



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

セレノ化糖を用いた蛋白質結晶構造解析に関する基盤研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2018-08-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 島袋, 隼平 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/56218

セレノ化糖を用いた蛋白質結晶構造解析に関する基盤研究

2016 年

岐阜大学大学院連合農学研究科

生物資源科学

(岐阜大学)

島袋 隼平

セレノ化糖を用いた蛋白質結晶構造解析に関する基盤研究

島袋 隼平

略号表

本論文において以下に示す、省略表記を用いた。

Ac : acetyl

BDA : benzaldehyde dimethylacetal

Bn : benzyl

BOM : benzyloxymethyl

Bz : benzoyl

Bzld : benzylidene

CSA : dl-10-camphorsulfonic acid

DIEA : *N,N*-diisopropylethylamine

DMAP : 4-dimethylaminopyridine

DMA : *N,N*-dimethylacetamide

DMC : 2-chloro-1,3-dimethyl-2-imidazolium chloride

DMF : *N,N*-dimethylformamide

2,2-DMP : 2,2-dimethoxypropane

DMP : Dess-Martin periodinane

Fuc : fucose

Gal : galactose

GalN : galactosamine

GlcN : glucosamine

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HPLC : high performance liquid chromatography

Man : mannose

MS AW300 : acid washed 4Å molecular sieve

NBS : *N*-bromosuccinimide

Me : methyl

PG : protective group

PMB : *p*-methoxybenzyl

Pyr : pyridine

TBA : tetra-*n*-butylammonium

TBME : methyl *tert*-butyl ether

TBDPS : *tert*-butyldiphenylsilyl

TEA : triethylamine

TEOA : triethylorthoacetate

TFA : trifluoroacetic acid

Tf₂O : trifluoromethanesulfonic anhydride

THF : tetrahydrofuran

TMOA : trimethylorthoacetate

Tol : 4-methylbenzoyl

Tris : tris(hydroxymethyl)aminomethane

目次

緒論	5
第一部 セレノ化フコース誘導体群の合成およびその応用	
第一章 セレノ化フコース誘導体の合成	
第一節 分子設計と合成戦略	9
第二節 α -及び β -メチルセレノフコースの合成	12
第三節 2-メチルセレノフコースの合成	14
第四節 3-メチルセレノフコースの合成	18
第五節 4-メチルセレノフコースの合成	23
第二章 セレン誘導体を用いた X 線共結晶構造解析および結合親和性試験	
第一節 フコースレクチン AOL の立体構造解析	24
第二節 AOL との親和性測定	26
第一部まとめ	28

第二部 糖蛋白質の X 線結晶構造解析の迅速化を指向したセレノ化糖の開発	
第一章 研究背景	29
第二章 分子設計	32
第三章 標識分子の合成	33
第四章 Endoglycosidase を用いた糖転移反応の検討	36
第二部まとめ	41
総括	42
実験の部	43
謝辞	

緒論

生命現象は核酸、蛋白質、糖鎖などの生体高分子が機能することによって発現している。これらの生体高分子がその機能を発現するにあたって、その多くは立体構造に基づいた分子認識に基づく複合体形成を開始段階に有している^{1,2,3}。そのため生体高分子の機能発現機構を分子レベルで理解するためにはそのような複合体の立体構造情報の取得が極めて重要である。また、このような機能発現機構の解明は生命現象の理解に留まらず、特定の現象を制御できる化合物の合理的な設計を可能とし、創薬の迅速化などが見込まれる。

蛋白質の立体構造解析には核磁気共鳴や電子線を用いたものなどがある。なかでも、電子による X 線の回折現象を利用して、蛋白質結晶内部での原子配列を明らかにする X 線結晶構造解析法は最も詳細にその立体構造を決定することができる手法である。しかし、X 線の検出器は波長と振幅のみしか記録することができず、原子の位置情報を知るのに必要な位相を検出することができないので何らかの方法で位相を推定する必要がある。古くから行われている位相決定法として、蛋白質を構成する原子と比較して電子密度が大きく異なる水銀や白金、鉛などの重原子を位相決定の際の目印として蛋白質に導入し、標識した結晶とネイティブ結晶との回折強度データを比較することで行う重原子多重同型置換法(MIR法)がある(**Fig. 1**)。その他にも、近年、波長可変なシンクロトロン放射光が利用可能になったことや異常散乱原子の一つであるセレン原子を遺伝子工学的手法により蛋白質に導入することが可能になったことから多波長異常分散法(MAD法)が行われるようになった。MAD法は1990年初頭 Graves らによるインターロイキン $1\alpha^4$ や Hendrickson らによるリボクレア

¹ Sok, D.; Doores, K. J.; Briney, B.; Le, K. M.; Saye-Francisco, K. L.; Ramos, A.; Kulp, D. W.; Jean-Philippe, J.; Menis, S.; Wickramasinghe, L.; Seaman, M. S.; Schief, W.; Wilson, I. A.; Poignard, P.; Burton, D. R. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 236.

² Stenmark, P.; Dupuy, J.; Imamura, A.; Kiso, M.; Stevens, R. C. *PLoS Pathogens* **2008**, *4*, e1000129.

³ Kato, K.; Ishiwa, A. *Trop. Med. Health* **2015**, *43*, 41.

⁴ Graves, B. J.; Hatada, M. H.; Hendrickson, W. A.; Miller, J. K.; Madison, V. S.; Satow, Y.

一ゼ H^sの解析などから利用され始めた手法であり、複数の重原子浸漬結晶を必要とする MIR 法に比べ簡便かつ迅速である。そして MAD 法が報告されて以降、X 線結晶構造解析法による蛋白質の構造決定数は 1990 年を境に急激に増加している。

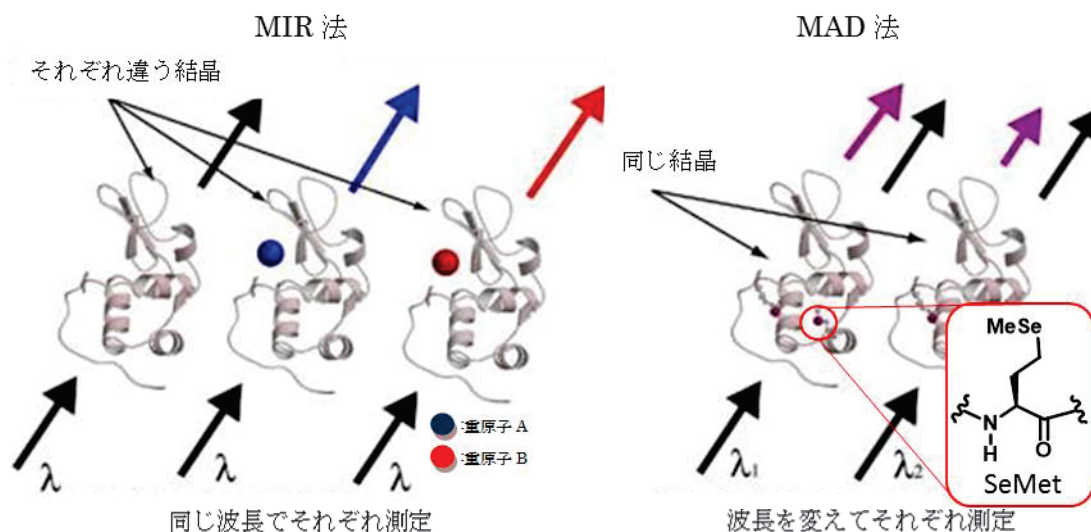


Fig.1 MIR 法と MAD 法における重原子標識の概略図

しかし、MAD 法にもいくつか課題が存在する。例えば、セレノメチオニン(SeMet)を有する非天然型蛋白質を大腸菌に産生させる際、メチオニン要求大腸菌株あるいは酵母を L-セレノメチオニン含有培地中で培養する必要があることが挙げられる。それというのも、セレン原子の毒性のために蛋白質産生細胞が十分に生育せず、サンプル調製の長期化が引き起こされる場合がある。また、硫黄原子とセレン原子では結合角やファンデルワールス半径などの物理化学的な性質が異なるため、セレン原子導入による立体構造の変化や、蛋白質の溶解性や結晶性の低下などが引き起こされ結晶化が困難となる場合がある。このような問題に対する解決策の一つとして蛋白質をセレン標識するのではなく、蛋白質に特異的に結合するリガンドをセレン標識し、セレノ化リガンド-蛋白質複合体として結晶構造解析

Biochemistry **1990**, *29*, 2670.

⁵ Yang, W.; Hendrison, W. A.; Crouch, R. J.; Satow, Y. *Science* **1990**, *249*, 1398.

へ利用することが考えられる。

これまでに、Buts ら⁶を始めとして、セレン化糖を用いた糖認識蛋白質の X 線結晶構造解析がいくつか報告されている^{7,8,9}。また、当研究室の鈴木はガラクトースまたはグルコースの 6 位水酸基をメチルセレン(MeSe)基で置換したセレン標識ラクトースを合成し、さらにそれを用いてガレクチン 9NCRD の立体構造決定を行いセレン含有二糖誘導体の X 線結晶構造解析における有用性を見出している(Fig. 2)¹⁰。また、この研究においてセレン原子の導入位置により蛋白質との共結晶化の可否が左右されることが明らかとなった(Fig. 2)。

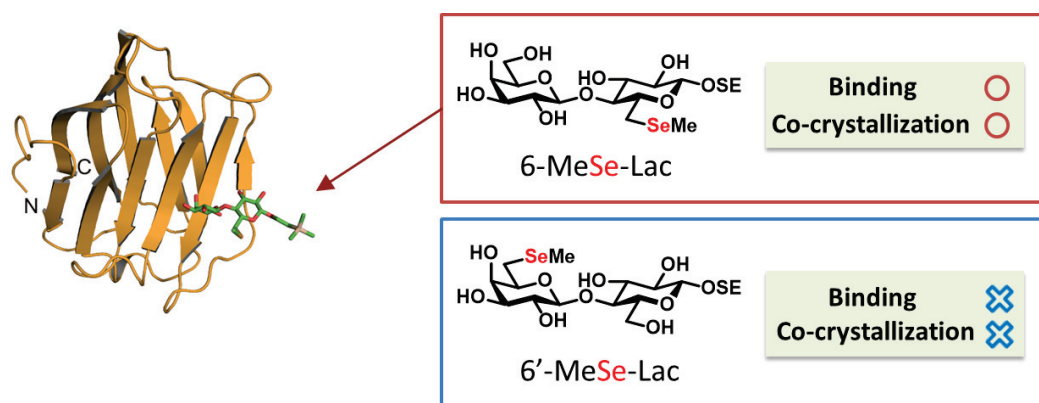


Fig. 2 ガレクチン 9NCRD とメチルセレンラクトース複合体の立体構造

このことから、セレン化糖を用いた X 線結晶構造解析にみられる問題点として基質認識機構が不明な蛋白質へのセレン化糖の利用には、予め調製した化合物が基質として認識されない可能性があることが挙げられる。また、近年、界面活性剤としてセレン化糖を用い

⁶ Buts, L.; Loris, R.; Genst, E. D.; Oscarson, S.; Lahmann, M.; Messens, J.; Brosens, E.; Wyns, L.; Greve, H. D.; Bouckaert, J. *Acta Cryst.* **2003**, D59, 1012.

⁷ Kostlánová, N.; Mitchell, E.P.; Lortat-Jacob, H.; Oscarson, S.; Lahmann, M.; Gilboa-Garber, N.; Chambat, G.; Wimmerová, M.; Imberty, A. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 27839.

⁸ Houser, J.; Komarek, J.; Kostlanova, N.; Cioci, G.; Varrot, A.; Kerr, S. C.; Lahmann, M.; Balloy, V.; Fahy, J. V.; Chignard, M.; Imberty, A.; Wimmerova, M. *PLoS One* **2013**, 8, e83077.

⁹ Sulák, O.; Cioci, G.; Delia, M.; Lahmann, M.; Varrot, A.; Imberty A.; Wimmerová, M. *Structure* **2010**, 18, 59.

¹⁰ Suzuki, T.; Makyio, H.; Ando, H.; Komura, N.; Menjo, M.; Yamada, Y.; Imamura, A.; Ishida, H.; Wakatsuki, S.; Kato R.; Kiso, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 2090.

た膜蛋白質の立体構造解析¹¹が報告されたが(Fig. 3)、構造解析分野におけるセレノ化糖利用のほとんどが糖認識蛋白質に対してのみであり汎用性に乏しい。そこで本研究では、一つ目の問題に対して、導入位置の異なるセレノ化糖ライブラリーを構築し、それらを試行的に共結晶化へ供することが有効であると考え、フコース誘導体群の合成および *Aspergillus oryzae* lectin, AOL を用いて前述した手法の有用性を第一部にて検証することとした。

また、第二部ではセレノ化糖を用いた新たな標識法として、酵素化学的な転移反応を利用した蛋白質への導入を提案し研究を行った。

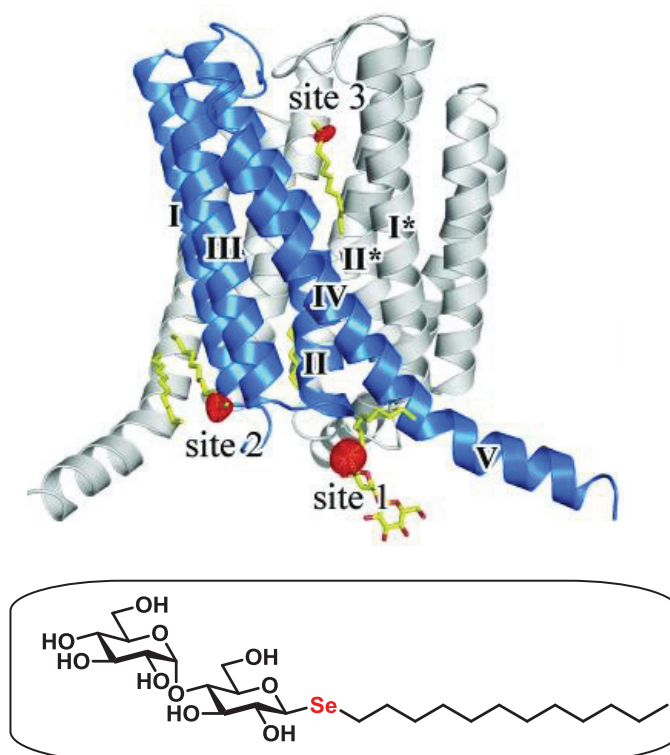


Fig. 3 Leukotriene C4 合成酵素と
Dodecyl- β -D-selenomaltoside との複合体の立体構造

¹¹ Saino, H.; Ago, H.; Ukita, Y.; Miyano, M. *Acta Crystallogr.* **2011**, *F67*, 1666.

第一部 セレノ化フコース誘導体群の合成およびその応用

第一章 セレノ化フコース誘導体の合成

第一節 分子設計と合成戦略

本研究ではセレノ化糖ライブラリー構築の際のモデル化合物として、構造的な単純さや、胚発生¹²・分化¹³・細胞認識¹⁴・癌化^{15,16}・炎症^{17,18}などの生命現象における重要性を考慮しフコースを選択した。糖分子へのセレン原子の導入は、これまでに当研究室で報告している手法に則ることとした。また、セレノール(RSeH)は容易に酸化されジレセニド(RSeSeR)となるため、アルキル基で保護することとした。また、蛋白質との相互作用に与える影響を最小限とするため Me 基で保護したものを最終目的物に設定した(Fig. 4)。

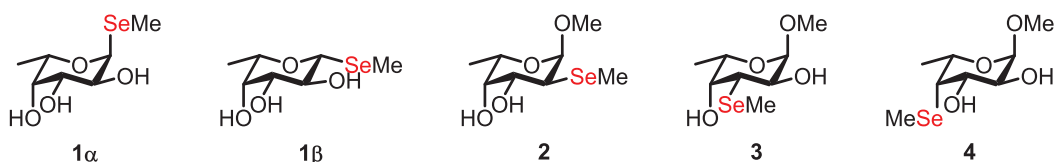


Fig. 4

アノマー位に対するセレン原子の導入は、当研究室において過去に報告された混合セレ

¹² Solter, D.; Knowles, B.B. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 5565.

¹³ Gringhuis, S. I.; Kaptein, T. M.; Wevers, B. A.; van der Vlist, M.; Klaver, E. J.; van Die, I.; Vriend, L. E. M.; de Jong, M. A.W. P.; Geijtenbeek, T. B.H. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5074.

¹⁴ Li, Y.-L.; Wu, G.-Z.; Zeng, L.; Dawe, G. S.; Sun, L.; Loers, G.; Tilling, T.; Cui, S.-s.; Schachner, M.; Xiao, Z.-C. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 703.

¹⁵ Kannagi, R. *Glycoconj. J.* **1997**, *14*, 577.

¹⁶ Kim, Y. J.; Varki, A. *Glycoconj. J.* **1997**, *14*, 569.

¹⁷ Flogel, M.; Lauc, G.; Gornik, I.; Macek, B. *Clin. Chem. Lab. Med.* **1998**, *36*, 99.

¹⁸ Gornik, I.; Maravic, G.; Dumic, J.; Flogel, M.; Lauc, G. *Clin. Biochem.* **1999**, *32*, 605.

ノアセタールの転移反応¹⁹を利用することにより、同一の中間体からアノマー異性体の合成を簡便に行えると考えた。また、縮合時における隣接基関与を排除するために 2 位水酸基をアルキル系保護基である PMB 基で保護することとした(**Fig. 5**)。また、ここで Bn 基としなかったのは、セレン原子が Pd を被毒し水素添加による脱保護が行えないためである²⁰。

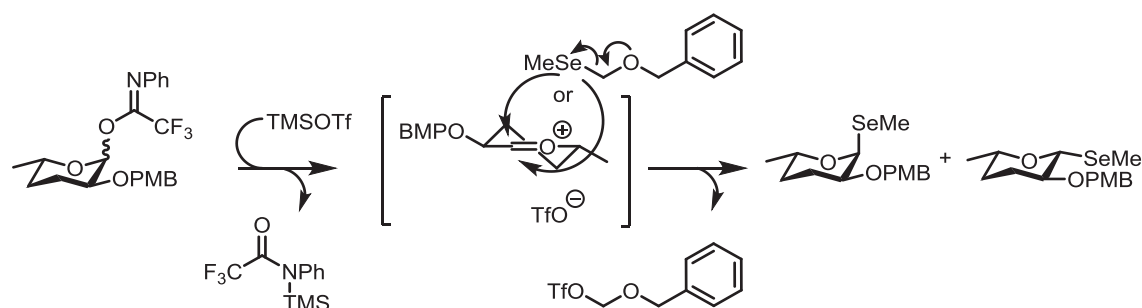


Fig. 5

糖ヌクレオチドを除き自然界に存在するほぼすべてのフコースは α -グリコシド結合を介して他の糖と結合しているため、2 位、3 位、4 位置換体のアノマー位の立体化学は全て α に統一した(**Fig. 4**)。2 位、3 位、4 位へのセレン原子の導入は、セレノトルオイル酸無水物^{21,22}の活性化とそれに続く求電子炭素への求核置換反応またはセレノトルオイル酸カリウム²³による求核置換反応により導入を行うこととした(**Fig. 6**)。また、セレノアシレートアニオン(RCOSe^-)やセレノラートアニオン(RSe^-)は、酸素分子により容易に酸化されラジカル中間体を経てジセレニド体(RCOSeSeCOR , RSeSeR)となるため、本研究では、セレノベンゾエート化およびセレン原子のアルキル化の際、セレノアニオンの安定化のために対カチオン源として DIEA または Cs_2CO_3 などの塩基を加えている。

¹⁹ Suzuki, T.; Komura, N.; Imamura, A.; Ando, H.; Ishida, H.; Kiso, M. *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 1920.

²⁰ 河合由美子, 岐阜大学大学院工学研究科修士論文 **2007**.

²¹ Ishihara, H.; Sato, S.; Hirabayashi, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1977**, 50, 3007.

²² Kawai, Y.; Ando, H.; Ozeki, H.; Koketsu, M.; Ishihara, H. *Org. Lett.* **2005**, 7, 4653.

²³ Ishihara, H.; Matsunami, N.; Yamada, Y. *Synthesis* **1987**, 4, 371.

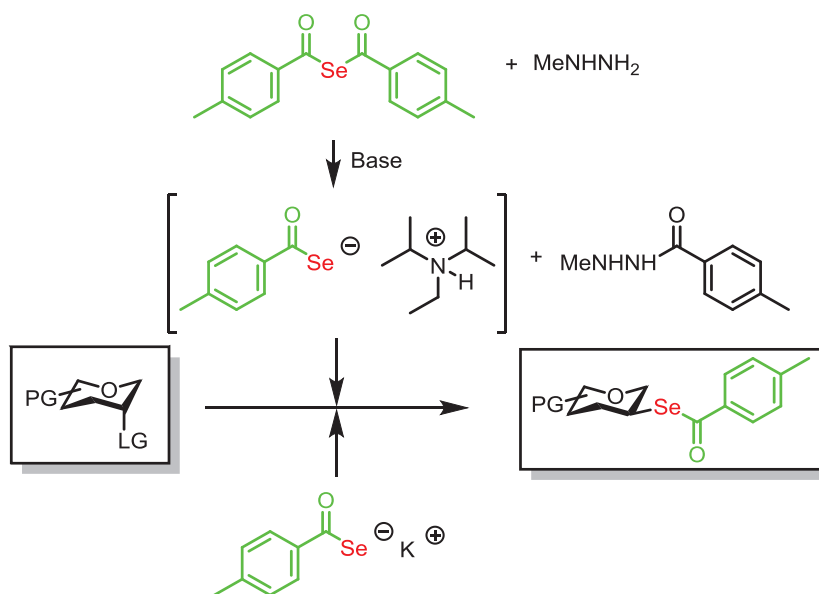


Fig. 6

2-MeSe-Fuc **2** の合成では、Gal 3 位と Me-Fuc 2 位の立体化学的な環境が類似していることから、当研究室において過去に行われた Gal3 位のハロゲン化を経たヘテロ原子導入を踏襲することとした(Fig. 7)²⁴。

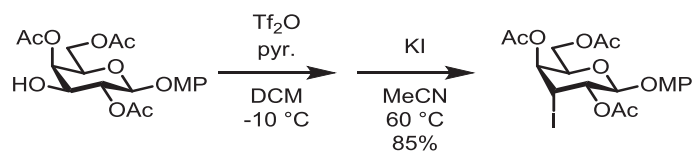


Fig. 7

また、3-MeSe-Fuc **3** の合成では、反応工程数を考慮し Bundle ら²⁵により報告されている Methyl 4-benzoyl-3-bromo-3,6-dideoxygulose を前駆体とした。4-MeSe-Fuc **4** の合成では、3-ブロモ体を調製する際に得られる Methyl 3-benzoyl-4-bromo-4,6-dideoxyglucose を前駆体とした(Fig 8)。

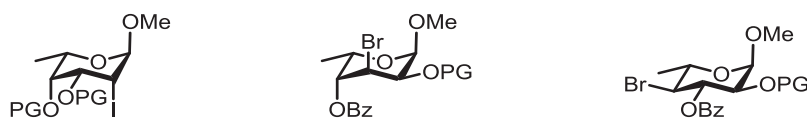


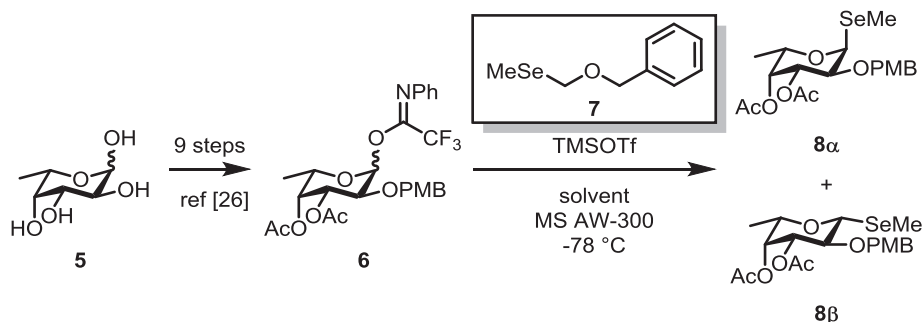
Fig. 8

²⁴ 林 知衣香, 岐阜大学大学院応用生物科学研究科修士論文 2011.

