

学位論文

エンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性測定のための  
糖鎖分子プローブの合成研究

Synthetic studies on glycan-based molecular probes for  
measurement of endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase activity

群馬大学 大学院理工学府 物質・生命理工学領域

石井 希実

## 目次

本論文で用いた略号

序論

本論

第1章 エンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼに関する研究

第1節 はじめに

第2節 エンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼとは

第3節 ENGase 研究における課題と本研究の目的

第2章 合成糖鎖基質を用いた ENGase の糖鎖認識能の解析

第1節 はじめに

第2節 これまでの糖転移反応における基質特異性解析

第3節 ENGase の糖鎖認識能解析に用いる糖鎖基質の合成

第4節 合成糖鎖基質を用いた Endo-M の糖転移活性の解析

第5節 化学修飾した4糖プローブの糖転移反応

第6節 まとめ

第3章 蛍光修飾糖鎖を用いた糖転移活性検出系の構築

第1節 はじめに

第2節 糖転移反応を検出する糖鎖プローブの開発

第3節 まとめ

第4章 FRET クエンチングを利用した ENGase の加水分解活性検出系の構築

第1節 はじめに

第2節 ENGase 加水分解活性を検出する5糖プローブの合成

第3節 5糖プローブを用いた ENGase の加水分解活性の検出

第4節 Endo-H 活性検出プローブの合成

第5節 Endo-H による 7糖プローブの加水分解反応

第6節 まとめ

第5章 ENGase 阻害剤の探索に向けた検討

第1節 はじめに

第2節 ENGase 阻害剤探索に向けた酵素活性検出系の最適化

第3節 既知阻害剤を用いた ENGase の阻害反応

第4節 まとめ

結論

実験の部

第2章 合成糖鎖基質を用いた ENGase の糖鎖認識能の解析

第3章 蛍光修飾糖鎖を用いた糖転移活性検出系の構築

第4章 FRET クエンチングを利用した ENGase の加水分解活性検出系の構築

参考文献

研究業績

謝辞

## 本論文中で使われる略号

Ac	acetyl
ADC	antibody-drug conjugate
ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity
AgOTf	silver trifluoromethanesulfonate
Asn	asparagine
Bn	benzyl
CDMBI	2-chloro-1,3-dimethyl-1 <i>H</i> -benzimidazol-3-ium chloride
ClAc	chloroacetyl
COSY	correlation spectroscopy
CsOAc	cesium acetate
°C	degrees Celsius
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DMSO	dimethyl sulfoxide
Dnp	2,4-di-nitrophenyl
ENGase	endo- $\beta$ - <i>N</i> -acetylglucosaminidase
ER	endoplasmic reticulum
FAM	5-carboxyfluorescein
FRET	förster resonance energy transfer
Gal	D-galactose
GH family	glycoside hydrolase families
Glc	D-glucose
GlcNAc	<i>N</i> -acetylglucosamine
HATU	1-[Bis(dimethylamino)methyl]yl]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i> ]pyridine-3-oxide hexafluorophosphate
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HPLC	high performance liquid chromatography
HSQC	heteronuclear single quantum correlation
IC <sub>50</sub>	half maximal inhibitory concentration
KO	knockout
MALDI-TOF-MS	matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry
Man	D-mannose
MS	mass spectrometry
MS 4A	molecular sieves 4A

NIS	<i>N</i> -iodosuccinimide
Nma	<i>N</i> -methylantranyloyl
NMR	nuclear magnetic resonance
oxa	oxazoline
Ph	phenyl
Phth	phthaloyl
Piv	pivaloyl
PNGase	peptide: <i>N</i> -glycanase
<i>p</i> NP	<i>p</i> -nitrophenyl
r.t.	room temperature
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<i>t</i> -BuOH	<i>tert</i> -butyl alcohol
Tal	D-talose
TAMRA	5-carboxytetramethylrhodamine
TBAI	tetrabutylammonium iodide
TBDMS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
Tf	trifluoromethanesulfonyl
THF	tetrahydrofuran
TLC	thin layer chromatograph
UV	ultraviolet
Vis	visible
WT	wild type

## 序論

糖鎖はタンパク質や脂質に結合した複合糖質の形で存在する。分泌タンパク質の大部分は糖鎖修飾を受けた糖タンパク質である。タンパク質上の糖鎖の役割は、タンパク質の熱安定性や可溶性、プロテアーゼ耐性といった物理的性質を付与するものと考えられていた。しかし、タンパク質上の糖鎖が細胞-細胞間相互作用におけるシグナル伝達やウイルス感染、がん転移、タンパク質の生理活性制御など、様々な生物学的機能を持つことが明らかとなり、核酸、タンパク質につぐ、第3の生命鎖として注目されている。

タンパク質上の糖鎖の構造は、アスパラギン残基に結合したアスパラギン結合型 (*N*-型) 糖鎖とセリン/スレオニン残基に結合した *O*-結合型 (*O*-型) 糖鎖に大別される。タンパク質上の糖鎖の生合成は様々な糖転移酵素が協同して行う。そのため、遺伝子によって制御されるタンパク質のような均一性はなく、タンパク質上の同じアスパラギン残基に結合する *N*-型糖鎖であっても構造のマイクロ不均一性 (microheterogeneity) が生じる。この糖鎖構造の不均一性は糖鎖の持つ生物機能の解明を困難にするばかりか、近年ではタンパク質性バイオ医薬品の糖鎖不均一性 (バイオシミラー) が、医薬品としての品質管理上の問題となっている。さらにハーセプチンに代表される抗体医薬品では、Fc 領域に結合した2本のアスパラギン結合型糖鎖の糖鎖構造によって抗体医薬としての薬効が大きく変化することが明らかとなり、糖鎖構造と活性、また副作用の可能性から糖鎖構造の制御が急務となっている。

近年、タンパク質上の糖鎖を制御する方法として、エンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase : ENGase) を利用した糖鎖リモデリング法が注目されている。すなわち、ENGase は糖タンパク質上の糖鎖を切断する糖加水分解酵素であるが、それに加えて *N*-アセチルグルコサミン残基上に糖鎖を付加する糖転移活性を有する。さらにタンパク質工学的手法により ENGase の糖転移活性のみを増強したグライコシターゼが開発されたことで、ENGase の糖加水分解活性により糖タンパク質上の不要な糖鎖を除去

した後、グライコシターゼ化された ENGase の糖転移反応で任意の構造の糖鎖をタンパク質上に導入する技術が確立された。現在、この糖鎖リモデリング技術によりタンパク質性医薬品の糖鎖構造均一化に向けた ENGase の糖鎖工学的利用研究がなされている。一方、ENGase の生物機能は不明であったが、近年、*NGLY1* 欠損症という希少疾患との関連が明らかとなり、工学的側面に加えて創薬研究においても注目されている。

このような背景のもと、上述した糖鎖工学的研究に適した新規 ENGase の生物試料からの探索や、高機能化 ENGase (グライコシターゼ) の開発、ENGase 阻害剤の探索研究が進められている。しかし、効率的な ENGase 活性測定系がないことが、これら研究のボトルネックとなっている。そこで著者は、ENGase 研究のさらなる発展のために、合成化学的アプローチにより ENGase の糖転移活性や糖加水分解活性を簡便に解析するための分子プローブの合成をすることとした。

# 本論

## 第1章 エンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼに関する研究

### 第1節 はじめに

エンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase) は糖加水分解酵素であるが、糖転移活性を有することから、糖鎖が結合した化合物の合成や糖タンパク質糖鎖の構造を均一化する糖鎖リモデリング研究において、有用なツールとして利用されている[1-2]。本章では、ENGase に関するこれまでの研究と ENGase を工学的に利用した応用研究、ENGase の生物機能について概説したのちに、ENGase 研究の課題を踏まえて本研究の目的について述べる。

### 第2節 エンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼとは

#### エンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ発見の歴史

エンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase) は、糖タンパク質上の *N*-型糖鎖に作用し、タンパク質上に GlcNAc 残基を 1 つ残して糖鎖を遊離するエンド型の糖加水分解酵素である。最初の ENGase は、村松らによって 1971 年にマウスのミエローマの  $\gamma$ -グロブリンから糖鎖を遊離する活性を持つ酵素として肺炎双球菌 *Diplococcus pneumoniae* (現 *Streptococcus pneumoniae*) 培養液中から発見され、後に Endo-D と名付けられた[3,4]。1972 年には、Tarentino らにより放線菌 *Streptomyces plicatus* より Endo-H が発見された[5]。ENGase は CAZy (Carbohydrate-Active enzymes) データベース[6]においてアミノ酸配列相同性に基づいて分類される糖質加水分解酵素 (Glycoside hydrolase: GH) ファミリーの 18 と 85 に分類されている。GH ファミリー-18 に分類される ENGase は、細菌と真菌類由来の酵素が含まれており、*Flavobacterium meningosepticum* 由来の Endo-F1、



F2、 F3[7]、 *Streptococcus pyogenes* 由来の Endo-S[8]などが発見されている。GH ファミリー-85 に分類される ENGase は細菌や真菌類、昆虫、植物、動物など広く分布しており、Endo-D[4]をはじめ、糸状菌 *Mucor hiemalis* 由来の Endo-M[9]、グラム陽性細菌 *Arthrobacter protophormiae* 由来の Endo-A[10]、*Homo sapiens* の細胞質の由来の human ENGase[11]、酵母 *Ogataea minuta* 由来の Endo-Om[12]、担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来の Endo-CC[13]など多くの ENGase が発見されている。

### ENGase の基質特異性解析

ENGase は先に述べたように様々な生物種から見出されている。ENGase は *N*-型糖鎖の還元末端の 2 糖構造（キトビオース）を加水分解するが、生物種の由来によって非還元末端部分の糖鎖構造に対する基質特異性が異なる。タンパク質上の *N*-型糖鎖は非還元末端部分の構造上の特徴から高マンノース型、混成型、複合型の 3 種類に分類される。代表的な *N*-型糖鎖の構造を Figure 1-1A に示す。由来の異なる ENGase の基質特異性について、大まかな傾向を Figure 1-1B にまとめた。高マンノース型糖鎖を切断する ENGase としては、Endo-H、Endo-F1、Endo-A、Endo-M、Endo-S、Endo-Om、Endo-CC などがある[14]Endo-H、Endo-F1、Endo-A、Endo-M、Endo-Om は高マンノース型糖鎖に加え、混成型も切断する。複合型糖鎖を切断する酵素としては Endo-F2、Endo-F3、Endo-M、Endo-S、Endo-Om、Endo-CC などがある。これらの ENGase は由来によって切断する糖鎖構造に傾向があり、切断効率に差があるものの、タンパク質上に結合しているほとんどの糖鎖を切断するためのツールはそろいつつある。その一方で、タンパク質上の糖鎖には多様性があり、例えば分岐鎖の長さや 2 本鎖、3 本鎖、4 本鎖といった分岐の数や、結合する糖残基数が異なるため、現在利用できる ENGase により全ての糖鎖構造を切断できるわけではない。また、還元末端部分にあるコアフコース残基や糖鎖分岐部分のバイセクティング GlcNAc 残基など、抗体医

薬品において活性との関係が示されている糖鎖を切断する ENGase も限られているため新しい基質特異性を有する新規 ENGase の発見が望まれている (Figure 1-1B)。

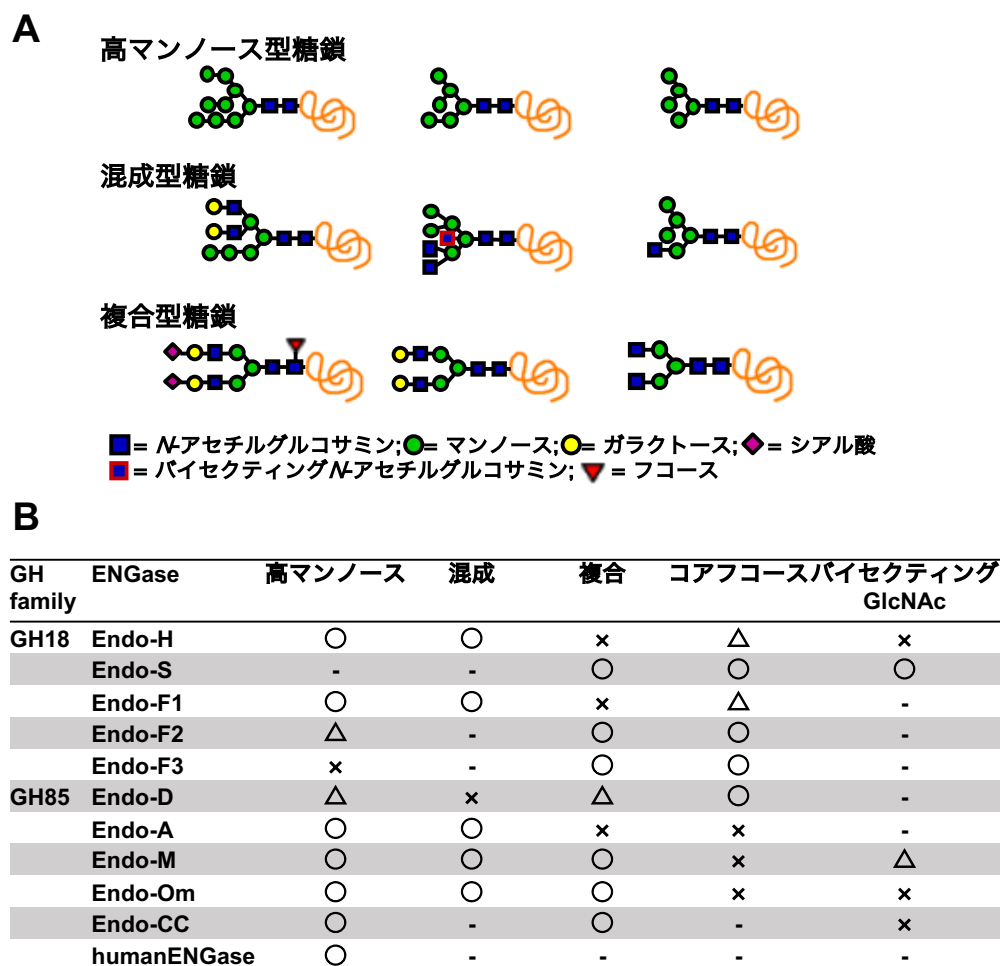


Figure 1-1. ENGase の基質特異性 (A) 代表的な *N*-型糖鎖の構造; (B) 種々の ENGase の基質特異性の違い

ENGase の基質特異性は、還元末端部分をピリジルアミノ基 (PA) や同位体元素、蛍光基などでラベル化した糖鎖を用いて、ENGase により加水分解されるかを HPLC で確認する方法や糖タンパク質を ENGase で処理した後に、切り出された糖鎖の構造を解析し、基質とした糖鎖構造を特定することで調べられている[15-17]。しかし、全ての酵素を同一条件で解析した例はなく、これまでに知られている基質特異性にも曖昧さが残っている。

## ENGase の触媒機構

ENGase の糖加水分解反応の触媒機構は、通常の糖加水分解酵素とは異なる基質補助型機構 (substrate-assisted mechanism) であることが報告されている[18]。通常の糖加水分解酵素の触媒機構は、反応前後の基質と生成物のアノマー位の立体配置から、アノマー反転型 (inverted-glycosidase mechanism) とアノマー保持型 (retaining-glycosidase mechanism) の2種類に分けられる。

アノマー反転型の触媒機構を Figure 1-2A に示す[19]。アノマー反転型機構では2つのカルボン酸が一般塩基触媒と一般酸触媒として働く。一般酸触媒は基質のグリコシド酸素にプロトンを供与し、グリコシド結合の正電荷を増加させ、脱離を促す。一方で、一般塩基触媒がアノマー炭素を求核攻撃する水分子を活性化する。この水分子はグリコシド結合とは反対側から求核攻撃するため、生成物のアノマーの立体配置は反転する。アノマー保持型の触媒機構では2つのカルボン酸が求核触媒と酸塩基触媒として働く。この機構はグリコシル化段階と脱グリコシル化段階の二重置換機構で進行する。グリコシル化段階では酸塩基触媒が一般酸触媒として働くことにより、グリコシド結合にプロトンを転移し、脱離を促す。これと同時に求核触媒はアノマー炭素を背面から攻撃し、基質-酵素中間体を形成する。この中間体は酸塩基触媒の一般塩基触媒としての働きにより活性化された水分子の背面攻撃によって分解されることで生成物となる。2回の背面攻撃を受けることにより、生成物のアノマー型は基質に対して保持される (Figure 1-2B)。

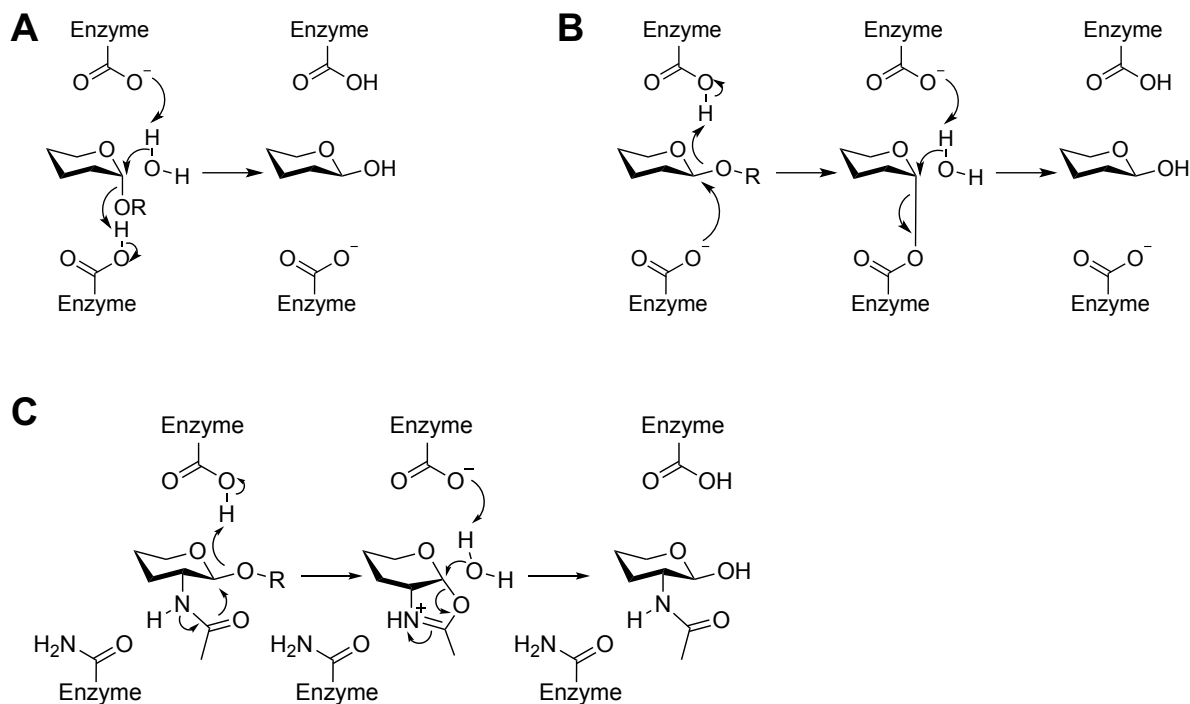


Figure 1-2. 糖加水分解酵素の触媒メカニズム

(A) アノマー反転型; (B) アノマー保持型; (C) 基質補助型

上述した2つの機構に対して、ENGaseはFigure 1-3Cに示した基質補助型の触媒機構をとる。すなわち、基質上の2位のアセトアミド基が求核基として働き、活性化された1位炭素原子を分子内攻撃し、オキサゾリニウムイオン中間体を形成する。その後、酸性アミノ酸 (Asp/Glu) が酸塩基触媒として働き、活性化された水が攻撃することにより加水分解反応が進行する。ENGaseが基質補助型機構であることは、オキサゾリニウムイオン中間体アナログであるチアゾリン誘導体と Endo-A の X 線立体構造解析の結果からも支持されている [20]。Endo-A においては E173 残基が酸塩基触媒として働き、N171 残基がオキサゾリニウムイオン中間体形成に関わるアミノ酸として同定されている。一方、正田らは ENGase の触媒機構が基質補助型であるか調べるためにオキサゾリニウムイオン中間体の構造を模倣した糖オキサゾリン誘導体を合成し、ENGaseによりオキサゾリン環が加水分解されるか確

認した[18]。その結果、予想した通りオキサゾリン環がENGaseによって加水分解され、糖アノメリック位がヘミアセタールへと変換されたことから、この触媒機構が化学合成プローブでも明らかにされた。

## ENGase の糖転移活性

多くの ENGase は糖鎖を遊離する加水分解活性とともに、その糖鎖を GlcNAc 残基を有する化合物に転移する糖転移活性を有している。糖転移反応は、ENGase によってグリコシド結合が切断される際、水分子ではなく、他の糖残基中の水酸基により攻撃されることで新たなグリコシド結合が形成される反応である (Figure 1-3)。

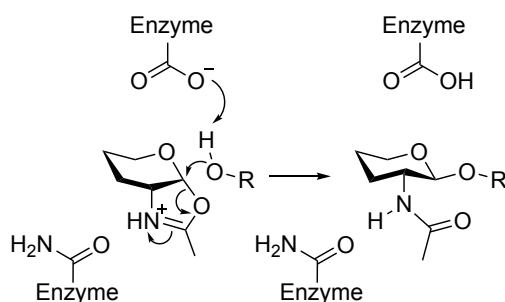


Figure 1-3. ENGase の糖転移反応におけるメカニズム

ENGase の糖転移活性は、Trimble らによって 1986 年に初めて報告された[21]。糖鎖に Endo-F を作用させた際、糖鎖が遊離するとともに、Endo-F の安定化剤として混在していたグリセロールに対して糖鎖が付加することを見出した。その後、竹川らにより 1991 年に Endo-A において、高マンノース型糖鎖が GlcNAc 残基に転移付加することが見出された[22]。とりわけ GH85 の ENGase で高い糖転移活性を示すことが見出されており、糖タンパク質や糖ペプチドの合成に応用されてきた[23-29]。しかし、ENGase の糖転移反応は、ENGase が加水分解酵素であるがゆえに、生成物が加水分解されてしまうため、転移収率が

低くなるという問題があった。効率よく糖転移生成物を得るためには、糖転移反応の効率化とともに、糖加水分解反応を抑える必要がある。これらの問題を解決するために糖加水分解活性を抑え、糖転移活性を高めたグライコシターゼの開発が行われた。

### 触媒部位への変異導入による改変型 ENGase (グライコシターゼ) の開発

前述したように、ENGase の糖転移反応は競合する加水分解反応のために、糖転移生成物の生成量は少ない。生成した糖転移生成物も酵素の基質となるため、加水分解され、反応の終点を見誤ると、糖転移生成物の収率はさらに減少する。糖転移生成物を高収率で得るためには、この糖加水分解活性を抑える必要がある。この考えのもと、酵素の触媒部位のアミノ酸残基に変異を導入することにより、加水分解活性を抑え、糖転移活性を向上させたグライコシターゼの作製が行われている。先に述べたように Endo-A の N171 残基が基質のオキサゾリニウムイオン中間体の形成に関わるアミノ酸であることが報告されている[20]。また、GH85 のホモログにおいては、触媒残基であるグルタミン酸の 2 残基 N-末端側にアスパラギン残基が保存されている。これらの知見をもとに *Mucor hiemalis* 由来の Endo-M のシターゼ化が行われた。Endo-M の立体構造情報は得られていなかったが、Endo-A の立体構造から、Endo-M においては 175 番目のアスパラギン残基がオキサゾリニウムイオン中間体の形成に関わっていると推定された。そこで、175 番目のアスパラギン残基を種々のアミノ酸残基に置き換えた変異型酵素が作製され、糖転移活性と糖加水分解活性の比較が行われた[30,31]。その結果、種々の変異型酵素のうち、175 番目のアスパラギン残基をグルタミン残基に変えた N175Q 変異型酵素は高い糖転移活性を示すことが示された。また、変異体酵素は遷移状態アナログである糖オキサゾリン誘導体を基質として用いることで GlcNAc-peptide に対して糖転移反応が進行することが示された。この時、糖転移生成物はほとんど加水分解されず、高収率で生成物を与えた。N175Q 変異体の加水分解活性は野生型の Endo-

Mの糖加水分解活性を100%とした時に比べて0.64%に低下していた[31]。同様に Endo-A においても171番目のアスパラギンをアラニンに変えた変異体酵素が作られた。この Endo-A-N171A 変異体も Endo-M 変異体と同様に、糖加水分解活性を示さず、高マンノース型糖鎖を効率的に転移した[32]。これらの知見をもとに、Endo-D[33]、Endo-S[34]、Endo-F3[35]、Endo-CC[13]などの ENGase においても高い糖転移能を持つグライコシターゼが作製されている。さらに近年では、触媒残基への変異導入に加え、糖鎖認識に関わるアミノ酸残基を置換することで、基質特異性を変化させる試みも行われており、ENGase の遺伝子改変による高機能化研究はますます発展している[36]。

### ENGase を利用した糖タンパク質糖鎖の改変

タンパク質上に付加した糖鎖の構造が糖タンパク質の活性に影響する例として、抗体医薬がある[37]。抗体上の定常領域 (Fc 領域) には2本の複合型糖鎖が付加しているが、Figure 1-4A に示した様にその糖鎖構造は非還元末端のシアル酸やバイセクティング GlcNAc、コアフコースの有無によって多様性を示す。近年、糖鎖構造によって抗体医薬としての活性が異なることが示された。すなわち、コアフコースを持つ抗体は、コアフコースを持たない抗体に比べて、抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性が 1/100 ~ 1/1000 と低い (Figure 1-4B) [37]。そのため、ENGase を利用して抗体上の糖鎖を活性型に変換する糖鎖リモデリング研究が盛んに行われている[38-44]。

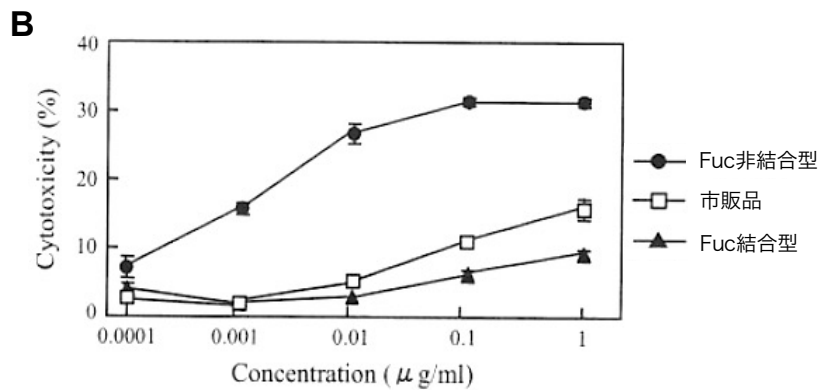
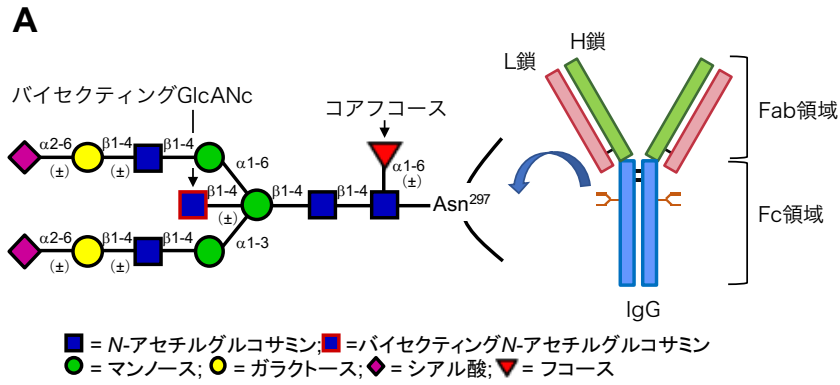


Figure 1-4. 抗体上の糖鎖構造が抗体の薬効に与える影響 (A) 抗体の Fc 領域に結合する糖鎖の構造多様性; (B) フコース有無抗体の ADCC 活性の違い (文献[35]より改変)

糖鎖リモデリングは、Figure 1-5 に示すようにまず抗体に結合している不均一構造の糖鎖を加水分解反応により切断し、GlcNAc 残基が 1 つ結合した抗体を調製する。その後、別途用意した任意の構造の糖供与体をグリコシターゼによる糖転移反応により GlcNAc 残基に付加することで、糖鎖のすげ替えを行う手法である。

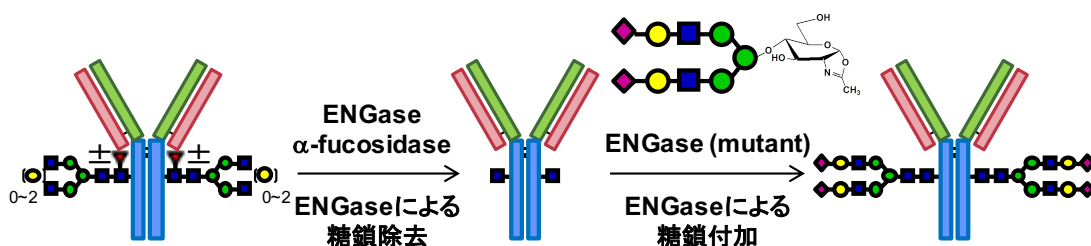


Figure 1-5. 抗体上の糖鎖リモデリング技術



David らは Endo-S を用いると IgG 抗体 Fc 領域の糖鎖が効率よく切断され、任意の糖鎖を糖転移反応により導入できることを報告した[45]。Wang らは Endo-S およびその変異体、フコースを切断するフコシダーゼを用いて IgG 抗体 Fc 領域の糖鎖をコアフコースを持つ低活性型の糖鎖構造からフコースを持たない高活性型の糖鎖構造へと変換した (Figure 1-6) [46]。また、IgG 抗体の Fc 領域に天然の糖タンパク質糖鎖にはない非天然型の分岐構造を持つ糖鎖を導入することで、抗体の Fc $\alpha$ IIIa 受容体との親和性が向上するといった糖鎖リモデリングも報告されている[47]。この様に ENGase の糖転移活性の応用利用、特に医薬品開発に向けた利用法が確立されつつある。

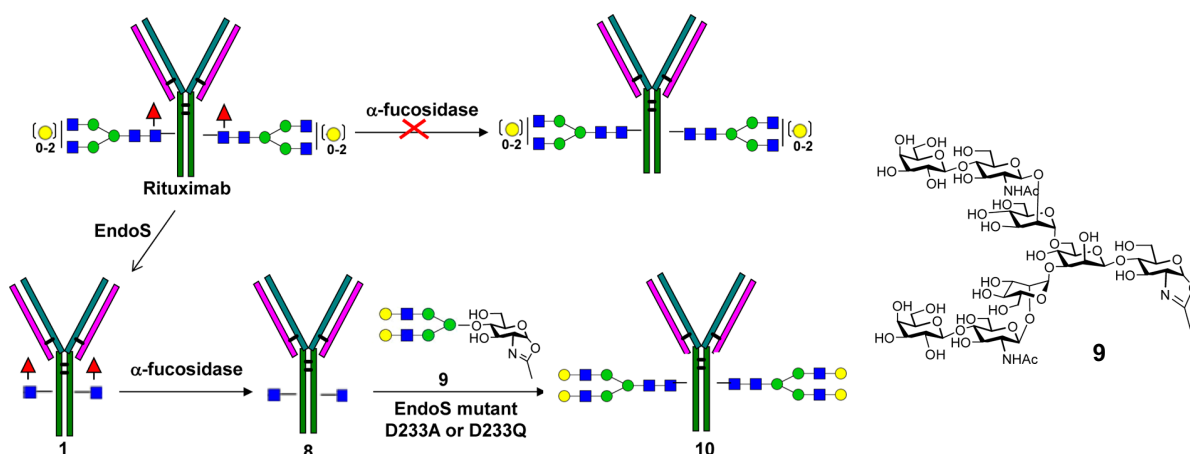


Figure 1-6. 抗体上の糖鎖リモデリング技術 (文献[46]より改変)

## ENGase の生物機能と *NGLY1* 疾患

ENGase は様々な生物種で見出されているが、その生物機能の詳細は明らかになっていない。微生物由来の ENGase においては、他の糖質関連酵素と協同して外部の糖タンパク質上の糖鎖を切断し、炭素源として取り込むことが予想されている。植物や線虫においては ENGase の遺伝子を破壊しても明確な表現型が確認されていないことからその機能は曖

味なままであった[48,49]。しかし近年、細胞内の ENGase の役割が明らかになりつつある。糸状菌由来の ENGase は細胞内の糖代謝経路に関与している可能性が示唆された[50]。また、鈴木らにより哺乳動物の細胞質 ENGase が糖代謝経路に関与していることが報告された (Figure 1-7) [51-53]。すなわち、不要糖タンパク質上の糖鎖が細胞でどの様に代謝されていくか、その経路は長い間不明であったが、ENGase がその代謝に関わっていることがわかった。

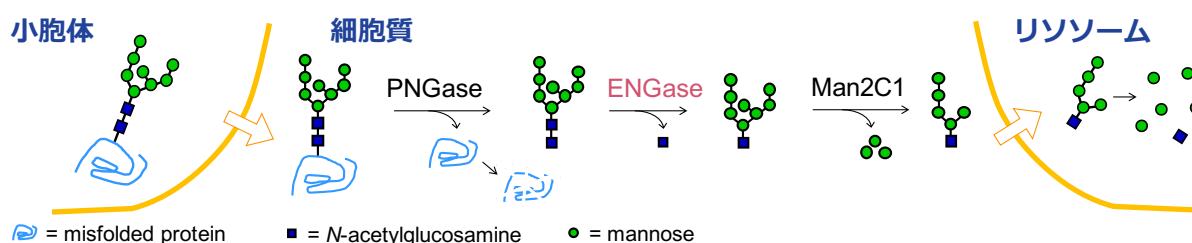


Figure 1-7. 不要糖タンパク質糖鎖の代謝経路

近年、希少遺伝子疾患である *NGLY1* 欠損症の発症に細胞質 ENGase が関与していることが報告された[54]。*NGLY1* 欠損症は 2012 年に初めて発見され、2017 年現在、世界で 50 人程度の患者が報告されている[55-59]。主な症状は、成長の遅れ、発育不全、運動障害、四肢の筋力低下、てんかん、無涙症などであり、未だ有効な治療法は見つかっていない。2015 年に鈴木らは *NGLY1* 欠損症の病理メカニズムを提唱した (Figure 1-8) [60,61]。*NGLY1* 遺伝子は糖代謝経路において ENGase の上流で作用する酵素であるペプチド:*N*-グリカナーゼ (PNGase) をコードする遺伝子である。PNGase は糖タンパク質分解経路において最初にタンパク質から糖鎖を切り出す酵素であるが、PNGase が存在しない細胞では、ENGase が直に糖タンパク質に作用してしまい、1 残基の GlcNAc が結合した GlcNAc-タンパク質を産生してしまう。この GlcNAc-タンパク質が細胞内に蓄積することで細胞に悪影響を及ぼすことが示された[61]。また、2017 年にマウスを用いたモデル実験において、C57BL/6

系統マウスの *Ngly1* 遺伝子を欠損させた *Ngly1*KO マウスは、胚性致死になるのに対して、*Ngly1* 遺伝子に加え、*Engase* 遺伝子を欠損させた *Ngly1/Engase* のダブル KO マウスの致死性は部分的に回避されることが示された[62]。以上の結果は、ENGase 活性を抑制することが、*NGLY1* 欠損症の症状を抑えることに繋がる可能性を示している。そのため、ENGase 阻害剤が *NGLY1* 欠損症の治療薬候補として考えられており、一刻も早い阻害剤の探索が求められている。

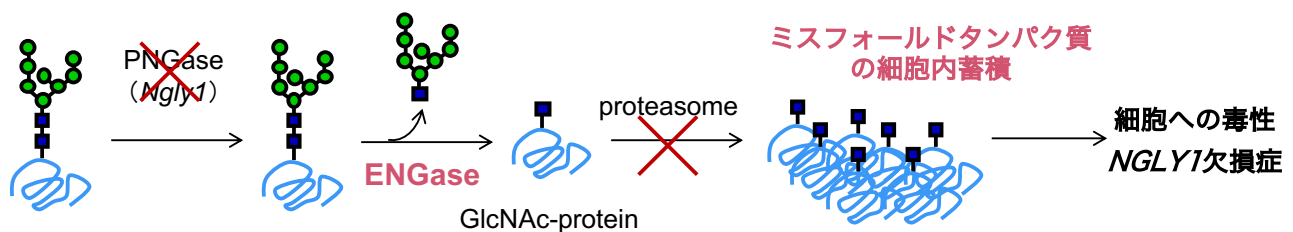


Figure 1-8. *NGLY1*欠損症の発症メカニズム

### 第3節 ENGase 研究における課題と本研究の目的

ENGase は糖加水分解活性を利用することで、糖鎖の検出、機能、構造解析など、糖鎖研究のツールとして利用されている。一方、ENGase の高い糖転移活性を利用した糖ペプチド・糖タンパク質合成など糖鎖工学的な応用研究も進められている。特にバイオ医薬品の創薬研究においては、抗体糖鎖のリモデリング、抗がん剤により化学修飾した非天然型糖鎖によるタンパク質修飾など、糖タンパク質の高機能化研究への応用が期待されている。しかし、ENGase の糖転移反応においては、糖鎖構造に対応した基質特異性を示す ENGase を選択する必要があり、糖転移反応に利用できる ENGase の種類は限られている。これまでも新規 ENGase の探索研究は積極的に行われているが、ENGase の糖加水分解活性の簡便な評価系がないために目覚ましい進歩はない。糖転移率を高めた改変型酵素の作製も進められているが、多くのアミノ酸変異体の中から、高い糖転移活性を有する ENGase 変異酵素を効率的

に選別するための簡便なアッセイ系はなく、有用なグライコシターゼの取得には多くの時間が必要である。さらに、近年報告された *NGLY1* 欠損症の治療薬となる ENGase 阻害剤の探索においても簡便な ENGase の加水分解活性検出法が求められている。

そこで本研究では、糖鎖合成技術を基盤として蛍光標識糖鎖分子プローブを利用した ENGase の糖転移活性検出系の確立および、簡便な糖加水分解活性検出系の確立を目的とした。第 1 章では、ENGase に関するこれまでの研究について記述した。第 2 章では ENGase 活性を高感度に検出するための蛍光標識糖鎖分子プローブを開発するために、ENGase の基質特異性について検討した。構造が異なる糖鎖を化学合成し、糖転移活性を指標に解析した結果より、酵素からの認識に関与していないと考えられる部位を特定した。この非認識部位に化学修飾した糖鎖を合成し、化学修飾糖鎖を用いて ENGase による糖転移反応を行った結果および考察について述べた。第 3 章では、糖転移反応の効率的な検出法の開発を目的に、蛍光標識化した糖鎖基質を利用して糖転移反応を追跡した結果および考察について述べた。第 4 章では、糖加水分解反応を効率的に検出するアッセイ系を構築するために、ENGase によって加水分解されると蛍光を発する 5 糖および 7 糖分子プローブの合成と得られた分子プローブを用いて ENGase の糖加水分解活性を検出した結果および考察について述べた。第 5 章では、*NGLY1* 欠損症治療薬の探索を志向して ENGase 阻害剤をスクリーニングするためのアッセイ系を検討した結果および考察について述べた。

## 第2章 合成糖鎖基質を用いた ENGase の糖鎖認識能の解析

### 第1節 はじめに

ENGase はエンド型の糖加水分解酵素であるが、高い糖転移活性を有することから糖ペプチドや糖タンパク質合成の有用なツールとして利用されている。近年では天然型の糖鎖を修飾した糖ペプチドや糖タンパク質の合成に限らず、非天然型糖鎖や化学修飾した糖鎖を利用した糖転移反応にも利用されつつある。しかし、糖転移反応における ENGase の基質特異性が詳細に解析されていないため、糖転移反応の基質として利用できる糖鎖構造に関する情報が少ない。また、高い糖転移活性を持つ ENGase が限られていることから、新規 ENGase 探索研究も積極的に行われているが、ENGase 活性の簡便な評価系がないために進んでいない。本章では、ENGase の糖鎖基質に対する認識について合成糖鎖を用いて糖転移活性を指標に解析した。さらに、ENGase 活性評価系の構築に向けて、糖鎖基質上の修飾可能な部位についての知見を得ることとした。

### 第2節 これまでの糖転移反応における基質特異性解析

糖転移反応の基質特異性について系統的な解析をおこなった例は Wang らと Fairbanks らによる野生型の Endo-M および Endo-A を用いた解析に限られている。Wang らは、*N*-型糖鎖のコア 2~4 糖基質を合成し、GlcNAc-ペプチドに対して野生型の Endo-A 酵素を作用させ、その糖転移収率を比較している (Figure 2-1) [63]。2~4 糖構造では、糖残基の数が多いほど、糖転移率が高くなることを見出した。また、2 糖において  $\beta$ -マンノシド残基を  $\beta$ -グルコースや  $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、 $\beta$ -ガラクトースに置換され

た基質は糖転移されなかったが、 $\beta$ -マンノシド残基の6位にベンジル基を有する2糖誘導体は転移することを報告した。

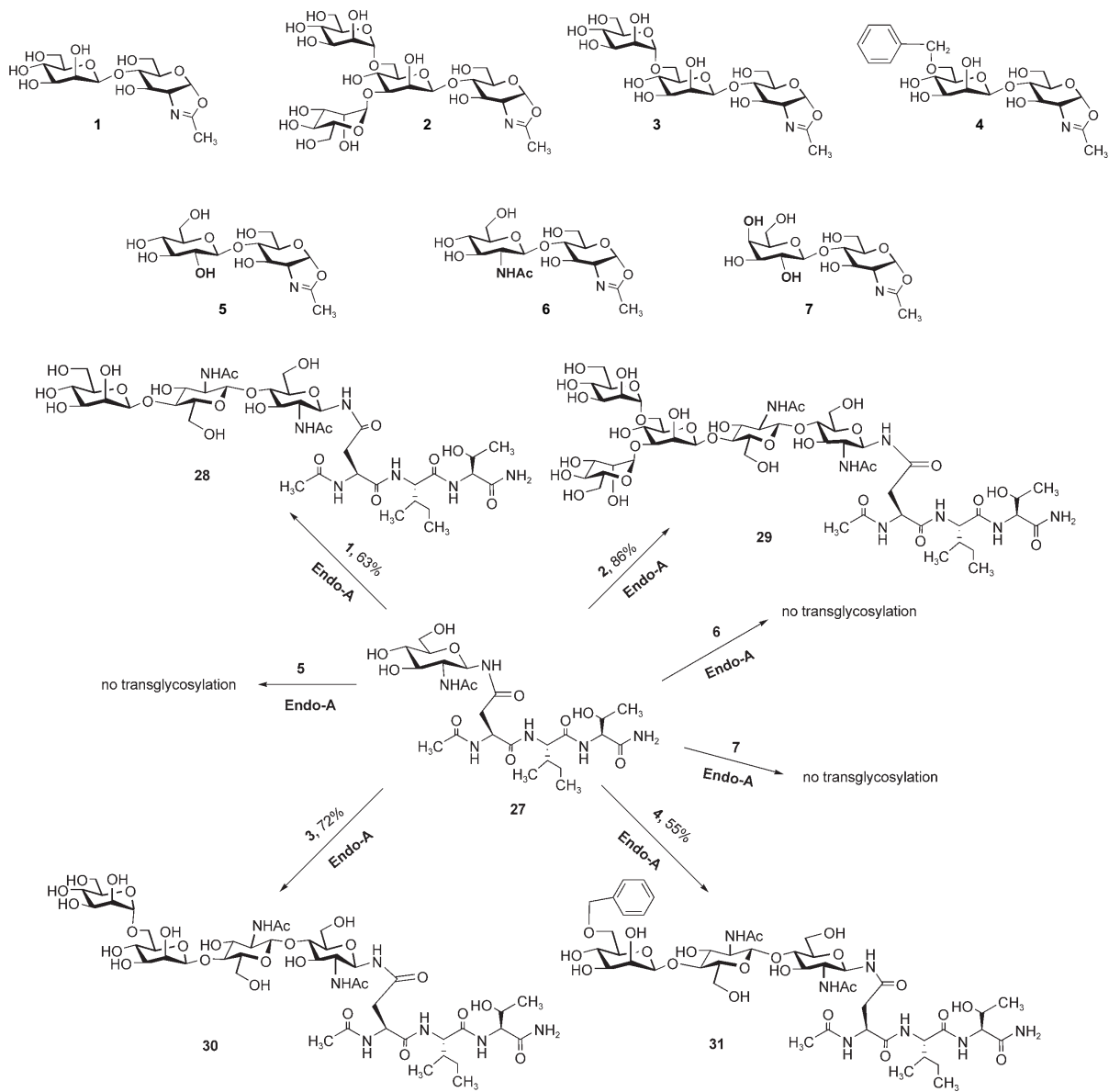


Figure 2-1. Wang らによる Endo-A の基質特異性解析 (文献[63]より改変)

一方、Fairbanks らは分岐部分の  $\beta$ -マンノシド残基がグルコースに置換された化合物を系統的に合成し、Endo-M と Endo-A の糖転移反応を行った (Table 2-1) [64,65]。

Table 2-1. Fairbanks らによる Endo-M と Endo-A の基質特異性解析 (文献[65]より改変)

Entry	Oxazoline donor	Product	Max. yield [%]	
			Endo-M	Endo-A
1			95 →	100 ↘
2			65 ↘	96 ↘
3			89 ↘	76 ↘
4			36 ↘	88 ↘
5			24 ↘	-
6			4 →	48 →
7			88 →	57 →
8			4 →	38 →
9			70 →	67 ↘
10			60 →	-

Yields determined by integration of acceptor and product peaks. → Yield stays constant, ↘ yield decreases after reaching the maximum stated by product hydrolysis.



その結果、 $\beta$ -マンノシド残基がグルコースに置換した糖鎖基質も Endo-M と Endo-A によって転移することを見出した。さらに  $\beta$ -マンノシド型では、反応時間を長くすると糖転移生成物が徐々に加水分解されて減少するが、 $\beta$ -グルコース型では糖転移生成物が加水分解されないという違いがあることを明らかにした。しかしながら、変異型酵素について解析した例はない。

### 第3節 ENGase の糖鎖認識能解析に用いる糖鎖基質の合成

#### 水酸基の配向が異なる糖鎖基質の合成戦略

著者は Wang らと Fairbanks らの結果と Endo-A の立体構造情報をもとに、糖鎖分岐部分に相当する  $\beta$ -マンノース残基の C-2 位は酵素に認識されており、一方 C-4 位部分は ENGase の認識が低いのではないかと考えた。Endo-A は 4 糖チアゾリンとの共結晶情報がある唯一の ENGase である。Protein data bank に登録された Endo-A の立体構造情報より分岐部分  $\beta$ -マンノース残基近傍のアミノ酸残基を抽出し、Figure 2-2 に示した。 $\beta$ -マンノース残基の C-2 位水酸基は Endo-A のグルタミン酸 (E272) とチロシン (Y299) と水素結合を形成できる距離にあることから、Endo-A との結合に関わっていることが予想される。一方、C-4 位の周辺には空間があるため Endo-A との結合には関わっていないことが推察される。

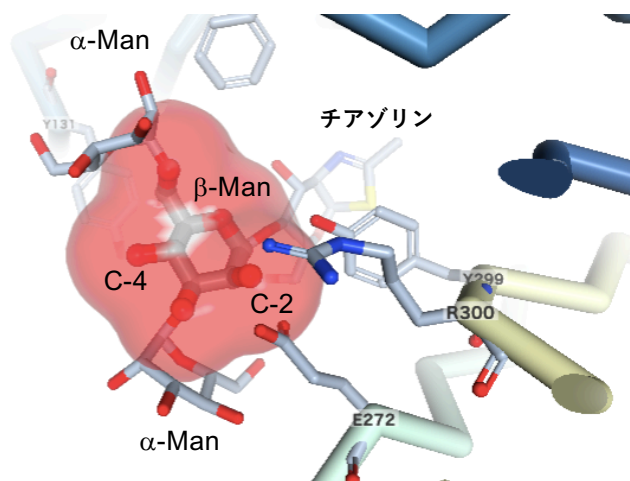


Figure 2-2. Endo-A と 4 糖チアゾリンの立体構造 (Protein data bank 3FHQ より)



この仮説を検証するために4糖構造の2位および4位水酸基の配向が異なる異性体について4種類全てを合成し、糖転移活性を比較することとした (Figure 2-3)。実験に用いるENGaseとしては、野生型酵素に加え変異型酵素についても解析し、触媒部位へのアミノ酸変異の導入と水酸基の認識に関する知見を得ることで、糖鎖糖残基上で最も化学修飾に適した部位を特定することを目的とした。

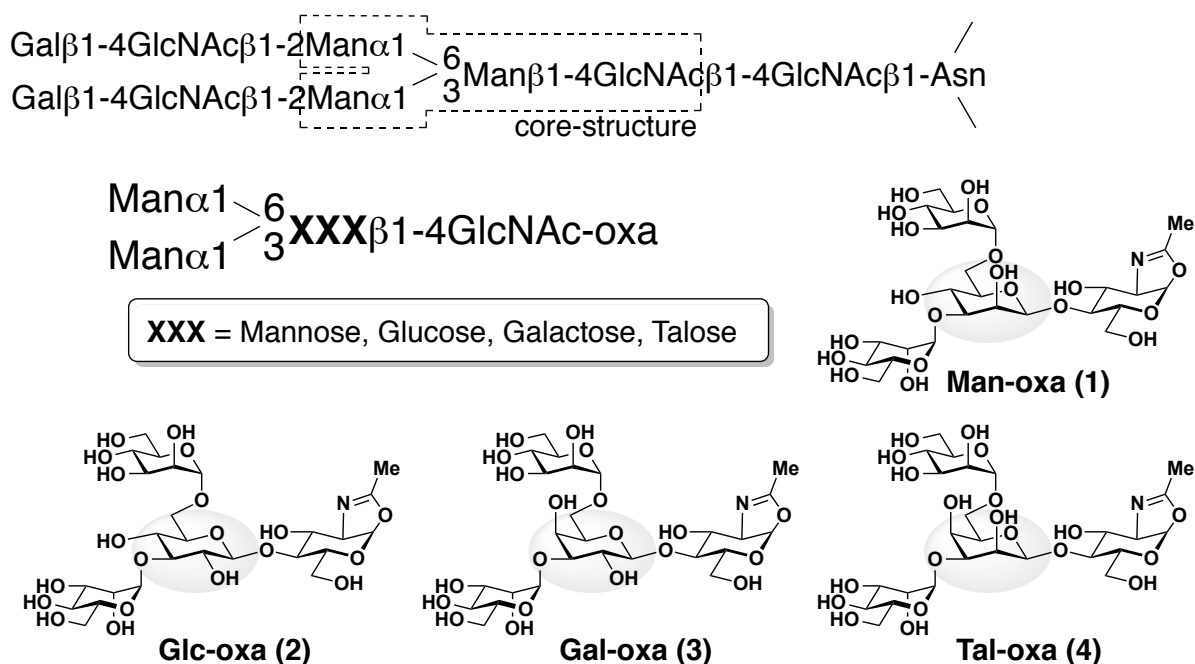


Figure 2-3. 水酸基の配向が異なる糖鎖基質の構造

ENGaseの糖鎖に対する認識能を解析する基質として、*N*-型糖鎖のコア構造である天然型4糖**1**と4糖の分岐部分の糖残基の立体配置が異なる3種類の異性体を合成した。すなわちβ-マンノース残基に対して2位の水酸基の立体が異なるβ-グルコース型**2**、2位および4位の水酸基の立体が異なるβ-ガラクトース型**3**、4位の水酸基の立体が異なるβ-タロース型**4**の糖鎖を合成した。4種類の基質の合成戦略をFigure 2-4に示す。合成する糖鎖基質は分岐部分のβ-グリコシド残基の2位および4位の水酸基の配向が異なった構造である。そ

ここで、まず  $\beta$ -ガラクトース型 4 糖を共通シントンとして構築することとした。そしてガラクトース残基の 2 位および 4 位の水酸基の立体を反転することで天然型である  $\beta$ -マンノース型へ、4 位の水酸基を反転することで  $\beta$ -グルコース型へ、2 位の水酸基を反転することで  $\beta$ -タロース型へ導くこととした。4 種類の異性体を合成するにあたり、共通の化合物を利用することで合成ルートが簡略化できるため効率的に基質の合成ができる。また、4 糖骨格の構築はガラクトース残基の水酸基の反応性の差を利用した位置選択的グリコシル化により、マンノース残基を一段階でガラクトース残基の 3 位と 6 位に導入することで、さらなる合成工程の簡略化を図った。このようにして得られた糖鎖は、糖転移反応の供与体基質とするために還元末端部分はオキサゾリン化した。

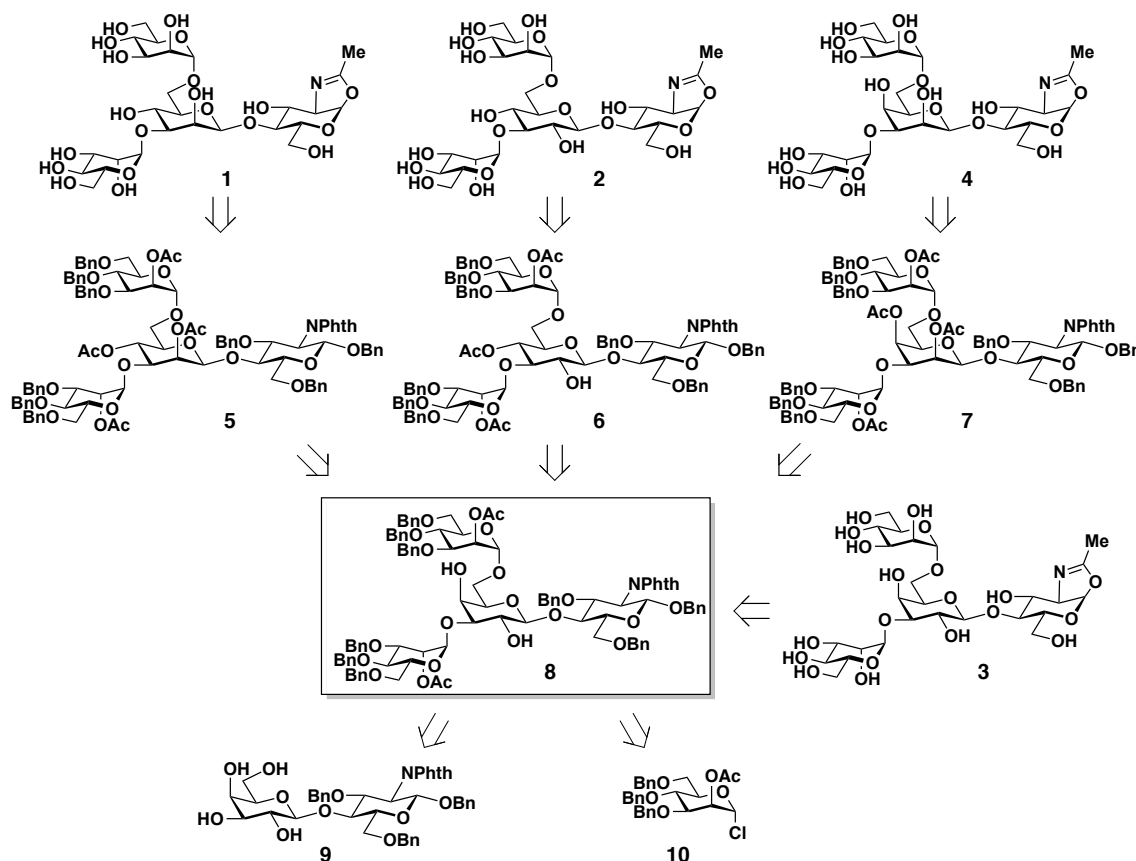
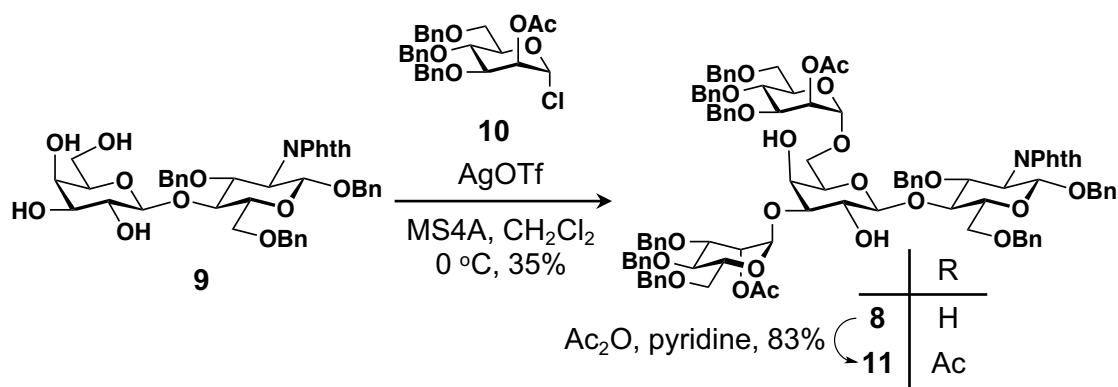


Figure 2-4. 水酸基の配向が異なる糖鎖基質の構造

## 位置選択的グリコシル化反応による $\beta$ -ガラクトース型 4 糖 **8** の構築

$\beta$ -ガラクトース型 4 糖誘導体 **8** を合成するにあたり、松尾らの手法[66]を参考にガラクトース残基の水酸基の反応性の差を利用した糖供与体の導入を試みた (Scheme 2-1)。すなわち、4 つの遊離の水酸基を有するラクトサミン受容体 **9**[67]に対して、2 当量のマンノース供与体 **10**[68]を反応させ、3 位と 6 位に選択的にマンノース残基を導入することとした。これにより、ガラクトース残基上の水酸基の反応点を制御するための保護・脱保護工程を省略し、合成工程数が削減できる。



Scheme 2-1.  $\beta$ -ガラクトース型 4 糖誘導体の合成

グリコシル化反応は、2, 3, 4, 6 位の水酸基が遊離のラクトサミン受容体 **9** に対し、マンノース供与体 **10** を、トリフルオロメタンスルホン酸銀を活性化剤としてジクロロメタン中で反応させた。反応混合物をゲルろ過クロマトグラフィーにて精製し、得られた各画分を MS スペクトルにて解析したところ、5 糖、4 糖および 3 糖誘導体の生成が確認された。目的とした 4 糖画分を NMR により解析したところ、2 種類の異性体が 4/1 の混合物比で生成していた。そこで、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、それぞれの 4 糖誘導体を単離した。得られた 4 糖誘導体は NMR による構造解析を容易にするためアセチル化した。 $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR、各種 2 次元 NMR スペクトルを解析することにより、主生成物が目的とした

