

令和4年度 修士学位論文

大腸菌 C 株のリポ多糖外部コア糖鎖を模倣した
部分構造三糖の合成と
バクテリオファージ ϕ X174 の
スパイクタンパク質へのレセプター活性

三重大学大学院 生物資源学研究科
生物圏生命科学専攻 生命機能化学講座
生理活性化学教育研究分野

松澤 朋生

略語表

Ac	アセチル基
AgOTf	トリフルオロメタンスルホン酸銀
All	アリル基
Bn	ベンジル基
Bz	ベンゾイル基
[¹³ C]-de-ON	均一に ¹³ C 標識された <i>O, N</i> -脱アシル化リポ多糖
CD	円偏光二色性
cHisG	C 末端に 6×ヒスチジンタグを融合した G タンパク質
de-ON	<i>O, N</i> -脱アシル化リポ多糖
DTBS	<i>Di-tert</i> -ブチルシリル基
HisH	N 末端に 6×ヒスチジンタグを融合した H タンパク質
HisG	N 末端に 6×ヒスチジンタグを融合した G タンパク質
HOBO	Highest Occupied Bond Orbital
LUBO	Lowest Unoccupied Bond Orbital
LPS	リポ多糖
MBP+F	N 末端にマルトース結合タンパクを融合した F タンパク質
NIS	<i>N</i> -ヨードスクシンイミド
STD-NMR	飽和移動差 NMR
TBABr	<i>n</i> -テトラブチルアンモニウム=ブロミド
TBAF	<i>n</i> -テトラブチルアンモニウム=フルオリド
TBAI	<i>n</i> -テトラブチルアンモニウム=ヨージド
TBS	<i>tert</i> -ブチル-ジメチルシリル基
TBDPS	<i>tert</i> -ブチル-ジフェニルシリル基

目次

略語表	2
第 1 章 緒論	5
第 1 節 バクテリオファージ ϕ X174 の宿主認識と LPS.....	5
第 2 節 NMR 分光法を用いた ϕ X174 と LPS の相互作用解析の試み	8
第 3 節 糖鎖の合成	9
第 1 項 糖鎖の有機合成と酵素による合成.....	9
第 2 項 グリコシル化反応に関与する化学種.....	10
第 3 項 アノマー効果とグリコシド結合.....	11
第 4 項 水酸基の保護 —2 位の保護基と隣接基関与—.....	13
第 5 項 水酸基の保護 —3, 4, 5 および 6 位の保護基—.....	14
第 6 項 4,6- <i>O</i> -DTBS 基を導入した <i>galacto</i> 型糖供与体	15
第 4 節 本研究の目的	17
第 2 章 本論	18
第 1 節 部分構造三糖の合成	18
第 1 項 部分構造三糖 1 の設計と合成戦略.....	18
第 2 項 糖供与体 2 の合成.....	20
第 3 項 糖受容体 3 の合成.....	20
第 4 項 α -選択的ガラクトシル化による三糖 1 の合成.....	22
第 2 節 分光分析を用いた三糖 1 とスパイクタンパク質との相互作用解析 25	
第 1 項 H タンパク質に三糖 1 を添加した際の蛍光スペクトルの変化.....	25
第 2 項 G タンパク質と三糖 1 の蛍光滴定実験.....	27
第 3 項 円偏光二色性測定を用いた H タンパク質との相互作用解析.....	29
第 4 項 円偏光二色性測定を用いた G タンパク質との相互作用解析.....	31
第 3 節 総括	34

第 4 節 今後の展望	34
第 1 項 レセプター三糖 18, 19, 20 の設計と合成計画.....	34
第 2 項 大腸菌 K-12 株 LPS を模倣した三糖の合成.....	35
第 3 章 Materials and Methods	39
3.1 LPS extraction from <i>E. coli</i> C and K-12 strain.....	39
3.2 Deacylation of LPSs	40
3.3 HisH expression and purification	40
3.4 cHisG expression and purification.....	42
3.5 Chemical synthesis of trisaccharide 1	42
3.6 Fluorescence spectra of HisH and cHisG in the presence of trisaccharide 1	61
3.7 Fluorometric Titrations of HisH and cHisG with deON and trisaccharide 1	62
3.8 CD spectra of HisH and cHisG in the presence of several saccharides.....	63
謝辞	64
参考文献	65

第1章 緒論

第1節 バクテリオファージ ϕ X174の宿主認識とLPS

バクテリオファージ ϕ X174は、大腸菌C株をはじめとしたグラム陰性細菌に感染する一本鎖DNAウイルスで、直径約26nmの正二十面体様の構造をもつヌクレオカプシドである。 ϕ X174は、宿主細菌の外膜外葉に存在するリポ多糖(LPS; Lipopolysaccharide)を認識して感染すると考えられており、それに関与しているのが、 ϕ X174の持つF, G, Hタンパク質である。12単位のカプシドFタンパク質5量体によって構成された正二十面体の頂点12ヶ所に、菌体表面に吸着する役割を持つスパイクGタンパク質5量体がある。また、Gタンパク質5量体の中心に、スパイクの役割と、不可逆的吸着後にファージDNAを菌体内部に注入する役割を持つHタンパク質があると推定されている (Figure 1-1, 2, 3)。

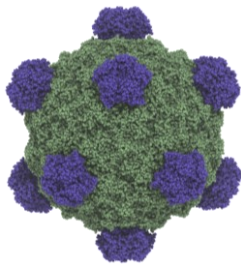


Figure 1-1 ϕ X174

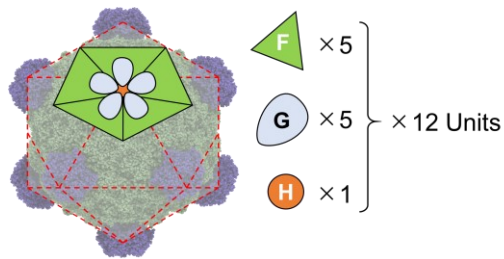


Figure 1-2 ϕ X174を構成するタンパク質

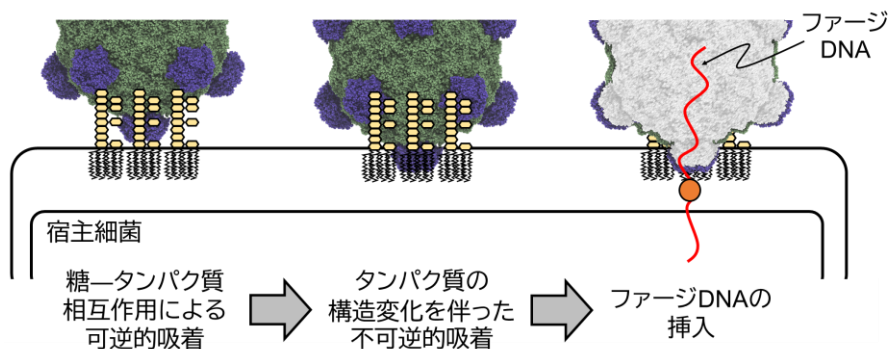


Figure 1-3 ϕ X174感染機構の模式図

電子顕微鏡を用いた研究により、 ϕ X174 がスパイクを使って宿主細菌の表面に吸着することが示され、スパイクタンパク質が LPS を認識すると考えられてきた¹。それ以来、ヒスチジンタグを融合したスパイク G 及び H タンパク質 (HisG, cHisG, HisH)^{2,3)} や、マルトース結合タグを融合したカプシド F タンパク質 (MBP+F)⁴⁾ が調製され、LPS とこれらの相互作用が生化学・物理化学的に研究されてきた。HisH や HisG は ϕ X174 感受性株から抽出された LPS にのみ結合し、非感受性株由来の LPS には結合しないことが明らかになった。そして、HisH は LPS 非還元末端付近を認識し、HisG は LPS 全体を認識していることが判った^{2,3)}。また、MBP+F では、先行研究⁵⁾により報告されていたグルコース結合サイトと予想される部位の酸性および塩基性アミノ酸が、 ϕ X174 の感染スペクトルに寄与していることが判った⁶⁾。

ϕ X174 の主要な宿主である大腸菌 C 株の LPS は、D-glucosamine に脂肪酸が結合した LipidA と、R-core と呼ばれる複雑なグリコシド結合で繋がったオリゴ糖から構成されている (Figure 1-4)⁷⁾。中でも宿主認識機構に重要な役割を果たすと言われているのが、R-core 非還元末端側の外部コア糖鎖である。大腸菌 C 株の外部コア糖鎖は、3 つの D-glucose 残基が $\beta(1\rightarrow3)$ 結合と $\alpha(1\rightarrow3)$ 結合で繋がっており、さらにその中間残基に 1,2- α -D-galactobiose が $\alpha(1\rightarrow2)$ 結合で繋がる形で構成されている (Figure 1-5)。我々は LPS の糖鎖部分に重要な相互作用があると考えており、LPS の脂質部分を強塩基で除去した O, N-脱アシル化 LPS (de-ON) をはじめとした化学的処理を施した糖鎖を用いた相互作用解析を行ってきた⁸⁻¹⁰⁾。

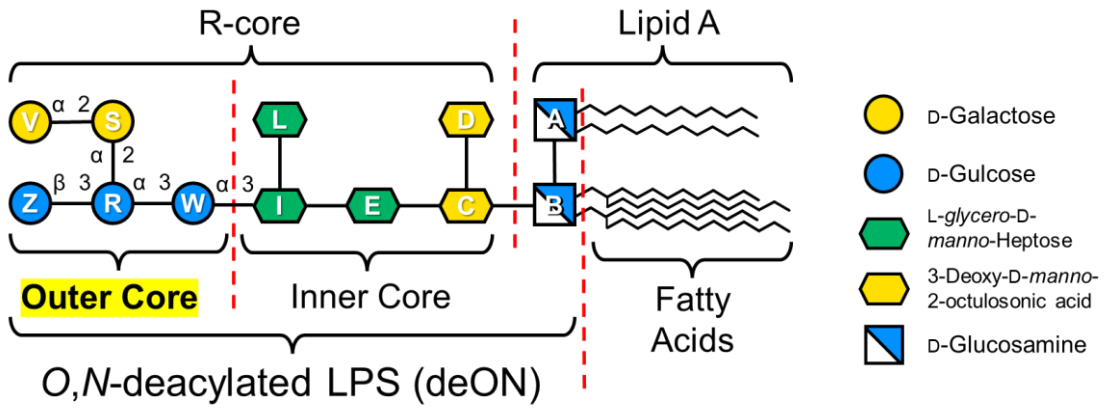


Figure 1-4 大腸菌 C 株由来 LPS の模式図。糖残基に付けられたアルファベットの呼称は Vinogradov らによって呼称されたものである⁷⁾。

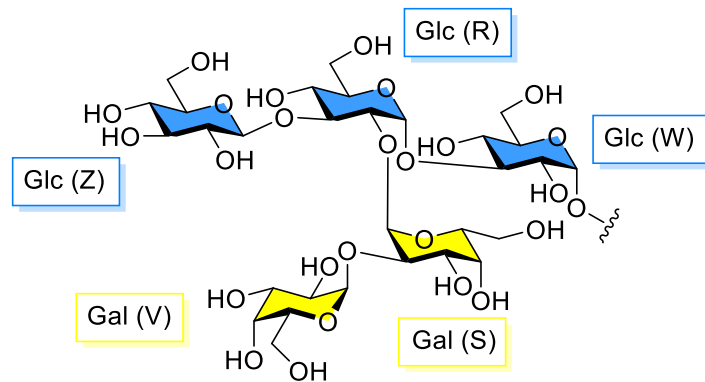


Figure 1-5 大腸菌 C 株由来 LPS の外部コア糖鎖領域

第2節 NMR 分光法を用いた ϕ X174 と LPS の相互作用解析の試み

我々は、 ϕ X174 のスパイクタンパク質と LPS の相互作用を有機化学的に解析するために、NMR 分光法を用いた相互作用解析を試みた^{11,12)}。スパイク H および G タンパク質の希薄溶液に de-ON を添加して飽和移動差 NMR (STD-NMR) を測定したが、相互作用と思われる信号が認められず、さらに、ピラノース環の信号の重なりが複雑で詳細な帰属は困難を極めた。そこで、Vinogradov らによって均一に ^{13}C 標識された LPS の糖鎖部分の NMR の帰属が達成されていることを用いて、リガンドベースの化学シフト摂動法による相互作用解析が試みられた。

炭素源として、 $[^{13}\text{C}]\text{-D-glucose}$ を制限培地に添加して培養することで得られた菌体から LPS を抽出し、アルカリ加水分解によって均一に ^{13}C 標識された de-ON ($[^{13}\text{C}]\text{-de-ON}$) が調製された。 $[^{13}\text{C}]\text{-de-ON}$ とスパイク H および G タンパク質の等モル混合液の HSQC スペクトルを測定した。得られたスペクトルについて、アノメリック領域の信号の重なりは二次元スペクトルになることによって改善されたが、非アノメリック領域については依然として信号の重なりが激しく、完全な帰属には至らなかった。また、Vinogradov らは HSQC-TOCSY によって複雑に重なり合う各糖残基の帰属を行っていたが⁷⁾、我々の H および G タンパク質を添加した状態では、数日～1 週間を越える長時間の連続測定を行っている際にタンパク質の凝集が認められ、実験系の限界も垣間見えた。

我々のこれまでの知見として、LPS の部分構造を模した三糖は ϕ X174 に特異的に吸着することが判っており¹³⁾、NMR 分光法での構造解析においても三糖の解析は de-ON と比較して簡便に行える利点がある。また、Faige らは LPS の外部

コア糖鎖の galactose 残基を欠損させた大腸菌の感染性が低下することを報告している。そこで、galactose 残基を含んだ部分構造三糖を調製することが、NMR 分光法での相互作用解析達成の糸口になると考えられた。

第3節 糖鎖の合成

第1項 糖鎖の有機合成と酵素による合成

糖鎖を有機化学的に合成する方法として、糖転移酵素による方法や有機合成による方法が挙げられる。糖転移酵素によって合成する方法では、糖の持つ水酸基の保護が必要なく温和な条件で特異的にグリコシル化が進むため、望まない位置でのグリコシドの形成や不斉制御への懸念が少なく済む。しかし、遺伝子工学的に酵素を調製する段階が律速になったり、本来の基質となり得ない立体障害の大きな糖鎖の合成への応用に限界があったりする。一方、有機合成による方法では、糖に複数存在する水酸基を選択的に保護したビルディングブロックの合成が律速になるが、得られるグリコシド結合の位置はビルディングブロックの構造に依存する。そのため、任意のグリコシド結合を持った糖鎖を確実に合成することができると考えられる。また、有機合成における糖鎖の一般的な合成方法として単糖誘導体を用いるため、目的とする糖鎖が複雑な構造であっても、導入した様々な官能基によって反応性や三次元構造を巧みに制御することで合成を達成できる可能性がある¹⁴⁾。

大腸菌 C 株の外部コア糖鎖に現れるグリコシド結合は極めて複雑なものであり、基質ごとに糖転移酵素を用意することが困難であると考えられた。そこで、本報では、構造の複雑な糖鎖の大量供給や同位体標識実験を見据え、有機合成で糖鎖を得ることにした。

第2項 グリコシル化反応に関する化学種

一般に、有機合成におけるグリコシル化反応は以下のように進行する (Figure 1-7)。アノメリック炭素に脱離基を導入した糖供与体 (グリコシルドナー) に、対応するプロモーターと呼ばれるルイス酸や重金属などを作用させて脱離基を脱離させやすくすることで、半椅子型のオキシカルベニウムカチオンを生じさせる。そこに、特定の箇所のみヒドロキシ基を持つ糖受容体 (グリコシルアクセプター) を反応させることで、グリコシド結合を構築することができる¹⁵⁾。

高収率で望みのグリコシド結合を得るため、様々な工夫を凝らした糖供与体やプロモーターの開発が行われてきた (Table 1-1)¹⁶⁾。どの方法もグリコシドを形成するという目的は同じであるが、糖供与体の化学的な安定性や立体障害を加味した糖受容体の求核性に対する相性に応じて糖供与体やプロモーターが使い分けられている。また、糖受容体についても、水酸基の位置選択的な保護が鍵となっており、単糖の化学的特性を巧みに利用して5つある水酸基をエステル、(シリル) エーテル、アセタール等々へ誘導体化する。さらに、複雑な糖鎖を合成するためには、特殊な例を除き、分岐差の分だけ位置選択的に除去することのできる保護基を用意する必要がある。

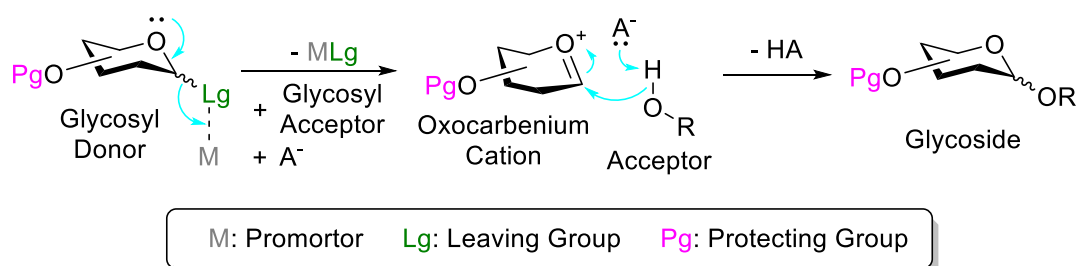
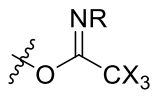
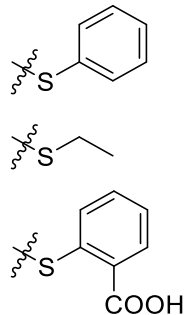
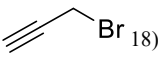



Figure 1-7 グリコシル化反応の概略

Table 1-1 糖供与体に導入する脱離基とプロモーターの組み合わせ¹⁶⁾

脱離基 (Lg)	プロモーターの一例	反応の名称
F	Cp ₂ HfCl ₂ , Cp ₂ ZrCl ₂ (メタロセン触媒)	向山・鈴木 グリコシル化
Cl, Br グリコシルハライド	AgOTf, Hg(CN) ₂ , Ag ₂ O/TMSOTf,	Koenigs-Knorr グリコシル化
 R = H, Ph, etc... X = F, Cl アセトイミデート	NIS, TMSOTf, TMSCl (ルイス酸)	Schmidt グリコシル化
 チオグリコシド ¹⁷⁾	CuBr ₂ /TBABr PdBr ₂ /  ₁₈₎	Fraser-Raid 条件
 スルホキシド	Tf ₂ O/DTBMP	Khane グリコシル化

第3項 アノマー効果とグリコシド結合

オリゴ糖の構造に大きな影響を及ぼすのがグリコシド結合の不斉中心であり、有機合成において生成物が α 、 β のどちらの不斉中心を持つようになるかは、反応に用いた溶媒や、糖供与体の2位のヒドロキシ基に導入した保護基等によって制御することができると考えられている。

アノメリック位 (1 位) のヒドロキシ基について、通常、シクロヘキサン様の六員環であれば、1,3-diaxial 相互作用により equatorial にある方がより安定である。しかし、アノマー効果と呼ばれる現象により、axial にある方がより安定である場合がある。アノマー効果については様々な理論が提唱されており、ピラノース環を構成している酸素原子の双極子モーメントを、アノメリック位の酸素原子が打ち消すことで axial のほうがより安定になると考えられている¹⁵⁾。そのほかにも、環を構成している酸素原子の n_0 軌道と、アノメリック位の σ_{CO}^* 軌道が同位相になり、アンチペリプラナー電子非局在化を起こすことが原因であるとも考えられている (Figure 1-8)¹⁹⁾。経験則的ではあるが、無極性溶媒でグリコシル化を行うと、アノマー効果の影響を大きく受けて α -アノマーが優先的に生成する。反対に、極性溶媒で反応を行うと、 β -アノマーが優先的に生成する。