²⁵ Bundle, D.; Josephson, S. *Can. J. Chem.* **1978**, *56*, 2686.

第二節 α -及び β -メチルセレノフコースの合成

合成戦略で述べたように、メチルセレノフコシド合成の鍵となるアノマー位への MeSe 基の導入は、本研究室の鈴木が開発した混合セレノアセタールと糖イミデートを用いるアセタール交換反応¹⁹により行うこととした。市販の L-Fuc **5** を出発物質として9段階の反応を経てイミデート体 **6**²⁶を得た。続いて調製したフコースドナー**7** および BOM メチルセレニド **7**¹⁹ を用いて、TMSOTf、MS-AW300 存在下、セレノ化を行った(Scheme 1, Table 1)。このとき、溶媒効果による α 選択的グリコシル化を期待し、反応溶媒として ether/CH₂Cl₂ の混合溶媒を用いた²⁷。



Scheme 1

Table 1

Entry	Acceptor (eq.)	Time (h)	TMSOTf (eq.)	Solvent	Yield (%)		
					8 α	8 β	9
1	2.0	1	0.1	CPME:CH ₂ Cl ₂ (1:1)	30	N.D.	51
2	5.0	20.5	0.6→1.2	CPME:CH ₂ Cl ₂ (2:1)	48*	43*	2
3	5.0	21	1.2	TBME:CH ₂ Cl ₂ (1:1)	56*	36*	3
4	5.0	20	1.2	CPME:CH ₂ Cl ₂ (1:1)	66	21	N.D.

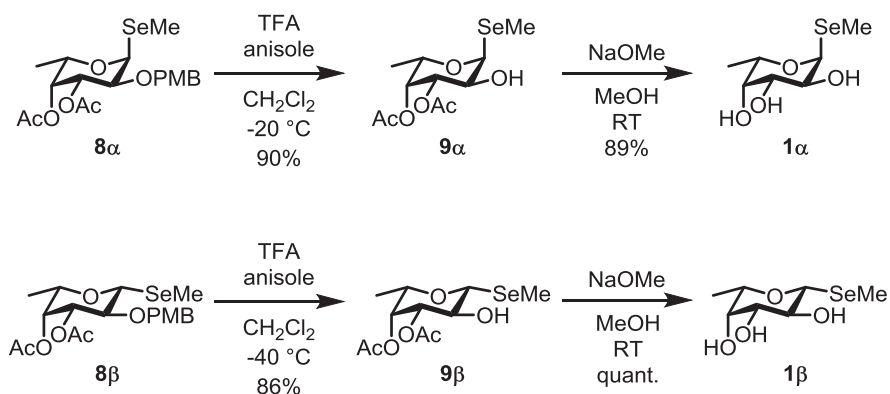
*determined by the ratio of the signal intensity in ¹H NMR

²⁶ Hara, A.; Imamura, A.; Ando, H.; Ishida, H.; Kiso, M.; *Molecules* **2013**, *19*, 414.

²⁷ Ishiwata, A.; Munemura, Y.; Ito, Y. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 92.

Entry1 では CPME-CH₂Cl₂ を用いて反応を行ったところ、目的物 **8 α** が 30%得られた。このとき、ヘミアセタールが 51%生成した。この結果は、アクセプターがドナーに対して少量であったため、アクセプターと反応する前に混入した水と反応した結果と考えた。そのため Entry 2 ではオキソカルベニウムイオンとセレノアセタール **7** の接触確率を増加させるため、セレノアセタール **7** を 5 当量に増やした。その結果 α -MeSe 体 **8 α** の収率は 48%となり若干改善された。このとき β 体 **8 β** も 43%与える結果となった。 β 体の生成は CPME のオキソカルベニウムイオンに対する配位が十分でなかったことによると考え、続く Entry 3 では、CPME の割合を増加させ反応を行った。その結果、 α/β 比は 1.5/1 となり、若干の選択性向上が見られた。さらに Entry 4 では CPME に比べより嵩高い TBME を用いて反応を行ったところ α/β 比は 3.14/1 にまで向上した。完全な α 選択性は得られなかったものの全体としての収率が 80%を超えていたため、アノマー異性体をそれぞれ分取し目的物へと変換することとした。

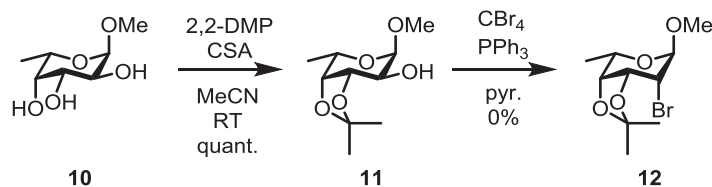
CH₂Cl₂ 溶媒中、カチオン捕捉剤である anisole を添加剤として加え、TFA を作用させ PMB 基の除去を行なった。続いて 3 位および 4 位水酸基の脱保護を経てそれぞれ良好な収率で **1 α** および **1 β** を得た(Scheme 2)。



Scheme 2

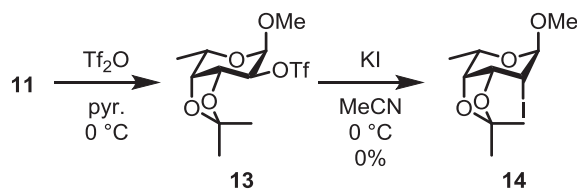
第三節 2-メチルセレノフコースの合成

2-MeSe 体 **2** の前駆体として、合成が容易であると予想される Methyl 2-bromo-2,6-dideoxy-L-taloside を選択した。市販の α -Me-L-fucopyranoside **10** を MeCN 溶媒中、2,2-DMP と CSA を用いて 3,4-イソプロピリデン体である化合物 **11** へと定量的に変換した。続いて、化合物 **11** に対し CBr_4 と PPh_3 を作用させ臭素化を試みた²⁸。しかし、目的とする化合物 **12** は得られず無数の生成物を与える結果となった(Scheme 3)。



Scheme 3

生成物の同定は行えなかったが、臭素原子の求核性が溶媒和により低下し、温和な条件で反応が進行しなかったと考え、次に臭素原子に比べてよりイオン半径が大きく溶媒和を受けにくいヨウ素原子を求核剤として選択した。化合物 **11** をトリフラート体 **13** へと変換後、MeCN 溶媒中、KI によるヨウ素化を試みたが目的物 **14** は得られなかった。

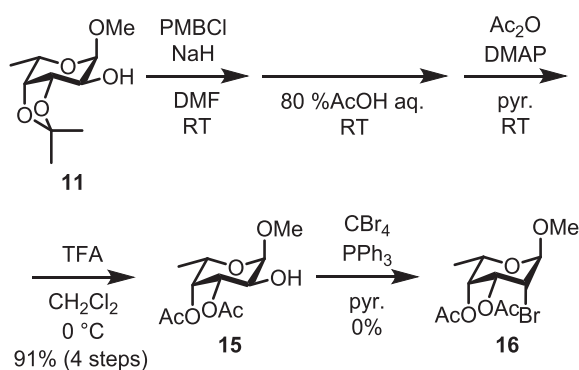


Scheme 4

これらの結果から、3,4-イソプロピリデン基による環構造の固定化のために遷移状態が不安定化され反応が進行しなかったと予想した。代替経路として 3,4-イソプロピリデン基を

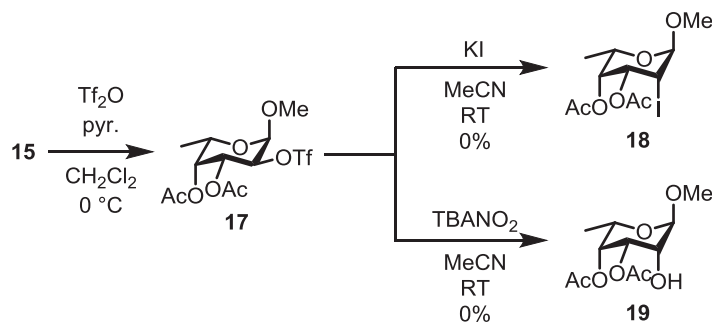
²⁸ Appel, R. *Chem. Ber.* **1971**, *104*, 1030.

Ac 基に変換し環固定を解消した経路をとることとした。まず、化合物 **11** の水酸基を PMB 基で保護した後、80%酢酸水溶液を用いて 3,4-ダイオール体とした。遊離となった水酸基を Ac 基で保護した後、CH₂Cl₂ 溶媒中、TFA を作用させ PMB 基を除去し化合物 **15** を得た (Scheme 5)。次に、得られた化合物 **15** をアップル反応に供した。しかし、目的物である化合物 **16** は得られなかった (Scheme 5)。



Scheme 5

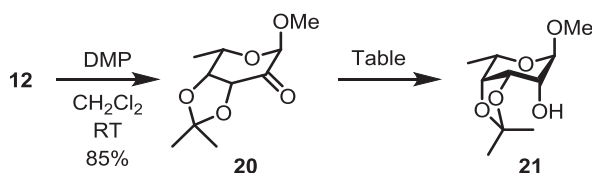
さらに、イソプロピリデン体 **11** と同様の理由で KI を用いてヨウ素化を試みが、目的物 **18** を得ることはできなかった。原因として溶媒和による求核性の低下のほかにも、4 位置換基による立体障害も考えられたため、ハロゲンに比べ嵩高くない亜硝酸イオンを求核剤として選択し反応を行った。しかし、TfO 体 **17** に対して TBANO₂ を作用させても目的物 **19** を得ることはできなかった (Scheme 6)。



Scheme 6

これらの結果より S_N2 反応による 2 位炭素へのハロゲン原子の導入またはエピマー化は不可能であると判断し、水酸基の酸化と立体選択的な還元により 6-deoxy-L-taloside 体へと

導くこととした。まず、化合物 **11** を DMP により酸化し化合物 **20** を収率 85% で得た。次に、THF/EtOH 混合溶媒中、NaBH₄ を用いて還元を行った。その結果、目的とする化合物 **21** を収率 40% で得た。このとき、エピマーである化合物 **11** が 20% 得られた。低選択性の原因として、ホウ素原子上の負電荷と 1 位 OMe 基中の酸素原子上の孤立電子対間での静電反発や、還元剤の嵩高さが関係していると考えられた。そのため Entry 2 では、ルイス酸性を有し、かつ、より嵩高い還元剤である DIBAL-H を用いて反応を行った。その結果、化合物 **21** を収率 95% で得た。(Scheme 7, Table 2)。

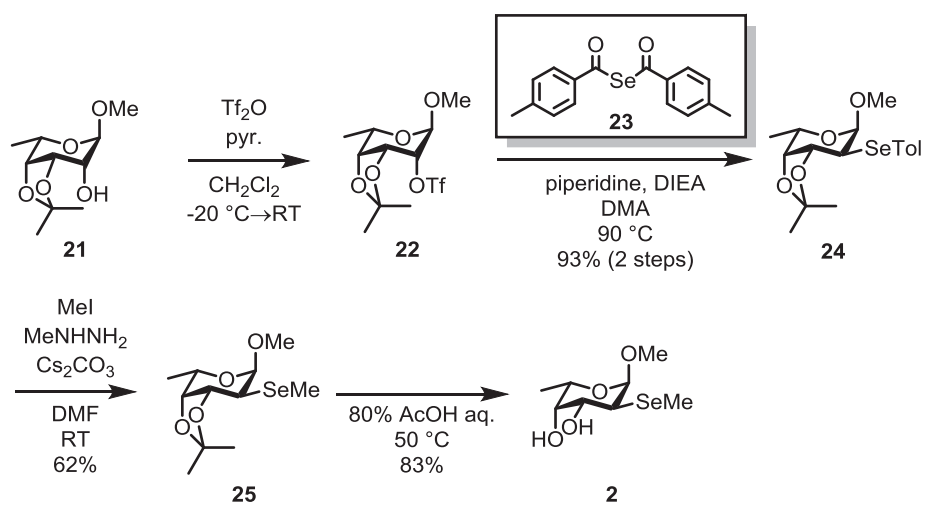


Scheme 7

Table 2

Entry	Reagents	Solvent	Temp (°C)	Time	Yield (%)
1	NaBH ₄	EtOH	0	20 min.	40
2	DIBAL-H	CH ₂ Cl ₂	-78	2.5 h	95

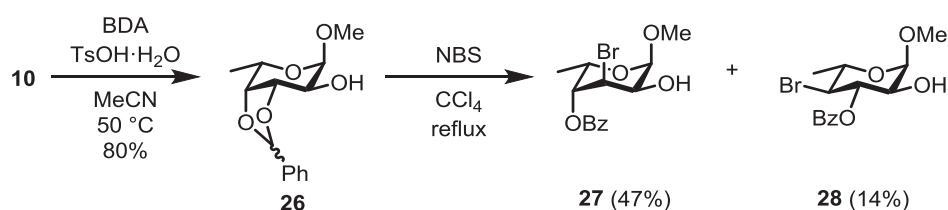
続いて、トリフラート体 **22** へと誘導し、Tol₂Se **23**、piperidine、DIEA を混合した DMA 溶液に、滴下にて加えて 30 分間攪拌し化合物 **24** を得た(92%, 2 steps)。次に、*in situ* セレノラートアニオン法を用いて Tol 基を Me 基へと変換した²¹(化合物 **25**, 64%)。その後、80%酢酸水溶液中でイソプロピリデン基の除去を行い収率 83%で最終目的物である化合物 **2** を得た(Scheme 8)。



Scheme 8

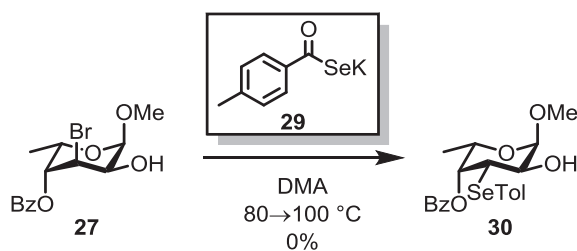
第四節 3-メチルセレノフコースの合成

次に、3-MeSe-Fuc **3** の合成を行った。合成の簡便さから前駆体として3-ブロモ体を選択した。化合物 **10** の3,4位の水酸基を BzId 基で保護し、ハネシアン・ヒュラー反応^{29,30}によって BzId 基を酸化的に開裂し化合物 **27**²³(収率 47%)へと誘導した(Scheme 9)。



Scheme 9

化合物 **27** と TolSeK **29** を 80 °C にて反応させセレノ化を試みたが出発物の消費が観られなかった。そこで、反応温度を 100 °C へ昇温したが複雑な混合物を得る結果となった(Scheme 10)。



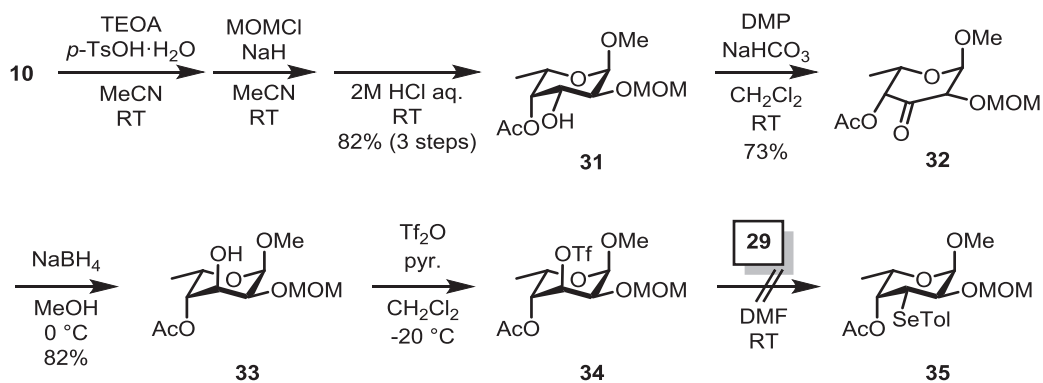
Scheme 10

この結果は、臭素原子の脱離能が十分でなかったことによるものと考え、より高い脱離能を有するトリフラート体の合成を行った。化合物 **10** に MeCN 溶媒中、TEOF、*p*-TsOH · H₂O を作用させ、出発物質の消失を確認した後、氷浴中にて PMBCl、NaH を加え遊離の水

²⁹ Failla, D. L.; Hullar, T. L.; Siskin, S. B. *Chem. Commun.* **1966**, 716.

³⁰ Hanessian, S. *Carbohydrate Res.* **1966**, 2, 86.

酸基を保護した。その後、反応溶液を 2M-塩酸で処理し 3-OH 体 **31** を得た(収率 82%)。次に、DMP を作用させ 3-keto 体 **32** を収率 73% で得た。続いて、3-keto 体 **32** を MeOH 溶媒中、0 °C にて NaBH₄ を用いて還元し、6-deoxy guloside 体 **33** を収率 82% で得た。このとき、単一のジアステレオマーのみが得られた。guloside 体 **33** をトリフラート体 **34** へと誘導し、TolSeK **29** によるセレン原子の導入を試みた。しかし、目的とする化合物 **35** は痕跡量程度得られるのみであった(Scheme 11)。

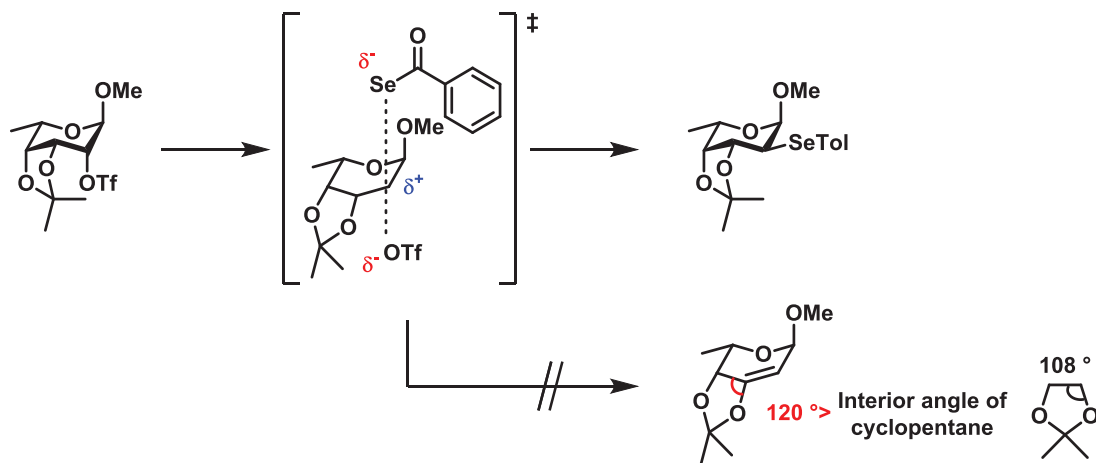


Scheme 11

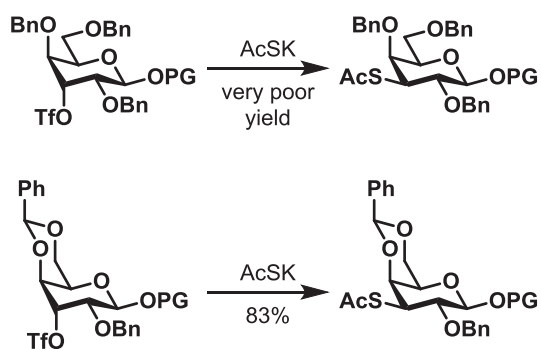
このとき、オレフィン体と思われる副生成物を 80% 得る結果となった。置換反応ではなく脱離反応が進行した原因として、脱離基と 1-OMe 基間および求核剤と 4 位水酸基間での立体反発および静電反発が考えられる³¹。しかし、脱離基近傍の立体化学が類似している化合物 **25** の合成には成功している。2 位炭素原子へのセレン原子導入に用いた前駆体 **23** の特徴として、導入部位に隣接する 3,4 位水酸基の環状アセタール保護が挙げられる。これにより、E2 脱離を行う際の遷移状態のひずみが増加し脱離反応が熱力学的に不利となり、置換反応が優先して進行したと予想した(Fig. 9)。また、トリフラート体 **13,17** ではエピマー化が進行せず、トリフラート体 **23** を用いたセレン化が進行した理由として、セレン原子の原子半径が酸素原子のそれに比べて大きく、置換基(3-H,1-OMe)-求核種間での立体反発が低減

³¹ Hale, K. J.; Hough, L.; Manaviazar, S.; Calabrese, A. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 4838.

されたためであると予想している。



また、Liakatos ら³²は、Gal 3 位へのチオアセチル基の導入の際に、4,6 位を Bn 基ではなく Bzld 基で架橋した場合にのみ目的物を得ることに成功している(Fig. 10)。



³² Liakatos, Angela; Kiefel, M. J.; von Itzstein, M.; *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4365.