3位と6位にマンノース残基が結合した4糖誘導体 **8** で、副生成物が2位と6位にマンノース残基が結合した4糖誘導体であることが明らかとなった。

主生成物の構造決定を例に、NMRによる化合物の構造解析について説明する。糖化合物の<sup>1</sup>H NMRスペクトルは、糖残基の数が多くなるほど、重なり合うシグナルが多くなり、帰属が難しくなる。そこで、シグナルを分離させるために、遊離の水酸基にアセチル基などの電子求引基を導入したのちに、構造解析を行うことが多い。アセチル化された水酸基が結合する炭素に結合するプロトンの化学シフト値は低磁場シフトする。このことから、何位の水酸基にアセチル基が導入されたかが分かる。したがって、アセチル化されなかった水酸基にマンノース残基が導入されていることがわかる。そのため、4糖誘導体の構造決定においても遊離の水酸基をアセチル化した。主生成物のアセチル化前後の<sup>1</sup>H NMRスペクトルをFigure 2-5に示した。アセチル化後のスペクトルでは、5.12 ppm、5.36 ppmに新たなシグナルが観測された。これらのピークは、カップリング定数から4位と2位であった。したがって、マンノース残基はガラクトース残基の3位と6位に導入されたと決定した。さらにH-H COSY、TOCSY、HSQCなど各種2次元NMRスペクトルを測定し、各シグナルの帰属を行い、2次元NMRスペクトルからもマンノース残基の結合位置がガラクトース残基の3位と6位であることを確認した。一方、新たに導入したマンノース残基の立体化学は2位のプロトンがエクソ配置であるため、1位のプロトンとのカップリング定数から推測することは難しい。そこで、マンノース残基のアノメリック位の炭素とプロトンの結合定数 ( $J_{\text{C-H}}$ ) から決定した。一般に、糖一位の $\alpha$ 結合と $\beta$ 結合の $J_{\text{C-H}}$ 値は、およそ170 Hz以上が $\alpha$ 結合、 $\beta$ 結合は150~160 Hzと小さい値を取ることが知られている[69]。得られた化合物 **11** の $J_{\text{C-H}}$ 値はそれぞれ、172 Hzと170 Hzであったことより、マンノースの結合様式は、 $\alpha$ 結合であると決定した。以上のことより、グリコシル化反応により得られた化合物は目的の4糖誘導体 **8** であると結論付けた。副生成物について2次元NMRスペクトルを解析

したところ、ガラクトースの 3, 4 位のプロトンの低磁場シフトが観測されたため、マンノースが 2, 6 位に結合した異性体であると決定した。

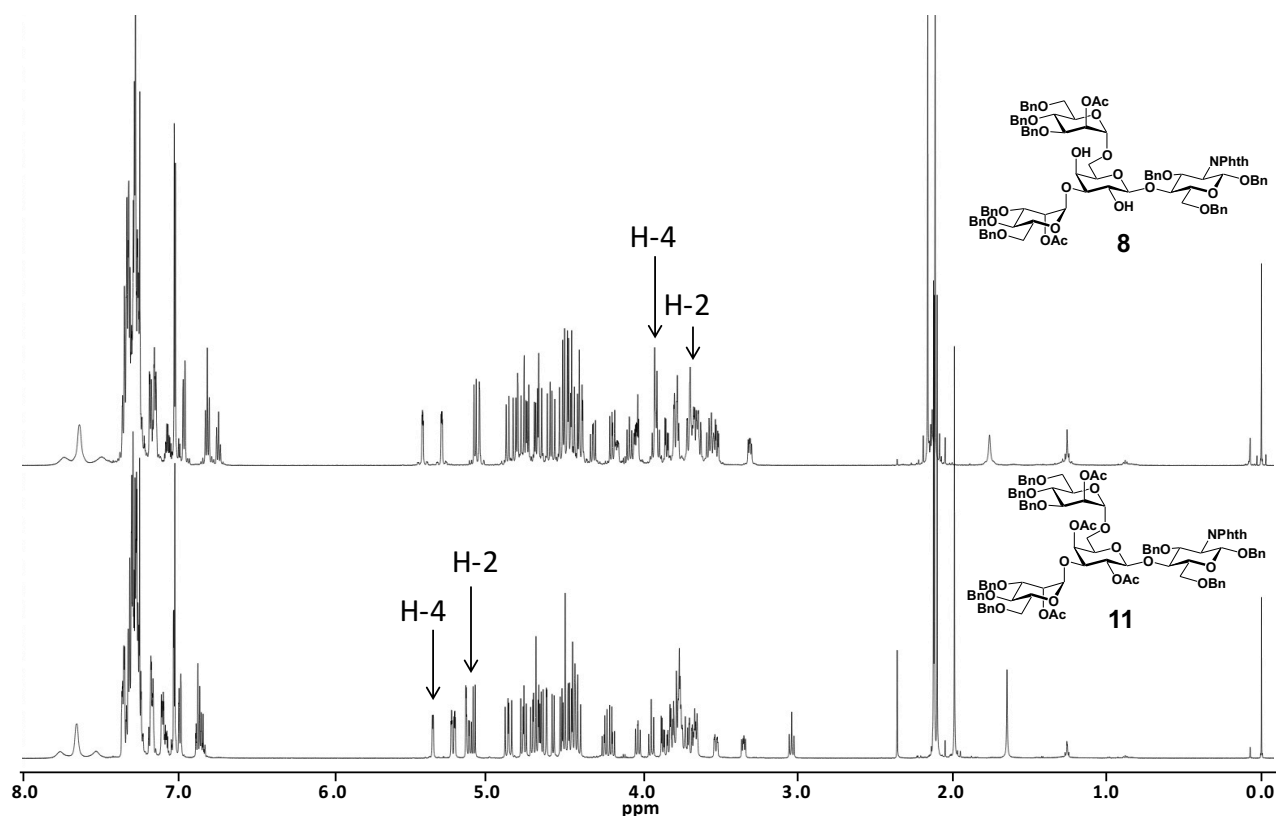
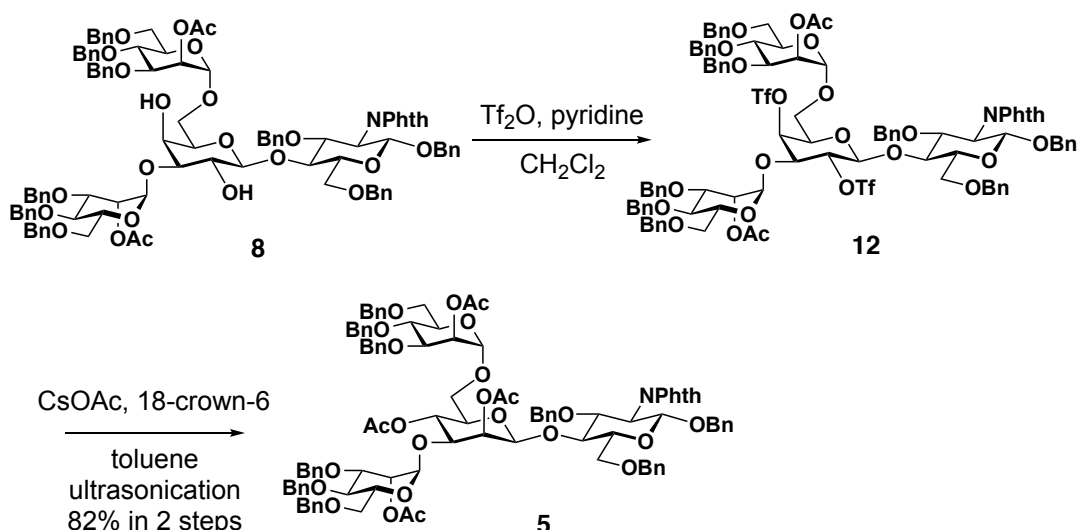


Figure 2-5. β-ガラクトース型 4 糖誘導体のアセチル化前後の <sup>1</sup>H NMR スペクトル (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

#### 水酸基の立体反転反応を用いた β-マンノース型 4 糖誘導体 **5** の合成

β-マンノース型 4 糖誘導体 **5** の水酸基の立体配置は、β-ガラクトース型 4 糖誘導体 **8** に対してガラクトース残基の 2 位と 4 位の水酸基の立体が異なっている。そこで、2 か所の水酸基の立体を同時に反転させることでマンノース残基へと導くこととした[66,70]。すなわち、β-ガラクトース型 4 糖誘導体 **8** のガラクトース残基の 2 位と 4 位の水酸基に脱離基としてトリフルオロメタンシルホニル (Tf) 基を導入、その後、求核置換反応によりアセチル

基を導入することで、2位と4位の立体が反転した $\beta$ -マンノース型4糖誘導体**5**を得ることとした (Scheme 2-2)。

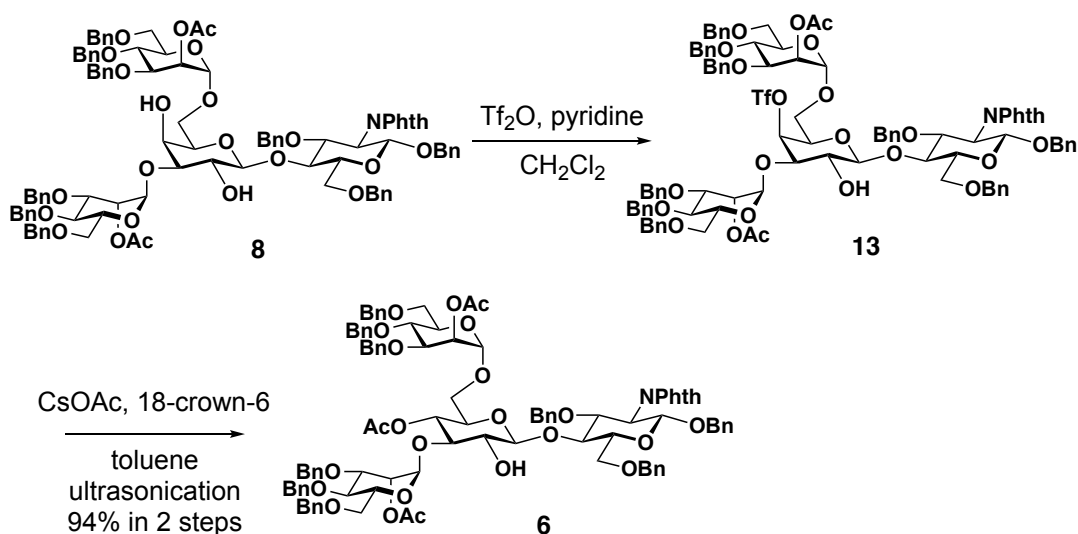


Scheme 2-2.  $\beta$ -マンノース型4糖誘導体**5**の合成

$\beta$ -ガラクトース型4糖誘導体**8**に対し30当量の無水トリフルオロメタンスルホン酸、90当量のピリジンと反応させ、ガラクトース残基の2位と4位の2ヶ所の水酸基にTf基が導入された化合物**12**を得た。その後、得られたTf体を酢酸セシウムと18-クラウン6-エーテルの存在下、超音波処理することで、 $\beta$ -マンノース型4糖誘導体**5**へと2段階収率81%で導いた。得られた化合物の構造は、2次元NMRスペクトルにより決定した。2位のプロトンのシグナルが5.35 ppmに結合定数が $J_{1,2} = -0 \text{ Hz}$ 、 $J_{2,3} = 3.0 \text{ Hz}$ で、4位のプロトンのシグナルが5.16 ppmに $J_{3,4} = 9.8 \text{ Hz}$ 、 $J_{4,5} = 9.8 \text{ Hz}$ で観測されたため、分岐部分の水酸基の立体がマンノース配置に変換されたことを確認した。

## $\beta$ -グルコース型 4 糖誘導体 **6** の合成

$\beta$ -グルコース型 4 糖誘導体 **6** の水酸基の立体配置は、 $\beta$ -ガラクトース型 4 糖誘導体 **8** に対してガラクトース残基の 4 位の水酸基の立体が異なっているため、4 位の水酸基にのみ Tf 基を導入し、水酸基の立体反転を行うこととした (Scheme 2-3)。



Scheme 2-3.  $\beta$ -グルコース型 4 糖誘導体 **6** の合成

4 位の水酸基に選択的に Tf 基を導入するために、 $\beta$ -ガラクトース型誘導体 **8** に対する Tf 化の際の試薬の当量、及び、反応温度を検討した。種々条件を検討した結果、6 当量の無水トリフルオロメタンスルホン酸、12 当量のピリジンを用い、 $0^\circ\text{C}$  で反応させた際、最も収率よく目的のガラクトース残基の 4 位水酸基が Tf 化された化合物 **13** を得た。得られた 4 位 Tf 体 **13** を  $\beta$ -マンノース型 4 糖誘導体 **5** の合成と同様に、酢酸セシウムと 18-クラウン 6-エーテルの存在下、超音波処理することで水酸基の反転反応を行い、 $\beta$ -グルコース型 4 糖誘導体 **6** を 2 段階収率 80% で得た。得られた化合物の構造は 2 次元 NMR スペクトルにより、4 位のプロトンのシグナルが 4.97 ppm に観測され、その結合定数が  $J_{3,4} = 9.6\text{ Hz}$ 、 $J_{4,5}$

= 9.6 Hz であったため、分岐部分の水酸基の立体がグルコース配置に変換されたことを確認した。

### $\beta$ -タロース型 4 糖誘導体 7 の合成

$\beta$ -タロース型 4 糖誘導体 7 は、 $\beta$ -ガラクトース型 4 糖誘導体 8 に対してガラクトース残基の 2 位の水酸基の立体が異なっているため、2 位水酸基の立体を反転することで得られる。しかしながら、 $\beta$ -グルコース型 4 糖誘導体 6 の合成で示したように、2 位および 4 位に水酸基を有する  $\beta$ -ガラクトース型 4 糖誘導体に対する Tf 化では、4 位の水酸基に優先的に反応が進行し、ガラクトース残基の 2 位の水酸基のみに Tf 基が導入された化合物を得ることはできなかった。この結果は 4 糖誘導体 8 のガラクトース残基の 4 位水酸基の反応性が高いことを示している。そこで、まずガラクトース残基の 4 位水酸基に保護基を導入し、2 位水酸基のみが遊離のガラクトース型 4 糖誘導体 14 を合成した後、2 位の水酸基の立体を反転することでタロース型へ導くこととした (Figure 2-6)。

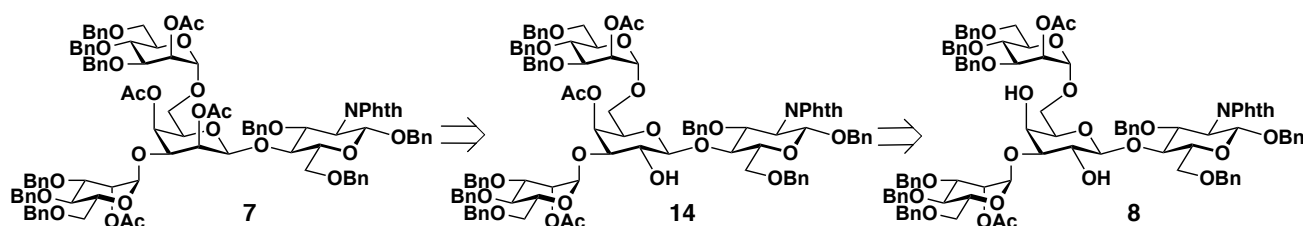
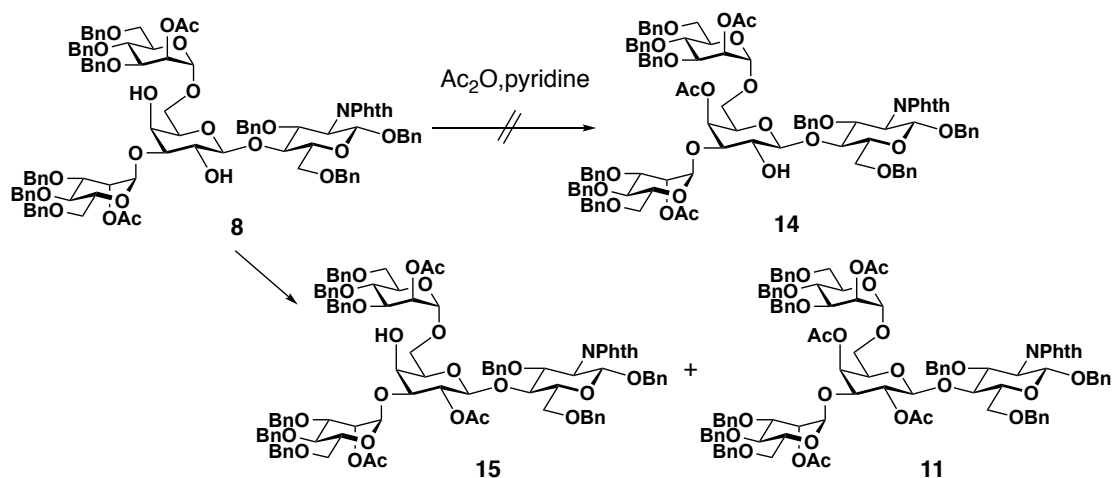


Figure 2-6.  $\beta$ -タロース型 4 糖誘導体 7 の合成戦略

$\beta$ -グルコース型 4 糖誘導体の 4 位選択的な Tf 化反応において得られた結果をもとに、化合物 8 の 4 位水酸基に対する選択的な Ac 化を試みた。化合物 8 をピリジン中、無水酢酸を反応させた結果、目的とした 4 位のみ Ac 化された化合物 14 は得られず、2 位の水酸基が Ac 化された化合物 15 と 2 位と 4 位の 2 箇所の水酸基が Ac 化された化合物 11 を得た

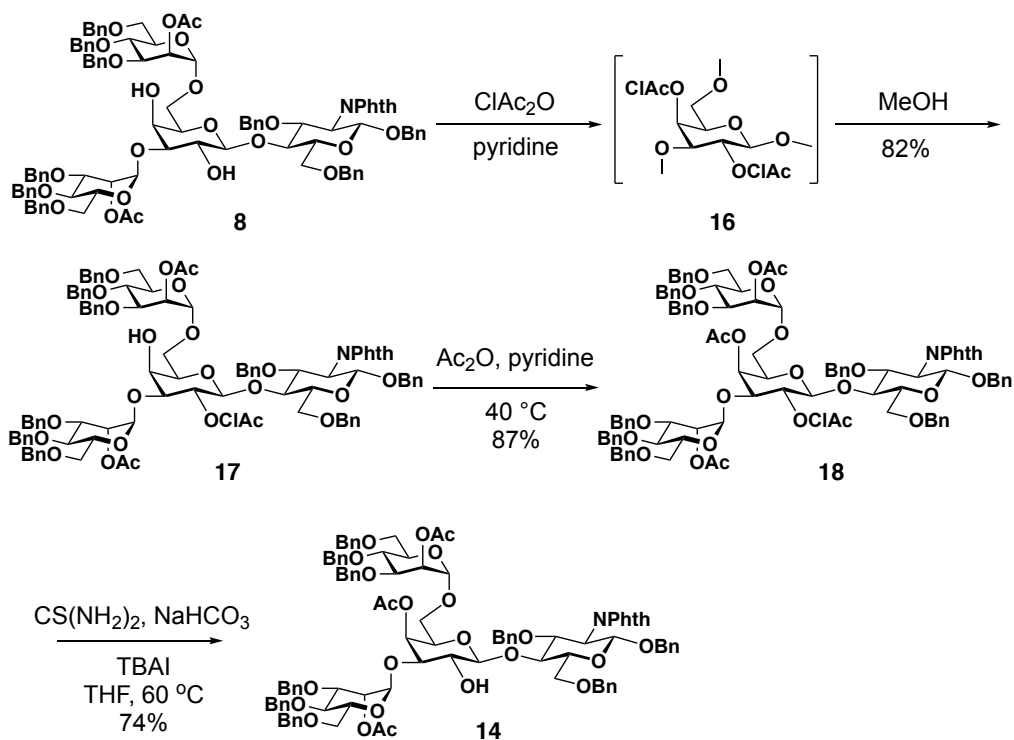


(Scheme 2-4)。この結果より、Ac 化反応では Tf 基と異なり、ガラクトース残基の 2 位水酸基に対して優先的に Ac 基が導入されることが示唆された。



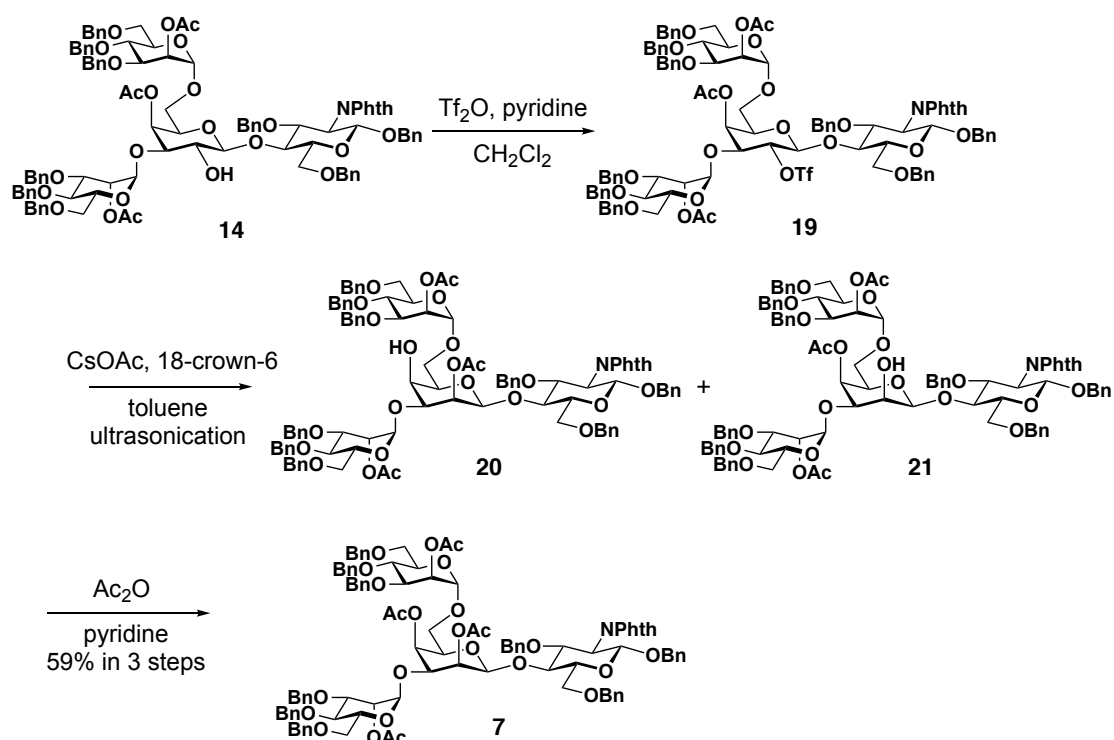
Scheme 2-4. C-4 位選択的アセチル化の検討

そこで、2 位の水酸基をクロロアセチル (ClAc) 基で保護し、4 位水酸基をアセチル基で保護した後、2 位の ClAc 基を除去することで、2 位の水酸基のみが遊離の  $\beta$ -ガラクトース型 4 糖誘導体 **14** を得る合成ルートに変更した (Scheme 2-5)。



Scheme 2-5. 4 位アセチルガラクトース型 4 糖 **14** の合成

ピリジン中、モノクロロ酢酸無水物を用いて化合物 **8** の 2 位水酸基選択的な ClAc 化反応を検討した結果、モノクロロ酢酸無水物の高い反応性のためか、2 位水酸基選択的に ClAc 基を導入することはできず、2 位と 4 位の 2 ヶ所の水酸基が ClAc 化された化合物が主生成物として得られた。しかし、一連の反応をおこなっている際に 4 位に導入された ClAc 基が選択的に除去できることを見出したことで目的とした生成物 **17** を得ることに成功した。すなわち、ガラクトース型 4 糖誘導体をピリジン中、無水クロロ酢酸を用いて 2, 4 位水酸基をジ ClAc 化、TLC にて原料の消失を確認後、反応液にメタノールを加え反応を停止した。その際、4 位の ClAc 基が選択的に除去され 2 位に ClAc 基を有する化合物 **17** が収率 68% で得られた。得られた化合物は 2 次元 NMR スペクトルを測定し、ガラクトース残基の 2 位の水酸基が低磁場シフトしていることより 2 位にクロロアセチル基が導入されたことを決定した。得られた化合物 **17** の 4 位水酸基をアセチル基で保護するために、ピリジン中、無水酢酸を用いて反応することにより、目的とした 4 位の水酸基がアセチル基で保護された化合物 **18** を収率 87% で得た。得られた **18** の ClAc 基の選択的除去は、チオ尿素、炭酸水素ナトリウムの条件下[71]、反応を行うことで選択的に進行し、2 位に水酸基を有する  $\beta$ -ガラクトース型 4 糖誘導体 **14** を収率 78% で得た。得られた **14** を用いて、これまでと同様に水酸基の反転反応によりタロース誘導体 **7** へと変換を試みた (Scheme 2-6)。



Scheme 2-6. 反転反応によるタロース型4糖 **7** の合成

化合物 **14** のガラクトース残基の 2 位水酸基に Tf 基を導入し、化合物 **19** へと導いた後に、**19** を酢酸セシウムと 18-クラウン 6-エーテルの存在下、超音波処理した。TLC にて反応の経過を確認したところ、出発原料とは異なる位置に新たな 2 つのスポットが確認された。得られた 2 つのスポットを分取薄層クロマトグラフィー（プレパラティブ TLC）にて単離・精製し、 $^1\text{H}$  NMR スペクトルおよび MS スペクトルを測定した結果、いずれの化合物の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルからもアセチル基由来のシグナルは 1 つ分しか観測されなかった。同様に MS スペクトルでも、いずれの化合物からも目的化合物 **7** の分子量ピークは観測されず、アセチル基が 1 つ分少ない分子量ピークが確認された。そこで、得られた 2 種類の化合物の構造を決定するためにそれぞれの化合物をアセチル化し、 $^1\text{H}$  NMR スペクトルを測定しところ、同一の化合物が得られていることが明らかとなった。また、アセチル化された化合物は 2 次元 NMR スペクトルの結果から、目的である  $\beta$ -タロース誘導体 **7** と同定した。これらの結果より、 $\beta$ -タロース誘導体合成の際の水酸基の反転反応について考察すると、この反応

では  $\beta$ -マンノース型や  $\beta$ -グルコース型合成の際とは異なり、分子内での立体反転反応が進行したと考えられる。通常の反転反応では、2位の Tf 基に対して、酢酸セシウムのアセトキシドが背面から求核攻撃することで立体が反転する。しかし、本反応では4位のアセチル基のカルボニル酸素原子が C-2 位に分子内求核攻撃することで、2位と4位の架橋構造を形成後、加水分解する際に2位側と4位側に開環するため、2種類のモノアセチル化された化合物が生成したと推定している (Figure 2-7)。

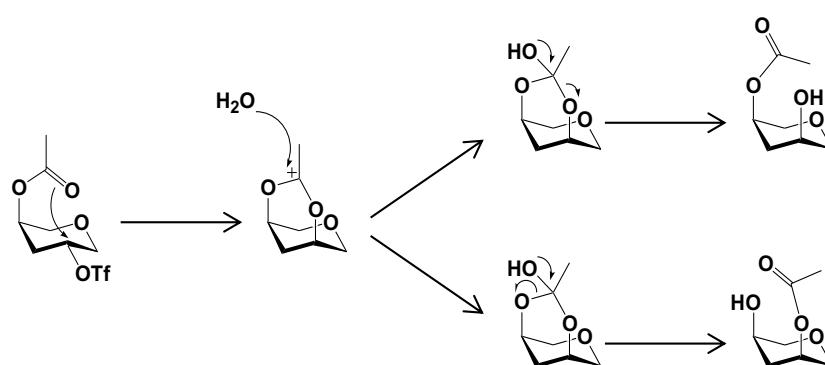
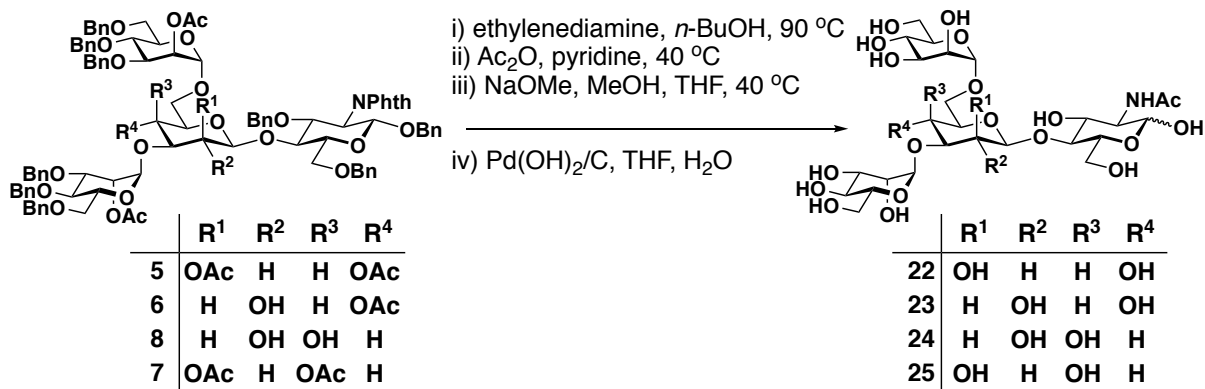


Figure 2-7. C-2 位の反転反応によるタロース型 4 糖の合成

#### 4 糖誘導体の保護基の除去とオキサゾリン誘導体への変換

得られた 4 種類の糖鎖を脱保護後、糖転移反応の供与体基質となるオキサゾリン誘導体へと導いた (Scheme 2-7)。4 糖の脱保護反応を  $\beta$ -マンノース型 4 糖 **5** を例に説明する。文献に従い、エチレンジアミン、*n*-ブチルアルコールを用い、加熱還流により、フタルイミド基を除去し、無水酢酸、ピリジンによりアセチル化することで、アセトアミド基へと変換した[72]。続いて、テトラヒドロフラン中、ナトリウムメトキシドによりアセチル基を除去した。その後、テトラヒドロフランと水の混合溶媒中、水酸化パラジウム触媒存在下、水素添加することによりベンジル基を除去し、 $\beta$ -マンノース型 4 糖 **22** を 4 段階収率 82% で得た。



Scheme 2-7. 4種類の4糖誘導体 **5-7** の脱保護反応

得られた化合物の構造は、<sup>1</sup>H NMR スペクトルより、芳香環由来のピークが消失し、保護基が除去されたことを確認した。さらに、MS スペクトルにより目的化合物の分子イオンピークを確認した。同様の方法で、β-グルコース型4糖 **23** を61%、β-ガラクトース型4糖 **24** を4段階収率92%、β-タロース型4糖 **25** を88%で得た。得られた化合物の<sup>1</sup>H-NMR スペクトルを Figure 2-8 に示した。

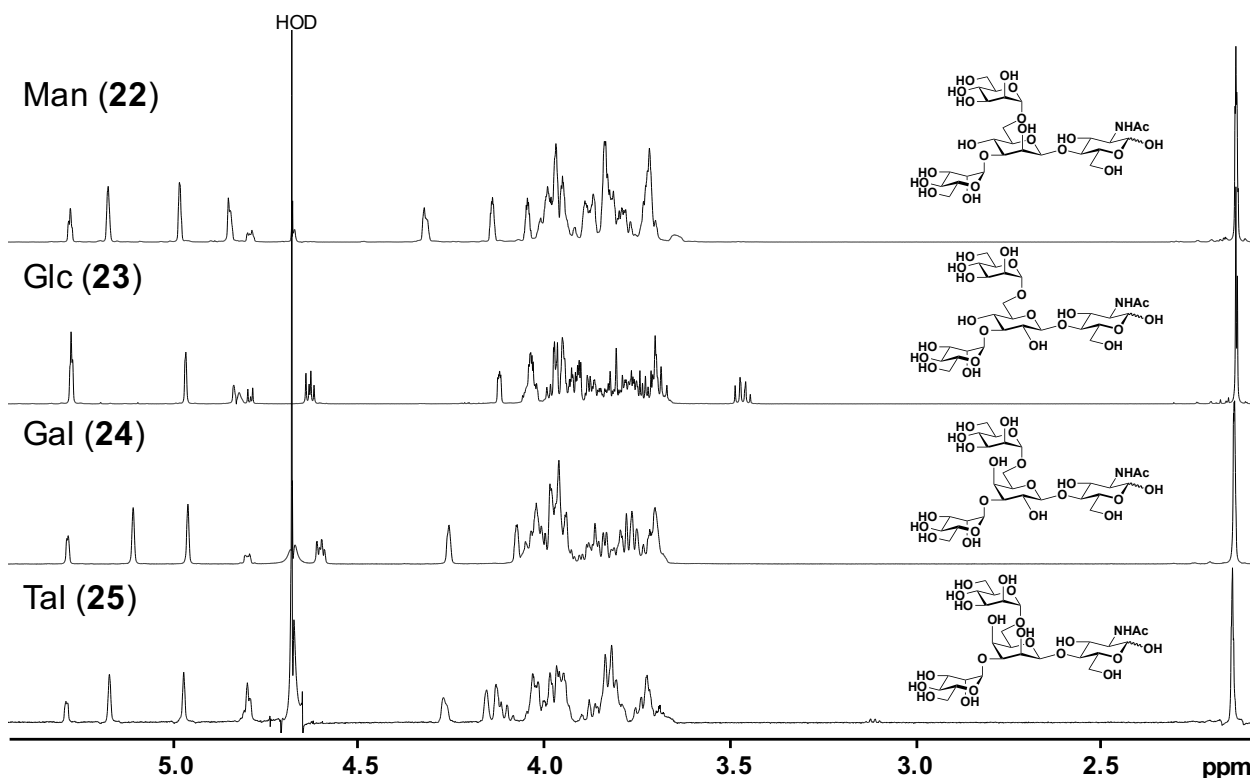
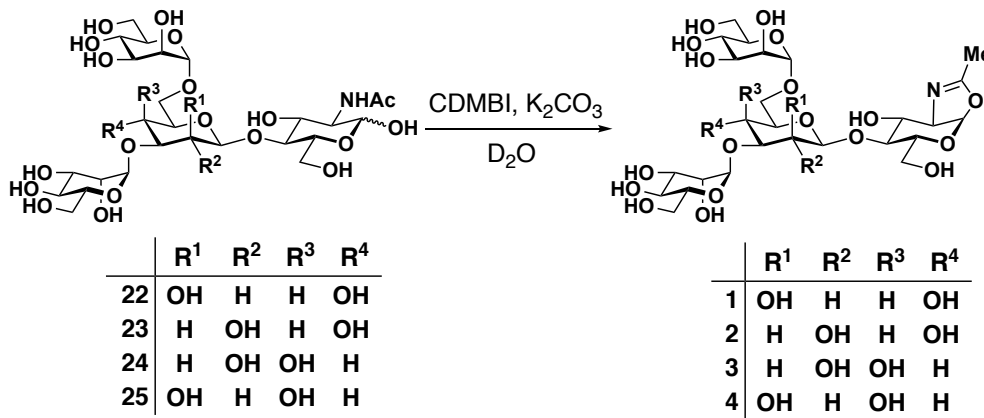


Figure 2-8. 4糖脱保護体 **22-25** の<sup>1</sup>H NMR スペクトル (600 MHz, D<sub>2</sub>O)

得られた化合物は、正田らが開発した CDMBI を用いた方法を参考にオキサゾリン化反応をおこなうことで糖転移反応の基質へと変換した (Scheme 2-8) [73-74]。



Scheme 2-8. 4 種類の 4 糖誘導体 22-25 のオキサゾリン化反応

この方法では、還元末端が GlcNAc である無保護の糖鎖を用いて、水溶液中で分子内脱水反応により一段階でオキサゾリン形成が可能である。さらに、縮合剤の CDMBI は反応の進行とともに、水に不溶性の化合物に変換されるため、反応終了後に反応液をろ過することで、簡便に試薬を除去することができる (Figure 2-9)。

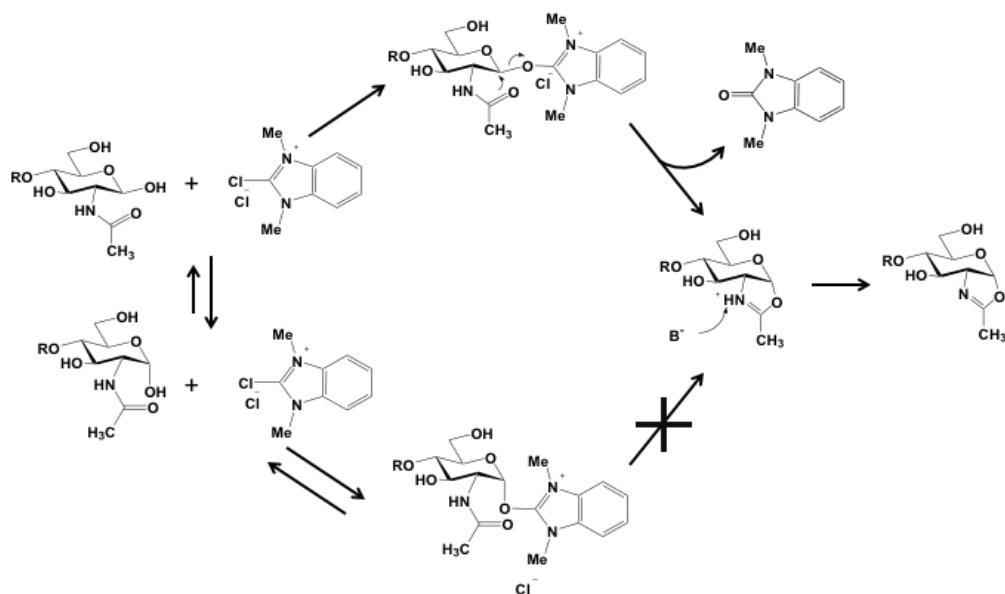


Figure 2-9. オキサゾリン化反応のメカニズム

オキサゾリン化反応の進行を  $^1\text{H-NMR}$  で適宜確認するために、重水溶媒中で反応を行った。まず、天然型のマンノース型 4 糖 **22** を重水に溶解し 60 mM 溶液を調製した。この溶液に炭酸カリウム、CDMBI を加え、0 °C で 2 時間反応させた。反応液を  $^1\text{H NMR}$  スペクトルにより測定した。反応の終了は、原料由来の GlcNAc の 1 位のピークが消失し、新たに低磁場側にオキサゾリンの 1 位のピークを確認することで判断した (Figure 2-10)。同様に、他の 4 糖誘導体についてもオキサゾリン化反応をおこなった。いずれも 95% 以上の変換率でオキサゾリン体へ変換されたことを確認した。得られたオキサゾリン誘導体の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを Figure 2-11 に示した。

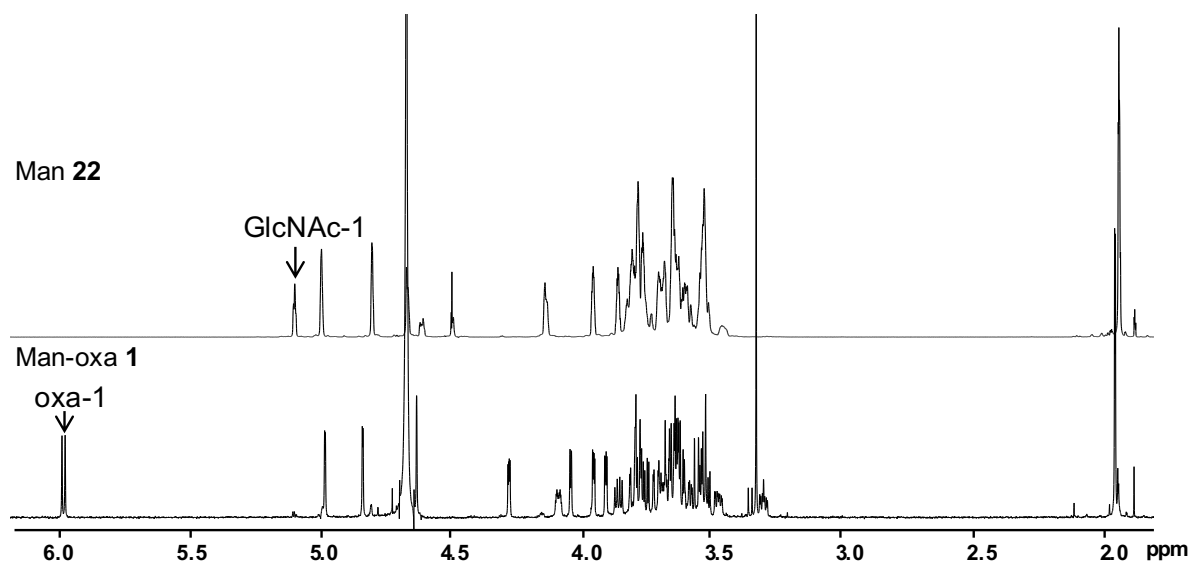


Figure 2-10. オキサゾリン化反応における  $^1\text{H NMR}$  スペクトル (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

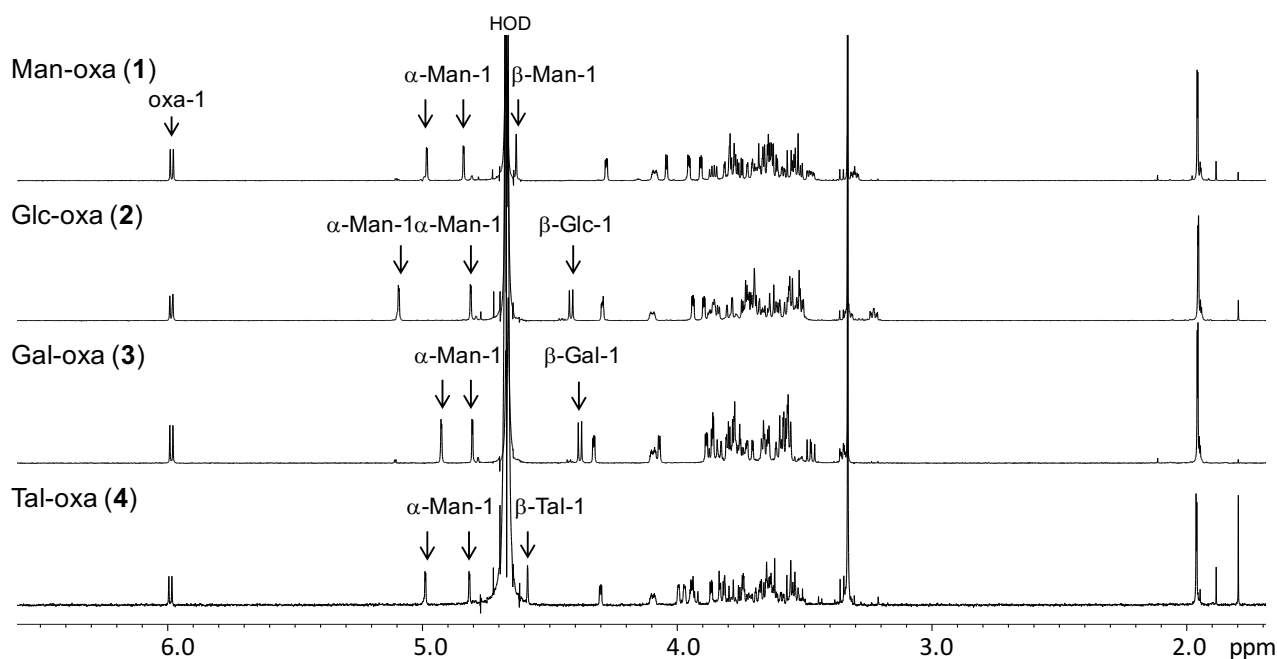


Figure 2-11. 4糖脱保護体の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

#### 第4節 合成糖鎖基質を用いた Endo-M の糖転移活性の解析

前節にて4糖構造に着目し、分岐部分の水酸基の配向が異なる異性体について4種類の4糖オキサゾリン誘導体を合成した。これらオキサゾリン誘導体を用いて糖転移反応を行い、その転移効率を比較することで、ENGaseの水酸基に対する認識に関して系統的な検討を行うこととした。得られた結果をもとに化学修飾が可能な部位を特定することとした。

糖転移反応では、糸状菌 *Mucor hiemalis* 由来の ENGase である Endo-M[9] の野生型 (WT) と加水分解活性が抑制されている変異型の Endo-M-N175Q[31] と Endo-M-N175A[30] の計3種類を利用した。Endo-M は ENGase の中でも基質特異性が広く、基質にできる糖鎖構造が多様であるため有用性が高い。また、触媒残基への変異導入による高機能化研究により高い糖転移活性を持つ酵素が開発、すでに市販されるなど、最も研究されている ENGase の一つである。したがって、本研究では、Endo-M を対象として、基質認識を解析することとした。また、糖転移反応を HPLC にて追跡する際に感度良く検出するために、糖受容体には、



UV 検出が可能な *p*NP-GlcNAc を用いた。糖転移反応は、糖供与体と糖受容体の比を 3/1 とし、pH 7 のリン酸バッファー中、酵素を加え 30 °C でおこなった。各基質の変換率は、ゲルろ過クロマトグラフィー用の HPLC カラムにより反応液を分析し、*p*-ニトロフェニル由来の UV 吸収により検出される糖受容体の *p*NP-GlcNAc と糖転移生成物のピークの面積比から算出した。

#### 4 糖オキサゾリンを用いた糖転移反応

コントロール実験として、すでに Endo-M の基質になることが知られている天然型の  $\beta$ -マンノース型 4 糖オキサゾリン **1** を用いた反応を行なった。Endo-M-WT による糖転移反応を HPLC にて追跡した結果を Figure 2-12 に示した。

反応液 (6 mM Man-oxa (**1**)、2 mM *p*NP-GlcNAc、Endo-M-WT (10  $\mu$ g)、220 mM リン酸バッファー (pH 7, 20  $\mu$ L) ) を調製し、30 °C でインキュベートした。反応液 (2  $\mu$ L) を 0, 3.5, 7.5, 15, 30, 60, 120 分ごとに分取し、アセトニトリル (8  $\mu$ L) に混合することで、酵素を失活させ、反応を停止した。さらに、水 (40  $\mu$ L) で希釈し、各反応時間の溶液を HPLC にて分析した (Figure 2-12B) 。その結果、糖受容体である *p*NP-GlcNAc のピークより早い保持時間に新たなピークの生成を確認した。また、この保持時間が 6.1 分のピークは反応時間が 3.5 分の時に最大の転移率を示した後、減少した。この 6.1 分のピークを分取し、MS スペクトルにより解析したところ、糖転移生成物の 5 糖 *p*NP 体の分子量と一致した。したがって、新規ピークは糖転移生成物であると判断した。なお、転移率は、糖転移生成物のピーク面積と *p*NP-GlcNAc のピーク面積の合計を 1 とし、両者の面積比から算出した (Figure 2-12C) 。

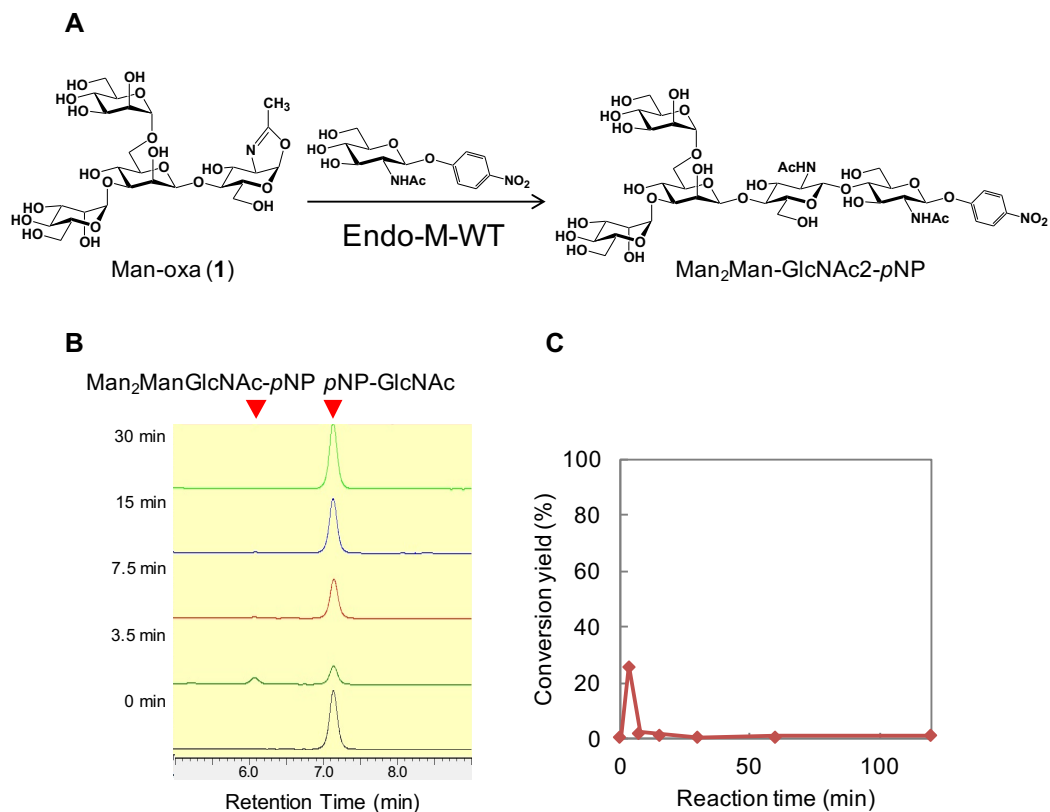


Figure 2-12. 4糖オキサゾリン誘導体を用いた糖転移反応 (A) Man-oxa **1** を用いた糖転移反応のスキーム, 反応条件: 6 mM Man-oxa (**1**), 2 mM *p*NP-GlcNAc, Endo-M-WT (10  $\mu$ g), 220 mM リン酸バッファー (pH7, 20  $\mu$ L), 30  $^{\circ}$ C; (B) HPLC による転移反応の追跡, 分析条件: YMC-Pack Diol-60 (YMC.Co.,Ltd., 300 x 4.6 mmI.D.S-5 $\mu$ m, 6 nm), H<sub>2</sub>O, 0.5 mL/min, UV 260 nm; (C) 転移率の経時変化

以上の条件により、変異型 Endo-M-N175Q および Endo-M-N175A を用いて、 $\beta$ -マンノース型 4糖オキサゾリン **1** の糖転移反応をおこなった。この結果を Figure 2-13A に示す。Endo-M-N175Q は高い糖転移率を示した。しかし、反応時間が長くなると糖転移生成物が徐々に減少することが明らかとなった。これは Endo-M-N175Q の加水分解活性がわずかに残存しており、反応時間が長くなると糖転移生成物が加水分解されるためであると考えられる。一方、Endo-M-N175A では、徐々に糖転生成物が増加した。

同様の条件で  $\beta$ -グルコース型 4糖オキサゾリン **2** を用いた糖転移反応を行った。その結果を Figure 2-13B に示す。Endo-M-WT を用いた場合、糖転移生成物が 62% 生じ、糖転移

生成物の加水分解は観察されなかった。Endo-M-N175Q と Endo-M-N175A ではそれぞれ 5%と 3%の糖転移生成物を確認した。 $\beta$ -ガラクトース型 4糖オキサゾリン **3** を用いた場合、Endo-M-WT では糖転移生成物を 6 %程度与えた。しかし、Endo-M-N175Q および Endo-M-N175A では糖転移生成物は確認できなかった (Figure 2-13C) 。一方、 $\beta$ -タロース型 4糖オキサゾリン **4** を用いた糖転移反応の WT では糖転移生成物が生成した後、生成物量は徐々に減少した。Endo-M-N175Q では糖転移率が 42%、Endo-M-N175A では 17%であった (Figure 2-13D) 。

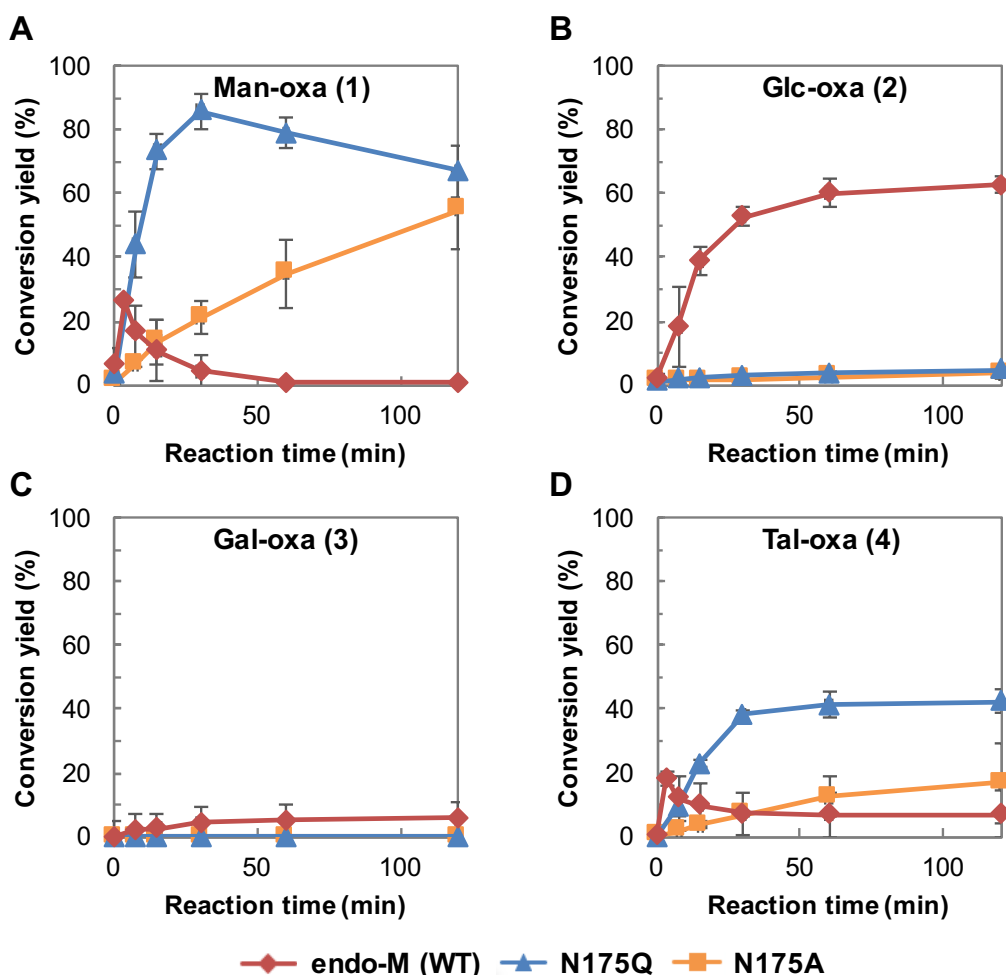


Figure 2-13. 4糖オキサゾリン誘導体を用いた糖転移反応, 反応条件: 6 mM 4糖オキサゾリン (**1**, **2**, **3** or **4**), 2 mM *p*NP-GlcNAc, N175Q (10  $\mu$ g), 220 mM リン酸バッファー (pH7, 20 mL), 30 °C; 分析条件: YMC-Pack Diol-60 (YMC.Co.,Ltd., 300 x 4.6 mm).D.S-5  $\mu$ m, 6 nm), H<sub>2</sub>O, 0.5 mL/min, UV 260 nm. (A) Man-oxa **1**; (B) Glc-oxa **2**; (C) Gal-oxa **3**; (D) Tal-oxa **4**.