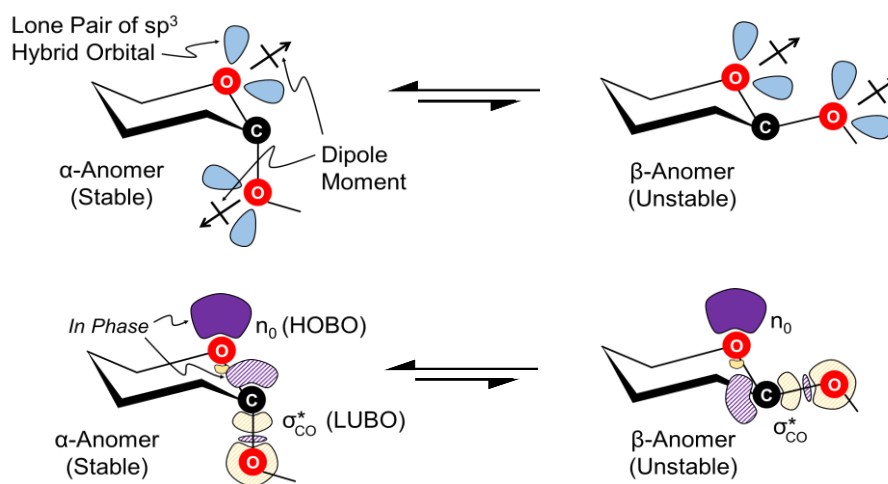


Figure 1-8 アノマー効果

(上) 双極子モーメントに基づいた理論

(下) フロンティア軌道論に基づいた理論

ヘキソアルドース同士のグリコシド結合の種類は、1位および2位の官能基を基準にして①1,2-*cis*- α 、②1,2-*trans*- β 、③1,2-*trans*- α 、④1,2-*cis*- β の4種類存在する (Figure 1-9)。アノマー効果や後述する隣接基関与の寄与を受けた1,2-*trans*型のグリコシド結合(②、③)の合成難易度が比較的低いことが知られており、mannose 残基がひたすら α (1 \rightarrow 2)グリコシド結合で繋がった糖鎖や、glucose 残基が β (1 \rightarrow 4)グリコシド結合で繋がった糖鎖の合成報告は多い。一方で、1,2-*cis*型のグリコシド結合(①、④)の連続する糖鎖は隣接する2位の立体障害が大きい他、次項で述べる隣接基関与を受けることができないため合成が難しくなる。

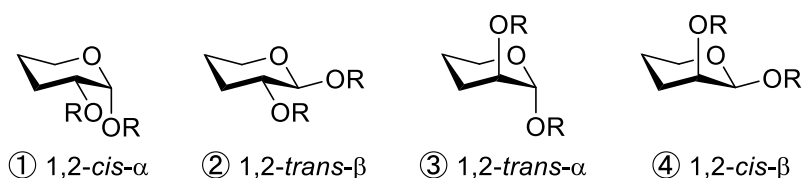


Figure 1-9 グリコシド結合の種類

第4項 水酸基の保護 —2位の保護基と隣接基関与—

グリコシル化反応の中間体であるオキソカルベニウムカチオンに対して分子内で反応が起こり、糖受容体の求核攻撃を受けにくい側を作ることができれば、グリコシド結合の不斉を制御できると考えられる。このような例として、反応中心に近い2位に“仕掛け”を作り、1,2-*trans*型のグリコシドが得られることが知られている。例えば、2位の保護基としてアシル系の保護基を用いることでアシルオキソニウムイオンを経由する方法 (Figure 1-10a) や、エーテル系のベンジル基でも超脱水アセトニトリルを反応溶媒に用いることでオキサゾリウムカチオンを経由する方法 (Figure 1-10b) が報告されている²⁰⁾。逆に、1,2-*cis*型のグリコシドを構築したい場合は、2位の保護基としてアシル基を避ける必要がある。

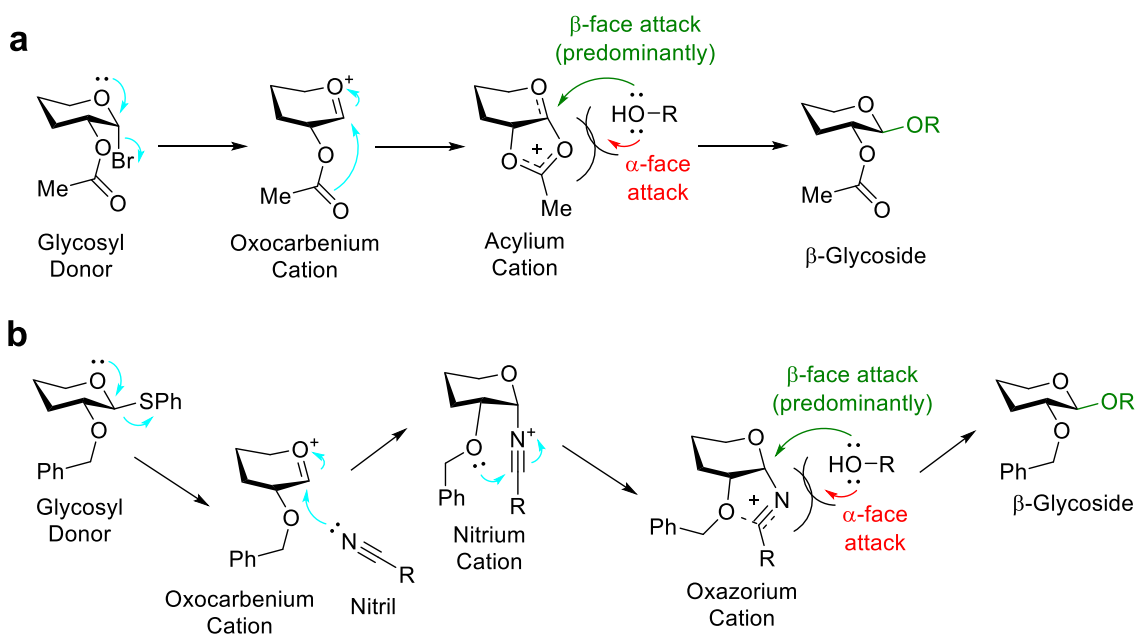


Figure 1-10 隣接基関与による 1,2-*trans* 型グリコシドの反応機構²⁰

a. アシル基が関与する場合 b. ニトリル系溶媒が関与する場合

第 5 項 水酸基の保護 —3, 4, 5 および 6 位の保護基—

2 位の水酸基の保護基は隣接基関与によってアノマーの制御に寄与するが、それ以外の水酸基の保護基も、グリコシル化反応に影響を及ぼす (Figure 1-11)。例えば、3, 4, 6 位の保護基がアセチル基の糖供与体 **A** とベンジル基の糖供与体 **B** を考える。アセチル基の方の電子吸引性がより大きいため、**A** から生じるオキソカルベニウムカチオン **A'** の安定性は **B'** より小さくなる。また、4, 6 位の水酸基をベンジリデンアセタールで保護した糖供与体 **C** と **B** を比較してみると、電子吸引性は同等であるが、**C** から生じるカチオン **C'** はコンフォメーションの制約を受けることで、オキソカルベニウムカチオンに特徴的な半イス型の構造をとるには高いエネルギーを要するため、**B'** より反応性に乏しくなる。このようにして、反応性がより大きくなるような誘導体化を **armed**、より小さくなるような誘導体化を **disarmed** とする²¹。

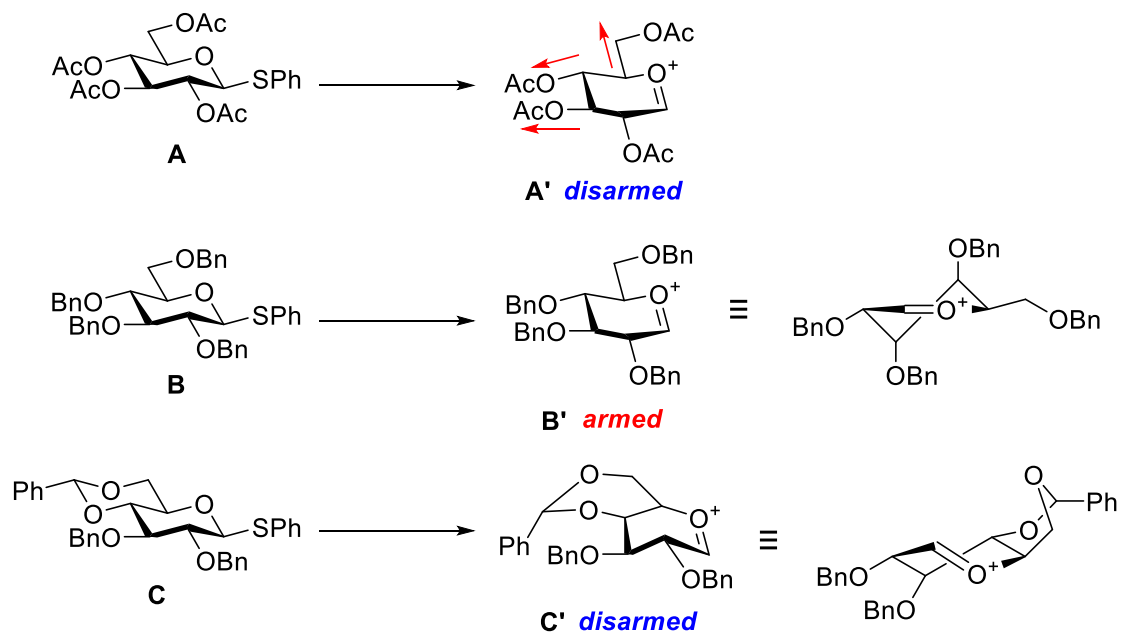


Figure 1-11 糖供与体の保護と armed, disarmed

第6項 4,6-O-DTBS 基を導入した *galacto* 型糖供与体

今村らによってアノマーの不斉制御の新たなアプローチが報告された^{22,23)}。彼らは第4項で述べた2位の“仕掛け”とは異なり、4,6位に導入した官能基の空間的な電子供与を利用して α -アノマーのみを与える *galacto* 型糖供与体の開発を目指し、4,6位に様々な保護基を導入してグリコシル化反応を試行した。すると、*di-tert-butylsilyl* (DTBS) 基が α -アノマーのみを与える *galacto* 型の糖供与体の不斉補助基になることが判った。DTBS 基は、過去に *cyclic-di-tert-butylsilyl* と呼ばれ *super-armed* な環状シリルエーテルとして単に4,6位を位置選択的保護する目的だけで使用されていたが²⁴⁾、不斉補助基としての新たな鉱脈を見出した。

ここで、4, 6位の保護が異なる2種類の糖供与体 **D**, **E** を考える。O-Si 結合と O-C 結合長を比較すると O-Si 結合の方が僅かに長いため、**D** は **E** よりも、より歪んだ構造を取っている。そして、オキソカルベニウムカチオン **D'** および **E'** になると、歪んだ構造が解消されるので、**D'** の方がより安定に存在することができ、環状でありながら armed な保護基となり得る (Figure 1-12) ²³⁾。

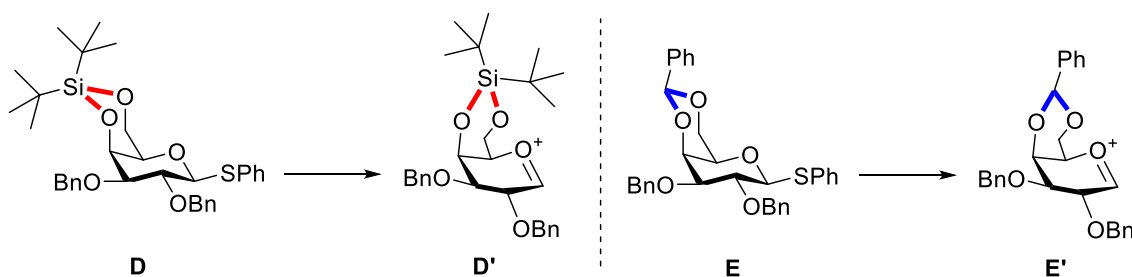


Figure 1-12 DTBS 基を導入した *galacto* 型糖供与体

DTBS 保護の更なる利点は、第 4 項で述べた 2 位の隣接基関与を振り切って α -アノマーを与えることである (Figure 1-13)。DTBS を導入した *galacto* 型糖供与体は、2 位にアシル基があったとしても、O4 および O6 からの空間的な電子供与によってアシルオキソニウムカチオンの生成を抑え、オキソカルベニウムカチオンの状態を維持する。このとき、DTBS はピラノース環の O5 側に倒れ込むような立体構造を取っていると考えられ、糖受容体の β 面からの求核攻撃を阻害するうえ、アノマー効果の恩恵も受けつつ生成物は α -アノマーを与える。2 位の保護基に制約がなくなったことで、より簡便な合成ステップの開発や、保護基の選択肢の幅が広がった ²²⁾。

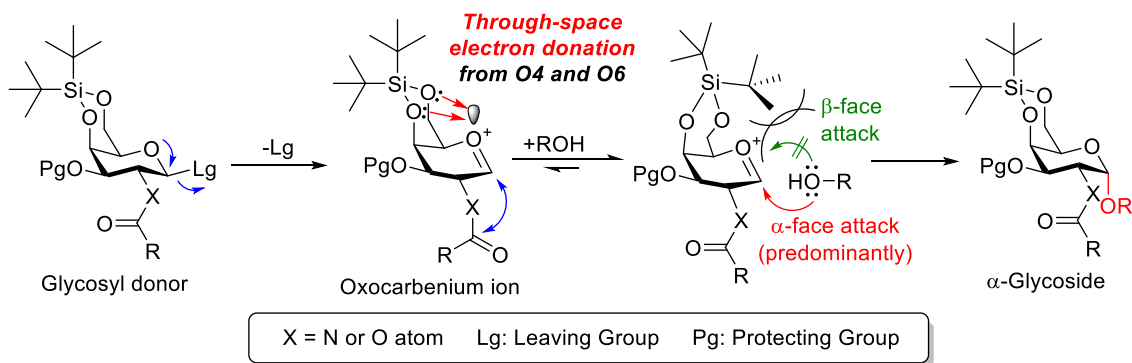


Figure 1-13 4,6-O-DTBS 基によるアノマー位の不斉制御²²⁾

第4節 本研究の目的

我々は、バクテリオファージ ϕ X174 のタンパク質と LPS およびその糖鎖との相互作用を NMR 分光法によって有機化学的に解析することを目指している。しかし、LPS そのものを用いた NMR 分光法での相互作用解析では、糖鎖の複雑すぎる信号により解析が困難であった。そこで、本研究では、相互作用に重要であると考えられている LPS の外部コア糖鎖に着目し、それを模倣した部分構造三糖を有機合成によって得ることを目的とした。

第2章 本論

第1節 部分構造三糖の合成

第1項 部分構造三糖 **1** の設計と合成戦略

大腸菌 C 株の LPS の外部コア糖鎖を 5 残基のオリゴ糖として考える。これを隣接する三糖の単位で分解すると、 $\text{Glc}\alpha(1\rightarrow2)\text{Gal}\alpha(1\rightarrow2)\text{Glc}\alpha$ の構造を持つ部分構造三糖 **1** が部分構造の一つとして考えられた (Figure 2-1)。本研究グループ以外での先行研究においても、 $\text{Glc}\alpha(1\rightarrow2)\text{Gal}\alpha(1\rightarrow2)\text{Glc}\alpha$ の構造は ϕX174 の宿主認識に寄与していると考えられている²⁵⁾ ため、これを模倣した部分構造三糖 **1** の示すレセプター活性に興味を持たれる。

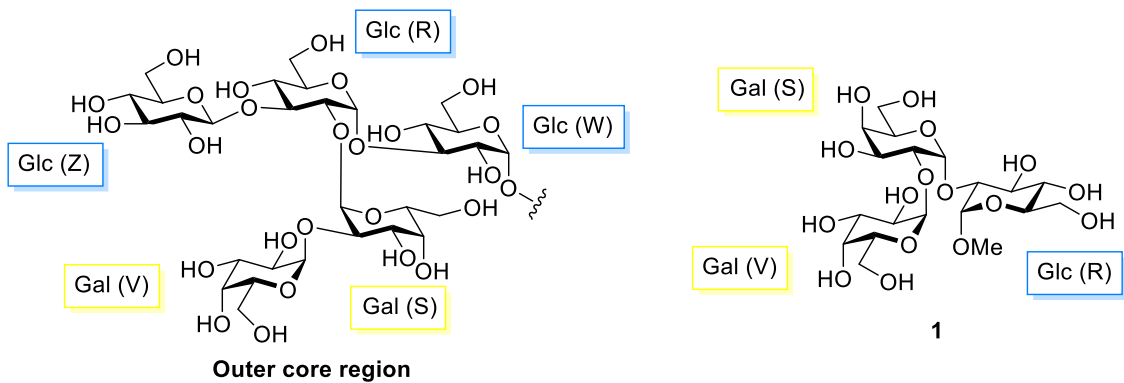
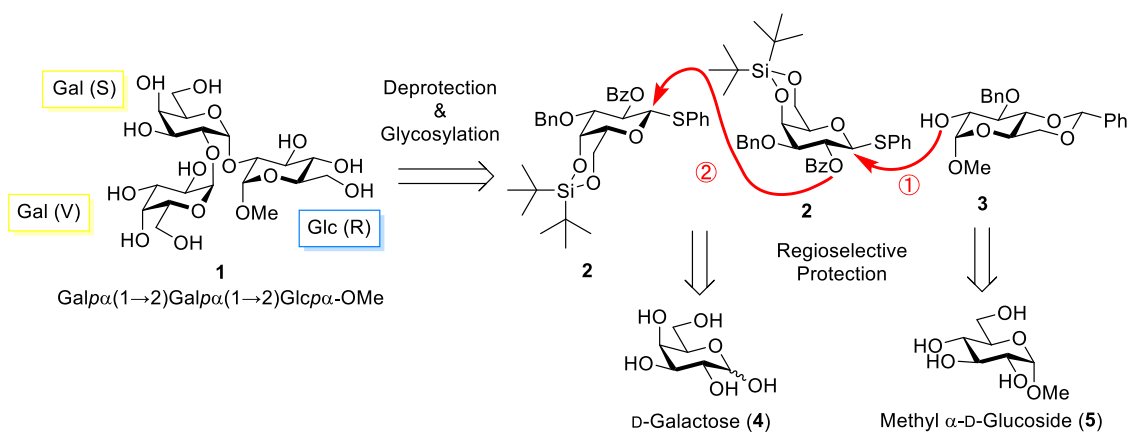


