



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

細胞膜ドメインの構造および形成機構の解明を指向
したガングリオシドプローブの創製

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2019-01-10 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 河村, 奈緒子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/77257

細胞膜ドメインの構造および形成機構の解明を
指向したガングリオシドプローブの創製

2018年

岐阜大学大学院連合農学研究科

(岐阜大学)

河村 奈緒子

細胞膜ドメインの構造および形成機構の解明を
指向したガングリオシドプローブの創製

河村 奈緒子

目次

略号表	04
緒言	06
第一部 蛍光ガングリオシドプローブの開発	11
第一章 研究背景	11
第二章 分子設計	14
第三章 ガラクトース 6 位標識 GM3 プローブの合成	15
第一節 合成戦略	15
第二節 シアリルガラクトース供与体の合成	18
第三節 GM3 骨格の構築	23
第四節 蛍光色素の導入	24
第四章 シアル酸 9 位標識 GM3 プローブの合成	28
第一節 合成戦略	28
第二節 シアリルガラクトース供与体の合成 I	31
第一項 1,4-ラクトン体の合成	31
第二項 供与体への変換	35
第三節 GM3 骨格の合成検討 I	35
第四節 シアリルガラクトース供与体の合成 II	37
第五節 GM3 骨格の合成検討 II	39
第六節 蛍光色素の導入	40
第五章 GM3 プローブの機能評価と一分子観察実験	42

第一節	ラフト分配特性の検証	42
第二節	一分子観察実験	50
第一項	拡散係数の計算	50
第二項	GPI アンカー型受容体との親和性の検証	53
第六章	シアル酸 9 位標識 GM1 及び GM2 プローブの合成	55
第一節	合成戦略	55
第二節	シアリルガラクトース受容体の合成	57
第三節	GM1 エピトープ骨格の構築と供与体への変換	58
第四節	GM1 骨格の構築と蛍光色素の導入	61
第五節	GM2 エピトープ骨格の構築と供与体への変換	62
第六節	GM2 骨格の構築と蛍光色素の導入	64
第七節	蛍光 GM1 及び GM2 プローブ合成のまとめ	65
第七章	ガングリオシドプローブの機能評価と一分子観察実験	70
第一節	機能評価	70
第一項	ラフト分配特性の検証	70
第二項	拡散係数の計算	72
第二節	GPI アンカー型受容体との親和性の検証	74
第三節	ガングリオシド結合タンパク質との親和性の検証	76
第一項	糖鎖認識タンパク質に対する結合能の検証	76
第二項	EGF 受容体との二色同時一分子観察	78
総括		81
実験の部		82

第二部 光反応性ガングリオシドプローブの開発	143
第一章 研究背景	143
第二章 分子設計	149
第三章 合成戦略	153
第四章 糖鎖修飾型光反応性プローブの合成	155
第一節 Trifluoromethylphenyl diazirine (TPD) ユニットの合成	155
第二節 光反応性 GM3 プローブの合成	158
第三節 光反応性 GM1 プローブの合成	160
第五章 脂質修飾型光反応性 GM3 プローブの合成	162
第一節 光反応性脂肪酸の合成	162
第二節 Sph 受容体の合成	166
第三節 Glc-Sph 受容体の合成	170
第四節 糖脂質骨格の構築と脂肪酸の導入	172
第五節 蛍光色素の導入	175
第六節 ビオチンの導入	176
総括	178
実験の部	179
結語	200
謝辞	201

略記一覧

本論文において以下に示す略号を用いた。

Ac	: acetyl
Bn	: benzyl
Bz	: benzoyl
CAN	: cerium(IV) ammonium nitrate
Cer	: ceramide
Chol	: cholesterol
DBU	: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DIEA	: <i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMAP	: 4- <i>N,N</i> -dimethylaminopyridine
DMF	: <i>N,N</i> -dimethylformamide
DMTST	: dimethyl(methylthio)sulfonium triflate
DOPE	: 1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
DRM	: detergent-resistant membrane
DTBMP	: 2,6-di- <i>tert</i> -butyl-4-methylpyridine
EDC	: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
Gal	: galactose
Glc	: glucose
GPI	: glycosylphosphatidylinositol
HOObt	: hydroxyl-3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazine
MP	: <i>p</i> -methoxyphenyl
MS	: molecular sieves
MS AW	: acid-washed molecular sieves
Neu	: neuraminic acid
NHS	: <i>N</i> -hydroxysuccinimide
NIS	: <i>N</i> -iodosuccinimide
Pfp	: pentafluorophenyl
PMB	: <i>p</i> -methoxybenzyl
Pyr	: pyridine
Sph	: sphingosine
TBAF	: tetrabutylammonium fluoride

TBAI : tetrabutylammonium iodide
TBS : *t*-butyldimethylsilyl
TEA : triethylamine
Tf : trifluoromethanesulfonyl
TFAc : trifluoroacetyl
THF : tetrahydrofuran
TMSOTf : trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate
Troc : 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl
Ts : *p*-toluenesulfonyl
TTBP : 2,4,6-tri-*tert*-butylpyrimidine

緒言

細胞は生体を構成する基本単位であり、DNA の制御のもと生命活動に必要なタンパク質を合成し、増殖・分化を重ねて生命を営む。これら一つ一つの細胞は、細胞膜によって包まれた独立した形状を持っており、細胞膜は、膜外界から細胞を区画・保護する役割を担う。しかしながら、細胞膜は外界から隔てる機能だけでなく、物質の授受や外界との相互作用の反応場としての役割を担うことが明らかとなり、細胞膜自体の性状や機能が注目されている。

1972 年、Singer と Nicolson は、細胞膜の動的概念として、流動モザイクモデルを提唱した¹。これにより、細胞膜は両親媒性の脂質分子が流動的な脂質二重膜を形成しており、その中を膜タンパク質が自由拡散するという考え方が広まった。この基本概念は現在も受け入れられているが、その後の研究で、膜タンパク質のみならず脂質分子も不均一に存在し、ドメイン構造をとることが分かってきた。1997 年、Simons らは細胞膜ドメインの新たな概念としてラフト仮説を提唱した²。彼らは、細胞膜上には、スフィンゴ糖脂質やコレステロールに富む、脂質ラフトと呼ばれる特殊な膜領域が存在し、そこへ様々なシグナル分子が濃縮されることによって、細胞内へのシグナル伝達が行われると考えた (**Figure 1**)。脂質ラフトの存否、定義については現在も議論が続いているが、細胞の増殖や接着など、広範囲にわたる生命現象において脂質ラフトの介在を支持する結果が蓄積しつつある。

¹ S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science* **1972**, 175, 720-731.

² a) K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, 387, 569-572. b) D. A. Brown, J. K. Rose, *Cell* **1992**, 68, 533-544. c) S. Munro, *Cell* **2003**, 115, 377-388.

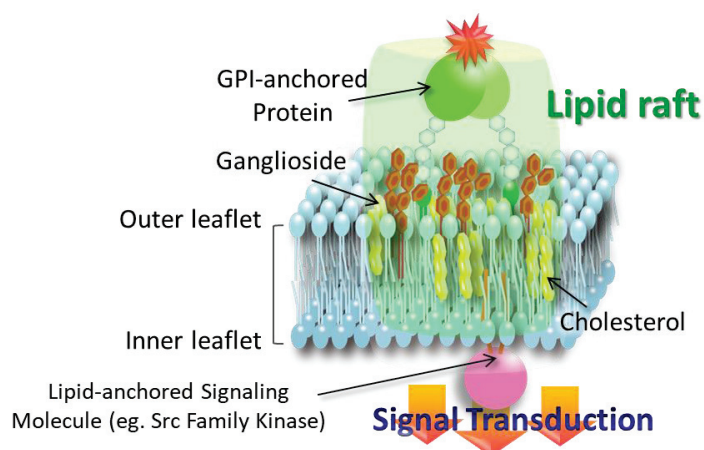


Figure 1. 脂質ラフトの構造

生体分子の挙動を画像として捉える新たな研究領域「分子イメージング」が近年急速に発展してきた背景には、このように生体分子の個々の性質を理解する必要性が高まってきた事実が存在する。分子イメージングは生きている細胞、組織、あるいは個体での生体分子の挙動や活性、量を可視化するものであり、主にポジトロン断層 (PET)、単一分子放射断層撮影 (SPECT)、蛍光イメージングの領域に分けられる。中でも蛍光イメージングは、蛍光標識した生体分子の挙動を生細胞中で直接観察する事を可能とし、生命科学研究の躍進に必須な技術として注目を集めている。

この研究領域において、楠見、鈴木らは、生細胞膜上における一分子観察法³を確立し、脂質ラフト構成成分の動態の詳細な解析を進めている。脂質ラフトを介したシグナル伝達 はリガンドの刺激で一時的に引き起こされるため、それらを静的な状況下で再現することは難しい。それに対し、一分子観察法では、複数の生体分子のリアルタイムな観察を可能とするため、脂質ラフトの大きさや寿命、構成分子の挙動などに関する詳細な解析結果がこれまでに得られている。特に、脂質ラフトの主要成分である GPI アンカー型受容体の観察結果は脂質ラフト形成機構を解く上で重要な知見をいくつか与えている。それは、まず一点目

³ A. Kusumi, T. A. Tsunoyama, K. M. Hirose, R. S. Kasai, T. K. Fujiwara, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 524-532.

に、GPI アンカー型受容体がリガンド刺激前、即ちラフト形成前に同種分子間でのみ、特異的にホモダイマーを形成するということである⁴ (Figure 2⁵)。楠見・鈴木らはこれをホモダイマーラフトと呼び、GPI アンカー型受容体に関与する最小構造のラフトとした。さらに、ホモダイマーラフトが会合したテトラマーラフトが形成される事も明らかにされたが、驚くべきことに、この段階では異種のホモダイマーラフトの会合を許容したヘテロテトラマーが安定して存在することが明らかとなった。つまり、この段階の会合では、タンパク質の特異的相互作用ではなく、特異性のない脂質間相互作用がテトラマーラフト形成に寄与していると推測される。これらの結果は GPI アンカー型受容体のホモダイマーラフトが脂質ラフト形成時の最小単位であることを示し、これを起点に構造不均一な脂質分子の会合が誘起されることを示唆する重要な結果である。

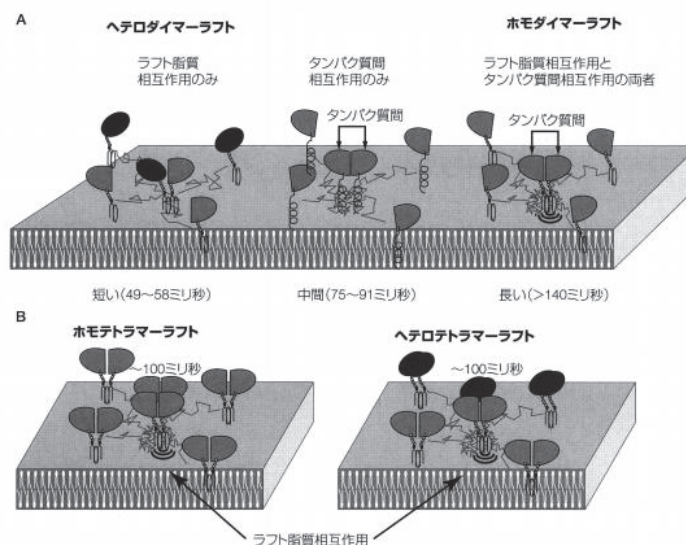


Figure 2. 定常状態における GPI アンカー型受容体のホモダイマーラフト

⁴ K. G. N. Suzuki, R. S. Kasai, K. M. Hirose, Y. L. Nemoto, M. Ishibashi, Y. Miwa, T. K. Fujiwara, A. Kusumi, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 774-783.

⁵ 鈴木健一, 楠見明弘, *分子消化器病* **2014**, *11*, 65-69.

さらに、リガンド刺激後の一分子観察により、会合した CD59 クラスターは細胞膜上で単純ブラウン運動をし、下流シグナル分子の会合時に STALL (Stimulation-induced Temporary Arrest of Lateral diffusion) と呼ばれる特異的な一時停留を示すこと⁶が明らかにされた (Figure 3)。このように組成や構造が不均一かつ不安定であり、その上動的な性質を持つ脂質ラフトの研究においては、一分子観察法が極めて有用であることが、以上の観察結果により実証された。

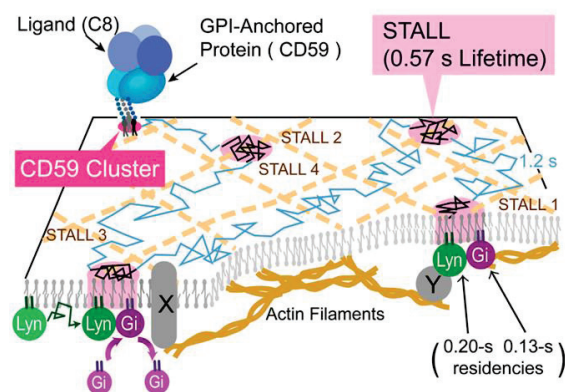


Figure 3. GPI アンカー型受容体の STALL

脂質ラフトは各々の組成に基づき、異なる性質を発現すると考えられている。その性質の決定に関与するラフト構成成分の一つがガングリオシドである。ガングリオシドは構造中に一残基以上のシアル酸を含むスフィンゴ糖脂質であり、その糖鎖構造に基づく特異的な機能が生理的、医学的に注目されている。例を挙げると、アミロイド β タンパク質は脂質ラフト中のガングリオシド GM1 上に特異的に凝集する。この凝集体の形成はアルツハイマー病に特徴的な病理変化をもたらすことから、アルツハイマー病の発症の一因であると考えられている⁷。また井ノ口らはガングリオシド GM3 が脂質ラフトを介してインスリン受容

⁶ a) K. G. N. Suzuki, T. K. Fujiwara, F. Sanematsu, R. Iino, M. Edidin, A. Kusumi, *J. Cell Biol.* **2007**, 177, 717-730. b) K. G. N. Suzuki, T. K. Fujiwara, M. M. Edidin, A. Kusumi, *J. Cell Biol.* **2007**, 177, 731-742.

⁷ K. Yanagisawa, A. Odaka, N. Suzuki, Y. Ihara, *Nat. Med.* **1995**, 1, 1062-1066.

体の機能調節に関わっていることを報告している⁸。しかしながら、脂質ラフトを介したガングリオシドの多くの機能が見出されているものの、ガングリオシドの挙動を捉え、性質を詳細に解析することは困難であるとされてきた。それは、天然のガングリオシドの機能を保持した観察用プローブの開発が遅れていることによる。このような課題を背景として、今日では優れた観察用ガングリオシドプローブの創製が一層必要とされるようになってきた。

この要求に応えることを目指し、本研究では細胞膜ドメインの形成機構や構造の解明を指向した機能性ガングリオシドプローブの化学合成を行うこととした。本論文の第一部では、一分子観察実験を指向した蛍光ガングリオシドプローブの開発について述べる。ここでは、蛍光プローブの化学合成法の開発、続いて蛍光プローブの生細胞膜上における機能の検証、さらには一分子観察実験によるラフト関連分子との相互作用の観察結果について論述する。第二部ではガングリオシドプローブの機能拡張を図り、近接分子との架橋形成が可能な光反応性ガングリオシドプローブの開発を試みた。種々の光反応性ガングリオシドプローブの化学合成について論述する。

⁸ S. Tagami, J. Inokuchi, K. Kabayama, H. Yoshimura, F. Kitamura, S. Uemura, C. Ogawa, A. Ishii, M. Saito, Y. Ohtsuka, S. Sakaue, Y. Igarashi, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 3085-3092.

第一部

蛍光ガングリオシドプローブの開発

第一章 研究背景

ガングリオシドを蛍光標識する手法として、従来では、ガングリオシド結合タンパク質や抗体の蛍光標識体を利用した間接的な標識法、又は天然からのガングリオシド抽出物を化学法又は酵素法により蛍光標識体へと誘導する直接的な標識法が利用されてきた。

間接的な標識法としては、例えば、蛍光標識したコレラ毒素 B サブユニット及びコムギ胚芽凝集素等を用いることで、細胞膜上の GM1 及び GM3 を標識化する手法が広く利用されていた。しかし、これらのタンパク質は多価であるため、ガングリオシドを凝集し、その局在や挙動を変えることが知られている^{9,10}。また、ガングリオシド抗体を利用する免疫蛍光染色では、最初の工程として細胞膜上のガングリオシドをパラホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドによる固定を行う。しかしながら、楠見・鈴木らは、このような処理によって脂質分子の殆どは固定されず、自由拡散することを指摘している。つまり、固定化されていないガングリオシドに対してガングリオシド抗体、蛍光標識した二次抗体を作用させることで、ガングリオシドの会合を誘起する可能性がある。その為、免疫蛍光染色においても生理条件とは異なる結果を与える事が懸念される¹¹。

一方で、直接的な標識法では、天然より抽出したガングリオシドを原料とした構造変換が行われてきた。即ち、GM1 を例に挙げると、Neu5 位、GalN2 位及び Sph2 位のアミド結合

⁹ D. J. Chinnapen, W. T. Hsieh, Y. M. te Welscher, D. E. Saslowsky, L. Kaoutzani, E. Brandsma, L. D' Auria, H. Park, H., J. S. Wagner, K. R. Drake, M. Kang, T. Benjamin, M. D. Ullman, C. E. Costello, A. K. Kenworthy, T. Baumgart, R. H. Massoi, W. I. Lencer, *Dev. Cell* **2012**, 23, 573-586.

¹⁰ A. T. Hammond, F. A. Hebert, T. Baumgart, D. Holowka, D. Baird, G. W. Geigenson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 6320-6325.

¹¹ K. A. K. Tanaka, K. G. N. Suzuki, Y. M. Shirai, S. T. Shibutani, M. S. Miyahara, H. Tsuboi, M. Yahara, A. Yoshimura, S. Mayor, T. K. Fujiwara, A. Kusumi, *Nat. Methods* **2010**, 7, 865-866.

をアルカリ加水分解し、遊離となったアミノ基の反応性差を利用して目的位置に蛍光分子を導入する手法や^{12,13}、スフィンゴ脂質セラミド *N*-デアシラーゼを利用し Sph2 位のアミド部分へ蛍光分子を導入する手法がとられていた (**Figure 4**)。さらに、Chinnapen らは、天然の GM1 のシアル酸側鎖を過ヨウ素酸酸化により選択的に C7-アルデヒド誘導体とした後に¹⁴、蛍光色素側のアミノ基と反応させることにより、シアル酸側鎖修飾型の GM1 プローブを開発した⁹。(この場合、側鎖は天然構造より二炭素分少ない。) しかしながら、これらの方法にはいくつか問題点が存在する。それは、以下の三点にまとめられる。(1) 抽出で得たガングリオシドは構造類縁体の混在により純品を得ることが難しいこと。(2) 化学的根拠に基づいた構造の証明が困難であること。(3) 脂質ラフト形成に重要な疎水結合や水素結合等に寄与する官能基の構造変換を行っているにもかかわらず、プローブの性質は評価されていないこと。

これまでにガングリオシドの動態に関し様々な解釈が存在した背景には、蛍光プローブ化法によってはガングリオシドの物性が本来とは異なるものへ変化していた為と考えれば説明がつくであろう。そのため、天然のガングリオシドの真の動態を明らかにするためには、天然と性質の近似した蛍光プローブの開発が必要と考えられる。そこで本研究では、蛍光プローブ化法として、分子設計の自在性の高い化学合成法を選択した。多様な蛍光プローブの候補を作成し、それらの細胞膜上における機能を評価することで、優れた蛍光ガングリオシドの開発を目指すこととした。

¹² S. M. Polyakova, V. N. Belov, S. F. Yan, C. Eggeling, C. Ringemann, G. Schwarzmman, A. de Meijere, S. W. Hell, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2009, 5162-5177.

¹³ C. Eggeling, C. Ringemann, R. Medda, G. Schwarzmman, K. Sandhoff, S. Polyakova, V. N. Belov, B. Hein, C. von Middendorff, A. Schönle, S. W. Hell, *Nature* **2009**, 457, 1159-1163.

¹⁴ M. Wilchek, S. Spiegel, Y. Spiegel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, 92, 1215-1222.

第二章 分子設計

本研究では、標的ガングリオシドとして脂質ラフトに豊富なガングリオ系ガングリオシド a 系列の GM3、GM2、GM1 を選択した。蛍光ガングリオシドプローブを設計する上で、蛍光分子を導入する位置の決定が最も重要である。そのため、以下の三点のことを考慮してそれぞれの導入位置の候補を挙げた。(1) 蛍光分子はラフト形成に重要なセラミドを立体的に障害しない位置に導入することが望ましい¹⁵。(2) タンパク質の認識部位になり得る、シアル酸カルボキシル基、アセトアミド基の構造は保持すること。(3) 合成の都合上、反応性の良い位置が望ましいこと。以上の点を考慮し、非還元末端側糖残基の一級水酸基二箇所ずつをそれぞれの導入候補位置として挙げた (**Figure 5**)。GM3 については、末端の Neu9 位の他、内部の Gal6 位を候補位置の一つに設定した。それぞれ標識位置の異なる蛍光プローブの細胞膜上における性質を検証・比較することで、天然の性質に近似した蛍光ガングリオシドの選別が可能であると考えた。

¹⁵ a) P. S. Niemelä, M. T. Hyvönen, I. Vattulainen, *Biophys. J.* **2006**, 90, 851-863. b) K. Simons, W. L. Vaz, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2004**, 33, 269-295.

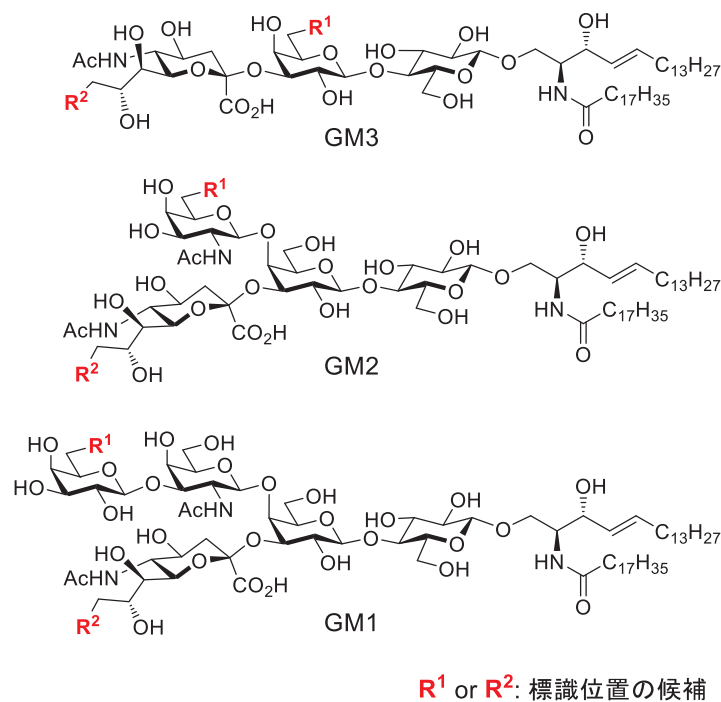


Figure 5. 標識位置の候補

第三章 ガラクトース 6 位標識 GM3 プローブの合成

第一節 合成戦略

蛍光ガングリオシドプローブの合成研究を開始するにあたり、まずはラフトに豊富に存在するガングリオシドの中でも、構造が最も単純な GM3 を標的分子とし、蛍光ガングリオシドプローブの合成法の確立を図った。標識位置の候補として Neu9 位、Gal6 位の二つの一級水酸基を挙げたが、初めに Gal6 位標識型の合成について検討した。

蛍光色素は高価で、しかも化学的に不安定であるため、合成の最終反応で導入するのが望ましいと考えた。そこで GM3 糖鎖の数ある水酸基の中から望む Gal6 位のみ蛍光色素

を導入するために、水酸基より反応性の高いアミノ基で Gal6 位水酸基を置換した中間体を設計し、これを蛍光色素導入の前駆体とした (**Figure 6**)。これに対して蛍光色素導入試薬を作用させることでチオウレア結合やアミド結合を介して蛍光色素を位置選択的に結合させることが可能と考えた。

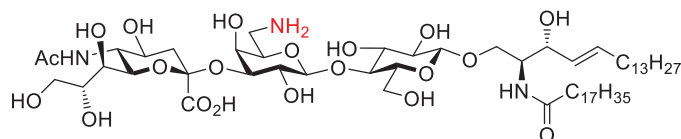
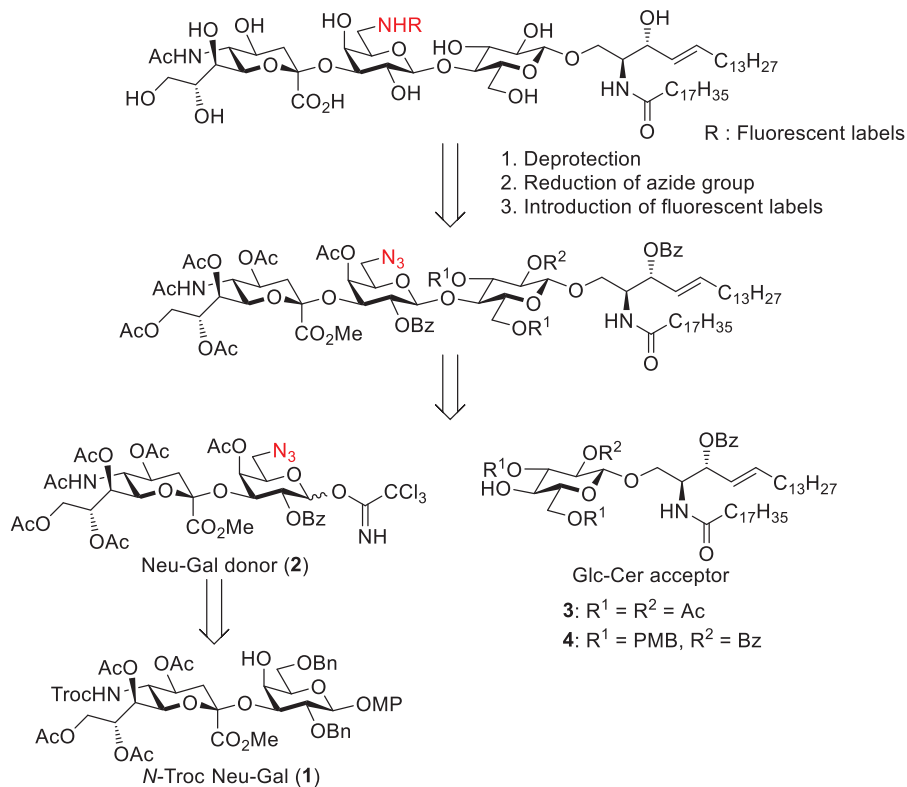


Figure 6. Gal6位標識GM3プローブの鍵化合物

合成戦略を **Scheme 1** に示した。Gal6 位水酸基をアジド基で置換した Neu-Gal 供与体と Glc-Cer 受容体の縮合反応により GM3 骨格を構築した後、脱保護、アジド基の還元により Gal6 位アミノ体とし、最後に各種蛍光色素を導入することにより目的化合物へと導く経路を立案した。



Scheme 1. Gal6位標識GM3プローブの合成戦略

この合成において、ガングリオシド骨格を効率良く構築する事が最も重要である。そこで、(1) Glc-Cer カセットの利用、(2) Neu-Gal 二糖ユニットに対する直接的な Gal6 位アジド化、の二つの戦略をとった。これらは、ガングリオシド合成における共通の課題として挙げられる二つの課題、(1) Cer 導入時の低収率、(2) シアル酸導入時の低収率・低立体選択性、を解決する手段として採用した。

Cer の 1 位水酸基は 2 位アミド基との水素結合に加え、二本の長鎖アルキル鎖による立体障害及び高凝集性により極めて低反応性である。そのため、従来のガングリオシド合成法では糖鎖に対する Cer 導入時の低収率が度々課題とされた。当研究室で開発された Glc-Cer カセットアプローチはこの課題を解決する画期的な脂質導入法である。糖鎖還元末端側の Glc に予め Cer を導入した Glc-Cer 受容体と糖鎖供与体をグリコシド化反応に供することで、高収率にて様々なガングリオシド骨格の構築が可能であることが報告されている^{16,17}。本研究では、その中でも最も汎用されている 3,6 位 PMB 型 Glc-Cer 受容体 **4** と、2,3,6 位 Ac 型 Glc-Cer 受容体 **3** を用い、効率を比較する事とした。2,3,6 位 Ac 型 Glc-Cer 受容体 **3** は、隣接位の水酸基を構造の小さな Ac 基で保護することにより、4 位水酸基への立体障害を軽減し、受容体の反応性が向上する可能性を期待して選択した。

二点目の課題として挙げたシアリル化反応は、完全な立体制御法がこれまでに確立されていないため、通常目的とする α -グリコシドとその立体異性体である β -グリコシドの混合物を与える。更に、1 位カルボキシ基によるオキシカルベニウムイオンの不安定化、3 位デオキシ構造による 2,3-ene 体の生成促進により、縮合収率の低下も課題となる。これまでに、シアリル化反応の立体選択性を高めるために、ニトリル溶媒効果¹⁸の利用、4,5-オキサ

¹⁶ K. Fujikawa, S. Nakashima, M. Konishi, T. Fuse, N. Komura, T. Ando, H. Ando, N. Yuki, H. Ishida, M. Kiso, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 5641-5651.

¹⁷ a) A. Imamura, H. Ando, H. Ishida, M. Kiso, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3009-3023. b) H. Tamai, H. Ando, H. N. Tanaka, R. Hosoda-Yabe, T. Yabe, H. Ishida, M. Kiso, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2330-2333. c) S. Nakashima, H. Ando, R. Saito, H. Tamai, H. Ishida, M. Kiso, *Chem. Asian J.* **2012**, *7*, 1041-1051.

¹⁸ O. Kanie, M. Kiso, A. Hasegawa, *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, *7*, 501-506.

ゾリジノン供与体を用いた溶媒非依存的なグリコシド化¹⁹などが報告されてきた。しかしながらこのような優れた効果・供与体をもっても依然深刻な問題であるのが、いずれも立体選択性が供与体・受容体の構造に依存して大きく変動するという点である。この問題点を受け、本研究においては、水酸基を窒素官能基で置換した単糖ユニットをシアリル化反応に供することは得策ではないという考えに至った。そこで、本研究では、大量供給が可能な *N*-Troc Neu-Gal 二糖ユニット **1**²⁰から、Gal6-N₃ 供与体 **2** へ誘導するアプローチを試みることにした。*N*-Troc Neu-Gal **1** は *N*-Troc Neu 供与体²¹の利用により高収率・高選択性で構築可能であるだけでなく、高い結晶性により立体異性体の分離が簡便である利点をもつ。これらの検討の詳細を次節から述べる。

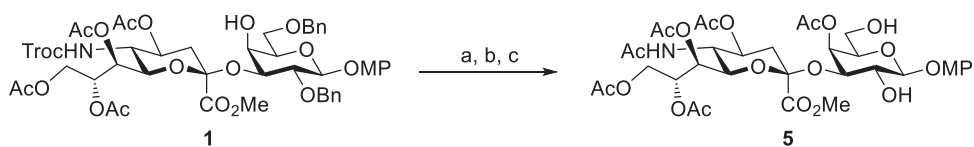
第二節 シアリルガラクトース供与体の合成

初めに *N*-Troc Neu-Gal (化合物 **1**) の Troc 基を ZnCu/AcOH により還元的に除いた後にアセチル化、接触水素添加法による脱ベンジル化を行い、Gal2,6 位の水酸基が遊離の化合物 **5** へと導いた (Scheme 2)。

¹⁹ a) H. Tanaka, Y. Nishiura, T. Takahashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7124-7125. b) D. Crich, W. Li, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2387-2391. c) M. D. Farris, C. De Meo, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1225-1227. d) T. Aoyagi, S. Ohira, S. Fuse, J. Uzawa, Y. Yamaguchi, H. Tanaka, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 6968-6973.

²⁰ T. Fuse, H. Ando, A. Imamura, N. Sawada, H. Ishida, M. Kiso, T. Ando, S. C. Li, Y. T. Li *Glycoconjugate. J.* **2006**, *23*, 329-343.

²¹ H. Ando, Y. Koike, H. Ishida, M. Kiso, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6883-6886.



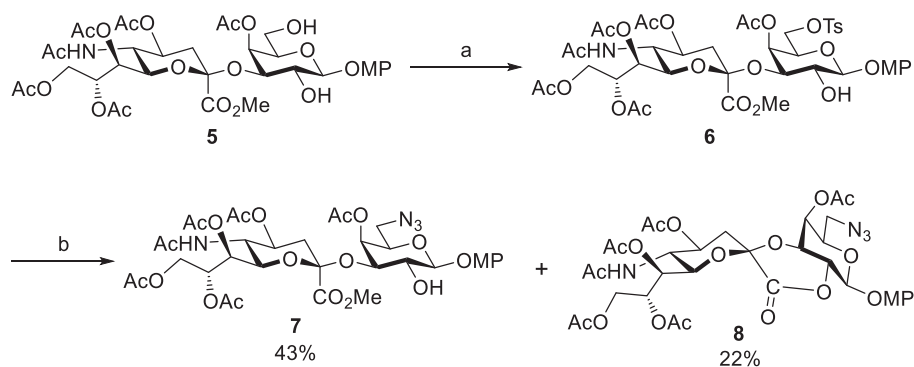
Reagents and conditions

a) ZnCu/ AcOH-MeOH, rt; b) Ac₂O, DMAP/ Pyr., rt, 82% (2 steps); c) H₂, Pd(OH)₂-C/ 1,4-Dioxane, rt, quant.

Scheme 2. シアリルガラクトースの変換

続いて化合物 **5** に対する Gal6 位アジド化の検討を行った。アジド基は主にハロゲンやスルホン酸エステルを脱離基とした求電子体へのアジドアニオンの S_N2 反応により導入される他、光延反応による導入法も汎用されている。多くの報告で、スルホン酸エステルは低温条件で一級水酸基選択的な導入が可能である。Ercégovic²²らは Neu9 位に Ts 基を極めて高収率にて導入し、続くアジド基への変換においても良好な結果を示している。そこで彼らの手法を参考に、Gal6 位の選択的 Ts 化を行った (**Scheme 3**)。CH₂Cl₂、Pyr の混合溶媒中、0 °C にて TsCl を作用させ、90%にて Gal6-Ts 体を得た。続いて化合物 **6** に対し NaN₃、18-crown-6 を作用させ、アジド基への変換を試みた。しかしながら、目的とする Gal6-N₃ 体 (化合物 **7**) の他に Gal6 位が N₃ 基の 1,2-ラクトン体 (化合物 **8**) の副生が目立つ結果となった。これは強塩基性・高温条件下、Gal2 位水酸基が隣接する Neu1 位のカルボニル炭素を求核攻撃し、分子内でエステル交換反応が起こった結果、安定な六員環形成が促進されたと考察した。

²² T. Ercégovic, G. Magnusson, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 179-184.



Reagents and conditions

a) TsCl/ CH₂Cl₂-Pyr., 0 °C, 90%; b) NaN₃, 18-crown-6/ DMF, 60 °C.

Scheme 3. Ts体を用いたアジド化の検討 I

目的とする Gal6-N₃ 体の収率が低く、また 1,2-ラクトン体との分離が困難であったため、変換の順序を変更した。すなわち、Gal6 位への脱離基導入後に Gal2 位水酸基を保護し、その後アジド化に供す経路をとれば、ラクトン形成は回避できると考えた。そこで化合物 **6** の 2 位水酸基をベンゾイル化し、化合物 **9** へと導いた後、再びアジド化の検討を行った (Table 1)。

		R ¹		R ²	
		6	OTs	H	
		9	OTs	Bz	
		10	N ₃	Bz	

entry	reagents (eq.)	solvent	temp. (°C)	time (h)	yield
1	NaN ₃ (8.0), 18-crown-6 (2.0), Drierite	DMF	80	19	62%
2	TMSN ₃ (2.5), TBAF (1.5)	MeCN	60	6	0%
3	TMGN ₃ (8.0), Drierite	DMF	80	14	57%

Table 1. Ts体を用いたアジド化の検討 II

しかしながら、これによりラクトン形成の課題は回避されたものの、TLC 上で原料と生成物の極性差が見出せず、反応終了の見極め及び精製が極めて困難という問題が新たに浮

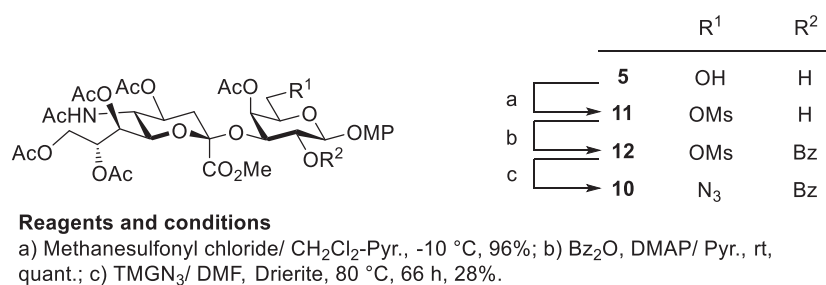
上した。そのため、条件 1 では反応時間を 19 時間とり、原料の完全な消費を図った結果、目的物の単離に成功し、62%の収率を得た。この時、Neu1 位がカルボン酸である副生成物の生成を確認し、これによって収率が中程度となった。これは、Curtius 転位や Schmidt 転位と同様に、系内で Neu カルボニル炭素がアジ化物イオンからの求核攻撃を受け、不安定なアジドエステルを形成している為であると推測した。

より温和な条件で反応が進行することを期待し、アジド化剤として Trimethylsilyl azide (TMSN₃) や Tetramethylguanidinium azide (TMGN₃)²³を用いた検討も行った (条件 2、条件 3)。溶解性が低い NaN₃ に対して TMSN₃ 及び TMGN₃ はほとんどの有機溶媒に可溶であり、試薬を過剰に用いる必要がない点で NaN₃ よりも優れた反応剤であると考えた。しかしながら、TMSN₃ を用いた系では生成物が得られず、原料のみが残る結果となった。一方の TMGN₃ においては反応の進行は若干促進されたが、原料の完全な消費が困難であり、NaN₃ の系と同様の結果を与えた。混在している原料を分離する手段として、アジ化物イオンよりも求核性の強いチオラートアニオンによるチオエステル化²⁴により目的物との極性差を作り出す検討も行ったが、反応の進行は観察されなかった。この結果を受け、Ts 基よりも脱離能の高い脱離基を用いれば、収率の向上と生成効率の改善が可能と期待した。そこで、Ts 基よりも脱離能が高いと考えられるスルホン酸エステルとして Methanesulfonyl (Ms) 基及び *p*-Nitrobenzenesulfonyl (Ns) 基を選択し、比較することとした。

芳香環を有する Ts 基に対して Ms 基は立体的に小さな構造であり、アジ化物イオンの接近がより容易になると考えた。同様にして基質を合成し、アジド化に供した。その結果、期待に反し、Ms 体の反応性は劣悪であり、反応時間を 66 時間かけても原料が残存する結果となった (Scheme 4)。

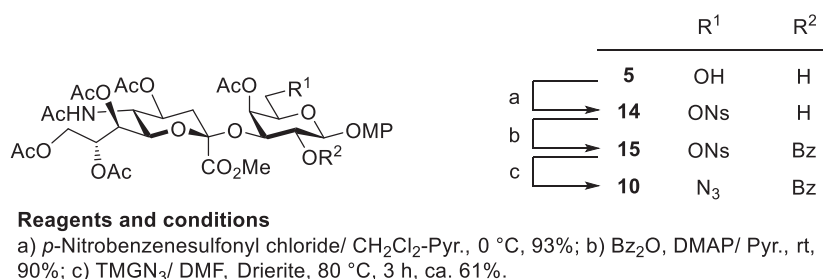
²³ a) A. J. Papa, *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 1426-1430. b) C. Chu, A. Ramamurthy, A. Makriyannis, M. A. Tius, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 55-61.

²⁴ J. Wu, *Chem. Lett.* **2006**, *35*, 562-563.



Scheme 4. Ms体を用いたアジド化の検討

Ns 基は *p* 位ニトロ基の電子求引の効果により、Ts 基よりも脱離が迅速であることを期待して選択した。同様にアジド化を検討した結果、予想通り反応は 3 時間で終了した (Scheme 5)。これによりメチルエステルの分解は若干抑制されたものの、構造不明の副生成物が複数生成したため収率の向上には至らなかった。

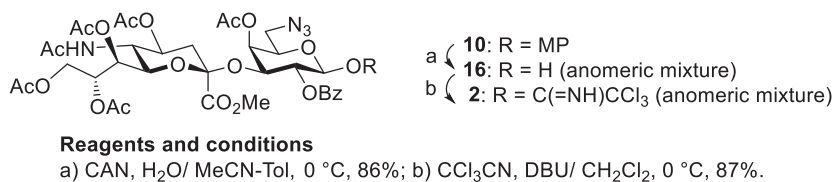


Scheme 5. Ns体を用いたアジド化の検討

以上の検討から Ms 基及び Ns 基は Ts 基に代わる脱離基にはなり得ないと判断した。6 位アジド化は解決すべき課題を残した。

検討を通して Neu (メチルエステル) 存在下におけるアジド化反応が困難であることが明らかとなった。単糖の段階で Gal6 位へアジド基を導入する方法も一つの手段であるが、合成戦略で述べた様に、Neu-Gal 骨格構築のシアリル化反応において収率及び立体選択性向上のための検討、さらに立体異性体の分離などの課題が生じると予想される。

続いて、化合物 **10** を供与体へ誘導した (Scheme 6)。CAN を作用させてアノマー位の脱保護を行った後²⁵、脱離基として有用なトリクロロアセトイミデート基²⁶を導入した。次節では合成した Neu-Gal 供与体 **2** を用いた GM3 骨格の構築について記す。



Scheme 6. 供与体への変換

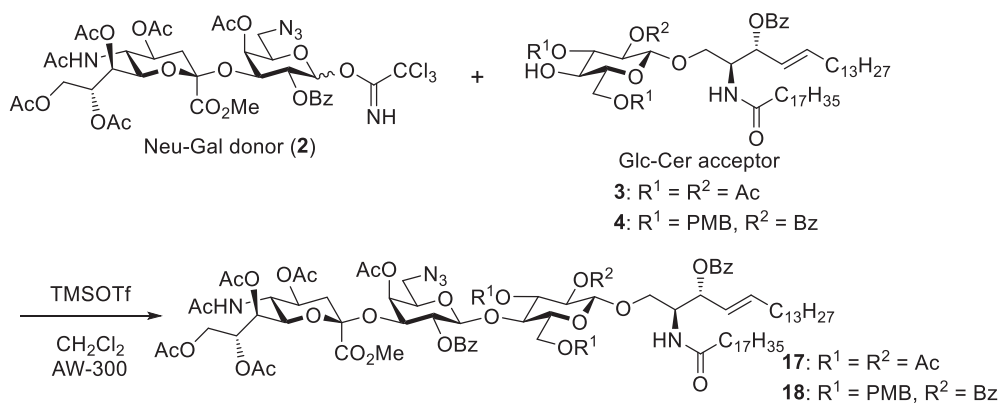
第三節 GM3 骨格の構築

前節にて合成した供与体 **2** と Glc-Cer 受容体をグリコシル化反応に供した (Table 2)。まずは Glc の 3,6 位水酸基を Ac 基で保護した Glc-Cer 受容体 **3** に対するグリコシル化を検討した。条件 1 では供与体に対して受容体を 1.5 当量用いて検討を行ったが、供与体由来のヘミアセタール体と二量体の生成が目立ち、収率はわずか 30%に留まった。受容体の低反応性が示唆されたため、条件 2 の検討ではこれを補うために受容体を 2.5 当量用いた。結果として収率 64%へ向上したが、依然中程度の結果であり、過剰量の受容体の使用は効果的ではないと判断した。次に、Glc の 3 位及び 6 位水酸基を PMB 基で保護した Glc-Cer 受容体 **4** 1.5 当量を用いて検討した (条件 3)。その結果、受容体の当量を抑えながらも収率の大幅な向上に成功し、84%にて目的物を得た。以上の結果より、受容体 **3** の 3,6 位の Ac 基による立体障害抑制の効果は低く、受容体 **4** の 3,6 位の PMB 基の電子供与が受容体の水酸基の反

²⁵ Y. Matsuzaki, Y. Ito, Y. Nakahara, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 1061-1064.

²⁶ R. R. Schmidt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 212-235.

応性向上に大きく寄与すると結論付けた。よって、以降のガングリオシド骨格構築反応は受容体 **4** の使用を優先する事とした。



entry	acceptor	temp. (°C)	yield (%)
1	3 (1.5 eq.)	0→22	30
2	3 (2.5 eq.)	0→rt	64
3	4 (1.5 eq.)	0	84

Table 2. GM3骨格の構築

第四節 蛍光色素の導入

GM3 への蛍光色素導入の検討をした。蛍光導入試薬として初めに、Fluorescein isothiocyanate (FITC)²⁷を選択した (**Figure 7**)。FITC とは、特に免疫学や分泌学で汎用されている蛍光標識剤のひとつであり、極めて高価な蛍光標識剤の中でも比較的安価である。この蛍光導入試薬は、アミノ基と特異的に反応してチオウレア結合を形成する。蛍光分子、

²⁷ M. Liu, C. Xie, H. Pan, J. Pan, W. Lu, *J. Chromatogr. A* **2006**, 1129, 61-66.

Fluorescein の励起波長 (λ_{ex}) は 492 nm、蛍光波長 (λ_{em}) が 518 nm であり、両波長がタンパク質の自己蛍光域と離れているため、細胞膜上の分子イメージングにしばしば利用される。

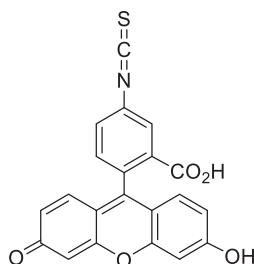
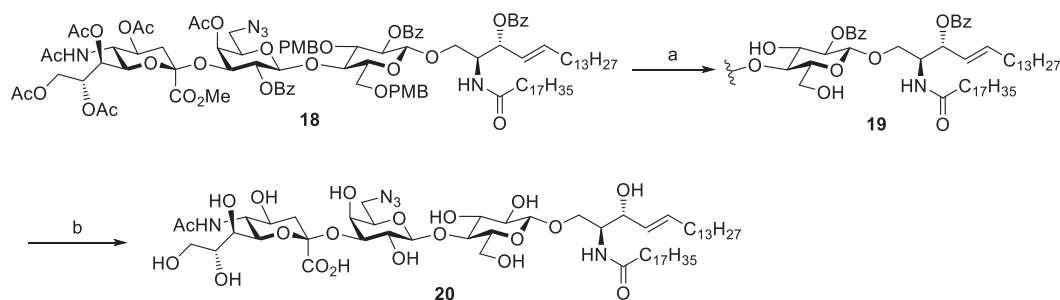


Figure 7. FITCの構造

まず、前節にて合成した GM3 骨格 (化合物 **18**) の脱保護を行った。GM3 誘導体 **18** に対して PMB 基の除去を行い、続いて NaOH 水溶液によるアシル系保護基の除去、及びメチルエステルのけん化を行うことで、Gal6-N₃ GM3 **20** への変換を収率良く行った (**Scheme 7**)。



Reagents and conditions

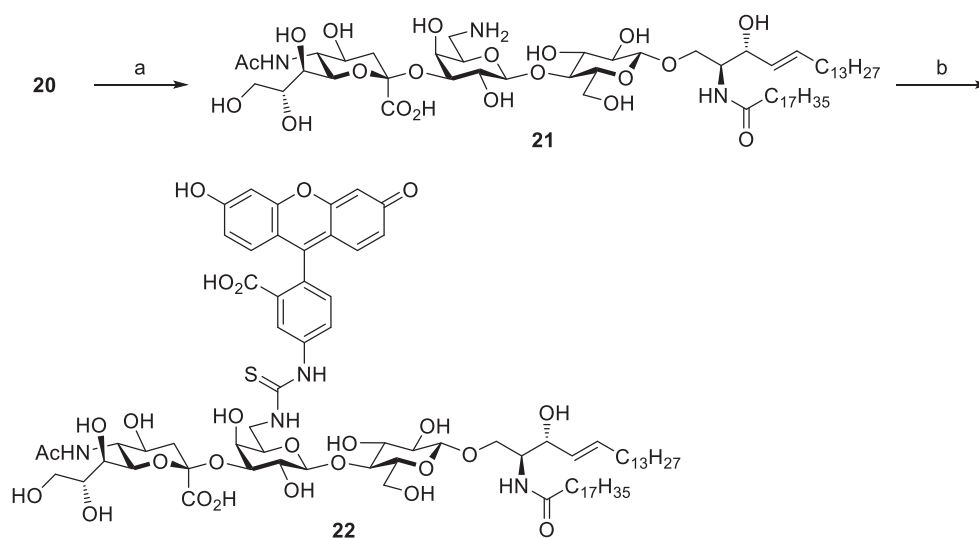
a) TFAcOH/ CH₂Cl₂, 0 °C, 99%; b) 1 M NaOH aq./ MeOH-THF, rt, quant.

Scheme 7. 脱保護反応

次いで化合物 **20** のアジド基をアミノ基へ還元した。その方法としてオレフィン存在下においても化学選択的な還元が可能である Staudinger 反応²⁸を採用した (**Scheme 8**)。

²⁸ H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta.* **1919**, 2, 635.

Staudinger 反応には Triphenylphosphine が Phosphine 試薬として汎用されるが、副生する Triphenylphosphine oxide は強力な水素結合生成能や疎水性を有するため精製時の妨げとなりやすい。そこで、カラムクロマトグラフィーでの精製が容易な Phosphine 試薬として Tributylphosphine を選択した。MeOH、THF 混合溶媒中 50 °C にて反応を行った結果、2 時間で反応の終結を確認した。そして生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーにより精製し、化合物 **21** を得た。次に化合物 **21** に FITC と TEA を作用させた。その結果、反応開始から 4 時間後に出発物質の消失と主生成物の生成を確認した。しかしながら精製において副生成物との分離は困難を極め、しかもこの副生成物は時間経過とともに徐々に増加しているように見受けられた。そこで -78 °C で一週間保存し、保存前後の TLC を比較したところ、複数のスポットが生じていた。この結果は化合物 **22** の構造が不安定で、時間の経過と共に徐々に分解していることを示す。そこで、蛍光色素の結合様式を安定なアミド結合へと変更する考えに至った。

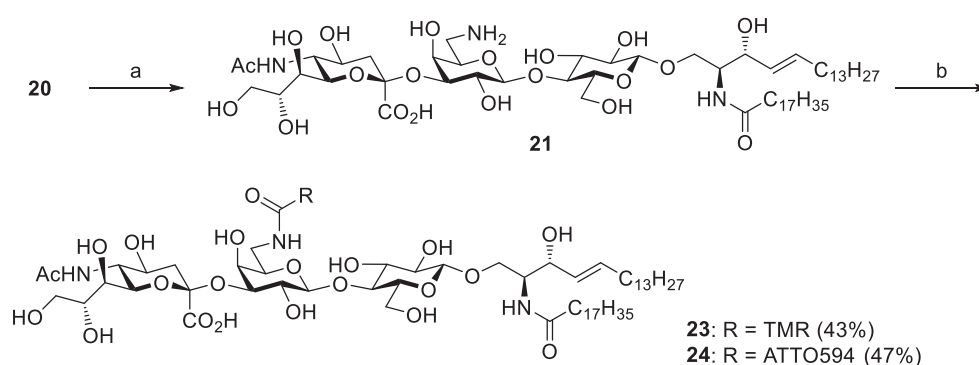


Reagents and conditions

a) Bu₃P, H₂O/ MeOH-THF, 50 °C; b) FITC, Et₃N/ MeOH-THF, rt, decomposed.

Scheme 8. FITCの導入

Tetramethylrhodamine (TMR) は励起波長 (λ_{ex}) 543 nm、蛍光波長 (λ_{em}) 578 nm の蛍光色素である (Figure 8)。また、強い発光を呈し、一分子観察において Fluorescein よりも光褪色されにくいという点で優れている。(光褪色時間は Fluorescein: 約 100 ms、TMR: 約 5 s) さらに、Fluorescein 類は水溶性が高く細胞膜を透過しない一方で、Rhodamine 類は比較的脂溶性が高く細胞内への導入が可能である特長をもつ²⁹。この TMR をアミド結合によりアミノ中間体へ結合させる検討を行った。化合物 **20** に対し Staudinger 反応を行いアミノ体とした後、5-Carboxytetramethylrhodamine *N*-succinimidyl ester、TEA を作用させた (Scheme 9)。精製は PTLC 及びゲル濾過クロマトグラフィーが効果的であり、目的化合物の TMR 標識 GM3 プローブを収率 43%にて得た。さらに同条件にて蛍光色素 ATTO594 の導入も行った。ATTO594 は TMR と比較して長波長 (λ_{ex} : 543 nm、 λ_{em} : 578 nm) で親水性が高い色素である。そして、褪色時間が長いいため (> 10 s)、一分子観察実験により適した特長を持つ。アミノ中間体に対して ATTO594 *N*-succinimidyl ester、TEA を作用させ、化合物 **24** を収率 47%にて得た。なお、これ以降、最終化合物名は蛍光色素の種類、結合位置に準じて 594-G6-GM3 のように呼ぶこととする。二種類の蛍光プローブの細胞膜上における性質の検証については後述する。



Reagents and conditions

a) Bu_3P , H_2O / MeOH-THF , 50 °C; b) Dye reagent, Et_3N / MeOH-THF , rt.

Scheme 9. 蛍光色素の導入

²⁹ 三輪佳宏 蛍光・発光試薬の選び方と使い方.

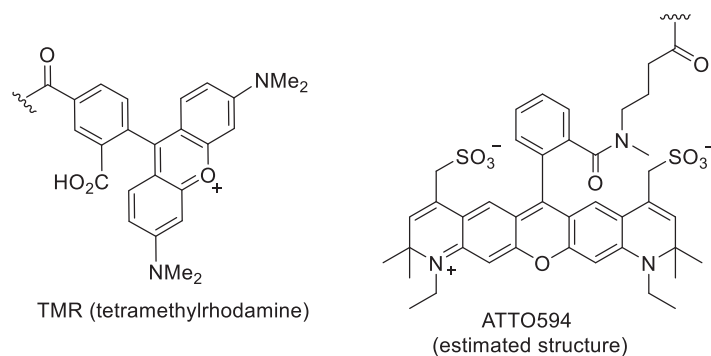


Figure 8. 蛍光色素の構造

第四章 シアル酸 9 位標識 GM3 プローブの合成

第一節 合成戦略

本章では、Neu9 位標識型の GM3 プローブの合成について述べる。蛍光色素導入法は Gal6 位標識型 GM3 プローブの合成結果に基づき、アミド結合を介して蛍光色素を結合させることとした。そこで、鍵化合物として Neu9-NH₂ GM3 誘導体を設計した (**Figure 9**)。

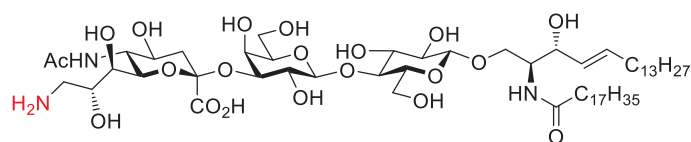
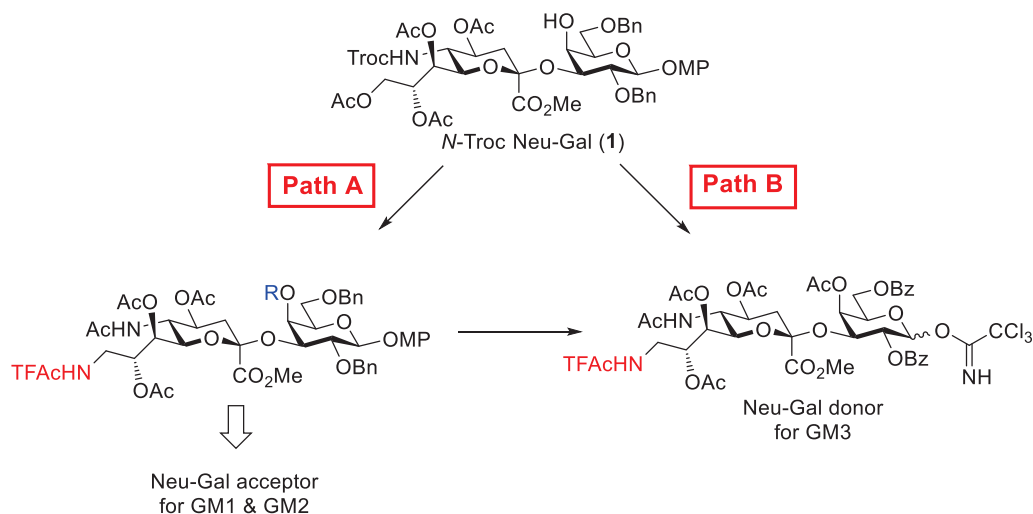


Figure 9. Neu9位標識GM3プローブの鍵化合物

Neu9 位標識型においてもガングリオシド骨格は *N*-Troc Neu-Gal から誘導した Neu9 位修飾型の二糖供与体と Glc-Cer 受容体のグリコシド化反応により構築することとした。そこで、骨格構築に重要な Neu9 位修飾型 Neu-Gal 供与体の合成経路を二経路立案した (Scheme 10)。経路 A では全ての α 系列ガングリオシドプローブの合成に適用する事を目的とし、Gal4 位からの分岐構造の構築を可能とした共通ユニットを合成する。すなわち、Gal4 位水酸基に選択的除去が可能な保護基を導入した共通化合物から、GM3 合成用の二糖供与体への誘導、並びに α 系列ガングリオシド合成用の Gal4-OH 受容体への誘導を指向した。経路 B は GM3 プローブの合成のみを想定して工程の簡略化を図った経路である。修士論文において経路 A をまず検討したが、立体的に込入った Gal4 位水酸基に対して着脱可能な保護基を見出すことが出来なかったため、経路 B により合成研究を進めた³⁰。

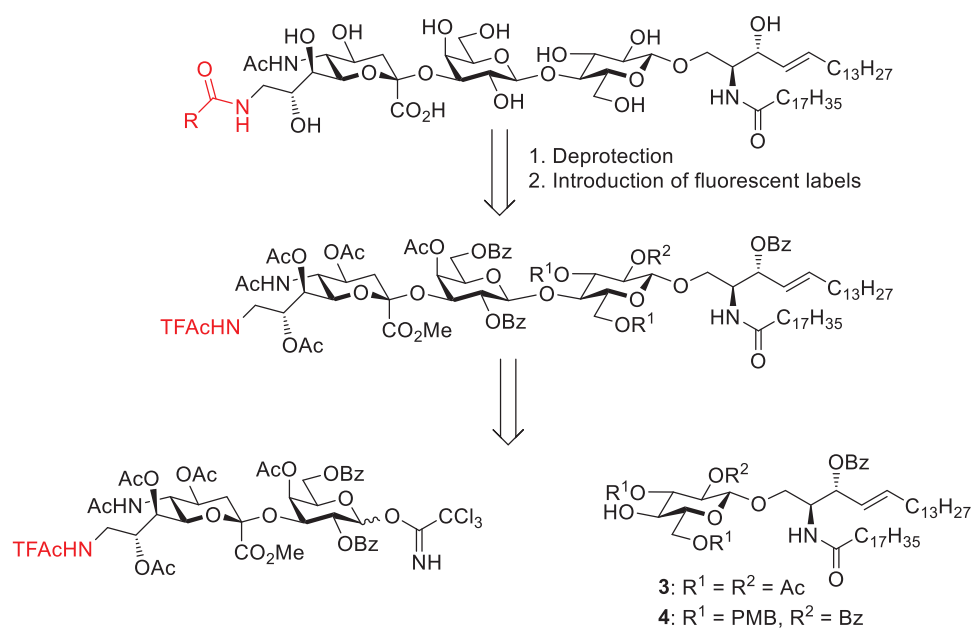


Scheme 10. Neu9位標識GM3プローブの合成戦略

経路 B を検討するにあたり課題となるのが Neu9 位アジド基の還元タイミングの決定であり、以下の点に留意する必要がある。(1)アジド基の還元反応は副反応として Troc 基の

³⁰ 河村奈緒子 岐阜大学大学院 応用生物科学研究科 修士論文 2010.

塩素原子を水素原子へ置換する恐れがあり、逆に活性化 Zn による Troc 基除去はアジド基をも還元してしまう。(2)アミノ基は隣接位からの Ac 基の転位を受けやすい。(3)Bn 基脱保護の段階までにはアジド基を接触水素添加法に耐性のある官能基に変換する必要がある。以上の点を考慮してアジド基は Troc 基除去後に導入することとし、還元のタイミングは Neu9 位アジド化の直後に設定した。遊離となったアミノ基は TFAc 基で保護することで、終盤の脱アシル化反応で遊離のアミンへ変換可能と考えた。Neu-Gal ユニットの供与体へと誘導した後、Glc-Cer 受容体との縮合反応、完全脱保護、蛍光色素の導入の手順で効率的に目的化合物へ導く経路を立てた (Scheme 11)。

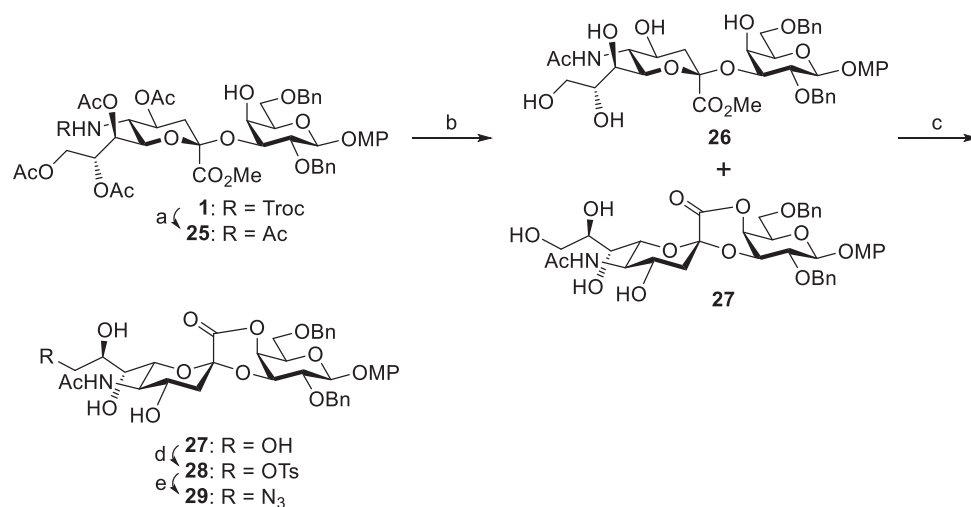


Scheme 11. Neu9位標識GM3プローブの合成戦略

第二節 シアリルガラクトース供与体の合成 I

第一項 1,4-ラクトン体の合成

経路 B の Neu-Gal ユニットの合成では Gal4 位の水酸基の保護を行わずに供与体へと変換する (Scheme 12)。化合物 **1** の 5 位 Troc 基を Ac₂O 存在下で除去する事により、5 位アセトアミド体 **25** を得た。次に化合物 **25** の Ac 基の除去を検討したところ、メチルエステル体 **26** と 1,4-ラクトン体 **27** の混合物が 6:4 の比率を保って生成し、系内で両化合物が可逆的な関係であることを確認した。この結果より、Gal4 位の水酸基が遊離の二糖中間体は塩基性または高温条件において容易にラクトン形成することが分かった。そこで、この 1,4-ラクトン構造を利用した合成経路について検討を行った。化合物 **25** の脱アセチル化反応後、メチルエステルテトラオール体 **26** と 1,4-ラクトントリオール体 **27** の混合物に対して DBU を作用させることで、1,4-ラクトン体 **27** へ収束させた。この変換について検討した結果、反応中にカルボン酸の副生を抑制するために乾燥剤 (MS4Å) を用い、さらに反応終了時には酢酸にて中和することで、再現性良く高収率が得られた。次に Neu9 位水酸基のトシル化、そしてアジド基への変換を行った。ラクトン構造はアジド化反応において非常に安定しており、また立体障害を受けにくい Neu9 位の置換が速やかに進行したため、99%という高収率にて 9-N₃ 体 **29** を得た。NaN₃ と TMGN₃ の両方で検討したが双方とも大差のない結果となったため、調製の必要のない NaN₃ を以後使用する事とした。



Reagents and conditions

a) Zn, Ac₂O/ AcOH-THF, rt, 99%; b) NaOMe/ MeOH, 40 °C; c) DBU/ CH₂Cl₂, MS4Å, 0 °C, 95% (2 steps); d) TsCl, Pyr./ CH₂Cl₂, 0 °C, 67%; e) NaN₃, 18-crown-6/ DMF, Drierite, 80 °C, 99%.

Scheme 12. Neu-Galの変換

続いて Neu9 位の TFAc アミド化の検討を行った。まずは Gal6 位標識 GM3 プローブ合成時と同様に MeOH と THF の混合溶媒中で Tributylphosphine を作用させて化合物 **29** の 9 位アジド基の還元を行った (Table 3)。しかしながら、目的とする化合物 **30** の他にメチルエステル体 **31** が顕著に副生していることが判明した (条件 1)。これは反応溶媒の MeOH によりラクトンがエステル交換を受けた結果生じた副生成物であると考えた。そのため、条件 2 では THF を用いて検討した。ところが TLC にて複数の生成物が確認され、主生成物として新たにイミノホスホランが生じた。イミノホスホランは Staudinger 反応の中間体であり、反応がここで停止するということは即ちプロトンの供給が滞っていることを示している (Scheme 13)。THF と比較して MeOH を用いた系の収率が良好であった要因は酸性度の高い MeOH がイミノホスホランへプロトンを供給していたためと推察される。

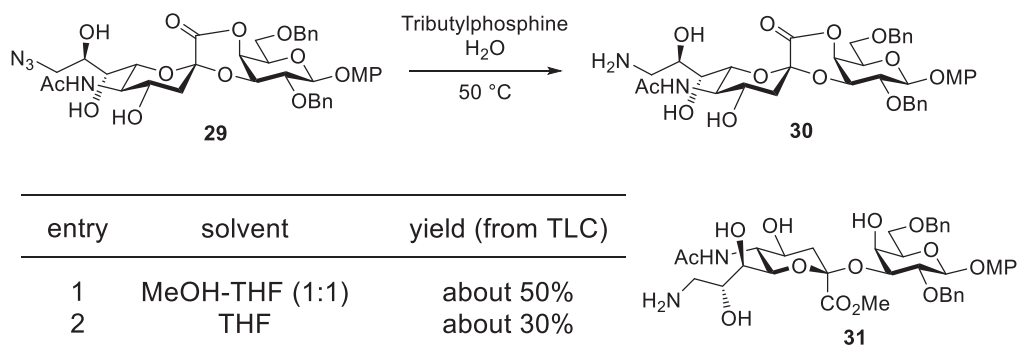
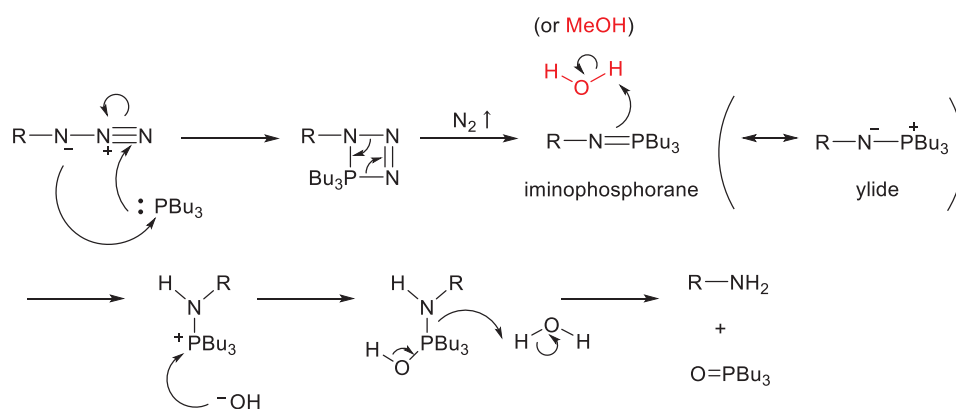


Table 3. PBu₃によるアジド基の還元



Scheme 13. Staudinger反応

当研究室の Magesh ら³¹は酸クロライド存在下 Ethylenebis(diphenylphosphine) (DPPE) をアジド化合物に作用させることによって高収率にてアミド結合の形成を達成している。彼らの報告を参考に、ワンポットによるアジド基の TFAc アミド基への変換を検討した (Table 4)。

³¹ S. Magesh, S. Moriya, T. Suzuki, T. Miyagi, H. Ishida, M. Kiso, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 532-537.