以上の実験で、天然型である  $\beta$ -マンノース型 4 糖 **1** と Endo-M-WT の糖転移反応と  $\beta$ -グルコース型 4 糖の Endo-M-WT を用いた糖転移反応はすでに報告がある[65]。Fairbanks らは  $\beta$ -マンノース型および  $\beta$ -グルコース型 4 糖がそれぞれ、変換率 36%、70%で GlcNAc アスパラギン誘導体に糖転移することを示している (Table 2-1)。著者らの実験もこれらの報告と転移率および転移生成物の加水分解の有無についての傾向がほぼ同じであったことより、我々の酵素反応解析系は信頼できるものと判断した。

4 つの基質を用いた糖転移反応の結果を野生型の Endo-M 酵素についてまとめると、Endo-M-WT では、 $\beta$ -ガラクトース型ではほとんど糖転移生成物は得られていないが、いずれの基質を用いた場合でも糖転移生成物が確認され、基質特異性が広いことが示された。また、 $\beta$ -マンノース型 4 糖 **1** と  $\beta$ -タロース型 4 糖 **4** に対しては同様の挙動を示すことが明らかとなった。

一方、変異型酵素については、2 位水酸基の配向がエクソトリアル配向である  $\beta$ -グルコース型と  $\beta$ -ガラクトース型では糖転移生成物を与えず、2 位水酸基の配向がアキシシャル配向である  $\beta$ -マンノース型 4 糖と  $\beta$ -タロース型 4 糖は基質とした。このことより、変異体酵素は 2 位水酸基の認識が厳密である反面、 $\beta$ -タロース型 4 糖も転移したことより 4 位水酸基の配向は基質認識に関与していないことが示された。変異体酵素は触媒部位のアミノ酸が置換されており、Endo-M-N175Q はアスパラギンから側鎖の炭素原子が 1 つ伸びたグルタミン残基、一方、Endo-M-N175A は側鎖がメチル基のアラニン残基に置換されているため、活性ポケットの空間のサイズが WT に比べて狭く、加えて疎水性度が上がっているために上述したような特異性に差が生じていると考えている。

Endo-M が 2 位水酸基を認識する可能性は、Figure 2-2 に示した Endo-A の X 線結晶構造解析の結果からも、2 位水酸基部分と触媒部位のグルタミン酸 (E272) とチロシン (Y299) との間での水素結合が示唆されることから理解できる。また分岐部分の 4 位についても近

接したアミノ酸側鎖がないことから空間的に余裕があると推察され、今回の実験結果と矛盾しない。したがって、糖残基を化学修飾する位置として、糖鎖分岐部分の C-4 位が修飾可能な部位と結論づけた。

## 第5節 化学修飾した4糖プローブの糖転移反応

前節において、化学修飾可能な位置として糖鎖分岐部分の  $\beta$ -マンノース残基の C-4 位を見出した。そこで、C-4 位に化学修飾した糖鎖基質を合成し、糖転移反応が進行することを確認することとした。化学修飾基質として、アルキン修飾4糖 **26** および蛍光基として5-カルボキシテトラメチルローダミン (TAMRA) を導入した糖鎖 **27** を合成した (Figure 2-14)。

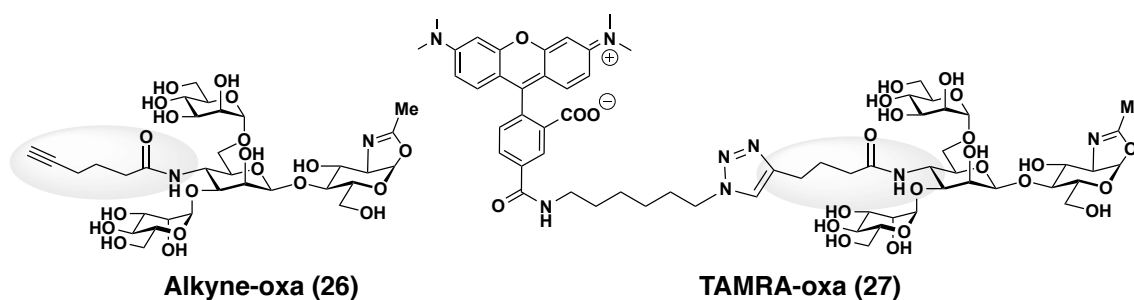


Figure 2-14. C-4 位修飾4糖オキサゾリン誘導體

アルキンはクリック反応[75]により、様々な置換基を糖鎖上に導入するためのタグとして利用できる。そこで、糖鎖に導入したアルキンに対してクリック反応が進行するか確認するために、モデル実験として TAMRA-アジドを反応させることとした。また TAMRA のような大きい分子を有する糖鎖でも Endo-M の基質となり、糖転移反応が進行するか興味もたれる。糖鎖の合成にあたり、C-4 位部分に化学修飾を施すための足場として、ピラノース環上にアミノ基を導入することとし、分岐部分の C-4 位に導入したアミノ基とカルボン酸の縮合反応により糖鎖のアルキンの修飾を行った (Figure 2-15)。

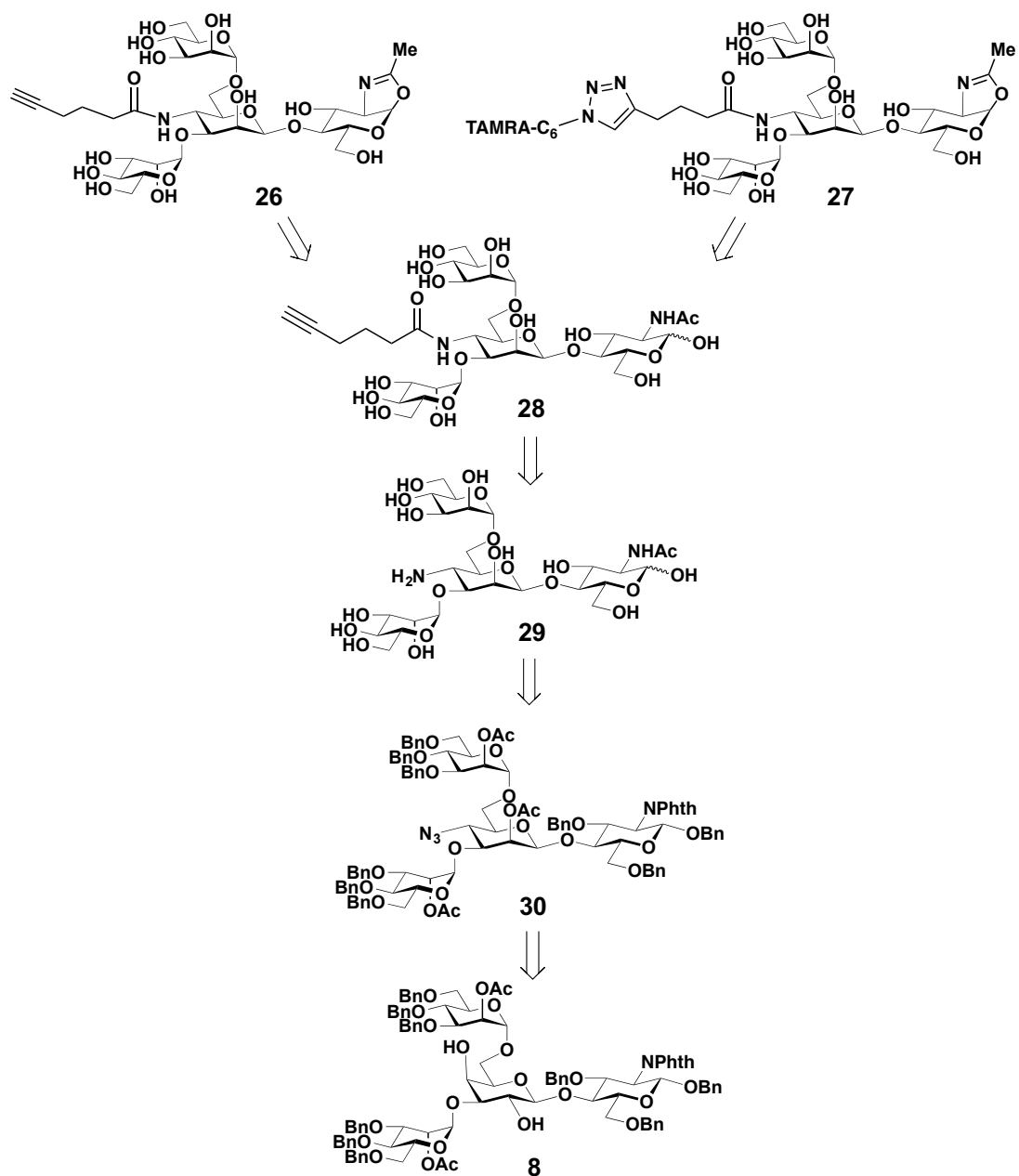
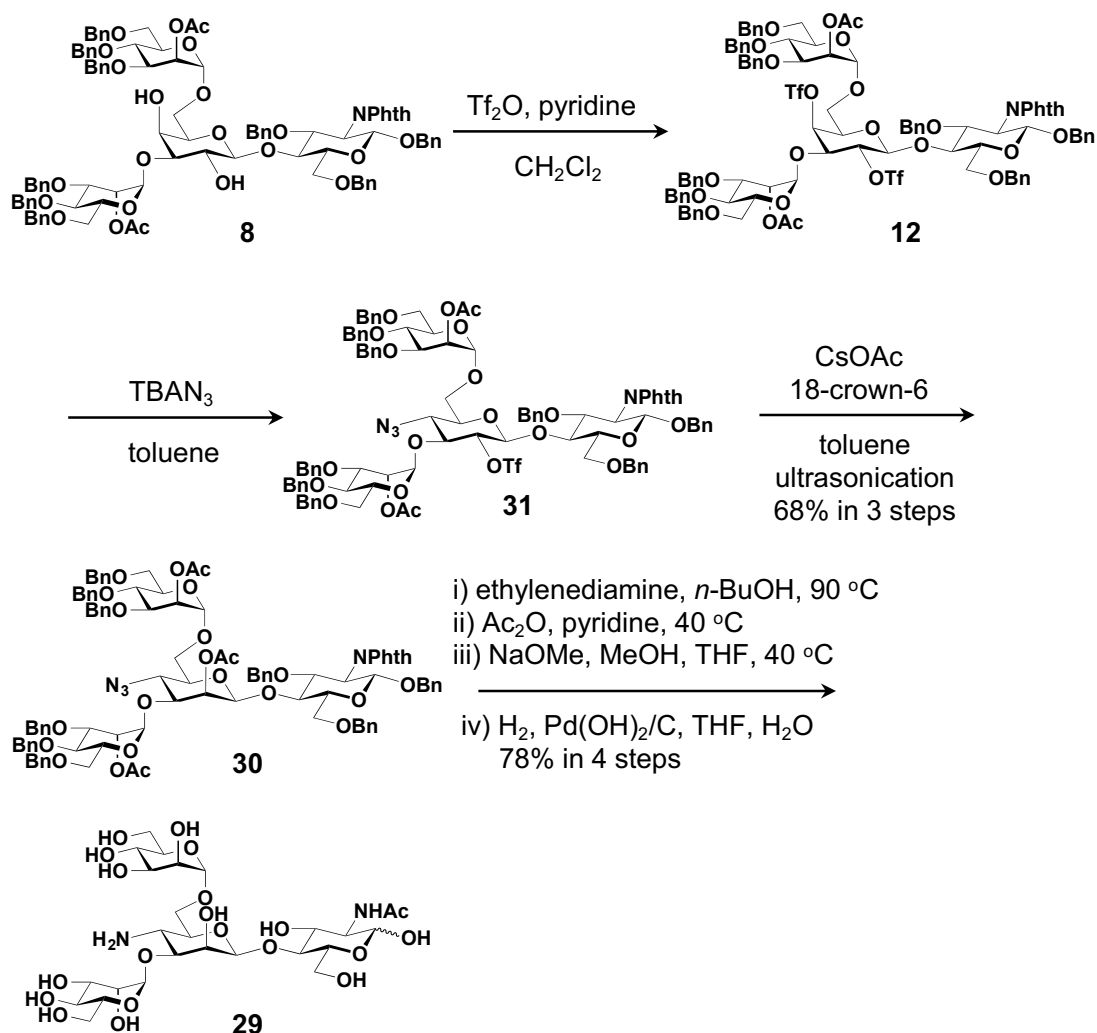


Figure 2-15. C-4 位修飾 4 糖オキサゾリン誘導体の合成戦略

### アミノ基を有する $\beta$ -マンノシド型 4 糖の合成

先に行った分岐部分の水酸基の配向が異なる 4 糖合成で得られた分岐部分の水酸基の反応性に関する知見をもとに、分岐部分の C-4 位へのアミノ基の導入を行なった。すなわち、 $\beta$ -ガラクトース型 4 糖 **8** を出発原料に水酸基の反転反応における反応性の差を利用して目

的の4位アミノ基の前駆体としてアジド基を4位に、2位水酸基の配向を  $\beta$ -マンノシド型とした4糖 **30** を合成した (Scheme 2-9)。



Scheme 2-9. C-4 位にアミノ基を有する4糖誘導体の合成

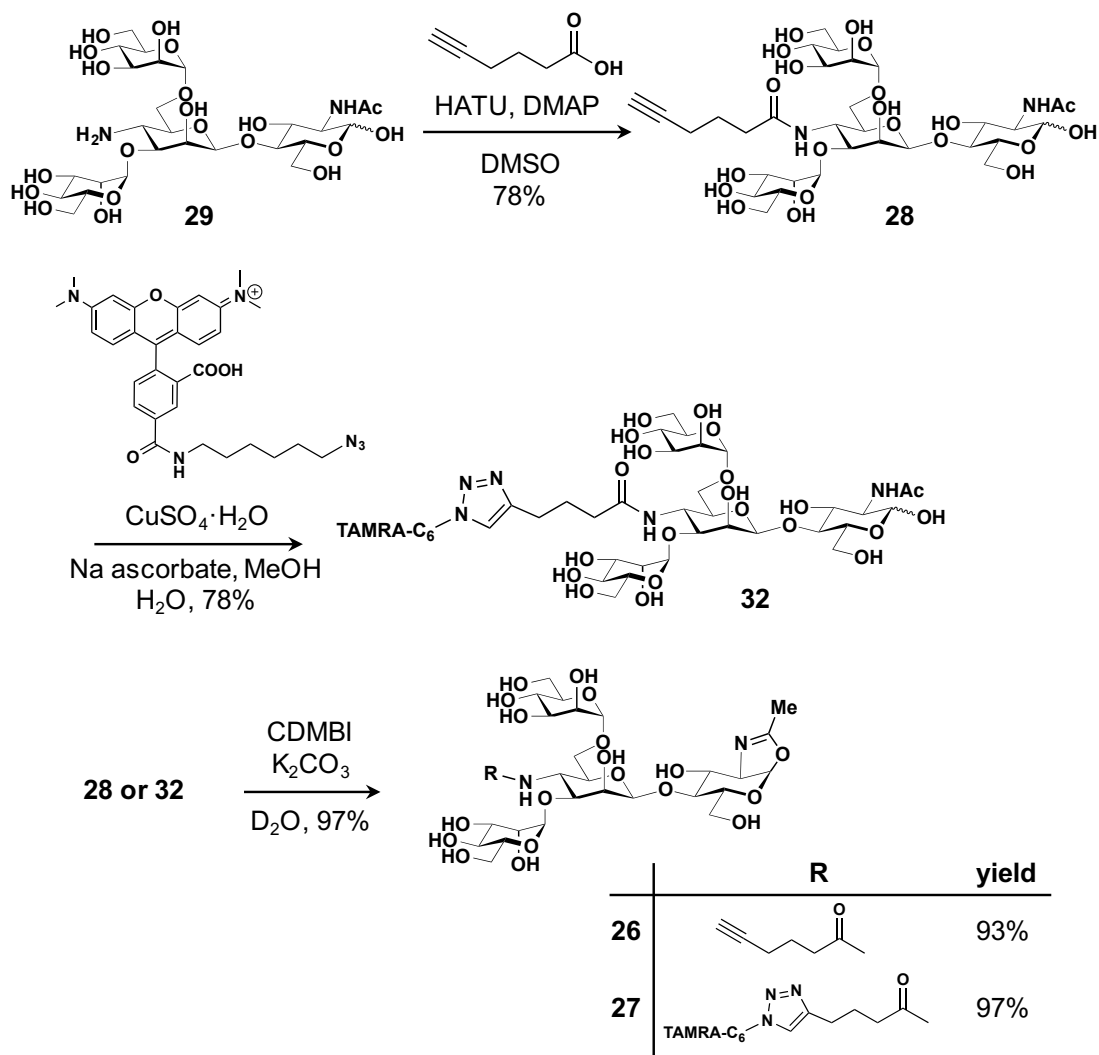
ガラクト型4糖誘導体 **8** の遊離の2位と4位の水酸基に Tf 基を導入した後、トルエン溶媒中、室温にてテトラブチルアンモニウムアジド ( $\text{TBAN}_3$ ) を反応させた。その結果、アキシャル配向の水酸基に導入された Tf 基に対して優先的に  $\text{TBAN}_3$  が反応、4位にアジド基が導入された化合物 **31** が主生成物として得られた。副生成物として2位および4位の両方にアジド基が導入されると推定される化合物も質量分析において確認された。得られたモノア

ジド体 **31** は、酢酸セシウム、18-クラウン 6-エーテルを用いて超音波処理することで、2位水酸基の立体を反転し、マンノシド誘導体 **30** へと変換した。得られた化合物 **30** の構造は2次元 NMR および MALDI-TOF-MS にて決定した。還元末端部分のフタルイミド基をアセトアミド基へと変換後、接触還元によるベンジル基の除去と同時にアジド基をアミノ基へと変換することで、アミノ基を有する4糖 **29** へと4段階収率78%で導いた。

### 化学修飾した $\beta$ -マンノシド型4糖オキサゾリン誘導体の合成

アルキンを修飾した4糖誘導体 **28** の合成はアミノ基に対して5-ヘキシシン酸を縮合させることで、アルキンを導入した (Scheme 2-10)。アミノ基を有する4糖 **29** を DMAP 存在下、縮合剤として HATU を用いて5-ヘキシシン酸と反応させた。反応混合物を逆相カラムクロマトグラフィーにより精製することで、アルキン修飾4糖 **28** を得た。得られた化合物の構造は NMR スペクトルにより確認した。オキサゾリン誘導体 **26** への変換は先に述べた方法に従い、重水中 CDMBI を縮合剤として用い、NMR スペクトルにより変換率を確認した。一方、TAMRA 修飾オキサゾリン誘導体 **27** の合成は、アルキン修飾4糖 **28** に対してアジド基を有する TAMRA を硫酸銅および還元剤としてアスコルビン酸ナトリウムを用いて反応後、CDMBI を縮合剤として反応することで合成した。クリック反応は MALDI-TOF-MS にて追跡した。反応終了後、反応混合物を逆相の HPLC により精製することで TAMRA 修飾4糖 **32** を得た。得られた化合物は CDMBI を用いることでオキサゾリン誘導体 **27** へと変換した。オキサゾリン体への変換率は Figure 2-10 に示した塩基性条件下で使用可能な逆相カラムを用いた HPLC のクロマトグラムより、原料として用いたヘミアセタール体 **32** とオキサゾリン体 **27** のピークの積分比から算出した。TAMRA 修飾4糖誘導体 **32** のオキサゾリン体への変換率は97%であった。

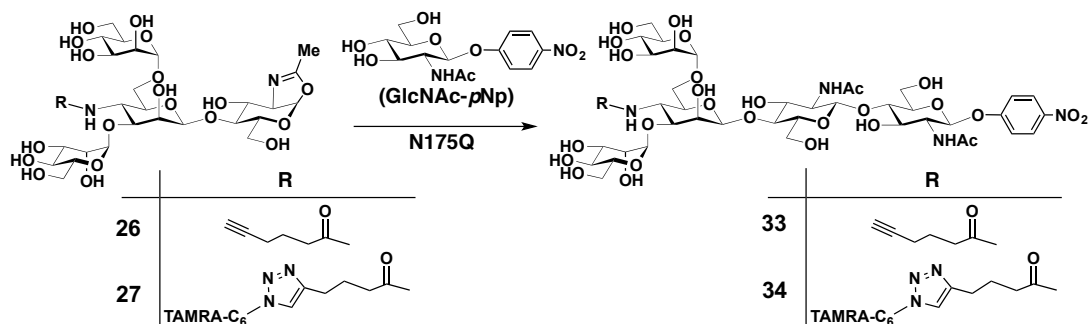




Scheme 2-10. 化学修飾4糖オキサゾリン誘導体の合成

### 化学修飾した $\beta$ -マンノシド型4糖の糖転移反応

$\beta$ -マンノシド型4糖のC-4位に化学修飾した糖鎖がENGaseの基質になり糖転移反応が進行するか確認した。合成した4糖オキサゾリン誘導体を糖供与体として、酵素には変異体酵素 Endo-M-N175Q を用い、糖受容体には、UV 検出が可能な *p*NP-GlcNAc を用いた (Scheme 2-11)。



Scheme 2-11. 化学修飾4糖オキサゾリン誘導体の糖転移反応

Alkyne-oxa **26** を用いた糖転移反応は、先に述べた糖転移反応と同じ条件 (6 mM Alkyne-oxa **26**、2 mM *p*NP-GlcNAc、Endo-M-WT (10 μg)、220 mM リン酸バッファー (pH 7, 20 μL) ) で行い、各時間の溶液を HPLC にて分析した (Figure 2-15)。その結果、糖受容体の *p*NP-GlcNAc のピークより早い保持時間に新たなピークの生成を確認した。得られたピークを逆相 HPLC にて精製し、NMR スペクトル、MALDI-TOF-MS により構造を確認した結果、アルキン修飾糖鎖が転移した5糖 **33** であることが確認された。一方、TAMRA-oxa **27** を用いた糖転移反応は、検出感度が高いため、Alkyne-oxa **26** を実験に対して、基質濃度を 15 分の 1 にした 0.4 mM の TAMRA-oxa **27** を用いて行った (Figure 2-16)。その結果、糖供与体 **27** のピークより遅い保持時間を示す新たなピークの生成を確認した。新たなピークは逆相 HPLC にて精製し、NMR スペクトル、MALDI-TOF-MS より糖転移生成物 **34** であると確認した。これらの結果から、C-4 位修飾4糖を基質としても変異型 Endo-M が基質として認識し、糖転移生成物を与えることが明らかとなった。

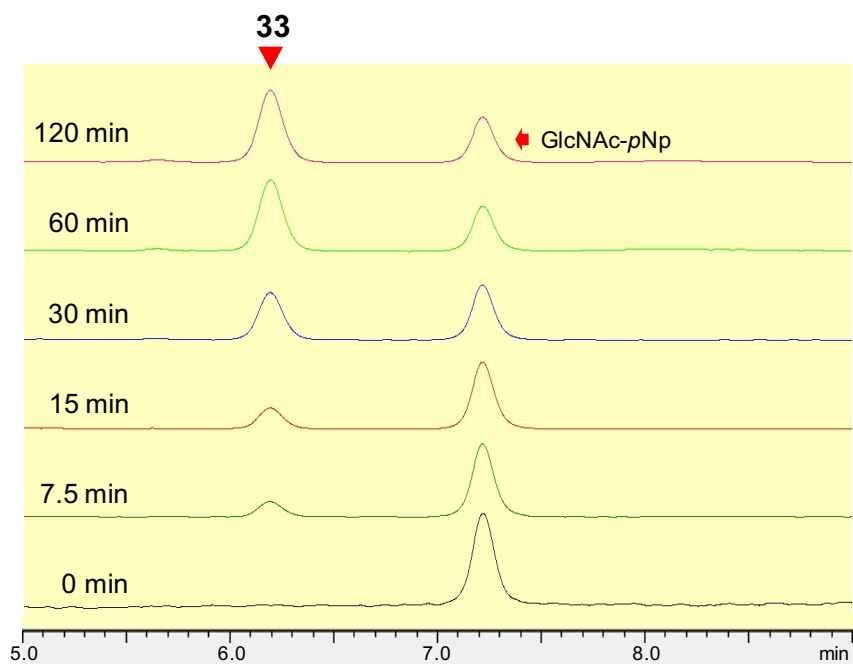


Figure 2-15. Alkyne-oxa (**26**)の N175Q による糖転移反応の HPLC クロマトグラム 反応条件: 6 mM Alkyne-oxa (**26**), 2 mM GlcNAc-*p*Np, 200 mM リン酸バッファー (pH 7, 20  $\mu$ L), 1  $\mu$ g N175Q, 30  $^{\circ}$ C. 分析条件: YMC-Pack Diol-60 (YMC.Co.,Ltd., 300 x 4.6 mm).D.S-5  $\mu$ m, 6 nm), H<sub>2</sub>O, 0.5 mL/min, UV 260 nm.

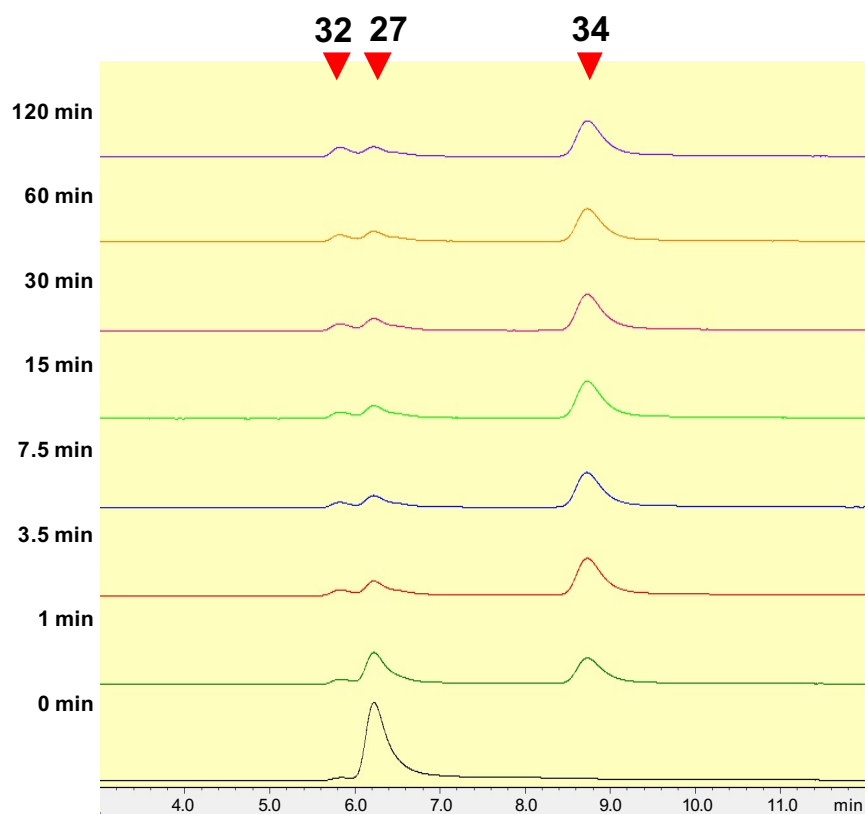


Figure 2-16. TAMRA-oxa (**27**)の N175Q による糖転移反応の HPLC クロマトグラム 反応条件: 0.4 mM TAMRA-oxa (**27**), 4 mM GlcNAc-*p*Np, 220 mM リン酸バッファー (pH 7, 10  $\mu$ L), 2  $\mu$ g N175Q, 30  $^{\circ}$ C. 分析条件: TOSOH TSKgel ODS-120H 3  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm, H<sub>2</sub>O / MeOH = 40 / 60 0.1% Et<sub>3</sub>N, 15 min, 0.5 mL / min, 蛍光検出 (ex) = 543 nm, (em) = 571 nm.

## 第 6 節 まとめ

本章では、ENGase の糖鎖基質に対する認識について、分岐部分のマンノース残基の C-4 位は ENGase による認識が低いのではないかという仮説を立て、合成糖鎖を用いて ENGase の認識について確認した。そして、得られた知見をもとに分岐部分のマンノース残基の C-4 位を化学修飾した基質を合成し、糖転移反応が進行するか確認した。*N*-型糖鎖のコア分岐部分の水酸基の配向が異なる 4 種類の 4 糖基質を合成し、Endo-M、変異体 N175Q および

N175A による糖転移反応を解析した結果、天然型の  $\beta$ -マンノース型と C-4 位水酸基の配向が異なる  $\beta$ -タロース型 4 糖が同じ傾向を示したことから、糖転移反応にはアキシヤル配向の C-2 位水酸基が重要で、一方、分岐部分に相当する糖残基の C-4 位部分は予想した様に ENGase による認識が弱いと結論づけた。次に、得られた知見をもとに分岐部分の C-4 位を化学修飾基としてアルキンおよび TAMRA を導入した糖鎖基質を合成し、糖転移反応を試みた結果、糖転移生成物が得られた。以上のことより、分岐部分のマンノース残基の C-4 位を修飾しても糖転移すること、さらに TAMRA のような大きな置換基を導入することも可能なことが明らかとなった。

これらの結果は、糖鎖の分岐部分を化学修飾した基質が ENGase の基質となり、糖転移生成物を与えることを初めて示したものであり、化学修飾した糖タンパク質合成の可能性を広げる興味深い成果である。

## 第3章 蛍光修飾糖鎖を用いた糖転移活性検出系の構築

### 第1節 はじめに

ENGase の糖転移活性は、糖タンパク質の糖鎖リモデリングなど、様々な糖鎖結合化合物の合成に利用されている。しかし、糖転移反応を高感度かつ簡便に検出するアッセイ系はない。そこで、前章にて糖鎖基質上で修飾可能な位置として糖鎖分岐部分の  $\beta$ -マンノース残基の C-4 位を見出し、蛍光性置換基を有する糖鎖を基質として糖転移反応の進行を確認した結果をもとに、糖転移活性を蛍光により高感度で検出するアッセイ系の構築を検討した。

### 第2節 糖転移反応を検出する糖鎖プローブの開発

#### これまでの糖転移活性の検出法

ENGase の糖転移反応の確認は、一般的にはラベル化した糖受容体と転移生成物を HPLC や TLC、タンパク質の場合は SDS-PAGE など検出することで確認される。混合物のまま検出する方法として質量分析法も用いられる。しかし、質量分析法は、酵素反応でバッファーを使用するため、バッファー由来の塩が感度に影響することもあり難しい。また、これらの方法では酵素反応をリアルタイムで追跡することや多サンプルの分析には不向きである。このような背景から、Wang らは2つの酵素を利用した2段階反応により糖転移活性を検出するアッセイ系を構築した (Figure 3-1) [76]。すなわち、蛍光基を還元末端にもつ GlcNAc 受容体に対して、ENGase が糖鎖を転移すると、糖転移生成物がキチナーゼ (Chitinase) の基質になることを利用して、還元末端部分に結合している蛍光基が遊離する系を考案した。この蛍光基は糖鎖に結合した状態では蛍光を示さず、加水分解されると蛍光を発するので、その蛍光強度を測定することで ENGase の糖転移活性を間接的に検出できる。このアッセイ系により、感度良く糖転移活性の有無を検出することが可能になった。しかし、この方法

はキチナーゼの活性に影響を受けるため、過剰にキチナーゼを用いる必要がある。また、ENGase の糖転移反応は、糖転移生成物の加水分解反応も競合して起こるが、その過程は検出できない。そのため、ENGase の糖転移反応をリアルタイムに直接検出する方法が必要となる。

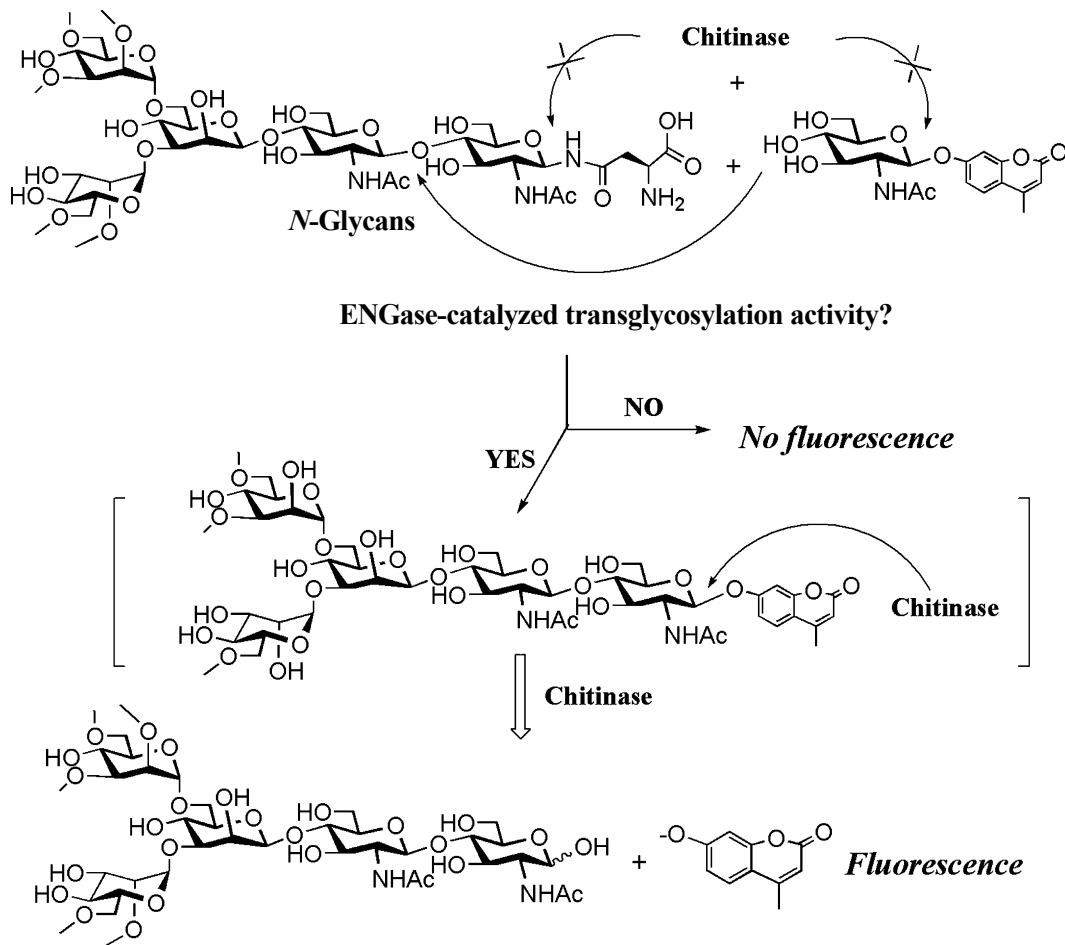


Figure 3-1. 2段階酵素反応を利用した ENGase の糖転移活性検出系 (文献[74]より抜粋)

### フェルスター型共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用した糖転移活性の検出法

前節にて蛍光基として TAMRA を修飾した糖鎖が Endo-M-N175Q により *p*NP-GlcNAc に対して糖転移することを明らかにした。この結果から、フェルスター型共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用して、TAMRA の FRET ペアとなる蛍光基を GlcNAc 受容体に導入す

れば、FRET による蛍光の変化を測定することで、転移反応が追跡できるのではないかと考えた。FRET は、蛍光分子 (FRET ドナー) の蛍光スペクトルともうひとつの蛍光分子 (FRET アクセプター) の励起スペクトルに重なりがある場合に、FRET ドナーの励起エネルギーが FRET アクセプターに移動することで FRET アクセプターが励起されて蛍光を生じる現象である。FRET は 2 つの蛍光分子が近接した距離 (10~100Å) に存在する場合に起こることから、糖鎖基質を蛍光修飾することで糖転移前では、FRET は観測されず、糖転移生成物でのみ FRET が観測されると考えた。

そこで、TAMRA の FRET ドナーとなる蛍光性置換基である 5-カルボキシフルオレセイン (FAM) を GlcNAc 受容体に導入することとした (Figure 3-2)。

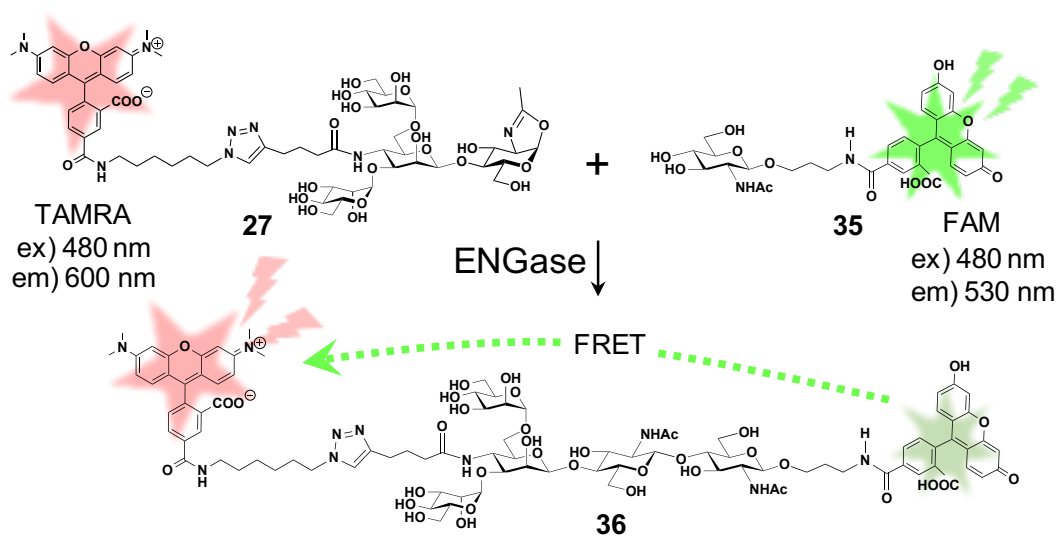


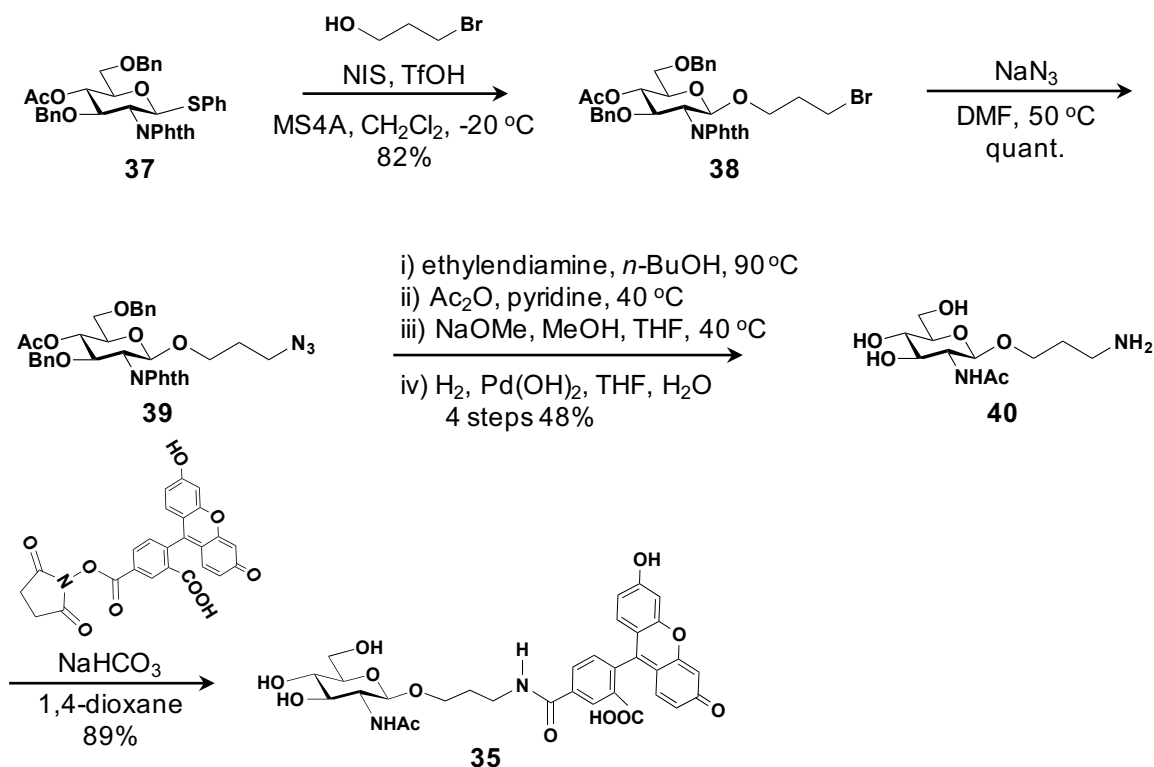
Figure 3-2. 蛍光修飾糖鎖を用いた ENGase 糖転移反応の検出系

### 還元末端に FAM 基を導入した単糖受容体の合成

糖転移反応の糖受容体として利用する FAM を有する糖受容体基質の合成を行った (Scheme 3-1)。まず、GlcNAc 誘導体 **37** を 3-ブromo-1-プロパノールとカップリングした後、アジ化ナトリウムを DMF 溶媒中、反応させることで、アジド基を有する化合物 **39** を



得た。化合物 **39** の保護基を除去することでアミノ基を有する GlcNAc 誘導体 **40** を得た。  
 得られた化合物 **40** のアミノ基に 5-カルボキシフルオレセイン *N*-スクシンイミジルを反応  
 させることで、GlcNAc-FAM **35** を得た。



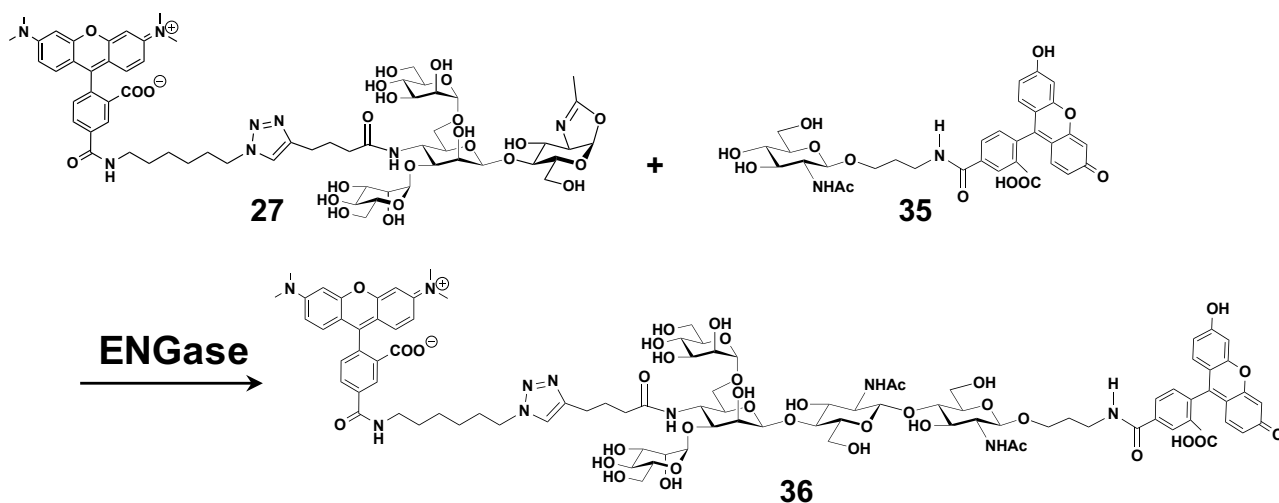
Scheme 3-1. GlcNAc-FAM 誘導体 **35** の合成

### HPLC による糖転移反応の検出

TAMRA-4 糖オキサゾリン誘導体 **27** と GlcNAc-FAM **35** を用いて、Endo-M-N175Q の糖転移反応を行い、HPLC にて反応の進行を確認した (Scheme 3-2)。

反応混合液 (267  $\mu\text{M}$  TAMRA-oxa **27**、67  $\mu\text{M}$  GlcNAc-FAM **35**、Endo-M-N175Q (0.1  $\mu\text{g}$ )、330 mM リン酸バッファー (pH 7, 10  $\mu\text{L}$ ) ) を調製し、30  $^\circ\text{C}$  でインキュベートした。反応液 (1  $\mu\text{L}$ ) を 0, 1, 3, 7.5, 15, 30, 60, 120 分ごとに分取し、アセトニトリル (9  $\mu\text{L}$ ) に

混合することで反応を停止した。各反応時間の溶液を HPLC にて分析した結果を Figure 3-3 に示す。UV 吸収で検出した HPLC クロマトグラムから、TAMRA-oxa **27** と GlcNAc-FAM **35** のピークの間 9.5 分に新たなピークが確認され、反応時間の経過とともに増加した (Figure 3-3A)。また、TAMRA-oxa **27** は、時間とともにオキサゾリン環が開環し、ヘミアセタール **32** へと変換された。9.5 分のピークは TAMRA の蛍光で検出したクロマトグラムからも確認できた (Figure 3-3B)。一方、FAM の励起波長で励起し、FAM の蛍光で検出したクロマトグラム (Figure 3-3C) では、新規ピーク **36** の蛍光強度と GlcNAc-FAM **35** の蛍光の相対強度が、Figure 3-3A の UV 検出の場合に比べて小さいことより FAM から TAMRA へのエネルギー移動が示唆された。この FRET は、FAM の吸収波長で励起し、TAMRA の蛍光波長で検出したクロマトグラムにおいて新規ピークが検出されたことから確認された (Figure 3-3D)。以上の結果から、糖転移生成物に相当する 5 糖 **36** では分子内 FRET、すなわち、FAM の蛍光が TAMRA へのエネルギー移動によって消光され、TAMRA の蛍光が観察されることが示された。



Scheme 3-2. TAMRA-oxa **27** の GlcNAc-FAM **35** への糖転移反応

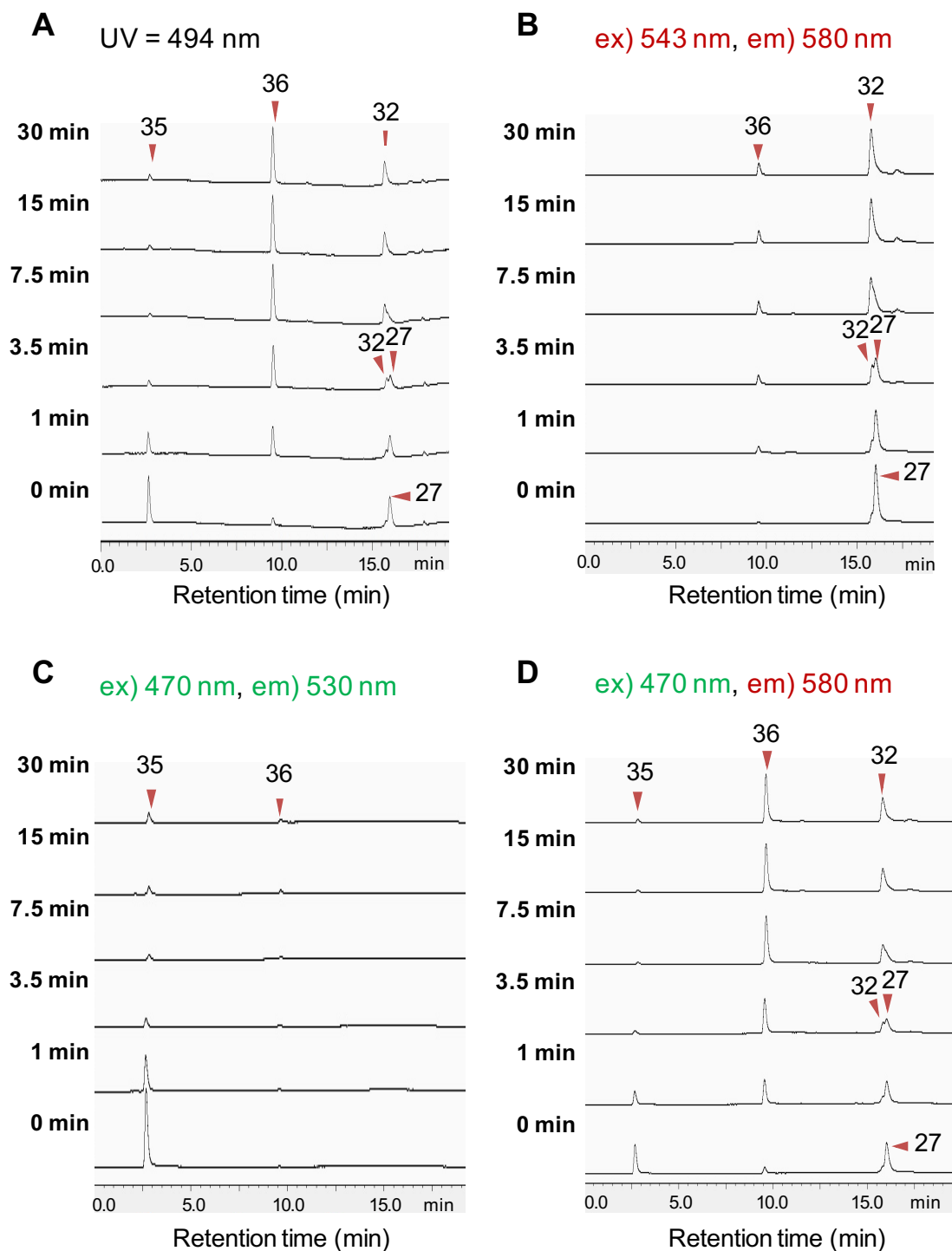


Figure 3-3. 糖転移反応の HPLC クロマトグラム. 分析条件: TOSOH TSKgel ODS-120H 3  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm, H<sub>2</sub>O / MeOH = 40 / 60 0.1% Et<sub>3</sub>N, 15 min, 0.5 mL / min, (A) UV = 494 nm; 蛍光検出 (B) ex) = 543 nm, em) = 580 nm; (C) ex) = 470 nm, em) = 530 nm; (D) ex) = 470 nm, em) = 580 nm.

## 蛍光測定による糖転移反応の検出

HPLCにて糖転移反応の進行が確認され、さらに FRET が観察されたので、プレートリーダーを用いて糖転移活性が検出できるか確認した。先の実験と同じ条件で糖転移反応を行い (267  $\mu$ M TAMRA-oxa **27**、67  $\mu$ M GlcNAc-FAM、Endo-M-NI75Q (0.1  $\mu$ g) 、330 mM Phosphate buffer (pH 7, 10  $\mu$ L) )、反応液 (1  $\mu$ L) を 0, 1, 3, 7.5, 15, 30, 60, 120 分ごとに分取した。各時間の反応液を FAM の吸収波長で励起し、TAMRA の蛍光波長で検出、HPLC での反応追跡結果と同様に TAMRA の蛍光強度の上昇が確認できるか確認した。その結果、TAMRA の蛍光強度の増加は確認できなかった (Figure 3-4A)。その原因は、FAM の蛍光に由来するバックグラウンド蛍光が高いためと考えられた。バックグラウンドの比が HPLC の様子と異なる理由は、反応液と HPLC の溶出溶媒では溶媒の組成、pH、プローブの濃度が異なるために FRET 効率が低くなっていることが考えられた。励起波長と検出波長の組み合わせを種々検討したが TAMRA の蛍光強度の増加を確認することはできなかった。FRET 効率向上のために、TAMRA をリンカーを介さず、4 糖の分岐部分のアミノ基に直接導入し FAM-TAMRA 間の距離を短くすることを試みたが、分岐部分のアミノ基に TAMRA が導入された化合物を得ることはできなかった。これは、TAMRA が大きい分子であるために、立体障害により反応が進行しなかったと考えた。一方、HPLC による酵素反応追跡の際、FAM の蛍光強度が有意に低下、TAMRA によりクエンチングされていることが観察されていたことから、FAM の消光で転移反応の追跡ができると考えた。そこで、先の酵素反応液を FAM の蛍光波長をプレートリーダーで測定したところ、反応時間の経過とともに蛍光強度が小さくなることが明らかとなった (Figure 3-4B)。すなわち、FAM の蛍光強度の減少度が糖転移率と相関していることが示された。

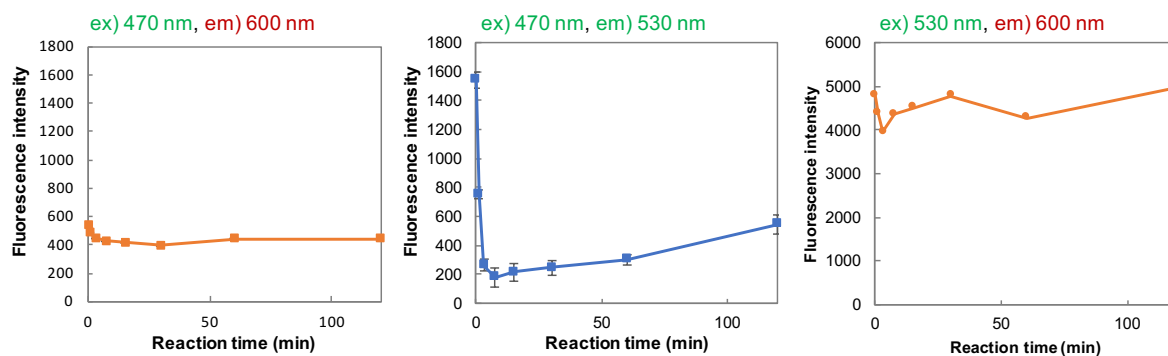


Figure 3-4. 各反応時間における反応液の蛍光強度変化

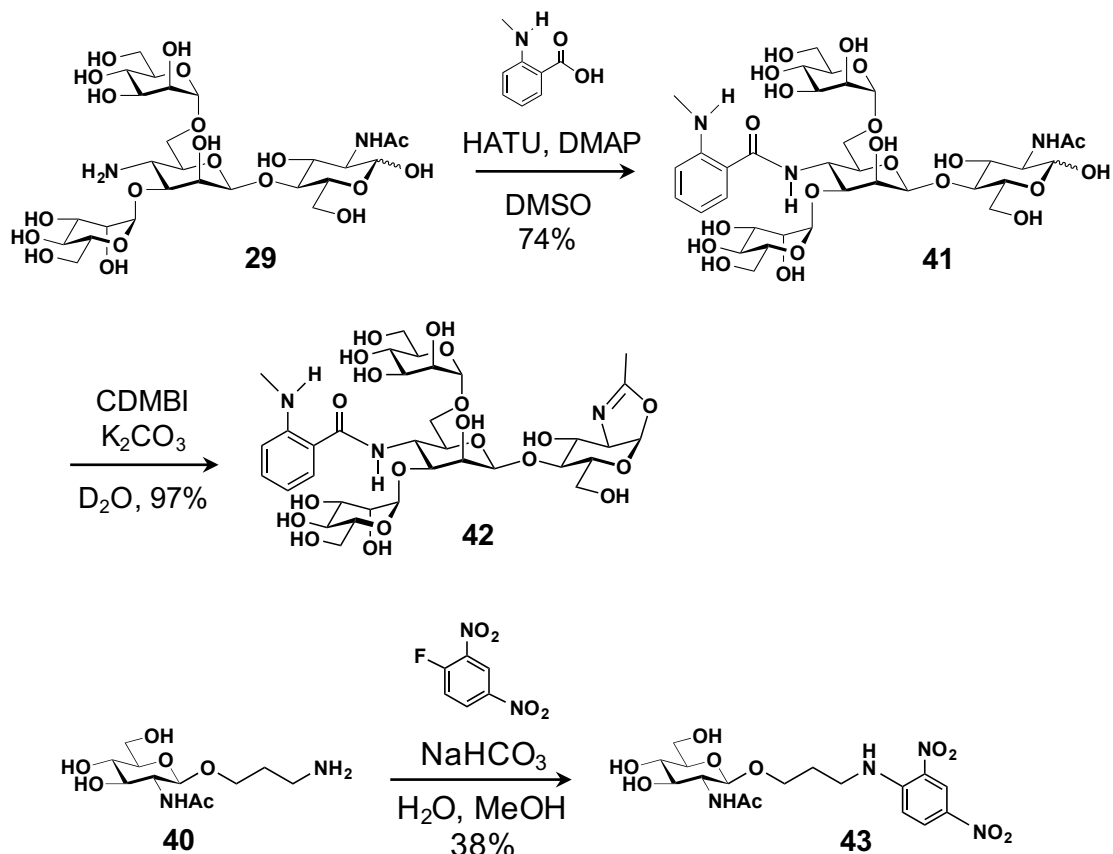
### FRET クエンチングによる糖転移反応の検出

ENGase の糖転移活性を FAM に由来する蛍光のクエンチングを検出することで追跡できることが示された。そこで、より単純化した FRET クエンチングによる糖転移活性検出系を構築するために FRET ペアーとして、新たに蛍光基として *N*-メチルアントラニル (Nma) 基と消光基として 2,4-ジニトロフェニル (Dnp) 基の組み合わせを選択し、糖鎖基質に導入することとした。この FRET ペアーはペプチド鎖上に導入することでプロテアーゼの活性検出プローブに利用されていることから、糖鎖にも適応できると考えた[77,78]。糖鎖の非還元末端に導入した TAMRA は、分子サイズが大きいため、立体障害により糖鎖の分岐部分の C-4 位のアミノ基に対して直接導入することが困難であった。蛍光基として小さい分子を選択することで、C-4 位のアミノ基に直接導入し、蛍光基と消光基の距離を短くできると考えた。そこで Nma を修飾した 4 糖 **41** および Dnp 基を有する GlcNAc 誘導体 **42** の合成を行った。

### Nma 修飾 4 糖および Dnp 修飾 GlcNAc 誘導体の合成

アミノ基を有する 4 糖 **29** および GlcNAc 誘導体 **40** にそれぞれ Nma 基、Dnp 基を導入した。(Scheme 3-3) 4 糖アミノ体 **29** の非還元末端部分のアミノ基に対して *N*-メチルア

ントラニル酸を HATU、DMAP により縮合させることで Nma 4 糖 **41** を 74% で得た。得られた 4 糖 **41** は CDMBI を縮合剤として用いることでオキサゾリン化した。一方、単糖誘導体は、化合物 **40** のリンカー部分のアミノ基に対して 2,4-ジニトロフェニルフルオリドを反応させることで収率 38% で GlcNAc-Dnp **43** へと導いた。



Scheme 3-3. Nma 修飾 4 糖オキサゾリン **42** および GlcNAc-Dnp **43** の合成

### プレートリーダーを用いたリアルタイムでの糖転移反応の検出

Nma 修飾 4 糖オキサゾリン **42** および Dnp 修飾 GlcNAc **43** を用いてプレートリーダーにより糖転移反応をリアルタイムに直接検出できるか確認した。

化合物 **42** および **43** の混合溶液 (5  $\mu$ M Nma4 糖-oxa **42**, 50  $\mu$ M GlcNAc-Dnp **43**, 40 mM リン酸バッファー (pH 7, 50  $\mu$ L) に 20 ng の Endo-M-N175Q を加え、30  $^{\circ}$ C で反応さ

せた。反応の進行はマイクロプレートリーダーにより追跡した。Figure 3-5 に示すように反応時間とともに蛍光強度の減少が確認された。したがって、FRET クエンチングを利用することで、ENGase の糖転移活性をリアルタイムに検出できることを示した。

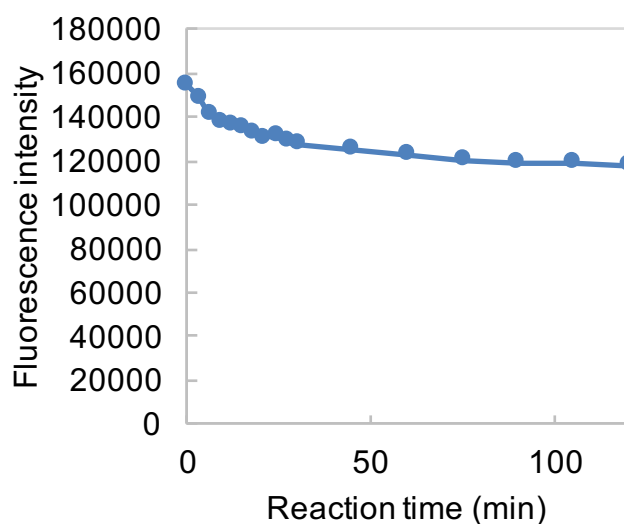


Figure 3-5. 反応液の蛍光強度の経時変化. 反応条件: 5  $\mu$ M Nma4 糖-oxa **42**, 50  $\mu$ M GlcNAc-Dnp **43**, 40 mM リン酸バッファー (pH 7, 50  $\mu$ L), 20 ng Endo-M-N175Q, 30  $^{\circ}$ C, 2h, 蛍光検出 ex) 340 nm, em) 440 nm.