これらのことから、3-MeSe Fuc **3** の中間体として、1 位、2 位水酸基を環状保護した中間体が有望であると考えた(Fig. 11)。

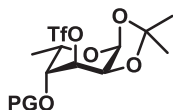
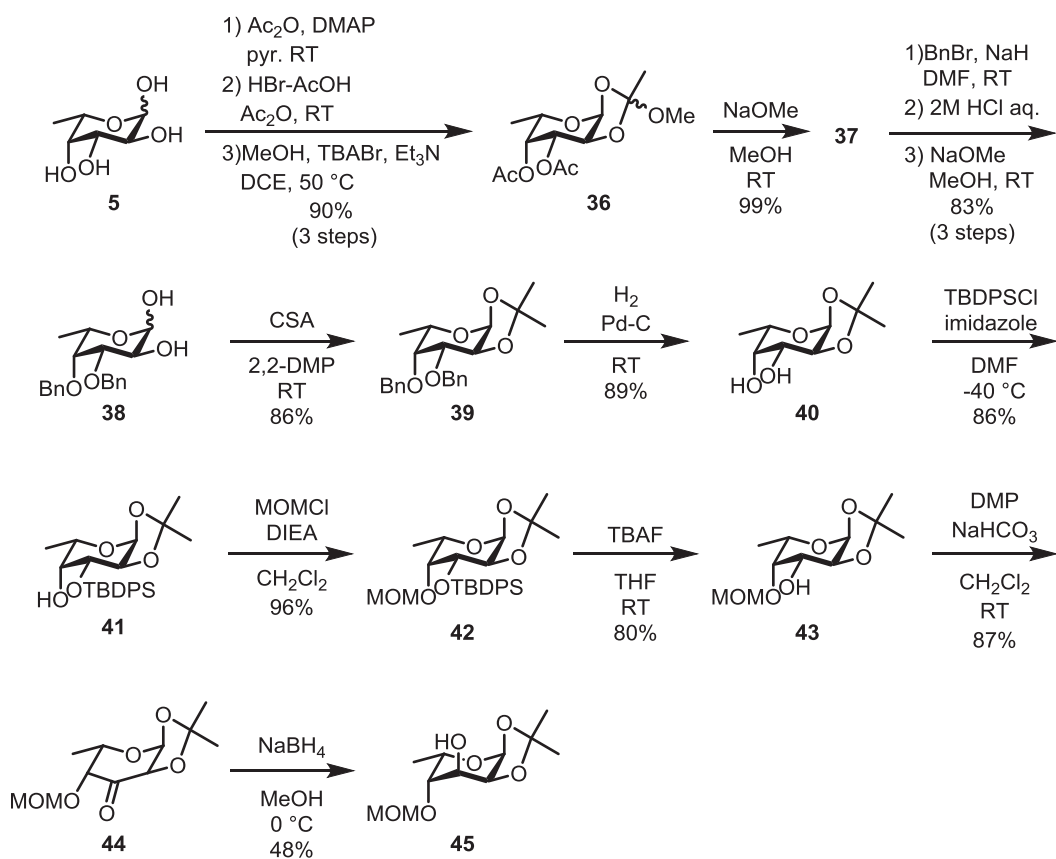


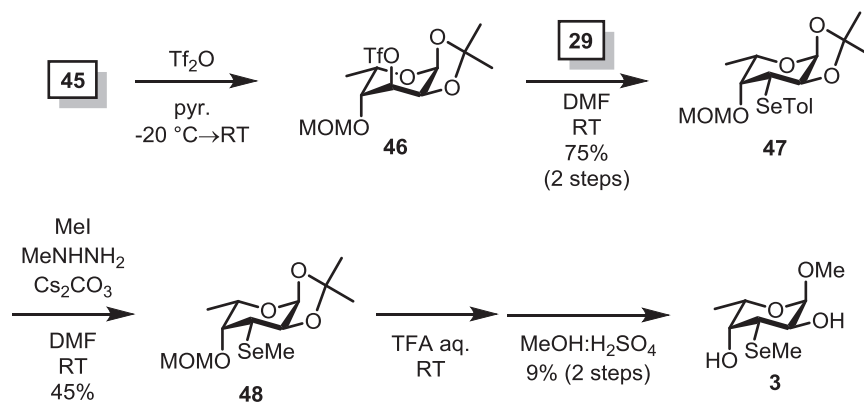
Fig. 11

L-Fuc **5** を出発物質として Ac 化、ブロモ化の後、1,2-DCE 溶媒中、Et₃N、MeOH を作用させオルソエステル体 **36** へと誘導した(収率 90%, 3 steps)。Ac 基の Bn 基への変換ののち、酸処理、続く脱アセチル化により 1,2-ダイオール体 **38** へと誘導した。溶媒量の 2,2-DMP 中、CSA を作用させ、1,2 位水酸基にイソプロピリデン基を導入後、水素添加による Bn 基の除去を収率よく行った。-40 °C での 3 位選択的なシリル保護の後、遊離となっている 4 位水酸基を MOM 基で保護した。続いて 3 位水酸基の脱保護、DMP による酸化、NaBH₄ による還元を行い、環状保護を施した guloside 体 **45** を得た(Scheme 12)。



Scheme 12

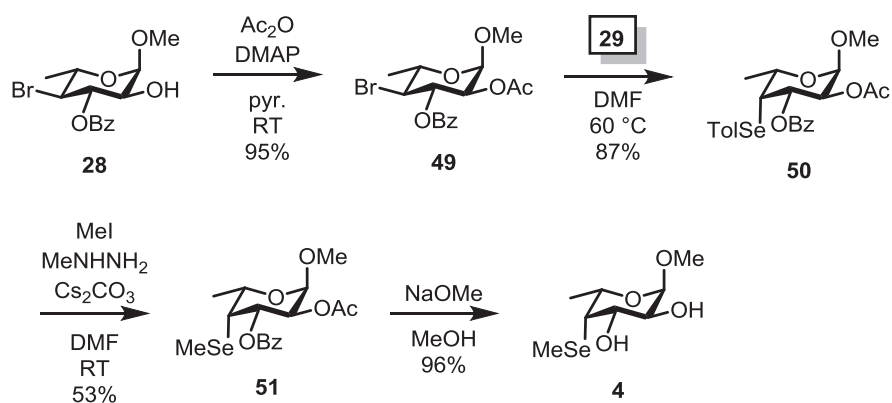
得られた guloside **45** をトリフラート体 **46** へと誘導後、TolSeK **29** と反応させたところ、環状保護を行っていない **35** では得られなかったセレノ体 **47** を 75% の収率で得た。Tol 基の Me 基への変換後、フィッシャーグリコシド化を経て、目的物である 3-MeSe-Fuc **3** を 9% という低収率ながらも得ることに成功した (Scheme 13)。



Scheme 13

第5節 4-メチルセレノフコースの合成

続いて、4-MeSe 体 **4** の合成を行うこととした。4-bromo-4-deoxyglucoside **28**²³ の 2 位水酸基を Ac 基で保護した後、TolSeK **29** を用いてセレン化を行い 4-セレン体 **50** を 87% の収率で得た。次に、2-MeSe 体 **2** を合成した際と同じ条件で、化合物 **50** を MeSe 体 **51** へと変換した (収率 53%)。最後に、THF/MeOH 混合溶媒中、NaOMe で処理することによりアシル系保護基を除去して、4-MeSe-Fuc **4** を収率 96% で得た (Scheme 14)。



Scheme 14

第二章 セレン誘導体を用いた X 線共結晶構造解析 および結合親和性試験

第一節 フコースレクチン AOL の立体構造解析

本研究で立体構造解析に用いる蛋白質として *Aspergillus oryzae* lectin (AOL) を選択した。AOL は清酒の夾雑物であるフェリクリシンの除去を目的として単離された 311 アミノ酸残基からなる分子量 34,481Da の蛋白質³³であり、ヒイロチャワンタケのフコース特異的レクチン (AAL) と 26% の相同性を示していることが報告されているが、その立体構造は報告されていない。

第 2 章で合成した化合物 (α -MeSe-Fuc **1a**, β -MeSe-Fuc **1b**, 2-MeSe-Fuc **2**, 3-MeSe-Fuc **3**, 4-MeSe-Fuc **4**) を AOL との共結晶化、X 線結晶構造解析へと供した。MeSe-Fuc-蛋白質複合体の立体構造はフコース中のセレン原子を用いた SAD 法または MAD 法による位相決定により解析された。得られたリボンモデルを **Fig. 12** に示す。AOL の全体構造は、6 回折りたたまれた β プロペラにより構成されており、同じフコース認識レクチンである AAL³⁴ や AFL⁸ と類似した構造であった。また、誘導体の違いによる立体構造への影響は見られなかった。

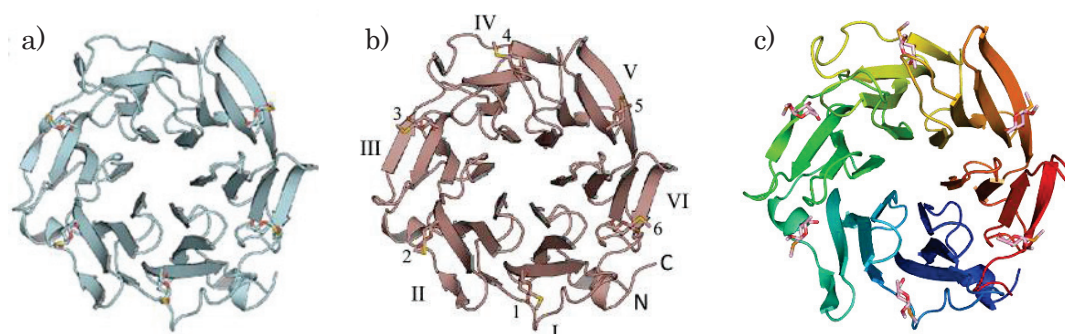


Fig. 12 Determined structure of AOL complexed with a) α -MeSe-Fuc **1a**, b) β -MeSe-Fuc **1b** and
c) 2-MeSe-Fuc **2**

³³ Ishida, H.; Moritani, T.; Hata, Y.; Kawato, A.; Suginami, K.; Abe, Y.; Imayasu, S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, *66*, 1002.

³⁴ Fujihashi, M.; Peapus, D. H.; Kamiya, N.; Nagata, Y.; Miki, K. *Biochemistry* **2003**, *42*, 11093.

しかし、 α -MeSe-Fuc 1 α を用いた場合には、Site 4 において誘導体の代わりに HEPES の結合が観察された。

フコース結合部位はプロペラを構成する β ブレードの間隙に存在し、Fuc の環内酸素、2 位、3 位、4 位水酸基との間で水素結合を形成していることが明らかとなった。また、結合部位によりフコースとの水素結合に寄与するアミノ酸の種類や数に相違が見られた (Fig. 13)。このことは、結合部位間において基質親和性に差があることを示唆する結果であるが、これ以上の追及は行わなかった。Fuc 誘導体 3,4 において共結晶が得られなかった原因として、相互作用に関与する水酸基をメチルセレン基で置換したことにより AOL との水素結合形成が阻害されたためと予想している。しかし、最適な結晶化条件が見つからなかっただけの可能性もある。

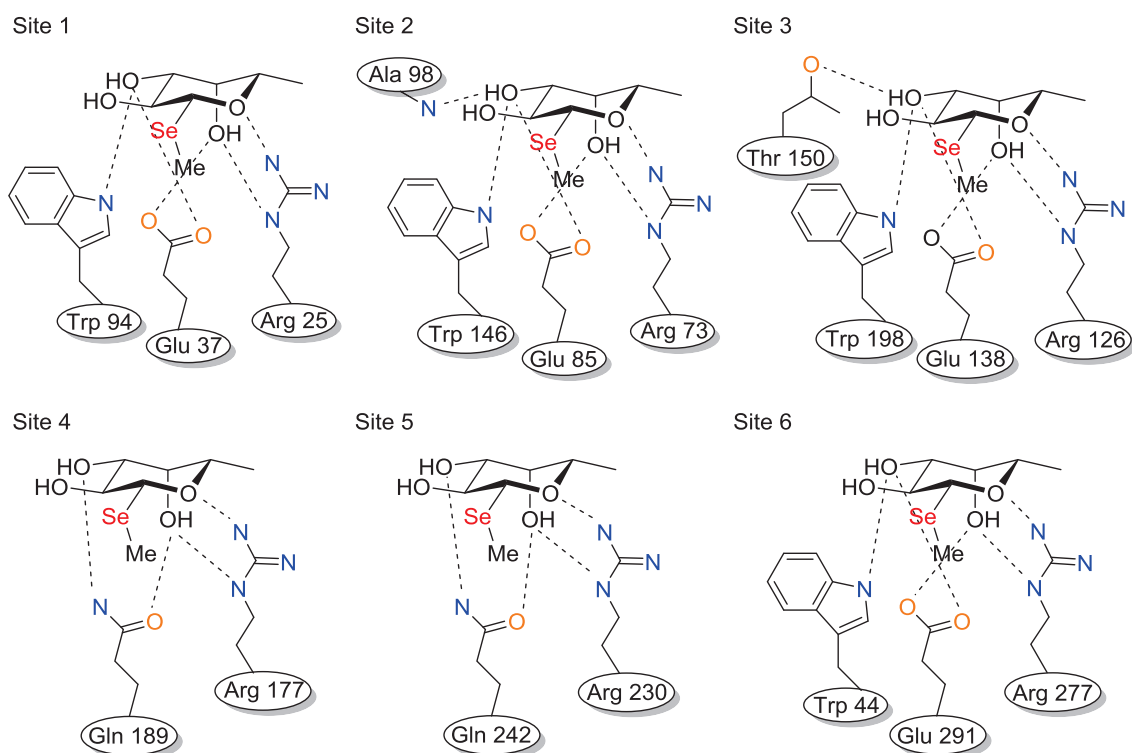


Fig. 13

第二節 AOL との親和性試験

結晶化の成否が酵素-基質間相互作用の程度の指標とはならないため、AOL との親和性を表面プラズモン共鳴(SPR)法により測定することとした。アミノカップリングにより AOL をセンサーチップ(CM5)へと固定化し、各濃度に希釈したセレノ化フコースを流し測定を行った。測定の結果を **Table 3** に示す。

	K_d	共結晶化の成否
α -Me-Fuc (11)	71±8.6	-
α -MeSe-Fuc (1α)	85±18	○
β -MeSe-Fuc (1β)	121±18	○
2-MeSe-Fuc (2)	52±2.5	○
3-MeSe-Fuc (3)	501±269	×
4-MeSe-Fuc (4)	624±108	×

Table 3

興味深いことにアノマー位の立体化学は親和性に対してあまり影響を与えていなかった。そして、蛋白質との共結晶化に失敗した誘導体(**3,4**)と AOL との親和性は、成功したもの (**1 α ,1 β ,2**)に比べ 4 倍以上低い値となり、結晶構造解析の結果から予想されていたように、フコースの 3 位または 4 位での置換が蛋白質との相互作用に影響を与えていることを示す結果となった。また、意外な事に 2-MeSe-Fuc **2** が最も高い親和性を示した。この現象に対する考察を以下に述べる。**Fig. 14** に示すように、2 位に位置するセレン原子と 3 位水酸基との間で水素結合を形成し 3 位酸素原子の求核性が高まった結果、蛋白質との結合が強くなったと予想した。

第一部 まとめ

第一部では、これまで報告のなかったセレノ化糖の系統的合成をフコースに対して行った。さらに、合成した化合物を用いて蛋白質との共結晶構造解析および親和性測定を行った。セレン原子のアノマー位への導入では、混合セレノアセタールをオキシカルベニウムイオンに作用させることにより共通の中間体からアノマー異性体をそれぞれ合成した。当初、2位および3位への S_N2 反応を経由したセレノ原子導入に問題があったが、導入部位に隣接するシスダイオールへ環状保護基を導入することによりセレノ化を収率よく行った。得られた誘導体を立体構造が未解明であったフコース認識蛋白質 AOL の構造解析へ用いた結果、その立体構造を初めて明らかとすることができた。また、親和性測定を行い誘導体間での相違を見出すことができた。以上の結果から、基質認識機構が未解明な蛋白質の共結晶構造解析におけるセレノ化糖群の利用の有用性と、共結晶化に向けたセレノ化糖探索での SPR 測定の実行可能性が示された。

第二部 糖蛋白質の X 線結晶構造解析の迅速化を指向したセレノ化糖の開発

第一章 研究背景

第一部では、糖認識蛋白質であるレクチンを対象とした X 線結晶構造解析へのセレノ化糖利用の拡充に向けた多様な標識様式を有するセレノ化糖の合成およびそれらを用いた立体構造解析の結果を報告した。第二部では、糖鎖をリガンドとしない蛋白質、ここでは N 結合型糖蛋白質の立体構造解析の迅速化に向けたプローブ合成とその応用について報告する。

蛋白質は翻訳後、リン酸化³⁵やアセチル化³⁶などの修飾を受けることにより、活性の調製や、蛋白質分解酵素への耐性等を調節している。このような翻訳後修飾の一つに糖鎖修飾が挙げられ、真核細胞に由来する蛋白質の約 50%以上はなんらかの糖鎖修飾を受けていると報告されている³⁷。糖蛋白質に結合した糖鎖の特徴として、同一の蛋白質でも由来となる細胞やその細胞の状態等により糖鎖構造に相違が見られることが知られており、このような特徴は微小不均一性と呼ばれている。また、蛋白質表面に存在する糖鎖は高い自由度を有しており分子中の一定の位置に存在するわけではない³⁸。このような糖鎖の特徴は、均一な分子が空間的に規則正しく配列することを必要とする結晶化の阻害要因となっている。

この問題に対し、従来では、糖鎖修飾を行わない原核生物を用いた試料調製や糖加水分解酵素による糖鎖除去により糖鎖部分を含まない蛋白質を調製し結晶化に供している。しかし、蛋白質の溶解性などに寄与する糖鎖の除去は溶解性の低下ひいては蛋白質の凝集を引き起こし、結晶化が不可能となる場合がある。そこで、本研究では不均一な糖鎖を均一かつセレン標識した糖鎖へと挿げ替えることにより上述した問題を解決さらに蛋白質の重原子標識を同時に行い、糖蛋白質の X 線結晶構造解析の迅速化が可能となると考え研究を

³⁵ Humphrey, S. J.; James, D. E.; Mann, M. *Trends Endocrinol. Metabol.* **2015**, *26*, 676.

³⁶ Allfrey, V. G.; Faulkner, R.; Mirsky, A. E. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **1964**, *51*, 786.

³⁷ Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 4.

³⁸ Yamaguchi, T.; Sakae, Y.; Zhang, Y.; Yamamoto, S.; Okamoto, Y.; Kato, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10941.

開始した(Fig. 15)。

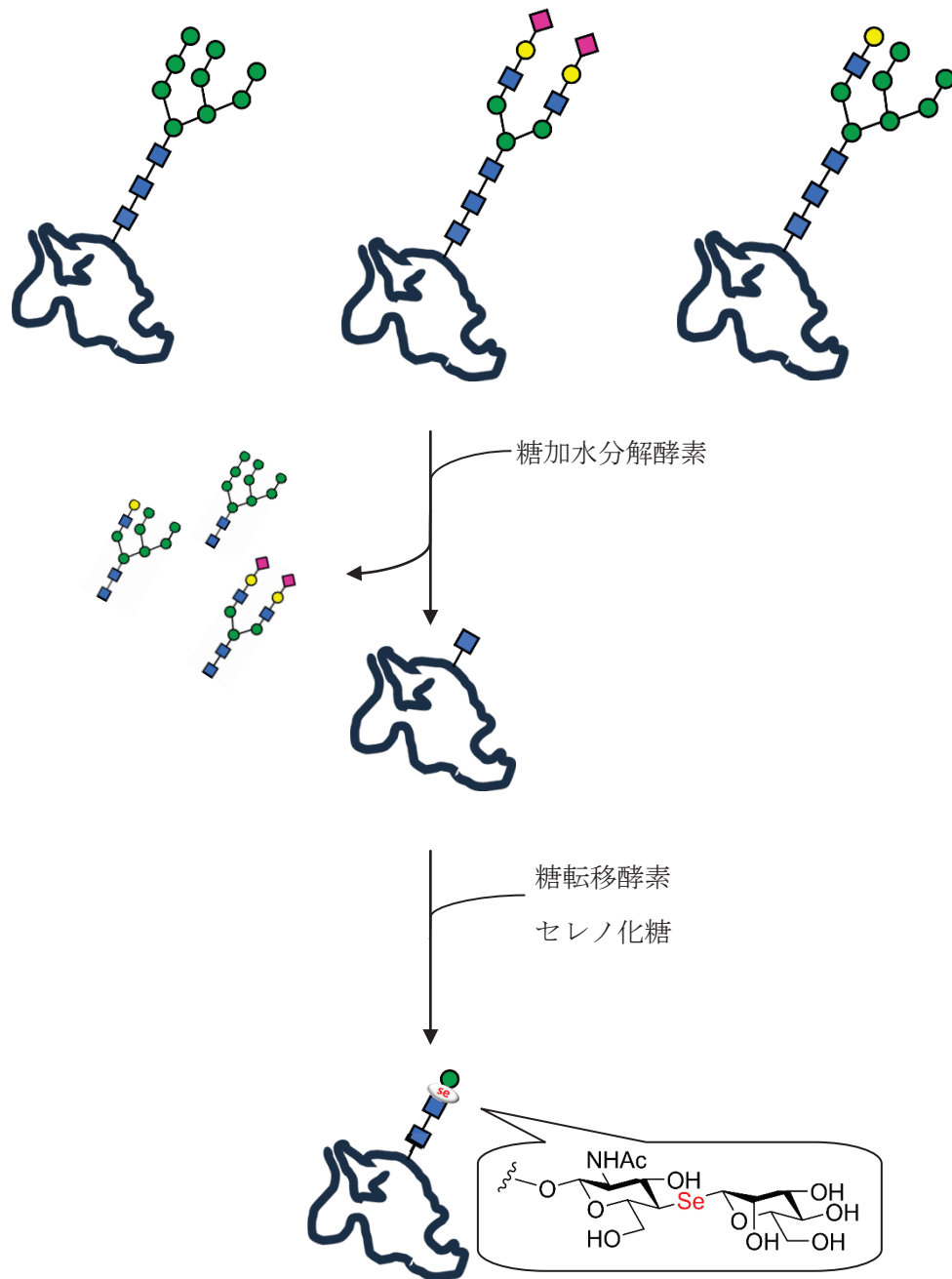


Fig. 15

蛋白質へのセレノ化糖の導入には、山本らにより糖転移活性が報告されている Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase (ENGase, Endo M) (EC 3.2.1.96)^{39,40}を用いることとした。Endo-M は糸状菌 *Mucor hiemalis* から単離されたエンドグリコシダーゼの一種で *N* 結合型糖鎖中のキトビオース結合(GlcNAc β (1-4)GlcNAc)を GlcNAc 一残基蛋白質側に残すように加水分解する。この際に、GlcNAc を有する適当な糖受容体があれば遊離した糖鎖をその受容体に転移するという性質を持つ(Fig. 16)。このような糖転移様活性を有する Endo-M を用いることにより効率的な蛋白質へのセレノ化糖の導入が可能であると考えた。

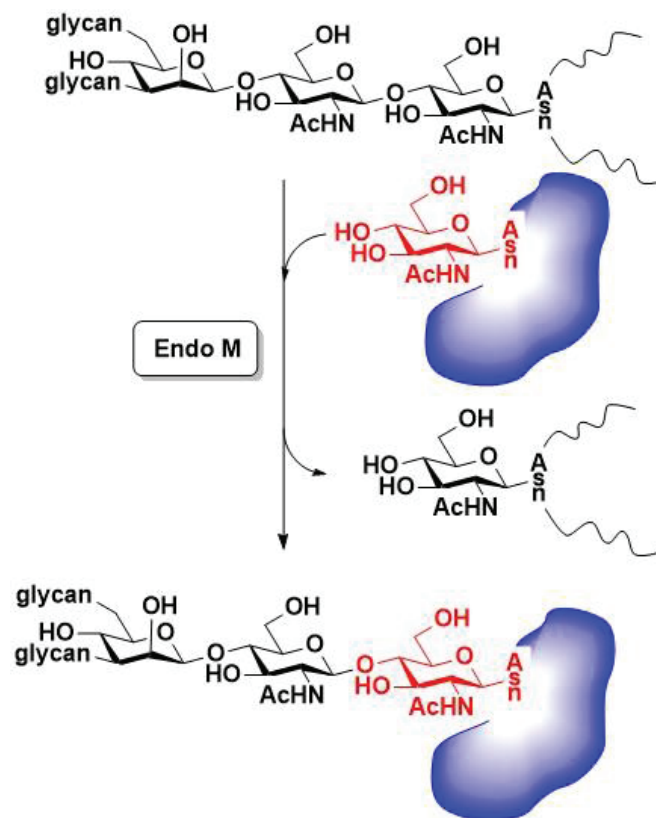


Fig. 16

³⁹ Kadowaki, S.; Yamamoto, K.; Fujisaki, M.; Izumi, K.; Tochikura, T.; Yokoyama, T.; *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54*, 97.

⁴⁰ Yamamoto, K.; Kadowaki, S.; Watanabe, J.; Kumagai, H.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *203*, 244.

