成蹊大学

博士(理工学)学位論文

合成化学的手法を基盤とした
高マンノース型糖鎖の構造多様性に関する研究

Study on structural diversity of high-mannose-type glycan based on synthetic chemical approach

2026 年 9 月

成蹊大学大学院 理工学研究科 理工学専攻

碓井 瑠智雄

目次

略語一覧 1

緒論 4

高マンノース型糖鎖の構造的特徴 4

高マンノース型糖鎖の入手法 6

高マンノース型糖鎖の生物学的機能 8

本研究の目的 11

本論 13

第 1 章　高マンノース型糖鎖の部分的グリコシル化法の開発 13

第 1 節　合成計画 13

第 2 節　単糖供与体およびジオールを含む単糖受容体の合成 15

第 3 節　グリコシル化による 2 分岐鎖構築の検討 16

第 4 節　2 分岐鎖の部分的グリコシル化法の検討 18

第 5 節　合成分岐鎖の脱保護 25

第 6 節　考察と小括 26

第 2 章　高マンノース型糖鎖のレクチン相互作用における分岐鎖特異性の解析 27

第 1 節　はじめに 27

第 2 節　GNL の分岐鎖特異性解析（タンパク質サーマルシフトアッセイ） 28

第 3 節　考察と小括 31

第 3 章　高マンノース型糖鎖分岐鎖の折り畳み配座の解析 32

第 1 節　合成計画 32

第 2 節　$GlcNAc_2$ の合成 35

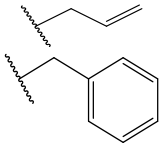
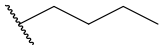
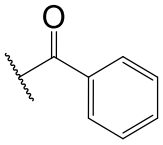
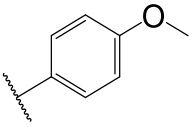
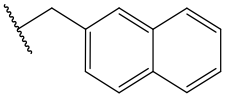
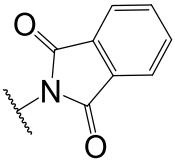
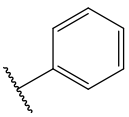
第 3 節　Glc_2 の合成 36

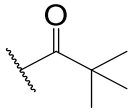
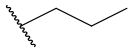
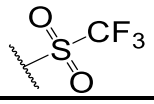
第 4 節　SMe を脱離基とするマンノース供与体の合成 37

第 5 節　*cis*-グリコシル化による $ManGlcNAc_2$ と $ManGlc_2$ の合成 39
第 6 節　$Man_3GlcNAc_2$ と Man_3Glc_2 骨格の合成と脱保護 40
第 7 節　NMR NOESY 相関による折り畳み配座の解析 43
第 8 節　分子動力学シミュレーションによる折り畳み配座の解析 55
第 9 節　考察と小括 63
結論 65
実験項 67
実験に関する一般事項 67
GNL のサーマルシフトアッセイでの評価 69
分子動力学シミュレーションでの評価 69
合成とスペクトルデータ 70
謝辞 110
本研究に関する業績 111
参考文献 115

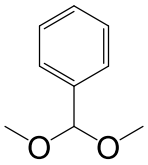
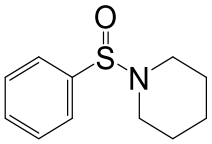
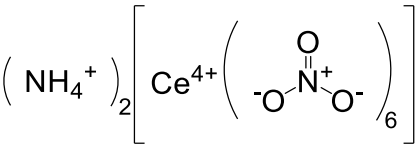
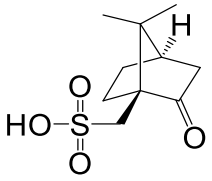
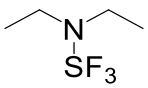
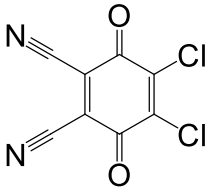
略語一覧

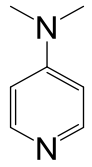
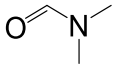
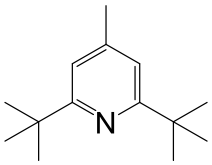
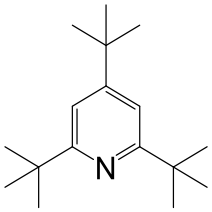
〇置換基の略称

略称	名称	構造式
Ac	acetyl	
All	allyl	
Bn	benzyl	
n-Bu	*n*-butyl	
Bz	benzoyl	
Cp	cyclopentadienyl	
Et	ethyl	
Me	methyl	
MP	*p*-methoxyphenyl	
NAP	2-naphthylmethyl	
NPhth	*N*-phthaloyl	
Ph	phenyl	

略称	名称	構造式
Piv	pivaloyl	
Pr	*n*-propyl	
Tf	trifluoromethanesulfonyl	

○試薬の略称

略称	名称	構造式、
BDA	benzaldehyde dimethyl acetal	
BSP	1-(benzenesulfinyl)piperidine	
CAN	ceric ammonium nitrate	
CSA	(+)-camphor-10-sulfonic acid	
DAST	*N,N*-diethylaminosulfur trifluoride	
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone	

略称	名称	構造式、
DMAP	4-(dimethylamino)pyridine	
DMF	*N,N*-dimethylformamide	
DTBMP	2,6-di-*tert*-butyl-4-methylpyridine	
MS	molecular sieves	
THF	tetrahydrofuran	
TTBP	2,4,6-tri-*tert*-butylpyridine	

〇糖の略称

略称	名称
Glc	D-glucose
GlcNAc	*N*-acetyl-D-glucosamine
Man	D-mannose

〇操作・機器の略称

略称	名称 (和名)
HRMS	high resolution mass spectrometry (高分解能質量分析)
NMR	nuclear magnetic resonance (核磁気共鳴)
TLC	thin layer chromatography (薄層クロマトグラフィー)

緒論

高マンノース型糖鎖の構造的特徴

高マンノース型糖鎖は、*N*-結合型糖鎖の一種でありコア構造 (-Man-β(1→4)-GlcNAc-β(1→4)-GlcNAc) と 3 つのマンノース分岐鎖 (A-アーム、B-アーム、C-アーム) で構成される (**Figure 1**) 。糖タンパク質上の高マンノース型糖鎖はアミノ酸と共有結合する還元末端の GlcNAc を除き、還元末端から遠ざかるほど自由度が増し、その立体配座は柔軟に可動するという特徴をもつ [1]。特に、マンノース分岐鎖の C-アームは、回転可能なグリコシド結合 (-Man-α(1→6)-Man-α(1→6)-Man-) を有し、立体配座の自由度が高い [2]。一方で水溶液中においては、水分子を介した分子内相互作用が働くことで、この立体配座が保持されやすくなる [3-4]。

高マンノース型糖鎖は、B-アームまたは C-アームを構成する分岐鎖がコア構造に近接する「折り畳み配座」をとることが知られている。この配座は、$Man_9GlcNAc_2$ および $Man_{8B}GlcNAc_2$ を対象とした核オーバーハウザー効果 (NOE) および常磁性効果を利用した NMR 測定により同定された [5-6]。また、計算化学を用いた解析においても $Man_3GlcNAc_2$, $Man_5GlcNAc_2$, $Man_6GlcNAc_2$, $Man_{7A}GlcNAc_2$ に至る一連の高マンノース型糖鎖において、同様の折り畳み配座が示唆されている [7-8]。特に、最も分岐鎖が短い $Man_3GlcNAc_2$ に関して、タンパク質構造データバンクに登録された多様な糖タンパク質結晶構造から得られた糖鎖構造に基づき、その立体配座を解析した結果 [7]、折り畳み配座の占有率は遊離状態の 40% に対し、タンパク質結合状態では 55% まで上昇することが明らかとなった。以上の結果は、折り畳み配座が生体内のタンパク質結合状態でより優勢な構造であることを示している。分子内水素結合数の解析では、非折り畳み配座では平均 1.5±0.8 個であるのに対し、折り畳み配座では平均 2.4±1.0 個へと増加していた。特に、マンノース分岐鎖とコア構造の GlcNAc 残基に

おける *N*-Ac 基との水素結合が、折り畳み配座の安定化に寄与する可能性が高い。Subedi らの報告では、3 つの高マンノース型糖鎖を有する *N*-Me-D-アスパラギン酸受容体 (NMDA 受容体) の細胞外リガンド結合ドメインを対象とした分子動力学シミュレーションを行い、N771 上の $Man_5GlcNAc_2$ (B-, C-アームの Man) と N471 上の $Man_5GlcNAc_2$ (コア $GlcNAc_2$) との分子間水素結合を確認した[9]。これは、分子間においても折り畳み配座に類似した相互作用が存在することを示唆している。また、コアフコシルトランスフェラーゼ Fut8 の酵素活性評価では、N771 上の糖鎖の除去に伴い、N471 上の糖鎖に対する活性の上昇が認められた。これは、N771 上の糖鎖が除去されたことで立体障害が緩和され、Fut8 が N471 上の糖鎖コア構造へアクセスしやすくなったことを示唆している[9]。すなわち、糖鎖の配座状態、および折り畳みの有無が糖認識タンパク質との親和性や反応性に作用する制御因子として機能する結果は、糖鎖の役割を解明する上で、重要な生物学的意義を有している。

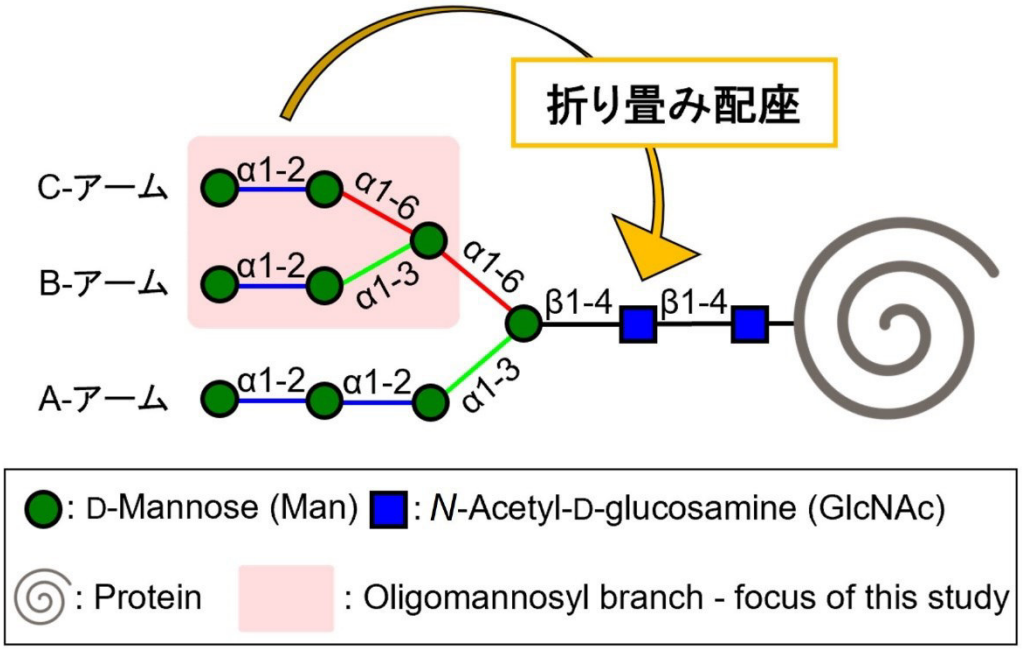


Figure 1. 高マンノース型糖鎖の構造と折り畳み配座

高マンノース型糖鎖の入手法

前節で構造的特徴を概説した高マンノース型糖鎖を研究標的する場合、これらを試料として調製する手法として、「生物試料からの抽出法」[10]、「化学酵素的合成法」、[11] もしくは「化学合成法」[12] が知られている。

「生物試料からの抽出法」では、サイズ排除および極性相互作用モードのクロマトグラフィーを段階的に併用することで $Man_9GlcNAc_2$ に代表される分岐異性体を持たない糖鎖を迅速に取得できる (Figure 2a)。一方、$Man_7GlcNAc_2$ や $Man_8GlcNAc_2$ などの分岐異性体が存在する糖鎖については、二次元高速液体クロマトグラフィーによる緻密な分離精製を要し、単離した異性体の構造決定が困難であるという課題がある [13]。

「化学酵素的合成法」では、糖加水分解酵素や糖転移酵素を用いて糖鎖の取得を目指す手法である (Figure 2b)。生物試料から得られた $Man_9GlcNAc_2$ に対し、α(1→2)-Mannosidase を用いて分岐鎖を切断するトップダウン型の酵素的合成法では、$Man_5GlcNAc_2$ へと至る過程で多様な分岐異性体が混合物として生成される [14-15]。これらの分岐異性体間の分離・同定の複雑さを解消するため、特定の分岐異性体を選択的に切断できる「保護(キャッピング)を利用した選択的トリミング法」が開発された。すなわち、トップダウン型の本手法では、$Man_9GlcNAc_2$ 分岐鎖の末端を異なる糖残基でキャッピングした非天然型糖鎖を出発物質とし、複数の糖加水分解酵素を使い分けることで、目的の分岐異性体を自在に得る解決策が示されている [16]。一方、これらの一度構築された糖鎖構造を部分的に分解していくトップダウン型の手法に対し、より小さなコア構造から糖転移酵素を用いて順次糖鎖を伸長させる「ボトムアップ型」の酵素的合成法も開発されており、多様な糖転移酵素を駆使することで $Man_{8C}GlcNAc_2$ などの分岐異性体が合成された [17]。しかし、いずれの「化学酵素的合

成法」においても、前駆体となる糖鎖の化学合成や高価な酵素の多用に伴う経済的負担など、工程の効率性には依然として改善の余地がある。

「化学合成法」においては、2～5 糖のフラグメント糖鎖の組み合わせから多様な分岐異性体を入手できる収斂的化学合成法が報告された (**Figure 2c**) [18-20]。ただし、必要となる多様な前駆体フラグメント糖鎖の合成が不可欠であり、多数の合成工程が必要となる。このように、多様な分岐異性体を効率的に入手する手法の開発には、依然として課題が残されている。

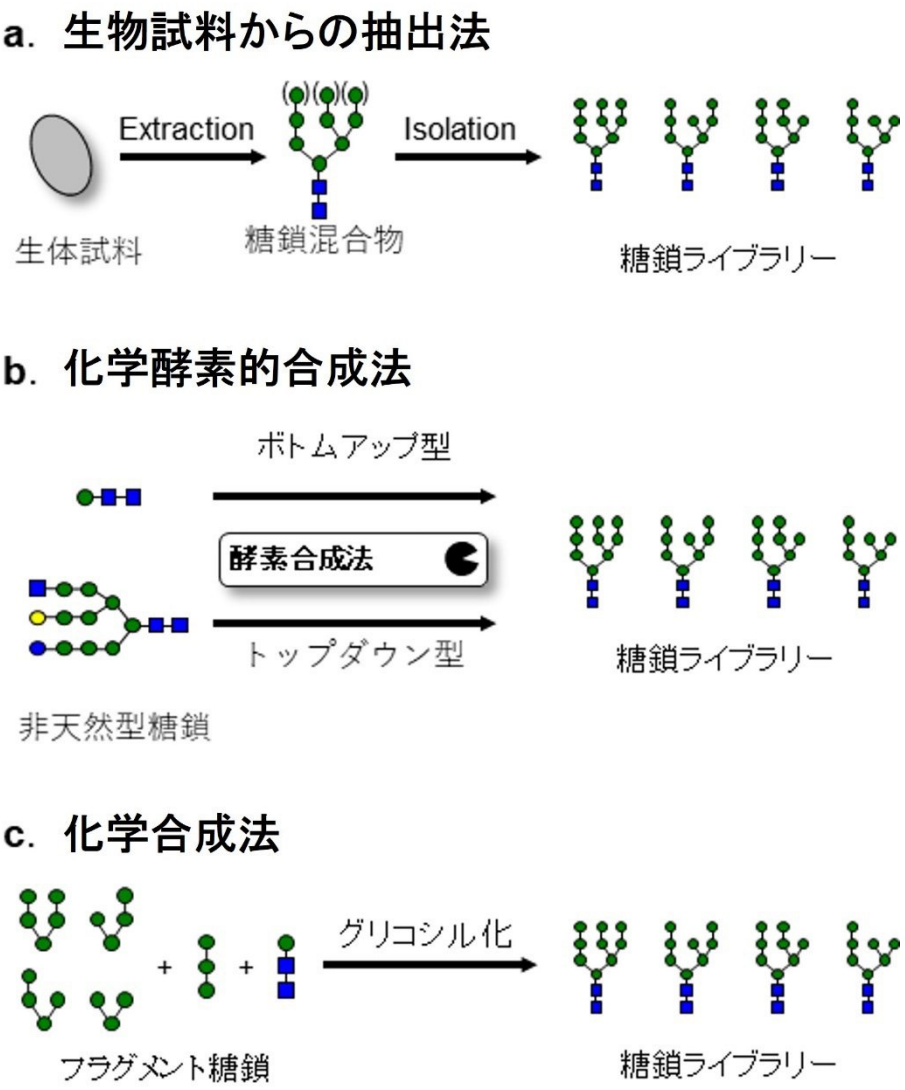


Figure 2. 高マンノース型糖鎖の入手法

(a) 生物試料からの抽出法 (b) 化学酵素的合成法 (c) 化学合成法

高マンノース型糖鎖の生物学的機能

高マンノース型糖鎖はがん細胞や腫瘍組織において特異的に発現し、免疫応答の標的として関与する。腫瘍細胞や転移性がん細胞の表面では高マンノース型糖鎖の発現が増加しており、その発現レベルが上昇するほど悪性進展のリスクが高まる正の相関が報告されている [21-23]。そのため、糖鎖プロファイリングによる悪性進行度の評価やバイオマーカーとしての応用研究が進んでいる[23-25]。免疫応答においては、樹状細胞表面の C 型レクチンである DC-SIGN が、抗原上の高マンノース型糖鎖を認識し、T 細胞へと抗原提示を行う役割を担う [26-28]。DC-SIGN に対する親和性は、α(1→3)Man およびα(1→6)Man がα(1→2)Man と比較して低いものの、T 細胞への抗原提示プロセス自体はα(1→2)Man よりも α(1→3)Man およびα(1→6)Man の方が迅速に進行することが示されている [29]。 したがって、高マンノース型糖鎖は、レクチンとの結合能評価のみならず、分子間相互作用や免疫応答の反応速度論的解析においても極めて重要な対象となっている。

高マンノース型糖鎖は、ウイルス感染機序から発症、さらには治療戦略に至るまで幅広く関与する。ヒト免疫不全ウイルス (HIV) においては、スパイクタンパク質を構成する糖タンパク質 gp120 上の高マンノース型糖鎖が感染能力の維持に寄与しており [30-31]、 HIV 陽性患者の血清中に見出される広域中和抗体 2G12 の認識抗原でもあることから、ワクチン開発の重要な標的として注目されている [32]。インフルエンザウイルスの場合、感染細胞の表面に発現した高マンノース型糖鎖を、自然免疫因子であるマンノース結合レクチンが認識することで炎症反応が誘発される。そのため、高マンノース型糖鎖のプロファイリングは、インフルエンザウイルス感染の重症度を予測するバイオマーカーとしての応用が期待される [33]。また、Cyanovirin-N や *Galanthus nivalis* レクチン (GNL) など、高マンノース型糖鎖に高い親和性を有するレクチンは、強力な抗ウイルス活性を示す分子候補として期待される。また、藍藻

Kappaphycus alvarezii のタイプⅠレクチンでは、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス-2 (SARS-CoV-2) のスパイクタンパク質上の高マンノース型糖鎖を標的とした優れた中和能が報告されている[34-37]。

細胞内における高マンノース型糖鎖は、小胞体糖タンパク質品質管理機構 (ERQC) において、糖タンパク質の分泌または分解経路を決定する重要なシグナル分子として機能する[38]。具体的には、糖鎖の分岐構造の切断状態がタンパク質のフォールディング状態に応じた経路を規定しており、例えば B-アームが切断された高マンノース型糖タンパク質は分泌経路であるゴルジ体へ輸送される。一方で、A-アームまたは C-アームが切断された後、さらにマンノース残基のトリミングが進んだ場合には、異常タンパク質として小胞体関連分解経路 (ERAD) へと輸送される[39]。その際、小胞体内の α(1→2)マンノシダーゼ類は、末端の α(1→2)Man のみならず、より内側の結合様式を識別して糖切断することが明らかになっており、分岐鎖内部のグリコシド結合様式の違いが品質管理における重要な決定因子であることが示唆された[40]。同様に、グルコシダーゼⅡにおいても高マンノース糖鎖上の Glc を標的としながらも、マンノース分岐鎖の構造異性体である $GlcMan_{8B}GlcNAc_2$ と $GlcMan_{8C}GlcNAc_2$ に対して異なる切断活性を示す[41]。このように、ERQC 内のレクチンや糖加水分解酵素は、分岐鎖レベルで糖鎖構造を厳密に識別することで、糖タンパク質の恒常性を制御する。

ERQC は、タンパク質のミスフォールドに起因する多様なフォールディング病にも関与する。代表的な例として、Glucocerebrosidase の異常によるゴーシェ病、α-galactosidase A によるファブリー病、Acid α-glucosidase によるポンペ病のほか、嚢胞性線維症跨膜調節因子の機能不全による嚢胞性線維症が挙げられる[42,43]。フォールディング病の疾患において、ERAD への輸送が過剰に進むことにより、小胞体内の糖鎖プロセシング酵素によるトリミング状況が変動することが報告されており、高マン

ノース型糖鎖のプロファイリングが新たなバイオマーカーとして利用されることが期待されている[44]。近年の研究では、変異によるミスフォールドタンパク質を安定化させ、正常な輸送を促す薬理学的シャペロン (PC) の開発が進められている。PC の設計では、ゴルディロックス曲線に基づく熱力学的安定化が重要であり、単一標的ポケットで不十分な症例に対しては、複数部位を狙うアロステリック戦略が有効とされる[45-46]。その評価には、単なる親和性 (K_d) のみならず自由エネルギー地形に踏み込んだ精緻な解析が不可欠であり、結合ポケットの重ね合わせを議論する上で、安定化能を直接評価できるサーマルシフトアッセイ (TSA) の活用が重要となる[47]。さらに、近年ではこれらを *in silico* で予測する計算手法の確立が求められるが[46]、正確な自由エネルギー地形の予測には、ERQC の基幹シグナルである高マンノース型糖鎖の動的な挙動、特に分岐鎖のコンホメーション変化を考慮する必要である。また、レクチン様分子シャペロンであるカルネキシン／カルレティキュリン (CRX/CRT) や、フォールディングチェック機構を担う UDP-Glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1 との競合的相互作用も無視できないため、高マンノース型糖鎖は、単なる解析対象ではなく、次世代の薬理学的シャペロンの機構解明および創薬研究における重要な研究資源であると言える。

本研究の目的

糖残基数や分岐構造が異なる高マンノース型糖鎖は、それぞれ異なるレクチンの認識標的となり、異なる活性を示すことが知られている。こうした「分岐構成の多様性」が持つ生物学的意義を理解するためには、各分岐異性体を効率的に調製する手法を確立が必要である。また、レクチンによる糖残基の露出・配置の識別に関する特異性、すなわち「分岐配置の多様性」を考慮し、詳細に比較・評価することが重要である。こうした実験的知見の蓄積は、複雑な糖鎖構造を扱うインシリコ予測モデルの検証・高精度化においても極めて重要な意義を持つ。レクチンによる初期認識プロセスには、糖鎖の立体配座の考慮が必要である。特に、結合様式の柔軟性が高い α(1→6)マンノース結合を含む分岐鎖は、高度な配座多様性を有する。配座多様性は、レクチンの認識に影響を与えるだけでなく、糖タンパク質の局所的な構造安定化や、タンパク質全体の活性変化に影響を与える可能性がある。したがって、高マンノース型糖鎖を保持した糖タンパク質全体の正確な立体構造予測・モデリングや、それを基にした結合親和性の熱力学的評価といった計算科学的手法を真に機能させるためには、本研究が対象とするような糖鎖部分の動的な配座特性を正しくモデルへと反映させることが重要である。本研究では、高マンノース型糖鎖の「分岐構成の多様性」「分岐配置の多様性」「立体配座の多様性」に焦点を当て、多様な高マンノース型分岐鎖を効率的に調製する化学合成手法の開発（第1章）、合成したマンノース分岐鎖を用いたレクチン認識における構造特異性の解析（第2章）、高マンノース型糖鎖のコア構造による配座制御（第3章）を通じて多角的な視点から得られた知見を総括した。各章の実施内容に関して、以下に概説した。

第 1 章　高マンノース型糖鎖の部分的グリコシル化法の開発 [48]

本章では、高マンノース型糖鎖の機能解析における課題となる分岐異性体の簡便な調製を実現する新手法を確立した。2 つの分岐鎖を同時に伸長させるグリコシル化反応を意図的に中断する集合的合成法を開発し、高マンノース型糖鎖の B-アームおよび C-アームの部分構造を模倣した異性体を含む計 4 種類の分岐鎖のワンポット合成を達成した。

第 2 章　高マンノース型糖鎖のレクチン相互作用における分岐鎖特異性の解析 [48]

本章では、第 1 章にて合成した 4 種類のマンノース分岐鎖を用い、αMan 構造を特異的に認識する抗ウイルス性レクチン *Galanthus nivalis* レクチン (GNL) [49-51] に対する結合特異性を評価した。その結果、分岐鎖における α(1→3)Man および α(1→6)Man 残基の露出と配置が、レクチン認識に対する分岐鎖特異性を決定する重要な因子であることを見出した。

第 3 章　高マンノース型糖鎖分岐鎖の折り畳み配座の解析 [52]

高マンノース型糖鎖の分岐鎖が形成する折り畳み配座の安定化要因を解明するため、コア構造の *N*-Ac 基の寄与を検証した。天然型構造である **$Man_3GlcNAc_2$** と、*N*-Ac 基を OH 基に置換した非天然型糖鎖 **Man_3Glc_2** を化学合成し、NMR (NOESY) および分子動力学 (MD) シミュレーションを用いた配座解析を行った。解析の結果、非天然型 **Man_3Glc_2** は、天然型 **$Man_3GlcNAc_2$** と比較して緩やかな折りたたみ配座をとることが確認された。これにより、*N*-Ac 基が分岐鎖をコア構造近傍へと引き寄せ、折りたたみ配座を安定化させる重要な役割を担うことを実験的に解明した。本知見は、コア糖鎖の *N*-Ac 基という微細な化学構造の違いが、糖鎖全体のエネルギー状態や立体構造予測の精度に影響を及ぼす可能性を示唆しており、レクチンによる糖鎖認識機構を理解する上での重要な基盤情報となる。

本論

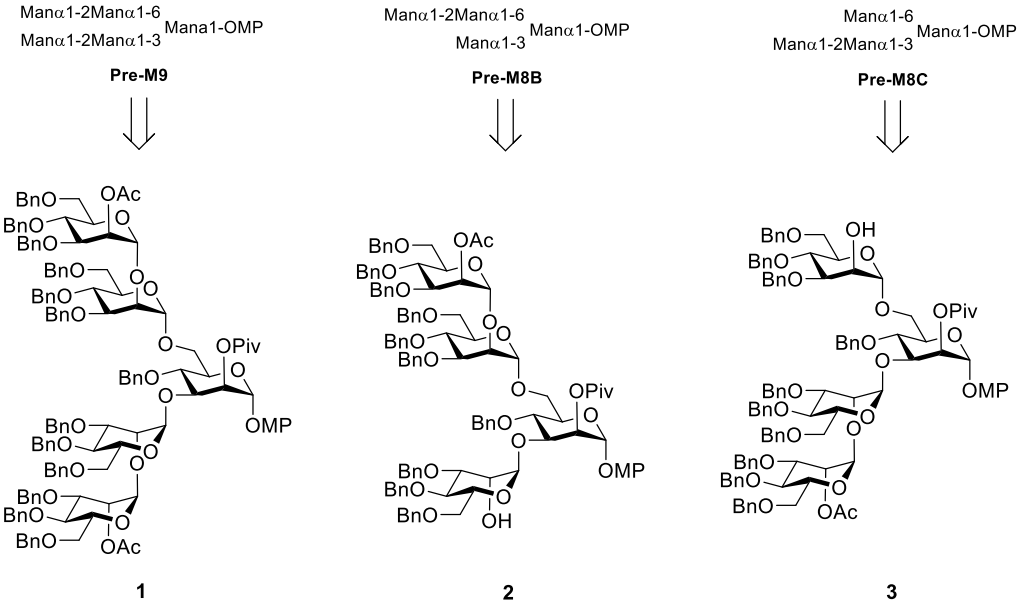
第1章　高マンノース型糖鎖の部分的グリコシル化法の開発

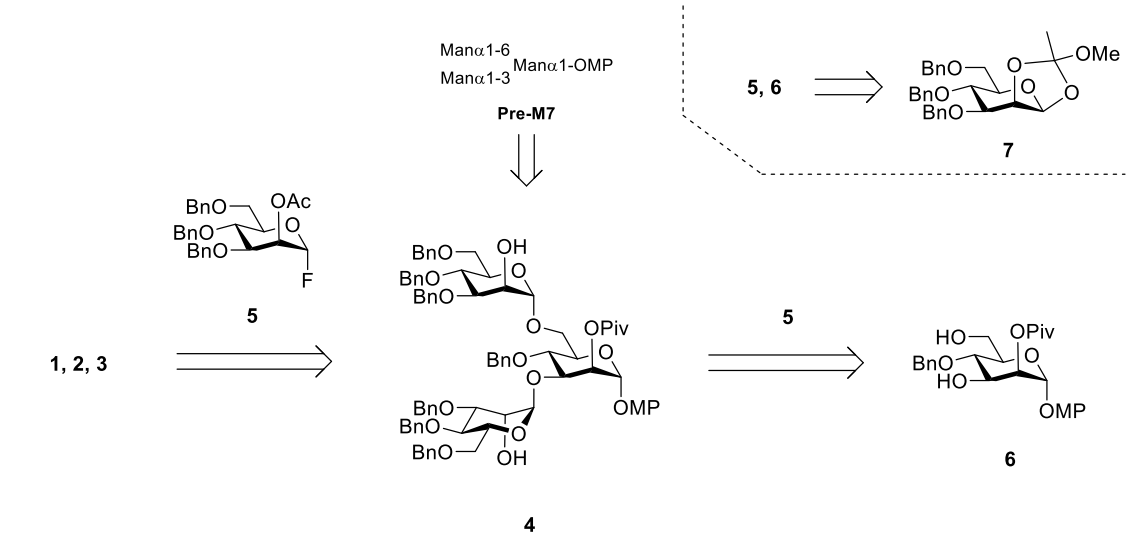
第 1 節　合成計画

グリコシル化反応を用いた多分岐構造の構築において、複数のヒドロキシ基を有する糖受容体に対し、多点同時にグリコシル化を行う手法は有効な戦略である [53-55]。高マンノース型糖鎖の各分岐鎖末端は、共通して α(1→2)Man 構造を有している。そのため、この共通末端構造を持つ単糖供与体を、複数のヒドロキシ基を持つ糖受容体へ同時に導入することで、複雑な分岐鎖を一挙かつ効率的に構築できる。本手法の過程においては、複数の分岐鎖が段階的に伸長されるため、反応系内には部分的にグリコシル化された多様な分岐異性体が中間体として生成する。この点に着目し、多点同時グリコシル化法を意図的に中断することで、反応中間体である多様な多分岐構造を同時に入手できると考えた。すなわち、一度のグリコシル化反応で複数の分岐鎖を生じさせ、それらを分離・精製することで、効率的なライブラリー構築を可能にする収斂的ワンポット合成法の確立を着想した。そこで本研究では、ERQC において生物学的に重要な役割を担う B-アームおよび C-アームを含む分岐鎖群を標的とし、部分的グリコシル化反応を用いた多様な高マンノース型糖鎖の部分構造のワンポット合成を計画した (**Scheme 1**)。

標的骨格の高マンノース型分岐糖鎖に相当する化合物 **1** 、**2** および **3** は、2 箇所にヒドロキシ基を有する 3 糖受容体 **4** に対して Man 供与体 **5** を 2 カ所同時にグリコシル化する過程を意図的に中断することにより、ワンポットにて合成可能と考えた。また、2 箇所にヒドロキシ基を有する受容体 **4** は、単糖受容体 **6** への 2 当量の糖供与体 **5** の二重グリコシル化により合成可能と考えた。単糖受容体 **6** と単糖供与体 **5** はどちらもオルトエステル体 **7** を出発化合物として誘導することとした。なお、本論文に

おいて、ペンタマンノシド **1**、2 種類のテトラマンノシド **2**, **3**、およびトリマンノシド **4** の脱保護体は、それぞれ **Pre-M9**、**Pre-M8B**、**Pre-M8C**、および **Pre-M7** と示す。

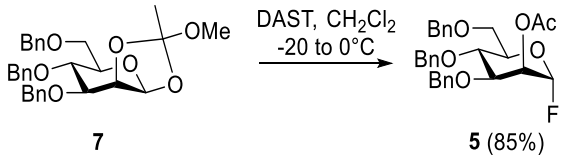




Scheme 1. **Pre-M9**, **Pre-M8B**, **Pre-M8C**, **Pre-M7** の逆合成

第 2 節　単糖供与体およびジオールを含む単糖受容体の合成

単糖供与体 **5** は、マンノースオルトエステル体 **7** [56] に対し DAST を作用させ、アノマー位を α 選択的にフッ素化することで合成した (**Scheme 2**)。なお、アノマー位の α 配置は non-decoupling HMQC NMR 測定により求めた $^{1}J_{CH}$ カップリング定数 (= 189.3, 185.8 Hz) に基づき同定した。この、$^{1}J_{CH}$ カップリング定数は、アノマー位の立体配座に依存し、α-Man では、アノマー位の $^{1}J_{CH}$ カップリングは >170.0 Hz となる値を示すことが知られている [57]。

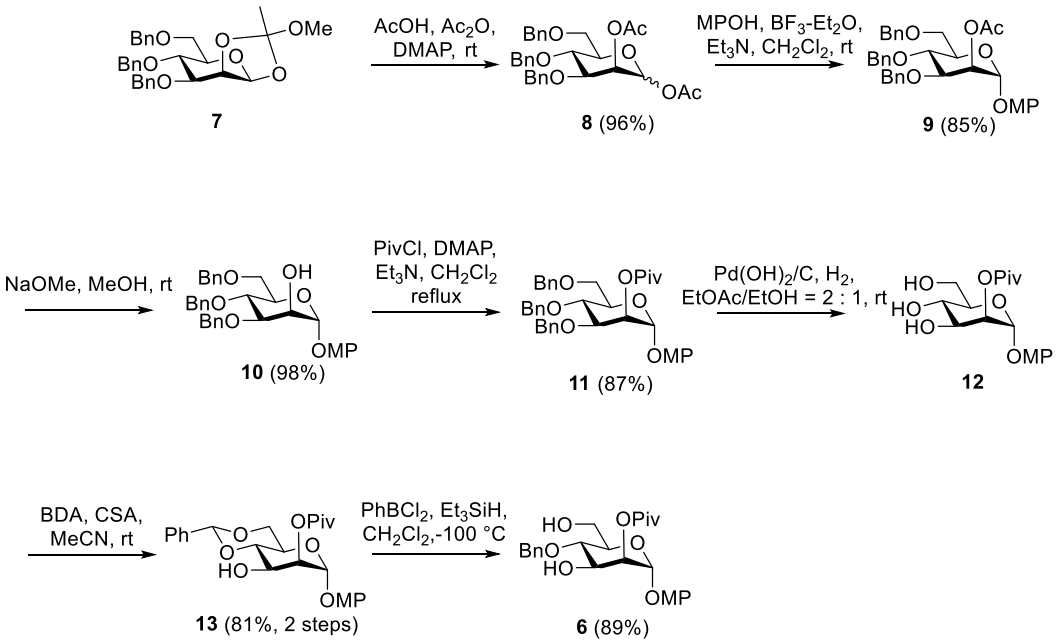


7　　**5** (85%)

Scheme 2. フッ素脱離基を有する糖供与体 **5** の合成

単糖受容体 **6** の合成に関しては、まず同様にオルトエステル体 **7** を出発物質として AcOH を用いた開環反応を行い、続いて DMAP 触媒下で Ac_2O で Ac 化することで化合物 **8** へと誘導した (**Scheme 3**)。次に、$BF_3{\cdot}Et_2O$ を用いて 1 位の Ac 基を活性化させたのち、MP-OH を作用させ、α 配置のメトキシフェニル体 **9** を得た。本反応では、ルイス酸が他の Ac 基への配位のためか、目的の反応の進行に試薬の追加を要した。なお、生成物の立体化学は $^{1}J_{CH}$ カップリング定数 (= 171.3 Hz) から決定した。次に強い求核剤である NaOMe によって 2 位の Ac 基を脱保護し、化合物 **10** を合成した。続いて、DMAP 触媒および Et_3N の存在下で PivCl を用いた、2 位の Piv 化体 **11** を合成した。なお、本反応は室温下では十分に進行しなかったため、加熱還流条件下にて実施した。その後、$Pd(OH)_2/C$ を触媒とした水素添加によって Bn 基を還元除去し、酸触媒 CSA を用いて BDA を作用させ、4,6-ベン