### 第3節 まとめ

ENGase の糖転移活性を検出するアッセイ系の開発を目的として TAMRA-FAM の FRET 系を構築するために還元末端部分に FAM を有する GlcNAc 誘導体を合成した。TAMRA 修飾 4 糖ドナーを FRET ペアとなる FAM を有する GlcNAc 受容体に対して糖転移させることで、HPLC を用いた解析では、FAM 励起-TAMRA 蛍光で検出する FRET により糖転移反応の追跡が可能であることを示すことができた。一方、プレートリーダーを用いた酵素反応混合物では、FAM 由来のバックグラウンド蛍光により TAMRA の蛍光測定による酵素反応追跡はできなかった。しかし、FAM-TAMRA による FRET クエンチングを利用すれば、蛍光測定により ENGase の糖転移活性を検出できることを示した。また、Nma-Dnp の組み合

わせを糖鎖基質上に導入し、Nmaに由来する蛍光のFRETクエンチングを追跡することで、糖転移反応をリアルタイムに直接検出できることを示した。プレートリーダーを用いた酵素反応追跡では蛍光の増加を検出する系の方が利用しやすい。本研究では実現できなかったが、FRET-クエンチングが観測できたことにより、今後、クマリン誘導体とフルオレセイン誘導体のペアや蛍光寿命の長いランタノイド系錯体など蛍光性置換基を種々検討することで蛍光強度の増加による糖転移反応の高感度検出系の構築が可能になると考えている。



## 第4章 FRET クエンチングを利用した ENGase の加水分解 活性検出系の構築

### 第1節 はじめに

ENGase の加水分解活性の測定は SDS-PAGE や HPLC、MS、TLC により確認されており、リアルタイムの活性検出や多サンプルの活性検出には不向きであった。前章にて蛍光基を導入した糖鎖基質が ENGase により GlcNAc 誘導体に糖転移することを見出した。その過程で、蛍光基を有する 4 糖オキサゾリン誘導体を FRET ペアとなる蛍光基を有する糖受容体に転移させると FRET ドナーの蛍光が消光することを見出した。この結果から、通常は消光しており ENGase による糖鎖基質の加水分解反応によって蛍光を発するプローブが開発できると考えた。そこで、本章では ENGase の加水分解活性を検出する糖鎖プローブの合成と本プローブを用いた ENGase の活性検出について述べる。

### 第2節 ENGase 加水分解活性を検出する 5 糖プローブの合成

#### 糖鎖分子プローブの設計と合成戦略

ENGase の活性を簡便に感度良く検出するために、FRET クエンチングを利用することで糖鎖が切断されると、蛍光発光するアッセイ系の構築を行なった (Figure 4-1)。これにより、生成物の分離操作が不要となり、反応液の蛍光強度を測定することで、加水分解反応の進行が確認できると考えた。そこで、プローブデザインとして、前章で FRET クエンチングが確認できている蛍光基の *N*-メチルアントラニル基 (Nma)、消光基の 2,4-ジニトロフェニル基 (Dnp) を 5 糖上に導入することとした。

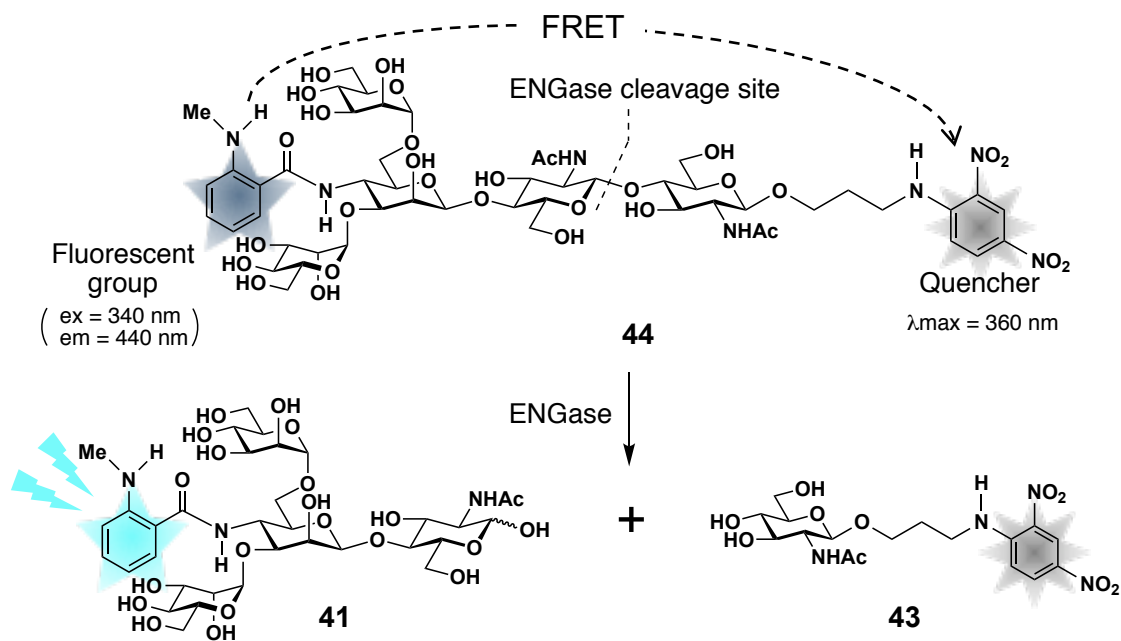


Figure 4-1. 5糖分子プローブを用いた ENGase の加水分解活性検出

Nma 基は蛍光性置換基としては他の蛍光基に比べて価格が安いこと、糖鎖プローブを大量に合成する際のコスト削減につながる。また、糖鎖基質上に導入する置換基はできる限り小さい方が酵素活性への影響が小さいと考えられ、Nma 基は構造的に小さいため望ましい蛍光基であると判断した。Nma 基は、前章までに述べた様に糖鎖基質上で化学修飾が可能な分岐部分の  $\beta$ -マンノース残基の C-4 位に導入し、消光基は還元末端部分にリンカーを介して Dnp 基を導入することとした。5糖プローブ **44** の合成戦略を Figure 4-2 に示した。

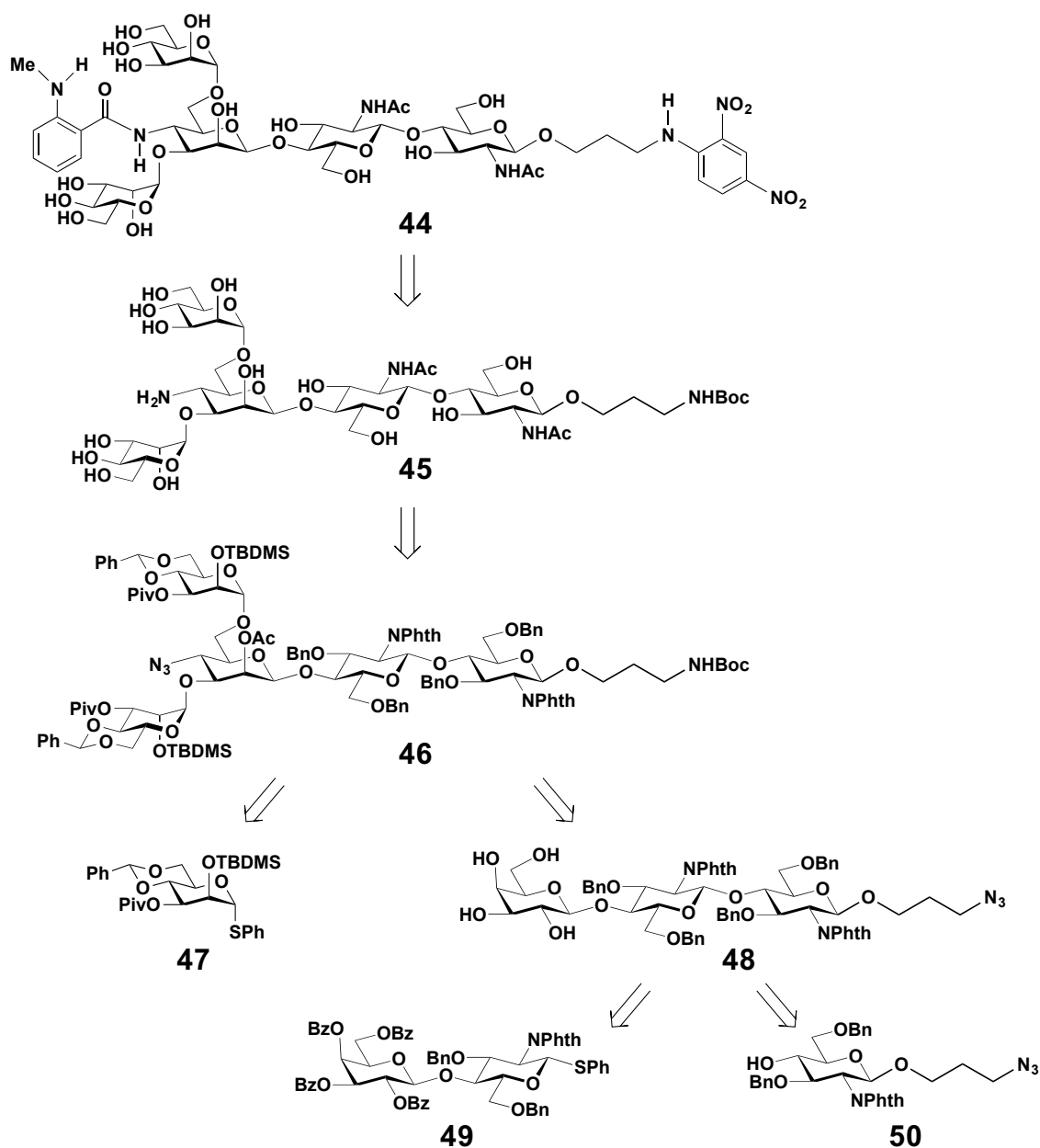


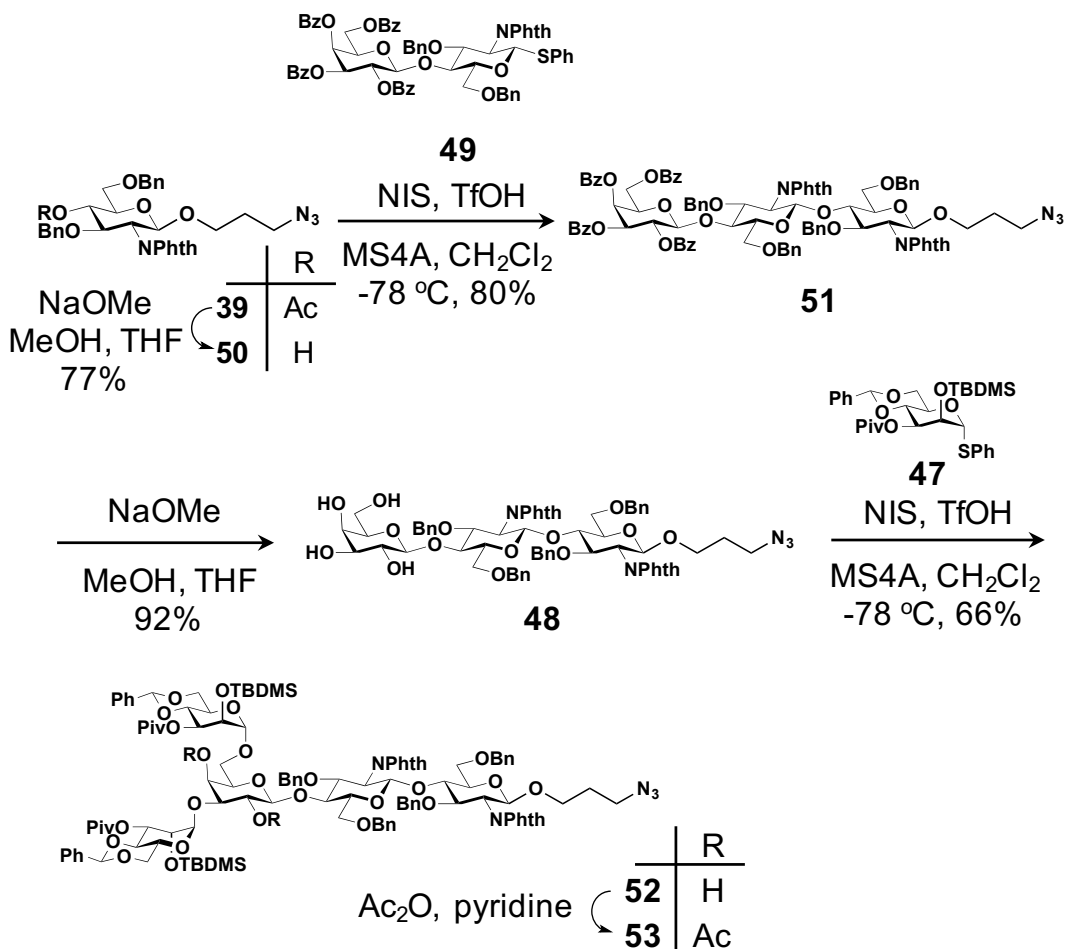
Figure 4-2. Boc 基を利用した 5 糖プローブの合成戦略

$\beta$ -マンノース残基の C-4 位に蛍光基を、還元末端側に消光基を、それぞれアミノ基を介して導入するために非還元末端部分と還元末端部分にアミノ基が必要となる。さらに二つのアミノ基を区別する必要があるため、還元末端部分のアミノ基を Boc 基で保護した 5 糖誘導体 **45** の合成を計画した。糖鎖骨格の構築は、ブromoプロパノールを GlcNAc の 1 位に導入した後、アジド基を導入した単糖誘導体 **50** に対し、ラクトサミン誘導体 **49** を結合するこ

とで3糖とすることとした。その後、マンノース誘導体 **47** を3糖誘導体 **48** のガラクトース残基の3位と6位に導入、5糖骨格を構築する。その後、還元末端部分のアジド基を還元、アミノ基としたのちに Boc 基で保護、分岐部分の C-4 位水酸基をアジド基へと変換、Boc 基以外の保護基を除去することで、非還元末端部分にアミノ基、還元末端部分に Boc 基で保護されたアミノ基を有する5糖誘導体を得られると考えた。

### 5糖骨格の構築

5糖の合成に用いる3糖受容体 **48** は、前章で合成したアジドリンカーを有する GlcNAc 誘導体 **39** と2糖供与体 **49** から合成した。すなわち、化合物 **39** の4位のアセチル基を除去した後、ラクトサミン供与体 **49** を NIS、TfOH 存在下、グリコシル化し、3糖誘導体 **51** を2段階収率 62% で合成した。化合物 **51** のベンゾイル基を除去し、3糖受容体 **48** を収率 92% で得た (Scheme 4-1)。次に、3糖誘導体 **48** の4ヶ所の水酸基に対して、マンノース供与体 **47** のグリコシル化反応を試みた。1当量の3糖受容体 **48** に対して2.1当量のマンノース供与体 **47** を NIS、TfOH 活性化剤として用いて反応させた。その結果、マンノース残基がガラクトース残基の3位と6位に位置選択的に結合した5糖誘導体 **52** を収率 66% で得た。得られた化合物の構造は5糖誘導体 **52** をアセチル化した5糖誘導体 **53** の2次元 NMR スペクトルより決定した。ガラクトース残基の2位および4位のプロトンが低磁場シフトしたことから、マンノース残基が3、6位に導入されたと決定した。結合の立体はマンノース残基のアノメリック位のプロトンとカーボンの結合定数がどちらも  $^1J_{\text{C-H}} = 173 \text{ Hz}$  であったことから2つのマンノシド結合の立体は  $\alpha$  結合であると決定した。

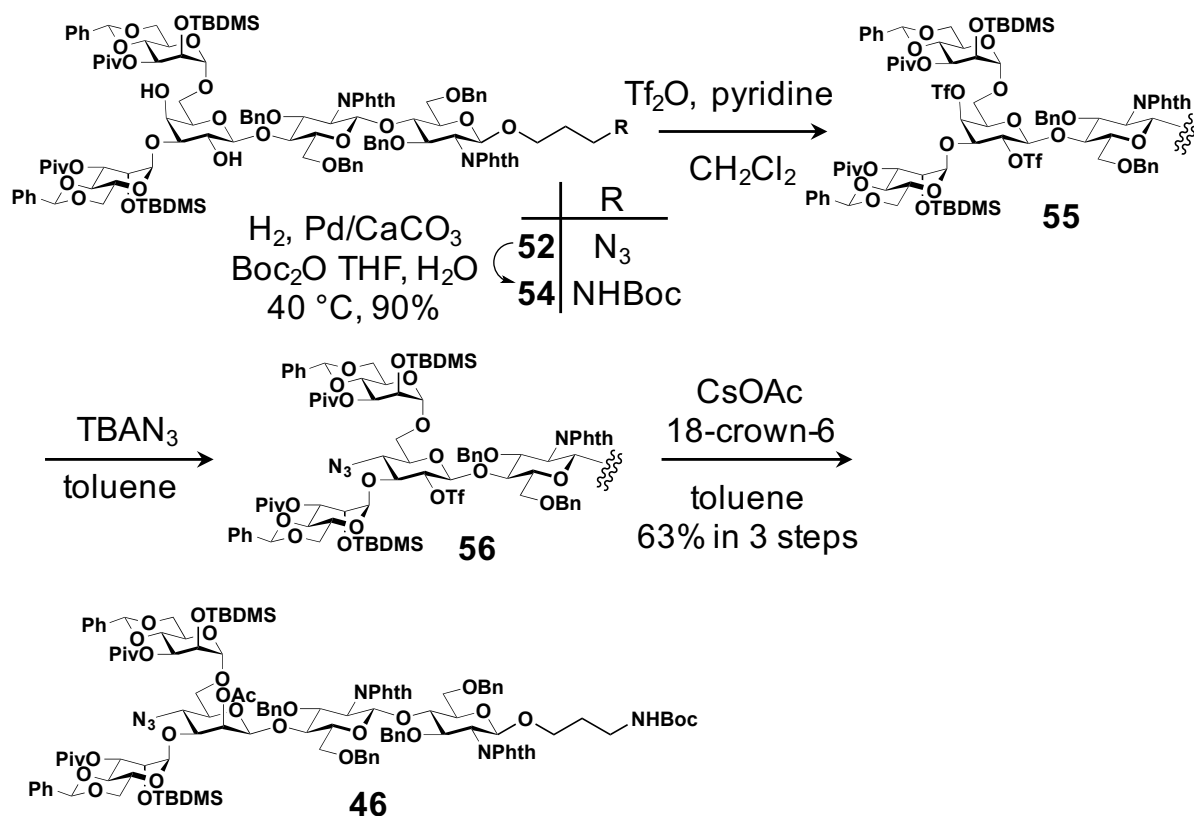


Scheme 4-1. 位置および立体選択的グリコシル化反応による 5 糖骨格の構築

### アジド基を有する $\beta$ -マンノシド型 5 糖の合成

得られた 5 糖誘導体 **52** の還元末端のアジド基を還元し、Boc 基で保護した後、ガラクトース残基の 2 および 4 位の水酸基の立体を反転することでアジド基を有するマンノシド誘導体 **46** への変換を行った (Scheme 4-2)。すなわち、5 糖誘導体 **52** のアジド基をリンドラー触媒を用いてアジド基のみを選択的にアミノ基へと還元、反応系中に  $\text{Boc}_2\text{O}$  を共存させることで還元と同時に Boc 基の導入を行ない[79]、5 糖誘導体 **54** へと導いた。得られた 5 糖 **54** の遊離の 2, 4 位の水酸基に Tf 基の導入を行なった。この反応では、 $\text{NHBoc}$  基部分が Tf 化された副生成物が得られることによる収率の低下が見られた。低温での反応を検討

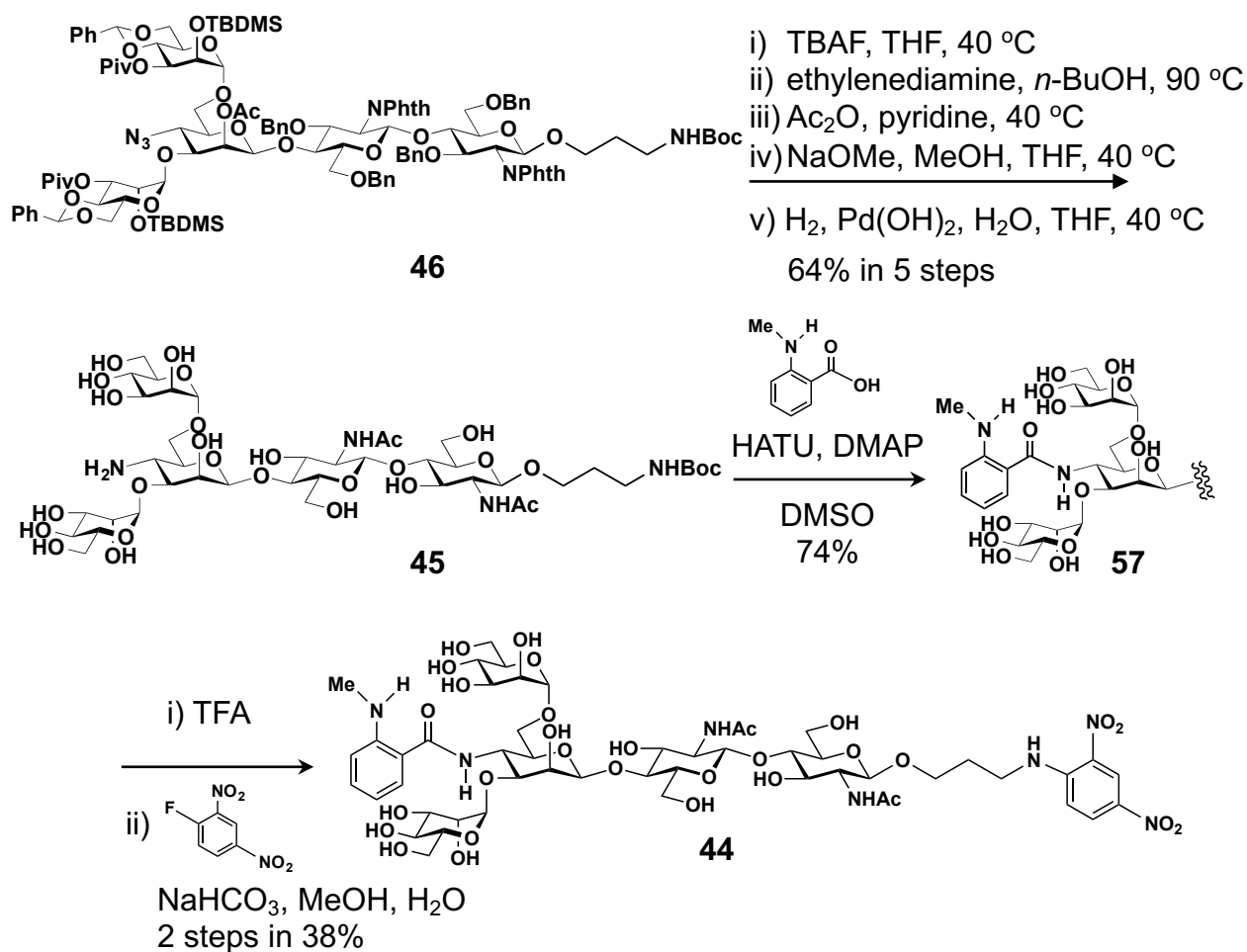
したが、副反応の制御はできず収率の向上はできなかったが、得られた化合物を用いて、次の反応を進めることとした。得られた Tf 体 **55** をトルエン溶媒中、室温にてテトラブチルアンモニウムアジドにより反応させることで、4 位にのみ選択的にアジド基を導入 **56** とした。その後、酢酸セシウム、18-クラウン 6-エーテルを用いて超音波処理することで、2 位水酸基がマンノース配置へと変換された 5 糖誘導体 **46** を 3 段階収率 63% で得た。得られた化合物の構造は 2 次元 NMR および MALDI-TOF-MS にて決定した。



Scheme 4-2. 反転反応による 4 位アジド基の導入

#### 5 糖誘導体の脱保護反応と蛍光基、消光基の導入

5 糖誘導体 **46** の脱保護反応を行い、その後、蛍光性置換基と消光基を導入することで、5 糖プローブ **44** へと導いた (Scheme 4-3)。



Scheme 4-3. 蛍光基および消光基の導入による5糖プローブ **44** の合成

非還元末端部分の $\alpha$ -マンノシド結合したマンノース残基上の2位 TBDMS 基をテトラブチルアンモニウムフルオリドにより除去、続いてエチレンジアミンによりフタルイミドを除去、*N*-アセチル化、水酸基に導入されたアセチル基を除去した。得られたアセトアミド体を精製後、水素による接触還元によりベンジリデン基、ベンジル基の除去およびアジド基のアミノ基への変換を行い、5段階収率64%で **45** を得た。得られたアミノ基に対して *N*-メチルアントラニル酸を HATU、DMAP により縮合させることで、蛍光性置換基を導入、収率74%で **57** を得た。その後、トリフルオロ酢酸にて Boc 基を除去し、生じたアミノ基に対して2,4-ジニトロフェニルフルオリドを反応させることで目的とした5糖プローブ

ブ **44** を 2 段階収率 38% で得た。得られた化合物は  $^1\text{H}$  NMR および HR-MS にて構造決定した (Figure 4-3)。

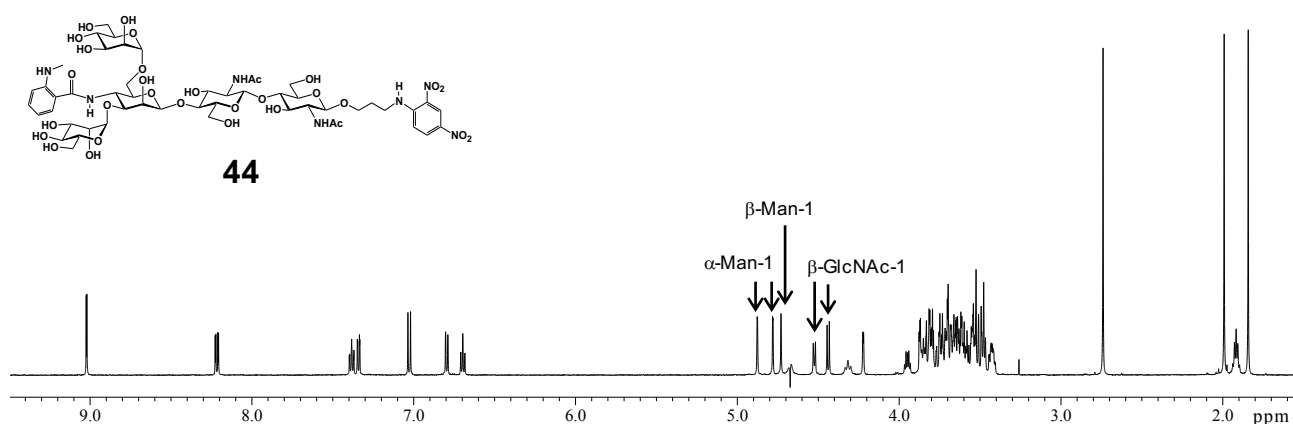


Figure 4-3. 5 糖プローブ **44** の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

### 5 糖プローブの光特性

前章にて Nma-Dnp の組み合わせで FRET クエンチングにより Nma の蛍光が小さくなることは確認できている。そこで、合成した基質を用いて 5 糖プローブがどの程度 FRET クエンチングにより消光しているかを定量的に解析することとした。5 糖プローブ **44** および前章で合成した加水分解生成物として得られる Nma-4 糖誘導体 **41**、GlcNAc-Dnp 誘導体 **43** の吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを測定した (Figure 4-4)。また、5 糖プローブに導入した Nma 基と Dnp 基との距離の計算値を Chem3D により求めたところ、約 23 Å であったことから、両置換基は FRET を示す距離である 10-100 Å の範囲内に存在していることも確認した。



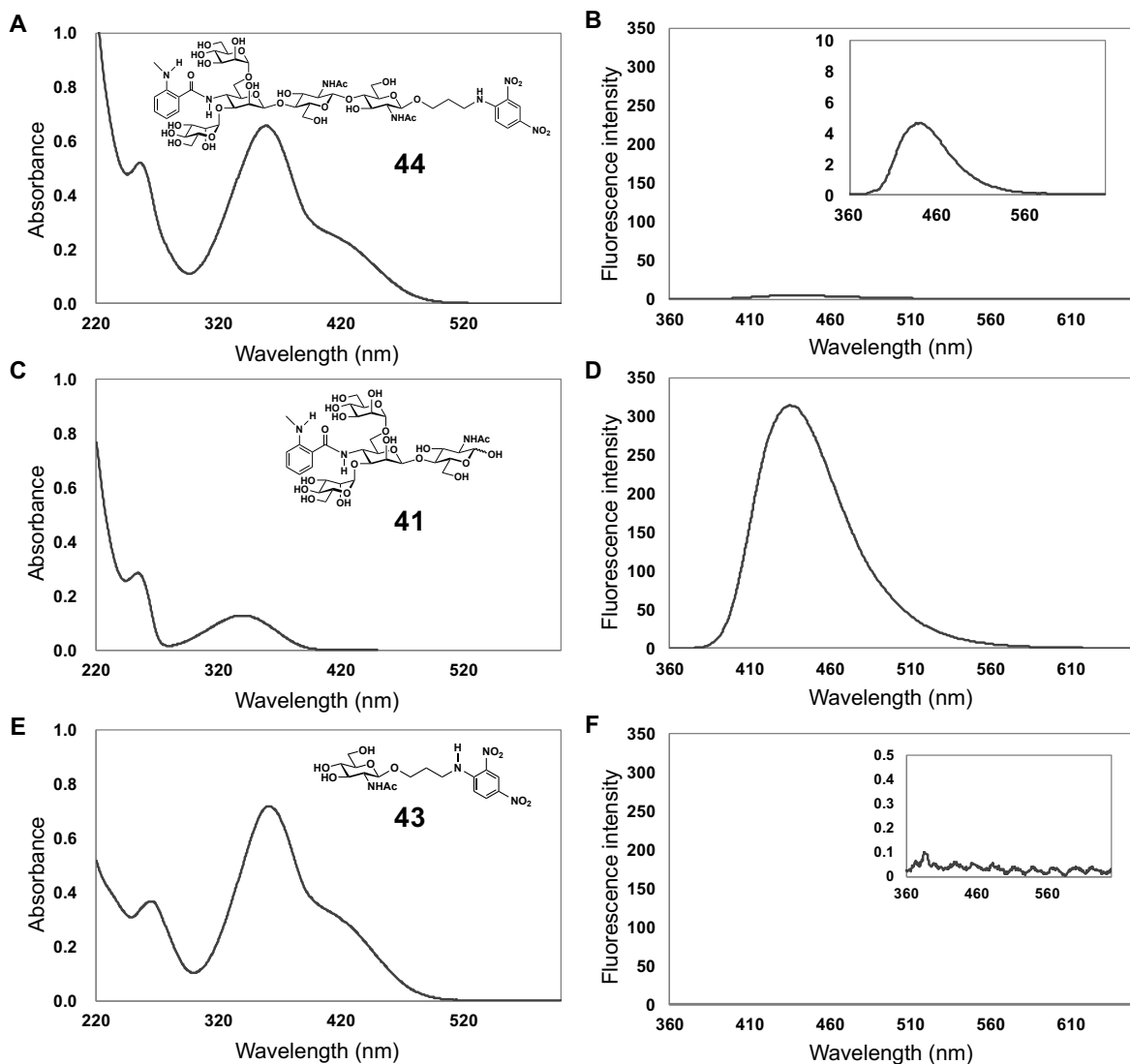


Figure 4-4. 5糖プローブ **44**、Nma-4糖誘導体 **41**、GlcNAc-Dnp 誘導体 **43** の吸収および蛍光スペクトル (40  $\mu$ M 水溶液)

5糖 **44** と Nma-4糖 **41** の Nma の蛍光強度を比較すると、5糖 **44** の方が 53 分の 1 にまで減少した (Figure 4-5A)。すなわち、5糖プローブ **44** の Nma 基の蛍光は Dnp への分子内 FRET により 98%消光されていると推定した。しかし、この消光が分子間で起こっている可能性がある。そこで、分子間 FRET クエンチングの影響を調べるために、4糖 **41** のみの溶液の蛍光強度と Nma-4糖 **41** に 5糖プローブ **44** および GlcNAc-Dnp **43** を混合させた溶液の蛍光強度を比較した (Figure 4-5B)。混合溶液は 5  $\mu$ M の 5糖プローブ **44** が加

水分解される際に生じる蛍光を再現するために、5糖プローブ **44** の濃度に対して、Nma-4糖 **41** と GlcNAc-Dnp **43** の濃度が反比例するように調製した。その結果、これら2種類の溶液の蛍光強度に差は見られなかったことから、5  $\mu\text{M}$  の条件においては分子間クエンチングはなく、先に示した5糖プローブ **41** の消光は分子内 FRET クエンチングによるものであると結論づけた。

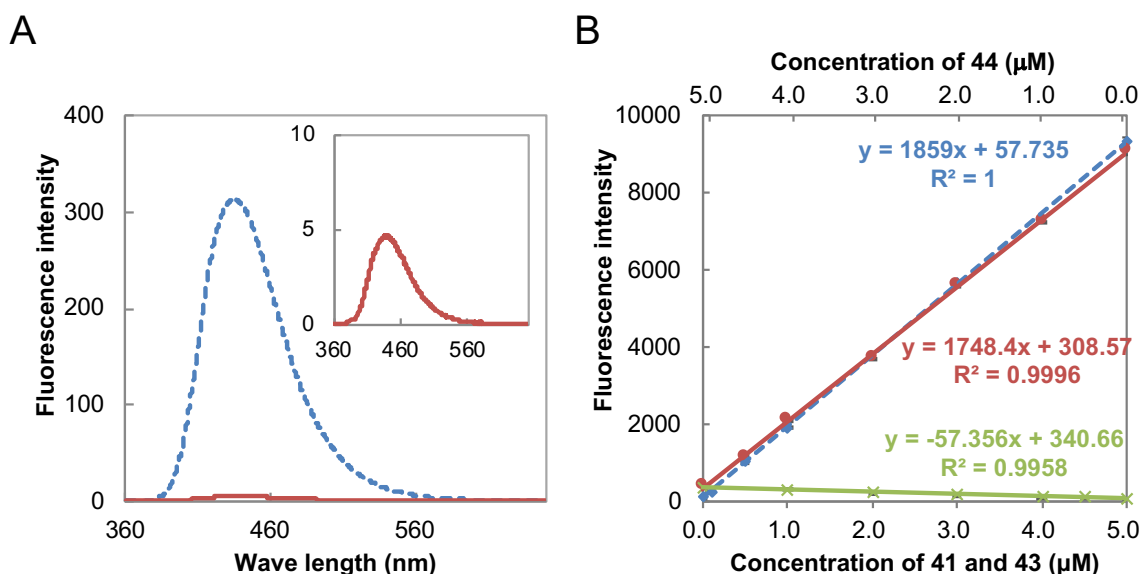


Figure 4-5. 5糖プローブの光特性. (A) 40  $\mu\text{M}$  の5糖プローブ **44** (実線) と Nma-4糖 **41** (破線) の蛍光スペクトルの比較 (励起波長: 340 nm) ; (B) 分子間クエンチングの影響の確認. 5糖プローブ **44** の蛍光強度 ( $\times$ ) ; Nma-4糖 **41** の蛍光強度 ( $\bullet$ ) ; Nma-4糖 **41** および5糖プローブ **44**、Dnp 修飾単糖 **43** の混合溶液の蛍光強度 ( $\blacklozenge$ ) 励起波長: 340 nm, 蛍光波長: 440 nm.

### 第3節 5糖プローブを用いた ENGase の加水分解活性の検出

#### HPLC 解析による5糖プローブの加水分解反応の確認

5糖プローブ **44** の分子内クエンチングが確認できたため、5糖プローブ **44** が Endo-Mにより加水分解されるか酵素反応を行い、HPLCによりその反応をモニターすることで確認した (Figure 4-6)。

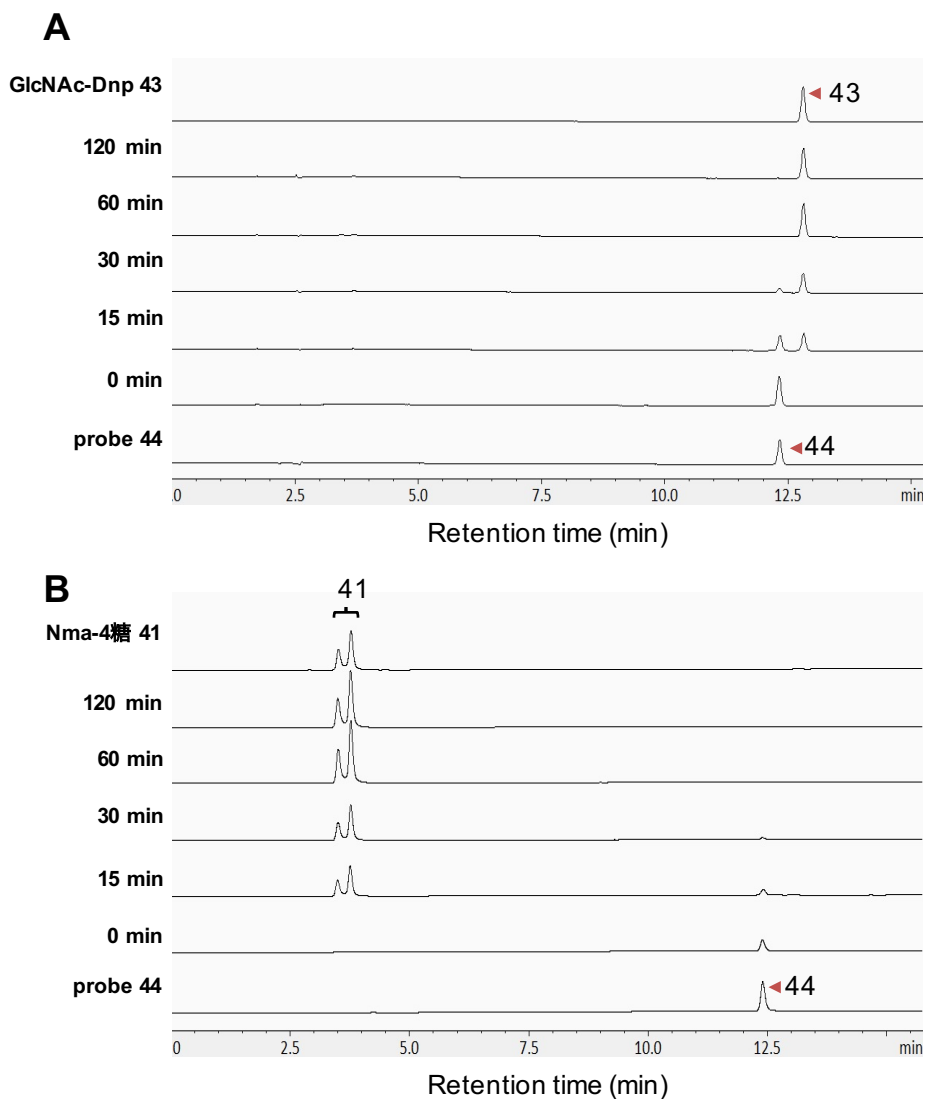


Figure 4-6. HPLC による 5 糖プローブの加水分解反応の検出. 分析条件: TOSOH TSK-gel ODS-100V 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 150 mm, 3-40% MeCN / H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, 1 mL / min, 15 min, (A) UV = 350 nm, (B) 蛍光検出 ex) 340 nm, em) 440 nm.

5 糖プローブ溶液 (5  $\mu\text{M}$  溶液、10% DMSO、40 mM リン酸バッファー (pH 6, 150  $\mu\text{L}$ )) を調製し、Endo-M (5  $\mu\text{g}$ ) を加え 37 °C でインキュベートした。反応液 (20  $\mu\text{L}$ ) を 0, 7.5, 15, 30, 60, 120 分ごとに分取し、アセトニトリル (10  $\mu\text{L}$ ) を加え反応を停止した。そして各反応時間の溶液を HPLC にて分析した。UV 吸収により反応をモニターした結果を Figure 4-6A に示す。12.5 分付近の 5 糖プローブ **44** のピークが時間経過とともに減少し、新たなピークが 13 分付近に確認された。このピークは、先に合成した GlcNAc-Dnp **43**

と同じ保持時間を示した。一方、この条件ではもう一方の加水分解生成物である4糖 **41** に相当するピークは Nma の UV 吸収が弱いために観測されなかった。そこで、Nma 基の蛍光波長で検出したところ、Figure 4-6B に示したように4分付近に4糖 **41** に相当する2つのピークが観測された。なお、この2つのピークは4糖 **41** の還元末端部分の異性体であるアノマーにより生じていることを別途確認した。また、4分付近と13分付近のピークは、それぞれ分取し MALDI-TOF-MS により4糖 **41** と単糖 **43** の分子量ピークを示すことを確認した。

### プレートリーダーを用いた ENGase 活性検出

HPLC にて5糖プローブ **44** が Endo-M によって加水分解されることが確認できたので、簡便でハイスループットアッセイに対応できるシステムを構築することを目的にマイクロプレートリーダーにより蛍光強度を測定することで、リアルタイムに加水分解反応を追跡できるか検討した。5  $\mu$ M の5糖プローブ **44** に対して Endo-M を 20 ng 用いて反応を行ったところ、時間経過とともに蛍光強度の上昇を確認した。この結果が酵素反応によるものであるかを確認するために酵素量を 1-20 ng と変化させ同様の実験を行なった (Figure 4-7A)。その結果、酵素量依存的に蛍光強度が上昇することが確認されたことより、この蛍光強度の変化は加水分解反応の進行に対応していると確認できた。5糖プローブ **44** の Endo-M に対するミカエリスメンテン定数 (Km 値) を算出した。5糖プローブ **44** (0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 mM) に対して、0.5 ng の Endo-M を用いて加水分解反応を行った結果、Km 値は 18.9  $\mu$ M であった (Figure 4-8)。これは、ダンシル基で蛍光ラベルされた Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Asn-DNS の Km 値 (0.51 mM) [16]に対して、約 27 倍小さい値であった。このことより、5糖プローブは Endo-M の良い基質であることが示された。Endo-M の酵素活性を検出することができたので、同様の方法により由来の異なる ENGase を用いて、合成

した5糖プローブ **44** の基質としての一般性を調べた。human ENGase、mouse ENGase、Endo-Om、Endo-CC、Endo-H を用いて加水分解反応を行った結果を Figure 4-6B-F に示した。その結果、human ENGase、mouse ENGase、Endo-Om、Endo-CC とともに酵素量依存的に蛍光強度が上昇し、5糖プローブ **44** により ENGase 活性を検出できることを確認した (Figure 4-7B) 。しかし、Endo-H の活性を検出することはできなかった。これは、Endo-H がコア5糖構造を基質にしない基質特異性と一致している (Table 4-1) [80]。この結果より、5糖プローブ **44** は酵素の基質特異性も反映することを確認できた。

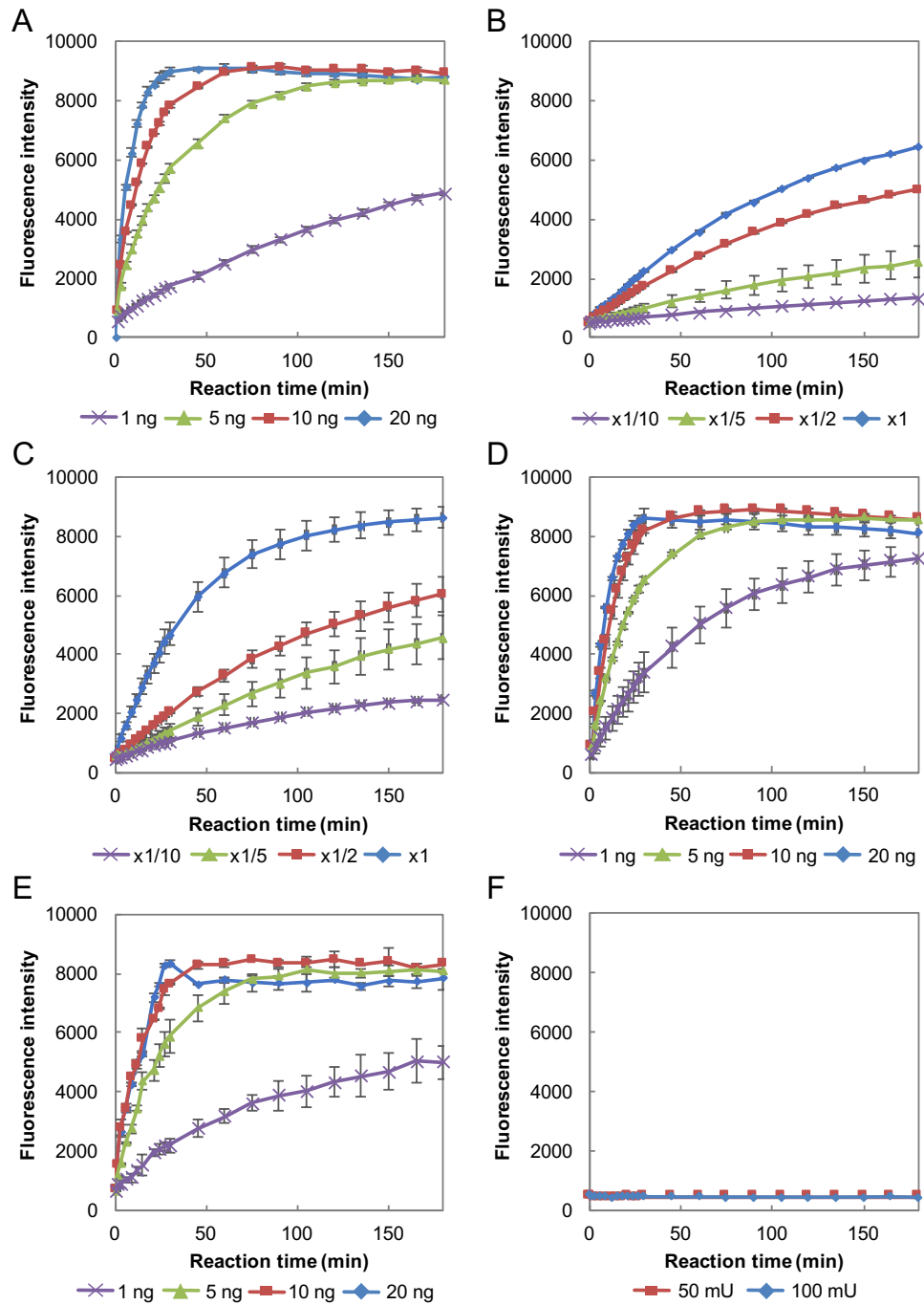


Figure 4-7. 5糖プローブ **44** を用いた種々の ENGase 活性の検出. 反応条件: 5  $\mu$ M 5糖プローブ **44**, 40 mM リン酸バッファー (pH 6, 50  $\mu$ L), 10% DMSO, 37  $^{\circ}$ C. (A) Endo-M, (B) Human ENGase, (C) Mouse ENGase, (D) Endo-Om and (E) Endo-CC, (F) Endo-H. 蛍光強度検出 (ex) 340 nm, (em) 440 nm.

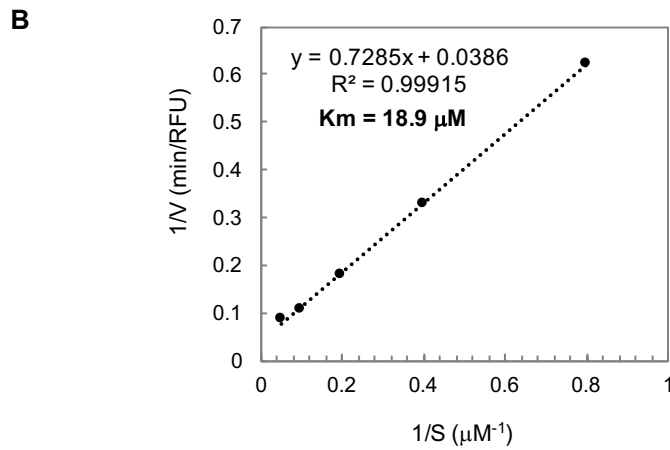
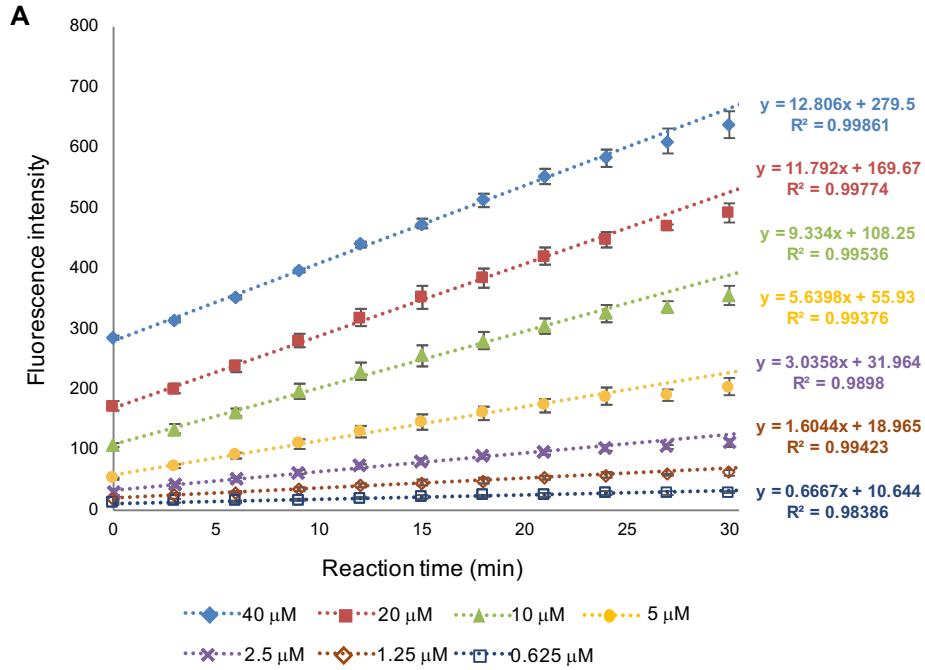


Figure 4-8. 5糖プローブ **44** の Endo-M に対する  $K_m$  値の算出. (A) 反応条件: 5糖プローブ **44** (0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40  $\mu\text{M}$ ) , リン酸バッファー (40 mM, pH 6, 50  $\mu\text{L}$ ), Endo-M (0.5 ng), 37 °C; (B)  $K_m$  値算出のためのラインウィーバーバークプロット.

Table 4-1. Endo-Hの基質特異性 (文献[78]より改変)

Structure	Hydrolyzed by <sup>a</sup>		
	Endo F	Endo H	PNG F
Man $\beta$ 1 + 4GlcNAc $\beta$ 1 + 4GlcNAc-R	-	-	+
Manal $\rightarrow$ <sup>6</sup> Man $\beta$ 1 + 4GlcNAc $\beta$ 1 + 4GlcNAc-R	-	-	+
Manal $\rightarrow$ <sup>3</sup> Man $\beta$ 1 + 4GlcNAc $\beta$ 1 + 4GlcNAc-R	-	-	+
5糖 Manal $\rightarrow$ <sup>6</sup> Manal $\rightarrow$ <sup>3</sup> Man $\beta$ 1 + 4GlcNAc $\beta$ 1 + 4GlcNAc-R	$\pm$	-	+
Manal $\rightarrow$ <sup>3</sup> Manal $\rightarrow$ <sup>6</sup> Man $\beta$ 1 + 4GlcNAc $\beta$ 1 + 4GlcNAc-R	+	+	+
Manal $\rightarrow$ <sup>6</sup> Manal $\rightarrow$ <sup>3</sup> Manal $\rightarrow$ <sup>6</sup> Man $\beta$ 1 + 4GlcNAc $\beta$ 1 + 4GlcNAc-R	+	+	+
7糖 Manal $\rightarrow$ <sup>6</sup> Manal $\rightarrow$ <sup>3</sup> Manal $\rightarrow$ <sup>6</sup> Man $\beta$ 1 + 4GlcNAc $\beta$ 1 + 4GlcNAc-R	+	+	+
Manal $\rightarrow$ <sup>6</sup> Manal $\rightarrow$ <sup>3</sup> Manal $\rightarrow$ <sup>3</sup> Man $\beta$ 1 + 4GlcNAc $\beta$ 1 + 4GlcNAc-R	$\pm$	$\pm$	+
Manal $\rightarrow$ 2Manal $\rightarrow$ <sup>3</sup> Manal $\rightarrow$ <sup>6</sup> Man $\beta$ 1 + 4GlcNAc $\beta$ 1 + 4GlcNAc-R	+	+	+
Manal $\rightarrow$ 2Manal $\rightarrow$ <sup>3</sup> Manal $\rightarrow$ <sup>3</sup> Man $\beta$ 1 + 4GlcNAc $\beta$ 1 + 4GlcNAc-R	+	+	+
Manal $\rightarrow$ 2Manal $\rightarrow$ <sup>6</sup> Manal $\rightarrow$ <sup>3</sup> Man $\beta$ 1 + 4GlcNAc $\beta$ 1 + 4GlcNAc-R	+	+	+
Manal $\rightarrow$ 2Manal $\rightarrow$ <sup>3</sup> Manal $\rightarrow$ <sup>6</sup> Manal $\rightarrow$ <sup>3</sup> Man $\beta$ 1 + 4GlcNAc $\beta$ 1 + 4GlcNAc-R	+	+	+



## 第4節 Endo-H 活性検出プローブの合成

前節にて5糖プローブでは、Endo-Hの加水分解活性を検出できないことを示した。これはEndo-Hが高マンノース型糖鎖あるいは、混成型糖鎖の非還元末端側の糖残基を認識するという基質特異性を持つためである。このことは、今回合成した5糖プローブでは、全てのENGaseの活性検出に対応するには不十分であり、新規ENGaseの探索を志向する場合は、ENGaseの基質特異性を考慮した新たな糖鎖プローブ、すなわち糖鎖構造が異なるプローブが必要であることを意味する。そこで、高マンノースに特異的なENGaseの活性を検出する糖鎖プローブを開発するために、Endo-Hの活性検出を指標にして、Endo-Hの基質特異性を考慮した糖鎖構造を有するプローブを合成し、Endo-Hで切断するか評価した。

### Endo-H 活性検出プローブの設計と合成戦略

Endo-HはN型糖鎖の高マンノース型糖鎖と一部の混成型糖鎖を切断することが明らかとなっている (Table 4-1) [80]。5糖プローブがEndo-Hによって切断されなかった理由はEndo-Hの基質認識に必要な非還元末端部分のマンノース残基がないためと考えられる。そこで、Endo-Hの基質特異性を考慮して5糖構造に対して、B, Cアーム部分にさらに1残基ずつマンノース残基が伸長した7糖構造を有するプローブ **58** を新たに合成することとした。7糖構造はTable 4-1に示したようにEndo-Hの基質となることから、合成する7糖分子プローブ **58** も基質になると考えた。

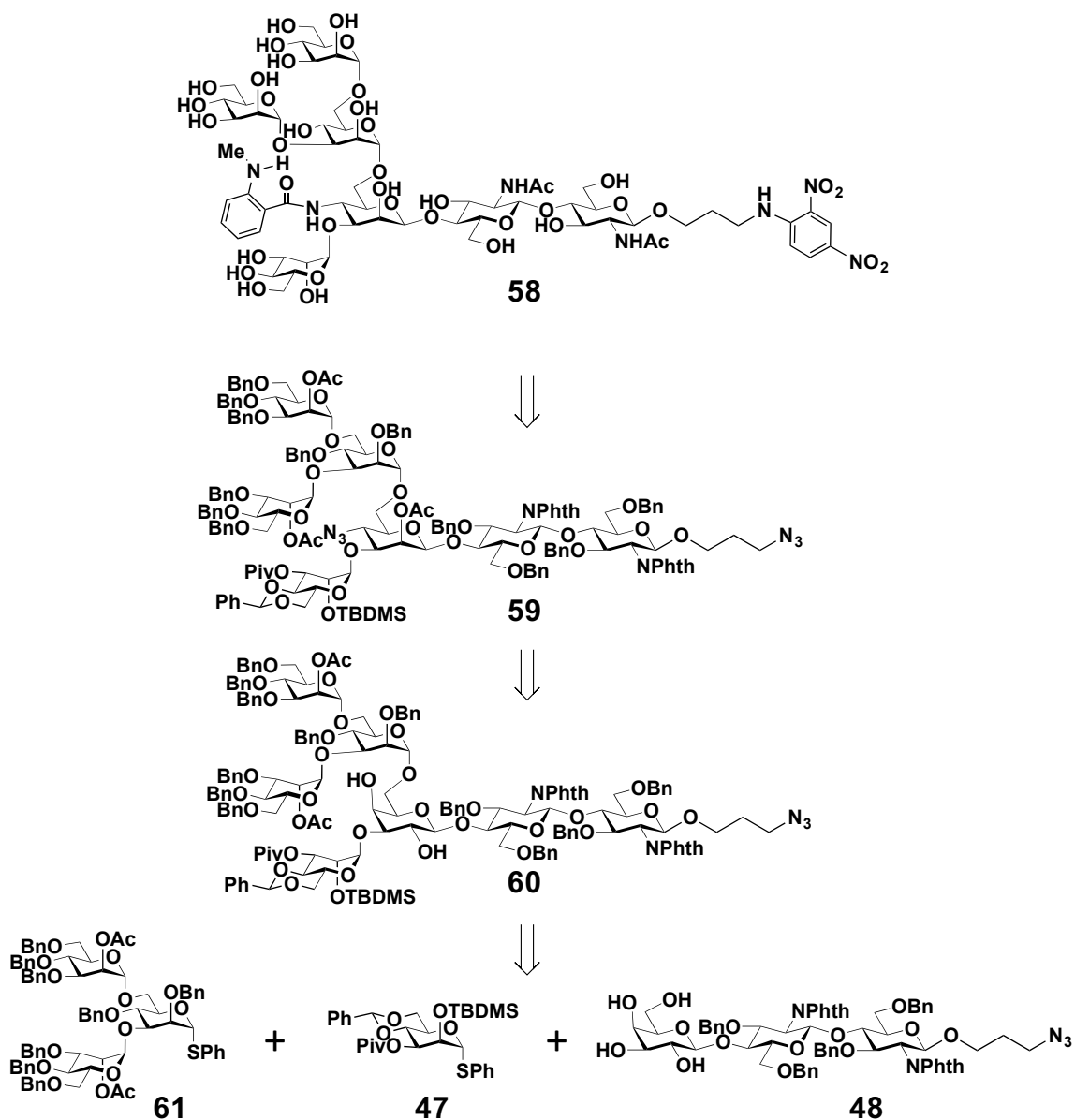


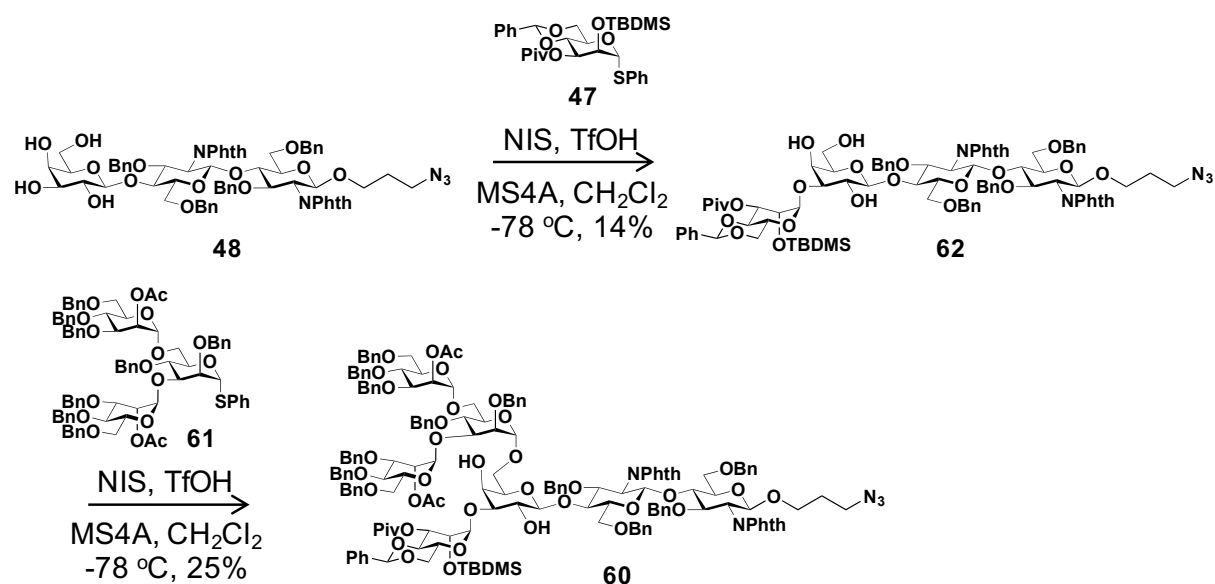
Figure 4-9. 7糖プローブの合成戦略

7糖プローブの合成戦略を Figure 4-9 に示した。すなわち非還元末端部分のガラクトース残基に4ヶ所に遊離の水酸基を有する3糖受容体 **48** の3位水酸基に対して、マンノース供与体 **46** を導入、4糖とした後に、トリマンノシル供与体 **60** を導入し7糖骨格を構築する。その後、水酸基の反転反応を利用することで、分岐部分のガラクトース残基へのアジド基の導入および、2位水酸基の立体反転によりマンノシド配置への変換を行う。得られた7

糖誘導体の保護基を除去した後、消光基の Dnp と蛍光基の蛍光基の導入を行うことにより目的の 7 糖プローブ **58** を得ることとした。

## 7 糖骨格の構築

7 糖骨格の構築は、5 糖プローブの合成においても利用した 3 糖受容体 **48** に対し、マンノース供与体 **47**、トリマンノシル供与体 **61** を順次反応することで得ることとした (Scheme 4-4)。