第二章 分子設計

山口ら⁴¹は、*N*結合型糖鎖(High mannose 型)を構成する各糖残基の溶液中での自由度を NMR により評価している。これによると、4 残基以上において糖部分の自由度が著しく増加している。位相決定を行うためには、目印となるセレン原子が一定の位置に存在していることが必要であるため、本研究で用いる化合物としては、3 糖以内の化合物が有用であると考えられる。また、セレン原子導入位置としては、糖転移酵素による基質認識に関与しない GlcN 残基の 3 位および 4 位あるいはマンノース残基中の 1、3、4、6 位のいずれかが有効であると予想される。さらに、合成の簡便さを加味しマンノース 1 位にセレン原子を有する二糖 *Se*-Man β (1-4) GlcNAc を基本骨格とした。また、糖オキサズリン体が Endo-M の基質として有用であることが報告されていることから⁴²、本研究における目的物として *Se*-Man β (1-4) GlcNAc-oxazoline を設定した(Fig 17)。

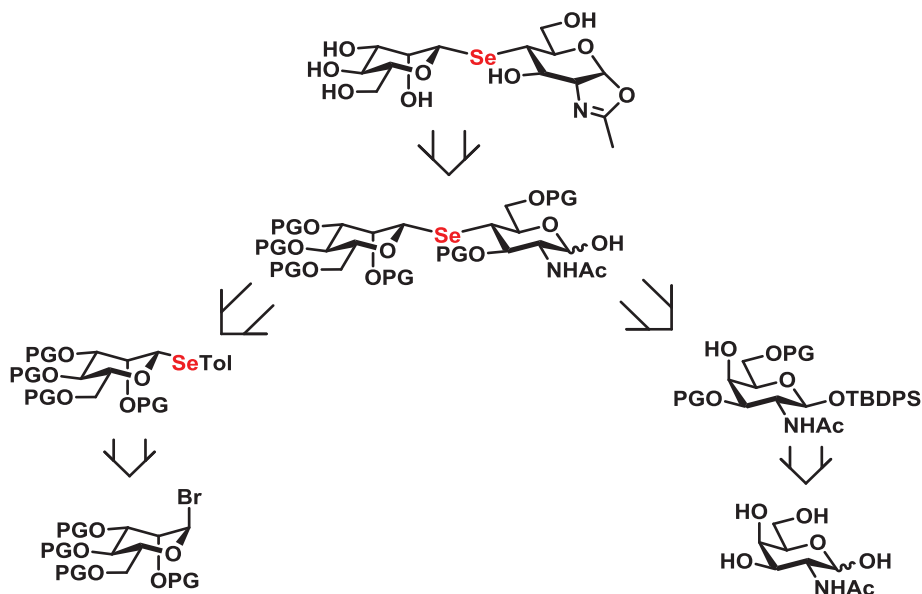


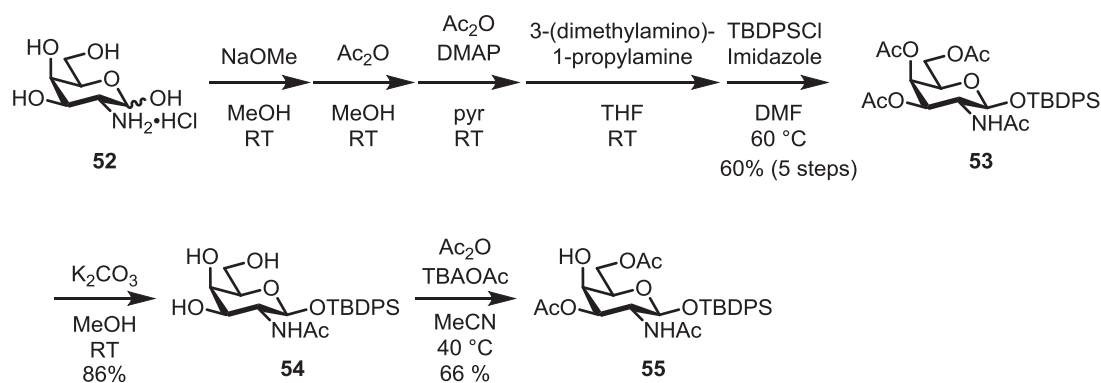
Fig. 17

⁴¹ Yamaguchi, T.; Sakae, Y.; Zhang, Y.; Yamamoto, S.; Okamoto, Y.; Kato, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10941.

⁴² Fujita, M.; Shoda, S.; Haneda, K.; Inazu, T.; Takegawa, K.; Yamamoto, K. *Biochim Biophys Acta* **2001**, *1528*, 9.

第三章 標識分子の合成

Man 部分の GlcN 部分への S_N2 反応により *Se*-Man $\beta(1-4)$ GlcNAc-oxa 骨格の構築を行うため、GlcNAc 部分の前駆体として、GlcN の C4 エピマーである GalN を選択した。ガラクトサミン塩酸塩 **52** のアセチル化、3-(dimethylamino)-1-propylamine による一位アセチル基の選択的除去⁴³を行った後、一位水酸基へ TBDPS 基を導入した。トリオール体 **54** への変換の後 (収率 86%)、3 位および 6 位水酸基への位置選択的なアセチル化⁴⁴へと供し誘導体 **55** (収率 66%)を得た (Scheme 15)。

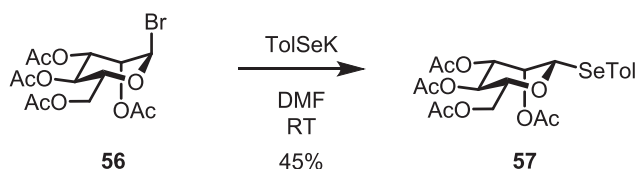


Scheme 15

⁴³ Andersen, S. M.; Heuckendorff, M.; Jensen, H. H. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 944.

⁴⁴ Ren, B.; Rahm, M.; Zhang, X.; Zhou, Y.; Dong, H. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 8134.

Man 部分の合成ではマンノシルブロミド **56** に TolSeK **29** を作用させセレノマンノシド **57** を収率 45% で得た (Scheme 16)。



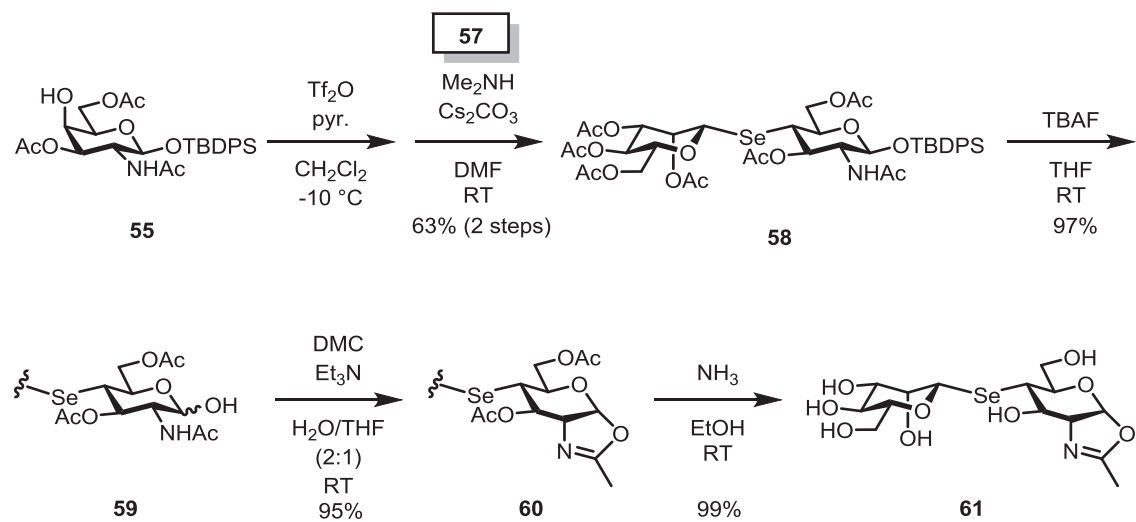
Scheme 16

次に、二糖骨格の構築を行った。河合ら²¹により報告されている *in situ* でのセレノアニオン発生法に則り、脱気した DMF 中にて Cs₂CO₃ 存在下、セレノマンノシド **57** に対し Me₂NH を作用させセレノエステルの活性化を行った。そして、別途調製した GalN のトリフラート誘導体を作用させ、二糖骨格の構築を 63 % の収率で行った。得られた化合物 **58** の ¹J_{CH} coupling を測定したところ 157.5 Hz となった。これは Yu らにより報告されている β マンノシドにみられる特徴的な値⁴⁵(160.5 Hz) に近く、α マンノシドの値(173.2 Hz) とは大きく異なっていた。このことから、化合物 **58** は β アノマーであると結論付けた。次に得られた二糖 **58** をヘミアセタールへと **59** と変換後、オキサゾリン体 **60** へと誘導した。初め種々の論文で報告されているように H₂O 中でのオキサゾリン化を試みたところ原料の凝集が観察された。そのため、反応溶媒として THF/H₂O の混合溶媒を用いた。ヘミアセタール体 **59** に DMC、Et₃N を作用させたところ開始 10 分程度で反応の収束が TLC 上にて確認された。しかし、濃縮後シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行った結果、ヘミアセタール体 **59** またはメチルグリコシドのみが得られ目的物の消失が観察された。安定であると一般的に知られているオキサゾリン体がシリカゲル中で分解したことを示唆する結果を受けて、後処理の際に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液による洗浄を行い、アミノシリカゲルによる

⁴⁵ Yu, B.; van Ingen, H.; Vivekanandan, S.; Rademacher, C.; Norris, S. E.; Freedberg, D. I. *J. Magn. Reson.*, **2012**, *215*, 10.

精製を行ったところ、95%という良好な収率でオキサズリン体 **60** を得ることに成功した。

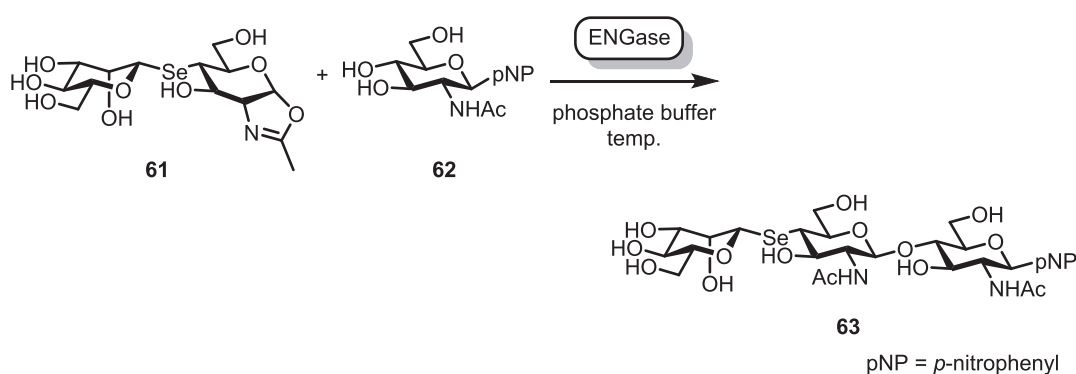
最後に得られた化合物 **60** を脱保護へと供することで、目的物 **61** の合成を達成した(Scheme 17)。



Scheme 17

第四章 Endoglycosidase を用いた糖転移反応の検討

続いて合成した化合物 **61** を糖供与体、GlcNAc-pNP **62** を糖受容体として用いて、Endo M によるグリコシル化の検討を行った (Scheme 18, Table 4)。



Scheme 18

Table 4

Entry	Enzyme (mU)	pH	Concentration (mM)		Yield (%)		
			Donor	Acceptor	0.5 h	2 h	18 h
1	Endo M (1.5)		32.31	10.77	20	47	62
2	Endo M (1.5)	6.25	100	3.33	49	60	63
3	Endo M (3.0)		100	3.33	73	90	93
4	Endo M N175Q (1.5)	7.01	32.31	10.77	0.5	1.5	-

Entry 1 では、*O*-Man β (1-4)GlcNAc oxa を用いて糖転移を行っていた論文⁴¹を参考に、糖供与体と受容体の比が 3:1 となるように調整し反応へ供した。その結果、糖供与体の減少と転移生成物と思われるシグナルの増加が HPLC にて観測された(Fig. 18)。質量分析の結果、保持時間が 21 分のピークに目的物が含まれていることが明らかとなった(Fig. 19)。また、このとき目的物と思われる分子イオンピークはセレン原子を有する化合物に特徴的にみられる同位体ピークを示した。

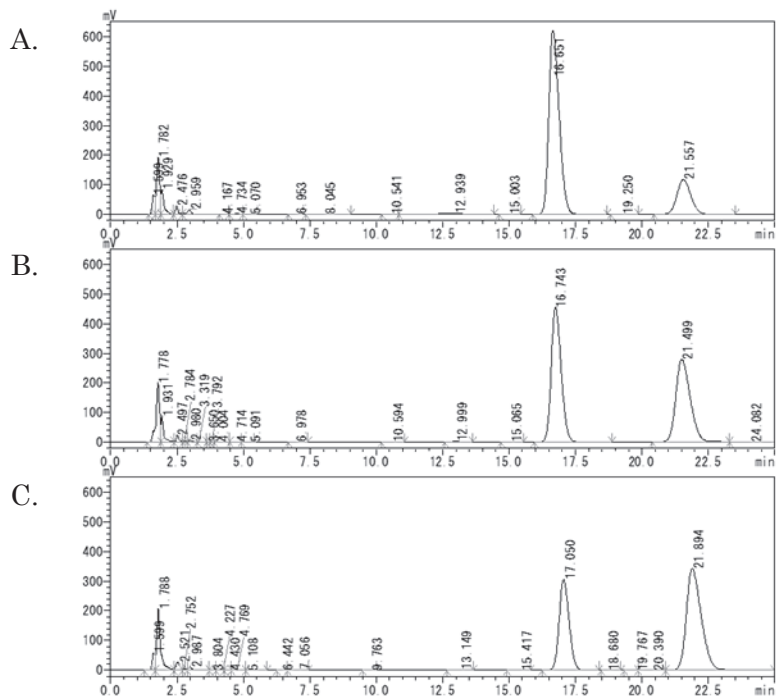


Fig. 18 RP-HPLC analysis of transglycosylation reaction.

Reaction time: A. 0.5 h, B. 2.0 h, C. 14 h.

Column: Inertsil ODS-3 (125×2.1 mm), Detection: UV detector (260 nm)

Eluent A: 0.1% TFA aq., Eluent B: MeCN containing 0.1% TFA

Eluent (Binary gradient 14% of eluent B, 1 mL/min) was employed.

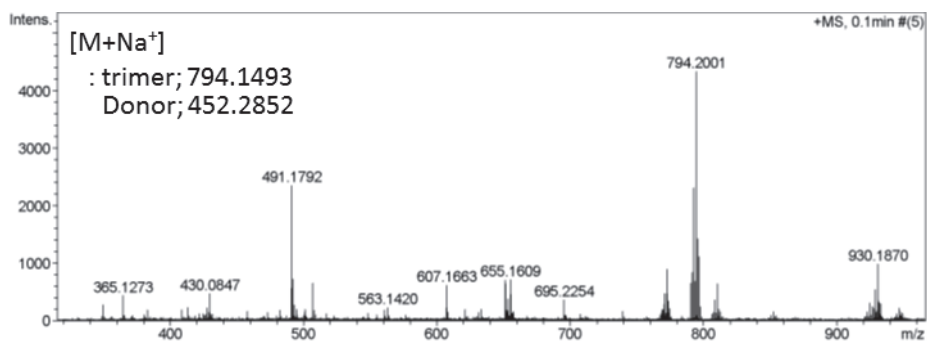


Fig. 19 ESI-TOF MS of glycosylated compound

さらに、¹H-NMR よりマンノシルグルコシドが糖供与体に β 結合を介して結合していることが示された(**Fig. 20**)。

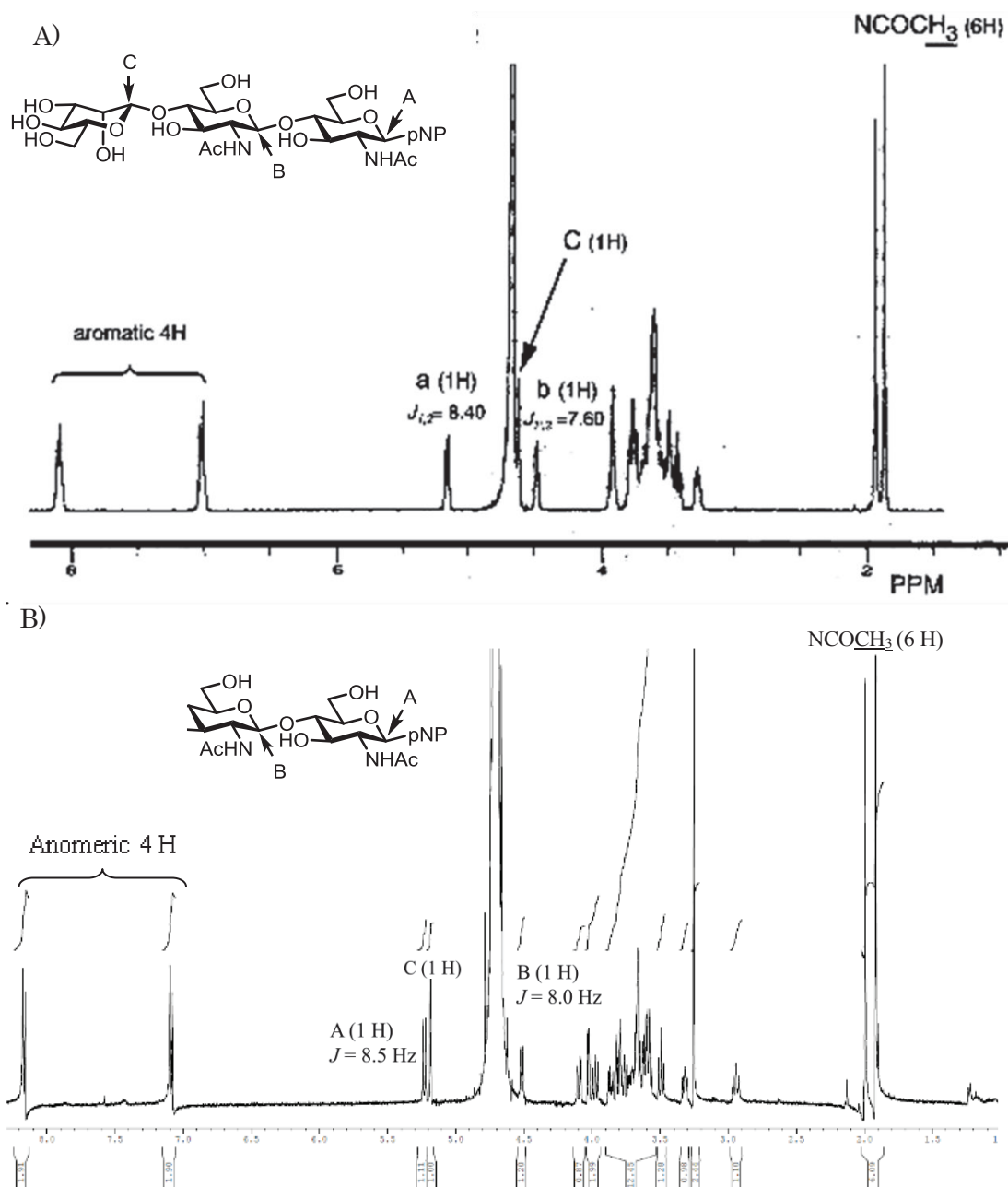


Fig. 20 NMR spectrum of A) *O*-type trisaccharide⁴¹ and B) *Se*-type trisaccharide.

合成したオキサズリン体 **62** がシリカゲルによる弱酸性条件下において不安定であったことから、糖供与体の一部が加水分解により消費されたと考え、Entry 2 では糖供与体の当量

をアクセプターに対して 30 当量に増やした。しかし、反応速度の増加は見られたが収率は Entry1 と同程度であった。この結果から、1.5 mU の Endo M では、糖受容体に比べ酵素量が少なく、転移速度より分解速度が速いのではないかと予想し、Entry3 では酵素量を 3.0 mU に増やし反応を行った。その結果、反応は 2 時間以内に終了し変換率も 90%と良好なものであった(Fig. 21)。

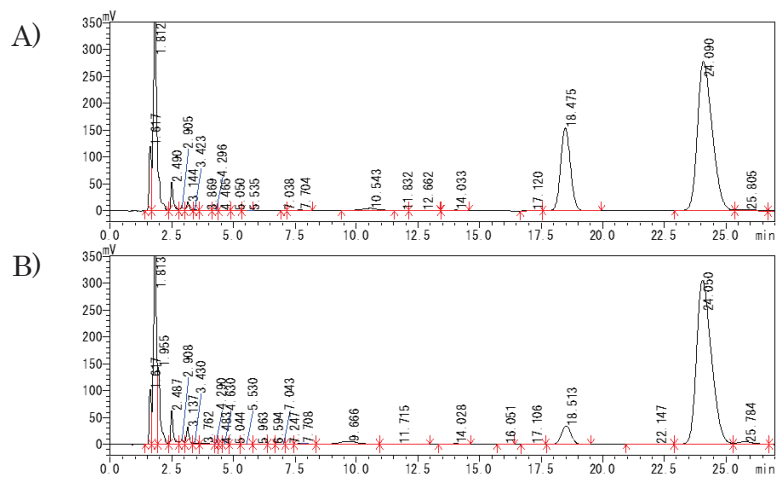


Fig. 21 RP-HPLC analysis of transglycosylation reaction.

Reaction time: A) 0.5 h and B) 2.0 h

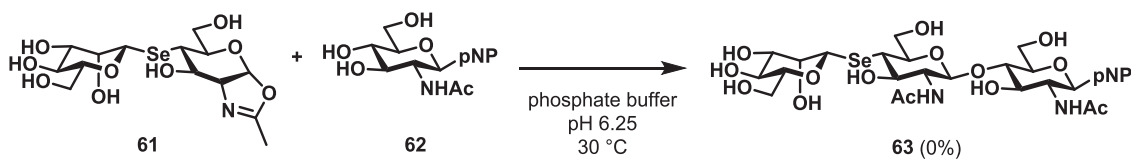
Column: Inertsil ODS-3 (125×2.1 mm)

Detection: UV detector (260 nm)

Eluent A: 0.1% TFA aq. Eluent B: MeCN containing 0.1% TFA

Eluent (Binary gradient 8% of eluent B, 1 mL/min) was employed.

次に、バッファー中での弱酸性条件下でオキサゾリン体 **61** が活性化された結果、縮合反応が生じた可能性を考慮し、Endo M を除いたオキサゾリン体 **61** と糖受容体 **69** を培養した (Scheme 19)。その結果、反応後 18 時間の時点においてオキサゾリン体 **61** の分解のみが観察され、HPLC による分析では、供与体に変化は見られなかった (Fig. 22)。これらのことから、セレン化糖オキサゾリン体 **61** が Endo M の基質となることが明らかとなった。



Scheme 19

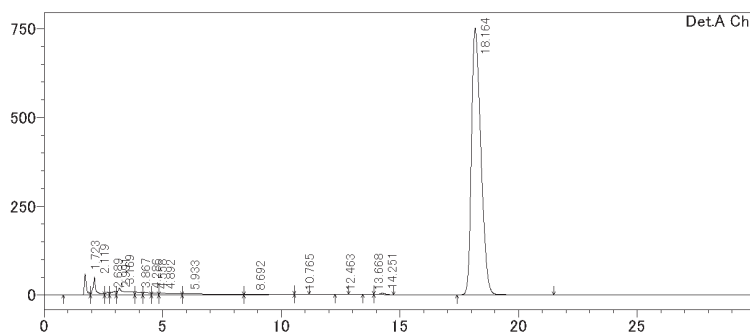


Fig. 22

Fig. 22 RP-HPLC analysis of transglycosylation reaction.

Reaction time: 18 h.

Column: Inertsil ODS-3 (125×2.1 mm)

Eluent A: 0.1% TFA aq. Eluent B: MeCN containing 0.1% TFA

Eluent (Binary gradient 8% of eluent B, 1 mL/min) was employed.