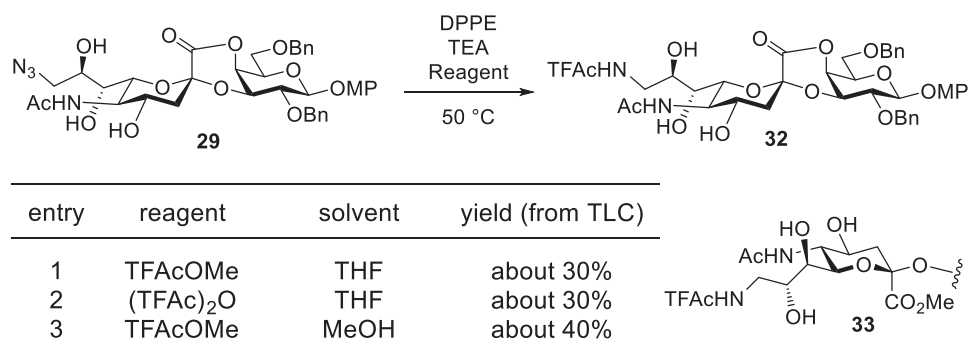
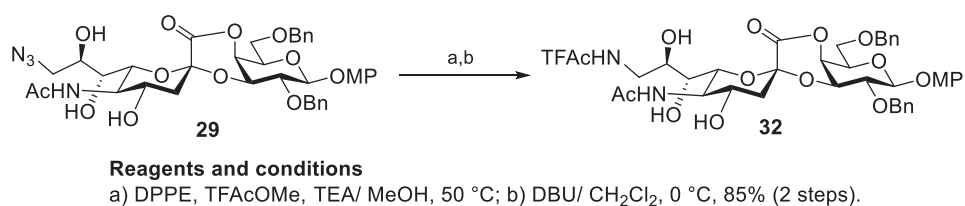


Table 4. DPPEによるアジド基の還元

条件 1 で THF 溶媒中 TFAcOMe を作用させたところ TLC 上で 3 スポット現れ、そのうち二つは目的物及び 9 位が TFAc アミド基のメチルエステル体であることが分かった。TFAc 化試薬を(TFAc)₂O に変えた検討も行ったが、生成物が複雑になった (条件 2)。これに対して MeOH を反応溶媒とした条件 3 では目的物とメチルエステル体が 4:6 程度の比率で生成し、9 位の TFAc アミド化の条件としては最適であると考えた。

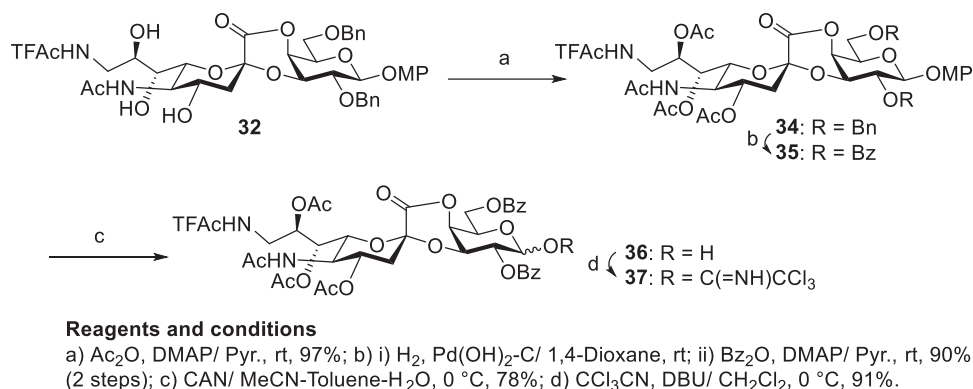
そこで、条件 3 の条件で反応を行った後に、前述の DBU を用いた条件により再びラクトン体へ誘導した。その結果、二段階 85%の収率で目的物 **32** を得た (Scheme 14)。



Scheme 14. TFAcアミド化の検討 (1, 4-ラクトン)

第二項 供与体への変換

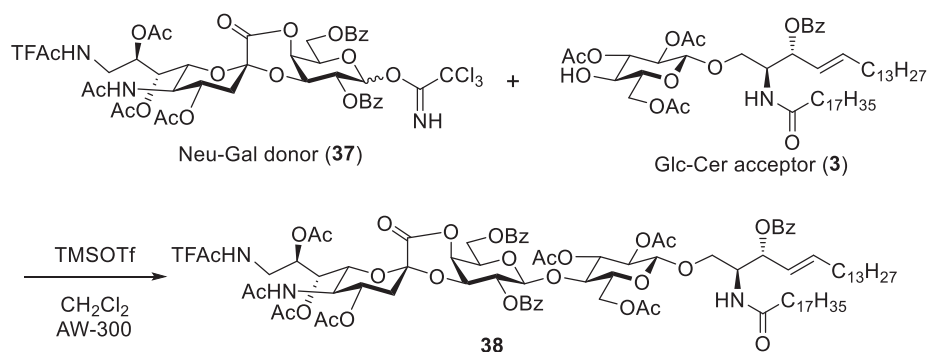
次に化合物 **32** を供与体へ変換した。シアル酸の遊離の水酸基をアセチル化した後、接触水素添加法による Bn 基の除去及び Gal2,6 位水酸基への Bz 基の導入を行い化合物 **35** へ誘導した (Scheme 15)。続いてアノマー位の脱保護、トリクロロアセトイミデート基の導入により供与体 **37** を得た。この反応において α 体が主生成物として得られ、 β 体は僅かにしか生成しなかった。1,4-ラクトン構造を有した Neu9 位修飾型 Neu-Gal ユニットを安定的に供与体へ誘導することに成功した。次節では供与体 **37** と Glc-Cer 受容体との縮合反応について述べる。



Scheme 15. 供与体への変換

第三節 GM3 骨格の合成検討 I

合成した Neu-Gal 供与体 **37** と Glc-Cer 受容体 **3** をグリコシル化反応に供した (Table 5)。



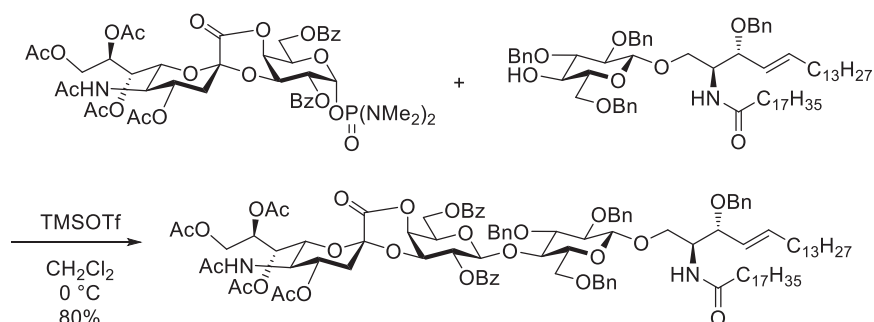
entry	acceptor	temp.	yield (%)
1	1.5 eq.	0 °C→23 °C	trace
2	2.5 eq.	0 °C→rt	trace

Table 5. GM3骨格の構築

まずは供与体に対して受容体 **3** を 1.5 当量用いて供与体の反応性を検証した。驚いたことに縮合物 **38** は質量分析にて僅かに存在が確認された程度であった (条件 1)。他の副生成物として供与体が加水分解を受けたヘミアセタール体と供与体の二量体を確認したが、それだけでなく構造不明の副生成物が複数生成する結果となった。条件 2 では受容体を 2.5 当量にし、室温にて検討を行ったが、改善の兆候を見出すことはできなかった。これらの結果は化合物 **37** の供与体としての低反応性を示唆している。これまでに報告されてきた Neu-Gal 供与体と比較して特徴的であるのが、1,4-ラクトン構造である。これが低収率の要因であるとする、供与体の Gal3,4 位水酸基間の堅固な六員環構造の強い環ひずみにより、オキソカルベニウムイオンが不安定化されたと推測できる。橋本ら³²は Neu α (2→3)Gal 1,4-ラクトン供与体と Bn 基で保護した Glc-Cer 受容体をグリコシル化反応に供することにより天然型 GM3 を高収率にて構築している (Scheme 16)。この結果を踏まえると、より高反応性の受容体を用いることで供与体の低反応性を補える可能性も期待できる。しかしながら、供与体の

³² H. Sakamoto, S. Nakamura, T. Tsuda, S. Hashimoto, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 7691-7695.

反応性の相違を検証するため、新たにメチルエステル型の供与体を合成し、二つのグリコシド化反応の結果を比較することとした。



Scheme 16. 橋本らの報告

第四節 シアリルガラクトース供与体の合成 II

メチルエステル供与体の合成法について検討した。1,4-ラクトン構造は出発物質の *N*-Troc Neu-Gal から Neu9 位アジド体へ誘導する上で有用であり、特に Neu9 位アジド化においてはカルボキシル基を保護する役割を担って高収率を与えた。一方で TFAc アミド化の検討から、1,4-ラクトンは MeOH 中で容易にメチルエステルへ開環されることが明らかとなった。以上のことをふまえて、1,4-ラクトン体 **29** の TFAc アミド化時に得られるメチルエステル体 **33** からの誘導が可能と考えた。

初めに、化合物 **29** のメチルエステル体への変換を検討した (Table 6)。

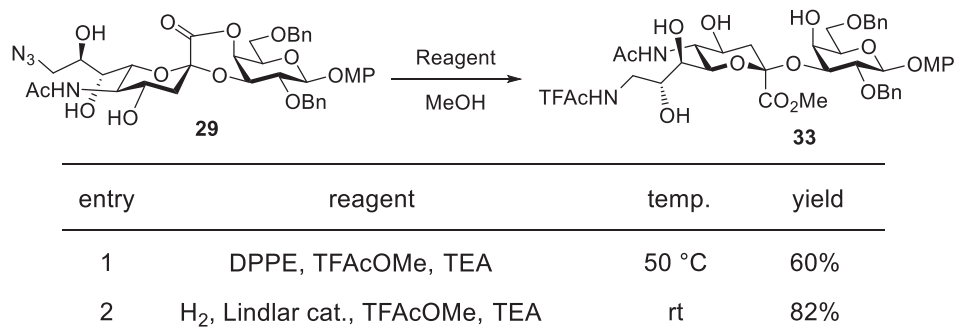
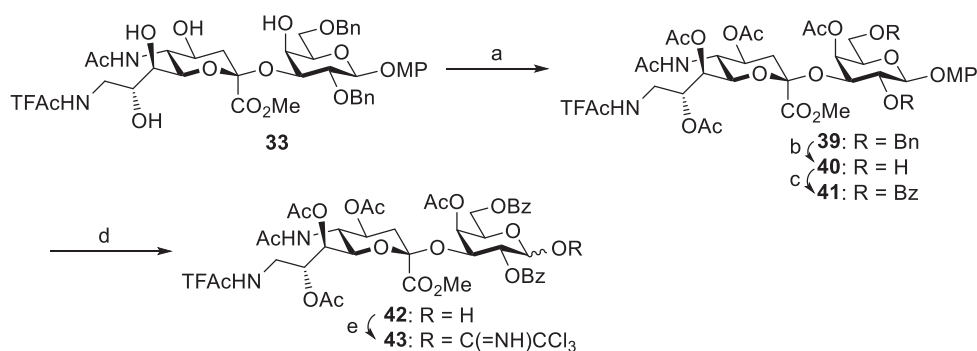


Table 6. アジド基の還元

条件 1 では MeOH 溶媒中 DPPE、TFAcOMe を作用させてメチルエステル体 **33** を 60% にて得た。条件 2 では TFAcOMe 存在下で Lindlar 触媒によるアジド基還元とアミド化をワンポットで行い、目的物を収率 82% にて得た。両反応ともラクトン体 **33** が同程度の割合で残したが、条件 2 ではその他の副生成物がほとんど生成しなかったため、収率が大幅に向上した。続いて、メチルエステル体 **33** をアセチル化し、順次保護基の変換を行うことで、トリクロロアセトイミデート体 **43** を得た ($\alpha:\beta = 4:1$) (Scheme 17)。



Reagents and conditions

a) Ac₂O, DMAP/ Pyr., rt, 98%; b) H₂, Pd(OH)₂-C/ 1,4-Dioxane, rt; c) Bz₂O, DMAP/ Pyr., rt, 91% (2 steps); d) CAN, H₂O/ MeCN-Tol, 0 °C, 88%; e) CCl₃CN, DBU/ CH₂Cl₂, 0 °C, 98%.

Scheme 17. 供与体への変換

第五節 GM3 骨格の合成検討 II

合成したメチルエステル供与体 **43** を用いて GM3 骨格構築の検討を行った (Table 7)。条件 1 では供与体に対して Glc-Cer 受容体 **3** を 1.5 当量使用し、0 °C で TMSOTf を加えた後水溫にて攪拌した。反応は 1 時間で終結し、主生成物を単離した結果、目的とする縮合物 **44** であることが確認された。条件 2 では受容体 **3** を 2.5 当量に増加して検討した結果、61%へ改善された。収率は中程度であるが、前章の Gal6-N₃ 型供与体のグリコシド化反応の収率と近似した結果が得られたことから、両供与体の反応性は同等であると考えられる。またこの結果から、1,4-ラクトン供与体 **37** と比較してメチルエステル供与体 **43** の方が高反応性であり、1,4-ラクトン供与体 **37** の低反応性はラクトン構造に起因していることを明らかにした。さらに、条件 3 では高反応性の受容体 **4** をグリコシル化に供し、95%という極めて高収率にて GM3 骨格 **45** を得た。

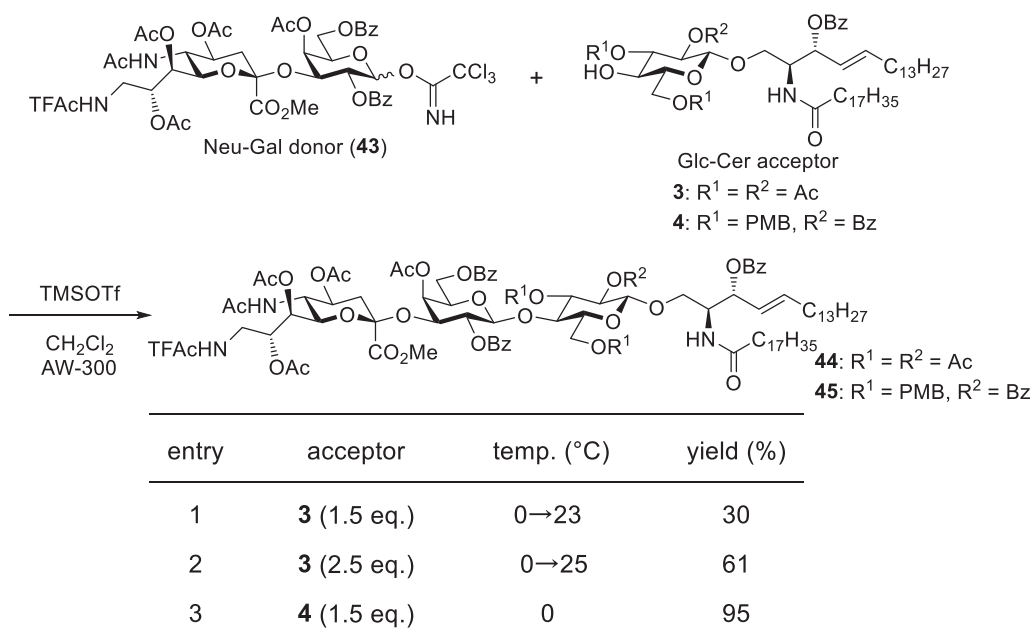
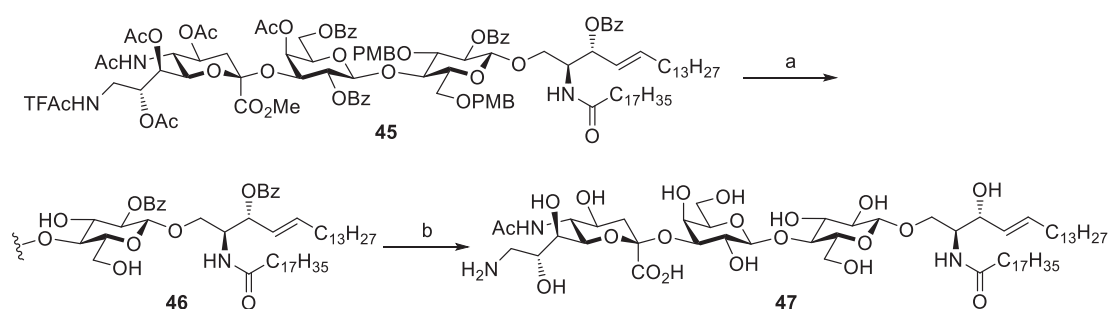


Table 7. GM3骨格の構築

第六節 蛍光色素の導入

次に、蛍光色素の導入に向け、GM3 骨格 **45** の脱保護を行った (**Scheme 18**)。GM3 骨格 **45** の PMB 基を TFAcOH により除去した後、全アシル系保護基を加水分解することによって Neu9-NH₂ 体 **47** へと収率良く誘導した。

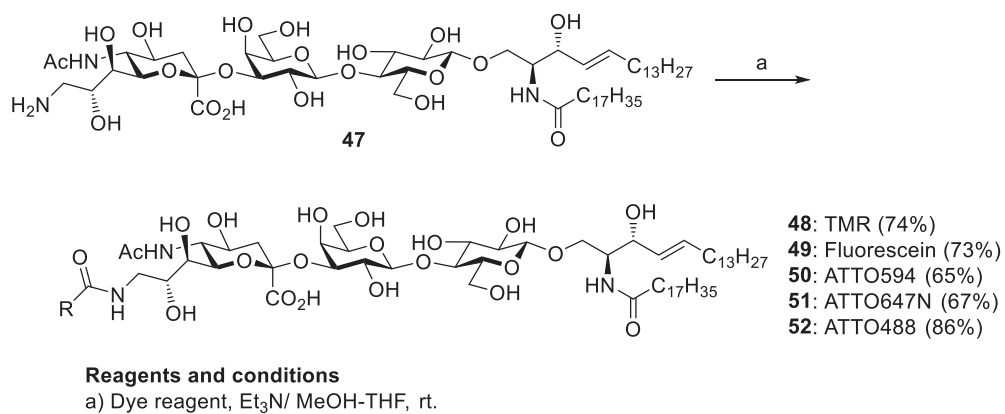


Reagents and conditions

a) TFAcOH/ CH₂Cl₂, 0 °C, 99%; b) 1 M NaOH aq./ MeOH-THF, rt, 85%.

Scheme 18. 脱保護反応

最後に、得られた Neu9 位アミノ体 **47** に各種蛍光色素の活性エステルを反応させ蛍光タングリオシドへ誘導した (**Scheme 19**)。いずれも 67~86%の高収率にて導入を達成し、生成物は LH-20 並びに PTLC によって精製した。GM3 の Gal6 位への蛍光色素の導入収率が 4 割程度であったのに対し、Neu9 位への導入収率が上回った要因は、Neu9 位近傍の立体障害が少なく、嵩高い蛍光色素の導入効率が良い為である考えられる。なお、それぞれの蛍光色素の構造を **Figure 10** に示した。



Scheme 19. 蛍光色素の導入

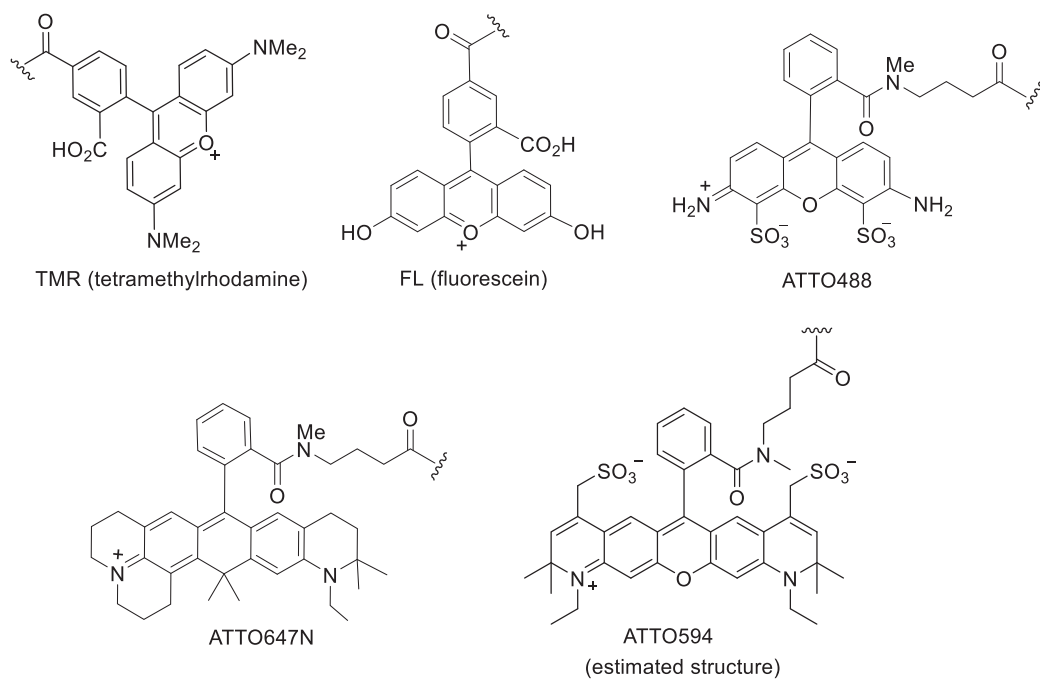


Figure 10. 蛍光色素の構造

第五章 GM3 プローブの機能評価と一分子観察実験

第一節 ラフト分配特性の検証

前述したように、これまでに、本研究とは異なる分子設計の蛍光ガングリオシドプローブは化学酵素法により合成されている。しかしながら、これらのプローブはラフト構成分子(以後ラフトマーカーと記す)としての性質を評価することなく利用されてきた。蛍光標識によって対象分子の物理化学的性質が変化する可能性を考慮すると、蛍光プローブのラフト親和性を厳密に評価してプローブを選別することが、より妥当性の高い観察結果を得る為に重要であると考えられる。

そこで、合成した Gal6 位標識 GM3 プローブ (594-G6-GM3, TMR-G6-GM3) 及び Neu9 位標識 GM3 プローブ (647N-S9-GM3, TMR-S9-GM3, FI-S9-GM3, 488-S9-GM3, 594-S9-GM3) の生細胞膜上における機能をまずは検証した。合成した蛍光 GM3 プローブがラフト構成分子としての機能を示すか否かを調べるために、代表的な評価方法である DRM 分配実験と Lo/Ld 分配実験、さらには GPI アンカー型受容体の CD59 クラスターとの親和性の評価により検証した。

ラフトに存在する膜分子は脂質間相互作用により凝集した脂質環境にあるため、低温で Triton-X100 などの非イオン性界面活性剤で処理をしても不溶性膜画分 (DRM 画分) に分配される性質が報告されている³³。これより、DRM 画分に分配される膜分子がラフトマーカー³⁴となり得る性質を示す分子であり、一方で DRM 画分に分配されない分子は非ラフトマーカーであると定義されるようになった。**Figure 11** に示すように、DRM 分配実験において

³³ a) A. K. Kenworthy, B. J. Nichols, C. L. Remmert, G. M. Hendrix, M. Kumar, J. Zimmerberg, J. Lippincott-Schwartz, *J. Cell Biol.* **2004**, 165, 735-746. b) B. J. Nichols, A. K. Kenworthy, R. S. Polishchuk, R. Lodge, T. H. Roberts, K. Hirschberg, R. D. Phair, J. Lippincott-Schwartz, *J. Cell Biol.* **2001**, 153, 529-541.

³⁴ 厳密には、ラフトマーカーではなく DRM 分子と呼んだほうが良い。
A. Kusumi, K. Suzuki, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1746, 234-251.

T24 細胞上の天然のガングリオシド GM1 及び GM3 は DRM 画分 (TX-100 不溶性膜画分) へ分配されることを確認した (図は TX-100 不溶性/可溶性膜画分の成分を PTLC 上で展開した結果)。

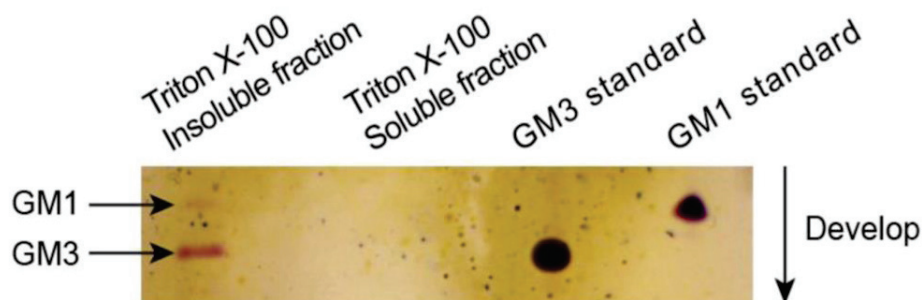


Figure 11. 天然型ガングリオシドの DRM 分配実験

そこで Kenworthy らの手法に従い蛍光ガングリオシドプローブの T24 細胞上における DRM 分配実験を行うこととした。以下に実験の手法を示す。

【方法】

- (1) T24 細胞に、最終濃度 $1.2 \mu\text{M}$ になるように、各プローブを加え、25 分間、 25°C でインキュベーションした。
- (2) インキュベーション後、バッファー (HBSS with PIPES) で 3 回洗浄した。
- (3) 2.8°C に冷やした 1% TX-100 で、on ice で 15 分間処理した。このときのシャーレ内の温度は 2.8°C 。
- (4) インキュベーション後、バッファー (HBSS with PIPES) で 3 回洗浄し、パラホルムアルデヒドで 90 分間固定した後、蛍光顕微鏡 (Olympus IX70 epifluorescence microscope) で観察した。

Figure 12 が界面活性剤処理前後の T24 細胞膜の蛍光顕微鏡による観察結果であり、図中と **Table 8** に各プローブの DRM への分配率を示した (処理後/処理前比)。膜上の白色の部分 が TX-100 処理後に残存したプローブを示しており、界面活性剤処理前において、いずれの 蛍光プローブも膜上に存在していることが確認できる。しかしながら界面活性剤処理後に

は異なる分配特性を示した。すなわち、Neu9 位標識 GM3 プローブ (TMR-S9-GM3, FI-S9-GM3, 488-S9-GM3, 594-G6-GM3) は細胞膜に残存し、ラフトマーカ-の性質を示したのに対して、Gal6 位標識 GM3 プローブ (594-G6-GM3, TMR-G6-GM3) 並びに ATTO647N が結合した Neu9 位標識 GM3 プローブ (647N-S9-GM3) は、TX-100 処理によって細胞膜から溶出した。そのため、これらのプローブはラフトへの分配が著しく低下していると考えられる。この結果は蛍光色素の導入位置によってガングリオシドのラフトへの分配が変動するという興味深い事実を示した。

さらに特記すべきことに、これまでラフト研究に利用されてきた BodipyFL-GM1 (構造は **Figure 4** に示す) の DRM への分配を評価した結果、驚くことに、TX-100 可溶性画分に優先的に分配されることを確認し、ラフトへの分配が極めて低いことが明らかになった。

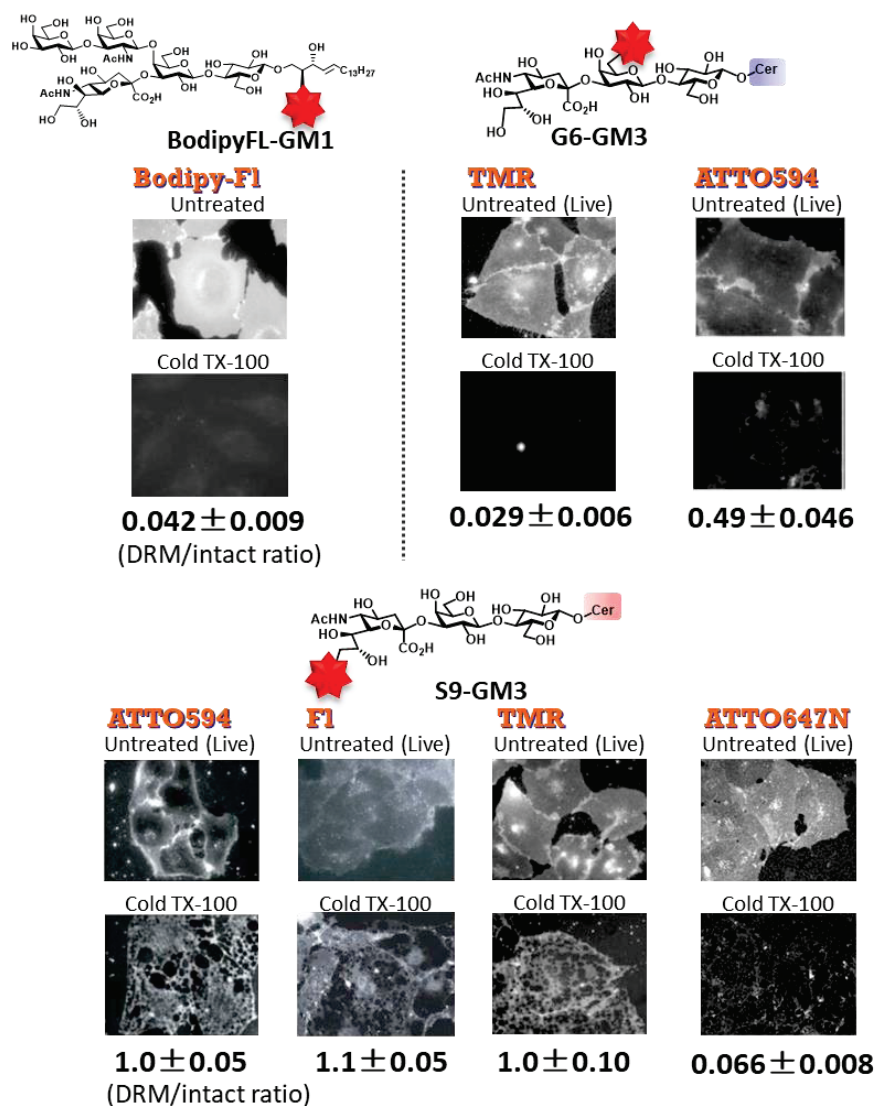


Figure 12. DRM 分配実験の結果

続いてラフト親和性を評価するもう一つの実験として、Giant PM vesicle (GPMV) 上での Lo/Ld 分配実験による評価も行った。分子プローブを導入した細胞 (RBL-2H3) を Formaldehyde と Dithiothreitol (DTT) による薬剤処理に供すことで、膜骨格が除去された、ブレップ膜 (直径 5~20 μm ほどの巨大ベシクルのような膜領域) が形成される。ブレップ膜は低温下 (10 $^{\circ}\text{C}$) では膜上の分子がラフト様の領域 (液体秩序相) とラフトから排除さ

れた領域 (液体無秩序相) に相分離される³⁵。このブレップ膜上で非ラフトマーカであるリン脂質 (BodipyFL-PC) 等とともに、蛍光ガングリオンドプローブを相分離させ、分配傾向を全反射蛍光顕微鏡 (TIRF) により観察した³⁶。その観察結果の一例を **Figure 13** に示す。例えば、左の結果は緑色の BodipyFL-PC を Ld 相の標識分子とし、赤色の 594-S9-GM3 共存下でブレップ膜の相分離を行った結果である。二つの分子の異なる分布が明示され、594-S9-GM3 が Lo 相に分配されていることが見て取れる。

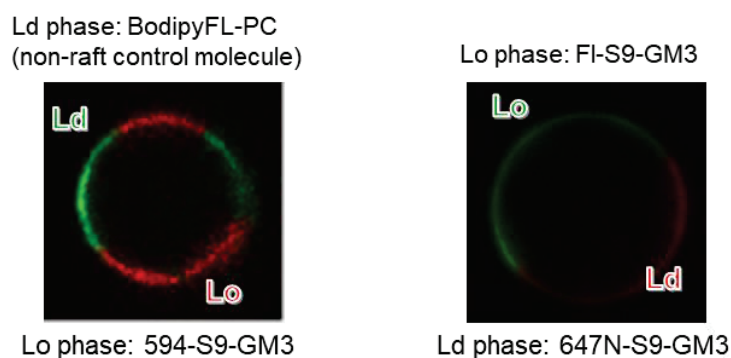


Figure 13. Lo/Ld 分配実験

Lo/Ld 分配実験の結果、DRM 実験にてラフトマーカートの性質を示した Neu9 位標識 GM3 プローブ (FI-S9-GM3, 488-S9-GM3, 594-G6-GM3) は Ld 相とは完全な相分離を示した。この実験からも、これらはラフト親和性の高い分子であることが確かめられた (**Table 8**)。さらに、DRM 分配実験で非ラフトマーカートの性質を示した 647N-S9-GM3 と BodipyFL-GM1 は非ラフト相の Ld 相へ分配し、Gal6 位標識 GM3 プローブ (594-G6-GM3, TMR-G6-GM3) と TMR で標識した Neu9 位標識 GM3 プローブ (TMR-S9-GM3) も Lo 相への分配率増加を示

³⁵ a) D. Lingwood, J. Ries, P. Schwill, K. Simons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 10005-10010.
b) T. Baumgart, A. T. Hammond, P. Sengupta, S. T. Hess, D. A. Holowka, B. A. Baird, W. W. Webb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 3165-3170. c) I. Levental, M. Grzybek, K. Simons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 11411-11416.
³⁶ H. J. Kaiser, D. Lingwood, I. Levental, J. L. Sampaio, L. Kalvodova, L. Rajendran, K. Simons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 16645-16650.

した (Table 8)。BodipyFL-GM1 に関しては、Burns ら³⁷が Ld 相への分配を示しており、この報告と実験結果の一致を確認した。Lo/Ld 分配実験の結果は DRM 分配実験の結果と概ね一致した。すなわち、GM3 への蛍光色素の導入位置がラフト分配特性に大きく影響し、Gal6 位標識体が非ラフト親和性、Neu9 位標識体がラフト親和性を示すことが明らかとなった。さらに、驚くべきことに Lo/Ld 分配実験より、結合させた蛍光色素の親疎水性の違い (Figure 14) によってラフトへの分配特性が大きく異なることが分かった。つまり、Neu9 位に親水性の色素である Fluorescein、ATTO488、ATTO594 を結合させた分子はラフト相に多く分配されたが、やや疎水性の TMR が結合すると非ラフト相への分配率が増し、さらに疎水性の高い ATTO647N が結合した GM3 は、ほぼ完全に非ラフト相に分配された。

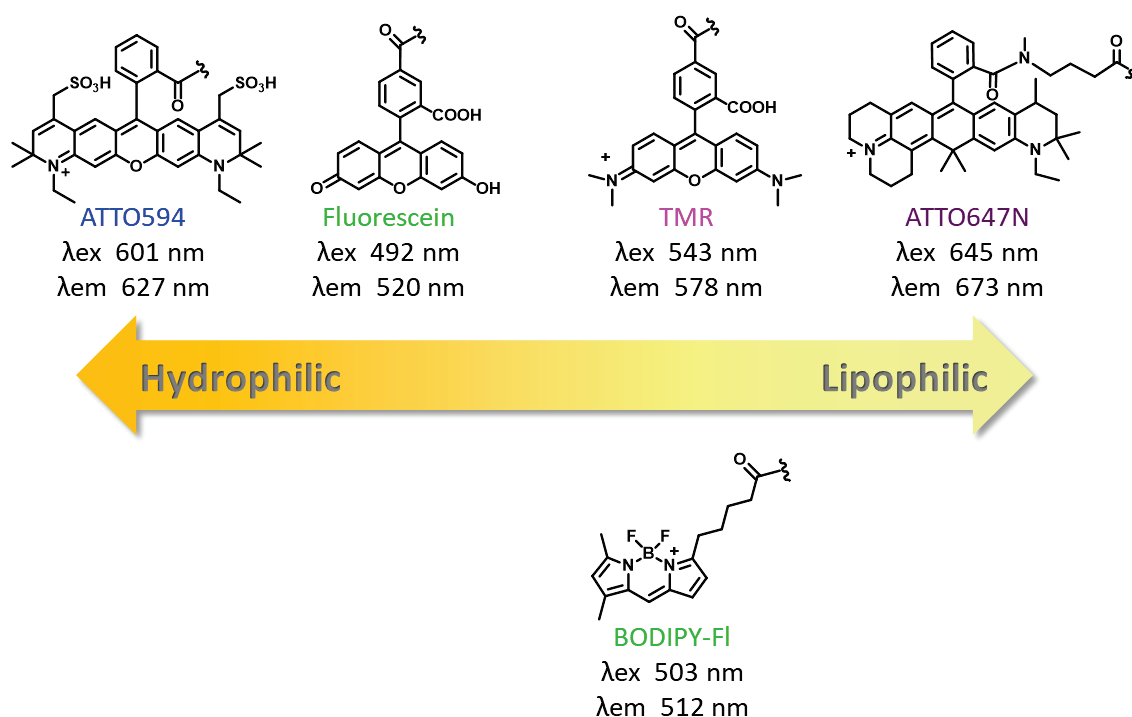


Figure 14. 蛍光色素の性質

³⁷ A. R. Burns, D. J. Frankel, T. Buranda, *Biophys. J.* **2005**, 89, 1081-1093.

さらに、蛍光ガングリオシドと、脂質ラフトモデル (CD59 パッチ) の親和性を実際に調べた。T24 細胞膜上で一次抗体と二次抗体を用いて GPI アンカー型受容体 CD59 を架橋した。これにより、 $1\mu\text{m}^2$ 以上³⁸の大きさの巨大な CD59 パッチを形成させた³⁹。その細胞膜上での蛍光 GM3 プローブの局在を調べることで CD59 パッチへの親和性を調べた (Figure 15、Table 8)。

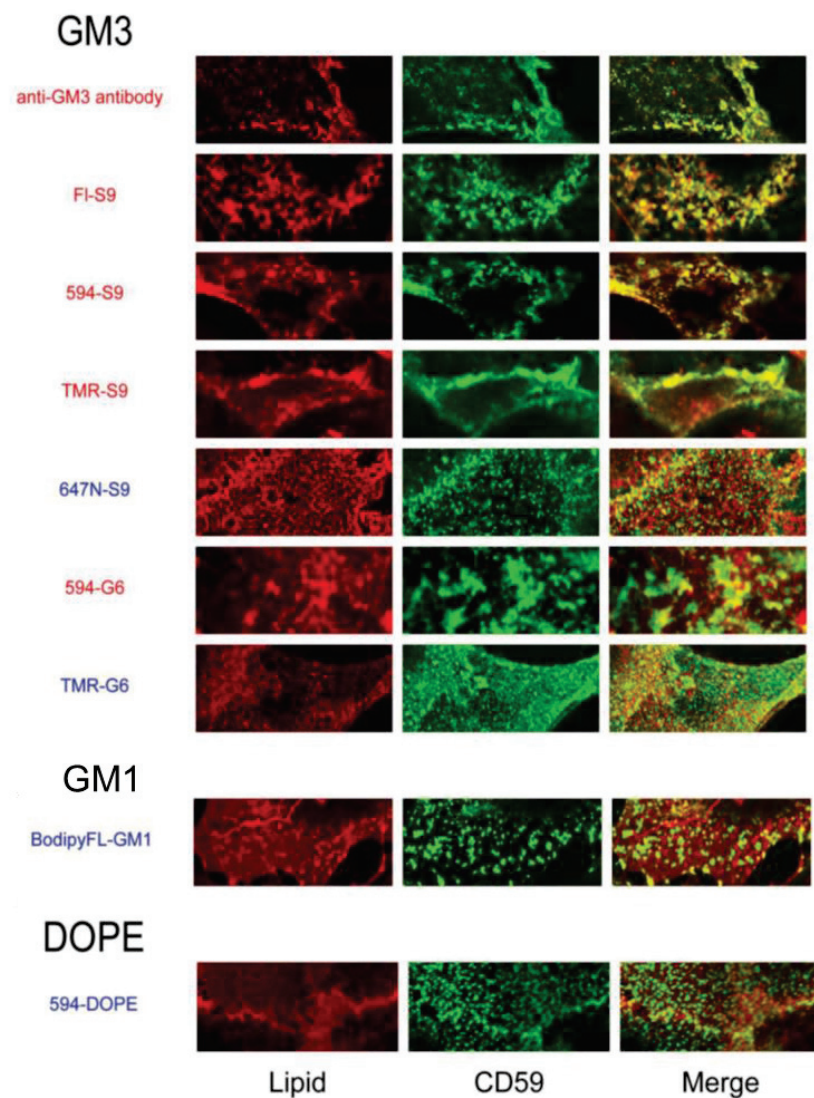


Figure 15. CD59 パッチとの親和性の検証

³⁸ 脂質ラフトのサイズについては諸説あるが、ラフト仮説では直径 100 nm～数ミクロンサイズ、近年ではナノ・メゾサイズであると報告されている。

³⁹ T. Harder, P. Scheiffele, P. Verkade, K. Simons, *J. Cell Biol.* **1998**, 141, 929-942.

その結果、天然型の GM3 (anti-GM3 antibody と表記)、親水性色素が結合した Neu9 位標識 GM3 プローブ (TMR-S9-GM3, FI-S9-GM3, 488-S9-GM3, 594-S9-GM3) のみ CD59 パッチと共局在する結果を得た。

Table 8. ラフト分配特性の検証結果

Probe	DRM vs. Intact Ratio (mean $\pm$ SE)	Lo/Ld Ratio in GPMV (mean $\pm$ SE)	CD59-patch colocalization
FI-S9-GM3	1.1 $\pm$ 0.05	8.8 $\pm$ 1.5	+
TMR-S9-GM3	1.0 $\pm$ 0.10	1.5 $\pm$ 0.08	+
594-S9-GM3	1.0 $\pm$ 0.05	4.0 $\pm$ 0.14	+
488-S9-GM3	1.1 $\pm$ 0.06	4.6 $\pm$ 0.58	+
647N-S9-GM3	0.066 $\pm$ 0.008	0.26 $\pm$ 0.02	-
TMR-G6-GM3	0.029 $\pm$ 0.006	1.7 $\pm$ 0.14	-
594-G6-GM3	0.49 $\pm$ 0.04	1.7 $\pm$ 0.09	$\pm$
BodipyFL-GM1	0.042 $\pm$ 0.009	0.62 $\pm$ 0.05	-

以上の DRM 分配実験、Lo/Ld 分配実験、CD59 パッチとの共局在の三つの検証はほぼ一致する評価結果を与え、高いラフト分配性が証明されたプローブは、親水性の蛍光分子で標識した S9-GM3 プローブ (FI-S9-GM3, 488-S9-GM3, 594-S9-GM3) であった。そして、機能評価より二つの重要な知見を得た。

一点目は、標識位置がガングリオシドの細胞膜上における物理化学的性質に大きく影響し、天然のガングリオシドのラフト分配特性を保持する為には、Neu9 位の標識が望ましいということ。従来ラフト研究に利用されてきた脂質修飾型 GM1 (BodipyFL-GM1)、脂質に近い内部 Gal6 位修飾 GM3 プローブは細胞膜上に局在し、膜分子としての正常な振舞いは示したが (分子運動については次節で述べる)、ラフトへの親和性は損なっていた。これらの要因は、ラフト関連分子との脂質間疎水結合に寄与するセラミドの機能が低下、又は阻害さ

れていることによると考えられる。つまり、BodipyFL-GM1 ではセラミドが一本鎖へ構造改変されていることにより疎水結合が天然型よりも弱まり、Gal6 位修飾 GM3 プローブでは構造が嵩高い蛍光分子がセラミドに近接した位置にあることにより、蛍光分子が脂質間の疎水結合を阻害したと考えた。ラフト分配性は、比較的疎水性の高い TMR による標識体で顕著に低く、構造中に高極性基を含む ATTO594 の標識体ではある程度向上したことからも、蛍光分子の疎水性の構造が脂質間の相互作用を妨げたと推測した。この推測が妥当であるとする、GM3 よりも糖鎖長の長い GM1 や GM2 おいては、Neu9 位のみならず、分岐糖鎖の他方の末端糖残基も蛍光色素導入の候補位置になると考えられる。この検証については第四章、第五章に記す。

二点目に得た知見は、蛍光分子の親疎水性がガングリオシドプローブのラフト親和性に大きく影響するという点である。糖鎖の高い親水性に影響しない為には高親水性の蛍光分子 (ATTO594, ATTO488, Fluorescein 等) の使用が好ましい事が示唆された。

以上より、本研究ではラフト親和性の性質保持が証明された蛍光ガングリオシドプローブを初めて開発した。さらにその評価の過程で、標識位置や蛍光色素の性質がガングリオシドに及ぼす影響を初めて明らかにし、プローブの機能の確認及び選別の必要性を立証した。

第二節 一分子観察実験

第一項 拡散係数の計算

合成した蛍光ガングリオシドプローブ分子の細胞膜上における挙動を全反射蛍光顕微鏡により観察した⁴⁰。まずは各種蛍光ガングリオシドを T24 細胞、PtK2 細胞膜に導入し、定

⁴⁰ a) I. Koyama-Honda, K. Ritchie, T. Fujiwara, R. Iino, H. Murakoshi, R. S. Kasai, A. Kusumi, *Biophys. J.* **2005**, 88, 2126-2136. b) T. Fujiwara, K. Ritchie, H. Murakoshi, K. Jacobson, A. Kusumi, *J. Cell Biol.* **2002**, 157, 1071-1081.

常状態におけるガングリオシドの拡散運動を検証することで、膜分子としての運動性を調べた。代表例として 594-S9-GM3 を時間分解能 0.5 ミリ秒で一分子観察した結果得られた拡散軌跡を **Figure 16** に示す。運動軌跡より、594-S9-GM3 が停留することなく常時拡散している様子が分かる。さらに、T24 細胞上で、100 ミリ秒間における各蛍光ガングリオシドプローブの拡散係数を求めた (**Table 9**)。この検証は、定常状態、つまりラフト形成を誘起しない条件で行っているため、蛍光ガングリオシドプローブの拡散運動は非ラフトマーカールのリン脂質 (DOPE) 以上に速いはずである。(すなわち拡散係数は DOPE より大きいはずである。) 拡散係数 $D_{100\text{ms}}$ の中央値を求めた結果、今回合成した全ての蛍光 GM3 プローブ ($0.26\sim 0.33\ \mu\text{m}^2/\text{s}$)、BodipyFL-GM1 ($0.34\ \mu\text{m}^2/\text{s}$) とともに、ATTO594 標識 DOPE (594-DOPE) ($0.20\ \mu\text{m}^2/\text{s}$) と同等もしくはそれ以上の値を示した。これにより、定常状態の細胞膜上において、これらの蛍光ガングリオシドが膜ドメインに取り込まれることなく常時単純ブラウン運動していることが明らかとなった。一方で GM1 結合タンパク質であるコレラ毒素 B サブユニットを Cy3 で標識し (Cy3-CTB)、T24 細胞上に発現している内因性 GM1 の運動を観察した結果、インキュベーション時間に伴って徐々に拡散運動が低下することが分かった ($\sim 0.01\ \mu\text{m}^2/\text{s}$)。これは、CTB が五量体であるため、時間経過とともに GM1 がクラスター化し、これによって単分子よりも GM1 の運動が低下することを明示している。蛍光 CTB を利用した GM1 の観察法はガングリオシドプローブ調製の必要がなく、簡便である利点がある。しかしながら、天然のガングリオシド一分子の振舞い、他の膜分子との相互作用を明らかにするという本研究の目的には沿わず、やはり蛍光分子が直接化学結合したガングリオシドプローブを合成する必要性が強調された。

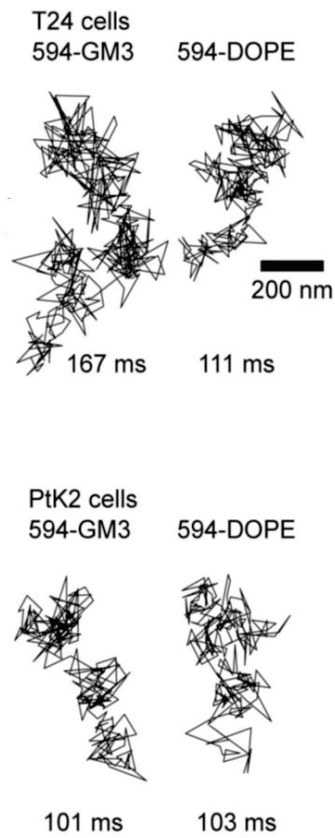


Figure 16. 594-S9-GM3 の拡散軌跡

Table 9. 蛍光ガングリオシドの拡散係数

Probe	$D_{100\text{ms}}$ ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) (mean $\pm$ SE)	N
FI-S9-GM3	0.26 (0.26 $\pm$ 0.02)	100
TMR-S9-GM3	0.33 (0.32 $\pm$ 0.02)	93
594-S9-GM3	0.32 (0.37 $\pm$ 0.02)	103
488-S9-GM3	0.32 (0.35 $\pm$ 0.02)	145
647N-S9-GM3	0.30 (0.34 $\pm$ 0.03)	80
TMR-G6-GM3	0.32 (0.36 $\pm$ 0.03)	94
594-G6-GM3	0.31 (0.34 $\pm$ 0.02)	108
BodipyFL-GM1	0.34 (0.36 $\pm$ 0.02)	107
Cy3-CTB incubated for 20 min	0.01 (0.02 $\pm$ 0.002)	75
594-DOPE	0.20 (0.21 $\pm$ 0.02)	145

第二項 GPI アンカー型受容体との親和性の検証

ラフト分配性が証明された Neu9 位標識 GM3 の中でも、ATTO594 標識体 (594-S9-GM3) は蛍光色素の光褪色時間が最も長いため、一分子観察にとりわけ適したプローブである。GPI-アンカー型受容体 (CD59) に対する刺激条件下、594-S9-GM3 が CD59 と実際に相互作用する様子を二色同時一分子観察により捉える実験を行った。初めに、前節の共局在実験で用いた CD59 パッチとの二色同時一分子観察の結果を示す (**Figure 17**)。左の結果は、緑色の CD59 パッチに対する非ラフトマーカ性 DOPE の運動軌跡である。DOPE は CD59 パッチへの親和性が低いため、パッチから弾かれ、常時外側で拡散している様子が分かる。これに対して、右の結果では、594-S9-GM3 が CD59 パッチへの出入りを頻繁に繰り返し、CD59 パッチ (脂質ラフトモデル) に対して高い親和性を示した。このような、脂質ラフトモデルとガングリオシドの一分子イメージングは本研究によって初めて達成し、脂質ラフトモデルとの動的相互作用を可視化することに成功した。

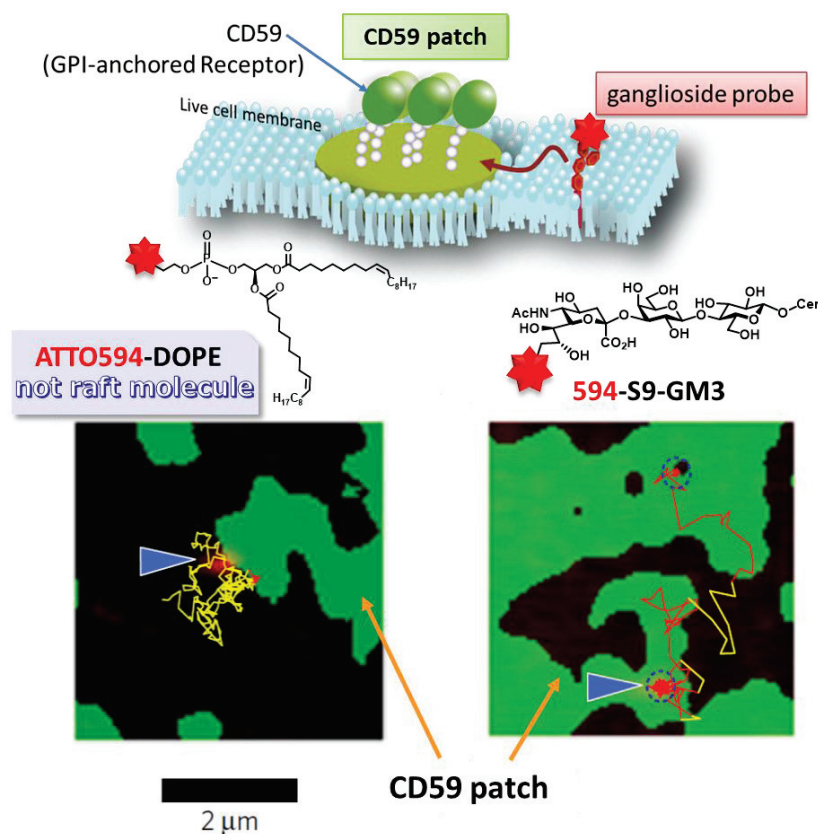


Figure 17. CD59 パッチとの共局在

次に、より生理的条件下に近い会合状態の CD59 とガングリオシドの共局在を観察するため、T24 細胞上において、抗 CD59 抗体と yellow-green beads で標識した CD59 クラスターとの二色同時観察を行った。この条件下、yellow-green beads に対して平均 3~6 分子の CD59 が会合する⁶。実験の結果、蛍光 GM3 プローブ (594-S9-GM3) が CD59 クラスターと相互作用する様子を初めて捉え、有意な共局在時間 (98 ms) を確認した (**Figure 18**)。後に記すが、対照的に、非ラフトマーカ性 ATTO594 標識 DOPE は 50 ms 程度のみ CD59 クラスターと共局在を示した。天然のガングリオシドは GPI アンカー型受容体と強く相互作用することが知られているため、この知見と合致する観察結果を得た。ここではリガンド刺激により誘起される CD59 クラスターのモデルに対する親和性を調べたが、定常状態で存在する、CD59 単分子または二量体に対するガングリオシドの親和性についてもさらに検証した。そ

の結果については後に述べる。

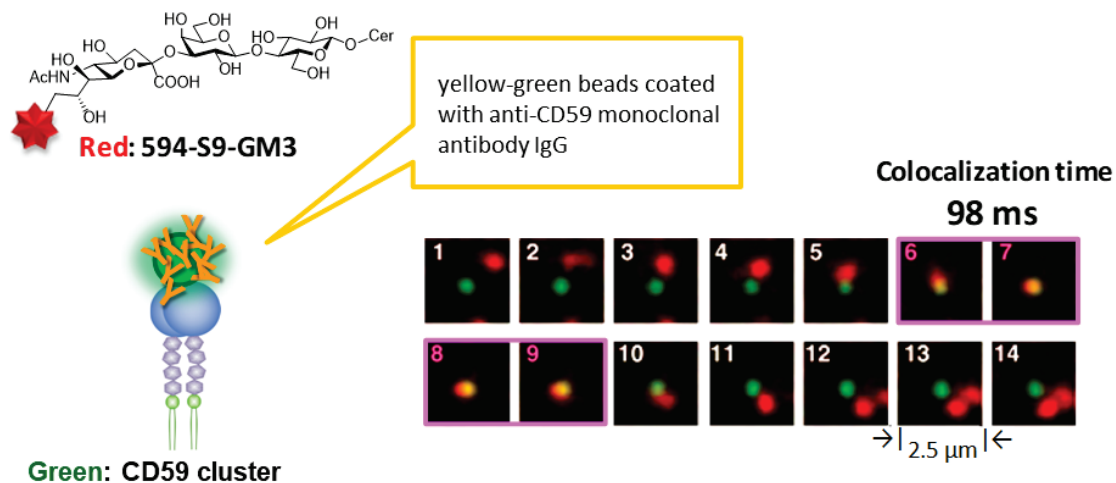


Figure 18. GPI アンカー型受容体プローブとの一分子観察実験結果

第六章 シアル酸 9 位標識 GM1 及び GM2 プローブの合成

第一節 合成戰略

蛍光 GM3 プローブの結果を踏まえて、脂質ラフトに存在する他の a 系列ガングリオシド (GM1 及び GM2) の合成に着手した。前章の蛍光 GM3 プローブの機能評価より、蛍光色素の導入位置がガングリオシドの物理化学的性質に大きく影響することが明らかとなり、蛍光色素の影響を最小限にするためには、標識位置を Neu9 位に設定するのが好ましいという示唆を得た。そこで、GM1 及び GM2 においても、標識位置を Neu9 位とした蛍光プローブを最初の候補とし、GM3 と同様に機能を検証することとした。また、GM1 及び GM2 は分岐構造を有し、他方の末端糖残基も標識位置の候補に成り得る。これらの蛍光プローブ

ブの合成結果については後述する。

Neu9 位標識 GM2 及び GM1 プローブの前駆体を **Figure 19** のように設計した。

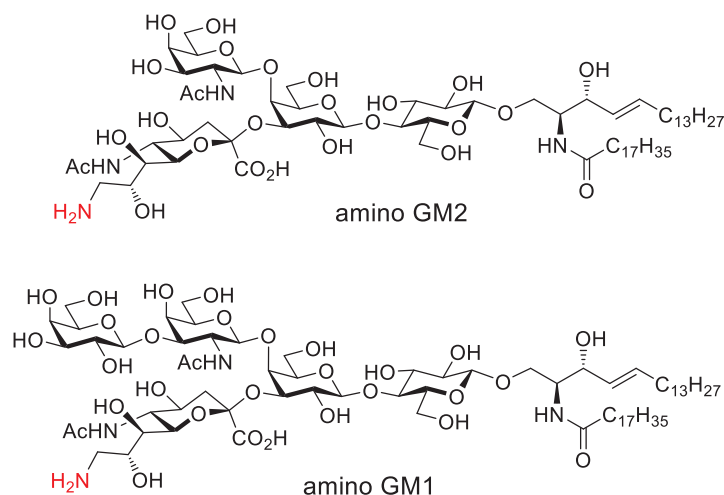
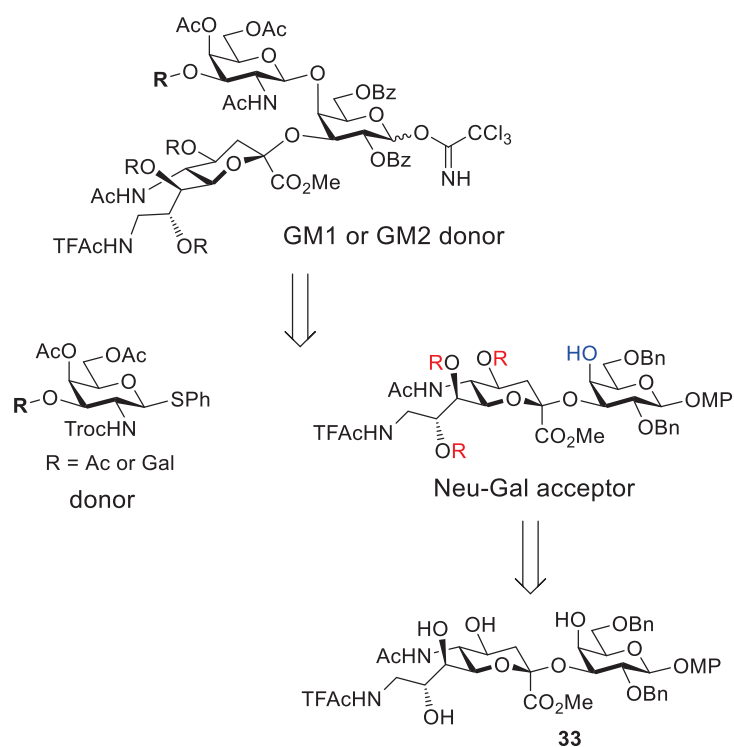


Figure 19. Neu9位標識GM1及びGM2プローブの鍵化合物

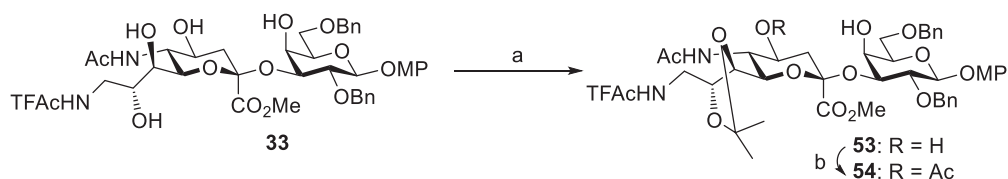
GM1 及び GM2 の蛍光プローブの合成においても Neu-Gal ユニットの設計・合成が最も重要である。第二章で述べた通り、Neu-Gal の Gal4 位水酸基へ着脱可能な保護基を導入するアプローチは達成には至らなかった (経路 A)。一方で、経路 B の GM3 合成経路を遂行する過程で有用なユニットを得ることができた。すなわち、**Scheme 20** に示す Neu9 位 TFAc アミド誘導体 **33** の遊離の水酸基を適切に保護することで、Gal4 位水酸基が遊離の受容体へ変換可能と考えた。



Scheme 20. 合成戦略

第二節 シアリルガラクトース受容体の合成

初めに Neu-Gal 受容体の合成について述べる (**Scheme 21**)。化合物 **33** の Neu7,8 位水酸基選択的にイソプロピリデン基を導入した。この反応は位置選択的に進行したが、原料を消費する為に高濃度と過剰の試薬を要した。この要因は 5 位アセトアミド基との水素結合により 8 位水酸基の求核性が低下しているためと考えられる。続いて Neu4 位水酸基を低温で選択的にアセチル化し、二段階 77%の収率で受容体 **54** へ変換した。



Reagents and conditions

a) 2,2-DMP, CSA/ MeCN, rt; b) AcCl, Pyr./ CH₂Cl₂, -40 °C, 77% (2 steps).

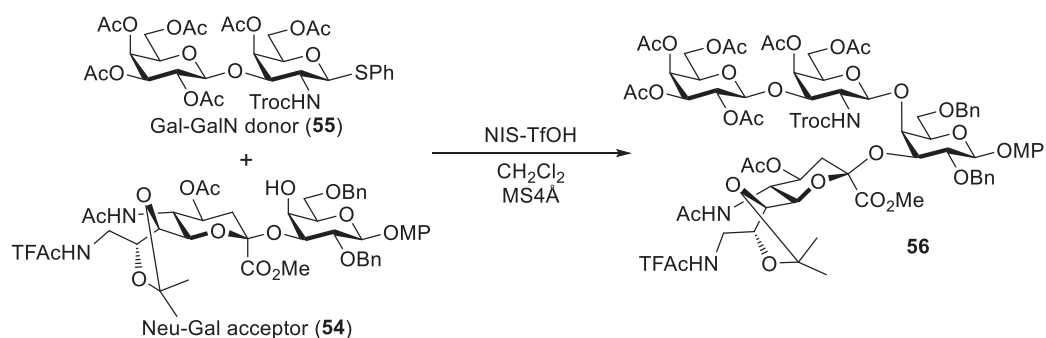
Scheme 21. Neu-Gal受容体の合成

第三節 GM1 エピトープ骨格の構築と供与体への変換

Neu-Gal 受容体 **54** と Galβ(1→3)GalNTroc 供与体 **55** をグリコシド化反応に供した (Table 10)。Galβ(1→3)GalNTroc 供与体 **55** は吉川ら⁴¹によって報告されている既知の供与体を採用し、GM1 エピトープ四糖骨格の効率的合成を目指した。

条件 1 では供与体に対して受容体を 2.5 当量用い、-40 °C にて反応を行った。その結果、縮合物 **56** の生成を確認することができたが、収率は約 29%に留まった。この結果より立体的に込入った Gal4 位水酸基の低反応性が確認できた。そこで条件 2 では温度を 0 °C から室温に上昇させて検討した結果、75%の高収率にて四糖骨格構築を達成した。

⁴¹ T. Yoshikawa, Y. Kato, N. Yuki, T. Yabe, H. Ishida, M. Kiso, *Glycoconjugate J.* **2008**, *25*, 545-553.



entry	donor	temp.	yield
1	2.5 eq.	-40 °C	29%
2	1.5 eq.	0 °C→rt	75%

Table 10. GM1 エピトープ骨格の構築

なお、条件 2 の副生成物として六糖グリコシルイミデートが 10%程度生成していることを確認した (**Figure 20**)。これは Neu5 位アセトアミド基の高い求核性により生じたと考えられる。立体障害の小さい末端の Neu9 位 TFAc アミド基に対しても起こり得る反応であるが、副生成物の ^1H NMR で TFAc アミドのプロトンの存在が確認されたことにより化合物 **57** の構造を決定した。また、化合物 **57** は 80% AcOH aq. 中で加熱することにより容易に四糖中間体へ変換可能であることを確認した。

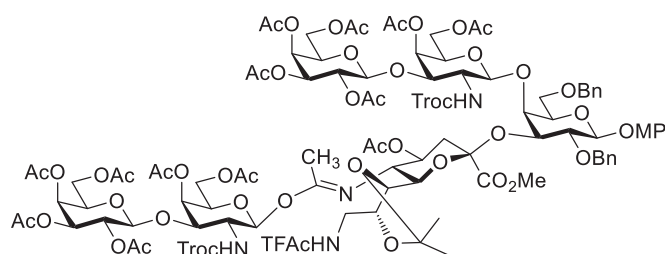
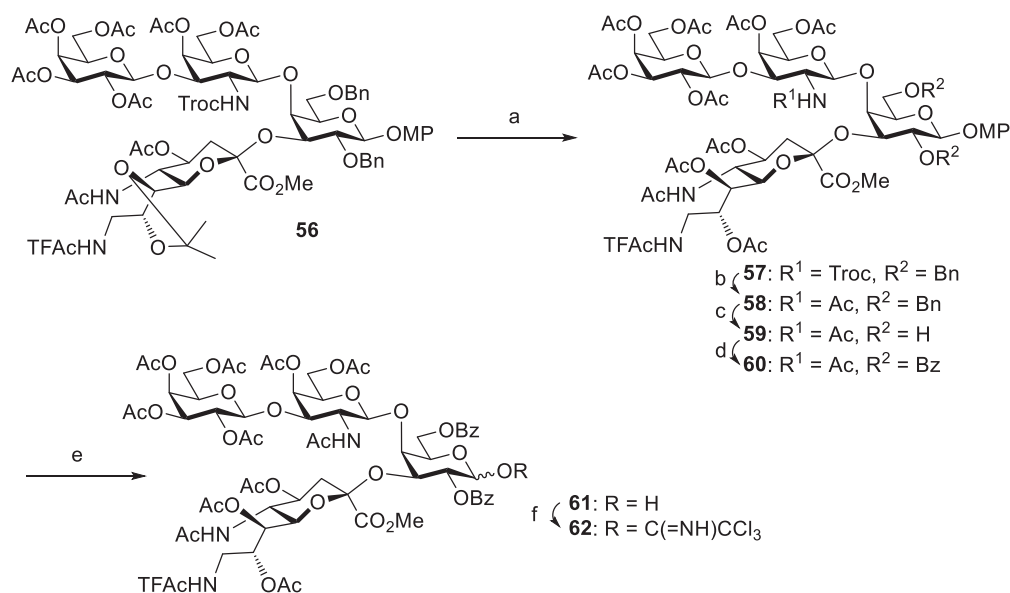


Figure 20. グリコシル化反応の副生成物

続いて合成した GM1 エピトープ四糖を供与体へ変換した (**Scheme 22**)。まず Neu7,8 位の

イソプロピリデン基を酸加水分解により除去した。この反応は進行し難かったため、超音波中で反応を行った結果⁴²、反応時間の短縮に成功した。続くアセチル化により二段階 95%の収率を得た。続いて Troc 基の除去、アミノ基をアセチル化することによって化合物 **58** へと導いた。次に還元末端側 Gal2,6 位水酸基の脱ベンジル化、ベンゾイル化を行い、化合物 **60** とした。この後、MP 基の除去、トリクロロアセトイミデート基の導入により供与体 **62** を合成した。



Reagents and conditions

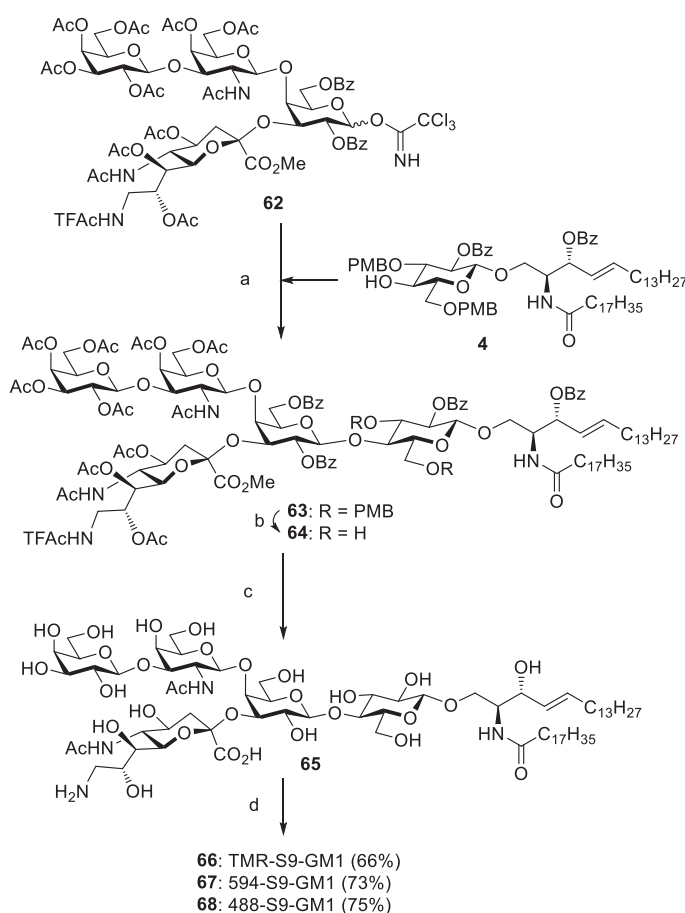
a) i) 80% AcOH aq./ 55 °C; ii) Ac₂O, DMAP/ Pyr., rt, 95% (2 steps); b) i) Zn, AcOH/ ClCH₂CH₂Cl, 40 °C; ii) Ac₂O, DMAP/ Pyr., rt, 88% (2 steps); c) H₂, Pd(OH)₂-C/ 1,4-Dioxane, rt; d) Bz₂O, DMAP/ Pyr., rt, 94% (2 steps); e) CAN, H₂O/ MeCN-Tol, 0 °C; f) CCl₃CN, DBU/ CH₂Cl₂, 0 °C, 86% (2 steps).

Scheme 22. 供与体への変換

⁴² S. Deng, U. Gangadharmath, C. T. Chang, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 5179-5185.