ジリデン体 **13** を合成した。最後に、嵩高いルイス酸 $PhBCl_2$ とヒドリド還元剤 Et_3SiH を用いてベンジリデン環を 6 位選択的に開裂させ、目的の単糖受容体 **6** を得た[58]。



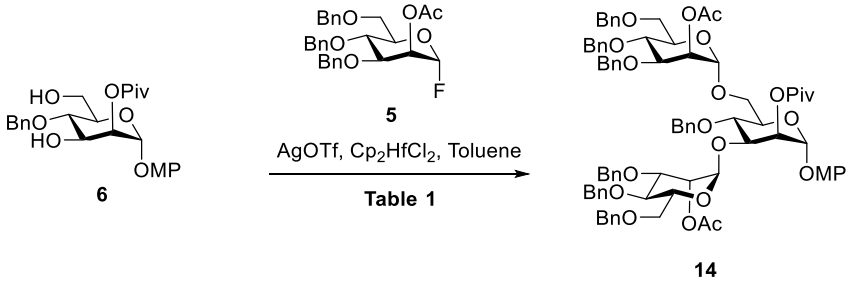
Scheme 3. ジオールを含む糖受容体 **6** の合成

第 3 節　グリコシル化による 2 分岐鎖構築の検討

本節では糖供与体 **5** と糖受容体 **6** を用いた二重グリコシル化によって、2 分岐鎖構築の最適反応条件を検討した (**Table 1**)。プロモーターには、糖供与体 **5** に対する高収率かつ高立体選択的なグリコシル化の実績を有する AgOTf-Cp_2HfCl_2 を使用した[40]。既報の通り、低極性かつ非配位性である Toluene 溶媒下では、隣接基関与が強化されることが考えられる。本検討においても、Toluene 溶媒を選択した結果、**Entry1~3** のいずれの条件においても完全な α 選択性が確認された。グリコシル化生成物 **14** の立体化学は、新たに生成したグリコシド結合に由来する $^1J_{C1',H1'}$ = 172.9 Hz および $^1J_{C1'',H1''}$ = 172.9 Hz から α 配置であると決定された。また収率に関

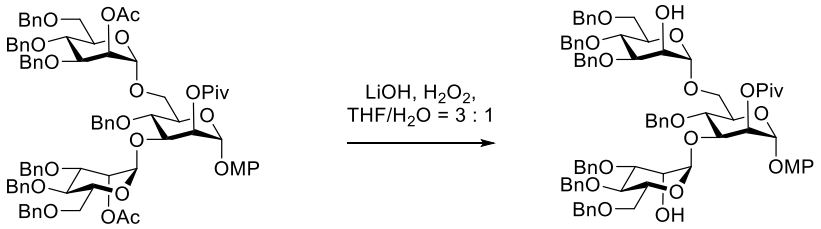
しては、**Entry 1** では、乾燥剤 MS AW-300 および塩基 DTBMP を使用し、室温下でグリコシル化反応を行ったところ、62%という中程度の収率でトリマンノシド **14** が得られた。本条件では副生成物として、トリマンノシド上の Ac 基が DTBMP により部分的に脱保護された化合物が生じたと推察した。そこで **Entry 2** では、穏やかな条件として-30˚C の低温下で反応を実施した。その結果、脱保護体は観測されず、収率は93%まで向上した。また、**Entry 3** にて、DTBMP 非存在下での反応を検討したところ、収率 90% で目的物を得た。-30˚C の反応温度下においては、乾燥剤を MS AW-300 から MS 4A へと変更し、かつ DTBMP を除去した条件下 (Entry 3) でも高収率を維持できたことから、本条件下では DTBMP の添加や乾燥剤の選択が収率に与える影響は軽微であることが判明した。さらに、本グリコシル化の TLC 分析では、単一の中間体のみが観察された。このことから、反応初期において 2 級ヒドロキシ基へのグリコシル化が進行した α(1→3) 結合のジマンノシドは生成されず、反応性が高い 1 級ヒドロキシ基へのグリコシル化が優先した α(1→6) 結合のジマンノシドのみが中間体として生成したと推測した。

Table 1. 二重グリコシル化による 2 分岐トリマンノシド **14** の合成



Entry	Conditions	Yield (%)	α/β
1	**5** (4.3 eq), DTBMP, MS AW-300, 0°C, 2 h	62	α only
2	**5** (4.2 eq), DTBMP, MS AW-300, -30°C, 2 h	93	α only
3	**5** (2.9 eq), MS 4A, -30°C, 2 h	90	α only

次節での更なる分岐鎖伸長を見据え、トリマンノシド **14** のアシル保護基のうち Ac 基のみを選択的に脱保護した 3 糖受容体 **4** を合成した (**Scheme 4**)。H_2O_2 に対して LiOH を反応させ、求核性を有する LiOOH を系中で生成させた。このペルオキシド種を介した反応は、通常の加水分解とは異なる経路で進行することが知られている [59]。Ac 基は、Piv 基と比較して、隣接するカルボニル炭素の立体障害が小さく、求核攻撃を受けやすいため、良好な選択性で脱保護が進行したと考えられる。



14 **4** (79%)

Scheme 4. 選択的脱アシル化による糖供与体 **4** の合成

第 4 節　2 分岐鎖の部分的グリコシル化法の検討

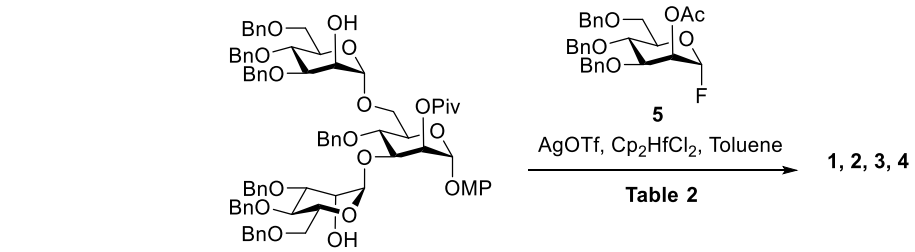
ジオール構造を有する 3 糖受容体 **4** と単糖供与体 **5** を用いたグリコシル化を検討した。本反応では、ペンタマンノシド **1** に加え、分岐異性体であるテトラマンノシドの分岐異性体 **2**, **3** を同時に得ることを目的とし、反応の中断による生成比の制御を試みた。まず、ペンタマンノシド **1** の合成に十分な過剰量の供与体 **5** を用い、TLC にて各中間体の生成を確認した段階で反応を停止させた (**Table 2, Entry 1**)。しかし、本条件では反応速度が極めて速く、適切なタイミングでの反応の停止が困難であった。その結果、ペンタマンノシド **1** は約 75% の収率で生成したものの、テトラマンノシド **2**, **3** およびトリマンノシド **4** はそれぞれ 20% および 4% の収率に留まった。

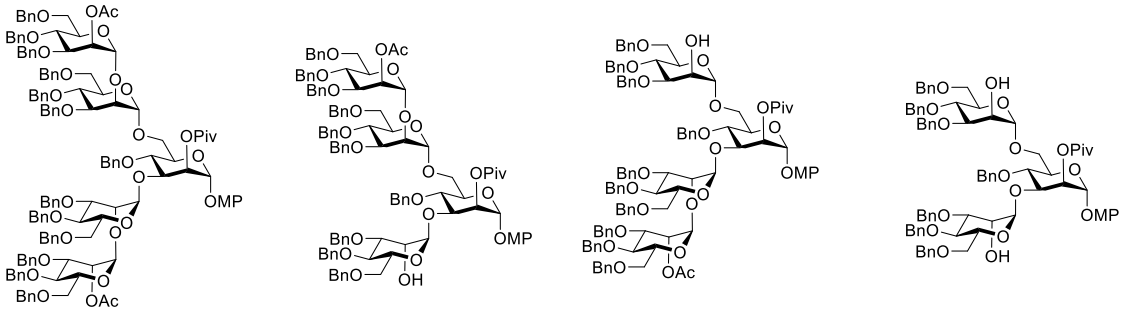
そこで、各生成物の収率を平均化するため、低温条件下で反応速度を抑制した (**Entry 2**)。この際、反応の進行が十分に穏やかになると予測し、トリフレートをトラッ

プして反応性を制御する役割をもつ DTBMP の添加をしなかった。その結果、反応時間は延長し、**Entry 1** と比較して構造異性体のブランチであるテトラマンノシド **2**, **3** の収率を大幅に改善することに成功した。

さらに、反応時間に依存せず再現性の高い部分的グリコシル化法を確立するため、供与体の当量を制限した条件を検討した (**Entry 3**)。具体的には、糖供与体 **5** の当量数を 1.5 当量へと減少させ、供与体の消失に伴い反応が自動的に停止する系を構築した。結果として、**Entry 2** と比較し、テトラマンノシド **2, 3** の収率の制御が容易となった。ただし、**Entry 2** と比較し、テトラマンノシド **2** が優位に生成されており、構造異性体間の収率差は 11% と拡大した。これは、供与体濃度の低下に伴い、2 箇所のグリコシル化における反応性の差が顕在化し、より求核性の高いヒドロキシ基から優先的に反応したと推測した。テトラマンノシド **2, 3** の収率差は、トリマンノシド **4** のヒドロキシ基周辺の電子状態に起因すると考えられる。各ヒドロキシ基に隣接する H-2 の ^{1}H NMR 化学シフトの差はそれぞれ 4.00 ppm と 3.91 ppm であり、6 位側由来のヒドロキシ基が、3 位側よりも高い求核性を有することを示唆している。なお、先行する化合物 **14** の合成において、DTBMP 非存在下でも良好な立体選択性が得られたため、本反応でも添加を行わなかった。新たに構築された立体化学は、ペンタマンノシド **1** ではどちらの伸長部分の糖鎖とも $^{1}J_{CH}$ = 172.0 Hz を示し、テトラマンノシド **2** では $^{1}J_{CH}$ = 170.2 Hz、テトラマンノシド **3** では $^{1}J_{CH}$ = 172.9 Hz であったことにより、α 体であると決定した。

Table 2. 2 分岐鎖の部分的グリコシル化によるマンノ-ス分岐鎖 **14** の合成





Entry	Condition	Time	Equivalent of 5	Yield of 1 (%)	Yield of 2 (%)	Yield of 3 (%)	Yield of 4 (%)	Overall (%)
1	MS AW-300, DTBMP, -30°C	1h.	2.9	75	11	9	4	99 (α only)
2	MS AW-300, -60 to -40°C	5h.	3.7	16	20	19	32	86 (α only)
3	MS 4A, -30°C	2h	1.5	14	28	17	29	89 (α only)

多分岐鎖のグリコシル化による混合生成物を、一回の精製で完全に分離すべく、中圧液体クロマトグラフィーの条件検討を行った。まず移動相として、Toluene - EtOAc 系を検討したが、低極性側に溶出するペンタマンノシド **1** と糖供与体由来の

副生成物との分離が困難であった (**Figure 3 左**)。一方、Hexane - EtOAc 系を移動相に用いた際には、テトラマンノシド **2**,**3** の分離が不十分であった。これらの分離能を向上させるため、順相シリカゲルカラム (ULTRA PACK B) を 2 本直列に連結し、高い理論段数を確保する手法を試行した。その結果、反応系内に含まれる4種類の分岐糖鎖 (**1**, **2**, **3**, **4**) を一度の精製で完全に単離することに成功した。**Figure 4** は、クロマトグラフの結果を示しており、縦軸には蒸発光散乱検出システム (ELSD) の検出強度、横軸は溶出時間を表している。なお、本精製系は原料 100 mg あたり、シリカゲル充填量 200 g のスケールで実施した。

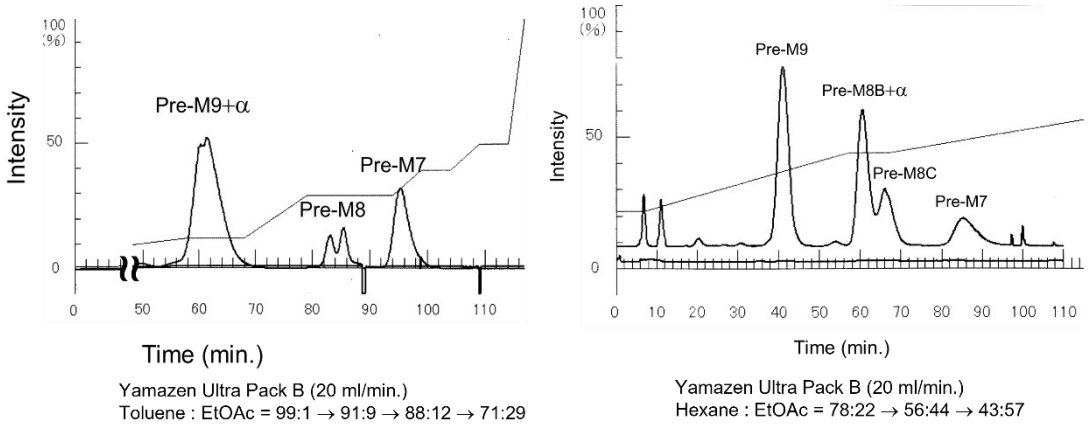


Figure 3. 中圧分取液体クロマトグラフィーによる移動相溶媒の検討

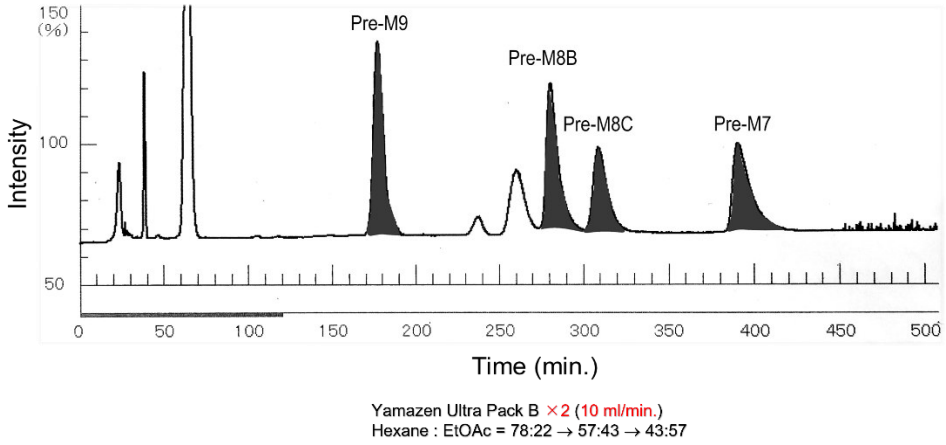


Figure 4. 中圧分取液体クロマトグラフィーによるマンノース分岐鎖の精製

次に、部分的グリコシル化法によって得られたテトラマンノシド **2**, **3** の同定について述べる。一般に、微量な *N*-結合型糖鎖の構造異性体の同定は、イオンモビリティー MS などで生じるネガティブイオンのクロスリングフラグメントを利用した方法や、LC-MS を用いた手法が汎用される [60-61]。これに対し、本研究では共通の官能基に由来する NMR シグナルの重複を考慮しつつ、HMBC NMR 測定によって構造異性体固有の相関ピークを比較することで同定を行った。ペンタマンノシド **1** の 2D-NMR (**Figure 5**) では、HMBC 測定での 4-Methoxyphenyl 上の炭素との相関をもつ Man_a の H-1 (5.25 ppm) を確認した。また、COSY 測定により、Man_a の H-1, H-2, H-3 における各相関 (5.24 ppm, 4.39 ppm) を判別した。さらに、HMQC, HMBC 測定により、Man_a の H-3 との相関をもつ Man_c の C-1 (101.9 ppm)が確認された。HMQC, COSY 測定により、Man_c の H-1 (5.29 ppm) および H-2 (3.92 ppm) と判別でき、HMBC において Man_e の C-1 (99.5 ppm) との相関を確認できた。一方の糖残基である Man_b においても、COSY 測定から H-1 (4.88 ppm) および H-2 (3.98 ppm) と判断でき、HMBC において Man_d の C-1 (99.8 ppm) との相関を確認できた。Man_b と Man_c の 2 位間でのにおける ^{1}H NMR のシグナル、および、Man_d と Man_e の ^{13}C NMR でのアノマー位のシグナルに重なりはなく、化合物 **2**, **3** でも同様の結果が得られた (**Figure 6**)。したがって、上記を基に分岐異性体である化合物 **2**, **3** を区別し、各構造異性体を明確に判別することが可能となった。

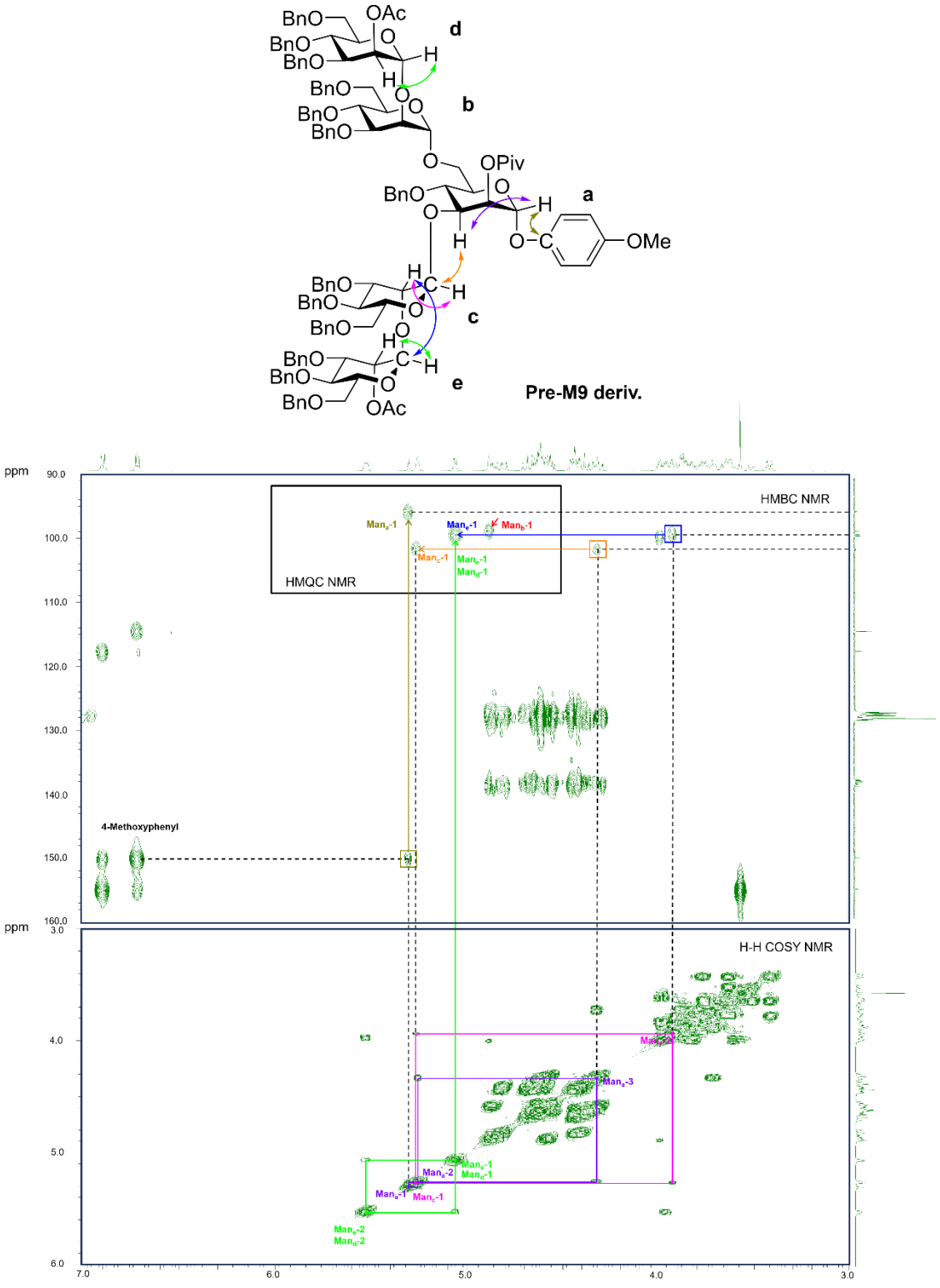


Figure 5. 化合物1の糖残基のアノマー位の同定

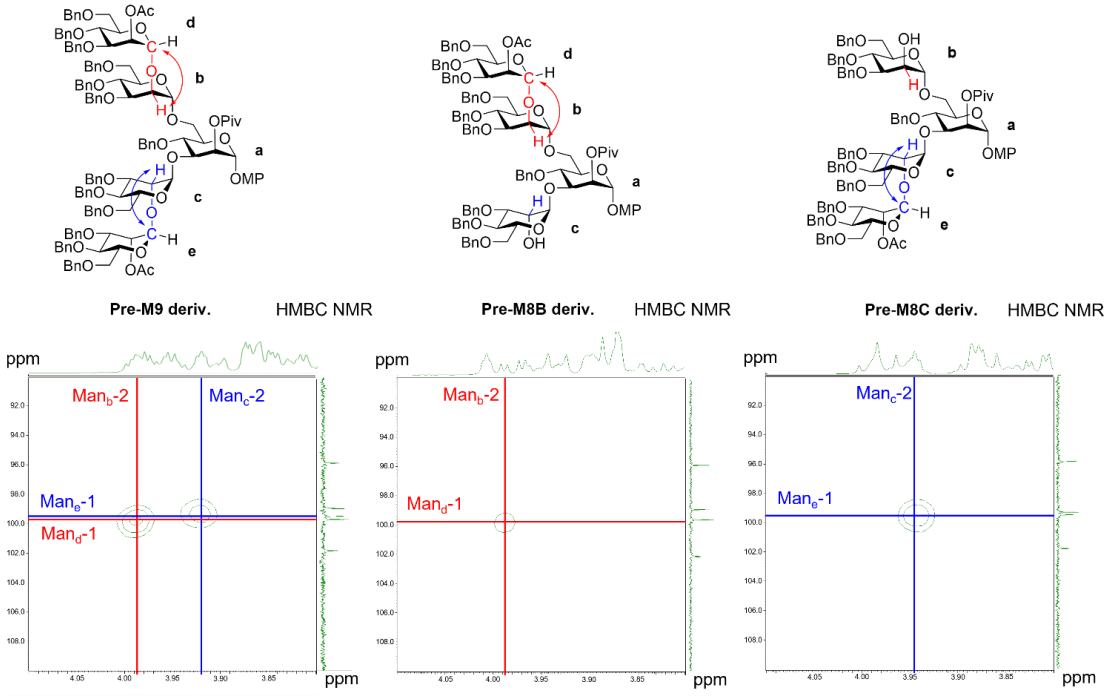
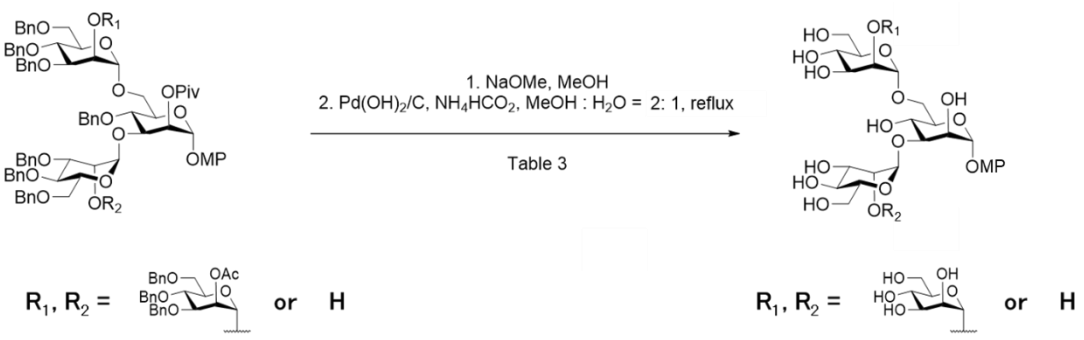


Figure 6. 化合物 **2**, **3** の分岐異性体の同定

第 5 節　合成分岐鎖の脱保護

部分的グリコシル化で合成されたマンノース分岐鎖は、脱アシル化、脱ベンジル化を経て脱保護された (**Table 3**)。脱ベンジル化工程では、水酸化パラジウムを触媒、ギ酸アンモニウムを水素源として用い、ブロックヒーターによる加熱条件下で還元した。その結果、**Pre-M9**、**Pre-M8B**、**Pre-M8C**、および **Pre-M7** をそれぞれ 87%、91%、87%、82% という良好な収率で得た。

Table 3. 合成マンノース分岐鎖の脱保護



Entry	Structure	Yield
1	**Pre-M9** (R_1, R_2 = αMan)	87%
2	**Pre-M8B** (R_1 = αMan, R_2 = H)	91%
3	**Pre-M8C** (R_1 = H, R_2 = αMan)	87%
4	**Pre-M7** (R_1, R_2 = H)	82%

第 6 節　考察と小括

本章では、多様な高マンノース型分岐糖鎖の簡便なワンポット合成法として、2 分岐鎖伸長に対する部分的グリコシル化法を開発した。併せて、反応系内に生成する各分岐糖鎖の一段階単離精製法、および分岐異性体間を区別可能な構造決定法を確立した。本章で開発した部分的グリコシル化法には、既存の糖鎖入手法とは異なる 2 つの利点がある。

第一に、グリコシル化の進行度に伴う反応追跡と精製容易性がある。本手法では、糖鎖伸長に伴い、未反応のヒドロキシ基数が減少するため、生成物の極性が段階的に低下する。この性質により、中圧分取液体クロマトグラフィーでの糖残基数の異なる目的物同士の効率的な分離精製が可能となった。この知見は、3 分岐鎖以上のより複雑な糖鎖合成系に応用した場合にも、グリコシル化度合いに応じたヒドロキシ基数の違いから、分離・単離を可能にすると期待される。

第二に、同一糖残基数を有する一連の分岐異性体を、単一の反応および精製操作で同時に入手可能とした点である。本手法の確立により、必要となる受容体・供与体数が減少する結果、分岐異性体群合成のグリコシル化までの総工程数は 24 工程から 12 工程へと短縮され、既存の手法と比較して大幅な効率化を達成した[20]。また、単離した各分岐異性体に対して、2D-NMR 解析を駆使することで、保護体の構造決定に成功した。構造決定された分岐鎖は、そのまま大型糖鎖合成のビルディングブロックとして次工程へ供することが可能である。

以上の利点に鑑み、部分的グリコシル化法を基盤とする多分岐鎖伸長戦略は、様々な糖鎖認識タンパク質の機能解析や性状評価に資する、多様な分岐パターンを持つ糖鎖ライブラリーの簡便かつ強力な入手法であると結論づける。

第 2 章　高マンノース型糖鎖のレクチン相互作用における分岐鎖特異性の解析

第 1 節　はじめに

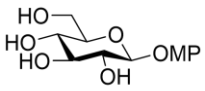
Galanthus nivalis レクチン (GNL) は、α-Man 構造を特異的に認識する植物レクチンであり、SARS-CoV-2 への抗ウイルス作用も期待される[62]。GNL は、1 サブユニットあたり 3 つの糖認識ドメイン (CRD1、CRD2、CRD3) を有する[50]。CRD1 と CRD2 は末端 αMan と中程度の親和性で結合するポケットを有するのに対し、CRD3 はマンノシル分岐鎖と特異的に相互作用する高親和性な結合ポケットを有する。GNL は、$Man_9GlcNAc_2$ よりも、末端の α(1→2) が欠落した $Man_5GlcNAc_2$ に対して高い親和性を示すことが知られており[63]、 **Pre-M7** 型のトリマノシドには $3.0 \times 10^3\ M^{-1}$ の結合定数を示すことが報告された[64]。しかし、GNL のマンノース分岐鎖に対する特異性は完全には解明されていない。そこで本章では、前章で合成した 4 種類のマンノース分岐鎖を用い、$Man_5GlcNAc_2$ の部分構造である **Pre-M7** との比較を通じて、GNL の分岐鎖特異性を明らかにすることを目的とした。その際、複数のポケットへの結合による安定化の相加効果を評価可能な、タンパク質サーマルシフトアッセイ (TSA) を採用した。

第 2 節　GNL の分岐鎖特異性解析（タンパク質サーマルシフトアッセイ）

TSA は、熱変性によって露出した疎水性タンパク質表面に集積する蛍光色素を使用し、昇温に伴う蛍光強度変化から算出した熱変性温度 (Td) が、リガンドの有無および種類の違いによって変動する現象を利用し、リガンド結合親和性によるタンパク質安定化を評価する手法である [65]。本手法では、リガンドが異なる結合ポケットに同時に作用することで、それぞれの結合エネルギーが相加的に寄与し、タンパク質の熱安定性を相加的に高める現象を捉えることができる。具体的には、単一のポケットへの結合能を向上させるよりも、複数の独立したポケットを同時に占有する方が、熱変性温度の大幅な上昇、安定化効果が期待できる。本研究では、この ΔTd の変化を指標として、合成した各分岐糖鎖が GNL の複数の CRD に対してどのように相互作用するかを精査した。アッセイ溶液 (15.0 μL) は、HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) 、GNL (10 μM) 、分岐糖鎖 (3.0 mM) 、$CaCl_2$ (0.10 mM) から調製した。アッセイ溶液を、37°C で 1 時間インキュベートし、室温下で SYPRO Orange (60 mM) を添加した。反応液を 10 秒毎に 0.2°C 加熱し、25°C から 100°C までの SYPRO Orange の蛍光強度 (Ex/Em. 470/570 nm) を Bio-Rad 社の CFX96 リアルタイム PCR システム内の CFX Manager ソフトウェアを使用してモニタリングし、GNL に関する熱変性曲線を取得した。次にこの変性曲線の微分をとることで、変化率に関する情報を抽出した熱変性ピークへと変換し、そのピーク極小点を基に熱変性温度を算出した。

まず、リガンドとして Glcβ-MP を使用し、マンノース分岐鎖のアグリコンであるメトキシフェニル基の影響を評価した TSA を行った (**Table 3**)。その結果、アグリコンのメトキシフェニル基は、TSA に大きな影響を与えないことが分かった。

Table 3 GNL の熱シフトアッセイにおけるアグリコンの影響度の検討 (n=3)



Glcβ-MP

	Glcβ-MP	**No Ligand**
Td (˚C)	83.8 ± 0.16	83.7 ± 0.2
ΔTd (˚C)	+0.1	0

次に、合成した各マンノース分岐鎖をリガンドとした TSA を実施した (**Figure 7**)。TSA は、n = 3 で行い、エラーバーには標準偏差 (SD) を用いた。その結果、非還元末端側に α(1→3)Man と α(1→6)Man の両方を露出した **Pre-M7** が最も大きな熱安定化効果を示した (ΔTd = +3.0°C)。これは、α(1→3)Man と α(1→6)Man の両末端マンノース残基が、GNL の CRD3 内にある複数のサブポケットに対して同時に、かつ相加的に相互作用する多点結合モードで強固に結合していることを示唆している [66]。一方、α(1→2)Man で覆われた **Pre-M9** は低い安定化効果 (ΔTd = +1.2°C)に留まった。これは、CRD3 の高親和性ポケットへのアクセスが阻害され、CRD1 または CRD2 の単一のポケットに対して中程度の親和性で結合していることが示唆された。分岐異性体である **Pre-M8B** と **Pre-M8C** については、**Pre-M8C** が **Pre-M9** と同様の低い値 (ΔTd = +1.1°C) を示したのに対し、**Pre-M8B** は有意に高い中程度の安定化効果(ΔTd = +2.0°C)を示した。この ΔTd 値の差は、結合エネルギーの相加性の観点から、次のように考察できる。**Pre-M8C** は、α(1→3)Man が露出されていないため、CRD1/2 への単点結合に限定され、**Pre-M9** と同等の低い安定化に寄与した。これに対し、**Pre-M8B** は、CRD3 の高親和性結合ポケットの一部を占有可能である。ただし、**Pre-M7** のような完全な多点結合には至らないものの、CRD1 および CRD2 への主結合に加え、CRD3 の単一ポケットに対しても弱い相互作用(結合エネルギーの足し合わせ)が生じた結果、Pre-M8C を上回る熱安定化が発揮されたと推察される。

このように、本研究により、これまで未解明であった GNL に対する **Pre-M8B** と **Pre-M8C** の親和性の明確な違いが初めて明らかとなった。

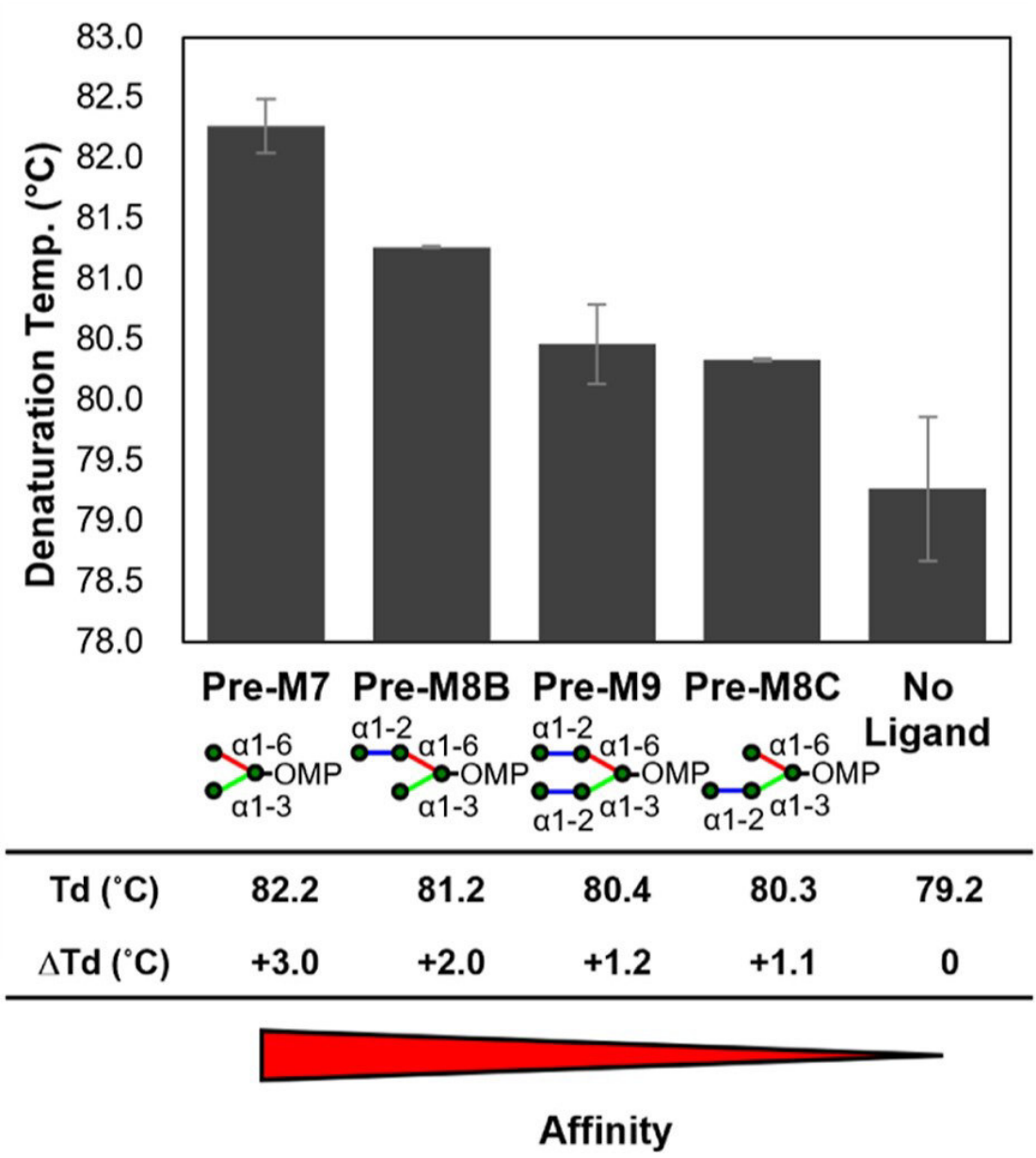


Figure 7. GNL とマンノース分岐鎖のタンパク質サーマルシフトアッセイ。データは独立した 3 回の試行の結果であり、エラーバーは標準偏差(SD)を表す。