Figure 2-1 大腸菌 C 株の LPS の外部コア糖鎖の構造と部分構造三糖 **1**

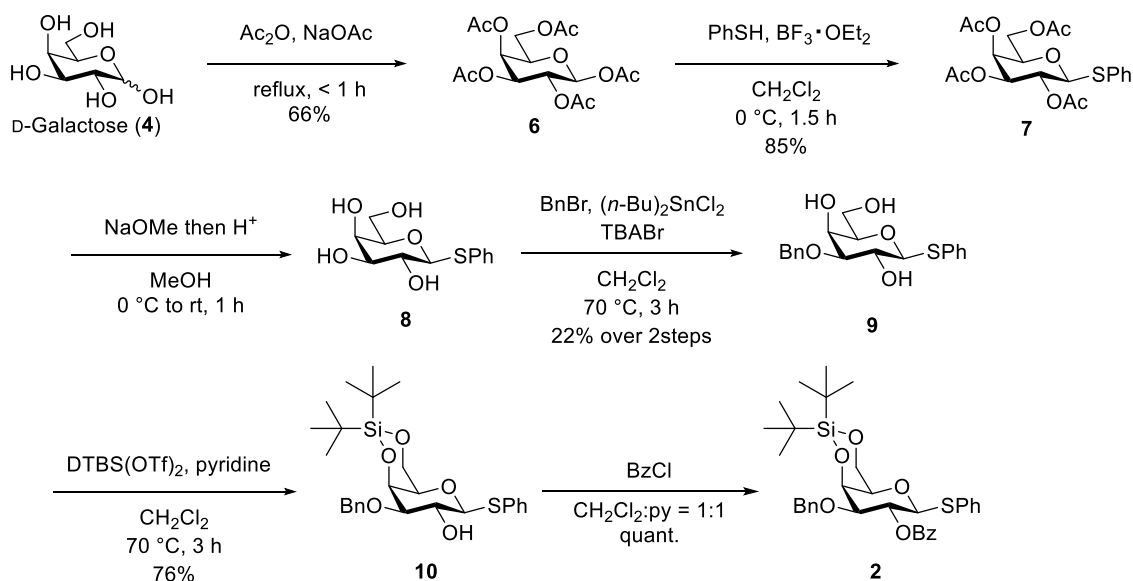
部分構造三糖 **1** は、2 位を選択的に除去することができる *galacto* 型糖供与体 **2** と、2 位が遊離の水酸基を持つ *gluco* 型糖受容体 **3** とのグリコシル化を繰り返すことで合成できると考えられた。そして、糖供与体 **2** は D-galactose (**4**) から、糖受容体 **3** は methyl α -D-glucoside (**5**) から、水酸基への位置選択的な保護基の導入によって合成できると考えられた (Scheme 2-1)。三糖 **1** は 2 つの $\alpha(1\rightarrow2)$ 結合を持つことから、かなり込み入った立体構造を取ることが予想される。そのため、糖供与体には、 α 選択的に効率よく反応を進めることのできる DTBS 基を導入することとした。



Scheme 2-1 部分構造三糖 **1** の逆合成解析

第2項 糖供与体 2 の合成

(±)-D-galactose (4) を出発物質として無水酢酸を作用させることでアセチル化糖 6 とした後に三フッ化ホウ素エーテル錯塩 (BF₃・OEt₂) 存在下でフェニルメルカプタン (PhSH) を作用させることでチオグリコシド 7 が得られた。7 のアセチル基を強塩基性条件で除去した後に、ジブチルスズクロリド ((*n*-Bu)₂SnCl₂) と臭化ベンジル (BnBr) を用いた 3 位選択的アルキル化によってモノベンジル化糖 9 が得られた。これにピリジン存在下で DTBS 化剤である DTBS(OTf)₂ を作用させることで、9 の持つ 3 つの遊離な水酸基のうち、4, 6 位のみに対して DTBS 基を導入した。得られた 10 の最後の遊離な水酸基にピリジン存在下で塩化ベンゾイル (BzCl) を作用させることで糖受容体 2 が得られた (Scheme 2-2)。

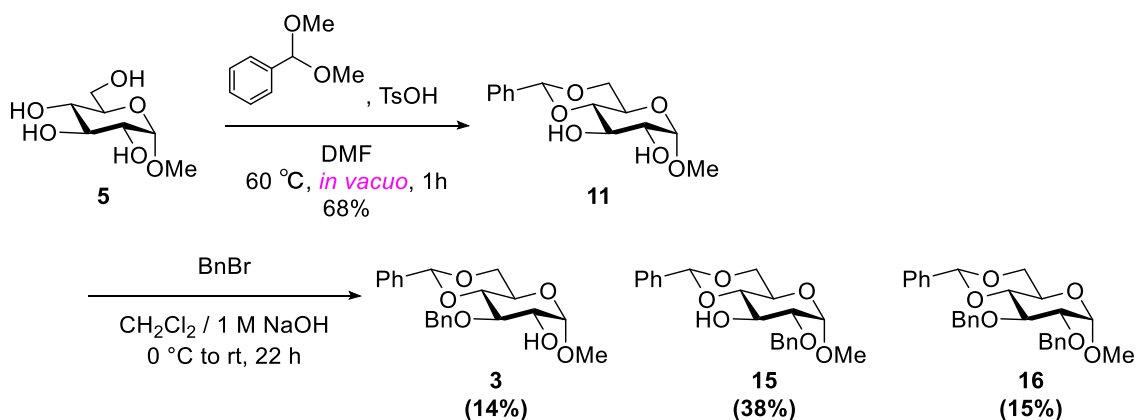


Scheme 2-2 糖供与体 2 の合成

第3項 糖受容体 3 の合成

Methyl α -D-glucoside (5) を出発物質として、まず、遊離の水酸基の 4, 6 位をベンズアルデヒドジメチルアセタールによってベンジリデンアセタール 11 とし

た。次いで、比較的弱い塩基性条件で BnBr を作用させることで、3位のベンジル化された糖受容体 **3** と2位のみベンジル化された糖受容体 **15**、そして、2,3位共にベンジル化された誘導体 **16** が得られた (Scheme 2-3)。



Scheme 2-3 糖受容体 **3** の合成

ベンジル化反応について、TLC で分析してみると、3種類の生成物は R_f 値が大きく異なることが判った (Figure 2-2)。分液操作を行った後に、フラッシュカラムクロマトグラフィーを2回行うことで、容易に3つの生成物を単離・精製できた。

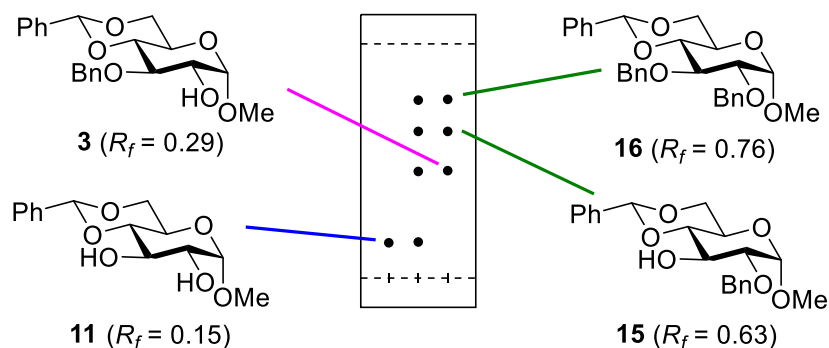
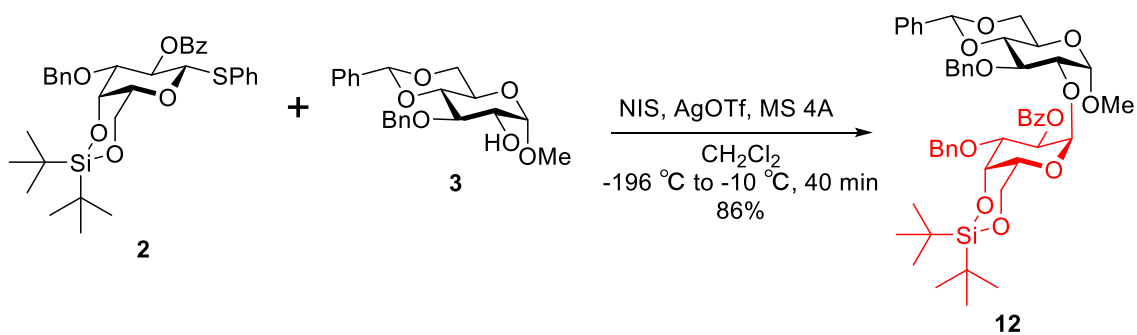


Figure 2-2 反応を行った際の TLC の模式図 (*n*-hexane/EtOAc = 1:1)

第4項 α -選択的ガラクトシル化による三糖 **1** の合成

前項までで得られた糖供与体 **2** と糖受容体 **3** を, *N*-ヨードスクシンイミド (NIS) 存在下, トリフルオロメタンスルホン酸銀 (AgOTf) を触媒として反応させた。すると, 迅速に反応が進み, α -アノマーの二糖誘導体 **12** が得られた (Scheme 2-4)。NMR で二糖誘導体 **12** のアノメリック位に着目したビシナルカップリング定数を計算した結果 $^3J_{H1'-H2'} = 3.4 \text{ Hz}$ であったことから, galactose 残基のアノメリック位の不斉は α であると決定した (Figure 2-3) ²⁶⁾。



Scheme 2-4 グリコシル化反応による二糖誘導体 **12** の合成

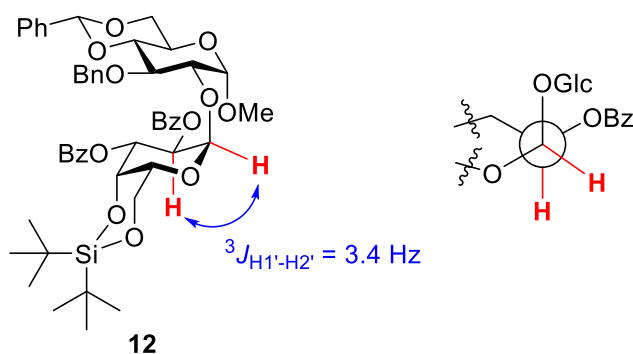
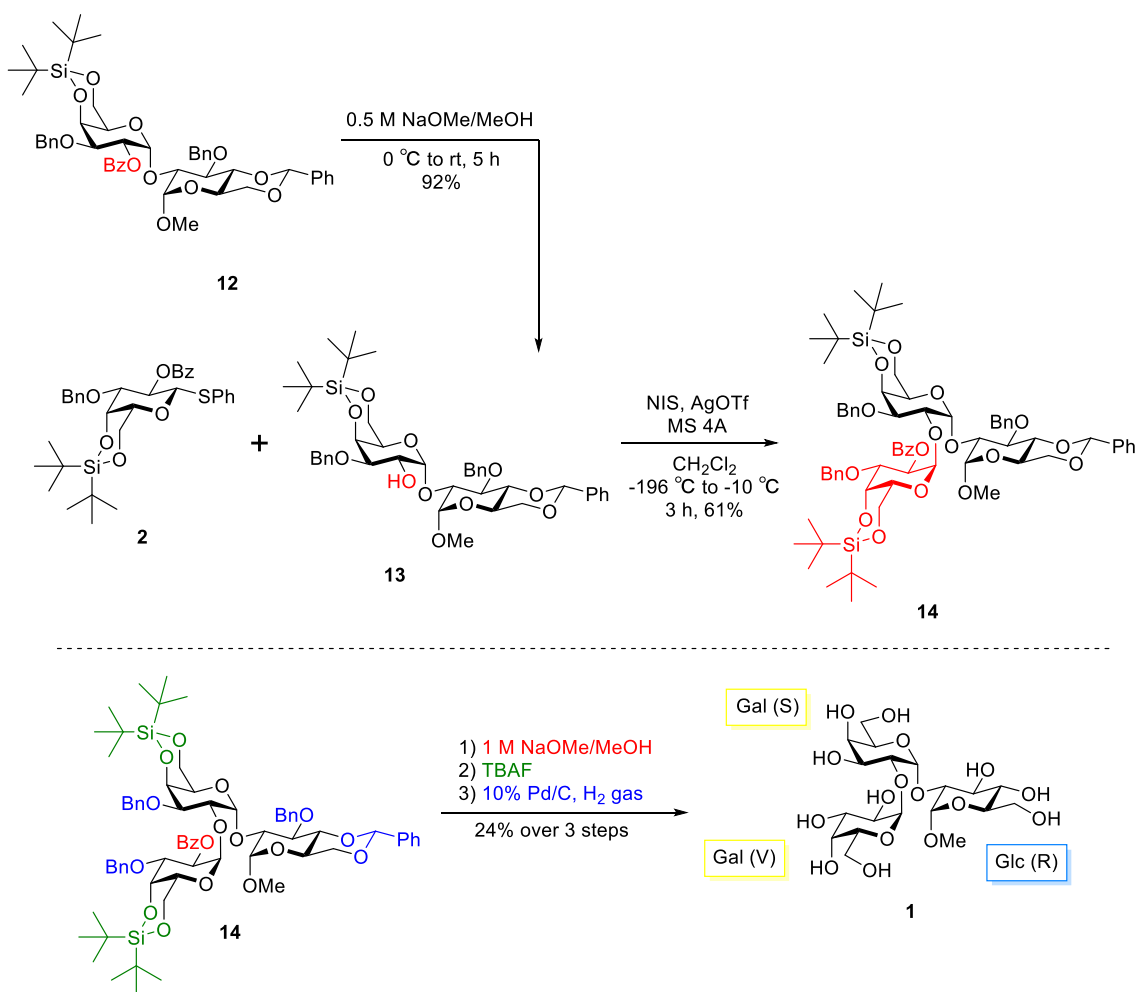


Figure 2-3 二糖誘導体 **12** の構造式と C1'-C2'間の Newman 投影式

二糖誘導体 **12** の O2'位のベンゾイル基を NaOMe によって除去することで糖受容体 **13** へと導き, 再び糖供与体 **2** とのグリコシル化反応に伏した。さいごに, 得られた三糖誘導体 **14** の保護基を順次除去して目的の三糖 **1** が得られた (Scheme 2-6)。



Scheme 2-6 三糖 **1** の合成

NMR で三糖 **1** のアノメリック位に着目したビシナルカップリング定数を計算した結果、**1** においても ${}^3J_{H1''-H2''} = 4.0 \text{ Hz}$ であった。Karplus 式から新たに生じた galactose 残基のアノメリック位の不斉も α であると決定した (Figure 2-4) ²⁶⁾。

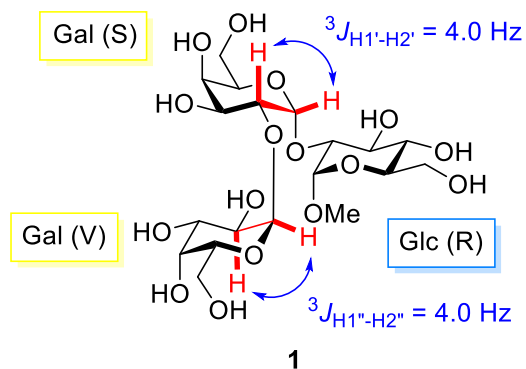


Figure 2-4 **1** の構造式とビシナルカップリング定数

第2節 分光分析を用いた三糖 **1** とスパイクタンパク質との相互作用解析

得られた部分構造三糖 **1** が ϕ X174 のレセプター糖鎖となり得るかを検証するために、本研究グループで相互作用解析に用いたことのある蛍光分光光度計を用いるタンパク質の蛍光スペクトル測定および蛍光滴定実験と、円偏光二色性 (CD) 測定を用いた実験を行った²⁷⁾。

第1項 Hタンパク質に三糖 **1** を添加した際の蛍光スペクトルの変化

タンパク質中のトリプトファン残基は 280 nm の励起光を与えると、基底状態に戻る過程で蛍光を発する。また、リガンドがトリプトファン残基付近に接近すると、励起した際のエネルギーがリガンドに移るため、消光することが知られている。これを利用して、励起波長 280 nm における蛍光強度の化合物の濃度依存性を測定し、その強度変化を観察することで、トリプトファン残基周辺の変化から化合物がタンパク質と結合するかどうかを評価することができる。

0.4 μ M HisH 溶液に終濃度がおよそ 0-6.4 μ M となるように三糖 **1** の溶液を添加し、蛍光分光光度計で蛍光スペクトルを測定した (Figure 2-5)。三糖 **1** が低濃度 (0-0.4 μ M) のときは **1** の濃度依存的に蛍光強度が減少していたが (Figure 2-5b), **1** の濃度がさらに増加すると、ピークトップの短波長側へのシフトが僅かに認められた (Figure 2-5b, c)。

先行研究において、HisH へ LPS を添加した際は、LPS の脂質部分の接近に伴う蛍光強度の増加やピークトップの短波長側へのシフトが報告されているが、糖鎖部分である de-ON を添加した際は、単に蛍光強度の減少のみが認められていた²⁸⁾。この実験において、蛍光強度が減少していることから、三糖 **1** は HisH

に結合していることが判った。そして、高濃度域における現象は HisH の立体構造の変化に伴うものと推察された。また、蛍光強度変化の誤差が大きく、精密な蛍光強度の測定が困難であったため、蛍光滴定実験を行うに至らなかった。

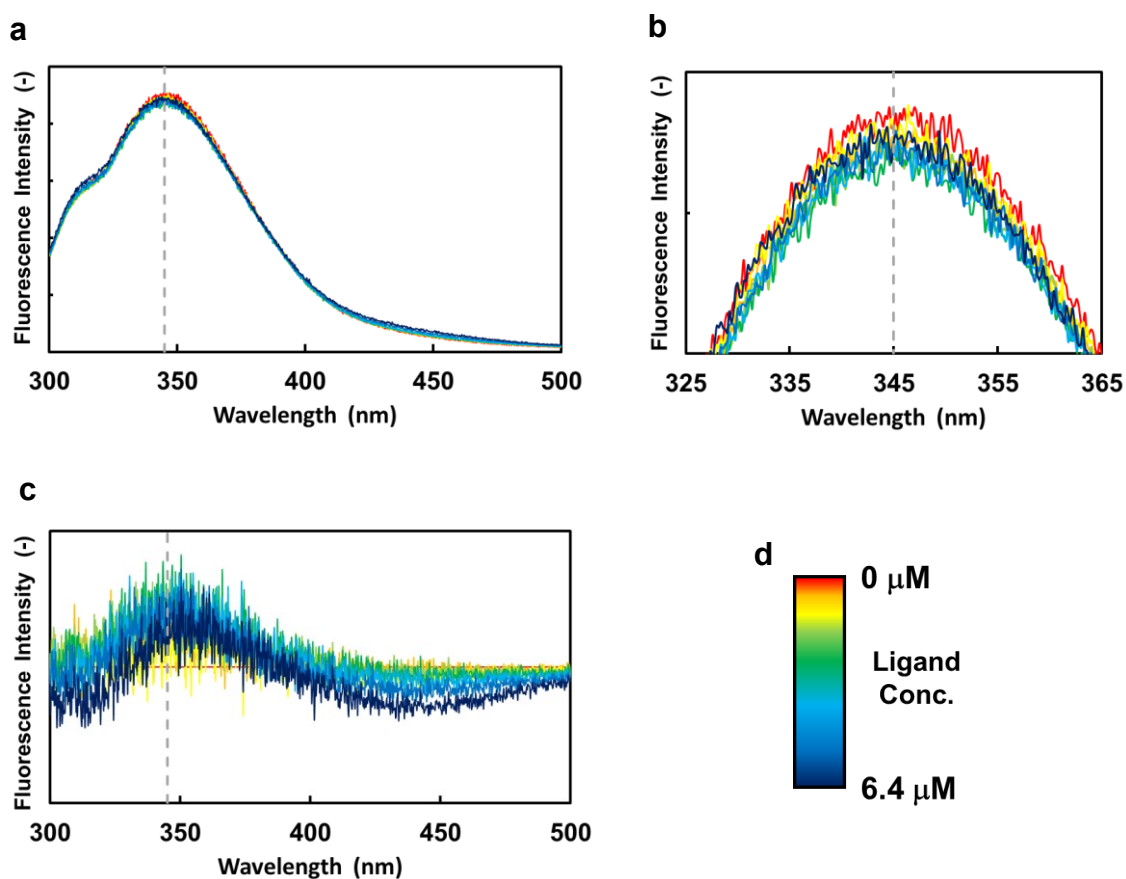


Figure 2-5 三糖 **1** を添加したときの HisH の蛍光スペクトル。

$\lambda_{\text{ex}} = 280 \pm 1.5 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 300\text{-}500 \pm 15 \text{ nm}$ 。 a. 測定範囲全域 ($\lambda_{\text{em}} = 300\text{-}500 \text{ nm}$) の蛍光スペクトル。 b. ピークトップ周辺 ($\lambda_{\text{em}} = 325\text{-}365 \text{ nm}$) の拡大図。 c. 三糖 **1** 非存在下のスペクトルを基に算出した各濃度条件での差スペクトル。 d. リガンド濃度の凡例。

