z*): 226 (M<sup>+</sup>), 211 (M – Me), 183, 169, 147, 118. HRMS–ESI (*m/z*): [M + Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>NaO<sub>6</sub>, 249.0370; found, 249.0368.

4-*tert*-Butyldimethylsilyloxy-6,7-dimethoxy-1,3-benzodioxole-5-carbadehyde (26): To a mixture of 4-hydroxy-6,7-dimethoxy-1,3-benzodioxole-5-carbaldehyde (25) (1.20 g, 5.31 mmol), 4-dimethylaminopyridine (DMAP) (130 mg, 1.06 mmol), and Et<sub>3</sub>N (1.5 mL, 11 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (27 mL), was added *tert*-butylchlorodimethylsilane (1.20 g, 7.96 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 3 h. After addition of saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>, the whole was extracted three times with EtOAc, and the combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residual pale-yellow oil (2.14 g) was used as a crude title compound without further purification to the next step.

4-*tert*-Butyldimethylsilyloxy-6,7-dimethoxy-1,3-benzodioxole-5-methanol (27): To a solution of the crude 4-*tert*-butyldimethylsilyloxy-6,7-dimethoxy-1,3-benzodioxole-5-carbaldehyde (26) (2.14 g) in EtOH (30 mL) was added NaBH<sub>4</sub> (714 mg, 18.8 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 30 min. After addition of water, the whole was extracted three times with EtOAc, and the combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated *in*

*vacuo*. The residual solids were purified by column chromatography (hexane/EtOAc 9:1 to 5:1) to give the title compound (1.73 g, 95% in two steps) as a colorless oil:  $R_f = 0.23$  (hexane/EtOAc 7:1).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.20 (s, 6H), 0.99 (s, 9H), 3.83 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 4.62 (s, 2H), 5.87 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -4.5, 18.3, 25.7, 55.6, 60.4, 61.9, 101.1, 119.8, 132.0, 132.2, 134.0, 138.7, 145.8. IR (neat): 3522, 3464, 2931, 2885, 2858, 1616, 1477, 1431, 1257, 1083, 1053  $\text{cm}^{-1}$ . EIMS ( $m/z$ ): 342 ( $\text{M}^+$ ), 285 ( $\text{M} - t\text{-Bu}$ ), 270, 255.

5-Bromomethyl-4-*tert*-butyldimethylsilyloxy-6,7-dimethoxy-1,3-benzodioxole (28): To a mixture of 4-*tert*-butyldimethylsilyloxy-6,7-dimethoxy-1,3-benzodioxole-5-methanol (27) (450 mg, 1.31 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (13 mL) was added  $\text{PBr}_3$  (0.14 mL, 1.4 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 30 min. After addition of water, the whole was extracted three times with  $\text{CHCl}_3$ , and the combined organic layers were washed with brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and concentrated *in vacuo*. The residual pale-yellow oil (552 mg) was used as a crude title compound without further purification to the next step.

5-Allyl-4-*tert*-butyldimethylsilyloxy-6,7-dimethoxy-1,3-benzodioxole (29): To a mixture of the crude 5-bromomethyl-4-*tert*-butyldimethylsilyloxy-6,7-dimethoxy-1,3-benzodioxole (28) (552 mg, 1.56 mmol),  $\text{CuI}$  (50 mg, 0.26 mmol), and 2,2'-bipyridine (41 mg, 0.26 mmol) in  $\text{Et}_2\text{O}$  (4 mL) was added a 1.0 M THF solution of vinylmagnesium bromide (2.0 mL, 2.0 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 30 min. After addition of water, the whole was extracted three times with EtOAc, and the combined organic layers were washed with brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and concentrated *in vacuo*. The residual solids were purified by column chromatography (hexane/EtOAc 50:1) to give the title compound (313 mg, 68% over 2 steps) as a pale-yellow oil:  $R_f = 0.52$  (hexane/EtOAc 7:1).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.19 (s, 6H), 0.99 (s, 9H), 3.30–3.37 (m, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 4.90–5.00 (m, 2H), 5.86 (s, 2H), 5.89–5.98 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -4.2, 18.4, 25.8, 28.4, 60.4, 61.4, 100.8, 114.3, 118.8, 131.9, 132.3, 133.8, 137.1, 137.3, 145.3. IR (neat): 3016, 2931, 2886, 1477, 1435, 1254, 1215, 1053, 910  $\text{cm}^{-1}$ . EIMS ( $m/z$ ): 352 ( $\text{M}^+$ ), 280 ( $\text{M} - \text{Me} - t\text{-Bu}$ ). HRMS-ESI ( $m/z$ ):  $[\text{M} + \text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{O}_5\text{Si}$ , 353.1779; found, 353.1779.