第四節 GM1 骨格の構築と蛍光色素の導入

続いて GM1 エピトープ供与体 **62** と Glc-Cer 受容体 **4** のグリコシル化によりガングリオシド骨格 **63** を高収率にて構築した (Scheme 23)。次に Glc3,6 位水酸基の PMB 基の除去、アシル系保護基の除去を行うことでアミノ GM1 **65** を得た。最後に、蛍光色素の活性エステルをアミノ基に作用させ、最終化合物へと誘導した。この際、前章の機能評価に基づき、高親水性の色素、ATTO594、ATTO488 並びにやや脂溶性の高い TMR を選択した。ここで、TMR は機能評価において高親水性蛍光色素との比較を行うために選択した。蛍光色素導入反応は、GM3 と同等の 70%前後を与え、これにて 3 種のプローブの合成を達成した。



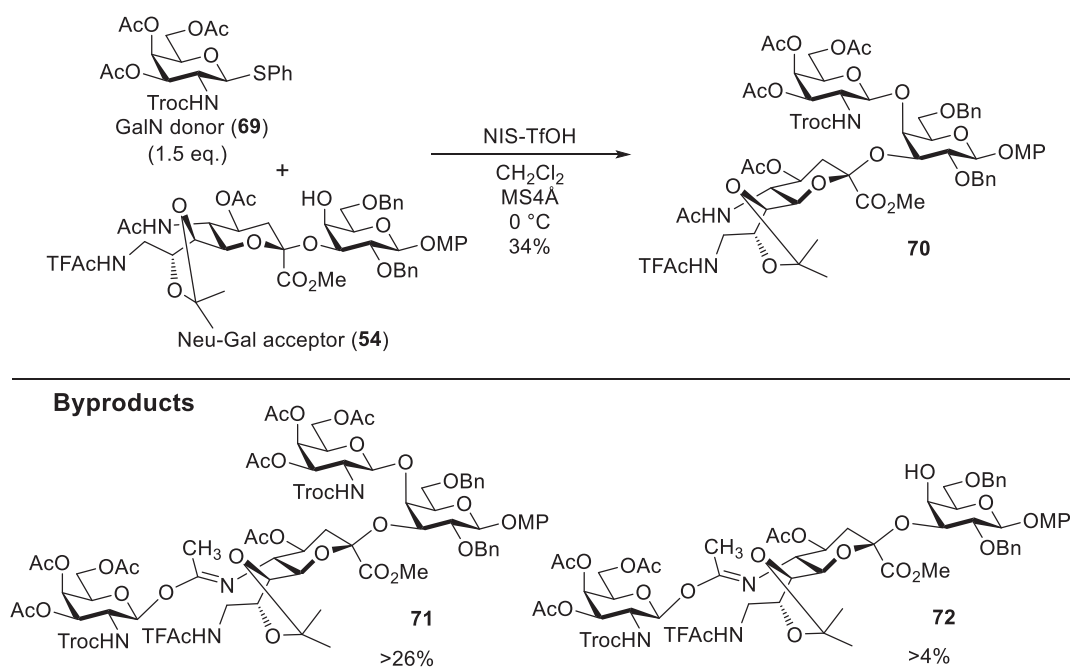
Reagents and conditions

a) TMSOTf/ CH_2Cl_2 , AW-300, 0 °C, 89%; b) TFAcOH/ CH_2Cl_2 , 0 °C, quant.; c) i) NaOMe/ MeOH-THF, sonication, rt to 50 °C; ii) then H_2O , 85% (2 steps); d) Dye reagent, Et_3N / MeOH-THF, rt.

Scheme 23. Neu9位標識GM1プローブへの変換

第五節 GM2 エピトープ骨格の構築と供与体への変換

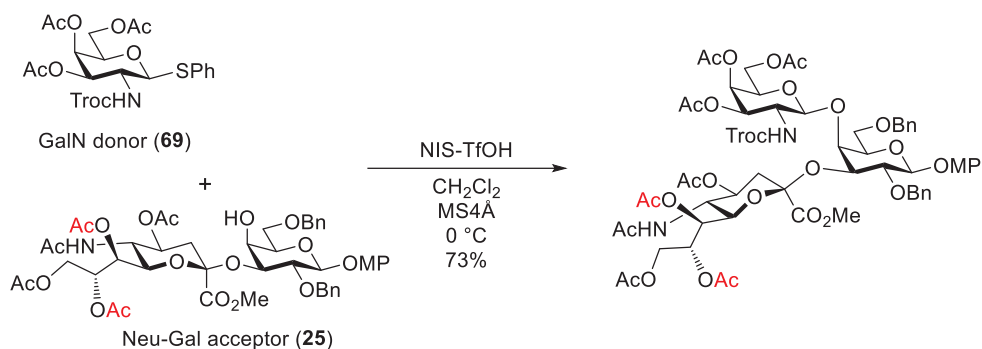
Neu9 位標識 GM1 の合成結果に基づき GM2 プローブの合成を検討した。初めに GM1 と共通の Neu-Gal 受容体 **54** に対する GalN 供与体 **69** のグリコシド化を行った (Scheme 24)。しかしながら三糖の収率は 34%に留まった。低収率の原因はグリコシルイミデートが顕著に生成した為であり、以下に示すようにグリコシルイミデート四糖 **71** (>26%) 及び三糖 **72** (>4%) を得た。



Scheme 24. GM2エピトープ骨格の構築

これらの副生成物は三糖 **70** または受容体 **54** のアセトアミド基が供与体のオキシカルベニウムイオンに対して求核攻撃することで生成する。予想していなかったことに、これらの生成比より、アセトアミド基の求核性が Gal4 位水酸基に次いで高いことが示唆された。

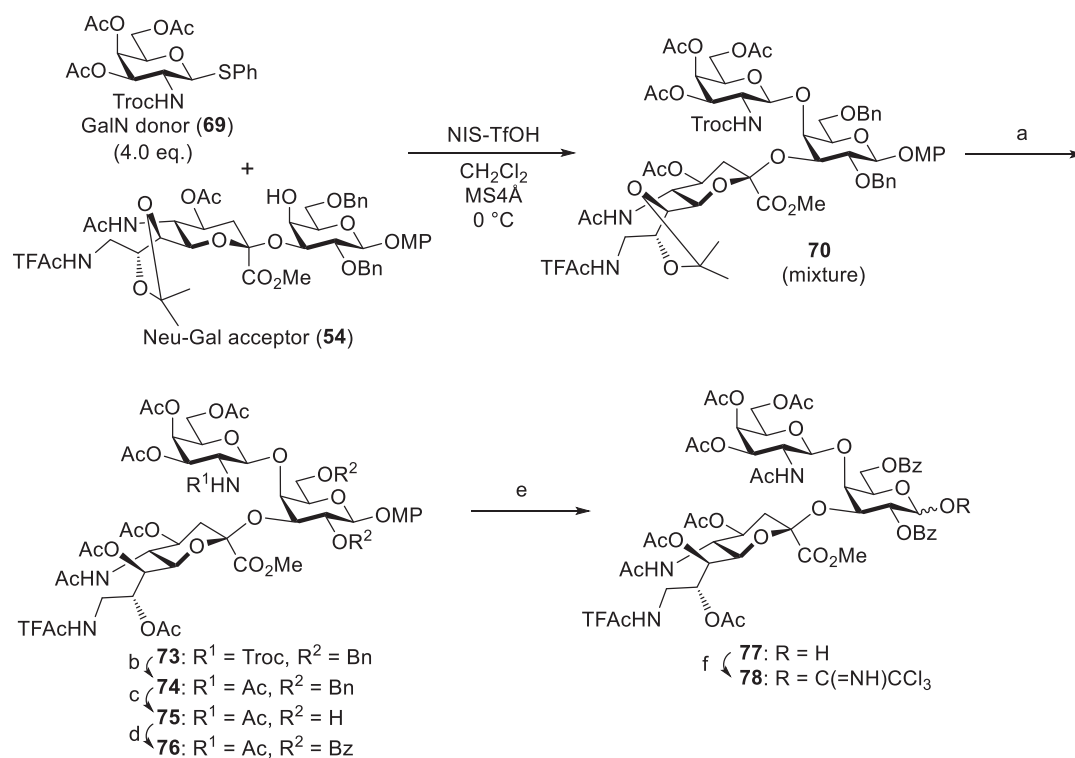
当研究の藤川らの報告⁴³によると、天然型の GM2 エピトープを GalN 供与体 **69** と Neu-Gal 受容体 **25** のグリコシル化により収率良く構築している (Scheme 25)。この結果の相違は、受容体のシアル酸側鎖の保護様式が異なることに起因すると説明できる。つまり、Neu-Gal 受容体 **25** は 7,8 位水酸基を電子求引性の Ac 基、Neu-Gal 受容体 **54** では電子供与性の高いイソプロピリデン基で保護していることにより、側鎖に近接する 5 位アセトアミド基の電子的環境が異なる。これにより、Neu-Gal 受容体 **54** のアセトアミド基の求核性が高まり、上記の予想していなかった副反応が起きたと考えられる。



Scheme 25. 藤川らの報告

しかしながら、グリコシルイミデート **71** は酸加水分解により三糖中間体への誘導が可能と考えられる。そこで、GalN 供与体を過剰量使用して受容体を消費し、生成した混合物を適切に処理すれば三糖中間体を収率良く得られると予想した。そこで、受容体に対して供与体を 4.0 当量用いてグリコシド化し、粗精製後、続く 80% AcOH aq. による処理でグリコシルイミデート並びにイソプロピリデン基の酸加水分解を行った (Scheme 26)。そして水酸基のアセチル化後、三工程の合計で 81% の高収率にて三糖 **73** を得ることに成功した。続いて GM1 エピトープと同様の変換により三糖供与体 **78** へと収率良く導いた。

⁴³ K. Fujikawa, S. Nakashima, M. Konishi, T. Fuse, N. Komura, T. Ando, H. Ando, N. Yuki, H. Ishida, M. Kiso, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 5641-5651.



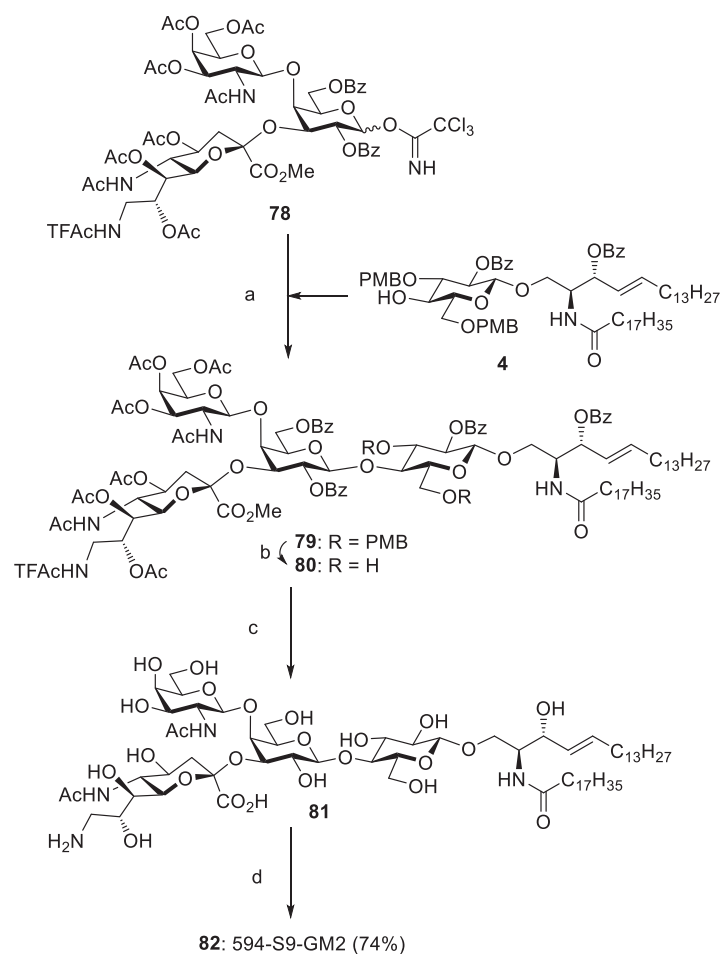
Reagents and conditions

a) i) 80% AcOH aq., sonication, rt to 55 °C; ii) Ac₂O, DMAP/ Pyr., rt, **81% (3 steps)**; b) i) Zn/ AcOH-ClCH₂CH₂Cl, 40 °C; ii) Ac₂O, DMAP/ Pyr., rt, 81% (2 steps); c) H₂, Pd(OH)₂-C/ 1,4-Dioxane, rt; d) Bz₂O, DMAP/ Pyr., rt, 96% (2 steps); e) CAN, H₂O/ MeCN-Tol, 0 °C, 90%; f) CCl₃CN, DBU/ CH₂Cl₂, 0 °C, 89%.

Scheme 26. 供与体への変換

第六節 GM2 骨格の構築と蛍光色素の導入

次に GM2 骨格の構築と蛍光色素の導入を行った (**Scheme 27**)。GM1 骨格合成時と同条件にて供与体 **78** と受容体 **4** のグリコシル化を行い、収率 88%にてガングリオシド骨格を構築した。続いて PMB 基の除去、全てのエステルの加水分解により GM2 アミノ中間体 **81** へ誘導した。最後に蛍光色素 ATTO594 の *N*-succinimidyl ester を TEA 存在下で反応させ、目的の蛍光標識体 **82** を収率 74%で得た。



Reagents and conditions

a) TMSOTf/ CH_2Cl_2 , AW-300, 0 °C, 88%; b) TFAcOH/ CH_2Cl_2 , 0 °C, 96%;
c) 1 M NaOH aq./ MeOH-THF, rt, 88%; d) Dye reagent, Et_3N / MeOH-THF, rt.

Scheme 27. Neu9位標識GM2プローブへの変換

第七節 蛍光 GM1 及び GM2 プローブ合成のまとめ

Neu9 位修飾型 GM1 及び GM2 プローブの合成を達成した。合成法確立の鍵となったのは、Neu-Gal 受容体 **54** の開発である。この受容体は *N*-Troc Neu-Gal 二糖のシアル酸側鎖を

適切に修飾することで効率良く誘導できたため、*N*-Troc Neu-Gal を原料にした合成法がここでも有用であることが示された (**Figure 21**)。この Neu-Gal 受容体 **54** は全ての α 系列グリコシドプローブの合成に適用可能であると期待される。

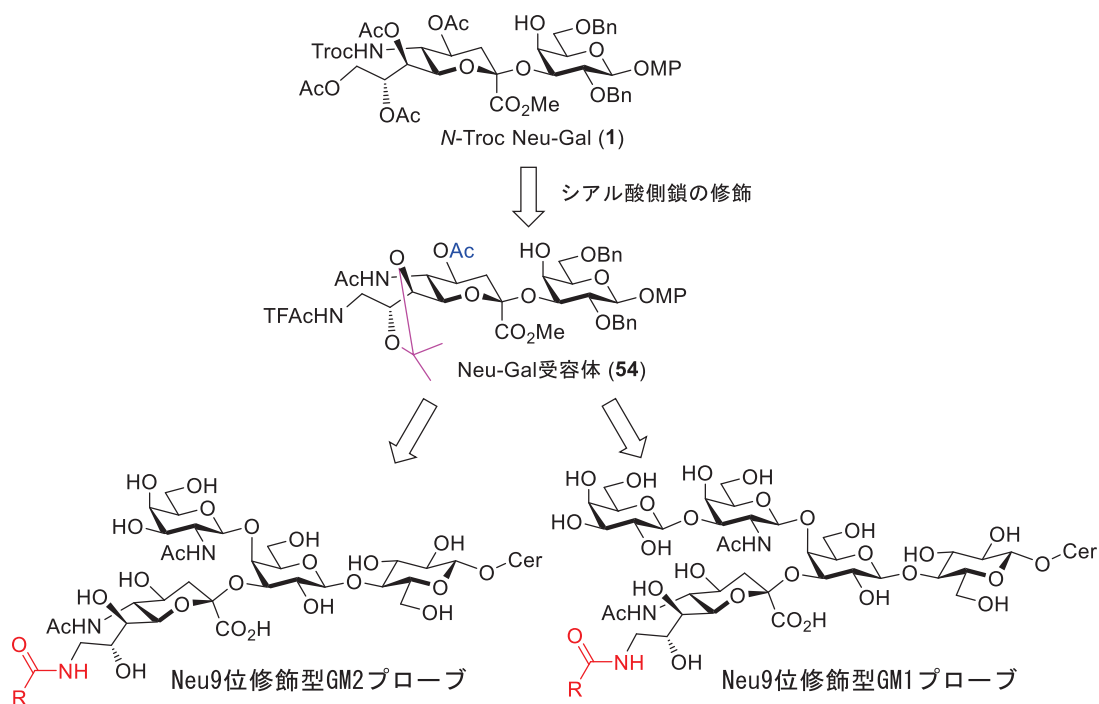


Figure 21. Neu9位修飾型プローブ合成の要約

一方で当研究室では小池田⁴⁴、松井⁴⁵によって標識位置の異なる GM2 及び GM1 プローブの合成が達成されている。その結果の概要を記す。GM3 の機能評価の結果を踏まえると、蛍光色素の導入位置は、糖鎖末端が適切であると考えられる。そこで、GM2 においては分岐糖鎖の末端に位置する GalN6 位、GM1 においては末端の Gal6 位 (termGal6) が標識位置に設定された (**Figure 22**)。

⁴⁴ 小池田真知 岐阜大学大学院 応用生物科学研究科 修士論文 2015.

⁴⁵ 松井泉美 岐阜大学大学院 応用生物科学研究科 修士論文 2012.

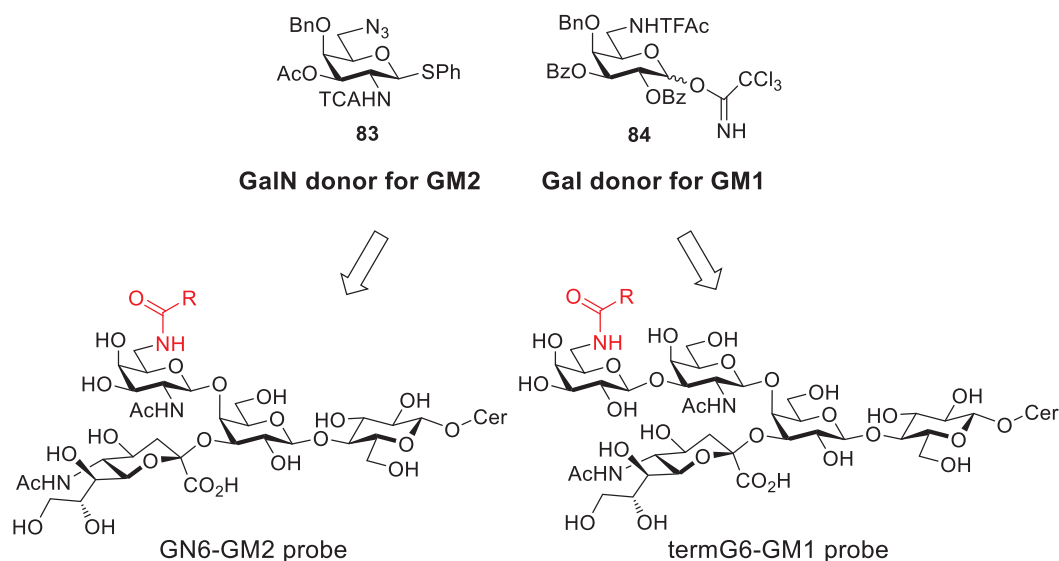


Figure 22. 6位修飾型供与体

GalN6 位標識 GM2 プローブ合成において、GalN 供与体の 2 位及び 6 位アミノ基の保護様式が重要であり、最終反応までに 2 位をアセトアミド基、6 位はアミノ基と、異なる窒素置換基へ変換可能な設計にしなければならない。そこで、小池田は 2 位アミノ基を TCA (Trichloroacetyl) 基で保護し、6 位水酸基をアジド基で置換した GalN 供与体 **83** を用いることで、2 位と 6 位の同時還元による置換基修飾を可能とした。その他種々の変換を最適化することにより、GM2 プローブの合成法を確立した。一方の GM1 プローブにおいて松井は、6 位を予め TFAc アミド基とした Gal 供与体 **84** を開発し、GM2 受容体とのグリコシド化を経て目的化合物へ誘導する経路を確立した。

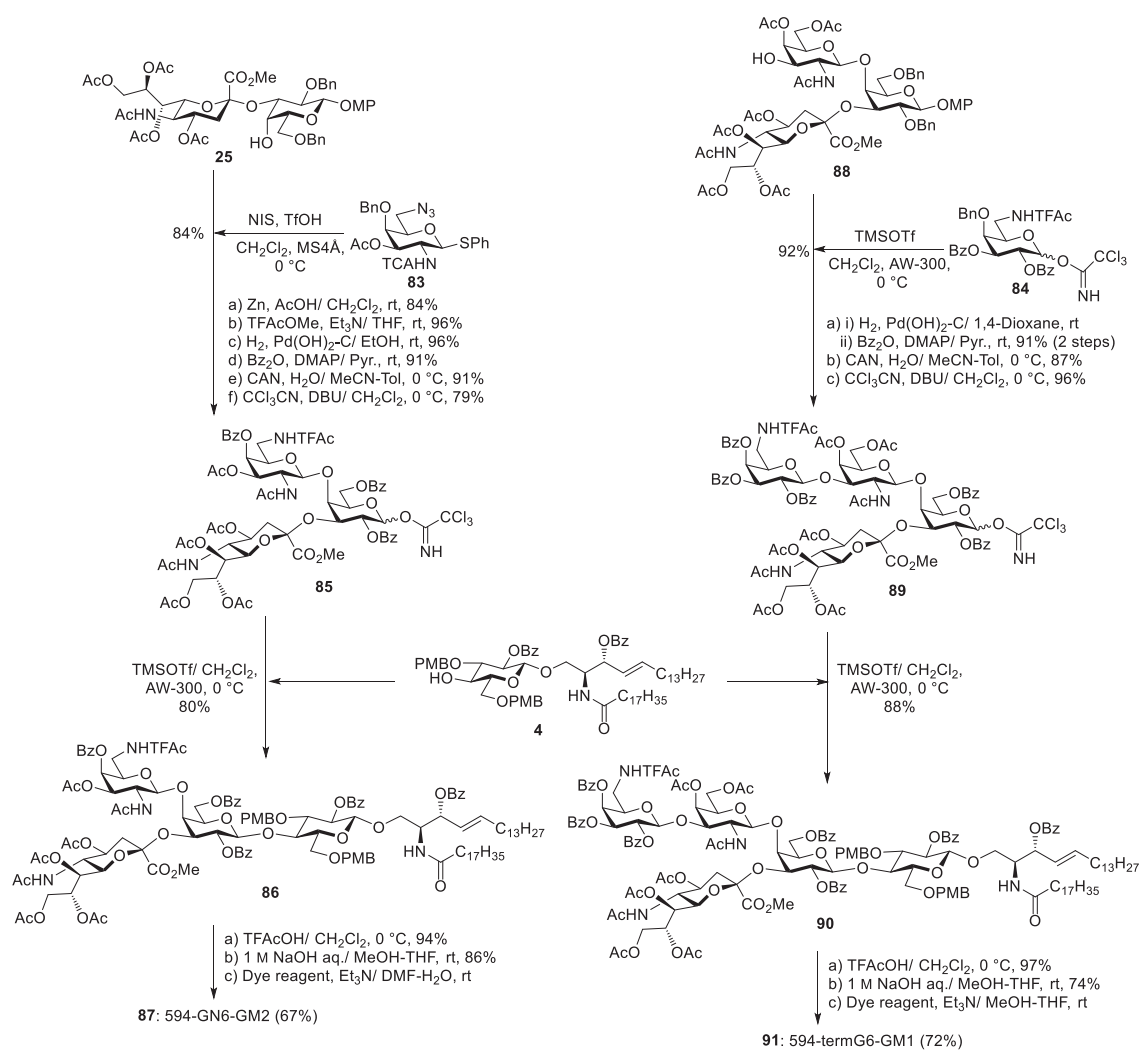
双方の合成において重要であるのが、ガングリオシドコア糖鎖の構築である。小池田は 4 位に Bn 基を導入した GalN 供与体を用いることでグリコシド化反応時のオキサゾリン生成の抑制・収率向上を報告しており、松井も同様の保護様式の Gal 供与体を用いて GM1 糖鎖の合成に成功している。これらは、供与体の優れた反応性を示しており、4 位へ導入した電子供与性保護基の Bn 基の効果によると考えられる。Demchenko ら、戸嶋らは、

armed-disarmed 概念⁴⁶に基づいたグリコシド化において、電子供与性保護基を遠隔位に導入した糖供与体 (Glc 及び 2,3-dideoxy Glc) は、遠隔位からの電子供与によりオキシカルベニウムイオンの生成が促進されることを報告している⁴⁷。この報告に基づいて考えると、本研究における 4 位 Bn 型の Gal 及び GalN 供与体の高反応性は、4 位から環内酸素への立体電子効果 (酸素原子からの π 供与) 又は結合を介した電子供与により、オキシカルベニウムイオンの生成が同じく促進されたためと推測できる。

それぞれのコア糖鎖はその後、供与体への変換、ガングリオシド骨格構築、蛍光色素の導入を経てそれぞれの蛍光標識体へと誘導された (**Scheme 28**)。本研究にて合成された Neu9 位標識 GM1 及び GM2 プローブとこれらの標識位置が異なる蛍光ガングリオシドプローブの細胞膜上における機能の検証結果、標識位置がガングリオシドに与える影響については次章で述べる。

⁴⁶ a) D. R. Moo, P. Konradsson, U. Udodong, B. Fraser-Reid, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5583-5584. b) B. Fraser-Reid, Z. Wu, U. E. Udodong, H. Ottosson, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 6068-6070.

⁴⁷ a) S. Tomono, S. Kusumi, D. Takahashi, K. Toshima, *Tetrahedron Lett.* **2011** *52*, 2399-2403. b) L. K. Mydock, A. V. Demchenko, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2103-2106.



Scheme 28. 6位標識型プローブの合成結果

第七章 ガングリオシドプローブの機能評価と一分子観察実験

第一節 機能評価

第一項 ラフト分配特性の検証

初めに、標識位置の異なる四種の蛍光 GM2 及び GM1 プローブの細胞膜上での機能を比較した。**Figure 23** に示すように、それぞれの蛍光プローブは標識位置に対応させて、以下に記したように呼ぶこととする。初めに、蛍光 GM3 プローブの機能検証と同様に、ラフト分配特性を調べ、その後一分子観察実験を行った。

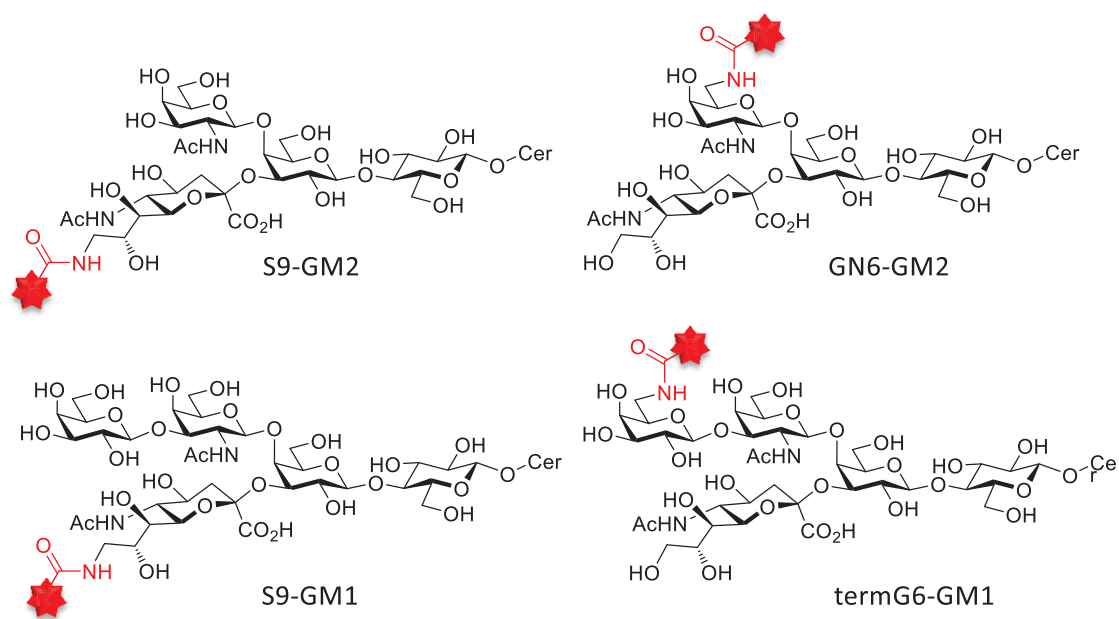


Figure 23. 蛍光GM1及びGM2プローブ

まずはそれぞれの DRM 分配実験の結果について説明する。前述した様に、ラフトに存在する膜分子は、低温で Triton-X100 処理をしても不溶性膜画分 (DRM 画分) への分配傾向が

ある。以下の方法で DRM 分配実験を行った。

【方法】

- (1) T24 細胞に、最終濃度 1.2 μM になるように、各プローブを加え、25 分間、25 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベーションした。
- (2) インキュベーション後、バッファー (HBSS with PIPES) で 3 回洗浄した。
- (3) 2.8 $^{\circ}\text{C}$ に冷やした 1% TX-100 で、on ice で 15 分間処理した。このときのシャーレ内の温度は 2.8 $^{\circ}\text{C}$ 。
- (4) インキュベーション後、バッファー (HBSS with PIPES) で 3 回洗浄し、パラホルムアルデヒドで 90 分間固定した後、蛍光顕微鏡 (Olympus IX70 epifluorescence microscope) で観察した。

Figure 24 は界面活性剤処理前後の T24 細胞膜の蛍光顕微鏡による観察結果である。処理後の観察結果より、ATTO594 で標識した 594-S9-GM2、594-GN6-GM2、594-S9-GM1、594-termG6-GM1 の全てが DRM 画分に残存していることを確認した。図中に示した分配率 (処理後/処理前比) からこれらの蛍光プローブがほぼ 1:0 の割合で DRM 画分に分布していることが分かる。これは従来法で用いられてきた Bodipy-FL-GM1 の分配とはやはり対照的な結果であった。

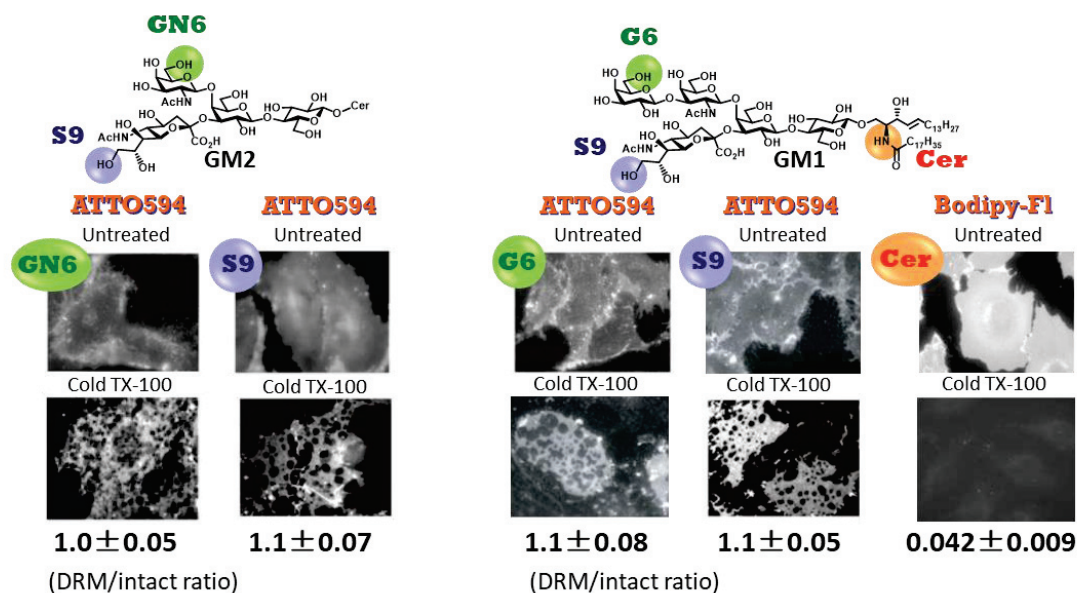


Figure 24. DRM 分配実験の結果

続いて Lo/Ld 分配実験及び CD59 パッチとの共局在を調べた。DRM 分配実験と合わせて、これらの結果を **Table 11** に示す。BodipyFL-GM1 は三つの評価において非ラフトマーカ性を示した。また、ATTO594 よりも疎水性の高い TMR で標識した S9-GM1 (TMR-S9-GM1) は、中間の性質を示した。つまり、DRM 分配実験、CD59 パッチとの共局在実験において、ラフトマーカの性質を示したが、Lo/Ld 分配実験では Ld 相と Lo 相の両方への分配を示した。これは、蛍光 GM3 の機能評価と共通しており、比較的脂溶性の高い蛍光色素を導入することで、ガングリオシドのラフトマーカとしての性質が損なわれる傾向が示唆された。さらに、594-GN6-GM2 及び 594-termG6-GM1 が Neu9 位標識型と同様のラフト分配特性を示すことを確認し、糖鎖末端の標識位置の違いはラフト分配性に影響しないことが分かった。

Table 11. ラフト分配特性の検証結果

Probe	DRM vs. Intact Ratio (mean $\pm$ SE)	Lo/Ld Ratio in GPMV (mean $\pm$ SE)	CD59-patch colocalization
594-S9-GM2	1.0 $\pm$ 0.05	4.1 $\pm$ 0.48	+
594-GN6-GM2	1.1 $\pm$ 0.07	4.4 $\pm$ 0.43	+
TMR-S9-GM1	1.0 $\pm$ 0.05	1.9 $\pm$ 0.25	+
594-S9-GM1	1.1 $\pm$ 0.08	3.3 $\pm$ 0.11	+
488-S9-GM1	1.1 $\pm$ 0.06	3.0 $\pm$ 0.23	+
596-termG6-GM1	1.0 $\pm$ 0.05	4.7 $\pm$ 0.35	+
BodipyFL-GM1	0.042 $\pm$ 0.009	0.62 $\pm$ 0.05	-

第二項 拡散係数の計算

次に一分子観察実験により、蛍光ガングリオシドの拡散の様子を調べた (**Table 12**)。各種蛍光ガングリオシドを T24 細胞に導入し、0.5 ミリ秒の時間分解能でガングリオシドの

拡散係数を求めた。その結果、今回合成した、標識位置の異なる GM2 及び GM1 の単純ブラウン運動を確認し、それぞれの拡散係数 $D_{100\text{ms}}$ は、594-DOPE ($0.20 \mu\text{m}^2/\text{s}$) よりも大きい値となった。そして、コレラ毒素 B サブユニットで標識した GM1 (Cy3-CTB) はやはり、S9-GM1、termG6-GM1 と比較して拡散速度が遅いことが明らかになった。特記すべきことに、594-S9-GM1 は、定常状態における一時停留を全く示さず、常時拡散運動していた。Eggeling らは、PtK2 細胞上で脂質を蛍光標識した GM1 プローブが、10~20 ms の間、直径 20 nm 以下の微小領域内に一時停留すると報告している¹³。しかしながら、今回、PtK2、CHO-K1、T24、NRK 細胞上の 594-S9-GM1 の拡散運動を検証した結果、直径 100 nm 以内で 5 ms 以上の一時停留は認められなかった。従って、彼らが提唱している微小領域はこれらの細胞膜上には存在しないと結論付けた。

Table 12. 蛍光ガングリオシドの拡散係数

Probe	$D_{100\text{ms}}$ ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) (mean $\pm$ SE)	N
594-S9-GM2	0.31 (0.34 ± 0.02)	230
594-GN6-GM2	0.34 (0.35 ± 0.02)	169
594-S9-GM1	0.34 (0.36 ± 0.03)	88
TMR-S9-GM1	0.31 (0.31 ± 0.02)	107
594-termG6-GM1	0.32 (0.34 ± 0.02)	231
BodipyFL-GM1	0.34 (0.36 ± 0.02)	107
Cy3-CTB incubated for 20 min	0.01 (0.02 ± 0.002)	75
594-DOPE	0.20 (0.21 ± 0.02)	145

第二節 GPI アンカー型受容体との親和性の検証

一分子観察実験により、蛍光ガングリオシドプローブと GPI アンカー型受容体 (CD59) の相互作用の詳細について解析した。

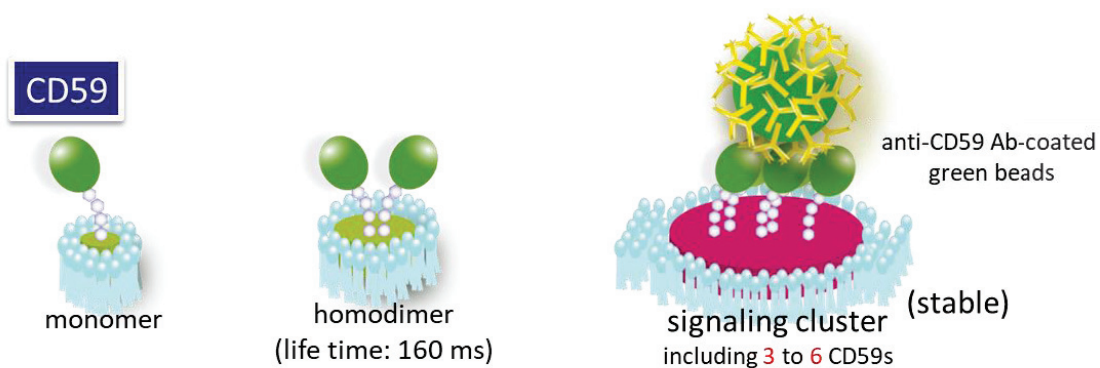
補体制御因子である CD59 はリガンド刺激後に安定なオリゴマーを形成することで、細胞質側の下流シグナル分子、Src ファミリーキナーゼやホスホリパーゼ C γ などをリクルートし、シグナル伝達を誘発する^{4,6}。一方、リガンド刺激前においては、CD59 はエクドメインのタンパク質相互作用により、頻繁に 160 ms 程の短寿命のホモダイマーを形成する事が報告されている。それに対し、コレステロールを除去した細胞膜上において CD59 はホモダイマーやオリゴマーを形成し難く、非ラフトマーカである CD59 の膜貫通型キメラタンパク質も、会合し難いとされている。これは、CD59 が会合体を形成する際に、コレステロール介在性の脂質間相互作用による安定化を受けることを示唆する。しかし、これらの会合体 (ホモダイマー、オリゴマー) の形成が可逆的で短寿命であるため、実際に CD59 会合体がガングリオシドをリクルートする様子は直接観察されていなかった。

第三章にてリガンド刺激により誘起される CD59 クラスターに対する蛍光 GM3 の親和性を調べた。ここでは、594-S9-GM3 と 594-S9-GM1 を用い、刺激状態の CD59 シグナリングクラスター (長寿命) だけでなく、定常状態で存在する、CD59 モノマー及びダイマー (160 ms の寿命) に対する共局在時間を測定し、親和性の差異を検証した (Table 13)。なお、CD59 シグナリングクラスターは、yellow-green beads で標識した抗 CD59 抗体により誘起し、蛍光分子に対して約 3~6 分子が集合した安定な会合体を指す。

まずは CD59 会合体へのガングリオシドのリクルートを二色同時一分子観察した結果、シグナリングクラスターに対する 594-S9-GM3 及び 594-S9-GM1 のリクルートは 100 ms 程度であった。それに対して非ラフトマーカ性の 594-DOPE と CD59 シグナリングクラスターの共局在時間、594-S9-GM3 と CD59 の貫通型キメラタンパク質クラスター (CD59TM

クラスター) の共局在時間はわずか 50 ms 程度であった。すなわち、この共局在時間をコントロールとして差し引いても、50 ms 以上の有意差があると言える。さらに 594-S9-GM3 及び 594-S9-GM1 における共局在寿命は、細胞膜からコレステロールを除くことにより半減した。これらの結果により、ガングリオシドと CD59 クラスターの会合体はコレステロール介在性の脂質間相互作用により安定化されていることが示唆された。一方で、定常状態における CD59 ホモダイマーに対するガングリオシドの共局在時間は、シグナリングクラスターよりも短寿命ではあったが、有意な寿命を示した (約 80 ms)。しかし一方で、CD59 モノマーへの共局在はコントロール分子と同等の 50 ms 程度に落込んだ。

これらの結果は GPI アンカー型受容体の会合度が高くなるほど、ガングリオシドの親和性が増大する傾向を示しており、この親和性はいずれもコレステロール依存的であった。以上を踏まえると、ガングリオシドとの親和性は、GPI アンカー型受容体の会合状態によって働く作用が異なり、高い会合状態になるほどコレステロール介在性の脂質間相互作用に依存的であると考えられる。



Gangliosides	CD59 assembly state	Lifetime $\pm$ S.E. (ms)
594-S9-GM1	CD59 signaling clusters	111 $\pm$ 8
	CD59 signaling clusters after chol. depl.	61 $\pm$ 3
	CD59 homodimers	77 $\pm$ 6
	CD59 monomers	49 $\pm$ 1
594-S9-GM3	CD59 signaling clusters	98 $\pm$ 4
	CD59 signaling clusters after chol. depl.	64 $\pm$ 4
	CD59TM clusters	42 $\pm$ 4
	CD59 homodimers	80 $\pm$ 6
594-DOPE	CD59 monomers	53 $\pm$ 2
	CD59 signaling clusters	57 $\pm$ 1
	CD59 homodimers	38 $\pm$ 2
	CD59 monomers	40 $\pm$ 1

Table 13. CD59 クラスターと蛍光プローブの共局在時間の検証

第三節 ガングリオシド結合タンパク質との親和性の検証

第一項 糖鎖認識タンパク質に対する結合能の検証

これまでの機能評価から、ラフトマーカ性蛍光ガングリオシドプローブが、GPI アンカー型受容体 (CD59) と強く相互作用することが一分子観察により示された。これらの

結果により、GPI アンカー型受容体とのシス相互作用において、糖鎖末端の標識は影響しないことが示唆された。しかしながら、GPI アンカー型受容体が多様なガングリオシドと相互作用可能であるのに対して、ラフト関連シグナル分子の中には糖鎖構造を識別して機能発現するタンパク質も多い。例えば、EGF (Epidermal Growth Factor) 受容体は、そのエクストドメインに対して GM3 が結合することで、自己リン酸化が抑制されることが報告されている。Simons �らはこの結合特異性の詳細を調べ、Lac-Cer、GM1、GM2、GD1a には自己リン酸化を抑制する効果がないことを明らかにした⁴⁸。また、井ノ口らはインスリン抵抗性獲得に GM3 の過剰発現が関与すると報告している。彼らは、インスリン代謝性シグナルの欠損は、GM3 過剰な細胞膜ドメインからインスリン受容体が解離することによると提唱している⁴⁹。

そのため、糖鎖結合性のタンパク質に対する蛍光ガングリオシドの結合力を比較することは蛍光色素の影響を評価する上で極めて重要である。そこで、GM1、GM3 のそれぞれの糖鎖に特異的に結合する事が知られているタンパク質の一例としてコレラ毒素 B サブユニット (CTB)、レクチンの一種であるコムギ胚芽凝集素 (WGA: Wheat germ agglutinin) を選択し、これらに対する蛍光ガングリオシドの結合定数 (K_d 値) をそれぞれ算出した。ラフトへの分配性が保持された蛍光ガングリオシドを 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerophosphorylcholine (POPC) ベシクルに各々取り込ませ (POPC/ガングリオシド = 9:1)、CTB と WGA に対する結合定数を表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) により求めた。その結果、Neu9 位を ATTO594 で標識した GM1、GM3 プローブの CTB、WGA への結合定数が、天然型とほぼ同じであることが分かった (Table 14)。それに対して 594-G6-GM3 は、WGA への結合性が証明されたものの、その結合能は天然型よりも若干上昇していた。また、一方で 594-termG6-GM1 は POPC ベシクルへ取り込まれず、CTB への結合定数

⁴⁸ Ü. Coskun, M. Grzybek, D. Drechsel, K. Simons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 9044-9048.

⁴⁹ K. Kabayama, T. Sato, K. Saito, N. Loberto, A. Prinetti, S. Sonnino, M. Kinjo, Y. Igarashi, J. Inokuchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 13678-13683.

を測定することが出来なかった。さらに、これまでの報告によると、GM1 のシアル酸側鎖を減炭・蛍光標識した蛍光プローブ⁵⁰の CTB への結合能は天然型の 10 分の 1 になるとされている⁹。

以上より、CTB、WGA に対して 594-S9 型のガングリオシドプローブがいずれも天然型と同様の結合性を示すことを証明した。しかし一方で 594-G6-GM3 は結合能に差異が認められた。以上の結果は、S9 型の蛍光ガングリオシドが糖鎖認識タンパク質と天然同様に結合可能である一例を示している。しかしその一方で、対象のタンパク質によっては、糖鎖の標識位置が相互作用に影響する可能性も示唆している。そのため、糖鎖結合型のラフト関連タンパク質を標的とした実験では、対象分子との結合性を評価する必要がある。

Table 14. ガングリオシド認識蛋白質と蛍光プローブの K_d 値

Gangliosides	CTB/WGA	K_d values
Native GM1	CTB	40 $\pm$ 7 nM
594-S9-GM1	CTB	44 $\pm$ 10 nM
594-termG6-GM1	CTB	ND
Native GM3	WGA	64 $\pm$ 10 μ M
594-S9-GM3	WGA	67 $\pm$ 15 μ M
594-G6-GM3	WGA	100 $\pm$ 16 μ M

第二項 EGF 受容体との二色同時一分子観察

最後に、ガングリオシドの中でも GM3 と GM1 に対して異なる相互作用を示すラフト関

⁵⁰ 化学構造は **Figure 4** 参照.

連タンパク質を標的に、蛍光ガングリオシドプローブとの二色同時一分子観察を行った。

前述したように、EGF 受容体は、そのエクトドメインに対して GM3 が結合することで、自己リン酸化が抑制されることが報告されている⁴⁸。そこで、EGF 受容体との共局在時間からそれぞれの蛍光ガングリオシドの親和性の比較を行った (**Figure 25**)。図中、赤色の輝点はガングリオシドを示し、緑色は EGF 受容体を示す。594-S9-GM1 と 594-S9-GM1 プローブの共局在時間を比較した結果、GM3 プローブが GM1 プローブよりも極めて長い総共局在時間を示した (7.4 倍)。これは天然のガングリオシドの親和性の違いと一致する結果であり、EGF 受容体が蛍光色素に阻害されることなく、糖鎖構造を識別する、という非常に興味深い結果を与えている。

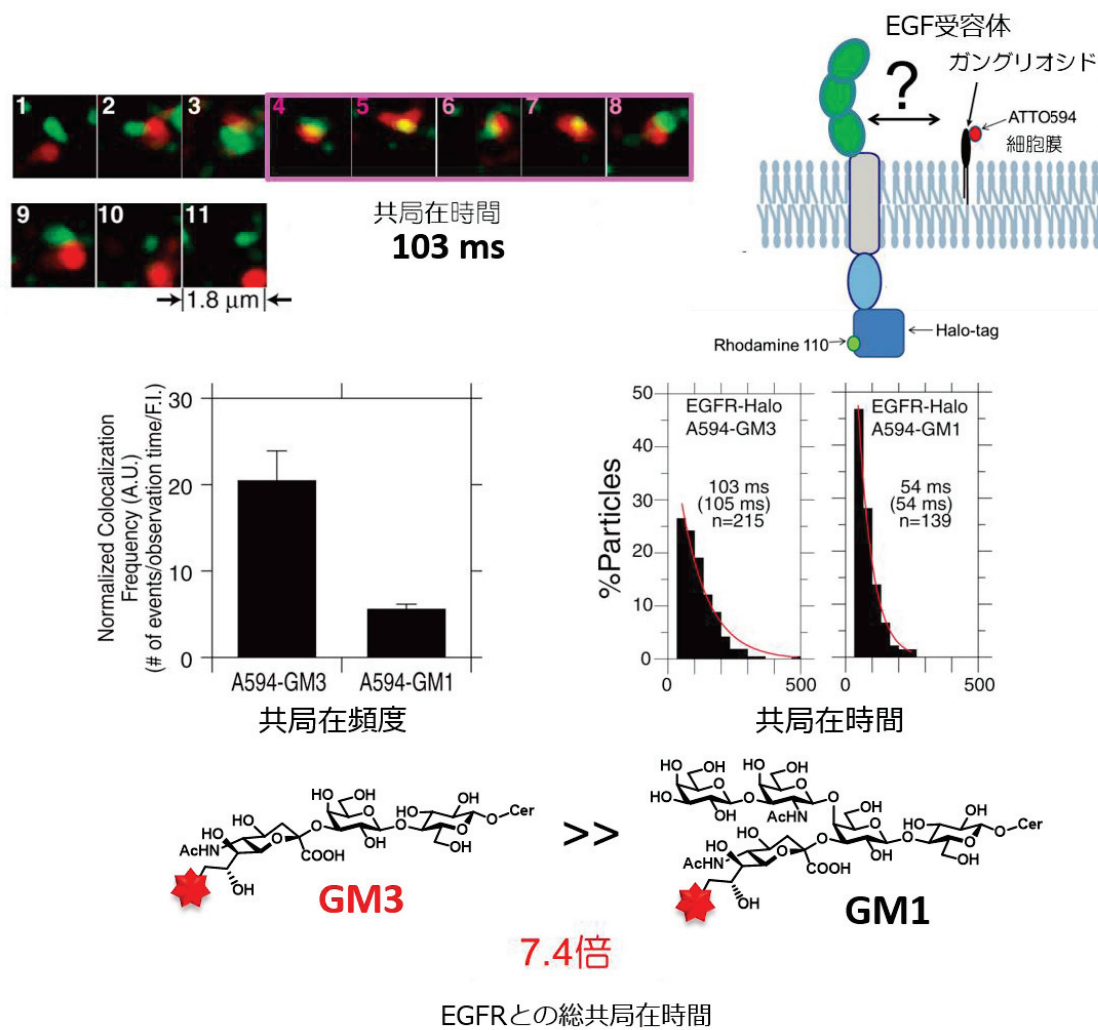


Figure 25. EGFR との共局在時間の検証

総括

本研究では一分子観察法を指向した、**a** 系列ガングリオシドの蛍光プローブの合成研究を行った。糖鎖の標的位置に蛍光分子を導入するために、各種アミノ置換ガングリオシド中間体を合成して最終段階で蛍光色素を導入する経路を立案した。

GM3 プローブ合成においては、*N*-Troc Neu-Gal を起点として 1,4-ラクトン構造を利用した合成経路を立案することで、Neu9 位 TFAc アミド置換型の Neu-Gal 供与体への誘導に成功した。Glc-Cer カセットアプローチにより GM3 骨格を構築した後、各種蛍光色素を導入することで多様な蛍光プローブの合成を達成した。

さらに Neu9 位標識 GM3 プローブの合成過程で得られたユニットを Gal4 位が遊離の受容体へ誘導することで、糖鎖の分岐構造構築を可能とした。これによって **a** 系列ガングリオシドプローブ合成の鍵となる Neu9 位修飾型のコア糖鎖の合成法を確立した。

合成した各種 GM1、GM2、GM3 プローブは細胞膜上でラフトマーカーとしての機能評価に供した。その結果、従来法で利用されてきた脂質修飾型 GM1 プローブがラフト親和性を欠損しているという驚愕する結果とともに、糖鎖の標識位置・蛍光分子の親疎水性によってもガングリオシドプローブのラフト分配特性が変動することを明らかにした。そして、ガングリオシド本来の性質に近似した蛍光プローブを合成する為には高親水性の色素を糖鎖の末端へ結合させることが望ましいという分子設計上の重要な指針を得た。

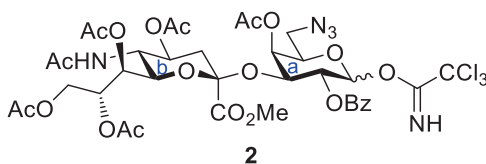
そして、生細胞膜上での二色同時一分子観察実験により、ガングリオシドと GPI アンカー型タンパク質 (CD59) の相互作用を捉えることに成功した。興味深いことに、ガングリオシドは CD59 の会合状態に準じて異なる親和性を示し、単量体よりも二量体、多量体に対して長く共局在をすることが分かった。これはラフト形成機構を解く重要な手掛かりであると考えられる。

実験の部

本論文において全ての実験は以下の手順、器具及び装置を使用した。また、記載についても以下の通り統一した。

反応溶媒はあらかじめ MS3Å、MS4Å、MS AW-300 (Wako chemical)にて乾燥したものを使用した。反応に用いた乾燥剤は 300 °C にて 2 時間活性化し使用した。TLC 分析には TLC plate silica gel 60F₂₅₄ (Merck)を使用し、検出は UV 吸収 (254 nm)及び発色試薬 (10% H₂SO₄ in EtOH, Phosphomolybdic acid solution 5 wt. % in ethanol, Ninhydrin reagent)を用いた。カラムクロマトグラフィーは Silica gel (Fuji Silysia, 80 mesh and 300 mesh)または、Sephadex (Pharmacia, LH-20)を用いた。なお TLC の展開溶媒及びカラムクロマトグラフィーの溶出溶媒は体積比で ()内に示した。¹H NMR スペクトル及び ¹³C NMR スペクトルは JEOL ECX400 (400MHz)、JEOL ECA500 (500MHz)、JEOL ECA600 (600MHz)及び Bruker Avance III 500 (500MHz)を用いた。ケミカルシフト値は、¹H NMR、¹³C NMR については内部標準物質 (tetramethylsilane)に対する δ 値 (ppm)で示した。旋光度は Horiba High Sensitive Polarimeter SEPA-300 を用いて測定し、HRMS スペクトル (ESI-TOF)は Bruker Daltonics microTOF (ESI-TOF) mass spectrometer を用いて positive-ion モード、または negative-ion モードで測定した。

Gal6 位標識 GM3 プローブ



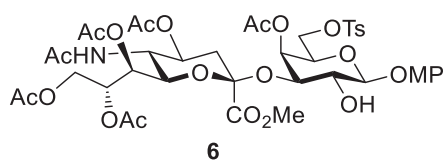
(Methyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylate)-(2 $\rightarrow$ 3)-4-*O*-acetyl-6-azido-2-*O*-benzoyl-6-deoxy-D-galactopyranosyl trichloroacetimidate (2)

Ar 雰囲気下にて、化合物 **10** (50.8 mg, 54.6 μ mol)を MeCN/toluene/H₂O (0.46 mL/0.40 mL/0.23 mL)に溶解し、0 °C に冷却後、CAN (299 mg, 546 μ mol)を加え、0 °C にて 2 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 15:1)にて確認後、反応液を AcOEt に希釈し、有機層を H₂O、satd NaHCO₃、brine の順で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (toluene/AcOEt/MeOH = 4:1:0.1)にて化合物 **16** (38.8 mg, 86%)を得た。

Ar 雰囲気下にて化合物 **16** (75.1 mg, 91.1 μ mol)を CH₂Cl₂ (1.8 mL)に溶解し、0 °C に冷却した後、CCl₃CN (182 μ L, 1.82 mmol)、DBU (2.7 μ L, 18 μ mol)を加え、0 °C にて 1 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 15:1)にて確認後、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (toluene/AcOEt/MeOH = 4:1:0.05)にて化合物 **2** (77.0 mg, 87%, α : β = 5:1)を得た。

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.73 (s, 1 H, C=NH ^{β}), 8.61 (s, 1 H, C=NH ^{α}), 8.16-7.17 (m, 10 H, Ar ^{α} , Ar ^{β}), 6.75 (d, 1 H, $J_{1,2}$ = 4.1 Hz, H-1a ^{α}), 6.17 (d, 1 H, $J_{1,2}$ = 8.2 Hz, H-1a ^{β}), 5.61-5.53 (m, 3 H, H-8b ^{α} , H-8b ^{β} , H-2a ^{β}), 5.48 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ = 10.3 Hz, H-2a ^{α}), 5.42 (dd, 1 H, $J_{6,7}$ = 2.1 Hz, $J_{7,8}$ = 9.0 Hz, H-7b ^{α}), 5.33 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ = 2.7 Hz, H-3a ^{α}), 5.28 (d, 1 H, H-4a ^{α}), 5.20 (dd, 1 H, $J_{6,7}$ = 2.8 Hz, $J_{7,8}$ = 9.7 Hz, H-7b ^{β}), 5.18 (d, 1 H, NH ^{α}), 5.03-4.99 (m, 2 H, H-4a ^{β} , NH ^{β}), 4.90 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ = 10.3 Hz, $J_{3,4}$ = 3.4 Hz, H-3a ^{β}), 4.89-4.82 (m, 2 H, H-4b ^{α} , H-4b ^{β}), 4.54 (m, 1 H, H-5a ^{α}), 4.33 (dd, 1 H, $J_{8,9}$ = 2.0 Hz, J_{gem} = 12.4 Hz, H-9b ^{β}), 4.24 (dd, 1 H, $J_{8,9}$ = 2.7 Hz, J_{gem} = 12.4 Hz, H-9b ^{α}), 4.16 (dd, 1 H, $J_{8,9'}$ = 4.8 Hz, H-9'b ^{α}), 4.10-4.04 (m, 2 H, H-5b ^{α} , H-5a ^{β}), 3.93 (dd, 1 H, H-9'b ^{β}), 3.90-3.80 (m, 8 H, H-5b ^{β} , H-6b ^{α} , COOMe ^{α} , COOMe ^{β}), 3.63 (dd, 1 H, $J_{5,6}$ = 10.9 Hz, $J_{6,7}$ = 2.8 Hz, H-6b ^{β}), 3.51 (dd, 1 H, $J_{5,6}$ = 7.6 Hz, J_{gem} = 13.1 Hz, H-6a ^{β}), 3.37 (dd, 1 H, $J_{5,6}$ = 7.6 Hz, J_{gem} = 13.1 Hz, H-6a ^{α}), 3.27

(dd, 1 H, $J_{5,6'} = 4.8$ Hz, H-6'a^α), 3.17 (dd, 1 H, $J_{5,6'} = 5.5$ Hz, $J_{\text{gem}} = 13.1$ Hz, H-6'a^β), 2.57 (dd, 1 H, $J_{\text{gem}} = 13.1$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 4.8$ Hz, H-3eq-b^β), 2.52 (dd, 1 H, $J_{\text{gem}} = 12.4$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 4.2$ Hz, H-3eq-b^α), 2.35-1.42 (m, 38 H, 6 Ac^β, H-3ax-b^β, 6 Ac^α, H-3ax-b^α); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 170.8, 170.7, 170.7, 170.6, 170.6, 170.3, 170.2, 170.1, 170.0, 169.8, 169.6, 168.1, 165.8, 160.7, 133.6, 130.1, 129.9, 129.8, 129.3, 128.6, 128.3, 96.8, 96.6, 96.1, 93.9, 90.9, 73.3, 72.8, 71.9, 71.0, 70.9, 69.8, 69.4, 69.3, 69.0, 68.3, 68.2, 67.6, 67.5, 67.2, 66.9, 66.6, 62.4, 62.2, 59.5, 53.3, 53.2, 50.7, 50.2, 49.3, 48.8, 38.4, 38.1, 37.3, 37.1, 31.9, 31.2, 30.0, 29.7, 29.6, 29.3, 27.1, 23.2, 23.1, 22.7, 21.5, 21.4, 20.8, 20.8, 20.7, 20.7, 20.7, 20.1, 19.7, 14.1; HRMS (ESI) m/z found [M+Na]⁺ 990.1588, C₃₇H₄₄Cl₃N₅O₁₉ calcd for [M+Na]⁺ 990.1588.

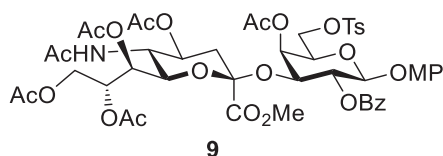


4-Methoxyphenyl (methyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylonate)-(2→3)-4-*O*-acetyl-6-*O*-*p*-toluenesulfonyl- β -D-galactopyranoside (6)

Ar 雰囲気下にて、化合物 **5** (485 mg, 605 μ mol)を CH₂Cl₂ (5.0 mL)、Pyr (1.0 mL)の混合溶媒に溶解し、0 °C に冷却後、TsCl (127 mg, 2.24 mmol)を 4 度に分けて加え、0 °C にて 70 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 15:1)にて確認後、MeOH を加えて過剰の試薬を分解した。toluene 共沸後、残渣を CHCl₃に希釈し、有機層を 2 M HCl、H₂O、satd Na₂CO₃、brine の順で洗浄した後、Na₂SO₄で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (CHCl₃/MeOH = 50:1)にて化合物 **6** (522 mg, 90%)を得た。

$[\alpha]_{\text{D}} -19.7^{\circ}$ (c 1.4, CHCl₃); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.72-6.80 (m, 8 H, 2 Ar), 5.44 (m, 1 H,

H-8b), 5.34-5.32 (m, 2 H, H-7b, NH), 5.06-4.95 (m, 3 H, H-1a, H-4a, H-4b), 4.50 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 9.6$ Hz, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, H-3a), 4.28 (dd, 1 H, $J_{8,9} = 2.8$ Hz, $J_{\text{gem}} = 12.4$ Hz, H-9b), 4.08-3.78 (m, 13 H, COOMe, MeO, H-2a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-6b, H-5b, H-9'b), 2.89 (s, 1 H, OH-2a), 2.70 (dd, 1 H, $J_{\text{gem}} = 12.9$ Hz, $J_{3eq,4} = 4.5$ Hz, H-3eq-b), 2.41 (s, 3 H, CH_3Ar), 2.17-1.88 (m, 19 H, 6 Ac, H-3ax-b); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 170.7, 170.5, 170.3, 169.9, 169.8, 167.5, 155.2, 151.0, 145.0, 132.3, 129.8, 128.0, 118.2, 114.4, 101.3, 96.9, 73.8, 72.4, 70.6, 69.1, 68.7, 67.9, 67.2, 67.0, 66.7, 62.4, 55.6, 53.4, 49.3, 37.6, 30.9, 23.1, 21.6, 21.3, 21.1, 20.7, 20.6, 20.5; HRMS (ESI) m/z found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 978.2677, $\text{C}_{42}\text{H}_{53}\text{NO}_{22}\text{S}$ calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 978.2678.

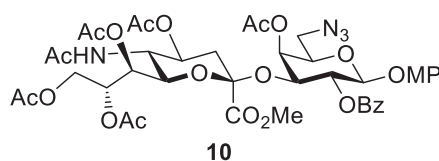


4-Methoxyphenyl (methyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylonate)-(2 $\rightarrow$ 3)-4-*O*-acetyl-2-*O*-benzoyl-6-*O*-*p*-toluenesulfonyl- β -D-galactopyranoside (9)

Ar 雰囲気下にて、化合物 **6** (64.0 mg, 67.0 μmol)を Pyr (0.67 mL)に溶解し、0 $^{\circ}\text{C}$ に冷却後安息香酸無水物 (30.0 mg, 134 μmol)、DMAP (1.0 mg, 8.1 μmol)を加え、室温にて 9.5 時間攪拌した。反応終了を TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 15:1$)にて確認後、MeOH を加えて過剰の試薬を分解した。toluene 共沸後、残渣を CHCl_3 に希釈し、有機層を 2 M HCl、 H_2O 、satd Na_2CO_3 、brine の順で洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 70:1$)にて化合物 **9** (70.5 mg, 99%)を得た。

$[\alpha]_{\text{D}} +13.1^{\circ}$ (c 1.0, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.14-7.26 (m, 9 H, 2 Ar), 6.88-6.72 (m, 4 H, Ar), 5.57 (m, 1 H, H-8b), 5.45 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, $J_{2,3} = 9.0$ Hz, H-2a), 5.22 (d, 1 H, H-1a),

5.18 (dd, 1 H, $J_{6,7} = 2.7$ Hz, $J_{7,8} = 9.6$ Hz, H-7b), 5.04 (d, 1 H, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, H-4a), 4.96 (d, 1 H, $J_{5,\text{NH}} = 10.1$ Hz, NH), 4.88-4.80 (m, 2 H, H-3a, H-4b), 4.27 (dd, 1 H, $J_{8,9} = 2.3$ Hz, $J_{\text{gem}} = 12.4$ Hz, H-9b), 4.14-4.05 (m, 3 H, H-5a, H-6a, H-6'a), 3.90-3.74 (m, 8 H, COOMe, MeO, H-5b, H-9'b), 3.59 (dd, 1 H, $J_{5,6} = 10.5$ Hz, H-6b), 2.56 (dd, 1 H, $J_{\text{gem}} = 12.8$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 4.6$ Hz, H-3eq-b), 2.42 (s, 3 H, CH_3Ar), 2.20-1.41 (m, 19 H, 6 Ac, H-3ax-b); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 170.7, 170.7, 170.6, 170.2, 170.1, 168.0, 165.4, 155.5, 151.3, 145.1, 133.1, 132.4, 130.0, 130.0, 129.8, 129.0, 128.4, 128.2, 128.0, 118.8, 114.4, 100.9, 96.8, 71.7, 70.9, 70.8, 70.6, 69.4, 67.5, 67.3, 67.1, 66.5, 62.4, 55.6, 53.3, 48.7, 37.2, 29.7, 23.1, 21.6, 21.5, 20.7, 20.7, 20.6, 20.2; HRMS (ESI) m/z found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1082.2940, $\text{C}_{49}\text{H}_{57}\text{NO}_{23}\text{S}$ calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1082.2940.

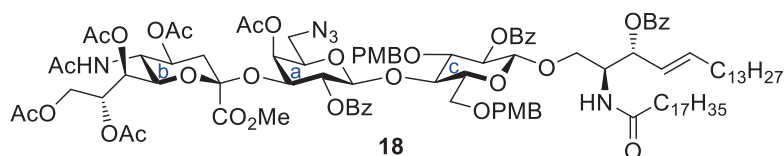


4-Methoxyphenyl (methyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylonate)-(2 $\rightarrow$ 3)-4-*O*-acetyl-6-azido-2-*O*-benzoyl-6-deoxy- β -D-galactopyranoside (10)

化合物 **9** (40.0 mg, 37.7 μmol) と NaN_3 (19.6 mg, 302 μmol) 及び 18-crown-6 (19.6 mg, 74.2 μmol) を DMF (0.38 mL) に溶解し、Drierite (40 mg) を加え、80 $^\circ\text{C}$ にて 19 時間攪拌した。反応終了を TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20:1$) 及び MALDI-TOF-MS にて確認後、固形物をセライトにて濾別し toluene 共沸した。得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 70:1$) にて化合物 **10** (21.6 mg, 62%) を得た。

$[\alpha]_{\text{D}} +10.3^\circ$ (c 0.3, CHCl_3); ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.17-7.27 (m, 5 H, Ar), 6.96-6.75 (m, 4 H, Ar), 5.59 (m, 1 H, H-8b), 5.52 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 7.6$ Hz, $J_{2,3} = 9.3$ Hz, H-2a), 5.23 (d, 1 H, H-1a), 5.18 (dd, 1 H, $J_{6,7} = 2.8$ Hz, $J_{7,8} = 9.6$ Hz, H-7b), 4.98 (d, 1 H, $J_{5,\text{NH}} = 10.3$ Hz, NH), 4.96 (d, 1 H,

$J_{3,4} = 2.8$ Hz, H-4a), 4.84 (td, 1 H, $J_{3eq,4} = 4.1$ Hz, $J_{3ax,4} = 11.0$ Hz, $J_{4,5} = 10.3$ Hz, H-4b), 4.81 (dd, 1 H, H-3a), 4.29 (dd, 1 H, $J_{8,9} = 2.1$ Hz, $J_{gem} = 12.4$ Hz, H-9b), 3.93-3.74 (m, 9 H, COOMe, MeO, H-5a, H-5b, H-9'b), 3.62 (dd, 1 H, $J_{5,6} = 10.3$ Hz, H-6b), 3.50 (dd, 1 H, $J_{5,6} = 8.3$ Hz, $J_{gem} = 13.1$ Hz, H-6a), 3.20 (dd, 1 H, $J_{5,6'} = 4.1$ Hz, H-6'a), 2.58 (dd, 1 H, $J_{gem} = 12.4$ Hz, H-3eq-b), 2.20-1.42 (m, 19 H, 6 Ac, H-3ax-b); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 170.8, 170.6, 170.6, 170.5, 170.2, 170.1, 168.1, 165.4, 155.6, 151.4, 133.1, 130.0, 128.4, 119.3, 114.4, 101.4, 96.8, 72.5, 71.8, 70.9, 70.7, 69.3, 68.4, 67.4, 66.5, 62.4, 55.6, 53.3, 50.8, 48.8, 37.3, 29.7, 23.1, 21.5, 20.8, 20.2; HRMS (ESI) m/z found $[\text{M}+\text{Na}]^+ 953.2912$, $\text{C}_{42}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_{20}$ calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+ 953.2916$.