第 3 節　考察と小括

本章では、TSA による相加性に焦点した多点結合解析手法の上で、GNL における新たな分岐構造認識能の発見を達成した。TSA は、単なる結合の有無を超えて、複雑な多分岐糖鎖がタンパク質表面の複数のポケットを同時に占有する多点結合モードを相加的に解析できる有効なツールである。本章では複数の糖認識ドメインを持つ GNL に対し、部分グリコシル化法によって合成した 4 種類のオリゴマンノース分岐鎖を用いたサーマルシフトアッセイを実施した。その結果、GNL が $Man_5GlcNAc_2$ などの低糖残基数を持つ分岐異性体 **Pre-M8B** と **Pre-M8C** においても、**Pre-M8B** が **Pre-M8C** より明確に高い親和性で認識されることを初めて明らかにした。GNL が高い親和性を示した **Pre-M7** および **Pre-M8B** の構造的共通点に鑑みると、GNL はウイルス上の高マンノース型糖鎖を単に糖残基数に応じて認識するのではなく、B-アーム、もしくは B-, C-アームの両方が切断された糖鎖群を異なる特異性として認識しているものと推測される。B-アームが切断された高マンノース型糖鎖は、CHIV, HCMV, EBOV, IV, HSV, HIV, LASV, MERS-CoV, SARS-CoV, SARS-CoV-2, ZIV など、広範なエンベロープウイルスにおいて共通して発現することが報告されている [35]。 したがって、本研究で得られた知見は、GNL が多様なウイルスに対して広範な抗ウイルス作用を発揮するメカニズムの裏付けとなるものである。

第 3 章　高マンノース型糖鎖の折り畳み配座の解析

第 1 節　合成計画

高マンノ-ス型糖鎖の分岐鎖の折り畳み配座は、*N*-Ac 基による安定化が示唆されているが、これを直接的に実証した例は未だ存在しない。そこで、本章では、コア構造に *N*-Ac 基を有さない非天然高マンノース型糖鎖を設計・合成し、その立体配座を天然型の高マンノース型糖鎖と比較し、*N*-Ac 基による折り畳み配座安定化の効果を実証することを目的とした。配座解析のターゲットとしては、計算化学上において折り畳み配座を取り得ることが示唆される最小ユニットの **Man$_3$GlcNAc$_2$** 、およびその比較対象として *N*-Ac 基をヒドロキシ基に置換した **Man$_3$Glc$_2$** を選定した (**Figure 8**)。なお、**Man$_3$GlcNAc$_2$** および **Man$_3$Glc$_2$** の合成には、共通した出発物質・糖供与体を用い、合成工程の効率化および短縮を図った (**Scheme 5**)。**Man$_3$GlcNAc$_2$** および **Man$_3$Glc$_2$** 上の 2 つの末端マンノースのグリコシル化は、前述の F を脱離基とした供与体 **5** および SMe を脱離基とした供与体 **38** を共通して用いることで達成可能と考えた。また、3 糖のコア構造 **39**, **41** におけるβ-マンノシドの合成は、供与体 **38** と同じ出発物質 **31** から合成した供与体 **35** を用いたグリコシル化によって合成できるものと考えた。また、天然型の 2 糖のコア構造は、受容体 **18** および出発物質 **16** から合成した供与体 **17** によるグリコシル化により得られるものと想定した。さらに、非天然型の 2 糖のコア構造は、出発物質 **26** から合成した受容体 **21** と、出発物質 **27** から合成した供与体 **28** のグリコシル化により得られるものと考えた。

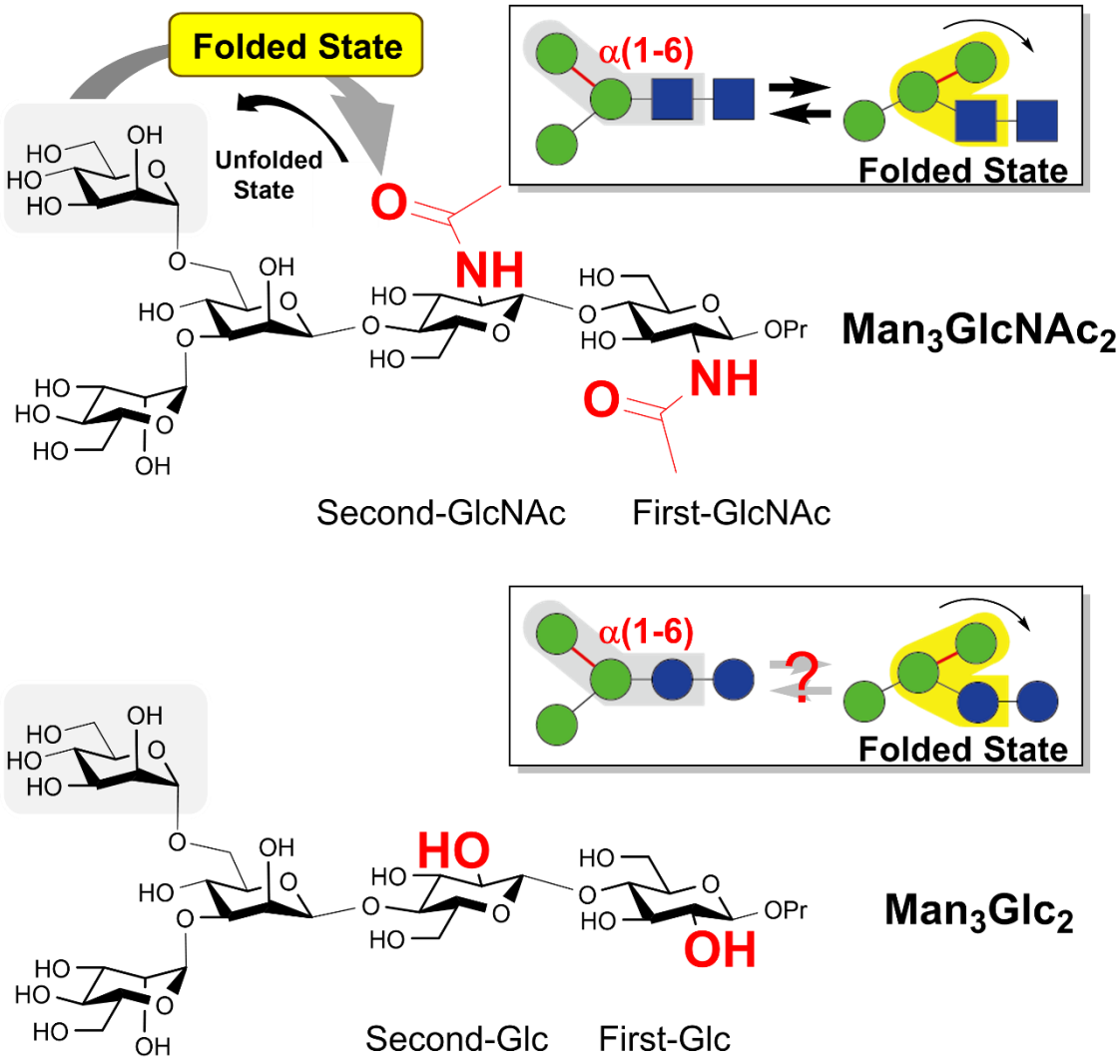
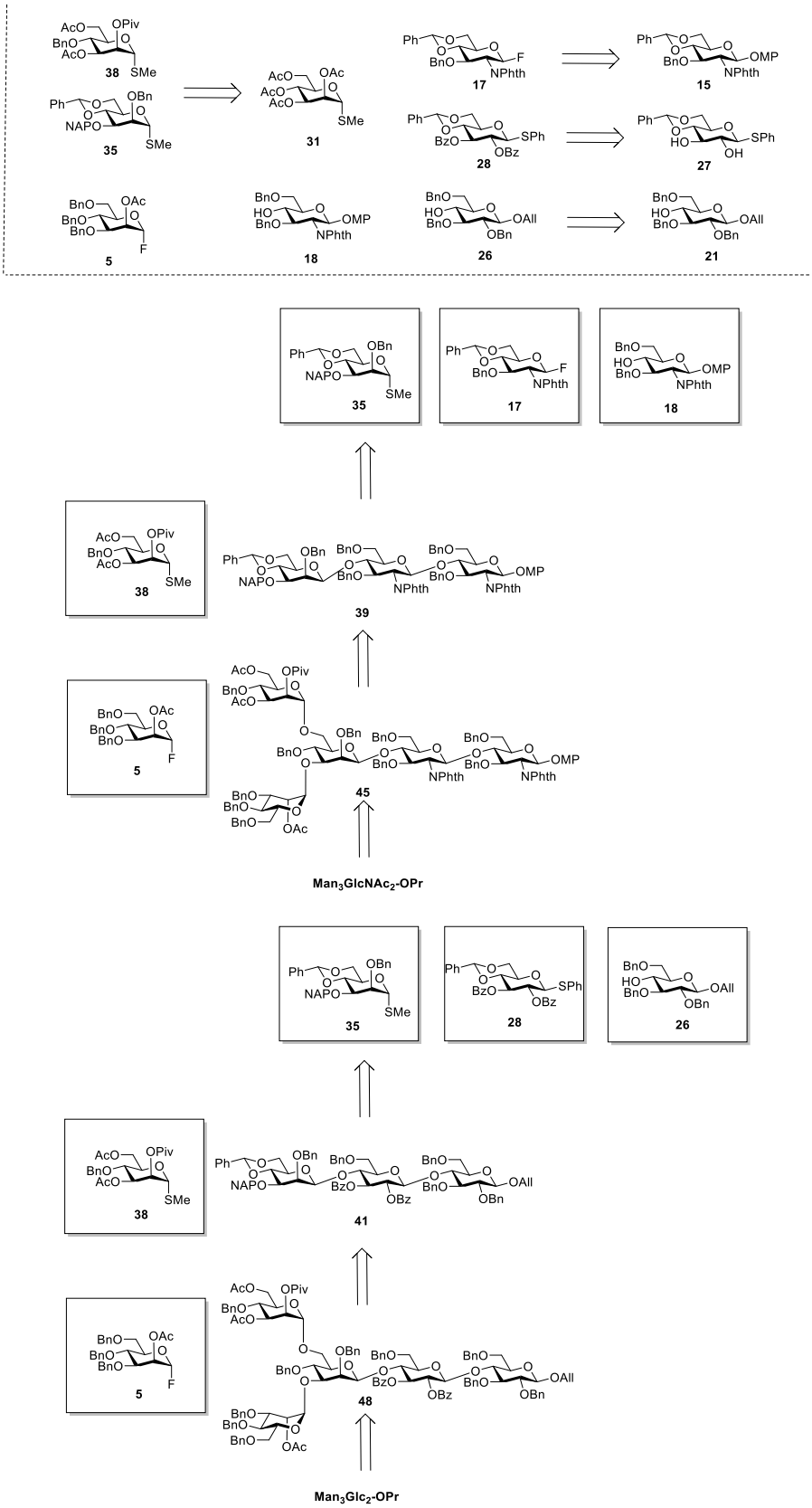


Figure 8. 標的化合物と想定される折り畳み配座

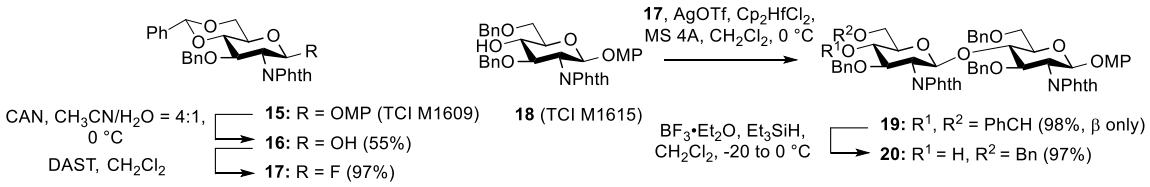


Scheme 5. **$Man_3GlcNAc_2$** および **Man_3Glc_2** の逆合成経路

第 2 節　$GlcNAc_2$ の合成

化合物 **15** (TCI M1609) に対し、CAN を用いた酸化的な脱保護を行い、 MP 基を除去した化合物 **16** を合成した (**Scheme 6**)。次いで、DAST を用いたアノマー位のフッ素化を行った。その際、2 位のフタルイミド基の隣接基関与を利用することで β 選択的に反応を進行させ、単糖供与体 **17** を合成した。なお、アノマープロトンの *J* 値は 8.0 Hz であり、カープラス曲線に基づき、1 位と 2 位プロトン間の 2 面角を推定し、立体化学を決定した。

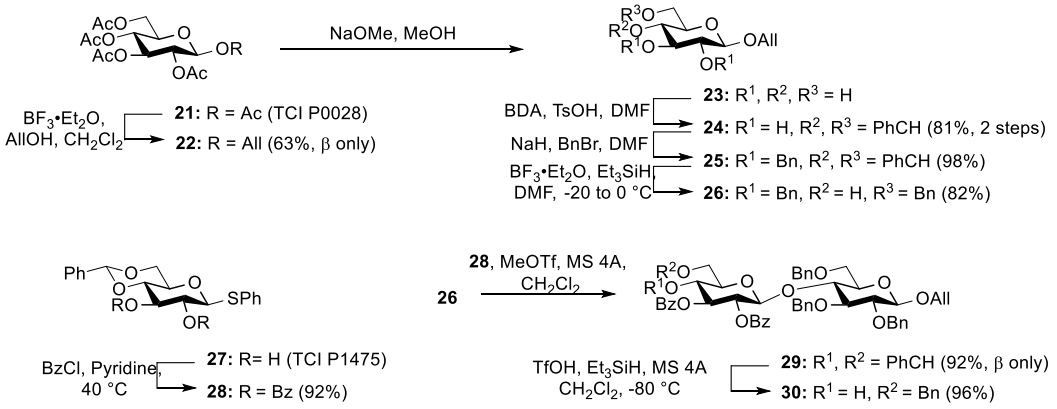
次いで、単糖受容体 **18** (TCI M1615) に対し、AgOTf, Cp_2HfCl_2 をプロモーターとしたグリコシル化を行った。本反応では、フッ素化工程と同様に、2 位のフタルイミド基の隣接基関与を利用することで、β 選択的に天然コア構造の 2 糖骨格を有する化合物 **19** を合成した。新たに構築されたグリコシド結合のアノマープロトンの *J* 値は 8.6 Hz であり、カープラス曲線に基づき目的の β 体であると決定した。本反応において、糖供与体は Superarmed 型であるためフッ素の脱離能が高く、短時間で高収率な合成を実現した。続いて、ルイス酸として $BF_3{\cdot}Et_2O$、還元剤として Et_3SiH を用いてベンジリデン環の 4 位選択的な開裂を行い、化合物 **20** を得た。これは、低温条件下でルイス酸を反応させた結果、酸素原子の電子密度がより高い 4 位側へルイス酸が優先的に配位し、位置選択的な開裂が進行したものと考えられる。



Scheme 6. $GlcNAc_2$ 受容体 **20** の合成

第 3 節　Glc_2 の合成

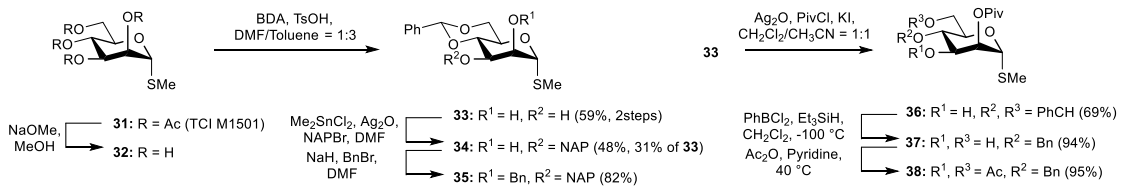
化合物 **21** (TCI P0028) から $BF_3{\cdot}Et_2O$ と AllOH によって All 基に変換した化合物 **22** を合成した (**Scheme 7**)。アノマープロトンの *J* 値は 8.0 Hz であり、カープラス曲線に基づき β 体であると決定した。次いで、化合物 **22** の 2,3,4,6 位の Ac 基を求核剤 NaOMe によって除去し、続いて酸触媒存在下でベンズアルデヒドジメチルアセタールを用いた 4,6 位のベンジリデン化を行い、化合物 **24** を 2 工程収率 81% にて得た。なお、本反応は平衡反応であり、系内の TsOH が生成物 **24** からの逆反応を誘導するため、触媒量を最小限に留めて行った。その後、NaH で活性化したのちに BnBr を用いた 2,3 位のベンジル化を行い、化合物 **25** を得た。さらに、ルイス酸として $BF_3{\cdot}Et_2O$ を用いた条件下で 4 位選択的なベンジリデン環の開裂を行い、糖受容体 **26** を収率 92% で得た。糖供与体に関しては、化合物 **27** (TCI P1475) に対して 2,3 位のベンゾイル化を行い、糖供与体 **28** を 92%の収率で得た。糖受容体 **26** と糖供与体 **28** のグリコシル化では、MeOTf をプロモーターとし、非天然コア構造の 2 糖骨格を有する化合物 **29** を完全な β 選択的かつ 92% の高収率で得た。アノマープロトンの *J* 値は 8.6 Hz であり、カープラス曲線より立体化学を決定した。続いて、-80°C 条件下で TfOH をルイス酸としたベンジリデン環の 4 位選択的な開裂により、All 基への副反応を抑制し、化合物 **30** を得た。



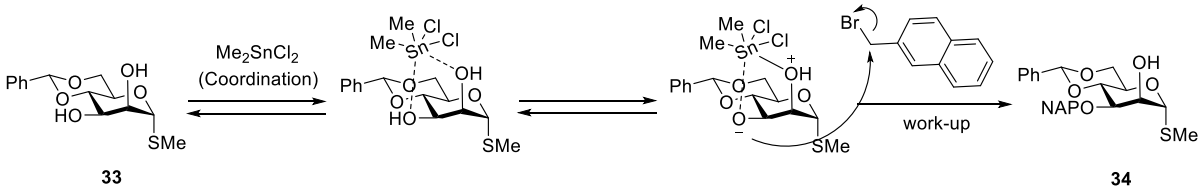
Scheme 7. Glc_2 受容体 **30** の合成

第 4 節　SMe を脱離基とするマンノース供与体の合成

市販の化合物 **31** (TCI M1501) を出発物質とし、NaOMe による脱 Ac 化により化合物 **32** とした (**Scheme 8**)。その後、TsOH と BDA を用い、化合物 **32** の 4,6 位選択的にベンジリデン化を行い、化合物 **33** を合成した。本反応では、進行に伴い生成する MeOH が、化合物のベンジリデン環に求核攻撃し、逆反応によって反応進行を阻害するため、エバポレーターによる減圧条件下で MeOH の除去を試みた。しかし、その際のわずかな昇温により、2, 3 位にも反応が進行したジベンジリデン体も副生した。また、減圧条件下においても一定時間経過後には反応が進行しなくなり、試薬を追加でも改善しなかった。これは、溶液内での基質・生成物間のベンジリデン環同士の π-π スタッキング相互作用により、分子集合体の粒径が拡大したことが原因と推測される。この結果として、凝集状態による立体障害が試薬の接近を阻害し、反応が停止したと推測される。この知見に基づき、溶媒量を増加させて基質濃度を低下させることで収率の改善が可能であると推察した。続いて、3 位選択的な NAP 化を行い、化合物 **34** を得た [67]。本反応では、Ag_2O によって NAPBr が活性化されるとともに、系内で生ずるスタニレンアセタールの中間体において、エクアトリアル側の 3 位の酸素原子が NAPBr と反応し、3 位選択的な導入が達成されたと考えられる (**Scheme 9**)。その際、2 位が NAP 化された生成物はほとんど観測されなかった。しかし、本反応においても試薬の添加に関わらず、途中で進行が停止した。これは、Sn とシスジオール間の環生成の平衡反応が関与しており、反応の進行に伴い系内の酸性度が上昇したことで、自発的に環が開裂したためと予想する。一方、本条件は選択性が高いために副生成物がほとんど見られないため、原料回収を含めたマスバランスは良好であり、基質濃度の向上によりさらなる収率を改善可能であると考えた。その後、2 位の Bn 化を行い、次工程のグリコシル化に用いる単糖供与体 **35** を得た。



Scheme 8. SMe を脱離基に有する糖供与体 **35**, **38** の合成



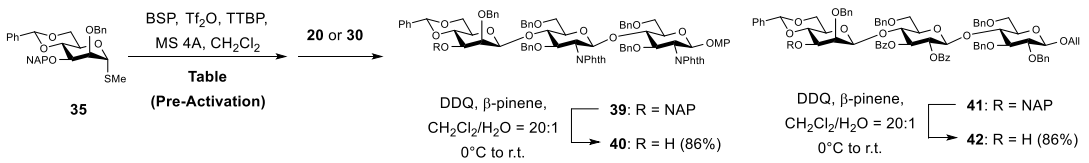
Scheme 9. ナフチルメチル基の位置選択的保護にて予想される反応機構

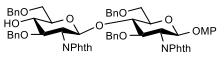
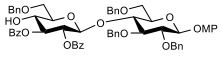
合成した化合物 **33** に対し、Ag_2O によってヒドロキシ基を活性化した後、Piv 化を行うことで 2 位選択的に保護された化合物 **36** を 69% の収率で得た。マンノースの Piv 化において、ピリジン溶媒下や DMAP による触媒下では、エクアトリアル側の 3 位が優先的に保護される [68]。これに対し、本反応条件は、本来反応性の高いアシル基を 2 位選択的に導入するために用いられる反応例である。次いで、前述の 6 位選択的なベンジリデン環の開裂と同様の方法で化合物 **37** を合成し、続けて Ac_2O および溶媒兼塩基であるピリジンを用いた Ac 化により、単糖供与体 **38** を得た。なお、ベンジリデン環の 6 位選択的な開裂については、化合物 **38** の ^{1}H NMR において、Ac 基の導入に伴い H-6 のシグナルが低磁場側へシフトしたことから 6 位が遊離のヒドロキシ基であると判断した。

第 5 節　*cis*-グリコシル化による $ManGlcNAc_2$ と $ManGlc_2$ の合成

次に、コア構造となる 3 糖骨格を構築すべく、1,2-*cis*-グリコシル化を検討した(**Table 4**)。本反応では、工程数を最小限に抑えた *cis*-グリコシド合成法として、α トリフレート中間体を経由する手法を採用した [69-71]。具体的には、BSP 触媒によって活性化させた Tf_2O を用いて、SMe 基を有する単糖供与体 **35** をプレアクティベーションし、α-トリフレートを生成させた後、2 糖受容体を加え、β 選択的なグリコシル化を試みた。**Entry 1** および **Entry 2** での -60°C 条件下では、天然型 **39**、非天然型 **41** の各 3 糖骨格を有する化合物はいずれも 5 割程度の収率に留まり、立体選択性も不十分な結果となった。このことから、-60°C 条件下では、α トリフレート体の生成が不完全であることが示唆された。一方で **Entry 3** で実施された -70°C での糖供与体の活性化では完全な β 選択性が達成され、76%の収率であった。なお、α/β 比は単離した生成物の質量比から算出した。TLC による解析の結果、天然型・非天然型糖鎖のどちらにおいても β 体の方が α 体と比べ、極性が低いことが判明した。また、主生成物の立体化学は、天然型糖鎖では $^1J_{CH}$ = 158.3 Hz、非天然型糖鎖では $^1J_{CH}$ = 155.9 Hz であったことから、目的の β 体として決定した。各 3 糖受容体 **40**, **42** の合成は、化合物 **39**, **41** の 3 位の脱 NAP 化によって行い、いずれも収率 86%で得た。DDQ の分解に伴う青酸の生成によるアノマー位のエピメリ化を抑制するため、嵩高い塩基である β-pinene を 4 当量以上添加して反応させた [72]。

Table 4. *cis*-グリコシル化による $ManGlcNAc_2$ と $ManGlc_2$ 骨格の合成

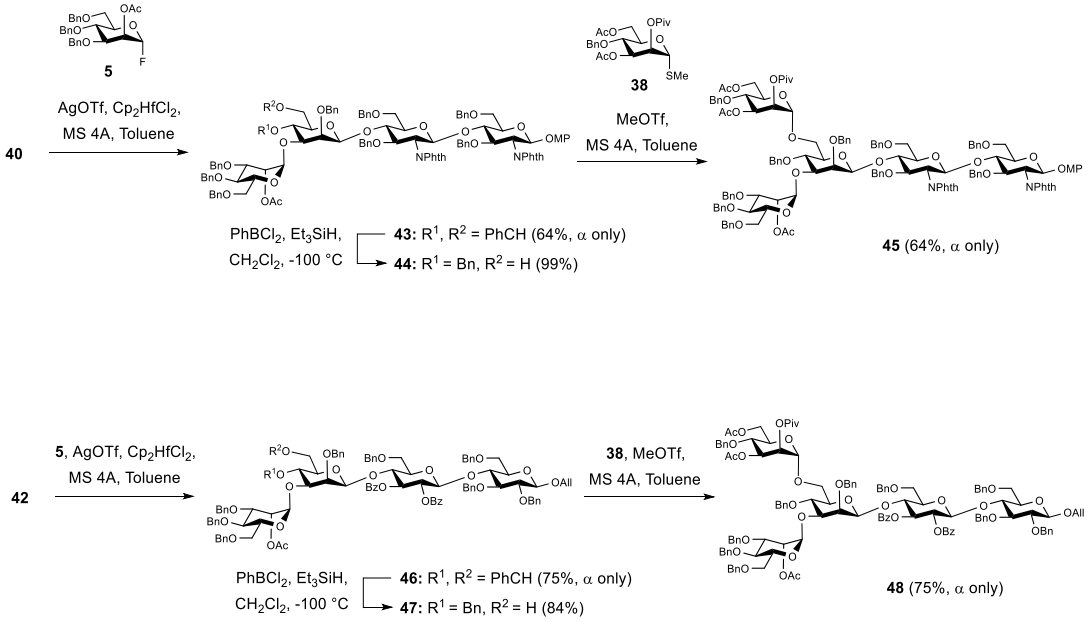


Entry	Acceptor	Temperature of Pre-Activation	Yield	α/β
1	 **20**	-60 °C	51% of **39**	33:67
2	 **30**	-60 °C	50% of **41**	36:64
3	**30**	-70 °C	76% of **41**	β only

第 6 節　$Man_3GlcNAc_2$ と Man_3Glc_2 骨格の合成と脱保護

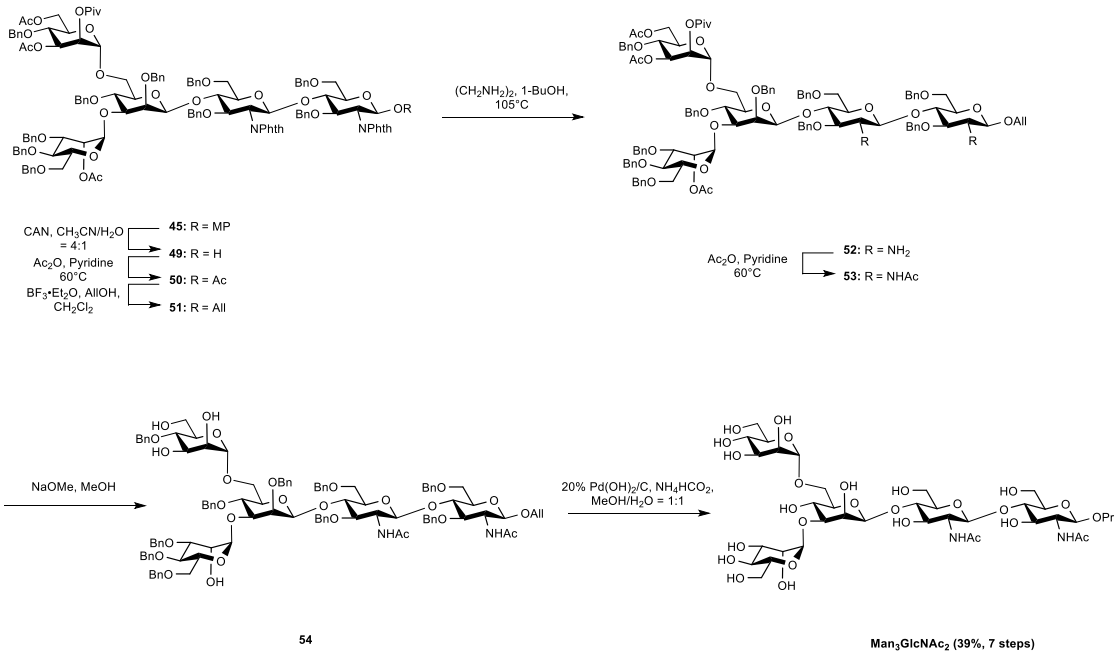
次に各 3 糖受容体 **40, 42** および単糖供与体 **5** を AgOTf-Cp_2HfCl_2 をプロモーターとしたグリコシル化を行い、4 糖骨格を有する化合物 **43, 46** をそれぞれ α 選択的に合成した (**Scheme 10**)。主生成物の立体化学は、天然型糖鎖では $^1J_{CH}$ = 175.2 Hz 、非天然型糖鎖では $^1J_{CH}$ = 176.0 Hz であることから目的の α 体であることを決定した。なお、本反応における受容体の 3 位のヒドロキシ基は、二級アルコールであり、かつ糖鎖伸長に伴う高分子量化の影響もあり、求核性が低いと予想されるため、反応性を確保すべく、一級アルコールの 6 位よりも先に脱保護を行い、グリコシル化を行った。また、更なる反応性向上のため、室温条件下で反応を進行させた。その後、ルイス酸として $PhBCl_2$、還元剤として Et_3SiH を用いた 6 位選択的なベンジリデン環の開裂を行い、各 4 糖受容体 **44, 47** それぞれを合成した。ジクロロメタン溶媒下で $PhBCl_2$ および Et_3SiH を使用すると、系内で生成する PhBHCl によってアノマー位のアリル基がヒドロホウ素化されて還元されてしまうことが報告される [73]。実際に、TLC において、アリル基の副反応に由来すると考えられる低極性スポットが検出された。この副反応の影響により、アノマー位にアリル基を有する非天然型糖鎖の収率は、ア

リル基を持たない天然型糖鎖と比較して収率よりも低い結果となった。続いて、MeOTf よって活性化した単糖供与体 **38** を反応させ、Piv 基の隣接基関与を利用した α 選択的グリコシル化により、各 5 糖骨格を有する化合物 **45** および化合物 **48** を合成した。主生成物の立体化学は、それぞれ $^{1}J_{CH}$ = 174.7 Hz, $^{1}J_{CH}$ = 173.9 Hz であることから α 体であると決定した。

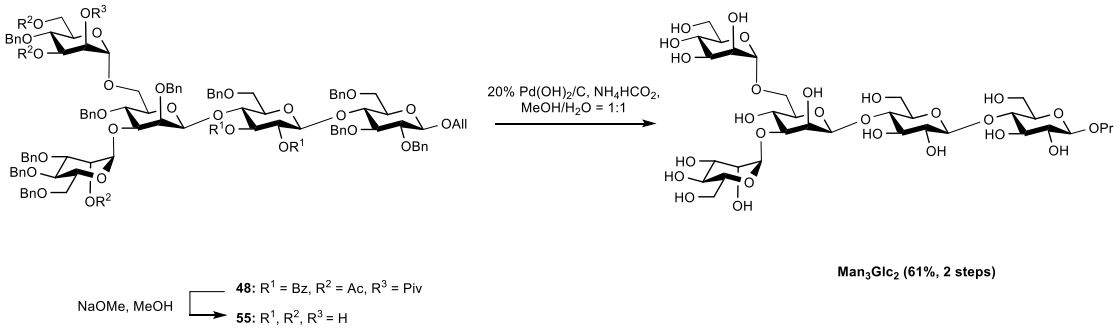


Scheme 10.　グリコシル化による $Man_3GlcNAc_2$ と Man_3Glc_2 骨格の合成

その後、天然型 $Man_3GlcNAc_2$ のアグリコンを、非天然型糖鎖と共通の 1-プロピル基に変換するため、化合物 **45** に対し、MP 基の脱保護、続くアノマー位の Ac 化、および $BF_3{\cdot}Et_2O$ による All 化を行った (**Scheme 11**)。次いで、$GlcNAc_2$ 上の 2 位 *N*-Phth 基を $(CH_2NH_2)_2$ により脱保護し、続く再 Ac 化によって *N*-Ac 基へと変換した。さらに、脱 Ac 化および接触水素還元による脱ベンジル化を経て、7 ステップ収率として 39%で **$Man_3GlcNAc_2$** を得た。この過程でアリル基はプロピル基へと還元された。一方、非天然型糖鎖については、同様の条件下で脱アシル化および脱ベンジル化を行い、目的の **Man_3Glc_2** を 2 工程収率 61%で得た。



Scheme 11. $Man_3GlcNAc_2$ への脱保護



Scheme 12. Man_3Glc_2 への脱保護

第 7 節　NMR NOESY 相関による折り畳み配座の解析

脱保護された **$Man_3GlcNAc_2$** と **Man_3Glc_2** に対し、D_2O 溶媒下での各種 NMR 測定を通じて配座解析を実施した。糖残基における各シグナルの帰属 (**Table 5, 6**) には、^1H NMR スペクトルでのアノマー位の ^1J カップリング定数、2D-NMR (COSY および TOCSY) を相補的に用いた(**Figure 10, 11**)。具体的には、天然型のアノマー位のカップリング定数 (7.1 Hz, 6.7 Hz) と非天然型のアノマー位のカップリング定数 (9.2 Hz, 8.0 Hz) に基づき、いずれの糖残基もβ体であることを確認した。その中で、還元末端側の GlcNAc (4.31 ppm) および Glc (4.08 ppm) のアノマー位については、プロピル基の近接による高磁場シフトの影響を指標として同定した。天然型では、GlcNAc (4.31 ppm) のアノマーシグナルが、Pr 基の $O\underline{CH_2}$ の Carbon と HMBC 相関を有することを確認した (**Figure 12**)。加えて、$^1J_{C\text{-}H}$=160.5Hz を有するアノマー位を β(1→4)Man の H-1 (4.59 ppm) とし、その C-3 (81.4 ppm) と HMBC 相関を持つアノマー位を α(1→3)Man の H-1 (4.91 ppm) として同定した (**Figure 13**)。最後に、残りの分岐鎖α(1→6)Man の H-1 (4.72 ppm) として同定した。次に、各糖残基の帰属を可能な限り行い、アノマープロトンを基準に、COSY 相関から H-2 を、TOCSY 相関から H-3 をそれぞれ同定した。非天然型においては、5.27-5.28 ppm のアノマーシグナルの積分値が 2 プロトン分であり、分岐鎖 α(1→3)Man と α(1→6)Man のシグナルが重複していることが示唆された。そのため、後に続く残基の追跡が困難であるものの、COSY 相関で H-2、TOCSY 相関で H-3 をあくまで候補として選定した。

次に、NOESY スペクトルからノイズとなる COSY 相関を排除するため、COSY および TOCSY スペクトルを重ね合わせて慎重に検証し、真の NOESY 相関を特定した (**Figure 14, 15**)。**$Man_3GlcNAc_2$** の NOESY 分析では、*N*-Ac 基のメチルとの NOE 相関は観察されず、*N*-Ac 基との NOE 相関の観測には、糖分岐鎖の伸長が必要であることを示唆した。これは、**$Man_3GlcNAc_2$** においては、相互作用の対象となる

マンノース分岐鎖の長さが十分ではなく、*N*-Ac 基上の Me プロトンとの距離が NOE を観測できる範囲にまで近接していないためと考えられる。実際、$Man_9GlcNAc_2$ においては、α(1→2) 結合により伸長された分岐鎖と Me 基との相互作用が報告されている[5,6]。このことから、**$Man_3GlcNAc_2$** よりも更にマンノース残基が伸長されることで、*N*-Ac 基上の Me 近傍に配向するものと推測される。一方、還元末端から 2 番目の GlcNAc の H-2 (3.58 ppm) が α(1→6)Man の H-2 (3.79 ppm) と相関することが明らかとなった (**Figure 16a**)。これらの NOE 信号は、**$Man_3GlcNAc_2$** の折り畳み状態を示す初の実験的証拠である。対照的に、**Man_3Glc_2** の場合、α(1→6)Man と α(1→3)Man のアノマー位のシグナルが重複するが、残基のいずれかの H-3 が相関を示すことが示唆された。すなわち、還元末端から 2 番目の GlcNAc の H-2 (3.32 ppm) が α(1→3)Man もしくは α(1→6)Man の H-3 (3.52 ppm) との相関を示した。また、その他の NOE 相関として、β(1→4)GlcNAc の H-1 (4.41 ppm) と β(OPr)GlcNAc の H-3 (3.45 ppm) との相関、α(1→3)Man の H-1(4.91 ppm) と β(1→4)Man の H-3 (3.58 ppm)、α(1→3)Man の H-2 (3.88 ppm) と β(1→4)Man の H-2 (4.07 ppm) の相関が確認された。

Proton 及び NOE 相関に基づく立体配座について考察した結果、天然型 **$Man_3GlcNAc_2$** は、α(1→6)Man がコア構造と近接する内向きの折り畳み配座へと指向するのに対し、*N*-Ac 基を欠く非天然型 **Man_3Glc_2** では、コア構造から離れてより開けた空間へと外向きに配座の指向性が変化している可能性が明らかとなった (**Figure 16b**)。この配座の差異が生じる要因として、*N*-Ac 基の分子内水素結合ネットワークの形成により、コア $GlcNAc_2$ の回転自由度を制限し、糖鎖全体が特定の折り畳み配座を形成しやすいためと考えられる。一方で、非天然型 **Man_3Glc_2** においても α(1→6)Man の H-3 と Glc の H-2 間に相関がある可能性が示唆されたことから、*N*-Ac 基を欠く場合でも配座の指向性を変化させながらも緩やかな折り畳み状

態自体は維持される可能性が実験的に示唆された。さらに、天然型と比較し、マンノースのアノマー位のピークの分裂にも変化が観察され、配座の変化が示唆された。先行研究の報告では、分子内の微弱な水素結合ネットワークがこの配座の維持に寄与するとされているが [7]、本研究により *N*-Ac 基が 5 糖骨格全体の配座決定に重要な役割を担っており、少なくとも間接的に折り畳み配座の安定化に寄与する可能性があることを NMR によって初めて実証した。

Table 5. $Man_3GlcNAc_2$ の主要なプロトンの化学シフト (Fig. 10 より同定).