5-Allyl-6,7-dimethoxy-1,3-benzodioxol-4-ol (30): To a solution of 5-allyl-4-*tert*-butyldimethylsiloxy-6,7-dimethoxy-1,3-benzodioxole (29) (690 mg, 1.96 mmol) in THF (20 mL) was added a 1.0 M THF solution of TBAF (1.96 mL, 2.0 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 30 min. After addition of water, the whole was extracted three times with EtOAc, and the combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The residual solids were purified by column chromatography (hexane/EtOAc 5:1 to 4:1) to give the title compound (462 mg, 99%) as a pale yellow solid: *R*<sub>f</sub> = 0.28 (hexane/EtOAc 4:1). Colorless needles of mp 65–67 °C (EtOAc/hexane). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.40 (ddd, *J* = 6.0, 1.7, 1.7 Hz, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 4.83 (br s, 1H), 5.08 (dt, *J* = 10.0, 1.7 Hz, 1H), 5.09 (dt, *J* = 17.0, 1.7 Hz, 1H), 5.92 (s, 2H), 5.99 (ddt, *J* = 17.0, 10.0, 6.0, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 28.1, 60.5, 61.7, 101.5, 114.3, 115.3, 131.7, 132.0, 132.8, 136.8, 137.2, 145.0. IR (neat): 3302, 2939, 1462, 1435, 1392, 1253, 1068, 1037, 910 cm<sup>-1</sup>. EIMS (*m/z*): 238 (M<sup>+</sup>). HRMS–ESI (*m/z*): [M + Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>NaO<sub>5</sub>, 261.0733; found, 261.0733. Anal. Calcd. for C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>: C, 60.50; H, 5.92. Found: C, 60.49; H, 5.87.

#### Synthesis of 6-Allyl-4,7-dimethoxy-1,3-benzodioxol-5-ol (34).

4,7-Dimethoxy-1,3-benzodioxol-5-ol [22934-69-6] (32): To a stirred solution of 4,7-Dimethoxy-1,3-benzodioxole-5-carbaldehyde, which was prepared according to literature [42,43], (1.0 g, 4.8 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 mL) was added *m*CPBA (1.8 g, 7.2 mmol) at 23 °C. After being stirred for 20 h, the mixture was quenched by saturated aqueous Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (30 mL). The organic layer was washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> (30 mL × 2) and brine (10 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure to give the crude formate. To a stirred solution of the above formate in MeOH (25 mL) was added K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 g, 14 mmol) at 23 °C. After being stirred for 2 h, the mixture was quenched with water (30 mL). The mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL × 2). The organic layers were washed with brine (10 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc) to afford 4,7-dimethoxy-1,3-benzodioxol-5-ol (32) (850 mg, 90%) as white solids. Spectroscopic properties

were consistent with those reported in the literature [44].

5-Allyloxy-4,7-dimethoxy-1,3-benzodioxol [2361555-45-3] (33): To a solution of 4,7-dimethoxy-1,3-benzodioxol-5-ol (32) (900 mg, 4.5 mmol) in dimethylformamide (7 mL) was added powdered NaOH (200 mg, 5.0 mmol). After being stirred at 23 °C for 20 min, allyl bromide (0.43 mL, 5.0 mmol) was added. After being stirred for 1 h, the reaction mixture was diluted with EtOAc (40 mL) and washed with water (20 mL × 2). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc) to afford 5-allyloxy-4,7-dimethoxy-1,3-benzodioxol (33) (850 mg, 82%) as white solids. Spectroscopic properties were consistent with those reported in the literature [45].