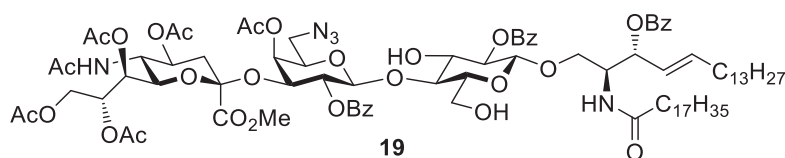


(Methyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylate)-(2 $\rightarrow$ 3)-(4-*O*-acetyl-6-azido-2-*O*-benzoyl-6-deoxy- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-*O*-benzoyl-3,6-di-*O*-(4-methoxybenzyl)- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 1)-(2*S*,3*R*,4*E*)-3-*O*-benzoyl-2-octadecanamido-4-octadecene-1,3-diol (18)

供与体 **2** (34.8 mg, 35.9 μmol)及び受容体 **4** (63.4 mg, 53.9 μmol)を CH_2Cl_2 (2.3 mL)に溶解し、MS AW-300 (150 mg)を加えた。室温にて 1 時間攪拌した後、0 $^\circ\text{C}$ に冷却し、TMSOTf (0.7 μL , 4 μmol)を加えて Ar 気流下で 1 時間攪拌した。反応終了を TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20:1$ 二回展開)にて確認後、セライト濾過にて濾別した。濾液を CHCl_3 に希釈し satd Na_2CO_3 、brine で洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 120:1$ to 90:1)にて化合物 **18** (59.9 mg, 84%)を得た。

$[\alpha]_{\text{D}} +20.1^\circ$ (c 0.4, CHCl_3); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.21-6.63 (m, 23 H, 5 Ar), 5.77 (dt, 1

H, $J_{4,5} = 15.2$ Hz, $J_{5,6} = J_{5,6'} = 6.8$ Hz, H-5^{Cer}), 5.72 (d, 1 H, $J_{2,\text{NH}} = 9.1$ Hz, NH^{Cer}), 5.65 (m, 1 H, H-8b), 5.47 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 7.1$ Hz, H-3^{Cer}), 5.39 (dd, 1 H, H-4^{Cer}), 5.31 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, $J_{2,3} = 9.9$ Hz, H-2a), 5.18 (dd, 1 H, $J_{6,7} = 2.7$ Hz, $J_{7,8} = 9.7$ Hz, H-7b), 5.11 (t, 1 H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 8.9$ Hz, H-2c), 5.06 (d, 1 H, H-1a), 4.99 (d, 1 H, $J_{5,\text{NH}} = 10.3$ Hz, NH-5b), 4.94 (d, 1 H, $J_{3,4} = 3.4$ Hz, H-4a), 4.86-4.81 (m, 2 H, H-4b, CH₂Ph), 4.73 (dd, 1 H, H-3a), 4.60 (d, 1 H, $J_{\text{gem}} = 11.3$ Hz, CH₂Ph), 4.35-4.28 (m, 5 H, H-9b, H-1c, H-2^{Cer}, CH₂Ph), 4.16 (t, 1 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 8.9$ Hz, H-4c), 4.02 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 3.2$ Hz, $J_{\text{gem}} = 9.9$ Hz, H-1^{Cer}), 3.92 (dd, 1 H, $J_{8,9'} = 6.3$ Hz, $J_{\text{gem}} = 12.4$ Hz, H-9'b), 3.86-3.66 (m, 12 H, H-5a, H-5b, H-3c, 2 MeO, COOMe), 3.61-3.56 (m, 2 H, H-6c, H-6'c), 3.44 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, H-1'^{Cer}), 3.30 (m, 1 H, H-5c), 3.24 (dd, 1 H, $J_{5,6} = 6.7$ Hz, $J_{\text{gem}} = 12.7$ Hz, H-6a), 2.97 (dd, 1 H, $J_{5,6'} = 6.3$ Hz, H-6'a), 2.53 (dd, 1 H, $J_{\text{gem}} = 12.6$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 4.6$ Hz, H-3_{eq}-b), 2.18-1.43 (m, 25 H, 6 Ac, H-3_{ax}-b, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}, NHCOCH₂^{Cer}, NHCOCH₂CH₂^{Cer}), 1.39-1.02 (m, 50 H, 25 CH₂^{Cer}), 0.92-0.83 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 172.6, 170.7, 170.6, 170.3, 170.2, 170.1, 168.0, 165.2, 165.1, 165.1, 159.0, 158.8, 137.0, 133.3, 133.1, 132.7, 130.7, 130.5, 130.3, 130.2, 129.9, 129.7, 129.7, 129.6, 129.1, 128.8, 128.5, 128.4, 128.2, 124.8, 113.6, 113.3, 100.9, 99.7, 96.8, 79.6, 75.3, 75.1, 74.6, 73.6, 73.5, 72.6, 71.8, 71.8, 71.2, 69.4, 68.3, 68.2, 67.1, 67.0, 66.6, 62.5, 55.2, 55.1, 53.3, 50.4, 50.0, 48.7, 37.4, 37.1, 36.4, 32.7, 32.3, 31.9, 31.2, 30.1, 30.0, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.2, 28.9, 27.1, 25.5, 23.1, 22.7, 21.4, 20.7, 20.7, 20.6, 20.2, 19.7, 14.1; HRMS (ESI) m/z found [M+Na]⁺ 2005.0023, C₁₀₇H₁₄₇N₅O₃₀ calcd for [M+Na]⁺ 2005.0023.



(Methyl 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylonate)-(2→3)-(4-*O*-acetyl-6-azido-2-*O*-benzoyl-6-deoxy- β -D-galactopyranosyl)-

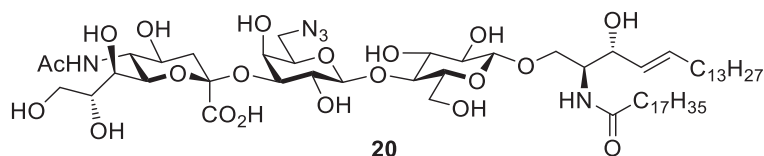
(1→4)-2-*O*-benzoyl-β-D-glucopyranosyl-(1→1)-(2*S*,3*R*,4*E*)-3-*O*-benzoyl-2-octadecanamido-4-octadecene-1,3-diol (19)

Ar 雰囲気下にて、化合物 **18** (41.7 mg, 21.0 μmol)を CH₂Cl₂ (1.4 mL)に溶かし、0 °C にて TFAcOH (0.7 mL)を加え、1.5 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 20:1 二回展開)にて確認後、satd NaHCO₃ を加えて反応を停止した。これを CHCl₃ で希釈し、H₂O、brine で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (CHCl₃/MeOH = 75:1)にて化合物 **19** (36.5 mg, 99%)を得た。

[α]_D +15.9° (*c* 3.7, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.23-7.39 (m, 15 H, 3 Ar), 5.84 (dt, 1 H, *J*_{4,5} = 15.3 Hz, *J*_{5,6} = *J*_{5,6'} = 6.8 Hz, H-5^{Cer}), 5.74 (d, 1 H, *J*_{2,NH} = 9.6 Hz, NH^{Cer}), 5.71 (m, 1 H, H-8b), 5.53 (t, 1 H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} = 8.1 Hz, H-3^{Cer}), 5.42 (dd, 1 H, H-4^{Cer}), 5.29 (dd, 1 H, *J*_{1,2} = 8.0 Hz, *J*_{2,3} = 10.1 Hz, H-2a), 5.16 (dd, 1 H, *J*_{6,7} = 2.7 Hz, *J*_{7,8} = 9.5 Hz, H-7b), 5.12 (t, 1 H, *J*_{1,2} = *J*_{2,3} = 8.3 Hz, H-2c), 4.99-4.95 (m, 3 H, H-1a, H-4a, NH-5b), 4.83-4.77 (m, 2 H, H-3a, H-4b), 4.46 (dd, 1 H, *J*_{8,9} = 2.4 Hz, *J*_{gem} = 12.2 Hz, H-9b), 4.39 (d, 1 H, H-1c), 4.38 (m, 1 H, H-2^{Cer}), 3.95-3.80 (m, 9 H, H-5a, H-5b, H-9'b, H-3c, H-4c, H-1^{Cer}, COOMe), 3.61 (dd, 1 H, *J*_{5,6} = 10.8 Hz, H-6b), 3.50 (dd, 1 H, *J*_{1,2} = 3.7 Hz, *J*_{gem} = 9.7 Hz, H-1'^{Cer}), 3.43 (dd, 1 H, *J*_{5,6} = 7.2 Hz, *J*_{gem} = 12.7 Hz, H-6a), 3.40 (m, 1 H, H-6c), 3.30 (dd, 1 H, *J*_{5,6'} = 6.0 Hz, H-6'a), 3.15-3.09 (m, 2 H, H-5c, H-6'c), 2.93 (br dd, 1 H, OH-6c), 2.54 (dd, 1 H, *J*_{gem} = 12.5 Hz, *J*_{3eq,4} = 4.6 Hz, H-3eq-b), 2.22-1.79 (m, 21 H, 5 Ac, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}, NHCOCH₂^{Cer}, NHCOCH₂CH₂^{Cer}), 1.68 (t, 1 H, *J*_{3ax,4} = 12.5 Hz, H-3ax-b), 1.51 (s, 3 H, Ac), 1.49-1.00 (m, 50 H, 25 CH₂^{Cer}), 0.99-0.75 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 172.7, 171.6, 170.7, 170.7, 170.3, 170.3, 170.2, 168.0, 165.6, 165.1, 138.0, 133.3, 133.1, 133.0, 130.4, 130.2, 129.9, 129.7, 129.6, 129.4, 128.4, 128.4, 124.8, 101.2, 100.1, 96.8, 79.3, 76.7, 74.3, 74.0, 74.0, 72.7, 71.9, 71.6, 70.9, 70.6, 69.3, 67.9, 67.1, 67.0, 66.5, 63.2, 59.6, 53.3, 50.4, 50.3, 48.6, 37.3, 37.1, 36.6, 32.7, 32.3, 31.9, 30.0, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.5, 29.3, 29.2, 29.2, 28.9, 27.1, 25.5, 23.1,

22.7, 21.5, 20.8, 20.7, 20.7, 20.4, 19.7, 14.1; HRMS (ESI) m/z found $[M+Na]^+$ 1764.8873,

$C_{91}H_{131}N_5O_{28}$ calcd for $[M+Na]^+$ 1764.8873.

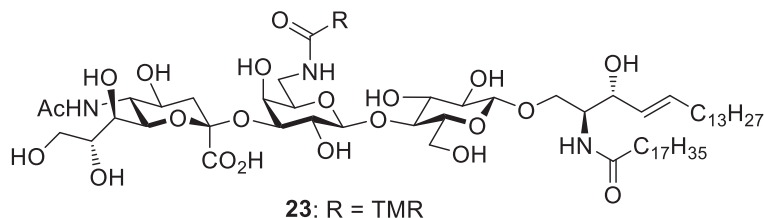


(5-Acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylonic acid)-(2 $\rightarrow$ 3)-(6-azido-6-deoxy- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(β -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 1)-(2*S*,3*R*,4*E*)-2-octadecanamido-4-octadecene-1,3-diol (20)

化合物 **19** (21.0 mg, 12.0 μ mol) を MeOH/THF (3.0 mL/3.0 mL) に溶かし、1 M NaOH 水溶液 (240 μ L) を加え、室温にて 23 時間攪拌した。反応終了を TLC ($CHCl_3$ /MeOH/5% $CaCl_2$ aq. = 5:4:1) で確認後、Muromac C101 を加え反応液を中和した。反応溶液を綿栓ろ過し、溶媒除去を行った後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($CHCl_3$ /MeOH/ H_2O = 6:2:0.07 to 5:4:1) で精製し、化合物 **20** (14.5 mg, quant.) を得た。

$[\alpha]_D -11.5^\circ$ (c 0.3, $CHCl_3$ /MeOH = 1:1); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$ / CD_3OD = 1:1) δ 7.72 (d, 1 H, $J_{5,NH} = 9.0$ Hz, NH-5b), 5.69 (dt, 1 H, $J_{4,5} = 15.0$ Hz, $J_{5,6} = J_{5,6'} = 6.5$ Hz, H-5^{Cer}), 5.45 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 7.5$ Hz, H-4^{Cer}), 4.45 (d, 1 H, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, H-1a), 4.31 (d, 1 H, $J_{1,2} = 7.5$ Hz, H-1c), 4.23-3.34 (m, 23 H, H-2a, H-3a, H-4a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-4b, H-5b, H-6b, H-7b, H-8b, H-9b, H-9'b, H-2c, H-3c, H-4c, H-5c, H-6c, H-6'c, H-1^{Cer}, H-1'^{Cer}, H-2^{Cer}, H-3^{Cer}), 2.81 (br dd, 1 H, H-3eq-b), 2.18 (t, 2 H, $NHCOCH_2^{Cer}$), 2.05-2.01 (m, 5 H, Ac, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}), 1.79 (br t, 1 H, H-3ax-b), 1.59 (m, 2 H, $NHCOCH_2CH_2^{Cer}$), 1.39-1.16 (m, 50 H, 25 CH_2^{Cer}), 0.91-0.88 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$ / CD_3OD = 1:1) δ 174.3, 174.0, 157.6, 134.0, 128.9, 103.4, 102.6, 79.5, 75.5, 74.3, 74.1, 73.3, 73.2, 73.0, 71.6, 71.1, 68.6, 68.4, 67.2, 63.0, 60.2, 57.1, 52.9, 52.3, 52.3, 51.0, 46.1, 40.3, 36.1, 32.0, 31.5, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 28.9, 28.9, 25.8, 25.6, 22.2, 21.8, 17.3, 13.6, 13.4, 13.3, 13.2;

HRMS (ESI) m/z found $[M-H]^-$ 1204.7433, $C_{59}H_{107}N_5O_{20}$ calcd for $[M-H]^-$ 1204.7431.



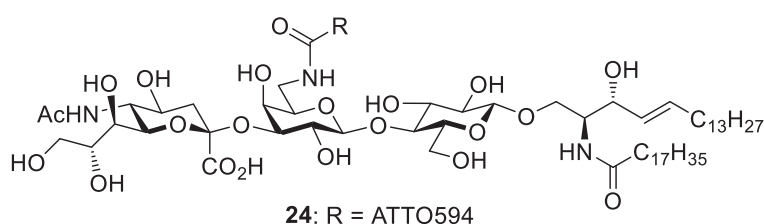
TMR-G6-GM3 (23)

Ar 雰囲気下、化合物 **20** (5.0 mg, 4.1 μ mol)を MeOH/THF (414 μ L/414 μ L)に溶かし、 H_2O (20 μ L)と tributylphosphine (3.1 μ L, 12 μ mol)を加え、50 $^{\circ}C$ にて 2 時間攪拌した。反応終了を TLC ($CHCl_3$ /MeOH/5% $CaCl_2$ aq. = 5:4:0.4)で確認後、toluene 共沸し、残渣をゲルろ過クロマトグラフィー (LH-20, $CHCl_3$ /MeOH = 1:1)で精製した後、2 時間真空乾燥した。

残渣を Ar 雰囲気条件下にて MeOH/THF (414 μ L/414 μ L)に溶かし、TEA (12.0 μ L, 82.8 μ mol)、5-carboxy-tetramethylrhodamine *N*-succinimidyl ester (5.0 mg, 9.5 μ mol)を加え、室温にて 69 時間攪拌した。反応終了を TLC ($CHCl_3$ /MeOH/5% $CaCl_2$ aq. = 5:4:0.5)で確認後、ゲルろ過クロマトグラフィー (LH-20, $CHCl_3$ /MeOH = 1:1)、PTLC ($CHCl_3$ /MeOH/ H_2O = 5:4:0.5)で精製し、**TMR-G6-GM3 (23)** (2.8 mg, 43%, 2 steps)を得た。

1H NMR (800 MHz, CD_3OD) δ 8.61-6.91 (m, 9 H, 3 Ar^{TMR}), 5.58 (dt, 1 H, $J_{4,5} = 15.2$ Hz, $J_{5,6} = 6.6$ Hz, H-5^{Cer}), 5.38 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 7.8$ Hz, H-4^{Cer}), 4.48 (d, 1 H, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, H-1a), 4.30 (d, 1 H, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, H-1c), 4.16-3.01 (m, 35 H, H-2a, H-3a, H-4a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-4b, H-5b, H-6b, H-7b, H-8b, H-9b, H-9'b, H-2c, H-3c, H-4c, H-5c, H-6c, H-6'c, H-1^{Cer}, H-1'^{Cer}, H-2^{Cer}, H-3^{Cer}, 4 NMe^{TMR}), 2.87 (dd, 1 H, $J_{gem} = 11.8$ Hz, $J_{3eq,4} = 3.8$ Hz, H-3eq-b), 2.10 (t, 2 H, NHCOCH₂^{Cer}), 2.00-1.89 (m, 5 H, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}, Ac), 1.76 (t, 1 H, $J_{3ax,4} = 11.8$ Hz, H-3ax-b), 1.51 (m, 2 H, NHCOCH₂CH₂^{Cer}), 1.32-1.30 (m, 50 H, 25 CH₂^{Cer}), 0.90-0.89 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ^{13}C NMR (200 MHz, CD_3OD) δ 175.8, 175.5, 174.9, 172.4, 169.6, 160.8, 159.0, 159.0, 158.6, 158.6, 141.8, 137.3, 137.2, 134.9, 132.7, 131.4, 130.5, 129.8, 115.0, 115.0, 114.7, 105.0, 104.4, 101.3, 101.3, 97.3,

80.6, 77.7, 76.5, 76.2, 75.0, 74.9, 74.3, 73.0, 72.8, 70.8, 70.1, 69.7, 69.6, 69.4, 64.6, 61.7, 57.7, 57.6, 57.5, 57.4, 57.3, 54.7, 53.9, 42.0, 41.9, 40.9, 37.3, 33.5, 33.1, 30.9, 30.9, 30.9, 30.9, 30.8, 30.8, 30.7, 30.7, 30.6, 30.5, 30.5, 30.5, 30.5, 27.2, 23.8, 23.8, 22.6, 17.4, 17.3, 17.2, 14.5; HRMS (ESI) m/z found $[M-H]^-$ 1590.8955, $C_{84}H_{129}N_5O_{24}$ calcd for $[M-H]^-$ 1590.8955.



594-G6-GM3 (24)

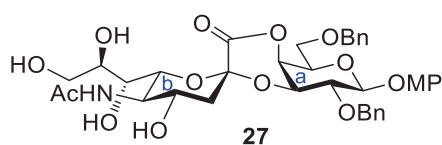
Ar 雰囲気下、化合物 **20** (4.9 mg, 4.1 μ mol)を MeOH/THF (700 μ L/700 μ L)に溶かし、 H_2O (20 μ L)と tributylphosphine (3.0 μ L, 12 μ mol)を加え、50 $^{\circ}C$ にて 2.5 時間攪拌した。反応終了を TLC ($CHCl_3$ /MeOH/5% $CaCl_2$ aq. = 5:4:1)で確認後、toluene 共沸し、残渣をゲルろ過クロマトグラフィー (LH-20, $CHCl_3$ /MeOH = 1:1)で精製した後、2 時間真空乾燥した。

残渣を Ar 雰囲気条件下にて MeOH/THF (700 μ L/700 μ L)に溶かし、TEA (17.0 μ L, 122 μ mol)、ATTO594 *N*-succinimidyl ester (8.5 mg, 6.1 μ mol)を加え、室温にて 12 時間攪拌した。反応終了を TLC ($CHCl_3$ /MeOH/5% $CaCl_2$ aq. = 5:4:1)で確認後、ゲルろ過クロマトグラフィー (LH-20, $CHCl_3$ /MeOH = 1:1)、PTLC ($CHCl_3$ /MeOH/ H_2O = 5:4:1)で精製し、**594-G6-GM3 (24)** (3.7 mg, 47%, 2 steps)を得た。

1H NMR (800 MHz, CD_3OD) δ 7.91-7.51 (m, 4 H, $Ar^{ATTO594}$), 7.39 (s, 1 H, $Ar^{ATTO594}$), 7.34 (s, 1 H, $Ar^{ATTO594}$), 6.81 (s, 1 H, $Ar^{ATTO594}$), 6.79 (s, 1 H, $Ar^{ATTO594}$), 5.90 (s, 1 H, $CH^{ATTO594}$), 5.88 (s, 1 H, $CH^{ATTO594}$), 5.68 (dt, 1 H, $J_{4,5} = 15.1$ Hz, $J_{5,6} = J_{5,6'} = 7.6$ Hz, H-5 Cer), 5.44 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 7.6$ Hz, H-4 Cer), 4.39 (d, 1 H, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, H-1a), 4.29 (d, 1 H, $J_{1,2} = 7.5$ Hz, H-1c), 4.21-3.19 (m, 33 H, H-2a, H-3a, H-4a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-4b, H-5b, H-6b, H-7b, H-8b, H-9b, H-9'b, H-2c, H-3c, H-4c, H-5c, H-6c, H-6'c, H-1 Cer , H-1' Cer , H-2 Cer , H-3 Cer , 3 $NCH_2^{ATTO594}$, 2 $CH_2SO_3^{ATTO594}$), 2.84 (br dd, 1 H,

H-3_{eq}-b), 2.73/2.65 (s, 3 H, NMe^{ATTO594}), 2.17-1.56 (m, 24 H, Ac, H-3_{ax}-b, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}, NHCOCH₂^{Cer}, NHCOCH₂CH₂^{Cer}, NCH₂CH₂CH₂^{ATTO594}, 4 Me^{ATTO594}), 1.48-1.28 (m, 58 H, 25 CH₂^{Cer}, NCH₂CH₂^{ATTO594}, 2 NCH₂CH₃^{ATTO594}), 0.91-0.89 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ¹³C NMR (200 MHz, CD₃OD) δ 175.9, 171.2, 159.2, 154.9, 154.2, 154.1, 138.5, 138.4, 137.5, 135.1, 132.1, 131.7, 131.4, 131.2, 130.7, 128.9, 126.2, 126.0, 124.2, 124.1, 122.9, 122.8, 115.0, 115.0, 104.9, 104.6, 97.1, 97.1, 80.3, 77.5, 76.5, 76.0, 76.0, 75.0, 74.9, 74.3, 73.0, 72.8, 70.7, 70.0, 70.0, 69.3, 64.5, 64.4, 64.3, 61.8, 61.7, 61.6, 55.8, 55.1, 54.7, 54.0, 53.9, 47.9, 47.8, 43.8, 41.9, 41.4, 38.8, 37.4, 33.6, 33.5, 33.1, 33.1, 30.9, 30.9, 30.9, 30.9, 30.8, 30.8, 30.8, 30.7, 30.6, 30.5, 30.5, 29.5, 29.5, 29.3, 29.3, 27.2, 23.8, 23.5, 22.6, 18.7, 17.4, 17.3, 14.5, 13.8, 13.7, 9.2; HRMS (ESI) *m/z* found [M-2H]²⁻ 982.5028, C₁₀₀H₁₅₆N₆O₂₉S₂ calcd for [M-2H]²⁻ 982.5028.

Neu9 位標識 GM3 プローブ

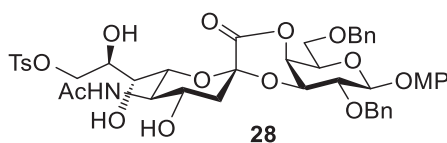


4-Methoxyphenyl (5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-α-D-galacto-2-nonulopyranosylono-1',4-lactone)-(2→3)-2,6-di-O-benzyl-β-D-galactopyranoside (27)

Ar 雰囲気下にて化合物 **25** (123 mg, 130 μmol) を MeOH(4.3 mL) に溶解し、28 w% NaOMe 触媒量を加えて 40 °C にて 1 時間攪拌した。TLC (CHCl₃/MeOH = 10:1 二回展開) にて、反応の収束を確認後、Muromac C101 を加えて溶液を中和した。Muromac C101 を濾別して得られた溶液を減圧濃縮し、10 時間真空乾燥した。

Ar 雰囲気下、残渣を CH₂Cl₂ (4.3 mL)に溶かし、MS4Å (250 mg)を加え、室温で 30 分撹拌した。そこへ DBU (19.4 μL, 130 μmol)を 0 °C で加え、さらに 0 °C で 30 分撹拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 10:1 二回展開)で確認後、AcOH を加えて反応を停止した。反応溶液をセライトろ過した後、ろ液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/acetone = 1:1)で単離精製し、化合物 **27** (91 mg, 95%, 2 steps)を無色シロップとして得た。

[α]_D +3.6° (*c* 0.2, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.38-6.79 (m, 14 H, 3 Ar), 5.37 (d, 1 H, *J*_{3,4} = 4.6 Hz, H-4a), 4.96-4.81 (m, 3 H, H-1a, CH₂Ph), 4.60 (2 d, 2 H, CH₂Ph), 4.34 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 9.7 Hz, H-3a), 4.31 (td, 1 H, *J*_{3eq,4} = 5.1 Hz, *J*_{3ax,4} = *J*_{4,5} = 10.3 Hz, H-4b), 4.09 (m, 1 H, H-5a), 3.87 (dd, 1 H, *J*_{5,6} = 5.2 Hz, *J*_{gem} = 10.9 Hz, H-6a), 3.80 (dd, 1 H, *J*_{5,6'} = 10.3 Hz, H-6'a), 3.73-3.30 (m, 10 H, H-2a, H-5b, H-6b, H-7b, H-8b, H-9b, H-9'b, MeO), 2.34 (dd, 1 H, *J*_{gem} = 12.6 Hz, H-3eq-b), 2.01 (s, 3 H, Ac), 1.69 (dd, 1 H, H-3ax-b); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 175.6, 166.9, 156.9, 152.6, 139.4, 139.3, 129.4, 129.3, 129.0, 128.9, 119.4, 115.6, 102.9, 97.1, 79.2, 75.7, 75.1, 74.7, 74.5, 73.6, 72.8, 71.8, 69.4, 69.2, 68.7, 65.0, 56.1, 53.9, 41.9, 22.6; HRMS (ESI) *m/z* found [M+Na]⁺ 762.2739, C₃₈H₄₅NO₁₄ calcd for [M+Na]⁺ 762.2738.

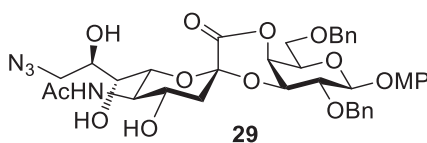


4-Methoxyphenyl (5-acetamido-3,5-dideoxy-9-*O*-*p*-toluenesulfonyl-D-glycero-α-D-galacto-2-nonulopyranosylono-1',4-lactone)-(2→3)-2,6-di-*O*-benzyl-β-D-galactopyranoside (28**)**

Ar 雰囲気下にて、化合物 **27** (1.03 g, 1.30 mmol)を CH₂Cl₂/Pyr (7.0 mL/7.0 mL)の混合溶媒に溶解し、0 °C に冷却後、TsCl (1.47 g, 7.71 mmol)を 5 度に分けて加え、0 °C にて 4.5 時間撹拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 10:1)にて確認後、MeOH を加えて過剰の試薬

を分解した。toluene 共沸後、残渣を CHCl_3 に希釈し、有機層を 2 M HCl、 H_2O 、satd Na_2CO_3 、brine の順で洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 40:1$)にて化合物 **28** (833 mg, 67%)を得た。

$[\alpha]_{\text{D}} -1.9^\circ$ (c 0.2, MeOH); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.70-6.77 (m, 18 H, 4 Ar), 6.63 (d, 1 H, $J_{5,\text{NH}} = 8.1$ Hz, NH), 5.27 (d, 1 H, $J_{3,4} = 4.0$ Hz, H-4a), 4.86-4.61 (m, 5 H, H-1a, 2 CH_2Ph), 4.30 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 9.8$ Hz, H-3a), 4.28 (m, 1 H, H-4b), 4.16 (br dd, 1 H, H-6a), 4.01 (dd, 1 H, $J_{5,6'} = 6.3$ Hz, $J_{\text{gem}} = 10.3$ Hz, H-6'a), 3.89-3.75 (m, 7 H, H-5a, H-5b, H-9b, H-9'b, MeO), 3.59 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, H-2a), 3.54-3.43 (m, 3 H, H-6b, H-7b, H-8b), 2.45 (dd, 1 H, $J_{\text{gem}} = 13.1$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 5.1$ Hz, H-3eq-b), 2.38 (s, 3 H, CH_3Ar), 2.00 (s, 3 H, Ac), 1.88 (dd, 1 H, $J_{3\text{ax},4} = 11.7$ Hz, H-3ax-b); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 175.6, 166.7, 157.0, 152.6, 146.6, 139.4, 139.1, 136.2, 134.1, 131.1, 130.4, 130.2, 129.5, 129.4, 129.3, 129.1, 128.9, 128.9, 119.4, 115.6, 102.9, 97.1, 79.1, 75.7, 75.1, 74.5, 74.4, 74.3, 73.8, 73.5, 72.5, 69.6, 69.1, 68.8, 68.5, 56.1, 53.8, 41.8, 22.6, 21.6; HRMS (ESI) m/z found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 916.2827, $\text{C}_{45}\text{H}_{51}\text{NO}_{16}\text{S}$ calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 916.2826.

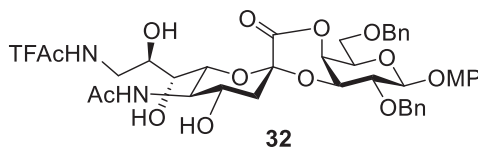


4-Methoxyphenyl (5-acetamido-9-azido-3,5,9-trideoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylono-1',4-lactone)-(2 $\rightarrow$ 3)-2,6-di-O-benzyl- β -D-galactopyranoside (29)

化合物 **28** (820 mg, 917 μmol)と NaN_3 (476 mg, 7.34 mmol)及び 18-crown-6 (143 mg, 541 μmol)を DMF (9.2 mL)に溶解し、Drierite (1.3 g)を加え、80 $^\circ\text{C}$ にて 5 時間攪拌した。反応終了を TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 10:1$)にて確認後、固形物をセライトにて濾別し toluene 共沸した。得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒

(CHCl₃/MeOH = 40:1)にて化合物 **29** (692 mg, 99%)を得た。

[α]_D +14.8° (*c* 0.2, MeOH); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 1:1) δ 7.38-6.80 (m, 14 H, 3 Ar), 5.31 (d, 1 H, *J*_{3,4} = 4.1 Hz, H-4a), 4.93-4.59 (m, 5 H, H-1a, 2 CH₂Ph), 4.35-4.29 (m, 2 H, H-3a, H-4b), 4.03 (m, 1 H, H-5a), 3.92 (dd, 1 H, *J*_{5,6} = 6.1 Hz, *J*_{gem} = 10.3 Hz, H-6a), 3.81-3.69 (m, 6 H, H-6'a, H-5b, H-8b, MeO), 3.58 (dd, 1 H, *J*_{1,2} = 8.3 Hz, *J*_{2,3} = 8.6 Hz, H-2a), 3.47-3.44 (m, 2 H, H-6b, H-7b), 3.35-3.25 (m, 2 H, H-9b, H-9'b), 2.37 (dd, 1 H, *J*_{gem} = 13.0 Hz, *J*_{3eq,4} = 5.5 Hz, H-3eq-b), 2.04 (s, 3 H, Ac), 1.75 (dd, 1 H, *J*_{3ax,4} = 11.7 Hz, H-3ax-b); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 1:1) δ 173.8, 164.8, 154.9, 150.5, 137.1, 136.8, 127.7, 127.5, 127.4, 127.2, 127.0, 117.6, 113.7, 101.0, 95.1, 77.2, 77.1, 77.0, 76.8, 73.9, 73.1, 72.9, 72.5, 71.2, 70.3, 68.6, 67.8, 66.9, 66.5, 54.4, 53.8, 51.9, 48.2, 47.8, 47.7, 47.5, 47.4, 47.2, 47.1, 46.9, 39.7, 20.9; HRMS (ESI) *m/z* found [M+Na]⁺ 787.2809, C₃₈H₄₄N₄O₁₃ calcd for [M+Na]⁺ 787.2803.

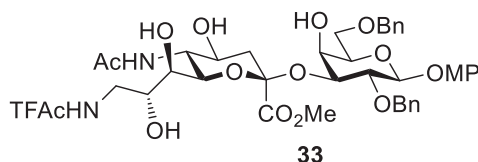


4-Methoxyphenyl (5-acetamido-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylono-1',4-lactone)-(2 $\rightarrow$ 3)-2,6-di-O-benzyl- β -D-galactopyranoside (32**)**

Ar 雰囲気下、化合物 **29** (9.4 mg, 12 μ mol)を MeOH (1.2 mL)に溶解し、TEA (6.9 μ L, 49 μ mol)、TFAcOMe (12 μ L, 0.12 mmol)を加えて 5 分間室温にて攪拌した後、DPPE (29 mg, 74 μ mol)を加え、60 °C にて 2 時間激しく攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 8:1)にて確認後、反応液を減圧濃縮した。残渣を CHCl₃に希釈し、有機層を 2 M HCl、H₂O、satd Na₂CO₃、brine の順で洗浄した後、Na₂SO₄で乾燥した。これを濾別して減圧濃縮し、2 時間真空乾燥した。得られたシラップを Ar 雰囲気下 CH₂Cl₂ (1.2 mL)に溶解し、0 °C に冷却した後、DBU (1.8 μ L, 12 μ mol)を加えて 30 分攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH =

8:1)にて確認後、Muromac C101 を加えて溶液を中和した。Muromac C101 を濾別して得られた溶液を減圧濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (CHCl₃/MeOH = 35:1)にて化合物 **32** (8.7 mg, 85%)を得た。

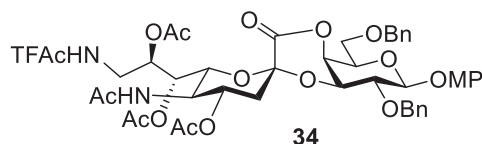
[α]_D -21.4° (c 0.2, CHCl₃); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.37-6.78 (m, 15 H, 3 Ar, NH-9b), 6.58 (d, 1 H, $J_{5,NH}$ = 9.7 Hz, NH-5b), 5.26-5.24 (m, 2 H, H-4a, H-7b), 4.85-4.75 (m, 3 H, H-1a, CH₂Ph), 4.56-4.51 (m, 2 H, CH₂Ph), 4.33-4.29 (m, 2 H, H-3a, H-4b), 3.91 (m, 1 H, H-5a), 3.81-3.62 (m, 7 H, H-6a, H-6'a, H-5b, H-8b, MeO), 3.58 (t, 1 H, $J_{1,2}$ = 8.2 Hz, $J_{2,3}$ = 8.2 Hz, H-2a), 3.51 (m, 1 H, H-9b), 3.38 (dd, 1 H, H-6b), 3.31-3.16 (m, 3 H, OH-4b, OH-7b, OH-8b), 2.92 (m, 1 H, H-9'b), 2.41 (dd, 1 H, H-3eq-b), 2.04 (s, 3 H, Ac) , 1.85 (t, 1 H, H-3ax-b); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 174.2, 165.7, 155.7, 150.9, 137.7, 136.6, 128.8, 128.6, 128.4, 128.3, 127.9, 118.8, 114.6, 102.1, 96.0, 77.7, 74.9, 74.2, 73.9, 73.3, 71.4, 70.3, 70.2, 68.1, 67.9, 67.0, 55.6, 52.9, 44.2, 40.4, 29.7, 22.9; HRMS (ESI) m/z : found [M+Na]⁺ 857.2722, C₄₀H₄₅F₃N₂O₁₄ calcd for [M+Na]⁺ 857.2721.



4-Methoxyphenyl (methyl 5-acetamido-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylate)-(2 $\rightarrow$ 3)-2,6-di-O-benzyl- β -D-galactopyranoside (33)

水素雰囲気下、化合物 **29** (30.0 mg, 39.2 μ mol)を MeOH (2.0 mL)に溶解し、TEA (54.6 μ L, 0.392 mmol)、TFAcOMe (19.7 μ L, 0.196 mmol)、Lindlar catalyst (5% Pd/CaCO₃ poisoned with Pb) (15.0 mg)を加えて 1.5 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 20:1)にて確認後、反応溶液をセライトろ過し、ろ液を減圧濃縮した。得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (CHCl₃/MeOH = 30:1)にて化合物 **33** (34.0 mg, 82%)を得た。

$[\alpha]_D -19.0^\circ$ (c 0.2, CHCl_3); ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.36-6.76 (m, 15 H, 3 Ar, NH-9b), 6.48 (d, 1 H, $J_{5,\text{NH}} = 8.3$ Hz, NH-5b), 4.87-4.85 (m, 2 H, H-1a, CH_2Ph), 4.77-4.73 (m, 2 H, OH-7b, CH_2Ph), 4.52 (2 d, 2 H, CH_2Ph), 4.12 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 9.6$ Hz, $J_{3,4} = 3.4$ Hz, H-3a), 3.91-3.72 (m, 15 H, H-2a, H-4a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-5b, H-6b, H-8b, OH-8b, MeO, COOMe), 3.62 (m, 1 H, H-4b), 3.56 (m, 1 H, H-9b), 3.48-3.42 (m, 3 H, H-6b, H-9'b, OH-4b), 3.33 (m, 1 H, H-7b), 3.07 (s, 1 H, OH-4a), 2.66 (dd, 1 H, $J_{\text{gem}} = 12.4$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 4.1$ Hz, H-3eq-b), 2.00 (dd, 1 H, $J_{3\text{ax},4} = 11.7$ Hz, H-3ax-b), 1.92 (s, 3 H, Ac); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 173.8, 169.6, 158.2, 157.9, 157.6, 157.3, 155.3, 151.3, 138.2, 137.9, 128.4, 128.3, 128.2, 127.8, 127.7, 127.6, 118.3, 117.0, 114.7, 114.5, 102.7, 99.5, 75.7, 75.1, 74.0, 73.6, 73.2, 70.5, 69.4, 69.1, 67.7, 55.6, 53.5, 52.6, 43.2, 38.5, 31.9, 30.0, 29.7, 22.8; HRMS (ESI) m/z found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 889.2985, $\text{C}_{41}\text{H}_{49}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_{15}$ calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 889.2983.

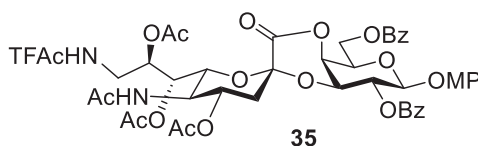


4-Methoxyphenyl (5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylono-1',4-lactone)-(2 $\rightarrow$ 3)-2,6-di-*O*-benzyl- β -D-galactopyranoside (34)

Ar 雰囲気下にて、化合物 **32** (152 mg, 182 μmol)を Pyr (1.8 mL)に溶解し、0 $^\circ\text{C}$ に冷却後無水酢酸 (280 μL , 2.98 mmol)、DMAP (2.0 mg, 16 μmol)を加え、室温にて1時間攪拌した。反応終了を TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20:1$ 二回展開)にて確認後、MeOH を加えて過剰の試薬を分解した。toluene 共沸後、残渣を CHCl_3 に希釈し、有機層を 2 M HCl、 H_2O 、satd Na_2CO_3 、brine の順で洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 80:1$)にて

化合物 **34** (170 mg, 97 %)を得た。

$[\alpha]_D -9.4^\circ$ (c 0.03, CHCl_3); ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.39-6.77 (m, 15 H, 3 Ar, NH-9b), 5.54 (d, 1 H, $J_{5,\text{NH}} = 10.3$ Hz, NH-5b), 5.47 (dd, 1 H, H-4b), 4.97 (m, 2 H, H-7b, H-8b), 4.95-4.77 (m, 4 H, H-1a, H-4b, CH_2Ph), 4.62-4.55 (m, 2 H, CH_2Ph), 4.23-4.17 (m, 3 H, H-3a, H-5a, H-9b), 4.01 (dd, 1 H, H-6a), 3.90 (m, 1 H, H-5a), 3.78-3.74 (s, 4 H, H-6'a, MeO), 3.61 (dd, 1 H, H-6b), 3.58 (t, 1 H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 8.3$ Hz, H-2a), 2.80 (m, 1 H, H-9'b), 2.25-1.91 (m, 13 H, 4 Ac, H-3eq-b), 1.85 (t, 1 H, $J_{3ax,4} = J_{\text{gem}} = 11.7$ Hz, H-3ax-b); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 172.6, 171.0, 170.1, 163.5, 158.1, 155.5, 151.1, 138.0, 137.6, 128.4, 128.4, 128.4, 127.9, 127.7, 127.6, 118.5, 114.6, 102.0, 95.0, 77.5, 74.9, 73.7, 73.3, 72.9, 72.7, 72.2, 69.3, 68.2, 67.2, 55.6, 49.4, 38.2, 37.8, 23.0, 21.0, 20.9, 20.4; HRMS (ESI) m/z : found $[\text{M}+\text{Na}]^+ 983.3038$, $\text{C}_{46}\text{H}_{51}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_{17}$ calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+ 983.3038$.



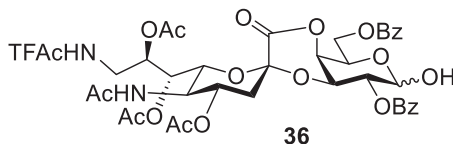
4-Methoxyphenyl (5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylono-1',4-lactone)-(2 $\rightarrow$ 3)-2,6-di-*O*-benzoyl- β -D-galactopyranoside (35)

化合物 **34** (164 mg, 170 μmol)を 1,4-dioxane (6.8 mL)に溶解し、 $\text{Pd}(\text{OH})_2\text{-C}$ (819 mg)を加え、水素気流下室温にて 3 時間攪拌した。反応終了を TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20:1$)にて確認後、固形物をセライトにて濾別して減圧濃縮した後、2 時間真空乾燥した。

得られたシラップを Ar 雰囲気下 Pyr (1.7 mL)に溶解し、0 $^\circ\text{C}$ に冷却後安息香酸無水物 (322 mg, 1.42 mmol)、DMAP (2.0 mg, 16 μmol)を加え、室温にて 32 時間攪拌した。反応終了を TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20:1$)にて確認後、MeOH を加えて過剰の試薬を分解した。toluene 共沸後、残渣を CHCl_3 に希釈し、有機層を 2 M HCl、 H_2O 、satd Na_2CO_3 、brine の順で洗浄

した後、Na₂SO₄で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (CHCl₃/MeOH = 80:1)にて化合物 **35** (151 mg, 90%, 2 steps)を得た。

[α]_D +12.1° (c 0.1, CHCl₃); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.07-7.45 (m, 10 H, 2 Ar), 7.33 (m, 1 H, NH-9b), 6.87-6.53 (m, 4 H, Ar), 5.66 (d, 1 H, $J_{5,NH}$ = 10.4 Hz, NH-5b), 5.59 (m, 1 H, H-4b), 5.51 (t, 1 H, $J_{1,2}$ = $J_{2,3}$ = 8.4 Hz, H-2a), 5.14 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ = 3.5 Hz, H-4b), 5.11 (m, 1 H, H-8b), 5.05 (dd, 1 H, $J_{7,8}$ = 9.6 Hz, H-7b), 5.00-4.98 (m, 2 H, H-1a, H-5a), 4.67 (dd, 1 H, H-6a), 4.43 (dd, 1 H, H-3a), 4.25-4.16 (m, 3 H, H-6'a, H-5b, H-9b), 3.71-3.66 (m, 4 H, H-6b, MeO), 2.81 (m, 1 H, H-9'b), 2.62 (dd, 1 H, $J_{3eq,4}$ = 5.5 Hz, J_{gem} = 13.7 Hz, H-3eq-b), 2.23-1.93 (4 s, 12 H, 4 Ac), 1.85 (t, 1 H, $J_{3ax,4}$ = 11.7 Hz, H-3ax-b); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 172.7, 171.1, 170.7, 166.2, 165.2, 162.8, 155.7, 150.9, 133.5, 133.2, 129.8, 129.8, 129.2, 128.5, 128.4, 118.9, 114.3, 100.0, 95.3, 72.6, 72.3, 72.1, 71.4, 70.3, 69.0, 67.9, 67.2, 62.7, 55.5, 49.6, 37.9, 23.1, 21.1, 20.9, 20.5; HRMS (ESI) m/z : found [M+Na]⁺ 1011.2626, C₄₆H₄₇F₃N₂O₁₉ calcd for [M+Na]⁺ 1011.2623.

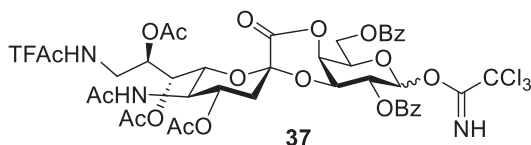


(5-Acetamido-4,7,8-tri-O-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylono-1',4-lactone)-(2 $\rightarrow$ 3)-2,6-di-O-benzoyl- β -D-galactopyranose (36**)**

Ar 雰囲気下にて、化合物 **35** (89.7 mg, 90.7 μ mol)を MeCN/toluene/H₂O (0.78 mL/0.65 mL/0.39 mL)に溶解し、0 °C に冷却後、CAN (497 mg, 907 μ mol)を加え、0 °C にて 2 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 15:1)にて確認後、反応液を AcOEt に希釈し、有機層を H₂O、satd NaHCO₃、brine の順で洗浄した後、Na₂SO₄で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒

(CHCl₃/MeOH = 120:1)にて化合物 **36** (62.2 mg, 78%)を得た。

[α]_D +60.6° (*c* 0.3, CHCl₃); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 172.7, 171.4, 171.2, 170.8, 170.4, 166.4, 166.2, 165.9, 163.2, 162.9, 158.1, 157.9, 133.5, 133.1, 130.1, 130.0, 129.9, 129.8, 129.7, 129.6, 129.1, 128.9, 128.7, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 116.7, 114.8, 95.4, 95.1, 90.7, 76.8, 74.2, 73.5, 72.2, 72.0, 71.8, 71.6, 69.6, 69.3, 69.1, 68.3, 67.8, 67.7, 67.1, 66.8, 66.4, 66.3, 63.4, 51.9, 49.5, 49.3, 38.0, 37.9, 37.8, 31.7, 30.9, 29.2, 22.9, 21.0, 20.9, 20.8, 20.5; HRMS (ESI) *m/z*: found [M+Na]⁺ 905.2201, C₃₉H₄₁F₃N₂O₁₈ calcd for [M+Na]⁺ 905.2204.

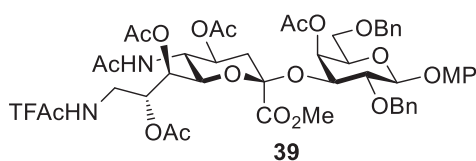


(5-Acetamido-4,7,8-tri-O-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylono-1',4-lactone)-(2→3)-2,6-di-O-benzoyl-D-galactopyranosyl trichloroacetimidate (37)

Ar 雰囲気下にて化合物 **36** (60.1 mg, 68.1 μ mol)を CH₂Cl₂ (1.4 mL)に溶解し、0 °C に冷却した後、CCl₃CN (137 μ L, 1.36 mmol)、DBU (2.0 μ L, 13.6 μ mol)を加え、0 °C にて 1 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 20:1 二回展開)にて確認後、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (CHCl₃/MeOH = 90:1)にて化合物 **37** (63.4 mg, 91%)を得た。

[α]_D +54.5° (*c* 0.2, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.61 (s, 1 H, C=NH), 8.03-7.27 (m, 11 H, 2 Ar, NH-9b), 6.60 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 3.6 Hz, H-1a), 5.74 (d, 1 H, *J*_{5,NH} = 9.6 Hz, NH-5b), 5.63-5.52 (m, 2 H, H-2a, H-4a), 5.29 (dd, 1 H, H-4a), 5.14 (m, 1 H, H-8b), 5.03- 4.97 (m, 2 H, H-5a, H-7b), 4.84 (dd, 1H, *J*_{2,3} = 10.5 Hz, *J*_{3,4} = 3.7 Hz, H-3a), 4.71-4.59 (m, 2 H, H-6a, H-6'a), 4.23-4.15 (m, 2 H, H-5b, H-9b), 3.67 (dd, 1 H, H-6b), 2.82 (m, 1 H, H-9'b), 2.56 (dd, 1 H, *J*_{3eq,4} = 5.5 Hz, *J*_{gem} =

13.7 Hz, H-3_{eq}-b), 2.24-1.81 (m, 13 H, 4 Ac, H-3_{ax}-b); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.6, 171.1, 170.6, 170.6, 166.2, 165.3, 163.0, 160.1, 133.7, 133.1, 129.9, 129.7, 128.7, 128.5, 128.3, 95.1, 93.3, 90.6, 73.2, 72.2, 69.2, 69.1, 68.6, 67.8, 67.7, 67.1, 63.1, 49.5, 38.0, 37.9, 29.7, 23.0, 21.0, 20.9, 20.5; HRMS (ESI) *m/z*: found [M+Na]⁺ 1048.1300, C₄₁H₄₁Cl₃F₃N₃O₁₈ calcd for [M+Na]⁺ 1048.1300.

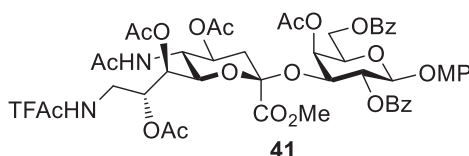


4-Methoxyphenyl (methyl 5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-*D*-glycero- α -*D*-galacto-2-nonulopyranosylate)-(2→3)-4-*O*-acetyl-2,6-di-*O*-benzyl- β -*D*-galactopyranoside (39)

Ar 雰囲気下にて化合物 **33** (323 mg, 373 μ mol)を Pyr (3.7 mL)に溶解し、0 °C に冷却後無水酢酸 (280 μ L, 2.98 mmol)、DMAP (4.6 mg, 37 μ mol)を加え、室温にて 20 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 30:1 二回展開)にて確認後、MeOH を加えて過剰の試薬を分解した。toluene 共沸後、残渣を CHCl₃ に希釈し、有機層を 2 M HCl、H₂O、satd Na₂CO₃、brine の順で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (CHCl₃/MeOH = 80:1)にて化合物 **39** (377 mg, 98%)を得た。

[α]_D +1.2° (*c* 0.2, CHCl₃); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.43-7.24 (m, 10 H, 2 Ar), 7.16 (m, 1 H, NH-9b), 7.01-6.78 (m, 4 H, Ar), 5.39 (m, 1 H, H-8b), 5.21 (d, 1 H, *J*_{5,NH} = 10.3 Hz, NH-5b), 5.09 (d, 1 H, *J*_{3,4} = 3.4 Hz, H-4a), 5.08 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 7.6 Hz, H-1a), 4.99 (dd, 1 H, *J*_{6,7} = 2.1 Hz, *J*_{7,8} = 9.0 Hz, H-7b), 4.95-4.87 (m, 3 H, H-4b, CH₂Ph), 4.54-4.44 (m, 3 H, H-3a, CH₂Ph), 4.22 (q, 1 H, *J*_{4,5} = *J*_{5,6} = 10.3 Hz, H-5b), 4.01 (m, 1 H, H-9b), 3.93 (t, 1 H, *J*_{5,6} = *J*_{5,6'} = 6.2 Hz, H-5a), 3.84 (s, 3 H,

COOMe), 3.76 (s, 3 H, MeO), 3.74 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 9.7$ Hz, H-2a), 3.65 (dd, 1 H, H-6b), 3.55 (dd, 1 H, $J_{\text{gem}} = 10.3$ Hz, H-6a), 3.51 (dd, 1 H, H-6'a), 2.75 (m, 1 H, H-9'b), 2.61 (dd, 1 H, $J_{3eq,4} = 4.8$ Hz, $J_{\text{gem}} = 13.0$ Hz, H-3eq-b), 2.08-1.87 (m, 16 H, 5 Ac, H-3ax-b); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 172.2, 170.9, 170.3, 170.2, 170.2, 167.8, 158.1, 157.8, 157.5, 157.2, 155.1, 151.5, 139.3, 137.9, 128.3, 128.1, 127.6, 127.6, 127.2, 127.1, 118.0, 117.0, 114.7, 114.5, 102.2, 97.3, 78.2, 74.8, 73.4, 73.3, 72.1, 69.3, 68.7, 68.3, 68.0, 67.7, 55.6, 53.1, 49.1, 38.6, 37.3, 29.6, 23.0, 21.0, 20.7, 20.7; HRMS (ESI) m/z found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1057.3403, $\text{C}_{49}\text{H}_{57}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_{19}$ calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1057.3405.

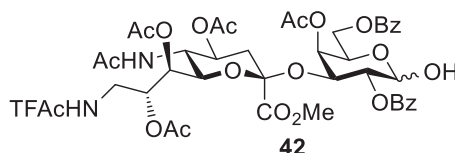


4-Methoxyphenyl (methyl 5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-*D*-glycero- α -*D*-galacto-2-nonulopyranosylonate)-(2 $\rightarrow$ 3)-4-*O*-acetyl-2,6-di-*O*-benzoyl- β -*D*-galactopyranoside (41)

化合物 **39** (368 mg, 356 μmol)を 1,4-dioxane (7.1 mL)に溶解し、 $\text{Pd}(\text{OH})_2\text{-C}$ (368 mg)を加え、水素気流下室温にて 1.5 時間攪拌した。反応終了を TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20:1$)にて確認後、固形物をセライトにて濾別して減圧濃縮した後、2 時間真空乾燥した。

得られたシラップを Ar 雰囲気下 Pyr (3.6 mL)に溶解し、0 $^{\circ}\text{C}$ に冷却後安息香酸無水物 (322 mg, 1.42 mmol)、DMAP (4.4 mg, 35 μmol)を加え、室温にて 44 時間攪拌した。反応終了を TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20:1$)にて確認後、MeOH を加えて過剰の試薬を分解した。toluene 共沸後、残渣を CHCl_3 に希釈し、有機層を 2 M HCl、 H_2O 、satd Na_2CO_3 、brine の順で洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 90:1$)にて化合物 **41** (344 mg, 91%, 2 steps)を得た。

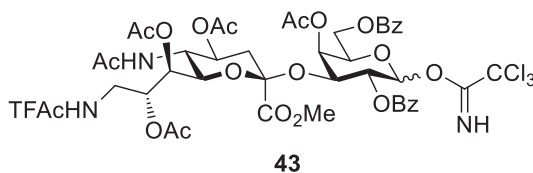
$[\alpha]_D +1.2^\circ$ (c 0.2, CHCl_3); ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.11-7.43 (m, 10 H, 2 Ar), 7.16 (m, 1 H, NH-9b), 6.92-6.66 (m, 4 H, Ar), 5.53 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 7.5$ Hz, $J_{2,3} = 9.6$ Hz, H-2a), 5.39 (m, 1 H, H-8b), 5.25 (d, 1 H, H-1a), 5.17 (d, 1 H, $J_{5,\text{NH}} = 10.3$ Hz, NH-5b), 5.15 (d, 1 H, $J_{3,4} = 3.5$ Hz, H-4a), 4.86 (dd, 1 H, $J_{6,7} = 2.7$ Hz, $J_{7,8} = 10.3$ Hz, H-7b), 4.82 (td, 1 H, $J_{3eq,4} = 4.1$ Hz, $J_{3ax,4} = J_{4,5} = 10.3$ Hz, H-4b), 4.78 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 3.4$ Hz, H-3a), 4.47 (dd, 1 H, $J_{5,6} = 7.6$ Hz, $J_{\text{gem}} = 11.0$ Hz, H-6a), 4.37 (dd, 1 H, $J_{5,6'} = 6.1$ Hz, H-6'a), 4.17-4.10 (m, 2 H, H-5a, H-9b), 3.99 (q, 1 H, $J_{5,6} = 10.3$ Hz, H-5b), 3.80 (s, 3 H, COOMe), 3.71 (s, 3 H, MeO), 3.50 (dd, 1 H, H-6b), 2.60-2.57 (m, 2 H, H-3eq-b, H-9'b), 2.20-1.54 (m, 16 H, 5 Ac, H-3ax-b); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 172.6, 170.9, 170.6, 170.3, 170.3, 167.9, 165.8, 165.1, 157.9, 157.7, 155.5, 151.2, 133.2, 133.1, 130.3, 130.0, 129.7, 129.6, 128.3, 118.6, 116.7, 114.8, 114.4, 100.9, 96.8, 71.6, 71.4, 71.1, 70.9, 69.2, 67.6, 67.0, 66.8, 62.1, 55.5, 53.1, 48.7, 38.3, 37.2, 29.6, 22.9, 21.1, 20.7, 20.4; HRMS (ESI) m/z found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1085.2985, $\text{C}_{49}\text{H}_{53}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_{21}$ calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1085.2985.



(Methyl 5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylonate)-(2 $\rightarrow$ 3)-4-*O*-acetyl-2,6-di-*O*-benzoyl-D-galactopyranose (42)

Ar 雰囲気下にて、化合物 **41** (220 mg, 207 μmol)を $\text{MeCN}/\text{toluene}/\text{H}_2\text{O}$ (1.8 mL/1.5 mL/0.9 mL)に溶解し、0 $^\circ\text{C}$ に冷却後、CAN (1.14 g, 2.07 mmol)を加え、0 $^\circ\text{C}$ にて 1.5 時間攪拌した。反応終了を TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20:1$)にて確認後、反応液を AcOEt に希釈し、有機層を H_2O 、satd NaHCO_3 、brine の順で洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 120:1$)にて化合物 **42** (175 mg, 88%)を得た。

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.18-7.42 (m, 20 H, 2 Ar^α , 2 Ar^β), 7.24 (m, 1 H, NH-9b^α), 7.19 (m, 1 H, NH-9b^β), 5.42-5.37 (m, 2 H, H-8b^α , H-8b^β), 5.30 (d, 1 H, $J_{5,\text{NH}} = 10.3$ Hz, NH-5b^α), 5.28-5.27 (m, 2 H, H-4a^α , H-4a^β), 5.24 (d, 1 H, $J_{5,\text{NH}} = 9.6$ Hz, NH-5b^β), 5.19-5.16 (m, 4 H, H-1a^α , H-2a^α , H-1a^β , H-2a^β), 5.03 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 9.7$ Hz, $J_{3,4} = 2.8$ Hz, H-3a^α), 4.98 (dd, 1 H, $J_{6,7} = 2.7$ Hz, $J_{7,8} = 10.3$ Hz, H-7b^β), 4.94 (dd, 1 H, $J_{6,7} = 3.5$ Hz, $J_{7,8} = 10.3$ Hz, H-7b^α), 4.88-4.82 (m, 2 H, H-4b^α , H-4b^β), 4.79 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 9.6$ Hz, $J_{3,4} = 2.7$ Hz, H-3a^β), 4.53 (m, 1 H, H-5a^β), 4.45-4.39 (m, 3 H, H-5a^α , H-6a^α , H-6a^β), 4.32-4.03 (m, 6 H, H-6'a^α , H-5b^α , H-9b^α , H-5b^β , H-6'a^β , H-9b^β), 3.76 (s, 3 H, COOMe^α), 3.75 (s, 3 H, COOMe^β), 3.59 (dd, 1 H, $J_{5,6} = 11.0$ Hz, H-6b^α), 3.55 (dd, 1 H, $J_{5,6} = 10.3$ Hz, H-6b^β), 2.84 (m, 1 H, H-9'b^α), 2.73 (m, 1 H, H-9'b^β), 2.56-2.52 (m, 2 H, H-3eq-b^α , H-3eq-b^β), 2.15-1.73 (m, 32 H, 10 Ac, H-3ax-b^α , H-3ax-b^β); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 172.5, 172.2, 171.2, 171.0, 170.6, 170.5, 170.5, 170.2, 170.2, 167.9, 167.8, 166.7, 165.9, 165.8, 165.8, 157.8, 133.4, 133.3, 133.2, 130.2, 130.0, 130.0, 129.7, 129.6, 128.5, 128.5, 128.3, 116.8, 114.9, 97.5, 97.0, 95.9, 91.7, 73.2, 72.3, 71.9, 71.0, 70.8, 69.8, 69.3, 69.0, 68.1, 68.0, 67.8, 67.5, 67.2, 67.1, 66.6, 62.2, 61.9, 53.1, 49.1, 49.0, 42.6, 38.6, 38.3, 37.3, 37.2, 29.7, 23.0, 21.1, 20.8, 20.8, 20.7, 20.7; HRMS (ESI) m/z : found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 979.2574, $\text{C}_{42}\text{H}_{47}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_{20}$ calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 979.2572.

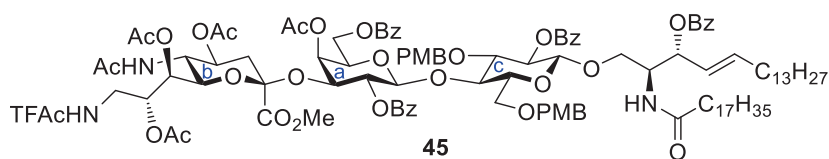


(Methyl 5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylonate)-(2 $\rightarrow$ 3)-4-*O*-acetyl-2,6-di-*O*-benzoyl-D-galactopyranosyl trichloroacetimidate (43)

Ar 雰囲気下にて化合物 **42** (93.2 mg, 97.4 μmol)を CH_2Cl_2 (2.0 mL)に溶解し、0 $^\circ\text{C}$ に冷却した後、 CCl_3CN (196 μL , 1.95 mmol)、DBU (2.9 μL , 20 μmol)を加え、0 $^\circ\text{C}$ にて 1.5 時間攪拌

した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 15:1)にて確認後、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (CHCl₃/MeOH = 90:1)にて化合物 **43** (105 mg, 98%)を得た。

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.60 (s, 1 H, C=NH), 8.18-7.41 (m, 10 H, 2 Ar), 7.26 (m, 1 H, NH-9b), 6.78 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 3.4 Hz, H-1a), 5.51-5.48 (m, 2 H, H-2a, H-4a), 5.43 (m, 1 H, H-8b), 5.34 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 10.3 Hz, *J*_{3,4} = 3.4 Hz, H-3a), 5.25 (d, 1 H, *J*_{5,NH} = 10.4 Hz, NH-5b), 5.06 (dd, 1 H, *J*_{6,7} = 2.0 Hz, *J*_{7,8} = 9.6 Hz, H-7b), 4.87 (m, 1 H, *J*_{3eq,4} = 4.8 Hz, *J*_{3ax,4} = 12.4 Hz, *J*_{4,5} = 10.4 Hz, H-4b), 4.71 (m, 1 H, H-5a), 4.45 (dd, 1 H, *J*_{5,6} = 6.9 Hz, *J*_{gem} = 11.0 Hz, H-6a), 4.26 (dd, 1 H, *J*_{5,6'} = 6.9 Hz, H-6'a), 4.21 (q, 1 H, *J*_{5,6} = 10.4 Hz, H-5b), 4.13 (m, 1 H, H-9b), 3.77 (s, 3 H, COOMe), 3.70 (dd, 1 H, H-6b), 2.86 (m, 1 H, H-9'b), 2.54 (dd, 1 H, *J*_{gem} = 12.4 Hz, H-3eq-b), 2.14-1.90 (5 s, 15 H, 5 Ac), 1.70 (t, 1 H, H-3ax-b); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 172.4, 171.0, 170.4, 169.9, 169.5, 167.8, 165.8, 160.6, 158.0, 157.7, 133.6, 133.1, 129.9, 129.7, 129.4, 128.6, 128.2, 117.0, 114.7, 96.8, 94.1, 90.9, 72.4, 69.7, 68.9, 68.5, 68.5, 67.5, 67.4, 66.9, 61.8, 53.2, 49.5, 38.6, 38.0, 29.6, 23.0, 21.0, 20.9, 20.7, 20.6; HRMS (ESI) *m/z* found [M+Na]⁺ 1122.1665, C₄₄H₄₇Cl₃F₃N₃O₂₀ calcd for [M+Na]⁺ 1122.1668.



(Methyl 5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylonate)-(2→3)-4-*O*-acetyl-2,6-di-*O*-benzoyl- β -D-galactopyranosyl-(1→4)-2-*O*-benzoyl-3,6-di-*O*-(4-methoxybenzyl)- β -D-glucopyranosyl-(1→1)-(2*S*,3*R*,4*E*)-3-*O*-benzoyl-2-octadecanamido-4-octadecene-1,3-diol (45**)**

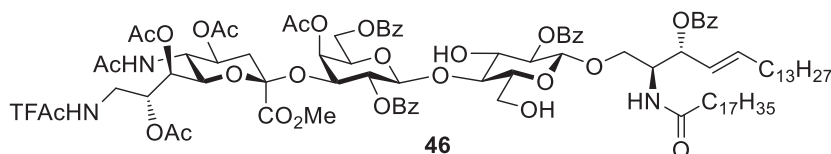
Ar 雰囲気下供与体 **43** (50.0 mg, 45.4 μ mol)及び受容体 **4** (80.1 mg, 68.1 μ mol)を CH₂Cl₂ (2.3

mL)に溶解し、MS AW-300 (130 mg)を加えた。室温にて1時間攪拌した後、0 °C に冷却し、TMSOTf (0.8 μ L, 5 μ mol)を加えて1時間攪拌した。反応終了を TLC (toluene/AcOEt/MeOH = 1:1:0.07 二回展開)にて確認後、セライト濾過にて濾別した。濾液を CHCl_3 に希釈し satd Na_2CO_3 、brine で洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 140:1$ to $90:1$)にて化合物 **45** (90.9 mg, 95%)を得た。

$[\alpha]_D +39.9^\circ$ (c 2.1, CHCl_3); ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.15-6.62 (m, 29 H, 6 Ar, NH-9b), 5.78 (dt, 1 H, $J_{4,5} = 15.1$ Hz, $J_{5,6} = J_{5,6'} = 6.9$ Hz, H-5^{Cer}), 5.70 (d, 1 H, $J_{2,\text{NH}} = 8.9$ Hz, NH^{Cer}), 5.47 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 7.5$ Hz, H-3^{Cer}), 5.41-5.38 (m, 2 H, H-8b, H-4^{Cer}), 5.32 (t, 1 H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 8.2$ Hz, H-2a), 5.14 (t, 1 H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 8.2$ Hz, H-2c), 5.09-5.07 (m, 2 H, H-1a, H-4a), 5.04 (d, 1 H, $J_{5,\text{NH}} = 10.3$ Hz, NH-5b), 4.86 (dd, 1 H, $J_{6,7} = 2.7$ Hz, $J_{7,8} = 10.3$ Hz, H-7b), 4.84-4.79 (m, 2 H, H-4b, CH_2Ph), 4.65 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 3.5$ Hz, H-3a), 4.60 (d, 1 H, $J_{\text{gem}} = 11.7$ Hz, CH_2Ph), 4.37-4.32 (m, 4 H, H-1c, H-2^{Cer}, CH_2Ph), 4.19 (dd, 1 H, $J_{5,6} = 7.5$ Hz, $J_{\text{gem}} = 11.0$ Hz, H-6a), 4.14-4.09 (m, 3 H, H-6'a, H-9b, H-4c), 4.03 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 3.4$ Hz, $J_{\text{gem}} = 9.6$ Hz, H-1^{Cer}), 3.98 (q, 1 H, $J_{4,5} = J_{5,6} = 10.3$ Hz, H-5b), 3.84 (t, 1 H, H-5a), 3.76-3.63 (m, 11 H, H-3c, H-6c, 2 OMe, COOMe), 3.56 (dd, 1 H, $J_{5,6'} = 4.8$ Hz, $J_{\text{gem}} = 11.0$ Hz, H-6'c), 3.48-3.44 (m, 2 H, H-6b, H-1'^{Cer}), 3.33 (m, 1 H, H-5c), 2.58 (br d, 1 H, H-9'b), 2.51 (dd, 1 H, $J_{\text{gem}} = 12.4$ Hz, $J_{3eq,4} = 4.1$ Hz, H-3eq-b), 2.10-1.58 (m, 22 H, 5 Ac, H-3ax-b, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}, $\text{NHCOCH}_2^{\text{Cer}}$, $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2^{\text{Cer}}$), 1.35-1.04 (m, 50 H, 25 CH_2^{Cer}), 0.89-0.84 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 172.6, 172.5, 170.8, 170.3, 170.2, 170.1, 167.7, 165.5, 165.1, 165.1, 164.9, 158.9, 158.8, 157.9, 157.6, 136.9, 133.2, 133.1, 133.1, 132.7, 130.4, 130.4, 130.3, 130.1, 130.0, 129.6, 129.6, 129.6, 129.2, 128.8, 128.4, 128.3, 128.2, 128.2, 124.7, 119.2, 116.9, 114.7, 113.5, 113.4, 100.8, 100.0, 97.0, 79.6, 77.6, 75.8, 75.2, 74.5, 73.7, 73.5, 72.7, 72.0, 71.7, 71.6, 70.5, 69.3, 68.3, 67.5, 67.1, 67.0, 66.7, 61.2, 55.1, 55.0, 52.9, 50.4, 48.7, 38.3, 37.2, 37.0, 36.3, 32.7, 32.2, 31.9, 30.0, 29.6, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.3, 29.2, 29.1, 28.9, 27.0, 25.4, 22.9,

22.6, 21.0, 20.7, 20.6, 20.5, 19.7, 14.0; HRMS (ESI) m/z found $[M+Na]^+$ 2137.0098,

$C_{114}H_{150}F_3N_3O_{31}$ calcd for $[M+Na]^+$ 2137.0098.