Position of Glycan	Proton	Chemical Shift (ppm)
GlcNAc-β(1→4)-GlcNAc	H-1	4.34
GlcNAc-β(1→4)-GlcNAc	H-2	3.52
GlcNAc-β(1→4)-GlcNAc	H-3	3.45
GlcNAc-β(1→4)-GlcNAc	H-1	4.43
GlcNAc-β(1→4)-GlcNAc	H-2	3.61
GlcNAc-β(1→4)-GlcNAc	H-3	3.55
Man-α(1→6)-Man	H-1	4.73
Man-α(1→6)-Man	H-2	3.79
Man-α(1→6)-Man	H-3	3.70

Table 6. Man_3Glc_2 の主要なプロトンの化学シフト (Fig. 11 より同定).

Position of Glycan	Proton	Chemical Shift (ppm)
Glc-β(1→4)-Glc	H-1	4.08
Glc-β(1→4)-Glc	H-2	3.91
Glc-β(1→4)-Glc	H-3	3.74
Glc-β(1→4)-Glc	H-1	4.50
Glc-β(1→4)-Glc	H-2	3.09
Glc-β(1→4)-Glc	H-3	3.32
Man-α(1→6)-Man	H-1	5.28
Man-α(1→6)-Man	H-2	3.43 or 3.40
Man-α(1→6)-Man	H-3	3.64 or 3.52

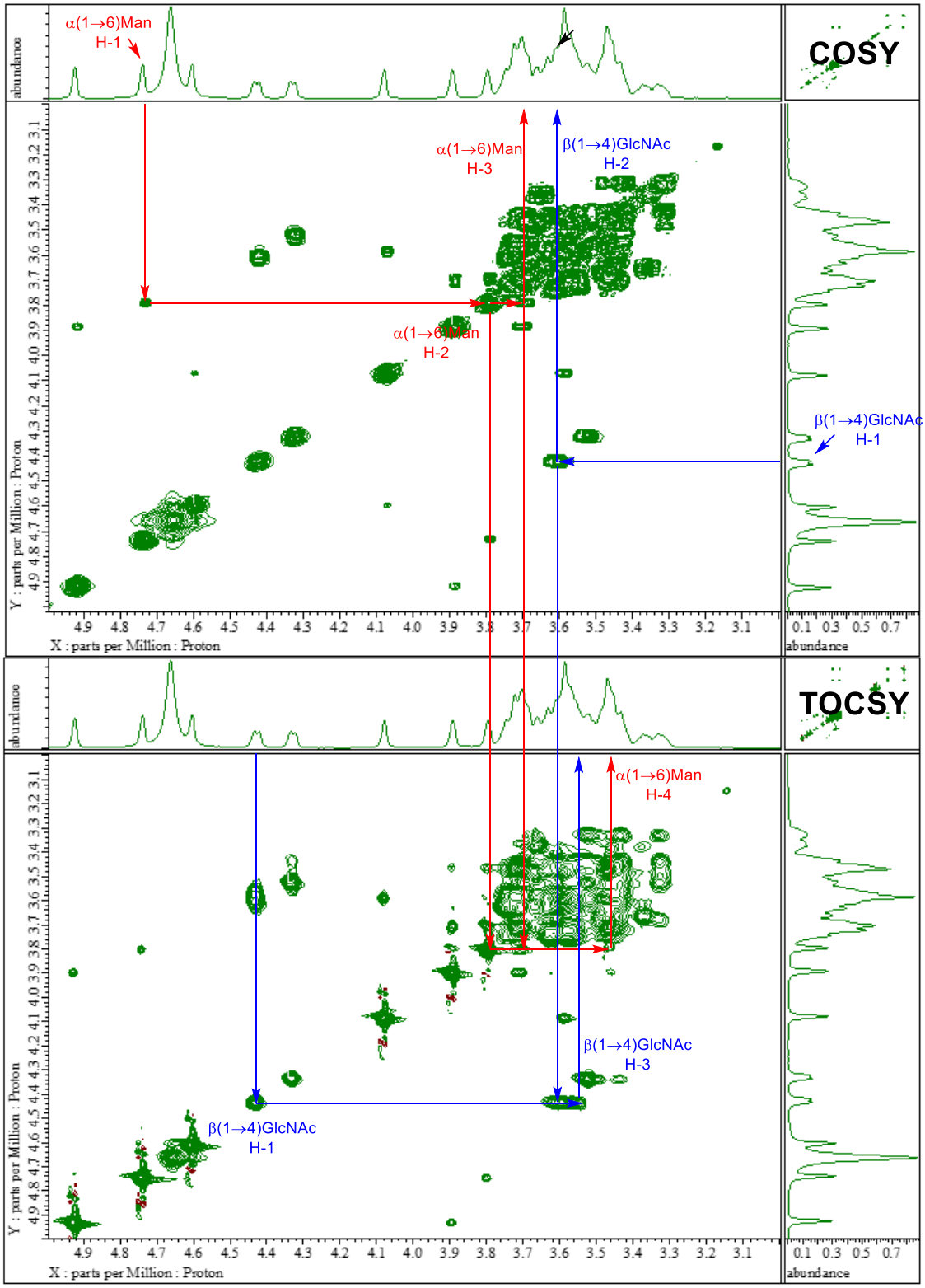


Figure 10. COSY (上) と TOCSY (下) による **$Man_3GlcNAc_2$** の糖残基の割り当て

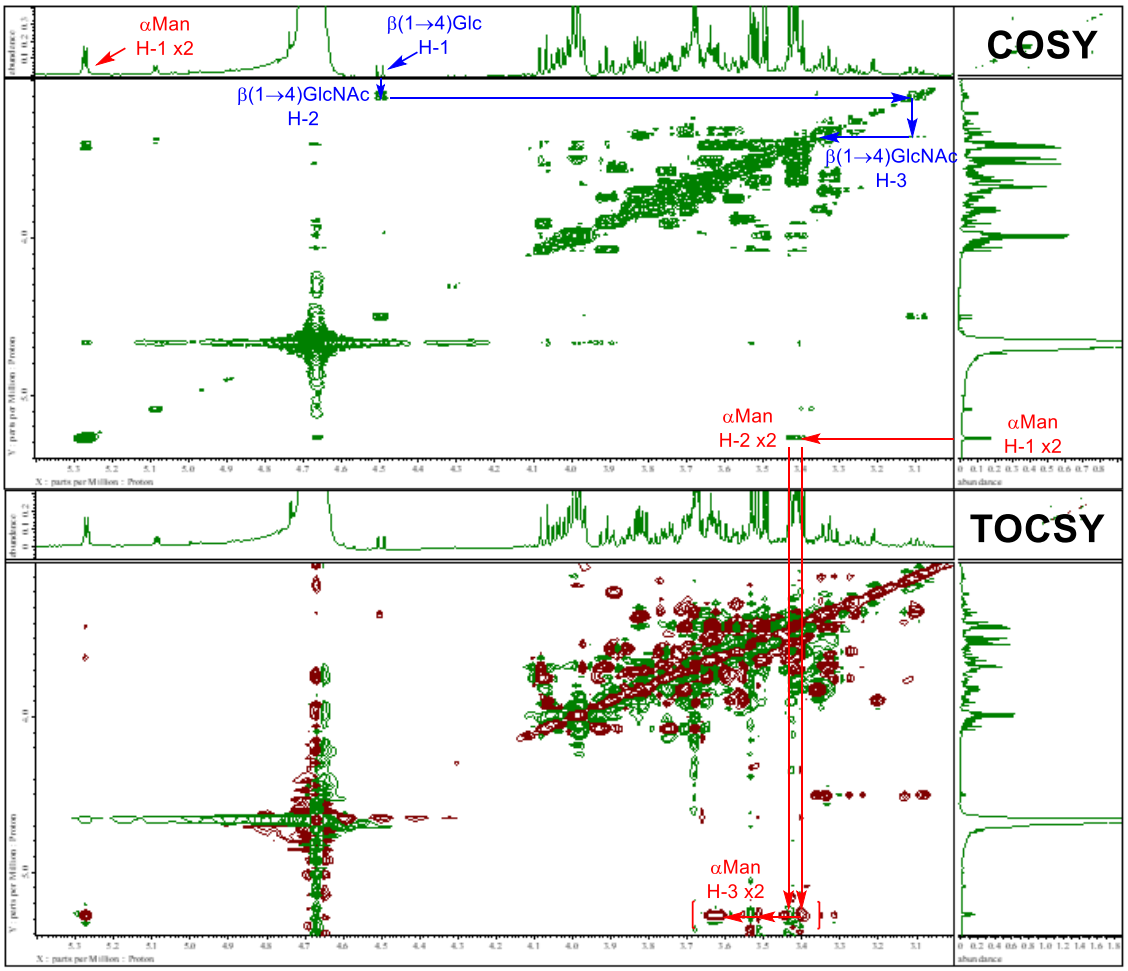


Figure 11. COSY (上) と TOCSY (下) による **Man_3Glc_2** の糖残基の割り当て

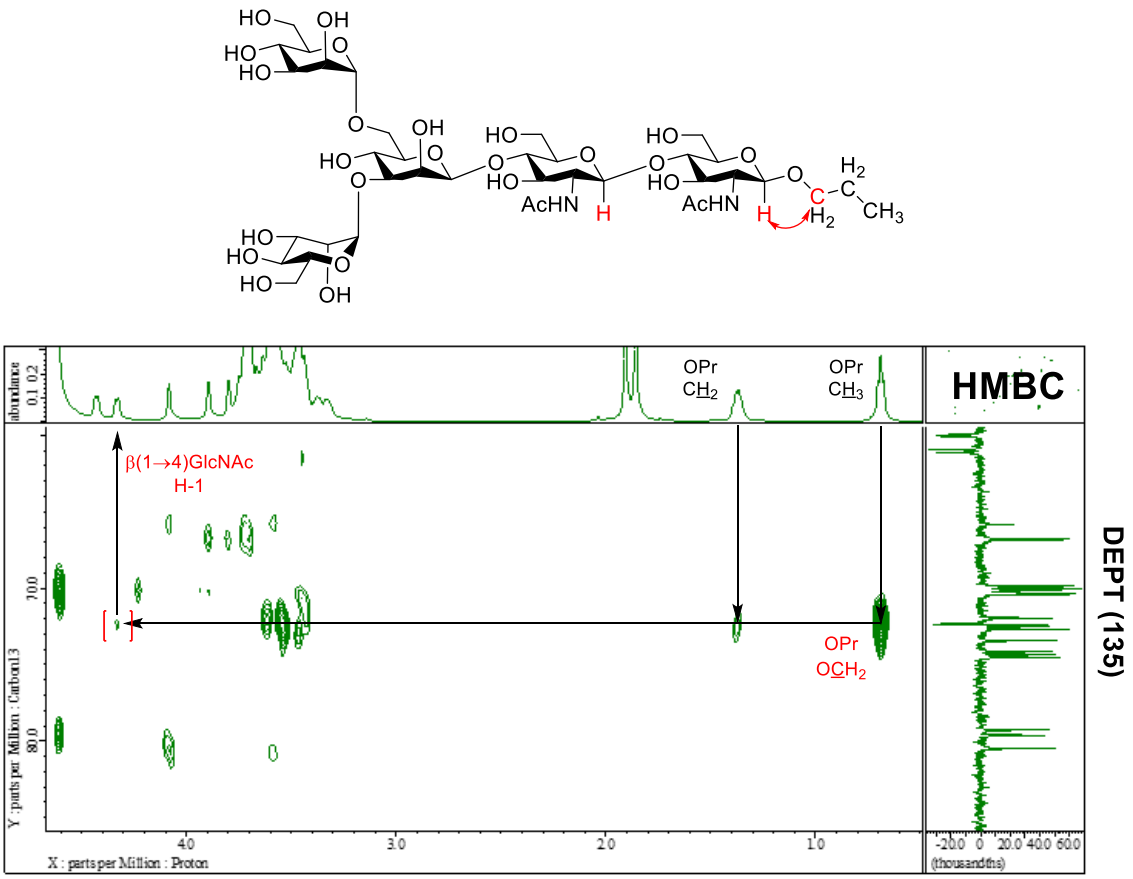


Figure 12. HMBC(Proton/DEPT) による **Man$_3$GlcNAc$_2$** 上の β(OPr)GlcNAc のアノマー位のプロトンの割り当て

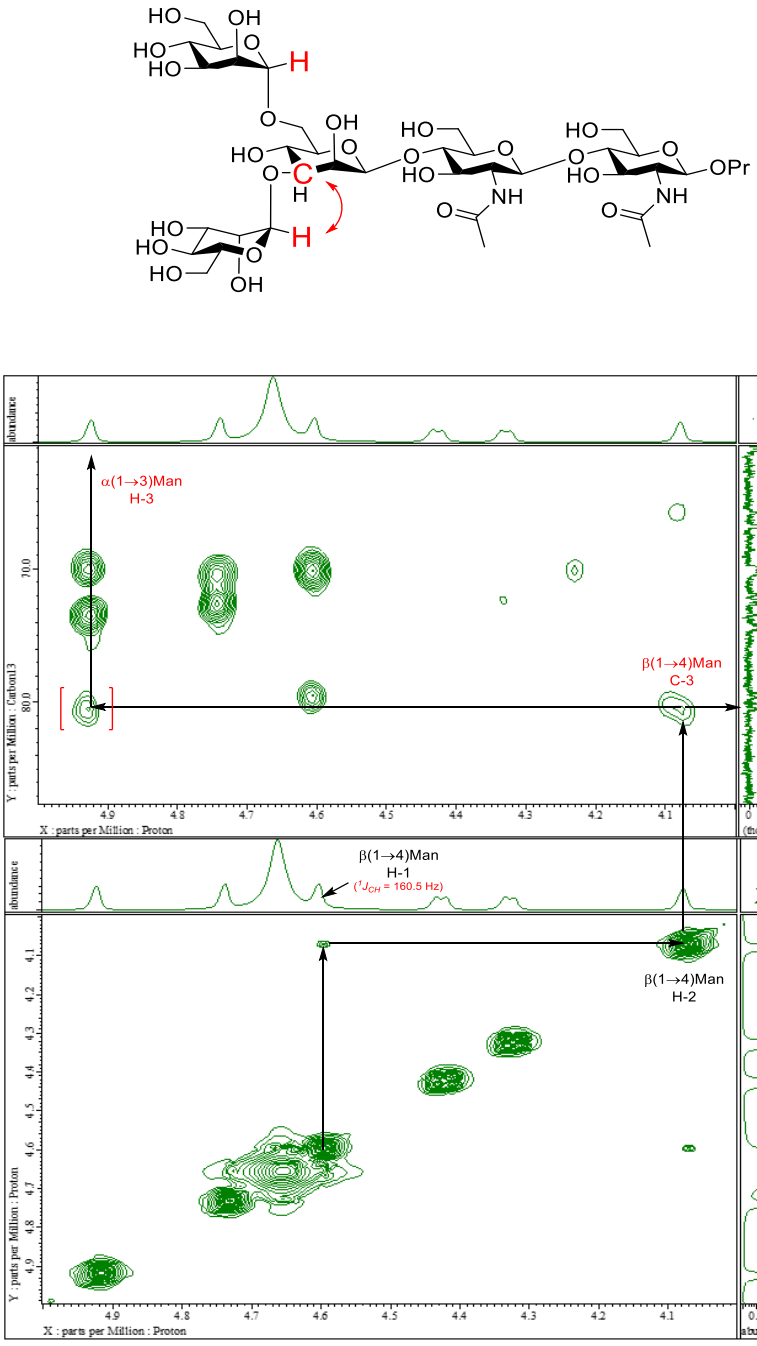


Figure 13. HMBC(上) と COSY(下) による **$Man_3GlcNAc_2$** 上の α(1→3)Man のアノマー位のプロトンの割り当て

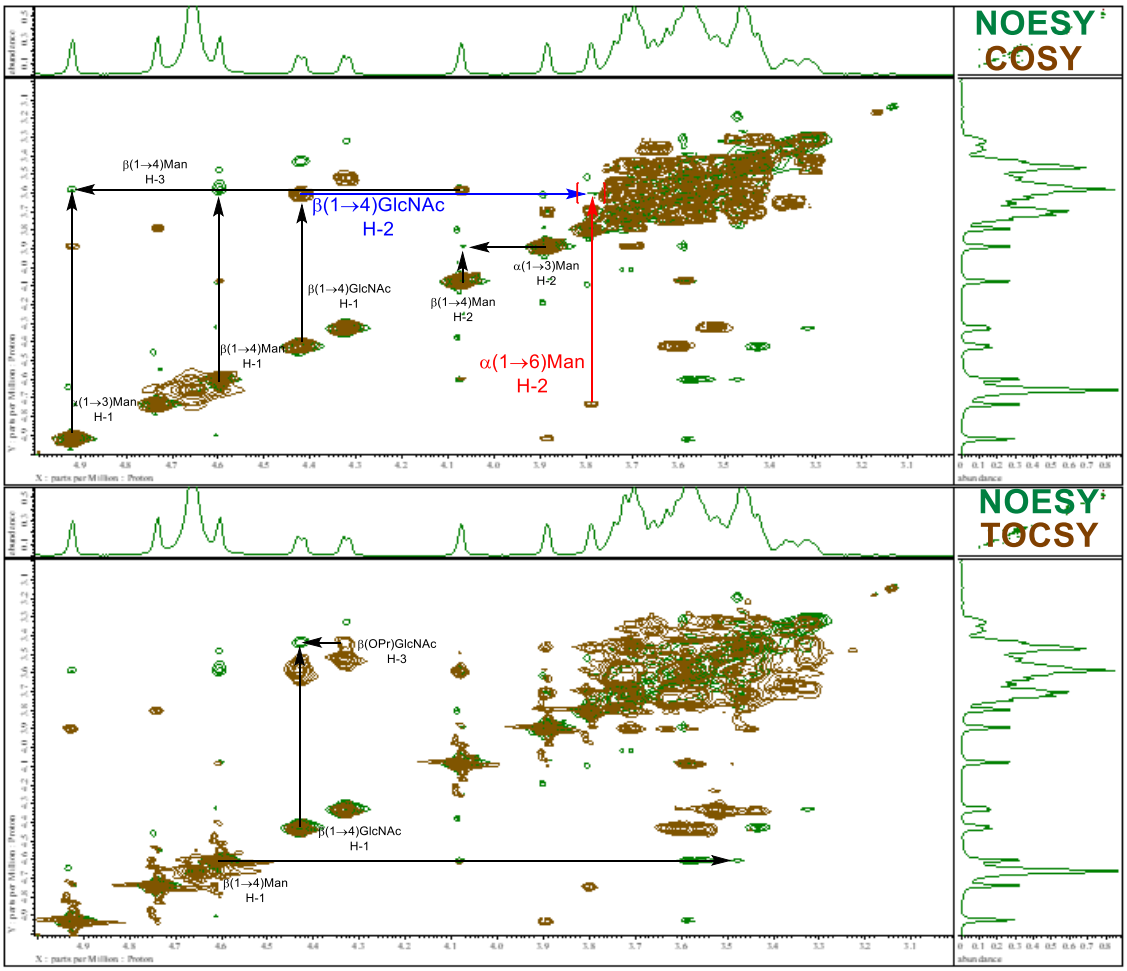


Figure 14. NOESY/COSY (上) と NOESY/TOCSY (下) における

$Man_3GlcNAc_2$ 上の NOESY 相関の割り当て

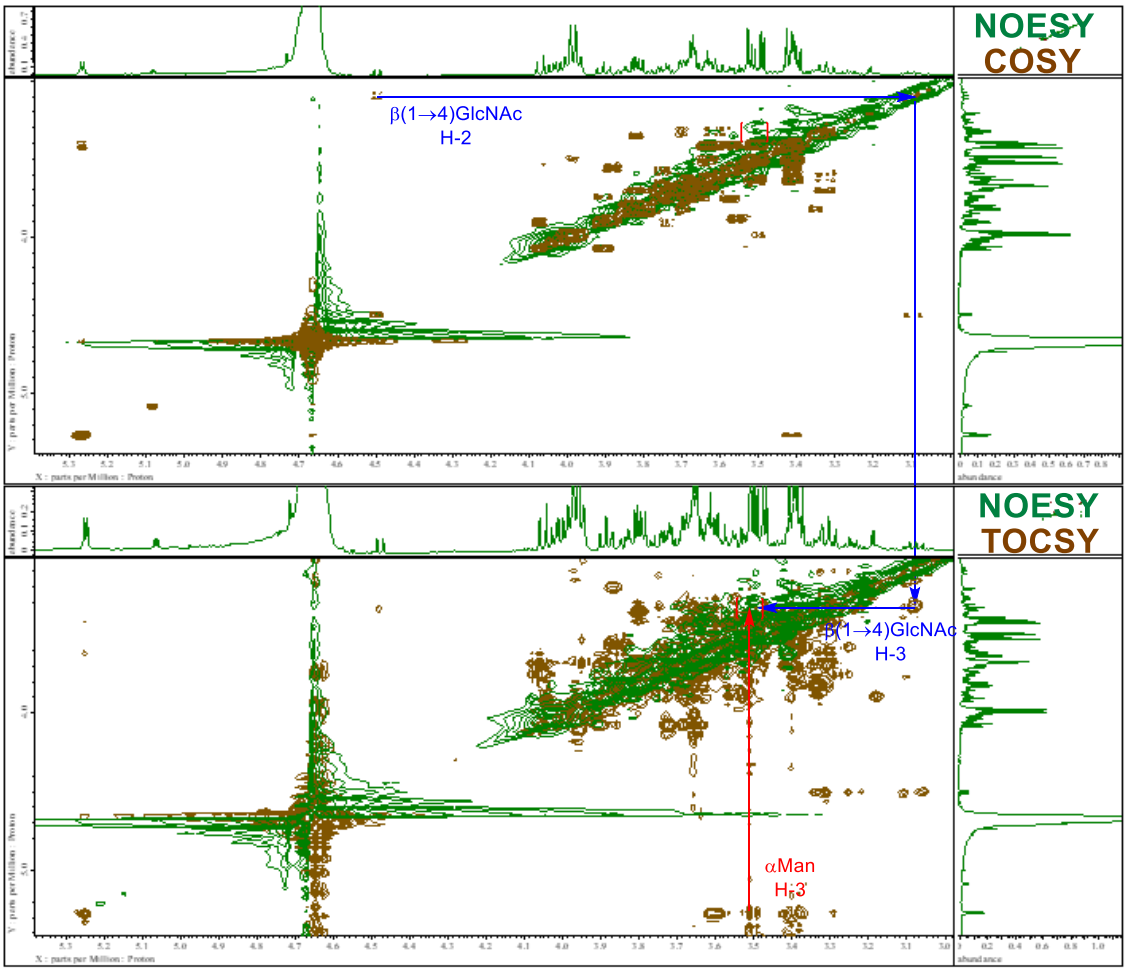


Figure 15. NOESY/COSY (上) と NOESY/TOCSY (下) における

Man_3Glc_2 上の NOESY 相関の割り当て

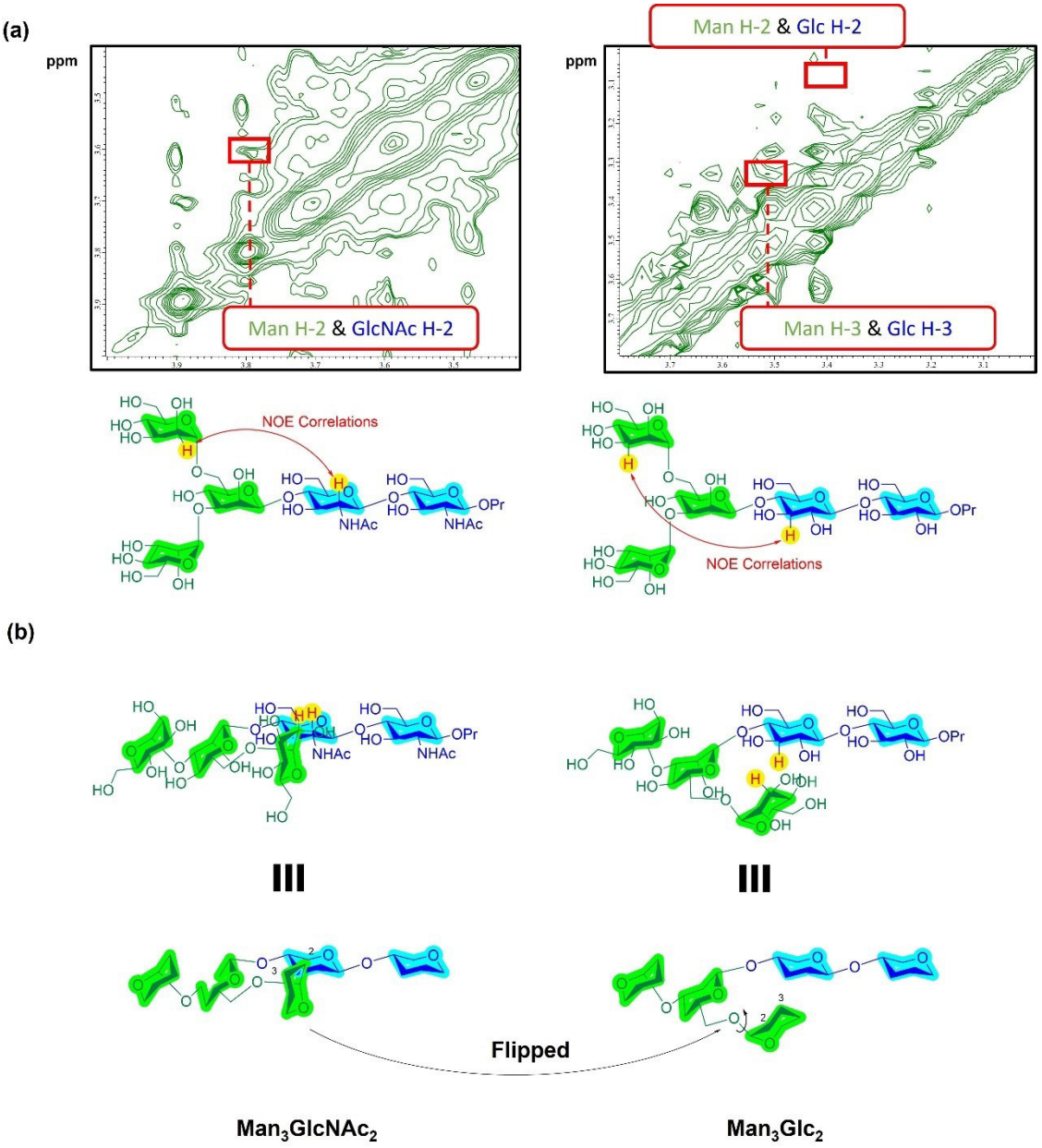


Figure 16. $Man_3GlcNAc_2$ と Man_3Glc_2 における (a) NOESY の比較 および (b) NOE 相関に基づく考えられる配座

第 8 節　分子動力学シミュレーションによる折り畳み配座の解析

本章では、前章で得られた実験結果を理論的に考察するため、**$Man_3GlcNAc_2$** および **Man_3Glc_2**を対象とした分子動力学 (MD) シミュレーションを実施した。通常、糖鎖の MD シミュレーションには GLYCAM06 や CHARMM36 carbohydrate force field が広く用いられる。例えば、既存の **$Man_3GlcNAc_2$** での MD シミュレーションでは、CHARMM36 carbohydrate force field が使用されているが、α(1→6) 結合の回転に対するエネルギー障壁が高く、標準的な MD シミュレーションでは構造変化に乏しいことが報告された [7]。そのため、折り畳み配座を含む複数の配座間を遷移させるためには温度レプリカ交換 MD のような拡張サンプリング手法が必要とされた。一方、GLYCAM を用いた **$Man_3GlcNAc_2$** の MD シミュレーションでは、レプリカ交換法を用いずとも **$Man_3GlcNAc_2$** の折り畳み配座がサンプリングされており、レプリカ交換無く、**$Man_3GlcNAc_2$** の折り畳み配座が示されており、α(1→6) 結合の回転に対するエネルギー障壁が低さを示唆している [8]。本研究では、α(1→6) 結合の回転に対するエネルギー障壁の考慮が最重要であると判断し、量子化学計算に類似したねじれ角エネルギーの精度を再現可能な OPLS を力場として採用した [74-75]。OPLS は、糖鎖を含む生体分子全般に対して最適化されており、分子の局所的な電子状態や配座のエネルギー障壁を厳密に評価できる特徴を有する。 また、結合自由エネルギー計算において高い予測精度を発揮するため、熱力学的な信頼性が広く実証されている。

MD シミュレーションの計算には、Schrödinger 社のソフトウェア Maestro を用い、ツールとして LigPrep による構造準備を行った。水溶液中における最安定配座の探索には、OPLS4 力場を用いた MacroModel によるコンフォメーション探索を実施した。多様な回転二面角のサンプリングと低周波モードの振動として MCMM/LMOD 法を組み合わせた構造サンプリングを 1000 回行い、エネルギー的に最も安定な初期構造を選択した。さらに、量子化学計算による初期構造の最適化を行うため、分散力や

分子内水素結合を精度良く記述できる B97-3c/def2-mTZVP での密度汎関数法 (DFT) 計算を Jaguar を使用して実施した [76]。これにより、水溶液中における相互作用を適切に考慮した安定構造を探索した。その後、TIP3P を水モデルとして使用した Desmond による 500 ns の MD シミュレーションを各 n=3 で実施し、構造のクラスタリングを行った。サンプリングの結果、前章の NOESY 相関を支持する構造が確認された (**Figure 17, 18**)。具体的には、**Man$_3$GlcNAc$_2$** における Man H-2 と GlcNAc H-2 の近接は 30%の頻度、ならびに **Man$_3$Glc$_2$** での Man H-3 と Glc H-3 の近接は 20%の頻度でクラスターで各々確認された。また、**Man$_3$GlcNAc$_2$** では合計 11%の頻度で GlcNAc 環の両面での折り畳み配座が検出され、**Man$_3$Glc$_2$** では片面に対する折り畳み配座のみが 8% の検出された。

折り畳み配座の多様性を定量的かつ多角的に評価するために、以下の 3 つの物理量に着目した。一つ目は二乗平均平方根偏差 (RMSD) であり、これは各フレームにおける構造変化の程度を示す指標である。RMSD の値が大きいほど、分子構造の変動が大きいことを意味する。二つ目は回転半径 (rGyr) であり、分子全体の広がりや容積の大きさを示す指標である。分子が伸長している状態では値が大きく、折り畳まれてよりコンパクトな状態では小さくなる特徴を持つ。三つ目は分子内水素結合数 (intraHB) であり、リガンド分子内で形成される水素結合の数を表す。以上の 3 指標を用いることで、折り畳み配座の多様性および安定性を多角的に評価した。

Man$_3$GlcNAc$_2$ では、N=1 での 320 ns から 350ns 付近、490 ns 付近および N=3 での 450 ns 付近において RMSD が約 4.5 Å まで急激に上昇するスパイクが見られた (**Figure 19**)。 この RMSD の上昇と同期して rGyr の急激な低下が確認されており、この挙動を示すフレームの構造は Figure 13 で定義される下向きの折り畳み配座をとっていることが確認された。また、シミュレーション期間中の分子内水素結合 (intraHB)の数は、主に 2 本から 3 本の範囲で推移していた。一方、*N*-Ac 基を OH 基

に置換した **Man_3Glc_2** では、RMSD が 2.0～3.0 Å の範囲で非常に安定して推移しており、天然型で見られたような急激な構造変化は観察されず、rGyr も一定の値を維持した。さらに、分子内水素結合の数は主に 3 本から 4 本と、天然型に比べて増加することが示された。