6-Allyl-4,7-dimethoxy-1,3-benzodioxol-5-ol [2361554-58-5] (34): 5-Allyloxy-4,7-dimethoxy-1,3-benzodioxol (33) (238 mg, 1.0 mmol) was dissolved in *N,N*-dimethylaniline (3.0 mL) and refluxed for 3 h. After cooling to 23 °C, the mixture was diluted with Et<sub>2</sub>O (20 mL). The mixture was washed with 20% aqueous HCl (10 mL × 2), followed by water (5 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane/EtOAc) to afford 6-allyl-4,7-dimethoxy-1,3-benzodioxol-5-ol (34) (211 mg, 89%) as a yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.46 (s, 1H), 5.88 (s, 2H), 5.82 (m, 1H), 4.97–4.83 (m, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.27–3.14 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 141.8 (C), 137.2 (C), 137.1 (CH), 136.6 (C), 130.4 (C), 128.1 (C), 114.2 (CH<sub>2</sub>), 111.1 (C), 100.8 (CH<sub>2</sub>), 60.1 (CH<sub>3</sub>), 59.6 (CH<sub>3</sub>), 27.7 (CH<sub>2</sub>). Spectroscopic properties were consistent with those reported in the literature [45] but the assignment of <sup>13</sup>C NMR chemical shift in previous report was likely incorrect. “110.6 ppm should be 137.2 ppm”.

## 参考文献

- [1] Ito M (2008) Studies on perilla relating to its essential oil and taxonomy. *Phytochemistry Research Progress*, Nova Science Publishers, Inc., New York, NY, USA, pp 13–30.
- [2] Koezuka Y, Honda G, Tabata M (1986) Genetic control of the chemical composition of volatile oils in *Perilla frutescens*. *Phytochemistry* 25:859–863
- [3] Ito M, Honda G (1996) A taxonomic study of Japanese wild Perilla (Labiatae). *J Phytogeogr Taxon* 44:43–52
- [4] Ito M, Toyoda M, Honda G (1999) Chemical composition of the essential oil of *Perilla frutescens*. *Nat Med* 53:32–36
- [5] Yuba A, Yazaki K, Honda G, Croteau R (1996) cDNA cloning, characterization, and functional expression of 4S(-)-limonene synthase from *Perilla frutescens*. *Arch Biochem Biophys* 332:280–287
- [6] Fujiwara Y, Ito M (2017) Molecular cloning and characterization of a *Perilla frutescens* cytochrome P450 enzyme that catalyzes the later steps of perillaldehyde biosynthesis. *Phytochemistry* 134:26–37
- [7] Martins C, Rueff J, Rodrigues AS (2018) Genotoxic alkenylbenzene flavourings, a contribution to risk assessment. *Food Chem Toxicol* 118:861–879
- [8] Gang DR, Lavid N, Zubieta C, Chen F, Beuerle T, Lewinsohn E, Noel JP, Pichersky E (2002) Characterization of phenylpropene *O*-methyltransferases from sweet basil: Facile change of substrate specificity and convergent evolution within a plant *O*-methyltransferase family. *Plant Cell* 14:505–519
- [9] Park C, Kim SI, Ahn YJ (2003) Insecticidal activity of asarones identified in *Acorus gramineus* rhizome against three coleopteran stored-product insects. *J Stored Prod Res* 39:333–342
- [10] Hauptenthal S, Berg K, Gründken M, Vallicotti, S, Hemgesberg M, Sak K, Schrenk D, Esselen M (2017) In vitro genotoxicity of carcinogenic asarone isomers. *Food Funct* 8:1227–1234
- [11] Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science Society of Japan (PMRJ). (2016) The Japanese Pharmacopoeia Technical Information; Jiho, Inc.: Tokyo, Japan, pp 1241–1242