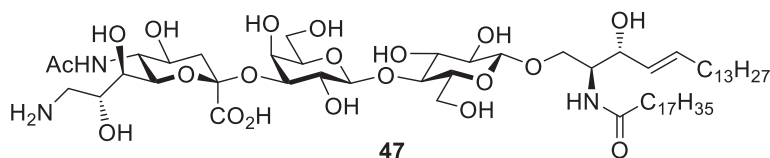


(Methyl 5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido- α -D-galacto-2-nonulopyranosylonate)-(2 $\rightarrow$ 3)-4-*O*-acetyl-2,6-di-*O*-benzoyl- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-*O*-benzoyl- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 1)-(2*S*,3*R*,4*E*)-3-*O*-benzoyl-2-octadecanamido-4-octadecene-1,3-diol (46)

Ar 雰囲気下にて、化合物 **45** (67.9 mg, 32.1 μ mol)を CH_2Cl_2 (2.0 mL)に溶かし、0 $^{\circ}C$ にて TFAcOH (1.0 mL)を加え、1.5 時間攪拌した。反応終了を TLC ($CHCl_3/MeOH = 20:1$ 二回展開)にて確認後、satd $NaHCO_3$ を加えて反応を停止した。これを $CHCl_3$ で希釈し、 H_2O 、brine で洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 ($CHCl_3/MeOH = 65:1$)にて化合物 **46** (59.3 mg, 99%)を得た。

$[\alpha]_D +53.0^{\circ}$ (c 0.7, $CHCl_3$); 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.36-7.27 (m, 21 H, 4 Ar, NH-9b), 5.88 (dt, 1 H, $J_{4,5} = 15.1$ Hz, $J_{5,6} = J_{5,6'} = 6.9$ Hz, H-5^{Cer}), 5.74 (d, 1 H, $J_{2,NH} = 9.6$ Hz, NH^{Cer}), 5.57 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.2$ Hz, H-3^{Cer}), 5.48 (m, 1 H, H-8b), 5.42 (dd, 1 H, H-4^{Cer}), 5.34 (t, 1 H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 8.2$ Hz, H-2a), 5.15 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.3$ Hz, H-2c), 5.10-5.08 (m, 2 H, NH-5b, H-4a), 5.00 (d, 1 H, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, H-1a), 4.96 (dd, 1 H, $J_{6,7} = 2.8$ Hz, $J_{7,8} = 9.7$ Hz, H-7b), 4.80 (m, 1 H, $J_{3eq,4} = 4.1$ Hz, $J_{3ax,4} = 12.4$ Hz, $J_{4,5} = 11.0$ Hz, H-4b), 4.76 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 2.7$ Hz, H-3a), 4.52 (br dd, 1 H, H-6a), 4.42 (d, 1 H, H-1c), 4.40 (m, 1 H, H-2^{Cer}), 4.18-4.12 (m, 2 H, H-5a, H-6'a), 4.05 (m, 1 H, H-9b), 3.96 (q, 1 H, $J_{5,6} = J_{5,NH} = 11.0$ Hz, H-5b), 3.90-3.85 (m, 3 H, H-3c, H-4c, H-1^{Cer}), 3.79 (s, 3 H,

COOMe), 3.53-3.52 (m, 2 H, H-6b, H-1'^{Cer}), 3.25 (m, 1 H, H-6c), 3.11 (m, 1 H, H-5c), 2.99-2.94 (m, 2 H, H-6'c, H-9'b), 2.76 (br dd, 1 H, OH-6c), 2.52 (dd, 1 H, $J_{\text{gem}} = 12.4$ Hz, H-3^{eq}-b), 2.15-1.82 (m, 16 H, 4 Ac, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}, NHCOCH₂^{Cer}), 1.72 (t, 1 H, H-3^{ax}-b), 1.64 (s, 3 H, Ac), 1.46-1.17 (m, 52 H, NHCOCH₂CH₂^{Cer}, 25 CH₂^{Cer}), 0.89-0.84 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 172.7, 172.2, 170.7, 170.6, 170.3, 170.1, 167.8, 166.1, 165.7, 165.6, 164.9, 158.4, 158.1, 157.8, 138.4, 133.3, 133.2, 133.1, 133.1, 130.3, 130.1, 129.9, 129.7, 129.6, 129.5, 129.1, 128.3, 128.3, 128.3, 124.7, 117.0, 114.7, 101.8, 99.9, 96.9, 80.6, 77.6, 74.1, 73.8, 73.8, 72.7, 71.8, 71.5, 71.3, 70.8, 69.3, 67.6, 67.3, 66.8, 66.4, 62.4, 59.7, 53.2, 50.4, 48.7, 39.0, 37.2, 37.1, 36.6, 32.3, 31.9, 30.0, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.2, 28.9, 25.5, 23.0, 22.6, 21.2, 20.7, 20.6, 19.7, 14.1; HRMS (ESI) m/z found [M+Na]⁺ 1896.8947, C₉₈H₁₃₄F₃N₃O₂₉ calcd for [M+Na]⁺ 1896.8947.

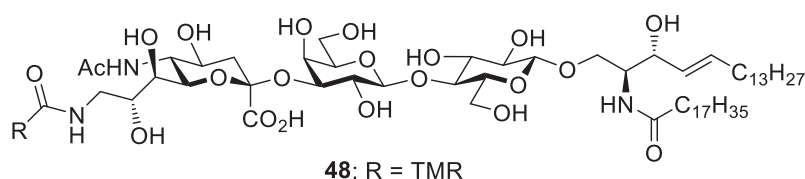


(5-Acetamido-9-amino-3,5,9-trideoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylonic acid)-(2 $\rightarrow$ 3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(β -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 1)-(2*S*,3*R*,4*E*)-2-octadecanamido-4-octadecene-1,3-diol (47)

化合物 **46** (19.9 mg, 106 μ mol)を MeOH/THF (3.0 mL/3.0 mL)に溶かし、1 M NaOH 水溶液 (120 μ L)を加え、室温にて 21 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH/5% CaCl₂ aq. = 5:4:1)で確認後、Muromac C101 を加え反応液を中和した。反応溶液を綿栓ろ過し、溶媒除去を行った後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/MeOH/H₂O = 5:1.7:0.1 to 5:3:0.2)で精製し、化合物 **47** (10.6 mg, 85%)を得た。

$[\alpha]_{\text{D}} +6.0^{\circ}$ (c 0.1, CHCl₃/MeOH = 1:1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 1:1) δ 5.70 (dt, 1 H, $J_{4,5} = 14.9$ Hz, $J_{5,6} = J_{5,6'} = 7.5$ Hz, H-5^{Cer}), 5.45 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 8.0$ Hz, H-4^{Cer}), 4.30 (d, 1 H, $J_{1,2}$

= 8.1 Hz, H-1a), 4.22 (br d, 1 H, H-1c), 4.08 (t, 1 H, $J_{2,3} = 8.1$ Hz, H-3^{Cer}), 4.02-3.35 (m, 22 H, H-2a, H-3a, H-4a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-4b, H-5b, H-6b, H-7b, H-8b, H-9b, H-9'b, H-2c, H-3c, H-4c, H-5c, H-6c, H-6'c, H-1^{Cer}, H-1'^{Cer}, H-2^{Cer}), 2.85 (br dd, 1 H, H-3eq-b), 2.17 (t, 2 H, NHCOCH₂^{Cer}), 2.05-2.02 (m, 5 H, Ac, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}), 1.76 (t, 1 H, H-3ax-b), 1.58 (m, 2 H, NHCOCH₂CH₂^{Cer}), 1.43-1.16 (m, 50 H, 25 CH₂^{Cer}), 0.91 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 1:1) δ 174.2, 170.1, 134.6, 134.2, 133.9, 128.9, 102.7, 74.8, 74.4, 73.6, 73.0, 71.6, 70.6, 68.6, 68.1, 67.9, 67.4, 67.2, 57.4, 52.8, 52.6, 52.1, 48.9, 48.7, 48.5, 48.3, 48.2, 48.0, 47.8, 47.3, 42.5, 36.1, 34.1, 33.3, 32.1, 31.6, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 25.6, 22.3, 22.1, 22.0, 15.5, 13.6, 12.9; HRMS (ESI) *m/z* found [M-H]⁻ 1178.7526, C₅₉H₁₀₉N₃O₂₀ calcd for [M-H]⁻ 1178.7526.

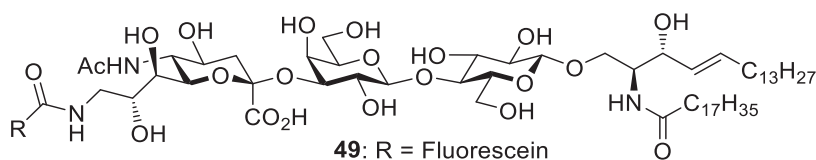


TMR-S9-GM3 (48)

Ar 雰囲気条件下にて化合物 **47** (4.0 mg, 3.4 μmol)を MeOH/THF (339 μL/339 μL)に溶かし、TEA (8.5 μL, 61 μmol)、5-carboxy-tetramethylrhodamine *N*-succinimidyl ester (5.0 mg, 9.5 μmol)を加え、室温にて 29 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH/5% CaCl₂ aq. = 5:4:0.5)で確認後、ゲルろ過クロマトグラフィー (LH-20, CHCl₃/MeOH = 1:1)、PTLC (CHCl₃/MeOH/H₂O = 5:4:0.5)で精製し、**TMR-S9-GM3 (48)** (3.9 mg, 74%)を得た。

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ 8.57-6.31 (m, 9 H, 3 Ar^{TMR}), 5.62 (dt, 1 H, $J_{4,5} = 15.8$ Hz, $J_{5,6} = J_{5,6'} = 6.2$ Hz, H-5^{Cer}), 5.40 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 7.6$ Hz, H-4^{Cer}), 4.43 (d, 1 H, $J_{1,2} = 7.5$ Hz, H-1a), 4.27 (d, 1 H, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, H-1c), 4.11-3.00 (m, 35 H, H-2a, H-3a, H-4a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-4b, H-5b, H-6b, H-7b, H-8b, H-9b, H-9'b, H-2c, H-3c, H-4c, H-5c, H-6c, H-6'c, H-1^{Cer}, H-1'^{Cer}, H-2^{Cer}, H-3^{Cer}, 4 NMe^{TMR}), 2.87 (dd, 1 H, $J_{3eq,4} = 4.8$ Hz, $J_{gem} = 12.4$ Hz, H-3eq-b), 2.15-1.97 (m, 7 H, Ac, H-

6^{Cer} , $H-6'^{Cer}$, $NHCOCH_2^{Cer}$), 1.75 (t, 1 H, $J_{3ax,4} = 12.4$ Hz, H-3 ax -b), 1.52-1.51 (m, 2 H, $NHCOCH_2CH_2^{Cer}$), 1.33-1.28 (m, 50 H, 25 CH_2^{Cer}), 0.91-0.88 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ^{13}C NMR (200 MHz, CD_3OD) δ 175.9, 175.4, 172.5, 169.4, 161.6, 159.0, 159.0, 158.7, 158.7, 142.0, 137.5, 137.0, 134.9, 132.7, 131.4, 130.8, 129.5, 115.2, 115.0, 114.8, 105.0, 104.5, 101.2, 97.3, 80.8, 77.8, 77.1, 76.5, 76.3, 74.9, 74.8, 73.0, 72.4, 71.2, 71.0, 69.9, 69.5, 69.0, 62.7, 61.9, 57.5, 57.4, 54.8, 53.9, 44.8, 42.2, 40.9, 40.9, 37.3, 33.5, 33.1, 33.1, 30.9, 30.9, 30.9, 30.8, 30.8, 30.7, 30.7, 30.6, 30.5, 30.5, 30.5, 30.1, 27.2, 23.8, 23.8, 22.6, 17.4, 17.3, 17.2, 14.5, 14.5; HRMS (ESI) m/z found $[M-H]^-$ 1590.8955, $C_{84}H_{129}N_5O_{24}$ calcd for $[M-H]^-$ 1590.8955.

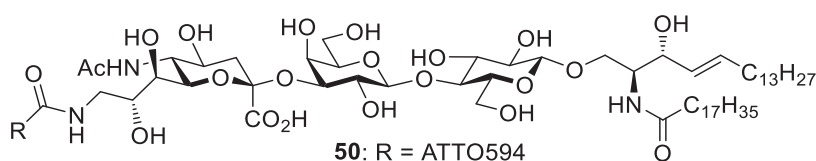


FI-S9-GM3 (49)

Ar 雰囲気条件下にて化合物 **47** (2.6 mg, 2.2 μ mol) を MeOH/THF (220 μ L/220 μ L) に溶かし、TEA (1.5 μ L, 11 μ mol)、5-carboxy-fluorescein *N*-succinimidyl ester (3.1 mg, 6.5 μ mol) を加え、室温にて 29 時間攪拌した。反応終了を TLC ($CHCl_3$ /MeOH/5% $CaCl_2$ aq. = 5:4:0.8) で確認後、ゲルろ過クロマトグラフィー (LH-20, $CHCl_3$ /MeOH = 1:1)、PTLC ($CHCl_3$ /MeOH/ H_2O = 5:4:0.8) で精製し、**FI-S9-GM3 (49)** (2.4 mg, 73%) を得た。

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3/CD_3OD = 1:3$) δ 8.46-6.54 (m, 9 H, 3 Ar^{Fl}), 5.64 (dt, 1 H, $J_{4,5} = 15.2$ Hz, $J_{5,6} = J_{5,6'} = 6.6$ Hz, H-5 Cer), 5.41 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 7.7$ Hz, H-4 Cer), 4.42 (d, 1 H, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, H-1a), 4.28 (d, 1 H, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, H-1c), 4.17-3.18 (m, 23 H, H-2a, H-3a, H-4a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-4b, H-5b, H-6b, H-7b, H-8b, H-9b, H-9'b, H-2c, H-3c, H-4c, H-5c, H-6c, H-6'c, H-1 Cer , H-1' Cer , H-2 Cer , H-3 Cer), 2.86 (dd, 1 H, $J_{3eq,4} = 3.9$ Hz, $J_{gem} = 11.2$ Hz, H-3 eq -b), 2.15-1.97 (m, 7 H, Ac, H-6 Cer , H-6' Cer , $NHCOCH_2^{Cer}$), 1.75 (t, 1 H, $J_{3ax,4} = 11.2$ Hz, H-3 ax -b), 1.55 (m, 2 H, $NHCOCH_2CH_2^{Cer}$),

1.33-1.17 (m, 50 H, 25 CH₂^{Cer}), 1.01-0.95 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ¹³C NMR(200 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 1:3) δ 175.9, 175.3, 174.8, 168.6, 137.9, 135.1, 131.0, 130.2, 104.9, 104.3, 103.6, 80.8, 77.5, 76.8, 76.2, 76.0, 74.6, 74.6, 72.9, 72.2, 70.8, 69.7, 69.2, 68.8, 62.6, 61.7, 54.5, 53.7, 47.7, 44.8, 41.9, 37.3, 33.4, 33.0, 33.0, 30.8, 30.7, 30.7, 30.7, 30.6, 30.5, 30.4, 30.4, 30.4, 30.3, 30.3, 27.0, 23.6, 23.6, 22.6, 14.5, 9.2; HRMS (ESI) *m/z* found [M-H]⁻ 1536.8009, C₈₀H₁₁₉N₃O₂₆ calcd for [M-H]⁻ 1536.8009.

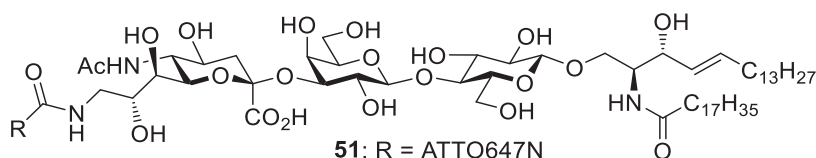


594-S9-GM3 (50)

Ar 雰囲気下、化合物 **47** (4.1 mg, 3.4 μmol)を MeOH/THF (200 μL/200 μL)に溶かし、TEA (9.8 μL, 69.6 μmol)、ATTO594 *N*-succinimidyl ester (7.3 mg, 5.2 μmol)を加え、室温にて 6.5 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH/5% CaCl₂ aq. = 5:4:0.5)で確認後、ゲルろ過クロマトグラフィー (LH-20, CHCl₃/MeOH = 1:1)、PTLC (CHCl₃/MeOH/H₂O = 5:4:0.5)で精製し、**594-S9-GM3 (50)** (4.4 mg, 65%)を得た。

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ 7.81-7.46 (m, 4 H, Ar^{ATTO594}), 7.25 (s, 1 H, Ar^{ATTO594}), 7.24 (s, 1 H, Ar^{ATTO594}), 6.71 (s, 1 H, Ar^{ATTO594}), 6.68 (s, 1 H, Ar^{ATTO594}), 5.80 (s, 1 H, CH^{ATTO594}), 5.78 (s, 1 H, CH^{ATTO594}), 5.58 (dt, 1 H, *J*_{4,5} = 15.8 Hz, *J*_{5,6} = *J*_{5,6'} = 7.6 Hz, H-5^{Cer}), 5.45 (dd, 1 H, *J*_{3,4} = 8.3 Hz, H-4^{Cer}), 4.25 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 7.6 Hz, H-1a), 4.27 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 7.6 Hz, H-1c), 4.27-3.11 (m, 33 H, H-2a, H-3a, H-4a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-4b, H-5b, H-6b, H-7b, H-8b, H-9b, H-9'b, H-2c, H-3c, H-4c, H-5c, H-6c, H-6'c, H-1^{Cer}, H-1'^{Cer}, H-2^{Cer}, H-3^{Cer}, 3 NCH₂^{ATTO594}, 2 CH₂SO₃^{ATTO594}), 2.75 (br dd, 1 H, H-3eq-b), 2.60/2.56 (s, 3 H, NMe^{ATTO594}), 2.07 (t, 2 H, NHCOCH₂^{Cer}), 1.91-1.88 (m, 5 H, Ac, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}), 1.65-1.11 (m, 75 H, H-3ax-b, 26 CH₂^{Cer}, 4 Me^{ATTO594}, NCH₂CH₂^{ATTO594}, NCH₂CH₂CH₂^{ATTO594}, 2 NCH₂CH₃^{ATTO594}) 0.81-0.79 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ¹³C NMR (200 MHz,

CD₃OD) δ 175.9, 175.4, 174.9, 174.8, 171.5, 171.1, 159.2, 159.1, 159.1, 155.0, 154.9, 154.2, 154.2, 138.4, 138.3, 137.8, 137.3, 135.0, 134.9, 132.2, 131.8, 131.7, 131.5, 131.1, 130.7, 130.5, 128.8, 126.2, 126.0, 124.3, 124.2, 122.9, 122.9, 115.0, 115.0, 105.1, 105.0, 104.6, 101.2, 97.2, 97.2, 96.9, 81.0, 80.9, 77.7, 77.1, 76.9, 76.5, 76.3, 74.8, 74.7, 72.9, 71.9, 70.9, 70.1, 69.6, 69.4, 69.0, 64.3, 62.7, 62.1, 61.9, 61.8, 61.7, 54.7, 54.0, 54.0, 53.9, 52.1, 43.9, 42.1, 41.5, 41.3, 38.7, 37.4, 33.7, 33.5, 33.1, 33.1, 32.7, 30.9, 30.9, 30.8, 30.8, 30.8, 30.8, 30.7, 30.7, 30.5, 30.5, 30.5, 29.5, 29.5, 29.3, 29.3, 27.2, 23.8, 23.7, 22.8, 22.7, 14.5, 13.9, 13.9, 13.7, 9.2; HRMS (ESI) m/z found $[M-2H]^{2-}$ 982.5028, C₁₀₀H₁₅₆N₆O₂₉S₂ calcd for $[M-2H]^{2-}$ 982.5028.

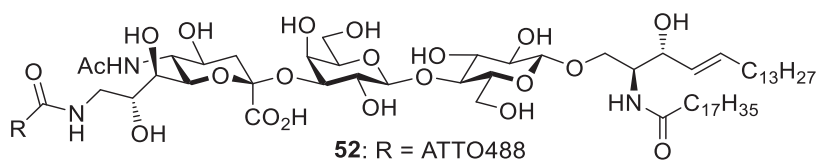


647N-S9-GM3 (51)

Ar 雰囲気下、化合物 **47** (1.4 mg, 1.2 μ mol)を MeOH/THF (200 μ L/200 μ L)に溶かし、TEA (2.5 μ L, 18 μ mol)、ATTO647N *N*-succinimidyl ester (1.0 mg, 1.3 μ mol)を加え、室温にて 27 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH/5% CaCl₂ aq. = 5:4:0.05)で確認後、ゲルろ過クロマトグラフィー (LH-20, CHCl₃/MeOH = 1:1)、PTLC (CHCl₃/MeOH/H₂O = 5:3:1)で精製し、**647N-S9-GM3 (51)** (1.4 mg, 67%)を得た。

¹H NMR (800 MHz, CD₃OD) δ 7.71-6.76 (m, 7 H, 3 Ar^{ATTO647N}), 5.66 (dt, 1 H, $J_{4,5} = 15.1$ Hz, $J_{5,6} = J_{5,6'} = 7.8$ Hz, H-5^{Cer}), 5.43 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 7.7$ Hz, H-4^{Cer}), 4.40-2.56 (m, 37 H, H-1a, H-2a, H-3a, H-4a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-3eq-b, H-4b, H-5b, H-6b, H-7b, H-8b, H-9b, H-9'b, H-1c, H-2c, H-3c, H-4c, H-5c, H-6c, H-6'c, H-1^{Cer}, H-1'^{Cer}, H-2^{Cer}, H-3^{Cer}, 4 NCH₂^{ATTO647N}, NMe^{ATTO647N}), 2.15 (t, 2 H, NHCOCH₂^{Cer}), 2.01-1.01 (m, 91 H, H-3ax-b, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}, 26 CH₂^{Cer}, CH^{ATTO647N}, 7 CH₂^{ATTO647N}, 6 Me^{ATTO647N}, Ac), 0.90-0.89 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ¹³C NMR (200 MHz, CD₃OD) δ 175.9, 175.5, 175.4,

174.9, 170.6, 159.2, 154.7, 153.5, 151.4, 135.0, 131.5, 130.1, 130.1, 129.6, 128.3, 124.8, 124.3, 124.3, 122.0, 105.1, 104.6, 101.3, 80.7, 77.9, 77.2, 76.5, 76.3, 74.9, 74.8, 73.0, 72.2, 70.9, 70.8, 70.0, 69.4, 69.1, 62.8, 61.8, 59.0, 59.0, 58.9, 54.7, 53.9, 53.3, 52.6, 49.5, 48.8, 48.7, 47.6, 44.3, 41.8, 41.8, 38.0, 37.9, 37.9, 37.4, 34.0, 33.5, 33.2, 33.2, 31.9, 31.7, 31.1, 31.1, 31.0, 30.9, 30.9, 30.9, 30.9, 30.8, 30.7, 30.6, 30.6, 30.5, 30.5, 29.5, 28.6, 28.6, 27.6, 27.5, 27.2, 26.3, 23.8, 22.7, 21.7, 14.9, 14.8, 14.8, 14.5; HRMS (ESI) m/z found $[M+2Na]^{2+}$ 926.5605, $C_{101}H_{158}N_6O_{22}$ calcd for $[M+2Na]^{2+}$ 926.5607.



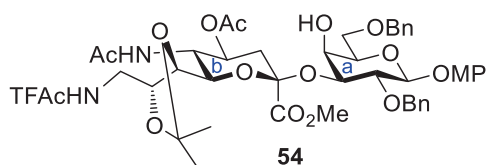
488-S9-GM3 (52)

Ar 雰囲気下、化合物 **47** (3.9 mg, 3.3 μ mol) を MeOH/THF (200 μ L/200 μ L) に溶かし、TEA (6.9 μ L, 50 μ mol)、ATTO488 *N*-succinimidyl ester (4.9 mg, 5.0 μ mol) を加え、室温にて 1.5 時間 撹拌した。反応終了を TLC ($CHCl_3$ /MeOH/5% $CaCl_2$ aq. = 5:4:0.7) で確認後、ゲルろ過クロマトグラフィー (LH-20, $CHCl_3$ /MeOH = 1:1)、PTLC ($CHCl_3$ /MeOH/ H_2O = 5:4:0.7) で精製し、**488-S9-GM3 (52)** (4.9 mg, 86%) を得た。

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$ = 1:1) δ 7.74-6.95 (m, 8 H, 3 Ar^{ATTO488}), 5.67 (dt, 1 H, $J_{4,5}$ = 15.0 Hz, $J_{5,6} = J_{5,6'} = 6.4$ Hz, H-5^{Cer}), 5.44 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 7.7$ Hz, H-4^{Cer}), 4.42-2.76 (m, 31 H, H-1a, H-2a, H-3a, H-4a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-3eq-b, H-4b, H-5b, H-6b, H-7b, H-8b, H-9b, H-9'b, H-1c, H-2c, H-3c, H-4c, H-5c, H-6c, H-6'c, H-1^{Cer}, H-1'^{Cer}, H-2^{Cer}, H-3^{Cer}, NMe^{ATTO488}, NCH₂^{ATTO488}), 2.18-1.74 (m, 14 H, H-3ax-b, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}, 2 CH₂^{ATTO488}, NHCOCH₂^{Cer}, NHCOCH₂CH₂^{Cer}, Ac), 1.37-1.16 (m, 50 H, 25 CH₂^{Cer}), 0.91-0.88 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ^{13}C NMR (200 MHz, $CDCl_3/CD_3OD$ = 2:1) δ 180.7, 175.0, 174.0, 156.7, 134.8, 130.2, 129.8, 120.0, 113.9, 112.7, 104.2, 103.7, 103.4,

100.5, 75.6, 75.2, 73.7, 72.4, 70.7, 69.8, 69.0, 68.3, 63.7, 62.7, 62.5, 61.9, 61.1, 59.6, 57.0, 56.7, 53.9, 53.8, 53.6, 53.0, 48.2, 46.7, 43.5, 37.6, 36.9, 35.2, 31.5, 27.1, 22.7, 17.3; HRMS (ESI) m/z found $[M-2H]^{2-}$ 874.4089, $C_{84}H_{131}N_6O_{29}S_2$ calcd for $[M-2H]^{2-}$ 874.4089.

Neu9 位標識 GM1 プローブ



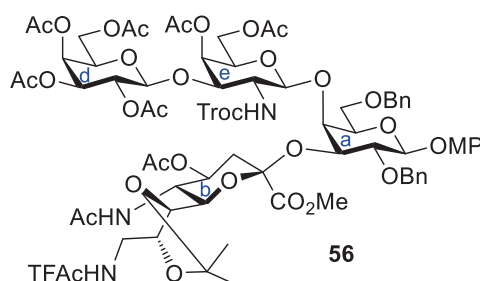
4-Methoxyphenyl (methyl 5-acetamido-4-*O*-acetyl-7,8-*O*-isopropylidene-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-*D*-glycero- α -*D*-galacto-2-nonulopyranosylonate)-(2 $\rightarrow$ 3)-2,6-di-*O*-benzyl- β -*D*-galactopyranoside (**54**)

Ar 雰囲気下、化合物 **33** (100 mg, 115 μ mol)を MeCN (577 μ L)に溶解し、CSA (8.0 mg, 35 μ mol)と 2,2-dimethoxypropane (DMP) (448 μ L, 3.68 mmol)を 5 度に分けて加え、室温で 24 時間攪拌した。反応終了を TLC ($CHCl_3/MeOH = 15:1$)で確認後、TEA で反応を停止した。反応溶液を toluene 共沸し、2 時間真空乾燥した。

残渣を Ar 雰囲気下にて、 CH_2Cl_2/Pyr (1.0 mL/1.0 mL)の混合溶媒に溶解し、 $-40^\circ C$ に冷却後、AcCl (46.8 μ L, 654 μ mol)を 8 度に分けて加え、 $-40^\circ C$ にて 52 時間攪拌した。反応終了を TLC ($CHCl_3/MeOH = 10:1$)にて確認後、MeOH を加えて過剰の試薬を分解した。toluene 共沸後、残渣を $CHCl_3$ に希釈し、有機層を 2 M HCl、 H_2O 、satd Na_2CO_3 、brine の順で洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 ($CHCl_3/MeOH = 40:1$)にて化合物 **54** (84 mg,

77%, 2 steps)を得た。

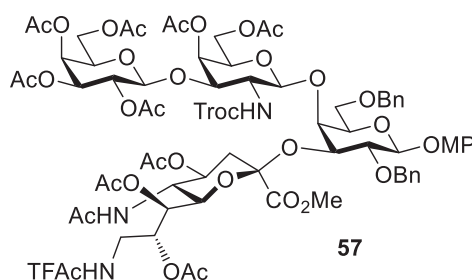
$[\alpha]_D -22.0^\circ$ (c 0.6, CHCl_3); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.40-6.79 (m, 15 H, 3 Ar, NH-9b), 5.28 (d, 1 H, $J_{5,\text{NH}} = 8.0$ Hz, NH-5b), 5.05-5.00 (m, 2 H, H-4b, CH_2Ph), 4.87 (d, 1 H, $J_{1,2} = 7.4$ Hz, H-1a), 4.71 (d, 1 H, $J_{\text{gem}} = 11.5$ Hz, CH_2Ph), 4.58-4.53 (2 d, 2 H, CH_2Ph), 4.23-4.09 (m, 4 H, H-3a, H-5b, H-7b, H-8b), 4.01 (s, 1 H, H-4a), 3.92-3.58 (m, 13 H, H-2a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-6b, H-9b, H-9'b, MeO, COOMe), 2.74 (s, 1 H, OH-4a), 2.48 (dd, 1 H, $J_{\text{gem}} = 13.2$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 5.1$ Hz, H-3eq-b), 2.17 (dd, 1 H, $J_{3\text{ax},4} = 10.9$ Hz, H-3ax-b), 1.99-1.88 (2 s, 6 H, 2 Ac), 1.36-1.29 (2 s, 6 H, 2 Me); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 170.6, 170.4, 168.9, 158.1, 157.8, 157.5, 157.2, 155.2, 151.3, 138.2, 137.8, 128.5, 128.3, 128.1, 127.9, 127.7, 127.6, 127.5, 127.5, 118.3, 118.2, 116.9, 114.6, 114.5, 108.4, 102.9, 99.4, 76.8, 75.2, 74.9, 74.7, 73.5, 73.2, 73.1, 71.8, 69.1, 68.8, 68.7, 55.5, 53.3, 50.6, 41.0, 35.3, 27.3, 24.5, 23.1, 20.8; HRMS (ESI) m/z found $[\text{M}+\text{Na}]^+ 971.3401$, $\text{C}_{46}\text{H}_{55}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_{16}$ calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+ 971.3401$.



4-Methoxyphenyl (2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-{4,6-di-*O*-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl)- β -D-galactopyranosyl}-(1 $\rightarrow$ 4)-{(methyl 5-acetamido-4-*O*-acetyl-7,8-*O*-isopropylidene-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylate)-(2 $\rightarrow$ 3)}-2,6-di-*O*-benzyl- β -D-galactopyranoside (56)

Ar 雰囲気下供与体 **55** (48.7 mg, 56.6 μmol)及び受容体 **54** (35.8 mg, 37.7 μmol)を CH_2Cl_2 (943 μL)に溶解し、MS4A (85 mg)を加えた。室温にて 30 分攪拌した後、0 $^\circ\text{C}$ に冷却し、NIS (19.0 mg, 84.9 μmol)と TfOH (1.5 μL , 17 μmol)を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応終

了を TLC (toluene/AcOEt = 1:6 二回展開)にて確認後、TEA で中和し、セライト濾過にて濾別した。濾液を CHCl₃ に希釈し satd Na₂S₂O₃、brine で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (CHCl₃/MeOH = 80:1 to 70:1)にて化合物 **56** (48.2 mg, 75%, 2 steps)を得た。

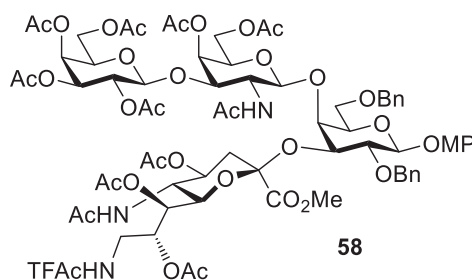


4-Methoxyphenyl (2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-{4,6-di-*O*-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl)- β -D-galactopyranosyl}-(1 $\rightarrow$ 4)-{(methyl 5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosyl)-(2 $\rightarrow$ 3)}-2,6-di-*O*-benzyl- β -D-galactopyranoside (57**)**

Ar 雰囲気下にて、化合物 **56** (1.22 g, 0.717 mmol)を AcOH/H₂O (14.0 mL/3.5 mL)に溶かし、50 °C にて 8 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 15:1 二回展開)で確認後、toluene 共沸し、2 時間真空乾燥した。

Ar 雰囲気下にて残渣を Pyr (7.0 mL)に溶解し、0 °C に冷却後無水酢酸 (270 μ L, 2.87 mmol)、DMAP (8.8 mg, 71 μ mol)を加え、室温にて 16 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 20:1 二回展開)にて確認後、MeOH を加えて過剰の試薬を分解した。toluene 共沸後、残渣を CHCl₃ に希釈し、有機層を 2 M HCl、H₂O、satd Na₂CO₃、brine の順で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (CHCl₃/MeOH = 70:1 to 60:1)にて化合物 **57** (1.19 g, 95%, 2 steps)を得た。

$[\alpha]_D +5.6^\circ$ (c 1.6, CHCl_3); ^1H NMR (600 MHz, CD_3CN , 40°C) δ 7.44 (m, 1 H, NH-9b), 7.34-6.80 (m, 14 H, 3 Ar), 6.07 (d, 1 H, $J_{2,\text{NH}} = 9.7$ Hz, NH-2e), 6.04 (d, 1 H, $J_{5,\text{NH}} = 10.3$ Hz, NH-5b), 5.32 (m, 2 H, H-4d, H-4e), 5.08-4.92 (m, 6 H, H-1a, H-4b, H-7b, H-8b, H-2d, H-3d), 4.86 (d, 1 H, $J_{\text{gem}} = 11.0$ Hz, $\text{CCl}_3\text{CH}_2\text{O}$), 4.81-4.76 (m, 3 H, H-1d, H-1e, CH_2Ph), 4.70 (d, 1 H, $\text{CCl}_3\text{CH}_2\text{O}$), 4.63 (d, 1 H, $J_{\text{gem}} = 12.4$ Hz, CH_2Ph), 4.54-4.47 (2 d, 2 H, CH_2Ph), 4.42 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 9.6$ Hz, $J_{3,4} = 2.7$ Hz, H-3a), 4.20 (dd, 1 H, $J_{5,6} = 4.1$ Hz, $J_{\text{gem}} = 9.6$ Hz, H-6d), 4.13 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.3$ Hz, $J_{3,4} = 2.7$ Hz, H-3e), 4.11-3.97 (m, 6 H, H-5b, H-5d, H-6'd, H-5e, H-6e, H-6'e), 3.93-3.79 (m, 7 H, H-4a, H-5a, H-6b, H-9b, COOMe), 3.76-3.68 (m, 5 H, H-6a, H-2e, MeO), 3.64-3.60 (m, 2 H, H-2a, H-6'a), 3.00 (m, 1 H, H-9'b), 2.53 (dd, 1 H, $J_{\text{gem}} = 13.0$ Hz, $J_{3eq,4} = 4.8$ Hz, H-3eq-b), 2.21-1.72 (m, 31 H, 10 Ac, H-3ax-b); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 172.1, 170.9, 170.5, 170.4, 170.4, 170.1, 170.0, 169.5, 169.3, 168.6, 157.9, 155.2, 154.1, 151.2, 138.4, 138.2, 128.3, 128.2, 128.0, 127.6, 127.5, 127.4, 127.3, 118.4, 116.7, 114.8, 114.4, 102.8, 101.0, 101.0, 99.3, 95.6, 77.9, 76.6, 75.6, 75.2, 74.3, 73.6, 73.5, 72.2, 70.5, 70.4, 70.3, 69.5, 68.9, 68.7, 68.6, 67.7, 67.3, 66.6, 62.2, 60.6, 55.5, 54.4, 53.3, 49.2, 38.0, 35.5, 29.6, 23.0, 22.6, 20.9, 20.8, 20.7, 20.6, 20.6, 20.5; HRMS (ESI) m/z found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1764.4192, $\text{C}_{74}\text{H}_{89}\text{Cl}_3\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_{35}$ calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1764.4192.



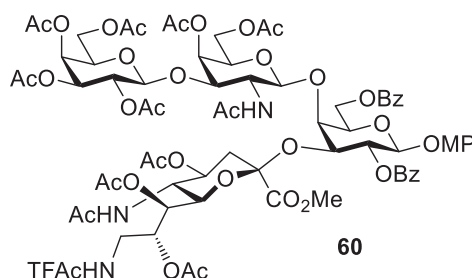
4-Methoxyphenyl (2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-{(methyl 5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylonate)-(2 $\rightarrow$ 3)}-2,6-di-*O*-benzyl- β -D-galactopyranoside (58)

Ar 雰囲気下にて、化合物 **57** (1.17 g, 0.670 mmol)を AcOH/ClCH₂CH₂Cl (2.5 mL/10.0 mL)に溶かし、Zn 粉末 (7.00 g)を加え、40 °C にて 1 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 20:1 二回展開)で確認後、セライト濾過にて濾別した。濾液を toluene 共沸した後、残渣を CHCl₃ に希釈し、有機層を H₂O、satd Na₂CO₃、brine の順で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップを 2 時間真空乾燥した。

Ar 雰囲気下にて残渣を Pyr (10.0 mL)に溶解し、0 °C に冷却後無水酢酸 (190 μ L, 2.01 mmol)、DMAP (8.2 mg, 67 μ mol)を加え、室温にて 1 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 20:1 二回展開)にて確認後、MeOH を加えて過剰の試薬を分解した。toluene 共沸後、残渣を CHCl₃ に希釈し、有機層を 2 M HCl、H₂O、satd Na₂CO₃、brine の順で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (CHCl₃/MeOH = 70:1 to 60:1)にて化合物 **58** (939 mg, 88%, 2 steps)を得た。

[α]_D +7.9° (*c* 3.0, CHCl₃); ¹H NMR (600 MHz CD₃CN, 40 °C) δ 7.44 (m, 1 H, NH-9b), 7.35-6.81 (m, 14 H, 3 Ar), 6.37 (d, 1 H, *J*_{2,NH} = 9.0 Hz, NH-2e), 6.06 (d, 1 H, *J*_{5,NH} = 10.3 Hz, NH-5b), 5.32 (d, 1 H, *J*_{3,4} = 3.4 Hz, H-4d), 5.31 (d, 1 H, *J*_{3,4} = 3.5 Hz, H-4e), 5.08-5.05 (m, 3 H, H-7b, H-8b, H-3d), 5.02 (td, 1 H, *J*_{3eq,4} = 4.8 Hz, *J*_{3ax,4} = *J*_{4,5} = 11.7 Hz, H-4b), 4.95-4.92 (m, 2 H, H-1a, H-2d), 4.85 (d, 1 H, *J*_{gem} = 11.0 Hz, CH₂Ph), 4.74 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 8.2 Hz, H-1d), 4.70-4.68 (m, 2 H, H-1e, CH₂Ph), 4.54-4.46 (2 d, 2 H, CH₂Ph), 4.36 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 9.6 Hz, *J*_{3,4} = 2.8 Hz, H-3a), 4.17 (dd, 1 H, *J*_{5,6} = 8.9 Hz, *J*_{gem} = 13.7 Hz, H-6d), 4.10-3.95 (m, 8 H, H-5b, H-5d, H-6'd, H-2e, H-3e, H-5e, H-6e, H-6'e), 3.91-3.86 (m, 5 H, H-6b, H-9b, COOMe), 3.82 (d, 1 H, H-4a), 3.79 (m, 1 H, H-5a), 3.74 (s, 3 H, MeO), 3.67 (dd, 1 H, *J*_{5,6} = 4.1 Hz, *J*_{gem} = 11.0 Hz, H-6a), 3.60 (dd, 1 H, *J*_{5,6'} = 7.6 Hz, H-6'a), 3.57 (dd, 1 H, *J*_{1,2} = 7.5 Hz, H-2a), 3.00 (m, 1 H, H-9'b), 2.54 (dd, 1 H, *J*_{gem} = 13.7 Hz, H-3eq-b), 2.15-1.76 (m, 34 H, 11 Ac, H-3ax-b); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 172.1, 170.9, 170.4, 170.4,

170.3, 170.1, 170.0, 169.9, 169.6, 169.6, 169.5, 169.2, 168.4, 157.8, 157.6, 155.1, 151.4, 151.3, 138.6, 138.2, 138.1, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.6, 127.5, 127.4, 127.3, 127.1, 118.2, 116.7, 114.8, 114.4, 102.6, 102.3, 100.9, 100.3, 100.0, 98.7, 77.9, 75.5, 75.5, 75.0, 74.8, 73.6, 73.4, 73.3, 72.1, 72.0, 70.7, 70.6, 70.4, 70.2, 69.7, 69.4, 68.9, 68.8, 68.7, 68.6, 67.6, 67.5, 67.4, 67.2, 66.6, 62.5, 62.3, 60.6, 55.5, 53.6, 53.0, 49.2, 38.1, 36.0, 29.5, 23.4, 22.9, 21.0, 20.9, 20.7, 20.7, 20.7, 20.6, 20.5, 20.4; HRMS (ESI) m/z found $[M+Na]^+$ 1632.5256, $C_{73}H_{90}F_3N_3O_{34}$ calcd for $[M+Na]^+$ 1632.5256.



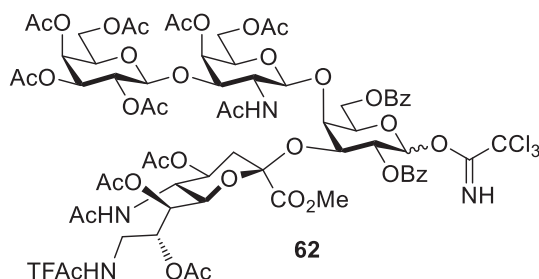
4-Methoxyphenyl (2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-{(methyl 5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylonate)-(2 $\rightarrow$ 3)}-2,6-di-*O*-benzoyl- β -D-galactopyranoside (60)

化合物 **58** (935 mg, 580 μ mol) を 1,4-dioxane (12.0 mL) に溶解し、 $Pd(OH)_2 \cdot C$ (2.00 g) を加え、水素気流下室温にて 1.5 時間攪拌した。反応終了を TLC ($CHCl_3/MeOH = 15:1$ 二回展開) にて確認後、固形物をセライトにて濾別して減圧濃縮した後、2 時間真空乾燥した。

得られたシラップを Ar 雰囲気下 Pyr (12.0 mL) に溶解し、0 $^{\circ}C$ に冷却後安息香酸無水物 (787 mg, 3.48 mmol)、DMAP (7.1 mg, 58 μ mol) を加え、室温にて 93 時間攪拌した。反応終了を TLC ($CHCl_3/MeOH = 20:1$ 二回展開) にて確認後、MeOH を加えて過剰の試薬を分解した。toluene 共沸後、残渣を $CHCl_3$ に希釈し、有機層を 2 M HCl、 H_2O 、satd Na_2CO_3 、brine の順で洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (toluene/AcOEt/MeOH = 2:1:0.07)

にて化合物 **60** (890 mg, 94%, 2 steps)を得た。

$[\alpha]_D +23.9^\circ$ (c 1.3, CHCl_3); ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.07-6.61 (m, 15 H, 3 Ar, NH-9b), 5.98 (d, 1 H, $J_{2,\text{NH}} = 6.8$ Hz, NH-2e), 5.59 (t, 1 H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 7.5$ Hz, H-2a), 5.40-5.34 (m, 3 H, H-8b, H-4d, H-4e), 5.23 (d, 1 H, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, H-1e), 5.19 (d, 1 H, H-1a), 5.13 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 7.5$ Hz, $J_{2,3} = 10.3$ Hz, H-2d), 5.07-5.04 (m, 2 H, NH-5b, H-3e), 4.97 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 3.4$ Hz, H-3d), 4.84 (dd, 1 H, $J_{6,7} = 2.5$ Hz, $J_{7,8} = 10.0$ Hz, H-7b), 4.75 (td, 1 H, $J_{3eq,4} = 4.5$ Hz, $J_{3ax,4} = J_{4,5} = 10.4$ Hz, H-4b), 4.64 (dd, 1 H, $J_{5,6} = 4.9$ Hz, $J_{\text{gem}} = 11.7$ Hz, H-6a), 4.61 (d, 1 H, H-1d), 4.50-4.46 (m, 2 H, H-3a, H-6'a), 4.14-3.80 (m, 12 H, H-5a, H-5b, H-9b, H-5d, H-6d, H-6'd, H-5e, H-6e, H-6'e, COOMe), 3.73 (br d, 1 H, H-4a), 3.70 (s, 3 H, MeO), 3.67 (dd, 1 H, $J_{5,6} = 10.3$ Hz, H-6b), 3.32 (m, 1 H, H-2e), 2.84 (dd, 1 H, $J_{\text{gem}} = 13.0$ Hz, H-3eq-b), 2.58 (m, 1 H, H-9'b), 2.36-1.54 (m, 34 H, 11 Ac, H-3ax-b); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 172.7, 172.2, 171.1, 170.4, 170.2, 170.0, 169.1, 168.1, 165.9, 165.1, 158.0, 157.8, 155.4, 151.3, 133.2, 130.2, 130.0, 129.9, 129.6, 129.0, 128.5, 128.4, 128.2, 125.3, 118.6, 116.8, 114.8, 114.3, 101.1, 100.7, 98.6, 97.6, 73.6, 73.4, 72.8, 72.1, 71.8, 70.9, 70.8, 70.8, 70.5, 69.0, 68.9, 68.7, 67.1, 66.8, 66.7, 63.6, 63.2, 62.6, 61.9, 60.8, 60.4, 55.5, 55.4, 52.8, 49.2, 38.2, 36.9, 29.7, 24.0, 23.0, 21.1, 21.0, 20.9, 20.8, 20.8, 20.7, 20.6, 20.5, 20.4, 14.2; HRMS (ESI) m/z found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1660.4841, $\text{C}_{73}\text{H}_{86}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_{36}$ calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1660.4841.



(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-{(methyl 5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylonate)-(2 $\rightarrow$ 3)}-2,6-di-*O*-benzoyl-D-

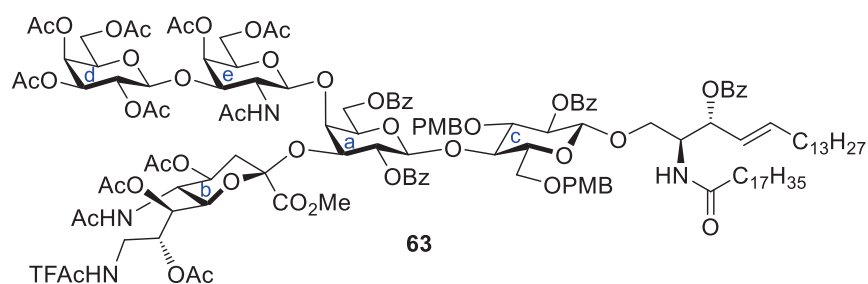
galactopyranosyl trichloroacetimidate (**62**)

Ar 雰囲気下にて、化合物 **60** (84.2 mg, 51.4 μ mol) を MeCN/toluene/H₂O (0.44 mL/0.37 mL/0.22 mL) に溶解し、0 °C に冷却後、CAN (282 mg, 514 μ mol) を加え、0 °C にて 2 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 20:1 二回展開) にて確認後、反応液を AcOEt に希釈し、有機層を H₂O、satd NaHCO₃、brine の順で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (CHCl₃/MeOH = 70:1 to 60:1) にてヘミアセタール **61** を得た。

ヘミアセタール **61** を Ar 雰囲気下 CH₂Cl₂ (1.0 mL) に溶解し、0 °C に冷却した後、CCl₃CN (100 μ L, 1.00 mmol)、DBU (1.5 μ L, 10.0 μ mol) を加え、0 °C にて 1.5 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 20:1 二回展開) にて確認後、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (CHCl₃/MeOH = 70:1 to 60:1) にて化合物 **62** (74.1 mg, 86%, α : β = 5:4, 2 steps) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.69 (s, 1 H, C=NH ^{β}), 8.47 (s, 1 H, C=NH ^{α}), 8.04-7.39 (m, 21 H, 2 Ar ^{α} , NH-9b ^{α} , 2 Ar ^{β}), 7.20 (m, 1 H, NH-9b ^{β}), 6.67 (d, 1 H, $J_{1,2}$ = 3.4 Hz, H-1a ^{α}), 6.20 (d, 1 H, $J_{2,NH}$ = 8.6 Hz, NH-2e ^{α}), 6.17 (d, 1 H, $J_{1,2}$ = 8.6 Hz, H-1a ^{β}), 6.06 (d, 1 H, $J_{2,NH}$ = 6.3 Hz, NH-2e ^{β}), 5.67 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ = 10.9 Hz, H-2a ^{α}), 5.63 (t, 1 H, $J_{2,3}$ = 8.6 Hz, H-2a ^{β}), 5.44-5.32 (m, 6 H, NH-5b ^{α} , H-4d ^{α} , H-4e ^{α} , H-8b ^{β} , H-4d ^{β} , H-4e ^{β}), 5.20 (d, 1 H, $J_{1,2}$ = 8.0 Hz, H-1e ^{β}), 5.15-5.10 (m, 5 H, H-8b ^{α} , H-2d ^{α} , H-2e ^{α} , NH-5b ^{β} , H-2d ^{β}), 5.06-4.96 (m, 4 H, H-4b ^{α} , H-3d ^{α} , H-3d ^{β} , H-3e ^{β}), 4.91-4.88 (m, 2 H, H-3e ^{α} , H-7b ^{β}), 4.82 (dd, 1 H, H-3a ^{α}), 4.79-4.77 (m, 2 H, H-7b ^{α} , H-4b ^{β}), 4.70 (dd, 1 H, H-6a ^{β}), 4.66 (d, 1 H, $J_{1,2}$ = 8.0 Hz, H-1d ^{α}), 4.61 (d, 1 H, $J_{1,2}$ = 8.0 Hz, H-1d ^{β}), 4.53-4.51 (m, 2 H, H-6a ^{α} , H-3a ^{β}), 4.39-3.79 (m, 30 H, H-4a ^{α} , H-5a ^{α} , H-6'a ^{α} , H-5b ^{α} , H-6b ^{α} , H-9b ^{α} , H-5d ^{α} , H-6d ^{α} , H-6'd ^{α} , H-2e ^{α} , H-5e ^{α} , H-6e ^{α} , H-6'e ^{α} , COOMe ^{α} , H-4a ^{β} , H-5a ^{β} , H-6'a ^{β} , H-5b ^{β} , H-9b ^{β} , H-5d ^{β} , H-6d ^{β} , H-6'd ^{β} , H-5e ^{β} , H-6e ^{β} , H-6'e ^{β} , COOMe ^{β}), 3.70 (dd, 1 H, H-6b ^{β}), 3.38 (m, 1 H, H-2e ^{β}), 3.04 (m, 1 H, H-9'b ^{α}), 2.81 (dd, 1 H, J_{gem} = 13.1 Hz, $J_{3eq,4}$ = 4.5 Hz, H-3eq-b ^{β}), 2.69 (m, 1 H, H-9'b ^{β}), 2.29 (dd, 1 H, J_{gem} = 13.8 Hz, $J_{3eq,4}$ = 5.2

Hz, H-3_{eq}-b^a), 2.25-1.58 (m, 68 H, 11 Ac^a, H-3_{ax}-b^a, 11 Ac^b, H-3_{ax}-b^b); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 172.5, 172.3, 172.0, 171.0, 170.8, 170.6, 170.4, 170.4, 170.2, 170.1, 169.9, 169.4, 169.3, 169.1, 168.1, 167.8, 166.5, 165.9, 164.9, 164.7, 160.9, 160.1, 158.1, 133.5, 133.3, 133.2, 133.1, 130.0, 129.7, 129.6, 129.5, 129.2, 128.4, 128.4, 128.3, 114.7, 101.3, 101.2, 99.0, 98.9, 97.8, 96.3, 94.3, 91.1, 90.3, 75.6, 73.8, 73.4, 73.1, 72.5, 72.1, 71.9, 70.8, 70.6, 70.5, 70.4, 70.1, 69.8, 69.0, 68.8, 68.7, 67.7, 67.6, 67.1, 66.9, 66.8, 66.7, 64.9, 63.6, 62.6, 60.9, 60.7, 55.2, 53.3, 53.0, 52.9, 49.6, 49.2, 38.5, 36.8, 35.7, 31.9, 29.7, 23.9, 23.2, 23.0, 21.2, 20.9, 20.8, 20.8, 20.7, 20.7, 20.6, 20.5, 20.4, 20.4, 14.1; HRMS (ESI) *m/z* found [M+Na]⁺ 1697.3513, C₆₈H₈₀Cl₃F₃N₄O₃₅ calcd for [M+Na]⁺ 1697.3513.

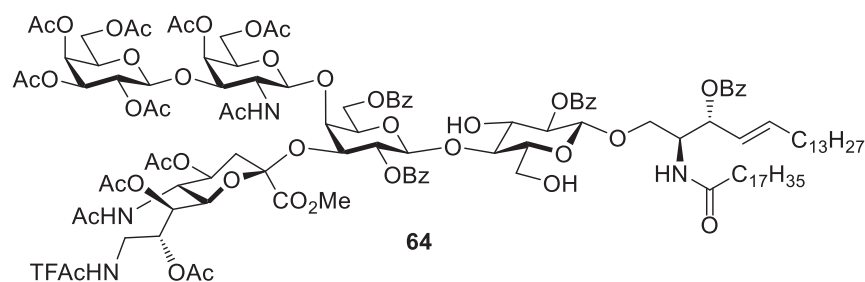


(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-(1→3)-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-deoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-{(methyl 5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-D-glycero-α-D-galacto-2-nonulopyranosylonate)-(2→3)}-2,6-di-*O*-benzoyl-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2-*O*-benzoyl-3,6-di-*O*-(4-methoxybenzyl)-β-D-glucopyranosyl-(1→1)-(2*S*,3*R*,4*E*)-3-*O*-benzoyl-2-octadecanamido-4-octadecene-1,3-diol (63)

Ar 雰囲気下供与体 **62** (114 mg, 68.0 μmol)及び受容体 **4** (120 mg, 102 μmol)を CH₂Cl₂ (3.4 mL)に溶解し、MS AW-300 (250 mg)を加えた。室温にて 1 時間攪拌した後、0 °C に冷却し、TMSOTf(1.2 μL, 6.8 μmol)を加えて 1 時間攪拌した。反応終了を TLC (toluene/AcOEt/MeOH = 1:1:0.2 二回展開)にて確認後、セライト濾過にて濾別した。濾液を CHCl₃ に希釈し satd Na₂CO₃、brine で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒

(toluene/AcOEt/MeOH = 2:1:0.08)にて化合物 **63** (161 mg, 89%)を得た。

$[\alpha]_D^{+40.0^\circ}$ (c 0.3, CHCl_3); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.10-6.67 (m, 29 H, 6 Ar, NH-9b), 5.96 (d, 1 H, $J_{2,\text{NH}} = 7.1$ Hz, NH-2e), 5.77 (dt, 1 H, $J_{4,5} = 15.2$ Hz, $J_{5,6} = J_{5,6'} = 6.8$ Hz, H-5^{Cer}), 5.71 (d, 1 H, $J_{2,\text{NH}} = 9.2$ Hz, NH^{Cer}), 5.47 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 7.1$ Hz, H-3^{Cer}), 5.42-5.31 (m, 5 H, H-2a, H-8b, H-4d, H-4e, H-4^{Cer}), 5.19-5.15 (m, 2 H, NH-5b, H-2c), 5.11-5.07 (m, 2 H, H-2d, H-1e), 5.02 (d, 1 H, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, H-1a), 4.95 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.5$ Hz, $J_{3,4} = 3.4$ Hz, H-3d), 4.89 (dd, 1 H, $J_{6,7} = 2.2$ Hz, $J_{7,8} = 10.3$ Hz, H-7b), 4.83 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.9$ Hz, $J_{3,4} = 3.3$ Hz, H-3e), 4.81-4.75 (m, 2 H, H-6a, H-4b), 4.65-4.59 (m, 3 H, H-4a, H-6'a, H-1d), 4.37 (d, 1 H, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, H-1c), 4.35-4.30 (m, 2 H, H-3a, H-2^{Cer}), 4.22-4.17 (2 d, 2 H, CH_2Ph), 4.14-3.97 (m, 9 H, H-5a, H-5b, H-9b, H-4c, H-6c, H-6'c, H-1^{Cer}, CH_2Ph), 3.86-3.42 (m, 19 H, H-3c, H-6b, H-5d, H-6d, H-6'd, H-2e, H-5e, H-6e, H-6'e, H-1'^{Cer}, 2 MeO, COOMe), 3.37 (m, 1 H, H-5c), 2.73 (m, 1 H, H-9'b), 2.65 (dd, 1 H, $J_{3eq,4} = 4.3$ Hz, $J_{\text{gem}} = 12.9$ Hz, H-3eq-b), 2.17-1.66 (m, 40 H, 11 Ac, H-3ax-b, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}, $\text{NHCOCH}_2^{\text{Cer}}$, $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2^{\text{Cer}}$), 1.38-1.05 (m, 50 H, 25 CH_2^{Cer}), 0.89-0.86 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 172.5, 172.3, 171.5, 170.7, 170.3, 170.3, 170.2, 170.2, 170.0, 169.9, 169.1, 168.0, 165.7, 165.1, 165.1, 164.6, 158.9, 157.9, 157.7, 136.8, 133.2, 133.0, 132.7, 130.3, 130.2, 129.9, 129.8, 129.6, 129.5, 129.4, 129.3, 128.7, 128.4, 128.3, 128.2, 124.7, 116.9, 114.6, 113.5, 100.9, 100.7, 100.2, 99.5, 98.1, 80.1, 76.1, 75.3, 74.4, 74.0, 73.7, 73.6, 73.5, 72.8, 72.2, 71.8, 71.4, 70.8, 70.7, 70.4, 68.9, 68.8, 68.7, 68.3, 67.2, 67.0, 66.9, 66.8, 63.4, 62.5, 60.8, 55.0, 54.9, 54.5, 52.8, 50.4, 49.1, 38.3, 36.4, 36.3, 32.2, 31.8, 29.5, 29.5, 29.4, 29.4, 29.2, 29.2, 29.1, 29.1, 28.8, 25.4, 23.6, 22.8, 22.5, 20.9, 20.6, 20.6, 20.5, 20.5, 20.4, 20.2, 14.0; HRMS (ESI) m/z found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 2712.1953, $\text{C}_{138}\text{H}_{183}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_{46}$ calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 2712.1948.

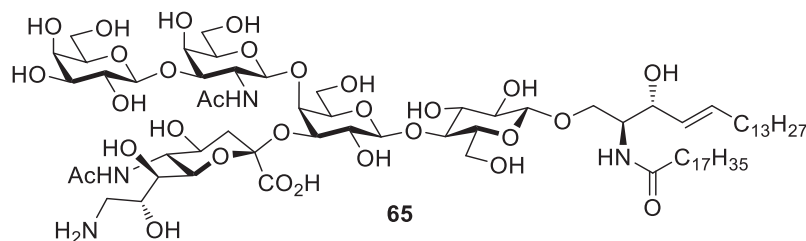


(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-{(methyl 5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylonate)-(2 $\rightarrow$ 3)}-2,6-di-*O*-benzoyl- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-*O*-benzoyl- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 1)-(2*S*,3*R*,4*E*)-3-*O*-benzoyl-2-octadecanamido-4-octadecene-1,3-diol (64)

Ar 雰囲気下にて、化合物 **63** (157 mg, 58.3 μ mol) を CH_2Cl_2 (4.0 mL) に溶かし、0 $^\circ\text{C}$ にて TFAcOH (2.0 mL) を加え、1 時間撹拌した。反応終了を TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20:1$ 二回展開) にて確認後、satd NaHCO_3 を加えて反応を停止した。これを CHCl_3 で希釈し、 H_2O 、brine で洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20:1$) にて化合物 **64** (143 mg, quant.) を得た。

$[\alpha]_{\text{D}} +33.3^\circ$ (c 0.3, CHCl_3); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.13-7.33 (m, 21 H, 4 Ar, NH-9b), 5.92 (d, 1 H, $J_{2,\text{NH}} = 7.4$ Hz, NH-2e), 5.86 (dt, 1 H, $J_{4,5} = 15.3$ Hz, $J_{5,6} = J_{5,6'} = 6.8$ Hz, H-5^{Cer}), 5.73 (d, 1 H, $J_{2,\text{NH}} = 9.7$ Hz, NH^{Cer}), 5.55 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.5$ Hz, H-3^{Cer}), 5.44-5.39 (m, 3 H, H-2a, H-8b, H-4^{Cer}), 5.36 (d, 1 H, $J_{3,4} = 3.3$ Hz, H-4d), 5.34 (d, 1 H, $J_{3,4} = 3.4$ Hz, H-4e), 5.14-5.10 (m, 3 H, H-2c, H-2d, NH-5b), 5.02 (d, 1 H, $J_{1,2} = 8.3$ Hz, H-1e), 4.97 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 8.5$ Hz, H-3d), 4.95 (dd, 1 H, $J_{6,7} = 2.2$ Hz, $J_{7,8} = 8.1$ Hz, H-7b), 4.88 (d, 1 H, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, H-1a), 4.80 (td, 1 H, $J_{3\text{eq},4} = 4.5$ Hz, $J_{3\text{ax},4} = J_{4,5} = 11.6$ Hz, H-4b), 4.77-4.74 (m, 2 H, H-6a, H-3e), 4.61 (d, 1 H, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, H-1d), 4.41 (d, 1 H, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, H-1c), 4.39 (m, 1 H, H-2^{Cer}), 4.37 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.2$ Hz, $J_{3,4} = 2.6$ Hz, H-3a), 4.26 (dd, 1 H, $J_{5,6'} = 8.4$ Hz, $J_{\text{gem}} = 12.4$ Hz, H-6'a), 4.16-3.78 (m, 15 H, H-5a, H-5b, H-9b, H-

3c, H-4c, H-5d, H-6d, H-6'd, H-5e, H-6e, H-6'e, H-1^{Cer}, COOMe), 3.74 (d, 1 H, H-4a), 3.67 (dd, 1 H, $J_{5,6} = 10.7$ Hz, H-6b), 3.55-3.49 (m, 2 H, H-2e, H-1'^{Cer}), 3.23 (m, 1 H, H-6c), 3.07 (m, 1 H, H-5c), 3.04-2.96 (m, 2 H, H-6'c, H-9'b), 2.73 (m, 1 H, OH-6c), 2.57 (dd, 1 H, $J_{gem} = 13.1$ Hz, H-3eq-b), 2.13-1.73 (m, 40 H, 11 Ac, H-3ax-b, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}, $\text{NHCOCH}_2^{\text{Cer}}$, $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2^{\text{Cer}}$), 1.48-1.00 (m, 50 H, 25 CH_2^{Cer}), 0.99-0.83 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 172.6, 171.9, 171.5, 170.6, 170.5, 170.4, 170.3, 170.2, 170.1, 169.9, 169.2, 167.9, 166.3, 165.7, 165.5, 164.6, 158.1, 157.8, 138.3, 133.2, 133.1, 133.0, 130.8, 130.1, 129.9, 129.8, 129.8, 129.6, 129.4, 129.3, 129.3, 128.3, 128.3, 124.6, 116.9, 114.6, 113.5, 112.3, 101.5, 101.1, 99.7, 99.6, 98.2, 80.3, 77.6, 74.4, 74.2, 73.9, 73.8, 73.3, 72.6, 72.5, 71.8, 70.7, 70.6, 70.4, 70.1, 68.8, 68.6, 67.4, 67.0, 66.7, 66.2, 63.9, 62.6, 60.8, 59.5, 55.2, 54.2, 52.9, 50.2, 48.9, 39.0, 36.9, 36.5, 36.1, 32.6, 32.2, 31.8, 30.2, 29.9, 29.5, 29.4, 29.4, 29.1, 28.8, 26.9, 25.5, 23.5, 22.9, 22.6, 21.0, 20.7, 20.6, 20.5, 20.4, 19.6; HRMS (ESI) m/z found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 2472.0798, $\text{C}_{122}\text{H}_{167}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_{44}$ calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 2472.0798.

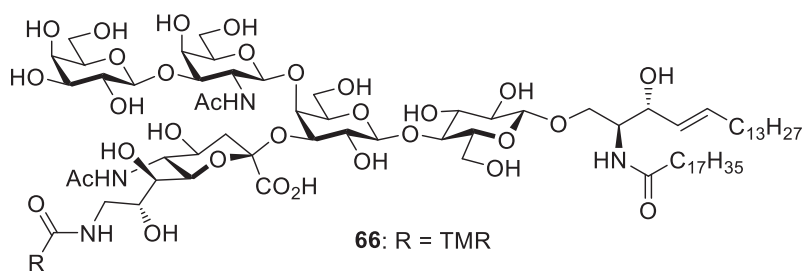


(β-D-Galactopyranosyl)-(1→3)-(2-acetamido-2-deoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-{(5-acetamido-9-amino-3,5,9-trideoxy-D-glycero-α-D-galacto-2-nonulopyranosylonic acid)-(2→3)}-(β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(β-D-glucopyranosyl)-(1→1)-(2S,3R,4E)-2-octadecanamido-4-octadecene-1,3-diol (65)

化合物 **64** (80.0 mg, 32.6 μmol) を MeOH/THF (3.0 mL/3.0 mL) に溶かし、28 w% NaOMe 触媒量を加え、50 °C にて超音波中で撹拌した。20 時間後 H₂O (0.5 mL) を加え、さらに 2 時間撹拌した。反応終了を TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/5\% \text{CaCl}_2 \text{ aq.} = 5:4:1$) で確認後、Muromac C101

を加え反応液を中和した。反応溶液を綿栓ろ過し、溶媒留去を行った後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/MeOH/H₂O = 5:3:0.2 to 5:4:0.5)で精製し、化合物 **65** (42.7 mg, 85%)を得た。

[α]_D +6.7° (*c* 0.7, CHCl₃/MeOH = 1:1); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 1:1) δ 5.70 (dt, 1 H, $J_{4,5}$ = 15.1 Hz, $J_{5,6}$ = $J_{5,6'}$ = 6.9 Hz, H-5^{Cer}), 5.46 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ = 6.9 Hz, H-4^{Cer}), 4.89-2.89 (m, 39 H, H-1a, H-2a, H-3a, H-4a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-4b, H-5b, H-6b, H-7b, H-8b, H-9b, H-9'b, H-1c, H-2c, H-3c, H-4c, H-5c, H-6c, H-6'c, H-1d, H-2d, H-3d, H-4d, H-5d, H-6d, H-6'd, H-1e, H-2e, H-3e, H-4e, H-5e, H-6e, H-6'e, H-1^{Cer}, H-1'^{Cer}, H-2^{Cer}, H-3^{Cer}), 2.75 (br dd, 1 H, H-3eq-b), 2.17 (t, 2 H, NHCOCH₂^{Cer}), 2.05-2.01 (m, 8 H, 2 Ac, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}), 1.87 (br t, 1 H, H-3ax-b), 1.59 (m, 2 H, NHCOCH₂CH₂^{Cer}), 1.36-1.27 (m, 50 H, 25 CH₂^{Cer}), 0.89 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 1:1) δ 174.0, 172.9, 172.8, 133.5, 129.0, 104.6, 103.2, 102.4, 102.0, 101.2, 80.8, 79.6, 76.3, 74.5, 74.3, 74.0, 73.5, 72.8, 72.8, 72.5, 71.2, 70.7, 70.5, 68.8, 68.3, 68.0, 67.2, 67.1, 61.3, 60.9, 59.9, 59.4, 52.6, 51.8, 50.8, 48.0, 47.8, 47.7, 47.5, 47.4, 47.2, 47.1, 42.7, 37.1, 35.6, 31.6, 31.2, 28.9, 28.9, 28.8, 28.7, 28.6, 28.6, 28.5, 25.3, 22.0, 21.9, 21.6, 21.1, 13.2, 12.9; HRMS (ESI) *m/z* found [M-H]⁻ 1543.8850, C₇₃H₁₃₂N₄O₃₀ calcd for [M-H]⁻ 1543.8848.