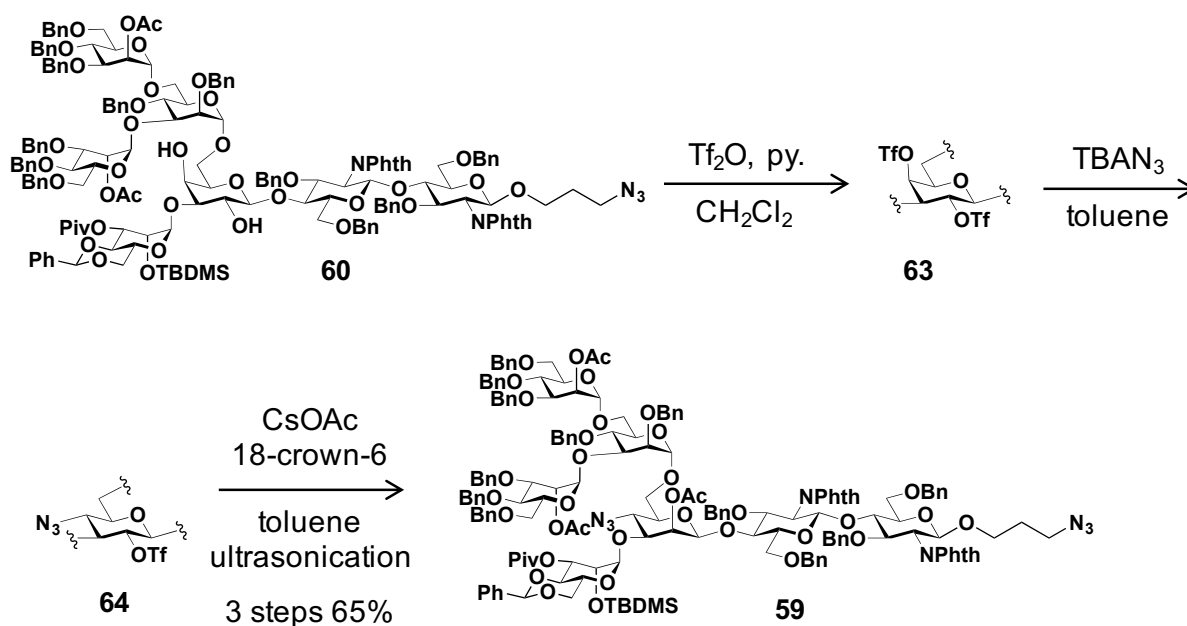
Scheme 4-4. 7 糖骨格の構築

先の 5 糖プローブ **44** の合成において、5 糖骨格を構築する際、反応条件によってはガラクトース残基の 3 位に選択的にマンノース残基が導入された 4 糖も生じることを確認していた。これは 3 糖受容体 **48** の 3 位水酸基の求核性が 6 位水酸基よりも高く、3 位に対するマンノース残基の導入が進行したためと考えられた。そこで、3 糖受容体 **48** に対するマン

ノース供与体 **47** の導入反応の条件を検討することで目的の 4 糖 **62** が主生成物として得られると考えた。3 糖受容体 **48** に対し、1 当量のマンノシル供与体 **47** を反応させたところ、3 位にマンノース残基が  $\alpha$  結合した目的の 4 糖体 **62** が収率 14% で得られた。この反応において、3 位以外の位置の水酸基にマンノース残基が結合した 4 糖は得られなかったが、さらに反応が進んだ 5 糖体 **52** が収率 10% で得られ、未反応の 3 糖受容体 **48** も 35% 回収された。得られた 4 糖体の構造は各種 2 次元 NMR スペクトルから決定した。得られた 4 糖 **62** を糖受容体として、ガラクトース残基の 6 位水酸基に対して、トリマンノシル供与体 **61** を反応させた。その結果、低い収率 (25%) ながら目的の 7 糖体 **60** が得られたものの、未反応の 4 糖受容体 **62** が 63% で回収された。

#### 水酸基の立体反転反応による 7 糖アジド体 **58** への変換

7 糖骨格 **60** が得られたので、次に求核置換を利用した水酸基の立体反転反応によるアジド基の導入とガラクトシド配置からマンノシド配置への変換を行なった (Scheme 4-5)。7 糖体 **60** のガラクトース残基上の水酸基に対して、Tf 基を導入し、続いて  $\text{TBAN}_3$  を反応させ、4-アジド体 **63** を得た。得られたアジド体 **63** に対し、酢酸セシウム、18-クラウン 6-エーテルを用いて超音波処理することにより、7 糖アジド体 **59** を収率 65% で得た。得られた化合物の構造は、2 次元 NMR により決定した。

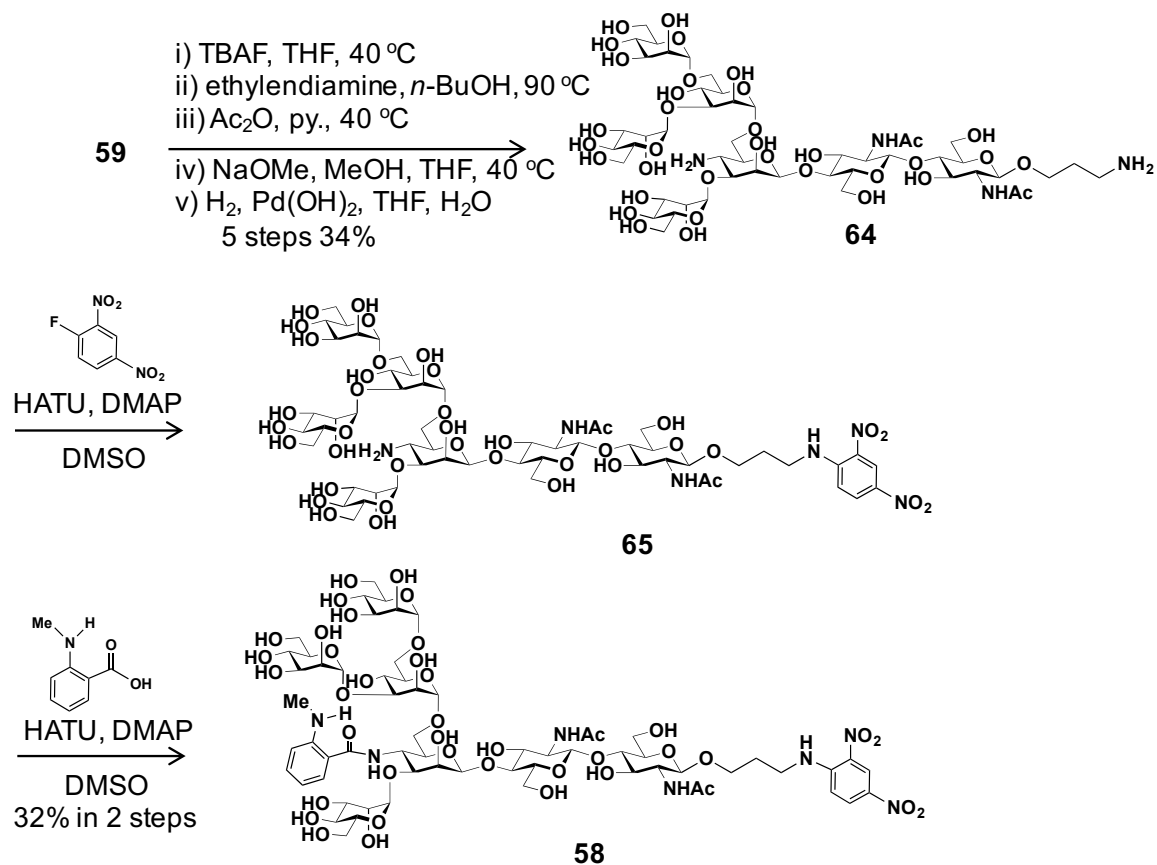


Scheme 4-5. 反転反応によるアジド基の導入

### 脱保護反応と消光基および蛍光基の導入

得られた7糖誘導体 **59** の保護基の除去およびアジド基のアミノ基への変換を行ない、位置選択な消光基の導入、続く蛍光基の導入を行うことで7糖プローブ **58** の合成を行なった (Scheme 4-6)。5糖プローブ **44** を合成する際は、還元末端部分のアミノ基は Boc 基で保護したが、7糖プローブ **58** の合成においては、還元末端部分のアミノ基と非還元末端の分岐部分のアミノ基とでは、立体障害により還元末端側のアミノ基が選択的に反応すると考えた。そこで、7糖 **59** の脱保護を行う際、アミノ基の区別を考慮することなく、7糖ジアミン体 **64** を合成することとした。すなわち、7糖誘導体 **59** の脱シリル化、フタルイミド基を除去、アセトアミド基へと変換後、ベンジル基とベンジリデン基の除去と同時に還元末端と非還元末端部分のアジド基をアミノ基へと変換して7糖ジアミン体 **64** を5段階収率34%で得た。得られたジアミン体 **64** に対し、2,4-ジニトロフェニルフルオリドを反応させることで還元末端部分に選択的に Dnp 基が導入された **65** が得られた。その後、*N*-メチルアント

ラニル酸を、HATU を縮合剤として用いることで非還元末端部分のアミノ基へと導入、目的とした7糖プローブ **58** を2段階収率 32%で得た。得られた7糖プローブ **58** の構造は NMR と MALDI-TOF MS により確認した (Figure 4-10)。



Scheme 4-6. 7糖誘導体の脱保護反転および蛍光基、消光基の導入

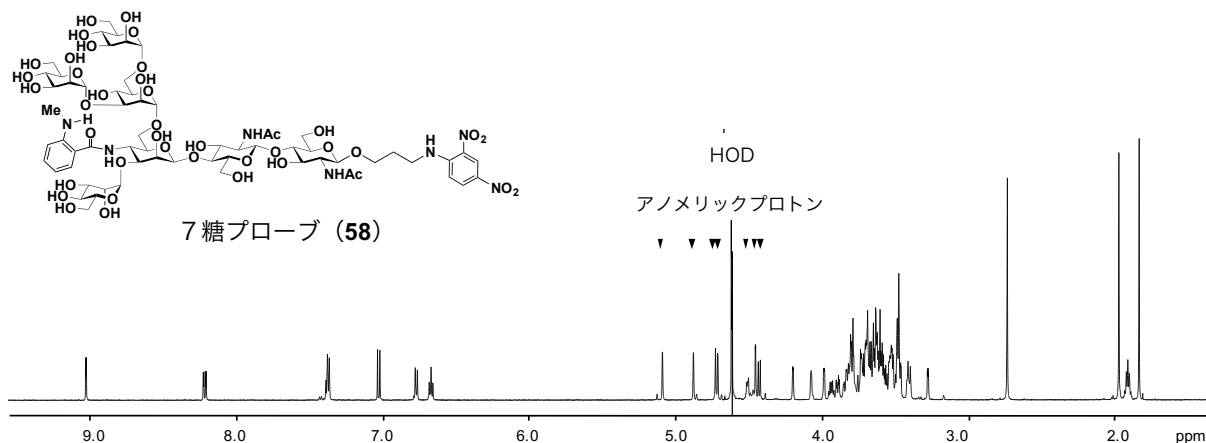


Figure 4-10. 7糖プローブ **58** の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

## 第5節 Endo-H による 7糖プローブの加水分解反応

### HPLC 解析による 7糖プローブ **58** の加水分解反応の確認

7糖プローブ **58** が合成できたため、Endo-H によって切断されるかを HPLC により確認した。5  $\mu\text{M}$  の 7糖プローブ **58** と 1、5、25 mU の Endo-H をリン酸バッファー (pH 6, 40 mM, 100  $\mu\text{L}$ ) 中で反応させ、反応液を分注し、HPLC にて解析した UV および蛍光により検出した結果を Figure 4-11B-C に示した。7糖プローブ **58** のピークは反応時間の経過とともに減少し、7糖プローブ **58** より遅い保持時間に新たなピークが確認された。新たに生成したピークは加水分解生成物である GlcNAc-Dnp **43** と同じ保持時間を示した。したがって、合成した 7糖プローブ **58** は、Endo-H により加水分解することが明らかとなった。この結果は、5糖プローブ **44** が Endo-H で加水分解されなかった理由が、Endo-H の基質特異性のためであることを支持している。

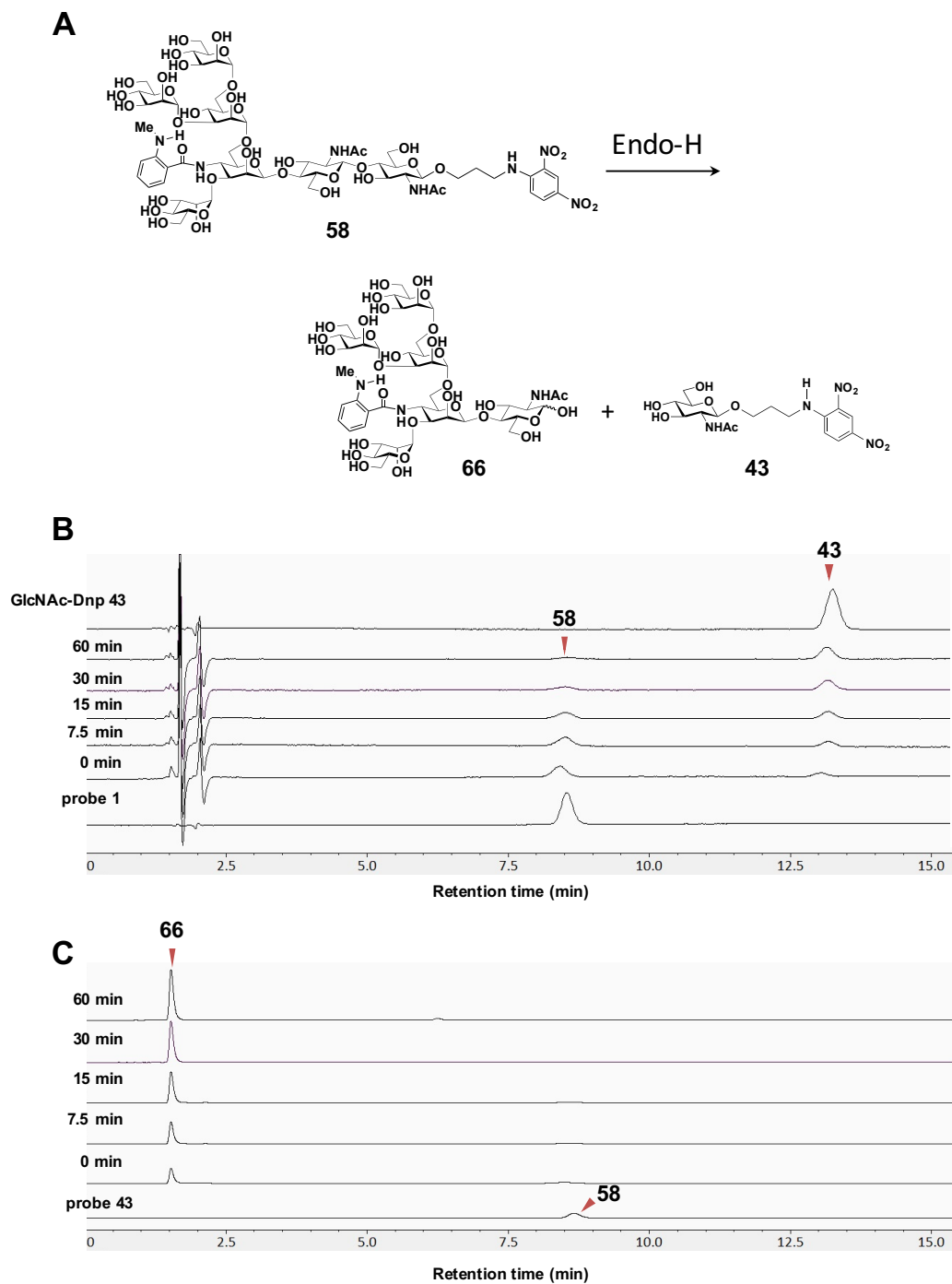


Figure 4-11. HPLC による 7 糖プローブの加水分解反応の確認. (A) 7 糖プローブ **58** の加水分解反応のスキーム, 反応条件: 5  $\mu$ M 7 糖プローブ **58**, 1 mU Endo-H, 40 mM リン酸バッファー (pH 6, 100  $\mu$ L), 10% DMSO, 37  $^{\circ}$ C; 分析条件: TOSOH TSK-gel ODS-100V 5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm, MeCN / H<sub>2</sub>O = 20 / 80 0.1% TFA, 1 mL / min, 15 min, (B) UV = 340 nm, (C) 蛍光検出 ex) 340 nm, em) 440 nm.



## プレートリーダーによる Endo-H の活性検出

7糖プローブが Endo-H により加水分解されることが明らかとなったため、次に、プレートリーダーによる蛍光強度の測定により、加水分解反応が追跡できるか確認した。その結果を Figure 4-12 に示した。5  $\mu\text{M}$  の 7糖プローブ **58** に対し、25 mU の endo-H を作用させた結果、速やかな蛍光強度の上昇を観測した。酵素量を 1 mU に減らして反応を追跡したところ、反応時間の経過とともに蛍光強度が増加した。以上の結果より、7糖プローブ **58** も 5糖プローブ **44** と同様にプレートリーダーによって酵素反応の追跡ができることが確認された。

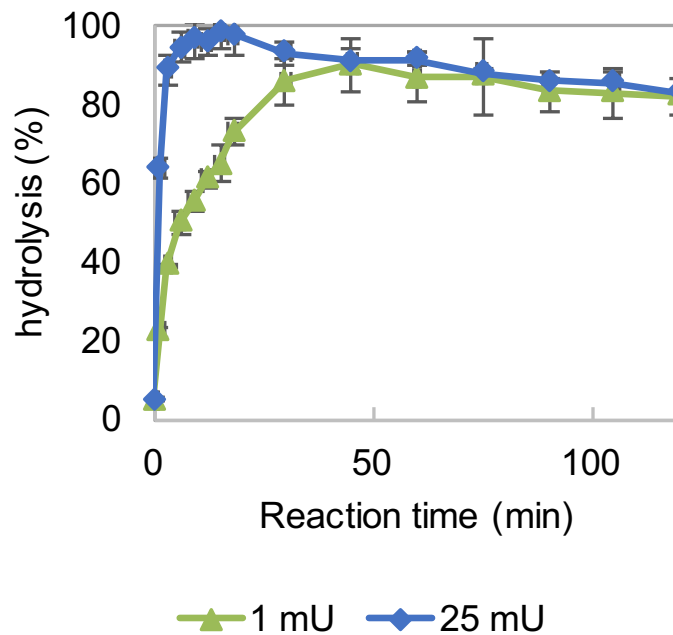


Figure 4-12. プレートリーダーを用いた 7糖プローブ **58** の加水分解反応の追跡. 反応条件: 5  $\mu\text{M}$  7糖プローブ **58**, 1, 25 mU Endo-H, 40 mM リン酸バッファー (pH 6, 50  $\mu\text{L}$ ), 10% DMSO, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 蛍光検出 ex) 340 nm, 440 nm.

## 5糖プローブと7糖プローブの加水分解反応の比較

本研究で、5糖と7糖と糖鎖構造の異なる2種類のプローブを合成した。そこで、高マンノース型糖鎖とコア5糖の両方を切断する Endo-M を用いて糖鎖構造認識の差異が合成プローブによって確認できるか実験した。

同濃度に調製した5糖および7糖プローブ溶液に対して Endo-M を同量加えて、加水分解反応を追跡した。その結果を Figure 4-13 に示した。5糖プローブと7糖プローブを比較すると5糖プローブの方が蛍光強度の上昇速度が速いことがわかる。すなわち、Endo-M は高マンノース型糖鎖7糖よりもコアの5糖骨格を認識することが示された。この傾向は天然型糖鎖を用いた結果とも一致する (Table 4-2) [15]。以上の結果より、本研究で合成した糖鎖分子プローブにより Endo-M の基質特異性の検証も可能であることが示された。

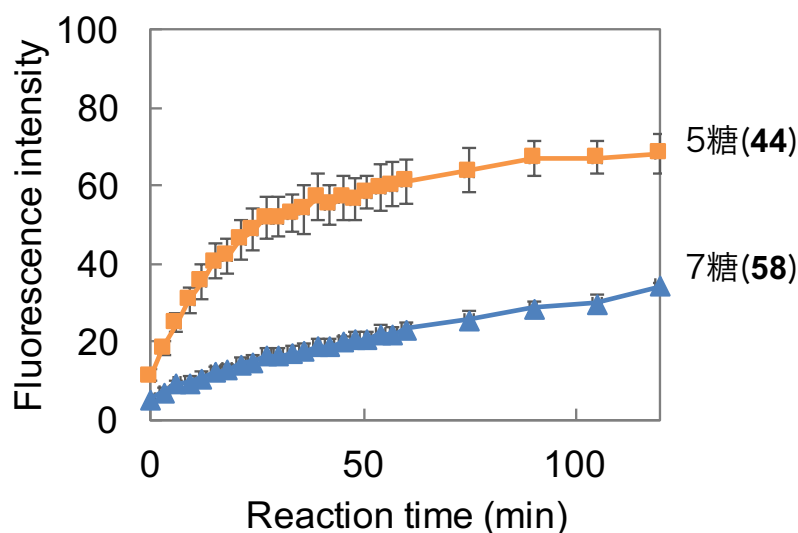


Figure 4-13. 5糖プローブ **44** と7糖プローブ **58** の加水分解反応の比較 反応条件: 2.5  $\mu$ M 5糖プローブ **44**, または7糖プローブ **58**, 5 ng Endo-M, 40 mM リン酸バッファー (pH 6, 100  $\mu$ L), 10% DMSO, 37  $^{\circ}$ C, 蛍光検出 ex) 340 nm, 440 nm.

Table 4-2. Endo-Mの基質特異性 (文献[15]より改変)

PA-oligosaccharide	Structure	Relative activity (%)
Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc-PA		100
Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc-PA		74.0
7糖	Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc-PA	15.4
5糖	Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc-PA	19.5

## 第6節 まとめ

ENGase の加水分解活性を FRET 型糖鎖基質の蛍光強度を観測することで簡便に検出するアッセイ法を構築した。5糖プローブ **44** の蛍光強度は、酵素による切断前後で、約 53 倍増強し、高感度に ENGase 活性の検出ができることを示した。また、マイクロプレートリーダーを利用することで、同時に多数のサンプルの加水分解活性をモニターできた。蛍光基を有する 4 糖骨格と消光基を有する GlcNAc 誘導体を別途化学合成することで、ENGase による切断実験における分解物の同定を容易にするとともに、光物理化学特性の評価を可能にした。今回合成した 5 糖プローブ **44** により多くの ENGase の活性検出ができることを示し、本アッセイ系により天然資源からの新規 ENGase の探索研究においても貢献できる可能性を示した一方で、Endo-H のように糖鎖の非還元末端側を認識する ENGase の探索には不向きなことが明らかとなった。そのため、様々な糖鎖構造を認識する ENGase を探索するためには、高マンノース型や混成型糖鎖、複合型糖鎖のような非還元末端部分の構造に特徴があるプローブも必要であることが示唆された。そこで、5 糖プローブ **44** で切断できなかった Endo-H の活性検出を指標に、高マンノース型糖鎖構造を有する新たな糖鎖分子プローブの

開発を行った。標的糖鎖構造として、これまでに報告されている Endo-H の基質特異性を考慮して、7糖構造を有する新規プローブ **58** を合成したところ、7糖プローブ **58** は Endo-H によって加水分解され、5糖プローブ **44** と同様に蛍光強度の測定によって感度良く加水分解反応を検出できることを確認した。

これまで、ENGase の基質特異性解析は、研究者間で必ずしも統一された基質によって行われておらず、曖昧さがあった。本研究で合成した2種類のプローブにより、Endo-M の基質認識能を解析し、これまでに報告されている結果と比較したところ、Endo-M の基質特異性と一致した。したがって、糖鎖構造の異なる分子プローブを利用し、その加水分解活性を比較することにより、ENGase の基質特異性を評価できる可能性を見出した。ENGase は細菌や動物、植物など様々な生物種に存在していることから本アッセイ系を用いることで新規 ENGase の探索研究においても貢献できると考えている。

## 第 5 章 ENGase 阻害剤の探索に向けた検討

### 第 1 節 はじめに

希少遺伝子疾患である *NGLY1* 欠損症の発症に ENGase が関与していることが報告された[54]。さらに ENGase 活性を抑制すると *NGLY1* 欠損症の症状を抑えることに繋がる可能性が示された。そのため、ENGase 阻害剤が *NGLY1* 欠損症の治療薬候補として考えられており、一刻も早い阻害剤の探索が求められている。

今回合成したプローブは ENGase の酵素活性を簡便に検出できることを示した。そこで、5糖プローブにより、ENGase による酵素阻害活性を評価できることを示し、*NGLY1* 欠損症の治療薬候補探索への応用ができることを示すこととした。

### 第 2 節 ENGase 阻害剤探索に向けた酵素活性検出系の最適化

化合物ライブラリーから効率よく阻害剤を探索するためには、多サンプルを解析できるハイスループットなスクリーニング系を構築する必要がある。一般にドラッグターゲットとしてヒット化合物を得るには、数千～数十万種類の化合物からのスクリーニングが行われている。第 4 章で述べたように 5糖プローブ **44** はプレートリーダーによる簡便な酵素活性検出が可能であるが、実際に創薬スクリーニングを行うためには、できる限り少量のプローブで活性検出が可能であることが望ましい。そこで、5糖プローブ **44** を実際の創薬スクリーニングに応用することを想定して酵素反応検出の最適化研究を行なった。一方、化合物ライブラリーの多くは DMSO 溶液となっているため、化合物スクリーニングを行うには DMSO 存在下で加水分解活性を検出できる必要がある。そこで、前節で構築したプレートリーダーによるアッセイシステムを用いて、加水分解反応における DMSO の影響についても解析することとした。

## プローブ濃度の検討

プローブ濃度について検討した。酵素反応を行う際、反応溶液量を極力少なくする必要がある。そこで、マイクロプレートとして、ハーフウェルサイズの 96 穴プレートを用いて酵素反応を行なった。さらにプレートリーダーの光軸調整を行うことで 50  $\mu\text{L}$  でも酵素反応を検出できることを明らかにした。さらに、酵素量を一定にして、基質のプローブ濃度を 5  $\mu\text{M}$ 、3  $\mu\text{M}$ 、1  $\mu\text{M}$  および 0.5  $\mu\text{M}$  まで薄い濃度で加水分解反応を検討した (Figure 5-1)。その結果、0.5  $\mu\text{M}$  までプローブ濃度を薄くしても十分な S/N 比で酵素反応の検出が可能であることを示した。

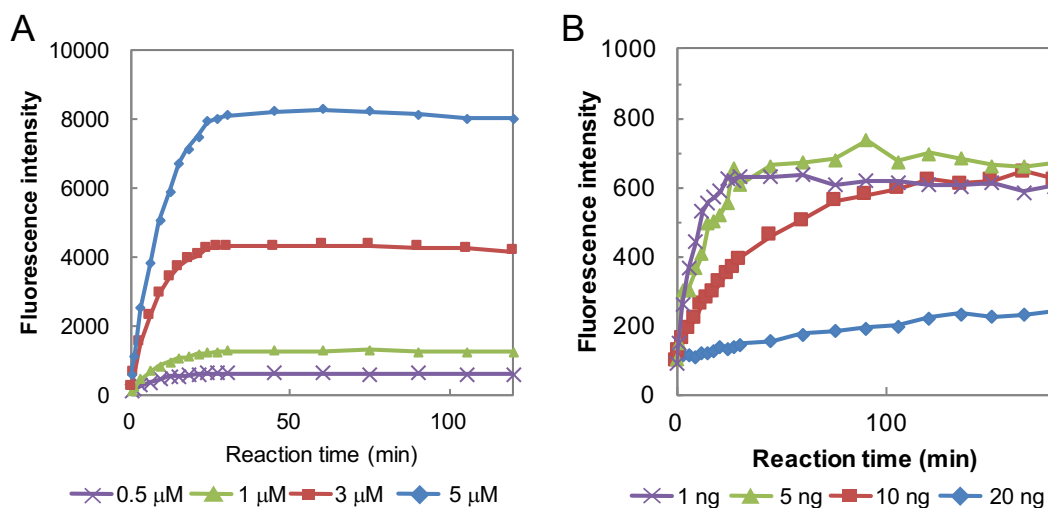


Figure 5-1. 5糖プローブ濃度の検討. (A) 最小プローブ濃度の検討, 反応条件: 0.5, 1, 3, 5  $\mu\text{M}$  5糖プローブ **44**, 40 mM リン酸バッファー (pH 6, 50  $\mu\text{L}$ ), 0, 10, 20, 30, 40, 50% DMSO, 20 ng Endo-M, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 蛍光検出 ex) 340 nm, 440 nm; (B) 0.5  $\mu\text{M}$  の5糖プローブにおける加水分解反応の検討, 反応条件: 0.5  $\mu\text{M}$  5糖プローブ **44**, 40 mM リン酸バッファー (pH 6, 50  $\mu\text{L}$ ), 10% DMSO, 1, 5, 10, 20 ng Endo-M, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 蛍光検出 ex) 340 nm, 440 nm.

## DMSO 濃度の検討

ENGase の加水分解反応における DMSO の影響を解析した。先に述べたよう理化学研究所や東京大学などの化合物ライブラリーから供給される化合物は、DMSO 溶液として供給

される。したがって、今回構築したアッセイ系で ENGase 阻害剤になり得る化合物スクリーニングを行うには DMSO 存在下でも、酵素活性が検出できるか確認することは重要である。そこで、DMSO を 0%~50%含む反応溶液中での加水分解反応を 5 糖プローブにより行なった。その結果を Figure 5-2 に示した。

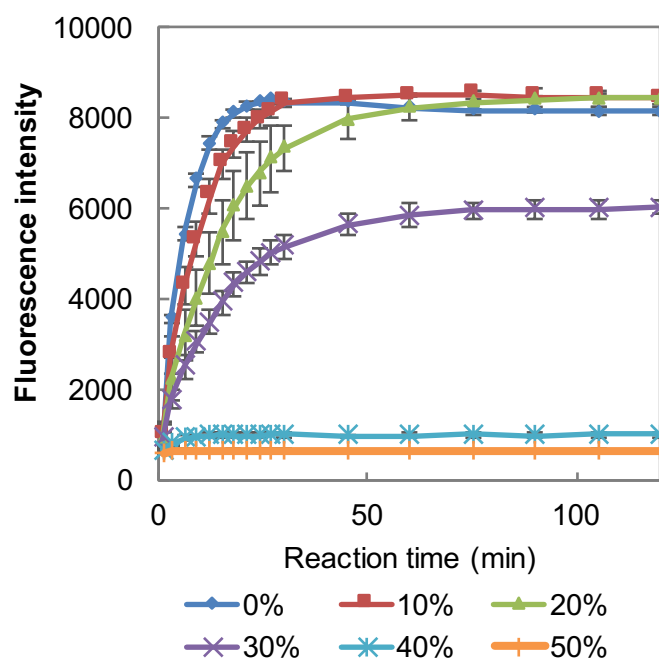


Figure 5-2. 加水分解反応における DMSO 濃度の検討. 反応条件: 5  $\mu$ M 5 糖プローブ **44**, 40 mM リン酸バッファー (pH 6, 50  $\mu$ L) , 0, 10, 20, 30, 40, 50% DMSO, 20 ng Endo-M, 37  $^{\circ}$ C, 蛍光検出 ex) 340 nm, 440 nm.

DMSO 濃度が高くなるにつれて ENGase 活性の低下が見られるものの DMSO 濃度 20% までは酵素活性を検出できることが示された。一方、30%DMSO を添加した場合は長時間反応を行なった場合でも、DMSO を加えなかった場合の 60%ほどまでしか蛍光強度が上昇しなかった。また、DMSO 濃度が 40%を超えると蛍光強度の上昇が確認できなかったことより、DMSO により Endo-M が失活したものと思われる。以上の結果より、DMSO を 20%程度まで添加しても 5 糖プローブを用いて ENGase 活性が検出できた。また、Endo-M の活性低下により蛍光強度の上昇が抑えられる結果を得た。このことは酵素活性を阻害する物質が

共存する場合、それに伴う酵素活性の変化を評価できることを示唆している。以上の結果より、今回開発したアッセイ系は創薬スクリーニングに十分耐える系であると結論した。

### 第3節 既知阻害剤を用いた ENGase の阻害反応

ENGase に対する既知の阻害化合物をモデル化合物として用いて阻害活性を検出できるか確認した。ENGase の阻害剤として4糖チアゾリン[81]とラベプラゾールナトリウム[82]を用いた。4糖チアゾリンは、ENGase の触媒機構における遷移状態アナログであり、ENGase の立体構造解析において共結晶化する基質に用いられた。一方、ラベプラゾールナトリウムは、近年にコンピューターシミュレーションによる ENGase 阻害剤探索研究によって見出された阻害剤である。しかし、これらの化合物は基質の加水分解反応を競合阻害するが、*NGLY1* 欠損症の治療薬として利用できるほど阻害能は高くなかったことが報告されている[82]。

2種類の阻害剤を用いた阻害活性検出の結果を Figure 5-3 に示した。濃度の異なる阻害剤溶液に対し、Endo-M と5糖プローブ **44** を加え、蛍光強度の変化を追跡した。その結果、阻害剤の濃度が高くなるにつれ、蛍光強度が低くなった。すなわち、阻害濃度依存的に5糖プローブ **44** の加水分解反応が抑えられたことから、本アッセイ系により阻害活性を検出できることを確認した。



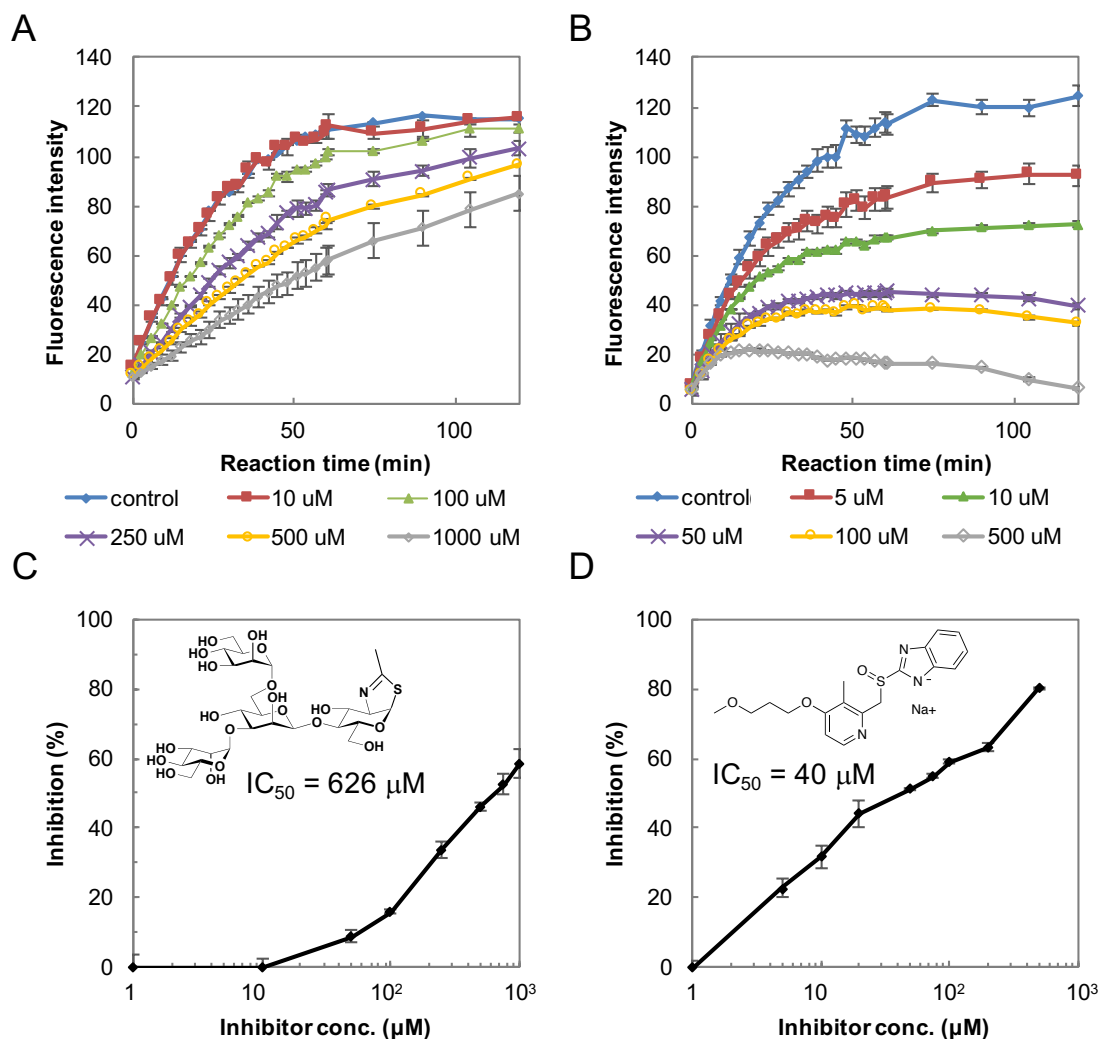


Figure 5-3. 阻害反応の検討. (A, C) 4糖チアゾリン誘導体の阻害反応, 反応条件: 2.5  $\mu\text{M}$  5糖プローブ **44**, 40 mM リン酸バッファー (pH 6, 100  $\mu\text{L}$ ), 10% DMSO, 10, 100, 250, 500, 1000  $\mu\text{M}$  4糖チアゾリン誘導体, 5 ng Endo-M, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 蛍光検出 ex) 340 nm, 440 nm; (B, D) ラベプラゾールナトリウムの阻害反応, 反応条件: 2.5  $\mu\text{M}$  5糖プローブ **44**, 40 mM リン酸バッファー (pH 6, 100  $\mu\text{L}$ ), 10% DMSO, 5, 10, 50, 100, 500  $\mu\text{M}$  ラベプラゾールナトリウム, 5 ng Endo-M, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 蛍光検出 ex) 340 nm, 440 nm.

#### 第4節 まとめ

ENGaseの阻害剤が遺伝子疾患である *NGLY1* 欠損症の治療薬になることが見出されたことから、ENGaseの加水分解反応を高感度で検出する系の確立が求められている。本研究で合成した5糖プローブが、創薬スクリーニングに利用できる可能性を見出すために、プローブ

ブ濃度と DMSO 添加による影響を検証した。また、既知阻害剤をスクリーニングのモデル化合物として用いた Endo-M の阻害実験により、5 糖プローブ **44** を用いた ENGase 加水分解活性のアッセイ系を利用することで、ENGase の阻害剤探索が可能であることを確認した。現在、5 糖プローブ **44** を利用した *NGLY1* 欠損症の治療薬探索が、群馬大学と公的機関、民間企業との間で進められている。本研究で開発した 5 糖プローブ **44** により、*NGLY1* 欠損症の治療薬探索が加速し、難病で苦しむ子供達が救われることを切に望む。

## 結論

第1章にて、これまで行われてきた ENGase の研究と課題について解説し、著者が行なった研究の位置付けと目的について示した。

第2章では、ENGase の糖鎖基質に対する認識について合成糖鎖を用いて糖転移活性を指標に解析し、糖鎖基質上の修飾可能な部位について知見を得た。すなわち、分岐部分の  $\beta$ -マンノース残基の C-2 位の水酸基が ENGase の糖鎖認識に必要であり、C-4 位部分の認識が低いことを明らかにした。そして、糖鎖分岐部分の糖残基の  $\beta$ -マンノース残基の C-4 位部分が修飾可能な部位であると結論付けた。得られた知見をもとに  $\beta$ -マンノース残基の C-4 位部分に蛍光標識化した糖鎖基質を合成し、修飾糖鎖が Endo-M の基質となり糖転移することを確認した。

第3章では、糖転移反応に用いる糖供与体と糖受容体に FRET ペアとなる蛍光基を修飾することで、糖転移活性を検出できることを見出した。

第4章では、糖鎖分子プローブを用いた糖加水分解活性の評価法の確立を目的として、糖鎖分子プローブをデザインし、合成した。合成した5糖プローブを用いることで、ENGase の活性を簡便かつ感度良く検出できることを見出した。一方、5糖プローブでは Endo-H の活性を検出できなかったことから、Endo-H の基質特異性を考慮した7糖プローブを開発した。合成した7糖プローブは Endo-H の基質となり、糖加水分解反応を追跡できることを確認した。

第5章では、第4章で構築した5糖プローブを用いた ENGase の加水分解検出系が ENGase の阻害剤探索に利用できることを示した。

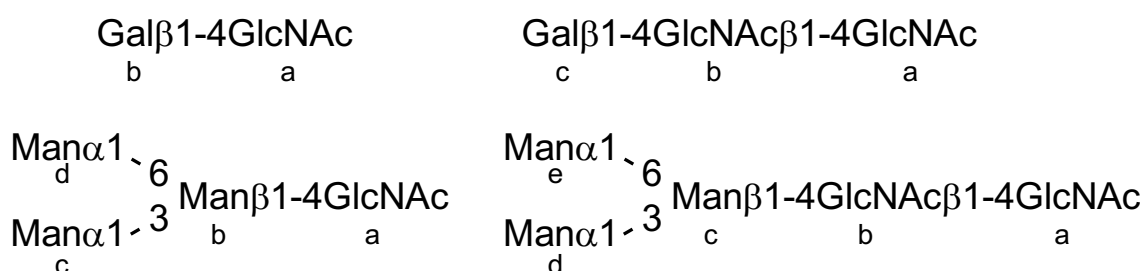
以上、合成基質を利用することで、ENGase の基質特異性について解析し、その結果をもとにデザインした蛍光修飾糖鎖分子プローブを用いた ENGase 活性の新たな解析手法を確立した。糖転移活性を検出するプローブを用いることで、遺伝子組み換えにより得られた改変

型 ENGase からより活性の高い高機能 ENGase のスクリーニングが容易になる。一方、加水分解活性検出糖鎖プローブを用いることで、新規の ENGase 探索研究の進展や *NGLY1* 欠損症の治療薬となる ENGase 阻害剤の探索が効率的に進められる。本研究で開発した ENGase 活性の解析技術は ENGase 研究の進展に広く貢献するものと期待している。

## 実験の部

本論文に掲載した物性値の測定法および装置は、次の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  スペクトルは、JEOL-JNM-ECA400 MHz 型、JEOL-JNM-ECA600 MHz 型核磁気共鳴装置（日本電子株式会社）を用い、溶媒はテトラメチルシランを内部標準として重クロロホルム溶液 ( $\delta\text{H } 0.00$  in  $\text{CDCl}_3$ )、もしくは *t*-ブチルアルコールを内部標準として重水溶液 ( $\delta\text{H } 1.24$  in  $\text{D}_2\text{O}$ ) で測定した。化学シフトは  $\delta$  値で、結合定数は Hz で示した。下図に示すように  $^1\text{H NMR}$  の解析では便宜的に、還元末端の糖残基を a とし、非還元末端側へ行くに従い b, c, d とアルファベットで表記することとした。



NMR シグナルの帰属

質量分析は、高分解能質量分析は Thermo Scientific™ Q Exactive™ ハイブリッド四重極-オービトラップ質量分析計（Thermo Fisher Scientific）にて、マトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析装置は MALDI-TOF-MS AXIMA® Performance（島津製作所製）を用いて high-resolution モードで測定した。マトリックスには 2,5-ジヒドロキシ安息香酸（DHBA）を用いた。

高速液体クロマトグラフ装置は、分析システムとして島津 Nexera HPLC システム、分取システムとして Gilson HPLC システムを用いた。

吸収スペクトルは紫外可視近赤外分光光度計 JASCO V-550（日本分光株式会社）、蛍光スペクトルは分光蛍光光度計 F-7000（株式会社日立ハイテクサイエンス）で測定した。

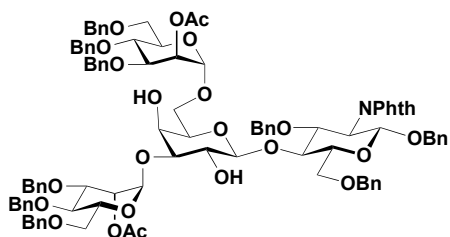
マイクロプレートリーダーは Infinite M200 PRO microplate reader（Tecan）もしくは SpectraMax i3x（Molecular Devices）を用いた。

反応に用いた溶媒および試薬は関東化学株式会社、東京化成工業株式会社、和光純薬工業株式会社、シグマ アルドリッチより購入した。薄層クロマトグラフィー（TLC）には、MERCK silica gel 60 F254CE を使用した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーには、KANTO CHEMICAL Silica Gel 60N（spherical,neutral）0.040-0.063 mm を用いた。YAMAZEN Hi-Flash column（山善株式会社）を使用した。ゲルろ過クロマトグラフィーは BIO-RAD Bio-Beads® S-X1（200-400mesh）を使用した。

酵素反応に用いた酵素は、東京化成工業株式会社より Endo-M、理化学研究所の鈴木先生、黄澄澄博士より Human ENGase および mouse ENGase、産業技術総合研究所の千葉靖典博士より Endo-Om、伏見製薬所より Endo-CC をご提供頂いた。Endo-H は New England Biolabs 社より購入した。

## 第2章

### Benzyl 2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1-4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside (8)

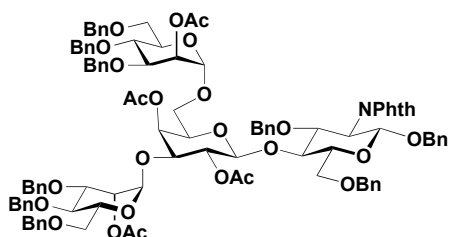


モレキュラーシーブス 4A (700 mg) にトリフルオロメタンスルホン酸銀 (27 mg, 0.11 mmol) を加え、 $-40^{\circ}\text{C}$  に冷却後、糖受容体 **9** (25 mg, 0.034 mmol) のジクロロメタン溶液 (4.0 mL) を加えた。続いて、糖供与体 **10** (36 mg, 0.71 mmol) のジクロロメタン溶液 (4.0 mL) を加え、徐々に  $0^{\circ}\text{C}$  へ昇温し、一晩攪拌した。反応液にトリエチルアミンを加え、反応を停止した。セライトろ過によりモレキュラーシーブスを除去し、酢酸エチルにて希釈、有機層を飽和食塩水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、再び飽和食塩水にて順次洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムにて乾燥した後、有機層を減圧濃縮した。得られた残渣をゲルろ過クロマトグラフィー (SX-1, トルエン)、続いてシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン / 酢酸エチル = 57 / 43) にて精製し、化合物 **8** (20 mg, 35%) を得た。

$R_f = 0.45$  (hexane / EtOAc = 3 / 2);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz):  $\delta$  7.74-6.73 (m, 49H, Ar), 5.42 (dd, 1H,  $J = 1.8, 3.2$  Hz, H-2<sup>c</sup>), 5.30 (dd, 1H,  $J = 1.7, 3.4$  Hz, H-2<sup>d</sup>), 5.08 (d, 1H,  $J = 8.5$  Hz, H-1<sup>a</sup>), 5.05 (d, 1H,  $J = 1.2$  Hz, H-1<sup>c</sup>), 4.88-4.38 (m, 20H, H-1<sup>d</sup>, H-1<sup>b</sup>,  $-\text{CH}_2\text{Ph} \times 18$ ), 4.32 (dd, 1H,  $J = 8.6, 10.7$  Hz, H-3<sup>a</sup>), 4.20 (dd, 1H,  $J = 8.6, 10.7$  Hz, H-2<sup>a</sup>), 4.16 (m, 1H, H-5c), 4.09 (t, 1H,  $J = 9.0$  Hz, H-4<sup>a</sup>), 4.06-4.03 (m, 2H, H-3<sup>c</sup>, H-6<sup>d</sup>), 3.94-3.89 (m, 3H, H-4<sup>b</sup>, H-4<sup>c</sup>, H-4<sup>d</sup>), 3.84 (dd, 1H,  $J = 3.2, 9.6$  Hz, H-3<sup>d</sup>), 3.80-3.77 (m, 3H, H-6<sup>a</sup>, H-6<sup>c</sup>, H-6<sup>d</sup>), 3.71-3.61 (m, 5H, H-6<sup>c</sup>, H-6<sup>b</sup>, H-5<sup>d</sup>, H-6<sup>a</sup>, H-2<sup>b</sup>), 3.59-3.51 (m, 3H, H-3<sup>b</sup>, H-5<sup>a</sup>, H-6<sup>b</sup>), 3.31 (dd, 1H,  $J = 5.4, 8.4$  Hz, H-5<sup>b</sup>), 2.16 (s, 3H,  $-\text{COCH}_3$ ), 2.11 (s, 3H,  $-\text{COCH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz):  $\delta$  170.6, 170.5, 138.7, 138.5, 138.4, 138.3, 138.1, 180.0, 137.4, 133.6, 131.7, 128.5, 128.4, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.2, 103.6 (C-1<sup>b</sup>), 98.4 (C-1<sup>d</sup>), 97.6 (C-1<sup>a</sup>), 96.2 (C-1<sup>c</sup>), 79.9 (C-3<sup>b</sup>), 78.6 (C-4<sup>a</sup>), 78.3 (C-3<sup>d</sup>), 78.2 (C-3<sup>c</sup>), 78.1 (C-3<sup>a</sup>), 75.3 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 75.2 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 74.8 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ , C-5<sup>a</sup>), 74.3 (C-4<sup>c</sup>), 74.0 (C-4<sup>d</sup>), 73.7 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 73.6 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 73.5 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 72.3 (C-5<sup>b</sup>), 72.2 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 71.9 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 71.7 (C-5<sup>c</sup>, C-5<sup>d</sup>), 70.9 (C-2<sup>b</sup>), 70.8 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 69.2 (C-2<sup>c</sup>), 68.9 (C-6<sup>c</sup>), 68.6 (C-2<sup>d</sup>), 68.5 (C-6<sup>a</sup>), 68.4 (C-6<sup>d</sup>), 65.4 (C-3<sup>b</sup>, C-5<sup>b</sup>), 56.0 (C-2<sup>a</sup>),

21.3 (-COCH<sub>3</sub>), 21.2 (-COCH<sub>3</sub>); MALDI-TOF MS *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>99</sub>H<sub>103</sub>NNaO<sub>24</sub>; 1712.676; found 1712.558.

**Benzyl 2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]-2,4-di-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1-4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside (11)**

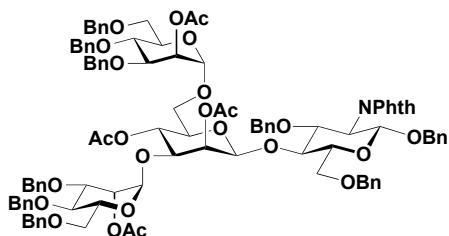


化合物 **8** (33 mg, 0.019 mmol) をピリジン溶媒 (1 mL) に溶かし、0 °C で無水酢酸 (500  $\mu$ L, 5.3 mmol) を加えた。室温で2時間反応させた後、反応混合物をメタノールにてクエンチした。反応混合物を酢酸エチルで希釈し1M塩酸、飽和食塩水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン / 酢酸エチル = 85 / 15 ~ 55 / 45) にて精製し、化合物 **11** (28 mg, 83%) を得た。

$R_f$  = 0.48 (toluene / EtOAc = 2 / 1); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz):  $\delta$  7.66-6.83 (m, 49H, Ar), 5.35 (d, 1H,  $J$  = 3.0 Hz, H-4<sup>b</sup>), 5.23 (dd, 1H,  $J$  = 1.8, 3.0 Hz, H-2<sup>c</sup>), 5.21 (dd, 1H,  $J$  = 1.8, 3.0 Hz, H-2<sup>d</sup>), 5.14 (d, 1H,  $J$  = 1.8 Hz, H-1<sup>c</sup>), 5.12 (dd, 1H,  $J$  = 8.4, 10.8 Hz, H-2<sup>b</sup>), 5.09 (d, 1H,  $J$  = 8.4 Hz, H-1<sup>a</sup>), 4.89-4.64 (m, 9H, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.62 (d, 1H,  $J$  = 1.8 Hz, H-1<sup>d</sup>), 4.58 (d, 1H,  $J$  = 7.8 Hz, H-1<sup>b</sup>), 4.53-4.40 (m, 9H, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.26-4.18 (m, 2H, H-3<sup>a</sup>, H-2<sup>a</sup>), 4.03 (dd, 1H,  $J$  = 9.0, 10.2 Hz, H-4<sup>a</sup>), 3.94 (t, 1H,  $J$  = 9.6 Hz, H-4<sup>d</sup>), 3.87 (dd, 1H,  $J$  = 3.0, 9.6 Hz, H-3<sup>d</sup>), 3.84-3.65 (m, 12H), 3.52 (m, 1H, H-5<sup>a</sup>), 3.35 (m, 1H, H-5<sup>b</sup>), 3.04 (t, 1H,  $J$  = 9.0 Hz, H-6<sup>a</sup>), 2.12 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2.11 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2.10 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 1.98 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz):  $\delta$  170.4, 170.1, 170.0, 169.4, 167.9, 138.8, 138.7, 138.6, 138.3, 138.2, 138.1, 137.9, 137.3, 133.7, 131.7, 129.2, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 127.2, 125.4, 123.3, 100.5 (C-1<sup>b</sup>), 98.1 (C-1<sup>d</sup>), 97.5 (C-1<sup>a</sup>), 94.4 (C-1<sup>c</sup>), 78.2 (C-3<sup>c</sup>), 78.1 (C-4<sup>a</sup>), 77.7 (C-3<sup>d</sup>), 76.6 (C-3<sup>a</sup>), 75.2 (-CH<sub>2</sub>Ph), 75.1 (C-5<sup>a</sup>), 75.0 (-CH<sub>2</sub>Ph), 74.5 (-CH<sub>2</sub>Ph), 73.9 (C-4<sup>d</sup>), 73.8 (C-4<sup>c</sup>), 73.6 (-CH<sub>2</sub>Ph), 73.5 (-CH<sub>2</sub>Ph), 73.4 (-CH<sub>2</sub>Ph), 72.2 (C-3<sup>b</sup>), 72.0 (C-5<sup>c</sup>), 71.9 (-CH<sub>2</sub>Ph), 71.8 (C-5<sup>d</sup>), 71.6 (-CH<sub>2</sub>Ph), 70.9 (C-5<sup>b</sup>), 70.8 (-CH<sub>2</sub>Ph), 70.6 (C-2<sup>b</sup>), 69.0 (C-6<sup>c</sup>), 68.6 (C-6<sup>d</sup>), 68.3 (C-2<sup>d</sup>), 68.0 (C-6<sup>a</sup>), 67.7 (C-2<sup>c</sup>), 64.7 (C-4<sup>b</sup>, C-6<sup>b</sup>), 55.8 (C-2<sup>a</sup>), 21.2 (-COCH<sub>3</sub>), 21.1 (-COCH<sub>3</sub>), 21.0 (-COCH<sub>3</sub>), 20.7 (-COCH<sub>3</sub>); MALDI-TOF MS *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>103</sub>H<sub>107</sub>NNaO<sub>26</sub>; 1796.697; found 1796.592.



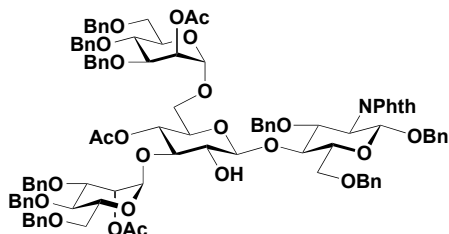
**Benzyl 2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]-2,4-di-*O*-acetyl- $\beta$ -D-mannopyranosyl-(1-4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside (5)**



化合物 **8** (40 mg, 0.024 mmol) をジクロロメタン (1.2 mL) に溶かし、0 °C にてピリジン (115  $\mu$ L, 1.42 mmol)、トリフルオロメタンスルホン酸 (80  $\mu$ L, 0.47 mmol) を加えた。室温で17時間攪拌後、反応液を酢酸エチルにて希釈、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (トルエン / 酢酸エチル = 93 / 7 ~ 63 / 37) にて精製し、ジトリフラート体 **12** (42 mg, 91%) を得た。得られた化合物 (42 mg, 0.021 mmol) をトルエン (2.0 mL) に溶かし、酢酸セシウム (90 mg, 0.47 mmol)、18-クラウン 6-エーテル (124 mg, 0.472 mmol) を加え、一晚超音波処理をおこなった。反応液を酢酸エチルで希釈後、有機層を順次、飽和食塩水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムにて乾燥、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (トルエン / 酢酸エチル = 97 / 3 ~ 44 / 57) にて精製し、化合物 **5** (31 mg, 82% in 2 steps) を得た。

$R_f$  = 0.58 (toluene / EtOAc = 3 / 1);  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.71-6.72 (m, 49H, Ar), 5.35 (d, 1H,  $J$  = 3.0 Hz, H-2<sup>b</sup>), 5.30 (m, 1H, H-2<sup>d</sup>), 5.17 (t, 1H,  $J$  = 9.8 Hz, H-4<sup>b</sup>), 5.11 (m, 1H, H-2<sup>c</sup>), 5.03 (m, 1H, H-1<sup>a</sup>), 4.91 (s, 1H, H-1<sup>c</sup>), 4.84-4.38 (m, 20H, H-1<sup>b</sup>, H-1<sup>d</sup>, -CH<sub>2</sub>Ph $\times$ 18), 4.17-4.13 (m, 2H, H-2<sup>a</sup>, H-3<sup>a</sup>), 4.08 (m, 1H, H-4<sup>a</sup>), 3.93-3.52 (m, 15H), 3.46 (m, 1H, H-5<sup>a</sup>), 3.22 (m, 1H, H-5<sup>b</sup>), 2.14, 2.11, 2.07, 1.96 (4s, 12H, -COCH<sub>3</sub> $\times$ 4);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.6, 170.3, 170.2, 169.9, 138.8, 138.7, 138.5 $\times$ 2, 138.4, 138.2 $\times$ 2, 138.0, 137.3, 129.2, 128.7, 128.5 $\times$ 2, 128.4, 128.3 $\times$ 2, 128.2, 128.1, 128.0 $\times$ 2, 127.9 $\times$ 2, 127.8, 127.7 $\times$ 2, 127.6 $\times$ 2, 127.5, 127.3, 125.4, 123.2, 100.1 (C-1<sup>c</sup>), 98.8 (C-1<sup>b</sup>), 98.1 (C-1<sup>d</sup>), 97.4 (C-1<sup>a</sup>), 79.0 (C-4<sup>a</sup>), 78.4 (C-3<sup>d</sup>), 77.7 (C-3<sup>b</sup>, C-3<sup>c</sup>), 76.4 (C-3<sup>a</sup>), 75.1 (-CH<sub>2</sub>Ph), 74.7 (-CH<sub>2</sub>Ph), 74.6 (C-5<sup>a</sup>), 74.4 (-CH<sub>2</sub>Ph), 74.2 (C-4<sup>d</sup>), 74.0 (C-4<sup>c</sup>), 73.5 (-CH<sub>2</sub>Ph), 73.4 (-CH<sub>2</sub>Ph), 73.0 (C-5<sup>b</sup>), 72.2 (C-5<sup>c</sup>), 71.9 (-CH<sub>2</sub>Ph), 71.8 (C-5<sup>d</sup>), 70.9 (C-2<sup>b</sup>), 70.8 (-CH<sub>2</sub>Ph), 69.2 (C-2<sup>c</sup>), 69.0 (C-6<sup>c</sup>, C-6<sup>d</sup>), 68.7 (C-4<sup>b</sup>), 68.6 (C-2<sup>d</sup>), 68.4 (C-6<sup>a</sup>), 66.9 (C-6<sup>b</sup>), 55.8 (C-2<sup>a</sup>), 21.2 (-COCH<sub>3</sub>), 21.1 (-COCH<sub>3</sub>), 21.0 (-COCH<sub>3</sub>), 20.9 (-COCH<sub>3</sub>); MALDI-TOF MS  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for C<sub>103</sub>H<sub>107</sub>NNaO<sub>26</sub>; 1796.697; found 1796.602.