- [12] Ito M, Toyoda M, Yuba A, Honda G (1999) Genetic analysis of nothoapiol formation in *Perilla frutescens*. *Biol Pharm Bull* 22:598–601
- [13] Ikezawa N, Iwasa K, Sato F (2007) Molecular cloning and characterization of methylenedioxy bridge-forming enzymes involved in stylopine biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *FEBS J* 274:1019–1035
- [14] Mizutani M, Sato F (2011) Unusual P450 reactions in plant secondary metabolism. *Arch Biochem Biophys* 507:194–203
- [15] Kitada C, Gong Z, Tanaka Y, Yamazaki M, Saito K (2001) Differential expression of two cytochrome P450s involved in the biosynthesis of flavones and anthocyanins in chemo-varietal forms of *Perilla frutescens*. *Plant Cell Physiol* 42:1338–1344
- [16] Takahashi S, Yeo YS, Zhao Y, O’Maille PE, Greenhagen BT, Noel JP, Coates RM, Chappell J (2007) Functional characterization of premnaspirodiene oxygenase, a cytochrome P450 catalyzing regio- and stereo-specific hydroxylations of diverse sesquiterpene substrates. *J Biol Chem* 282:31744–31754
- [17] Wüst M, Little DB, Schalk M, Croteau R (2001) Hydroxylation of limonene enantiomers and analogs by recombinant (2)-limonene 3- and 6-Hydroxylases from mint (*Mentha*) species: Evidence for catalysis within sterically constrained active sites. *Arch Biochem Biophys* 387:125–136
- [18] Mathela CS, Joshi RK, Bisht BS, Joshi SC (2015) Nothoapiole and  $\alpha$ -asarone rich essential oils from Himalayan *Pleurospermum angelicoides* Benth. *Rec Nat Prod* 9:546–552
- [19] Gotoh O (1992) Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem* 267:83–90
- [20] Schalk M, Croteau R (2000) A single amino acid substitution (F363I) converts the regiochemistry of the spearmint (2)-limonene hydroxylase from a C6- to a C3-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci* 97:11948–11953
- [21] Ito M, Honda G (2007) Geraniol synthases from perilla and their taxonomical significance. *Phytochemistry* 68:446–453
- [22] Ikezawa N, Tanaka M, Nagayoshi M, Shinkyo R, Sakaki T, Inouye K, Sato F (2003)

- Molecular cloning and characterization of CYP719, a methylenedioxy bridge-forming enzyme that belongs to a novel P450 family, from cultured *Coptis japonica* cells. *J Biol Chem* 278:38557–38565
- [23] Omura T, Sato R (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 239:2370–2378
- [24] Bochicchio A, Cefola R, Choppin S, Colobert F, Di Noia MA, Funicello M, Hanquet G, Pisano I, Todisco S (2016) Selective Claisen rearrangement and iodination for the synthesis of polyoxygenated allyl phenol derivatives. *Tetrahedron Lett* 37:4053–4055
- [25] Auvray P, Knochel P, Normant JF (1998) 3-Bromo-2-t-butylsulfonyl-1-propene: A versatile multi-coupling reagent part I. *Tetrahedron* 44:4495–4508
- [26] Pettus TRR, Inoue M, Chen XT, Danishefsky SJ (2000) A fully synthetic route to the neurotrophic illicinones: Syntheses of tricycloillicinone and bicycloillicinone aldehyde. *J Am Chem Soc* 122:6160–6168
- [27] Allen CFH, Gates JW Jr. (1945) *o*-Eugenol. *Org Synth* 25:49–50
- [28] Taskinen E (2001) Thermodynamic, spectroscopic, and density functional theory studies of allyl aryl and prop-1-enyl aryl ethers. Part 1. Thermodynamic data of isomerization. *J Chem Soc Perkin Trans 2*:1824–1834
- [29] Argüelles N, Sánchez-Sandoval E, Mendieta A, Villa-Tanaca L, Garduño-Siciliano L, Jiménez F, del Carmen Cruz M, Medina-Franco JL, Chamorro-Cevallos G, Tamariz J (2010) Design, synthesis, and docking of highly hypolipidemic agents: *Schizosaccharomyces pombe* as a new model for evaluating  $\alpha$ -asarone-based HMG-CoA reductase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 18:4238–4248
- [30] Büchi G, Chu PS (1981) The synthesis of megaphone. *J Am Chem Soc* 103:2718–2721
- [31] Singh SB, Pettit GR (1989) Isolation, structure, and synthesis of combretastatin C-1. *J Org Chem* 54:4105–4114
- [32] Pettit GR, Thornhill A, Melody N, Knight JC (2009) Antineoplastic agents. 578. Synthesis of stilstatins 1 and 2 and their water-soluble prodrugs. *J Nat Prod* 72:380–388
- [33] Chittimalla SK, Kuppusamy R, Bandi C (2014) A detour route for meta functionalization of phenols. *Synlett* 25:1991–1996