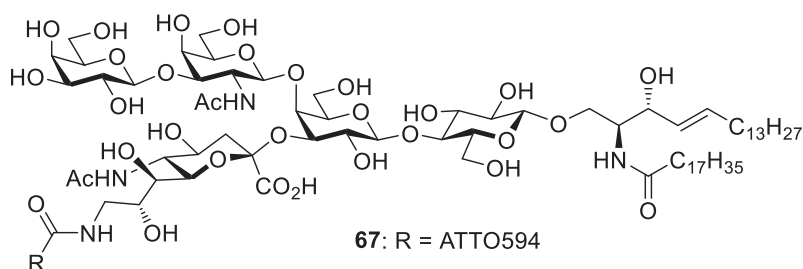
TMR-S9-GM1 (**66**)

Ar 雰囲気条件下にて化合物 **65** (2.6 mg, 1.7 μ mol)を MeOH/THF (300 μ L/300 μ L)に溶かし、TEA (6.7 μ L, 48 μ mol)、5-carboxy-tetramethylrhodamine *N*-succinimidyl ester (2.2 mg, 4.2 μ mol)を加え、室温にて 46 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH/5% CaCl₂ aq. =

5:4:0.8)で確認後、ゲルろ過クロマトグラフィー (LH-20, CHCl₃/MeOH = 1:1)、PTLC

(CHCl₃/MeOH/H₂O = 5:4:0.7)で精製し、**TMR-S9-GM1 (66)** (2.1 mg, 66%)を得た。

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 1:1) δ 8.56-6.81 (m, 9 H, 3 Ar^{TMR}), 5.68 (dt, 1 H, *J*_{4,5} = 15.2 Hz, *J*_{5,6} = *J*_{5,6'} = 6.8 Hz, H-5^{Cer}), 5.45 (dd, 1 H, *J*_{3,4} = 7.6 Hz, H-4^{Cer}), 4.76-3.17 (m, 51 H, H-1a, H-2a, H-3a, H-4a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-4b, H-5b, H-6b, H-7b, H-8b, H-9b, H-9'b, H-1c, H-2c, H-3c, H-4c, H-5c, H-6c, H-6'c, H-1d, H-2d, H-3d, H-4d, H-5d, H-6d, H-6'd, H-1e, H-2e, H-3e, H-4e, H-5e, H-6e, H-6'e, H-1^{Cer}, H-1'^{Cer}, H-2^{Cer}, H-3^{Cer}, 4 NMe^{TMR}), 2.72 (br dd, 1 H, H-3eq-b), 2.16 (t, 2 H, NHCOCH₂^{Cer}), 2.05-2.00 (m, 8 H, 2 Ac, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}), 1.90 (t, 1 H, *J*_{gem} = *J*_{3ax,4} = 11.6 Hz, H-3ax-b), 1.58 (m, 2 H, NHCOCH₂CH₂^{Cer}), 1.36-1.27 (m, 50 H, 25 CH₂^{Cer}), 0.89 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ¹³C NMR (200 MHz, CD₃OD) δ 175.9, 175.6, 175.3, 174.8, 172.3, 169.9, 162.1, 159.1, 158.8, 141.9, 139.2, 137.9, 136.9, 135.0, 132.7, 131.4, 130.9, 129.7, 129.6, 128.6, 126.1, 115.3, 115.3, 115.1, 114.8, 114.8, 106.5, 105.0, 104.4, 104.3, 103.4, 97.3, 97.2, 82.5, 81.4, 79.1, 76.5, 76.4, 76.3, 76.2, 76.1, 75.7, 75.1, 74.9, 74.6, 73.0, 72.6, 72.5, 71.5, 71.1, 70.2, 70.0, 69.8, 69.8, 63.0, 62.4, 61.8, 61.7, 57.7, 57.6, 57.5, 57.4, 54.7, 53.8, 52.6, 44.6, 40.9, 40.9, 40.8, 38.9, 37.4, 35.4, 33.5, 33.1, 33.1, 30.9, 30.9, 30.8, 30.8, 30.7, 30.7, 30.6, 30.5, 30.5, 30.4, 30.1, 27.2, 23.8, 23.8, 22.6, 17.4, 17.3, 17.2, 17.1, 14.5; HRMS (ESI) *m/z* found [M-H]⁻ 1956.0275, C₉₈H₁₅₄N₆O₃₄ calcd for [M-H]⁻ 1956.0277.

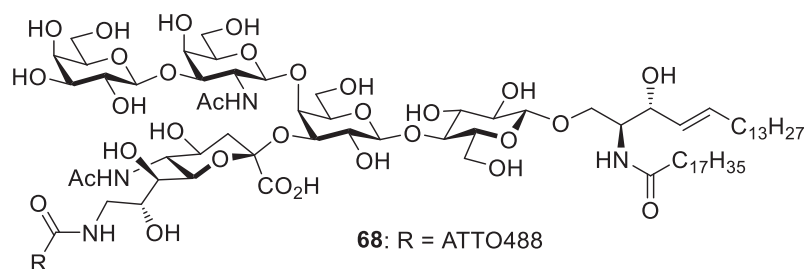


594-S9-GM1 (67)

Ar 雰囲気下、化合物 **65** (4.6 mg, 3.0 μmol)を MeOH/THF (300 μL/300 μL)に溶かし、TEA (12.3 μL, 89.1 μmol)、ATTO594 *N*-succinimidyl ester (6.2 mg, 4.5 μmol)を加え、室温にて 6 時

間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH/5% CaCl₂ aq. = 5:4:1)で確認後、ゲルろ過クロマトグラフィー (LH-20, CHCl₃/MeOH = 1:1)、PTLC (CHCl₃/MeOH/H₂O = 5:4:0.5)で精製し、**594-S9-GM1 (67)** (5.0 mg, 73%)を得た。

¹H NMR (800 MHz, CD₃OD) δ 7.74-7.47 (m, 4 H, Ar^{ATTO594}), 7.36 (s, 1 H, Ar^{ATTO594}), 7.34 (s, 1 H, Ar^{ATTO594}), 6.79 (s, 1 H, Ar^{ATTO594}), 6.78 (s, 1 H, Ar^{ATTO594}), 5.89 (s, 1 H, CH^{ATTO594}), 5.88 (s, 1 H, CH^{ATTO594}), 5.68 (dt, 1 H, $J_{4,5} = 15.2$ Hz, $J_{5,6} = J_{5,6'} = 6.7$ Hz, H-5^{Cer}), 5.44 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 7.8$ Hz, H-4^{Cer}), 4.57-2.98 (m, 49 H, H-1a, H-2a, H-3a, H-4a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-4b, H-5b, H-6b, H-7b, H-8b, H-9b, H-9'b, H-1c, H-2c, H-3c, H-4c, H-5c, H-6c, H-6'c, H-1d, H-2d, H-3d, H-4d, H-5d, H-6d, H-6'd, H-1e, H-2e, H-3e, H-4e, H-5e, H-6e, H-6'e, H-1^{Cer}, H-1'^{Cer}, H-2^{Cer}, H-3^{Cer}, 3 NCH₂^{ATTO594}, 2 CH₂SO₃^{ATTO594}), 2.75 (dd, 1 H, $J_{\text{gem}} = 12.5$ Hz, $J_{3eq,4} = 4.6$ Hz, H-3eq-b), 2.70/2.64 (s, 3 H, NMe^{ATTO594}), 2.17 (t, 2 H, NHCOCH₂^{Cer}), 2.15-1.97 (m, 8 H, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}, 2 Ac), 1.87 (dd, 1 H, $J_{3ax,4} = 11.7$ Hz, H-3ax-b), 1.83-1.81 (m, 16 H, NHCOCH₂CH₂^{Cer}, NCH₂CH₂CH₂^{ATTO594}, 4 Me^{ATTO594}), 1.67-1.29 (m, 58 H, 25 CH₂^{Cer}, NCH₂CH₂^{ATTO594}, 2 NCH₂CH₃^{ATTO594}), 0.91 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ¹³C NMR (200 MHz, CD₃OD) δ 176.0, 175.5, 175.1, 174.8, 171.6, 171.1, 159.2, 159.2, 159.1, 155.0, 154.9, 154.2, 154.2, 138.4, 137.6, 137.3, 135.1, 132.2, 131.7, 131.4, 131.2, 130.7, 130.5, 128.8, 126.1, 126.0, 124.3, 124.3, 124.2, 122.9, 122.9, 115.0, 115.0, 106.6, 105.0, 104.5, 104.2, 103.1, 97.1, 97.1, 82.8, 81.2, 78.9, 76.6, 76.5, 76.4, 76.1, 76.1, 75.8, 75.0, 74.9, 74.6, 73.0, 72.5, 71.8, 71.0, 71.0, 70.3, 70.0, 69.9, 69.7, 69.6, 62.8, 62.7, 62.5, 61.8, 61.7, 61.7, 54.7, 53.9, 53.9, 53.8, 52.7, 52.2, 43.6, 43.5, 41.4, 41.3, 39.1, 38.7, 37.4, 33.8, 33.5, 33.3, 33.1, 33.1, 32.6, 30.9, 30.9, 30.8, 30.8, 30.8, 30.7, 30.7, 30.5, 30.5, 30.4, 29.5, 29.5, 29.3, 29.3, 27.2, 23.8, 23.8, 23.7, 22.8, 22.7, 14.5, 13.8, 13.8, 13.7, 11.6; HRMS (ESI) m/z found [M-2H]²⁻ 1165.0689, C₁₁₄H₁₇₉N₇O₃₉S₂ calcd for [M-2H]²⁻ 1165.0689.

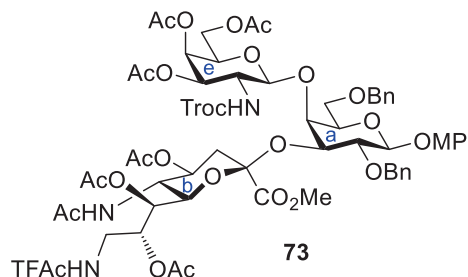


488-S9-GM1 (68)

Ar 雰囲気下、化合物 **65** (5.2 mg, 3.4 μ mol) を MeOH/THF (300 μ L/300 μ L) に溶かし、TEA (9.2 μ L, 67 μ mol)、ATTO488 *N*-succinimidyl ester (5.0 mg, 5.1 μ mol) を加え、室温にて 3.5 時間撹拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH/5% CaCl₂ aq. = 5:4:1) で確認後、ゲルろ過クロマトグラフィー (LH-20, CHCl₃/MeOH = 1:1)、PTLC (CHCl₃/MeOH/H₂O = 5:4:1) で精製し、**488-S9-GM1 (68)** (5.3 mg, 75%) を得た。

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 1:1) δ 7.74-6.94 (m, 8 H, 3 Ar^{ATTO488}), 5.69 (dt, 1 H, $J_{4,5}$ = 15.2 Hz, $J_{5,6}$ = $J_{5,6'}$ = 6.8 Hz, H-5^{Cer}), 5.44 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ = 7.5 Hz, H-4^{Cer}), 4.46-2.76 (m, 45 H, H-1a, H-2a, H-3a, H-4a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-3eq-b, H-4b, H-5b, H-6b, H-7b, H-8b, H-9b, H-9'b, H-1c, H-2c, H-3c, H-4c, H-5c, H-6c, H-6'c, H-1d, H-2d, H-3d, H-4d, H-5d, H-6d, H-6'd, H-1e, H-2e, H-3e, H-4e, H-5e, H-6e, H-6'e, H-1^{Cer}, H-1'^{Cer}, H-2^{Cer}, H-3^{Cer}, NMe^{ATTO488}, NCH₂^{ATTO488}), 2.17 (t, 2 H, NHCOCH₂^{Cer}), 2.01-1.58 (m, 15 H, H-3ax-b, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}, 2 CH₂^{ATTO488}, NHCOCH₂CH₂^{Cer}, 2 Ac), 1.37-1.18 (m, 50 H, 25 CH₂^{Cer}), 0.99-0.88 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 1:1) δ 179.7, 175.0, 162.5, 157.4, 156.6, 151.8, 144.1, 138.9, 137.9, 134.7, 129.7, 121.1, 119.9, 104.4, 103.3, 103.0, 101.7, 96.3, 84.6, 75.2, 73.7, 72.4, 70.7, 70.2, 69.8, 69.0, 68.7, 67.2, 61.9, 61.2, 60.0, 54.3, 53.6, 45.8, 42.3, 39.2, 36.8, 32.8, 31.5, 26.3, 10.1; HRMS (ESI) *m/z* found [M-2H]²⁻ 1056.9750, C₉₈H₁₅₄N₇O₃₉S₂ calcd for [M-2H]²⁻ 1056.9750.

Neu9 位標識 GM2 プローブ



4-Methoxyphenyl {3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl)-β-D-galactopyranosyl}-(1→4)-{(methyl 5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-D-glycero-α-D-galacto-2-nonulopyranosylonate)-(2→3)}-2,6-di-*O*-benzyl-β-D-galactopyranoside (73)

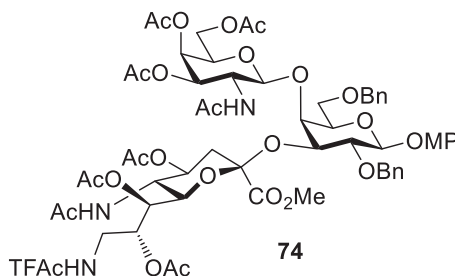
Ar 雰囲気下供与体 **69** (728 mg, 1.27 mmol) 及び受容体 **54** (300 mg, 0.316 mmol) を CH₂Cl₂ (16 mL) に溶解し、MS4Å (1.00 g) を加えた。室温にて 30 分攪拌した後、0 °C に冷却し、NIS (570 mg, 2.54 mmol) と TfOH (22.0 μL, 254 μmol) を加え、0 °C で 1 時間攪拌した。反応終了を TLC (toluene/AcOEt/MeOH = 1:1:0.1 二回展開) にて確認後、TEA で中和し、セライト濾過にて濾別した。濾液を CHCl₃ に希釈し satd Na₂S₂O₃、brine で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをゲルろ過クロマトグラフィー (LH-20, CHCl₃/MeOH = 1:1) で粗精製した。混合物を 2 時間真空乾燥した。

Ar 雰囲気下にて、残渣を AcOH/H₂O (16.0 mL/4.0 mL) に溶かし、50 °C にて 12 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 20:1 二回展開) で確認後、toluene 共沸し、2 時間真空乾燥した。

Ar 雰囲気下にて残渣を Pyr (6.0 mL) に溶解し、0 °C に冷却後無水酢酸 (149 μL, 1.58 mmol)、DMAP (3.8 mg, 32 μmol) を加え、室温にて 10 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 20:1 二回展開) にて確認後、MeOH を加えて過剰の試薬を分解した。toluene 共沸後、残渣を CHCl₃ に希釈し、有機層を 2 M HCl、H₂O、satd Na₂CO₃、brine の順

で洗浄した後、Na₂SO₄で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (CHCl₃/MeOH = 70:1)にて化合物 **73** (372 mg, 81%, 3 steps)を得た。

[α]_D +24.0° (*c* 0.3, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CD₃CN) δ 7.41 (m, 1 H, NH-9b), 7.40-6.73 (m, 14 H, 3 Ar), 6.06 (d, 1 H, *J*_{2,NH} = 9.2 Hz, NH-2e), 6.00 (d, 1 H, *J*_{5,NH} = 9.8 Hz, NH-5b), 5.24 (d, 1 H, *J*_{3,4} = 3.0 Hz, H-4e), 5.12 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 11.1 Hz, H-3e), 5.00-4.93 (m, 3 H, H-4b, H-7b, H-8b), 4.90 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 7.8 Hz, H-1a), 4.83 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 8.6 Hz, H-1e), 4.76 (d, 1 H, *J*_{gem} = 11.2 Hz, CH₂Ph), 4.55 (d, 1 H, CH₂Ph), 4.47 (d, 1 H, *J*_{gem} = 11.8 Hz, CH₂Ph), 4.41 (d, 1 H, CH₂Ph), 4.31 (br dd, 1 H, H-3a), 4.20 (t, 1 H, *J*_{5,6} = *J*_{5,6'} = 6.5 Hz, H-5e), 4.07-3.82 (m, 4 H, H-4a, H-5b, H-6e, H-6'e), 3.80-3.72 (m, 7 H, H-5a, H-6b, H-9b, H-2e, COOMe), 3.66-3.64 (m, 4 H, H-6a, MeO), 3.56-3.51 (m, 2 H, H-2a, H-6'a), 2.92 (m, 1 H, H-9'b), 2.30 (dd, 1 H, *J*_{3eq,4} = 5.1 Hz, *J*_{gem} = 13.6 Hz, H-3eq-b), 2.07-1.68 (m, 22 H, 7 Ac, H-3ax-b); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃CN) δ 172.3, 171.2, 171.1, 171.0, 170.9, 170.8, 170.7, 169.7, 158.5, 158.2, 156.2, 155.6, 152.4, 139.7, 139.7, 129.4, 129.2, 129.1, 128.6, 128.6, 128.5, 128.4, 119.1, 119.0, 115.8, 115.5, 102.9, 100.7, 96.9, 79.7, 79.2, 79.1, 76.3, 76.0, 75.1, 74.9, 74.0, 73.7, 72.8, 72.0, 71.2, 70.6, 70.3, 69.2, 68.4, 68.0, 62.5, 56.2, 54.2, 53.8, 49.3, 49.2, 39.6, 35.9, 23.1, 21.3, 21.2, 21.2, 21.0, 20.9, 20.9; HRMS (ESI) *m/z* found [M+Na]⁺ 1476.3348, C₆₂H₇₃Cl₃F₃N₃O₂₇ calcd for [M+Na]⁺ 1476.3347.



4-Methoxyphenyl (2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-
{(methyl 5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-D-glycero-α-D-

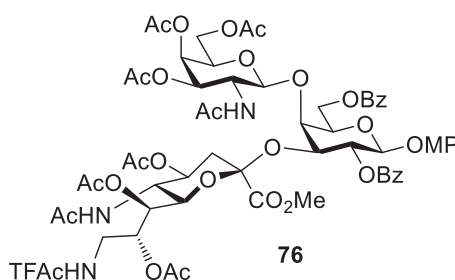
galacto-2-nonulopyranosylonate)-(2→3)}-2,6-di-O-benzyl-β-D-galactopyranoside (74)

Ar 雰囲気下にて、化合物 **73** (369 mg, 0.253 mmol)を AcOH/ClCH₂CH₂Cl (2.0 mL/8.0 mL)に溶かし、Zn 粉末 (1.90 g)を加え、40 °C にて 1.5 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 20:1 二回展開)で確認後、セライト濾過にて濾別した。濾液を toluene 共沸した後、残渣を CHCl₃ に希釈し、有機層を H₂O、satd Na₂CO₃、brine の順で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップを 2 時間真空乾燥した。

Ar 雰囲気下にて残渣を Pyr (6.0 mL)に溶解し、0 °C に冷却後無水酢酸 (72 μL, 0.76 mmol) と DMAP (3.1 mg, 25 μmol)を加え、室温にて 1.5 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 20:1 二回展開)にて確認後、MeOH を加えて過剰の試薬を分解した。toluene 共沸後、残渣を CHCl₃ に希釈し、有機層を 2 M HCl、H₂O、satd Na₂CO₃、brine の順で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (CHCl₃/MeOH = 65:1 to 55:1)にて化合物 **74** (270 mg, 81%, 2 steps)を得た。

[α]_D +16.0° (c 3.0, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz CD₃CN) δ 7.41 (m, 1 H, NH-9b), 7.39-6.73 (m, 14 H, 3 Ar), 6.32 (d, 1 H, *J*_{2,NH} = 9.5 Hz, NH-2e), 6.02 (d, 1 H, *J*_{5,NH} = 9.9 Hz, NH-5b), 5.22 (d, 1 H, *J*_{3,4} = 3.0 Hz, H-4e), 5.01 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 11.3 Hz, H-3e), 4.99-4.94 (m, 3 H, H-4b, H-7b, H-8b), 4.90 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 7.7 Hz, H-1a), 4.77 (d, 1 H, *J*_{gem} = 11.2 Hz, CH₂Ph), 4.71 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 8.6 Hz, H-1e), 4.56 (d, 1 H, CH₂Ph), 4.46 (d, 1 H, *J*_{gem} = 11.9 Hz, CH₂Ph), 4.40 (d, 1 H, CH₂Ph), 4.26 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 9.9 Hz, *J*_{3,4} = 2.9 Hz, H-3a), 4.12 (t, 1 H, *J*_{5,6} = *J*_{5,6'} = 6.6 Hz, H-5e), 4.06-3.92 (m, 4 H, H-5b, H-2e, H-6e, H-6'e), 3.82-3.71 (m, 7 H, H-4a, H-5a, H-6b, H-9b, COOMe), 3.65-3.62 (m, 4 H, H-6a, MeO), 3.52 (dd, 1 H, *J*_{5,6'} = 7.1 Hz, *J*_{gem} = 10.6 Hz, H-6'a), 3.48 (dd, 1 H, H-2a), 2.92 (m, 1 H, H-9'b), 2.39 (dd, 1 H, *J*_{3eq,4} = 5.2 Hz, *J*_{gem} = 13.7 Hz, H-3eq-b), 2.10-1.66 (m, 25 H, 8 Ac, H-3ax-b); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃CN) δ 172.3, 171.3, 171.2, 171.1, 170.9, 170.9, 170.8, 169.7, 158.5, 158.2,

156.2, 152.4, 139.8, 139.7, 129.3, 129.1, 128.6, 128.5, 128.4, 119.0, 115.5, 103.4, 103.1, 100.6, 79.5, 79.1, 79.0, 76.0, 75.9, 74.0, 73.7, 72.9, 72.0, 71.0, 70.8, 70.4, 69.3, 68.5, 67.9, 62.6, 56.2, 54.0, 51.0, 49.2, 39.6, 36.0, 23.6, 23.1, 21.3, 21.3, 21.0, 20.9, 20.9; HRMS (ESI) m/z found $[M+Na]^+$ 1344.4405, $C_{61}H_{74}F_3N_3O_{26}$ calcd for $[M+Na]^+$ 1344.4405.



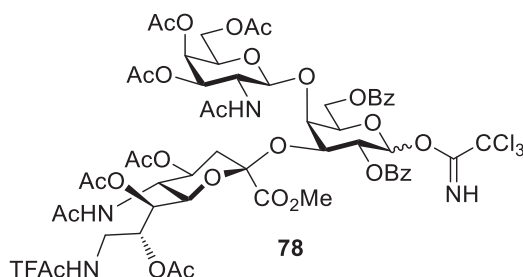
**4-Methoxyphenyl (2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-
 {(methyl 5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-D-glycero- α -D-
galacto-2-nonulopyranosylonate)-(2 $\rightarrow$ 3)}-2,6-di-*O*-benzoyl- β -D-galactopyranoside (**76**)**

化合物 **74** (268 mg, 202 μ mol) を 1,4-dioxane (6.7 mL) に溶解し、 $Pd(OH)_2 \cdot C$ (355 mg) を加え、水素気流下室温にて 3.5 時間攪拌した。反応終了を TLC ($CHCl_3/MeOH = 15:1$ 二回展開) にて確認後、固形物をセライトにて濾別して減圧濃縮した後、2 時間真空乾燥した。

得られたシラップを Ar 雰囲気下 Pyr (4.0 mL) に溶解し、0 $^{\circ}C$ に冷却後安息香酸無水物 (274 mg, 1.21 mmol)、DMAP (2.4 mg, 20 μ mol) を加え、室温にて 64 時間攪拌した。反応終了を TLC ($CHCl_3/MeOH = 20:1$ 二回展開) にて確認後、MeOH を加えて過剰の試薬を分解した。toluene 共沸後、残渣を $CHCl_3$ に希釈し、有機層を 2 M HCl、 H_2O 、satd Na_2CO_3 、brine の順で洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 ($CHCl_3/MeOH = 55:1$ to 45:1) にて化合物 **76** (262 mg, 96%, 2 steps) を得た。

$[\alpha]_D +30.0^{\circ}$ (c 0.5, $CHCl_3$); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.07-6.62 (m, 15 H, 3 Ar, NH-9b), 5.98 (d, 1 H, $J_{2,NH} = 7.7$ Hz, NH-2e), 5.66 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 11.2$ Hz, $J_{3,4} = 3.3$ Hz, H-3e), 5.59 (t, 1 H, $J_{1,2} =$

$J_{2,3} = 8.0$ Hz, H-2a), 5.38 (d, 1 H, H-4e), 5.25 (m, 1 H, H-8b), 5.18 (d, 1 H, $J_{5,\text{NH}} = 10.2$ Hz, NH-5b), 5.14 (d, 1 H, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, H-1e), 5.11 (d, 1 H, H-1a), 4.92-4.86 (m, 2 H, H-4b, H-7b), 4.72 (dd, 1 H, $J_{5,6} = 4.7$ Hz, $J_{\text{gem}} = 11.8$ Hz, H-6a), 4.53 (dd, 1 H, $J_{5,6'} = 7.2$ Hz, H-6'a), 4.38 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 2.8$ Hz, H-3a), 4.14-3.86 (m, 11 H, H-4a, H-5a, H-5b, H-9b, H-2e, H-5e, H-6e, H-6'e, COOMe), 3.73-3.71 (m, 4 H, H-6b, MeO), 2.72 (m, 1 H, H-9'b), 2.53 (dd, 1 H, $J_{3\text{eq},4} = 4.8$ Hz, $J_{\text{gem}} = 13.4$ Hz, H-3eq-b), 2.22-1.61 (m, 25 H, 8 Ac, H-3ax-b); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 172.4, 171.2, 170.8, 170.5, 170.3, 170.3, 170.0, 168.0, 166.2, 164.6, 158.1, 157.8, 155.5, 151.2, 133.3, 133.2, 129.9, 129.9, 129.9, 129.6, 128.5, 128.4, 118.8, 117.0, 114.7, 114.3, 100.8, 100.6, 98.3, 75.1, 73.8, 72.2, 72.0, 70.3, 70.1, 69.8, 68.7, 67.2, 67.0, 66.9, 63.8, 61.5, 55.5, 53.2, 52.1, 49.2, 38.3, 36.2, 31.9, 29.7, 29.3, 23.4, 23.0, 22.7, 21.0, 20.7, 20.7, 20.6, 20.5, 14.1; HRMS (ESI) m/z found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1372.3995, $\text{C}_{61}\text{H}_{70}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_{28}$ calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1372.3996.



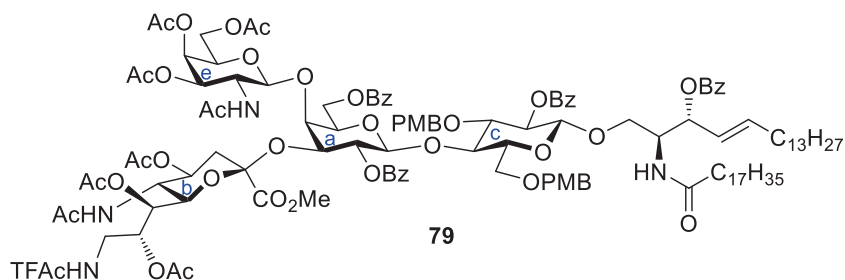
(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-{(methyl 5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-D-glycero-α-D-galacto-2-nonulopyranosylate)-(2→3)}-2,6-di-*O*-benzoyl-D-galactopyranosyl trichloroacetimidate (78)

Ar 雰囲気下にて、化合物 **76** (176 mg, 130 μmol) を MeCN/toluene/H₂O (1.2 mL/1.0 mL/0.6 mL) に溶解し、0 °C に冷却後、CAN (714 mg, 1.30 mmol) を加え、0 °C にて 1.5 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 20:1 二回展開) にて確認後、反応液を AcOEt に希釈し、有機層を H₂O、satd NaHCO₃、brine の順で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶

出溶媒(CHCl₃/MeOH = 55:1 to 45:1)にてヘミアセタール **77** (145 mg, 90%)を得た。

ヘミアセタール **77** (115 mg, 92.4 μmol)を Ar 雰囲気下 CH₂Cl₂ (2.0 mL)に溶解し、0 °C に冷却した後、CCl₃CN (186 μL, 1.85 mmol)、DBU (17 μL, 111 μmol)を加え、0 °C にて 1 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 20:1 二回展開)にて確認後、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (CHCl₃/MeOH = 55:1)にて化合物 **78** (114 mg, 89%, α:β = 20:1)を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.67 (s, 1 H, C=NH), 8.47-7.36 (m, 11 H, 2 Ar, NH-9b), 6.69 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 3.4 Hz, H-1a), 6.26 (d, 1 H, *J*_{2,NH} = 9.0 Hz, NH-2e), 5.66 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 10.7 Hz, H-2a), 5.44 (d, 1 H, *J*_{5,NH} = 9.8 Hz, NH-5b), 5.37 (d, 1 H, *J*_{3,4} = 2.9 Hz, H-4e), 5.18 (td, 1 H, *J*_{3eq,4} = 5.3 Hz, *J*_{3ax,4} = *J*_{4,5} = 11.0 Hz, H-4b), 5.12-5.08 (m, 2 H, H-8b, H-3e), 4.99 (dd, 1 H, *J*_{6,7} = 1.1 Hz, *J*_{7,8} = 10.2 Hz, H-7b), 4.90 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 8.7 Hz, H-1e), 4.86 (dd, 1 H, *J*_{5,6} = 3.4 Hz, *J*_{gem} = 12.3 Hz, H-6a), 4.77 (dd, 1 H, *J*_{3,4} = 2.7 Hz, H-3a), 4.51 (m, 1 H, H-5a), 4.48-4.40 (m, 2 H, H-6'a, H-2e), 4.36 (t, 1 H, *J*_{5,6} = *J*_{5,6'} = 6.6 Hz, H-5e), 4.33 (d, 1 H, H-4a), 4.20 (dd, 1 H, *J*_{gem} = 11.2 Hz, H-6e), 4.12 (q, 1 H, *J*_{5,6} = 10.4 Hz, H-5b), 4.07 (dd, 1 H, H-6'e), 3.94 (dd, 1 H, H-6b), 3.93-3.86 (m, 4 H, H-9b, COOMe), 3.05 (m, 1 H, H-9'b), 2.34-1.76 (m, 26 H, 8 Ac, H-3eq-b, H-3ax-b); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 207.1, 172.3, 170.7, 170.7, 170.5, 170.4, 169.3, 167.8, 166.7, 164.3, 160.0, 158.1, 157.8, 133.5, 133.4, 129.7, 129.6, 129.5, 129.0, 128.6, 128.4, 117.0, 114.7, 102.6, 99.0, 94.3, 91.0, 79.2, 72.6, 72.1, 71.7, 70.3, 70.2, 68.7, 67.7, 67.6, 67.4, 67.1, 64.9, 61.7, 53.5, 50.5, 49.4, 38.6, 35.6, 29.7, 29.3, 23.0, 22.9, 20.9, 20.8, 20.7, 20.7, 20.6; HRMS (ESI) *m/z* found [M+Na]⁺ 1409.2676, C₅₆H₆₄Cl₃F₃N₄O₂₇ calcd for [M+Na]⁺ 1409.2673.

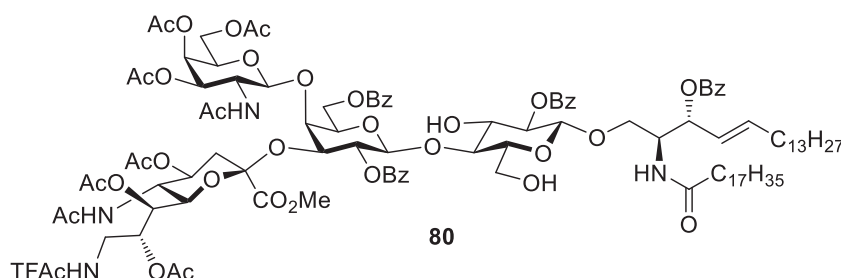


(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-{(methyl 5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylonate)-(2 $\rightarrow$ 3)}-2,6-di-*O*-benzoyl- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-*O*-benzoyl-3,6-di-*O*-(4-methoxybenzyl)- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 1)-(2*S*,3*R*,4*E*)-3-*O*-benzoyl-2-octadecanamido-4-octadecene-1,3-diol (79)

Ar 雰囲気下供与体 **78** (63.0 mg, 45.3 μ mol)及び受容体 **4** (80.1 mg, 68.1 μ mol)を CH₂Cl₂ (2.3 mL)に溶解し、MS AW-300 (150 mg)を加えた。室温にて 1 時間攪拌した後、0 °C に冷却し、TMSOTf (0.8 μ L, 4.5 μ mol)を加えて 1 時間攪拌した。反応終了を TLC (toluene/AcOEt/MeOH = 1:1:0.2 二回展開)にて確認後、セライト濾過にて濾別した。濾液を CHCl₃ に希釈し satd Na₂CO₃、brine で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (CHCl₃/MeOH = 80:1 to 65:1)にて化合物 **79** (94.8 mg, 88%)を得た。

$[\alpha]_D +31.9^\circ$ (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.04-6.71 (m, 29 H, 6 Ar, NH-9b), 5.94 (d, 1 H, $J_{2,NH} = 8.5$ Hz, NH-2e), 5.77 (dt, 1 H, $J_{4,5} = 15.2$ Hz, $J_{5,6} = J_{5,6'} = 6.8$ Hz, H-5^{Cer}), 5.71 (d, 1 H, $J_{2,NH} = 9.2$ Hz, NH^{Cer}), 5.47 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 7.1$ Hz, H-3^{Cer}), 5.42-5.34 (m, 4 H, H-2a, H-3e, H-4e, H-4^{Cer}), 5.24 (d, 1 H, $J_{5,NH} = 10.0$ Hz, NH-5b), 5.47 (t, 1 H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 8.3$ Hz, H-2c), 5.12 (m, 1 H, H-8b), 4.98 (td, 1 H, $J_{3eq,4} = 4.9$ Hz, $J_{3ax,4} = J_{4,5} = 11.2$ Hz, H-4b), 4.96 (d, 1 H, $J_{1,2} = 8.4$ Hz, H-1e), 4.91 (dd, 1 H, $J_{6,7} = 1.5$ Hz, $J_{7,8} = 10.3$ Hz, H-7b), 4.88-4.86 (m, 2 H, H-1a, CH₂Ph), 6.67 (dd, 1 H, $J_{5,6} = 5.7$ Hz, $J_{gem} = 11.6$ Hz, H-6a), 4.60 (d, 1 H, $J_{gem} = 10.4$ Hz, CH₂Ph), 4.36 (d, 1 H, H-1c), 4.35-4.32 (m, 2 H, H-2^{Cer}, CH₂Ph), 4.25 (m, 1 H, H-2e), 4.22-4.01 (m, 9 H, H-3a, H-6'a, H-5b,

H-4c, H-6c, H-6e, H-6'e, H-1^{Cer}, CH₂Ph), 3.99 (d, 1 H, $J_{3,4} = 2.4$ Hz, H-4a), 3.92 (m, 1 H, H-9b), 3.85 (s, 3 H, COOMe), 3.81 (t, 1 H, $J_{3,4} = 8.9$ Hz, H-3c), 3.73 (dd, 1 H, $J_{5,6} = 10.7$ Hz, H-6b), 3.71-3.67 (m, 8 H, H-5a, H-5e, 2 MeO), 3.54-3.44 (m, 2 H, H-6'c, H-1'^{Cer}), 3.31 (m, 1 H, H-5c), 2.84 (m, 1 H, H-9'b), 2.20-1.65 (m, 32 H, H-3eq-b, H-3ax-b, 8 Ac, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}, NHCOCH₂^{Cer}, NHCOCH₂CH₂^{Cer}), 1.47-1.00 (m, 50 H, 25 CH₂^{Cer}), 0.89-0.83 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 172.6, 172.2, 170.6, 170.6, 170.6, 170.5, 170.5, 169.6, 167.9, 166.2, 165.3, 165.1, 164.1, 159.0, 158.9, 158.1, 157.8, 157.5, 137.0, 133.3, 133.3, 132.7, 130.5, 130.3, 129.8, 129.7, 129.6, 129.5, 129.5, 128.9, 128.6, 128.5, 128.2, 124.8, 117.0, 114.7, 113.6, 113.5, 101.8, 101.0, 100.2, 98.8, 80.0, 76.9, 76.4, 75.5, 74.6, 74.5, 74.1, 73.7, 73.1, 72.3, 72.2, 71.1, 70.8, 70.1, 68.7, 67.8, 67.3, 67.1, 67.0, 63.7, 61.4, 55.1, 55.0, 53.3, 51.2, 50.4, 49.1, 38.4, 37.1, 36.4, 35.7, 32.7, 32.3, 30.0, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.2, 29.2, 28.9, 27.1, 25.5, 23.2, 23.0, 20.8, 20.7, 20.7, 20.7, 20.7, 20.5, 19.7; HRMS (ESI) m/z found [M+Na]⁺ 2424.1098, C₁₂₆H₁₆₇F₃N₄O₃₈ calcd for [M+Na]⁺ 2424.1097.

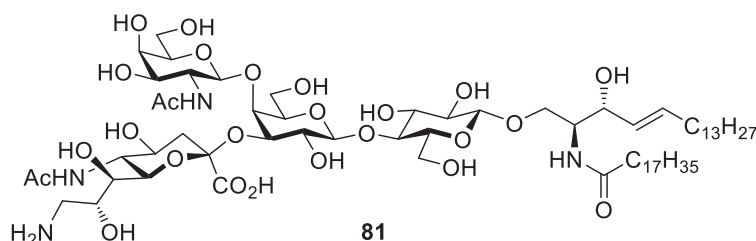


(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-{(methyl 5-acetamido-4,7,8-tri-O-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-D-glycero-α-D-galacto-2-nonulopyranosylate)-(2→3)}-2,6-di-O-benzoyl-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyl-(1→1)-(2S,3R,4E)-3-O-benzoyl-2-octadecanamido-4-octadecene-1,3-diol (80)

Ar 雰囲気下にて、化合物 **79** (80.9 mg, 33.6 μmol)を CH₂Cl₂ (2.0 mL)に溶かし、0 °C にて TFAcOH (1.0 mL)を加え、1 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 20:1 二回展開)にて確認後、satd NaHCO₃ を加えて反応を停止した。これを CHCl₃ で希釈し、H₂O、brine

で洗浄した後、Na₂SO₄で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (CHCl₃/MeOH = 20:1)にて化合物 **80** (69.7 mg, 96%)を得た。

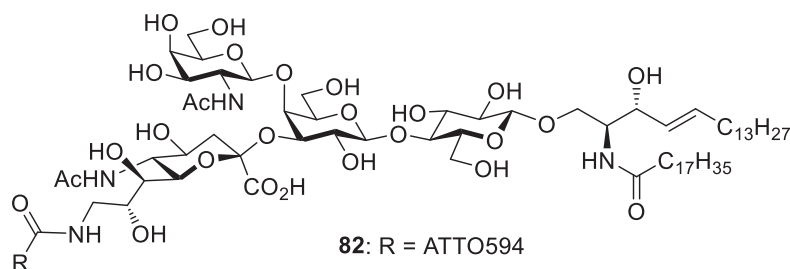
[α]_D +38.5° (*c* 0.3, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.10-7.27 (m, 21 H, 4 Ar, NH-9b), 6.01 (d, 1 H, *J*_{2,NH} = 8.5 Hz, NH-2e), 5.87 (dt, 1 H, *J*_{4,5} = 15.3 Hz, *J*_{5,6} = *J*_{5,6'} = 6.7 Hz, H-5^{Cer}), 5.76 (d, 1 H, *J*_{2,NH} = 9.7 Hz, NH^{Cer}), 5.55 (t, 1 H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} = 8.6 Hz, H-3^{Cer}), 5.44-5.39 (m, 3 H, H-2a, H-4^{Cer}, NH-5b), 5.35 (s, 1 H, H-4e), 5.30 (br dd, 1 H, H-3e), 5.14-5.11 (m, 2 H, H-8b, H-2c), 5.01 (td, 1 H, *J*_{3eq,4} = 5.2 Hz, *J*_{3ax,4} = *J*_{4,5} = 11.0 Hz, H-4b), 4.98 (dd, 1 H, *J*_{6,7} = 1.4 Hz, *J*_{7,8} = 10.4 Hz, H-7b), 4.90 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 8.6 Hz, H-1e), 4.86 (dd, 1 H, *J*_{5,6} = 2.7 Hz, *J*_{gem} = 12.6 Hz, H-6a), 4.78 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 8.0 Hz, H-1a), 4.46-4.39 (m, 2 H, H-1c, H-2^{Cer}), 4.36-4.22 (m, 4 H, H-3a, H-6'a, H-3c, H-2e), 4.16 (dd, 1 H, *J*_{5,6'} = 6.6 Hz, *J*_{gem} = 11.2 Hz, H-6e), 4.12-4.03 (m, 2 H, H-5b, H-6'e), 3.96-3.91 (m, 4 H, H-4a, H-5a, H-9b, H-5e), 3.86-3.81 (m, 5 H, H-4c, H-1^{Cer}, COOMe), 3.76 (dd, 1 H, *J*_{5,6} = 11.9 Hz, H-6b), 3.51 (dd, 1 H, *J*_{1',2} = 3.3 Hz, *J*_{gem} = 9.4 Hz, H-1'^{Cer}), 3.21-3.03 (m, 3 H, H-5c, H-6c, H-9'b), 2.93 (br dd, 1 H, H-6'c), 2.76 (br dd, 1 H, OH-6c), 2.23-1.52 (m, 30 H, 8 Ac, H-3eq-b, H-3ax-b, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}, NHCOCH₂^{Cer}), 1.46-1.41 (m, 2 H, NHCOCH₂CH₂^{Cer}), 1.30-1.00 (m, 50 H, 25 CH₂^{Cer}), 0.89-0.84 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 172.6, 172.2, 170.9, 170.6, 170.5, 170.4, 170.4, 169.7, 167.8, 166.6, 165.8, 165.7, 164.1, 158.1, 157.8, 138.5, 133.3, 133.2, 133.1, 133.0, 130.0, 130.0, 130.0, 129.9, 129.7, 129.5, 129.3, 129.1, 128.4, 128.3, 124.7, 116.9, 114.7, 112.4, 101.8, 101.7, 99.7, 99.0, 80.6, 73.9, 73.8, 73.8, 73.0, 72.3, 72.3, 70.9, 70.1, 69.8, 68.7, 67.4, 67.2, 67.1, 66.1, 64.2, 61.7, 59.5, 53.4, 50.9, 50.3, 49.1, 38.6, 37.1, 36.6, 35.5, 32.2, 31.9, 30.0, 29.7, 29.6, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 28.8, 27.0, 25.5, 23.1, 23.0, 22.6, 20.9, 20.8, 20.7, 20.7, 20.6, 20.5, 14.1; HRMS (ESI) *m/z* found [M+Na]⁺ 2183.9947, C₁₁₀H₁₅₁F₃N₄O₃₆ calcd for [M+Na]⁺ 2183.9947.



(2-acetamido-2-deoxy- β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-{(5-acetamido-9-amino-3,5,9-trideoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylonic acid)-(2 $\rightarrow$ 3)}-(β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(β -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 1)-(2*S*,3*R*,4*E*)-2-octadecanamido-4-octadecene-1,3-diol (81**)**

化合物 **80** (42.2 mg, 19.5 μ mol) を MeOH/THF (3.0 mL/3.0 mL) に溶かし、1 M NaOH 水溶液 (390 μ L) を加え、室温にて 85 時間攪拌した。反応終了を TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/5\% \text{ CaCl}_2 \text{ aq.} = 5:4:1$) で確認後、Muromac C101 を加え反応液を中和した。反応溶液を綿栓ろ過し、溶媒除去を行った後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 5:2.5:0.2$ to $5:4:0.35$) で精製し、化合物 **81** (23.6 mg, 88%) を得た。

$[\alpha]_{\text{D}} +12.7^\circ$ (c 1.9, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 1:1$); ^1H NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD} = 1:1$) δ 5.69 (dt, 1 H, $J_{4,5} = 15.2$ Hz, $J_{5,6} = J_{5,6'} = 6.7$ Hz, H-5^{Cer}), 5.45 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 7.7$ Hz, H-4^{Cer}), 4.86-2.93 (m, 32 H, H-1a, H-2a, H-3a, H-4a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-4b, H-5b, H-6b, H-7b, H-8b, H-9b, H-9'b, H-1c, H-2c, H-3c, H-4c, H-5c, H-6c, H-6'c, H-1e, H-2e, H-3e, H-4e, H-5e, H-6e, H-6'e, H-1^{Cer}, H-1'^{Cer}, H-2^{Cer}, H-3^{Cer}), 2.79 (dd, 1 H, $J_{3eq,4} = 4.6$ Hz, $J_{\text{gem}} = 12.6$ Hz, H-3eq-b), 2.18 (t, 2 H, $\text{NHCOCH}_2^{\text{Cer}}$), 2.10-2.01 (m, 8 H, 2 Ac, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}), 1.87 (t, 1 H, $J_{3ax,4} = 12.6$ Hz, H-3ax-b), 1.59 (m, 2 H, $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2^{\text{Cer}}$), 1.38-1.15 (m, 50 H, 25 CH_2^{Cer}), 0.86 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD} = 1:1$) δ 175.6, 174.6, 174.3, 135.0, 130.7, 104.8, 104.0, 103.6, 102.6, 81.0, 76.2, 75.9, 75.6, 75.1, 74.4, 74.0, 72.7, 72.1, 70.5, 69.6, 69.4, 68.8, 68.7, 62.8, 61.4, 61.1, 54.3, 54.2, 53.4, 44.1, 38.9, 37.2, 33.2, 32.8, 32.7, 30.8, 30.5, 30.4, 30.4, 30.3, 30.2, 30.2, 30.2, 30.1, 26.9, 23.4, 23.4, 22.7, 14.4; HRMS (ESI) m/z found $[\text{M}-\text{H}]^-$ 1381.8325, $\text{C}_{67}\text{H}_{122}\text{N}_4\text{O}_{25}$ calcd for $[\text{M}-\text{H}]^-$ 1381.8325.



594-S9-GM2 (**82**)

Ar 雰囲気下、化合物 **81** (4.2 mg, 3.0 μ mol) を MeOH/THF (300 μ L/300 μ L) に溶かし、TEA (17.0 μ L, 0.12 mmol)、ATTO594 *N*-succinimidyl ester (6.3 mg, 4.6 μ mol) を加え、室温にて 2 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH/5% CaCl₂ aq. = 5:4:1) で確認後、ゲルろ過クロマトグラフィー (LH-20, CHCl₃/MeOH = 1:1)、PTLC (CHCl₃/MeOH/H₂O = 5:4:0.5) で精製し、**594-S9-GM2 (82)** (4.8 mg, 74%) を得た。

¹H NMR (800 MHz, CD₃OD) δ 7.74-7.48 (m, 4 H, Ar^{ATTO594}), 7.36-7.35 (2 s, 2 H, 2 Ar^{ATTO594}), 6.79 (s, 1 H, Ar^{ATTO594}), 6.78 (s, 1 H, Ar^{ATTO594}), 5.90-5.88 (2 s, 2 H, 2 CH^{ATTO594}), 5.68 (dt, 1 H, $J_{4,5}$ = 15.2 Hz, $J_{5,6}$ = $J_{5,6'}$ = 6.6 Hz, H-5^{Cer}), 5.45 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ = 7.8 Hz, H-4^{Cer}), 4.81-3.17 (m, 42 H, H-1a, H-2a, H-3a, H-4a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-4b, H-5b, H-6b, H-7b, H-8b, H-9b, H-9'b, H-1c, H-2c, H-3c, H-4c, H-5c, H-6c, H-6'c, H-1e, H-2e, H-3e, H-4e, H-5e, H-6e, H-6'e, H-1^{Cer}, H-1'^{Cer}, H-2^{Cer}, H-3^{Cer}, 3 NCH₂^{ATTO594}, 2 CH₂SO₃^{ATTO594}), 2.75 (dd, 1 H, $J_{3eq,4}$ = 4.3 Hz, J_{gem} = 12.2 Hz, H-3eq-b), 2.70/2.64 (s, 3 H, NMe^{ATTO594}), 2.17 (t, 2 H, NHCOCH₂^{Cer}), 2.04-1.97 (m, 8 H, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}, 2 Ac), 1.87 (t, 1 H, $J_{3ax,4}$ = 12.2 Hz, H-3ax-b), 1.81 (t, 2 H, NCH₂CH₂CH₂^{ATTO594}), 1.62-1.58 (m, 14 H, NHCOCH₂CH₂^{Cer}, 4 Me^{ATTO594}), 1.49-1.35 (m, 58 H, 25 CH₂^{Cer}, NCH₂CH₂^{ATTO594}, 2 NCH₂CH₃^{ATTO594}), 0.91 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ¹³C NMR (200 MHz, CD₃OD) δ 176.0, 175.5, 175.1, 174.9, 174.7, 171.1, 159.2, 159.1, 155.1, 155.0, 154.2, 154.2, 138.4, 137.7, 135.0, 132.2, 131.8, 131.7, 131.4, 131.1, 130.7, 130.6, 128.8, 126.1, 126.0, 124.3, 124.3, 124.2, 122.9, 122.9, 115.0, 115.0, 105.0, 104.5, 104.3, 103.1, 97.1, 97.1, 81.3, 78.8, 76.5, 76.2, 75.8, 75.0, 74.9, 74.2, 74.1, 73.0, 71.8, 71.1, 71.0, 70.0, 69.9, 69.8, 69.6, 62.7, 61.9, 61.8, 61.7, 61.7, 57.5, 54.8, 54.3, 53.9, 53.9, 49.9,

47.7, 43.6, 41.4, 41.3, 39.2, 38.7, 37.4, 33.8, 33.5, 33.4, 32.6, 30.6, 30.4, 29.5, 29.5, 29.3, 29.3, 27.2, 23.6, 22.8, 22.7, 13.8, 13.7; HRMS (ESI) m/z found $[M-2H]^{2-}$ 1084.0425, $C_{108}H_{167}N_7O_{34}S_2$ calcd for $[M-2H]^{2-}$ 1084.0425.

第二部

光反応性ガングリオシドプローブの開発

第一章 研究背景

第一部において、天然と性質が近似した蛍光ガングリオシドを開発し、生細胞膜上におけるその挙動を一分子観察実験により初めて捉えた。その中で、ラフト形成機構を解く足掛かりとなる重要な知見を得た。まず、GPI アンカー型受容体 (CD59) に対して、ガングリオシドが頻繁に共局在をすること。そして共局在時間の解析より、二量体以上の会合状態の GPI アンカー型受容体に対してのみガングリオシドが高い親和性を示すことが明らかになった。

さらに近年、定常状態における蛍光ガングリオシドの挙動を解析した結果、GM3、GM2、GM1 それぞれが単純ブラウン運動と、同種分子間における共局在を頻繁に繰り返す様子が観察された。(一分子観察実験においては、二分子の分子間距離が 240 nm 以内にある時に共局在と呼ぶこととする。) これは、ガングリオシドが頻繁にホモダイマー形成していることを示唆する (Figure 26)。しかも興味深いことに糖鎖構造が異なるガングリオシド間では有意な二量体形成が認められなかった (Figure 27)。さらに、蛍光分子の異なる同種ガングリオシド間 (ATTO594 と ATTO488 標識体) で FRET が観察されたことは、二つの分子の近接 (5.7 nm 以内) を示し、水素結合や疎水結合などの分子間相互作用によりホモダイマー化が誘起されていることを示唆している。

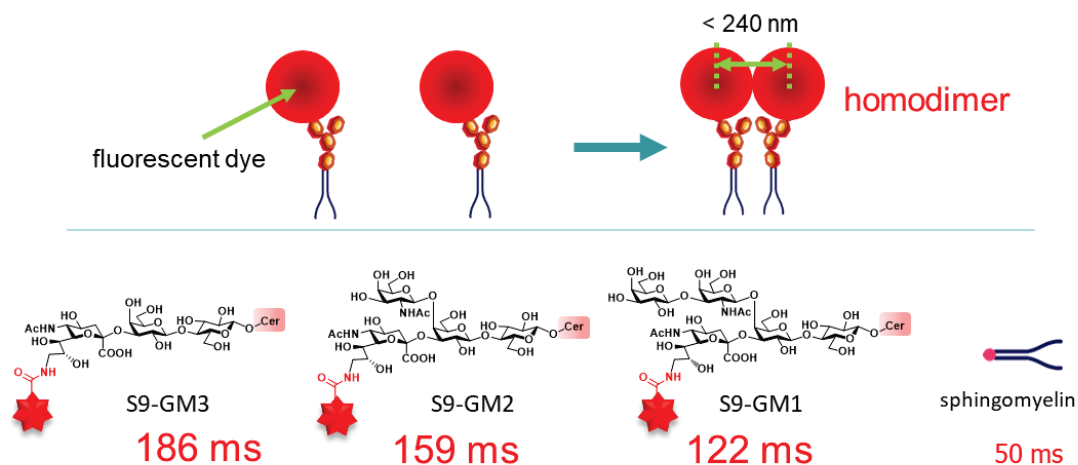


Figure 26. ホモダイマー形成の一分子観察

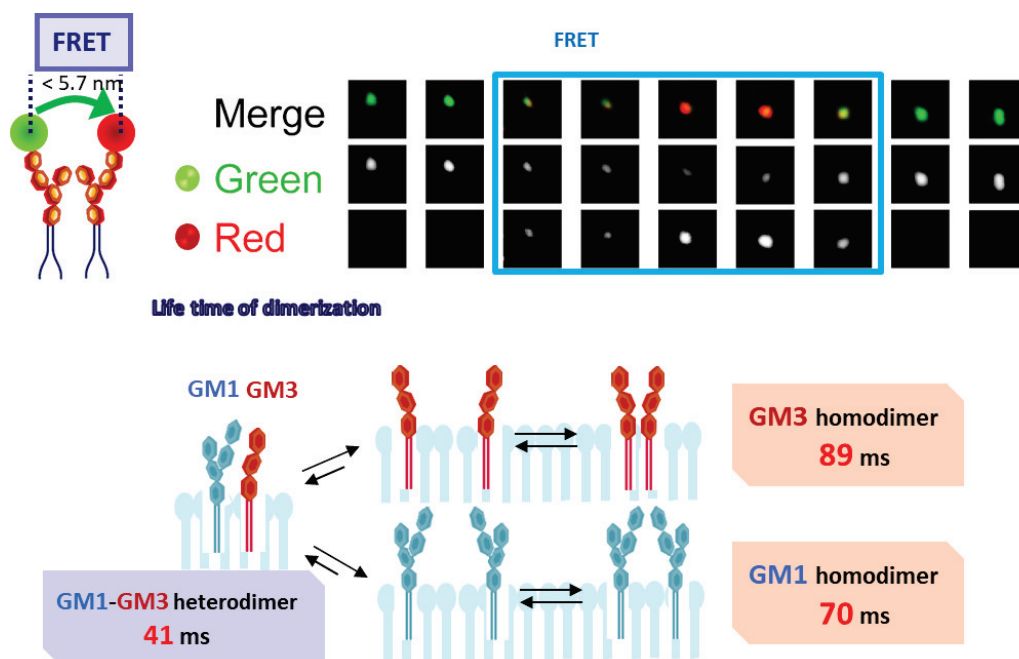


Figure 27. FRET によるホモダイマー形成の観察

これらの結果から想定されることは、定常状態でも頻繁に形成するガングリオシドのホモダイマーが脂質ラフト形成時の基本単位であり、刺激状態においてはガングリオシドホ

モダイマーとラフト関連分子の会合が頻繁に起きているという新たなラフト形成機構である。しかしながら、この仮説を一分子イメージングにより検証するためには解決すべき課題がある。それは、ガングリオシドとタンパク質の会合やガングリオシドホモダイマーの形成は短寿命であるため、このような可逆的相互作用をする会合体同士の集合、さらにはその集合体としての挙動を一分子観察により捉える事は困難を極めるという点である。

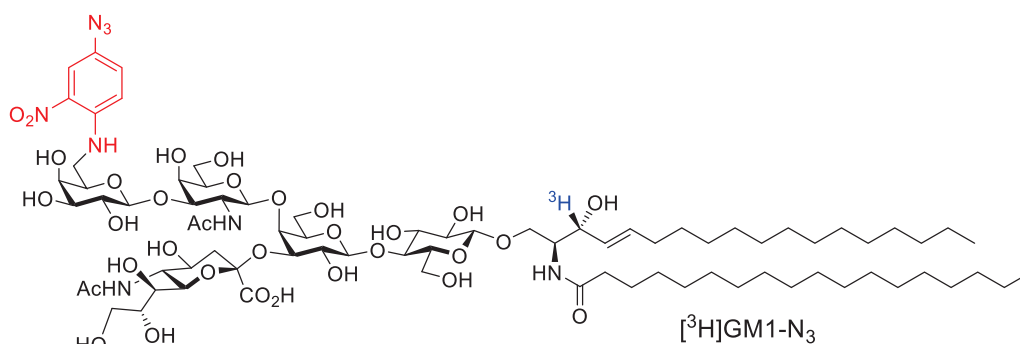
この課題を受け、第二部ではガングリオシドとラフト関連タンパク質、並びにガングリオシドホモダイマーといった会合体の可視化・細胞膜からの抽出を可能とすることを目指し、プローブの機能拡張を図った。すなわち、ガングリオシドに蛍光等の検出機能に加え、会合体の安定化能を付与した新たな二官能性ガングリオシドプローブの開発を試みることにした。

生細胞膜上で形成する会合体を安定化する方法として、光架橋法が有用であると考えた。1962年に Westheimer らが開発した光架橋法⁵¹は、タンパク質ーリガンド、タンパク質間の相互作用を調べる手法として現在まで広く利用されている⁵²。この手法は、架橋形成のために、光反応性基と呼ばれる官能基を予め結合させた分子プローブを用いるのが特徴である。この光反応性基に対して細胞膜上で UV 照射することによりカルベン等の高エネルギー活性種を発生するため、相互作用する生体分子を近接部位で安定な共有結合形成により連結できるというのが光架橋法の原理である。本手法を用いればガングリオシドに対する他の膜分子の可逆的な相互作用を不可逆的な結合で固定化できると考えた。一般的に光照射により生じた活性種の寿命は短く、近接する分子が存在しない場合は水と速やかに反応して失活するため、非特異的架橋を効果的に抑制できる優れた手法である。

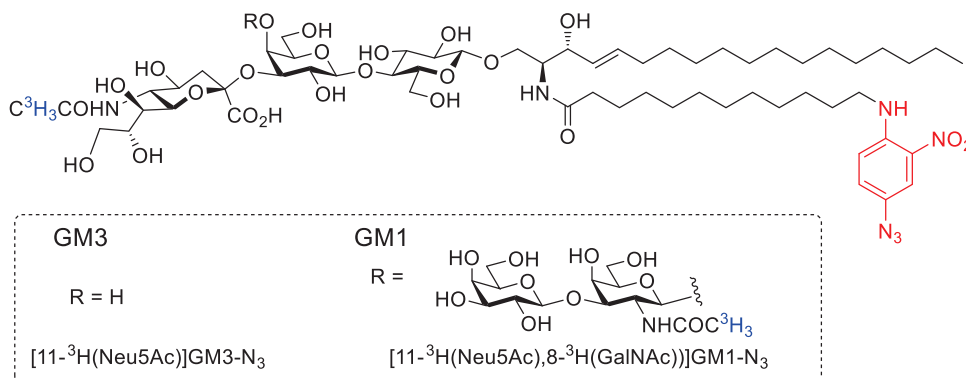
⁵¹ A. Singh, E. R. Thorton, F. H. J. Westheimer, *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 3006-3008.

⁵² a) J. T. Nguyen, M. Porter, M. Amoui, W. T. Miller, R. N. Zuckermann, W. A. Lim, *Chem. Biol.* **2000**, 7, 463-473. b) S. Blencke, A. Ullrich, H. Daub, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 15435-15440. c) X. Chen, H. H. Ye, R. Kuruvilla, N. Ramanan, K. W. Scangos, C. Zhang, N. M. Johnson, P. M. England, K. M. Shokat, D. D. Ginty, *Neuron* **2005**, 46, 13-21.

これまでに光反応性ガングリオシドの合成はいくつか報告がある。2004 年に Sonnino らはガングリオシドの糖鎖及び脂質にそれぞれ光反応性基の Nitrophenylazide 基、放射性同位元素 (^3H) を導入した GM1 プローブの合成について報告した⁵³ (Figure 28)。以下に構造を示す、 $[^3\text{H}]\text{GM1-N}_3$ を例に、彼らの合成アプローチを説明する。



S. Sonnino *et al. Glycoconjugate J.* **2004**, 21, 461-470.



S. Sonnino *et al. Glycoconjugate J.* **2004**, 20, 11-23.

Figure 28. Sonnino らの報告

⁵³ a) S. Prioni, L. Mauri, N. Loberto, R. Casellato, V. Chigorno, D. Karagogeos, A. Prinetti, S. Sonnino, *Glycoconjugate J.* **2004**, 21, 461-470. b) L. Mauri, S. Prioni, N. Loberto, V. Chigorno, A. Prinetti, S. Sonnino, *Glycoconjugate J.* **2004**, 20, 11-23.

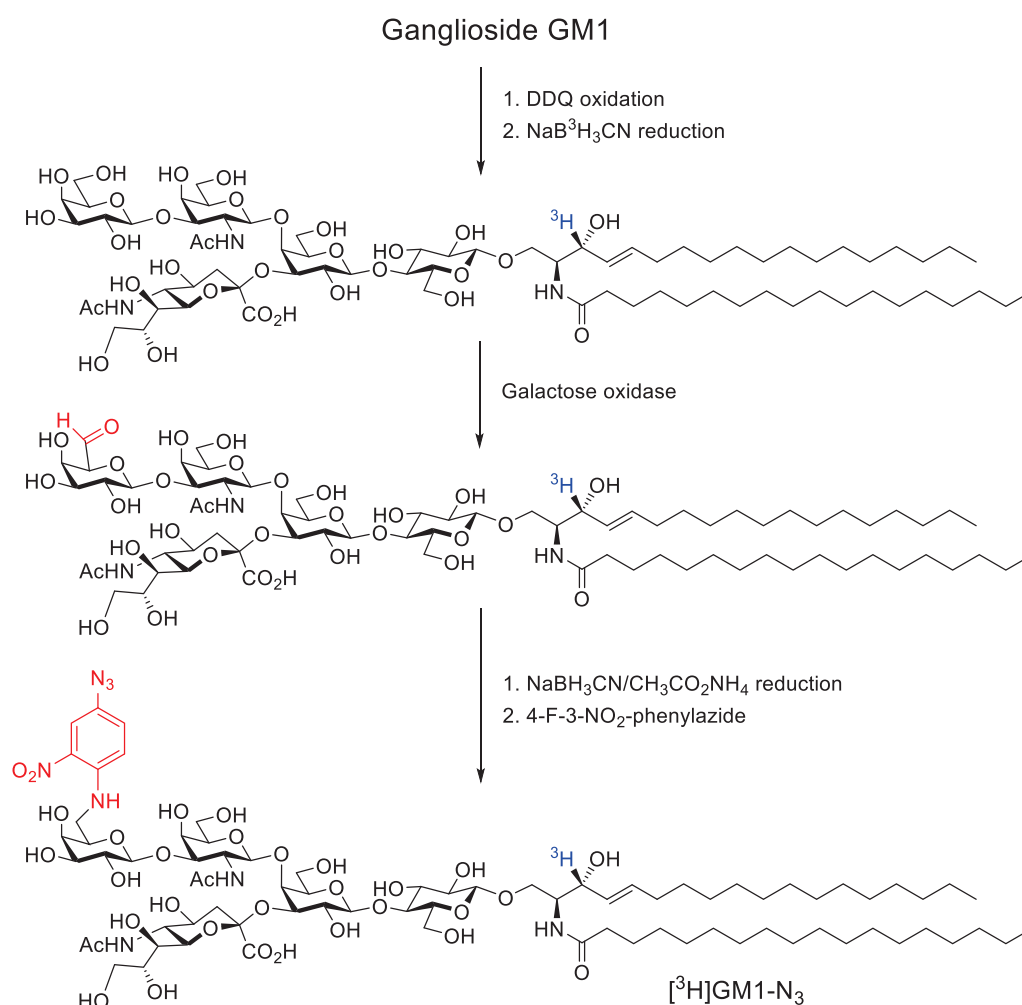


Figure 29. Sonninoらが開発した合成法

彼らは、天然より抽出した GM1 を原料とし、Sph3 位水酸基の選択的 DDQ 酸化、NaB³H₃CN によるヒドリド還元により 3 位トリチウム標識体を合成した (Figure 29)⁵⁴。続いて、還元末端 Gal6 位を Galactose oxidase により選択的にアルデヒドへ変換した後、還元的アミノ化、Nitrophenylazide 基を導入し、これによって、Gal6 位修飾型の二官能性 GM1 プローブ ([³H]GM1-N₃) の合成を初めて成し遂げた。そして小脳顆粒細胞上における [³H]GM1-N₃ の光架橋反応を行った結果、主要な結合分子の一つが GPI アンカー型タンパク質

⁵⁴ S. Sonnino, V. Chigorno, D. Acquotti, M. Pitto, G. Kirschner, G. Tettamanti, *Biochemistry*, **1989**, 28, 77-84.

TAG-1であることを同定した。同様の合成アプローチにより、彼らは GM1、GM3、GD1b 等の修飾法を確立した。また、同時期に Sandhoff らは GM2 の脂肪酸を TPD 修飾した分子プローブを作成し、光架橋反応により GM2 活性化タンパク質 (GM2AP) の捕捉、結合位置の特定に成功している⁵⁵ (Figure 30)。

さらに近年、畑中らは捕捉分子を効率的に釣り上げる手法として、光アフィニティービオチン化法 (Photoaffinity biotinylation)⁵⁶を開発した。この手法は対象分子にジアジリン基とビオチンを導入する事で、光反応後にビオチン-アビジンの強力な結合能 ($K_d = 10^{-15}$ M) を利用して会合体を取り出すことを可能としている。畑中らはこの手法をガングリオシドへ適用し、調製した lyso-GM1 に対して光反応性基とビオチンを導入した新たな光反応性ガングリオシドプローブを合成した⁵⁷ (Figure 30)。

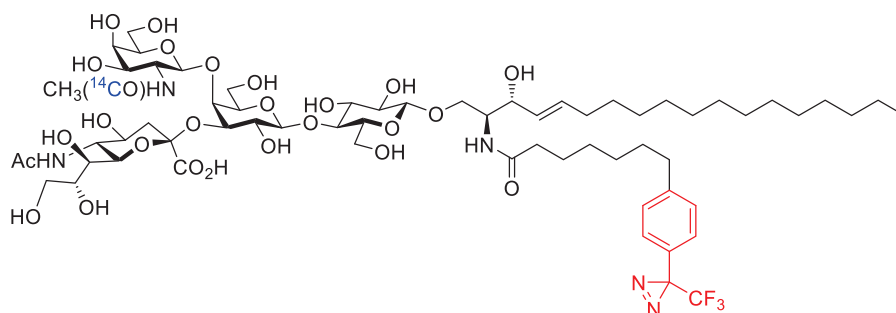
このように種々の報告はあるものの、糖鎖に対してビオチン及び蛍光色素を結合させた光反応性ガングリオシドは開発されていない。しかしながら、これまでに述べてきたように、脂質ラフト関連分子とガングリオシドの相互作用を解析する目的においては、脂質間相互作用を保持する必要がある。一方で、これらの手法を合成の観点から見ると、天然からの抽出物を原料とする化学酵素法は、化学合成と比較して、工程数が圧倒的に少なく簡便という大きな長所がある。しかしながら、抽出したガングリオシドは脂質構造が異なる類縁体を複数含むため、高純度の化合物を得ることが難しい事が問題点になり得る。さらに、多くの官能基の中から標的位置を選択的に官能基修飾し、光反応性基を導入する事は、反応位置の制御・化学的根拠に基づいた構造証明がともに困難である可能性が高い。

⁵⁵ M. Wendeler, J. Hoernschemeyer, D. Hoffmann, T. Kolter, G. Schwarzmann, K. Sandhoff, *Eur. J. Biochem.* **2004**, 271, 614-627.

⁵⁶ a) T. Tomohiro, M. Hashimoto, Y. Hatanaka, *Chem. Rec.* **2005**, 5, 385-395. b) Y. Hatanaka, M. Hashimoto, Y. Kanaoka, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, 2, 1367-1373. c) Y. Hatanaka, M. Hashimoto, Y. Kanaoka, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 453-454. d) M. Hashimoto, J. Yang, G. D. Holman, *Carbohydr. Res.* **2001**, 331, 119-127.

⁵⁷ M. Hashimoto, Y. Hatanaka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 650-652.

Sandhoffらの報告



畑中らの報告

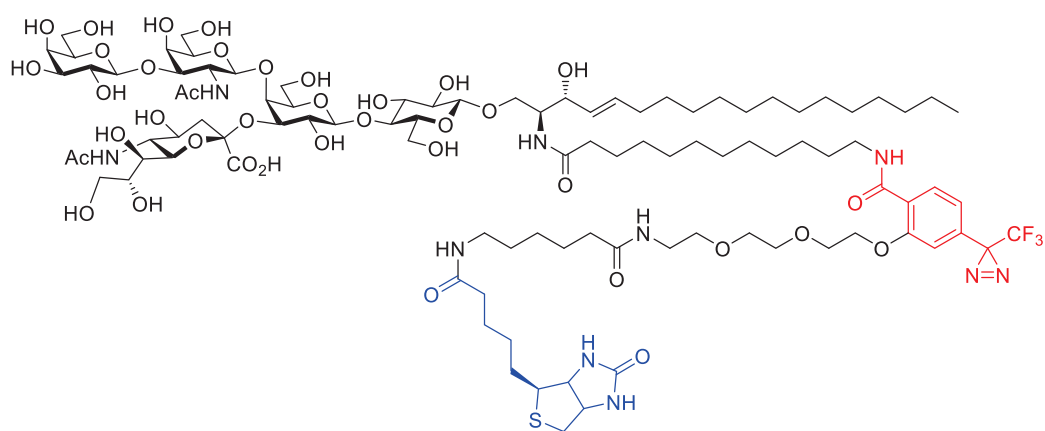


Figure 30. 既知の光反応性ガングリオシド

第二章 分子設計

本研究では、畑中らが開発した光アフィニティービオチン化法に基づき、光反応性基と検出基（ビオチン及び蛍光色素）の二種類の官能基が結合した、二官能性ガングリオシドプローブを設計した。

ケミカルバイオロジー研究において利用される代表的な光反応性基は、Aryl azide、

Benzophenone、Trifluoromethylphenyl diazirine (TPD) の三種類である⁵⁸ (**Figure 31**)。これらへの光照射により発生する活性種に対して、近接分子の求核部位 (主に C-H、NH₂、SH) が攻撃することにより結合形成される。従って水和反応は架橋反応の妨げとなるが、近接する分子が他に存在しない場合、未反応の活性種を速やかに失活させるため、結合形成の高特異性に寄与する。

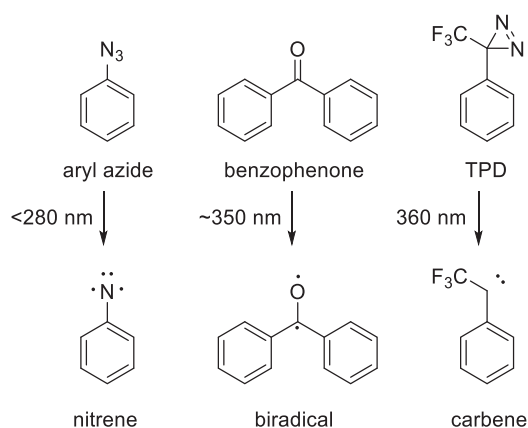


Figure 31. 典型的な光反応性基

Aryl azide は、三種類の中で構造が最も小さい利点をもつ。しかし、活性種の一重項窒素を発生させる為に 300 nm 未満の短波長の光源が必要である。これにより、生体分子への光化学的な損傷がしばしば問題となる他、光源波長がタンパク質の吸収波長に近い点が欠点とされる。一方、Benzophenone は 350 nm 以上の長波長の UV 照射により、活性種の一重項カルボニルを生じるため、短波長の光源を必要としない長所がある。さらに、この活性種は架橋可能な分子が存在しない場合、基底状態に戻る事が可能である。そのため、架橋収率が良い反面、非特異的結合の抑制効果が低く、反応の完結に長時間を要する欠点がある。一方で 1980 年に Brunner ら⁵⁹によって開発された TPD は 350 nm 以上の UV 照射により瞬時に

⁵⁸ M. Hashimoto, Y. Hatanaka, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2008, 2513-2523.