第二部 まとめ

第二部では、セレノ化糖の更なる適用範囲拡充にむけて新たな蛋白質標識法として糖転移酵素を用いた蛋白質のセレノ化糖修飾を提案し研究に取り組んだ。糖転移反応の基質として *Se-Man*β(1-4)*GlcNAc-oxa* を設計した。マンノシルセレノシドとガラクトサミン誘導体との S_N2 反応により基本骨格を構築しオキサゾリンとした後、脱保護を行うことで簡便に合成した。また、セレノ化糖オキサゾリン体を糖供与体、*GlcNAc-pNP* を糖受容体として用いた糖転移反応へと供した結果、転移体生成物を得られ、糖オキサゾリン体が糖転移酵素の基質となることが明らかとなった。今後は、蛋白質への導入および構造の同一性の確認を行っていく。

総括

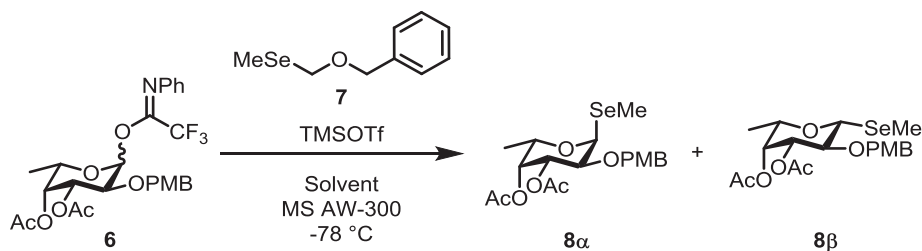
1828年 Wöhler が無機物であるシアンガスとアンモニアから尿素を合成したことから始まった有機合成化学は、今や手間や費用をかければどんなに複雑な天然物であろうが合成できないものはないといわれて久しい。このような情勢のなかで、有機化学に今後ますます求められるのは、低環境負荷型の高効率的な合成法の確立や生命現象の解明に向けた人工分子の合成であると思われる。本研究では、後者に分類される蛋白質の立体構造解析を迅速化する非天然型セレノ化糖の合成および新規利用に向けた基礎的研究を報告した。第一部では、多様な糖認識蛋白質に対応するためにセレン導入箇所が異なる化合物群(セレノ化フコース誘導體群)が有効であると着想し、その合成および立体構造が未解明であった蛋白質の立体構造解析を行いその手法の有用性を示した。この結果は、既存の結晶化ロボットを併用することで複数の糖認識蛋白質の網羅的な立体構造解析の実行可能性を示唆するため、今後の発展に期待が持たれる。また、第二部ではセレノ化糖の更なる応用を目指し、セレノ化糖オキサゾリン体の合成およびそれを基質とした酵素糖転移反応の検証を行った。本研究で得られた結果より糖蛋白質のセレノ化糖修飾の可能性が示され、蛋白質上の糖鎖構造の微小不均一性により立ち遅れている糖蛋白質の結晶構造解析の迅速化が見込まれる。また、この手法によりセレノメチオニン標識試料の調製が困難な蛋白質のセレン標識化およびX線結晶構造解析が可能になると期待される。

本研究で得られた知見が今後、X線結晶構造解析を含む蛋白質の立体構造解析に少しでも役に立てれば幸いである。

実験の部

一般操作

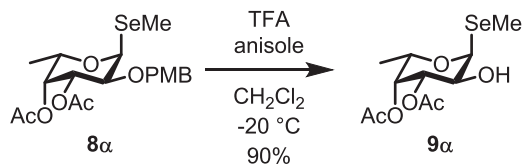
^1H 、 ^{77}Se 、 ^{13}C NMR スペクトルは Bruker Avance III 500 を用いて測定した。 ^1H NMR のケミカルシフトは内部標準物質 (Me_4Si) に対する相対値 ppm (δ) として表した。また、 ^{77}Se と ^{13}C NMR のケミカルシフトはそれぞれ、溶媒および外部標準に対する相対値 ppm (δ) として表した。以下の略称は多重度を表すのに用いた (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad)。質量分析 (HRMS) は、Bruker Daltonics micrOTOF (ESI-TOF) を用いて測定した。比旋光度は Horiba SEPA-300 高感度旋光光度計を用いて測定した。測定に使用した溶媒と濃度は () 内に示した。モレキュラーシーブは Wako Chemicals Inc. のものを、 $300\text{ }^\circ\text{C}$ にて 2 時間活性化させてから用いた。反応に用いた溶媒は $\text{MS4}\text{\AA}$ 、および MSAW-300 で予め乾燥させたものを用いた。反応はアルゴンガス雰囲気下で行った。TLC 分析には Merck TLC (silica gel 60F₂₅₄ on glass) を用い、化合物の検出には UV 照射 (254 nm)、10% 硫酸-エタノール溶液、20% リンモリブデン酸-エタノール溶液、ニンヒドリン試薬を用いた。フラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーには (Fuji Silysia Co., 80 mesh and 300 mesh)、あるいは Sephadex (Pharmacia LH-20) を用い、使用した溶出溶媒は体積比 (v/v) で示した。全ての濃縮操作は湯浴による加温と減圧条件化で行った。



Methyl 3,4-di-*O*-acetyl-6-deoxy-2-*O*-(4-methoxybenzyl)-1-seleno- α -L-galactopyranoside (8 α**) and - β -L-galactopyranoside (**8 β**)**

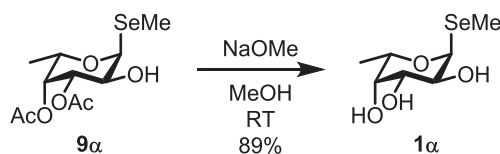
アルゴン雰囲気下、セレノアセタール **7** (100 mg, 463 μ mol)、フコシルイミデート **6** (50.0 mg, 90.0 μ mol)、および AW-300 (90 mg)を CH₂Cl₂-TBME (925 μ L, 1:2)に懸濁させ、室温で1時間攪拌した。溶液を-78 °Cへ冷却後、TMSOTf (10.2 μ L, 99.6 μ mol)を加えて21時間攪拌した。反応終了をTLC (EtOAc/Toluene = 1/8)で確認後、triethylamine (500 μ L)を加えて反応を停止し、固形物をセライトにて濾別し、CH₂Cl₂で洗浄した。ろ液を濃縮後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/Toluene = 1/30)で精製し化合物 **8 α** (27.3 mg, 66%) および **8 β** (9.3 mg, 21%)を黄色粘性液体として得た。 α -isomer (**8 α**); $[\alpha]_D$ -165.2 ° (c 1.0, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.27-6.87 (2 d, 4 H, Ar), 5.87 (d, 1 H, $J_{1,2}$ = 5.5 Hz, H-1), 5.29 (d, 1 H, $J_{3,4}$ = 3.0 Hz, H-4), 5.16 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ = 10.5 Hz, H-3), 4.64 (d, 1 H, J_{gem} = 12.0 Hz, OCH₂Ar), 4.49 (d, 1 H, J_{gem} = 12.0 Hz, OCH₂Ar), 4.37 (m, 1 H, H-5), 3.97 (dd, 1 H, H-2), 3.80 (s, 3 H, OCH₃), 2.14-1.98 (2 s, 6 H, 2 Ac), 1.90 (s, 3 H, SeCH₃), 1.15 (d, 3 H, $J_{5,6}$ = 6.5 Hz, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 170.4, 170.0, 159.4, 129.7, 129.3, 113.8, 80.8, 72.9, 71.8, 71.4, 71.0, 66.2, 55.3, 20.8, 16.0, 1.63; ⁷⁷Se NMR (94 MHz, CDCl₃) δ 91.3; HRMS (ESI) m/z : found [M+Na]⁺ 469.0736, C₁₉H₂₆O₇Se calcd for [M+Na]⁺ 469.0736. β -isomer (**8 β**); $[\alpha]_D$ +3.6 ° (c 0.8, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.27-6.86 (2 d, 4 H, Ar), 5.27 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ = 3.0 Hz, $J_{4,5}$ = 0.5 Hz, H-4), 4.98 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ = 9.5 Hz, H-3), 4.75 (d, 1 H, J_{gem} = 10.5 Hz, OCH₂Ar), 4.66 (d, 1 H, $J_{1,2}$ = 9.5 Hz, H-1), 4.59 (d, 1 H, J_{gem} = 10.0 Hz, OCH₂Ar), 3.79-3.71 (m, 5 H, CH₃, H-2, H-5), 2.17-1.99 (3 s, 9 H, 2 Ac, SeCH₃), 1.38 (d, 3 H, $J_{5,6}$ = 6.5 Hz, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.4, 170.1, 159.6, 130.1, 129.8, 113.9, 79.0, 76.4, 75.1, 74.7, 74.2, 71.2, 55.4, 29.8, 20.9, 20.9, 16.5, 3.4; ⁷⁷Se NMR (94 MHz, CDCl₃) δ 211.8;

HRMS (ESI) m/z : found $[M+Na]^+$ 469.0736, $C_{19}H_{26}O_7Se$ calcd for $[M+Na]^+$ 469.0736.



Methyl 3,4-di-*O*-acetyl-6-deoxy-1-seleno- α -L-galactopyranoside (**9a**)

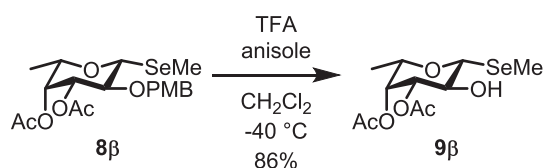
アルゴン雰囲気下、化合物 **8a** (30 mg, 70 μmol) および anisole (15 mg, 140 μmol) を CH_2Cl_2 (0.92 mL) に溶解させ -20°C に冷却した。Trifluoroacetic acid (0.46 mL) を加えて同温度条件で 6 時間攪拌した。反応終了を TLC (EtOAc/*n*-Hexane = 1/1) で確認後、トルエン共沸を行った。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/*n*-Hexane = 1/2) で精製し化合物 **9a** (21 mg, 90%) を黄色粘性液体として得た。 $[\alpha]_D^{25} -273.2^\circ$ (c 1.0, CHCl_3); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 5.71 (d, 1 H, $J_{1,2} = 5.5$ Hz, H-1), 5.26 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 3.0$ Hz, $J_{4,5} = 1.0$ Hz, H-4), 4.91 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, H-3), 4.34 (m, 1 H, H-5), 4.13 (m, 1 H, H-2), 2.16-2.05 (3 s, 9 H, 2 Ac, SeCH_3), 1.18 (d, 3 H, $J_{5,6} = 6.5$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 171.0, 170.8, 86.9, 73.2, 71.1, 67.9, 67.4, 21.4, 21.0, 16.3, 4.3; ^{77}Se NMR (94 MHz, CDCl_3) δ 75.2; HRMS (ESI) m/z : found $[M+Na]^+$ 349.0161, $C_{11}H_{18}O_6Se$ calcd for $[M+Na]^+$ 349.0161.



Methyl 1-seleno- α -L-galactopyranoside (**1a**)

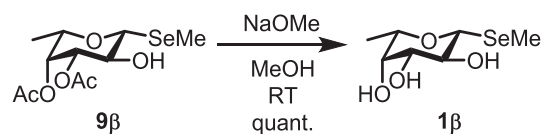
化合物 **9a** (16.0 mg, 49.0 μmol) を MeOH (500 μL) に溶解させ Sodium methoxide (28% in MeOH, 2.00 mg, 10.0 μmol) を加え、室温にて 20 分間攪拌した。反応終了を TLC (MeOH/Toluene = 1/5) で確認後、Muromac (H^+) を用いて中和した。固形物を脱脂綿にて濾別し、メタノールによる樹脂の洗浄、濾液の濃縮を行った。残渣をゲル濾過クロマトグラフ

イー Sephadex LH-20 (H₂O/MeOH = 1/4) で精製し化合物 **1α** (10.6 mg, 89%) を白色個体として得た。[α]_D -327.6° (c 0.8, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 4.51 (dd, 1 H, *J*_{1,2} = 9.5 Hz, H-1), 3.70-3.61 (m, 3 H, H-2, H-4, H-5), 3.47 (dd, 1 H, *J*_{3,4} = 3.5 Hz, H-3), 2.10 (s, 3 H, SeCH₃), 1.28 (d, 3 H, *J*_{5,6} = 6.5 Hz, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 85.3, 73.2, 73.2, 69.9, 69.4, 16.6, 1.4; ⁷⁷Se NMR (94 MHz, CD₃OD) 75.4; HRMS (ESI) *m/z*: found [M+Na]⁺ 264.9948, C₇H₁₄O₄Se calcd for [M+Na]⁺ 264.9950.



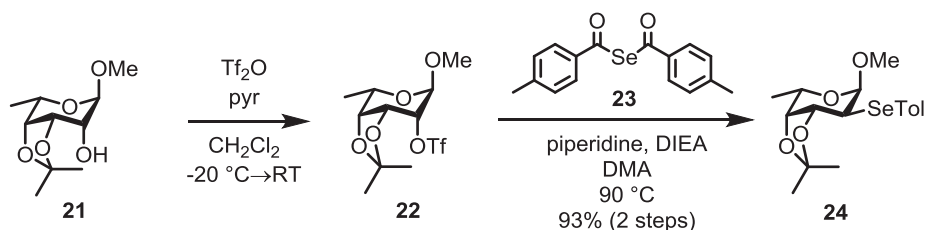
Methyl 3,4-di-*O*-acetyl-6-deoxy-1-seleno-β-L-galactopyranoside (**9β**)

アルゴン雰囲気下、化合物 **8β** (64 mg, 140 μmol) および anisole (31 μL, 290 μmol) を CH₂Cl₂ (1.9 mL) に溶解させ -40 °C に冷却した。Trifluoroacetic acid (0.46 mL) を加えて同温度条件で 5 時間攪拌した。反応終了を TLC (MeOH/CHCl₃ = 1/20) で確認後、トルエン共沸を行い、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/*n*-Hexane = 1/2) で精製し化合物 **9β** (40 mg, 86%) を黄色粘性液体として得た。[α]_D -6.6° (c 0.8, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.27 (d, 1 H, *J*_{3,4} = 3.0 Hz, H-4), 4.93 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 9.5 Hz, H-3), 4.60 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 10.0 Hz, H-1), 3.90-3.83 (m, 2 H, H-2, H-5), 2.47 (d, 1 H, *J*_{2,OH} = 2.0 Hz, OH), 2.16-2.06 (3 s, 9 H, 2 Ac, SeCH₃), 1.21 (d, 3 H, *J*_{5,6} = 6.5 Hz, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 168.4, 79.3, 78.9, 72.3, 71.8, 68.7, 65.6, 65.5, 18.7, 18.5, 14.3; ⁷⁷Se NMR (94 MHz, CDCl₃) δ 177.9; HRMS (ESI) *m/z*: found [M+Na]⁺ 349.0161, C₁₁H₁₈O₆Se calcd for [M+Na]⁺ 349.0161.



Methyl 1-seleno-β-L-galactopyranoside (**1β**)

化合物 **9β** (40 mg, 120 μmol) を MeOH (4.1 mL) に溶解させ Sodium methoxide (28% in MeOH, 10 mg, 40 μmol) を加え、室温にて 30 分間攪拌した。反応終了を TLC (MeOH/Toluene = 1/5) で確認後、Muromac (H⁺) を用いて中和した。固形物をろ過し、メタノールで洗浄後、ろ液を濃縮し、得られた残渣をゲル濾過クロマトグラフィー Sephadex LH-20 (H₂O/MeOH = 1/4) で精製し化合物 **1β** (30 mg, quant.) を白色個体として得た。[α]_D +21.9 ° (c 0.8, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 4.51 (dd, 1 H, J_{1,2} = 9.5 Hz, H-1), 3.70-3.61 (m, 3 H, H-2, H-4, H-5), 3.47 (dd, 1 H, J_{2,3} = 9.5 Hz, J_{3,4} = 3.5 Hz, H-3), 2.10 (s, 3 H, SeCH₃), 1.28 (d, 3 H, J_{5,6} = 6.5 Hz, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 110.0, 105.3, 104.2, 101.3, 99.7, 45.0, 29.7; ⁷⁷Se NMR (94 MHz, CD₃OD) δ 190.4; HRMS (ESI) *m/z*: found [M+Na]⁺ 264.9948, C₇H₁₄O₄Se calcd for [M+Na]⁺ 264.9950.

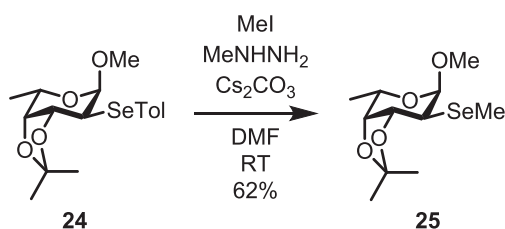


Methyl 2,6-dideoxy-3,4-*O*-isopropylidene-2-(4-methylbenzoylseleno)- α -L-galactopyranoside

(24)

アルゴン雰囲気下、化合物 **21** (96.0 mg, 440 μmol) の CH₂Cl₂ (10.0 mL) 溶液に、pyridine (148 μL, 183 μmol) および trifluoromethanesulfonic anhydride (154 μL, 916 μmol) を -20 °C にて加え 30 分間室温で攪拌した。反応終了を TLC (EtOAc/*n*-Hexane = 1/1) で確認し、CH₂Cl₂ で希釈後、洗浄(2M-塩酸、蒸留水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水)、乾燥 (無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去後、真空ラインにて 3 時間乾燥した。得られたトリフラート体を脱気した DMA (3.60 mL) に溶解させた。反応溶液に 4-methylselenobenzoyl anhydride **23** (788 mg, 2.48 mmol)、*N,N*-diisopropylethylamine (444 μL, 2.48 mmol) そして piperidine (244 μL, 2.48 mmol) の DMA (6.40 mL) 溶液を滴下にて加え、90 °C にて 75 分間攪拌した。反応終了を TLC

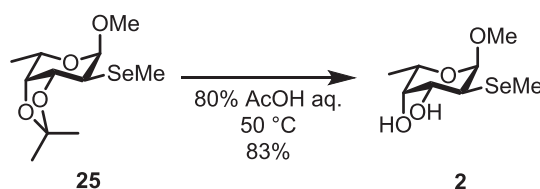
(EtOAc/*n*-Hexane = 1/3)で確認後、希釈(EtOAc)、洗浄(2M-塩酸、H₂O、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水)、乾燥(無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去を行った。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/toluene = 1/5)で精製し化合物 **24** (163 mg, 93%)を黄色粘性液体として得た。[α]_D-66.0° (c 1.1, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.81-7.24 (2 d, 4 H, Ar), 4.76 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 3.5 Hz, H-1), 4.38 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 11.0 Hz, *J*_{3,4} = 5.0 Hz, H-3), 4.16 (m, 1 H, H-5), 4.04 (dd, 1 H, *J*_{4,5} = 2.0 Hz, H-4), 3.94 (dd, 1 H, H-2), 3.37 (s, 3 H, OCH₃), 2.39 (s, 3 H, Ar-CH₃), 1.63 (s, 3 H, (CH₃)₂C), 1.41 (d, 3 H, *J*_{5,6} = 6.5 Hz, H-6), 1.36 (s, 3 H, (CH₃)₂C); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 192.5, 144.6, 136.2, 129.4, 127.5, 109.4, 109.1, 101.3, 75.9, 74.4, 63.1, 55.7, 44.9, 29.7, 28.1, 26.5, 21.7, 16.7; ⁷⁷Se NMR (94 MHz, CDCl₃) δ 534.0; HRMS (ESI) *m/z*: found [M+Na]⁺ 423.0681, C₁₈H₂₄O₅Se calcd for [M+Na]⁺ 423.0681.



Methyl 2,6-dideoxy-3,4-*O*-isopropylidene-2-methylseleno- α -L-galactopyranoside (**25**)

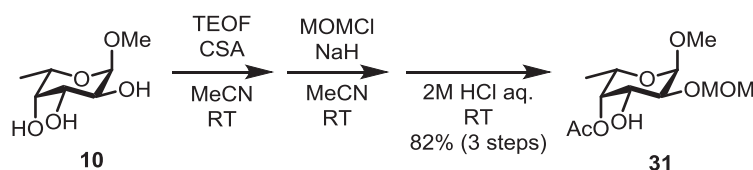
アルゴン雰囲気下、化合物 **24** (60 mg, 150 μ mol)を脱気した DMF (2.0 mL)に溶解させ、Cs₂CO₃ (98 mg, 300 μ mol)、*N*-methylhydrazine (12.0 mg, 230 μ mol)そして methyl iodide (19.0 μ L, 300 μ mol) を室温で加え 70 分間攪拌した。反応終了を TLC (EtOAc/*n*-Hexane = 1/3)で確認後、希釈(EtOAc)、洗浄(飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水)、乾燥(無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去を行った。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/*n*-Hexane = 1/6)で精製し化合物 **25** (29 mg, 64%)を黄色粘性液体として得た。[α]_D-141.7° (c 1.1, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4.81 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 3.0 Hz, H-1), 4.43 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 9.5 Hz, *J*_{3,4} = 5.0 Hz, H-3), 4.11 (m, 1 H, H-5), 3.96 (dd, 1 H, *J*_{4,5} = 2.5 Hz, H-4), 3.36 (s, 3 H, OCH₃), 2.82 (dd, 1 H, H-2), 2.14 (s, 3 H, SeCH₃), 1.52-1.36 (m, 9 H, (CH₃)₂C, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ

108.7, 101.6, 75.7, 62.8, 55.6, 43.1, 29.7, 28.6, 26.4, 16.7, 4.6; ^{77}Se NMR (94 MHz, CDCl_3) δ 127.2; HRMS (ESI) m/z : found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 319.0419, $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Se}$ calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 319.0419.



Methyl 2,6-dideoxy-2-methylseleno- α -L-galactopyranoside (**2**)

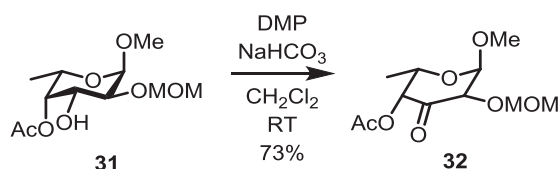
化合物 **25** (10 mg, 34 μmol) を H_2O (67 μL) に懸濁させ、 $0\text{ }^\circ\text{C}$ で Acetic acid (270 μL) を加え、 $50\text{ }^\circ\text{C}$ で 50 分間攪拌した。反応の終了を TLC ($\text{MeOH}/\text{CHCl}_3 = 1/10$) で確認後、トルエン共沸を行った。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\text{EtOAc}/\text{Toluene} = 2/1$) で精製し化合物 **2** (7.2 mg, 83%) を白色個体として得た。 $[\alpha]_{\text{D}} +21.9\text{ }^\circ$ (c 0.8, MeOH); ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 4.77 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-1), 3.91-3.84 (m, 2 H, H-3, H-5), 3.61 (d, 1 H, $J_{3,4} = 2.5$ Hz, H-4), 3.31 (s, 3 H, OCH_3), 2.96 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 11.0$ Hz, H-2), 2.06 (s, 3 H, SeCH_3), 1.21 (d, 3 H, $J_{5,6} = 6.5$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 103.3, 73.5, 72.5, 67.7, 55.8, 44.9, 16.9, 4.8; ^{77}Se NMR (94 MHz, CD_3OD) δ 102.8; HRMS (ESI) m/z : found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 279.0106, $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_4\text{Se}$ calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 279.0106.



Methyl 4-*O*-acetyl-6-deoxy-2-methoxymethyl- α -L-galactopyranoside (**31**)

アルゴン雰囲気下、化合物 **10** (2.44g, 13.7 mmol) を MeCN (137 mL) に溶解させ、 $0\text{ }^\circ\text{C}$ で triethyl orthoformate (3.80 mL, 20.6 mmol) と CSA (325 mg, 1.40 mmol) を加え、室温で 7 時間攪拌した。反応終了を TLC ($\text{MeOH}/\text{CHCl}_3 = 10/1$) で確認後、 $0\text{ }^\circ\text{C}$ で triethylamine を加え反応を停止させた。反応溶液に DIEA (11.8 mL, 68.5 mmol) および MOMCl (2.10 mL, 27.4 mmol) を加え室温

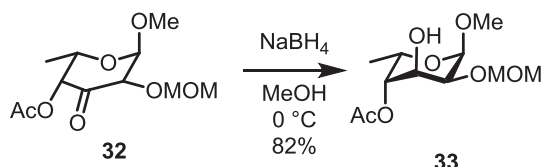
で 28 時間攪拌した。反応終了を TLC (EtOAc/*n*-Hexane = 1/1)にて確認後、MeOH を加えて反応を停止させた。2M-塩酸を加え室温で 10 分間攪拌し、オルソエステルの加水分解を TLC (EtOAc/*n*-Hexane = 1/1)にて確認後、希釈(EtOAc)、洗浄 (2M-塩酸、H₂O、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水)、乾燥(無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去を行った。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/Toluene = 1/5) で精製し化合物 **31** (2.97 g, 82%)を無色粘性液体として得た。[α]_D-28.9° (c 0.4, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.27 (dd, 1 H, *J*_{3,4} = 3.5 Hz, *J*_{4,5} = 1.0 Hz, H-4), 4.84 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 3.5 Hz, H-1), 4.82 (d, 1 H, *J*_{gem} = 12.0 Hz, OCH₂OCH₃), 4.73 (d, 1 H, *J*_{gem} = 12.0 Hz, OCH₂OCH₃), 4.12-4.04 (m, 2 H, H-3, H-5), 3.72 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 10.0 Hz, H-2), 3.43-3.41 (m, 6 H, 2 OCH₃), 3.01 (s, 1 H, OH), 2.18 (s, 3 H, Ac), 1.16 (d, 3 H, *J*_{5,6} = 6.5 Hz, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 177.2, 99.3, 98.1, 78.3, 73.0, 67.6, 64.5, 55.9, 55.3, 20.9, 16.2; HRMS (ESI) *m/z*: found [M+Na]⁺ 287.1103, C₁₁H₂₀O₇ calcd for [M+Na]⁺ 287.1101.