- [34] Lorient M, Robin JP, Brown E (1984) Syntheses totales et études de lignanes biologiquement actifs—6: Syntheses totales de la ( $\pm$ )-iso- $\beta$ -peltatine et de ses analogues. *Tetrahedron* 40:2529–2535
- [35] Coppola GM, Schuster HF (1989) The chemistry of 2H-3,1-benzoxazine-2,4(1H)-dione (isatoic anhydride). 21. A mild process for the preparation of 10-alkyl-9-acridanones and its application to the synthesis of acridone alkaloids. *J Heterocycl Chem* 26:957–964
- [36] McKittrick BA, Stevenson R (1984) Synthesis of the yeast antioxidant benzofuran and analogues. *J Chem Soc Perkin Trans 1*:709–712
- [37] Adesomoju AA, Davis WA, Rajaraman R, Pelletier JC, Cava MP (1984) Total synthesis of leucoxylinone. *J Org Chem* 49:3220–3222
- [38] Vshyvenko S, Scattolon J, Hudlicky T, Romero AE, Kornienko A, Ma D, Tuffley I, Pandey S (2012) Unnatural C-1 homologues of pancratiostatine—Synthesis and promising biological activities. *Can J Chem* 90:932–943
- [39] Lin J, Zhang W, Jiang N, Niu Z, Bao K, Zhang L, Liu D, Pan C, Yao X (2008) Total synthesis of bulbophyllol-B. *J Nat Prod* 71:1938–1941
- [40] Dallacker F (1969) Derivatives of methylenedioxybenzene. XXVIII. Reactions of the dimethoxymethylenedioxybenzaldehydes. *Monats Chem* 100:742–747
- [41] Olia MBA, Zavras A, Schiesser CH, Alexander SA (2016) Blue ‘turn-on’ fluorescent probes for the direct detection of free radicals and nitric oxide in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Org Biomol Chem* 14:2272–2281
- [42] Kunyane P, Sonopo MS, Selepe MA (2019) Synthesis of isoflavones by tandem demethylation and ring-opening/cyclization of methoxybenzoylbenzofurans. *J Nat Prod* 82:3074–3082
- [43] Rizzacasa MA, Sargent MV (1987) The structure and synthesis of nepenthone-A, a naphthoquinone from *Nepenthes rafflesiana*. *J Chem Soc, Perkin Trans. 1*:2017–2022
- [44] Tsyganov DV, Chernysheva NB, Salamandra LK, Konyushkin LD, Atamanenko OP, Semenova MN, Semenov VV (2013) Synthesis of polyalkoxy-3-(4-methoxyphenyl) coumarins with antimutagenic activity from plant allylpolyalkoxybenzenes. *Mendeleev Commun* 23:147–149



- [45] Samet AV, Shevchenko OG, Rusak VV, Chartov EM, Myshlyavtsev AB, Rusanov DA, Semenova MN, Semenov VV (2019) Antioxidant activity of natural allylpolyalkoxybenzene plant essential oil constituents. *J Nat Prod* 82:1451–1458

## 謝 辞

本研究を行うに際し、終始懇切なご指導と御鞭撻を賜りました、京都大学大学院薬学研究科 伊藤 美千穂 准教授に謹んで感謝の意を表します。

P450 の命名法に基づき *Pf-49487* と *Pf-18428* を分類、命名して頂きました、テネシー大学ヘルスサイエンスセンター David R. Nelson 教授、pGYR-SpeI ベクターを分与して頂きました、富山県立大学 榎 利之 教授、標品を合成するにあたり様々な助言とご協力を頂きました、京都大学大学院薬学研究科 山田 健一 准教授（現徳島大学薬学部教授）と山岡 庸介 助教に謝意を表します。

本研究を実施するにあたり、実験用植物の栽培にご協力を頂きました、京都大学大学院薬学研究科附属薬用植物園 木田 定美 様、小林 よしみ 様に深謝致します。

終始温かく励ましてくださいました、京都大学大学院薬学研究科薬品資源学分野のみなさまに心より御礼申し上げます。

いつも変わらず支え続けてくれた両親に心より感謝致します。