⁵⁹ J. Brunner, H. Senn, F. M. Richards, *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 3313-3318.

活性種カルベンを発生する。この活性種は、ジアジリン炭素に結合したトリフルオロメチル基により求電子性が非常に高いため、CH 挿入生成物も収率良く与えることが報告されている。さらに、高い特異性を示すことから、三種の中でも特に高効率性の光反応性基とされている。これらの特長に加えて、TPD 基は種々の化学反応に耐性があり、また芳香環部分の修飾・誘導化も可能であることから、対象分子に二官能基を付与するという本研究の目的においても有用であると考えられる。

分子設計において、光反応性基の導入位置が考慮すべき点となる。収率良く架橋体を得るためには、他のガングリオシド親和性分子との近接部位付近に光反応性基を導入する事が望ましいと考えられる。そこで、細胞膜上の膜分子は親水性部分の水素結合又は脂溶性部分の疎水結合のいずれかにより他の分子と近接することを念頭に、糖鎖部分または脂質部分に光反応性基を導入した二種類のプローブの設計について考えることとした。これら二種類を化学合成することで、相互作用部位に合わせたプローブの使い分けも可能と期待した。一方、検出基としては一分子観察実験を目的とした蛍光色素、及び会合分子の抽出を指向したビオチンを選択した。これらの標識位置については、第一部の結果に準じ、糖鎖の末端に設定することとした (Figure 32)。この研究コンセプトの成否の検証を目的に、まずは取り掛かりとして構造が最も単純な GM3 を対象に分子設計を行った。

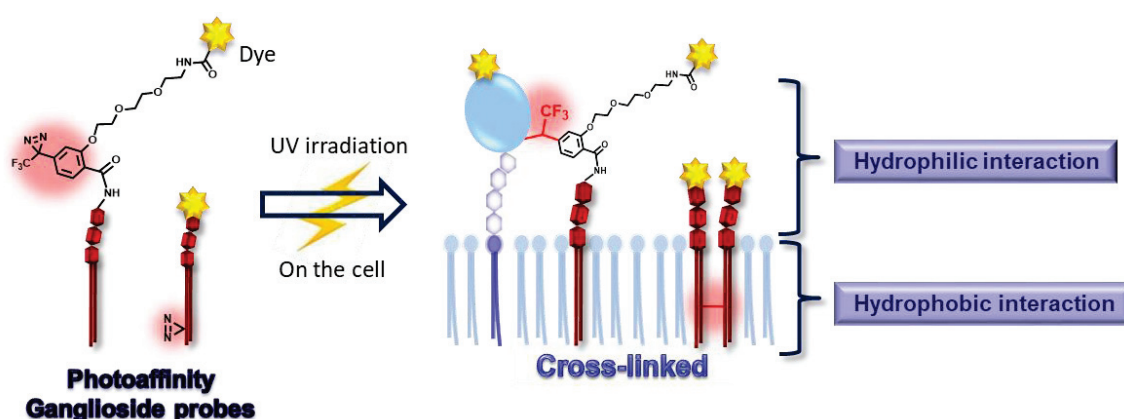
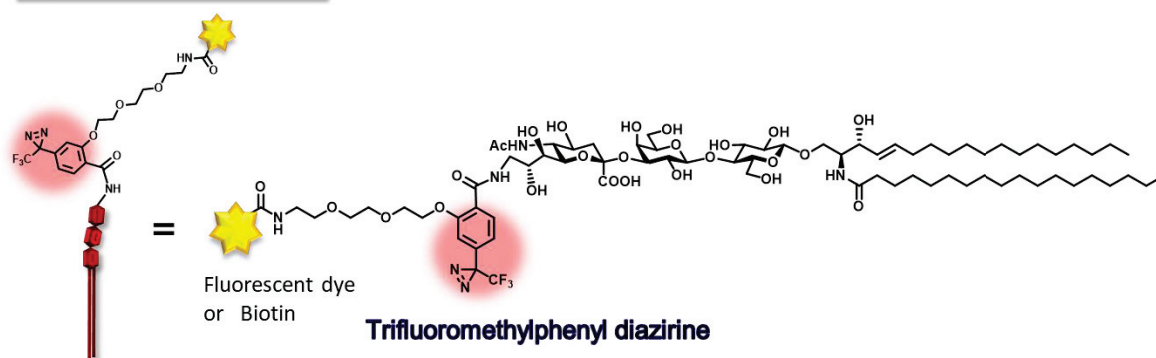


Figure 32. 研究コンセプト

GM3 プローブの具体的な分子設計について述べる (Figure 33)。これまでの研究より、グリコリピッド本来の機能を化学修飾により損なわないようにするためには構造の大きな分子を糖鎖の末端に導入する必要があることが分かった。そこで糖鎖修飾型のプローブでは、有用な光反応性基として汎用されている TPD 基を選択し、TPD 基と検出基を Neu9 位に対して連結させた分子を設計した。一方で、脂質修飾型プローブに導入する光反応性基は、TPD 基の嵩高い構造が脂質間相互作用の妨げになることを懸念した。そのため、標識部位を構造が最小のアルキルジアジリンとした。アルキルジアジリンは活性種の求電子性は TPD 基より劣るため、架橋収率が低いことが懸念されるが、立体障害を最小限にできる効果を優先して選択した。即ち、分子の構造は、検出基のみ Neu9 位に導入し、脂肪酸末端の C17 位にジアジリン基を結合させた設計とした。脂肪酸に対するジアジリン基の結合位置は、細胞質側の脂質分子 (脂質アンカー型シグナル分子など) の捕捉も膜内で可能になることを期待して末端に設定した。

Glycan-modified GM3



Lipid-modified GM3

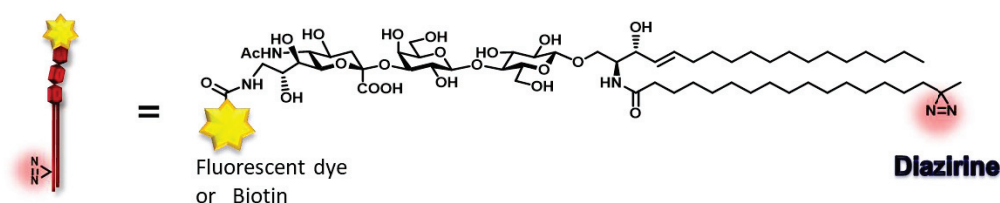


Figure 33. 分子設計

第三章 合成戦略

初めに、二官能性 GM3 プロブの合成戦略について述べる。光反応性のジアジリン基は UV 照射で容易にカルベンを生成する不安定な性質を考慮し、合成の終盤に導入するべきであると考えた。そして、糖鎖修飾型プロブ並びに脂質修飾型プロブのガングリオシド骨格は、脂質の効率的な導入を狙い、Glc-Cer 受容体 **4** と、新規 Glc-Sph 受容体 **92** によるカセットアプローチで各々構築することとした。この二点を踏まえてそれぞれの光反応性 GM3 プロブの合成法を立案した (Scheme 29)。

Sph2 位の選択的修飾を可能とした合成スキームを立てる必要がある。そこで、Glc-Cer カセットアプローチを模倣し、Sph の 2 位がアジド基の Glc-Sph 受容体 **92** を設計した。Glc-Sph 受容体 **92** と Neu9 位が TFAc アミド基の Neu-Gal 供与体 **43** のグリコシド化により糖脂質骨格を構築した後、Sph2 位アジド基の還元、光反応性ステアリン酸の導入を行うことで、GM3 骨格の構築が可能と考えた。続く変換により Neu9 位をアミノ基とした化合物を共通ユニットに設定し、最後に Neu9 位への標識導入 (ビオチン又は蛍光色素) を行う合成経路を立案した。

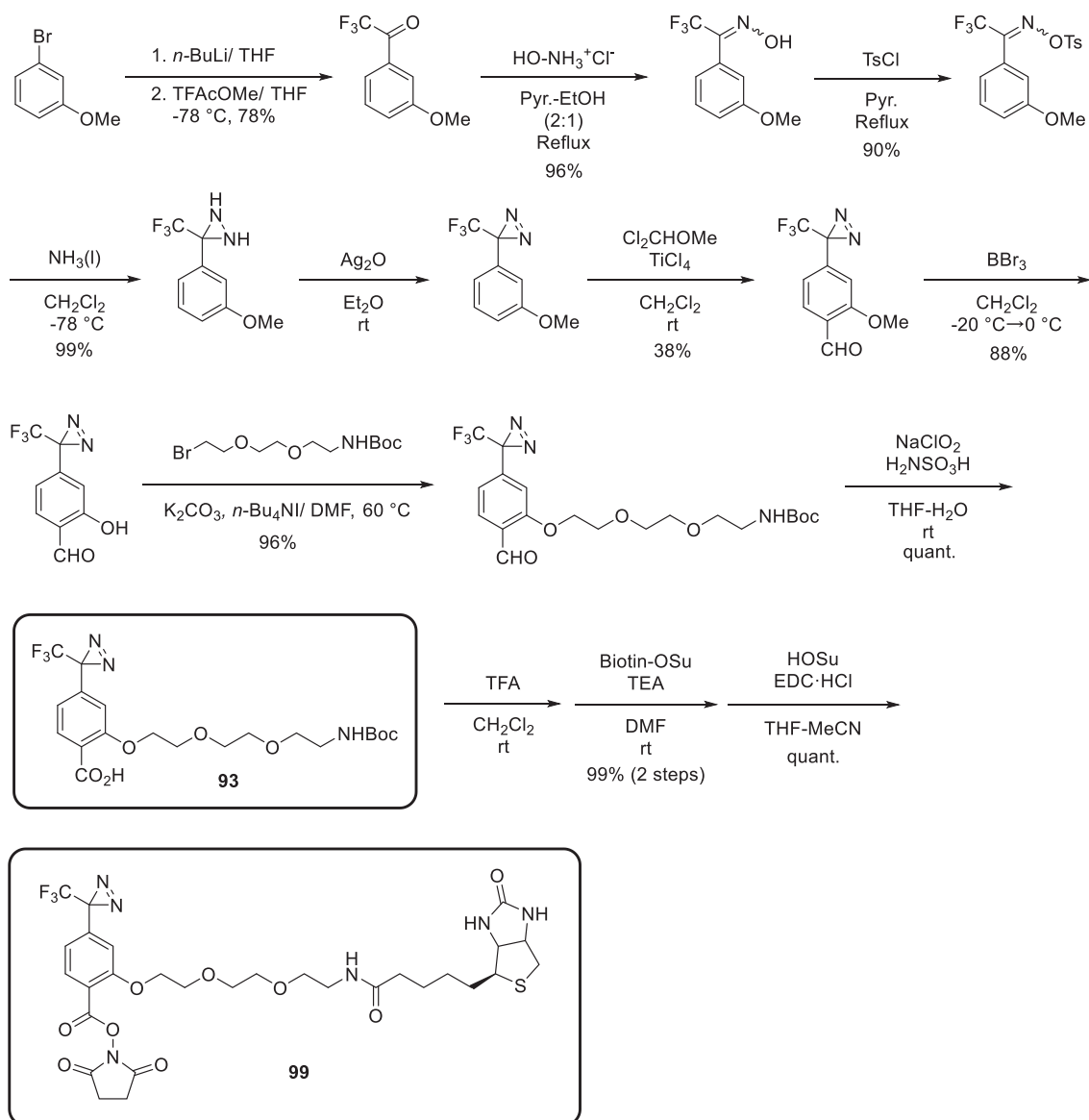
第四章 糖鎖修飾型光反応性プローブの合成

第一節 Trifluoromethylphenyl diazirine (TPD) ユニットの合成

初めに糖鎖修飾型プローブ合成に使用する TPD ユニットの合成を行った。合成戦略でも述べたように、標的化合物は検出基が TPD ユニットを介して Neu9 位に結合した構造をとるため、Neu9 位がアミノ基の共通中間体に対して TPD 基および検出基 (ビオチン又は蛍光色素) を段階的もしくは複合ユニットとして導入することが可能と考えた。複合ユニットを GM3 中間体に導入出来れば一反応で標的化合物へ誘導できる利点があるため、まずは複合ユニットの合成を試みた。畑中ら⁶⁰、Qiu ら⁶¹の報告に従い、TPD ユニット **93** 及びビオチン標識 TPD の活性エステル体 **99** を調製した (Scheme 30)。

⁶⁰ M. Hashimoto, Y. Hatanaka, J. Yang, J. Dhesi, G. D. Holman, *Carbohydr. Res.* **2001**, 331, 119-127.

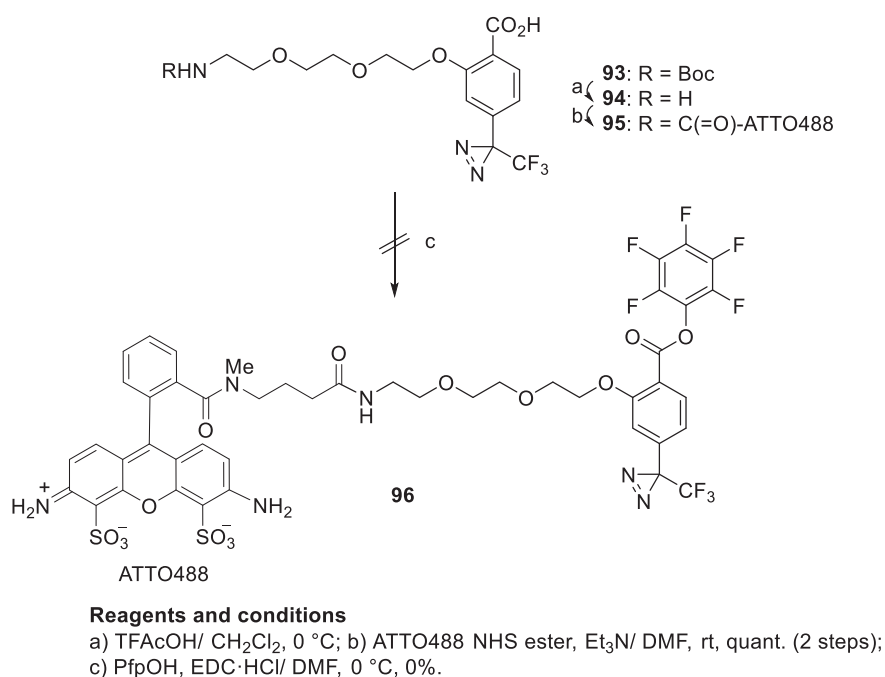
⁶¹ W. W. Qiu, J. Xu, J. Y. Li, J. Li, F. J. Nan, *ChemBioChem* **2007**, 8, 1351-1358.



Scheme 30. TPDユニットの合成

続いて、化合物 **93** の Boc 基の除去によりトリエチレングリコール末端を遊離のアミノ基とした (**Scheme 31**)。蛍光色素は一分子観察実験を指向して光褪色時間の長い ATTO488 を選択した。化合物 **94** に対して ATTO488 の *N*-Succinimidyl エステルを反応させ、複合ユニット **95** を定量的に得た。この複合ユニット **95** は原料と物性が大きく異なり、各種有機

溶媒に対して難溶性を示した。その中でも DMF に対しては比較的溶解し易かったため、続く反応には DMF を溶媒として選択した。続いて、GM3 アミノ中間体 **47** とのアミド結合形成に向け、複合ユニットのカルボキシル基の Pfp エステル化を試みた。DMF 中、化合物 **95** に PfpOH、EDC・HCl を作用させた結果、原料がほとんど残存し、僅かではあるが複雑な生成物を与えた。この原因は原料の難溶性により、反応が進行しなかったためと考えた。また、僅かな生成物が複雑な混合物であったことは、構造中の二箇所の硫酸基のいずれかにも Pfp エステル化を受けていた可能性を示唆し、反応位置の制御が困難であると予想した。

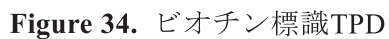


Scheme 31. ATTO488 標識 TPD ユニットの合成

そこで合成経路を変更し、TPD 基と ATTO488 それぞれを順次導入する経路を試みた。これに向け、まずは TPD ユニット **98** の合成を試みた (**Scheme 32**)。TPD ユニット **93** の Boc 基を除き、遊離のアミンを TFAc 基で保護した。続いてカルボン酸を *N*-Succinimidyl

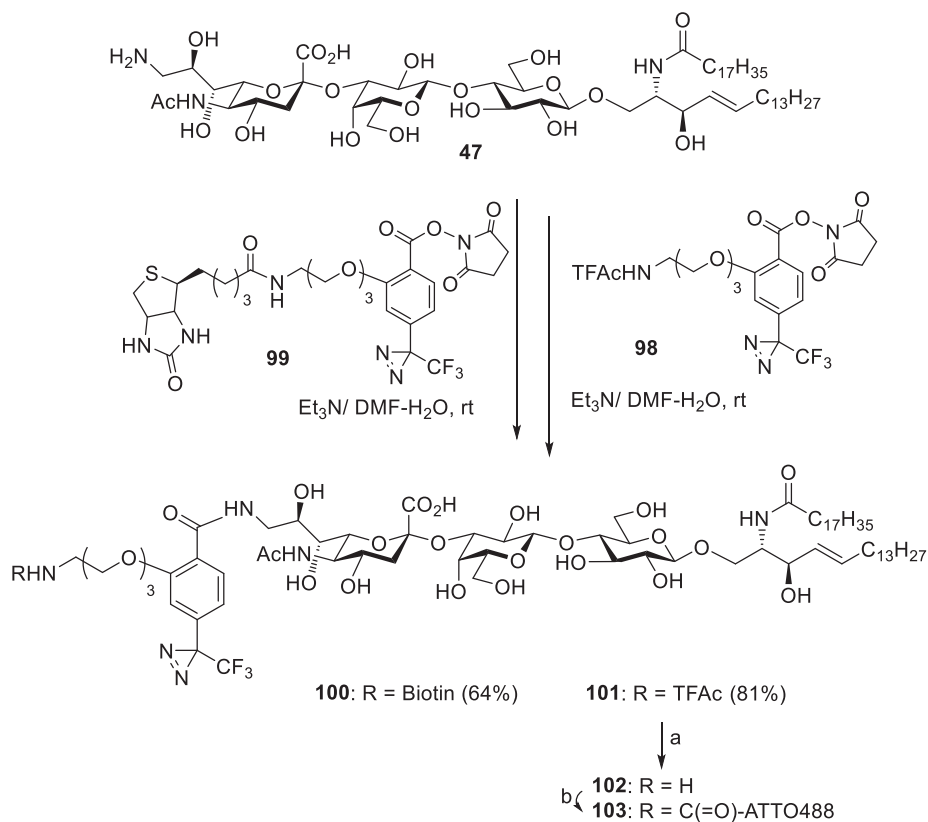


Scheme 32. TPDユニットの変換



アミノ GM3 中間体 **47** へのビオチン標識 TPD の導入を試みた (**Scheme 33**)。ビオチン標識 TPD ユニットの *N*-Succinimidyl ester **99** を DMF-水混合溶媒中で反応させた結果、目的化合物のビオチン標識光反応性 GM3 プローブ **100** を収率 64%にて得た。

一方で蛍光標識体の合成に向け、化合物 **47** と化合物 **98** のアミド化を同条件下行うことで、化合物 **101** へ誘導した (Scheme 33)。続いて、リンカー末端の TFAc 基を NaOMe により除去することで、末端がアミノ基の中間体 **102** へ誘導した。さらにこれに対して蛍光分子 ATTO488 の *N*-Succinimidyl ester、TEA を作用させることで、ATTO488 標識光反応性 GM3 プローブの合成を達成した。これにより、ビオチン及び蛍光色素で標識した二種類の光反応性 GM3 プローブの合成が完了した。



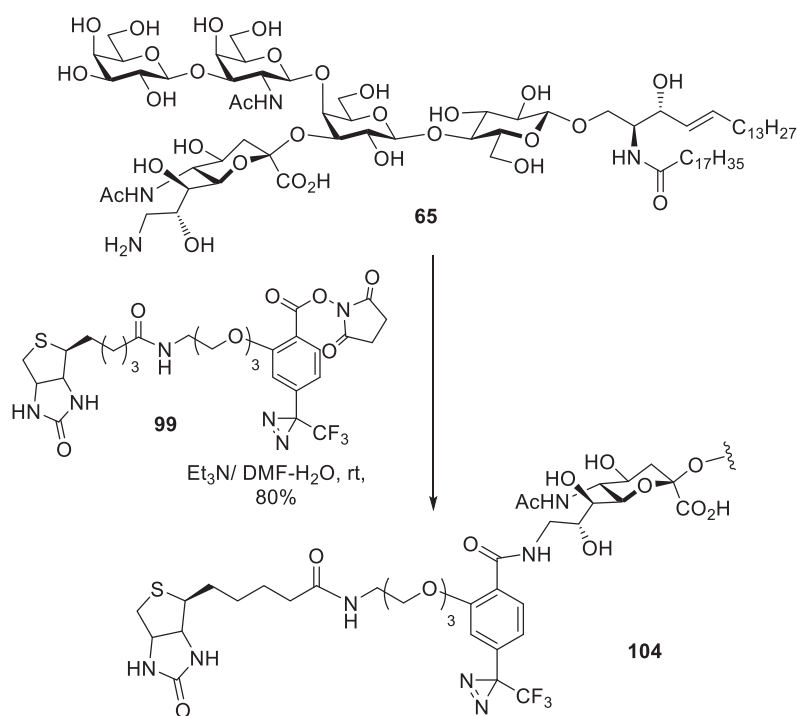
Reagents and conditions

a) NaOMe/ MeOH-THF, sonication, 55 °C; b) ATTO488 NHS ester, Et_3N /DMF- H_2O , rt, 55% (2 steps).

Scheme 33. 糖鎖修飾型光反応性GM3プローブの合成

第三節 光反応性 GM1 プローブの合成

ガングリオシド GM1 は Trk 受容体などの神経栄養因子受容体の調節機能が知られており⁶²、このような相互作用は脂質ラフト依存的であることが報告されている⁶³。そこで、合成標的を GM1 に拡張し、二官能性 GM1 プローブの合成を試みた。前節で確立した、ビオチン標識光反応性 GM3 プローブの合成法を GM1 に適用し、ビオチン標識光反応性 GM1 プローブの合成を行った (Scheme 34)。第一部で合成したアミノ GM1 に対しビオチン標識 TPD の活性エステルを反応させた。その結果、目的化合物 **104** を収率 88%にて合成することに成功した。



Scheme 34. 糖鎖修飾型光反応性GM1プローブの合成

- ⁶² a) A. Bachis, S. J. Rabin, M. Del Fiacco, I. Mocchetti, *Neurotox. Res.* **2002**, 4, 225-234. b) S. J. Rabin, A. Bachis, I. Mocchetti, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 49466-49472. c) S. J. Rabin, I. Mocchetti, *J. Neurochem.* **1995**, 65, 347-354. d) T. Farooqui, T. Franklin, D. K. Pearl, A. J. Yates, *J. Neurochem.* **1997**, 68, 2348-2355. e) G. Ferrari, B. L. Anderson, R. M. Stephens, D. R. Kaplan, L. A. Greene, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 3074-3080.
- ⁶³ M. Aureli, L. Mauri, M. G. Ciampa, A. Prinetti, G. Toffano, C. Secchieri, S. Sonnino, *Mol. Neurobiol.* **2016**, 53, 1824-1842.

さらに、合成したビオチン標識光反応性 GM3 プローブ、GM1 プローブの細胞膜上における機能を調べるため、DRM 分配実験に供した。その結果、界面活性剤処理前後の蛍光強度の比較から、いずれも DRM 画分への完全な分配を示した。これにより、両プローブ共に、天然のガングリオシドと同様にラフト親和性が保持されている事を確認した (Figure 35)。

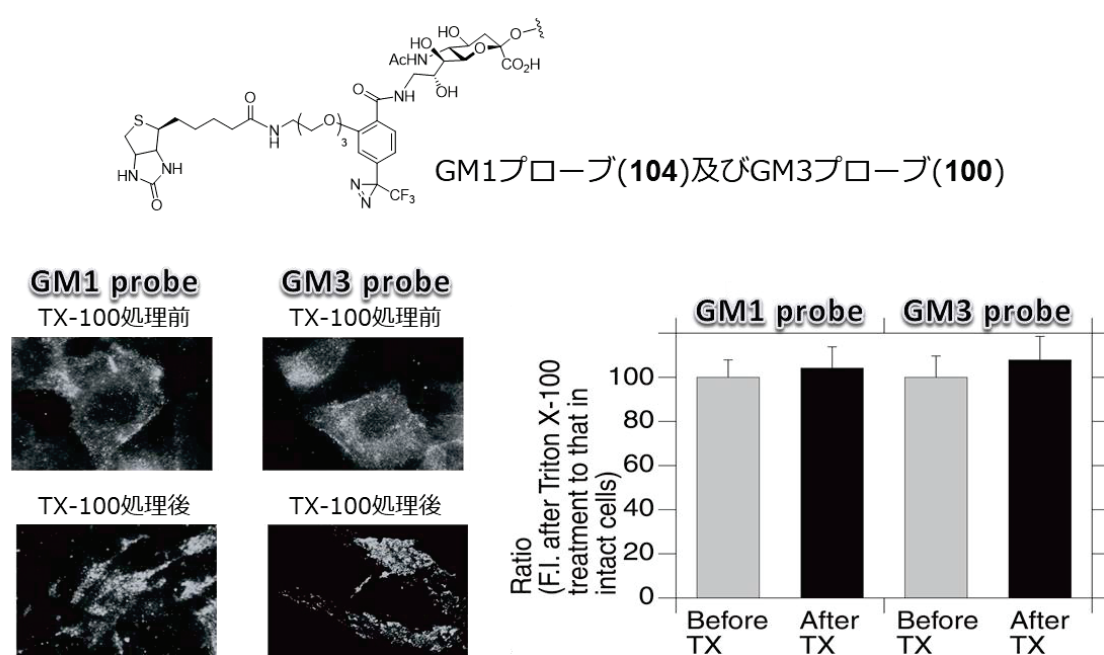


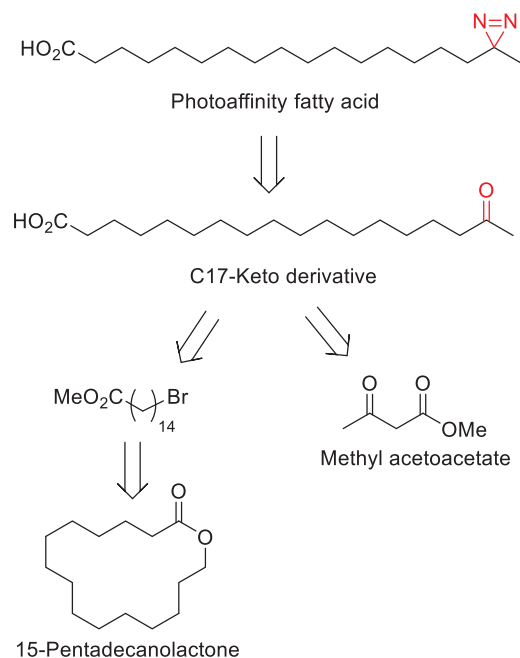
Figure 35. ビオチン標識プローブの DRM 分配実験

第五章 脂質修飾型光反応性 GM3 プローブの合成

第一節 光反応性脂肪酸の合成

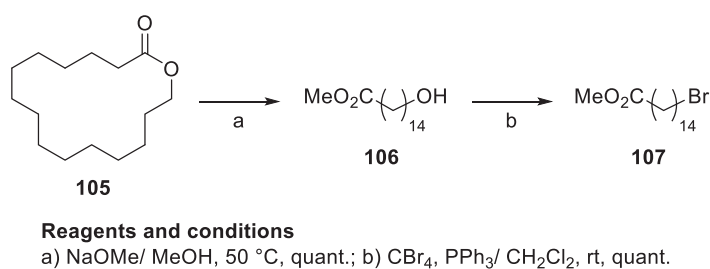
続いて、脂質修飾型の光反応性 GM3 プローブの合成について検討した。

まずは C17 位にジアジリン基を有したステアリン酸の合成を試みた。その合成戦略を **Scheme 35** に示す。アルキルジアジリンは、ケトンやアルデヒドから変換可能なジアジリン基の酸化により一般的に合成される。そこで、C17-ジアジニルステアリン酸の前駆体として C17-ケト中間体を設定した。Methyl 15-bromopentadecanoate に対して Methyl acetoacetate との縮合反応、脱炭酸反応を行うことで、三炭素増炭とともに C17 位へのカルボニル基導入が可能と考えた。ここで、Methyl 15-bromopentadecanoate は C1 位をカルボキシル基とする必要性により選択し、この化合物は安価な 15-Pentadecanolactone の開環反応により短工程で誘導可能と考えた。



Scheme 35. 光反応性脂肪酸の合成戦略

合成結果について述べる (Scheme 36)。15-Pentadecanolactone を原料とし、MeOH 中 NaOMe によるエステル交換反応を行うことで、定量的に鎖状のメチルエステル体 **106**⁶⁴へと変換した。続いて、化合物 **106** の末端水酸基の Br 化により、化合物 **107**⁶⁵へと誘導した。



Scheme 36. 15-Pentadecanolactoneの変換

次に β-ケトエステルの Methyl acetoacetate と化合物 **107** とのカップリング反応を検討した (Table 15)。条件 1 では塩基として NaH (2.0 当量) を選択し、DMF 中 60 °C で反応を行った。その結果、C-アルキル化物 **108** (44%) の他に O-アルキル化物 **109** (36%) を得る結果となった。エノラートは両性求核剤であるが、一般的にソフトな炭素求電子剤とは炭素上で優先して反応し、C-アルキル化物を与える⁶⁶。しかしながら、この反応においては予想に反して O-アルキル化物も同等量与えたため、C-選択性の向上が課題となった。初めに、エノラートイオンの対金属イオンが C/O 生成比に及ぼす影響を見るため、塩基を NaH から DBU に変えて同条件で検討した (条件 2)。即ち、求核種として NaH の系では Na エノラート、DBU の系では遊離のエノラートアニオンが生成すると考えられる。その結果、二つの系において C/O 生成比に殆ど差が見られなかった。これより、生成した Na エノラートは遊離のエノラートアニオンと同等の C/O 選択性を示す、もしくは Na⁺が DMF による

⁶⁴ C. Jacopin, M. J. Egron, D. Scherman, J. Herscovici, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 1447-1450.

⁶⁵ M. Adamkiewicz, T. O'Hara, D. O'Hagan, G. Hähner, *Thin Solid Films* **2012**, 520, 6719-6723.

⁶⁶ H. Mayr, M. Breugst, A. R. Ofial, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 6470-6505.

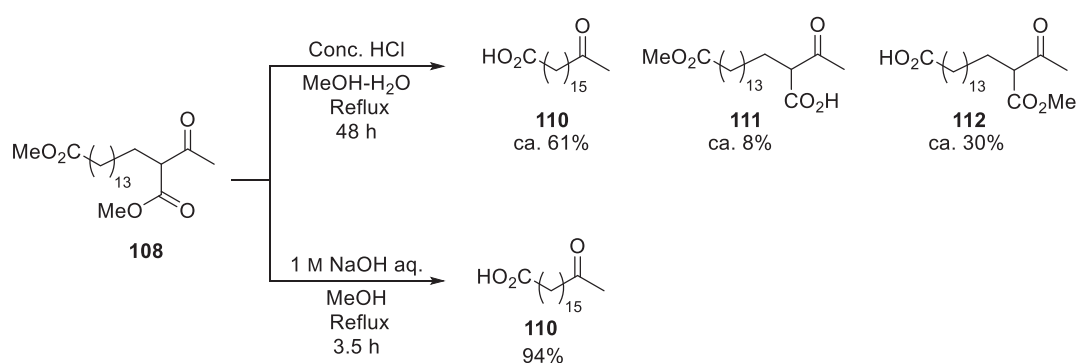
溶媒和を受けて溶媒分離イオン対として存在することにより、C/O 生成比に差がなかったと推測した。DBU の使用により反応時間は大幅に短縮したため、条件 3 以降は塩基を DBU に設定した。条件 3 では溶媒を THF に変えて検討したが、原料が多く残存し、C/O 生成量も同程度であった。条件 4 では求電子剤をよりソフトにすることで、C-選択性が向上すると考え、添加剤として TBAI (0.2 当量) を加えた。その結果、C-アルキル化物の生成比の向上を確認した (**108**: 52%, **109**: <29%)。この反応はヨウ素の高い脱離能により、室温における検討でも反応が進行したが、C/O 比は反応温度を 40 °C に上昇させても変化しないことを確認した (条件 5)。さらに、ヨウ素への脱離基の交換を促進するため、条件 6 では TBAI を 0.4 当量へ増量した。その結果、O-アルキル化物 **109** を 23%に抑制し、望む化合物 **108** を 73%の収率で得ることに成功した。

entry	reagents (eq.)	solv.	temp.	time	108	109
1	NaH (2.0)	DMF	60 °C	33 h	44%	<36%
2	DBU (2.0)	DMF	60 °C	3 h	48%	<34%
3	DBU (2.0)	THF	60 °C	50 h	22%	<21%
4	DBU (2.0), TBAI (0.2)	DMF	rt	23 h	52%	<29%
5	DBU (2.0), TBAI (0.2)	DMF	40 °C	6 h	54%	<29%
6	DBU (2.0), TBAI (0.4)	DMF	40 °C	4 h	73%	23%

Table 15. C-アルキル化の検討

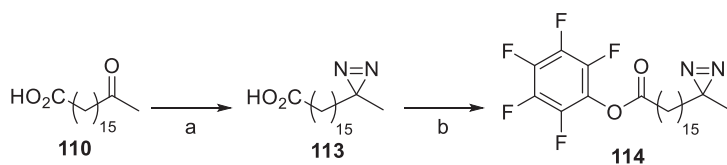
続いて化合物 **108** の二箇所のメチルエステルの加水分解に続き、β-ケト酸の脱炭酸反応を行った。その検討結果を以下に示す (**Scheme 37**)。初めに、HCl による酸加水分解反応

を試みた。その結果、加熱還流条件においても反応中間体が残存し、長時間反応を継続しても目的物の収率が約 61%に留まった。これは、MeOH を混合溶媒として組み合わせたことにより、酸加水分解反応の逆反応が進行し易い環境であったためと考えた。条件を変え、NaOH 水溶液によるアルカリ加水分解反応で改善を図った。その結果、加水分解、続く脱炭酸反応が滞りなく進行し、目的物 **110** を高収率で得た。



Scheme 37. 脱炭酸反応の検討

続いて Church らに報告されている条件⁶⁷に従い、C17-ケト中間体のアルキルジアジリンへの変換を行い、化合物 **114** を四段階、66%の収率で得た。最後に Pfp エステル体 **114** とした (**Scheme 38**)。



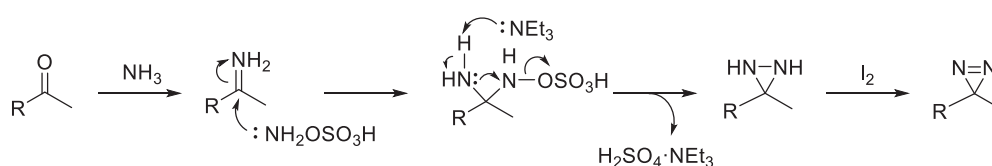
Reagents and conditions

a) i) NH₃/ MeOH-CH₂Cl₂, 0 °C; ii) NH₂OSO₃H/ CH₂Cl₂, 0 °C; iii) Et₃N/ CH₂Cl₂, 0 °C; iv) I₂/ CH₂Cl₂, 0 °C, 66% (3 stps); b) PfpOH, EDC·HCl/ CH₂Cl₂, rt, 90%.

Scheme 38. 光反応性脂肪酸への変換

⁶⁷ R. F. R. Church, M. J. Weiss, *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 2465-2471.

なお、ケト中間体から四段階でアルキルジアジリンへ変換する反応の推定機構を **Scheme 39** に記した。ケト中間体と液体アンモニアの反応によりイミンが生成した後、ヒドロキシルアミン-*O*-スルホン酸のイミンへの求核付加が起こると考えられる。続いて、硫酸基の脱離を伴う S_N2 型の環化反応によりジアジリンが生成し、最後にヨウ素による酸化反応を受けることでジアジリンへ変換されると考えられる。

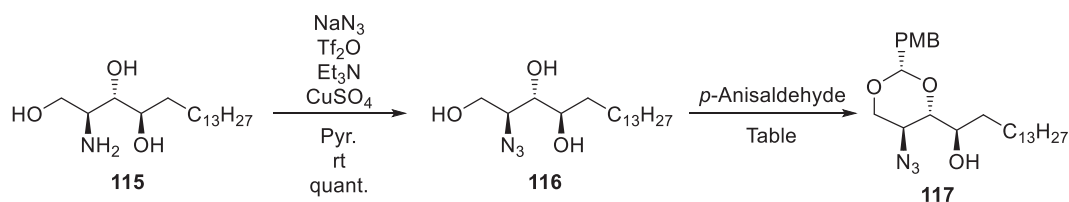


Scheme 39. ジアジリン化推定機構

第二節 Sph 受容体の合成

次に Sph 受容体の合成を行った (**Scheme 40**)。ファイトスフィンゴシ **115** を原料とし、TfN₃によるジアゾ転移反応を行うことで、アジドスフィンゴシン **116**⁶⁸を得た。次に化合物 **116** の 1,3-アニシリデンアセタール化を行った。条件 1、2 における検討では原料が残存し、また複雑な位置及び立体異性体の混合物を与えた為に収率は 20%未満となった。そこで、条件 3 ではトルエン中、共沸条件下で *p*-Anisaldehyde と CSA を作用させた。その結果、原料の消費に成功し、熱力学的に最安定な化合物 **117** を主生成物として得た。

⁶⁸ R. R. Schmidt, T. Maier, *Carbohydr. Res.* **1988**, 174, 169-179.



Table

entry	solvent	temp.	time	regio- & stereoisomers	yield of 117
1	DMF	0 °C	23 h	58%	<15%
2	MeCN-DMF	rt	30 min	58%	<18%
3	Toluene	reflux	10 h	32%	55%

Scheme 40. ファイトスフィンゴシンの変換

続いて 4,5-オレフィン化を検討した。化合物 **117** に対して Pyr と Tf₂O を作用させたとこ
ろ、反応が速やかに進行し、3-OTf 体 **118** の生成を確認したが、この化合物は非常に不安
定であり単離が困難であった。トリフリル化の段階で 4,5-オレフィン体 **119** の生成がすで
に確認されたため、連続して塩基共存下、ワンポットで E2 脱離反応を行った (**Table 16**)。
条件 1 では Pyr 存在下でトリフリル化と E2 脱離反応を試みた。その結果、目的物である
4,5-オレフィン体 **119** は 23%のみ得られ、副生成物としてピリジニウム塩 **120** を約 56%回
収した。この副生成物が生成した要因は、3-OTf 中間体生成後、E2 脱離よりも Pyr による
求核攻撃が優先したためと考察した。そこで、この副反応を回避するためには Pyr よりも
求核性の低い塩基を作用させれば良いと考えた。条件 2 で 2,6-Lutidine を用いた結果、収率
は 43%へ大きく向上したが、ここでもピリジニウム塩の生成が確認された。この結果を受
け、条件 3、4 ではより求核性の低い、DIEA、DBU をそれぞれ選択した。しかし、原料が
ほとんど未反応のまま残存し、最初のトリフリル化が全く進行していないことが原因と見
受けられた。これらの結果より、トリフリル化において Tf₂O よりも反応性の高い活性種
の生成が必要であると推測し、条件 5 では Pyr 存在下でまず 3-OTf 中間体 **118** へ誘導した

後に、速やかに DBU を加えることで、脱離反応の促進を図った。反応開始から 30 分以内に原料が消費したことを確認し、続いて DBU を加えた。その結果、副反応の抑制に成功し、目的物 **119** を 91% の収率で得た。なお、この変換において望まない Z 体の生成は見られなかった。

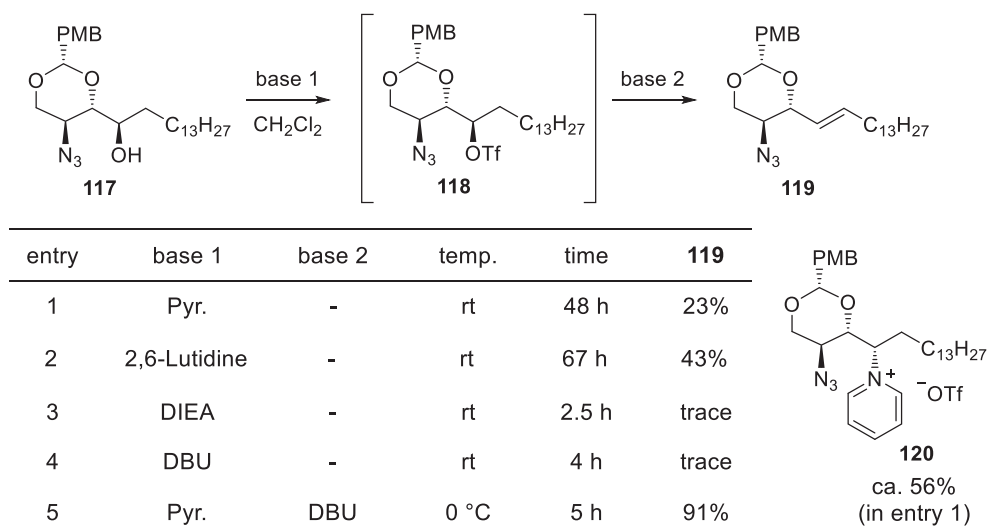
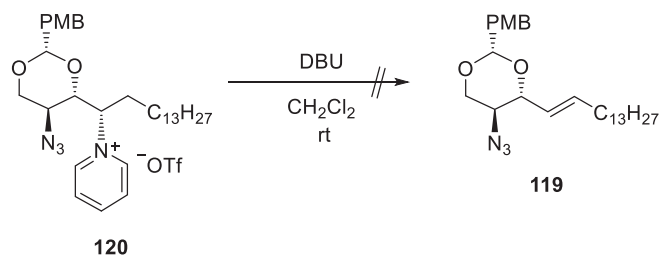


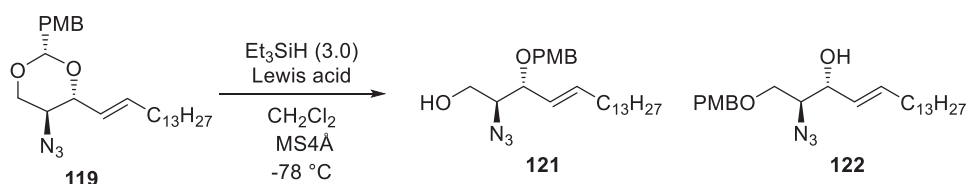
Table 16. オレフィン化の検討

一方で、条件 1 で得られたピリジニウム塩 **120** は強塩基を作用させれば、脱離反応により目的物への誘導が可能と推測した。しかしながら、化合物 **120** を DBU で処理した結果、化合物 **120** の生成は全く観察されなかった (**Scheme 41**)。これより、安定なピリジニウム塩を目的物へ誘導することは困難であることが分かった。



Scheme 41. ピリジニウム塩を用いた検討

続いて、化合物 **119** のアニシリデン基の還元的環開裂により、Sph 受容体への変換を行った (Table 17)。条件 1 では Et_3SiH と PhBCl_2 ⁶⁹を反応させたが、目的物 **121**⁷⁰の収率は 20% となり、構造不明の副生成物の生成を確認した。¹H NMR から PhBCl_2 由来と考えられる芳香族のシグナルを確認したが、構造の特定には至らなかった。この結果より、条件 2、3 では、Lewis 酸を SnCl_4 、 AlCl_3 に変えて検討した。その結果、どちらも優れた位置選択性を示し、良好な収率を与えたが、 AlCl_3 においては原料が完全に消費されたため、より高い収率となった。以上より、ファイトスフィンゴシンから Sph 受容体への合成経路を確立した。



entry	Lewis acid (eq.)	121	122
1	PhBCl_2 (3.0)	20%	-
2	SnCl_4 (1.5)	74%	-
3	AlCl_3 (1.2)	92%	trace

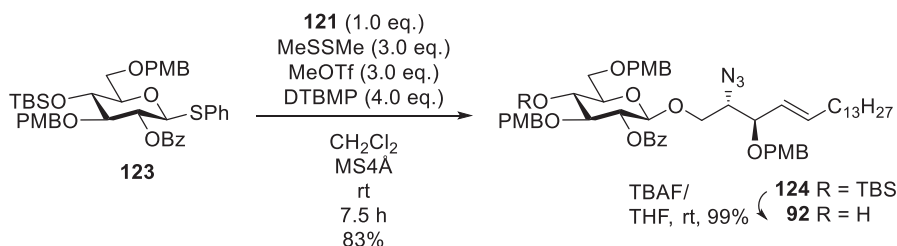
Table 17. アニシリデン基の還元的環開裂の検討

⁶⁹ M. Sakagami, H. Hamana, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 5547-5551.

⁷⁰ W. Du, J. Gervay-Hague, *Org. Lett.* **2005**, 7, 2063-2065.

第三節 Glc-Sph 受容体の合成

Glc のチオグリコシド供与体 **123**⁷¹ と Sph 受容体 **121** のグリコシド化反応により Glc-Sph 骨格の構築を行った。構造中にオレフィンを含む基質とチオグリコシドのグリコシド化反応において、NIS-TfOH による供与体の活性化法はオレフィンに対するヨウ素カチオンの求電子付加が懸念されるため、一般的に利用されない。そこで硫黄親和性の他の活性化剤として DMTST⁷² を選択し、蟹江らの *in situ* で DMTST を生成する条件⁷³ により反応を行った (Scheme 42)。供与体 **123** に対して受容体 **121** を 1.0 当量用い、酸捕捉剤の DTBMP 共存下で MeSSMe、MeOTf を 3.0 当量ずつ作用させた。その結果、Glc-Sph を収率 83% にて得た。得られた Glc-Sph **124** は Glc4 位の TBS 基の除去により Glc-Sph 受容体 **92** へと誘導した。



Scheme 42. グリコシド化反応

当研究室の山崎は、このグリコシド化反応について検討し、最適条件を見出している⁷⁴ (Table 18)。山崎の検討結果について説明する。条件 1 では、MeSSMe、MeOTf により生成する DMTST を活性化剤として検討した結果、酸性条件により PMB 基が一部脱離し、収

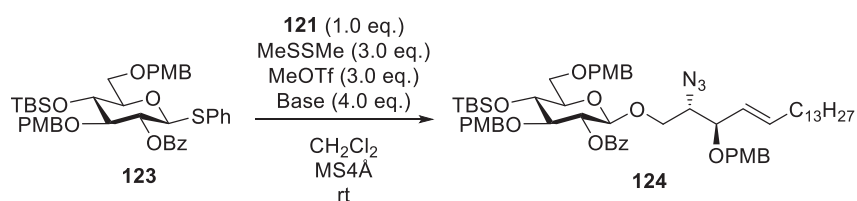
⁷¹ S. Nakashima, H. Ando, R. Saito, H. Tamai, H. Ishida, M. Kiso, *Chem. Asian J.* **2012**, 7, 1041-1051.

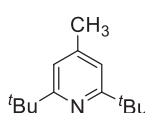
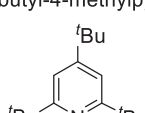
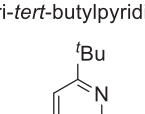
⁷² P. Fügedi, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1986**, 149, C9-C12.

⁷³ I. Ohtsuka, T. Ako, R. Kato, S. Daikoku, S. Koroghi, T. Kanemitsu, O. Kanie, *Carbohydr. Res.* **2006**, 341, 1476-1487.

⁷⁴ 山崎彩乃 岐阜大学大学院 応用生物科学研究科 修士論文 **2016**.

率低下の原因となった。これを防ぐために、酸捕捉剤存在下における温和な反応条件を検討した。条件 2 では塩基として 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylpyridine、条件 3 では 2,4,6-tri-*tert*-butylpyridine を共存させた。しかしながら、両反応とも収率は向上したが、副生成物としてオルソエステルが生成し、中程度の収率に留まった。条件 4 では 2,4,6-tri-*tert*-butylpyrimidine を用いた結果、オルソエステルの生成は減少し、収率が 91%に向上した。以上の検討で得られた収率は **Table 18** に示すように、酸捕捉剤の共役酸の pK_a ⁷⁵に依存しており、弱い塩基を用いた時に、オルソエステルの生成が減少する傾向が見られた。



entry	base (pK_a^* of conjugated acid)	time	yield (%)
1	-	22 h	47
2	 2,6-di- <i>tert</i> -butyl-4-methylpyridine (4.41)	6 h	71
3	 2,4,6-tri- <i>tert</i> -butylpyridine (4.02)	7 h	76
4	 2,4,6-tri- <i>tert</i> -butylpyrimidine (1.02)	7 h	92

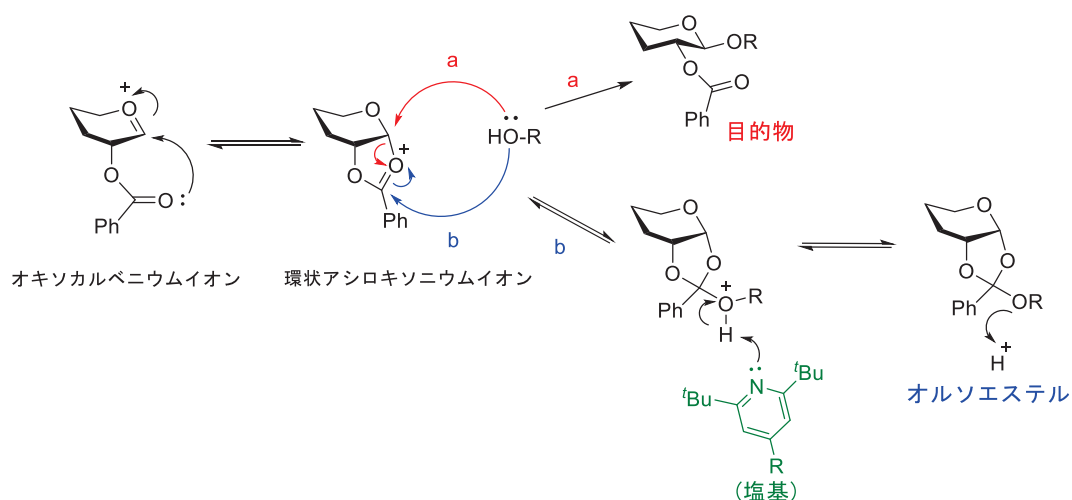
* in 50% aqueous ethanol

Table 18. グリコシド化反応の検討（山崎の報告）

この結果についての考察を **Scheme 43** 示す。供与体から生成する環状アシロキソニウム

⁷⁵ D. Crich, M. Smith, Q. Yao, J. Picione, *Synthesis* **2001**, 323-326.

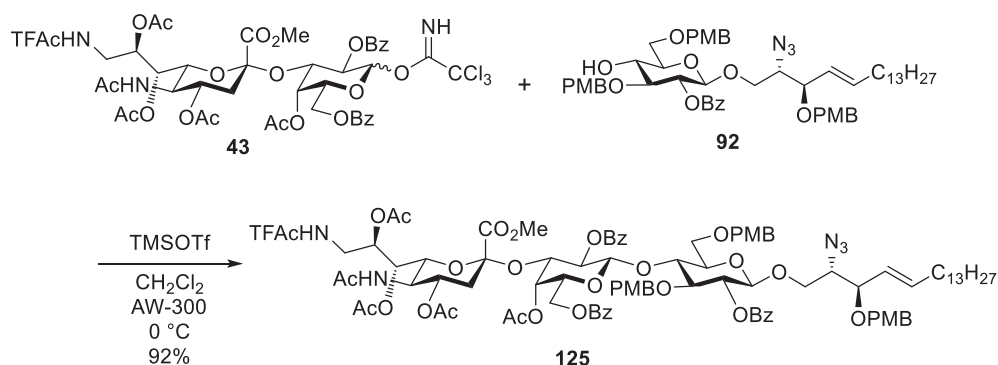
イオンには、二箇所の求電子部位が存在するため、受容体との反応様式が二通り考えられる。**b** の経路のオルソエステル生成は可逆反応であるため、時間の経過とともに不可逆的な **a** の経路の生成物に収束すると考えられる。しかしながら、酸捕捉剤の塩基性が強い場合、**b** の経路の脱プロトン化が促進され、オルソエステルへと平衡が偏ると考えられる。



Scheme 43. オルソエステルの形成機構

第四節 糖脂質骨格の構築と脂肪酸の導入

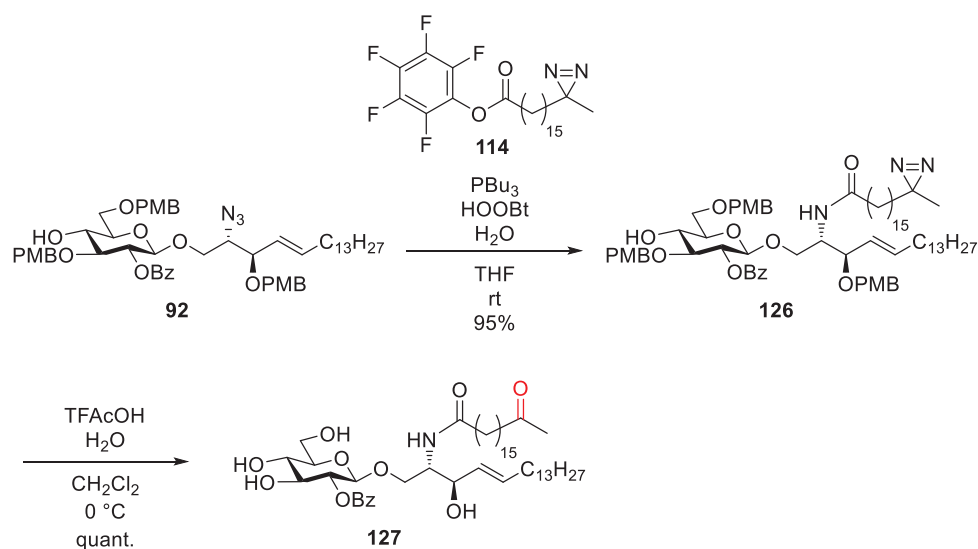
得られた Glc-Sph 受容体 **92** と Neu-Gal 供与体 **43** のグリコシド化反応を行い、収率 92%にて糖脂質骨格 **125** を合成した (Scheme 44)。



Scheme 44. 糖脂質骨格の構築

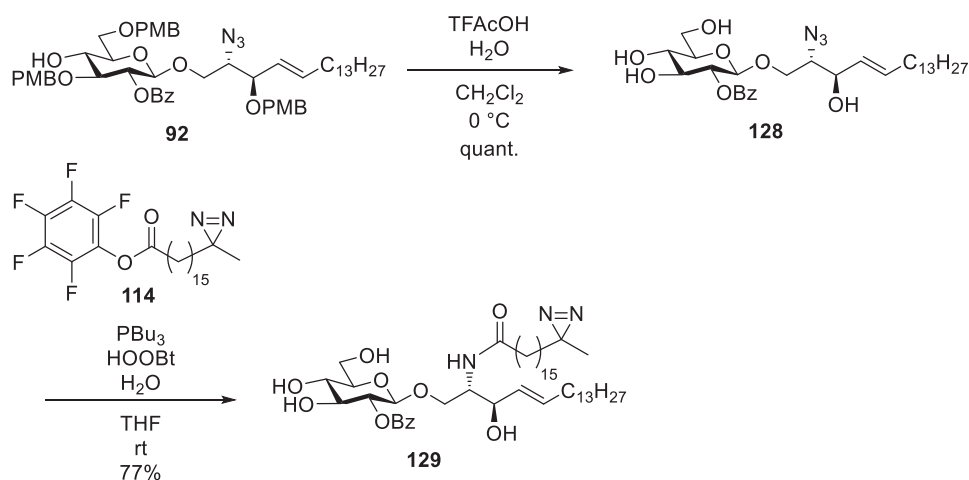
続いて、Staudinger Ligation による C17-ジアジニルステアリン酸導入の検討を行った。まずはモデル実験として Glc-Sph **92** に対する導入を試みた。伊藤らの報告⁷⁶に従い、化合物 **92** に対して 98% THF aq. 中、Pfp エステル **114** 共存下で Bu₃P、HOObt を作用させた。その結果、収率 95% で目的物 **126** を得た (Scheme 45)。次にこの化合物の PMB 基を酸加水分解により除去した。その結果、望む化合物は得られず、ジアジリン基も加水分解を受けてできた C17-ケト体 **127** をほぼ定量的に得た。TPD ユニットのジアジリン基は同様の条件の酸加水分解に対して耐性を示したが、アルキルジアジリンはジアジリン窒素の電子密度がより高いためにプロトン化を受け易くなったと考えた。C17-ケト体 **127** は前述の条件により再びジアジリン化することも可能であると考えられるが、この副反応を回避する経路を優先して検討する事とした。

⁷⁶ M. Hagiwara, M. Dohi, Y. Nakahara, K. Komatsu, Y. Asahina, A. Ueki, H. Hojo, Y. Nakahara, Y. Ito, *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 5229-5239.



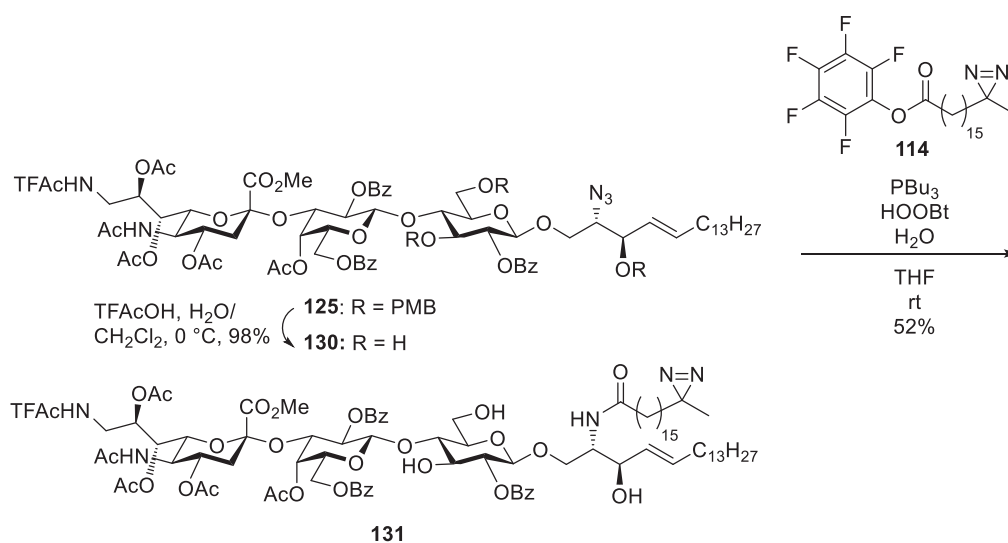
Scheme 45. モデル実験 I

以上の結果を受けて、C17-ジアジニルステアリン酸導入のタイミングを PMB 基除去後に設定するのが望ましいと考えた。そこで、反応の順序を変えたモデル実験を行った (**Scheme 46**)。ここでは、先に PMB 基を除去し、続いて C17-ジアジニルステアリン酸の導入を検討した。その結果、中程度の収率ではあるが、目的構造への誘導に成功した。モデル実験 I と比較して脂肪酸導入が低収率になった要因は、遊離の水酸基に対するアシル化も起きたためであると考えられる。



Scheme 46. モデル実験 II

モデル実験Ⅱの結果を受け、同条件で化合物 **130** への C17-ジアジニル脂肪酸の導入を行った (Scheme 47)。まずは化合物 **125** の PMB 基を除去し、つづいて Staudinger Ligation 反応を行った。その結果、モデル実験と同様に、目的物の他に複数の副生成物が生成したため、中程度の収率ではあるが、GM3 骨格の構築に成功した。なお、当研究室の山口は、後に糖脂質のアジドスフィンゴシン部分を Zn/AcOH により効率良く還元する方法を確立しており⁷⁷、この条件は本研究においても適用可能であると考えられる。



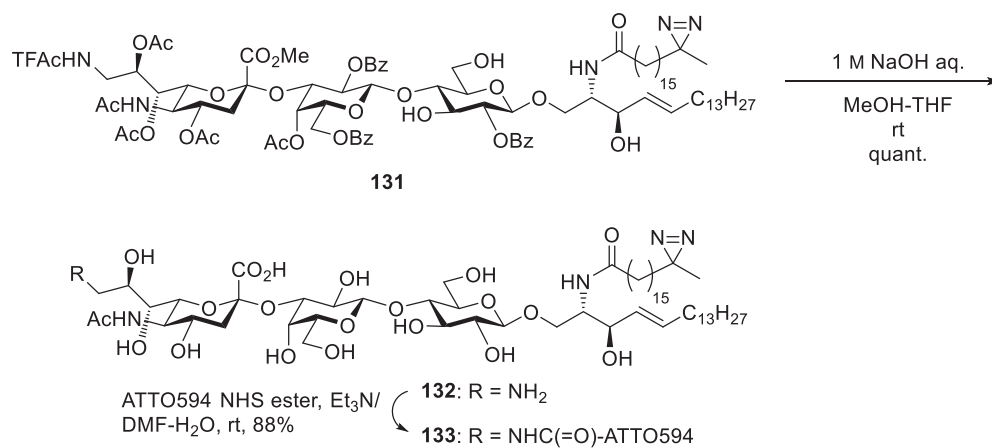
Scheme 47. 脂肪酸の導入

第五節 蛍光色素の導入

続いて全てのエステルを NaOH により加水分解することで、Neu9 位がアミノ基の中間体 **132** へ誘導した (Scheme 48)。Neu9 位に導入するラベルとして、まずは蛍光分子 ATTO594 を選択した。アミノ中間体に対し ATTO594 NHS ester を反応させ、脂質修飾型プ

⁷⁷ 山口英利子 岐阜大学大学院 応用生物科学研究科 修士論文 2017.

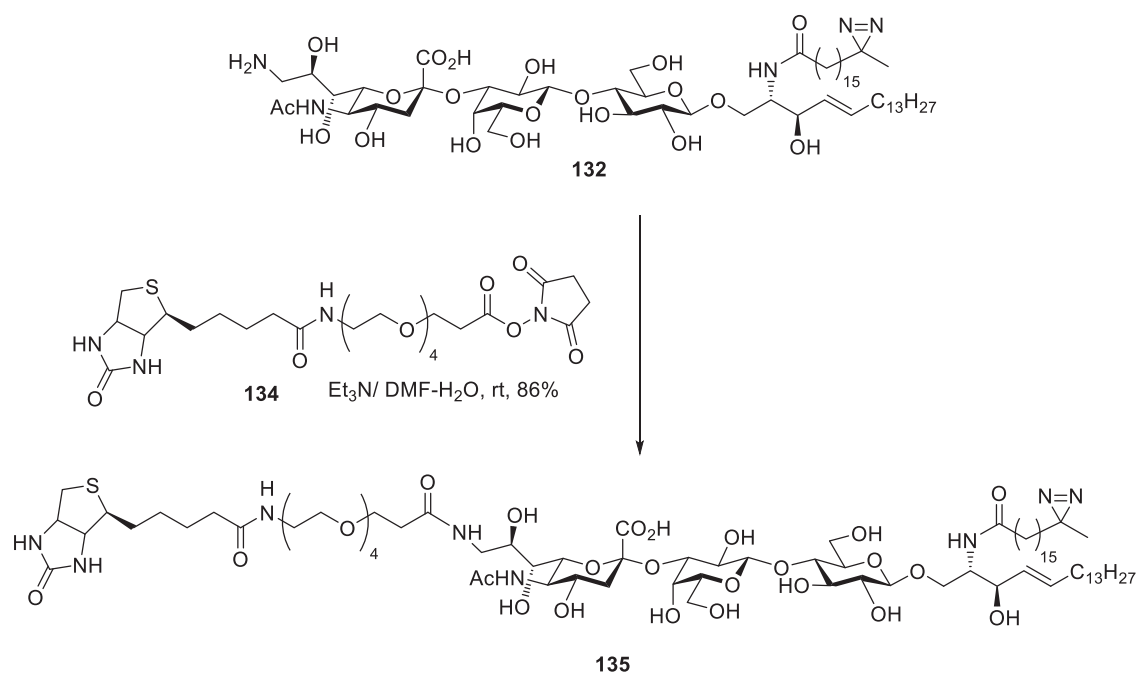
ローブ **133** の合成を達成した。



Scheme 48. 蛍光色素の導入

第六節 ビオチンの導入

続いて脂質修飾型 GM3 のビオチン標識を試みた。アミノ中間体に対し NHS ester **134** を作用させ、ビオチン標識光反応性プローブ **135** の合成も達成した (**Scheme 49**)。



Scheme 49 ビオチンの導入

総括

本研究では光架橋能を付与した新たな機能性 GM3 プローブの合成研究を行った。糖鎖修飾型、脂質修飾型の二種類を設計・合成し、ガングリオシドの相互作用部位に応じて選択可能とした。

糖鎖修飾型二官能性プローブは、蛍光 GM3 プローブの合成法に基づき、検出基と光反応性基の TPD 基を連結させて Neu9 位に導入することで合成を達成した。

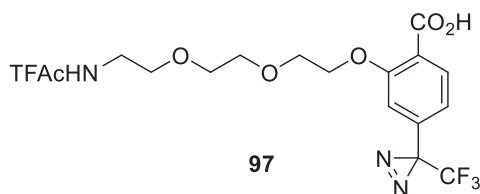
一方で、糖鎖に検出基、脂質に光反応性基を結合させた脂質修飾型二官能性プローブの合成法を検討した。合成上重要であったのが、既存の脂質導入法を模倣した Glc-Sph カセットアプローチによる糖脂質骨格構築である。Sph ユニットの合成法を改良した後、DMTST による Glc 供与体とのグリコシド化反応を検討した。縮合収率が共存する酸捕捉剤の塩基性に依存することを見出し、新規 Glc-Sph カセットの合成に成功した。脂肪酸へ結合させる光反応性基は脂質間相互作用への影響を考慮し、TPD よりも構造が小さなジアジリン基を選択した。15-Pentadecanolactone を原料に、短工程で C17-ジアジリンステアリン酸を合成する経路を確立した。そして、糖脂質骨格構築後、光反応性脂肪酸、検出基を順次導入することで標的分子の合成を達成した。

これにより、二種類の二官能性ガングリオシドプローブの合成を達成した。細胞膜上における架橋反応は今後検討する予定である。

実験の部

本論文において全ての実験は以下の手順、器具及び装置を使用した。また、記載についても以下の通り統一した。

反応溶媒はあらかじめ MS3Å、MS4Å、MS AW-300 (Wako chemical)にて乾燥したものを使用した。反応に用いた乾燥剤は 300 °C にて 2 時間活性化し使用した。TLC 分析には TLC plate silica gel 60F₂₅₄ (Merck)を使用し、検出は UV 吸収 (254 nm)及び発色試薬 (10% H₂SO₄ in EtOH, Phosphomolybdic acid solution 5 wt. % in ethanol, Ninhydrin reagent)を用いた。カラムクロマトグラフィーは Silica gel (Fuji Silysia, 80 mesh and 300 mesh)または、Sephadex (Pharmacia, LH-20)を用いた。なお TLC の展開溶媒及びカラムクロマトグラフィーの溶出溶媒は体積比で ()内に示した。¹H NMR スペクトル及び ¹³C NMR スペクトルは Bruker Avance III 500 (500MHz)を用いた。ケミカルシフト値は、¹H NMR、¹³C NMR については内部標準物質 (tetramethylsilane)に対する δ 値 (ppm)で示した。旋光度は Horiba High Sensitive Polarimeter SEPA-300 を用いて測定し、HRMS スペクトル (ESI-TOF)は Bruker Daltonics micrOTOF (ESI-TOF) mass spectrometer を用いて positive-ion モード、または negative-ion モードで測定した。

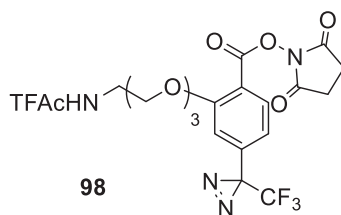


2-{2-[2-(2-Trifluoroacetamidoethoxy)ethoxy]ethoxy}-4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]benzoic acid (97)

Ar 雰囲気下にて、化合物 **93** (50.0 mg, 105 μ mol) を CH_2Cl_2 (1.4 mL) に溶かし、0 $^\circ\text{C}$ にて TFAcOH (0.6 mL) を加え、1 時間室温で撹拌した。反応終了を TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 10:1$ 二回展開) で確認後、溶媒留去を行い、2 時間真空乾燥した。

Ar 雰囲気下にて、化合物 **96** を MeOH (2.0 mL) に溶かし、TEA (146 μL , 1.05 mmol) と TFAcOMe (52.0 μL , 0.525 mmol) を加え、2 時間撹拌した。反応終了を TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 5:1$) で確認後、 CHCl_3 で抽出し、有機層を H_2O 、brine で洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 50:1$ to $10:1$) にて化合物 **97** (46.6 mg, 94%, 2 steps) を得た。

$[\alpha]_{\text{D}} +1.1^\circ$ (c 2.2, CHCl_3); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.16 (d, 1 H, $J_{5,6} = 8.3$ Hz, H-6), 7.26 (s, 1 H, NH), 6.96 (d, 1 H, H-5), 6.79 (s, 1 H, H-3), 4.39-4.37 (m, 2 H, CH_2), 3.92-3.91 (m, 2 H, CH_2), 3.73-3.55 (m, 8 H, 4 CH_2); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 164.4, 157.8, 157.5, 157.4, 157.2, 156.9, 135.9, 134.2, 124.9, 122.8, 120.6, 120.3, 119.8, 119.3, 118.4, 117.0, 114.7, 112.4, 111.6, 71.1, 70.6, 70.4, 70.2, 70.0, 69.4, 68.8, 68.7, 68.3, 39.7, 30.1, 29.6, 28.8, 28.4, 28.1, 27.8; HRMS (ESI) m/z found $[\text{M}-\text{H}]^-$ 472.0949, $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_6$ calcd for $[\text{M}-\text{H}]^-$ 472.0949.