**Benzyl 2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]-4-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside (6)**

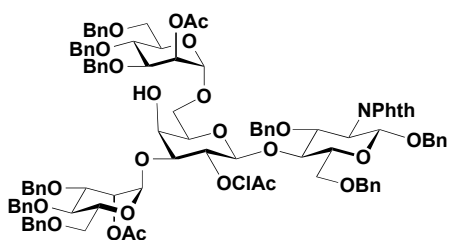


化合物 **8** (30 mg, 0.018 mmol) をジクロロメタン (1.0 mL) に溶かし、0 °C にてピリジン (9.0  $\mu$ L, 0.11 mmol)、トリフルオロメタンスルホン酸無水物 (6  $\mu$ L, 0.036 mmol) を加えた。室温で 20 分攪拌後、再び 0 °C にてピリジン (9.0  $\mu$ L, 0.11 mmol)、トリフルオロメタンスルホン酸無水物 (6  $\mu$ L, 0.036 mmol) を加え、30 分攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥、減圧濃縮し、残渣をトルエン共沸後、真空乾燥した。得られた化合物 **13** トルエン (2 mL) に溶かし、酢酸セシウム (34 mg, 0.18 mmol)、18-クラウン 6-エーテル (47 mg, 0.18 mmol) を加え、10 分間超音波処理をおこなった。反応液を酢酸エチルで希釈、有機層を順次、飽和食塩水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥、減圧濃縮し、残渣をプレパラティブ TLC (トルエン / 酢酸エチル = 2 / 1) にて精製し、化合物 **6** (30 mg, 94% in 2 steps) を得た。

$R_f$  = 0.40 (toluene / EtOAc = 2 / 1);  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.97-6.62 (m, 49H, Ar), 5.24 (q, 1H,  $J$  = 1.8 Hz, H-2<sup>d</sup>), 5.12 (dd, 1H,  $J$  = 2.4, 3.0 Hz, H-2<sup>c</sup>), 5.07 (d, 1H,  $J$  = 7.8 Hz, H-1<sup>a</sup>), 4.98 (t, 1H,  $J$  = 9.6 Hz, H-4<sup>b</sup>), 4.87 (d, 1H,  $J$  = 1.7 Hz, H-1<sup>c</sup>), 4.86-4.60 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.53-4.43 (m, 10H, H-1<sup>b</sup>, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.29 (d, 1H,  $J$  = 11.4 Hz, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.25 (dd, 1H,  $J$  = 10.8, 8.4 Hz, H-3<sup>a</sup>), 4.17 (dd, 1H,  $J$  = 10.8, 8.4 Hz, H-2<sup>a</sup>), 4.13-4.08 (m, 2H, H-5<sup>c</sup>, H-4<sup>a</sup>), 4.03 (dd, 1H,  $J$  = 11.4, 3.6 Hz, H-6<sup>a</sup>), 3.97 (dd, 1H,  $J$  = 9.6, 3.6 Hz, H-3<sup>c</sup>), 3.88 (bd, 1H,  $J$  = 1.8 Hz, OH), 3.86 (dd, 1H,  $J$  = 9.6, 3.6 Hz, H-3<sup>d</sup>), 3.83-3.67 (m, 7H, H-4<sup>c</sup>, H-4<sup>d</sup>, H-5<sup>d</sup>, H-6<sup>a</sup>, H-6<sup>d</sup>, H-6<sup>c</sup>), 3.64-3.61 (m, 2H, H-6<sup>b</sup>, H-6<sup>d</sup>), 3.53-3.48 (m, 2H, H-6<sup>b</sup>, H-5<sup>a</sup>), 3.42 (t, 1H,  $J$  = 8.2 Hz, H-2<sup>b</sup>), 3.37 (t, 1H,  $J$  = 9.0 Hz, H-3<sup>b</sup>), 3.29 (dt, 1H,  $J$  = 10.2, 3.6 Hz, H-5<sup>b</sup>), 2.14 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2.08 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 1.98 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.6, 170.3, 169.6, 138.9, 138.5, 138.4, 138.2, 138.0, 137.9, 137.4, 133.5, 131.8, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 127.2, 123.3, 102.9 (C-1<sup>b</sup>), 99.8 (C-1<sup>c</sup>), 98.2 (C-1<sup>d</sup>), 97.5 (C-1<sup>a</sup>), 86.0 (C-3<sup>b</sup>), 78.9 (C-4<sup>a</sup>), 78.3 (C-3<sup>d</sup>), 77.8 (C-3<sup>c</sup>), 77.0 (C-3<sup>a</sup>), 75.1 (-CH<sub>2</sub>Ph), 75.0 (-CH<sub>2</sub>Ph), 74.9 (C-5<sup>a</sup>), 74.5 (-CH<sub>2</sub>Ph), 74.3 (C-4<sup>c</sup>), 74.2 (C-4<sup>d</sup>), 73.7 (C-2<sup>b</sup>), 73.7 (-CH<sub>2</sub>Ph), 73.5 (-CH<sub>2</sub>Ph), 73.4 (-CH<sub>2</sub>Ph), 72.3 (C-5<sup>b</sup>), 72.1 (C-5<sup>c</sup>), 72.0 (-CH<sub>2</sub>Ph), 71.8 (C-5<sup>d</sup>, -CH<sub>2</sub>Ph), 70.8 (-CH<sub>2</sub>Ph),

69.7 (C-4<sup>b</sup>), 69.3 (C-2<sup>c</sup>), 69.1 (C-6<sup>c</sup>), 69.0 (C-6<sup>d</sup>), 68.6 (C-2<sup>d</sup>), 68.2 (C-6<sup>a</sup>), 66.7 (C-6<sup>b</sup>), 55.9 (C-2<sup>a</sup>), 21.2 (-COCH<sub>3</sub>), 21.1 (-COCH<sub>3</sub>), 21.0 (-COCH<sub>3</sub>); MALDI-TOF MS *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>101</sub>H<sub>105</sub>NNaO<sub>25</sub>; 1754.687; found 1754.438.

**Benzyl 2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]-2-*O*-chloroacetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1-4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside (17)**

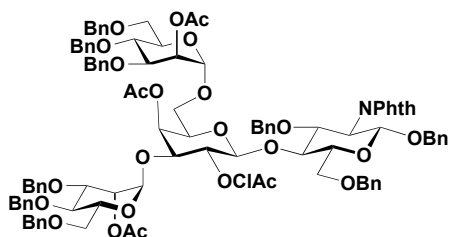


化合物 **8** (40 mg, 0.023mmol) をピリジン (1 mL) に溶かし、0 °C にて無水クロロ酢酸 (40 mg, 0.23 mmol) を加え、30 分攪拌した。その後、反応液に 0 °C にてメタノール (1 mL) を加え、3 日間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、得られた残渣を酢酸エチルにて希釈した。有機層を 1M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥、減圧濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (トルエン / 酢酸エチル = 85 / 15 ~ 65 / 35) にて精製し、化合物 **17** (34 mg, 82%) を得た。

$R_f = 0.50$  (toluene / EtOAc = 2 / 1); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.61-6.80 (m, 49H, Ar), 5.32 (dd, 1H,  $J = 1.9, 2.8$  Hz, H-2<sup>c</sup>), 5.29 (dd, 1H,  $J = 1.7, 3.1$  Hz, H-2<sup>d</sup>), 5.23 (dd, 1H,  $J = 8.1, 10.0$  Hz, H-2<sup>b</sup>), 5.10 (d, 1H,  $J = 1.7$  Hz, H-1<sup>d</sup>), 5.08 (d, 1H,  $J = 7.5$  Hz, H-1<sup>a</sup>), 4.87-4.84 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.82 (d, 1H,  $J = 1.8$  Hz, H-1<sup>d</sup>), 4.78-4.62 (m, 7H, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.59 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, H-1<sup>b</sup>), 4.55-4.39 (m, 9H, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.23-4.16 (m, 2H, H-2<sup>a</sup>, H-3<sup>a</sup>), 4.08 (dd, 1H,  $J = 8.2$  Hz, 9.6 Hz, H-4<sup>a</sup>), 4.02-3.96 (m, 4H, H-4<sup>b</sup>, H-4<sup>d</sup>, -COCH<sub>2</sub>Cl), 3.91 (dd, 1H,  $J = 3.0, 9.6$  Hz, H-3<sup>d</sup>), 3.88-3.82 (m, 4H, H-3<sup>c</sup>, H-4<sup>c</sup>, H-6<sup>a</sup>, H-6<sup>d</sup>), 3.78-3.67 (m, 8H, H-3<sup>b</sup>, H-5<sup>c</sup>, H-5<sup>d</sup>, H-6<sup>a</sup>, H-6<sup>d</sup>, H-6<sup>c</sup>, H-6<sup>b</sup>), 3.55-3.49 (m, 2H, H-6<sup>b</sup>, H-5<sup>a</sup>), 3.22 (dd, 1H,  $J = 5.0, 8.8$  Hz, H-5<sup>b</sup>), 2.51 (bd, 1H, -OH), 2.13 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2.12 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  170.8, 170.6, 166.1, 138.7, 138.5, 138.4, 138.3, 138.2, 138.1, 137.8, 137.3, 133.7, 131.8, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.2, 123.3, 99.9 (C-1<sup>b</sup>), 98.4 (C-1<sup>d</sup>), 97.5 (C-1<sup>a</sup>), 93.6 (C-1<sup>c</sup>), 78.3 (C-3<sup>d</sup>), 77.9 (C-3<sup>c</sup>), 77.6 (C-4<sup>a</sup>), 76.6 (C-3<sup>a</sup>), 75.3 (-CH<sub>2</sub>Ph), 75.2 (-CH<sub>2</sub>Ph), 75.0 (C-5<sup>a</sup>), 74.7 (-CH<sub>2</sub>Ph), 74.4 (C-3<sup>b</sup>), 74.1 (C-4<sup>d</sup>), 73.8 (C-4<sup>c</sup>), 73.7 (-CH<sub>2</sub>Ph), 73.6 (-CH<sub>2</sub>Ph), 73.5 (-CH<sub>2</sub>Ph), 72.4 (C-2<sup>b</sup>), 72.3 (C-5<sup>b</sup>), 72.2 (-CH<sub>2</sub>Ph), 72.1 (-CH<sub>2</sub>Ph), 72.0 (C-5<sup>c</sup>), 71.8 (C-5<sup>d</sup>), 70.9 (-CH<sub>2</sub>Ph), 68.9 (C-6<sup>c</sup>), 68.8 (C-2<sup>d</sup>), 68.6 (C-6<sup>d</sup>), 68.5 (C-2<sup>c</sup>), 68.1 (C-6<sup>a</sup>), 64.8

(C-6<sup>b</sup>), 63.7 (C-4<sup>b</sup>), 55.9 (C-2<sup>a</sup>), 40.8 (-COCH<sub>2</sub>Cl), 21.3 (-COCH<sub>3</sub>), 21.2 (-COCH<sub>3</sub>); MALDI-TOF MS *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>101</sub>H<sub>104</sub>ClNNaO<sub>25</sub>; 1788.648; found 1788.743.

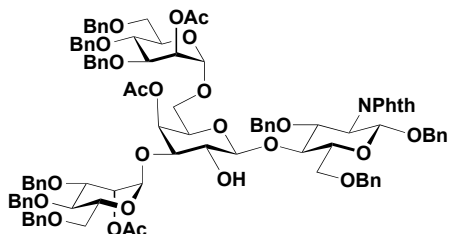
**Benzyl 2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]-4-*O*-acetyl-2-*O*-chloroacetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1-4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside (18)**



化合物 **17** (28 mg, 0.016 mmol) をピリジン (800  $\mu$ L) に溶かし、0  $^{\circ}$ C にて無水酢酸 (400  $\mu$ L, 4.2 mmol) を加え、40  $^{\circ}$ C にて一晩攪拌した。反応液に 0  $^{\circ}$ C にてメタノール (1 mL) を加え、反応を停止した。溶液を減圧留去した後、残渣を酢酸エチルにて希釈し、1 M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水にて順次洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムにて乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (トルエン / 酢酸エチル = 82 / 18 ~ 62 / 38) にて精製し、化合物 **18** (25 mg, 87%) を得た。

$R_f$  = 0.58 (toluene / EtOAc = 2 / 1); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.77-6.84 (m, 49H, Ar), 5.34 (d, 1H,  $J$  = 3.0 Hz, H-4<sup>b</sup>), 5.20 (m, 2H, H-2<sup>d</sup>, H-2<sup>c</sup>), 5.15-5.12 (m, 2H, H-1<sup>c</sup>, H-2<sup>b</sup>), 5.08 (d, 1H,  $J$  = 8.2 Hz, H-1<sup>a</sup>), 4.90-4.65 (m, 9H), 4.62 (d, 1H,  $J$  = 1.8 Hz, H-1<sup>d</sup>), 4.61 (d, 1H,  $J$  = 7.8 Hz, H-1<sup>b</sup>), 4.54-4.39 (m, 9H, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.26-4.18 (m, 2H, H-2<sup>a</sup>, H-3<sup>a</sup>), 4.08 (dd, 1H,  $J$  = 9.6, 8.2 Hz, H-4<sup>a</sup>), 4.00 (m, 2H, -COCH<sub>2</sub>Cl), 3.95 (t, 1H,  $J$  = 9.6 Hz, H-4<sup>d</sup>), 3.87-3.64 (m, 12H), 3.52 (m, 1H, H-5<sup>a</sup>), 3.27 (dd, 1H,  $J$  = 9.1, 6.0 Hz, H-5<sup>b</sup>), 3.03 (t, 1H,  $J$  = 9.3 Hz, H-6<sup>b</sup>), 2.12 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2.10 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2.10 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  170.4, 170.0, 169.9, 166.1, 138.7, 138.6, 138.3, 138.2, 138.1, 137.8, 137.3, 133.8, 131.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.0, 127.8, 127.7, 127.6, 127.2, 99.7 (C-1<sup>b</sup>), 98.2 (C-1<sup>d</sup>), 97.4 (C-1<sup>a</sup>), 94.4 (C-1<sup>c</sup>), 78.2 (C-3<sup>c</sup>), 77.7 (C-3<sup>d</sup>), 77.6 (C-4<sup>a</sup>), 76.6 (C-3<sup>a</sup>), 75.2 (-CH<sub>2</sub>Ph $\times$ 2), 74.9 (C-5<sup>a</sup>), 74.5 (-CH<sub>2</sub>Ph), 73.9 (C-4<sup>d</sup>), 73.7 (C-4<sup>c</sup>), 73.6 (-CH<sub>2</sub>Ph), 73.5 (-CH<sub>2</sub>Ph $\times$ 2), 72.5 (C-2<sup>b</sup>), 72.1 (C-3<sup>b</sup>), 72.0 (C-5<sup>c</sup>, -CH<sub>2</sub>Ph), 71.9 (C-5<sup>d</sup>), 71.6 (-CH<sub>2</sub>Ph), 70.9 (C-5<sup>b</sup>, -CH<sub>2</sub>Ph), 69.0 (C-6<sup>c</sup>), 68.6 (C-6<sup>d</sup>), 68.3 (C-2<sup>d</sup>), 68.1 (C-6<sup>a</sup>), 67.5 (C-2<sup>c</sup>), 64.8 (C-4<sup>b</sup>), 64.6 (C-6<sup>b</sup>), 55.8 (C-2<sup>a</sup>), 40.7 (-COCH<sub>2</sub>Cl), 21.3 (-COCH<sub>3</sub>), 21.1(-COCH<sub>3</sub>), 20.7 (-COCH<sub>3</sub>); MALDI-TOF MS *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>103</sub>H<sub>106</sub>ClNNaO<sub>26</sub>; 1830.658; found 1830.647.

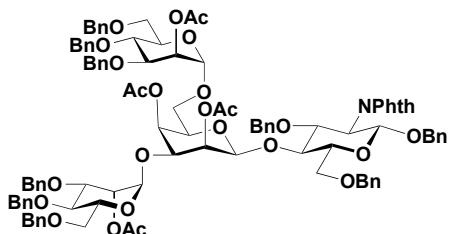
**Benzyl 2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]-4-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1-4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside (14)**



化合物 **18** (20 mg, 0.011 mmol) をテトラヒドロフラン (800  $\mu$ L) に溶かし、チオ尿素 (20 mg, 0.26 mmol) および炭酸水素ナトリウム (24 mg, 0.29 mmol)、ヨウ化テトラブチルアンモニウム (2.0 mg, 5.4  $\mu$ mol) を加え、60  $^{\circ}$ C にて 2 日間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (トルエン / 酢酸エチル = 90/10 ~ 70/30) にて精製し、化合物 **14** (14 mg, 74%) を得た。

$R_f$  = 0.53 (toluene / EtOAc = 2 / 1);  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.71-6.74 (m, 49H, Ar), 5.33-3.32 (m, 2H, H-2<sup>c</sup>, H-4<sup>b</sup>), 5.19 (dd, 1H,  $J$  = 1.8, 3.0 Hz, H-2<sup>d</sup>), 5.09 (d, 1H,  $J$  = 9.0 Hz, H-1<sup>a</sup>), 5.05 (d, 1H,  $J$  = 1.2 Hz, H-1<sup>c</sup>), 4.87-4.68 (m, 7H, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.63-4.59 (m, 3H, H-1<sup>d</sup>, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.56 (d, 1H, H-1<sup>b</sup>), 4.53-4.34 (m, 9H, -CH<sub>2</sub>Ph, H-3<sup>a</sup>), 4.21 (dd, 1H,  $J$  = 8.4, 10.8 Hz, H-2<sup>a</sup>), 4.12-4.03 (m, 3H, H-4<sup>a</sup>, H-5<sup>c</sup>, H-6<sup>a</sup>), 3.91 (dd, 1H,  $J$  = 3.0, 9.0 Hz, H-3<sup>c</sup>), 3.86 (t, 2H,  $J$  = 9.0 Hz, H-4<sup>c</sup>, H-4<sup>d</sup>), 3.81-3.57 (m, 10H), 3.41 (m, 1H, H-5<sup>b</sup>), 3.18 (t, 1H,  $J$  = 9.0 Hz, H-6<sup>b</sup>), 2.12 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2.08 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2.04 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.4, 170.0, 169.9, 138.7, 138.6, 138.5, 138.3, 138.2, 138.1, 137.8, 137.3, 133.7, 131.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 127.3, 103.6 (C-1<sup>b</sup>), 98.3 (C-1<sup>d</sup>), 97.7 (C-1<sup>a</sup>), 96.2 (C-1<sup>c</sup>), 78.6 (C-4<sup>a</sup>), 78.4 (C-3<sup>a</sup>, C-3<sup>c</sup>), 77.8 (C-3<sup>d</sup>), 76.8 (C-3<sup>b</sup>), 75.3 (-CH<sub>2</sub>Ph), 75.1 (-CH<sub>2</sub>Ph), 74.8 (C-2<sup>b</sup>), 74.7 (-CH<sub>2</sub>Ph), 74.4 (C-4<sup>d</sup>), 74.0 (C-4<sup>c</sup>), 73.9 (-CH<sub>2</sub>Ph), 73.5 (-CH<sub>2</sub>Ph $\times$ 2), 71.8 (C-5<sup>d</sup>, -CH<sub>2</sub>Ph), 71.6 (C-5<sup>c</sup>), 71.5 (-CH<sub>2</sub>Ph), 71.3 (C-5<sup>a</sup>, C-5<sup>b</sup>), 70.9 (-CH<sub>2</sub>Ph), 69.1 (C-6<sup>c</sup>), 68.7 (C-6<sup>d</sup>), 68.5 (C-2<sup>c</sup>, C-6<sup>a</sup>), 68.4 (C-2<sup>d</sup>), 65.9 (C-4<sup>b</sup>), 65.5 (C-6<sup>b</sup>), 56.0 (C-2<sup>a</sup>), 21.2 (-COCH<sub>3</sub>), 20.7 (-COCH<sub>3</sub>); MALDI-TOF MS  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for C<sub>101</sub>H<sub>105</sub>NNaO<sub>25</sub>; 1754.687; found 1754.819.

**Benzyl 2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]-2,4-di-*O*-acetyl- $\beta$ -D-talopyranosyl-(1-4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside (7)**

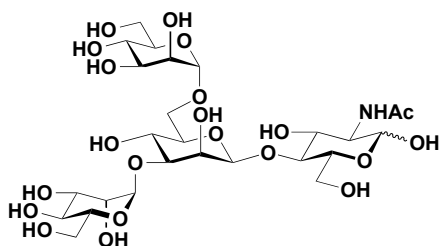


化合物 **14** (8.7 mg, 5.0  $\mu$ mol) をジクロロメタン (1.0 mL) に溶かし、0 °C にてピリジン (33  $\mu$ L, 0.42 mmol)、トリフルオロメタンスルホン酸 (23  $\mu$ L, 0.14 mmol) を加えた。室温で 12 時間攪拌後、反応液を酢酸エチルにて希釈後、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、1 M 塩酸、再び、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥、減圧濃縮し、残渣をトルエン共沸後、真空乾燥した。残渣をトルエン (1.0 mL) に溶かし、酢酸セシウム (26 mg, 0.14 mmol)、18-クラウン 6-エーテル (36 mg, 0.14 mmol) を加え、一晚超音波処理をおこなった。反応液を酢酸エチルで希釈後、有機層を飽和食塩水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、再び飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムにて乾燥、減圧濃縮し、残渣をプレパラティブ TLC (トルエン / 酢酸エチル = 2 / 1) にて精製し、化合物 (**20** (3.1 mg)、**21** (2.0 mg)) を得た。得られた化合物を、ピリジン (300  $\mu$ L) に溶かし、無水酢酸 (150  $\mu$ L, 1.6 mmol)、DMAP (触媒量) を加え、12 時間攪拌した。反応液を酢酸エチルにて希釈後、有機層を 1 M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥、減圧濃縮し、残渣をプレパラティブ TLC (トルエン / 酢酸エチル = 2 / 1) にて精製し、化合物 **7** (3 mg, 59% in 3 steps) を得た。

$R_f$  = 0.48 (toluene / EtOAc = 2 / 1);  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.66-6.83 (m, 49H, Ar), 5.24 (d, 1H,  $J$  = 3.6 Hz, H-2<sup>b</sup>), 5.22 (dd, 1H,  $J$  = 1.8, 2.4 Hz, H-2<sup>c</sup>), 5.18 (dd, 1H,  $J$  = 2.4, 3.6 Hz, H-2<sup>d</sup>), 5.17 (d, 1H,  $J$  = 1.8 Hz, H-4<sup>b</sup>), 5.07 (d, 1H,  $J$  = 1.8 Hz, H-1<sup>c</sup>), 5.06 (d, 1H,  $J$  = 9.0 Hz, H-1<sup>a</sup>), 4.87-4.76 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.67-4.61 (m, 6H, H-1<sup>d</sup>, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.57 (d, 1H,  $J$  = 1.2 Hz, H-1<sup>b</sup>), 4.51-4.36 (m, 9H, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.26-4.17 (m, 2H, H-3<sup>a</sup>, H-2<sup>a</sup>), 4.07 (dd, 1H,  $J$  = 8.4, 9.8 Hz, H-4<sup>a</sup>), 3.92 (t, 1H,  $J$  = 9.6 Hz, H-4<sup>d</sup>), 3.85-3.78 (m, 5H, H-3<sup>c</sup>, H-3<sup>d</sup>, H-4<sup>c</sup>, H-5<sup>c</sup>, H-6<sup>d</sup>), 3.75-3.63 (m, 8H, H-3<sup>b</sup>, H-5<sup>d</sup>, H-6<sup>a</sup>, H-6<sup>b</sup>, H-6<sup>c</sup>, H-6<sup>d</sup>), 3.50 (m, 1H, H-5<sup>a</sup>), 3.28 (ddd, 1H,  $J$  = 1.8, 5.4, 9.0 Hz, H-5<sup>b</sup>), 3.02 (t, 1H,  $J$  = 9.0 Hz, H-6<sup>b</sup>), 2.11 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2.11 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2.06 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 1.97 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.4, 170.0, 169.8, 138.7, 138.6, 138.3, 138.2, 138.1, 138.0, 137.3, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 127.3, 98.9 (C-1<sup>b</sup>), 98.2 (C-1<sup>d</sup>), 97.5 (C-1<sup>a</sup>), 95.8 (C-1<sup>c</sup>), 78.4 (C-4<sup>a</sup>), 77.7 (C-3<sup>c</sup>), 77.5 (C-3<sup>d</sup>), 76.9 (C-3<sup>a</sup>), 75.1 (-CH<sub>2</sub>Ph), 74.9 (-CH<sub>2</sub>Ph), 74.6

(C-5<sup>a</sup>), 74.5 (-CH<sub>2</sub>Ph), 74.1 (C-4<sup>c</sup>), 73.9 (C-4<sup>d</sup>), 73.5 (-CH<sub>2</sub>Ph×2), 73.4 (-CH<sub>2</sub>Ph), 72.6 (C-5<sup>c</sup>), 71.9 (-CH<sub>2</sub>Ph), 71.8 (C-5<sup>d</sup>), 71.6 (C-5<sup>b</sup>), 71.4 (-CH<sub>2</sub>Ph), 70.8 (-CH<sub>2</sub>Ph), 70.1 (C-3<sup>b</sup>), 69.1 (C-6<sup>c</sup>), 68.6 (C-6<sup>d</sup>), 68.5 (C-6<sup>a</sup>), 68.4 (C-2<sup>b</sup>, C-2<sup>c</sup>, C-2<sup>d</sup>), 65.1 (C-6<sup>b</sup>), 63.0 (C-4<sup>b</sup>), 55.8 (C-2<sup>a</sup>), 21.2 (-COCH<sub>3</sub>), 21.1 (-COCH<sub>3</sub>), 20.9 (-COCH<sub>3</sub>), 20.6 (-COCH<sub>3</sub>); MALDI-TOF MS *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>103</sub>H<sub>107</sub>NNaO<sub>26</sub>; 1796.697; found 1796.781.

**α-D-mannopyranosyl-(1-3)-[α-D-mannopyranosyl-(1-6)]-β-D-mannopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose (22)**

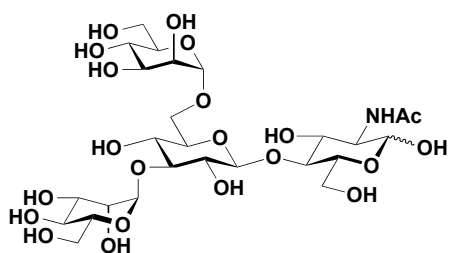


化合物 **5** (71 mg, 40 μmol) に *n*-ブチルアルコール (1.5 mL)、エチレンジアミン (150 μL, 2.25 mmol) を加え、アルゴンガス雰囲気下 90 °C にて一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残渣をピリジン (1 mL) に溶かし、氷浴中、無水酢酸 (500 μL, 5.29 mmol) を加え、アルゴン雰囲気下 40 °C にて一晩攪拌した。メタノール (1 mL) を加え反応を停止し、反応液を減圧濃縮した。残渣を酢酸エチルにて希釈し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、食塩水にて洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥し、減圧濃縮した。残渣をテトラヒドロフラン (1.0 mL)、メタノール (1.0 mL) に溶かし、氷浴中 1 M ナトリウムメトキシド/メタノール (500 μL, 0.50 mmol) を加え、アルゴンガス雰囲気下、40 °C で一晩攪拌した。反応液をアンバーリストにて中和後、アンバーリストをろ別し、溶液を減圧濃縮した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (クロロホルム / メタノール = 100 / 0 ~ 93 / 7) にて精製し、化合物 (49 mg, 82% in 3 steps) を得た。化合物 (49 mg, 0.032 μmol) をテトラヒドロフラン (3.0 mL) に溶かし、水 (3.0 mL) を加えた。反応容器をアルゴンガスにて置換し、水酸化パラジウム (30 mg) を加え、再び反応容器をアルゴンガスで置換した。反応系内を水素ガスで置換、充填後、室温で一晩攪拌した。セライトろ過にて水酸化パラジウムを除去し、反応液を減圧濃縮した。残渣を ISOLUT 18C (MilliQ 水) にて精製後、凍結乾燥し、化合物 **22** (23 mg, 82% in 4 steps) を得た。

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 5.27 (s, 1H, H-1<sup>a</sup>, α-anomer), 5.17 (s, 1H, H-1<sup>c</sup>), 5.00 (s, 1H, H-1<sup>d</sup>), 4.85 (s, 1H, H-1<sup>b</sup>) 4.79 (m, 1H, H-1<sup>a</sup>, β-anomer), 4.31 (m, 1H), 4.13 (m, 1H), 4.04-3.62 (m, 23H), 2.12 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 175.1, 174.8, 102.7 (C-1<sup>c</sup>), 100.6 (C-1<sup>b</sup>), 99.9 (C-1<sup>d</sup>), 95.2 (C-1<sup>a</sup>, β-anomer), 90.8 (C-1<sup>a</sup>, α-anomer), 80.8, 80.5, 80.2, 74.7, 74.5, 73.7, 73.0, 72.5, 70.7, 70.6,

70.5, 70.4, 70.3, 70.2, 69.4, 67.2, 67.1, 66.2, 66.1, 61.4, 61.3, 60.6, 60.4, 56.4, 53.9, 22.5, 22.2. MALDI-TOF MS  $m/z$ :  $[M+Na]^+$  calcd for  $C_{26}H_{45}NNaO_{21}$ ; 730.238; found 730.145.

**$\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose (23)**

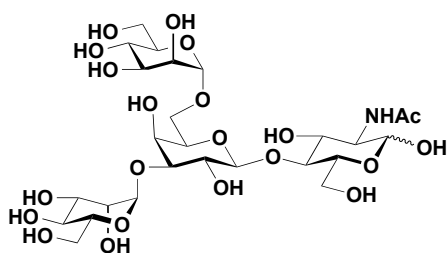


化合物 **6** (33 mg, 18  $\mu$ mol) に *n*-ブチルアルコール (1.0 mL)、エチレンジアミン (100  $\mu$ L, 1.5 mmol) を加え、アルゴンガス雰囲気下 90 °C にて一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残渣をピリジン (1 mL) に溶かし、氷浴中、無水酢酸 (500  $\mu$ L, 5.29 mmol) を加えた。反応容器をアルゴンで置換した後 40 °C にて一晩攪拌した。メタノールを加え反応を停止し、酢酸エチルにて希釈、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、食塩水で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥、減圧濃縮した。残渣をテトラヒドロフラン (1 mL) に溶かし、氷浴中 1 M ナトリウムメトキシド/メタノール (500  $\mu$ L, 0.50 mmol) を加え、アルゴンガス雰囲気下、40 °C で 5 時間した。アンバーリストを加えて中和後、ろ過にてアンバーリストを除去、溶液を減圧濃縮した。得られた残渣をゲルろ過クロマトグラフィー (LH20, メタノール 100%)、プレパラティブ TLC (クロロホルム / メタノール = 20 / 1) にて精製し、化合物 (17 mg, 63% in 3 steps) を得た。得られた化合物 (17 mg, 0.011 mmol) をテトラヒドロフラン (2.0 mL) に溶かし、水 (2.0 mL) を加えた。反応容器をアルゴンガスにて置換し、水酸化パラジウム (10 mg) を加え、再びアルゴンガスで置換した。反応系内を水素ガスで置換、充填後、室温で二晩攪拌した。セライトろ過にて水酸化パラジウムを除去し、溶液を減圧濃縮した。残渣を ISOLUT 18C (MilliQ 水) にて精製後、凍結乾燥し、化合物 **23** (7.7 mg, 61% in 4 steps) を得た。

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  5.21 (m, 2H, H-1<sup>a</sup>,  $\alpha$ -anomer, H-1<sup>c</sup>), 4.90 (s, 1H, H-1<sup>d</sup>), 4.72 (m, 1H, H-1<sup>a</sup>,  $\beta$ -anomer), 4.57-4.55 (m, 1H, H-1<sup>b</sup>), 4.05 (m, 1H, H-2<sup>e</sup>), 3.99-3.59 (m, 23H), 3.41-3.37 (m, 1H, H-2<sup>b</sup>), 2.05 (m, 3H, -COCH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  174.6, 103.0 (C-1<sup>b</sup>), 101.1 (C-1<sup>c</sup>), 99.9 (C-1<sup>d</sup>), 94.9 (C-1<sup>a</sup>,  $\beta$ -anomer), 90.6 (C-1<sup>b</sup>,  $\alpha$ -anomer), 82.2, 82.1, 80.3, 79.9, 74.7, 73.9, 72.8, 72.7, 72.6, 72.0, 70.5, 70.4, 70.3, 70.1, 70.0, 69.9, 69.3, 66.8, 66.5, 65.7, 65.6, 61.0, 60.7, 60.0, 53.7, 29.7, 22.0; MALDI-TOF MS  $m/z$ :  $[M+Na]^+$  calcd for  $C_{26}H_{45}NNaO_{21}$ ; 730.238; found 730.216.



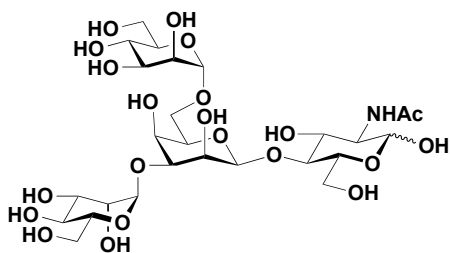
**$\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose (24)**



化合物 **8** (68 mg, 40  $\mu$ mol) に *n*-ブチルアルコール (1.5 mL)、エチレンジアミン (150  $\mu$ L, 2.25 mmol) を加え、アルゴンガス雰囲気下、90  $^{\circ}$ C にて一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残渣をピリジン (1 mL) に溶かし、氷浴中、無水酢酸 (500  $\mu$ L, 5.29 mmol) を加え、アルゴン雰囲気下 40  $^{\circ}$ C にて一晩攪拌した。メタノール (1 mL) を加え反応を停止し、反応液を減圧濃縮した。残渣を酢酸エチルにて希釈し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、食塩水にて洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥し、減圧濃縮した。残渣をテトラヒドロフラン (1 mL)、メタノール (1 mL) に溶かし、氷浴中 1 M ナトリウムメトキシド/メタノール (500  $\mu$ L) を加え、アルゴンガス雰囲気下、40  $^{\circ}$ C で一晩攪拌した。反応液をアンバーリストにて中和後、アンバーリストをろ別し、溶液を減圧濃縮した。得られた残渣をプレパラティブ TLC (クロロホルム / メタノール = 100 / 0~93 / 7) にて精製し、化合物 (59 mg, 97% in 3 steps) を得た。得られた化合物 (59 mg, 39  $\mu$ mol) をテトラヒドロフラン (3.0 mL) に溶かし、水 (3.0 mL) を加えた。反応容器をアルゴンガスにて置換し、水酸化パラジウム (40 mg) を加え、再び反応容器をアルゴンガスで置換した。反応系内を水素ガスで置換、充填後、30  $^{\circ}$ C にて一晩攪拌した。セライトろ過にて水酸化パラジウムを除去し、反応液を減圧濃縮した。残渣を ISOLUT 18C (MilliQ 水) にて精製後、凍結乾燥し、化合物 **24** (26 mg, 92% in 4 steps) を得た。

$^1$ H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  5.28 (d, 1H,  $J$  = 2.4 Hz, H-1<sup>a</sup>,  $\alpha$ -anomer), 5.10 (s, 1H, H-1<sup>c</sup>), 4.96 (s, 1H, H-1<sup>d</sup>), 4.79 (m, 1H, H-1<sup>a</sup>,  $\beta$ -anomer), 4.60 (m, 1H, H-1<sup>b</sup>), 4.25 (bs, 1H), 4.07-3.67 (m, 23H), 2.12 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>); MALDI-TOF MS  $m/z$ : [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>26</sub>H<sub>45</sub>NNaO<sub>21</sub>; 730.238; found 730.167.

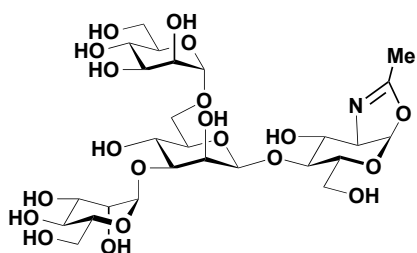
$\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]- $\beta$ -D-talopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose (25)



化合物 7 (4.0 mg, 2.3  $\mu$ mol) に *n*-ブチルアルコール (800  $\mu$ L)、エチレンジアミン (80  $\mu$ L, 1.20 mmol) を加え、アルゴンガス雰囲気下 90  $^{\circ}$ C にて一晚攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残渣をピリジン (800  $\mu$ L) に溶かし、氷浴中、無水酢酸 (500  $\mu$ L, 4.23 mmol) を加えた。反応容器をアルゴンで置換した後 40  $^{\circ}$ C にて一晚攪拌した。メタノールを加え反応を停止し、酢酸エチルにて希釈、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、食塩水で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムにて乾燥、減圧濃縮した。残渣をテトラヒドロフラン (800  $\mu$ L)、メタノール (400  $\mu$ L) に溶かし、氷浴中 1 M ナトリウムメトキシド/メタノール (400  $\mu$ L, 0.50 mmol) を加え、アルゴンガス雰囲気下、40  $^{\circ}$ C で一晚攪拌した。アンバーリストを加えて中和後、アンバーリストを慮別し、溶液を減圧濃縮した。得られた残渣をプレパラティブ TLC (クロロホルム / メタノール = 20 / 1) にて精製し、化合物 (3.0 mg, 88% in 3 steps) を得た。得られた化合物 (3.0 mg, 2.0  $\mu$ mol) をテトラヒドロフラン (1 mL) に溶かし、水 (1 mL) を加えた。反応容器をアルゴンガスにて置換し、水酸化パラジウム (10 mg) を加え、再びアルゴンガスで置換した。反応系内を水素ガスで置換、充填後、室温で一晩攪拌した。セライトろ過にて水酸化パラジウムを除去し、溶液を減圧濃縮した。残渣を ISOLUT 18C (MilliQ 水) にて精製後、凍結乾燥し、化合物 25 (1.4 mg, 88% in 4 steps) を得た。

$^1$ H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  5.26 (d, 1H,  $J$  = 3.0 Hz, H-1<sup>a</sup>,  $\alpha$ -anomer), 5.15 (s, 1H, H-1<sup>c</sup>), 4.95 (s, 1H, H-1<sup>d</sup>), 4.77 (m, 2H, H-1<sup>b</sup>, H-1<sup>a</sup>,  $\beta$ -anomer), 4.25 (m, 1H), 4.13-3.66 (m, 24H), 2.10 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>); MALDI-TOF MS  $m/z$ : [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>26</sub>H<sub>45</sub>NNaO<sub>21</sub>; 730.238; found 730.151.

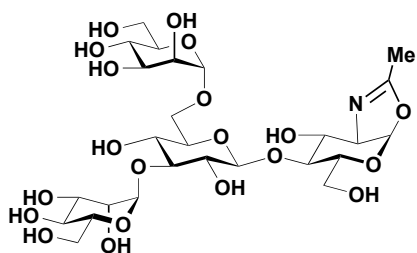
**$\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]- $\beta$ -D-mannopyranosyl-(1-4)-(1, 2-dideoxy - $\alpha$ -D-glucopyrano)-[2, 1-*d*]-2-oxazoline (1)**



化合物 **22** (4.2 mg, 6.0  $\mu$ mol)、炭酸カリウム (10.5 mg, 75  $\mu$ mol) を水 (100  $\mu$ L) に CDMBI (6.5 mg, 30  $\mu$ mol) を加え、0  $^{\circ}$ C にて 2 時間攪拌した。反応液 10  $\mu$ L を D<sub>2</sub>O にて希釈し、NMR スペクトルを測定した。反応の終了を確認した後、反応液をろ過し、基質溶液を得た。得られた溶液はそのまま酵素反応に用いた。

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  5.96 (d, 1H,  $J$  = 7.2 Hz, H-1<sup>a</sup>), 4.96 (d, 1H,  $J$  = 1.2 Hz), 4.82 (s, 1H), 4.26 (dd, 1H,  $J$  = 1.8, 3.0 Hz), 4.08 (m, 1H), 4.02 (d, 1H,  $J$  = 3.0 Hz), 3.93 (dd, 1H,  $J$  = 1.8, 3.0 Hz), 3.89 (q, 1H,  $J$  = 1.8 Hz), 3.46 (dd, 1H,  $J$  = 6.0, 5.4 Hz), 3.80-3.44 (m, 20H), 3.34-3.27 (m, 2H), 1.94 (d, 3H, -CH<sub>3</sub>).

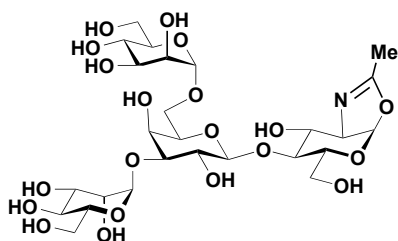
**$\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-4)-(1, 2-dideoxy - $\alpha$ -D-glucopyrano)-[2, 1-*d*]-2-oxazoline (2)**



化合物 **23** (4.2 mg, 6.0  $\mu$ mol)、炭酸カリウム (10.5 mg, 75  $\mu$ mol) を水 (100  $\mu$ L) に CDMBI (6.5 mg, 30  $\mu$ mol) を加え、0  $^{\circ}$ C にて 2 時間攪拌した。反応液 10  $\mu$ L を D<sub>2</sub>O にて希釈し、NMR スペクトルを測定した。反応の終了を確認した後、反応液をろ過し、基質溶液を得た。得られた溶液はそのまま酵素反応に用いた。

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  6.09 (d, 1H,  $J$  = 7.2 Hz, H-1<sup>a</sup>), 5.20 (d, 1H,  $J$  = 1.8 Hz), 4.92 (d, 1H,  $J$  = 1.8 Hz), 4.52 (d, 1H,  $J$  = 7.8 Hz), 4.40 (m, 1H), 4.21 (m, 1H), 4.05 (dd, 1H,  $J$  = 3.0, 1.8 Hz), 4.00 (dd,  $J$  = 1.8, 1.2 Hz), 3.99-3.60 (m, 20H), 3.47-3.42 (m, 1H), 3.34 (m, 1H), 2.06 (m, 3H, -CH<sub>3</sub>).

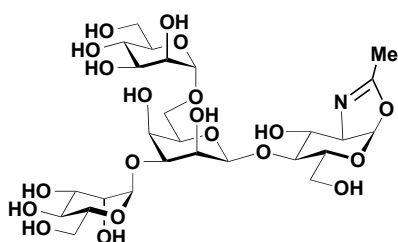
**$\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1-4)-(1, 2-dideoxy- $\alpha$ -D-glucopyrano)-[2, 1-*d*]-2-oxazoline (3)**



化合物 **24** (4.2 mg, 6.0  $\mu$ mol)、炭酸カリウム (10.5 mg, 75  $\mu$ mol) を水 (100  $\mu$ L) に CDMBI (6.5 mg, 30  $\mu$ mol) を加え、0  $^{\circ}$ C にて 2 時間攪拌した。反応液 10  $\mu$ L を D<sub>2</sub>O にて希釈し、NMR スペクトルを測定した。反応の終了を確認した後、反応液をろ過し、基質溶液を得た。得られた溶液はそのまま酵素反応に用いた。

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  5.96 (d, 1H,  $J$  = 7.2 Hz, H-1<sup>a</sup>), 4.91 (d, 1H,  $J$  = 1.8 Hz), 4.78 (d, 1H,  $J$  = 1.8 Hz), 4.36 (d, 1H,  $J$  = 7.8 Hz, H-1<sup>b</sup>), 4.31 (dd, 1H,  $J$  = 3.0, 1.8 Hz), 4.08 (m, 1H), 4.05 (d, H,  $J$  = 3.6 Hz), 3.89-3.44 (m, 24H), 3.34-3.32 (m, 1H), 1.94 (d, 3H, -CH<sub>3</sub>).

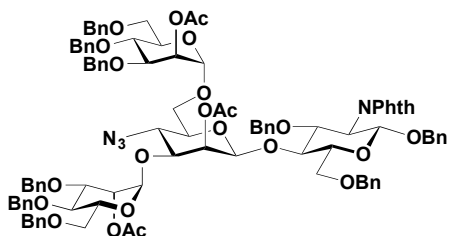
**$\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]- $\beta$ -D-talopyranosyl-(1-4)-(1, 2-dideoxy- $\alpha$ -D-glucopyrano)-[2, 1-*d*]-2-oxazoline (4)**



化合物 **25** (2.3 mg, 3.3  $\mu$ mol)、炭酸カリウム (5.6 mg, 41  $\mu$ mol) を水 (100  $\mu$ L) に CDMBI (3.5 mg, 16  $\mu$ mol) を加え、0  $^{\circ}$ C にて 2 時間攪拌した。反応液 8  $\mu$ L を D<sub>2</sub>O にて希釈し、NMR スペクトルを測定した。反応の終了を確認した後、反応液をろ過し、基質溶液を得た。得られた溶液はそのまま酵素反応に用いた。

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  5.99 (d, 1H,  $J$  = 7.2 Hz, H-1<sup>a</sup>), 4.99 (d, 1H,  $J$  = 1.8 Hz), 4.82 (d, 1H,  $J$  = 1.2 Hz), 4.59 (s, 1H, H-1<sup>b</sup>), 4.30 (dd, 1H,  $J$  = 3.0, 1.8 Hz), 4.10 (m, 1H), 4.00-3.50 (m, 25H), 1.96 (d, 3H, -CH<sub>3</sub>).

**Benzyl 2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[2-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]-2-*O*-acetyl-4-azido-4-deoxy- $\beta$ -D-mannopyranosyl-(1-4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside (30)**

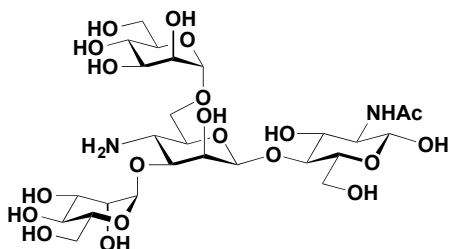


化合物 **8** (33 mg, 20  $\mu$ mol) をジクロロメタン (1.2 mL) に溶かし、0 °C にてピリジン (94  $\mu$ L, 1.2 mmol)、トリフルオロメタンスルホン酸無水物 (65  $\mu$ L, 0.39 mmol) を加えた。室温で16時間攪拌後、反応液を酢酸エチルにて希釈、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムにて乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (トルエン / 酢酸エチル = 90 / 10 ~ 70 / 30) にて精製し、ジトリフレート化合物 **12** を得た。得られた化合物 **12** をトルエンにて共沸、真空乾燥した後、トルエン (2 mL) に溶かし、0 °C にてテトラブチルアンモニウムアジド (6.1 mg, 22  $\mu$ mol) を加え、室温にて2時間攪拌した。反応液を酢酸エチルにて希釈、有機層を飽和食塩水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムにて乾燥後、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (トルエン / 酢酸エチル = 90 / 0 ~ 65 / 35) にて精製し、4位がアジド化された化合物 **31** (384 mg, 97%) を得た。得られた化合物をトルエン共沸、真空乾燥した後トルエン (2 mL) に溶かし、酢酸セシウム (37 mg, 0.20 mmol)、18-クラウン 6-エーテル (52 mg, 0.20 mmol) を加え、一晩超音波処理をおこなった。反応液を酢酸エチルで希釈後、有機層を順次、飽和食塩水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムにて乾燥、減圧濃縮し、残渣をプレパラティブ TLC (トルエン / 酢酸エチル = 7 / 2) にて精製し、化合物 **30** (23 mg, 68% in 3 steps) を得た。

$R_f$  = 0.51 (toluene / EtOAc = 3 / 1);  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.72-6.67 (m, 49H), 5.46 (dd, 1H,  $J$  = 3.0, 2.4 Hz, H-2), 5.33 (d, 1H,  $J$  = 3.0 Hz, H-2<sup>b</sup>), 5.30 (dd, 1H,  $J$  = 3.0, 2.4 Hz, H-2), 5.06 (d, 1H,  $J$  = 1.8 Hz, H-1<sup>c</sup>), 5.01 (d, 1H,  $J$  = 8.4 Hz, H-1<sup>a</sup>), 4.93 (d, 1H,  $J$  = 1.7 Hz, H-1<sup>d</sup>), 4.85-4.63 (m, 8H), 4.52-4.31 (m, 11H), 4.14-4.03 (m, 3H), 3.98 (t, 1H,  $J$  = 9.6 Hz), 3.92 (dd, 1H,  $J$  = 9.0, 3.0 Hz), 3.89-3.66 (m, 13H), 3.44 (m, 1H), 3.33 (dd, 1H,  $J$  = 10.2, 3.0 Hz), 2.87 (dt, 1H,  $J$  = 9.6, 2.4 Hz), 2.18 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2.08 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 1.79 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.5, 170.1, 169.9, 167.6, 138.6, 138.5, 138.4, 138.2, 138.1, 137.9, 137.3, 128.8, 128.5, 128.4, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.3, 123.2, 100.4, 99.1, 98.2, 97.3, 79.5, 78.2, 77.9, 76.1, 75.3,

74.9, 74.5, 74.3×2, 73.9, 73.6, 73.5×2, 72.7, 72.1, 72.0, 71.8, 70.8, 70.2, 68.9, 68.8, 68.4, 65.9, 58.5, 55.8, 21.3, 21.1, 20.8; MALDI-TOF MS  $m/z$ :  $[M+Na]^+$  calcd for  $C_{101}H_{104}N_4NaO_{24}$ ; 1779.693; found 1779.519.

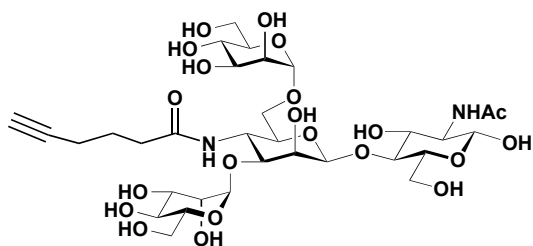
**$\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]- $\beta$ -D-4-deoxy-4-azido mannopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose (29)**



化合物 **30** (12 mg, 6.8  $\mu$ mol) を *n*-ブチルアルコール (1 mL)、エチレンジアミン (100  $\mu$ L, 1.5 mmol) を加え、アルゴンガス雰囲気下、90 °C にて一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残渣をピリジン (1.0 mL) に溶かし、氷浴中、無水酢酸 (500  $\mu$ L, 5.29 mmol) を加え、アルゴン雰囲気下、40 °C にて一晩攪拌した。メタノール (1 mL) を加え反応を停止し、反応液を減圧濃縮した。残渣を酢酸エチルにて希釈し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、食塩水にて順次洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムにて乾燥し、減圧濃縮した。残渣をテトラヒドロフラン (1 mL) に溶かし、氷浴中 1 M ナトリウムメトキシド/メタノール (500  $\mu$ L) を加え、アルゴンガス雰囲気下、40 °C で一晩攪拌した。反応液をアンバーリストにて中和後、アンバーリストをろ別し、ろ液を減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム / メタノール = 100 / 0~90 / 10) にて精製し、脱保護中間体を得た。得られた中間体をテトラヒドロフラン (3 mL) に溶かし、水 (3 mL) を加えた。反応容器をアルゴンガスにて置換し、水酸化パラジウム (10 mg) を加え、再び反応容器をアルゴンガスで置換した。ついで反応容器を水素ガスで置換後、40 °C にて一晩攪拌した。セライトろ過にて水酸化パラジウムを除去した後、反応液を凍結乾燥した。残渣を ISOLUT 18C (MilliQ 水) にて精製後、凍結乾燥し、化合物 **29** (3.7 mg, 78% in 4 steps) を得た。

$R_f$  = 0.17 ( $CH_3CN / H_2O = 2 / 1$ );  $^1H$  NMR (600 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  5.20 (d, 1H,  $J = 3.1$  Hz, H-1<sup>a</sup>,  $\alpha$ -anomer), 5.05 (s, 1H, H-1<sup>c</sup>), 4.92 (s, 1H, H-1<sup>d</sup>), 4.75 (m, 1H, H-1<sup>b</sup>), 4.71 (m, H-1<sup>a</sup>,  $\beta$ -anomer), 4.33 (m, 1H, H-2<sup>b</sup>), 4.10 (m, 1H, H-2<sup>c</sup>), 3.97-3.56 (m, 23H), 3.12 (t, 1H,  $J = 10.1$  Hz), 2.04 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>);  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  225.4, 175.1, 174.8, 103.1 (C-1<sup>c</sup>), 100.6 (C-1<sup>b</sup>), 100.2 (C-1<sup>d</sup>), 95.2 (C-1<sup>a</sup>,  $\beta$ -anomer), 90.8 (C-1<sup>a</sup>,  $\alpha$ -anomer), 81.7, 80.5, 80.2, 74.7, 74.2, 73.9, 73.2, 72.6, 70.7, 70.7, 70.6, 70.3, 70.1, 69.5, 69.4, 67.1, 66.7, 66.6, 61.4, 61.3, 60.5, 60.4, 56.4, 53.9, 47.9, 29.9, 22.5, 22.2; MALDI-TOF MS  $m/z$ :  $[M+Na]^+$  calcd for  $C_{26}H_{46}N_2NaO_{20}$ ; 729.254; found 729.175.

**$\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]- $\beta$ -D-4-deoxy-4-(5-hexynoyl amino)-mannopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose (28)**

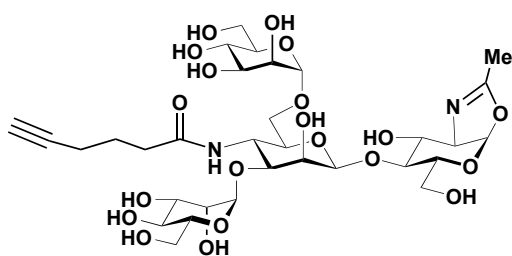


化合物**29** (3.0 mg, 4.2  $\mu$ mol) をジメチルスルホキシド (300  $\mu$ L) に溶解し、ジメチルアミノピリジン (0.93 mg, 7.6  $\mu$ mol)、5-ヘキシン酸 (0.76  $\mu$ L, 6.6  $\mu$ mol)、HATU (2.9 mg, 7.6  $\mu$ mol) を加え、室温にて2日間反応させた。反応液を水にて希釈、水層をジエチルエーテルにて洗浄後、水層を凍結乾燥した。得られた残渣をHPLC (COSMOSIL Protein-R, 20  $\times$  250 mm, H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN = 97 / 3, 7.0 mL / min) により精製し、化合物**28** (2.3 mg, 68%) を得た。

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  5.21 (d, 1H,  $J$  = 3.1 Hz, H-1<sup>a</sup>,  $\alpha$ -anomer), 4.95 (s, 1H, H-1<sup>c</sup>), 4.86 (s, 1H, H-1<sup>d</sup>), 4.76 (s, 1H, H-1<sup>b</sup>), 4.72 (m, 1H, H-1<sup>a</sup>,  $\beta$ -anomer), 4.27 (m, 1H), 4.13 (t, 1H,  $J$  = 10.7 Hz), 3.97-3.55 (m, 22H), 2.50-2.38 (m, 3H), 2.28-2.25 (m, 2H), 2.05 (m, 3H), 1.83-1.78 (m, 2H).

MALDI-TOF MS  $m/z$ : [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>32</sub>H<sub>52</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>21</sub>; 823.296; found 823.390.

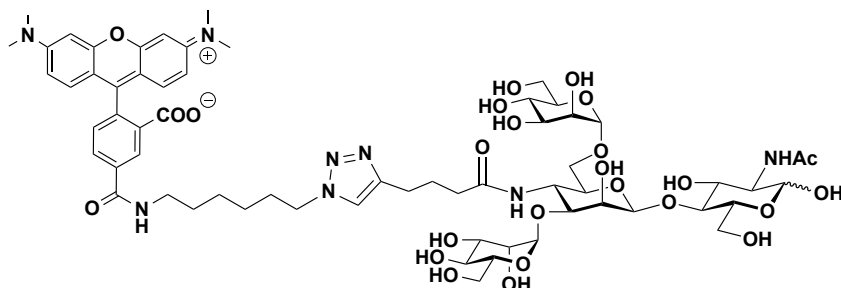
**$\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]- $\beta$ -D-4-deoxy-4-(5-hexynoylamino)-mannopyranosyl-(1-4)-(1,2-dideoxy- $\alpha$ -D-glucopyrano)-[2,1- $d$ ]-2-oxazoline (26)**



化合物**28** (2.2 mg, 2.8  $\mu$ mol) と炭酸カリウム (2.9 mg, 14  $\mu$ mol) を重水 (90  $\mu$ L) に溶かし、0 $^{\circ}$ CにてCDMBI (2.9 mg, 14  $\mu$ mol) を加え、2時間反応させた。反応液 (8  $\mu$ L) を分注し、重水にて希釈後NMRを測定し、反応の終了を確認した。反応混合物から不要性の塩を遠心ろ過により除去し、化合物**26**溶液を得た。

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  6.10 (d, 1H), 4.94 (s, 1H), 4.90 (s, 1H), 4.73 (s, 1H), 4.36 (m, 1H), 4.09 (m, 1H), 4.20-4.13 (m, 3H), 4.02 (m, 1H), 3.90-3.41 (m, 22H), 2.41 (m, 2H), 2.27 (m, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.81 (m, 2H).

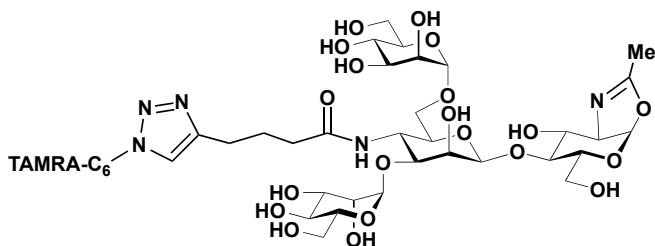
**$\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]- $\beta$ -D-4-deoxy-4-[6-(5-carboxytetra methylrhodaminy)-aminohexyl-triazolylbutanoylamino]-mannopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranose (32)**



化合物 **28** (0.57 mg, 0.72  $\mu$ mol)、硫酸銅五水和物 (0.13 mg, 0.52  $\mu$ mol)、アスコルビン酸ナトリウム (0.12 mg, 0.63  $\mu$ mol) を水 (25  $\mu$ L) に溶かし、TAMRA-N<sub>3</sub> (0.40 mg, 0.72  $\mu$ mol) のメタノール溶液 (50  $\mu$ L) を加えた。室温で24時間反応させ、MALDI-OF-MSにて化合物**28**が消失し、化合物**32**が生成していることを確認した。反応液を凍結乾燥し、ISOLUT C18 (H<sub>2</sub>O / MeOH = 100 / 0 ~ 20 / 80) および逆相HPLC (Imtakt Unison US-C18, 20  $\times$  250 mm, H<sub>2</sub>O / MeOH = 50 / 50, 7.0 mL / min; UV, 543 nm) にて精製し、化合物 **32** (0.36 mg, 37%) を得た。

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  8.20 (s, 1H), 7.95 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.82 (s, 1H), 7.46 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.18 (d, 2H,  $J = 9.6$  Hz), 6.87 (m, 2H), 6.63 (s, 2H), 5.20 (d, 1H,  $J = 3.1$  Hz, H-1<sup>a</sup>,  $\alpha$ -anomer), 4.93 (s, 1H), 4.74 (s, 1H), 4.71 (m, 1H, H-1<sup>a</sup>,  $\beta$ -anomer), 4.40 (t, 2H,  $J = 6.9$  Hz), 4.25 (m, 1H), 4.14-4.10 (m, 1H), 3.94-3.39 (m, 31H), 3.17 (s, 12H), 2.71 (t, 2H,  $J = 7.8$  Hz), 2.30-2.26 (m, 2H), 2.04 (s, 3H), 1.95-1.9 (m, 2H), 1.67-1.62 (m, 2H), 1.43-1.39 (m, 2H), 1.35-1.26 (m, 4H); MALDI-TOF MS  $m/z$ : [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>63</sub>H<sub>87</sub>N<sub>8</sub>O<sub>25</sub>; 1355.578; found 1355.339.