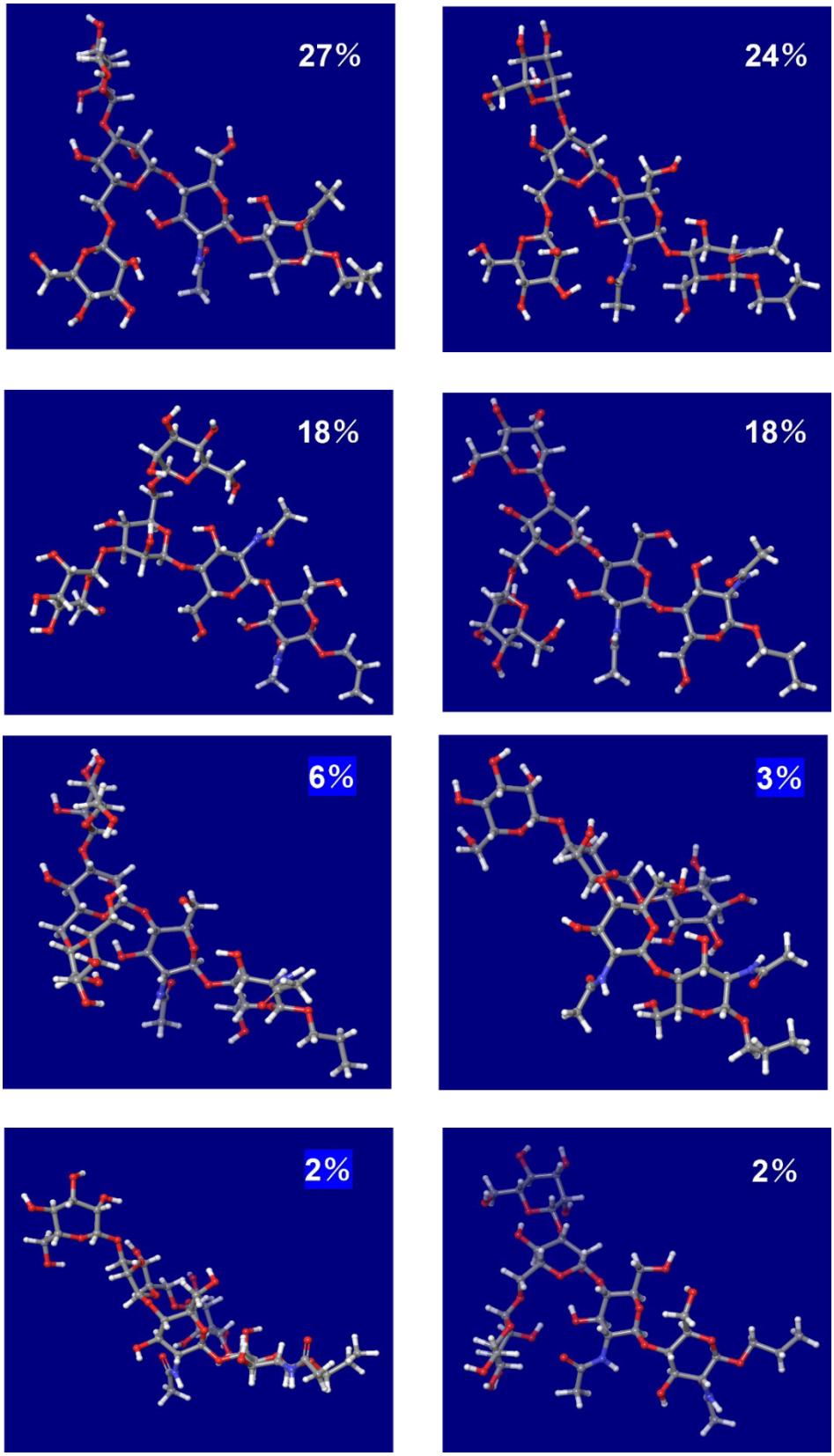


Figure 17. $Man_3GlcNAc_2$ の MD シミュレーションでのクラスターと出現割合

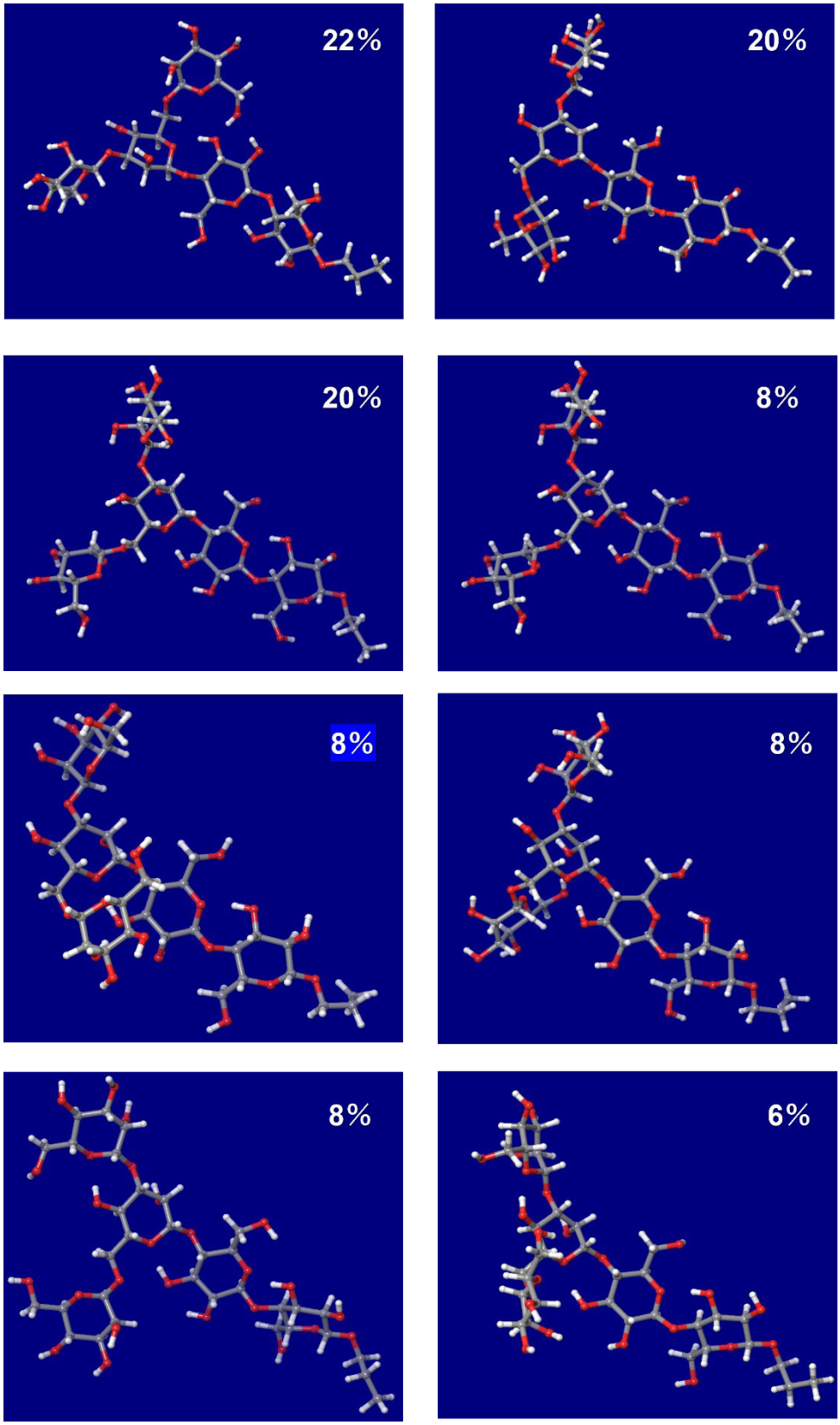


Figure 18. Man_3Glc_2 の MD シミュレーションでのクラスターと出現割合

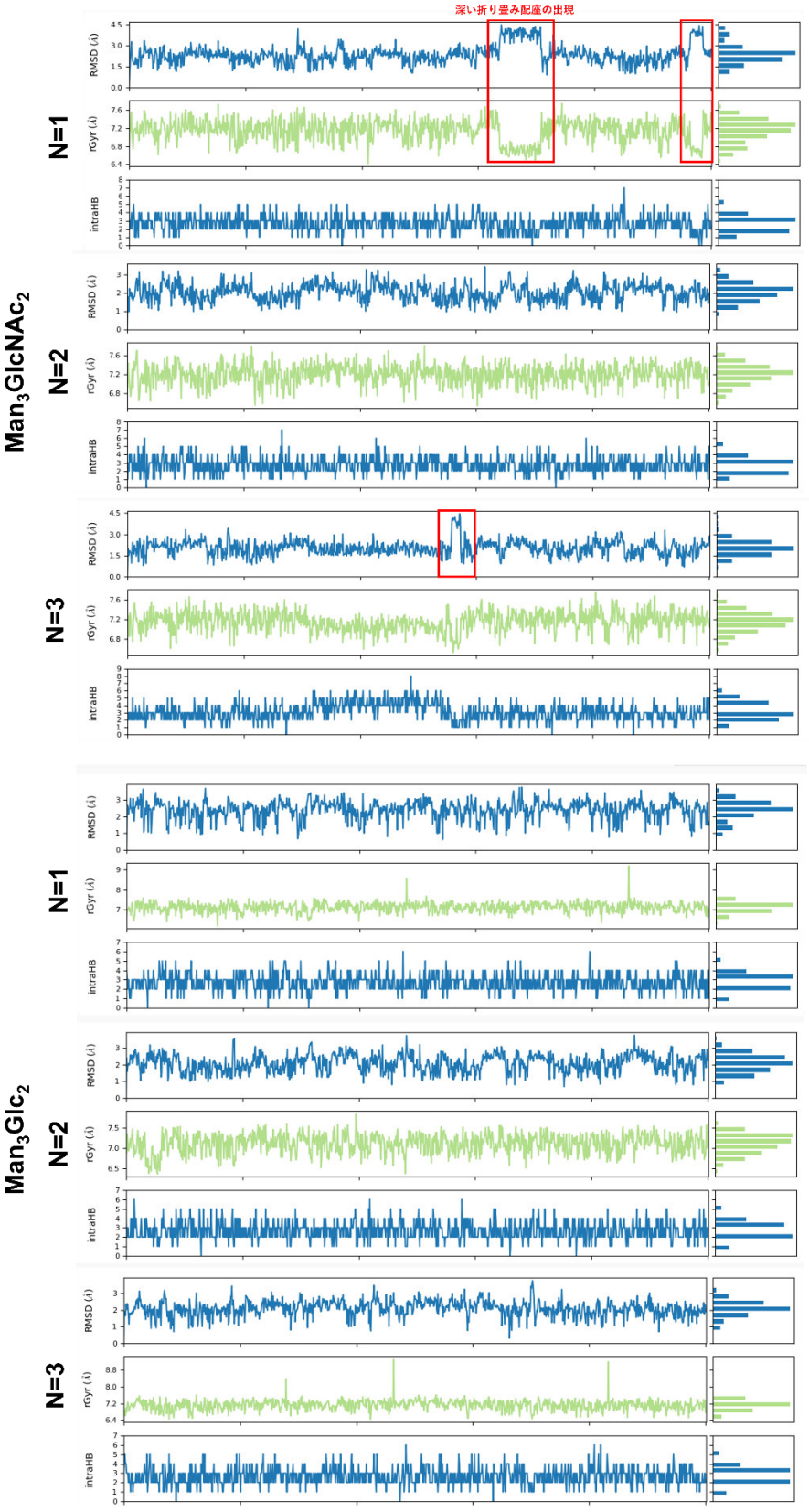


Figure 19. $Man_3GlcNAc_2$ と Man_3Glc_2 における RMSD、rGyr、intraHB

前章で示した「*N*-Ac 基がコア $GlcNAc_2$ の構造自由度を制限し、糖鎖全体が折り畳み配座を誘発する」という仮説を検証するため、MD シミュレーションから得られたフレームデータを用い、**$Man_3GlcNAc_2$** における GlcNAc の C-N(H) 結合の回転角を解析した。本解析は、特定の回転角における存在確率がその状態の自由エネルギーに依存するという原理に基づく。**Figure 20** の折れ線グラフは、力場計算により理論的に算出されたエネルギー障壁を示し、ヒストグラムはシミュレーション中の各角度の滞在頻度および存在確率密度を表す。また、円グラフは、回転可能な結合角度の出現確率密度分布を示す。

解析結果として、*N*-Ac 基の二面角の回転は明確に制限されており、特定の角度に固定される傾向が見られた。これは、*N*-Ac 基が平面構造を形成することで、コア構造を剛直化していることを示唆している。さらに、*N*-Ac 基に存在する強い双極子が水分子や自身の残基内の近傍基と相互作用を形成し、一時的な RMSD 上昇と rGyr 低下を誘発し、折り畳み構造を維持していると考えられる。

この折り畳みの配座の形成に伴い分子全体はコンパクト化するが、極性基の配向が制限されるなどの立体的な制約も生じる。そのため、形成される分子内水素結合は 2〜3 本に限定されたと推察される。つまり、**$Man_3GlcNAc_2$** では、コア構造の局所的な剛直性が折り畳み配座を許容しつつ、分子全体としてより安定な水素結合を形成していると考えられる。

一方、**Man_3Glc_2** における Glc の C-O(H) 結合の回転柔軟性を評価した結果、Glc_2 の二面角のねじれに伴う内部エネルギー変化量としてのひずみのエネルギー (strain) が $GlcNAc_2$ よりも大きく、かつ広範囲な角度分布を示すことが確認された。これは、OH 基がコア構造に厳しく制約されず、自由に回転できることを意味する。こうした柔軟性により、ひずみの大きい折り畳み配座はとりにくくなる一方で、分子全体として最適な水素結合ネットワークの再構築能力が向上する。結果として、分子内水

素結合数が 3〜4 本へと明確に増加し、伸長状態の安定な配座が優先的に占有されると推察する。

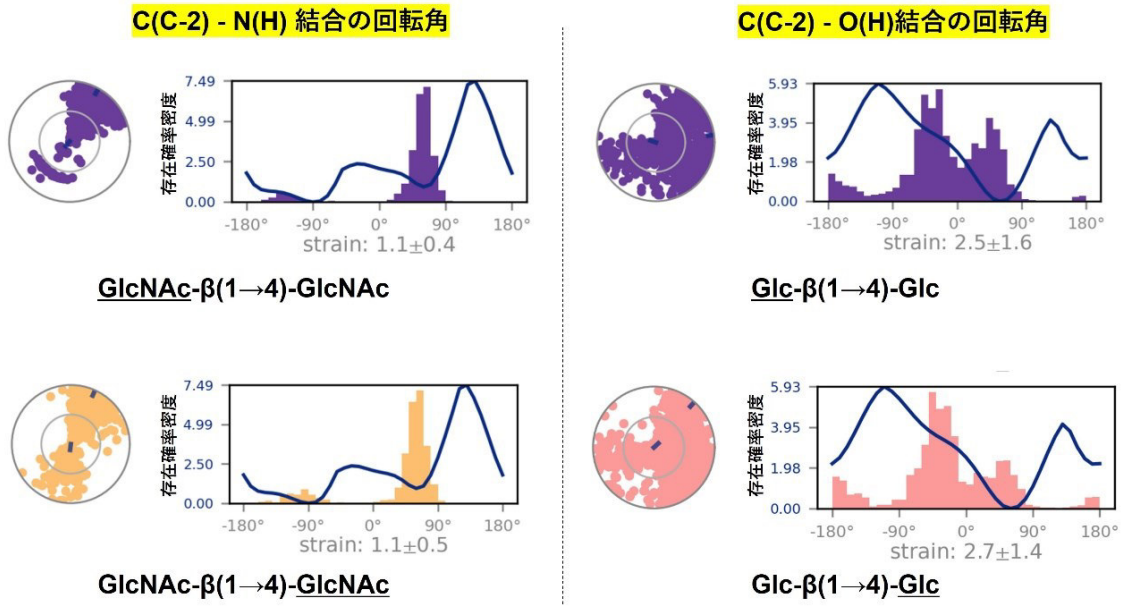


Figure 20. $Man_3GlcNAc_2$ と Man_3Glc_2 における

2 位の C-N(H) および C-O(H) の回転角の存在確率密度

第 9 節　考察と小括

本章では、天然型の高マンノース型糖鎖 **Man$_3$GlcNAc$_2$** と、相当する非天然型の **Man$_3$Glc$_2$** を合成し、NMR 測定および MD シミュレーションを用いた統合的な解析を行った。NMR の NOESY 解析により、非天然型糖鎖においても折り畳み配座に由来する NOE 相関が観測されたものの、天然型糖鎖においては、コア糖鎖の内部までより高度に折り畳まれた配座を支持する NOE 相関が観測された。また、MD シミュレーション (500 ns) による立体配座のサンプリング結果は、これらの NOE 相関に対応する糖残基間の空間的近接を正確に再現した。NMR によって実験的に捉えられた高度に折り畳まれた配座と緩やかな配座という構造的差異が、MD シミュレーションによるプロトン間距離の軌跡によっても支持され、両手法が極めて良好な整合性を示すことが確認された。また、*N*-Ac 基がコア構造の自由度を制限するという NMR からの仮説は、MD シミュレーションのトラジェクトリ解析によって理論的に実証された。MD 解析の結果、**Man$_3$GlcNAc$_2$** における C-N(H) 結合は、アミド平面の性質により回転が強く制限され、特定の二面角に固定される傾向がみられた。対照的に、*N*-Ac 基を OH 基に置換した **Man$_3$Glc$_2$** の MD 解析では、C-O(H) 結合が高い回転柔軟性を有することが示された。OH 基は局所的な配座に固執せず、エネルギー障壁を超えて動的に回転することで、分子全体としてより安定な水素結合ネットワークを再構築でき、この適応的な柔軟性により局所的なひずみが緩和される結果、分子は特定の折り畳み配座にトラップされることなく、NMR で観測された緩やかな配座を維持しながら伸長状態の空間を優先的に占有することが理論的に裏付けられた。

つまり、*N*-Ac 基がもたらす局所的な剛直性がコア構造を安定化させるとともに、*N*-Ac 基の強い双極子が水分子や近傍基との間に特異的な局所相互作用を形成でき、この局所相互作用による折り畳み配座の一時的な保持が駆動力となり、シミュレーシ

ョン中において RMSD の上昇と回転半径 (rGyr) の低下を伴う高度な折り畳み配座の発生ができることが初めて明らかとなった。

以上の結果から、**Man$_3$GlcNAc$_2$** における *N*-Ac 基は、局所的な剛直性および双極子相互作用を通じてコア **GlcNAc$_2$** の配座自由度を制御し、糖鎖全体に深い折り畳み配座を誘起・安定化させる構造的決定因子として不可欠な役割を担っていると結論づけられる。

また、本章で解明した *N*-Ac 基による折りたたみ配座の安定化機構を考慮すると、レクチンがコア GlcNAc$_2$ との相互作用を介して分子内相互作用を競合または阻害することで、分岐鎖の配座環境を制約し、糖鎖認識の初期プロセスを制御している可能性が示唆される。すなわち、本結果はレクチンによるコア糖鎖へのアクセスが配座変換を通じて、分岐鎖の認識に影響を及ぼしうることを示している。

この知見をさらに発展させるには、本研究で用いた非天然型糖鎖のように、骨格改変を通じて折りたたみ配座を制御し、レクチンに対する親和性を意図的に操作するアプローチが必要である。レクチンによる認識プロセスを詳細に解明する上で、本章で合成した非天然型糖鎖 **Man$_3$GlcNAc$_2$** は、折りたたみ配座が不安定化したモデル糖鎖として極めて有用である。今後は、実験および分子シミュレーションの両面から、本糖鎖を比較対象とした親和性解析への応用が期待される。

結論

本研究では、多様な生体機能を有する高マンノース型糖鎖の分岐鎖対象に、その合成法、レクチンによる特異性解析、およびコア構造による配座制御の理解に貢献した。本研究は、高マンノース型糖鎖がもつ不均一性を「分岐構成」「分岐配置」「立体配座」の多様性に分割して捉えることで、その複雑な構造と機能の理解に大きく貢献するものである。具体的には以下のとおりである。

第 1 章　高マンノース型糖鎖の化学合成における部分的グリコシル化法の開発

本章では、高マンノース型糖鎖の分岐異性体を簡便に入手する手法として、多分岐骨格に対する部分的グリコシル化法を開発した。反応条件の最適化により、糖供与体の当量数を制御することで、部分的伸長反応を再現性よく達成できることを見出した。反応混合物の精製においては、中圧分取液体クロマトグラフィーを用いた一段階精製法を確立した。また、得られた分岐異性体の構造決定には、2D-NMR による HMBC の活用が有効であることを明らかにした。本合成戦略は、高マンノース型糖鎖の多様な分岐構造の迅速な供給を可能にし、分岐異性体レベルでの詳細な機能解析への貢献が期待される。

第 2 章　抗ウイルス性レクチンに対する高マンノース型糖鎖の分岐鎖特異性解析

本章では、脱保護された一連のマンノース分岐鎖を使用し、抗ウイルス性植物レクチン GNL の複数の結合ポケットに対する分岐糖鎖の特異性解析を行った。その結果、分岐異性体 **Pre-M8B** および **Pre-M8C** に対する GNL の顕著な結合能の違いが観察され、本レクチンは多様な高マンノース型糖鎖構造に対して、糖残基数の違いよりも分岐パターンの違いを優先して認識する分岐鎖特異性を有することを初めて見出した。

第 3 章　高マンノース型糖鎖分岐鎖の折り畳み配座に関する安定化要因の解析

本章では、糖鎖コア構造における *N*-Ac 基の役割を解明するため、**Man$_3$GlcNAc$_2$** とその模倣体 **Man$_3$Glc$_2$** をボトムアップ型の化学合成法にて調製し、NMR および MD シミュレーションによる統合的な立体配座解析を実施した。

NMR 解析の結果、**Man$_3$GlcNAc$_2$** では α(1→6)Man 分岐鎖が深く折り畳まれた配座をとるのに対し、*N*-Ac 基を OH 基に変換した **Man$_3$Glc$_2$** は開放的で緩やかな配座を示すことが初めて実験的に証明された。MD 計算により、*N*-Ac 基の局所的な剛直性と双極子相互作用がコア糖鎖の自由度を緻密に制限し、糖鎖全体の深い折り畳みを誘起・安定化させていることが理論的に裏付けられた。以上の結果から、*N*-Ac 基は糖鎖全体の配座を支配する不可欠な構造的決定因子であると結論づけられる。この折り畳み安定化機構は、レクチンがコア糖鎖へアクセスする際に配座変換を誘起し、分岐鎖の初期認識プロセスを制御している可能性を示唆している。本研究で合成した **Man$_3$Glc$_2$** は、折り畳み配座が不安定化した極めて有用なモデル糖鎖であり、今後は実験および計算の両面から、レクチン親和性解析等への応用が期待される。

本研究は、分岐鎖の効率的な合成、レクチンによる多様な分岐鎖認識、そして折り畳みの立体配座解析を通じて、糖鎖側が受容体に適した形状を時間的に維持する動的メカニズムの理解に貢献できる基盤情報を提供した。これにより、将来的には糖鎖の分岐構造と立体配座を制御した、新規機能性分子の創出を加速できると考える。

実験項

実験に関する一般事項

薄層クロマトグラフィー (TLC)

Merck 社製のシリカゲル 60 F_{254} を使用した。呈色は、オルシノール硫酸呈色液・Hannesian 呈色液に浸した後、ホットプレート上で加熱することで行った。紫外線吸収の検出は、Spectronics 社製の UV ランプ ENF-260C/J (波長：254 nm) を使用した。

核磁気共鳴 (NMR) スペクトル

^{1}H NMR : JEOL 製の JNM-ECA500 型 FT-NMR スペクトルメーター (500 MHz) を使用し、重溶媒は $CDCl_3$ (内部標準δ_H 7.26 ppm) 、CD_3OD (内部標準δ_H 3.31 ppm) 、D_2O (内部標準δ_H 4.65 ppm) を使用した。NOESY の測定は、緩和遅延時間 1.5s、混合時間 0.5s とし、室温条件下で実施した。

^{13}C NMR : JEOL 製の JNM-ECA500 型 FT-NMR スペクトルメーター (126 MHz) を使用し、重溶媒は $CDCl_3$ (内部標準δ_H 77.2 ppm) 、CD_3OD (内部標準δ_H 49.2 ppm) 、MeOH in D_2O (内部標準δ_H 49.2 ppm) を使用した。

高分解能質量分析 (HRMS) スペクトル

高分解能質量分析には、Thermo Fisher Scientific 社製の Q-Exactive (ESI-Orbitrap) 質量分析計を使用した。

シリカゲルカラムクロマトグラフィー

関東化学社製の SiOH 60N (40-50 μm、球状、中性) もしくは SiOH 60N (40-100 μm、球状、中性) を使用した。

中圧分取液体クロマトグラフィー (MPLC)

山善社製の EPCLC-AI-580S 型クロマトグラフィーシステムを使用した。また、分取のカラムは、ULTRA-PACK B (SiOH 30 μm, 40 μm) もしくは ULTRA-PACK B 150L (SiOH 40 μm) を使用し、インジェクションは、インジェクトカラム (SiOH) を使用した。

減圧濃縮

BÜCHI 製のダイヤフラム真空ポンプ V-700 および東京理科器械製ロータリーエバポレーターN-1000 を使用し、30-60℃ の湯浴中で行った。

冷却反応装置

MeOH の冷媒下にて、テクノシグマ社製の超低温反応器である UC リアクター (UCR-150) を使用した。

反応溶液 (無水溶媒)

関東化学社製の CH_2Cl_2(超脱水、>99.5%)、$(CH_2Cl)_2$ (超脱水、>99.0%)、MeOH(超脱水、>99.8%)、MeCN (超脱水、>99.5%)、Toluene (超脱水、>99.5%)、EtOAc (超脱水、>99.5%) および富士フィルム和光純薬社製の Pyridine (超脱水、>99.5%) を使用した。

乾燥

分液操作後の有機層の乾燥は、無水硫酸ナトリウム (Na_2SO_4) を使用した。

GNL のサーマルシフトアッセイでの評価

HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) 、GNL (10 μM) 、分岐糖鎖 (3.0 mM) 、$CaCl_2$ (0.10 mM) の終濃度 (15.0 μL, SYPRO Orange を含む) となるように調製した。アッセイ溶液は、37°C で 1 時間インキュベートし、室温に冷却後 SYPRO Orange (60 mM) を添加した。その後、反応液を 10 秒毎に 0.2°C 加熱し、25°C から 100°C までの SYPRO Orange の蛍光強度 (Ex/Em. 470/570 nm) を Bio-Rad 社の CFX96 リアルタイム PCR システム内の CFX Manager ソフトウェアを使用してモニタリングした。

分子動力学シミュレーションでの評価

Schrödinger 社の Schrödinger Release 2025-2 を用いて実施した。初期構造最適化には、以下の条件を使用した。

・力場：OPLS4

・イオン化状態の考慮：Epik Classic, pH 7.0±2.0

DFT (jaguar)は以下の条件を使用した。

・手法：B97-3c

・基底関数：def2-mTZVP

・連続溶媒モデル：PBF

MD (Desmond) は以下の条件を使用した。計算開始前の緩和計算を使用した。

・力場：OPLS4

・水分子モデル： TIP3P

・シミュレーション時間：500ns (500.0 ps)

・アンサンブル：NPT (温度：300K, 気圧:1.01325bar)

合成とスペクトルデータ

第 1 章 多分岐鎖の部分的グリコシル化法の開発

2-*O*-Acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-1-deoxy-α-D-mannosyl fluoride (5)

化合物 **7** (651 mg, 1.28 mmol) を CH_2Cl_2 (13.5 mL) に溶解し、-40°C 下にて DAST (260 μL, 1.79 mmol) を加えた。-20°C 下で 3 時間攪拌した後、DAST (130 μL, 0.893 mmol) を加え、さらに 3 時間攪拌した。その後、0°C に昇温し、1 時間 30 分間攪拌した。その後、-20°C に冷却し、MeOH (4.0 mL) を加え、反応をクエンチした。反応溶液は、EtOAc (100 mL)にて希釈され、飽和重曹水 (100 mL)、飽和食塩水 (100 mL) で洗浄した。有機層を乾燥後、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 9 : 1) にて精製し、無色シロップとして化合物 **5** を 540 mg (85 %) 得た。

化合物 **5** (既知)[77]: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.34-7.15 (m, 15H), 5.61 (dd, 1H, J = 2.0 Hz, $J_{H\text{-}F}$ = 49.0 Hz), 5.48 (brs, 1H), 4.71, 4.55 (ABq, 2H, J = 11.2 Hz), 4.67, 4.51 (ABq, 2H, J = 12.0 Hz), 4.86, 4.50 (ABq, 2H, J = 10.9 Hz), 3.99-3.93 (m, 3H), 3.81 (m, 1H), 3.71 (dd, J = 11.5, 1.2 Hz, 1H), 2.16 (s, 3H).

1,2-di-*O*-Acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-D-mannopyranose (8)

化合物 **7**(220 mg, 0.433 mmol)を 0°C 下で AcOH (2.0 mL) に溶解し、室温で 2 時間攪拌した。その後、0°C に冷却し Ac_2O (2.0 mL), DMAP (111 mg, 0. 909 mmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。その後、0°C に冷却し Ac_2O (1.0 mL) を加え、室温で 30 分間攪拌した。その後、0°C に冷却し、MeOH (3.0 mL) を加え、クエンチした。反応後、EtOAc (100 mL) にて希釈し、飽和重曹水 (300 mL)、飽和食塩水 (150 mL) で洗浄した。有機層を乾燥後、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラ

フィー (Hexane : EtOAc = 2 : 1) にて精製し、無色シロップとして化合物 **8** を 220 mg (96%) 得た。

化合物 **8**(既知化合物)[78]: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.36-7.16 (m, 15H), 6.12 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 5.37 (dd, 1H, *J* = 2.3, 2.0 Hz), 4.73, 4.55 (ABq, 2H, *J* = 10.9 Hz), 4.68, 4.51 (ABq, 2H, *J* = 11.7 Hz), 4.86, 4.51 (ABq, 2H, *J* = 11.2 Hz), 4.00-3.96 (m, 2H), 3.86-3.80 (m, 2H), 3.68 (dd, 1H, *J* = 10.9, 1.7 Hz), 2.16 (s, 3H), 2.07 (s, 3H).

4-Methoxyphenyl 2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-α-D-mannopyranoside (9)

化合物 **8** (220 mg, 0.412 mmol) を CH_2Cl_2 (4.4 mL) に溶解し、0°C 下で MPOH (90.6 mg, 0.730 mmol)、Et_3N (29.0 μL, 0.208 mmol)、BF_3-Et_2O (104 μL, 0.827 mmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。その後、0°C に冷却し、MPOH (43.2 mg, 0.348 mmol)、Et_3N (14.0 μL, 0.100 mmol)、BF_3-Et_2O (50.0 μL, 0.398 mmol) を加え、室温で 3 時間攪拌した。その後、0°C に冷却し、MPOH (21.0 mg, 0.169 mmol)、Et_3N (7.00 μL, 0.0502 mmol)、BF_3-Et_2O (26.0 μL, 0.207 mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応後、EtOAc (110 mL)にて希釈し、飽和重曹水 (110 mL)、飽和食塩水 (110 mL) で洗浄した。有機層を乾燥後、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane only → Toluene : EtOAc = 6 : 1) にて精製した。その後、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Toluene : EtOAc = 20 : 1) にて精製し、無色シロップとして化合物 **9** を 211 mg (85%) 得た。

化合物 **9**(既知化合物)[79]: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.37-7.16 (m, 15H), 7.00-6.97 (m, 2H), 6.81-6.77 (m, 2H), 5.54 (dd, 1H, *J* = 3.4, 1.7 Hz), 5.46 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz), 4.77, 4.61 (ABq, 2H, *J* = 11.2 Hz), 4.89, 4.50 (ABq, 2H, *J* = 10.6 Hz), 4.66, 4.45 (ABq, 2H, *J* = 11.4 Hz), 4.18 (dd, 1H, *J* = 9.4, 3.4 Hz), 4.00 (dd, 1H, *J*

= 9.7, 9.4 Hz), 3.96-3.93 (m, 1H), 3.81 (dd, 1H, *J* = 10.9, 4.0 Hz), 3.76 (s, 3H), 3.67 (dd, 1H, *J* = 10.9, 1.7 Hz), 2.18 (s, 3H).

4-Methoxyphenyl 3,4,6-tri-*O*-benzyl-α-D-mannopyranoside (10)

化合物 **9** (1.03 g, 1.73 mmol) を MeOH (13.0 mL) に溶解し、0°C 下で NaOMe (0.650 mL, 3.18 mmol, 28% in MeOH) を加え、室温下で 1.5 時間攪拌した。その後、0°C に冷却し、Amberlyst 15E で中和した。反応液から酸性樹脂をろ別し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc Only) にて精製し、無色シロップとして化合物 **10** を 935 mg (98%) 得た。

化合物 **10**(既知化合物)[80]: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.40-7.18 (m, 15H), 7.01-6.98 (m, 2H), 6.81-6.78 (m, 2H), 5.53 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz), 4.79-4.74 (m, 2H), 4.85, 4.53 (ABq, 2H, *J* = 10.9 Hz), 4.62, 4.45 (ABq, 2H, *J* = 12.0 Hz), 4.79 (brd, 1H, *J* = 1.7 Hz), 4.08 (dd, 1H, *J* = 9.0, 3.4 Hz), 3.93-3.90 (m, 1H), 3.78-3.75 (m, 4H), 3.66 (dd, 1H, *J* = 10.9, 1.7 Hz), 2.58 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz).

4-Methoxyphenyl 3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-*O*-pivaloyl-α-D-mannopyranoside (11).

化合物 **10**(172 mg, 0.308 mmol)を CH_2Cl_2 (3.43 mL) に溶解し、0°C 下で PivCl (94.5 μL, 0.768 mmol)、Et_3N (214 μL, 1.54 mmol)、DMAP (75.3 mg, 0.616 mmol) を加え、50°C の reflux 下で 1.5 時間攪拌した。反応後、EtOAc (100 mL)にて希釈し、飽和重曹水 (100 mL)、飽和食塩水 (100 mL) で洗浄した。有機層を乾燥後、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 8 : 1) にて精製し、無色シロップとして化合物 **11** を 173 mg (87%) 得た。

化合物 **11** (既知)[40]: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.36-7.17 (m, 15H), 7.02-6.99 (m, 2H), 6.81-6.78 (m, 2H), 5.55 (dd, 1H, *J* = 3.3, 1.9 Hz), 5.44 (d, 1H, *J* = 1.9

Hz), 4.76-4.58 (m, 2H), 4.87, 4.52 (ABq, 2H, *J* = 10.6 Hz), 4.63, 4.46 (ABq, 2H, *J* = 12.0 Hz), 4.00-3.95 (m, 2H), 3.80 (dd, 1H, *J* = 10.5, 3.2 Hz), 3.75 (s, 3H), 3.71 (br-d, 1H, *J* = 10.5 Hz), 1.24 (s, 9H).

4-Methoxyphenyl 4,6-*O*-benzylidene-2-*O*-pivaloyl-α-D-mannopyranoside (13)

化合物 **11**(188 mg, 0.294 mmol)を EtOAc (2.5 mL)、EtOH (1.25 mL) に溶解し、$Pd(OH)_2/C$ (163 mg) を加え、水素雰囲気下、室温で 2.5 時間攪拌した。反応液をセライトろ過し、ろ液と洗液を合わせて減圧濃縮し、化合物 **12** を得た。

化合物 **12** を MeCN (3.8 mL) に溶解し、0°C に冷却し BDA (176 μL, 1.18 mmol)、CSA (70.1 mg, 0.302 mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。その後、0°C に冷却し、MeCN (2.0 mL), BDA (100 μL, 0.670 mmol), CSA (51.2 mg, 0.220 mmol) を加え、室温で 40 分間攪拌した。反応後、EtOAc (100 mL)にて希釈し、飽和重曹水 (100 mL)、飽和食塩水 (100 mL) で洗浄した。有機層を乾燥後、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 5 : 1) にて精製し、白色結晶として化合物 **13** を 110 mg (81%, 2 steps) 得た。

化合物 **13** : ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.52-7.34 (m, 5H), 7.00-6.97 (m, 2H), 6.85-6.82 (m, 2H), 5.62 (s, 1H), 5.38 (dd, 1H, *J* = 3.3, 1.7 Hz), 5.35 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz), 4.45 (ddd, 1H, *J* = 7.9, 5.2, 3.3 Hz), 4.23 (dd, 1H, *J* = 10.3, 5.0 Hz), 4.04 (dt, 1H, *J* = 9.9, 5.0 Hz), 3.92 (dd, 1H, *J* = 9.7, 7.9 Hz), 3.82-3.78 (m, 4H, -$PhOCH_3$), 2.32 (d, 1H, *J* = 5.2 Hz), 1.30 (s, 9H); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 178.1, 155.5, 150.0, 137.2, 129.5, 128.5, 126.5, 118.1, 114.8, 102.5, 97.7, 79.5, 71.8, 68.8, 67.5, 64.1, 55.8, 39.3, 27.3; HRMS calcd for $C_{25}H_{30}O_8Na$ $[M+Na]^+$ *m/z* 481.1838, found 481.1836

.

4-Methoxyphenyl 4-*O*-benzyl-2-*O*-pivaloyl-α-D-mannopyranoside (6)

化合物 **13**(110 mg, 0.239 mmol)を CH_2Cl_2 (2.4 mL)に溶解し、-100°C 下で $PhBCl_2$ (105 μL, 0.820 mmol)、Et_3SiH (116 μL, 0.726 mmol) を加え、-100°C 下で 2 時間攪拌した。反応後、EtOAc (100 mL)にて希釈し、飽和重曹水 (100 mL)、飽和食塩水 (100 mL) で洗浄した。有機層を乾燥後、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 2 : 1) にて精製し、白色結晶として化合物 **6** を 98.4 mg (89%) 得た。

化合物 **6** : ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.39-7.29 (m, 5H), 6.97-6.94 (m, 2H), 6.82-6.79 (m, 2H), 5.35 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz), 5.26 (dd, 1H, *J* = 3.4, 1.7 Hz), 4.82-4.76 (ABq, 2H, *J* = 10.8 Hz), 4.37-4.33 (m, 1H), 3.86-3.76 (m, 7H), 2.02 (d, 1H, *J* = 5.2 Hz), 1.79 (dd, 1H, *J* = 8.6, 4.6 Hz), 1.25 (s, 9H); ^{13}C{^{1}H} NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 178.2, 155.3, 150.0, 138.1, 128.7, 128.3, 128.2, 118.1, 114.7, 97.0, 75.0, 74.9, 72.4, 72.0, 70.3, 61.8, 55.7, 39.2, 27.2; HRMS calcd for $C_{25}H_{32}O_8Na$ $[M+Na]^+$ *m/z* 483.1995, found 483.1990.