Methyl 4-*O*-acetyl-6-deoxy-2-*O*-methoxymethyl- α -L-xylo-hexopyranosid-3-ulose (**32**)

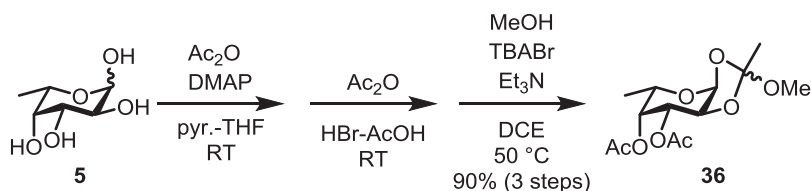
アルゴン雰囲気下、化合物 **31** (620 mg, 2.35 mmol) と NaHCO₃ (983 mg, 11.7 mmol) を CH₂Cl₂ (23.5 mL)に懸濁させ、0 °C で Dess-Martin periodinane (1.29 g, 3.05 mmol) を加えて室温で 18 時間攪拌した。反応終了を TLC (EtOAc/*n*-Hexane = 2/1)にて攪拌後、希釈(Et₂O)し、satd aq. Na₂S₂O₃を加え反応を停止させた。水層を Et₂O で抽出後、洗浄(飽和食塩水)、乾燥 (無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去を行った。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Acetone/Toluene = 1/5) で精製し化合物 **32** (449 mg, 73%) を無色粘性液体として得た。[α]_D+3.0° (c 0.7, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.11 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 4.0 Hz, H-1), 5.08 (d, 1 H, *J*_{4,5} = 1.5 Hz, H-4), 4.74-4.72 (m, 3 H, H-2, 2 OCH₂OCH₃), 4.28-4.24 (m, 1 H, H-5), 3.43-3.42 (m, 6

H, 2 OCH₃), 2.19 (s, 3 H, Ac), 1.27 (d, 3 H, $J_{5,6} = 6.5$ Hz, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 197.8, 169.6, 101.8, 96.5, 78.9, 77.4, 67.7, 56.0, 55.7, 20.7, 15.6; HRMS (ESI) m/z : found [M+Na]⁺ 285.0945, C₁₁H₁₈O₇ calcd for [M+Na]⁺ 285.0945.



Methyl 4-*O*-acetyl-6-deoxy-2-*O*-methoxymethyl- α -L-gulopyranoside (**33**)

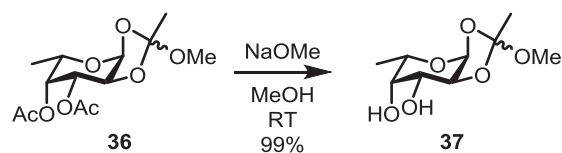
アルゴン雰囲気下、化合物 **32** (50 mg, 0.19 mmol) の MeOH (1.9 mL) 溶液に 0 °C で NaBH₄ (7.9 mg, 0.21 mmol) を加え、同温度条件で 5 分間攪拌した。反応終了を TLC (EtOAc/*n*-Hexane = 2/1) で確認し、希釈後 (EtOAc)、洗浄 (蒸留水、飽和食塩水)、乾燥 (無水硫酸ナトリウム)、溶媒除去を行った。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/*n*-Hexane = 3/1) で精製し化合物 **33** (41 mg, 82%) を無色粘性液体として得た。[α]_D -43.7 ° (c 0.4, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), δ 4.98 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 3.5$ Hz, $J_{4,5} = 1.0$ Hz, H-4), 4.87 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-1), 4.81 (d, 1 H, $J_{\text{gem}} = 12.0$ Hz, OCH₂OCH₃), 4.74 (d, 1 H, $J_{\text{gem}} = 12.0$ Hz, OCH₂OCH₃), 4.35-4.30 (m, 2 H, H-3, H-5), 4.00 (m, 1 H, H-3), 3.84 (t, 1 H, $J_{2,3} = 3.5$ Hz, H-3), 3.68 (d, 1 H, $J_{3,\text{OH}} = 8.0$ Hz, OH), 3.47-3.43 (m, 6 H, 2 OCH₃), 2.14 (s, 3 H, Ac), 1.16 (d, 3 H, $J_{5,6} = 6.5$ Hz, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 170.0, 100.1, 95.9, 73.6, 71.0, 68.3, 60.5, 55.9, 55.7, 20.9, 15.7; HRMS (ESI) m/z : found [M+Na]⁺ 287.1103, C₁₁H₂₀O₇ calcd for [M+Na]⁺ 287.1101.



1,2-*O*-Diacetyl-6-deoxy-1,2-*O*-(1-methoxymethylidene)- α -L-galactopyranose (**36**)

アルゴン雰囲気下、フコース **5** (5.00 g, 30.5 mmol) を pyridine-THF に溶解させ 4-DMAP (37.0 mg, 300 μ mol) および Ac₂O (23.0 mL, 244 mmol) を 0 °C で加え、室温で 13 時間攪拌した。反

応終了を TLC (MeOH/CHCl₃ = 1/10)で確認後、0 °C で MeOH を加え反応を停止させた。トルエン共沸後、残渣を EtOAc で希釈し、洗浄(2M-塩酸、蒸留水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水)、乾燥(無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去を行った。24 時間真空乾燥させた後、残渣を CH₂Cl₂ (20.0 mL)に溶解させ、Ac₂O (23.0 mL, 244 mmol)および 25% HBr-HOAc 溶液 (40.0 mL)を加え 16 時間攪拌した。反応終了を TLC(EtOAc/*n*-Hexane = 1/5)で確認後、CH₂Cl₂ で希釈し氷浴へ注いだ。反応溶液を洗浄(飽和炭酸ナトリウム水溶液、飽和食塩水)、乾燥(無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去後、真空ラインにて 12 時間乾燥させた。得られたフコシルブロミドを DCE (95.3 mL)に溶解させ triethylamine (8.50 mL, 61.0 mmol)、MeOH (1.40 mL, 33.6 mmol)そして TBAB (4.93 g, 15.3 mmol)を室温に加え、50 °C で 5 時間攪拌した。反応終了を TLC (EtOAc/*n*-Hexane = 1/3)で確認後、固形物をろ過し CH₂Cl₂ で洗浄した。ろ液を洗浄(2M-塩酸、蒸留水、飽和炭酸ナトリウム水溶液、飽和食塩水)、乾燥 (無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(EtOAc/*n*-Hexane = 1/5)で精製し化合物 **36** (8.65 g, 90%)を無色粘性液体として得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.80 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 5.0 Hz, H-1), 5.27-5.25 (m, 1 H, H-4), 5.04 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 7.0 Hz, *J*_{3,4} = 3.0 Hz, H-3), 4.29-4.23 (m, 2 H, H-2, H-5), 3.30 (s, 3 H, OCH₃), 2.14 (s, 3 H, Ac), 2.06 (s, 3 H, Ac), 1.20 (d, 3 H, *J*_{5,6} = 6.5 Hz, H-6); HRMS (ESI) *m/z*: found [M+Na]⁺ 327.1050, C₁₃H₂₀O₈ calcd for [M+Na]⁺ 327.1045.



6-Deoxy-1,2-*O*-(1-methoxymethylidene)- α -L-galactopyranose (**37**)

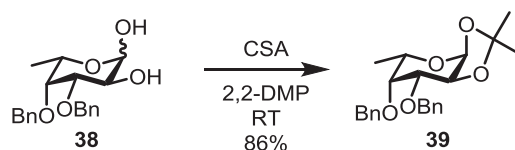
化合物 **36** (1.00 g, 3.28 mol)を MeOH (6.56 mL)に溶解させ Sodium methoxide (28% in MeOH, 21.0 mg, 400 μ mol)を加え、室温にて 30 分間攪拌した。反応終了を TLC (EtOAc/*n*-Hexane = 1/1)で確認し、Muromac (H⁺) を用いて中和した。固形物をろ過し、樹脂をメタノールで洗浄後、

濾液を濃縮しシリカゲルクロマトグラフィー (MeOH/CHCl₃ = 1/20) で精製し化合物 **37** (720 mg, 99%) を白色固体として得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.74 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 5.0 Hz, H-1), 4.25 (t, 1 H, *J*_{2,3} = 5.0 Hz, H-2), 4.04-4.00 (m, 1 H, H-5), 3.88-3.85 (m, 1 H, H-3), 3.78-3.75 (m, 1 H, H-4), 3.38 (m, 1 H, OH-3), 3.29 (s, 3 H, OCH₃), 2.84 (s, 1 H, OH-4), 1.32 (d, 3 H, *J*_{5,6} = 6.5 Hz, H-6); HRMS (ESI) *m/z*: found [M+Na]⁺ 243.0839, C₉H₁₆O₆ calcd for [M+Na]⁺ 243.0842.



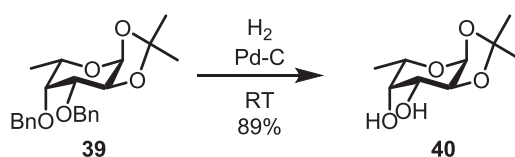
3,4-Di-*O*-benzyl-6-deoxy-L-galactopyranose (**38**)

アルゴン雰囲気下、化合物 **37** (700 mg, 3.17 mmol) を DMF (16.0 mL) に溶解させ、0 °C で NaH (1.20 g, 6.99 mmol) を加え 1 時間攪拌した。同温条件下で BnBr (834 μL, 6.99 mmol) を加えた後、室温で 24 時間攪拌した。反応終了を TLC (EtOAc/Toluene = 1/1) で確認後、0 °C で MeOH を加え反応を停止させた。反応溶液を EtOAc で希釈後、2M-塩酸を加え 10 分間攪拌した。オルソエステルの加水分解を TLC (EtOAc/Toluene = 1/1) で確認後、洗浄(蒸留水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水)、乾燥 (無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去を行った。3 時間真空乾燥を行った残渣を、MeOH (6.30 mL) に溶解させ、sodium methoxide (28% in MeOH, 61.2 mg, 317 μmol) を室温で加え、20 分間攪拌した。反応終了を TLC (MeOH/CHCl₃ = 1/10) で確認後、Muromac (H⁺) により中和した。樹脂をろ過後、MeOH で洗浄し濾液を濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (MeOH/CHCl₃ = 1/25) で精製し化合物 **38** (911 mg, 83%) を白色固体として得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.37-7.23 (m, 10 H, Ar), 5.31 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 3.5 Hz, H-1), 4.93-4.63 (m, 4 H, 2 ArCH₂), 4.15 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 9.5 Hz, H-2), 3.74 (dd, 1 H, *J*_{3,4} = 2.5 Hz, H-3), 3.68 (d, 1 H, *J*_{4,5} = 1.5 Hz, H-4), 3.53 (m, 1 H, H-5), 1.18 (d, 3 H, *J*_{5,6} = 6.5 Hz, H-6); HRMS (ESI) *m/z*: found [M+Na]⁺ 367.1516, C₂₀H₂₄O₅ calcd for [M+Na]⁺ 367.1516.



3,4-Di-*O*-benzyl-6-deoxy-1,2-*O*-isopropylidene- α -L-galactopyranose (**39**)

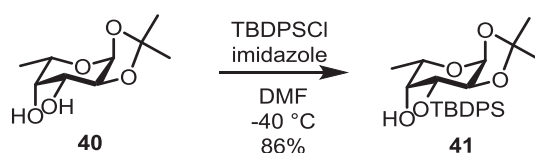
アルゴン雰囲気下、化合物 **38** (1.83 g, 5.31 mmol) を 2,2-DMP (26.6 mL) に溶解させ、CSA (12.0 mg, 500 μ mol) を室温で加え、4 時間攪拌した。反応終了を TLC (EtOAc/Toluene = 1/2) で確認後、triethylamine を加え反応を停止させた。溶媒留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/Toluene = 1/5) で精製し化合物 **39** (1.76 g, 86%) を白色固体として得た。 $[\alpha]_D$ -59.2° (c 1.0, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.41-7.26 (m, 10 H, Ar), 5.58 (d, 1 H, $J_{1,2}$ = 4.5 Hz, H-1), 4.99-4.65 (m, 4 H, 2 ArCH₂), 4.30 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ = 6.5 Hz, H-2), 4.03 (m, 1 H, H-5), 3.68-3.66 (m, 2 H, H-3, H-4), 1.45 (1 s, 3 H, (CH₃)₂C), 1.39 (1 s, 3 H, (CH₃)₂C), 1.25 (d, 3 H, $J_{5,6}$ = 6.5 Hz, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 138.6, 138.5, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 127.7, 127.6, 108.7, 97.5, 81.1, 77.7, 77.6, 75.6, 74.4, 71.7, 70.2, 28.4, 27.3, 16.7; HRMS (ESI) m/z : found $[M+Na]^+$ 407.1829, C₂₃H₂₈O₅ calcd for $[M+Na]^+$ 407.1829.



6-Deoxy-1,2-*O*-isopropylidene- α -L-galactopyranose (**40**)

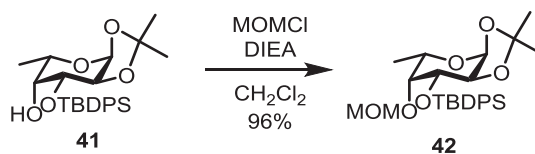
アルゴン雰囲気下、化合物 **39** (3.30 g, 8.59 mmol) を MeOH (430 mL) に溶解させ、10% Pd on activated carbon (3.30 g) を加え、H₂ 雰囲気下、室温で 24 時間攪拌した。反応終了を TLC (EtOAc/Toluene = 1/1) で確認後、固形物をセライトにて濾別し、CHCl₃ で洗浄した。ろ液を濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (MeOH/CHCl₃ = 1/25) で精製し化合物 **40** (1.55 g, 89%) を白色固体として得た。 $[\alpha]_D$ -52.5° (c 0.6, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz,

CDCl₃) δ 5.57 (d, 1 H, $J_{1,2} = 5.5$ Hz, H-1), 4.14-4.07 (m, 2 H, H-2, H-5), 3.88 (m, 1 H, H-3), 3.77 (s, 1 H, H-4), 2.68-2.23 (2 s, 2 H, OH), 1.52 (1 s, 3 H, (CH₃)₂C), 1.38 (1 s, 3 H, (CH₃)₂C), 1.33 (d, 3 H, $J_{5,6} = 6.5$ Hz, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 108.2, 97.5, 75.7, 71.6, 69.4, 67.6, 27.8, 26.8, 16.4; HRMS (ESI) m/z : found [M+Na]⁺ 227.0890, C₉H₁₆O₅ calcd for [M+Na]⁺ 227.0890.



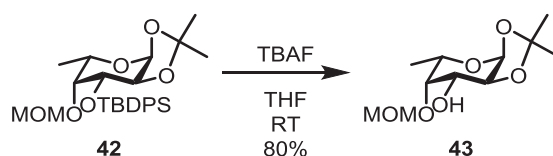
3-*O*-*tert*-Butyldiphenylsilyl-6-deoxy-1,2-*O*-isopropylidene- α -L-galactopyranose (41)

アルゴン雰囲気下、化合物 **40** (2.80 g, 13.7 mmol) を DMF (68.0 mL) に溶解させ imidazole (2.30 g, 34.3 mmol) と TBDPSCI (3.60 mL, 13.7 mmol) を -40 °C で加え 15 時間攪拌した。反応終了を TLC (EtOAc/*n*-Hexane = 1/5) で確認後、同温度条件で MeOH を加えて反応を停止させ希釈 (EtOAc)、洗浄 (飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水)、乾燥 (無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Et₂O/Toluene = 1/15) で精製し化合物 **41** (5.20 g, 86%) を白色固体として得た。[α]_D -41.5 ° (c 0.4, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.74-7.37 (m, 10 H, Ar), 5.53 (d, 1 H, $J_{1,2} = 5.0$ Hz, H-1), 4.04 (t, 1 H, $J_{2,3} = 5.0$ Hz, H-2), 3.89 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 4.0$ Hz, H-3), 3.83 (m, 1 H, H-5), 3.39 (d, 1 H, H-4), 2.48 (d, 1 H, $J_{4,\text{OH}} = 2.5$ Hz, OH), 1.33-1.12 (m, 18 H, (CH₃)₂C, H-6, ^tBu); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 136.2, 136.0, 135.8, 133.5, 132.8, 130.2, 130.1, 128.0, 127.8, 107.4, 97.6, 75.6, 74.0, 70.0, 67.4, 27.7, 27.3, 27.1, 19.4, 16.5; HRMS (ESI) m/z : found [M+Na]⁺ 465.2068, C₂₅H₃₄O₅Si calcd for [M+Na]⁺ 465.2068.



3-*O*-*tert*-Butyldiphenylsilyl-6-deoxy-1,2-*O*-isopropylidene-4-*O*-methoxymethyl- α -L-galactopyranose (42)

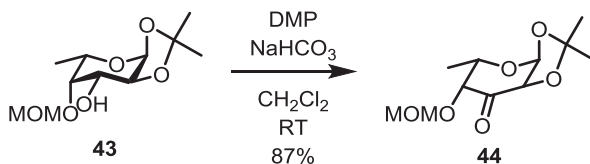
アルゴン雰囲気下、化合物 **41** (1.90 g, 4.29 mmol) を DCE (21.0 mL) に溶解させ、MOMCl (3.30 mL, 42.9 mmol) と DIEA (7.40 mL, 42.9 mmol) を室温で加えた後、45 °C で 3 時間攪拌した。反応終了を TLC (EtOAc/*n*-Hexane = 1/8) で確認後、MeOH を 0 °C で加え反応を停止させた。トルエン共沸後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/*n*-Hexane = 1/15) で精製し化合物 **42** (2.01 g, 96%) を白色固体として得た。 $[\alpha]_D -20.3^\circ$ (c 0.6, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.74-7.35 (m, 10 H, Ar), 5.51 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 4.5 Hz, H-1), 4.95-4.66 (2 d, 2 H, OCH₂), 4.15 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 6.5 Hz, H-2), 3.93 (dd, 1 H, *J*_{3,4} = 2.5 Hz, H-3), 3.86 (m, 1 H, H-5), 3.49 (t, 1 H, *J*_{4,5} = 2.5 Hz, H-4), 3.37 (s, 3 H, OCH₃), 1.24-1.10 (m, 18 H, ^tBu, (CH₃)₂C, OCH₃, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 136.4, 136.1, 133.7, 133.3, 130.0, 129.8, 127.8, 127.5, 108.5, 97.6, 97.0, 78.2, 76.0, 75.3, 69.8, 56.2, 27.9, 27.1, 27.0, 19.4, 16.7; HRMS (ESI) *m/z*: found [M+Na]⁺ 509.2330, C₂₇H₃₈O₆Si calcd for [M+Na]⁺ 509.2330.



6-Deoxy-1,2-*O*-isopropylidene-4-*O*-methoxymethyl- α -L-galactopyranose (**43**)

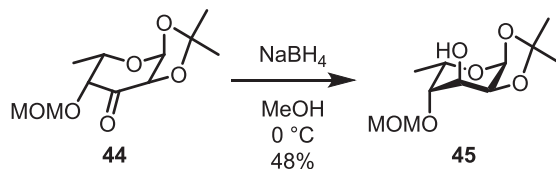
アルゴン雰囲気下、化合物 **42** (2.0 g, 4.1 mmol) を THF (21 mL) に溶解させ、TBAF (1.0 M in THF, 8.2 mL, 8.2 mmol) を室温で加え 8 時間攪拌した。反応終了を TLC (EtOAc/Toluene = 1/1) で確認後、希釈 (EtOAc)、洗浄 (蒸留水、飽和食塩水)、乾燥 (無水硫酸ナトリウム)、溶媒除去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/Toluene = 1/1) で精製し化合物 **43** (1.0 g, 80%) を無色粘性液体として得た。 $[\alpha]_D -57.1^\circ$ (c 0.5, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.56 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 4.5 Hz, H-1), 4.84-4.63 (2 d, 2 H, OCH₂), 4.18 (m, 1 H, H-5), 4.04 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 6.5 Hz, H-2), 3.88-3.85 (m, 1 H, H-3) 3.66 (t, 1 H, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 2.5 Hz, H-4), 3.58 (d, 1 H, *J*_{3,OH} = 6.5 Hz, OH), 3.47 (s, 3 H, OCH₃), 1.54 (1 s, 3 H, (CH₃)₂C), 1.39 (1 s, 3 H, (CH₃)₂C), 1.30 (d, 3 H, *J*_{5,6} = 6.5 Hz, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 108.5, 98.4, 97.4, 79.3, 71.0, 68.6, 56.3,

28.1, 27.0, 16.4; HRMS (ESI) m/z : found $[M+Na]^+$ 271.1152, $C_{11}H_{20}O_6$ calcd for $[M+Na]^+$ 271.1152.



6-Deoxy-1,2-*O*-isopropylidene-4-*O*-methoxymethyl- α -L-xylo-hexopyrano-3-ulose (**44**)

アルゴン雰囲気下、化合物 **43** (840 mg, 3.39 mmol)を CH_2Cl_2 (42.0 mL)に溶解させ $NaHCO_3$ (1.63 g, 20.3 mmol)および Dess-Martin periodinane (2.20 mg, 5.08 mmol)を $0^\circ C$ で加え、室温で 12 時間攪拌した。反応終了を TLC (EtOAc/Toluene = 1/8)で確認後、 Et_2O で希釈し、飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加え反応を停止させた。水層を Et_2O で抽出した後、洗浄 (飽和食塩水)、乾燥 (無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/Toluene = 1/20)で精製し化合物 **44** (728 mg, 87%)を無色粘性液体として得た。 $[\alpha]_D + 38.7^\circ$ (c 1.0, $CHCl_3$); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 5.75 (d, 1 H, $J_{1,2} = 4.5$ Hz, H-1), 4.79-4.69 (2 d, 2 H, OCH_2), 4.60 (m, 1 H, H-5), 4.47 (d, 1 H, H-2), 4.24 (d, 1 H, $J_{4,5} = 6.5$ Hz, H-4), 3.43 (s, 3 H, OCH_3), 1.58 (1 s, 3 H, $(CH_3)_2C$), 1.40 (1 s, 3 H, $(CH_3)_2C$), 1.34 (d, 3 H, $J_{5,6} = 6.5$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 202.7, 111.3, 99.9, 96.8, 79.3, 77.4, 70.5, 56.3, 26.7, 26.4, 15.4; HRMS (ESI) m/z : found $[M+Na]^+$ 269.0995, $C_{11}H_{18}O_6$ calcd for $[M+Na]^+$ 269.0996.