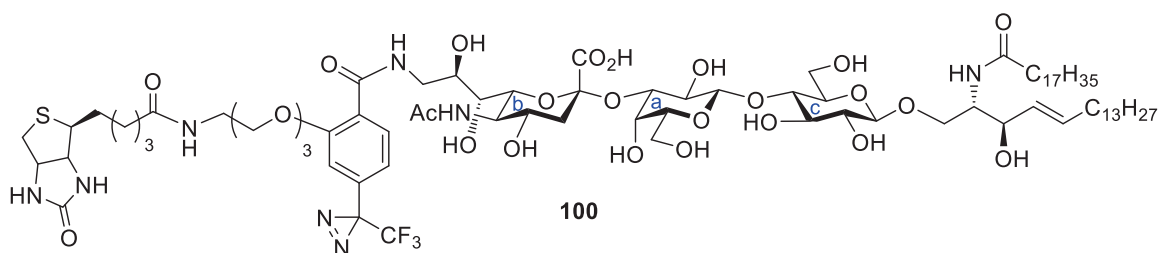


***N*-hydroxysuccinimidyl 2-{2-[2-(2-Trifluoroacetamidoethoxy)ethoxy]ethoxy}-4-[3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl]benzoate (**98**)**

Ar 雰囲気下にて、化合物 **97** (24.1 mg, 50.9 μ mol) を CH_2Cl_2 (2.6 mL) に溶かし、HOSu (8.8 mg, 76 μ mol) と EDC $\cdot$ HCl (14.7 mg, 76.4 μ mol) を加え、室温にて 2 時間撹拌した。反応終了を TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 10:1$) で確認後、 CHCl_3 で抽出し、有機層を H_2O 、brine で洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラム

ムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (CHCl₃/MeOH = 100:1 to 80:1)にて化合物 **98** (27.6 mg, 95%)を得た。

[α]_D +12.5° (*c* 0.5, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.04 (d, 1 H, *J*_{5,6} = 8.3 Hz, H-6), 7.16 (s, 1 H, NH), 6.87 (d, 1 H, H-5), 6.76 (s, 1 H, H-3), 4.24-4.22 (m, 2 H, CH₂), 3.92-3.90 (m, 2 H, CH₂), 3.74-3.51 (m, 8 H, 4 CH₂), 2.89 (s, 4 H, 2 CH₂); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 169.2, 159.6, 159.6, 157.4, 157.1, 136.8, 133.1, 125.0, 122.8, 120.6, 118.5, 118.4, 117.0, 116.0, 114.7, 112.5, 111.3, 71.1, 70.3, 70.2, 69.4, 69.2, 68.7, 68.6, 39.7, 31.9, 30.1, 29.7, 28.9, 28.6, 28.2, 27.9, 25.6, 25.5, 14.1; HRMS (ESI) *m/z* found [M+Na]⁺ 593.1077, C₂₁H₂₀F₆N₄O₈ calcd for [M+Na]⁺ 593.1078.

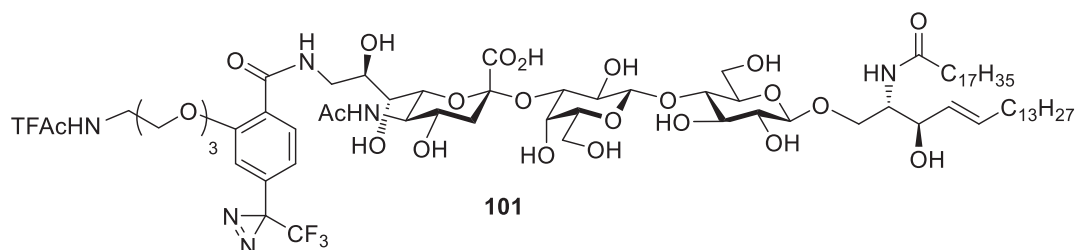


(Biotin-diazirine)-S9-GM3 (**100**)

Ar 雰囲気条件下にて、化合物 **47** (3.0 mg, 1.7 μ mol)を DMF/H₂O (220 μ L/20 μ L)に溶かし、TEA (7.1 μ L, 51 μ mol)、化合物 **99** (2.7 mg, 3.8 μ mol)を加え、室温にて 1.5 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH/5% CaCl₂ aq. = 5:4:0.5)で確認後、ゲルろ過クロマトグラフィー (LH-20, CHCl₃/MeOH = 1:1)、PTLC (CHCl₃/MeOH/H₂O = 5:3.5:0.7)で精製し、化合物 **100** (2.8 mg, 64%)を得た。

[α]_D +22.6° (*c* 0.3, MeOH); ¹H NMR (800 MHz, CD₃OD) δ 8.07-6.82 (m, 3 H, Ar), 5.68 (dt, 1 H, *J*_{4,5} = 15.2 Hz, *J*_{5,6} = *J*_{5,6'} = 6.7 Hz, H-5^{Cer}), 5.45 (dd, 1 H, *J*_{3,4} = 7.7 Hz, H-4^{Cer}), 4.49-3.18 (m, 40 H, H-1a, H-2a, H-3a, H-4a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-4b, H-5b, H-6b, H-7b, H-8b, H-9b, H-9'b, H-1c, H-2c, H-3c, H-4c, H-5c, H-6c, H-6'c, H-1^{Cer}, H-1'^{Cer}, H-2^{Cer}, H-3^{Cer}, 6 CH₂, 3 CH^{Biotin}), 2.91 (m, 1 H,

$\text{CH}_2^{\text{Biotin}}$), 2.85 (dd, 1 H, $J_{\text{gem}} = 12.9$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 4.2$ Hz, H-3 eq-b), 2.70 (m, 1 H, $\text{CH}_2^{\text{Biotin}}$), 2.20-1.29 (m, 65 H, H-3 ax-b , 4 $\text{CH}_2^{\text{Biotin}}$, 28 CH_2^{Cer}), 0.90 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ^{13}C NMR (200 MHz, CD_3OD) δ 176.2, 175.9, 166.1, 135.0, 131.4, 105.0, 104.5, 77.7, 77.0, 76.4, 76.3, 74.8, 74.8, 73.0, 71.7, 71.4, 70.9, 70.6, 70.3, 69.9, 69.1, 63.4, 62.7, 61.6, 57.0, 54.7, 53.9, 41.1, 37.4, 36.7, 33.5, 33.1, 33.1, 30.9, 30.7, 30.7, 30.5, 30.5, 30.5, 30.5, 29.7, 29.5, 27.2, 26.8, 23.8, 23.8, 22.6, 14.5; HRMS (ESI) m/z found $[\text{M-H}]^-$ 1763.9401, $\text{C}_{84}\text{H}_{139}\text{F}_3\text{N}_8\text{O}_{26}\text{S}$ calcd for $[\text{M-H}]^-$ 1763.9401.

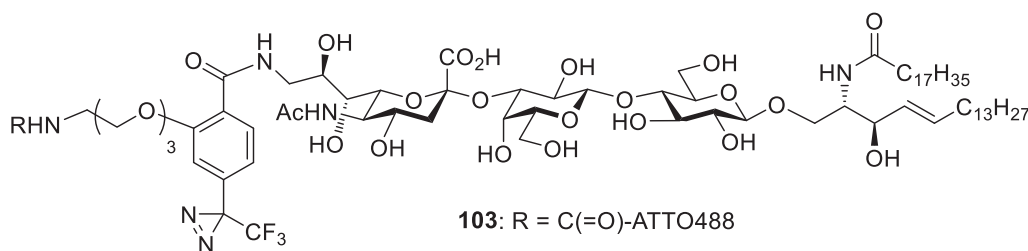


{5-Acetamido-3,5,9-trideoxy-9-(2-{2-[2-(2-trifluoroacetamidoethoxy)ethoxy]ethoxy}-4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]benzamide)-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylonic acid}-(2 $\rightarrow$ 3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(β -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 1)-(2*S*,3*R*,4*E*)-2-octadecanamido-4-octadecene-1,3-diol (101)

Ar 雰囲気条件下にて、化合物 **47** (7.0 mg, 5.9 μmol)を DMF/ H_2O (400 μL /200 μL)に溶かし、TEA (17.0 μL , 119 μmol)、化合物 **98** (6.0 mg, 11 μmol)を加え、室温にて 1.5 時間撹拌した。反応終了を TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/5\% \text{ CaCl}_2 \text{ aq.} = 5:4:1$)で確認後、溶媒留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 5:1.2:0.1$ to $5:1.4:0.1$)で精製し、化合物 **101** (7.9 mg, 81%)を得た。

$[\alpha]_{\text{D}} -11.4^\circ$ (c 0.8, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 1:1$); ^1H NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD} = 1:2$) δ 8.66 (m, 1 H, NHTFAc), 8.07 (d, 1 H, Ar), 7.81 (m, 1 H, NH-9b), 6.98 (d, 1 H, Ar), 6.86 (s, 1 H, Ar), 5.69 (dt, 1 H, $J_{4,5} = 15.2$ Hz, $J_{5,6} = J_{5,6'} = 6.7$ Hz, H-5 $^{\text{Cer}}$), 5.45 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 7.8$ Hz, H-4 $^{\text{Cer}}$), 4.41-3.18 (m, 37 H, H-1a, H-2a, H-3a, H-4a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-4b, H-5b, H-6b, H-7b, H-8b, H-9b, H-9'b, H-1c,

H-2c, H-3c, H-4c, H-5c, H-6c, H-6'c, H-1^{Cer}, H-1'^{Cer}, H-2^{Cer}, H-3^{Cer}, 6 CH₂), 2.83 (dd, 1 H, $J_{\text{gem}} = 13.0$ Hz, $J_{3\text{eq},4} = 3.7$ Hz, H-3_{eq-b}), 2.19-2.01 (m, 4 H, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}, CH₂^{Cer}), 1.96 (s, 3 H, Ac), 1.77 (t, 1 H, $J_{3\text{ax},4} = 13.0$ Hz, H-3_{ax-b}), 1.58-1.17 (m, 52 H, 26 CH₂^{Cer}), 0.91-0.88 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 1:2) δ 175.7, 175.1, 158.8, 158.4, 134.9, 134.5, 133.2, 130.9, 124.5, 124.1, 120.2, 118.3, 112.2, 104.8, 104.2, 80.8, 79.0, 77.3, 76.5, 76.1, 75.9, 74.6, 74.5, 72.8, 71.8, 71.5, 71.2, 70.6, 70.1, 70.0, 69.7, 69.5, 69.0, 68.9, 62.5, 61.7, 54.4, 53.7, 49.7, 49.6, 49.5, 49.3, 47.7, 44.0, 41.5, 40.5, 37.2, 33.3, 32.8, 32.8, 30.6, 30.6, 30.5, 30.5, 30.4, 30.3, 30.2, 30.2, 29.4, 26.9, 23.5, 22.6, 14.4, 9.2; HRMS (ESI) m/z found [M-H]⁻ 1633.8448, C₇₆H₁₂₃F₆N₆O₂₅ calcd for [M-H]⁻ 1633.8448.



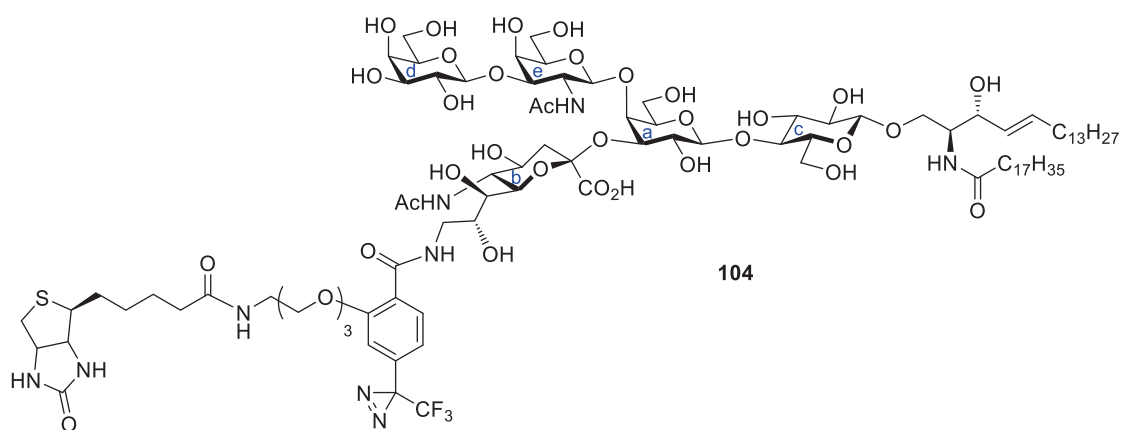
(488-diazirine)-S9-GM3 (**103**)

Ar 雰囲気下にて、化合物 **101** (3.0 mg, 1.8 μmol)を MeOH/THF (0.9 mL/0.9 mL)に溶かし、28 w% NaOMe (7.1 mg, 37 μmol)を加え、室温にて 20 時間撹拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH/5% CaCl₂ aq. = 5:2.5:0.4)で確認後、Muromac C101 を加え反応液を中和した。反応溶液を綿栓ろ過し、溶媒留去を行った後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/MeOH/H₂O = 5:1:0.8 to 5:2.5:0.2)で精製し、化合物 **102** を得た。

続いて、Ar 雰囲気条件下にて、化合物 **102** を DMF/H₂O (220 μL /20 μL)に溶かし、TEA (5.1 μL , 36 μmol)、ATTO488 *N*-succinimidyl ester (8.5 mg, 6.1 μmol)を加え、室温にて 1 時間撹拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH/5% CaCl₂ aq. = 5:2.5:0.4)で確認後、ゲルろ過クロマトグラフィー (LH-20, CHCl₃/MeOH = 1:1)、PTLC (CHCl₃/MeOH/H₂O = 5:2.5:0.4)で精製

し、化合物 **103** (2.1 mg, 55%, 2 steps)を得た。

^1H NMR (800 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD} = 1:3$) δ 8.12-6.78 (m, 11 H, 4 Ar), 5.69 (dt, 1 H, $J_{4,5} = 15.2$ Hz, $J_{5,6} = J_{5,6'} = 6.8$ Hz, H-5^{Cer}), 5.44 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 7.8$ Hz, H-4^{Cer}), 4.47-2.72 (m, 43 H, H-1a, H-2a, H-3a, H-4a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-3eq-b, H-4b, H-5b, H-6b, H-7b, H-8b, H-9b, H-9'b, H-1c, H-2c, H-3c, H-4c, H-5c, H-6c, H-6'c, H-1^{Cer}, H-1'^{Cer}, H-2^{Cer}, H-3^{Cer}, NMe^{ATTO488}, NCH₂^{ATTO488}, 6 CH₂), 2.34-1.49 (m, 14 H, H-3ax-b, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}, 2 CH₂^{ATTO488}, NHCOCH₂^{Cer}, NHCOCH₂CH₂^{Cer}, Ac), 1.37-1.20 (m, 50 H, 25 CH₂^{Cer}), 0.91-0.88 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ^{13}C NMR (200 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD} = 1:3$) δ 175.8, 175.0, 174.7, 170.0, 158.4, 158.2, 157.3, 157.2, 137.3, 135.0, 134.4, 133.0, 131.3, 131.0, 130.8, 128.4, 123.7, 122.4, 120.3, 120.2, 114.7, 114.6, 113.2, 112.1, 104.7, 104.2, 100.9, 80.6, 77.3, 76.6, 76.1, 75.8, 74.4, 72.7, 71.4, 71.0, 70.7, 70.3, 69.9, 69.7, 69.0, 62.6, 61.7, 58.8, 54.4, 53.8, 49.5, 41.7, 40.1, 37.8, 37.2, 33.3, 32.9, 30.6, 30.6, 30.5, 30.5, 30.3, 30.3, 30.2, 27.0, 23.6, 22.8, 14.5; HRMS (ESI) m/z found $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ 1053.9636, $\text{C}_{99}\text{H}_{146}\text{F}_3\text{N}_9\text{O}_{33}\text{S}_2$ calcd for $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ 1053.9636.

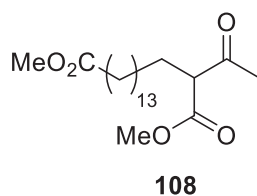


(Biotin-diazirine)-S9-GM1 (104)

Ar 雰囲気条件下にて、化合物 **65** (3.0 mg, 1.9 μmol)を DMF/H₂O (100 μL /100 μL)に溶かし、TEA (5.4 μL , 39 μmol)、化合物 **99** (2.0 mg, 2.9 μmol)を加え、室温にて 1.5 時間撹拌した。反応終了を TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/5\% \text{ CaCl}_2 \text{ aq.} = 5:4:1$)で確認後、ゲルろ過クロマトグラ

フイー (LH-20, CHCl₃/MeOH = 1:1)、PTLC (CHCl₃/MeOH/H₂O = 5:3.5:0.7)で精製し、化合物 **104** (3.1 mg, 80%)を得た。

[α]_D +22.6° (*c* 0.3, MeOH); ¹H NMR (800 MHz, CD₃OD) δ 8.00-6.87 (m, 3 H, Ar), 5.68 (dt, 1 H, $J_{4,5}$ = 15.2 Hz, $J_{5,6}$ = $J_{5,6'}$ = 6.7 Hz, H-5^{Cer}), 5.44 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ = 7.9 Hz, H-4^{Cer}), 4.84-3.17 (m, 54 H, H-1a, H-2a, H-3a, H-4a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-4b, H-5b, H-6b, H-7b, H-8b, H-9b, H-9'b, H-1c, H-2c, H-3c, H-4c, H-5c, H-6c, H-6'c, H-1d, H-2d, H-3d, H-4d, H-5d, H-6d, H-6'd, H-1e, H-2e, H-3e, H-4e, H-5e, H-6e, H-6'e, H-1^{Cer}, H-1'^{Cer}, H-2^{Cer}, H-3^{Cer}, 6 CH₂, 3 CH^{Biotin}), 2.92 (dd, 1 H, CH₂^{Biotin}), 2.76 (dd, 1 H, J_{gem} = 12.5 Hz, $J_{3eq,4}$ = 4.7 Hz, H-3_{eq-b}), 2.70 (d, 1 H, CH₂^{Biotin}), 2.21-1.33 (m, 65 H, H-3_{ax-b}, 4 CH₂^{Biotin}, 28 CH₂^{Cer}), 0.91 (m, 6 H, 2 Me^{Cer}); ¹³C NMR (200 MHz, CD₃OD) δ 176.2, 175.9, 175.4, 175.2, 174.8, 167.1, 166.1, 158.6, 135.1, 134.4, 133.1, 131.4, 125.6, 120.5, 112.5, 106.5, 105.0, 104.5, 104.2, 103.1, 82.8, 81.3, 78.8, 76.6, 76.4, 76.1, 76.0, 75.8, 75.1, 74.8, 74.6, 72.9, 72.6, 71.8, 71.7, 71.4, 71.0, 70.9, 70.6, 70.5, 70.4, 70.2, 69.9, 69.7, 69.6, 63.4, 62.6, 62.4, 61.8, 61.7, 61.6, 57.0, 54.7, 53.9, 52.8, 49.9, 49.5, 49.4, 49.3, 49.3, 43.9, 41.1, 40.3, 39.2, 37.4, 36.7, 33.5, 33.1, 33.1, 30.9, 30.9, 30.8, 30.8, 30.7, 30.7, 30.5, 30.5, 30.5, 30.5, 29.8, 29.6, 29.5, 27.2, 26.8, 23.8, 23.8, 22.6, 14.5; HRMS (ESI) *m/z* found [M-H]⁻ 2129.0722, C₉₈H₁₆₂F₃N₉O₃₆S calcd for [M-H]⁻ 2129.0723.

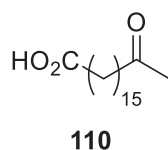


Dimethyl 2-acetylheptadecanedioate (**108**)

Ar 雰囲気下にて、アセト酢酸メチル (3.85 mL, 35.8 mmol)を DMF (130 mL)に溶かし、DBU (5.35 mL, 35.8 mmol)を加え、室温にて 30 分攪拌した。そこへ、化合物 **107** (6.00 g, 17.9 mmol)を DMF (50 mL)に溶解した溶液と、TBAI (2.30 g, 7.16 mmol)を 0 °C にて加え、

40 °C にて 4 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 10:1 二回展開)で確認後、AcOEt で抽出、有機層を 2 M HCl、H₂O、brine で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (*n*-hexane/Et₂O = 10:1 to 6:1)にて化合物 **108** (4.81 g, 73%)を得た。

[α]_D +6.5° (*c* 1.1, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 3.73 (s, 3 H, CO₂Me), 3.66 (s, 3 H, CO₂Me), 3.42 (t, 1 H, CHC(O)Me), 2.30 (t, 2 H, CH₂CO₂Me), 2.22 (s, 3 H, C(O)Me), 1.88-1.81 (m, 2 H, CH₂), 1.65-1.59 (m, 2 H, CH₂), 1.29-1.25 (m, 22 H, 11 CH₂); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 203.1, 174.2, 170.3, 59.7, 52.2, 51.3, 34.0, 29.5, 29.5, 29.4, 29.4, 29.2, 29.2, 29.1, 28.7, 28.2, 27.4, 24.9; HRMS (ESI) *m/z* found [M+Na]⁺ 393.2610, C₂₁H₃₈O₅ calcd for [M+Na]⁺ 393.2611.

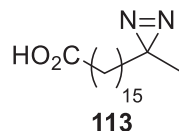


17-Oxostearic acid (**110**)

Ar 雰囲気下にて、化合物 **108** (59.3 mg, 0.160 mmol)を MeOH (3.2 mL)に溶かし、1 M NaOH 水溶液 (3.2 mL)を加え、3.5 時間加熱還流した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 20:1)で確認後、溶媒留去した。残渣を CHCl₃ で抽出、有機層を 2 M HCl、H₂O、brine の順で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (*n*-hexane/Et₂O = 3:2)にて化合物 **110** (45.1 mg, 94%)を得た。

[α]_D +9.9° (*c* 1.3, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 2.41 (t, 2 H, CH₂), 2.34 (t, 2 H, CH₂), 2.13 (s, 3 H, C(O)Me), 1.66-1.59 (m, 2 H, CH₂), 1.58-1.55 (m, 2 H, CH₂), 1.33-1.25 (m, 22 H, 11 CH₂); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 209.5, 179.8, 43.8, 34.0, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 24.7, 23.9; HRMS (ESI) *m/z* found [M-H]⁻ 297.2435, C₁₈H₃₄O₃ calcd for

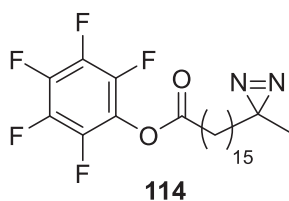
[M+Na]⁺ 297.2435.



16-(3-Methyl-3*H*-diaziren-3-yl)hexadecanoic acid (113)

Ar 雰囲気下にて、化合物 **110** (30.0 mg, 0.100 mmol)を CH₂Cl₂ (1.0 mL)に溶かし、0 °C にて 7.0 M NH₃ MeOH 溶液 (1.0 mL) を加え、3 時間攪拌した。続いて、MeOH (1.0 mL)に溶解させた NH₂OSO₃H (13.6 mg, 0.120 mmol)を加えて 29 時間攪拌した後、0 °C にて TEA (0.2 mL)を加えて 1 時間攪拌した。そして、固体のヨウ素を、反応液が橙色になるまで少しずつ加え、さらに 30 分間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 10:1)で確認後、CHCl₃ で抽出、有機層を 2 M HCl、satd Na₂S₂O₃、brine の順で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (*n*-hexane/Et₂O = 4:1)にて化合物 **113** (20.3 mg, 66%, 4 steps)を白色固体として得た。

[α]_D +5.0° (*c* 2.3, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 2.35 (t, 2 H, CH₂CO₂H), 1.67-1.56 (m, 4 H, 2 CH₂), 1.34-1.12 (m, 24 H, 12 CH₂), 0.99 (s, 3 H, Me); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 179.6, 34.3, 34.0, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.4, 29.2, 29.2, 29.1, 25.9, 24.7, 24.0, 19.9; HRMS (ESI) *m/z* found [M-H]⁻ 309.2548, C₁₈H₃₄N₂O₂ calcd for [M+Na]⁺ 309.2548.

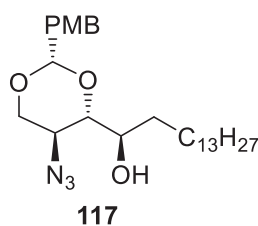


Pentafluorophenyl 16-(3-methyl-3*H*-diaziren-3-yl)hexadecanoate (114)

Ar 雰囲気下にて、化合物 **113** (346 mg, 1.11 mmol)を CH₂Cl₂ (1.4 mL)に溶かし、0 °C にて

PfpOH (422 mg, 2.23 mmol)と EDC·HCl (428 mg, 2.23 mmol)を加え、1 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH = 10:1)で確認後、CHCl₃ で抽出、有機層を satd NaHCO₃、H₂O、brine の順で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (*n*-hexane/Et₂O = 50:1)にて化合物 **114** (473 mg, 90%)を得た。

[α]_D +7.3° (*c* 2.0, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 2.66 (t, 2 H, CH₂CO₂Pfp), 1.80-1.74 (m, 2 H, CH₂), 1.43-1.12 (m, 26 H, 13 CH₂), 0.99 (s, 3 H, Me); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 169.6, 34.3, 33.3, 29.6, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.4, 29.2, 29.1, 28.8, 25.9, 24.8, 24.0, 19.9; HRMS(ESI) *m/z* found [M+Na]⁺ 499.2354, C₂₄H₃₃F₅N₂O₂ calcd for [M+Na]⁺ 499.2354.

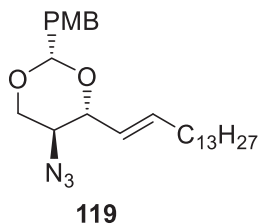


(2*S*,3*S*,4*R*)-1,3-*O*-(4-methoxybenzylidene)-2-azidooctadecane-1,3,4-triol (117**)**

Ar 雰囲気下にて、化合物 **116** (6.00 g, 17.5 mmol)を toluene (175 mL)に溶かし、*p*-anisaldehyde (4.2 mL, 35 mmol)、CSA (407 mg, 1.75 mmol)を加え、共沸条件下にて 10 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/EtOAc = 30:1)で確認後、satd NaHCO₃ で反応を停止した。反応溶液を CHCl₃ で抽出し、有機層を satd NaHCO₃、H₂O、brine の順で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (CHCl₃/EtOAc = 100:1)にて化合物 **117** (4.41 g, 55%)を無色シロップとして得た。

[α]_D +37.0° (*c* 2.0, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.41-6.86 (2 d, 4 H, Ar), 5.43 (s, 1 H, CH), 4.38 (dd, 1 H, *J*_{1,2} = 3.6 Hz, *J*_{gem} = 9.9 Hz, H-1), 3.88 (m, 1 H, H-4), 3.78 (s, 3 H, OMe), 3.75-3.65 (m, 3 H, H-1', H-2, H-3), 2.09 (d, 1 H, *J*_{4,OH} = 11.0 Hz, OH-4), 1.62 (m, 2 H, H-5, H-5'), 1.40-

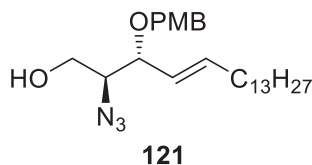
1.26 (m, 24 H, 12 CH₂), 0.88 (t, 3 H, CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 160.6, 130.0, 127.8, 114.0, 101.5, 82.4, 72.7, 69.1, 55.6, 53.5, 32.3, 32.1, 30.0, 30.0, 29.9, 29.9, 29.8, 29.7, 26.3, 23.0, 14.5.; HRMS(ESI) *m/z* found [M+Na]⁺ 484.3146, C₂₆H₄₃N₃O₄ calcd for [M+Na]⁺ 484.3146.



(2*S*,3*R*,4*E*)-1,3-*O*-(4-methoxybenzylidene)-2-azido-4-octadecene-1,3-diol (119)

Ar 雰囲気下にて、化合物 **117** (30.0 mg, 65.0 μmol)を CH₂Cl₂ (2.2 mL)に溶かし、Pyr (31.5 μL, 0.39 mmol)、trifluoromethanesulfonic anhydride (13.1 μL, 78.0 μmol)を加え、0 °C で 15 分間攪拌した。反応終了を TLC (*n*-hexane/Et₂O = 4:1)で確認後、さらに DBU (58.3 μL, 0.39 mmol)を加え、0 °C で 5 時間攪拌をした。反応終了を TLC (*n*-hexane/Et₂O = 4:1)で確認後、MeOH を加えて反応を停止した。反応溶液を CHCl₃ で抽出し、有機層を H₂O、brine の順で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (*n*-hexane/Et₂O = 40:1)にて化合物 **119** (26.3 mg, 91%)を無色シロップとして得た。

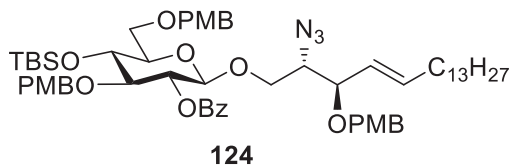
[α]_D +5.0° (*c* 2.0, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.45-6.90 (2 d, 4 H, Ar), 5.96 (dt, 1 H, *J*_{4,5} = 15.5 Hz, *J*_{5,6} = *J*_{5,6'} = 6.9 Hz, H-5), 5.58 (dd, 1 H, *J*_{3,4} = 7.5 Hz, H-4), 5.45 (s, 1 H, CH), 4.32 (dd, 1 H, *J*_{1,2} = 5.2 Hz, *J*_{gem} = 11.1 Hz, H-1), 4.03 (t, 1 H, *J*_{2,3} = 8.3 Hz, H-3), 3.81 (s, 3 H, OMe), 3.60 (t, 1 H, *J*_{1',2} = *J*_{gem} = 11.0 Hz, H-1'), 3.45 (m, 1 H, H-2), 2.10 (m, 2 H, H-6, H-6'), 1.43-1.25 (m, 22 H, 11 CH₂), 0.89 (t, 3 H, CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 159.6, 138.6, 130.1, 129.8, 126.6, 114.2, 80.6, 70.0, 66.3, 63.1, 55.6, 32.8, 32.3, 30.0, 30.0, 30.0, 29.8, 29.7, 29.5, 29.3, 23.0, 14.5.; HRMS(ESI) *m/z* found [M+Na]⁺ 466.3040, C₂₆H₄₁N₃O₃ calcd for [M+Na]⁺ 466.3038.



(2*S*,3*R*,4*E*)-2-Azido-3-*O*-(4-methoxybenzyl)-4-octadecene-1,3-diol (121)

Ar 雰囲気下にて、化合物 **119** (2.00 g, 4.51 mmol)を CH₂Cl₂ (150 mL)に溶かし、MS4Å (3.00 g)を加え、室温にて 1 時間攪拌した。-78 °C に冷却し、Et₃SiH (2.16 mL, 13.5 mmol)、AlCl₃ (722 mg, 5.41 mmol)を加え、-78 °C にて 3.5 時間攪拌した。反応終了を TLC (*n*-hexane/Et₂O = 6:1)で確認後、TEA と MeOH を加え、反応を停止し、CHCl₃ で抽出、有機層を satd NaHCO₃、brine の順で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (*n*-hexane/Et₂O = 9:1)にて化合物 **121** (1.83 g, 92%)を無色シロップとして得た。

[α]_D -75.3° (*c* 2.0, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.25-6.86 (2 d, 4 H, Ar), 5.77 (dt, 1 H, *J*_{4,5} = 15.0 Hz, *J*_{5,6} = *J*_{5,6'} = 7.0 Hz, H-5), 5.42 (dd, 1 H, *J*_{3,4} = 8.5 Hz, H-4), 4.55-4.27 (2 d, 2 H, *J*_{gem} = 11.5 Hz, CH₂), 3.87 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 6.0 Hz, *J*_{3,4} = 8.5 Hz, H-3), 3.79 (s, 3 H, OMe), 3.71-3.68 (m, 2 H, H-1, H-1'), 3.46 (m, 1 H, H-2), 2.33 (s, 1 H, OH-1), 2.12 (m, 2 H, H-6, H-6'), 1.43-1.26 (m, 22 H, 11 CH₂), 0.88 (t, 3 H, CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 160.5, 138.1, 130.2, 127.8, 126.3, 114.0, 101.4, 82.1, 69.4, 57.8, 55.6, 32.9, 32.3, 30.0, 30.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.6, 29.0, 23.0, 14.4; HRMS(ESI) *m/z* found [M+Na]⁺ 468.3197, C₂₆H₄₃N₃O₃ calcd for [M+Na]⁺ 468.3198.

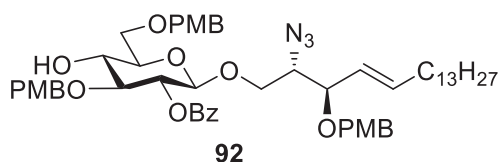


2-*O*-Benzoyl-4-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-3,6-di-*O*-(4-methoxybenzyl)-β-D-glucopyranosyl-(1→1)-(2*S*,3*R*,4*E*)-2-azido-3-*O*-(4-methoxybenzyl)-4-octadecene-1,3-diol (124)

Ar 雰囲気条件下にて、供与体 **123** (85.8 mg, 112 μmol)と受容体 **121** (50.0 mg, 112 μmol)を

CH₂Cl₂ (4.48 mL)に溶かし、MS4Å (336 mg)、2,6-di-*tert*-butyl-4-methylpyrimidine (92 mg, 448 μmol)を加え、室温で1時間攪拌した。そこへ dimethyl disulfide (29 μL, 0.34 mmol)、methyl trifluoromethanesulfonate (38 μL, 0.34 mmol)を0 °Cで加え、さらに室温で7時間攪拌した。反応終了をTLC (toluene/EtOAc = 20:1 二回展開)で確認後、satd NaHCO₃を加えて反応を停止した。反応溶液をセライトろ過した後、ろ液をAcOEtで抽出し、有機層をsatd NaHCO₃、H₂O、brineの順で洗浄した後、Na₂SO₄で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (CHCl₃/EtOAc = 70:1)にて化合物 **124** (109 mg, 92%)を無色シロップとして得た。

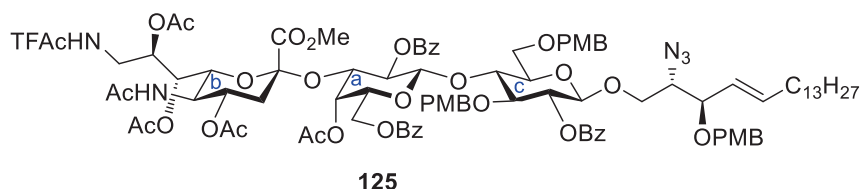
[α]_D +17.0° (c 2.0, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.97-6.63 (m, 17 H, 4 Ar), 5.39 (dt, 1 H, *J*_{4,5} = 13.5 Hz, *J*_{5,6} = *J*_{5,6'} = 7.0 Hz, H-5^{*Sph*}), 5.36-5.23 (m, 2 H, H-2^{*Glc*}, H-4^{*Sph*}), 4.60-4.54 (m, 4 H, H-1^{*Glc*}, CH₂), 4.46-4.10 (3 d, 3 H, *J*_{gem} = 6.0 Hz, CH₂), 4.20 (dd, 1 H, *J*_{1,2} = 5.5 Hz, *J*_{gem} = 10.0 Hz, H-1^{*Sph*}), 3.78-3.48 (m, 15 H, 3 OMe, H-3^{*Glc*}, H-4^{*Glc*}, H-5^{*Glc*}, H-6^{*Glc*}, H-6'^{*Glc*}, H-3^{*Sph*}), 3.52-3.49 (m, 2 H, H-1'^{*Sph*}, H-2^{*Sph*}), 1.93-1.90 (m, 2 H, H-6^{*Sph*}, H-6'^{*Sph*}), 1.44-1.25 (m, 22 H, 11 CH₂), 0.85 (s, 12 H, ^{*t*}Bu, CH₃), 0.01 (s, 3 H, 2 CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 164.9, 159.2, 159.0, 137.8, 133.0, 130.3, 130.1, 130.0, 129.7, 129.2, 129.2, 129.1, 128.3, 125.7, 113.8, 113.4, 101.0, 82.9, 79.4, 76.7, 76.4, 74.4, 74.1, 73.1, 71.2, 69.8, 69.0, 67.8, 63.9, 55.2, 55.2, 55.1, 32.3, 31.9, 29.7, 29.5, 29.4, 29.2, 29.0, 25.9, 22.7, 18.0, 14.1; HRMS (ESI) *m/z* found [M+Na]⁺ 1088.6002, C₆₁H₈₇N₃O₁₁Si calcd for [M+Na]⁺ 1088.6002.



2-*O*-Benzoyl-3,6-di-*O*-(4-methoxybenzyl)-β-D-glucopyranosyl-(1→1)-(2*S*,3*R*,4*E*)-2-azido-3-*O*-(4-methoxybenzyl)-4-octadecene-1,3-diol (92)

Ar 雰囲気条件下にて、化合物 **124** (848 mg, 0.795 mmol) を THF (16 mL) に溶かし、1 M tetra-*n*-butylammonium fluoride THF 溶液 (2.39 mL, 2.39 mmol) を加え、室温にて 45 分間攪拌した。反応終了を TLC (toluene/EtOAc = 3:1) で確認後、AcOEt で抽出し、有機層を satd NaHCO₃、brine の順で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (toluene/EtOAc = 15:1) にて化合物 **92** (754 mg, 99%) を無色シロップとして得た。

$[\alpha]_D^{25} 13.0^\circ$ (*c* 2.0, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.05-6.69 (m, 17 H, 4 Ar), 5.40 (dt, 1 H, $J_{4,5} = 13.6$ Hz, $J_{5,6} = J_{5,6'} = 6.7$ Hz, H-5^{Sph}), 5.28-5.21 (m, 2 H, H-4^{Sph}, H-2^{Glc}), 4.67-4.60 (2 d, 2 H, $J_{gem} = 11.0$ Hz, CH₂), 4.56-4.49 (m, 3 H, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, H-1^{Glc}, CH₂), 4.35-4.10 (2 d, 2 H, $J_{gem} = 11.0$ Hz, CH₂), 3.91 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 5.6$ Hz, $J_{gem} = 10.2$ Hz, H-1^{Sph}), 3.86-3.72 (m, 13 H, H-4^{Glc}, H-6^{Glc}, H-6'^{Glc}, H-3^{Sph}, 3 OMe), 3.64 (t, 1 H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.2$ Hz, H-3^{Glc}), 3.57 (m, 1 H, H-5^{Glc}), 3.55-3.47 (m, 2 H, H-1'^{Sph}, H-2^{Sph}), 2.77 (s, 1 H, OH-4^{Glc}), 1.93-1.90 (m, 2 H, H-6^{Sph}, H-6'^{Sph}), 1.31-1.26 (m, 22 H, 11 CH₂), 0.88 (t, 3 H, CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 167.9, 159.4, 159.2, 159.0, 137.9, 133.1, 130.3, 130.1, 130.0, 129.6, 129.1, 128.4, 125.6, 113.9, 113.8, 113.7, 101.2, 81.6, 79.3, 76.7, 74.0, 74.0, 73.5, 73.3, 72.5, 70.1, 69.8, 68.1, 63.8, 55.3, 55.2, 55.1, 32.3, 31.9, 29.7, 29.7, 29.5, 29.4, 29.2, 28.9, 22.7, 14.1; HRMS (ESI) *m/z* found [M+Na]⁺ 974.5137, C₅₅H₇₃N₃O₁₁ calcd for [M+Na]⁺ 974.5137.



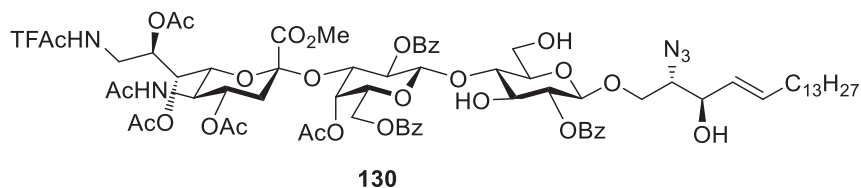
(Methyl 5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylonate)-(2→3)-4-*O*-acetyl-2,6-di-*O*-benzoyl- β -D-galactopyranosyl-(1→4)-2-*O*-benzoyl-3,6-di-*O*-(4-methoxybenzyl)- β -D-glucopyranosyl-(1→1)-(2*S*,3*R*,4*E*)-2-azido-

3-*O*-(4-methoxybenzyl)-4-octadecene-1,3-diol (**125**)

Ar 雰囲気条件下にて、供与体 **43** (60.1 mg, 54.6 μmol)と受容体 **92** (78.0 mg, 81.0 μmol)を CH_2Cl_2 (2.7 mL)に溶かし、MS AW-300 (200 mg)を加え、室温で 1 時間撹拌した。そこへ TMSOTf (1.0 μL , 5.5 μmol)を加え、0 $^\circ\text{C}$ にて 1 時間撹拌した。反応終了を TLC (toluene/EtOAc/MeOH = 1:1:0.1 二回展開)で確認後、TEA を加えて反応を停止した。反応溶液をセライトろ過した後、ろ液を CHCl_3 で抽出し、有機層を satd NaHCO_3 、brine の順で洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 90:1$)にて化合物 **125** (94.8 mg, 92%)を白色結晶として得た。

$[\alpha]_D^{25} 31.4^\circ$ (c 0.7, CHCl_3); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.18-6.61 (m, 28 H, 6 Ar, NH-9b), 5.41-5.30 (m, 3 H, H-5^{Sph}, H-8b, H-2a), 5.22 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 8.7$ Hz, $J_{4,5} = 15.5$ Hz, H-4^{Sph}), 5.17 (t, 1 H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 8.4$ Hz, H-2c), 5.09 (d, 1 H, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, H-1a), 5.08 (d, 1 H, $J_{3,4} = 3.4$ Hz, H-4a), 5.01 (d, 1 H, $J_{\text{NH},5} = 10.5$ Hz, NH-5b), 4.86 (dd, 1 H, $J_{6,7} = 2.6$ Hz, $J_{7,8} = 10.3$ Hz, H-7b), 4.84-4.80 (m, 2 H, H-4b, CH_2), 4.65 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, H-3a), 4.62-4.44 (3 d, 3 H, $J_{\text{gem}} = 11.1$ Hz, CH_2), 4.36 (d, 1 H, H-1c), 4.33-4.07 (m, 6 H, H-1'^{Sph}, H-9b, H-6a, H-6'a, CH_2), 3.98 (q, 1 H, $J_{4,5} = J_{5,6} = 10.5$ Hz, H-5b), 3.86-3.81 (m, 2 H, H-4c, H-5a), 3.77-3.63 (m, 15 H, 3 OMe, COOMe, H-3^{Sph}, H-3c, H-6c), 3.60 (dd, 1 H, $J_{5,6'} = 5.0$ Hz, $J_{\text{gem}} = 11.1$ Hz, H-6'c), 3.54 (m, 1 H, H-5c), 3.47 (dd, 1 H, H-6b), 3.39-3.35 (m, 2 H, H-1'^{Sph}, H-2^{Sph}), 2.59 (near d, 1 H, H-9'b), 2.51 (dd, 1 H, $J_{3\text{eq},4} = 4.6$ Hz, $J_{\text{gem}} = 12.7$ Hz, H-3eq-b), 2.10-1.59 (m, 18 H, 5 Ac, H-6^{Sph}, H-6'^{Sph}, H-3ax-b), 1.31-1.25 (m, 22 H, 11 CH_2), 0.89-0.83 (m, 3 H, CH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 172.6, 170.9, 170.3, 170.2, 170.1, 167.7, 165.6, 164.9, 164.8, 159.0, 158.9, 158.8, 158.0, 157.7, 137.8, 133.3, 133.1, 132.9, 130.5, 130.4, 130.3, 130.2, 130.1, 130.0, 129.8, 129.7, 129.6, 129.2, 129.1, 128.8, 128.5, 128.3, 125.5, 117.0, 114.7, 113.7, 113.6, 113.4, 100.9, 100.2, 97.0, 80.0, 79.3, 76.7, 76.1, 75.1, 73.7, 73.2, 72.7, 72.1, 71.8, 71.7, 70.5, 69.7, 69.3, 68.3, 67.9, 67.6, 67.1, 66.7, 63.7, 61.3, 55.2, 55.1, 55.0, 53.0, 48.8,

38.2, 37.2, 37.1, 32.3, 31.9, 30.0, 29.7, 29.7, 29.6, 29.6, 29.4, 29.3, 29.1, 28.9, 23.0, 22.7, 21.0, 20.7, 20.7, 20.6, 14.1, 1.0; HRMS (ESI) m/z found $[M+Na]^+$ 1912.7706, $C_{97}H_{118}F_3N_5O_{30}$ calcd for $[M+Na]^+$ 1912.7709.

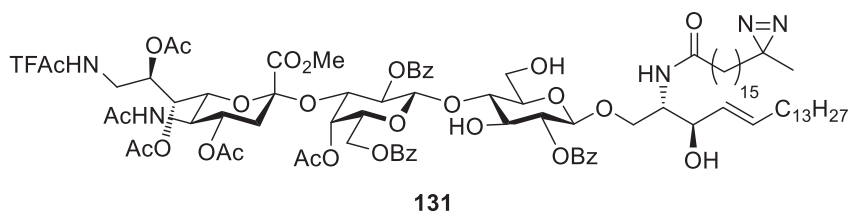


(Methyl 5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-*D*-glycero- α -*D*-galacto-2-nonulopyranosylonate)-(2 $\rightarrow$ 3)-4-*O*-acetyl-2,6-di-*O*-benzoyl- β -*D*-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-*O*-benzoyl- β -*D*-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 1)-(2*S*,3*R*,4*E*)-2-azido-4-octadecene-1,3-diol (130)

Ar 雰囲気下にて、化合物 **125** (30.0 mg, 15.8 μ mol)を CH_2Cl_2 (0.13 mL)に溶かし、TFAcOH (1.3 mL)、 H_2O (0.26 mL)を加え、0 $^{\circ}C$ にて 1 時間攪拌した。反応終了を TLC ($CHCl_3/MeOH = 20:1$ 二回展開)にて確認後、satd $NaHCO_3$ を加えて反応を停止した。反応溶液を $CHCl_3$ で抽出し、有機層を satd $NaHCO_3$ 、brine の順で洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 ($CHCl_3/MeOH = 40:1$ to $30:1$)にて化合物 **130** (23.7 mg, 98%)を得た。

$[\alpha]_D +33.1^{\circ}$ (c 4.0, $CHCl_3$); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.21-7.34 (m, 15 H, 3 Ar), 7.15 (m, 1 H, NH-9b), 5.58-5.48 (m, 2 H, H-5^{Sph}, H-8b), 5.38-5.34 (m, 2 H, H-4^{Sph}, H-2a), 5.20 (t, 1 H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 8.5$ Hz, H-2c), 5.07 (d, 1 H, $J_{3,4} = 3.5$ Hz, H-4a), 5.00 (d, 1 H, $J_{NH,5} = NH-5b$), 4.97 (d, 1 H, $J_{1,2} = 8.0$ Hz, H-1a), 4.94 (dd, 1 H, $J_{6,7} = 2.7$ Hz, $J_{7,8} = 10.2$ Hz, H-7b), 4.81 (dt, 1 H, $J_{3eq,4} = 4.5$ Hz, $J_{4,5} = 11.8$ Hz, $J_{3ax,4} = 12.0$ Hz, H-4b), 4.74 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, H-3a), 4.55 (m, 1 H, H-6a), 4.54 (d, 1 H, H-1c), 4.15-4.06 (m, 4 H, H-6'a, H-9b, H-5a, H-3^{Sph}), 3.99-3.88 (m, 3 H, H-3c, H-1^{Sph}, H-5b), 3.84-3.80 (m, 4 H, H-4c, COOMe), 3.58 (dd, 1 H, $J_{1',2} = 4.5$ Hz, $J_{gem} = 10.0$ Hz, H-1'^{Sph}), 3.52-3.42 (m, 4 H, H-6c, H-6'c, H-2^{Sph}, H-6b), 3.36 (m, 1 H, H-5c), 2.86 (m, 1 H, H-9'b), 2.53 (dd, 1 H, $J_{gem} =$

12.5 Hz, H-3_{eq}-b), 2.17-1.55 (m, 18 H, 5 Ac, H-3_{ax}-b, H-6^{Sph}, H-6^{’Sph}), 1.30-1.26 (m, 22 H, 11 CH₂), 0.94-0.84 (m, 3 H, CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 172.2, 170.8, 170.7, 170.3, 170.1, 167.8, 166.2, 165.2, 164.9, 158.2, 157.9, 136.0, 133.5, 133.3, 133.0, 130.2, 129.9, 129.8, 129.6, 129.0, 128.5, 128.4, 128.3, 127.3, 119.2, 116.9, 114.7, 101.7, 100.9, 96.9, 80.9, 74.3, 73.2, 73.1, 72.2, 71.8, 71.5, 71.3, 70.8, 69.3, 68.5, 67.6, 67.3, 66.7, 64.7, 62.4, 60.6, 53.3, 48.7, 39.1, 37.2, 37.1, 32.7, 32.2, 31.9, 30.0, 29.7, 29.6, 29.6, 29.6, 29.4, 29.3, 29.2, 28.8, 27.1, 23.0, 22.7, 21.2, 20.7, 20.6, 19.7, 14.1; HRMS (ESI) *m/z* found [M+Na]⁺ 1552.5980, C₇₃H₉₄F₃N₅O₂₇ calcd for [M+Na]⁺ 1552.5980.

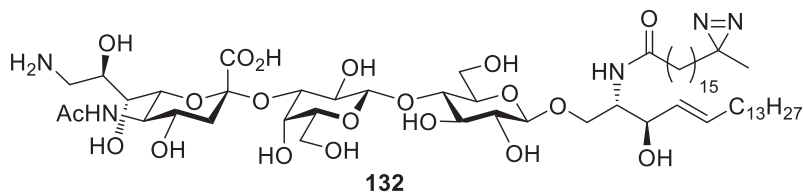


(Methyl 5-acetamido-4,7,8-tri-*O*-acetyl-3,5,9-trideoxy-9-trifluoroacetamido-*D*-glycero- α -*D*-galacto-2-nonulopyranosylonate)-(2→3)-4-*O*-acetyl-2,6-di-*O*-benzoyl- β -*D*-galactopyranosyl-(1→4)-2-*O*-benzoyl- β -*D*-glucopyranosyl-(1→1)-(2*S*,3*R*,4*E*)-2-[16-(3-methyl-3*H*-diaziren-3-yl)hexadecanamido]-4-octadecene-1,3-diol (131)

Ar 雰囲気下にて、化合物 **130** (30.0 mg, 15.8 μ mol)を 98% THF 水溶液 (1.2 mL)に溶かし、化合物 **114** (16.6 mg, 34.8 μ mol)、HOObt (5.7 mg, 35 μ mol)、PBU₃ (8.6 μ L, 35 μ mol)を加え、室温にて 26 時間攪拌した。反応終了を TLC (toluene/AcOEt/MeOH = 1:1:0.1 二回展開)にて確認後、AcOE で抽出し、有機層を H₂O、brine の順で洗浄した後、Na₂SO₄で乾燥した。これを濾別し、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、溶出溶媒 (toluene/AcOEt/MeOH = 4:1:0.13 to 4:1:0.25)にて化合物 **131** (10.8 mg, 52%)を得た。

[α]_D +25.6° (*c* 0.8, CHCl₃); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.21-7.29 (m, 15 H, 3 Ar), 7.19 (m, 1

H, NH-9b), 5.74 (d, 1 H, $J_{2,\text{NH}} = 8.2$ Hz, NH^{Sph}), 5.65 (dt, 1 H, $J_{4,5} = 15.8$ Hz, $J_{5,6} = J_{5,6'} = 6.8$ Hz, $\text{H-}5^{Sph}$), 5.51 (m, 1 H, H-8b), 5.40 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 6.8$ Hz, $\text{H-}4^{Sph}$), 5.36 (t, 1 H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 8.2$ Hz, H-2a), 5.15 (t, 1 H, $J_{1,2} = J_{2,3} = 8.9$ Hz, H-2c), 5.06-5.04 (m, 2 H, NH-5b, H-4a), 4.97 (d, 1 H, $J_{1,2} = \text{H-}1\text{a}$), 4.94 (dd, 1 H, $J_{6,7} = 2.7$ Hz, $J_{7,8} = 9.7$ Hz, H-7b), 4.81 (dt, 1 H, $J_{3ax,4} = 12.4$ Hz, $J_{3eq,4} = 4.9$ Hz, $J_{4,5} = 11.7$ Hz, H-4b), 4.74 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 2.8$ Hz, H-3a), 4.52 (m, 1 H, H-6a), 4.43 (d, 1 H, H-1c), 4.16-4.02 (m, 5 H, H-5a, H-6'a, H-9b, $\text{H-}1^{Sph}$, $\text{H-}3^{Sph}$), 3.98-3.90 (m, 3 H, H-5b, H-3c, $\text{H-}2^{Sph}$), 3.81-3.79 (m, 4 H, H-4c, COOMe), 3.54-3.50 (m, 4 H, H-6b, H-6c, H-6'c, $\text{H-}1'^{Sph}$), 3.34 (m, 1 H, H-5c), 2.87 (m, 1 H, H-9'b), 2.54 (dd, 1 H, $J_{\text{gem}} = 12.4$ Hz, H-3eq-b), 2.17-1.58 (m, 22 H, 5 Ac, H-3ax-b, $\text{H-}6^{Sph}$, $\text{H-}6'^{Sph}$, 2 CH_2), 1.40-1.07 (m, 48 H, 24 CH_2), 0.99 (s, 3 H, Me), 0.89-0.87 (m, 3 H, Me); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 173.2, 172.3, 170.9, 170.8, 170.3, 170.2, 167.8, 166.1, 165.6, 164.9, 134.4, 133.6, 133.3, 130.3, 129.9, 129.8, 129.7, 129.6, 129.0, 129.0, 128.7, 128.6, 128.5, 128.5, 128.3, 101.7, 101.2, 96.9, 81.0, 79.2, 77.6, 76.6, 74.4, 73.5, 73.0, 72.8, 71.8, 71.6, 71.3, 70.8, 69.3, 68.8, 67.6, 67.3, 66.7, 62.4, 60.7, 53.3, 52.8, 48.7, 39.0, 37.2, 37.1, 36.3, 34.3, 32.3, 31.9, 30.0, 29.6, 29.5, 29.4, 29.4, 29.3, 29.3, 29.3, 29.2, 29.2, 27.1, 25.9, 25.5, 24.0, 23.1, 22.7, 21.2, 20.7, 20.7, 20.6, 19.9, 14.1, 1.0; HRMS (ESI) m/z found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1818.8590, $\text{C}_{91}\text{H}_{128}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_{28}$ calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1818.8590.

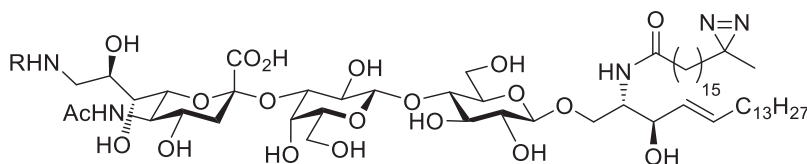


(5-Acetamido-9-amino-3,5,9-trideoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylonic acid)-(2 $\rightarrow$ 3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-(β -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 1)-(2*S*,3*R*,4*E*)-2-[16-(3-methyl-3*H*-diaziren-3-yl)hexadecanamido]-4-octadecene-1,3-diol (132)

Ar 雰囲気下にて、化合物 **131** (10.0 mg, 5.56 μmol)を MeOH/THF (1.0 mL/1.0 mL)に溶か

し、1 M NaOH 水溶液 (111 μ L)を加え、室温にて 17 時間攪拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH/5% CaCl₂ aq. = 5:3:0.2)で確認後、Muromac C101 を加え反応液を中和した。反応溶液を綿栓ろ過し、溶媒留去を行った後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/MeOH/H₂O = 5:1.6:0.1 to 5:2.5:0.12)で精製し、化合物 **132** (6.7 mg, quant.)を白色粉末として得た。

$[\alpha]_D^{+3.7^\circ}$ (*c* 0.7, CHCl₃/MeOH = 1:1); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 1:1) δ 5.70 (dt, 1 H, $J_{4,5} = 15.2$ Hz, $J_{5,6} = J_{5,6'} = 6.8$ Hz, H-5^{Cer}), 5.46 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 7.6$ Hz, H-4^{Cer}), 4.39 (d, 1 H, $J_{1,2} = 7.5$ Hz, H-1a), 4.31 (d, 1 H, $J_{1,2} = 7.5$ Hz, H-1c), 4.25-3.31 (m, 22 H, H-2a, H-3a, H-4a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-4b, H-5b, H-6b, H-7b, H-8b, H-9b, H-2c, H-3c, H-4c, H-5c, H-6c, H-6'c, H-1^{Cer}, H-1'^{Cer}, H-2^{Cer}, H-3^{Cer}), 2.91 (br dd, 1 H, H-9'b), 2.85 (dd, 1 H, $J_{gem} = 12.4$ Hz, $J_{3eq,4} = 4.8$ Hz, H-3eq-b), 2.17 (t, 2 H, NHCOCH₂^{Cer}), 2.04-2.01 (m, 5 H, Ac, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}), 1.77 (t, 1 H, $J_{3ax,4} = 12.4$ Hz, H-3ax-b), 1.63-1.17 (m, 50 H, 25 CH₂^{Cer}), 0.99 (s, 3 H, Me^{Cer}), 0.89 (s, 3 H, Me^{Cer}); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃/CD₃OD = 1:1) δ 175.2, 175.1, 174.0, 135.0, 130.1, 104.6, 104.6, 100.6, 100.5, 80.4, 78.6, 77.2, 76.4, 75.3, 75.2, 74.0, 72.5, 71.7, 70.0, 69.2, 68.4, 68.2, 68.2, 62.1, 61.1, 53.7, 53.1, 49.8, 49.7, 49.5, 43.6, 41.2, 36.9, 34.8, 32.9, 32.4, 30.2, 30.1, 30.1, 30.0, 29.9, 29.9, 29.8, 29.7, 26.5, 26.3, 24.5, 23.2, 22.5, 20.0, 14.3, 1.3; HRMS (ESI) *m/z* found [M-H]⁻ 1204.7437, C₅₉H₁₀₇N₅O₂₀ calcd for [M-H]⁻ 1204.7437.



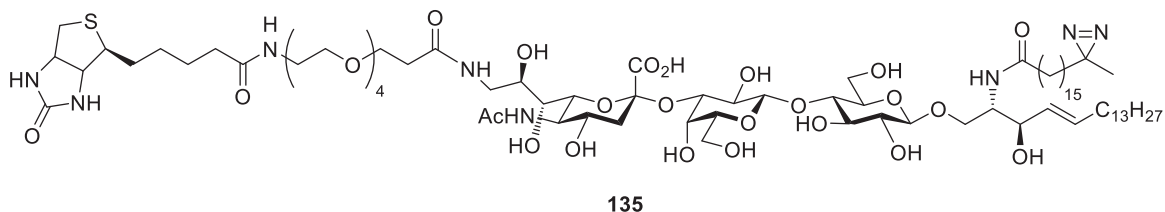
133: R = C(=O)-ATTO594

594-S9-diazirine(FA)-GM3 (**133**)

Ar 雰囲気条件下にて、化合物 **132** (2.0 mg, 1.65 μ mol)を DMF/H₂O (154 μ L/14 μ L)に溶かし、TEA (4.6 μ L, 33 μ mol)、ATTO594 *N*-succinimidyl ester (3.4 mg, 2.5 μ mol)を加え、室温に

て1時間攪拌した。反応終了をTLC (CHCl₃/MeOH/5% CaCl₂ aq. = 5:4:1)で確認後、ゲルろ過クロマトグラフィー (LH-20, CHCl₃/MeOH = 1:1)、PTLC (CHCl₃/MeOH/H₂O = 5:4:0.5)で精製し、化合物 **133** (2.8 mg, 88%)を得た。

¹H NMR (800 MHz, CD₃OD) δ 7.75-7.37 (m, 4 H, Ar^{ATTO594}), 7.34 (s, 1 H, Ar^{ATTO594}), 7.33 (s, 1 H, Ar^{ATTO594}), 6.81 (s, 1 H, Ar^{ATTO594}), 6.79 (s, 1 H, Ar^{ATTO594}), 5.90 (s, 1 H, CH^{ATTO594}), 5.88 (s, 1 H, CH^{ATTO594}), 5.68 (dt, 1 H, *J*_{4,5} = 15.1 Hz, *J*_{5,6} = *J*_{5,6'} = 6.6 Hz, H-5^{Cer}), 5.43 (dd, 1 H, *J*_{3,4} = 7.8 Hz, H-4^{Cer}), 4.35-3.19 (m, 35 H, H-1a, H-2a, H-3a, H-4a, H-5a, H-6a, H-6'a, H-4b, H-5b, H-6b, H-7b, H-8b, H-9b, H-9'b, H-1c, H-2c, H-3c, H-4c, H-5c, H-6c, H-6'c, H-1^{Cer}, H-1'^{Cer}, H-2^{Cer}, H-3^{Cer}, 3 NCH₂^{ATTO594}, 2 CH₂SO₃^{ATTO594}), 2.84 (dd, 1 H, *J*_{gem} = 13.0 Hz, *J*_{3eq,4} = 3.6 Hz, H-3eq-b), 2.70/2.65 (s, 3 H, NMe^{ATTO594}), 2.16 (t, 2 H, NHCOCH₂^{Cer}), 2.04-1.98 (m, 5 H, Ac, H-6^{Cer}, H-6'^{Cer}), 1.78-1.15 (m, 73 H, H-3ax-b, 25 CH₂^{Cer}, 4 Me^{ATTO594}, NCH₂CH₂^{ATTO594}, NCH₂CH₂CH₂^{ATTO594}, 2 NCH₂CH₃^{ATTO594}) 0.97 (s, 3 H, Me^{Cer}), 0.90 (m, 3 H, Me^{Cer}); ¹³C NMR (200 MHz, CD₃OD) δ 176.0, 175.4, 171.2, 159.1, 159.1, 154.8, 154.2, 154.2, 138.5, 138.4, 135.0, 132.2, 131.7, 131.5, 131.1, 130.7, 126.1, 124.1, 122.9, 122.9, 115.0, 115.0, 105.0, 104.6, 97.2, 97.1, 80.9, 77.7, 77.0, 76.5, 76.2, 74.8, 72.9, 71.9, 70.9, 70.1, 69.4, 69.0, 64.4, 62.7, 62.0, 61.8, 61.7, 54.7, 54.0, 53.9, 53.8, 49.5, 49.4, 49.3, 49.3, 49.2, 49.2, 49.1, 49.0, 48.9, 48.8, 48.7, 47.6, 43.9, 42.0, 41.5, 38.8, 37.4, 35.3, 33.6, 33.5, 33.1, 30.9, 30.9, 30.9, 30.8, 30.7, 30.6, 30.5, 30.5, 30.5, 30.3, 29.5, 29.4, 29.3, 29.3, 27.2, 26.6, 25.1, 23.8, 23.7, 22.7, 20.0, 14.5, 13.8, 13.7; HRMS (ESI) *m/z* found [M-2H]²⁻ 995.4981, C₁₀₀H₁₅₂N₈O₂₉S₂ calcd for [M-2H]²⁻ 995.4981.



Biotin-S9-diazirine(FA)-GM3 (135)

Ar 雰囲気条件下にて、化合物 **132** (1.0 mg, 0.83 μmol) を DMF/H₂O (154 μL /14 μL) に溶かし、TEA (2.3 μL , 17 μmol)、化合物 **134** (0.7 mg, 1 μmol) を加え、室温にて 40 分撹拌した。反応終了を TLC (CHCl₃/MeOH/5% CaCl₂ aq. = 5:4:1) で確認後、ゲルろ過クロマトグラフィー (LH-20, CHCl₃/MeOH = 1:1)、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃/MeOH/H₂O = 5:3:0.15) で精製し、化合物 **135** (1.2 mg, 86%) を得た。HRMS (ESI) m/z found [M-H]⁻ 1677.9632, C₈₀H₁₄₂N₈O₂₇S calcd for [M-H]⁻ 1677.9632.

結語

本研究では、細胞膜ドメインの形成機構や構造の解明を目的に、ガングリオシドの機能性プローブの開発に取り組んだ。機能性官能基の種類や導入位置がガングリオシドの物性に影響することを証明し、本来の性質を保った優れたガングリオシドプローブの開発に成功した。このような分子設計の最適化には、多様な分子を網羅的に合成可能な有機化学的なアプローチが必須であり、今後の糖鎖及び複合糖質のプローブ開発においても有効な手段であると期待される。しかしながら、ガングリオシドをはじめとしたシアル酸含有化合物は、今後、シアロシド結合構築における完全な立体制御法が必要とされるであろう。

蛍光ガングリオシドの一分子観察実験によって、脂質ラフト関連分子との相互作用の観察に初めて成功しただけでなく、ガングリオシド同士がホモダイマーを形成するという新たな知見を得た。これは、脂質ラフト等の細胞膜ドメインは、ガングリオシドのホモダイマーの会合が起点となって形成される可能性を示唆し、細胞膜ドメイン形成機構を解く重要な結果を得た。このように、ガングリオシドの動態解析法は確立されつつある。今後は、ガングリオシド親和性分子の特定や会合体形成後の動態解析に焦点が置かれるであろう。しかしながら、膜分子の会合体形成は可逆的であり、かつ非常に短寿命であるため、会合体の解析・観察はこれからの課題になると考えられる。この課題の解決策の一つとして、本研究では二官能性の光反応性プローブを開発し、プローブの機能拡張により会合体の解析を目指すアプローチを提案した。本研究のコンセプトが妥当であれば、ガングリオシドと親和性分子の架橋体の動態観察のみならず、親和性分子の特定も可能であると考えられ、今後の細胞膜ドメイン形成機構の研究に貢献できることが期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、研究の機会を与えて下さり、終始御懇篤な御指導を賜りました木曾真名誉教授、石田秀治教授、安藤弘宗教授、今村彰宏准教授、田中秀則助教に厚く御礼申し上げます。また、本論文を審査して頂きました、静岡大学農学部の河合真吾教授に御礼申し上げます。

共同研究者として、蛍光ガングリオシドの機能評価、並びに一分子観察を行って頂き、また、論文作成においても多大なるご指導、ご助力を賜りました沖縄科学技術大学院大学膜協同性ユニットの楠見明弘教授、岐阜大学研究推進・社会連携機構の鈴木健一教授に厚く御礼申し上げます。さらに、共同研究者、Iowa 大学の Dr. Rahul Chadda、京都大学高等研究院 iCeMS の藤原敬宏特定准教授、坪井久恵客員研究員、Harvard Medical School の Dr. Ren Sheng、Illinois 大学の Prof. Wonhwa Cho、中部大学生命健康科学部の古川鋼一教授、古川圭子教授、東京大学大学院農学生命科学研究科の山内祥生特任准教授に心より感謝申し上げます。

そして、様々な御助言を頂きました青森大学の植木章晴准教授、Dr. Rita Pal、藤川紘樹博士、岩山祐己博士、玉井秀樹博士、中島慎也博士、鈴木達哉博士、島袋隼平博士、八神なほこ博士に感謝いたします。

ガングリオシドプローブ合成達成を目指し、苦楽を共にしてくださった、松井泉美修士、小池田真知修士、山崎彩乃修士、山口英利子修士、浅野早知修士に深く感謝いたします。日々の生活を充実したものに下さった生理活性物質学研究室の皆様に御礼致します。

最後に学生時代より研究生活を理解し、支えて下さった父、母、妹に感謝し謝辞とさせていただきます。