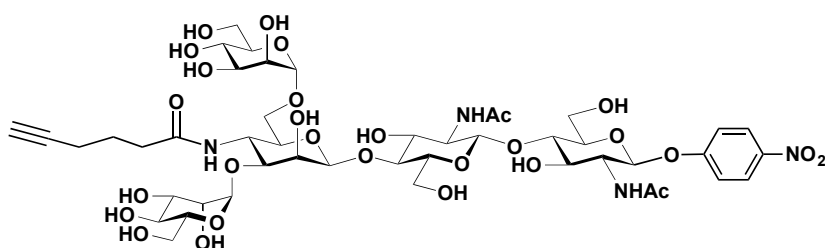
**$\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]- $\beta$ -D-4-deoxy-4-[6-(5-carboxytetra methylrhodaminy)-aminohexyl-triazolylbutanoylamino]-mannopyranosyl-(1-4)-(1,2-dideoxy- $\alpha$ -D-glucopyrano)-[2,1-*d*]-2-oxazoline (27)**





化合物 **32** (0.15 mg, 0.11  $\mu\text{mol}$ ) と炭酸カリウム (1.9 mg, 0.14 mmol) を水 (55  $\mu\text{L}$ ) に溶かし、0°C にて CDMBI (1.2 mg, 5.5  $\mu\text{mol}$ ) を加え、2 時間反応させた。反応液 (1  $\mu\text{L}$ ) を分注し、水にて希釈後、逆相 HPLC にて分析し、反応の終了を確認した。反応混合物から不要性の塩を遠心ろ過により除去し、化合物 **27** 溶液を得た。

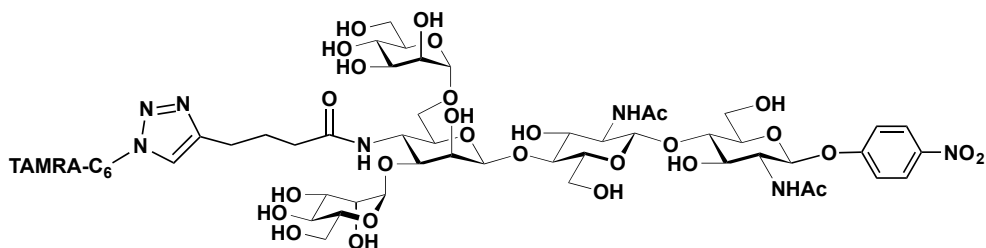
**4-Nitrophenyl  $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]- $\beta$ -D-4-deoxy-4-(5-hexynylamino)-mannopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-4)-2-(acetamido)-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside (**33**)**



20 mM の糖供与体溶液 **26** (30 mM, 36  $\mu\text{L}$ )、40 mM の糖受容体溶液 **12** (180 mM, 18  $\mu\text{L}$ )、水 92  $\mu\text{L}$ 、1 M リン酸バッファー (pH 7) を 50  $\mu\text{L}$ 、Endo-M-N175Q を 8  $\mu\text{L}$  を加えた (終濃度 125 mM リン酸バッファー (pH 7)、全量 180  $\mu\text{L}$  に調製)。37°C で 2 時間インキュベーションした後、アセトニトリルを 50  $\mu\text{L}$  加え、反応を停止した。反応混合液を凍結乾燥し、得られた残渣を HPLC (Imtakt Unison US-C18, 20  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ , H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN = 82 / 18 containing 0.1% TFA, 7.0 mL / min; UV, 260 nm) にて精製し、化合物 **33** (0.51 mg, 42%) を得た。

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  8.22 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 2H), 7.15 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 2H), 5.28 (d, 1H,  $J$  = 8.4 Hz, H-1<sup>a'</sup>), 4.92 (s, 1H, H-1<sup>c</sup>), 4.83 (s, 1H, H-1<sup>d</sup>), 4.73 (s, 1H, H-1<sup>b</sup>), 4.60 (d, 1H,  $J$  = 7.8 Hz, H-1<sup>a</sup>), 4.24 (d, 1H,  $J$  = 3.0 Hz, H-2<sup>b</sup>), 4.10 (t, 1H,  $J$  = 10.5 Hz, H-4<sup>b</sup>), 4.03 (dd,  $J$  = 10.5, 8.4 Hz), 3.93 (q, 1H,  $J$  = 1.6 Hz), 3.88-3.50 (m, 26H), 2.40-2.37 (m, 2H), 2.23 (t, 2H,  $J$  = 7.0 Hz), 2.06 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.77 (m, 2H); MALDI-TOF MS  $m/z$ : [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>46</sub>H<sub>68</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>28</sub>; 1147.391; found 1147.430.

**4-Nitrophenyl  $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]- $\beta$ -D-4-deoxy-4-[(5-carboxytetramethylrhodaminyl)-aminoethyl-triazolybutanoylamino]-mannopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside (34)**

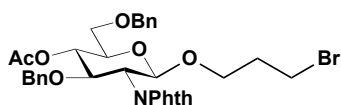


20 mM の糖供与体 **27** 溶液 (2 mM, 30  $\mu$ L)、40 mM の糖受容体 **12** 溶液 (0.2 mg, 0.58  $\mu$ mol)、1 M リン酸バッファー (pH 7) を 20  $\mu$ L、Endo-M-N175Q を (10  $\mu$ g) を加えた (終濃度 250 mM リン酸バッファー (pH 7)、全量 80  $\mu$ L に調製)。37  $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベーションした後、アセトニトリルを 50  $\mu$ L 加え、反応を停止した。反応混合液を凍結乾燥し、得られた残渣を HPLC (Imtakt Unison US-C18, 20  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m; H<sub>2</sub>O / MeOH = 45 / 55; 7.0 mL / min; UV, 543 nm) にて精製し、化合物 **34** (0.026 mg, 27%) を得た。

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  8.15 (d, 2H,  $J$  = 9.3 Hz), 8.12 (d, 1H,  $J$  = 2.1 Hz), 7.88 (d, 1H,  $J$  = 8.9 Hz), 7.72 (s, 1H), 7.40 (d, 1H,  $J$  = 8.2 Hz), 7.16 (dd, 2H,  $J$  = 9.5, 5.7 Hz), 7.07 (d, 2H,  $J$  = 9.3 Hz), 6.88-6.86 (m, 2H), 6.78 (s, 2H), 5.18 (d, 1H,  $J$  = 8.6 Hz), 4.84 (s, 1H), 4.77 (s, 1H), 4.53 (d, 1H,  $J$  = 7.9 Hz), 4.32 (t, 2H,  $J$  = 6.7 Hz), 4.16 (m, 1H), 4.01-3.33 (m, 31H), 3.16 (d, 12H,  $J$  = 2.4 Hz), 3.06 (s, 1H), 2.62 (m, 2H), 2.20 (m, 2H), 2.13 (s, 1H), 2.06 (m, 1H), 1.99 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 1.87-1.79 (m, 2H), 1.57 (m, 2H), 1.32 (m, 2H), 1.25-1.18 (m, 2H); MALDI-TOF MS  $m/z$ : [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>77</sub>H<sub>103</sub>N<sub>10</sub>O<sub>32</sub>; 1679.673; found 1680.079.

### 第3章

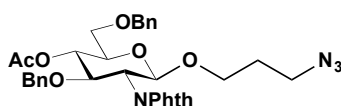
#### 3-Bromopropyl 4-O-acetyl-3,6-di-O-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside (38)



化合物 **37** (1.00 g, 1.60 mmol) のジクロロメタン溶液 (20 mL) とブロモプロパノール (168  $\mu$ L, 1.92 mmol) を  $-78^\circ\text{C}$  にて乾燥モレキュラーシーブス 4A (5 g) と N-ヨードこはく酸イミド (542 mg, 2.41 mmol) に加えた。20 分攪拌後、トリフルオロメタンスルホン酸 (70  $\mu$ L, 0.160 mmol) を  $-78^\circ\text{C}$  にて加え、 $-20$  に昇温した。反応液を 6 時間攪拌した。TLC にて原料の消失を確認した。反応液にトリエチルアミン (30  $\mu$ L) を加え、反応を停止した。反応液に酢酸エチルを加え希釈し、セライトでろ過した後、チオ硫酸ナトリウム、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水を用いて順次洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムにて乾燥後、溶媒を減圧留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン / 酢酸エチル = 95 / 5 ~ 65 / 35) を用いて精製し、化合物 **38** (862 mg, 82%) を得た。

$R_f = 0.38$  (toluene / EtOAc = 5 / 1);  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.77-6.89 (m, 14H, Ar), 5.15 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, H-1), 5.13 (dd, 1H,  $J = 9.0, 9.6$  Hz, H-4), 4.60 (d, 1H,  $J = 12.0$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.56 (s, 2H,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.45 (dd, 1H,  $J = 10.8, 9.0$  Hz, H-3), 4.33 (d, 1H,  $J = 12.0$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.24 (dd, 1H,  $J = 10.8, 8.4$  Hz, H-2), 3.91 (m, 1H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ), 3.76 (m, 1H, H-5), 3.62 (d, 2H,  $J = 4.5$  Hz, H-6), 3.55 (m, 1H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ), 3.26-3.11 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ ), 2.05-1.98 (m, 1H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 1.95 (s, 3H,  $-\text{COCH}_3$ ), 1.91-1.74 (m, 1H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  169.8, 138.0, 137.8, 134.0, 131.7, 128.5, 128.3, 128.0, 127.9, 127.8, 127.6, 123.5, 98.6 (C-1), 77.0 (C-3), 74.0 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 73.8 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 73.6 (C-5), 72.6 (C-4), 69.8 (C-6), 67.13 ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ), 55.62 (C-2), 32.27 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 30.19 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ ), 21.04 ( $-\text{COCH}_3$ ); MALDI-TOF MS  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{BrNNaO}_8$ ; 674.136; found 674.150.

#### 3-Azidopropyl 4-O-acetyl-3,6-di-O-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside (39)

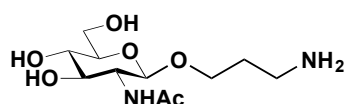


化合物 **38** (660 mg, 1.01 mmol) をジメチルホルムアミド (5.0 mL) に溶かし、アジ化ナトリウム (657 mg, 10.1 mmol) を加えた。反応液を  $50^\circ\text{C}$  にて 2 時間攪拌した。反応液を酢酸エチルにて希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水を用いて順次洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムにて乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカ

ゲルカラムクロマトグラフィー（トルエン / 酢酸エチル = 100 / 0 ~ 72 / 28）を用いて精製し、化合物 **39** (621 mg, quant.) を得た。

$R_f = 0.35$  (toluene / EtOAc = 5 / 1);  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.77-6.90 (m, 14H, Ar), 5.15 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, H-1), 5.13 (t, 1H,  $J = 9.6$  Hz, H-4), 4.60 (d, 1H,  $J = 12.0$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.56 (s, 2H,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.43 (dd, 1H,  $J = 9.6, 10.8$  Hz, H-3), 4.32 (d, 1H,  $J = 12.0$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.24 (dd, 1H,  $J = 8.4, 10.8$  Hz, H-2), 3.87 (m, 1H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ), 3.76 (dt, 1H,  $J = 4.6, 9.6$  Hz, H-5), 3.61 (d, 2H,  $J = 4.6$  Hz, H-6), 3.48 (m, 1H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ), 3.13 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 1.95 (s, 3H,  $-\text{COCH}_3$ ), 1.86-1.63 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  169.8, 138.0, 137.8, 134.1, 131.6, 128.5, 128.2, 128.0, 127.9, 127.6, 127.6, 123.5, 98.4 (C-1), 77.0 (C-3), 74.0 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 73.8 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 73.6 (C-5), 72.6 (C-4), 69.8 (C-6), 66.3 ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ), 55.6 (C-2), 48.1 ( $-\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 28.9 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 21.0 ( $-\text{COCH}_3$ ); MALDI-TOF MS  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{NaO}_8$ ; 637.227; found 637.441.

### 3-Aminopropyl 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside (**40**)

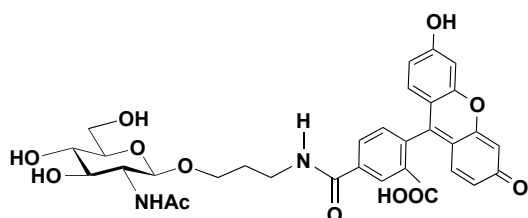


化合物 **39** (48 mg, 0.078 mmol) に *n*-ブチルアルコール (2 mL)、エチレンジアミン (200  $\mu\text{L}$ , 3.0 mmol) を加え、アルゴンガス雰囲気下、90  $^\circ\text{C}$  にて一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残渣をピリジン (1 mL) に溶かし、氷浴中、無水酢酸 (500  $\mu\text{L}$ , 529 mmol) を加え、アルゴン雰囲気下 40  $^\circ\text{C}$  にて一晩攪拌した。メタノールを加え反応を停止し、反応液を減圧濃縮した。残渣をテトラヒドロフラン (1 mL) とメタノール (1 mL) に溶かし、氷浴中 1 M ナトリウムメトキシド/メタノール (500  $\mu\text{L}$ ) を加え、アルゴンガス雰囲気下、40  $^\circ\text{C}$  で一晩攪拌した。反応液をアンバーリストにて中和後、アンバーリストをろ別し、溶液を減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム / メタノール = 100 / 0 ~ 90 / 10）にて精製し、脱保護中間体 (26 mg, 69% in 3 steps) を得た。得られた中間体 (26 mg, 54  $\mu\text{mol}$ ) をテトラヒドロフラン (3 mL) に溶かし、水 (6 mL) を加えた。反応容器をアルゴンガスにて置換後、水酸化パラジウム (15 mg) を加えた。反応容器を水素ガスで置換後、室温にて一晩攪拌した。セライトろ過にて水酸化パラジウムを除去後、得られたろ液を凍結乾燥した。残渣を ISOLUT 18C (Millipore 水) にて精製後、凍結乾燥し、化合物 **40** (10 mg, 48% in 4 steps) を得た。

$R_f = 0.18$  (2-propanol /  $\text{H}_2\text{O} = 2 / 1$ );  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  4.49 (d, 1H,  $J = 8.6$  Hz, H-1), 4.00 (quintet, 1H,  $J = 6.0$  Hz,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ), 3.92 (dd, 1H,  $J = 11.0, 1.4$  Hz, H-6), 3.76-3.70 (m, 3H, H-6',  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ , H-2), 3.54 (dd, 1H,  $J = 8.6, 10.3$  Hz, H-3), 3.47-3.40 (m, 2H, H-4, H-5), 3.03 (t, 2H,  $J = 7.0$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 2.04 (s, 3H,  $-\text{COCH}_3$ ), 1.91 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,

D<sub>2</sub>O):  $\delta$  174.8(-COCH<sub>3</sub>), 101.3 (C-1), 75.9 (C-5), 73.7 (C-3), 70.0 (C-4), 68.0 (C-6), 60.8 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 55.6 (C-2), 37.7 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 27.2 (-COCH<sub>3</sub>), 22.2 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); MALDI-TOF MS  $m/z$ : [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>11</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>6</sub>; 301.137; found 301.131.

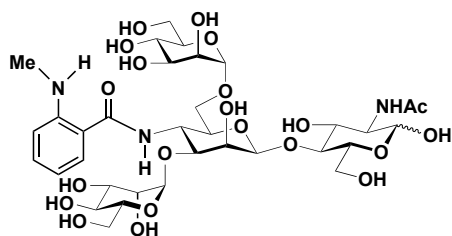
### 3-*N*-(5-carboxyfluoresceinyl)-3-aminopropyl 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside (35)



化合物 **40** (3.5 mg, 13  $\mu$ mol) を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (125  $\mu$ L)、1,4-ジオキササン (125  $\mu$ L) に溶解し、5-カルボキシフルオレセイン *N*-スクシンイミジル (6.6 mg, 13  $\mu$ mol) を加えた。一晩反応させた後、反応混合物を水で希釈し、ジエチルエーテルにて洗浄した。水層を凍結乾燥し、得られた残渣を ISOLUTE C18 (水 / アセトニトリル = 100/0~10/90) にて精製し、化合物 **35** (7.1 mg, 89%) を得た。

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  8.17 (d, 1H,  $J$  = 1.7 Hz), 7.96 (dd, 1H,  $J$  = 7.9, 2.1 Hz), 7.46 (d, 1H,  $J$  = 7.9 Hz), 7.19 (d, 2H,  $J$  = 9.3 Hz), 6.65 (td, 4H,  $J$  = 8.8, 2.2 Hz), 4.55 (d, 1H,  $J$  = 8.6 Hz), 4.03 (m, 1H), 3.92 (dd, 1H,  $J$  = 12.2, 1.9 Hz), 3.76-3.71 (m, 3H), 3.59-3.54 (m, 2H), 3.48-3.42 (m, 3H), 2.06 (s, 3H,  $J$  = 3.4 Hz), 1.95 (m, 2H).

### $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]-4-deoxy-4-*N*-methylantraniloyl amido- $\beta$ -D-mannopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose (41)

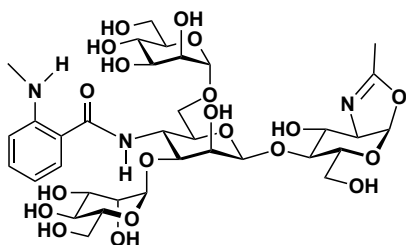


化合物 **29** (4.0 mg, 5.7  $\mu$ mol) をジメチルスルホキシド (400  $\mu$ L) に溶解し、ジメチルアミノピリジン (1.4 mg, 11  $\mu$ mol)、*N*-メチルアントラニル酸 (1.0 mg, 8.4  $\mu$ mol)、HATU (4.1 mg, 10  $\mu$ mol) を加え、室温にて5時間反応させた。反応液を水にて希釈、水層をジエチルエーテ

ルにて洗浄後、水層を凍結乾燥した。得られた残渣を ISOLUTE C18 にて精製した。その後、HPLC (Unison C18, 20 × 250 mm, H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN = 97 / 3, 0.1% TFA 溶液) により精製し、化合物 **41** (3.5 mg, 74%) を得た。

$R_f = 0.5$  (CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O = 3 / 1); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O at 40 °C): δ 7.80-7.72 (m, 1H, Nma-aromatic-H), 7.72-7.63 (m, 1H, Nma-aromatic-H), 7.43-7.31 (m, 2H, Nma-aromatic-H), 5.21 (d, 1H,  $J = 3.4$  Hz, H-1<sup>a</sup>, α-anomeric-H), 4.97 (s, 1H, H-1<sup>c</sup>), 4.85 (d, 1H,  $J = 1.4$  Hz, H-1<sup>d</sup>), 4.72 (m, H-1<sup>a</sup>, β-anomeric-H), 4.45 (t, 1H,  $J = 9.1$  Hz, H-4<sup>e</sup>), 4.34 (m, 1H, H-2<sup>c</sup>), 4.07-3.40 (m, 24H), 3.01 (s, 3H, -NHCH<sub>3</sub>), 2.05 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, D<sub>2</sub>O at 40 °C): δ 174.8, 170.2, 134.3, 134.326, 128.7, 123.6, 120.5, 118.6, 102.8 (C-1<sup>c</sup>), 100.6 (C-1<sup>b</sup>), 100.1 (C-1<sup>d</sup>), 95.2 (C-1<sup>a</sup>, β-anomeric-C), 90.8 (C-1<sup>a</sup>, α-anomeric-C), 80.3, 78.0, 79.5, 74.8, 73.8, 73.0, 72.9, 72.6, 70.6, 70.3, 70.2, 69.9, 69.4, 67.1, 66.9, 66.3, 66.2, 61.4, 61.0, 60.5, 60.4, 56.4, 53.9, 47.0 (C-4<sup>e</sup>), 33.9, 29.9, 22.5, 22.2; MALDI-TOF MS  $m/z$ : [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>34</sub>H<sub>53</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>21</sub>; 862.306; found 862.287; HRMS  $m/z$ : [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>34</sub>H<sub>53</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>21</sub>; 862.3064; found 862.3077.

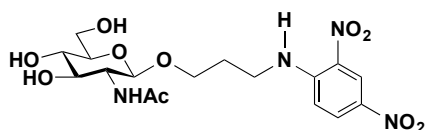
**2-Methyl-[α-D-mannopyranosyl-(1-3)-[α-D-mannopyranosyl-(1-6)] -4-deoxy-4-N-methyl anthraniloylamido-β-D-mannopyranosyl-(1-4)-1,2-dideoxy-α-D-glucopyrano]- [2,1-d]-oxazoline (42)**



化合物 **41** (1 mg, 1.2 μmol) と炭酸カリウム (6.2 mg, 44.6 μmol) を重水 (60 μL) に溶かし、0°C にて CDMBI (3.9 mg, 17.8 μmol) を加え、2 時間反応させた。反応液 (5 μL) を分注し、重水にて希釈後 NMR を測定し、反応の終了を確認した。反応混合物から不要性の塩を遠心ろ過により除去し、化合物 **42** 溶液 (20 mM, 55 μL) を得た。

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7.53-7.46 (m, 1H), 7.44 (dd, 1H,  $J = 7.7, 1.5$  Hz), 6.89 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz), 6.79 (m, 1H), 6.11 (d, 1H,  $J = 7.2$  Hz, H-1<sup>a</sup>), 4.95 (d, 1H,  $J = 1.7$  Hz, H-1<sup>c</sup>), 4.90 (d, 1H,  $J = 1.4$  Hz, H-1<sup>d</sup>), 4.78 (s, 1H, H-1<sup>b</sup>), 4.39 (q, 1H,  $J = 1.7$  Hz), 4.20 (m, 2H), 4.00-3.44 (m, 22H), 2.83 (s, 3H, -NHCH<sub>3</sub>), 2.08 (d,  $J = 1.7$  Hz, 3H).

### 3-*N*-2,4-di-nitrophenyl-3-aminopropyl 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside (43)

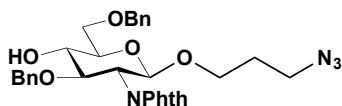


化合物 **40** (10 mg, 37  $\mu$ mol) を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (900  $\mu$ L) に溶解し、2,4-ジニトロフェニルフルオリド (11 mg, 56  $\mu$ mol) のメタノール溶液 (450  $\mu$ L) を加えた。2 時間反応させた後、2,4-ジニトロフェニルフルオリド (8.9 mg, 48  $\mu$ mol) のメタノール溶液 (450  $\mu$ L) を再度加えた。14 時間反応させた後、反応混合物を水で希釈し、ジエチルエーテルにて洗浄した。水層を凍結乾燥し、得られた残渣を ISOLUTE C18 (水 / メタノール) にて精製し、化合物 **43** (6.4 mg, 38%) を得た。

$R_f = 0.62$  (CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O = 5 / 1); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  9.03 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz, Dnp-aromatic-*H*), 8.31 (dd, 1H,  $J = 9.6, 2.7$  Hz, Dnp-aromatic-*H*), 7.17 (d, 1H,  $J = 9.6$  Hz, Dnp-aromatic-*H*), 4.21 (d, 1H,  $J = 8.6$  Hz, H-1), 4.10-3.95 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 3.88 (dd, 1H,  $J = 2.1, 12.0$  Hz, H-6), 3.77-3.49 (m, 5H, H-2, H-6, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 3.44 (dd, 1H,  $J = 10.3, 8.6$  Hz, H-3), 3.32-3.21 (m, 2H, H-4, H-5), 1.97 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1.93 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  173.7, 149.8, 136.9, 131.2, 124.8, 115.8, 102.9 (C-1), 78.1 (C-4), 76.0 (C-3), 72.1 (C-5), 67.7 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-), 62.8 (C-6), 57.3 (C-2), 41.637 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 29.9 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 23.014 (-COCH<sub>3</sub>); MALDI-TOF MS  $m/z$ : [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>10</sub>; 467.139; found 467.208; HRMS  $m/z$ : [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>Na; 467.1385; found 467.1371.

## 第4章

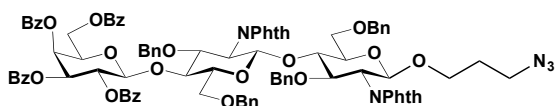
### 3-Azidopropyl 3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside (50)



化合物 **39** (621 mg, 1.01 mmol) をテトラヒドロフラン (5 mL) に溶かし、メタノール (5 mL) を加え、0 °C で 1M ナトリウムメトキシド/メタノール溶液 (200  $\mu$ L, 0.200 mmol) を加えた。反応液を室温にて 6 時間攪拌後、アンバーリストにより反応液の中和を行い、アンバーリストをろ別し、溶媒を減圧留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン / 酢酸エチル = 65 / 35 ~ 44 / 56) を用いて精製し、化合物 **50** (445 mg, 77%) を得た。

$R_f$  = 0.20 (toluene / EtOAc = 5 / 1);  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.81-6.95 (m, 14H, Ar), 5.14 (d, 1H,  $J$  = 8.4 Hz, H-1), 4.74 (d, 1H,  $J$  = 12.0 Hz,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.65 (d, 1H,  $J$  = 12.0 Hz,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.59 (d, 1H,  $J$  = 12.0 Hz,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.53 (d, 1H,  $J$  = 12.0 Hz,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.23 (dd, 1H,  $J$  = 8.4, 10.8 Hz, H-3), 4.14 (dd, 1H,  $J$  = 8.4, 10.8 Hz, H-2), 3.95-3.72 (m, 4H, H-4, H-6,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ), 3.65 (m, 1H, H-5), 3.46 (m, 1H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ), 3.22-3.02 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 2.93 (d, 1H,  $J$  = 3.0 Hz, OH), 1.84-1.54 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  168.5, 167.8, 138.3, 137.7, 134.0, 131.7, 128.7, 128.3, 128.1, 128.0, 127.9, 127.6, 123.5, 123.4, 98.5 (C-1), 78.8 (C-3), 74.6 (C-4), 74.5 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 73.9 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 73.7 (C-5), 70.8 (C-6), 66.2 ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ), 55.5 (C-2), 48.1 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 29.0 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ); MALDI-TOF MS  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{NaO}_7$ ; 595.216; found 595.436.

### Azidopropyl 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1-4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside (51)



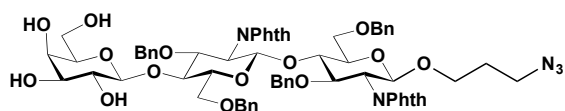
乾燥モレキュラーシーブス 4A (6.7 g)、N-ヨードこほく酸イミド (273 mg, 1.15 mmol) に、-78 °C にて、化合物 **50** (440 mg, 0.679 mmol) と化合物 **49** (892 mg, 0.679 mmol) のジクロロメタン溶液 (55 mL) を加えた。30 分攪拌後、トリフルオロメタンスルホン酸 (13.6  $\mu$ L, 15.4  $\mu$ mol) を加えた。反応液を -78 °C にて 1.5 時間攪拌後、TLC にて原料の消失を確認した。



反応液にトリエチルアミンを加え、反応を停止した。反応液に酢酸エチルを加え希釈し、セライトでろ過した後、チオ硫酸ナトリウム、飽和食塩水、1 M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水を用いて順次洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムにて乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（トルエン / 酢酸エチル = 95 / 5 ~ 65 / 35）を用いて精製し、化合物 **51** (1.01 g, 80%) を得た。

$R_f = 0.54$  (toluene / EtOAc = 5 / 1);  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.02-6.73 (m, 48H, Ar), 5.86 (d, 1H,  $J = 3.3$  Hz, H-4 $^c$ ), 5.79 (dd, 1H,  $J = 8.1, 10.2$  Hz, H-2 $^c$ ), 5.42 (dd,  $J = 10.2$  Hz, 3.3 Hz, H-3 $^c$ ), 5.18 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, H-1 $^b$ ), 5.06 (d, 1H,  $J = 12.3$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 5.00 (d, 1H,  $J = 8.1$  Hz, H-1 $^c$ ), 4.93 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, H-1 $^a$ ), 4.82 (d, 1H,  $J = 12.9$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.66 (d, 1H,  $J = 12.3$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.62 (d, 1H,  $J = 12.2$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.51 (d, 1H,  $J = 12.9$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.42 (m, 3H,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.37-4.34 (m, 2H, H-6 $^c$ , H-3 $^b$ ), 4.28-4.20 (m, 3H, H-6 $^c$ , H-4 $^b$ , H-2 $^b$ ), 4.14-4.03 (m, 4H, H-4 $^a$ , H-3 $^a$ , H-2 $^a$ , H-5 $^c$ ), 3.70 (m, 1H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ), 3.56 (dd, 1H,  $J = 2.5, 11.3$  Hz, H-6 $^b$ ), 3.51 (dd, 1H,  $J = 1.2, 11.0$  Hz, H-6 $^a$ ), 3.44 (dd, 1H,  $J = 1.3, 11.3$  Hz, H-6 $^b$ ), 3.36 (dd, 1H,  $J = 3.8$  Hz, 11.0 Hz, H-6 $^a$ ), 3.32 (m, 1H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ), 3.28 (m, 1H, H-5 $^a$ ), 3.10-3.01 (m, 3H, H-5 $^b$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 1.66-1.52 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  138.9, 138.7, 138.3, 134.1, 133.9, 133.8, 133.7, 133.6, 133.4, 133.3, 131.9, 131.7, 131.6, 129.9, 129.9, 129.6, 129.2, 129.1, 128.9, 128.8, 128.7, 128.7, 128.6, 128.4, 128.3, 128.1, 128.1, 128.0, 127.9, 127.7, 127.5, 127.4, 127.1, 127.0, 123.74, 123.3, 100.5 (C-1 $^c$ ), 98.3 (C-1 $^a$ ), 97.0 (C-1 $^b$ ), 78.1 (C-4 $^b$ ), 76.7 (C-3 $^a$ ), 76.5 (C-3 $^b$ ), 75.7 (C-4 $^a$ ), 74.6 (C-5 $^a$ ), 74.6 (C-5 $^b$ ), 74.5 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ) 74.5 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 73.3 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 72.8 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 72.1 (C-3 $^c$ ), 71.1 (C-5 $^c$ ), 70.3 (C-2 $^c$ ), 68.2 (C-6 $^a$ ), 68.1 (C-4 $^c$ ), 66.8 (C-6 $^b$ ), 66.0 ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ), 61.6 (C-6 $^c$ ), 56.7 (C-2 $^b$ ), 55.7 (C-2 $^a$ ), 48.1 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 28.9 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ); MALDI-TOF MS  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{93}\text{H}_{83}\text{N}_5\text{NaO}_{22}$ ; 1644.542; found 1644.441.

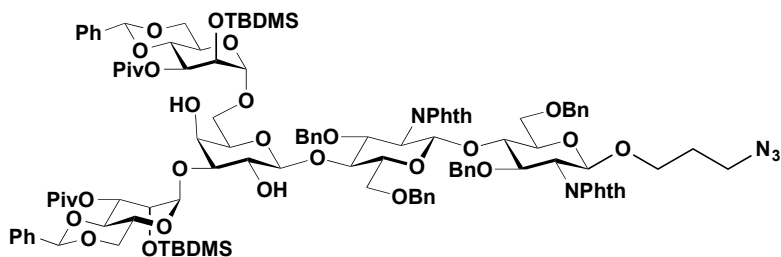
**Azidopropyl  $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1-4)-3,6-di-O-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-4)-3,6-di-O-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranoside (48)**



化合物 **51** (1.19 g, 0.733 mmol) をテトラヒドロフラン (4.0 mL) とメタノール (4.0 mL) に溶かし、氷浴中にて 1 M ナトリウムメトキシドメタノール溶液 (860  $\mu\text{L}$ ) を加えた。反応液を室温に戻し、8 時間攪拌した。アンバーリストにより反応液の中和を行い、減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム / メタノール = 98 / 2 ~ 90 / 10）を用いて精製し、化合物 **48** (811 mg, 92%) を得た。

$R_f = 0.45$  ( $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} = 10 / 1$ );  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.84-6.76 (m, 28H, Ar), 5.27 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, H-1<sup>b</sup>), 4.93 (m, 1H,  $J = 8.6$  Hz, H-1<sup>a</sup>), 4.88 (d, 1H,  $J = 12.1$  Hz, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.84 (d, 1H,  $J = 12.8$  Hz, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.60-4.38 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>Ph $\times$ 6, H1<sup>c</sup>, H-3<sup>b</sup>), 4.25-4.19 (m, 2H, H-4<sup>a</sup>, H-2<sup>b</sup>), 4.15-4.08 (m, 3H, H-3<sup>a</sup>, H-3<sup>b</sup>, H-2<sup>a</sup>), 3.84-3.80 (m, 2H, H-4<sup>c</sup>, H-6<sup>b</sup>), 3.73-3.60 (m, 5H, H-6<sup>b</sup>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, H-6<sup>c</sup>, H-2<sup>c</sup>), 3.53 (m, 2H, H-6<sup>a</sup>, -OH), 3.42-3.32 (m, 4H, H-6<sup>a</sup>, H-5<sup>b</sup>, H-3<sup>c</sup>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 3.29 (m, 1H, H-5<sup>a</sup>), 3.23 (m, 1H, H-5<sup>c</sup>), 3.11-3.02 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 2.59 (bs, 1H, -OH), 1.99 (m, 1H, -OH), 1.60 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  168.6, 167.8, 138.6, 138.4, 137.7, 134.2, 134.0, 133.8, 131.8, 131.7, 131.4, 128.6, 128.4, 128.2, 128.2, 128.0, 127.9, 127.4, 123.8, 123.3, 103.0 (C-1<sup>c</sup>), 98.3 (C-1<sup>a</sup>), 97.0 (C-1<sup>b</sup>), 78.1 (C-3<sup>b</sup>, C-4<sup>b</sup>), 76.6 (C-3<sup>a</sup>), 75.6 (C-4<sup>a</sup>), 75.0 (-CH<sub>2</sub>Ph), 74.8 (C-5<sup>b</sup>), 74.6 (C-5<sup>a</sup>), 74.5 (-CH<sub>2</sub>Ph), 74.3 (C-5<sup>c</sup>), 73.7 (C-3<sup>c</sup>), 73.3 (-CH<sub>2</sub>Ph), 72.8 (-CH<sub>2</sub>Ph), 72.5 (C-2<sup>c</sup>), 69.5 (C-4<sup>c</sup>), 68.1 (C-6<sup>b</sup>), 67.5 (C-6<sup>b</sup>), 66.0 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 62.7 (C-6<sup>c</sup>), 56.7 (C-2<sup>b</sup>), 55.7 (C-2<sup>a</sup>), 48.0 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 28.9 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); MALDI-TOF MS  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for C<sub>65</sub>H<sub>67</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>18</sub>; 1228.437; found 1228.550.

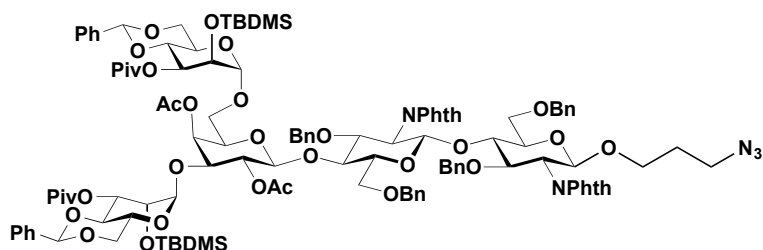
**Azidopropyl 4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-pivaloyl-2-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-pivaloyl-2-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1-4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside (52)**



乾燥モレキュラーシーブス 4A (3.0 g) に、N-ヨードこはく酸イミド (294 mg, 1.24 mmol)、-78 °C にて、化合物 **48** (475 mg, 0.393 mmol) と化合物 **47** (462 mg, 0.827 mmol) のジクロロメタン溶液 (50 mL) を加えた。30 分攪拌後、トリフルオロメタンスルホン酸 (37  $\mu\text{L}$ , 0.41 mmol) を加えた。反応液を -78 °C にて 15 時間攪拌後、TLC にて原料の消失を確認した。反応液にトリエチルアミンを加え、反応を停止した。反応液に酢酸エチルを加え希釈し、セライトでろ過した後、チオ硫酸ナトリウム、1 M 塩酸、飽和食塩水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水を用いて順次洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムにて乾燥後、溶媒を減圧留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン / 酢酸エチル = 92 / 8 ~ 37 / 63) を用いて精製し、化合物 **52** (545 mg, 66%) を得た。

$R_f = 0.55$  (hexane / EtOAc = 3 / 2);  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.85-6.74 (m, 38H, Ar), 5.59 (s, 1H,  $-\text{CHPh}-$ ), 5.53 (s, 1H,  $-\text{CHPh}-$ ), 5.34 (dd, 1H,  $J = 3.1$  Hz,  $J = 10.3$  Hz, H-3<sup>d</sup>), 5.25 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, H-1<sup>b</sup>), 5.18 (dd, 1H,  $J = 2.9$  Hz,  $J = 10.3$  Hz, H-3<sup>e</sup>), 4.93 (d, 1H,  $J = 7.9$  Hz, H-1<sup>a</sup>), 4.86-4.79 (m, 3H, H-1<sup>d</sup>,  $-\text{CH}_2\text{Ph} \times 2$ ), 4.61-4.43 (m, 8H, H-1<sup>e</sup>, H-1<sup>c</sup>,  $-\text{CH}_2\text{Ph} \times 6$ ), 4.38 (dd, 1H,  $J = 8.6$  Hz,  $J = 10.6$  Hz, H-3<sup>b</sup>), 4.31-4.01 (m, 12H, H-6<sup>d</sup>, H-4<sup>a</sup>, H-5<sup>d</sup>, H-2<sup>b</sup>, H-6<sup>e</sup>, H-2<sup>d</sup>, H-4<sup>d</sup>, H-4<sup>b</sup>, H-2<sup>a</sup>, H-3<sup>a</sup>, H-4<sup>e</sup>, H-2<sup>c</sup>), 3.89 (bt, 1H,  $J = 3.0$  Hz, H-4<sup>c</sup>), 3.85-3.65 (m, 7H, H-6<sup>b</sup>, H-6<sup>e</sup>, H-6<sup>d</sup>, H-5<sup>e</sup>,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ , H-6<sup>b</sup>, H-2<sup>c</sup>), 3.60-3.46 (m, 5H, H-6<sup>c</sup>, H-6<sup>a</sup>, H-3<sup>c</sup>, H-6<sup>c</sup>), 3.40 (dd, 1H,  $J = 3.4$  Hz,  $J = 10.7$  Hz, H-6<sup>a</sup>), 3.35-3.27 (m, 4H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ , H-5<sup>b</sup>, H-5<sup>c</sup>, H-5<sup>a</sup>), 3.07 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 2.21 (bs, 1H, OH), 1.60 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 1.22, 1.17 (2s, 18H,  $-\text{COC}(\text{CH}_3)_3 \times 2$ ), 0.94, 0.91 (2s, 18H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_3 \times 2$ ), 0.079, 0.027, 0.020 (4s, 12H,  $-\text{CH}_3 \times 2$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 178.3, 178.0, 168.5, 167.7, 138.6, 138.4, 137.7, 137.6, 134.1, 133.9, 133.8.0, 131.9, 131.7, 131.5, 128.8 $\times 2$ , 128.6, 128.4, 128.3, 128.2 $\times 2$ , 128.1 $\times 2$ , 128.0, 127.6, 127.4 $\times 2$ , 127.2, 127.0, 126.0, 123.8, 123.3, 103.6 (C-1<sup>c</sup>), 101.8 (C-1<sup>e</sup>), 101.3 $\times 2$  ( $-\text{CHPh} \times 2$ ), 99.6 (C-1<sup>d</sup>), 98.3 (C-1<sup>a</sup>), 97.0 (C-1<sup>b</sup>), 79.8 (C-3<sup>c</sup>), 78.5 (C-4<sup>b</sup>), 78.1 (C-3<sup>b</sup>), 76.5 $\times 2$  (C-4<sup>e</sup>, C-3<sup>a</sup>), 76.3 (C-4<sup>d</sup>), 75.4 (C-4<sup>a</sup>), 74.8 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 74.7 (C-5<sup>b</sup>), 74.6 (C-5<sup>c</sup>), 74.5 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 73.3 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 72.7 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 72.0 (C-5<sup>a</sup>), 71.1 (C-2<sup>d</sup>), 70.9 (C-2<sup>c</sup>), 70.7 (C-3<sup>d</sup>), 70.5 $\times 2$  (C-2<sup>e</sup>, C-3<sup>e</sup>), 69.0 (C-6<sup>e</sup>), 68.8 (C-6<sup>d</sup>), 68.2 (C-6<sup>a</sup>), 67.3 (C-6<sup>b</sup>), 65.9 ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ), 65.2 (C-4<sup>c</sup>), 65.0 (C-5<sup>d</sup>), 64.8 (C-6<sup>c</sup>), 64.7 (C-5<sup>e</sup>), 56.8 (C-2<sup>b</sup>), 55.7 (C-2<sup>a</sup>), 48.1 ( $-\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 39.1, 39.0, 28.9 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 27.4 $\times 2$  ( $-\text{OCO}(\text{CH}_3)_3 \times 2$ ), 25.8 ( $-\text{OCO}(\text{CH}_3)_3 \times 2$ ), 18.1, 0.14, -4.38, -4.46, -4.66, -4.72 ( $-\text{CH}_3 \times 4$ ); MALDI-TOF MS  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{113}\text{H}_{139}\text{N}_5\text{NaO}_{30}\text{Si}_2$ ; 2124.894; found 2124.820.

**Azidopropyl 4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-pivaroyl-2-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-pivaroyl-2-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)] 2,4-di-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1-4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside (53)**

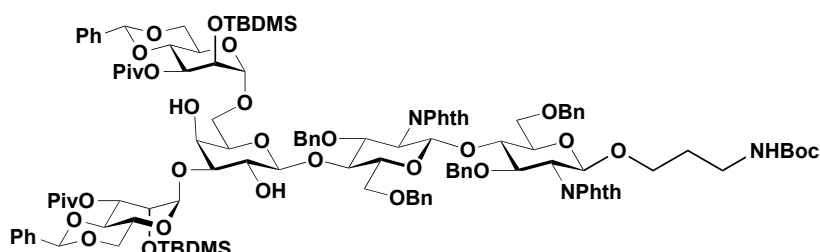


化合物 **52** (18 mg, 8.4  $\mu\text{mol}$ ) をピリジン (400  $\mu\text{L}$ ) に溶かし、氷浴中、無水酢酸 (200  $\mu\text{L}$ ) を加えた。反応液を室温に戻し、反応容器をアルゴンで置換した後で 17 時間攪拌した。反応液にメタノールを加え、反応を停止した。反応液に酢酸エチルを加え希釈し、1 M 塩酸、

飽和食塩水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水を用いて順次洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムにて乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン / 酢酸エチル = 69 / 31 ~ 52 / 48）を用いて精製した。化合物 **53**（18 mg, quant.）を得た。

$R_f = 0.43$  (hexane / EtOAc = 2 / 1);  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.86-6.74 (m, 38H, Ar), 5.57 (s, 1H, -CHPh-), 5.52 (s, 1H, -CHPh-), 5.37 (d, 1H,  $J = 3.1$  Hz, H-4<sup>c</sup>), 5.27-5.24 (m, 2H, H-1<sup>b</sup>, H-3<sup>d</sup>), 5.16-5.12 (m, 2H, H-3<sup>e</sup>, H-2<sup>c</sup>), 4.93 (m, 1H, H-1<sup>a</sup>), 4.87-4.85 (m, 2H, H-1<sup>d</sup>, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.80 (d, 1H,  $J = 12.4$  Hz, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.63-4.59 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>Ph $\times$ 1, H-1<sup>c</sup>), 4.52-4.43 (m, 5H, -CH<sub>2</sub>Ph $\times$ 5), 4.31-4.16 (m, 6H, H-1<sup>e</sup>, H-2<sup>b</sup>, H-3<sup>b</sup>, H-4<sup>a</sup>, H-6<sup>d</sup>, H-6<sup>e</sup>), 4.12-4.08 (m, 4H, H-2<sup>a</sup>, H-3<sup>a</sup>, H-4<sup>b</sup>, H-4<sup>d</sup>), 4.01 (m, 1H, H-4<sup>e</sup>), 3.96 (dd, 1H,  $J = 1.7, 2.9$  Hz, H-2<sup>e</sup>), 3.90 (dd, 1H,  $J = 1.7, 2.7$  Hz, H-2<sup>d</sup>), 3.89-3.81 (m, 2H, H-6<sup>a</sup>, H-5<sup>d</sup>), 3.78-3.66 (m, 5H, H-5<sup>e</sup>, H-6<sup>e</sup>, H-3<sup>c</sup>, H-6<sup>b</sup>, -CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 3.62 (dd, 1H,  $J = 4.5, 9.3$  Hz, H-6<sup>c</sup>), 3.58-3.52 (m, 2H, H-6<sup>b</sup>, H-6<sup>a</sup>), 3.41-3.71 (m, 2H, H-5<sup>a</sup>, H-6<sup>e</sup>), 3.35-3.29 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, H-5<sup>a</sup>), 3.21 (m, 1H, H-5<sup>b</sup>), 3.06 (m, 2H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2.85 (t, 1H,  $J = 9.6$  Hz, H-6<sup>c</sup>), 2.13 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 2.05 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 1.65-1.53 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1.18 (2s, 18H, -OCO(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> $\times$ 2), 0.93, 0.91 (2s, 18H, -OCO(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> $\times$ 2) 0.11, 0.05, 0.04, 0.01 (4s, 12H, -CH<sub>3</sub> $\times$ 4);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  177.8, 177.7, 170.0, 169.3, 168.4, 167.8, 138.9, 138.7, 138.4, 138.1, 137.6, 134.1, 133.9, 133.8, 131.9, 131.7, 131.5, 128.9, 128.8, 128.7, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.6, 127.5, 127.1, 127.0, 126.1, 126.0, 123.7, 123.3, 102.3 (C-1<sup>e</sup>), 101.6 (-CHPh-), 101.4 (-CHPh-), 100.6 (C-1<sup>c</sup>), 98.3 (C-1<sup>a</sup>), 97.4 (C-1<sup>d</sup>), 97.0 (C-1<sup>b</sup>), 77.8 (C-4<sup>b</sup>), 76.7 (C-3<sup>a</sup>, C-4<sup>d</sup>), 76.6 (C-3<sup>b</sup>), 75.7 (C-4<sup>a</sup>), 74.8 (C-5<sup>b</sup>), 74.6 (C-5<sup>a</sup>), 74.5 (-CH<sub>2</sub>Ph), 74.4 (-CH<sub>2</sub>Ph), 73.3 (-CH<sub>2</sub>Ph), 72.8 (C-3<sup>c</sup>), 72.7 (-CH<sub>2</sub>Ph), 70.6 (C-2<sup>e</sup>, C-5<sup>d</sup>), 70.4 (C-2<sup>d</sup>), 70.2 $\times$ 3 (C-2<sup>c</sup>, C-3<sup>d</sup>, C-3<sup>e</sup>), 69.1 (C-6<sup>d</sup>), 68.9 (C-6<sup>e</sup>), 68.2 (C-6<sup>a</sup>), 67.1 (C-6<sup>b</sup>), 65.9 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 64.9 (C-5<sup>d</sup>), 64.8 (C-5<sup>e</sup>), 64.7 (C-6<sup>c</sup>), 56.7 (C-2<sup>b</sup>), 55.7 (C-2<sup>a</sup>), 48.1 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 39.0, 28.9 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 27.4 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> $\times$ 2), 26.0 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.9 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 21.2 (-COCH<sub>3</sub>), 20.8 (-COCH<sub>3</sub>), 18.1 $\times$ 2, -4.69, -4.77, -5.01, -5.13 (-CH<sub>3</sub>); MALDI-TOF MS  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for C<sub>117</sub>H<sub>143</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>32</sub>Si<sub>2</sub>; 2208.9152; found 2208.7769.

**3-(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)aminopropyl 4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-pivaloyl-2-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-pivaloyl-2-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1-4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside (54)**

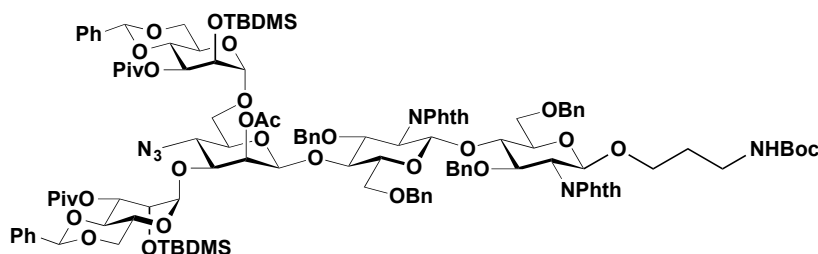


化合物 **52** (450 mg, 0.218 mmol) をテトラヒドロフラン (25 mL) に溶かした。反応容器をアルゴンガスにて置換し、氷浴中にて、水酸化パラジウム/炭酸カルシウム (455 mg, 4.27 mmol)、二炭酸ジ-*tert* ブチル無水物約 30%1,4-ジオキサン溶液 (442  $\mu$ L, 1.92 mmol) を加え、反応液を室温に戻し、再び反応容器をアルゴンガスで置換した。反応系内を水素ガスで置換、充填後、室温で二晩攪拌した。セライトろ過にて水酸化パラジウム/炭酸カルシウムを除去し、反応液を減圧濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン / 酢酸エチル = 62 / 38 ~ 41 / 59) を用いて精製し、化合物 **54** (417 mg, 90%) を得た。

$R_f = 0.40$  (hexane / EtOAc = 3 / 2);  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.83-6.73 (m, 38H, Ar), 5.59 (s, 1H, -CHPh-), 5.53 (s, 1H, -CHPh-), 5.34 (dd, 1H,  $J = 3.1, 10.3$  Hz, H-3<sup>d</sup>), 5.24 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, H-1<sup>b</sup>), 5.18 (dd, 1H,  $J = 3.1, 10.3$  Hz, H-3<sup>e</sup>), 4.94 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, H-1<sup>a</sup>), 4.85-4.80 (m, 3H, H-1<sup>d</sup>, -CH<sub>2</sub>Ph $\times$ 2), 4.69 (m, 1H, -NHBoc), 4.65-4.41 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>Ph $\times$ 6, H-1<sup>c</sup>, H-1<sup>e</sup>), 4.38 (dd, 1H,  $J = 10.7, 8.6$  Hz, H-3<sup>b</sup>), 4.31-4.02 (m, 12H, H-6<sup>d</sup>, H-6<sup>e</sup>, H-5<sup>d</sup>, H-2<sup>d</sup>, H-2<sup>e</sup>, H-4<sup>d</sup>, H-4<sup>e</sup>, H-4<sup>a</sup>, H-4<sup>b</sup>, H-2<sup>a</sup>, H-2<sup>b</sup>, H-3<sup>a</sup>), 3.90 (m, 1H, H-4<sup>c</sup>), 3.86-3.79 (m, 2H, H-6<sup>b</sup>, H-6<sup>d</sup>), 3.76-3.64 (m, 9H, H-5<sup>e</sup>, H-6<sup>e</sup>, H-2<sup>c</sup>, H-6<sup>b</sup>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, H-6<sup>a</sup>, H-6<sup>a</sup>, H-4<sup>c</sup>, H-6<sup>c</sup>), 3.40 (dd, 1H,  $J = 10.7, 3.8$  Hz, H-6<sup>c</sup>), 3.37-3.33 (m, 2H, H-5<sup>b</sup>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 3.30-3.28 (m, 2H, H-5<sup>a</sup>, H-5<sup>c</sup>), 2.98-2.89 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>NHBoc), 1.56-1.47 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1.35 (s, 9H, -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.22, 1.17 (2s, 18H, -COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> $\times$ 2), 0.94, 0.91 (2s, 18H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> $\times$ 2), 0.079 (2s, 6H, -CH<sub>3</sub> $\times$ 2), 0.028, 0.021 (2s, 6H, -CH<sub>3</sub> $\times$ 2);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  178.3, 178.0, 168.5, 167.7, 156.0, 138.7, 138.6, 138.3, 137.8, 137.7, 134.1, 133.9, 133.7, 131.8, 131.6, 128.8, 128.8, 128.6, 128.4, 128.3, 128.2, 128.2, 128.1, 128.1, 127.9, 127.6, 127.5, 127.2, 127.0, 126.0, 123.8, 123.3, 103.6 (C-1<sup>c</sup>), 101.8 (C-1<sup>e</sup>), 101.4 $\times$ 2 (-CHPh- $\times$ 2), 99.6 (C-1<sup>d</sup>), 98.3 (C-1<sup>a</sup>), 97.0 (C-1<sup>b</sup>), 79.8 (C-3<sup>c</sup>), 79.0, 78.6 (C-4<sup>b</sup>), 78.1 (C-3<sup>b</sup>), 76.7 (C-3<sup>a</sup>), 76.5 (C-4<sup>e</sup>), 76.4 (C-4<sup>d</sup>), 75.6 (C-4<sup>a</sup>), 74.8 (-CH<sub>2</sub>Ph), 74.8 (C-5<sup>b</sup>), 74.5 (C-5<sup>a</sup>), 74.5 (-CH<sub>2</sub>Ph), 73.3 (-CH<sub>2</sub>Ph), 72.8 (-CH<sub>2</sub>Ph), 72.0 (C-5<sup>c</sup>), 71.2 (C-2<sup>d</sup>), 70.9 (C-2<sup>c</sup>), 70.8 (C-3<sup>d</sup>), 70.6 $\times$ 2 (C-2<sup>e</sup>, C-3<sup>e</sup>), 69.0 (C-6<sup>e</sup>), 68.9 (C-6<sup>d</sup>), 68.3 (C-6<sup>a</sup>), 67.5 (C-6<sup>c</sup>), 66.9 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 65.2 (C-4<sup>c</sup>), 65.0 (C-5<sup>d</sup>), 64.9 (C-6<sup>c</sup>), 64.8 (C-5<sup>e</sup>), 56.8 (C-2<sup>b</sup>), 55.7 (C-2<sup>a</sup>), 39.2,

39.1, 37.3 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), 29.6 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 28.5 (-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.4×2, 25.8×2 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>×4), -4.38, -4.45, -4.64, -4.70 (-CH<sub>3</sub>×4); MALDI-TOF MS *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>118</sub>H<sub>149</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>32</sub>Si<sub>2</sub>; 2198.956; found 2198.789.

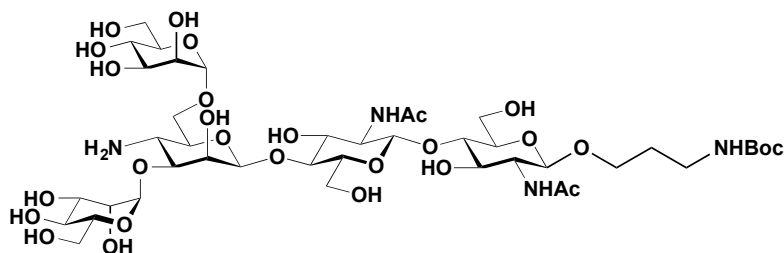
**3-(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)aminopropyl 4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-pivaloyl-2-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-pivaloyl-2-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]-2-*O*-acetyl-4-azido-4-deoxy- $\beta$ -D-mannopyranosyl-(1-4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside (46)**



化合物 **54** (87 mg, 0.040 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶かし、脱水ピリジン (97  $\mu$ L, 1.2 mmol) と塩水中にてトリフルオロメタンスルホン酸無水物 (68  $\mu$ L, 0.40 mmol) を加えた。-10  $^{\circ}$ C にて 8 時間攪拌した。その後、反応液を酢酸エチルで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水を用いて順次洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムにて乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (トルエン / 酢酸エチル = 100 / 0 ~ 70 / 30) を用いて精製し、化合物 **55** (76 mg, 77%) を得た。続いて、化合物 **55** (76 mg, 0.031 mmol) をトルエン (6 mL) に溶かし、氷浴中にてテトラブチルアンモニウムアジド (11 mg, 0.037 mmol) を加えた。反応液を室温に戻し、1 時間攪拌した。その後、反応液を酢酸エチルで希釈し、飽和食塩水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水を用いて順次洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムにて乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン / 酢酸エチル = 62 / 38 ~ 41 / 59) を用いて精製し、化合物 **56** (69 mg, 94%) を得た。続いて、室温にて、化合物 **56** (69 mg, 0.029 mmol) をトルエン (2 mL) に溶かし、18-クラウン 6-エーテル (78 mg, 0.29 mmol) と酢酸セシウム (56 mg, 0.29 mmol) を加えた。反応液を 12 時間超音波照処理した。その後、反応液を酢酸エチルで希釈し、飽和食塩水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水を用いて順次洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムにて乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (トルエン / 酢酸エチル = 85 / 15 ~ 55 / 45) を用いて精製し、化合物 **46** (57 mg, 63% in 3 steps) を得た。

$R_f = 0.53$  (toluene / EtOAc = 3 / 1);  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.83-6.72 (m, 38H, Ar), 5.57 (s, 1H,  $-\text{CHPh}$ -), 5.50 (s, 1H,  $-\text{CHPh}$ -), 5.34 (d, 1H,  $J = 3.1$  Hz, H-2<sup>c</sup>), 5.25 (m, 2H, H-3<sup>d</sup>, H-3<sup>e</sup>), 5.18 (d, 1H, H-1<sup>b</sup>), 4.93 (d, 1H,  $J = 1.4$  Hz, H-1<sup>d</sup>), 4.91 (d, 1H,  $J = 7.9$  Hz, H-1<sup>a</sup>), 4.84 (d, 1H,  $J = 13.1$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.77 (d, 1H,  $J = 13.1$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.69 (m, 1H,  $-\text{NHBoc}$ ), 4.66 (d, 1H,  $J = 1.7$  Hz, H-1<sup>e</sup>), 4.62 (d, 1H,  $J = 11.7$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.50-4.44 (m, 5H,  $-\text{CH}_2\text{Ph} \times 5$ ), 4.30 (m, 1H, H-6<sup>d</sup>), 4.25 (dd, 1H,  $J = 1.7, 2.8$  Hz, H-2<sup>d</sup>), 4.22-4.02 (m, 10H, H-2<sup>a</sup>, H-2<sup>b</sup>, H-2<sup>c</sup>, H-3<sup>a</sup>, H-3<sup>b</sup>, H-4<sup>a</sup>, H-4<sup>b</sup>, H-4<sup>d</sup>, H-4<sup>e</sup>, H-6<sup>e</sup>), 3.98 (td, 1H,  $J = 4.8, 10.0$  Hz, H-5<sup>d</sup>), 3.83-3.76 (m, 4H, H-4<sup>c</sup>, H-5<sup>e</sup>, H-6<sup>c</sup>, H-6<sup>d</sup>), 3.71 (t, 1H,  $J = 10.3$  Hz, H-6<sup>e</sup>), 3.66-3.62 (m, 3H, H-6<sup>b</sup>,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ), 3.58 (dd, 1H,  $J = 2.8, 11.6$  Hz, H-6<sup>e'</sup>), 3.49 (bd, 1H,  $J = 10.3$  Hz, H-6<sup>a</sup>), 3.36-3.32 (m, 3H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ , H-3<sup>c</sup>, H-6<sup>a</sup>), 3.26 (m, 1H, H-5<sup>a</sup>), 3.21 (m, 1H, H-5<sup>b</sup>), 2.99 (dt, 1H,  $J = 3.1, 10.0$  Hz, H-5<sup>c</sup>), 2.93 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 2.25 (s, 3H,  $-\text{COCH}_3$ ), 1.49 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 1.34 (s, 9H,  $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.20, 1.13 (2s, 18H,  $-\text{COC}(\text{CH}_3)_3 \times 2$ ), 0.97, 0.82 (2s, 18H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_3 \times 2$ ), 0.12, 0.10 (2s, 6H,  $-\text{CH}_3 \times 2$ ), -0.10 (2s, 6H,  $-\text{CH}_3 \times 2$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  177.7, 177.5, 171.3, 170.2, 168.2, 167.6, 156.0, 138.7, 138.7, 138.2, 138.1, 137.8, 137.6, 133.9, 133.7, 131.9, 131.8, 131.6, 128.7, 128.7, 128.5, 128.2, 128.2, 128.1, 128.0, 128.0, 127.9, 127.9, 127.8, 127.7, 127.2, 127.0, 126.3, 126.1, 123.6, 123.3, 104.0 (C-1<sup>d</sup>), 101.5 ( $-\text{CHPh} \times 2$ ), 101.4 (C-1<sup>c</sup>), 99.9 (C-1<sup>e</sup>), 98.3 (C-1<sup>a</sup>), 96.9 (C-1<sup>b</sup>), 80.1 (C-4<sup>b</sup>), 78.9 (C-3<sup>c</sup>), 78.3 (C-3<sup>b</sup>), 76.8 (C-3<sup>a</sup>), 76.5 (C-4<sup>e</sup>), 76.3 (C-4<sup>d</sup>), 75.7 (C-4<sup>a</sup>), 74.7 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 74.5 (C-5<sup>a</sup>), 74.5 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 74.4 (C-5<sup>b</sup>), 73.6 (C-5<sup>c</sup>), 73.1 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 72.9 ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 70.9 (C-2<sup>d</sup>), 70.6 (C-2<sup>e</sup>), 70.5 (C-3<sup>e</sup>), 70.2 (C-3<sup>d</sup>), 70.2 (C-2<sup>c</sup>), 68.9 (C-6<sup>e</sup>), 68.8 (C-6<sup>d</sup>), 68.3 (C-6<sup>a</sup>), 67.7 (C-6<sup>b</sup>), 66.8 ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ), 66.5 (C-6<sup>c</sup>), 65.4 (C-5<sup>d</sup>), 64.9 (C-5<sup>e</sup>), 60.5, 59.8 (C-4<sup>c</sup>), 56.7 (C-2<sup>b</sup>), 55.7 (C-2<sup>a</sup>), 38.9, 38.8, 37.3 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ -), 29.6 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 28.5 ( $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 27.4 $\times 2$ , 25.8, 25.7 ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_3 \times 4$ ), 21.0 ( $-\text{COCH}_3$ ), -4.44, -4.72, -4.91 ( $-\text{CH}_3 \times 4$ ); MALDI-TOF MS  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{120}\text{H}_{150}\text{N}_6\text{NaO}_{32}\text{Si}_2$ ; 2265.973; found 2265.770.