第2項 Gタンパク質と三糖1の蛍光滴定実験

0.4 μM cHisG 溶液に終濃度がおよそ 0-6.4 μM となるように三糖1の溶液を添加し、蛍光分光光度計で蛍光スペクトルを測定した (Figure 2-6)。すると、三糖1の濃度依存的に蛍光強度の単調減少が認められた (Figure 2-6b, c)。このことから、三糖1は cHisG に結合していることが判った。

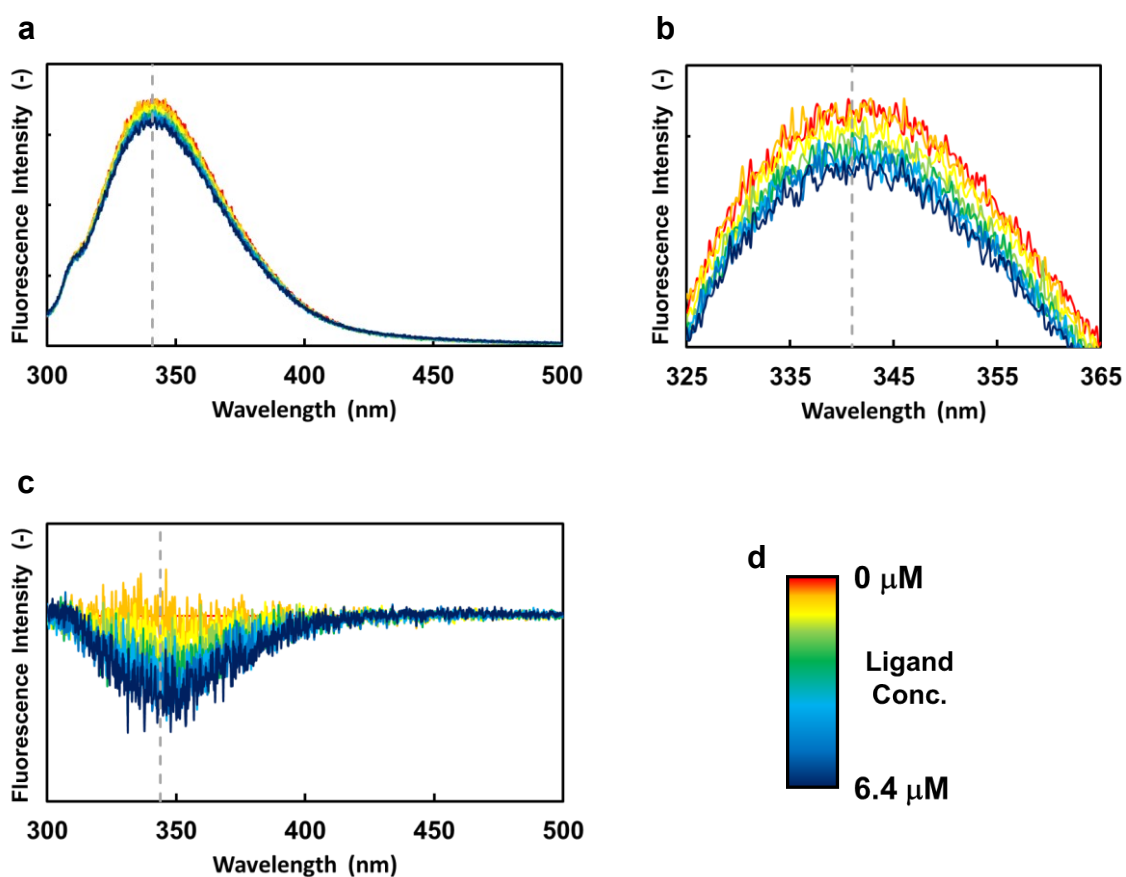


Figure 2-6 三糖1を添加したときの cHisG の蛍光スペクトル。

$\lambda_{\text{ex}} = 280 \pm 1.5 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 300\text{-}500 \pm 15 \text{ nm}$ 。 a. 測定範囲全域 ($\lambda_{\text{em}} = 300\text{-}500 \text{ nm}$) の蛍光スペクトル。 b. ピークトップ周辺 ($\lambda_{\text{em}} = 325\text{-}365 \text{ nm}$) の拡大図。 c. 三糖1非存在下のスペクトルを基に算出した各濃度条件での差スペクトル。 d. リガンド濃度の凡例。

341 nm における蛍光強度に注目して、三糖 **1** の他に、 ϕ X174 感受性株である大腸菌 C 株の de-ON と ϕ X174 非感受性株である大腸菌 K-12 株の de-ON を用いて蛍光滴定実験を行った。リガンド濃度に対する蛍光強度の変化をプロットし、非線形回帰によって結合解離定数 K_d を算出した (Figure 2-7) ^{27,28}。親和性の指標となる K_d はリガンド間で有意な差は認められなかったが、K-12 株の de-ON の最大蛍光強度変化 ΔF_{\max} が突出して小さかった。 ΔF_{\max} は親和性の強さに直接影響するものではないが、非感受性株の de-ON を用いて蛍光滴定を行った際に類似の傾向が認められれば、糖鎖から感受性かどうかを見極める指標になり得ると考えられた。以上の結果から、三糖 **1** は C 株の de-ON と同様の挙動を示し、de-ON と類似の親和性を持っていると考えられ、スパイク G タンパク質のレセプター活性を持つと結論した。

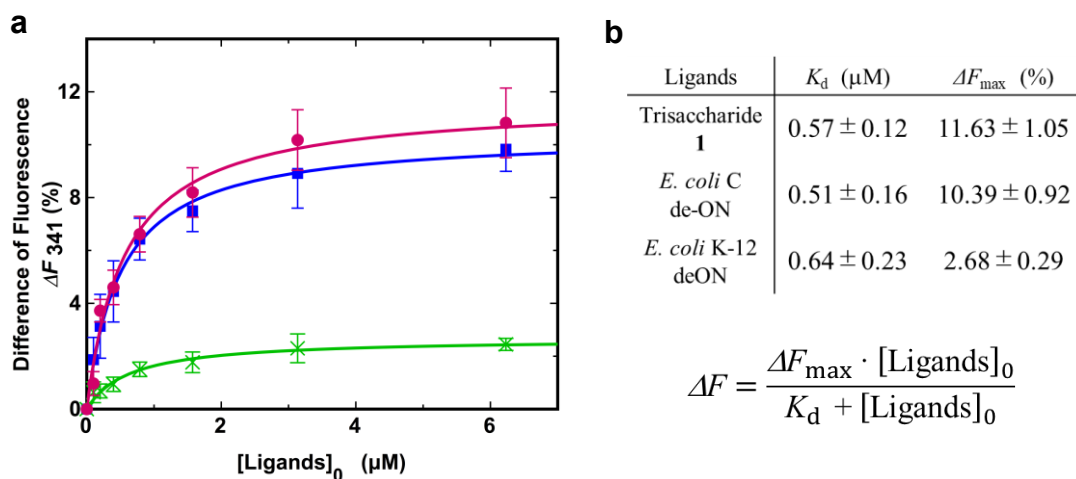


Figure 2-7 各種リガンドを添加した際の蛍光強度変化 (%)。

- a. 蛍光滴定のプロットと近似曲線、三糖 **1** (赤●), 大腸菌 C 株の de-ON (青■), 大腸菌 K-12 株の de-ON (緑×)。b. 結合解離定数 K_d と最大蛍光強度変化 ΔF_{\max} 。

第3項 円偏光二色性測定を用いた H タンパク質との相互作用解析

蛍光分光光度計を用いた実験で三糖 **1** が HisH や cHisG に結合すると判ったが、三糖 **1** がどのような影響を与えているのかについて新たな興味を持たれた。そこで、タンパク質の二次構造の特徴を観測することのできる円偏光二色性(CD)測定を行った。0.1 mg/mL (4.2 μ M) の HisH 溶液、終濃度が 0, 20, 50, 100 μ M となるように三糖 **1**, 大腸菌 C 株の de-ON, 大腸菌 K-12 株の de-ON を添加した²⁸⁾。

スパイク H タンパク質は α -ヘリックスが優位な二次構造を持ち²⁹⁾, CD 測定の結果も α -ヘリックス構造を示す特徴的な負のコットン効果が認められた (Figure 2-8)。そして、三糖 **1** および大腸菌 C 株の de-ON の濃度の増加に伴って 208 nm および 222 nm における α -ヘリックスを示す信号の増強が観察された (Figure 2-8a, b)。一方で、大腸菌 K-12 株の de-ON を添加した際は、208 nm における信号の増強は認められたが 222 nm における信号について、他の二種ほど大きな変化が認められず、ランダムコイル含量が増加したと推察された (Figure 2-8c)。このことから、三糖 **1** は HisH と結合し、より α -ヘリックス含量の高い立体構造の変化を引き起こすものと推察された。

スパイク H タンパク質は LPS の外部コア糖鎖の認識に寄与していると考えられている³⁾ が、この実験においても外部コア糖鎖を模倣した三糖 **1** および感受性株の LPS の外部コア糖鎖に対して大きな信号の増強を示していることから、その考察を支持するものであると考えられた。

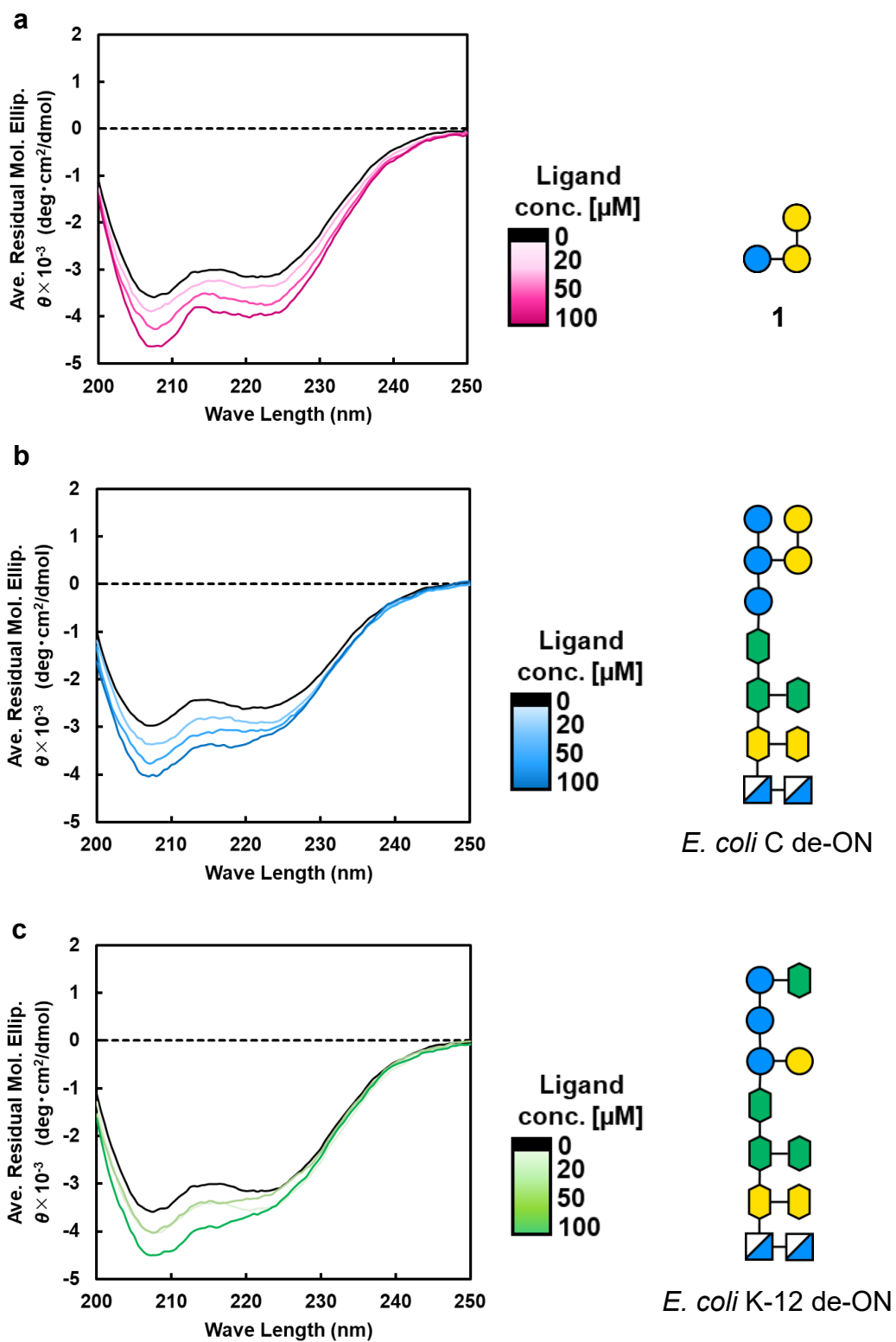


Figure 2-8 各種リガンドを添加した際の CD スペクトルの変化。

a. 三糖 1。 b. 大腸菌 C 株の de-ON。 c. 大腸菌 K-12 株の de-ON。

第4項 円偏光二色性測定を用いた G タンパク質との相互作用解析

cHisG に対しても同様に CD 測定を行った。0.1 mg/mL (6.9 μ M) の cHisG 溶液, 終濃度が 0, 20, 50, 100 μ M となるように三糖 **1**, 大腸菌 C 株の de-ON, 大腸菌 K-12 株の de-ON を添加した。

スパイク G タンパク質は β -シートが優位な二次構造を持ち⁸⁾, CD 測定の結果も β -シート構造を示す特徴的な負のコットン効果が認められた (Figure 2-9)。HisH ではどの糖鎖を添加したときでもスペクトルの変化が観察されたが (Figure 2-9b, c), 三糖 **1** を添加したときのみ, 極僅かに信号の増強は認められたものの, スペクトルの大きな変化は観察されなかった (Figure 2-9a)。この結果から, 三糖 **1** はスパイク G タンパク質に結合するものの, 立体構造変化を引き起こすものではないと推察された。また, 糖鎖を受け入れる“結合ポケット”が広く, 三糖 **1** のような低分子の糖鎖が結合した程度では周辺の構造が変化しないのではないかと考えられた。

低分子の糖鎖に対して cHisG の CD スペクトルがどのような変化を辿るかを調べるため, 三糖 **1** に加えて, methyl α -D-glucoside (**5**) と maltotetraose を同様の条件で添加して CD 測定を行った (Figure 2-10)。すると, 単糖 **5** を添加したときは大きな信号の変化は観察されず (Figure 2-10a), maltotetraose を添加したときは信号の減衰が認められた (Figure 2-10b)。

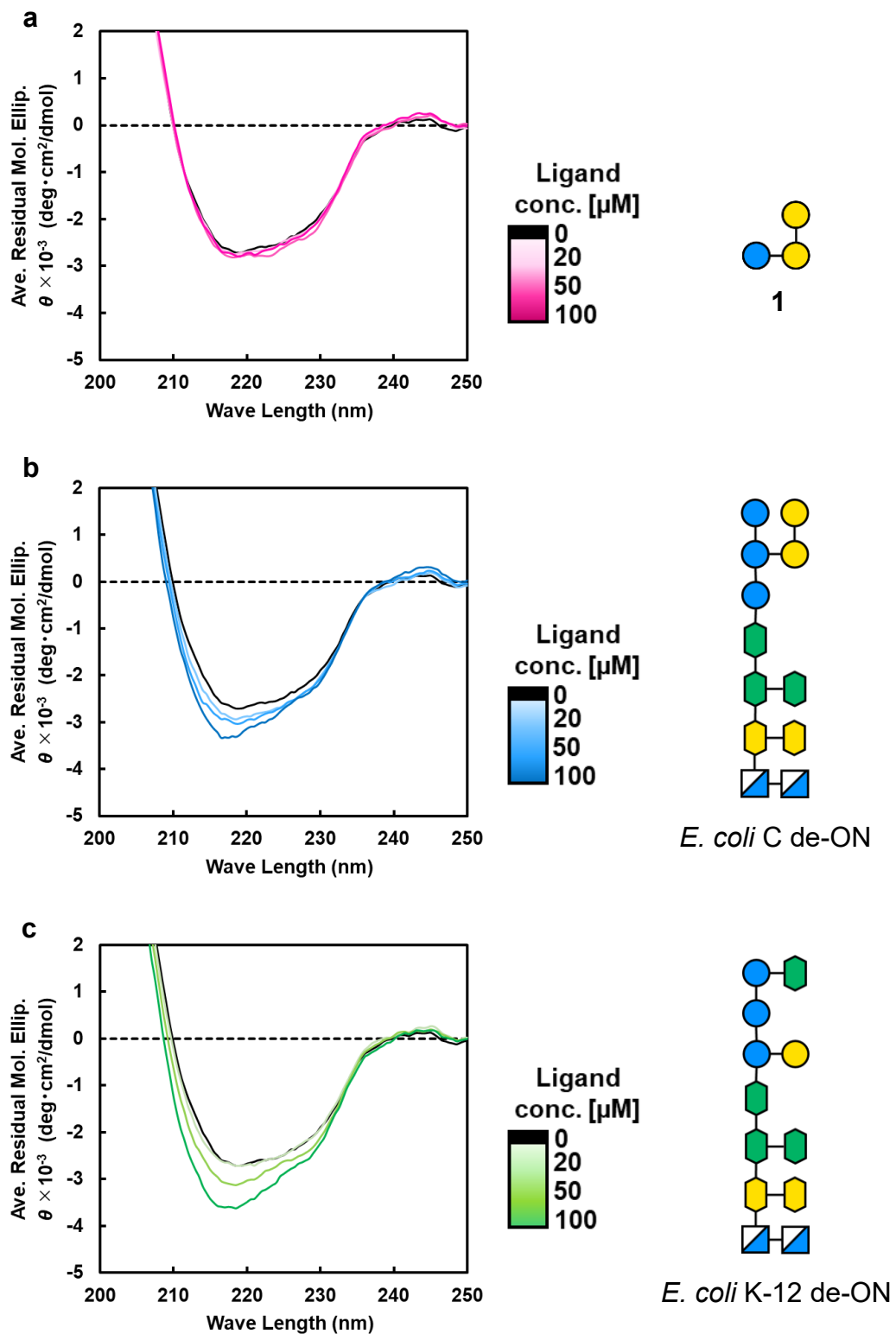


Figure 2-8 各種リガンドを添加した際の CD スペクトルの変化。

a. 三糖 1。 b. 大腸菌 C 株の de-ON。 c. 大腸菌 K-12 株の de-ON。

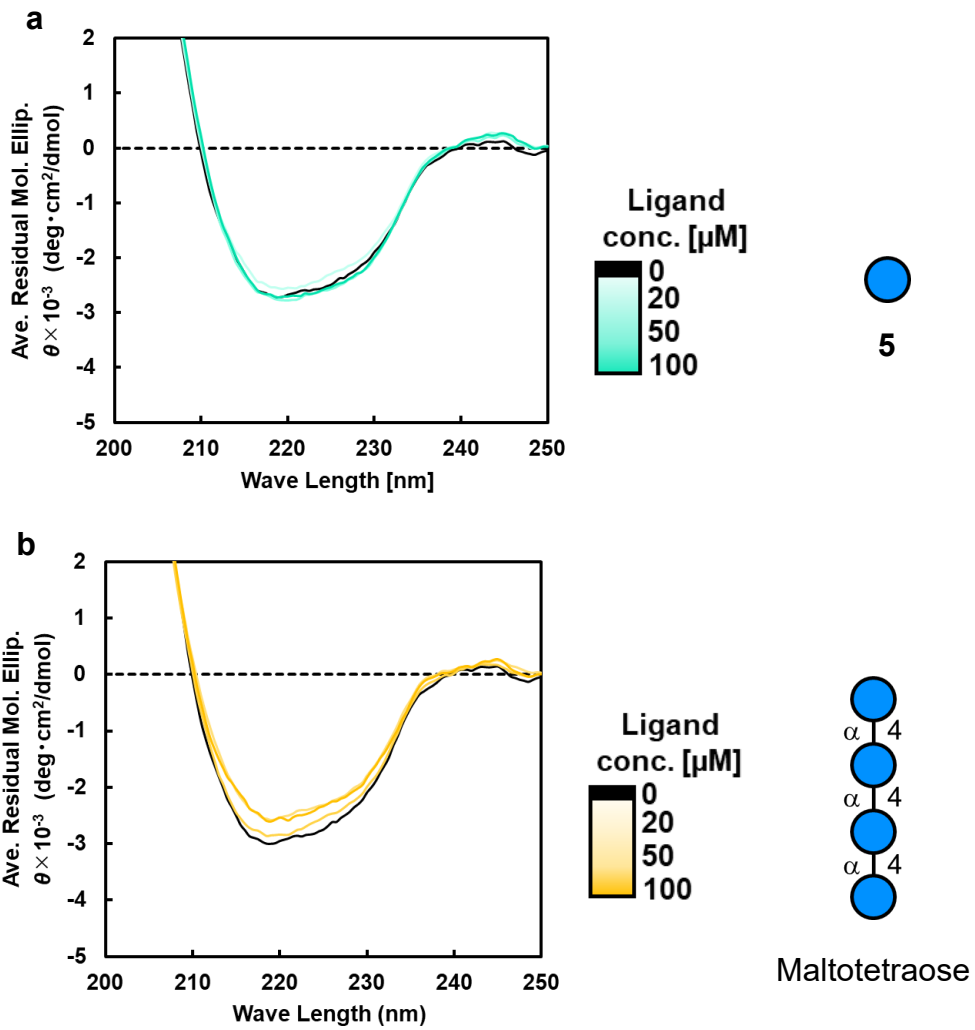


Figure 2-8 各種リガンドを添加した際の CD スペクトルの変化。

a. Methyl α -D-glucoside (5)。 b. Maltotetraose。

スパイク G タンパク質は LPS の inner core を認識に寄与していると考えられている³⁾が、この実験において外部コア糖鎖を模倣した三糖 1 では特徴的な相互作用が認められず、inner core の構造は共通な 2 種類の de-ON では β -シートを示す信号の増強が認められたため、こちらも以前からの考察を支持するものと考えられた。