6-Deoxy-1,2-*O*-isopropylidene-4-*O*-methoxymethyl- α -L-gulopyranose (**45**)

アルゴン雰囲気下、化合物 **44** (1.00 g, 4.06 mmol)を MeOH (40.6 mL)に溶解後、 $NaBH_4$ (169 mg, 4.47 mmol)を $0^\circ C$ で加え、5 分間攪拌した。反応終了を TLC ($Et_2O/CHCl_3 = 1/20$)で確認後、

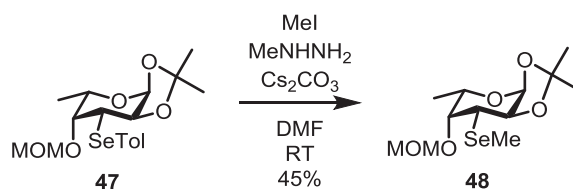
飽和塩化アンモニウム水溶液を加え反応を停止させた。反応溶液を希釈(EtOAc)、洗浄 (蒸留水、飽和食塩水)、乾燥 (無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Et₂O/CHCl₃ = 1/20) で精製し化合物 **45** (485 mg, 48%)を白色固体として得た。[α]_D-20.3 ° (c 1.0, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.50 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 5.0 Hz, H-1), 4.80-4.65 (2 d, 2 H, OCH₂), 4.46 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 3.0 Hz, H-2), 4.31 (m, 1 H, H-5), 4.13 (bs, 1 H, OH) 3.79 (dd, 1 H, *J*_{3,4} = 6.5 Hz, H-3), 3.56 (t, 1 H, *J*_{4,5} = 6.0 Hz, H-4), 3.47 (s, 3 H, OCH₃), 1.57 (1 s, 6 H, (CH₃)₂C), 1.38 (1 s, 6 H, (CH₃)₂C), 1.22 (d, 3 H, *J*_{5,6} = 6.5 Hz, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 110.0, 98.4, 97.7, 83.1, 74.6, 71.2, 66.6, 56.0, 26.1, 25.3, 15.1; HRMS (ESI) *m/z*: found [M+Na]⁺ 271.1153, C₁₁H₂₀O₆ calcd for [M+Na]⁺ 271.1152.



3,6-Dideoxy-1,2-*O*-isopropylidene-4-*O*-methoxymethyl-3-(4-methylbenzoylseleno)- α -L-galactopyranose (**47**)

アルゴン雰囲気化、化合物 **45** (75.0 mg, 302 μ mol) の CH₂Cl₂ (1.50 mL)溶液に、pyridine (260 μ L, 1.03 mmol)および trifluoromethanesulfonic anhydride (92.0 μ L, 1.03 mmol)を-20 °C で加え 150 分間室温で攪拌した。反応終了を TLC (EtOAc/*n*-Hexane = 1/4)で確認後、希釈(CH₂Cl₂)、洗浄(2M-塩酸、蒸留水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水)、乾燥(無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去後、真空ラインで 3 時間乾燥した。得られたトリフレート体を脱気した DMF (500 μ L)に溶解させ、potassium 4-methylselenobenzoate **29** (215 mg, 906 μ mol)を加え、室温で 3 時間攪拌した。反応終了を TLC (EtOAc/Toluene = 1/10)で確認後、希釈(EtOAc)、洗浄 (2M-塩酸、蒸留水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水)、乾燥(無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去を行った。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/toluene = 1/50) で精製し化合物 **47** (97.0 mg, 75%)を黄色粘性液体として得た。[α]_D -10.0 ° (c 0.5,

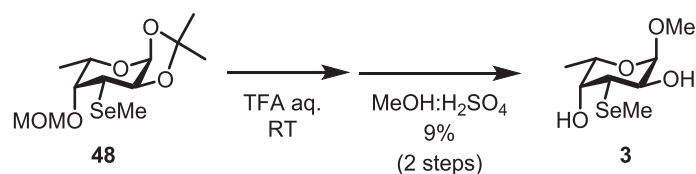
CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.82-7.24 (2 d, 4 H, Ar), 5.56 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 4.5 Hz, H-1), 4.75-4.61 (2 d, 2 H, OCH₂), 4.42-4.33 (m, 3 H, H-2, H-4, H-5), 4.08 (t, 1 H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} = 4.0 Hz, H-3), 3.40 (s, 3 H, OCH₃), 2.40 (s, 3 H, ArCH₃), 1.56 (1 s, 3 H, (CH₃)₂C), 1.35 (1 s, 3 H, (CH₃)₂C), 1.29 (d, 3 H, *J*_{5,6} = 6.5 Hz, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 193.7, 145.0, 136.2, 129.6, 127.5, 108.8, 97.8, 97.3, 74.5, 74.4, 67.7, 56.5, 44.1, 27.2, 26.5, 21.9, 16.6; ⁷⁷Se NMR (94 MHz, CDCl₃) δ 539.5; HRMS (ESI) *m/z*: found [M+Na]⁺ 453.0787, C₁₉H₂₆O₆Se calcd for [M+Na]⁺ 453.0787.



3,6-Dideoxy-1,2-*O*-isopropylidene-4-*O*-methoxymethyl-3-methylseleno- α -L-galactopyranose

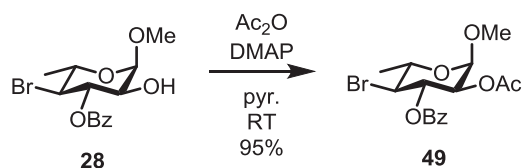
(48)

アルゴン雰囲気下、化合物 **47** (200 mg, 470 μ mol)を脱気した DMF (3.2 mL)に溶解させ、Cs₂CO₃ (300 mg, 930 μ mol)、*N*-methylhydrazine (32 mg, 700 μ mol)そして methyl iodide (58 μ L, 930 μ mol)を室温で加え 2 時間攪拌した。反応終了を TLC (EtOAc/*n*-Hexane = 1/4)で確認後、希釈(EtOAc)、洗浄(飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水)、乾燥(無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去を行った。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/*n*-Hexane = 1/6)で精製し化合物 **48** (67 mg, 45%)を黄色粘性液体として得た。[α]_D -10.3 ° (c 1.0, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.53 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 4.5 Hz, H-1), 4.86-4.67 (2 d, 2 H, OCH₂), 4.36 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 7.0 Hz, H-2), 4.18 (m, 1 H, H-5), 3.88 (t, 1 H, *J*_{3,4} = 3.5 Hz, H-4), 3.44 (s, 3 H, OCH₃), 3.12 (dd, 1 H, H-3), 2.15 (s, 3 H, SeCH₃), 1.53 (1 s, 3 H, (CH₃)₂C), 1.38 (1 s, 3 H, (CH₃)₂C), 1.28 (d, 3 H, *J*_{5,6} = 6.5 Hz, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 108.2, 97.9, 92.3, 76.5, 76.0, 69.2, 56.6, 43.8, 28.0, 26.8, 16.9, 5.4; ⁷⁷Se NMR (94 MHz, CDCl₃) δ 138.7; HRMS (ESI) *m/z*: found [M+Na]⁺ 349.0525, C₁₂H₂₂O₅Se calcd for [M+Na]⁺ 349.0525.



Methyl 3,6-dideoxy-3-methylseleno- α -L-galactopyranoside (3)

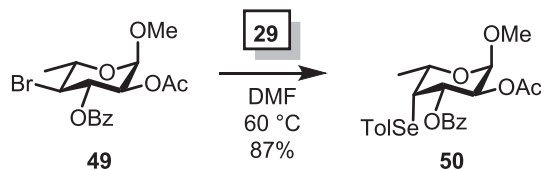
化合物 **48** (30 mg, 90 μ mol) を H₂O (2.8 mL) に懸濁させ、室温で Trifluoroacetic acid (11 mL) を加え 19.5 時間攪拌した。反応終了を TLC (MeOH/CHCl₃ = 1/10) で確認後、triethylamine を加えて反応を停止させトルエン共沸を行った。真空ポンプにて 24 時間乾燥させた後、アルゴン雰囲気下、得られた残渣を MeOH (550 μ L) に溶解させ、95% sulfonic acid (16 μ L) を室温で加え 5 時間攪拌した。反応終了を TLC (MeOH/CHCl₃ = 1/100) で確認後、1M 水酸化ナトリウム水溶液を加え中和しトルエン共沸を行った。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (MeOH/CHCl₃ = 1/300) で精製し化合物 **3** (3.2 mg, 9%) を白色固体として得た。
 $[\alpha]_D^{25} -32.5^\circ$ (c 0.1, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4.77 (d, 1 H, $J_{1,2} = 4.0$ Hz, H-1), 3.97 (m, 1 H, H-5), 3.85 (m, 1 H, H-2), 3.76 (s, 1 H, H-4), 3.46 (s, 3 H, OCH₃), 3.24 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 11.5$ Hz, $J_{3,4} = 2.5$ Hz, H-3), 2.42-2.14 (2 d, 2 H, OH), 2.07 (s, 3 H, SeCH₃), 1.31 (d, 3 H, $J_{5,6} = 6.5$ Hz, H-6); ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 99.1, 71.0, 67.7, 66.2, 55.3, 48.6, 16.7, 3.3; ⁷⁷Se NMR (94 MHz, CDCl₃) δ HRMS (ESI) m/z : found [M+Na]⁺ 279.0106, C₈H₁₆O₄Se calcd for [M+Na]⁺ 279.0106.



Methyl 2-O-acetyl-3-O-benzoyl-4-bromo-4,6-dideoxy- α -L-galactopyranoside (49)

アルゴン雰囲気下、化合物 **28** (490 mg, 1.40 mmol) を pyridine-THF (4.80 mL, 1:1) に溶解させ、室温にて 4-DMAP (1.20 mg, 10.0 μ mol) および Ac₂O (286 μ L, 2.84 mmol) を加え 3 時間攪拌した。反応終了を TLC (EtOAc/*n*-Hexane = 1/5) で確認後、0 $^\circ$ C でメタノールを加え反応を停止させた。トルエン共沸後、残渣を EtOAc で希釈し、洗浄 (2M-塩酸、蒸留水、飽和炭酸水素

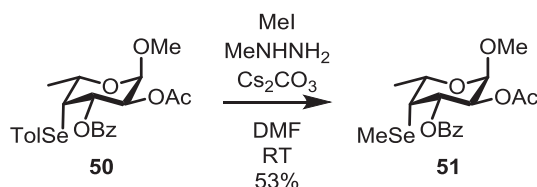
ナトリウム水溶液、飽和食塩水)、乾燥 (無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/Toluene = 1/5)で精製し化合物 **49** (523 mg, 95%)を黄色粘性液体として得た。[α]_D -53.4 ° (c 2.2, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CHCl₃) δ 7.82-7.24 (m, 5 H, Ar), 5.83 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, $J_{3,4} = 10.5$ Hz, H-3), 5.00 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-2), 4.95 (d, 1 H, H-1), 4.13 (m, 1 H, H-5), 3.76 (t, 1 H, $J_{4,5} = 10.5$ Hz, H-4), 3.45 (s, 3 H, OCH₃), 1.96 (s, 3 H, Ac), 1.46 (d, 3 H, $J_{5,6} = 6.5$ Hz, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 170.3, 165.2, 133.3, 129.8, 129.4, 128.4, 97.0, 72.0, 72.0, 55.4, 52.7, 20.7, 19.1; ⁷⁷Se NMR (94 MHz, CDCl₃) δ 464.1; HRMS (ESI) m/z : found [M+Na]⁺ 367.0152, C₁₄H₁₇BrO₅ calcd for [M+Na]⁺ 367.0152.



Methyl 2-*O*-acetyl-3-*O*-benzoyl-4,6-dideoxy-4-(4-methylbenzoylseleno)- α -L-galactopyranoside (50**)**

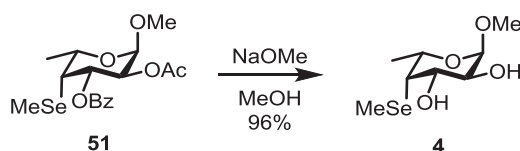
アルゴン雰囲気下、化合物 **49** (60 mg, 0.16 mmol)を脱気した DMF (1.6 mL) に溶解させ室温で potassium *p*-methylselenobenzoate **29** (110 mg, 470 μ mol)を加えた。その後、60 °C で7時間攪拌した。反応終了を TLC (EtOAc/*n*-Hexane = 1/10)で確認後、トルエン共沸を行った。残渣を EtOAc で希釈し、洗浄(蒸留水、飽和食塩水)、乾燥(無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/*n*-Hexane = 1/10)で精製し化合物 **50** (58 mg, 87%)を黄色粘性液体として得た。[α]_D -92.3 ° (c 2.2, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CHCl₃) δ 7.95-7.21 (m, 9 H, Ar), 5.79 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 11.0$ Hz, $J_{3,4} = 4.5$ Hz, H-3), 5.11 (dd, 1 H, $J_{1,2} = 4.0$ Hz, H-2) 4.94 (d, 1 H, H-1), 4.53 (dd, 1 H, $J_{4,5} = 1.0$ Hz, H-4), 4.49 (m, 1 H, H-5), 3.43 (s, 3 H, OCH₃), 2.38 (s, 3 H, ArCH₃), 2.01 (s, 3 H, Ac), 1.33 (d, 3 H, $J_{5,6} = 6.5$ Hz, H-6); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 170.5, 165.3, 144.7, 136.1, 132.8, 129.7, 129.6, 129.3, 128.3, 128.2, 127.3,

97.5, 71.0, 69.4, 65.0, 55.4, 52.3, 21.7, 20.8, 19.2; ^{77}Se NMR (94 MHz, CDCl_3) δ 465.9; HRMS (ESI) m/z : found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 529.0737, $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_7\text{Se}$ calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 529.0736.



Methyl 3-*O*-benzoyl-4,6-dideoxy-4-methylseleno- α -L-galactopyranoside (**51**)

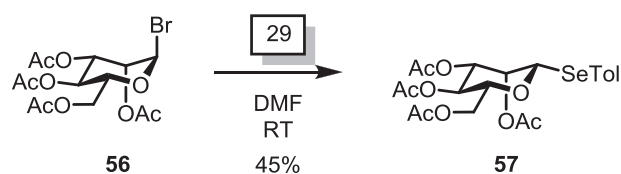
アルゴン雰囲気下、化合物 **50** (80.0 mg, 186 μmol)を脱気した DMF (3.70 mL)に溶解させ、 Cs_2CO_3 (121 mg, 372 μmol)、*N*-methylhydrazine (14.6 μL , 279 μmol)そして methyl iodide (23.3 μL , 372 μmol) を室温で加え 1 時間攪拌した。反応終了を TLC (EtOAc/Toluene = 1/1)で確認後、希釈(EtOAc)、洗浄 (飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水)、乾燥(無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去を行った。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/*n*-Hexane = 1/16) で精製し化合物 **51** (39.6 mg, 53%)を黄色粘性液体として得た。 $[\alpha]_{\text{D}}^{-56.7}$ (c 3.1, CHCl_3); 8.07-7.45 (m, 5 H, Ar), 5.54-5.46 (m, 2 H, H-2, H-3), 4.91 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3.5$ Hz, H-1), 4.27 (m, 1 H, H-5), 3.45 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 4.0$ Hz, $J_{4,5} = 2.0$ Hz, H-4), 3.40 (s, 3 H, OCH_3), 2.03 (s, 3 H, Ac), 1.89 (s, 3 H, SeCH_3) 1.26 (d, 3 H, $J_{5,6} = 6.5$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 170.4, 165.8, 133.4, 129.7, 129.5, 128.6, 97.5, 72.0, 69.9, 65.3, 55.3, 51.5, 20.9, 19.6, 6.0; ^{77}Se NMR (94 MHz, CDCl_3) δ 37.6; HRMS (ESI) m/z : found $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 425.0474, $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_6\text{Se}$ calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 425.0474.



Methyl 4,6-dideoxy-4-methylseleno- α -L-galactopyranoside (**4**)

化合物 **51** (17.6 mg, 40.0 μmol) を MeOH (200 μL)に溶解させ Sodium methoxide (28% in

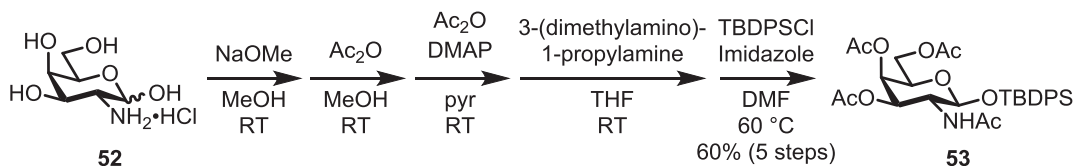
MeOH, 2.00 mg, 10.0 μmol)を加え、室温で 10 分間攪拌した。反応終了を TLC (EtOAc/*n*-Hexane = 1/1)で確認し、Muromac (H^+) を用いて中和した。固形物をろ過し、メタノールで洗浄後、濾液を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (MeOH/Toluene = 1/8)およびゲル濾過クロマトグラフィー Sephadex LH-20 ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH} = 1/4$) で精製し化合物 **4** (10.2 mg, 96%) を白色固体として得た。 $[\alpha]_{\text{D}} -47.2^\circ$ (c 1.1, CHCl_3); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 4.72 (d, 1 H, $J_{1,2} = 4.0$ Hz, H-1), 4.10 (m, 1 H, H-5), 3.81 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, H-2), 3.48 (dd 1 H, $J_{3,4} = 3.0$ Hz, H-3), 3.11 (dd, 1 H, $J_{4,5} = 1.5$ Hz, H-4), 2.07 (s, 3 H, SeCH_3), 1.26 (d, 3 H, $J_{5,6} = 6.5$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 99.4, 72.1, 71.1, 65.9, 57.8, 55.4, 19.6, 7.1; ^{77}Se NMR (94 MHz, CDCl_3) δ 3.7; HRMS (ESI) m/z : found $[\text{M}+\text{Na}]^+ 279.0106$, $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_4\text{Se}$ calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+ 279.0106$.



4-Methylbenzoyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-seleno- β -D-mannopyranoside (**57**)

アルゴン雰囲気下、化合物 **56** (4.3 g, 11 mmol)を DMF (17.5 mL)に溶解させ potassium *p*-methylselenobenzoate **29** (5.0 g, 21 mmol)を室温で加え 3 時間攪拌した。反応終了を TLC (EtOAc/Toluene = 1/5)で確認後、固形物をろ過し CH_2Cl_2 で洗浄した。ろ液をトルエン共沸後、残渣を EtOAc で希釈し洗浄 (2M-塩酸、蒸留水、飽和炭酸ナトリウム水溶液、飽和食塩水)、乾燥 (無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/ Toluene = 1/10)で精製し化合物 **36** (2.5 g, 45%)を白色泡状粉末として得た。 $[\alpha]_{\text{D}} 5.2^\circ$ (c 1.1, CHCl_3); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.73 (d, 2 H, Ar), 7.26 (d, 2 H, Ar), 5.75 (d, 1 H, $J_{1,2} = 1.5$ Hz, H-1), 5.64 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 4.0$ Hz, H-2), 5.32 (t, 1 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 10.0$ Hz, H-4), 5.22 (dd, 1 H, H-3), 4.30 (dd, 1 H, $J_{5,6} = 5.5$ Hz, $J_{\text{gem}} = 12.5$ Hz, H-6), 4.14 (dd, 1 H, $J_{5,6'} = 2.0$ Hz, H-6'), 2.14-1.99 (m, 15 H, ArCH_3 , 4 Ac); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 190.6, 170.8, 170.1, 170.0, 169.8, 145.7, 135.5, 129.8, 127.7, 78.9, 78.1, 72.0, 72.0, 65.6, 62.6, 21.9, 20.9, 20.8, 20.8, 20.7; ^{77}Se NMR

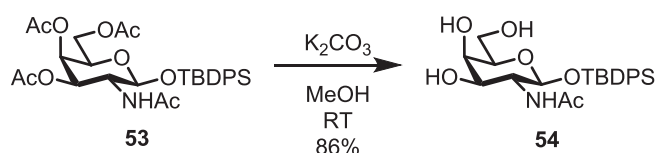
(94 MHz, CDCl₃) δ 636.5; HRMS (ESI) *m/z*: found [M+Na]⁺ 553.0583, C₂₂H₂₆O₁₀Se calcd for [M+Na]⁺ 553.0583.



tert-Butyldiphenylsilyl 2-acetamido-3,4,6-O-tri-acetyl-2-deoxy-β-D-galactopyranoside (**53**)

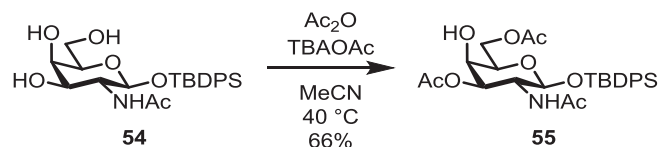
化合物 **52** (15 g, 69.6 mmol) を MeOH(232 mL) に懸濁後、Sodium methoxide (28% in MeOH, 14.8 g, 76.6 mmol) を加え、化合物 **52** が完全溶解し、NaCl が生じたのを視認した後、Ac₂O (7.7 mL, 76.6 mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応終了を TLC (NH₃ aq./MeOH/CHCl₃ = 1/4/5) で確認後、濃縮し、一晚真空乾燥を行った。得られたアセトアミド体を pyridine (232 mL) に溶解させたのち、Ac₂O (56.1 mL, 557 mmol) および 4-DMAP (85 mg, 0.7 mmol) を 0 °C で加え、室温で 13 時間攪拌した。反応終了を TLC (MeOH/CHCl₃ = 1/10) で確認後、固形物をセライトにて濾別し、MeOH で洗浄した。濃縮後、残渣を EtOAc で希釈し、洗浄(2M-塩酸、蒸留水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水)、乾燥 (無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去し、4 時間真空乾燥を行った。得られたテトラアセテート体を THF (304 mL) に溶解させ、3-(dimethylamino)-1-propylamine (21.6 mL, 304 mmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。反応終了を TLC (MeOH/CHCl₃ = 1/10) で確認後、CH₂Cl₂ で希釈し、洗浄(2M-塩酸、蒸留水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水)、乾燥 (無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去し、16 時間真空乾燥を行った。得られたヘミアセタール体を DMF 溶液(76.6 mL) に溶解させ、TBDPSCI (15.1 mL, 58.2 mmol)、imidazole (3.96 g, 58.2 mmol) を加えた。60 °C で 10 時間攪拌した。反応終了を TLC (MeOH/CHCl₃ = 1/10) で確認後、0 °C で MeOH を加え反応を停止させた。この溶液を EtOAc にて希釈し、洗浄(2M-塩酸、蒸留水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水)、乾燥 (無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (MeOH/CHCl₃ = 1/100) で精製し、化合物 **53** (24.3 g, 60%, 5 steps) を白色泡状粉

末として得た。[α]_D -3.1 ° (c 0.4, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.70-7.65 (m, 4 H, Ar), 7.47-7.35 (m, 6 H, Ar), 5.23 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ = 3.0 Hz, $J_{4,5}$ = 1.0 Hz, H-4), 5.05 (d, 1 H, $J_{2,NH}$ = 9.5 Hz, NH), 4.85 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ = 11.0 Hz, H-3), 4.53 (d, 1 H, $J_{1,2}$ = 8.0 Hz, H-1), 4.38-4.32 (m, 1 H, H-2), 4.03-4.02 (m, 2 H, H-6, H-6'), 3.62 (td, 1 H, $J_{5,6}$ = 3.0 Hz, $J_{5,6'}$ = 6.5 Hz, H-5), 2.16 (s, 3 H, Ac), 1.97 (s, 3 H, Ac), 1.95 (s, 3 H, Ac), 1.81 (s, 3 H, Ac), 1.08 (s, 9 H, ^tBu); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 170.8, 170.4, 170.4, 169.8, 136.0, 135.8, 132.9, 132.8, 130.0, 130.0, 127.5, 113.8, 96.6, 70.7, 70.6, 66.7, 61.6, 52.4, 26.7, 23.4, 20.8, 20.7, 20.6, 19.7, 19.1.; HRMS (ESI) m/z : found [M+Na]⁺ 608.2286, C₃₀H₃₉NO₉Si calcd for [M+Na]⁺ 608.2286.