4-Methoxyphenyl di-(2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-α-D-mannopyranosyl)-(1→3,6)-4-*O*-benzyl-2-*O*-pivaloyl-α-D-mannopyranoside (14)

AgOTf (213 mg, 0.830 mmol)、Cp_2HfCl_2 (155 mg, 0.997 mmol)、Activated MS 4A (2.10 g) を Ar・室温下で Toluene (3.2 mL) に溶解させた。-40°C 下に冷却し、混合物を 30 分間撹拌した。化合物 **5**(270 mg, 0.545 mmol)と化合物 **6**(86.0 mg, 0.187 mmol) を加え、-30°C に昇温し、2 時間攪拌した。その後、Et_3N (0.80 mL) を加え、クエンチした。反応液をセライトろ過し、EtOAc (150 mL) にて洗浄・希釈した。飽和重曹水 (150 mL)、飽和食塩水 (150 mL) で洗浄した。有機層を乾燥後、減圧濃縮し、

残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 95 : 5 → 74 : 26 → 57 : 43) にて精製し、さらに残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー (Toluene : EtOAc = 100 : 0 → 90 : 10) にて精製し、無色シロップとして化合物 **14** を 238 mg (90%) 得た。

化合物 **14** : ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.35-7.12 (m, 35H), 6.93-6.89 (m, 2H), 6.78-6.74 (m, 2H), 5.40-5.39 (m, 2H), 5.31 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz), 5.25 (dd, 1H, *J* = 3.3, 1.9 Hz), 5.22 (d, 1H, *J* = 1.9Hz), 4.91 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz), 4.86 (d, 1H, *J* = 10.9 Hz), 4.85 (d, 1H, *J* = 10.9 Hz), 4.76 (d, 1H, *J* = 10.9 Hz), 4.71 (d, 1H, *J* = 12.0 Hz), 4.68 (d, 1H, *J* = 10.9 Hz), 4.65 (d, 1H, *J* = 12.0 Hz), 4.64 (d, 1H, *J* = 11.5 Hz), 4.52-4.43 (m, 7H), 4.38 (dd, 1H, *J* = 9.2, 3.3 Hz), 3.98-3.58 (m, 17H), 2.13 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 1.21 (s, 9H); ^{13}C{^{1}H} NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 177.6, 170.4, 170.4, 155.2, 150.0, 138.9, 138.6, 138.4, 138.3, 138.1, 137.9, 137.6, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.8, 127.6, 127.4, 117.8, 114.8, 100.4, 98.1, 96.0, 78.7, 78.0, 77.7, 75.6, 75.4, 74.7, 74.6, 74.3, 74.1, 73.6, 72.3, 72.1, 72.0, 71.7, 71.3, 69.2, 68.7, 68.6, 68.4, 65.9, 55.6, 39.2, 27.3; HRMS calcd for $C_{83}H_{92}O_{20}Na$ [*M*+Na]$^{+}$ *m/z* 1431.6080, found 1431.6074.

4-Methoxyphenyl di-(3,4,6-tri-*O*-benzyl-α-D-mannopyranosyl)-(1→3,6)-4-*O*-benzyl-2-*O*-pivaloyl-α-D-mannopyranoside (4)

化合物 **14**(138 mg, 0.0976 mmol)を THF (2.1 mL)、H_2O (0.7 mL) に溶解し、0°C 下で H_2O_2 (270 μL, 4.03 mmol, 35% in water)、LiOH (105 mg, 0.820 mmol) を加え、室温で 2.5 時間攪拌した。反応後、EtOAc (100 mL)にて反応液を希釈し、飽和重曹水 (100 mL)、飽和食塩水 (100 mL) で洗浄した。有機層を乾燥後、減圧濃縮し、

残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー(Hexane : EtOAc = 65 : 35 → 50 : 50) にて精製し、白色結晶として化合物 **4** を 102 mg (79%) 得た。

化合物 **4** : ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.35-7.15 (m, 35H), 6.96-6.92 (m, 2H), 6.78-6.75 (m, 2H), 5.32 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz), 5.27 (dd, 1H, *J* = 1.7, 3.0 Hz), 5.24 (d, 1H, *J* = 1.2 Hz), 4.96 (d, 1H, *J* = 1.2Hz), 4.82 (d, 1H, *J* = 10.9Hz), 4.81 (d, 1H, *J*=11.5 Hz), 4.70−4.59 (m, 7H), 4.52−4.44 (m, 5H), 4.38 (dd, 1H, *J* = 3.0, 9.5 Hz), 4.00 (brs, 1H), 3.96−3.58 (m, 18H), 2.414−2.407 (m, 2H), 1.20 (s, 9H); 13C{1H}NMR(126MHz,CDCl3): δ177.5, 155.2, 150.0, 138.9, 138.5, 138.4, 137.6, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.1, 128.1, 128.0, 128.0, 128.0, 127.9, 127.9, 127.8, 127.7,127.6, 127.5, 117.9, 114.7, 102.2, 99.4, 96.0, 80.5, 79.6, 78.0, 75.4, 75.4, 74.8, 74.7, 74.4, 74.1, 73.6, 73.5, 72.2, 72.1, 71.9, 71.9, 71.5, 71.3, 69.0, 68.7,68.5,68.3,65.9,55.6,39.1,27.3; HRMS calcd for $C_{79}H_{88}O_{18}Na$ [*M*+Na]$^{+}$ *m/z* 1347.5868, found 1347.5883.

4-Methoxyphenyl di-[2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-α-D-mannopyranosyl-(1→2)-3,4,6-tri-*O*-benzyl-α-D-mannopyranosyl]-(1→3,6)-4-*O*-benzyl-2-*O*-pivaloyl-α-D-mannopyranoside (1)

4-Methoxyphenyl 2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-α-D-mannopyranosyl-(1→2)-3,4,6-tri-*O*-benzyl-α-D-mannopyranosyl-(1→3)-[3,4,6-tri-*O*-benzyl-α-D-mannopyranosyl-(1→6)]-4-*O*-benzyl-2-*O*-pivaloyl-α-D-mannopyranoside (2)

4-Methoxyphenyl 3,4,6-tri-*O*-benzyl-α-D-mannopyranosyl- (1→3)-[2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-α-D-mannopyranosyl-(1→2)-3,4,6-tri-*O*-benzyl-α-D-mannopyranosyl-(1→6)]-4-*O*-benzyl-2-*O*-pivaloyl-α-D-mannopyranoside (3)

AgOTf (47.2 mg, 0.184 mmol)、Cp_2HfCl_2 (34.3 mg, 0.0904 mmol)、Activated MS 4A (979 mg) を Ar・室温下で Toluene (3.2 mL) に溶解させた。-40°C 下に冷却し、この混合物を-40°C で 30 分間撹拌した。化合物 **5**(59.7 mg, 0.121 mmol)と化合物 **4** (104 mg, 0.0786 mmol) を加え、-30°C に昇温し、2 時間攪拌した。その後、Et_3N (0.20 mL) を加え、クエンチした。反応後、反応液をセライトろ過し、EtOAc (100 mL) にて洗浄・希釈した。飽和重曹水 (100 mL)、飽和食塩水 (100 mL) で洗浄した。有機層を乾燥後、減圧濃縮し、残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 78 : 22 → 56 : 44 → 49 : 51) にて精製し、無色シロップとして化合物 **1** を 25.3 mg (14%)、化合物 **2** を 39.7 mg (28%)、化合物 **3** を 24.8 mg (17%) 得た。また、原料 **4** を 30.3 mg (29%) 回収した。

化合物 **1** : ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.32-7.06 (m, 65H), 6.90-6.88 (m, 2H), 6.73-6.70 (m, 2H), 5.52-5.51 (m, 2H), 5.29 (brs, 1H), 5.25-5.24 (m, 2H), 5.06-5.05 (m, 2H), 4.88-4.79 (m, 5H), 4.70-4.55 (m, 13H), 4.45-4.28 (m, 10H), 3.99-3.60 (m, 23H), 3.57 (s, 3H), 3.51 (brd, 1H, *J* = 10.3 Hz), 3.42-3.40 (m, 2H), 1.20 (s, 9H); ^{13}C{^{1}H} NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 177.6, 170.3, 155.2, 150.2, 139.0, 138.8, 138.7, 138.6, 138.4, 138.3, 138.2, 138.0, 128.7, 128.6, 128.5, 128.3, 128.3, 128.2, 128.0, 128.0, 127.8, 127.8, 127.7, 127.7, 127.6, 127.5, 127.4, 117.9, 114.7, 101.9, 99.8, 99.5, 99.0, 95.9, 80.3, 79.3, 79.0, 78.4, 78.3, 75.4, 75.3, 75.1, 74.7, 74.6, 74.4, 74.4, 74.2, 73.5, 73.4, 72.8, 72.4, 72.1, 72.1, 72.1, 72.0, 71.2, 68.9, 68.6, 66.5, 55.6, 39.2, 27.4, 21.4, 21.3; HRMS calcd for $C_{137}H_{148}O_{30}Na$ [*M*+Na]$^+$ *m/z* 2296.9987, found 2296.9958.

化合物 **2** : ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.34-7.12 (m, 50H), 6.94-6.91 (m, 2H), 6.75-6.72 (m, 2H), 5.51 (dd, 1H, *J* = 3.4, 1.7 Hz), 5.30 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz), 5.25 (dd, 1H, *J* = 2.3, 1.7 Hz), 5.22 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz), 5.05 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz), 4.87-

4.79 (m, 3H), 4.69-4.56 (m, 10H), 4.51-4.35 (m, 8H), 3.99-3.57 (m, 23H), 3.48 (brd, 1H, *J* = 9.2 Hz), 2.41 (brs, 1H), 2.11 (s, 3H), 1.19 (s, 9H); $^{13}C\{^{1}H\}$ NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 177.5, 170.3, 155.1, 150.1, 138.8, 138.6, 138.6, 138.5, 138.4, 138.3, 138.2, 138.1, 137.9, 137.7, 128.6, 128.5, 128.5, 128.4, 128.4, 128.3, 128.1, 128.0, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.6, 127.5, 127.5, 127.4, 117.8, 114.7, 102.2, 99.7, 99.0, 96.0, 80.2, 79.6, 78.2, 75.4, 75.2, 74.8, 74.7, 74.3, 74.0, 73.6, 73.4, 73.3, 72.1, 72.0, 72.0, 71.9, 71.8, 71.2, 69.0, 68.8, 66.5, 55.6, 39.1, 27.3, 21.3; HRMS calcd for $C_{108}H_{118}O_{24}Na$ $[M+Na]^+$ *m/z* 1822.7944, found 1822.7933.
化合物 **3** : ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.36-7.07 (m, 50H), 6.92-6.89 (m, 2H), 6.76-6.73 (m, 2H), 5.53 (dd, 1H, *J* = 3.3, 1.9 Hz), 5.31 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz), 5.26-5.25 (m, 2H), 5.07 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz), 1.92 (d, 1H, *J* = 1.2 Hz), 4.88-4.79 (m, 3H), 4.70-4.39 (m, 15H), 4.34-4.30 (m, 3H), 3.98-3.59 (m, 22H), 3.54 (dd, 1H, *J* = 10.3, 1.7 Hz), 3.45 (brd, 1H, *J* = 10.3 Hz), 2.41 (brs, 1H), 2.13 (s, 3H), 1.21 (s, 9H); $^{13}C\{^{1}H\}$ NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 177.5, 170.4, 155.2, 150.1, 139.0, 138.7, 138.7, 138.5, 138.4, 138.3, 138.2, 138.0, 138.0, 128.7, 128.5, 128.4, 128.4, 128.3, 128.3, 128.1, 128.0, 127.8, 127.8, 127.7, 127.7, 127.6, 127.5, 127.4, 117.9, 114.7, 101.8, 99.6, 99.4, 95.9, 80.6, 79.1, 78.4, 75.4, 75.3, 75.1, 74.7, 74.4, 74.3, 74.2, 73.6, 73.5, 73.4, 72.7, 72.4, 72.1, 71.9, 71.4, 71.3, 68.9, 68.7, 68.6, 68.2, 65.9, 60.6, 55.7, 39.1, 27.3, 21.4; HRMS calcd for $C_{108}H_{118}O_{24}Na$ $[M+Na]^+$ *m/z* 1822.7944, found 1822.7961.

4-Methoxyphenyl di-[α-D-mannopyranosyl-(1→2)-α-D-mannopyranosyl]-(1→3,6)-α-D-mannopyranoside (Pre-M9)

化合物 **1**(10.5 mg、0.00462 mmol)が溶解した MeOH(2.0 mL)中に NaOMe(200 μL,

0.98 mmol, 28% in MeOH)を 0°C 下で加えた。室温で 28 時間攪拌した後、0°C に冷却し、Amberlyst 15E で中和した。その後、反応液をろ過し、MeOH (100 mL) にて洗浄・希釈した。減圧濃縮し、残渣を MeOH/H_2O(1:1)(4.0 mL) で溶解させた。反応液に $Pd(OH)_2$/C (42.2 mg) と NH_4HCO_2 (140 mg、2.22 mmol) を 0°C 下で加えた。80°C で 3 時間攪拌した後、反応液をセライトろ過し、MeOH(200 mL)にて洗浄・希釈した。その後、減圧濃縮し、残渣はシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー (MeOH/$CHCl_3$、1:1) およびゲルろ過クロマトグラフィー (Sephadex LH-20, MeOH/H_2O、1:1) にて精製し、白色結晶として **Pre-M9** を 3.8 mg (87%) 得た。

Pre-M9 : ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.11-7.08 (m, 2H), 6.92-6.89 (m, 2H), 5.48 (brs, 1H), 5.32 (brs, 1H), 5.14 (brs, 1H), 5.05 (brs, 1H), 4.97 (brs, 1H), 4.26 (brs, 1H), 4.10-3.59 (m, 32H); ^{13}C{^{1}H} NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 156.9, 152.0, 119.5, 115.9, 104.3, 102.5, 101.3, 100.0, 80.5, 80.4, 75.3, 75.1, 74.6, 74.2, 72.7, 72.6, 72.3, 72.3, 72.1, 71.6, 69.0, 63.4, 63.3, 63.3, 56.3; HRMS calcd for $C_{37}H_{58}O_{27}Na$ [*M*+Na]$^+$ *m/z* 957.3063, found 957.3023.

4-Methoxyphenyl α-D-mannopyranosyl-(1→3)-[α-D-mannopyranosyl-(1→2)-α-D-mannopyranosyl-(1→6)]-α-D-mannopyranoside (Pre-M8B).

化合物 **2** (30.3 mg、0.0168 mmol) が溶解した MeOH (2.0 mL) 中に NaOMe(200 µL, 0.98 mmol, 28% in MeOH) を 0°C 下で加えた。室温で 28 時間攪拌した後、0°C に冷却し、Amberlyst 15E で中和した。その後、反応液をろ過し、MeOH (100 mL) にて洗浄・希釈した。減圧濃縮し、残渣を MeOH/H_2O (1:1)(4.0 mL) 中で溶解させた。反応液に $Pd(OH)_2$/C (60.8 mg) と NH_4HCO_2 (201 mg、3.18 mmol) を 0°C 下で加えた。80°C で 3 時間攪拌した後、反応液をセライトろ過し、MeOH(200 mL)にて洗浄・希釈した。その後、減圧濃縮し、残渣はシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー

(MeOH/$CHCl_3$、1:1)およびゲルろ過クロマトグラフィー (Sephadex LH-20, MeOH/H_2O、1:1)にて精製し、白色結晶として **Pre-M8B** を 11.9 mg (91%) 得た。

Pre-M8B : ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.08-7.04 (m, 2H), 6.89-6.87 (m, 2H), 5.29 (d, 1H, *J* = 1.2 Hz), 5.14 (brs, 1H), 5.10 (brs, 1H), 4.94 (brs, 1H), 4.24 (brs, 1H), 4.02-3.57 (m, 26H); $^{13}C\{^1H\}$ NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 156.8, 152.0, 119.5, 115.9, 104.3, 101.3, 100.0, 80.7, 75.2, 75.1, 74.6, 74.2, 72.6, 72.3, 72.1, 71.5, 69.2, 68.9, 68.9, 67.6, 63.2, 63.1, 63.0, 56.3, 49.5; HRMS calcd for $C_{31}H_{48}O_{22}Na$ [*M*+Na]$^+$ *m/z* 795.2535, found 795.2596.

4-Methoxyphenyl α-D-mannopyranosyl-(1→2)-α-D-mannopyranosyl-(1→3)-[-α-D-mannopyranosyl-(1→6)]-α-D-mannopyranoside (Pre-M8C).

化合物 **3**(12.0 mg、0.00667 mmol)が溶解したMeOH(2.0 mL)中にNaOMe(200 µL, 0.98 mmol, 28% in MeOH)を 0°C 下で加えた。室温で 28 時間攪拌した後、0°C に冷却し、Amberlyst 15E で中和した。その後、反応液をろ過し、MeOH (100 mL) にて洗浄・希釈した。減圧濃縮し、残渣を MeOH/H_2O(1:1)(4.0 mL)中で溶解させた。反応液に $Pd(OH)_2$/C(40.5 mg)と NH_4HCO_2(141 mg、2.24 mmol)を 0°C 下で加えた。80°C で 3 時間攪拌した後、反応液をセライトろ過し、MeOH(200 mL)にて洗浄・希釈した。その後、減圧濃縮し、残渣はシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー(MeOH/$CHCl_3$、1:1)および Sephadex LH-20 上のゲル透析クロマトグラフィー(MeOH/H_2O、1:1)にて精製し、白色結晶として **Pre-M8C** を 4.6 mg (87%, 2 steps) 得た。

Pre-M8C : ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.09-7.07 (m, 2H), 6.86-6.84 (m, 2H), 5.30 (d, 1H, *J* = 1.7Hz), 5.03 (d, 1H, *J* = 1.7Hz), 4.86 (d, 1H, *J* = 1.7Hz), 4.83 (d, 1H, *J* = 1.7Hz), 4.06-3.57 (m, 27H); $^{13}C\{^1H\}$ NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 156.7,

153.5, 119.5, 115.5, 104.2, 102.4, 101.6, 100.4, 80.8, 80.3, 77.0, 75.2, 74.6, 73.8, 72.9, 72.6, 72.3, 72.1, 70.4, 69.3, 68.7, 68.1, 67.6, 63.1, 62.6, 56.2; HRMS calcd for $C_{31}H_{48}O_{22}Na$ [*M*+Na]$^+$ *m/z* 795.2535, found 795.2596.

4-Methoxyphenyl di-(α-D-mannopyranosyl)-(1→3,6)-α-D-mannopyranoside (Pre-M7)

化合物 **4**(6.8 mg、0.0051 mmol)が溶解した MeOH(2.0 mL)中に NaOMe(100 μL, 0.49 mmol, 28% in MeOH)を 0°C 下で加えた。室温で 28 時間攪拌した後、0°C に冷却し、Amberlyst 15E で中和した。その後、反応液をろ過し、MeOH (100 mL) にて洗浄・希釈した。減圧濃縮し、残渣を MeOH/H_2O(1:1)(4.0 mL)中で溶解させた。反応液に $Pd(OH)_2$/C(18.0 mg)と NH_4HCO_2(86.1 mg、1.36 mmol)を 0°C 下で加えた。80°C で 3 時間攪拌した後、反応液をセライトろ過し、MeOH(200 mL)にて洗浄・希釈した。その後、減圧濃縮し、残渣はシリカゲル上のカラムクロマトグラフィー(MeOH/$CHCl_3$、1:1)および Sephadex LH-20 上のゲル透析クロマトグラフィー(MeOH/H_2O、1:1)にて精製し、白色結晶として **Pre-M7** を 2.6 mg (82%, 2steps) 得た。

Pre-M7 : ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.08-7.06 (m, 2H), 6.89-6.87 (m, 2H), 5.29 (brs, 1H), 5.15 (brs, 1H), 4.82 (brs, 1H), 4.26 (brs, 1H), 4.03-3.63 (m, 20H); ^{13}C{^{1}H} NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 156.9, 152.1, 119.4, 115.9, 104.3, 101.5, 101.4, 80.7, 75.2, 74.6, 74.0, 72.8, 72.7, 72.3, 72.2, 71.6, 69.0, 68.8, 67.7, 67.4, 63.1, 56.3; HRMS calcd for $C_{25}H_{38}O_{17}Na$ [*M*+Na]$^+$ *m/z* 633.2007, found 633.2031.

第 3 章　分岐鎖の折り畳み配座の機能解析

3-*O*-Benzyl-4,6-*O*-benzylidene-2-*N*-phthalimide- D-glucopyranose (16)

化合物 **15**(196 mg, 0.351 mmol)を MeCN (1.6 mL)、H_2O (0.4 mL) に溶解し、0°C 下で CAN (768 mg, 1.40 mmol) を加え、0°C 下で 1 分間攪拌した。反応後、ジクロロメタン (300 mL)にて反応液を希釈し、飽和重曹水 (200 mL)、飽和食塩水 (200 mL) で洗浄した。有機層を乾燥後、減圧濃縮し、残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー(Hexane : EtOAc = 85 : 15 → 67 : 33 → 0 : 100) にて精製し、さらに中圧分取液体クロマトグラフィー (Toluene : EtOAc = 78 : 22 → 70 : 30 → 0 : 100) にて精製し、白色結晶として化合物 **16** を 97.9 mg (55%) 得た。本化合物の NMR はα/β体の混ざりで得られたため、α/βと共に帰属する。

化合物 **16**(既知化合物)[81]: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.83–6.88 (14H of α, 14H of β, m), 5.65 (1H of α, s), 5.63 (1H of β, s), 5.24 (1H of β, dd, *J* = 8.2, 8.3 Hz), 5.33 (1H of α, dd, *J* = 4.3, 4.3 Hz), 4.95 (1H of β, d, *J* = 5.2 Hz), 4.87–4.80 (2H of α, 1H of β, m), 4.56–4.49 (2H of α, 2H of b, m), 4.42–4.36 (1H of α, 1H of β, m), 4.29–4.25 (1H of α, m), 4.15 (1H of β, dd, *J* = 8.3, 10.6 Hz), 3.87–3.81 (3H of α, 1H of β, m), 3.70 (1H of β, dt, *J* = 4.6, 9.7 Hz), 3.27 (1H of β, d, *J* = 8.0 Hz).

3-*O*-Benzyl-4,6-*O*-benzylidene-1,2-dideoxy-2-*N*-phtalimide-β-D-glucopyranosyl fluoride (17)

化合物 **16**(94.1 mg, 0.193 mmol)を CH_2Cl_2 (4.0 mL) に溶解し、0°C 下で DAST (42.5 μL, 0.292 mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。その後、0°C に冷却し、MeOH (1.0 mL) でクエンチした。反応後、EtOAc (200 mL)にて反応液を希釈し、飽和重曹水 (150 mL)、飽和食塩水 (150 mL) で洗浄した。有機層を乾燥後、減圧濃縮し、残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 87 : 13 → 66 : 34 → 0 : 100) にて精製し、白色結晶として化合物 **17** を 92.1 mg (97%) 得た。

化合物 **17**(既知化合物)[82]: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.77–6.87 (14H, m), 5.90 (1H, dd, *J* = 8.0, 53.3 Hz), 5.65 (1H, s), 4.50, 4.80 (each 1H, ABq, *J* = 12.6 Hz), 4,48–4.44 (2H, m), 4.35–4.29 (1H, m), 3.92 (1H, dd, *J* = 9.6, 9.7 Hz), 3.80 (1H, t, *J* = 9.2 Hz), 3.73 (1H, dt, *J* = 4.0, 9.4 Hz).

4-Methoxyphenyl 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-2-*N*-phtalimide-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-*N*-phtalimide-β-D-glucopyranoside (19).

AgOTf (32.5 mg, 0.127 mmol)、Cp_2HfCl_2 (23.0 mg, 0.0605 mmol)、Activated MS 4A (620 mg) を CH_2Cl_2 (2.0 mL) に Ar・室温下で加え、-40°C に冷却した。30 分間撹拌した後、化合物 **17** (30.3 mg, 0.0619 mmol) と化合物 **18** (21.8 mg, 0.0366 mmol) を加え、0°C に昇温し、2 時間攪拌した。その後、-40°C に冷却し、Et_3N (20.0 μL) を加え、クエンチした。反応後、反応液をセライトろ過し、EtOAc (150 mL) にて洗浄・希釈した。飽和重曹水 (100 mL)、飽和食塩水 (100 mL) で洗浄した。有機層を乾燥後、減圧濃縮し、残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー(Hexane : EtOAc = 73 : 27 → 60 : 40) にて精製し、無色シロップとして化合物 **19** を 38.3 mg (98%, β only) 得た。

化合物 **19:** ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.87–6.89 (28H, m), 6.73–6.70 (2H, m), 6.61–6.57 (2H, m), 5.53 (1H, s), 5.48 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 5.41 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 4.85 (1H, d, *J* = 12.6 Hz), 4.79 (1H, d, *J* = 12.0 Hz), 4.55–4.43 (4H, m), 4.39–4.34 (2H, m), 4.23–4.21 (4H, m), 3.74 (1H, t, *J* = 8.9 Hz), 3.62 (3H, s), 3.57 (1H, t, *J* = 10.3 Hz), 3.51–3.36 (4H, m); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 168.2, 167.6, 155.3, 150.8, 138.5, 138.2, 137.9, 137.4, 134.2, 134.1, 133.9, 131.6, 129.1, 128.3, 128.3, 128.1, 128.1, 127.9, 127.6, 127.5, 127.4, 127.2, 126.2, 123.8, 123.4, 118.7, 114.3,

101.3, 97.9, 97.6, 83.2, 77.4, 76.9, 76.5, 75.7, 74.5, 74.2, 72.8, 68.8, 68.0, 65.9, 55.6; HRMS calcd for $C_{63}H_{56}O_{14}N_2Na$ $[M+Na]^+$ *m/z* 1087.3629, found 1087.3676.

4-Methoxyphenyl 3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-*N*-phtalimide-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-*N*-phtalimide-β-D-glucopyranoside (20).

化合物 **19** (81.1 mg, 0.0761 mmol) を CH_2Cl_2 (2.0 mL) に溶解し、-20°C 下で BF_3-Et_2O (24.0 μL, 0.191 mmol)、Et_3SiH (116 μL, 0.924 mmol) を加え、-20°C 下で 17 時間攪拌した。その後、-20°C 下で BF_3-Et_2O (12.0 μL, 0.0753 mmol)、Et_3SiH (50.0 μL, 0.398 mmol) を加え、45 分間攪拌した。反応後、EtOAc (150 mL)にて反応液を希釈し、飽和重曹水 (100 mL)、飽和食塩水 (100 mL) で洗浄した。有機層を乾燥後、減圧濃縮し、残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー(Hexane : EtOAc = 67 : 33 → 55 : 45) にて精製し、白色結晶として化合物 **20** を 92.1 mg (97%) 得た。

化合物 **20**(既知化合物)[83]:^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.88–7.56 (8H, m), 7.36–7.25 (12H, m), 7.05–7.00 (4H, m), 6.95–6.93 (3H, m), 6.85–6.84 (3H, m), 6.72–6.70 (2H, m), 6.60–6.58 (2H, m), 5.45 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 5.32 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 4.81, 4.51 (each 1H, ABq, *J* = 12.6 Hz), 4.79, 4.43 (each 1H, ABq, *J* = 12.0 Hz), 4.53, 4.51 (each 1H, ABq, *J* = 13.8 Hz), 4.51, 4.50 (each 1H, ABq, *J* = 13.2 Hz), 4.35 (1H, dt, *J* = 5.7, 6.9 Hz), 4.26 (1H, dd, *J* = 8.6, 10.9 Hz), 4.22–4.15 (3H, m), 3.83 (1H, dt, *J* = 2.3, 8.9 Hz), 3.72 (1H, dd, *J* = 4.0, 9.7 Hz), 3.64 (3H, s), 3.58–3.53 (2H, m), 3.45–3.40 (3H, m), 3.13 (1H of OH, d, *J* = 1.7 Hz).

Allyl 2,3,4,6-penta-*O*-acetyl-β-D-glucopyranoside (22).

化合物 **21** (110.2 mg, 0.2823 mmol) を CH_2Cl_2 (2.1 mL) に溶解し、氷冷下で、AllOH (31 μL, 0.45 mmol)、$BF_3{\cdot}Et_2O$ (0.15 mL, 1.2 mmol)を加えた。室温で 2 時間撹拌後、氷冷下で、AllOH (15 μL, 0.22 mmol)、$BF_3{\cdot}Et_2O$ (0.07 mL, 0.6 mmol) を加えた。室温で 2 時間 50 分撹拌後、氷冷下で、AllOH (15 μL, 0.22 mmol)、$BF_3{\cdot}Et_2O$ (0.07 mL, 0.6 mmol) を加えた。室温で 1 時間撹拌後、反応液を EtOAc (40 mL) で希釈し、飽和重曹水 (40 mL)、飽和食塩水 (40 mL) で洗浄した。有機相を乾燥後、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane/EtOAc = 5:2) にて精製し、化合物 **22** を無色シロップとして 68.9 mg (63%) 得た。

化合物 **22** (既知)[84]: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 5.84 (1H, ddt, *J* = 17.2, 10.3, 5.7 Hz), 5.28 (1H, dd, *J* = 1.7, 17.2 Hz), 5.20 (2H, dd, *J* = 1.7, 10.3 Hz), 5.20 (1H, t, *J* = 9.2 Hz), 5.10 (1H, t, *J* = 9.7 Hz), 5.03 (1H, dd, *J* = 8.0, 9.2 Hz), 4.56 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 4.34 (1H, dd, *J* = 5.2, 13.1 Hz), 4.27 (1H, dd, *J* = 4.6, 12.0 Hz), 4.15 (1H, dd, *J* = 2.3, 12.0 Hz), 4.10 (1H, dd, *J* = 5.7, 13.1 Hz), 3.71–3.67 (1H, m), 2.09 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.01 (3H, s).

Allyl β-D-glucopyranoside (23).

化合物 **22** (0.204 g, 0.341 mmol) を MeOH (50 mL) 溶液に溶解し、氷冷下、NaOMe (2.5 mL, 12.3 mmol, 28% in MeOH) を添加し、室温で 1 時間撹拌後、0°C 下で Amberlyst 15E を用いて中和した。反応液を濾過し、減圧濃縮し、残渣 (**23**) を得た。得られた残渣は精製せず、そのまま次の反応に使用した。

Allyl 4,6-*O*-benzylidene-β-D-glucopyranoside (24).

残渣 (**23**) を DMF (100 mL) に溶解し、BDA (3.40 mL, 23.0 mmol) と $TsOH{\bullet}H_2O$ (0.198 g, 1.15 mmol) を加えた。室温で 19 時間撹拌後、反応液を $CHCl_3$ (800 mL)

で希釈し、飽和重曹水(40 mL) で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥後、減圧下で溶媒を除去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane:EtOAc = 2:1, v/v) で精製して 化合物 **24** を白色固体として 68.9 mg (63%, 2steps) 得た。

化合物 **24** (既知)[85]: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.50–7.48 (2H, m), 7.39–7.35 (3H, m), 5.94 (1H, ddt, *J* = 17.2, 10.3, 5.7 Hz), 5.34 (1H, dd, *J* = 1.2, 17.2 Hz), 5.25 (1H, *J* = 1.2, 10.3 Hz), 5.23 (1H, s), 4.45 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 4.39 (1H, dd, *J* = 5.2, 12.6 Hz), 4.34 (1H, dd, *J* = 5.2, 10.6 Hz), 4.15 (1H, dd, *J* = 6.3, 12.6 Hz), 3.81 (1H, t, *J* = 9.2 Hz), 3.79 (1H, t, *J* = 10.3 Hz), 3.57–3.51 (2H, m), 3.45 (1H, m), 2.94 (1H, br-s), 2.80 (1H, br-s).

Allyl 2,3-di-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-β-D-glucopyranoside (25).

化合物 **24** (120 mg, 0.388 mmol) を DMF (2.0 mL)に溶解し、氷冷下で NaH (55% in oil, 52.5 mg, 1.20 mmol) を加えた。室温で 30 分撹拌後、氷冷下で BnBr (138 μL, 1.16 mmol) を加えた。室温で 1 時間 30 分撹拌後、氷冷下で NaH (55% in oil, 24.2 mg, 0.55 mmol)、BnBr (70 μL, 0.59 mmol) を加えた。室温で13 時間撹拌後、氷冷下で MeOH (1.0 mL) を加えクエンチした。反応液を EtOAc (50 mL) で希釈し、飽和重曹水 (50 mL)、飽和食塩水 (50 mL) で洗浄した。有機相を乾燥後、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane/EtOAc = 15 : 1) にて精製し、化合物 **25** を白色固体として 185.0 mg (98%) 得た。

化合物 **25** (既知)[84]:^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.51–7.49 (2H, m), 7.41–7.23 (13H, m), 5.96 (1H, ddt, *J* = 17.2, 10.3, 5.7 Hz), 5.57 (1H, s), 5.36 (1H, dd, *J* = 1.7, 17.2 Hz), 5.22 (1H, dd, *J* = 1.7, 10.3 Hz), 4.80, 4.91 (2H, ABq, *J* = 11.5 Hz), 4.77, 4.91 (each 1H, ABq, *J* = 10.9 Hz), 4.56 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 4.41 (1H, dd, *J* = 5.2, 12.6 Hz), 4.35 (1H, dd, *J* = 5.2, 10.3 Hz), 4.16 (1H, dd, *J* = 6.3, 12.6 Hz),

3.82–3.73 (2H, m), 3.69 (1H, t, *J* = 9.2 Hz), 3.50 (1H, t, *J* = 8.0 Hz), 3.44–3.38 (1H, m).

Allyl 2,3,6-tri-*O*-benzyl-β-D-glucopyranoside (26).

化合物 **25** (60.8 mg, 0.388 mmol) を DMF (2.0 mL) に溶解し、-40°C で BF_3•Et_2O (31.0 μL, 0.250 mmol) と Et_3SiH (0.400 mL, 2.50 mmol) を加えた。反応溶液を -20°C で 13 時間撹拌した後、反応温度を 0°C にまで上昇させ、さらに 1 時間撹拌した。反応溶液を EtOAc (40 mL) で希釈し、飽和重曹水 (40 mL) と brine (40 mL) で洗浄し、有機層を Na_2SO_4 で乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane:EtOAc = 4:1, v/v) で精製し化合物 **26** を白色固体として 50.3 mg (82%) 得た。

化合物 **26** (既知)[86]: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.38–7.25 (15H, m), 6.00–5.91 (1H, m), 5.34 (1H, dd, *J* = 1.2, 17.2 Hz), 5.20 (1H, dd, *J* = 1.2, 10.6 Hz), 4.96, 4.93 (each 1H, ABq, *J* = 11.5 Hz), 4.73, 4.71 (each 1H, ABq, *J* = 10.9 Hz), 4.61, 4.57 (each 1H, ABq, *J* = 12.0 Hz), 4.47 (1H, dd, *J* = 2.3, 5.2 Hz), 4.42 (1H, dd, *J* = 5.2, 12.6 Hz), 4.14 (1H, dd, *J* = 6.3, 12.6 Hz), 3.77 (1H, dd, *J* = 3.4, 10.3 Hz), 3.70 (1H, dd, *J* = 5.7, 10.3 Hz), 3.62–3.55 (1H, m), 3.48–3.41 (3H, m).

Phenyl 2,3-di-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-1-deoxy-1-thio-β-D-glucopyranoside (28).

化合物 **27** (0.832 g, 2.31 mmol)[87] を Pyridine (16.5 mL) に溶解し、BzCl (2.10 mL, 18.0 mmol) を添加したのちに 40°C に昇温した。反応液を EtOAc (500 mL) で希釈し、0.05 M HCl (500 mL)、飽和重曹水(500 mL)、brine (500 mL) で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥後、減圧下で溶媒を除去した。残渣はカラムクロマトグラフィ

ー (Hexane:EtOAc = 5:1 → 3:1 → 1:2, v/v) で精製し、化合物 **28** を白色固体として 1.21 g (92%) 得た。

化合物 **28** (既知)[88]: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.98–7.92 (4H, m), 7.54–7.29 (16H, m), 5.80 (1H, t, *J* = 9.7 Hz), 5.54 (1H, s), 5.48 (1H, t, *J* = 9.7 Hz), 5.03 (1H, d, *J* = 10.3 Hz), 4.46 (1H, dd, *J* = 5.2, 10.3 Hz), 3.92–3.86 (2H, m), 3.75 (1H, ddd, *J* = 5.2, 9.5, 9.7 Hz).

Allyl 2,3-di-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidene-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-benzyl -β-D-glucopyranoside (29).