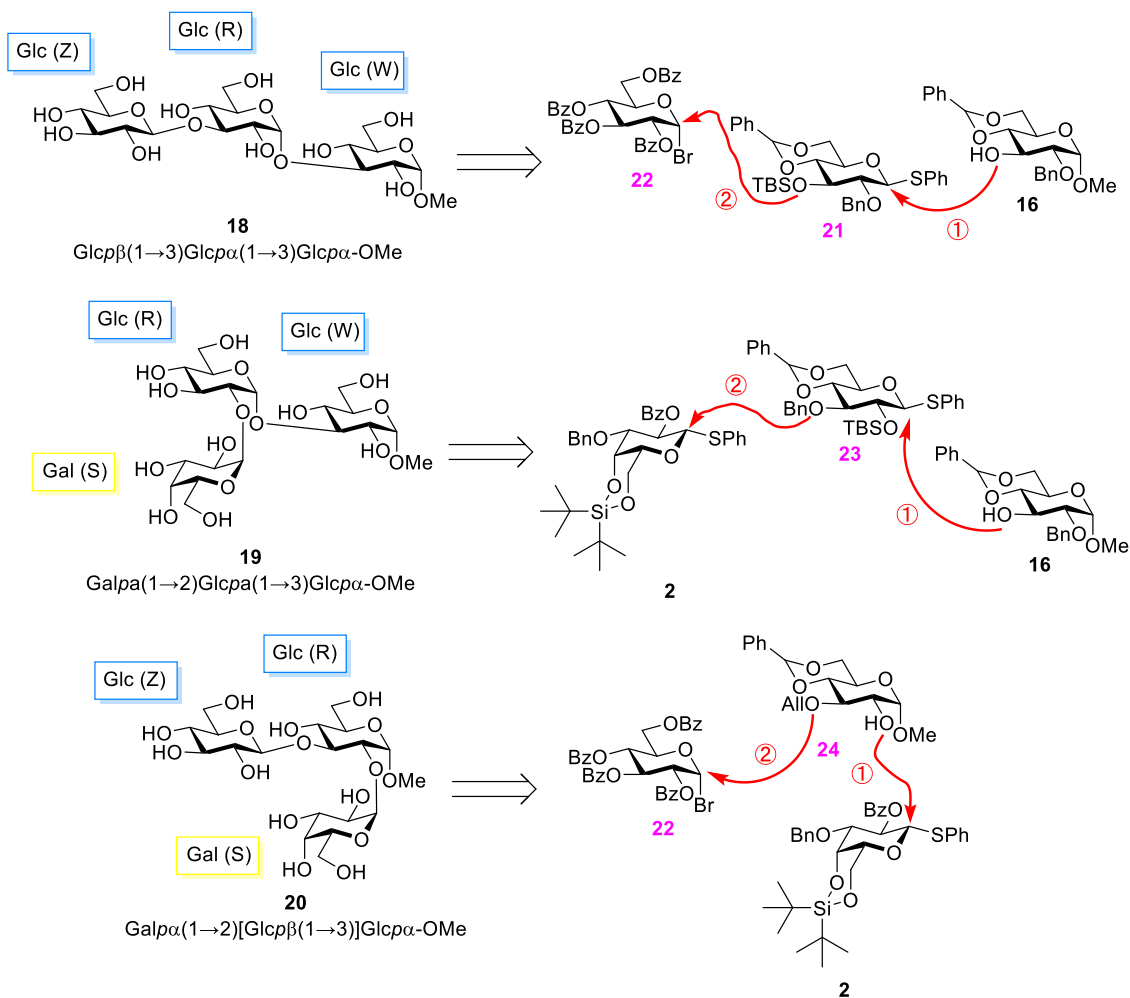
第3節 総括

本研究では、バクテリオファージ ϕ X174 と LPS の相互作用に重要であると考
えられている LPS の外部コア糖鎖に着目し、それを模倣した部分構造三糖 **1** を
有機合成によって得た。そして、得られた三糖 **1** は分光分析の結果、 ϕ X174 の糖
鎖認識に重要と考えられているスパイク H および G タンパク質のレセプター糖
鎖となり得ることが判った。とりわけ、三糖 **1** はスパイク H タンパク質に対し
て構造変化を引き起こすことが示唆され、今後の NMR 分光法を用いた相互作用
解析において重要な情報が得られた。

第4節 今後の展望

第1項 レセプター三糖 **18**, **19**, **20** の設計と合成計画

本報では三糖 **1** の合成を行ったが、LPS の外部コア糖鎖を模倣した部分構造
三糖はあと 3 種類考えることができる。 $\text{Glc}\beta(1\rightarrow3)\text{Glc}\alpha(1\rightarrow3)\text{Glc}\alpha$ の構造を
持つ三糖 **18**, $\text{Glc}\alpha(1\rightarrow2)\text{Glc}\alpha(1\rightarrow3)\text{Glc}\alpha$ の構造を持つ三糖 **19**, そして分岐差
の $\text{Glc}\alpha(1\rightarrow2)[\text{Glc}\beta(1\rightarrow3)]\text{Glc}\alpha$ の構造を持つ三糖 **20** がその候補である。また、
ビルディングブロック **21-24** を新たに合成し、それらを組み合わせることで合
成できると考えられた (Figure 2-11)。これらを合成し、相互作用解析に供する
ことで、外部コア糖鎖のどの構造が相互作用に重要かを網羅的に調べることが
できるため、 ϕ X174 の糖鎖認識機構において外部コア糖鎖のなす役割の更なる
詳細な知見が得られると考えられる。



Scheme 2-7 部分構造三糖 **18-20** とその合成計画

第2項 大腸菌 K-12 株 LPS を模倣した三糖の合成

大腸菌 K-12 株は ϕ X174 非感受性株であり、その LPS は非還元末端に $\alpha(1\rightarrow6)$ グリコシド結合で L-glycero-D-manno-heptose (LDManHep) 残基 (Figure 2-11) を持つことが最大の特徴である。大腸菌 K-12 株の LPS を模倣した部分構造三糖を合成し、相互作用解析に供することができれば、感染スペクトルと相互作用の関係を紐づけることができると考える。

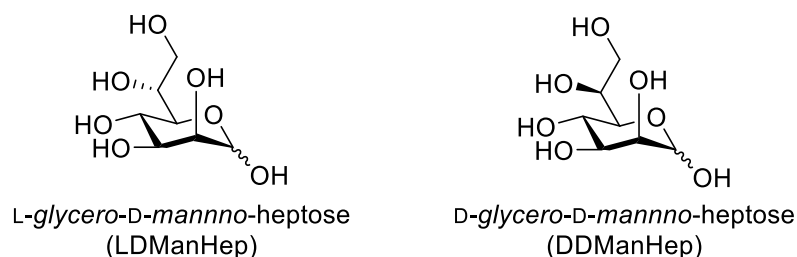
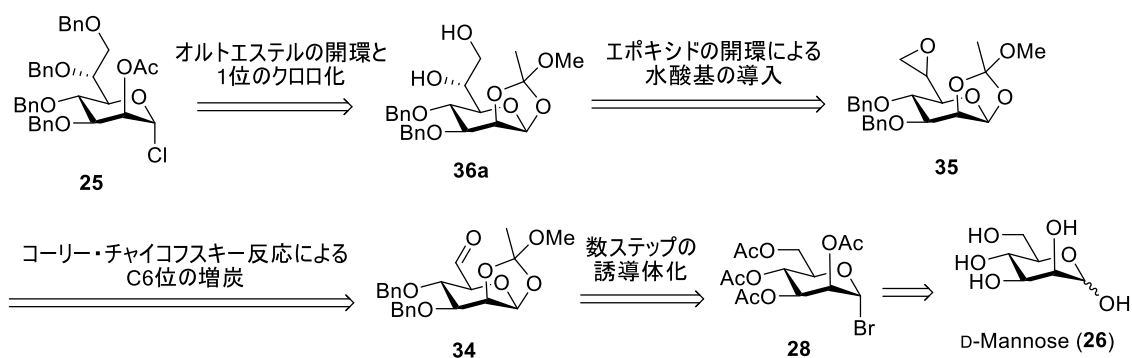


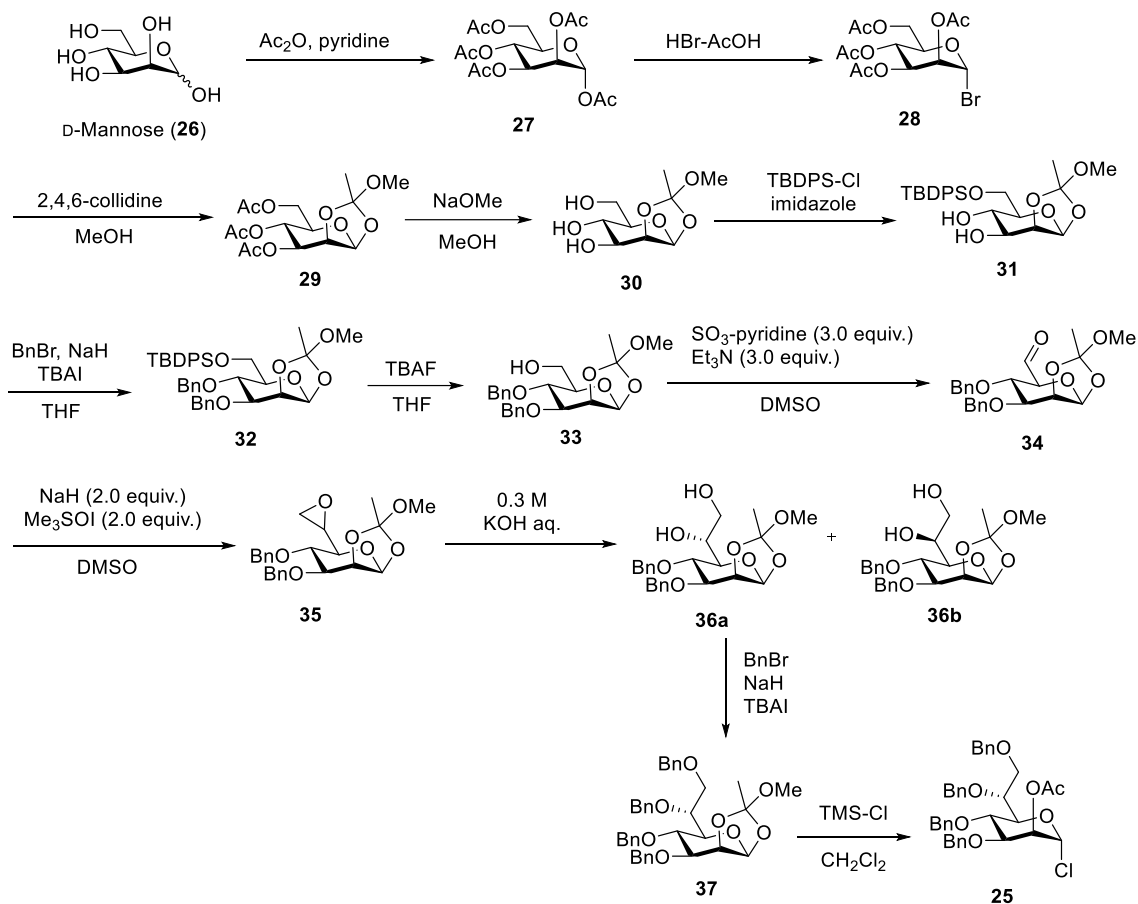
Figure 2-11 *glycero-D-manno-heptose* の構造式

1. LDManHep 型糖供与体の合成計画

LDManHep 残基は *trans*-1,2- α グリコシド結合のため、相対する糖受容体とは、アシル基による隣接基関与を利用した Koenigs-Knorr グリコシル化反応によって比較的容易に構築することができると考えられた。そのため、**25** のような糖供与体の合成を目指した (Scheme 2-8)。1, 2 位をオルトエステルとして最終ステップまで保護した状態を保ち、オルトエステル **36a** の開環を伴ってアシル基の導入と 1 位のクロロ化を同時に行うこととした。また、**36a** の C6 位の増炭および新たに生じた C7 位水酸基の導入は、**34** からのコーリー・チャイコフスキー反応によるエポキシドの形成と、その後の塩基による加水分解によって得られると考えられた³⁰⁾。以上の経緯を踏まえ、D-mannose から計 12 ステップで LDManHep 型糖供与体 **25** が得られると考えられた (Scheme 2-9)。



Scheme 2-8 LDManHep 型糖供与体 **25** の逆合成解析

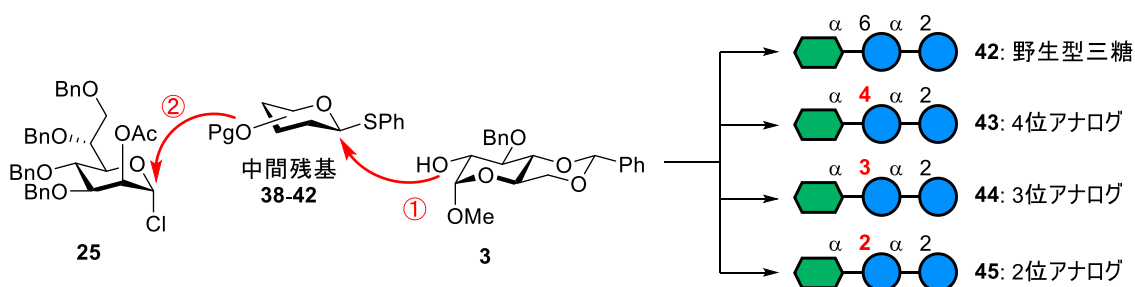


Scheme 2-9 LDManHep 型糖供与体 **25** の合成計画

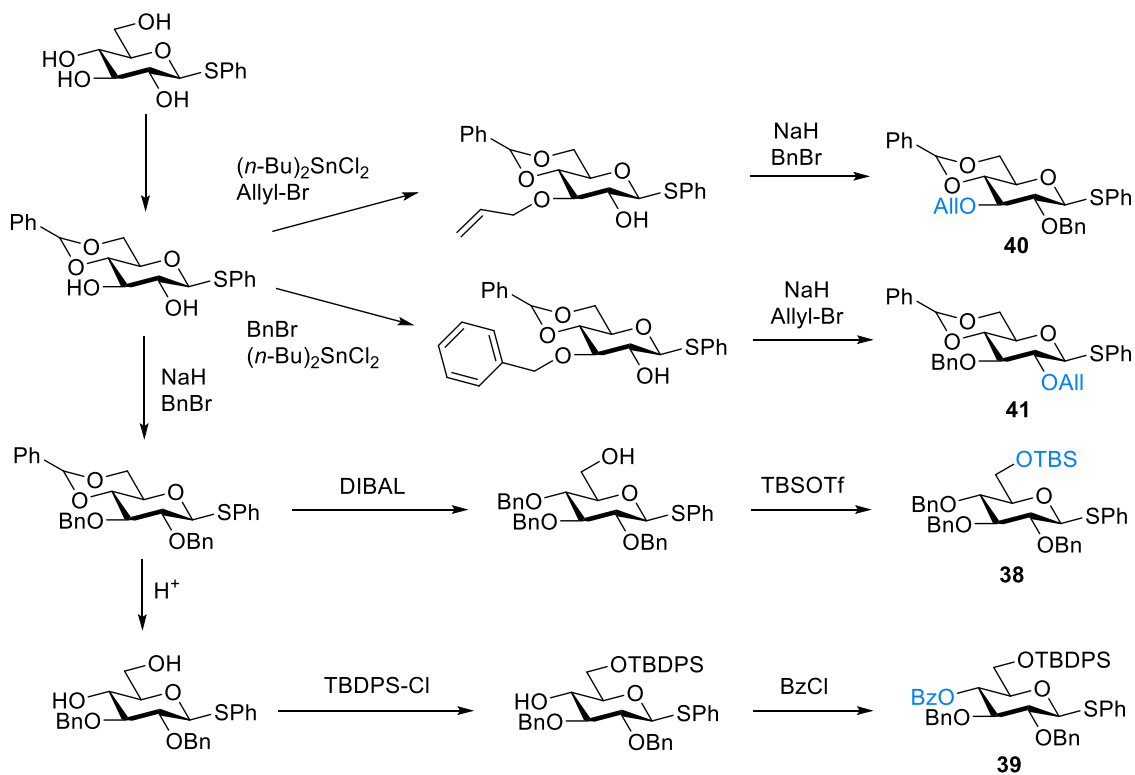
2. グリコシド結合位改変アナログの構想

大腸菌 K-12 株の LPS の LDManHep 残基は先述のとおり， $\alpha(1\rightarrow6)$ グリコシド結合である。こちらも他の感受性株の LPS の外部コア糖鎖では見られない特徴であり，LDManHep の特異さと合わせて宿主認識機構における役割に興味を持たれる。選択的に保護基の除去ができる位置を変えた中間残基のビルディングブロック **38–41** を合成し，糖受容体 **3** とのグリコシル化，保護基の選択的除去を経て糖供与体 **25** と再びグリコシル化させることで，野生型の結合様式を持つ三糖 **42** と，結合の位置が異なる三糖 **43–45** が得られると考えられた (Scheme 2-10)。

中間残基ビルディングブロック **38-41** については、 α -D-glucose を出発物質として、ベンジリデンやスズアセタールの性質を利用した選択的な誘導体化³¹⁾を繰り返すことで得られると考えられた (Scheme 2-11)。



Scheme 2-10 部分構造三糖 **42** と結合位改変アナログ **43-45** の合成計画



Scheme 2-11 中間残基ビルディングブロック **38-41** の合成計画

第3章 Materials and Methods

3.1 LPS extraction from *E. coli* C and K-12 strain

Cultivation of bacterial cells³²⁾

Cultivation was carried out 37 °C in baffle flask using 2 L of LB culture (pH 7.4). The bacterial growth was monitored by OD₆₀₀. The bacterial cells were harvested by centrifugation (5,000×g, 15 min). The cell paste was washed successively with EtOH, acetone, and *n*-hexane then dried under reduced pressure.