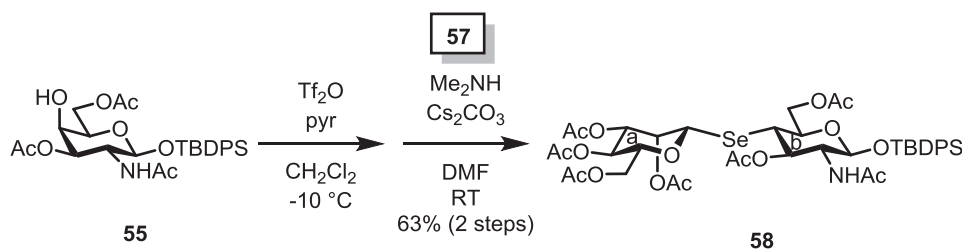
***tert*-Butyldiphenylsilyl 2-acetamido-2-deoxy- β -D-galactopyranoside (54)**

化合物 **53** (24.4 g, 41.6 mmol)を MeOH (139 mL)に溶解させ、K₂CO₃ (2.73 g, 20.8 mmol)を室温で加え、16 時間攪拌した。反応終了を TLC (MeOH/CHCl₃ = 1/10)で確認後、固形物をセライトにて濾別し CH₂Cl₂ で洗浄した。濾液を減圧濃縮後、得られた残渣を、シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (MeOH/CHCl₃ = 1/100 \rightarrow 1/10)を用いて精製した。化合物 **54** (16.4 g, 86%)を白色泡状結晶として得た。[α]_D -1.9 ° (c 0.8, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.68 (dd, 4 H, Ar), 7.45-7.34 (m, 6 H, Ar), 5.91 (d, 1 H, $J_{2,NH}$ = 7.0 Hz, NH), 5.30 (br s, 1 H, OH), 4.51 (d, 1 H, $J_{1,2}$ = 8.0 Hz, H-1), 3.93 (br q, 1 H, H-2), 3.83-3.63 (m, 4 H, H-4, H-6, H-6', OH), 3.62 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ = 10.5 Hz, $J_{3,4}$ = 3.0 Hz, H-3), 3.21 (br t, 1 H, $J_{5,6}$ = $J_{5,6'}$ = 6.0 Hz, H-5), 2.35 (br s, 1 H, OH), 1.87 (s, 3 H, Ac), 1.07 (s, 9 H, ^tBu); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 172.9, 136.1, 135.8, 133.2, 133.0, 130.3, 130.2, 128.0, 127.7, 96.2, 74.8, 72.8, 68.3, 61.9, 56.4, 26.9, 26.9, 23.4, 19.2; HRMS (ESI) m/z : found [M+Na]⁺ 482.1969, C₂₄H₃₃NO₆Si calcd for [M+Na]⁺ 482.1969.



***tert*-Butyldiphenylsilyl 2-acetamido-3,6-diacetyl-2-deoxy- β -D-galactopyranoside (55)**

アルゴン雰囲気下、化合物 **54** (1.83 g, 3.98 mmol)を MeCN (26.5 mL)に溶解させ、TBAOAc (720 mg, 2.39 mmol)、Ac₂O (842 μ L, 8.36 mmol)を室温に加え、40 °C で 16 時間攪拌した。反応終了を TLC (MeOH/CHCl₃ = 1/10)で確認後、MeOH を加え、同温度条件下で 1 時間攪拌し反応を停止させた。溶媒留去後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/ Toluene = 1/1) で精製し化合物 **55** (1.43 mg, 66%)を白色泡状粉末として得た。[α]_D -46.7 ° (c 0.7, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.66 (dd, 4 H, Ar), 7.47-7.35 (m, 6 H, Ar), 5.04 (d, 1 H, $J_{2,NH}$ = 9.5 Hz, NH), 4.80 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ = 11.0 Hz, $J_{3,4}$ = 3.0 Hz, H-3), 4.54 (d, 1 H, $J_{1,2}$ = 8.0 Hz, H-1), 4.35 (br q, 1 H, H-2), 4.23-4.16 (m, 2 H, H-6, H-6'), 3.87 (s, 1 H, H-4), 3.48 (br t, 1 H, $J_{5,6} = J_{5,6'}$ = 7.0 Hz, H-5), 2.08-1.82 (3 s, 9 H, 3 Ac), 1.07 (s, 9 H, ^tBu); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 171.0, 170.8, 170.0, 136.1, 135.9, 133.1, 133.0, 130.1, 130.0, 127.9, 127.8, 127.6, 96.6, 73.0, 72.2, 67.0, 62.7, 60.5, 53.5, 52.5, 26.8, 23.5, 21.0, 20.8, 19.2; HRMS (ESI) m/z : found [M+Na]⁺ 566.2181, C₂₈H₃₇NO₈Si calcd for [M+Na]⁺ 566.2181.

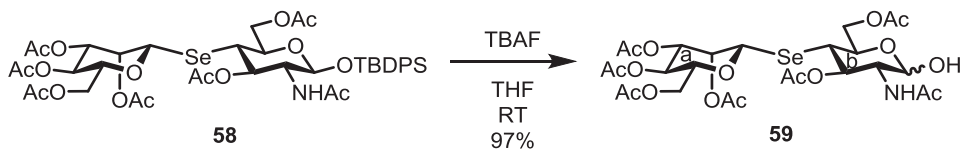


***tert*-Butyldiphenylsilyl**

[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-seleno- β -D-mannopyranosyl-(1-4)]-2-acetamido-3,6-diacetyl-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (58)

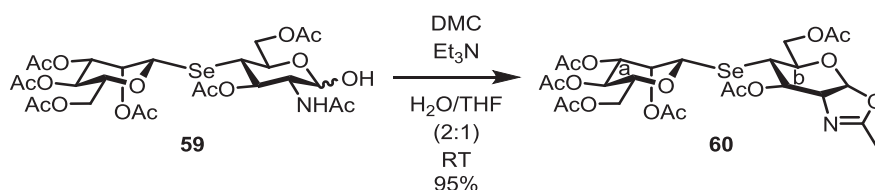
アルゴン雰囲気下、化合物 **55** (3.1 g, 5.7 mmol)の CH₂Cl₂ (114 mL)溶液に、pyridine (2.76 mL,

34.2 mmol)および trifluoromethanesulfonic anhydride 1.0 mL, 11.4 mmol)を-15 °C にて加え 150 分間攪拌した。反応終了を TLC (MeOH/CHCl₃ = 1/10)で確認後、希釈(CH₂Cl₂)、洗浄 (2M-塩酸、蒸留水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水)、乾燥 (無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去後、真空ラインにて 3 時間乾燥した。得られたトリフラート体を脱気した DMF (57 mL)に溶解させ、化合物 **57** (3.0 g, 5.66 mmol)、2 M Me₂NH in THF (3.14 mL, 6.27 mmol) そして Cs₂CO₃ (2.04 g, 6.27 mmol) の DMF (6.4 mL)懸濁液へ滴下にて加え、室温にて 24 時間攪拌した。反応終了を TLC (MeOH/CHCl₃ = 1/10, EtOAc/Hexane = 1/1)で確認後、CH₂Cl₂ で希釈し固形物を濾別した。ろ液をトルエン共沸後、残渣を EtOAc で希釈し、洗浄 (2M-塩酸、炭酸ナトリウム水溶液、飽和食塩水)、乾燥 (無水硫酸ナトリウム)、溶媒留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc/Hexane = 1/1)で精製し化合物 **43** (3.36 g, 63%) を白色泡状粉末として得た。[α]_D -61.0 ° (c 0.3, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.67 (dd, 4 H, Ar), 7.45-7.33 (m, 6 H, Ar), 5.62 (d, 1 H, J_{2,NH} = 9.5 Hz, NH), 5.38 (d, 1 H, J_{2,3} = 3.0 Hz, H-2^a), 5.18 (t, 1 H, J_{3,4} = J_{4,5} = 10.0 Hz, H-4^a), 5.10 (s, 1 H, H-1^a), 5.02 (dd, 1 H, J_{3,4} = 10.0 Hz, H-3^a), 4.94 (t, 1 H, J_{2,3} = J_{3,4} = 10.5 Hz, H-3^b), 4.55 (d, 1 H, J_{1,2} = 8.0 Hz, H-1^b), 4.49 (dd, 1 H, J_{5,6} = 1.5 Hz, J_{gem} = 11.5 Hz, H-6^b), 4.29 (dd, 1 H, J_{5,6'} = 5.5 Hz, H-6^{b'}), 4.16-4.07 (m, 2 H, H-2^b, H-6^a), 3.98 (dd, 1 H, J_{5,6'} = 3.0 Hz, J_{gem} = 12.5 Hz, H-6^{a'}), 3.59 (ddd, 1 H, H-5^a), 3.49 (ddd, 1 H, J_{4,5} = 11.0 Hz, H-5^b), 3.11 (t, 1 H, H-4^b), 2.18-1.86 (m, 21 H, 7 Ac), 1.05 (s, 9 H, ^tBu); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 171.3, 170.5, 170.4, 170.0, 169.8, 169.6, 162.5, 135.9, 135.7, 132.9, 132.7, 129.9, 129.9, 127.6, 127.4, 127.4, 95.8, 77.5, 74.6, 73.6, 71.6, 71.5, 71.1, 66.0, 64.4, 63.1, 57.2, 41.1, 36.4, 31.4, 26.7, 26.6, 23.2, 20.7, 20.6, 20.6, 20.6, 20.5, 19.0; ⁷⁷Se NMR (94 MHz, CDCl₃) δ 318.00; HRMS (ESI) *m/z*: found [M+Na]⁺ 960.2343, C₄₂H₅₅NO₁₆SeSi calcd for [M+Na]⁺ 960.2348.



[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-seleno-β-D-mannopyranosyl-(1-4)]-2-acetamido-3,6-diacetyl-2-deoxy-β-D-glucopyranose (59)

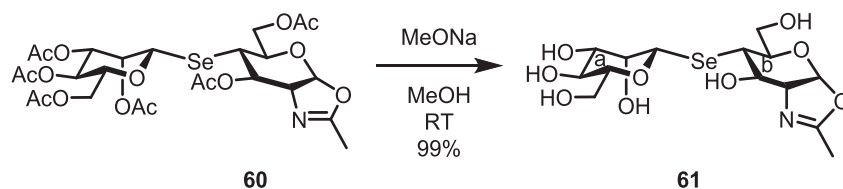
アルゴン雰囲気下、化合物 **58** (520 mg, 0.557 mmol) を THF (5.6 mL) に溶解させ、TBAF (1.0 M in THF, 1.67 mL, 1.67 mmol) を室温で加え 10 分間攪拌した。反応終了を TLC (MeOH/CHCl₃ = 1/10) で確認後、濃縮し得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (MeOH/CHCl₃ = 1/30→10/1) で精製し化合物 **59** (379 mg, 97%) を無色粘性液体として得た。α-isomer; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.87 (d, 1 H, *J*_{NH,2} = 10.0 Hz, NH), 5.43 (d, 1 H, *J*_{2,3} = 3.5 Hz, H-2^a), 5.34-5.29 (m, 2 H, H-1^b, H-3^b), 5.24 (t, 1 H, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} 10.0 Hz, H-4^a), 5.20 (s, 1 H, H-1^a), 5.10 (dd, 1 H, H-3^a), 4.52-4.51 (m, 2 H, H-6^b, H-6^{b'}), 4.36 (dt, 1 H, *J*_{4,5} = 11.5 Hz, *J*_{5,6} = *J*_{5,6'} = 3.0 Hz, H-5b), 4.27 (td, 1 H, *J*_{1,2} = 3.5 Hz, *J*_{2,3} = 10.0 Hz, H-2^b), 4.23-4.15 (m, 2 H, H-6^a, H-6^{a'}), 3.711 (ddd, 1 H, *J*_{4,5} = *J*_{5,6} = 10.0 Hz, *J*_{5,6'} = 3.5 Hz, H-5^a), 3.12 (t, 1 H, H-4^b), 2.21-2.01 (m, 21 H, 7 Ac); ⁷⁷Se NMR (94 MHz, CDCl₃) δ 328.9, 328.6; HRMS (ESI) *m/z*: found [M+Na]⁺ 722.1170, C₂₆H₃₇NO₁₆Se calcd for [M+Na]⁺ 722.1170.



2-Methyl-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-seleno-β-D-mannopyranosyl-(1-4)]-2-acetamido-3,6-diacetyl-2-deoxy-β-D-glucopyrano]-[2,1-*d*]-oxazoline (60)

化合物 **59** (300 mg, 0.43 mmol) を H₂O-THF (43 mL, 1:1) に溶解させ、0 °C にて Et₃N (2.70 mL, 19.3 mmol)、DMC (1.09 g, 6.44 mmol) を加え 50 分間攪拌した。反応終了を TLC (MeOH/CHCl₃

=1/10)で確認後、希釈(CH₂Cl₂)、洗浄 (飽和炭酸水素ナトリウム水溶液)、乾燥 (無水硫酸ナトリウム)、留去し得られた残渣をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー (MeOH/CHCl₃=1/800)、およびゲル濾過クロマトグラフィー Sephadex LH-20 (MeOH/CHCl₃=1/1) で精製し化合物 **60** (278 mg, 95%)を白色泡状粉末として得た。[α]_D-56.5 ° (c 0.3, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.98 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 7.5 Hz, H-1^b), 5.68 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 2.0 Hz, *J*_{3,4} = 3.5 Hz, H-3^b), 5.54 (dd, 1 H, *J*_{1,2} = 0.5 Hz, *J*_{2,3} = 3.5 Hz, H-2^a), 5.39 (d, 1 H, H-1^a), 5.25 (t, 1 H, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 10.0 Hz, H-4^a), 5.12 (dd, 1 H, H-3^a), 4.29-4.29 (m, 2 H, H-6^b, H-6^b), 4.23 (dd, 1 H, *J*_{5,6} = 6.0 Hz, *J*_{gem} = 12.5 Hz, H-6^a), 4.17-4.13 (m, 2 H, H-2^b, H-6^a), 3.79 (ddd, 1 H, *J*_{5,6} = 2.5 Hz, *J*_{5,6} = 5.5 Hz, H-5^a), 3.67 (dt, 1H, *J*_{4,5} = 10.0 Hz, H-5^b), 3.22 (br d, 1 H, H-4^a), 2.17-1.97 (m, 21 H, 7 CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 170.7, 170.2, 170.1, 169.8, 169.7, 167.3, 99.7, 72.9, 71.9, 71.3, 69.3, 65.9, 64.5, 64.4, 62.9, 36.6, 21.2, 20.9, 20.9, 20.8, 20.7, 20.7, 14.1; ⁷⁷Se NMR (94 MHz, CDCl₃) δ 409.1; HRMS (ESI) *m/z*: found [M+Na]⁺ 704.1064, C₂₆H₃₅NO₁₅Se calcd for [M+Na]⁺ 704.1064.



2-Methyl-[1-seleno-β-D-mannopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyrano]-[2,1-d]-oxazoline (**61**)

化合物 **60** (150 mg, 220 μmol)を 2 M NH₃ in EtOH (2.2 mL)に溶解させ室温にて 10 分間攪拌した。反応終了を TLC (NH₃ aq./MeOH/CHCl₃ = 1/4/5)で確認後、濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH₃ aq./MeOH/CHCl₃ = 0.1/2/10)による精製を行い化合物 **61** (93.7 mg, 99%)を白色個体として得た。[α]_D-17.9 ° (c 0.1, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 6.12 (d, 1 H, *J*_{1,2} = 7.5 Hz, H-1^b), 5.19 (s, 1 H, H-1^a), 4.64 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 2.0 Hz, *J*_{3,4} = 3.5 Hz, H-3^b), 4.20-4.18 (m, 1 H, H-2^b), 4.09 (d, 1 H, *J*_{2,3} = 3.5 Hz, H-2^a), 3.91-3.87 (m, 2 H, H-6^a, H-6^b), 3.72-3.61 (m, 4 H,

H-3^a, H-5^b, H-6^a, H-6^b), 3.57 (t, 1 H, $J_{3,4} = J_{4,5} = 10.0$ Hz, H-4^a), 3.37 (ddd, 1 H, $J_{5,6} = 2.0$ Hz, $J_{5,6} = 6.5$ Hz, H-5^a), 3.12 (d, 1 H, $J_{4,5} = 10.5$ Hz, H-4^b), 2.10 (s, 3 H, Ac); ¹³C NMR (125 MHz, D₂O) δ 168.7, 100.1, 81.5, 81.4, 73.7, 73.0, 72.6, 71.7, 66.7, 65.1, 62.4, 61.2, 38.4, 12.9; ⁷⁷Se NMR (94 MHz, D₂O) δ 400.9.; HRMS (ESI) m/z : found [M+Na]⁺ 452.0430, C₁₄H₂₃NO₉Se calcd for [M+Na]⁺ 452.0430.

共結晶化および X 線結晶構造解析

X 線結晶構造解析に使用した AOL は東京化成工業より購入した。セレン化フコースと AOL の共結晶化条件は結晶化ロボットを用いて検討した。AOL と化合物 **1 α** は、20 °C in 2% v/v PEG-400, 2.0 M ammonium sulfate, 0.1 M HEPES-Na (pH 7.5)、化合物 **1 β** は 20 °C in 1.0 M mono-ammonium dihydrogen phosphate, 0.1 M tri-sodium citrate dihydrate (pH 5.6)、化合物 **2** は 20 °C in 12% w/v PEG3350、1% w/v tryptone、0.05 M HEPES-Na (pH 7.0)の条件でそれぞれ最も良好な結晶を与えた。セレン原子の異常信号の検出に適した波長はデータ回収の前に確認した。SAD データは、0.9790 Å の波長で BL-1A beamline (高エネルギー加速器研究機構、筑波、日本)を用いて収集した。

表面プラズモン共鳴を用いた相互作用解析

全ての SPR 試験は Biacore T200 (GE Healthcare) を用いて行った。AOL のセンサーチップへの固定化は、CM5 センサーチップを EDC/NHS solution (1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide, *N*-hydroxysuccinimide)により活性化した後、AOL 溶液 2.4 μL {5 mg/mL AOL in 10 mM HBS-*N* buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 6.5)}を 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流速で流し行った。未反応の CM5 チップ上のカルボキシメチル基は 1 M ethanolamine を用いて不活化した。ブランクとして AOL を固定化していないチップを用いた。各フコース誘導体は、1.95, 3.91, 7.81, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000 μM の濃度で running buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4)に希釈し親和性を測定した。サンプルの注入は 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流速で 2 分間かけて行った。また、AOL からの解離は注入後 20 分間確認した。それぞれの結果は、フコース誘導体の AOL に対する解離定数として算出した。また、データの解析は Biacore T-200 evaluation software (GE Healthcare)を用いて行った。解離定数の算出に用いたセンサグラムを Fig. S1 に示す。

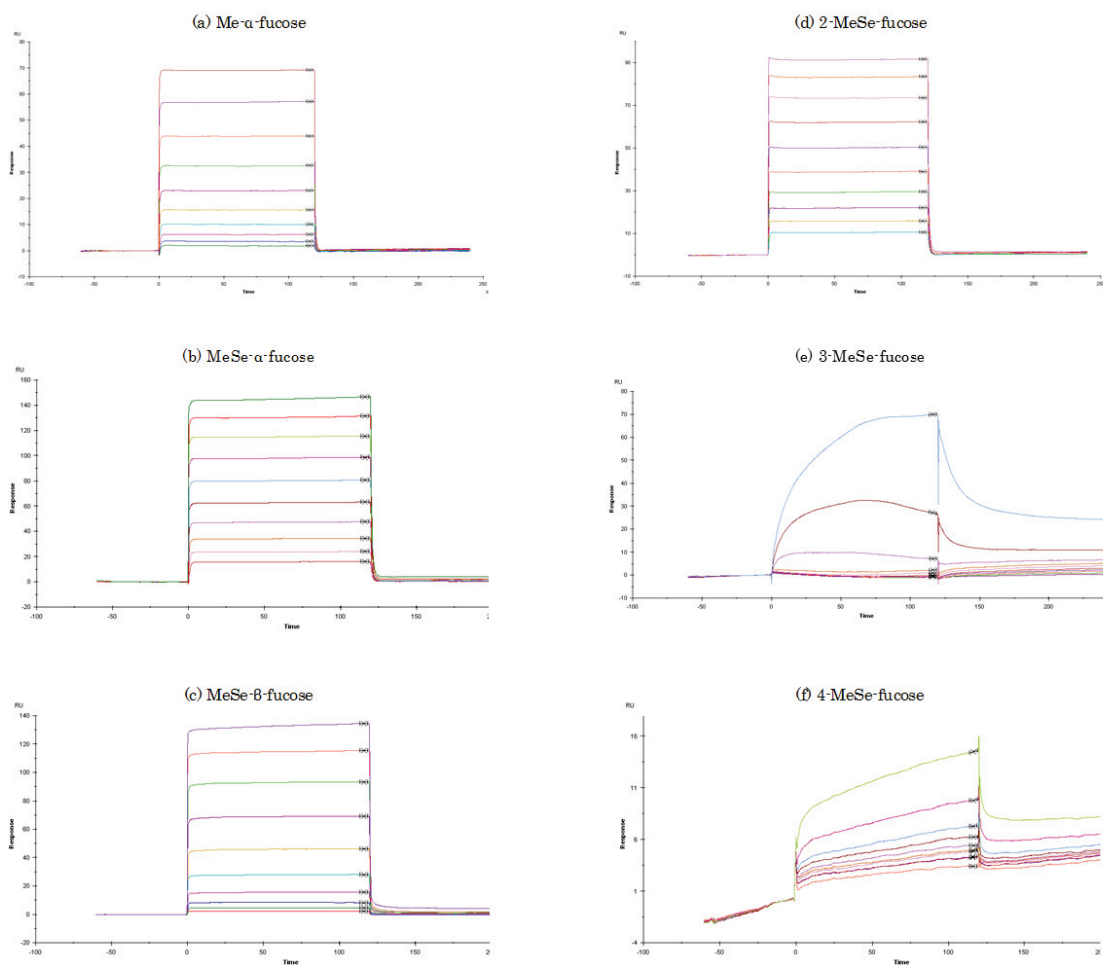


Fig. S1 The SPR sensorgrams for the protein-carbohydrate interactions between AOL and fucose derivatives.

謝辞

本研究に際し、研究の機会を与えてくださり、終始御懇篤な御指導、御助力を賜りました木曾真教授、石田秀治教授、安藤弘宗准教授、今村彰宏准教授に厚く御礼申し上げます。

共同研究者として、AOLのX線共結晶構造解析の実施からSPR試験のご指導、さらに、論文作成に至るまで、多大なるご助力を賜りました高エネルギー加速器研究機構の牧尾尚能博士、加藤龍一准教授、川崎政人准教授、西河洋祐博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を行う上で、研究者としての基礎をご指導していただいた鈴木達哉博士、委細にわたり様々な御助言を頂きました植木章晴博士、Rita Pal博士、玉井秀樹博士、河村奈緒子女史、小西美紅女史、Yadagiri Kommagalla博士、Chandrababunaidu Kona博士に感謝申し上げます。

日々、有意義な討論をおこない、愚鈍な私に刺激を与え研究室生活を充実したものにしてくださった八神なほ子女史、河合一憲氏、吉仲宏輝氏、武藤達朗氏、浅野拓哉氏を始めとする生理活性物質学研究室の先輩、同期、後輩の皆様方に心より感謝いたします。また、事務書類の作成を始め、多岐に渡りご協力いただきました伊藤清子女史に御礼申し上げます。

最後に、本研究生生活に御理解を頂き、常に応援していただいた親愛なる両親に対し感謝の意を表して謝辞と致します。