**3-(*N*-tert-butoxycarbonyl)aminopropyl  $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]-4-amino-4-deoxy- $\beta$ -D-mannopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside (45)**

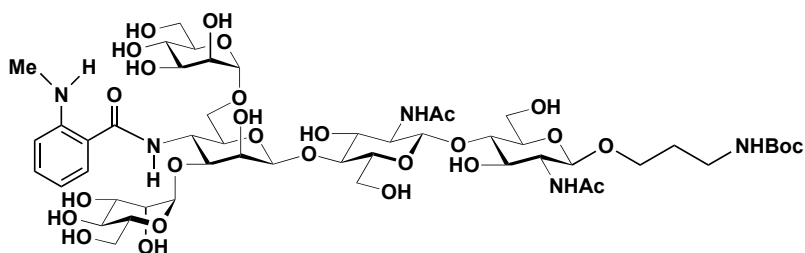


化合物 **46** (150 mg, 66.8  $\mu\text{mol}$ ) をテトラヒドロフラン (2.0 mL) に溶かし、氷浴中にて、1 M テトラヒドロアンモニウムフルオリド/テトラヒドロフラン溶液 (200  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{mol}$ ) を

加えた。反応液を 30 °C にて 15 時間攪拌した後、減圧濃縮した。得られた残渣に、*n*-ブチルアルコール (2.0 mL)、エチレンジアミン (400  $\mu$ L, 3.00 mmol) を加え、アルゴンガス雰囲気下 90 °C にて 15 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残渣をピリジン (1 mL) に溶かし、氷浴中、無水酢酸 (500  $\mu$ L, 5.29 mmol) を加えた。反応液を 40 °C で一晩攪拌した。反応液にメタノールを加え、反応を停止した。反応液を酢酸エチルにて希釈し、有機層を 1 M 塩酸、飽和食塩水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水を用いて順次洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムにて乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をテトラヒドロフラン (2.0 mL)、メタノール (1.0 mL) に溶かし、氷浴中 1 M ナトリウムメトキシド/メタノール溶液 (500  $\mu$ L) を加えた。反応液を 40 °C で 9 時間攪拌した。アンバーリストにより反応液の中和し、減圧留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム / メタノール = 95 / 5 ~ 88 / 12) を用いて精製し、脱保護中間体 (76 mg, 70% in 4 steps) を得た。得られた化合物 (76 mg, 46.6  $\mu$ mol) をテトラヒドロフラン (5 mL) に溶かし、水 (5 mL) を加えた。反応容器をアルゴンガスにて置換し、水酸化パラジウム (50 mg) を加え、再びアルゴンガスで置換した。反応系内を水素ガスで置換、充填後、40 °C で一晩攪拌した。セライトろ過にて水酸化パラジウムを除去し、溶液を減圧濃縮した。残渣を ISOLUT 18C (Millipore, 水) にて精製後、凍結乾燥し、化合物 **45** (45 mg, 63% in 5 steps) を得た。

$R_f = 0.25$  (CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O = 3 / 1); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  5.08 (d, 1H,  $J = 1.4$  Hz, H-1<sup>d</sup>), 4.95 (d, 1H,  $J = 1.4$  Hz, H-1<sup>e</sup>), 4.79 (s, 1H, H-1<sup>c</sup>), 4.59 (d, 1H,  $J = 7.9$  Hz, H-1<sup>a</sup>), 4.48 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, H-1<sup>b</sup>), 4.44 (d, 1H,  $J = 2.7$  Hz, H-2<sup>c</sup>), 4.13 (q, 1H,  $J = 1.6$  Hz, H-2<sup>d</sup>), 4.03-3.59 (m, 32H), 3.51-3.45 (m, 2H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 3.09 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc), 2.07 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2.03 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 1.72 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1.42 (s, 9H, -OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  174.8, 174.7, 100.6 (C-1<sup>d</sup>), 101.4 (C-1<sup>e</sup>), 101.0 (C-1<sup>c</sup>), 100.1 (C-1<sup>a</sup>), 100.0 (C-1<sup>b</sup>), 79.3, 79.3, 74.5, 74.4, 73.8, 73.0, 72.4, 71.9, 69.8 (C-2<sup>d</sup>), 69.7, 68.8 (C-2<sup>c</sup>), 67.8, 66.8, 66.7, 65.9, 61.0, 61.0, 60.1, 60.0, 55.0, 48.1 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 37.5 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>-), 29.6, 28.9 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 27.7 (-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 22.2 $\times$ 2 (-COCH<sub>3</sub> $\times$ 2); MALDI-TOF MS  $m/z$ : [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>117</sub>H<sub>143</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>32</sub>Si<sub>2</sub>; 1089.443; found 1089.436.

**3-(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)aminopropyl  $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]-4-deoxy-4-*N*-methylanthranyl- $\beta$ -D-mannopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside (**57**)**

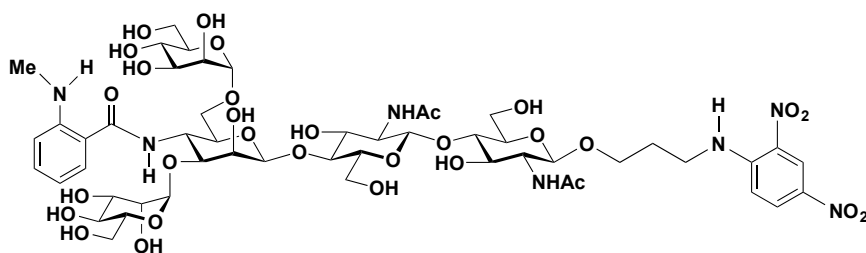




化合物 **45** (3.7 mg, 3.5  $\mu\text{mol}$ ) をジメチルスルホキシド (500  $\mu\text{L}$ ) に溶かし、ジメチルアミノピリジン (1.7 mg, 14  $\mu\text{mol}$ )、*N*-メチルアントラニル酸 (1.2 mg, 3.6  $\mu\text{mol}$ )、HATU (4.8 mg, 13  $\mu\text{mol}$ ) を加えた。反応液を室温にて2時間攪拌した。反応液を水で希釈し、ジエチルエーテルで3回洗浄した。水層を凍結乾燥した。得られた残渣を ODS カラム ( $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN} = 84/16$ ) にて精製し、化合物 **57** (2.8 mg, 66%) を得た。

$R_f = 0.67$  ( $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O} = 3/1$ );  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  7.47 (m, 1H, Nma-aromatic-*H*), 7.43 (dd, 1H,  $J = 7.9, 1.4$  Hz, Nma-aromatic-*H*), 6.89 (d, 1H,  $J = 7.9$  Hz, Nma-aromatic-*H*), 6.79 (m, 1H, Nma-aromatic-*H*), 4.96 (d, 1H,  $J = 1.4$  Hz, H-1<sup>d</sup>), 4.87 (d, 1H,  $J = 1.4$  Hz, H-1<sup>e</sup>), 4.81 (s, 1H, H-1<sup>c</sup>), 4.61 (d, 1H,  $J = 7.9$  Hz, H-1<sup>a</sup>), 4.49 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, H-1<sup>b</sup>), 4.40 (t, 1H,  $J = 10.7$  Hz, H-4<sup>c</sup>), 4.31 (d, 1H,  $J = 2.7$  Hz, H-2<sup>c</sup>), 3.96-3.48 (m, 31H), 3.09 (td, 2H,  $J = 13.1, 6.6$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$ ), 2.83 (s, 3H,  $-\text{NHCH}_3$ ), 2.08 (s, 3H,  $-\text{COCH}_3$ ), 2.04 (s, 3H,  $-\text{COCH}_3$ ), 1.72 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 1.42 (s, 9H,  $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  175.4, 175.2, 172.6, 158.9, 150.1, 134.3, 128.8, 117.2, 117.0, 113.0, 103.4 (C-1<sup>d</sup>), 102.1 (C-1<sup>a</sup>), 101.7 (C-1<sup>b</sup>), 101.0 (C-1<sup>c</sup>), 100.5 (C-1<sup>e</sup>), 80.1, 80.0, 75.2, 75.1, 74.2, 73.4, 73.1, 72.6, 71.0, 70.9, 70.6, 70.3 (C-2<sup>c</sup>), 68.5, 67.5, 67.3, 66.7, 61.8, 61.4, 60.8, 60.7, 55.7, 55.6, 47.1 (C-4<sup>c</sup>), 37.5 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ ), 30.2 ( $-\text{NHCH}_3$ ), 29.6 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 28.4 ( $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 22.9 ( $-\text{COCH}_3$ ), 22.8 ( $-\text{COCH}_3$ ); MALDI-TOF MS  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{50}\text{H}_{81}\text{N}_5\text{NaO}_{28}$ ; 1222.496; found 1222.113.

**3-*N*-2,4-di-nitrophenyl-3-aminopropyl  $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]-4-deoxy-4-*N*-methylantraniloylamido- $\beta$ -D-mannopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside (44)**

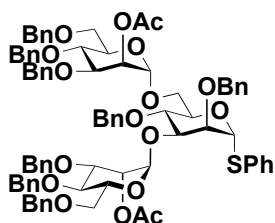


化合物 **57** (5.0 mg, 4.1  $\mu\text{mol}$ ) にトリフルオロ酢酸 (200  $\mu\text{L}$ ) に氷浴中にて加えた。氷浴中、20分間攪拌した。窒素ガスを用いて、トリフルオロ酢酸を除去した。氷浴中にて、アンモニア水を加えた。窒素ガスを用いて、アンモニアを除去したのち、凍結乾燥をした。得られた残渣を水 (180  $\mu\text{L}$ ) に溶かし、炭酸水素ナトリウム水溶液 (2.0 mg) を加えた。続いて、2,4-ジニトロフルオロベンゼン/メタノール溶液 (1.1 mg/90  $\mu\text{L}$ ) を氷浴中にて加えた。反応液を室温にて、2時間攪拌した。その後、2,4-ジニトロフルオロベンゼン/メタノール溶液 (1.1

mg/90  $\mu$ L) を氷浴中にて加えた。反応液を室温にて 2.5 時間攪拌した。反応液を水で希釈し、ジエチルエーテルにて洗浄した。水層を凍結乾燥した。得られた残渣を ODS カラム ( $\text{H}_2\text{O} / \text{CH}_3\text{CN} = 84 / 16$ ) にて精製し、凍結乾燥を行い、化合物 **44** (2.0 mg, 39%) を得た。

$R_f = 0.53$  ( $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O} = 4 / 1$ );  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , at 25  $^\circ\text{C}$ ):  $\delta$  9.11 (d, 1H,  $J = 2.6$  Hz, Dnp-aromatic-*H*), 8.30 (dd, 1H,  $J = 9.6, 2.6$  Hz, Dnp-aromatic-*H*), 7.47 (ddd, 1H,  $J = 1.0, 7.8, 9.8$  Hz, Nma-aromatic-*H*), 7.43 (dd, 1H,  $J = 1.4, 7.8$  Hz, Nma-aromatic-*H*), 7.11 (d, 1H,  $J = 9.6$  Hz, Dnp-aromatic-*H*), 6.88 (d, 1H,  $J = 7.8$  Hz, Nma-aromatic-*H*), 6.78 (td, 1H,  $J = 1.0, 7.8$  Hz, Nma-aromatic-*H*), 4.96 (d, 1H,  $J = 1.0$  Hz, H-1<sup>d</sup>), 4.87 (d, 1H,  $J = 1.4$  Hz, H-1<sup>e</sup>), 4.82 (s, 1H, H-1<sup>c</sup>), 4.61 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, H-1<sup>a</sup>), 4.52 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, H-1<sup>b</sup>), 4.40 (t, 1H,  $J = 10.1$  Hz, H-4<sup>c</sup>), 4.31 (d, 1H,  $J = 2.7$  Hz, H-2<sup>c</sup>), 4.04 (m, 1H,  $-\text{CH}_2\text{NH}-$ ), 3.99-3.45 (m, 33H), 2.83 (s, 3H,  $-\text{NHCH}_3$ ), 2.08 (s, 3H,  $-\text{COCH}_3$ ), 2.00 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 1.93 (s, 3H,  $-\text{COCH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , at 25  $^\circ\text{C}$ ):  $\delta$  175.4, 175.0, 172.6, 150.1, 149.6, 135.9, 134.3, 131.2, 130.6, 128.8, 125.5, 117.2, 117.0, 115.4, 113.0, 103.3 (C-1<sup>d</sup>,  $J_{\text{C-H}} = 171$  Hz), 102.1 (C-1<sup>a</sup>,  $J_{\text{C-H}} = 167$  Hz), 101.8 (C-1<sup>b</sup>,  $J_{\text{C-H}} = 165$  Hz), 101.0 (C-1<sup>c</sup>,  $J_{\text{C-H}} = 163$  Hz), 100.5 (C-1<sup>e</sup>,  $J_{\text{C-H}} = 173$  Hz), 80.1, 80.0, 75.3, 75.1, 74.2, 73.4, 73.2, 72.6, 71.0, 70.9, 70.6, 70.4, 70.3, 68.5, 67.5, 67.3, 66.7, 61.8, 61.4, 60.8, 60.7, 55.7, 55.6, 46.5 (C-4<sup>c</sup>), 40.8 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ ), 30.2 ( $-\text{NCH}_3$ ), 28.5 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 22.9 ( $-\text{COCH}_3$ ), 22.7 ( $-\text{COCH}_3$ ); MALDI-TOF MS  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{51}\text{H}_{75}\text{N}_7\text{NaO}_{30}$ ; 1288.445; found 1288.446; HRMS  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{51}\text{H}_{75}\text{N}_7\text{NaO}_{30}$ ; 1288.4451; found 1288.4434.

**Phenyl 2-*O*-acethyl-3,4,6-*O*-tri-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-1-3-(2-*O*-acethyl-3,4,6-*O*-tri-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-1-6-2,4-*O*-di-benzyl-1-thio- $\alpha$ -D-mannopyrasoside (**60**)**

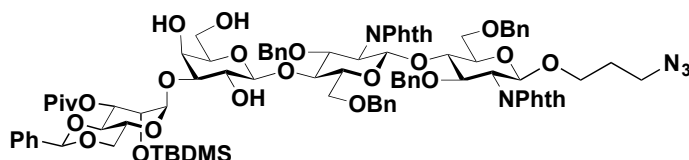


糖受容体 (50 mg, 0.11 mmol) と糖供与体 (155 mg, 0.305 mmol) のジクロロメタン溶液 (6 mL) を  $-40$   $^\circ\text{C}$  にて乾燥モレキュラーシーブス 4A (0.6 g) とトリフルオロメタンスルホン酸銀 (93 mg, 0.729 mmol) に加えた。反応液を 2 時間攪拌後、トリエチルアミン (30  $\mu$ L) を加え、反応を停止した。反応液に酢酸エチルを加え希釈し、セライトでろ過した後に、飽和食塩水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水を用いて順次洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムにて乾燥後、溶媒を減圧留去した。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにて精製し、3

糖画分を得たのち、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（トルエン / 酢酸エチル = 95 / 5 ~ 65 / 35）を用いて精製し、3 糖誘導体（142 mg, 92%）を得た。

$R_f = 0.33$  (toluene : EtOAc = 8 : 1);  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.46-6.99 (m, 45H, Ph), 5.53 (s, 1H, H-1a), 5.51 (s, 1H, H-2b), 5.43 (t,  $J = 2.4$  Hz, 1H, H-2c), 5.21 (s, 1H, H-1b), 4.92 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H, H-1c), 4.87 (d,  $J = 11.0$ , 1H,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.85 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.75 (d,  $J = 11.3$  Hz, 1H,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.69-4.34 (m, 13H,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.21 (dd,  $J = 9.8, 4.0$  Hz, 1H, H-5a), 4.13 (s, 1H, H-2a), 4.08 (dd,  $J = 9.3, 2.7$  Hz, 1H, H-3a), 4.01 (dd,  $J = 9.3, 3.4$  Hz, 1H, H-3b), 3.98-3.85 (m, 5H, H-4a, H-3c, H-4c, H-5b, H-6a), 3.82 (t,  $J = 9.6$  Hz, 1H, H-4b), 3.79-3.74 (m, 1H, H-5c), 3.72 (dd,  $J = 10.8, 4.0$  Hz, 1H, H-6c), 3.70-3.65 (m, 2H, H-6b), 3.63 (m, 1H, H-6a'), 3.59 (dd,  $J = 10.7, 1.4$  Hz, 1H, H-6c'), 2.13 (s, 3H,  $-\text{COCH}_3$ ), 2.09 (s, 3H,  $-\text{COCH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.4, 170.2, 138.7, 138.7, 138.3, 138.0, 137.9, 134.8, 131.0, 129.2, 129.2, 128.6, 128.6, 128.5, 128.4, 128.4, 128.2, 128.0, 128.0, 127.9, 127.9, 127.8, 127.8, 127.7, 127.6, 127.3, 125.4, 100.0 (C-1b), 98.3 (C-1c), 85.0 (C-1a), 79.4 (C-3a), 79.2 (C-2a), 78.2 (C-3b), 77.9 (C-3c), 75.3 (Bn), 75.1 (C-4a), 75.0 (Bn), 74.5 (C-4b), 74.3 (C-4c), 73.7 (Bn), 73.5 (Bn), 72.4 (C-5b), 72.3 (C-5a), 72.0 (Bn), 71.6 (, 69.3 (C-6b), 68.9 (C-2b), 68.8 (C-6c), 68.6 (C-2c), 66.7 (C-6a), 21.3, 21.1; MALDI-TOF MS  $m/z$  1423.5634  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{84}\text{H}_{88}\text{O}_{17}\text{SNa}$ , found 1423.5634.

**Azidopropyl 4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-pivaroyl-2-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1-4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside (62)**

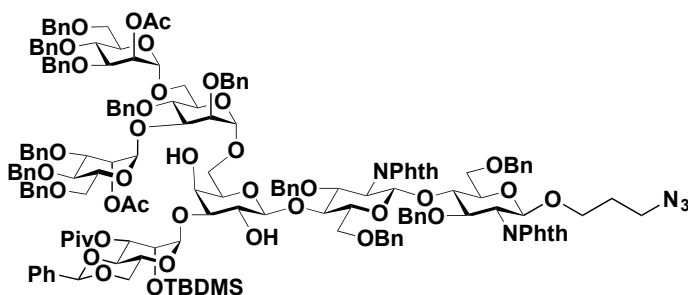


乾燥モレキュラーシーブス 4A (1.0 g) に、N-ヨードこはく酸イミド (62 mg, 0.137 mmol)、 $-78^\circ\text{C}$  にて、化合物 **48** (200 mg, 0.083 mmol) と化合物 **47** (102 mg, 0.091 mmol) のジクロロメタン溶液 (10 mL) を加えた。30 分攪拌後、トリフルオロメタンスルホン酸 (8  $\mu\text{L}$ , 0.045 mmol) を加えた。反応液を  $-78^\circ\text{C}$  にて 14 時間攪拌後、 $-40^\circ\text{C}$  にて 24 時間攪拌した。反応液にトリエチルアミンを加え、反応を停止した。反応液に酢酸エチルを加え希釈し、セライトでろ過した後、チオ硫酸ナトリウム、1 M 塩酸、飽和食塩水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水を用いて順次洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムにて乾燥後、溶媒を減圧留去した。ゲルろ過カラムクロマトグラフィー (Bio-Beads S-X1, トルエン) およびシリカ

ゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン / 酢酸エチル = 69 / 31 ~ 48 / 52）を用いて精製し、化合物 **62** (39.7 mg, 14%) を得た。

$R_f = 0.37$  (hexane : EtOAc = 1 : 1);  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.85-6.76 (m, 33H), 5.59 (s, 1H, -CHPh-), 5.34 (dd, 1H,  $J = 10.0, 3.1$  Hz, H-3<sup>d</sup>), 5.28 (d, 1H,  $J = 8.6$  Hz, H-1<sup>b</sup>), 4.94 (m, 1H, H-1<sup>a</sup>), 4.89 (d, 1H,  $J = 12.4$  Hz, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.85 (d, 1H,  $J = 12.7$  Hz, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.82 (d, 1H,  $J = 1.7$  Hz, H-1<sup>d</sup>), 4.59-4.44 (m, 7H, H-1<sup>c</sup>, -CH<sub>2</sub>Ph $\times$ 6), 4.39 (dd, 1H,  $J = 10.7, 8.6$  Hz, H-3<sup>b</sup>), 4.29-4.19 (m, 5H, H-2<sup>b</sup>, H-4<sup>a</sup>, H-5<sup>d</sup>, H-6<sup>d</sup>, H-2<sup>d</sup>), 4.15-4.11 (m, 4H, H-2<sup>a</sup>, H-3<sup>a</sup>, H-4<sup>b</sup>, H-4<sup>d</sup>), 3.88 (s, 1H, H-4<sup>c</sup>), 3.82-3.78 (m, 2H, H-H-6<sup>b</sup>, H-6<sup>d</sup>), 3.73-3.61 (m, 5H, H-H-2<sup>c</sup>, H-6<sup>b</sup>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, H-6<sup>c</sup>), 3.55 (d, 1H,  $J = 9.6$  Hz, H-6<sup>a</sup>), 3.50 (dd, 1H,  $J = 9.6, 3.4$  Hz, H-3<sup>c</sup>), 3.42 (dd, 1H,  $J = 11.0, 3.8$  Hz, H-6<sup>a</sup>), 3.36-3.29 (m, 3H, H-5<sup>b</sup>, H-5<sup>a</sup>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 3.19 (m, 2H, H-5, -OH), 3.11-3.02 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 2.65 (s, 1H, -OH), 2.04 (s, 1H, -OH), 1.69-1.46 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1.21 (s, 9H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.94 (s, 9H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.08 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 0.06 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  178.3, 168.6, 167.7, 138.7, 138.6, 138.4, 138.0, 137.6, 134.2, 134.0, 133.8, 131.9, 131.8, 131.5, 128.8, 128.6, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9, 127.7, 127.6, 127.4, 127.4, 127.3, 127.0, 126.0, 123.8, 123.3, 103.2 (C-1<sup>c</sup>), 101.3 (-CHPh-), 98.8 (C-1<sup>d</sup>), 98.3 (C-1<sup>a</sup>), 97.1 (C-1<sup>b</sup>), 78.6 (C-3<sup>c</sup>), 78.3 (C-4<sup>d</sup>), 77.9 (C-3<sup>b</sup>), 76.9 (C-3<sup>a</sup>), 76.7 (C-4<sup>b</sup>), 76.3 (C-4<sup>a</sup>), 75.6 (-CH<sub>2</sub>Ph), 74.9 (C-5<sup>b</sup>), 74.7 (C-5<sup>a</sup>), 74.5 (-CH<sub>2</sub>Ph), 74.0 (C-5<sup>c</sup>), 73.3 (-CH<sub>2</sub>Ph), 72.8 (-CH<sub>2</sub>Ph), 71.1 (C-2<sup>d</sup>), 70.8 (C-3<sup>d</sup>), 70.5 (C-2<sup>c</sup>), 68.9 (C-6<sup>d</sup>), 68.3 (C-6<sup>a</sup>), 67.5 (C-6<sup>b</sup>), 66.9 (C-4<sup>c</sup>), 65.9 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 64.9 (C-5<sup>d</sup>), 62.7 (C-6<sup>c</sup>), 56.8 (C-2<sup>b</sup>), 55.8 (C-2<sup>a</sup>), 48.1 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 39.2, 28.9, 27.4, 25.8, 18.1, -4.4, -4.7; MALDI-TOF MS  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for C<sub>89</sub>H<sub>103</sub>N<sub>5</sub>O<sub>24</sub>Si; 1676.665; found 1676.973.

**Azidopropyl 4,6-O-benzylidene-3-O-pivaroyl-2-O-tert-butylidimethylsilyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[2-O-acethyl-3,4,6-O-tri-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-1-3-(2-O-acethyl-3,4,6-O-tri-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-1-6-2,4-O-di-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl]- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1-4)-3,6-di-O-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-4)-3,6-di-O-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside (60)**

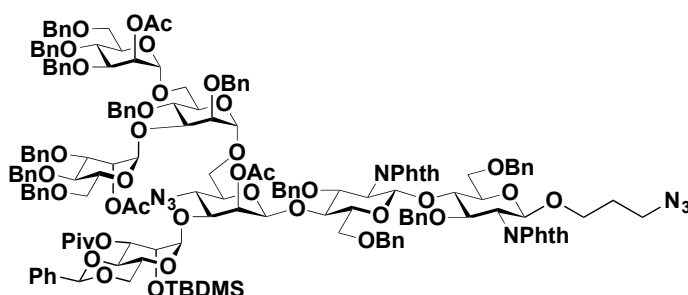


乾燥モレキュラーシーブス 4A (0.3 g) に、N-ヨードこほく酸イミド (8.5 mg, 0.038 mmol)、-78 °C にて、化合物 **62** (38 mg, 0.024 mmol) と化合物 **61** (35 mg, 0.025 mmol) のジクロロメ

タン溶液(4 mL)を加えた。30分攪拌後、トリフルオロメタンスルホン酸(1.1  $\mu$ L, 0.045 mmol)を加えた。反応液を-78  $^{\circ}$ Cにて3時間攪拌した。反応液にトリエチルアミンを加え、反応を停止した。反応液に酢酸エチルを加え希釈し、セライトでろ過した後、チオ硫酸ナトリウム、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水を用いて順次洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムにて乾燥後、溶媒を減圧留去した。ゲルろ過カラムクロマトグラフィー (SX-1, toluene) および HPLC (ヘキサン / 酢酸エチル = 60/40) により精製し、化合物 **60** (18 mg, 25%) を得た。

$R_f$  = 0.30 (hexane : EtOAc = 3 : 2);  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.95-6.61 (m, 73H, Ar-H), 5.57 (s, 1H, -CHPh-), 5.47 (t, 1H,  $J$  = 2.4 Hz, H-2g), 5.43 (t, 1H,  $J$  = 2.4 Hz, H-2f), 5.36 (dd, 1H,  $J$  = 10.3, 3.1 Hz, H-3d), 5.23 (d, 1H,  $J$  = 8.6 Hz, H-1b), 5.05 (d, 1H,  $J$  = 1.4 Hz, H-1f), 4.94-4.92 (m, 2H, H-1g, H-1a), 4.83-4.79 (m, 5H, H-1d, -CH<sub>2</sub>Ph $\times$ 4), 4.76 (d, 1H,  $J$  = 0.6 Hz, H-1e), 4.68 (d, 1H,  $J$  = 11.3 Hz, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.63-4.33 (m, 21H, H-1<sup>c</sup>, H-3<sup>b</sup>, -CH<sub>2</sub>Ph $\times$ 19), 4.29-4.07 (m, 9H, H-2<sup>a</sup>, H-3<sup>a</sup>, H-4<sup>a</sup>, H-2<sup>b</sup>, H-4<sup>b</sup>, H-2<sup>d</sup>, H-3<sup>d</sup>, H-5<sup>d</sup>, H-6<sup>d</sup>), 3.99 (dd, 1H,  $J$  = 9.3, 3.4 Hz, H-3<sup>f</sup>), 3.97-3.47 (m, 27H), 3.39 (dd, 1H, H-6<sup>a</sup>), 3.33 (m, 1H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 3.32-3.24 (m, 3H, H-5<sup>a</sup>, H-5<sup>b</sup>, H-5<sup>c</sup>), 3.11-3.02 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 2.31 (d, 1H,  $J$  = 2.7 Hz, -OH), 2.11 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2.05 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 1.68-1.52 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1.21 (s, 9H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.91 (s, 9H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.05 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 0.03 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  178.1, 170.2, 168.4, 167.6, 138.7, 138.7, 138.6, 138.5, 138.4, 138.3, 138.3, 138.2, 138.0, 137.9, 137.7, 137.6, 134.0, 133.7, 131.7, 131.5, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.4, 128.4, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.1, 128.0, 127.9, 127.9, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.6, 127.5, 127.4, 127.4, 127.2, 127.0, 126.0, 123.7, 123.3, 103.8 (C-1<sup>c</sup>), 101.3 (-CHPh-), 99.6 (C-1<sup>f</sup>), 99.2 (C-1<sup>d</sup>), 98.5 (C-1<sup>g</sup>), 98.3 (C-1<sup>a</sup>), 97.6 (C-1<sup>e</sup>), 97.0 (C-1<sup>b</sup>), 79.3, 78.7, 78.4, 78.3, 77.5, 76.6, 76.4, 75.5, 75.1, 74.9, 74.8, 74.6, 74.4, 74.3, 74.1, 73.5, 73.4, 73.3, 72.7, 72.4, 72.3, 72.2, 71.8, 71.7, 71.6, 71.3, 71.1, 70.9, 70.6, 69.2, 68.9, 68.8, 68.7, 68.3, 68.2, 67.3, 66.1, 65.9, 65.6, 64.9, 56.8, 55.7, 48.1, 39.1, 28.9, 27.4, 25.8, 21.2, 21.1, 18.0, 0.1, -4.4, -4.7; MALDI-TOF MS  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for C<sub>167</sub>H<sub>185</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>41</sub>Si; 2967.2206; found 2967.530.

**Azidopropyl 4,6-*O*-benzylidene-3-*O*-pivaroyl-2-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[2-*O*-acetyl-3,4,6-*O*-tri-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-1-3-(2-*O*-acetyl-3,4,6-*O*-tri-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-(1-6)-2,4-*O*-di-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]- 2-*O*-acetyl-4-azido-4-deoxy- $\beta$ -D-mannopyranosyl-(1-4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-deoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranoside (59)**

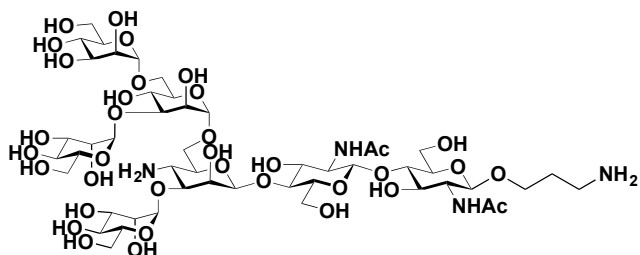


化合物 **60** (18 mg, 6.1  $\mu$ mol) をジクロロメタン (1 mL) に溶かし、脱水ピリジン (15  $\mu$ L, 0.18 mmol) と塩水中にてトリフルオロメタンスルホン酸無水物 (10  $\mu$ L, 0.061 mmol) を加えた。-10  $^{\circ}$ C にて 8 時間攪拌した。その後、反応液を酢酸エチルで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水を用いて順次洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムにて乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (トルエン / 酢酸エチル = 100 / 0 ~ 70 / 30) を用いて精製し、ジトリプレート化合物 (20 mg) を得た。続いて、化合物 **63** (20 mg) をトルエン (1 mL) に溶かし、氷浴中にてテトラブチルアンモニウムアジド (2 mg, 6.7  $\mu$ mol) を加えた。反応液を 2.5 時間攪拌した。その後、反応液を酢酸エチルで希釈し、飽和食塩水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水を用いて順次洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムにて乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン / 酢酸エチル = 100 / 0 ~ 70 / 30) を用いて精製し、化合物 **64** を得た。続いて、室温にて、化合物 **64** をトルエン (1 mL) に溶かし、酢酸セシウム (12 mg, 0.61 mmol) と 18-クラウン 6-エーテル (32 mg, 0.61 mmol) を加えた。反応液を超音波照射下、一晩反応させた。その後、反応液を酢酸エチルで希釈し、飽和食塩水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水を用いて順次洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムにて乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (トルエン / 酢酸エチル = 85 / 15 ~ 55 / 45) を用いて精製し、化合物 **59** (12 mg, 65%) を得た。

$R_f$  = 0.52 (toluene / EtOAc = 3 : 1);  $^1$ H NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.78-6.53 (m, 94H), 5.50 (s, 1H), 5.37 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 2H), 5.26 (d,  $J$  = 3.2 Hz, 1H), 5.20-4.98 (m, 3H), 4.93-2.79 (m, 89H), 2.28 (s, 1H), 2.11 (d,  $J$  = 14.9 Hz, 2H), 2.07-2.01 (m, 3H), 1.98 (s, 6H), 1.96-1.87 (m, 3H), 1.67-1.35 (m, 5H),

1.14-1.04 (s, 9H), 0.85 (s, 9H), 0.04 (s, 3H), 0.03 (s, 2H), -0.14 (m, 3H); MALDI-TOF MS  $m/z$ :  $[M+Na]^+$  calcd for  $C_{169}H_{186}N_8NaO_{41}Si$ ; 3034.238; found 3034.386.

**Aminopropyl - $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyl-1-3-( $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-(1-6)- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]-4-amino-4-deoxy- $\beta$ -D-mannopyranosyl-(1-4)-2-deoxy-2-acetoamido- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-4)-2-deoxy-2-acetoamido- $\beta$ -D-glucopyranoside (64)**

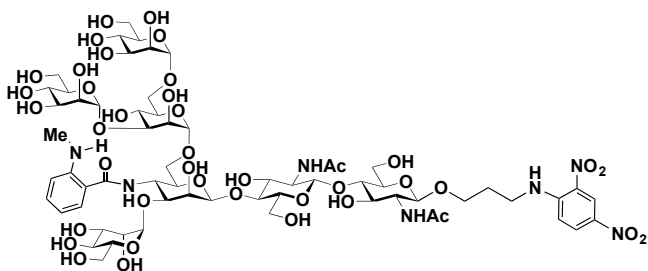


化合物 **59** (7 mg, 0.0046 mmol) をテトラヒドロフラン (1 mL) に溶かし、氷浴中にて、1 M テトラブチルアンモニウムフルオリド/テトラヒドロフラン溶液 (14  $\mu$ L, 0.014 mmol) を加えた。反応液を室温に戻し、40  $^{\circ}$ C にて 157 時間攪拌した。反応液をトルエン共沸後、真空乾燥した。得られた残渣に、室温にて、*n*-ブチルアルコール (1 mL)、エチレンジアミン (100  $\mu$ L) を加え、アルゴンガス雰囲気下 90  $^{\circ}$ C にて 15 時間 30 分間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残渣をピリジン (500  $\mu$ L) に溶かし、氷浴中、無水酢酸 (200  $\mu$ L) を加えた。反応液を室温に戻し、反応容器をアルゴンで置換した後、40  $^{\circ}$ C で 18 時間 30 分間攪拌した。反応液にメタノールを加え、反応を停止した。反応液を酢酸エチルにて希釈し、有機層を 1 M 塩酸、飽和食塩水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水を用いて順次洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムにて乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をテトラヒドロフラン (1 mL) に溶かし、氷浴中 1 M ナトリウムメトキシド/メタノール溶液 (500  $\mu$ L) を加えた。反応液を室温に戻し、アルゴンガス雰囲気下、30  $^{\circ}$ C で一晩攪拌した。アンバーリストにより反応液の中和を行い、減圧留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム / メタノール = 100 / 1 ~ 92 / 8) を用いて精製し、脱保護中間体を得た。得られた化合物をテトラヒドロフラン (5 mL) に溶かし、水 (5 mL) を加えた。反応容器をアルゴンガスにて置換し、水酸化パラジウム (12 mg) を加え、再びアルゴンガスで置換した。反応系内を水素ガスで置換、充填後、室温で一晩攪拌した。セライトろ過にて水酸化パラジウムを除去し、溶液を減圧濃縮した。残渣を ISOLUT 18C (Millipore, 水 100%) にて精製後、凍結乾燥し、化合物 **64** (1.7 mg, 34%) を得た。

$^1$ H NMR (400 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  5.08 (s, 1H), 5.07-4.99 (m, 2H), 4.93 (m, 4H), 4.58 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 1H), 4.48 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 4.36-4.21 (m, 1H), 4.21-3.28 (m, 43H), 3.06 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 2.18-2.05 (m,

3H), 2.04 (s, 3H), 1.94 (s, 3H), 1.90 (s, 3H); MALDI-TOF MS  $m/z$ :  $[M+Na]^+$  calcd for  $C_{55}H_{86}N_4NaO_{36}$ ; 1401.4914; found 1401.402.

**3-*N*-2,4-di-nitrophenyl-3-aminopropyl  $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-3)-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyl -1-3-( $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-(1-6)- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1-6)]-4-deoxy-4-*N*- methylanthranyl $\beta$ -D-mannopyranosyl-(1-4)-2-deoxy-2-acetoamido- $\beta$ -D-glucopyranosyl- (1-4)-2-deoxy-2- acetoamido- $\beta$ -D-glucopyranoside (58)**



化合物 **64** (1.7 mg, 1.3  $\mu$ mol) を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (60  $\mu$ L) に溶解し、2,4-ジニトロフェニルフルオリド (0.7 mg, 2.0  $\mu$ mol) のメタノール溶液 (40  $\mu$ L) を加えた。24 時間反応させた後、反応混合物を水で希釈し、ジエチルエーテルにて洗浄した。水層を凍結乾燥し、得られた残渣を ISOLUTE C18 (水/メタノール) にて精製した。化合物 **65** をジメチルスルホキシド (100  $\mu$ L) に溶かし、ジメチルアミノピリジン/ジメチルスルホキシド溶液 (0.49 mg/20  $\mu$ L, 4.0  $\mu$ mol)、*N*-メチルアントラニル酸/ジメチルスルホキシド溶液 (0.35 mg/20  $\mu$ L, 3.0  $\mu$ mol) を加えた。その後、氷浴中にて、HATU/ジメチルスルホキシド溶液 (1.4 mg/20  $\mu$ L, 1.4  $\mu$ mol) を加えた。反応液を室温にて 11 時間攪拌した。反応液を水にて希釈、水層をジエチルエーテルにて洗浄後、水層を凍結乾燥した。得られた残渣を逆相中圧カラムクロマトグラフィー (水 / アセトニトリル = 80 / 20) にて精製した。その後、逆相 HPLC (Unison C18, 20  $\times$  250 mm, H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>CN = 80 / 20) により精製し、化合物 **58** (0.55 mg, 31%) を得た。

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  9.22 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 1H), 8.41 (dd,  $J$  = 9.8, 2.6 Hz, 1H), 7.57 (dd,  $J$  = 7.4, 6.4 Hz, 2H), 7.23 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H), 6.97 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 6.87 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 5.29 (s, 1H), 5.08 (s, 1H), 4.92 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 4.74-4.60 (m, 4H), 4.39 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 4.27 (s, 1H), 4.18 (q,  $J$  = 1.6 Hz, 1H), 4.16-3.56 (m, 47H), 3.47 (q,  $J$  = 1.6 Hz, 1H), 2.93 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.15-2.06 (m, 2H), 2.03 (s, 3H), 1.34 (s, 16H). MALDI-TOF MS  $m/z$ :  $[M+Na]^+$  calcd for  $C_{63}H_{95}N_7NaO_{40}^+$ ; 1612.5507; found 1612.783.



#### 酵素反応条件

5糖プローブ溶液 (25  $\mu\text{M}$ ) を 10  $\mu\text{L}$  と水を 20  $\mu\text{L}$ 、DMSO を 5  $\mu\text{L}$ 、リン酸ナトリウムバッファー (200 mM, pH 7) を 10  $\mu\text{L}$  の混合溶液に酵素液を 5  $\mu\text{L}$  加え、50  $\mu\text{L}$  の反応混合液 (終濃度 5  $\mu\text{M}$  5糖分子プローブ, 10% DMSO, 40 mM リン酸バッファー) を 37  $^{\circ}\text{C}$  で3時間インキュベートした。反応は、マイクロプレートリーダーを使用し、励起波長 340 nm、蛍光波長 440 nm にて追跡した。

## 参考文献

- 1) R. M. Schmaltz, S. R. Hanson, C. H. Wong, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4259-4307.
- 2) L. X. Wang, M. N. Amin, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 51-66.
- 3) T. Muramatsu, *J. Biol. Chem.* 1971, *246*, 5535.
- 4) H. Muramatsu, H. Tachikui, H. Ushida, X. Song, Y. Qiu, S. Yamamoto, T. Muramatsu, *J. Biochem.* **2001**, *129*, 923-928.
- 5) A. L. Tarentino, F. Maley, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 811-817.
- 6) CAZy Database <http://www.cazy.org>
- 7) R. B. Trimble, P. H. Alkinson, A. L. Tarentino, T.H. Plummer, F. Maley, K. B. Tomer, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 12000.
- 8) M. Collin, A. Olsen, *Embo J.* **2001**, *20*, 3046-3055.
- 9) S. Kadowaki, K. Yamamoto, M. Fujisaki, K. Izumi, T. Tochikura, T. Yokoyama, *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54*, 97-106.
- 10) K. Takegawa, K. Yamabe, K. Fujita, M. Tabuchi, M. Mita, H. Izu, A. Watanabe, Y. Asada, M. Sano, A. Kondo, I. Kato, S. Iwahara, *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *338*, 22-28.
- 11) T. Suzuki, K. Yano, S. Sugimoto, K. Kitajima, W. J. Lennarz, S. Inoue, Y. Inoue, Y. Emori, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 9691-9696.
- 12) S. Murakami, Y. Takaoka, H. Ashida, K. Yamamoto, H. Narimatsu, Y. Chiba, *Glycobiology* **2013**, *23*, 736-744.
- 13) Y. Eshima, Y. Higuchi, T. Kinoshita, S. I. Nakakita, K. Takegawa, *PLoS One* **2015**, *10*, e0132859.
- 14) A. J. Fairbanks, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 5128-5146.
- 15) K. Yamamoto, S. Kadowaki, M. Fujisaki, H. Kumagai, T. Tochikura, *Biosci. Biotech. Biochem.* **1994**, *58*, 72-77.
- 16) K. Fujitaa, K. Kobayashib, A. Iwamatsub, M. Takeuchib, H. Kumagaia, K. Yamamoto, *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *432*, 41-49.
- 17) S. Hase, S. Natsuka, H. Oku, T. Ikenaka, *Anal. Biochem.* **1987**, *167*, 321-326.
- 18) M. Fujita, S. Shoda, K. Haneda, T. Inazu, K. Takegawa, K. Yamamoto, *Biochim. Biophys. Acta.* **2001**, *1528*, 9-14.
- 19) P. M. Danby, S. G. Withers, *Acs Chem. Biol.* **2016**, *11*, 1784-1794.
- 20) J. Yin, L. Li, N. Shaw, Y. Li, J. K. Song, W. Zhang, C. Xia, R. Zhang, A. Joachimiak, H. C. Zhang, L. X. Wang, Z. J. Liu, P. Wang, *PLoS One* **2009**, *4*, e4658.
- 21) R. B. Trimble, A. L. Tarentino, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 1646-1651.

- 22) K. Takegawa, S. Yamaguchi, A. Kondo, H. Iwamoto, M. Nakoshi, I. Kato, S. Iwahara, *Biochem. Int.* **1991**, *24*, 849-855.
- 23) H. Hojo, H. Tanaka, M. Hagiwara, Y. Asahina, A. Ueki, H. Katayama, Y. Nakahara, A. Yoneshige, J. Matsuda, Y. Ito, Y. Nakahara, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 9437-9446.
- 24) K. Yamamoto, *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, *92*, 493-501.
- 25) K. Yamamoto, *Biotechnol. Lett.* **2013**, *35*, 1733-1743.
- 26) K. Haneda, T. Inazu, M. Mizuno, R. Iguchi, K. Yamamoto, H. Kumagai, S. Aimoto, H. Suzuki, T. Noda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1303-1306.
- 27) D. Murakami, Y. Shimada, S. Kamiya, K. Yamazaki, Y. Makimura, K. Ito, N. Minamiura, K. Yamamoto, *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *477*, 299-304.
- 28) Y. Tomabechi, Y. Odate, R. Izumi, K. Haneda, T. Inazu, *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, 2458-2463.
- 29) Y. Tomabechi, T. Inazu, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 6504-6507.
- 30) M. Umekawa, W. Huang, B. Li, K. Fujita, H. Ashida, L. X. Wang, K. Yamamoto, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 4469-4479.
- 31) M. Umekawa, C. Li, T. Higashiyama, W. Huang, H. Ashida, K. Yamamoto, L. X. Wang, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 511-521.
- 32) W. Huang, C. Li, B. Li, M. Umekawa, K. Yamamoto, X. Zhang, L. X. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2214-2223.
- 33) S. Yamamoto, H. Muramatsu, T. Muramatsu, *Glycoconj. J.* **2005**, *22*, 35-42.
- 34) T. Li, X. Tong, Q. Yang, J. P. Giddens, L. X. Wang, *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 16508-16518.
- 35) J. P. Giddens, J. V. Lomino, M. N. Amin, L. X. Wang, *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 9356-9370.
- 36) T. Katoh, T. Katayama, Y. Tomabechi, Y. Nishikawa, J. Kumada, Y. Matsuzaki, K. Yamamoto, *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 23305-23317.
- 37) T. Shinkawa, K. Nakamura, N. Yamane, E. Shoji-Hosaka, Y. Kanda, M. Sakurada, K. Uchida, H. Anazawa, M. Satoh, M. Yamasaki, N. Hanai, K. Shitara, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 3466-3473.
- 38) F. Tang, L. X. Wang, W. Huang, *Nat. Protoc.* **2017**, *12*, 1702-1721.
- 39) E. L. Smith, J. P. Giddens, A. T. Iavarone, K. Godula, L. X. Wang, C. R. Bertozzi, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 788-795.
- 40) W. Huang, C. Li, B. Li, M. Umekawa, K. Yamamoto, X. Zhang, L. X. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2214-2223.
- 41) J. V. Lomino, A. Naegeli, J. Orwenyo, M. N. Amin, M. Aebi, L. X. Wang, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 2262-2270.

- 42) L. X. Wang, J. V. Lomino, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 110-122.
- 43) B. Li, H. Song, S. Hauser, L. X. Wang, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3081-3084.
- 44) A. J. Fairbanks, *C. R. Chimie* **2011**, *14*, 44-58.
- 45) J. J. Goodfellow, K. Baruah, K. Yamamoto, C. Bonomelli, B. Krishna, D. J. Harvey, M. Crispin, C. N. Scanlan, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8030-8033.
- 46) W. Huang, J. Giddens, S. Q. Fan, C. Toonstra, L. X. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12308-12318.
- 47) G. Z. Zou, H. Ochiai, W. Huang, Q. Yang, C. Li, L. X. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18975-18991.
- 48) Y. Kimura, Y. Takeoka, M. Inoue, M. Maeda, K. Fujiyama, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, *75*, 1019-1021.
- 49) T. Kato, K. Kitamura, M. Maeda, Y. Kimura, T. Katayama, H. Ashida, K. Yamamoto, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 22080-22088.
- 50) G. Tzelepis, A. Hosomi, T. J. Hossain, H. Hirayama, M. Dubey, D. F. Jensen, T. Suzuki, M. Karlsson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *449*, 256.
- 51) T. Suzuki, Y. Harada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *453*, 213-219.
- 52) Y. Harada, Y. Masahara-Negishi, T. Suzuki, *Glycobiology* **2015**, *25*, 1196-1205.
- 53) T. Suzuki, *Mol. Aspects. Med.* **2016**, *51*, 89-103.
- 54) Y. Harada, C. Huang, S. Yamaki, N. Dohmae, T. Suzuki, *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 8048-8058.
- 55) A. C. Need, V. Shashi, Y. Hitomi, K. Schoch, K. V. Shianna, M. T. McDonald, M. H. Meisler, D. B. Goldstein, *J. Med. Genet.* **2012**, *49*, 353-361.
- 56) G. M. Enns, V. Shashi, M. Bainbridge, M. J. Gambello, F. R. Zahir, T. Bast, R. Crimian, K. Schoch, J. Platt, R. Cox, J. A. Bernstein, M. Scavina, R. S. Walter, A. Bibb, M. Jones, M. Hegde, B. H. Graham, A. C. Need, A. Oviedo, C. P. Schaaf, S. Boyle, A. J. Butte, R. Chen, M. J. Clark, R. Haraksingh, T. M. Cowan, P. He, S. Langlois, H. Y. Zoghbi, M. Snyder, R. A. Gibbs, H. H. Freeze, D. B. Goldstein, *Genet Med.* **2014**, *16*, 751-758.
- 57) C. Lam, C. Ferreira, D. Krasnewich, C. Toro, L. Latham, W. M. Zein, T. Lehky, C. Brewer, E. H. Baker, A. Thurm, C. A. Farmer, S. D. Rosenzweig, J. J. Lyons, J. M. Schreiber, A. Gropman, S. Lingala, M. G. Ghany, B. Solomon, E. Macnamara, M. Davids, C. A. Stratakis, V. Kimonis, W. A. Gahl, L. Wolfe, *Genet. Med.* **2017**, *19*, 160-168.
- 58) A. O. Caglayan, S. Comu, J. F. Baranoski, Y. Parman, H. Kaymakcalan, G. T. Akgumus, C. Caglar, D. Dolen, E. Z. Erson-Omay, A. S. Harmanci, K. Mishra-Gorur, H. H. Freeze, K. Yasuno, K. Bilguvar, M. Gunel, *Eur. J. Med. Genet.* **2015**, *58*, 39-43.

- 59) Tomlin, F. M.; Gerling-Driessen, U. I. M.; Liu, Y.; Flynn, R. A.; Vangala, J. R.; Lentz, C. S.; Clauder-Muenster, S.; Jakob, P.; Mueller, W. F.; Ordonez-Rueda, D.; Paulsen, M.; Matsui, N.; Foley, D.; Rafalko, A.; Suzuki, T.; Bogyo, M.; Steinmetz, L. M.; Radhakrishnan, S.K. Bertozzi, C. R. *ACS Cent. Sci.* **2017**, *3*, 1143-1155.
- 60) T. Suzuki, C. Huang, H. Fujihira, *Gene* **2016**, *577*, 1-7.
- 61) C. Huang, Y. Harada, A. Hosomi, Y. Masahara-Negishi, J. Seino, H. Fujihira, Y. Funakoshi, T. Suzuki, N. Dohmae, T. Suzuki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, *112*, 1398-1403.
- 62) H. Fujihira, Y. Masahara-Negishi, M. Tamura, C. Huang, Y. Harada, S. Wakana, D. Takakura, N. Kawasaki, N. Taniguchi, G. Kondoh, T. Yamashita, Y. Funakoshi, T. Suzuki, *PLoS Genet.* **2017**, *13*, e1006696.
- 63) Y. Zeng, J. Wang, B. Li, S. Hauser, H. Li, L. X. Wang, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 3355-3364.
- 64) T. W. D. F. Rising, T. D. W. Claridge, J. W. B. Moir, A. J. Fairbanks, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1177-1180.
- 65) T. W. D. F. Rising, C. D. Heidecke, J. W. B. Moir, Z. Ling, A. J. Fairbanks, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6444-6464.
- 66) I. Matsuo, M. Isomura, K. Ajisaka, *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, *18*, 841-850.
- 67) K. Sato, A. Yoshitomo, Y. Takai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1997**, *70*, 885-890.
- 68) T. Ogawa, K. Katano, M. Matsui, *Carbohydr. Res.* **1978**, *64*, C3-C9.
- 69) K. Bock, I. Lundt, C. Pedersen, *Tetrahedr. Lett.* **1973**, *13*, 1037-1040.
- 70) K. Sato, S. Akai, A. Yoshitomo, Y. Takai, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 8199-8201.
- 71) B. Wu, M. Li, G. A. O'Doherty, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5466-5469.
- 72) O. Kanie, S. C. Crawley, M. M. Palcic, O. Hindsgaul, *Carbohydr. Res.* **1993**, *243*, 139-164.
- 73) M. Noguchi, T. Tanaka, H. Gyakushi, A. Kobayashi, S. Shoda, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2210-2212.
- 74) M. Noguchi, T. Fujieda, W. C. Huang, M. Ishihara, A. Kobayashi, S. Shoda, *Helv. Chem. Acta* **2012**, *95*, 1928-1936.
- 75) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- 76) S. Hauser, H. Song, H. Li, L. X. Wang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *328*, 580-585.
- 77) D. M. Bickett, M. D. Green, J. Berman, M. Dezube, A. S. Howe, P. J. Brown, J. T. Roth, G. M. McGeehan, *Anal. Biochem.* **1993**, *212*, 58-64.
- 78) S. Tanskul, K. Oda, H. Oyama, N. Noparatnaraporn, M. Tsunemi, K. Takada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *309*, 547-551.
- 79) S. Saito, H. Nakajima, M. Inaba, T. Moriwake, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 837-838.

- 80) F. Maley, R. B. Trimble, A. L. Tarentino, T. H. Plummer, *Anal. Biochem.* **1989**, *180*, 195-204.
- 81) B. Li, K. Takegawa, T. Suzuki, K. Yamamoto, L. X. Wang, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4670-4675.
- 82) Y. Bi, M. Might, H. Vankayalapati, B. Kuberan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 2962-2966.

## 研究業績

### 関連論文

- 1) Nozomi Ishii, Ken Ogiwara, Kanae Sano, Jyunichi Kumada, Kenji Yamamoto, Yuji Matsuzaki, and Ichiro Matsuo, Specificity of donor structures for endo- $\beta$ -N-acetylgluco saminidase-catalyzed transglycosylation reactions, *ChemBioChem*, **2018**, *19*(2), 136-141.
- 2) Nozomi Ishii, Chie Sunaga, Kanae Sano, Chengcheng Huang, Kenta Iino, Yuji Matsuzaki, Tadashi Suzuki and Ichiro Matsuo, A New Fluorogenic Probe for the Detection of Endo- $\beta$ -N-acetylgluco saminidase, *ChemBioChem*, **2017**, in press. DOI=10.1002/cbic.201700662

### 特許

- 1) 特願 2016-118055、松尾一郎、吉村弥生、石井希実、須永千恵  
発明の名称：ENGase 活性検出プローブ

### 参考論文

- 1) Katsumi Ajisaka, Kaoru Yuki, Kaori Sato, Nozomi Ishii, Ichiro Matsuo, Ryo Kuji, Tatsuo Miyazaki and Kiyoshi Furukawa, Preferential binding of *E. coli* with type 1 fimbria to D-mannobiose with the Man $\alpha$ 1-2Man structure, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2016**, *88*(1), 128-134.
- 2) 松尾一郎、石井希実、宇津井隆志、佐野加苗、均一な糖タンパク質を作る：アスパラギン結合型糖鎖の化学合成、*実験医学*、2017、Vol 35, pp 1434-1439.
- 3) Hung Hiep Huynh, Nozomi Ishii, Ichiro Matsuo, and Manabu Arioka, Characterization of a glucuronoyl esterase from the fungus *Aspergillus fumigatus*: the role of conserved Lys residue in the preference for the 4-O-methyl glucuronoyl esters, *Appl. Microbiol. Biotech.* **2017**, in press.

### 賞罰

1. 第7回東北糖鎖研究会 みちのく糖鎖ポスター賞 (2013.9.27)
2. GlycoTOKYO2013 シンポジウム ポスター賞 (2013.10.19)
3. 第10回東北糖鎖研究会 みちのく糖鎖ポスター賞 (2016.8.7)
4. GlycoTOKYO2016 シンポジウム ポスター賞 (2016.11.19)
5. 第19回日本糖質学会ポスター賞 (2017.7.19)

## 研究助成

平成 28 年度笹川科学研究助成に係る助成金

研究課題：細胞内ヒトエンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性検出系の確立と  
酵素阻害剤の探索

研究番号：28-607



## 謝辞

本研究を遂行し、本論文をまとめるにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました群馬大学 分子科学部門 松尾一郎教授に深く感謝いたします。生化学実験に関してご指導、ご助言をいただいた群馬大学 分子科学部門 吉村弥生助教（現、産業技術総合研究所、博士研究員）に心から感謝申し上げます。日々の研究生生活をご援助していただいた小林京子技官に深く感謝いたします。

本論文をまとめるにあたり、有益なご助言をくださいました群馬大学 分子科学部門 角田欣一教授、中村洋介教授、栗原正靖准教授、吉原利忠准教授に深く感謝いたします。

Endo-M の発見者として、本研究に関して多くのご助言をくださり、Endo-M-N175A 変異体酵素をご供与くださいました県立大学 山本憲二教授に深く感謝いたします。

Endo-M の糖転移反応に関して、オキサゾリン化反応と糖転移反応の基礎についてご指導くださり、Endo-M-WT および Endo-M-N175Q をご提供くださいました東京化成工業 松崎祐二博士、熊田純一博士に深く感謝いたします。

ENGase の加水分解活性を検出する研究の遂行にあたり、有益なご助言をくださるとともに、humanENGase および mouseENGase をご供与くださいました理化学研究所の鈴木匡博士、黄澄澄博士に感謝いたします。

学部生の頃から有意義なご助言をくださるとともに、Endo-Om をご供与くださいました産業技術総合研究所の千葉靖典博士に厚く感謝を申し上げます。

Endo-CC をご供与くださいました伏見製薬所の木下崇司博士、須田稔博士に感謝いたします。

蛍光強度測定に関してご助言くださいました群馬大学 分子化学部門の飛田成史教授、吉原利忠准教授に感謝を申し上げます。

学部生の頃から学会やセミナーにてご指導、ご助言をくださり、高分解能質量分析を測定くださいました成蹊大学 戸谷希一郎准教授に深く感謝いたします。

糖鎖化学研究室で共に研究を行なった多くの同志の皆さまに心から感謝いたします。また、学生生活をともにした友人、関係したすべての方に厚く御礼申し上げます。

本研究は、研究費の一部を笹川科学研究助成による助成金により遂行したものです。ご援助いただきありがとうございます。

最後に、ここまでの学生生活を辛抱強く支えてくださった父、母、妹に心からの感謝の意を表し、謝辞といたします。