PCP extraction method³²⁾

The cells were placed centrifugation tube (PTFE coated, pear-shaped 30 mL) and suspended with the PCP extraction mixture (90 v/v% aqueous PhOH: CHCl₃: petroleum ether = 2:5:8); PCP mixture was added 4 mL per 1 g of bacterial cells. The suspension was stirred for 15 min at R.T. under irradiation of ultrasound (by Branson[®]; Brasonic M2800 H-J). The cells were centrifuged off (14,000×g, 5 min) and the supernatant was collected in a round bottom flask. The precipitated cells were extracted once more with the same volume of PCP mixture and centrifuged as above, and the supernatant was added to the first extract. This extraction protocols were repeated 4 times. The combined supernatant was evaporated to remove completely chloroform, petroleum ether, and H₂O in aqueous PhOH. The PhOH solution was transferred to centrifugation tube and H₂O was added dropwise until the LPS precipitated. The precipitated LPS was centrifuged (14,000×g, 8 min) and the supernatant was decanted. The viscous precipitate was washed 3 times with 80 v/v% aqueous PhOH and acetone respectively. The LPS was dissolved in H₂O and lyophilized for 3 days to afford LPS.

3.2 Deacylation of LPSs

To a screw-top test tube was added the LPS and 4 M KOH aq., then the mixture was stirred 18 hrs. at 125 °C. The reaction mixture was neutralizing with 6 M HCl aq. and washed with CH₂Cl₂. An aqueous layer was collected in round bottom flask, removed solvent *in vacuo*. Furthermore, a residue was purified by gel filtration (Cytiva® PD-10 column and Bio gel® P4 long column; ϕ 12 mm \times 1.3 m) then solvent was removed *in vacuo* and lyophilized to afford to a *O, N*-deacylated LPS (de-ON)⁸⁾.

3.3 HisH expression and purification

E. coli M15 harboring pQE-H (spike H protein fragment fusion plasmid based on pQE-30) was grown at 37 °C in LB medium culture containing ampicillin (100 μ g/mL) and kanamycin (25 μ g/mL) until the OD₆₀₀ reached about 0.5. Isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) (0.5 mM) was added to the cell culture for the induction and the culture was subsequently incubated for 3 hrs. The bacterial cells were harvested by centrifugation (5,000 \times g, 15 min). The cell paste was washed “sonication buffer” (see table 3-1) (pH 7.4) then suspended with “sonication buffer” again. The suspended cells were disrupted by sonication (MISONIX® microson™ ultrasonic cell disruptor XL-2007); the cycle that was disrupted for 1min then cooled down for 1 min, was repeated 30 times. The suspended cell lysate was centrifuged, and supernatant was decanted. To a residue was added “denature condition extracting reagent” (see table 3-2) and disrupted the mixture again; the cycle that was disrupted for 1 min then cooled down for 1 min, was repeated until the extracting reagent has been transparent (about 8 times). The precipitate was removed by centrifuged and supernatant containing HisH was purified by affinity chromatography using a Ni-NTA agarose. The HisH was refolded by gradient of

extracting reagent (see table 3-3), then eluted with a 4 mL gradient of 25-250 mM imidazole. The crude of HisH was dialyzed against 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), concentrated by a centrifugation ultrafilter (Amicon[®] ultra-15 10,000 MWCO)³³).

Table 3-1 The composition of “sonication buffer”

Composition for 1 L scale

NaH ₂ PO ₄ •2H ₂ O	7.8 g	50 mM
NaCl	17.4 g	300 mM

Adjusted desired pH using 2.5 M NaOH aq.

Table 3-2 The composition of “denature condition extracting reagent”

Composition for 1 L scale

Urea	480 g	8 M
NaH ₂ PO ₄ •2H ₂ O	15.6 g	100 mM
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	1.2 g	10 mM

Adjusted desired pH using 6.0 M HCl aq.

Table 3-3 Gradient condition for refolding the HisH

Fraction No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Extracting reagent (mL)	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.5	1.0	0.5	0
Sonication buffer (mL)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0

3.4 cHisG expression and purification

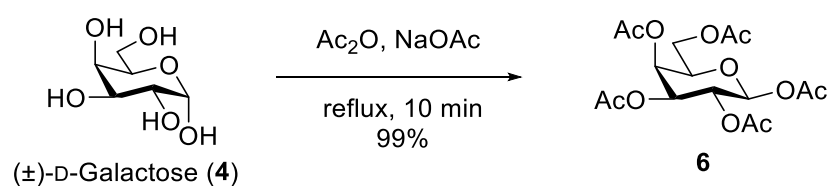
E. coli JM109 harboring pQE-60+G gene (spike G protein fragment fusion plasmid based on pQE-60) was grown at 37 °C in LB medium culture containing ampicillin (100 µg/mL) and until the OD₆₀₀ reached about 0.5. IPTG (1 mM) was added to the cell culture for the induction and the culture was subsequently incubated for 3 hrs. The bacterial cells were harvested by centrifugation (5,000×g, 15 min). The cell paste was washed “sonication buffer” (see table 3-1) (pH 8.0) then suspended with “sonication buffer” again. The suspended cells were disrupted by sonication (MISONIX® microson™ ultrasonic cell disruptor XL-2007); the cycle that was disrupted for 1min then cooled down for 1 min, was repeated 30 times. The precipitate was removed by centrifuged and supernatant containing cHisG was purified by affinity chromatography using a Ni-NTA agarose. The cHisG was eluted with a gradient of 50–500 mM imidazole. The crude of cHisG was dialyzed against 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), concentrated by a centrifugation ultrafilter (Amicon® ultra-15 50,000 MWCO) ³⁴ .

3.5 Chemical synthesis of trisaccharide1

General techniques of chemical synthesis

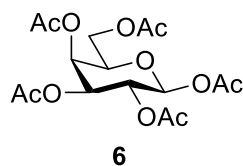
All commercially available reagents were purchased from commercial suppliers and used as received. All reactions were monitored by thin-layer-chromatography performed on glass-packed silica gel plates (60F-254) with UV light and visualized with 10% H₂SO₄ aq. stain. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a JEOL JNM-ECX400P or JNM-ECZ500R spectrometers. Chemical shifts (δ) for ¹H NMR spectra were referenced to internal standards; Tetramethylsilane (TMS) (0.00 ppm) in CDCl₃ and DMSO-*d*₆ and, 3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-*d*₄ acid (TSP) (0.00 ppm) in D₂O.

Chemical shifts (δ) for ^{13}C NMR spectra were referenced to internal standards; TMS (0.00 ppm) or $[\text{C}^{13}]\text{-CDCl}_3$ (77.0 ppm) and, TSP (0.00 ppm) in D_2O . The ^1H and ^{13}C chemical shifts were assigned using a combination of COSY, HSQC, HMBC and 1D-TOCSY. Multiplicities are reported by the following abbreviations: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), dd (double doublet), ddd (double double doublet). Coupling constants (J) are represented in hertz (Hz). High-resolution mass spectra were measured on an LTQ Orbitrap Velos ETD Mass Spectrometers (Thermo Fisher Scientific). The optical rotation was measured JASCO P-2200 polarimeter.

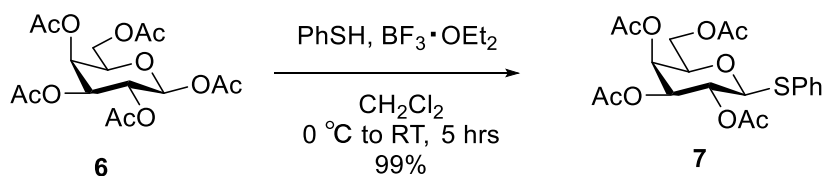


To a gently refluxed (110 °C *ca.*) Ac_2O (42.0 mL, 444 mmol) contained NaOAc (4.55 g, 55.5 mmol) was slowly added powdered $(\pm)\text{-D-galactopyranose (4)}$ (10.0 g, 55.5 mmol) over a period 5 min. After mixture was refluxed for 10 min, a mixture was cooled to room temperature. A reaction mixture was then quenched by addition of ice-colded water (20 mL). To a quenched mixture was extracted with EtOAc (70 mL), then washed with sat. NaHCO_3 aq., water, and brine. An organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered, and removed solvent *in vacuo* gave a colorless syrup. To a residue was coevaporated 2 times with PhMe and then recrystallized with *n*-hexane/EtOAc obtained 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl- $\beta\text{-D-galactopyranose (6)}$ (21.6 g, 99%) as a white powder ³⁵).

1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl- β -D-galactopyranose (**6**)



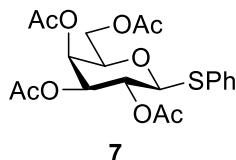
$^1\text{H-NMR}$ (Chloroform-*d*, 500 MHz) δ 5.71 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, *H1*), 5.43 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H, *H4*), 5.34 (dd, $J = 10.3, 8.6$ Hz, 1H, *H2*), 5.09 (dd, $J = 10.3, 3.4$ Hz, 1H, *H3*), 4.17-4.11 (m, 2H, *H6*), 4.08-4.06 (m, 1H, *H5*), 2.17 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.05 (s $\times 2$, 6H, *Ac* $\times 2$), 2.00 (s, 3H, *Ac*); $^{13}\text{C-NMR}$ (Chloroform-*d*, 125 MHz) δ 170.3, 170.1, 169.9, 169.3, 168.9, 92.1, 71.6, 70.8, 67.8, 66.7, 61.0, 20.8, 20.6, 20.5; ESI-MS ; $R_f = 0.55$ (*n*-hexane/EtOAc = 1:1).



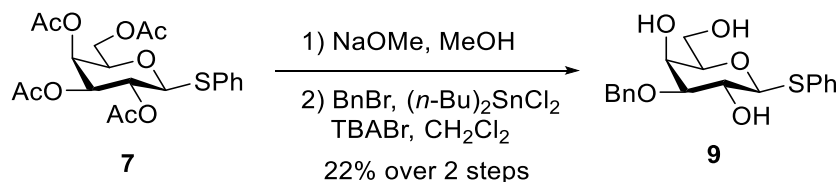
To a solution of 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl- β -D-galactopyranose (**6**) (3.90 g, 10.0 mmol) in dry CH_2Cl_2 (51.2 mL) was added PhSH (1.43 mL, 14.0 mmol) at 0 °C under Ar gas. A mixture and was added $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (2.10 mL, 16.6 mmol) dropwise at 0 °C, stirred for 5 hrs. with warmed up to room temperature. A reaction mixture was quenched sat. NaHCO_3 aq. (50 mL), stirred for more 5 min. A separated liquid was shake with separatory funnel and an organic layer was washed with brine. An organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtrated, and removed solvent *in vacuo* an gave colorless syrup. From a residue, gave phenyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (**7**) (4.39 g,

99%) as a colorless syrup by open column chromatography (*n*-hexane/EtOAc = 10:0 to 4:1).

Phenyl 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (7)



$^1\text{H-NMR}$ (Chloroform-*d*, 500 MHz) δ 7.52 (q, $J = 3.2$ Hz, 2H, *SPh-o*), 7.32 (t, $J = 3.2$ Hz, 3H, *SPh-m and p*), 5.42 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H, *H4*), 5.24 (t, $J = 9.7$ Hz, 1H, *H2*), 5.05 (dd, $J = 10.0, 3.2$ Hz, 1H, *H3*), 4.72 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H, *H1*), 4.16 (ddd, $J = 37.7, 11.3, 6.7$ Hz, 2H, *H6*), 3.94 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, *H5*), 2.13 (s, 3H, *Ac*), 2.10 (s, 3H, *Ac*), 2.05 (s, 3H, *Ac*), 1.98 (s, 3H, *Ac*); $^{13}\text{C-NMR}$ (Chloroform-*d*, 125 MHz) δ 170.4, 170.2, 170.1, 169.4, 132.5, 132.4, 128.9, 128.2, 86.6, 74.4, 72.0, 67.2, 67.2, 61.6, 20.8, 20.7, 20.6, 20.6; ESI-MS calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_9\text{S}$ m/z $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 458.147963, found 458.14932 ; $R_f = 0.50$ (*n*-hexane/EtOAc = 3:2), 0.83 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 9:1$).

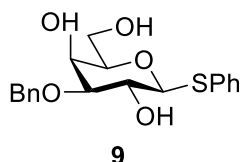


Removing Acetyl group: To a solution of phenyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (7) (4.39 g, 9.96 mmol) in MeOH (30.4 mL) was added a solution of NaOMe (2.42 g, 44.8 mmol; it was added so that the final conc. of a reaction mixture

was 1 M.) in MeOH (30.0 mL) at 0 °C, stirred for 3 hrs. with warmed up to room temperature. A reaction mixture was then neutralized with Dowex[®] 50W (H⁺), filtrated off Dowex[®] beads, and removed solvent *in vacuo*. A residue was coevaporated with EtOH 2 times then obtained crude of phenyl 1-thio-β-D-galactopyranose (**8**) (3.51 g, quant.) as a colorless amorphous.

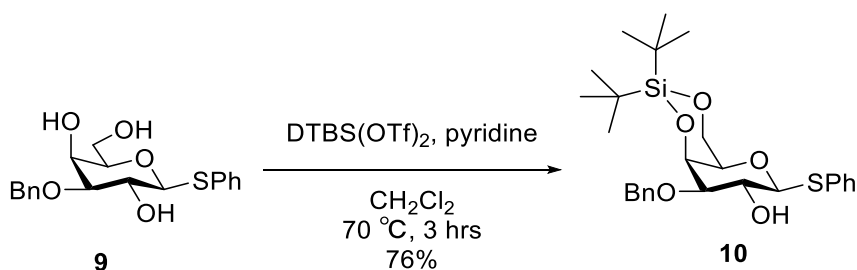
Selective benzylation: To a mixture of K₂CO₃ (2.02 g, 14.61 mmol), *n*-tetrabutylammonium bromide (0.314 g, 0.970 mmol) and dibutyltin dichloride (0.296 g, 0.97 mmol) in dry MeCN (20.9 mL) was added a solution of phenyl 1-thio-β-D-galactopyranose (**8**) as mentioned above in dry MeCN/DMF (20 mL/7 mL) under Ar gas, then stirred for 30 min at 80 °C. And to a mixture was added benzyl bromide while heated at 80 °C then stirred more 3 hrs. After the filtrated off reaction mixture with Celite pad, removed solvent *in vacuo*, and a residue was pre-purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH = 19:1, Silica gel containing 10 w/w % K₂CO₃ was used) to afford crude of compound as a colorless syrup. From a residual syrup was recrystallized with MeOH/CH₂Cl₂/*n*-hexane obtained phenyl 3-*O*-benzyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (**9**) (0.984 g, 22% over 2 steps from **7**) as a white crystal.

Phenyl 3-*O*-benzyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (**9**)



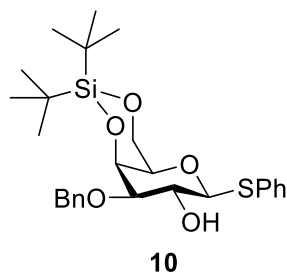
¹H-NMR (Methanol-*d*₄, 400 MHz) δ 7.56-7.54 (m, 2H, *SPh-o*), 7.43 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, *CH₂Ph-o*), 7.34-7.22 (m, 6H, *SPh-m, p* and *CH₂Ph-m, p*), 4.73 (dd, *J* = 32.5, 11.4 Hz, 2H,

CH₂Ph), 4.60 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, *H1*), 4.08 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, *H4*), 3.79-3.68 (m, 3H, *H2* and *H6*), 3.51 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, *H5*), 3.41 (dd, *J* = 9.2, 3.2 Hz, 1H, *H3*); ¹³C-NMR (100 MHz, Methanol-*d*₄) δ 139.9, 136.0, 132.3, 129.9, 129.3, 129.1, 128.7, 128.1, 90.3, 83.8, 80.5, 72.8, 70.3, 67.5, 62.6; ESI-MS calcd. for C₁₉H₂₂O₅S *m/z* [M+NH₄]⁺ 380.15262, found 380.15363, [M+Na]⁺ 385.10802, found 385.10883; [α]_D²¹ = -10.12° (*c* = 1.00, MeOH); mp: 154.9–160.1 °C; *R_f* = 0.39 (CHCl₃/MeOH = 9:1).

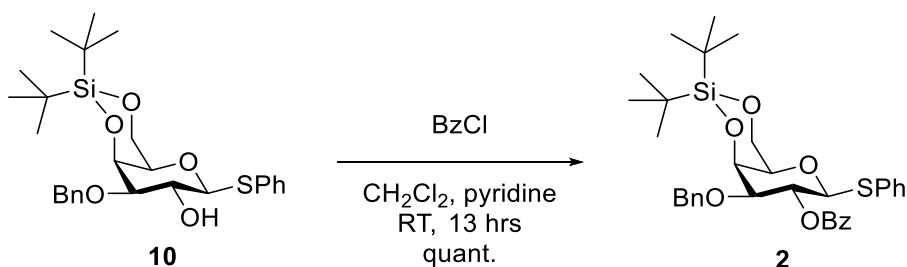


To a solution of phenyl 3-*O*-benzyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (**9**) (0.91 g, 2.50 mmol) in pyridine (16.1 mL) was added di-*tert*-butylsilyl bis(trifluoromethanesulfonate) (1.376 mL, 4.25 mmol) at 0 °C and then stirred for 1 hr with warmed up to room temperature. A reaction mixture was quenched by addition of MeOH at 0 °C and coevaporated with PhMe. A residue was diluted with EtOAc and then washed with 1 M HCl aq., H₂O, sat. NaHCO₃ aq. and brine. An organic layer was dried over Na₂SO₄, removed solvent *in vacuo*, residue was purified by flash column chromatography (*n*-hexane/EtOAc = 3:1) to afford phenyl 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-di-*tert*-butylsilyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (**10**) (0.955 g, 76%) as a colorless syrup.

Phenyl 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-di-*tert*-butylsilyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (10)



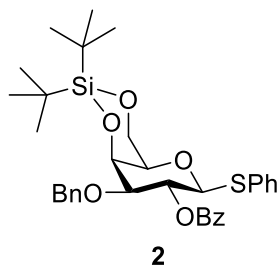
$^1\text{H-NMR}$ (Chloroform-*d*, 400 MHz) δ 7.56-7.25 (m, 10H, $\underline{\text{CH}_2\text{Ph}}$ and $\underline{\text{SPh}}$), 4.81 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, $H6\alpha$), 4.63-4.56 (m, 3H, $H6\beta$, $H1$ and $H4$), 4.23 (ddd, $J = 18.2, 12.5, 1.9$ Hz, 2H, $\underline{\text{CH}_2\text{Ph}}$), 4.05-4.00 (m, 1H, $H2$), 3.37 (dd, $J = 9.2, 3.2$ Hz, 2H, $H5$ and $H3$), 2.64 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, 2- OH), 1.09-1.01 (s \times 2, 18H, $\text{Si}[\text{C}(\underline{\text{CH}_3})_3]_2$); $^{13}\text{C-NMR}$ (Chloroform-*d*, 100 MHz) δ 137.9, 133.5, 132.6, 128.8, 128.5, 127.9, 127.7, 89.1, 81.9, 75.2, 70.3, 69.2, 68.4, 67.4, 27.6, 27.5, 27.2, 23.4, 20.6; $R_f = 0.70$ (*n*-hexane/EtOAc = 3:2), 0.74 (PhMe/EtOAc = 3:1).