CH_2Cl_2 (16.0 mL) に化合物 **28** (0.542 g, 0.953 mmol)、化合物 **26** (0.376 g, 0.767 mmol)、MS 4A (4.79 g) を混合して 0°C に冷却し、MeOTf (0.600 mL, 5.47 mmol) を添加した。室温で 9 時間撹拌した後、0°C 下で MeOTf (0.300 mL, 2.70 mmol) を添加した。さらに室温で 15 時間撹拌後、0°C に冷却し、Et_3N (0.200 mL) にてクエンチした。混合物をセライト濾過した。残渣を EtOAc (100 mL) で希釈し、飽和重曹水 (200 mL) と brine(200 mL) で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥し、濾過し、減圧濃縮した。残渣を中圧液体クロマトグラフィー (Hexane:EtOAc = 99:1 → 90:10, 15 mL/min) で精製し、化合物 **29** を白色固体として 666.3 mg (92%, β only) 得た。

化合物 **29**:^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.95–7.85 (4H, m), 7.54–7.23 (26H, m), 5.95–5.85 (1H, m), 5.60 (1H, t, *J* = 9.7 Hz), 5.44 (1H, s), 5.40 (1H, t, *J* = 9.7 Hz), 5.28 (1H, dd, *J* = 1.7, 17.2 Hz), 5.16 (1H, dd, *J* = 1.7, 10.3 Hz), 4.91–4.86 (2H, m), 4.95, 4.83 (each 1H, ABq, *J* = 10.9 Hz), 4.70, 4.66 (each 1H, ABq, *J* = 11.5 Hz), 4.37–4.33 (3H, m), 4.20 (1H, dd, *J* = 5.2, 10.6 Hz), 4.05 (1H, dd, *J* = 6.3, 12,6 Hz), 4.00 (1H, t, *J* = 9.2 Hz), 3.79 (1H, t, *J* = 9.7 Hz), 3.61 (1H, dd, *J* = 3.4, 10.9 Hz), 3.57–3.52 (2H, m), 3.49 (1H, dd, *J* = 1.2, 10.9 Hz), 3.43 (1H, t, *J* = 9.2

Hz), 3.40–3.34 (1H, m), 3.20–3.16 (1H, m); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 165.7, 165.2, 139.3, 138.7, 138.1, 137.0, 134.2, 133.5, 133.2, 129.9, 129.6, 129.2, 128.8, 128.6, 128.39, 128.35, 128.2, 127.7, 127.6, 126.3, 117.4, 102.7, 101.6, 101.0, 82.9, 81.8, 79.0, 75.6, 75.1, 74.5, 73.7, 73.1, 72.4, 70.4, 68,7, 67.8, 66.5; HRMS calcd for $C_{57}H_{56}O_{13}Na$ [*M*+Na]$^+$ *m/z* 971.3619, found 971.3617.

Allyl 2,3-di-*O*-benzoyl-6-*O*-benzyl-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-benzyl-β-D-glucopyranoside (30).

化合物 **29** (36.0 mg, 37.9 μmol) の CH_2Cl_2 溶液 (4.0 mL) に、-96°C で TfOH (11.0 μL, 0.130 mmol) と Et_3SiH (18.0 μL, 0.110 mmol) を添加し、反応液を -80°C で 2 時間撹拌した。その後、-96°C 下に冷却し、Et_3N (0.100 mL) でクエンチした。反応液をセライト濾過した。残渣を EtOAc (100 mL) で希釈し、飽和重曹水 (100 mL) と brine (100 mL) で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane:EtOAc = 3:1, v/v) で精製し、化合物 **30** を白色固体として 34.5 mg (96%) 得た。

化合物 **30**:^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.97–7.93 (4H, m), 7.52–7.21 (26H, m), 5.94–5.86 (1H, m), 5.37–5.32 (2H, m), 5.28 (1H, dd, *J* = 1.7, 17.2 Hz), 5.15 (1H, dd, *J* = 1.7, 10.3 Hz), 4.84 (1H, d, *J* = 7.5 Hz), 4.98, 4.81 (2H, ABq, *J* = 11.5 Hz), 4.87, 4.68 (each 1H, ABq, *J* = 10.9 Hz), 4.61 (1H, ABq, *J* = 12.0 Hz), 4.43, 4.39 (2H, ABq, *J* = 12.0 Hz), 4.37–4.30 (3H, m), 4.05 (1H, dd, *J* = 6.3, 12,6 Hz), 3.94 (1H, dd, *J* = 9.2 Hz), 3.92–3.87 (1H, m), 3.63–3.49 (5H, m), 3.45–3.39 (2H, m), 3.22–3.19 (1H, m); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 166.9, 165.2, 139.5, 138.7, 138.2, 137.7, 134.2, 133.4, 130.1, 129.9, 129.4, 128.8, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.8, 127.7, 127.6, 127.3, 117.4, 102.7, 100.5, 82.9, 81.9,

76.3, 75.3, 75.0, 74.5, 73.9, 73.7, 73.6, 72.2, 70.9, 70.4, 68.0; HRMS calcd for $C_{57}H_{58}O_{13}Na$ $[M+Na]^+$ *m/z* 973.3775, found 973.3756.

Methyl 4,6-*O*-benzylidene-1-deoxy-1-thio-α-D-mannopyranoside (33).

0°C に冷却した MeOH (100 mL) 中の 化合物 **31** (2.54 g, 6.69 mmol) の溶液に、NaOMe (10.0 mL, 49.0 mmol, 28% in MeOH) を添加した。反応液を室温で 2 時間撹拌後、0°C 下で Amberlyst 15E を使用し、中和した。混合物を濾過し、減圧濃縮後、残渣 (**32**) を DMF (125 mL) と Toluene (375 mL) に溶解し、BDA (5.00 mL, 33.5 mmol) と $TsOH•H_2O$ (0.353 g, 2.05 mmol) で処理した。室温で 19 時間撹拌した後、減圧濃縮し、残渣を $CHCl_3$ (1.0 L) で希釈し、飽和重曹水 (1.0 L) で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥後、減圧下で溶媒を除去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane:EtOAc = 1:2, v/v) で精製し、化合物 **33** を白色固体として 1.18 g (59%, 2 steps) 得た。

化合物 **33** (既知)[89]: ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.45–7.42 (2H, m), 7.39–7.34 (3H, m), 6.10 (1H, s), 5.50 (1H, br-s), 4.37 (1H, dd, *J* = 5.4, 7.7 Hz), 4.16 (1H, br-d, *J* = 5.7 Hz), 3.94 (1H, ddd, *J* = 2.3, 6.0, 10.0 Hz), 3.90 (1H, dd, *J* = 2.3, 12.0 Hz), 3.78–3.72 (2H, m), 2.15 (3H, s).

Methyl 4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-2-naphthylmethyl-1-deoxy-1-thio-α-D-mannopyranoside (34).

化合物 **33** (209 mg, 0.702 mmol) を DMF (4.0 mL) に溶解し、0°C 下で Me_2SnCl_2 (16.3 mg, 0.0742 mmol)、Ag_2O (182 mg, 0.784 mmol)、NAPBr (360 mg, 1.63 mmol) を加え、室温下で 30 分間攪拌した。その後、0°C 下で Me_2SnCl_2 (22.3 mg, 0.102 mmol) を加え、室温下で 24 時間攪拌した。その後、0°C 下で Me_2SnCl_2

(20.3 mg, 0.0924 mmol)、Ag_2O (224 mg, 0.968 mmol)、NAPBr (332 mg, 1.50 mmol) を加え、室温下で 46 時間攪拌した。反応後、EtOAc (150 mL)にて反応液をセライトろ過し、飽和重曹水 (150 mL)、飽和食塩水 (150 mL) で洗浄した。有機層を乾燥後、減圧濃縮し、残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー(Hexane : EtOAc = 80 : 20 → 59 : 41 → 20 : 80) にて精製し、白色結晶として化合物 **34** を 148 mg (48 %) を得た。また、原料 **33** を 64.8mg (31%) 回収した。

化合物 **34**: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.37–7.32 (12H, m), 5.56 (1H, s), 5.18 (1H, br-s), 4.92, 4.80 (each 1H, ABq, *J* = 12.0 Hz), 4.23–4.06 (4H, m), 3.92 (1H, dd, *J* = 3.4, 9.2 Hz), 3.85 (1H, t, *J* = 9.5 Hz), 2.04 (3H, s), 1.21 (1H, t, *J* = 7.2 Hz); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 137.6, 135.3, 133.4, 133.2, 129.2, 129.1, 128.43, 128.40, 128.35, 128.1, 127.8, 126.8, 126.31, 126.28, 126.2, 125.8, 101.8, 85.8, 79.2, 76.0, 73.2, 71.3, 68.9, 63.9, 13.7; HRMS calcd for $C_{25}H_{26}O_5SNa$ [*M*+Na]$^+$ *m/z* 461.1399, found 461.1393.

Methyl 2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-2-naphthylmethyl-1-deoxy-1-thio-α-D-mannopyranoside (35).

化合物 **34** (0.677 g, 1.54 mmol) を DMF (13.5 mL) に溶解し、0°C 下で NaH 55% in oil (103.9 mg, 2.381 mmol) を加え、0°C 下で 5 分間攪拌した。その後、BnBr (0.220 mL, 1.85 mmol)を加え、0°C 下で 5 分間攪拌した。その後、室温下で 1 時間攪拌した。その後 55% in oil (44.3 mg, 1.02 mmol), BnBr (50.0 µL, 0.421 mmol) を加え、室温下で 30 分間攪拌した。反応後、Hexane (30mL)、EtOAc (10 mL)にて反応液を希釈し、飽和塩化アンモニウム (40 mL)、飽和食塩水 (40 mL) で洗浄した。有機層を乾燥後、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー

(Toluene : EtOAc = 100 : 0 → 50 : 1 → 40 : 1) にて精製し、白色結晶として化合物 **35** を 671.2 mg (82%) 得た。

化合物 **35:** ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.82–7.13 (17H, m), 5.66 (1H, s), 5.21 (1H, d, *J* = 1.2 Hz), 4.90, 4.76 (each 1H, ABq, *J* = 11.7 Hz), 4.75 (2H, t, *J* = 12.6 Hz), 4.32 (1H, dd, *J* = 9.6, 9.7Hz), 4.23 (1H, dd, *J* = 3.9, 10.0 Hz), 4.16 (1H, dt, *J* = 3.9, 9.6 Hz), 3.98 (1H, dd, *J* = 3.9, 9.7 Hz), 3.94–3.90 (2H, m), 2.07 (3H, s); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 138.0, 137.8, 136.0, 133.4, 133.1, 129.0, 128.6, 128.4, 128.2, 128.1, 128.0, 127.8, 126.4, 126.3, 126.1, 125.9, 125.8, 101.7, 85.0, 79.3, 77.9, 76.6, 73.2, 73.1, 68.8, 64.7, 13.9; HRMS calcd for $C_{25}H_{26}O_5SNa$ $[M+Na]^+$ *m/z* 551.1868, found 551.1867.

Methyl 4,6-*O*-benzylidene-2-*O*-pivaloyl-1-thio-α-D-mannopyranoside (36)

化合物 **33** (426 mg, 1.43 mmol) を CH_2Cl_2 (8.5 mL) と CH_3CN (8.5 mL) の混合溶媒に溶解し、0°C で PivCl (0.200 mL, 1.62 mmol)、KI (46.4 mg, 0.280 mmol)、Ag_2O (0.359 g, 1.55 mmol) を添加した。室温下で 2 時間撹拌した後、セライト濾過し、EtOAc (100 mL) で希釈した。飽和重曹水 (100 mL) と brine (100 mL) で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥、濾過、減圧濃縮した。残渣を中圧液体クロマトグラフィー (Hexane:EtOAc = 96:4 → 82:18, 15 mL/min) で精製し、化合物 **36** を白色固体として 0.366 g (69%) 得た。

化合物 **36**: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.52–7.50 (2H, m), 7.40–7.36 (3H, m), 5.60 (1H, br-s), 5.27 (1H, br-d, *J* = 3.4 Hz), 5.11 (1H, s), 4.27–4.18 (3H, m), 3.88 (1H, t, *J* = 9.5 Hz), 3.83 (1H, t, *J* = 10.0 Hz), 2.39 (1H, br-s), 2.15 (3H, s), 1.28 (9H, s); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 178.0, 137.2, 129.5, 126.5, 102.4, 84.8,

79.8, 73.3, 68.8, 68.0, 64.1, 39.3, 27.3, 14.1; HRMS calcd for $C_{19}H_{26}O_6SNa$ [*M*+Na]$^+$ *m/z* 405.1348, found 405.1341.

Methyl 4-*O*-benzyl-2-*O*-pivaloyl-1-deoxy-1-thio-α-D-mannopyranoside (37).

化合物 **36** (0.178 g, 0.466 mmol) を CH_2Cl_2 (3.8 mL) に溶解し、-100°C で $PhBCl_2$ (0.190 mL, 1.44 mmol) と Et_3SiH (0.220 mL, 1.38 mmol) を添加した。反応混合物を 30 分撹拌した後、残渣を EtOAc (100 mL) で希釈し、飽和重曹水 (100 mL) と brine (100 mL) で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥、濾過、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane:EtOAc = 4:1, v/v) で精製して、化合物 **37** を白色固体として 0.170 g (95%) 得た。.

化合物 **37**: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.40–7.29 (5H, m), 5.17 (1H, dd, *J* = 1.7, 3.4 Hz), 5.09 (1H, d, *J* = 1.7 Hz), 4.79, 4.74 (each 1H, ABq, *J* = 11.5 Hz), 4.10 (1H, dd, *J* = 3.4, 9.2 Hz), 4.01–3.97 (1H, m), 3.90–3.80 (2H, m), 3.77 (1H, t, *J* = 9.2 Hz), 2.12 (3H, s), 1.24 (9H, s); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 178.1, 138.1, 128.9, 128.4, 128.3, 83.9, 75.4, 75.0, 73.6, 72.1, 71.2, 62.1, 39.3, 27.3, 14.1; HRMS calcd for $C_{19}H_{28}O_6SNa$ [*M*+Na]$^+$ *m/z* 407.1504, found 407.1501.

Methyl 3,6-di-*O*-acetyl-4-*O*-benzyl-1-deoxy-1-thio-α-D-mannopyranoside (38).

Pyridine (1.0 mL) 中の 化合物 **37** (15.5 mg, 0.0403 mmol) 溶液に Ac_2O (0.100 mL) を加えた。40°C で 4 時間撹拌した後、残渣を EtOAc (30 mL) で希釈し、飽和硫酸銅水溶液 (60 mL)、飽和重曹水 (30 mL)、brine (30 mL) で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥、濾過、減圧濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー

(Hexane:EtOAc = 4:1, v/v) で精製し、化合物 **38** を白色固体として 17.7 mg (94%) 得た。

化合物 **38**: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.36–7.27 (5H, m), 5.33 (1H, dd, *J* = 1.4, 3.0 Hz), 5.29 (1H, dd, *J* = 3.0, 9.6 Hz), 5.10 (1H, d, *J* = 1.4 Hz), 4.65, 4.59 (each 1H, ABq, *J* = 11.5 Hz), 4.37–4.25 (3H, m), 3.87 (1H, dd, *J* = 9.6, 9.7 Hz), 2.13 (3H, s), 2.05 (3H, s), 1.96 (3H, s), 1.25 (9H, s); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 177.2, 170.7, 169.7, 137.5, 128.7, 128. 3, 128.2, 83.5, 74.8, 72.7, 72.6, 71.0, 70.0, 63.1, 39.2, 27.2, 20.94, 20.92, 13.8; HRMS calcd for $C_{23}H_{32}O_8SNa$ [*M*+Na]$^{+}$ *m/z* 491.1716, found 491.1711.

4-Methoxyphenyl 2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-2-naphthylmethyl-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-*N*-phtalimide-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-*N*-phtalimide-β-D-glucopyranoside (39).

BSP (30.8 mg, 0.147 mmol)、TTBP (65.9 mg, 0.265 mmol)、Activated MS 4A (958 mg)、化合物 **35** (69.9 mg, 0.132 mmol) を混合した CH_2Cl_2 (3.0 mL) に、-60°C 下にて Tf_2O (22.0 μL, 0.134 mmol) を加え、-60°C 下で 5 分間攪拌した。その後、-60°C 下にて化合物 **20** (176 mg, 0.165 mmol) が溶解した CH_2Cl_2 (1.0 mL) を加え、-60°C 下で 5 分間攪拌した。その後、室温に昇温し、30 分間攪拌した。その後、0°C 下で Et_3N (0.10 mL) を加え、反応をクエンチした。反応後、反応液をセライトろ過し、EtOAc (150 mL) にて洗浄・希釈した。飽和重曹水 (100 mL)、飽和食塩水 (100 mL) で洗浄した。有機層を乾燥後、減圧濃縮し、残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー (Toluene : EtOAc = 100 : 0 → 92 : 8 → 60 : 40) にて精製し、さらに中圧分取液体クロマトグラフィー (Toluene : EtOAc = 100 : 0 → 94 : 6) にて精製し、さら

に中圧分取液体クロマトグラフィー(Hexane : EtOAc = 67 : 33 → 46 : 54) にて精製し、白色結晶として化合物 **39β** を 68.7 mg (34%)、化合物 **39α** を 35.0 mg (17%) 得た。

化合物 **39β**: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.87–6.58 (49H, m), 5.53 (1H, s), 5.46 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 5.30 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 4.92–4.84 (4H, m), 4.74 (1H, d, *J* = 12.6 Hz), 4.57–4.05 (16H, m), 3.79 (1H, br-d), 3.64 (3H, s), 3.62–3.37 (9H, m), 3.24 (1H, br-d), 3.13 (1H, dt, *J* = 4.8, 9.6 Hz); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 168.6, 167.7, 155.4, 151.0, 139.0, 138.8, 138.7, 138.5, 138.0, 137.9, 137.8, 134.2, 134.0, 133.8, 131.9, 131.7, 131.6, 129.2, 129.0, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 127.94, 127.89, 127.80, 127.76, 127.5, 127.1, 126.29, 126.26, 126.0, 125.6, 125.5, 123.8, 123.4, 123.3, 118.7, 114.4, 102.0, 101.6, 97.6, 97.3, 79.4, 78.8, 78.4, 77.4, 77.1, 76.8, 76.1, 75.3, 74.8, 74.7, 74.6, 73.3, 72.8, 72.6, 68.7, 68.2, 68.1, 67.4, 56.7, 55.8, 55.6, 21.6; HRMS calcd for $C_{94}H_{86}O_{19}SN_2Na$ [*M*+Na]$^{+}$ *m/z* 1570.5756, found 1570.5778.

4-Methoxyphenyl 2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-*N*-phtalimide-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-*N*-phtalimide-β-D-glucopyranoside (40).

化合物 **39** (26.2 mg, 0.0169 mmol) を CH_2Cl_2 (2.0 mL)、H_2O (0.10 mL) に溶解し、0°C 下で β-pinene (12.0 μL, 0.0720 mmol), DDQ (8.00 mg, 0.0350 mmol) を加え、室温下で 1 時間攪拌した。その後、0°C 下で 11 時間攪拌した。その後、0°C 下で β-pinene (6.00 μL, 0.0360 mmol), DDQ (3.10 mg, 0.0130 mmol) を加え、室温下で 4.5 時間攪拌した。その後、0°C 下で β-pinene (6.00 μL, 0.0360 mmol), DDQ (2.60 mg, 0.0110 mmol) を加え、室温下で 3 時間攪拌した。反応後、EtOAc (40

mL)にて反応液を希釈し、飽和重曹水 (40 mL)、飽和食塩水 (40 mL) で洗浄した。有機層を乾燥後、減圧濃縮し、残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー (Toluene : EtOAc = 94 : 6 → 64 : 36, 10 mL/min.) にて精製し、白色結晶として化合物 **40** を 20.5 mg (86%) 得た。

化合物 **40**: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.88–6.58 (42H, m), 5.46 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 5.42 (1H, s), 5.30 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 5.01 (1H, d, *J* = 11.5 Hz), 4.91–4.88 (2H, m), 4.68–4.10 (16H, m), 3.72–3.66 (3H, m), 3.65 (3H, s), 3.59-3.41 (6H, m), 3.24 (1H, br-d, *J* = 9.7 Hz), 3.11 (1H, dt, *J* = 4.8, 9.7 Hz); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 168.6, 167.6, 155.3, 150.9, 138.9, 138.6, 138.5, 138.3, 138.0, 137.8, 137.3, 134.2, 133.8, 129.1, 128.7, 128.6, 128.33, 128.29, 128.01, 127.95, 127.9, 127.7, 127.4, 127.1, 127.0, 126.4, 125.4, 123.8, 123.4, 123.2, 118.7, 114.3, 102.0, 97.6, 97.2, 79.5, 79.3, 79.0, 77.4, 76.8, 76.0, 75.9, 74.7, 74.6, 73.5, 72.7, 71.0, 68.6, 68.2, 67.9, 66.9, 56.6, 55.7, 55.6, 21.2; HRMS calcd for $C_{83}H_{78}O_{19}N_2Na$ $[M+Na]^+$ *m/z* 1429.5096, found 1429.5095.

Allyl 2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-2-naphthylmethyl-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-2,3-di-*O*-benzoyl-6-*O*-benzyl-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-benzyl-β-D-glucopyranoside (41).

CH_2Cl_2 (1.0 mL) に 化合物 **35** (52.0 mg, 98.4 μmol) を溶解し、BSP (33.1 mg, 0.158 mmol)、TTBP (48.5 mg, 0.195 mmol)、MS 4A (601.8 mg) を添加し、-70°C に冷却した。1 時間撹拌後、Tf_2O (24.0 μL, 0.146 mmol) の溶液を加え、さらに 20 分間撹拌した。次に、CH_2Cl_2 (1.0 mL) 中の 化合物 **30** (49.2 mg, 51.7 μmol) を添加し、室温で 1 時間撹拌した。その後、Et_3N (0.10 mL) でクエンチし、反応液をセライト濾過した。残渣を EtOAc (150 mL) で希釈し、飽和重曹水 (150 mL) と brine

(150 mL) で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥、濾過、減圧濃縮し、中圧液体クロマトグラフィー (Hexane:EtOAc = 96:2 → 84:16, 8 mL/min) とシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Toluene/EtOAc = 19:1, v/v) で精製し、化合物 **41** を白色固体として 56.2 mg (76%, β only) 得た。

化合物 **41**: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.94–7.08 (47H, m), 5.95–5.86 (1H, m), 5.52 (1H, dd, *J* = 9.5 Hz), 5.35 (1H, dd, *J* = 9.5 Hz), 5.31–5.25 (2H, m), 5.16 (1H, dd, *J* = 1.7, 10.3 Hz), 5.09 (1H, d, *J* = 11.5 Hz), 4.91–4.84 (3H, m), 4.80 (1H, d, *J* = 11.5 Hz), 4.73–4.57 (5H, m), 4.37–4.32 (4H, m), 4.27 (1H, brs), 4.09–4.03 (3H, m), 3.95 (1H, dd, *J* = 9.2 Hz), 3.81 (1H, dd, *J* = 9.2 Hz), 3.62–3.56 (3H, m), 3.55–3.40 (4H, m), 3.37–3.24 (3H, m), 3.23–3.19 (1H, m), 2.90–2.79 (2H, m); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 165.6, 165.2, 139.6, 139.0, 138.6, 138.3, 137.8, 136.2, 134.2, 133.4, 133.0, 130.6, 129.9, 129.5, 129.2, 129.0, 128.7, 128.6, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.4, 127.2, 126.3, 126.2, 126.0, 125.9, 125.5, 117.4, 102.7, 102.5, 101.4, 100.8, 83.2, 81.9, 78.3, 77.9, 77.6, 76.7, 76.1, 75.3, 75.1, 74,7, 74.5, 73.6, 73.5, 72.6, 72.2, 70.4, 68.4, 68.2, 68.0, 67.4; HRMS calcd for $C_{88}H_{86}O_{18}Na$ $[M+Na]^+$ *m/z* 1453.5703, found 1453.5703.

Allyl 2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-2,3-di-*O*-benzoyl-6-*O*-benzyl-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-benzyl-β-D-glucopyranoside (42).

化合物 **41** (44.1 mg, 30.8 μmol) を CH_2Cl_2 (2.0 mL) と H_2O (0.10 mL) に溶解し、0°C 下で β-pinene (19.0 mL, 0.115 mmol) と DDQ (14.3 mg, 63.0 μmol) を添加した。反応液を 0°C で 19 時間撹拌した後、β-pinene (10.0 mL, 60.5 μmol) と DDQ (7.8 mg, 34.4 μmol) を添加した。さらに 0°C で 21 時間撹拌した後、β-

pinene (10.0 mL, 60.5 μmol) と DDQ (6.9 mg, 30.4 μmol) を添加し、室温でさらに 3 時間撹拌した。残渣を EtOAc (40 mL) で希釈し、飽和重曹水 (40 mL) と brine (40 mL) で洗浄し、有機層を Na_2SO_4 で乾燥、濾過、減圧濃縮した。残渣を中圧液体クロマトグラフィー (Toluene:EtOAc = 78:22 → 65:35, 15 mL/min) で精製して、化合物 **42** を白色固体として 34.2 mg (86%) 得た。

化合物 **42**: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.95–7.19 (40H, m), 5.95–5.86 (1H, m), 5.50 (1H, t, *J* = 9.7 Hz), 5.38 (1H, dd, *J* = 8.0, 9.7 Hz), 5.28 (1H, dd, *J* = 1.7, 17.2 Hz), 5.18–5.14 (2H, m), 5.12 (1H, m), 5.01 (1H, ABq, *J* = 11.5 Hz), 4.80–4.80 (3H, m), 4.66 (1H, ABq, *J* = 10.9 Hz), 4.60 (1H, ABq, *J* = 12.0 Hz), 4.51 (1H, ABq, *J* = 12.0 Hz), 4.39–4.30 (5H, m), 4.20 (1H, ABq, *J* = 12.0 Hz), 4.14–4.03 (2H, m), 3.97 (1H, t, *J* = 9.5 Hz), 3.63–3.41 (8H, m), 3.38–3.33 (2H, m), 3.31–3.27 (1H, m), 3.24–3.20 (1H, m), 2.89–2.83 (1H, m), 2.67 (1H, t, *J* = 10.3 Hz); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 165.5, 165.1, 139.6, 138.6, 138.4, 137.6, 137.3, 134.1, 133.4, 133.0, 130.5, 129.9, 129.4, 129.2, 128.8, 128.7, 128.64, 128.61, 128.4, 128.34, 128.30, 128.12, 128.07, 127.7, 127.4, 127.2, 126.4, 117.4, 102.7, 102.3, 101.9, 100.7, 83.2, 81.9, 79.0, 78.6, 77.5, 76.6, 75.5, 75.3, 75.0, 74.7, 74.5, 73.7, 73.6, 73.5, 72.5, 70.6, 70.4, 68.2, 67.8, 66.9; HRMS calcd for $C_{77}H_{78}O_{18}Na$ $[M+Na]^+$ *m/z* 1313.5086, found 1313.5077.

4-Methoxyphenyl 2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-α-D-mannopyranosyl-(1→3)-2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-*N*-phtalimide-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-*N*-phtalimide-β-D-glucopyranoside (43).

AgOTf (70.8 mg, 0.276 mmol)、Cp_2HfCl_2 (53.1 mg, 0.140 mmol)、Activated MS 4A (281 mg) 、Toluene (1.0 mL)を Ar・室温下で加えた。30 分間の撹拌した後、0°C に冷却し、化合物 **5** (84.6 mg, 0.171 mmol) と化合物 **40** (58.0 mg, 0.0412 mmol) を加えた。室温に昇温し、40 分間攪拌した。その後、0°C に冷却し、Et_3N (200 μL) を加え、クエンチした。反応後、反応液をセライトろ過し、EtOAc (150 mL) にて洗浄・希釈した。飽和重曹水 (100 mL)、飽和食塩水 (100 mL) で洗浄した。有機層を乾燥後、減圧濃縮し、残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー(Hexane : EtOAc = 78 : 22 → 57 : 43 → 52 : 48) にて精製し、白色結晶として化合物 **43** を 49.5 mg (64%, α only) 得た。

化合物 **43**: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.88–6.58 (57H, m), 5.59 (1H, dd, *J* = 1.7, 3.4 Hz), 5.47 (1H, s), 5.45 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 5.32 (1H, d, *J* = 1.7 Hz), 5.28 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 4.90–3.37 (41H, m), 3.23 (1H, br-d, *J* = 9.7 Hz), 3.06 (1H, dt, *J* = 5.2, 9.7 Hz), 2.08 (3H, s); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 171.3, 170.2, 168.6, 167.7, 155.4, 151.0, 139.0, 138.7, 138.5, 138.2, 138.0, 137.9, 137.4, 134.2, 134.0, 133. 8, 131.9, 131.6, 128. 9, 128.8, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.5, 127.1, 126.1, 123.8, 123.4, 123.3, 118.7, 114.4, 101.6, 101.2, 98.8, 97.6, 97.3, 79.0, 78.9, 78.5, 78.1, 77.1, 76.8, 76.1, 75.6, 74.5, 75.3, 74.9, 74.8, 74.72, 74.68, 74.3, 73.6, 73.4, 72.8, 72.4, 71.8, 69.1, 68.5, 68.2, 67.9, 67.0, 56.7, 55.8, 55.7, 21.2, 14.4; HRMS calcd for $C_{112}H_{108}O_{25}N_2Na$ $[M+Na]^+$ *m/z* 1904.7172, found 1904.7180.

4-Methoxyphenyl 2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-α-D-mannopyranosyl-(1→3)-2,4-di-*O*-benzyl-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-*N*-

phtalimide-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-*N*-phtalimide-β-D-glucopyranoside (44).

化合物 **43**(49.5 mg, 0.0263 mmol)を CH_2Cl_2 (1.0 mL) に溶解し、-100°C 下で $PhBCl_2$ (11.0 μL, 0.0859 mmol)、Et_3SiH (4.20 μL, 0.0264 mmol) を加え、-100°C 下で 20 分間攪拌した。その後、-100°C 下で $PhBCl_2$ (11.0 μL, 0.0859 mmol)、Et_3SiH (4.20 μL, 0.0264 mmol) を加え、-100°C 下で 30 分間攪拌した。その後、-100°C 下で $PhBCl_2$ (11.0 μL, 0.0859 mmol)、Et_3SiH (4.20 μL, 0.0264 mmol) を加え、-100°C 下で40 分間攪拌した。その後、-100°C 下で $PhBCl_2$ (11.0 μL, 0.0859 mmol), Et_3SiH (4.20 μL, 0.0264 mmol) を加え、-100°C 下で 1 時間攪拌した。反応後、クロロホルム (120 mL)、飽和重曹水 (40 mL) で洗浄した。有機層を乾燥後、減圧濃縮し、残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー (Toluene : EtOAc = 99 : 1 → 93 : 7 → 70 : 30, 10mL/min.) にて精製し、白色結晶として化合物 **44** を 49.4 mg (99%) 得た。

化合物 **44**: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.88–6.58 (57H, m), 5.59–5.45 (2H, m), 5.29 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 5.17 (1H, d, *J* = 1.4 Hz), 4.97–3.25 (44H, m), 3.07–3.04 (1H, m), 2.10 (3H, s); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 170.2, 168.7, 167.7, 155.4, 151.0, 138.8, 138.7, 138.5, 138.2, 138.0, 137.9, 134.3, 134.1, 133.8, 131.9, 131.6, 129.2, 128.8, 128.6, 128.5, 128.4, 128.33, 128.26, 128.2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.5, 127.2, 127.1, 127.1, 125.5, 123.9, 123.4, 123.3, 118.7, 114.4, 101.0, 99.8, 97.6, 97.4, 80.8, 78.5, 78.3, 78.1, 77.0, 75.6, 75.1, 74.9, 74.84, 74.75, 74.5, 74.4, 73.6, 73.4, 72.9, 72.5, 72.0, 69.2, 68.9, 68.2, 67.7, 62.1, 56.6, 55.8, 55.7, 21.6. 21.2; HRMS calcd for $C_{112}H_{110}O_{25}N_2Na$ $[M+Na]^+$ *m/z* 1906.7329, found 1906.7327.

4-Methoxyphenyl 2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-α-D-mannopyranosyl-(1→3)-[3,6-di-*O*-acetyl-4-*O*-benzyl-2-*O*-pivaloyl-α-D-mannopyranosyl-(1→6)]-2,4-di-*O*-benzyl-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-*N*-phtalimide-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-*N*-phtalimide-β-D-glucopyranoside (45).

化合物 **38** (10.6 mg, 0.0226 mmol) と化合物 **44** (30.0 mg, 0.0159 mmol) を Toluene (1.0 mL) に溶解し、Activated MS 4A (309 mg) を加えたのち、-20°C 下にて MeOTf (70.2 μL, 0.642 mmol) を加えた。その後、室温に昇温し、40 分間攪拌した。その後、-20°C 下にて MeOTf (140 μL, 1.28 mmol) を加え、4 時間攪拌した。-20°C に冷却し、Et_3N (250 μL) を加え、クエンチした。反応後、反応液をセライトろ過し、EtOAc (150 mL) にて洗浄・希釈した。飽和重曹水 (100 mL)、飽和食塩水 (100 mL) で洗浄した。有機層を乾燥後、減圧濃縮し、残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー(Hexane : EtOAc = 74 : 26 → 60 : 40 → 50 : 50) にて精製し、白色結晶として化合物 **45** を 23.5 mg (64%, α only) 得た。

化合物 **45**: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.88–6.58 (57H, m), 5.47 (1H, dd, *J* = 1.7, 3.4 Hz), 5.42 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 5.36 (1H, dd, *J* = 2.9, 9.5 Hz), 5.27 (1H, dd, *J* = 2.3, 2.9 Hz), 5.20 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 5.14 (1H, d, *J* = 1.7 Hz), 4.98–3.16 (52H, m), 2.08 (3H, s), 1.84 (3H, s), 1.82 (3H, s), 0.98 (9H, s); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 176.7, 170.7, 170.1, 169.5, 155.3, 151.0, 139.0, 138.9, 138.8, 138.5, 138.3, 138.2, 138.1, 138.0, 137.9, 133.9, 133.8, 133.7, 132.0, 131.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 127.3, 127.1, 127.0, 126.9, 126.8, 123.6, 123.4, 123.2, 118.7, 114.4, 101.8, 99.8, 97.6, 97.4, 97.2, 81.0, 79.6, 78.1, 78.0, 76.5, 76.2, 75.4, 75.2, 75.0, 74.8, 74.5, 74.4, 74.3, 74.2, 73.6, 73.3, 72.8, 72.5, 72.2, 71.8, 69.7, 69.4, 69.1, 68.9, 68.2, 67.8, 65.7,

63.1, 56.6, 55.8, 55.7, 38.9, 27.0, 21.2, 21.0, 20.8; HRMS calcd for $C_{134}H_{138}O_{33}N_2Na$ $[M+Na]^+$ *m/z* 2326.9113, found 2326.9131.

Propyl α-D-mannopyranosyl-(1→3)-[α-D-mannopyranosyl-(1→6)]-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-2-acetoamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-2-acetoamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside ($Man_3GlcNAc_2$).

0°C 下で、MeCN (2.0 mL) と水 (0.5 mL) の混合溶媒に **45**(22.1 mg, 9.59 μmol) を溶解し、CAN (50.0 mg, 96.0 μmol) を添加した。室温で 1 時間撹拌した後、$CHCl_3$ (200 mL) で希釈し、飽和重曹水 (100 mL) で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥、濾過、減圧濃縮した。残渣 (**49**) を続いて、Ac_2O (0.100 mL)、Pyridine (2.0 mL) で 0°C で添加し、60°C で 2 時間撹拌した。その後、MeOH (0.500 mL) でクエンチし、溶液を濃縮し、Toluene 共沸した。残渣 (**50**) を続いて、$BF_3{\cdot}Et_2O$ (40 mL, 0.318 mmol)、AllOH (0.100 mL)、CH_2Cl_2 (2.0 mL) で 0°C で処理した。反応液を室温で 4 時間撹拌した後、$BF_3{\cdot}Et_2O$ (20 mL, 0.159 mmol)、AllOH (0.050 mL) を 0°C で添加し、さらに室温で 4.5 時間撹拌した。その後反応液を EtOAc (50 mL) で希釈し、飽和重曹水 (50 mL) と brine (50 mL) で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥、濾過、減圧濃縮した。残渣 (**51**) を続いて、1-BuOH (2.0 mL) と $(CH_2NH_2)_2$ (0.5 mL) を室温で添加した。反応液を 105°C で 12 時間撹拌した後、EtOH と Toluene を添加し、共沸蒸留した。残渣 (**52**) を続いて、Ac_2O (0.100 mL) と Pyridine (2.0 mL) で 0°C で処理した。反応液を 60°C で 2 時間撹拌し、減圧濃縮し、Toluene で共沸した。残渣を EtOAc (50 mL) で希釈し、飽和重曹水 (50 mL) と brine (50 mL) で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥、濾過、減圧濃縮し、残渣を中圧液体クロマトグラフィー (Hexane:EtOAc = 99:1 → 50:50, 10 mL/min) で粗精製した。濃縮後、MeOH (2.0 mL) 中の反応混合物に 0°C で NaOMe (200 μL,

0.98 mmol, 28% in MeOH) を添加し、反応液を室温で 2 時間撹拌した後、0°C で Amberlyst 15E で中和した。反応液を濾過し、減圧濃縮した。残渣 (**54**) の MeOH/H_2O 溶液 (1/1, v/v) (5.0 mL) に、$Pd(OH)_2$/C (0.111 g) と NH_4HCO_2 (0.253 g, 4.00 mmol) を添加した。反応混合物を加温マントルで 80°C で 24 時間撹拌した後、セライト層を通して濾過し、濾液と洗浄液を H_2O (200 mL) で希釈し、減圧濃縮した。残渣を中圧液体クロマトグラフィー (ODS) (H_2O:MeOH = 100:0 → 45:55, 5 mL/min) とゲルろ過クロマトグラフィー (Sephadex G-10, EtOH/H_2O = 1/4, v/v) で精製し、**Man$_3$GlcNAc$_2$** を白色固体として 3.60 mg (39%, 7 steps) 得た。

Man$_3$GlcNAc$_2$: ^{1}H NMR (500 MHz, D_2O) δ 4.91 (1H, brs), 4.72 (1H, brs), 4.59 (1H, brs), 4.41 (1H, d, *J* = 7.1 Hz), 4.31 (1H, d, *J* = 6.7 Hz), 4.07 (1H, brs), 3.88 (1H, brs), 3.78 (1H, brs), 3.73–3.32 (29H, m), 1.89 (3H, s), 1.84 (3H, s), 1.35 (2H, br-q, *J* = 6.9 Hz), 0.67 (3H, t, *J* = 6.9 Hz); ^{13}C NMR (126 MHz, D_2O with 1% MeOH-d_4) δ/ppm = 175.6, 175.5, 103.4, 102.3, 101.9, 101.3, 100.5, 81.4, 80.5, 80.2, 75.4, 75.3, 75.1, 74.4, 73.6, 73.4, 73.3, 72.9, 71.33, 71.25, 71.1, 70.9, 70.8, 67.8, 67.7, 66.7, 62.1, 61.9, 61.0, 60.9, 56.0, 55.8, 23.13, 23.06, 23.0, 10.5; HRMS calcd for $C_{37}H_{64}O_{26}N_2Na$ [*M*+Na]$^+$ *m/z* 975.3645, found 975.3637.