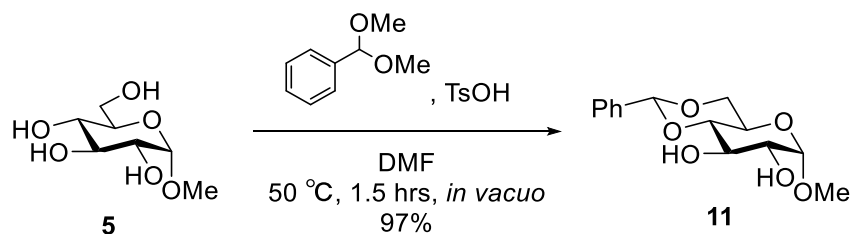
To a solution of phenyl 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-di-*tert*-butylsilyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (**10**) (0.91 g, 1.81 mmol) and 4-dimethylaminopyridine (0.022 g,

0.180 mmol) in dry CH₂Cl₂ (5.79 mL) and pyridine (4.37 mL) was added benzyl chloride (0.315 mL, 2.72 mmol) at 0 °C under Ar gas. A reaction mixture was stirred 13 hrs. with warmed up to room temperature and then washed 1 M HCl aq., H₂O, and brine. An organic layer was dried over Na₂SO₄, removed solution *in vacuo* and coevaporated with PhMe at 5 times to afford phenyl 2-*O*-benzoyl-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-di-*tert*-butylsilyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (**2**) (1.21 g, quant.) as a colorless syrup.

Phenyl 2-*O*-benzoyl-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-di-*tert*-butylsilyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (2**)**

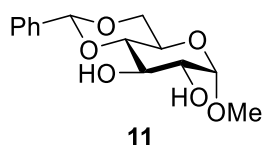


¹H-NMR (Chloroform-*d*, 500 MHz) δ 8.04 (dd, *J* = 8.6, 1.1 Hz, 2H, C(=O)Ph-*o*), 7.59-7.55 (m, 1H, C(=O)Ph-*p*), 7.46-7.40 (m, 4H, C(=O)Ph-*m* and CH₂Ph-*o*), 7.22-7.14 (m, 3H, CH₂Ph-*m* and *p*), 5.72 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H, *H*₂), 4.80 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, *H*₁), 4.71 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H, *H*₆α), 4.60-4.56 (m, 2H, *H*₄ and *H*₆β), 4.26 (ddd, *J* = 21.0, 12.5, 1.9 Hz, 2H, CH₂Ph), 3.58 (dd, *J* = 9.7, 2.9 Hz, 1H, *H*₃), 3.39 (s, 1H, *H*₅), 1.12 (s × 2, 18H, Si[C(CH₃)₃]₂); ¹³C-NMR (Chloroform-*d*, 125 MHz) δ 165.4, 137.8, 134.3, 133.0, 132.0, 130.0, 129.8, 128.7, 128.2, 128.1, 127.6, 127.4, 87.5, 79.2, 77.3, 77.0, 76.8, 75.1, 70.0, 69.7, 69.3, 67.2, 27.6, 23.4, 20.6; ESI-MS calcd. for C₃₄H₄₂O₆SSi *m/z* [M+H]⁺ 607.25441, found 607.25543, [M+NH₄]⁺ 624.28096, found 624.28210, [M+Na]⁺ 629.23636, found 629.23669; [α]_D²¹ = +59.95° (*c* = 1.00, CHCl₃); *R*_f = 0.85 (PhMe/EtOAc = 3:1), 0.79 (*n*-hexane/EtOAc = 3:2).



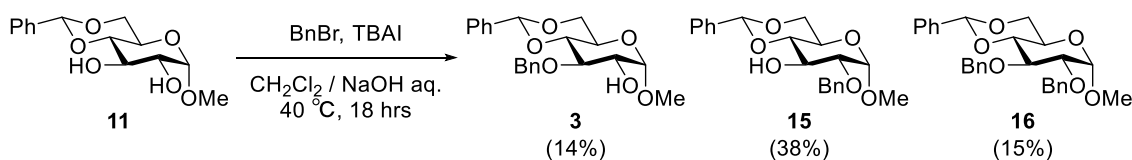
To a round-bottom flask was added methyl α -D-glucopyranoside (**5**) (3.88 g, 20.0 mmol) and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.19 g, 1.00 mmol) and, well dried *in vacuo*. To a mixture was added dry DMF (77.4 mL) and benzaldehyde dimethylacetal (6.00 mL, 40 mmol) and then attached to evaporator immediately, stirred for 1.5 *hrs.* at 50 °C *in vacuo*. The reaction was carried out, excess amount of benzaldehyde and DMF was removed *in vacuo*, obtained peel-yellow syrup. A residue was diluted with CH_2Cl_2 and then washed with sat. NaHCO_3 aq. and brine. An organic layer was dried over with Na_2SO_4 and removed solvent *in vacuo* and then recrystallized with *n*-hexane/EtOAc obtained methyl 4,6-*O*-benzylidene- α -D-glucopyranoside (**11**) (5.50 g, 97%) as a white powder.

Methyl 4,6-*O*-benzylidene- α -D-glucopyranoside (**11**)



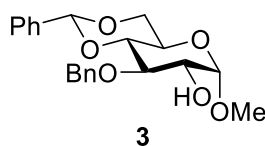
$^1\text{H-NMR}$ (Chloroform-*d*, 500 MHz) δ 7.50-7.48 (m, 2H, CHPh-m), 7.37-7.35 (m, 3H, CHPh-o and p), 5.50 (s, 1H, CHPh), 4.72 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H1), 4.26 (q, $J = 4.8$ Hz,

1H, *H6* α), 3.89 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, *H3*), 3.76 (q, *J* = 4.8 Hz, 1H, *H5*), 3.70 (t, *J* = 10.0 Hz, 1H, *H6* β), 3.57 (td, *J* = 8.2, 3.2 Hz, 1H, *H2*), 3.45 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, *H4*), 3.41 (s, 3H, *OMe*), 3.35 (s, 1H, 3-*OH*), 2.76 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, 2-*OH*); ¹³C-NMR (Chloroform-*d*, 125 MHz) δ 137.0, 129.2, 128.3, 126.3, 101.9, 99.8, 80.9, 72.7, 71.4, 68.9, 62.3, 55.4; ESI-MS calcd. for C₁₄H₁₈O₆ [M+H]⁺ 283.11761, found 283.11722; *R_f* = 0.56 (CHCl₃/MeOH = 1:1), 0.15 (*n*-hexane/EtOAc = 1:1).



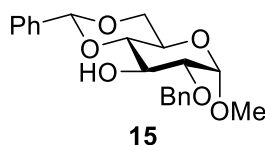
To a solution of methyl 4,6-*O*-benzylidene- α -D-glucopyranoside (**11**) (0.990 g, 3.51 mmol) and *n*-tetrabutylammonium iodide (1.30 g, 3.51 mmol) in a mixture of CH₂Cl₂ and 1 M NaOH aq. (equal volume, 12.3 mL each) was added benzyl bromide (0.50 mL, 4.21 mmol) at 0 °C. A reaction mixture was stirred for 18.5 hrs. at 40 °C and then washed with H₂O and brine. An organic layer was dried over Na₂SO₄ and removed solvent *in vacuo* and residue was pre-purified by flash column chromatography (*n*-hexane/EtOAc = 1:1) to afford crude compound as a colorless syrup. Furthermore, a residue was purified by flash column chromatography (*n*-hexane/EtOAc = 7:3 to 3:1) to afford methyl 2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene- α -D-glucopyranoside (**3**) (495 mg, 38%) and methyl 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene- α -D-glucopyranoside (**15**) (176 mg, 14 %) as a white solid each. Moreover, methyl 2,3-*O*-di-benzyl-4,6-*O*-benzylidene- α -D-glucopyranoside (**16**) (243 mg, 15%) was also obtained as a colorless syrup.

Methyl 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene- α -D-glucopyranoside (**3**)



$^1\text{H-NMR}$ (Chloroform-*d*, 500 MHz) δ 7.51-7.26 (m, 10H, *CHPh* and *CH₂Ph*), 5.57 (s, 1H, *CHPh*), 4.97 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.82-4.78 (m, 2H), 4.30 (q, $J = 5.0$ Hz, 1H), 3.85-3.82 (m, 2H), 3.78-3.73 (m, 2H), 3.65 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H), 3.45 (s, 3H), 2.33 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (Chloroform-*d*, 125 MHz) δ 138.4, 137.3, 128.9, 128.4, 128.2, 128.0, 127.7, 126.0, 101.3, 99.8, 81.9, 78.8, 77.3, 77.0, 76.8, 74.8, 72.4, 69.0, 62.6, 55.4; ESI-MS calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 373.16456, found 373.16458; $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = +38.68^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3); $R_f = 0.46$ (n -hexane/EtOAc = 1:1), 0.29 (n -hexane/EtOAc = 3:2)^{36,37}.

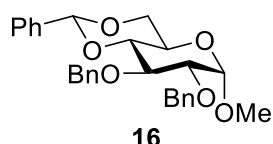
Methyl 2-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene- α -D-glucopyranoside (**15**)



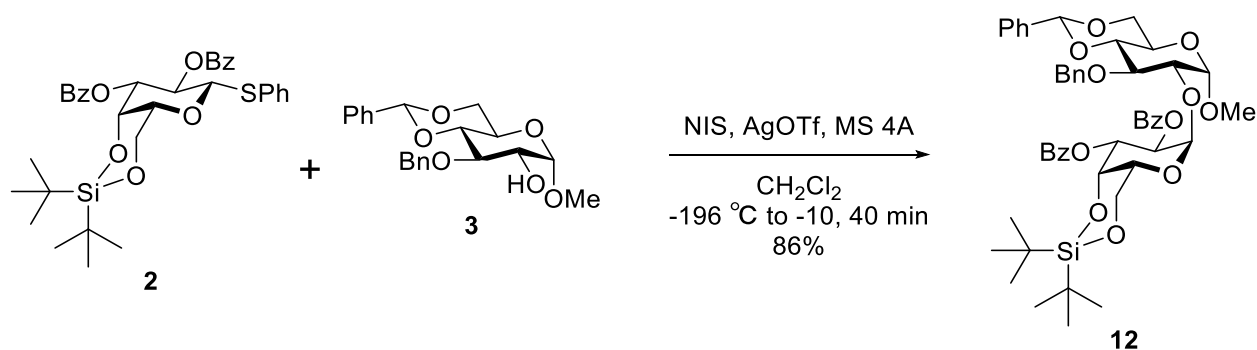
$^1\text{H-NMR}$ (Chloroform-*d*, 500 MHz) δ 7.49-7.29 (m, 10H, *CHPh* and *CH₂Ph*), 5.49 (s, 1H, *CHPh*), 4.76 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.67 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 4.59 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 4.23 (q, $J = 5.0$ Hz, 1H), 4.13 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 3.79 (td, $J = 9.9, 4.8$ Hz, 1H), 3.67 (t, $J = 10.3$ Hz, 1H), 3.48-3.43 (m, 2H), 3.35 (s, 3H), 2.77 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (Chloroform-*d*, 125 MHz) δ 137.8, 137.0, 129.1, 128.4, 128.2, 128.0, 128.0, 126.2, 101.8, 98.5, 81.1, 79.4, 73.2, 70.1, 68.9, 61.9, 55.2; ESI-MS calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

373.16456, found 373.16412; $[\alpha]_D^{21} = +90.35^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3); $R_f = 0.63$ (n -hexane/EtOAc = 1:1).

Methyl 2,3-*O*-di-benzyl-4,6-*O*-benzylidene- α -D-glucopyranoside (16)

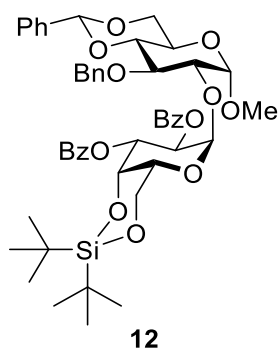


$^1\text{H-NMR}$ (Chloroform-*d*, 500 MHz) δ 7.50-7.26 (m, 15H), 5.54 (s, 1H), 4.91 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.84 (dd, $J = 11.5, 4.6$ Hz, 2H), 4.69 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.59 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 4.26 (q, $J = 5.0$ Hz, 1H), 4.05 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H), 3.81 (q, $J = 4.8$ Hz, 1H), 3.70 (t, $J = 10.3$ Hz, 1H), 3.62-3.54 (m, 2H), 3.39 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (Chloroform-*d*, 125 MHz) δ 138.7, 138.1, 137.3, 128.8, 128.4, 128.2, 128.1, 128.0, 128.0, 127.9, 127.5, 126.0, 101.2, 99.2, 82.1, 79.1, 78.5, 75.3, 73.7, 69.0, 62.2, 55.3; ESI-MS calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 463.21152, found 463.21176, $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 480.23806, found 480.23807; $R_f = 0.76$ (n -hexane/EtOAc = 1:1).

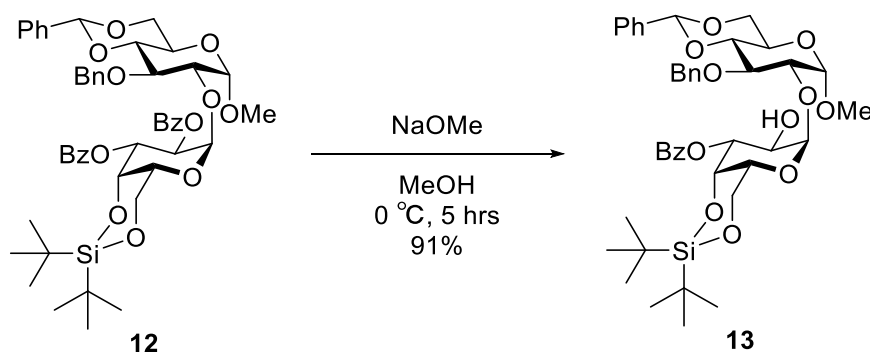


To a round-bottom flask was added well dried molecular sieves 4A (0.300 g: powder type), *N*-iodosuccinimide (0.101 g, 0.45 mmol) and silver trifluoromethanesulfonate (0.031 g, 0.12 mmol) under Ar. To a mixture was added solution of methyl 3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene- α -D-glucopyranoside (**3**) (0.112 g, 0.30 mmol: glycosyl acceptor) in dry CH₂Cl₂ (5.0 mL) at -10 °C and then stirred 30 min under shaded. Furthermore, a mixture of glycosyl acceptor was cooled with liquid N₂, before completely frozen, to a mixture was added phenyl 2-*O*-benzoyl-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-di-*tert*-butylsilyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (**2**) (0.218 g, 0.36 mmol: glycosyl donor) in dry CH₂Cl₂ (4.6 mL). A reaction mixture was allowed to stand 5 min at -196 °C in frozen then warmed to -10 °C and stirred for 25 min under shaded. A reaction mixture was quenched by 2 mL of sat. NaHCO₃ aq., filtrated off a reaction mixture with Celite pad and then washed with sat. NaHCO₃ aq., H₂O and brine. An organic layer was dried over Na₂SO₄ and removed solvent *in vacuo*. A residue was purified by flash column chromatography (*n*-hexane/EtOAc = 4:1) to afford methyl 2-*O*-(2-*O*-benzoyl-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-di-*tert*-butylsilyl- α -D-galactopyranosyl)-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene- α -D-glucopyranoside (**12**) (0.252 g, 86%) as a colorless syrup³⁸).

Methyl 2-*O*-(2-*O*-benzoyl-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-di-*tert*-butylsilyl- α -D-galactopyranosyl)-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene- α -D-glucopyranoside (12**)**



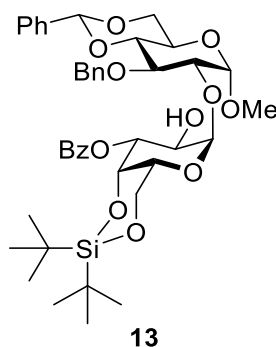
$^1\text{H-NMR}$ (Chloroform-*d*, 500 MHz) δ 8.14-8.12 (m, 3H), 7.62-7.14 (m, 20H), 5.54 (s, 1H), 5.42 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, *HI'*), 5.36 (dd, $J = 10.3, 4.0$ Hz, 1H), 4.94 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 4.75 (dd, $J = 16.0, 12.6$ Hz, 2H), 4.65 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H, *HI*), 4.43 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 4.21 (dd, $J = 10.0, 3.7$ Hz, 2H), 3.98-3.94 (m, 2H), 3.78-3.58 (m, 6H), 3.38 (dd, $J = 12.6, 1.7$ Hz, 1H), 2.86 (s, 3H, *OMe*), 1.06 (s, 9H, $\text{Si}[\text{C}(\text{CH}_3)_3]_2$), 1.03 (s, 9H, $\text{Si}[\text{C}(\text{CH}_3)_3]_2$); $^{13}\text{C-NMR}$ (Chloroform-*d*, 125 MHz) δ 166.3, 138.5, 138.3, 137.3, 134.4, 132.9, 130.4, 130.1, 129.7, 129.6, 128.8, 128.7, 128.3, 128.3, 128.2, 128.1, 127.6, 127.6, 127.5, 125.8, 101.0, 97.3, 93.7, 82.7, 77.2, 75.5, 74.6, 74.1, 70.7, 70.6, 70.5, 68.9, 66.8, 66.5, 62.0, 54.7, 27.5, 27.2, 23.2, 20.5; ESI-MS calcd. for $\text{C}_{49}\text{H}_{60}\text{O}_{12}\text{Si}$ m/z $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 886.41923, found 886.42059, $[\text{M}+\text{K}]^+$ 907.34856, found 907.34851; $R_f = 0.88$ (*n*-hexane/EtOAc = 3:2), 0.23 (*n*-hexane/EtOAc = 9:1), 0.54 (*n*-hexane/EtOAc = 4:1).



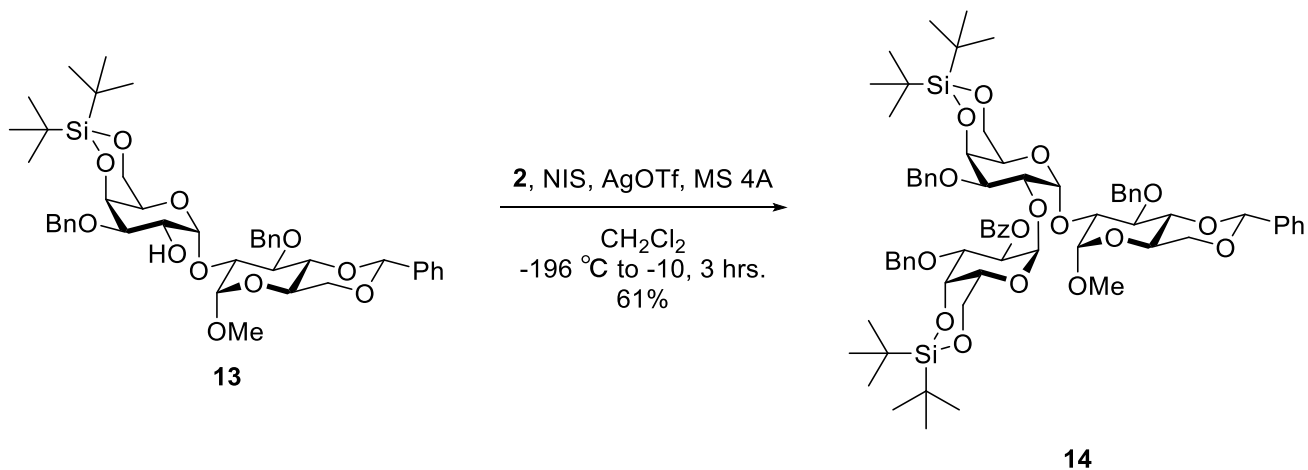
To a solution of methyl 2-*O*-(2-*O*-benzoyl-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-di-*tert*-butylsilyl- α -D-galactopyranosyl)-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene- α -D-glucopyranoside (**12**) (0.225 g, 0.259 mmol) in MeOH (5.0 mL) was added a solution of NaOMe (0.270 g, 5.00 mmol; it was added so that the final conc. of a reaction mixture was 0.5 M.) in MeOH (5.0 mL) at 0 °C, stirred for 5 *hrs.* with warmed up to room temperature. A reaction mixture was

then neutralized with Dowex[®] 50W (H⁺), filtrated off Dowex[®] beads, and removed solvent in vacuo. A residue was coevaporated with EtOH 2 times then purified by flash column chromatography obtained methyl 2-*O*-(3-*O*-benzyl-4,6-*O*-di-*tert*-butylsilyl- α -D-galactopyranosyl)-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene- α -D-glucopyranoside (**13**) (0.179 g, 91%) as a pale-yellow amorphous.