Allyl 2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-α-D-mannopyranosyl-(1→3)-2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-2,3-di-*O*-benzoyl-6-*O*-benzyl-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-benzyl-β-D-glucopyranoside (46).

AgOTf (93.0 mg, 0.362 mmol)、Cp_2HfCl_2 (71.3 mg, 0.188 mmol)、MS 4A (1.21 g) を室温下で Toluene (3.0 mL) に加えた。−20°C に冷却し、15 分間撹拌した後、化合物 **5** (0.114 g, 0.231 mmol) と化合物 **42** (0.116 g, 89.8 μmol) が溶解した Toluene

(1.0 mL) 溶液を −20°C で添加した。反応混合物を室温で 2 時間撹拌した後、AgOTf (93.0 mg, 0.150 mmol)、Cp_2HfCl_2 (35.2 mg, 92.7 μmol) を添加し、さらに室温で 1 時間撹拌した。その後、0°C に冷却し Et_3N (0.300 mL) でクエンチした。反応液をセライト濾過し、残渣を EtOAc (100 mL) で希釈し、飽和重曹水 (100 mL) と brine (100 mL) で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥、濾過、減圧濃縮した。残渣を中圧液体クロマトグラフィー (Hexane:EtOAc = 89:11 → 75:25, 15 mL/min) とシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Toluene/EtOAc = 20:1 → 10:1, v/v) で精製し、化合物 **46** を白色固体として 120 mg (75%, α only) 得た。

化合物 **46**: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.91–7.13 (55H, m), 5.94–5.86 (1H, m), 5.53–5.48 (2H, m), 5.36 (1H, dd, *J* = 8.0, 9.7 Hz), 5.28 (1H, dd, *J* = 1.2, 17.4 Hz), 5.24–5.18 (2H, m), 5.15 (1H, dd, *J* = 1.2, 10.3 Hz), 4.89–4.83 (4H, m), 5.11, 4.79 (each 1H, ABq, *J* = 12.0 Hz), 4.67–4.54 (5H, m), 4.47–4.28 (8H, m), 4.14 (1H, ABq, *J* = 12.0 Hz), 4.09–4.03 (2H, m), 3.96 (1H, t, *J* = 9.5 Hz), 3.92 (1H, dd, *J* = 3.4, 9.2 Hz), 3.81 (1H, t, *J* = 9.5 Hz), 3.77–3.68 (3H, m), 3.62–3.56 (5H, m), 3.55–3.49 (3H, m), 3.43 (1H, t, *J* = 8.3 Hz), 3.35 (1H, dd, *J* = 3.4, 11.2 Hz), 3.30–3.26 (1H, m), 3.23–3.19 (1H, m), 2.81–2.73 (2H, m), 2.04 (3H, s); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 170.1, 165.5, 165.2, 139.6, 138.8, 138.7, 138.6, 138.3, 138.2, 130.8, 129.94, 129.40, 128.9, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.9, 127.8, 127.7, 127.4, 127.3, 126.1, 117.4, 102.7, 102.0, 101.0, 100.8, 98.8, 83.2, 81.9, 78.4, 78.3, 77.9, 76.0, 75.3, 75.2, 75.0, 74.8, 74.5, 74.3, 73.6, 73.5, 72.6, 72.2, 71.9, 70.4, 69.1, 68.23, 68.15, 67.9, 67.0, 21.2; HRMS calcd for $C_{106}H_{108}O_{24}N_2Na$ $[M+Na]^+$ *m/z* 1788.7162, found 1788.7141.

Allyl 2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-α-D-mannopyranosyl-(1→3)-2,4-di-*O*-benzyl-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-2,3-di-*O*-benzoyl-6-*O*-benzyl-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-benzyl-β-D-glucopyranoside (47).

CH_2Cl_2 (1.0 mL) 中に化合物 **46** (30.7 mg, 17.4 μmol) を溶解し、−100°C で $PhBCl_2$ (8.00 mL, 62.4 μmol) と Et_3SiH (4.20 mL, 56.6 μmol) を添加した。−100°C で 1.5 時間撹拌した後、$PhBCl_2$ (8.00 mL, 62.4 μmol) と Et_3SiH (4.20 mL, 56.6 μmol) を添加した。さらに −100°C で 1 時間撹拌した後、$PhBCl_2$ (8.00 mL, 62.4 μmol) と Et_3SiH (4.20 mL, 56.6 μmol) を添加した。−100°C で 30 分間撹拌した後、残渣を EtOAc (40 mL) で希釈し、飽和重曹水 (40 mL) と brine (40 mL) で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥、濾過、減圧濃縮し、残渣を中圧液体クロマトグラフィー (Hexane:EtOAc = 78:22 → 65:35, 15 mL/min) で精製し、化合物 **47** を白色固体として 25.6 mg (83%) 得た。

化合物 **47**: ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.88–7.11 (55H, m), 5.94–5.86 (1H, m), 5.50 (1H, t, *J* = 9.5 Hz), 5.41–5.36 (2H, m), 5.28 (1H, dd, *J* = 1.2, 17.2 Hz), 5.16 (1H, dd, *J* = 1.2, 10.6 Hz), 5.12–5.06 (2H, m), 4.97 (1H, d, *J* = 11.5 Hz), 4.88–4.82 (3H, m), 4.79 (1H, d, *J* = 12.0 Hz), 4.68–4.55 (5H, m), 4.52 (1H, d, *J* = 11.5 Hz), 4.45–4.31 (9H, m), 4.20 (1H, d, *J* = 12.0 Hz), 4.08–4.01 (2H, m), 3.96 (1H, dd, *J* = 9.5 Hz), 3.91 (1H, dd, *J* = 2.9, 8.7 Hz), 3.85–3.76 (2H, m), 3.71–3.50 (8H, m), 3.49–3.39 (2H, m), 3.39–3.26 (3H, m), 3.23–3.19 (1H, m), 3.18–3.11 (1H, m), 2.86–2.81 (1H, m), 2.08 (3H, s); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 170.2, 165.6, 165.1, 139.6, 139.1, 138.8, 138.6, 138.2, 138.1, 138.0, 137.9, 137.8, 134.2, 133.4, 130.1, 129.9, 129.5, 129.4, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 127.97, 127.95, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 127.4, 127.3, 117.4, 102.7, 101.0, 100.7, 99.7, 83.1, 81.9, 80.7, 78.2, 77.6, 77.3, 76.0, 75.3, 75.1, 75.0, 74.5,

74.3, 73.9, 73.7, 73.6, 73.5, 72.5, 72.3, 72.0, 70.4, 69.1, 68.1, 61.7, 29.9, 21.2; HRMS calcd for $C_{106}H_{110}O_{24}N_2Na$ $[M+Na]^+$ *m/z* 1790.7318, found 1790.7330.

Allyl 2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-α-D-mannopyranosyl-(1→3)-[3,6-di-*O*-acetyl-4-*O*-benzyl-2-*O*-pivaloyl-α-D-mannopyranosyl-(1→6)]-2,4-di-*O*-benzyl-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-2,3-di-*O*-benzoyl-6-*O*-benzyl-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-*O*-benzyl-β-D-glucopyranoside (48).

化合物 **38** (13.2 mg, 28.2 μmol) 、化合物 **47** (25.6 mg, 14.5 μmol) 、MS 4A (600 mg) を Toluene (2.0 mL) に加え、−20°C で MeOTf (30.0 mL, 0.274 mmol) を添加した。室温で 2 時間撹拌した後、MeOTf (30.0 mL, 0.274 mmol) を −20°C で添加した。さらに室温で 2 時間撹拌した後、MeOTf (30.0 mL, 0.274 mmol) を −20°C で添加した。室温で 24 時間撹拌した後、MeOTf (30.0 mL, 0.274 mmol) と **38** (9.0 mg, 19.2 μmol) を −20°C で添加した。室温で 21 時間撹拌した後、0°C に冷却し、Et_3N (0.500 mL) でクエンチした。反応液をセライト層を通して濾過し、濾液と洗浄液を減圧濃縮した。残渣を EtOAc (150 mL) で希釈し、飽和重曹水 (150 mL) と brine (150 mL) で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥、濾過、減圧濃縮した。残渣を中圧液体クロマトグラフィー (Hexane:EtOAc = 3:1, 15 mL/min) と ゲルろ過クロマトグラフィー (Bio-Beads SX-1, EtOAc/Toluene = 1:1, v/v) で精製し、化合物 **48** を白色固体として 23.7 mg (75%, α only) 得た。

化合物 **48**:^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.91–7.04 (60H, m), 5.94–5.85 (1H, m), 5.51 (1H, t, *J* = 9.5 Hz), 5.42–5.37 (2H, m), 5.35 (1H, dd, *J* = 2.9, 9.5 Hz), 5.30–5.23 (2H, m), 5.17–5.00 (3H, m), 4.87–4.81 (4H, m), 4.75 (1H, d, *J* = 11.5 Hz), 4.69–4.60 (4H, m), 4.60–4.36 (10H, m), 4.36–4.29 (4H, m), 4.24–4.10 (4H, m), 4.04 (1H, dd, *J* = 5.7, 13.2 Hz), 3.94–3.86 (2H, m), 3.83–3.70 (4H, m), 3.65–3.51

(8H, m), 3.44 (1H, dd, *J* = 2.9, 9.5 Hz), 3.42–3.36 (2H, m), 3.35–3.30 (1H, m), 3.26–3.17 (3H, m), 2.94–2.90 (1H, m), 2.05 (3H, s), 1.93 (3H, s), 1.89 (3H, s), 1.20 (9H, s); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 177.0, 170.7, 170.2, 169.6, 165.9, 165.1, 139.7, 138.9, 138.7, 138.3, 138.2, 138.0, 137.8, 134.2, 133.3, 132.9, 130.2, 130.0, 129.9, 129.6, 129.2, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.30, 128.26 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 127.3, 127.2, 125.5, 117.3, 102.6, 100.9, 99.5, 97.3, 83.2, 82.9, 80.3, 78.2, 77.8, 77.3, 75.3, 75.2, 75.0, 74.8, 74.6, 74.2, 73.9, 73.8, 73.6, 73.5, 72.9, 72.5, 72.3, 72.1, 71.9, 70.4, 69.8, 69.5, 69.0, 68.8, 68.6, 68.3, 66.8, 39.1, 27.3, 21.6, 21.2, 21.0, 20.9; HRMS calcd for $C_{128}H_{138}O_{32}SNa$ [*M*+Na]$^+$ *m/z* 2210. 9102, found 2210.9104.

Propyl α-D-mannopyranosyl-(1→3)-[α-D-mannopyranosyl-(1→6)]-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranoside (Man$_3$Glc$_2$).

MeOH (2.0 mL) 中に化合物 **48** (17.2 mg, 7.67 μmol) を溶解し、NaOMe (200 μL, 1.04 mmol, MeOH 中 w/v 28%)を 0°C で添加した。反応混合物を室温で 2 時間撹拌した後、0°C で Amberlyst 15E で中和した。混合物を濾過し、減圧濃縮した。得られた残渣を MeOH/H_2O (1/1, v/v) (5.0 mL)に溶解し、$Pd(OH)_2$/C (0.111 g) と NH_4HCO_2 (0.253 g, 4.00 mmol) を添加した。反応混合物を加温マントルで 80°C で 24 時間撹拌した後、セライト層を通して濾過し、濾液と洗浄液を H_2O (200 mL) で希釈し、減圧濃縮した。残渣を中圧液体クロマトグラフィー (ODS) (H_2O:MeOH = 100:0 → 45:55, 5 mL/min) と ゲルろ過クロマトグラフィー (Sephadex G-10, EtOH/H_2O = 1/4, v/v) で精製し、**Man$_3$Glc$_2$** を白色固体として 4.1 mg (61%) 得た。

Man_3Glc_2: ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 5.28 (1H, brs), 5.27 (1H, brs), 5.09 (1H, d, *J* = 3.4 Hz), 4.50 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 4.08 (1H, d, *J* = 9.2 Hz), 4.05-3.21 (29H, m), 3.12-3.08 (1H, m), 1.37-1.31 (2H, m), 0.91-0.80 (3H, m); ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ/ppm = 102.57, 102.54, 102.3, 98.6, 98.1, 79.0, 76.2, 73.6, 73.4, 73.0, 72.9, 70.6, 70.5, 70.33, 70.30, 70.2, 67.14, 67.08, 67.0, 66.7, 66.6, 61.4, 61.3, 61.2, 61.0, 55.4, 55.0, 38.1, 30.5, 26.7, 6.8; HRMS calcd for $C_{33}H_{58}O_{26}Na$ $[M+Na]^+$ *m/z* 893.3114, found 893.3094.

謝辞

学士課程から数えて長年にご指導を賜りました主指導教員の戸谷希一郎教授に、深甚なる感謝の意を表します。先生には国際学会をはじめとする貴重な研鑽の場を多く与えていただきました。時には厳しく、妥協を許さないご指導をいただくこともありましたが、そのお陰で研究者としての視野を広げ、今日この日を迎えることができました。先生から伝授いただいたケミカルバイオロジーの深い知見と有機合成の実践は、私が製薬の道に進むという生涯の目標を見出す原点となりました。これまでの多大なるご厚情に対し、心より御礼申し上げます。

また、久富寿教授、ならびに横山明弘教授には、副指導教員として、また本論文の副査としてご助言を賜り、厚く御礼申し上げます。先生方には、学内での研究発表の場を中心に、常に客観的な視点から真摯にご指導をいただきました。また、日常の研究生活においても進捗を気にかけてくださり、温かく支えていただいたことは、大きな励みとなりました。あわせて、前回の審査に際し、専門的な知見に基づき貴重なご示唆を賜りました坪村太郎名誉教授(現・ご定年)に対し、深く敬意を表し、感謝申し上げます。

学外審査委員の任を執り行っていただきました群馬大学の松尾一郎教授には、心より御礼申し上げます。学会の折に議論に加わってくださっただけでなく、貴研究室の学生との交流の場を設けていただき、私の研究生活における刺激となりました。

研究室の運営とともに、私の論文提出に向けて多大なるお力添えをいただきました、栗原大輝前助教、ならびに廣瀬光了助教には、研究が行き詰まった際での的確なアドバイスや、論文作成における献身的なサポートをしていただきました。深く御礼申し上げます。

また、研究室の皆様には、日々の研鑽を共にし、充実した研究生活の時間を共有できましたことを心より感謝申し上げます。特に、実験技術の基礎を丁寧に教えてくだ

さった新田恭平氏、大学院進学後も切磋琢磨し、議論を通じて互いの成長を支え合ってきた同期の北條真琴さんと石井涼太さんに、感謝申し上げます。また、非天然型糖鎖の合成ルート確立に向け粘り強く取り組んでくださった樺澤恵さん、そして最終論文のリバイスにて、追加実験を完遂して下さった田島直也さんと平啓人さんに対し、深く感謝いたします。

最後に、私のわがままとも言える長年の研究生活を、物心両面から無条件に支えてくれた父母と叔父に、心からの感謝を捧げます。日々の生活基盤を献身的に支え、常に激励を送ってくださった妻(萌子さん)、そして妻のご両親に感謝を捧げます。

本論文に関わってくださったすべての方々に、重ねて深く感謝申し上げます。今後も、本研究で培った経験を糧に、人々の健康に貢献できる医薬品の創出を目指し、一層精進してまいる所存です。

2026 年 9 月

碓井 瑠智雄

本研究に関する業績

学術論文

- Taiki Kuribara, Ruchio Usui, Kiichiro Totani, Glycan structure-based perspectives on the entry and release of glycoproteins in the calnexin/calreticulin cycle, *Carbohydr. Res.*, **2021**, *502,* 108273.

- Ruchio Usui, Akira Koizumi, Kyohei Nitta, Taiki Kuribara, Kiichiro Totani, Multisite partial glycosylation approach for preparation of biologically relevant oligomannosyl branches contribute to lectin affinity analysis**,** *J. Org. Chem.* **2023**, *88*, 14357-14367. (Supplementary Cover)

- Ruchio Usui, Megumi Kabasawa, Naoya Tajima, Akito Taira, Mitsuaki Hirose, Kiichiro Totani, Synthesis of *N*-glycan mimics for investigating the influence of the *N*-acetyl group in core $GlcNAc_2$ on the folded conformation, *Chem. Lett.* **2025**, *54*, upaf120.

国際会議

- Lucio Usui, Kyohei Nitta, Akira Koizumi, Taiki Kuribara, Kiichiro Totani, “Development of Dendritic Glycosylation Methodology Towords One-pot Synthesis of High-mannose Glycans (P226)”, EURO CARB XX LEIDEN 2019, (Holland) 2019. 7, Poster

・ Ruchio Usui, Kabasawa Megumi, Taiki Kuribara, Kiichiro Totani, “High-mannose Glycan Library Synthesized by Dendritic Glycosylation (3413480)”, Pacificchem 2021, (Online) 2021. 12, Poster

・ Ruchio Usui, Kyohei Nitta, Akira Koizumi, Taiki Kuribara, Kiichiro Totani, “Development of Dendritic Glycosylation Methodology Towords One-pot Synthesis of High-mannose Glycans (GS-SO-30)”, The International Graduate Symposium on Industrial Biotechnology, (China) 2019. 10, Oral

国内会議

・ 東京糖鎖研究会(GlycoTokyo) (2018)、ポスター発表
雄井瑠智雄、新田恭平、小泉亮、栗原大輝、戸谷希一郎
高マンノース型糖鎖のワンポット合成を志向した樹状型グリコシル化反応の開発
2018 年 11 月 30 日(金)、理化学研究所

・ 日本化学会第 99 春季年会 (2019)、口頭発表
雄井瑠智雄、新田恭平、小泉亮、栗原大輝、戸谷希一郎
高マンノース型糖鎖のワンポット合成を志向した樹状型グリコシル化法の開発
2019 年 3 月 16 日(土) ～ 19 日(火)、甲南大学 (岡本キャンパス)

・ 第 38 回日本糖質学会年会 (2019)、ポスター発表
2019 年 8 月 19 日(月) ～ 21 日(水)、名古屋大学
雄井瑠智雄、新田恭平、小泉亮、栗原大輝、戸谷 希一郎
高マンノース型糖鎖のワンポット合成を志向した樹状型グリコシル化反応の開発

・ 第 10 回 CSJ 化学フェスタ(2020)、ポスター発表

雄井瑠智雄、新田恭平、小泉亮、栗原大輝、戸谷希一郎

高マンノース型糖鎖のワンポット合成を志向した 樹状型グリコシル化反応の開発

2020 年 10 月 20 日(火) ～ 22 日(木)、オンライン開催

・ 日本化学会第 101 春季年会 (2021)、口頭発表

2021 年 3 月 19 日(金) ～ 22 日(月)、オンライン開催

雄井瑠智雄、樺澤恵、栗原大輝、戸谷 希一郎

樹状型グリコシル化法を利用した高マンノース型糖鎖ライブラリーの構築研究

・ 第 11 回 CSJ 化学フェスタ(2021)、口頭発表

2021 年 10 月 19 日(火) ～ 21 日(木)、オンライン開催

雄井瑠智雄、栗原大輝、戸谷希一郎

樹状型グリコシル化法を利用した高マンノース型糖鎖ライブラリーの構築研究

・ 第 40 回日本糖質学会年会 (2021)、口頭発表

2021 年 10 月 27 日(水) ～ 29 日(金)、鹿児島県民交流センター

雄井瑠智雄、樺澤恵、栗原大輝、戸谷希一郎

樹状型グリコシル化法による高マンノース型糖鎖ライブラリーの構築研究

・ 日本化学会第 102 春季年会(2022)、口頭発表

2022 年 3 月 23 日(水) ～ 26 日(土)、オンライン開催

雄井瑠智雄、樺澤恵、比留川達也、栗原大輝、戸谷 希一郎

樹状型グリコシル化法を利用した高マンノース型糖鎖ライブラリーの合成研究

・ 日本化学会第 102 春季年会(2023)、口頭発表

雉井瑠智雄、樺澤恵、栗原大輝、戸谷希一郎

樹状型グリコシル化法による分岐鎖伸長を利用した高マンノース型糖鎖ライブラリーの合成研究

2023 年 3 月 22 日(水) ～ 25 日(土)、東京理科大学 (野田キャンパス)

参考文献

1. J. S. Dialpuri, H. Bagdonas, M. Atanasova, L. C. Schofield, M. L. Hekkelman, R. P. Joosten, J. Agirre, *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.*, **2023**, *79*, 462-472.
2. S. Jo, H. S. Lee, J. Skolnick, W. Im, *PLos. Comput. Biol.,* **2023**, *9*, e1002946.
3. E. C. Stanca-Kaposta, D. P. Gamblin, E. J. Cocinero, J. Frey, R. T. Kroemer, A. J. Fairbanks, B. G. Davis, J. P. Simons, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 10691–10696.
4. R. Roy, S. Poddar, P. Kar, *Carbohydr. Res.,* **2022**, *522*, 108700.
5. Y. Kamiya, K. Yanagi, T. Kitajima, T. Yamaguchi, Y. Chiba, K. Kato, *Biomolecules,* **2013**, *3*, 108-123.
6. T. Yamaguchi, Y. Sakae, Y. Zhang, S. Yamamoto, Y. Okamoto, K. Kato, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10941-10944.
7. S. Jo, Y. Qi, W. Im, *Glycobiology,* **2016**, *26*, 19-29.
8. C. A. Fogarty, E. Fadda, *J. Phys. Chem. B*, **2021**, *125*, 2607-2616.
9. G. P. Subedi, A. V. Sinitskiy, J. T. Roberts, K. R. Patel, V. S. Pande, A. W. Barb, *Structure*, **2019**, *27*, 55–65.
10. Y. Tomabechi, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **2020**, *32*, E147-E150.
11. Q. Chao, Y. Ding, Z.-H. Chen, M.-H. Xiang, N. Wang, X.-D. Gao, *Front. Chem.*, 2020, *8*, 513.
12. Y. Takeda, K. Totani, I. Matsuo, Y. Ito, *Curr. Opin. Chem. Biol.,* **2009**, *13*, 582-591.
13. Y. Zhu, M. Yan, Y. Lasanajak, D. F. Smith, X. Song, *Carbohydr. Res.*, **2018**, *464*, 19-27.

14. Y. Maki, Y. Otani, R. Okamoto, M. Izumi, Y. Kajihara, *Carbohydr, Res.,* **2022**, *521*, 108680.
15. C. Toonstra, L. Wu, C. Li, D. Wang, L.-X. Wang, *Bioconjugate Chem.*, **2018**, *29,* 1911-1921.
16. A. Koizumi, I. Matsuo, M. Takatani, A. Seko, M. Hachisu, Y. Takeda, Y. Ito, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7426-7431.
17. S.-T. Li, T.-T, Lu, X.-X. Xu, Y. Ding, Z. Li, T. Kitajima, N. Dean, N. Wang, X.-D. Gao, *Nat. Commun.*, **2019**, *10*, 1813.
18. X. Geng, V. Y. Dudkin, M. Mandal, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 2562-2565.
19. B. Meng, J. Wang, Q. Wang, A. S. Serianni, Q. Pan, *Tetrahedron*, **2017**, *73*, 3932-3938.
20. I. Matsuo, K. Totani, A. Tatami, Y. Ito, *Tetrahedron,* **2006**, *62*, 8262-8277.
21. Y. J. Oh, M. W. Dent, A. R. Freels, Q. Zhou, C. B. Lebrilla, M. L. Merchant, N. Matoba, *Mol. Ther.*, **2022**, *30*, 1523-1535.
22. F. Boyaval, H. Dalebout, R. V. Zeijl, W. Wang, A. Fariña-Sarasqueta, G. S. M. Lageveen-Kammerijer, J. J. Boonstra, L. A. McDonnell, M. Wuhrer, H. Morreau, B. Heijs, *Cancers*, **2022**, *14*, 1552.
23. D. D. Park, C. Phoomak, G. Xu, C. B. Lebrilla, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2020**, *117*, 7633-7644.
24. S. Hua, H. J. An, S. Ozcan, G. S. Ro, S. Soares, R. DeVere-White, C. B. Lebrilla, *Analyst,* **2011**, *136*, 3663-3671.

25. S. Hua, C. C. Williams, L. M. Dimapasoc, G. S. Ro, S. Ozcan, S. Miyamoto, C. B. Lebrilla, H. J. An, G. S. Leiserowitz, *J. Chromatogr. A.,* **2013**, *1279,* 58-67.
26. A. Medetalibeyoglu, G. Bahat, N. Senkal, M. Kose, K. Avci, G. Y. Sayin, U. Isoglu-Alkac, T. Tukek, S. Pehlivan, *Infect. Genet. Evol.,* **2021**, *89*, 104717.
27. M. D. Knierman, G. Valentina, N. A. Zlatniski, J. H. Mullen, R. W. Siegel, R. J. Konrad, *J. Allergy Infect. Dis.*, **2021**, *2*, 24-28.
28. M. Jan, C. Upadhyay, A. Sharma, C. E. Hioe, S. K. Arora, *AIDS Res. Hum. Retrovir.*, **2017**, *33*, 941-945.
29. R.-J. E. Li, T. P. Hogervorst, S. Achilli, S. C. Bruijins, T, Arnoldus, C.Vivès, C. C. Wong, M. Thépaut, N. J. Meeuwenoord, H. van den Elst, H. S. Overkleeft, G. A. van der Marel, D. V. Filippov, S. J. van Vliet, F. Fieschi, J. D. C. Codée, Y. van Kooyk, *Front. Chem.*, **2019**, *7*, 650.
30. L.-X. Wang, J. Ni, S. Singh, H. Li, *Chem. Biol.*, **2004**, *11*, 127-134.
31. M. Witvrouw, V. Fikkert, A. Hantson, C. Pannecouque, B. R. O'Keefe, J. McMahon, L. Stamatatos, E. de Clercq, A. Bolmstedt, *J. Virol.*, **2005**, *79*, 7777-7784.
32. V. Y. Dudkin, M. Orlova, X. Geng, M. Mandal, W. C. Olson, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.,* **2004**, *126*, 9560-9562.
33. D. W. Heindel, S. Koppolu, Y. Zhang, L. K. Mahal, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2020**, *117*, 26926-26935.
34. M. Jan, C. Upadhyay, J. A. Pertejo, C. E. Hioe, S. K. Arora, *PLoS One,* **2018,** *13,* e0194498.

35. A. Barre, E. J. M. Van Damme, B. Klonjkowski, M. Simplicien, J. Sudor, H. Benoist, P. Rougé, *Cells*, **2022**, *11*, 339.
36. M. N. Ahmed, R. Jahan, V. Nissapatorn, P. Wilairatana, M. Rahmatullah, *Biomed. Pharmacother.*, **2022**, *146*, 112507.
37. T. Nazmul, B. M. Lawal-Ayinde, T. Morita, R. Yoshimoto, A. Higashiura, A. Yamamoto, T. Nomura, Y. Nakano, M. Hirayama, H. Kurokawa, Y. Kitajima, K. Hori, T. Sakaguchi, *Microbiol. Immunol.*, **2023**, *67*, 334-344.
38. T. Suzuki, H. Fujihara, *Comprehensive Glycoscience*; 2nd ed.; J. J. Barchi Jr. Ed.; Elsevier: Dutch, **2021**; Vol. 3, Chapter 3.01.
39. T. Kuribara, M. Hirano, G. Speciale, S, J. Williams, Y. Ito, K. Totani, *ChemBioChem,* **2017**, *18*, 1027-1035.
40. K. Nitta, T, Kuribara, K. Totani, *Org. Biomol. Chem.*, **2021**,*19*, 4137-4145.
41. K. Totani, Y. Ihara, I. Matsuo, Y. Ito, *J. Biol. Chem*., **2006**, *281*, 31502-31508.
42. M. L. Tran, Y. Génisson, S. Ballereau, C. Dehoux, *Molecules*, **2020**, *25*, 3145.
43. L. Liguori, M. Monticelli, M. Allocca, B. H. Mele, J.Lukas, M. V. Cubellis, G. Andreotti, *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, *21*, 489.
44. T. Kuribara, K. Totani, *Biology,* **2022**, *11,* 199.
45. A. G. McKee, E. F. McDonald, W. D. Penn, C. P. Kuntz, K. Noguera, L. M. Chamness, F. J. Roushar, J. Meiler, K. E. Oliver, L. Plate, J. P. Schlebach, *Cell. Chem. Biol.*, **2023**, *30,* 632-642.
46. A.Tedman, M. Goel, S. Shah, J. P. Schlebach, *J. Biol. Chem.*, **2025**, *301*, 110375.
47. Y. Miao, S. E. Nichols, J. A. McCammon, *Phys. Chem. Chem. Phys.,* **2014**, *16*, 6398-6406.

48. R. Usui, A. Koizumi, K. Nitta, T. Kuribara, K. Totani, *J. Org. Chem.,* **2023**, *88*, 14357-14367.

49. E. J. M. Van Damme, A. K. Allen, W. J. Peumans, *FEBS Lett.* **1987**, *215*, 140-144.

50. B. Hoorelbeke, E. J. M. Van Damme, P. Rougé, D. Schols, K. Van Laethem, E. Fouquaert, J. Balzarini, *Retrovirology*, **2011**, *8*, 10.

51. N. Shibuya, I. J. Goldstein, E. J. M. Van Damme, W. J. Peumans, *J. Biol. Chem.*, **1988**, *263*, 728-734.

52. R. Usui, M. Kabasawa, N. Tajima, A. Taira, M. Hirose, K. Totani, *Chem. Lett.*, **2025**, *54*, upaf120.

53. Y. Nakahara, S. Shibayama, Y. Nakahara, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.*, **1996**, *280*, 67-84.

54. N. Teumelsan, X. Huang, *J. Org. Chem.*, **2007**, *72,* 8976-8979.

55. M. N. Amin, W. Huang, R. M. Mizanur, L.-X. Wang, *J. Am. Chem. Soc.,* **2011**, *133,* 14404-14417.

56. C. S. Callam, T. L. Lowary, *J. Org. Chem.*, **2001**, *66,* 8961-8972.

57. K. Bock, C. Pedersen, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1974**, 293-297.

58. M. Sakagami, H. Hamana, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 5547-5551.

59. G. L. Beutner, B. M. Cohen, A. J. DelMonte, D. D. Dixon, K. J. Fraunhoffer, A. W. Glace, E. Lo, J. M. Stevens, D. Vanyo, C. Wilbert, *Org. Process Res. Dev.,* **2019**, *23*, 1378-1385.

60. D. J. Harvey, C. A. Scarff, M. Edgeworth, W. B. Struwe, K. Pagel, K. Thalassinos, M. Crispin, J. Scrivens, *J. Mass Spectrom.,* **2016**, *51*, 219-235.

61. L. Veillon, Y. Huang, W. Peng, X. Dong, B. G. Cho, Y. Mechref, *Electrophoresis,* **2017**, *38*, 2100-2114.
62. M. Simplicien, P. Pério, J. Sudor, A. Barre, H. Benoist, E. J. M. Van Damme, P. Rougé, *Glycoconj. J.*, **2023**, *40*, 109-118.
63. D. Bojar, L. Meche, G. Meng, W. Eng, D. F. Smith, R. D. Cummings, L. K. Mahal, *ACS Chem. Biol.*, **2022**, *17*, 2993-3012.
64. M. C. Chervenak, E. J. Toone, *Biochemistry*, **1995**, *34,* 5685-5695.
65. M.-C. Lo, A. Aulabaugh, G. Jin, R. Cowling, J. Bard, M. Malamas, G. Ellestad, *Anal. Biochem.*, **2004**, *332*, 153-159.
66. C. S. Wright, G. Hester, *Structure,* **1996**, *4*, 1339-1352.
67. V. Saikam, S. Dara, M. Yadav, P. P. Singh, R. A. Vishwakarma, *J. Org. Chem.*, **2015**, *80*, 11916-11925.
68. V. Dimakos, M. S. Taylor, *Chem. Rev.*, **2018**, *118*, 11457-11517.
69. A. Ishiwata, Y. J. Lee, Y. Ito, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 3596-3608.
70. S. Izumi, Y. Kobayashi, Y. Takemoto, *Org. Lett.*, **2019**, *21*, 665-670.
71. D. Crich, M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 9015-9020.
72. D. Lloyd, M. Bylsma, D. K. Bright, X. Chen, C. S. Bennett, *J. Org. Chem.,* **2017**, *82*, 3926-3934.
73. J. Hénault, P. Quellier, M. Mock-Joubert, C. Le Narvor, A. Alix, D. Bonnaffé, *J. Org. Chem.*, **2022**, *87*, 963-973.
74. K. J. Bowers, E. Chow, H. Xu, R. O. Dror, M. P. Eastwood, B. A. Gregersen, J. L. Klepeis, I. Kolossvary, M. A. Moraes, F. D. Sacerdoti, J. K. Salmon, Y. Shan, D. E. Shaw, *Proceedings of the ACM/IEEE Conference on Supercomputing (SC06)*, **2006**, Tampa, Florida, USA.

75. C. Lu, C. Wu, D. Ghoreishi, W. Chen, L. Wang, W. Damm, G. A. Ross, M. K. Dahlgren, E. Russell, C. D. Von Bargen, R. Abel, R. A. Friesner, E. D. Harder, *J. Chem. Theory Comput.*, **2021**, *17,* 4291–4300.
76. D. Folmsbee, G. Hutchison, *Int. J. Quantum Chem.*, **2020**, *121,* e26381.
77. N. Chakraborty, M. d'Alarcao, *Bioorg. Med. Chem.,* **2005**, *13*, 6732-6741.
78. S. Valerio, A. Pastore, M. Adinolfi, A. Iadonisi, *J. Org. Chem.,* **2008**, *73*, 4496-4503.
79. A. Pastore, M. Adinolfi, A. Iadonisi, S. Valerio, *Carbohydr. Res.,* **2010**, *345*, 1316-1323.
80. A. Ishiwata, H. Akao, Y. Ito, *Org. Lett.,* **2006**, *8*, 5525-5528.
81. J. L. Chiara, Á. García, and G. Cristóbal-Lumbroso, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 4142–4151.
82. K. Suzuki, Y. Ito, O. Kanie, *Carbohydr. Res.*, **2012**, *359*, 81–91.
83. P. Wang, J. Wang, T. Guo, Y. Li, *Carbohydr. Res.*, **2010**, *345*, 607–620.
84. Y. A. Lin, J. M. Chalker, N. Floyd, G. J. L. Bernardes, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.,* **2008**, *130*, 9642–9643.
85. S. Garneau, L. Qiao, L. Chen, S. Walker, J. C. Vaderas, *Bioorg. Med. Chem.,* **2004**, *12*, 6473–6494.
86. Q. Chen, T. Gong, J. Liu, X. Wang, H. Fu, Z. Zhang, *J. Drug Target.*, **2009**, *17*, 318–328.
87. M. S. M. Timmer, B. L. Stocker, P. T. Northcote, B. A. Burkett, *Tetrahedron Lett.*, **2009**, *50*, 7199–7204.
88. S. Bera, R. J. Linhardt, *J. Org. Chem.*, **2011**, *76*, 3181–3193.

89. F. Yamazaki, S. Sato, T. Nukada, Y. Ito, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.*, **1990**, *201*, 31–50.