Methyl 2-*O*-(3-*O*-benzyl-4,6-*O*-di-*tert*-butylsilyl- α -D-galactopyranosyl)-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene- α -D-glucopyranoside (13**)**



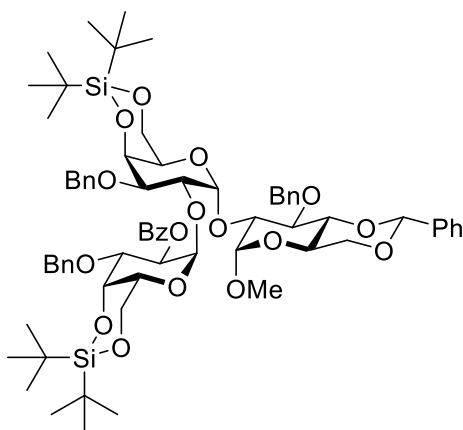
¹H-NMR (Chloroform-*d*, 500 MHz) δ 7.49-7.16 (m, 19H), 5.58 (s, 1H), 4.99 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 4.94 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 4.87 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 4.74 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.65 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.43 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 4.30 (q, *J* = 5.0 Hz, 1H), 4.17 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 4.08 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 3.95 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 3.90 (s, 1H), 3.85-3.73 (m, 4H), 3.66-3.63 (m, 2H), 3.51 (td, *J* = 10.2, 2.7 Hz, 2H), 3.43 (d, *J* = 2.9 Hz, 3H), 2.42 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, 2-*OH*'), 1.03-1.00 (s \times 2, 18H, Si[C(CH₃)₃]₂); ¹³C-NMR (Chloroform-*d*, 125 MHz) δ 138.5, 138.4, 137.2, 129.5, 128.9, 128.4, 128.3, 128.2, 127.7, 127.7, 127.6, 125.9, 101.2, 97.4, 96.6, 82.5, 77.6, 77.5, 75.6, 74.3, 70.3, 70.0, 68.9, 67.4, 67.3, 66.7, 62.2, 55.2, 27.5, 27.2, 23.3, 20.5; ESI-MS calcd. for C₄₂H₅₆O₁₁Si [M+NH₄]⁺ 782.39301, found 782.39398; *R_f* = 0.51 (*n*-hexane/EtOAc = 4:1).



To a round-bottom flask was added well dried molecular sieves 4A (0.300 g: powder type), *N*-iodosuccinimide (0.079 g, 0.35 mmol) and silver trifluoromethanesulfonate (0.024 g, 0.09 mmol) under Ar. To a mixture was added solution of methyl 2-*O*-(3-*O*-benzyl-4,6-*O*-di-*tert*-butylsilyl- α -D-galactopyranosyl)-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene- α -D-glucopyranoside (**13**) (0.179 g, 0.23 mmol: glycosyl acceptor) in dry CH₂Cl₂ (3.5 mL) at -10 °C and then stirred 30 min under shaded. Furthermore, a mixture of glycosyl acceptor was cooled with liquid N₂, before completely frozen, to a mixture was added phenyl 2-*O*-benzoyl-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-di-*tert*-butylsilyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (**2**) (0.171 g, 0.28 mmol: glycosyl donor) in dry CH₂Cl₂ (4.0 mL). A reaction mixture was allowed to stand 30 min at -196 °C in frozen then warmed to -10 °C and stirred for 2.5 hrs. under shaded. A reaction mixture was quenched by 2 mL of sat. NaHCO₃ aq., filtrated off a reaction mixture with Celite pad and then washed with sat. NaHCO₃ aq., H₂O and brine. An organic layer was dried over Na₂SO₄ and removed solvent *in vacuo*. A residue was purified by flash column chromatography (*n*-hexane/EtOAc = 4:1) to afford methyl 2-*O*-[2-*O*-(2-*O*-benzoyl-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-di-

tert-butylsilyl- α -D-galactopyranosyl)-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-di-*tert*-butylsilyl- α -D-galactopyranosyl]-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene- α -D-glucofuranoside (**14**) (0.175 g, 61%) as a pale-yellow syrup³⁸).

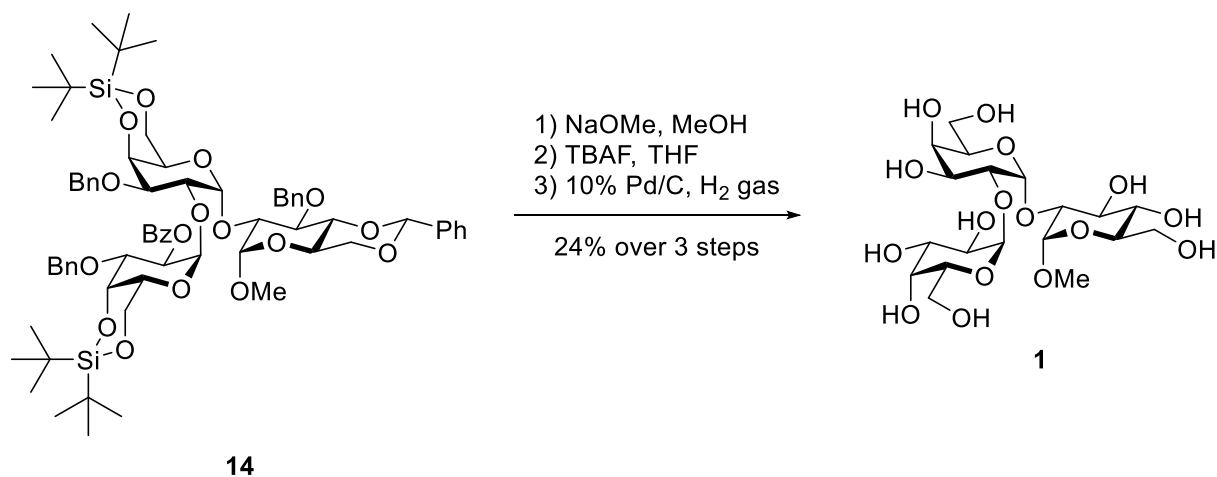
Methyl 2-*O*-[2-*O*-(2-*O*-benzoyl-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-di-*tert*-butylsilyl- α -D-galactopyranosyl)-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene- α -D-glucofuranoside (14**)**



14

¹H-NMR (Chloroform-*d*, 500 MHz) δ 8.16-8.12 (m, 4H), 7.66-7.05 (m, 22H), 5.74 (dd, $J = 10.6, 3.7$ Hz, 1H), 5.46 (s, 1H), 5.36 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 5.15 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 4.81 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 4.75-4.72 (m, 1H), 4.66 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 4.59 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.51-4.45 (m, 3H), 4.24 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.21 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 4.17 (q, $J = 5.0$ Hz, 1H), 4.13-4.09 (m, 2H), 4.03 (s, 2H), 3.96-3.93 (m, 2H), 3.83 (dd, $J = 12.6, 1.7$ Hz, 1H), 3.68 (dd, $J = 9.7, 2.9$ Hz, 1H), 3.61 (dd, $J = 12.3, 9.5$ Hz, 3H), 3.41 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H), 3.36 (q, $J = 4.8$ Hz, 1H), 3.26 (s, 3H), 1.14 (s, 9H), 1.07 (s, 9H), 1.02 (s, 9H), 1.00 (s, 9H); ¹³C-NMR (Chloroform-*d*, 125 MHz) δ 165.9, 162.3, 138.8, 138.5, 137.6, 134.5, 132.9, 130.5, 129.8, 128.8, 128.4, 128.3, 128.1, 128.1, 127.6, 127.6, 127.5, 127.4,

126.0, 101.0, 96.6, 92.3, 91.1, 81.5, 77.6, 77.2, 75.6, 75.0, 74.5, 72.9, 70.8, 70.5, 70.4,
69.1, 68.8, 68.5, 67.3, 67.0, 66.9, 61.6, 54.5, 27.6, 27.6, 27.3, 27.3, 23.4, 23.3, 20.7, 20.6;
 $R_f = 0.48$ (n-hexane/EtOAc = 4:1).



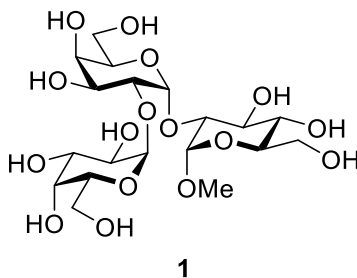
Removing benzoyl group: To a solution of methyl 2-*O*-[2-*O*-(2-*O*-benzoyl-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-di-*tert*-butylsilyl- α -D-galactopyranosyl)-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-di-*tert*-butylsilyl- α -D-galactopyranosyl]-3-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidene- α -D-glucopyranoside (**14**) (0.175 g, 0.14 mmol) in MeOH (5.0 mL) was added a solution of NaOMe (0.810 g, 14.9 mmol; it was added so that the final conc. of a reaction mixture was 1.5 M.) in MeOH (5.0 mL) at 0 °C, stirred for 5 hrs. with warmed up to room temperature. A reaction mixture was then neutralized with Dowex[®] 50W (H⁺), filtrated off Dowex[®] beads, and removed solvent in vacuo. A residue was coevaporated with EtOH 2 times then obtained intermediate **I** (0.157 g) as a pale-yellow syrup.

Removing di-*tert*-butylsilyl group: To a solution of intermediate **I** in dry THF (3.3 mL) was added 1 M *n*-tetrabutylammonium fluoride THF solution (0.142 mL) at

0 °C. A reaction mixture was stirred 16.5 hrs. with warmed up to 40 °C then solvent was removed *in vacuo* to afford intermediate **II** (0.0431 g) as a colorless solid.

Removing benzyl and benzylidene group: Intermediate **II** was dissolved in MeOH (4.0 mL) and to this Pd/C (10% wt) (0.400 g) was added. A round bottom flask was purged with Ar gas then H₂ gas and left to stir under a balloon of H₂ gas at room temperature for 2.5 hrs. A reaction mixture was filtered through Celite pad, then solvent was removed *in vacuo*. A residue was purified by gel filtration (Bio gel[®] P4 long column; ϕ 12 mm \times 1.3 m) then solvent was removed *in vacuo* and lyophilized for 3 days to afford methyl 2-*O*-[2-*O*-(α -D-galactopyranosyl)- α -D-galactopyranosyl]- α -D-glucopyranoside (**1**) (0.0201 g, 24% for 3 steps from **14**) as a white solid.

Methyl 2-*O*-[2-*O*-(α -D-galactopyranosyl)- α -D-galactopyranosyl]- α -D-glucopyranoside (1**)**



¹H-NMR (D₂O, 500 MHz) δ 5.36 (d, J = 4.0 Hz, 1H, *HI'*), 5.14 (d, J = 4.0 Hz, 1H, *HI''*), 5.09 (d, J = 3.4 Hz, 1H, *HI*), 4.15 (dt, J = 22.9, 6.3 Hz, 2H), 4.07-4.05 (m, 2H), 4.01-3.92 (m, 2H), 3.89-3.83 (m, 2H), 3.81-3.68 (m, 8H), 3.66-3.62 (m, 1H), 3.42 (d, J = 4.0 Hz, 3H); ¹³C-NMR (D₂O, 125 MHz) δ 99.2, 98.8, 96.6, 78.5, 75.0, 74.6, 74.3, 74.1, 73.8, 72.5, 72.3, 72.1, 72.1, 71.2, 70.6, 64.1, 63.8, 63.5, 57.5; ESI-MS calcd. for

C₁₉H₃₄O₁₆ *m/z* [M+H]⁺ 519.19196, found 519.19165, [M+NH₄]⁺ 536.21851, found 536.21924, [M+Na]⁺ 541.17391, found 541.17456, [M+K]⁺ 557.14784, found 557.14783; [α]_D²¹ = -230.84° (*c* = 0.50, H₂O).

Table 3-4 NMR signals assignment of trisaccharide **1** by HSQC experiment

Residue	δH / δC (ppm)						OMe
	1	2	3	4	5	6	
V (Gal'')	5.16 / 98.8	3.87 / 71.2	3.97 / 72.3	4.03 / 72.1	4.20 / 74.1	3.76 / 64.1	-
S (Gal')	5.38 / 96.6	4.01 / 75.1	4.07 / 72.1	4.09 / 70.6	4.15 / 73.8	3.76 / 63.8	-
R (Glc)	5.11 / 99.2	3.73 / 78.5	3.81 / 74.6	3.48 / 72.5	3.66 / 74.3	3.99 / 63.5	3.45 / 57.5

3.6 Fluorescence spectra of HisH and cHisG in the presence of trisaccharide **1**

Fluorescence spectra of spike H and G proteins were recorded using a Shimadzu RF-5300PC spectrometer. Excitation wavelength (280 nm), excitation slit width (±1.5 nm), and emission slit width (G protein: ±5 nm, H protein: ±15 nm) were fixed throughout the experiments. To a solution of G or H protein (0.4 μM) in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) (2 mL) in a quartz cell at 25 °C, solutions of trisaccharide **1** in 10 mM sodium phosphate buffer (50 μM and 500 μM) was added stepwise by a micro syringe (see table 3-4). Fluorescence emission spectra were recorded in the range from 300 to 500 nm at 0.2 nm increments. The intensities were corrected for dilution factors caused by addition of of ligand solutions ²⁷).

3.7 Fluorometric Titrations of HisH and cHisG with deON and trisaccharide **1**

Fluorometric titrations of spike H and G proteins were performed using a Shimadzu RF-5300PC spectrometer. The excitation wavelength (280 nm) and excitation slit width (± 1.5 nm) were fixed throughout the experiments. To a solution of G or H protein ($0.4 \mu\text{M}$) in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) (2 mL) in a quartz cell at 25 °C, each ligand solutions dissolved in 10 mM sodium phosphate buffer ($50 \mu\text{M}$ and $500 \mu\text{M}$) was added stepwise by a micro syringe (see table 3-4). After the addition of ligands, the fluorescence intensity change of G protein was monitored at emission wavelength 341 ± 5 nm for all ligands. Also, the fluorescence intensity change of H protein was monitored at 341 ± 15 nm for all ligands. The intensities were corrected for dilution factors caused by addition of of ligand solutions, and expressed as relative decrease in percentages, ΔF (%), based on the intensity of the solution without ligands ²⁷).

Table 3-5 The experiment conditions of fluorescence spectra and fluorometric titration in the presence of ligands

Entry	Ligand solutions (concentration/added volume)		Final concentration of ligands (μM)	Final concentration of proteins (μM)
1	-	-	0.000	0.400
2	50 μM	4 μL	0.099	0.399
3		4 μL	0.199	0.398
4		8 μL	0.397	0.397
5		16 μL	0.787	0.394
6		3.2 μL	1.572	0.393
7	500 μM	6.4 μL	3.134	0.392
8		12.8 μL	6.230	0.389

3.8 CD spectra of HisH and cHisG in the presence of several saccharides

CD spectra (200-250 nm) of spike G and H proteins (0.1 mg/mL) in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) were recorded at 25 °C in a quartz cell (1 mm light pass) in the presence of ligands (0, 20, 50, 100 μM) using a JASCO J-720M spectrometer and software by the manufacturer. The scanning parameters were sensitivity: 20 mdeg; scan speed: 10 nm/min; band width: 1.0 nm²⁷⁾.

謝辞

本研究を行うにあたり、ご懇篤なるご指導を賜りました三重大学大学院 生物資源学研究科、稲垣穰教授に心より感謝致します。NMR 測定や有機合成に関するご助言やご指導を賜りました三重大学大学院 生物資源学研究科、増田裕一准教授に深く感謝致します。また、論文審査において副査をして頂きました三重大学大学院 生物資源学研究科、勝崎裕隆准教授に深く感謝致します。

三糖の合成に関するご助言を賜りました岐阜大学 応用生物学部、石田秀治教授ならびに今村彰宏准教授に深く感謝致します。

研究生活において様々な面で支えてくださった生理活性化学・創薬化学研究室の諸先輩方、同輩、後輩に深く感謝致します。さいごに、6年間の学生生活を支えてくれた家族に深く感謝致します。

参考文献

- (1) Brown, D. T.; MacKenzie, J. M.; Bayer, M. E. Mode of Host Cell Penetration by Bacteriophage ϕ X174. *J. Virol.* **1971**, *7* (6), 836–846.
<https://doi.org/10.1128/jvi.7.6.836-846.1971>.
- (2) Kawaura, T.; Inagaki, M.; Karita, S.; Kato, M.; Nishikawa, S.; Kashimura, N. Recognition of Receptor Lipopolysaccharides by Spike G Protein of Bacteriophage ϕ X174. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64* (9), 1993–1997.
<https://doi.org/10.1271/bbb.64.1993>.
- (3) Inagaki, M.; Kawaura, T.; Wakashima, H.; Kato, M.; Nishikawa, S.; Kashimura, N. Different Contributions of the Outer and Inner R-Core Residues of Lipopolysaccharide to the Recognition by Spike H and G Proteins of Bacteriophage ϕ X174. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *226* (2), 221–227.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00601-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00601-3).
- (4) Ohashi, S. バクテリオファージ ϕ X174カプシドタンパク質とLPSの相互作用解析, Mie University, 2020.
- (5) McKenna, R.; Xia, D.; Willingmann, P.; Ilag, L. L.; Krishnaswamy, S.; Rossmann, M. G.; Olson, N. H.; Baker, T. S.; Incardona, N. L. Atomic Structure of Single-Stranded DNA Bacteriophage ϕ X174 and Its Functional Implications. *Nature* **1992**, *355* (6356), 137–143. <https://doi.org/10.1038/355137a0>.
- (6) Asano, A. バクテリオファージ ϕ X174カプシドタンパク質のグルコース結合サイトに関するアミノ酸の機能解析, Mie University, 2021.
- (7) Vinogradov, E. V.; Van Der Drift, K.; Thomas-Oates, J. E.; Meshkov, S.; Brade, H.; Holst, O. The Structures of the Carbohydrate Backbones of the Lipopolysaccharides from *Escherichia Coli* Rough Mutants F470 (R1 Core

- Type) and F576 (R2 Core Type). *Eur. J. Biochem.* **1999**, *261* (3), 629–639.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00280.x>.
- (8) Kawaura, T.; Inagaki, M.; Tanaka, A.; Kato, M.; Nishikawa, S.; Kashimura, N. Contributions of Polysaccharide and Lipid Regions of Lipopolysaccharide to the Recognition by Spike G Protein of Bacteriophage ϕ X174. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67* (4), 869–876. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.869>.
- (9) Haishima, Y.; Holst, O.; Brade, H. Structural Investigation of the Lipopolysaccharide of *Escherichia Coli* F653 Representation of the R3 Core Type. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *203* (1), 127–134.
- (10) Prehm, P.; Stirm, S.; Jann, B.; Jann, K. Cell-Wall Lipopolysaccharide from *Escherichia Coli* B. *Eur. J. Biochem.* **1975**, *56* (1), 41–55.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1975.tb02205.x>.
- (11) Shinoda, C. NMRによるバクテリオファージ ϕ X174スパイクHタンパク質とレセプター糖鎖の相互作用解析, Mie University, 2020.
- (12) Matsuzawa, T. NMR分光法による完全な帰属が可能なバクテリオファージ ϕ X174レセプター糖鎖の合成に関する研究, Mie University, 2021.
- (13) Kojima, H. バクテリオファージ ϕ 174レセプター糖鎖：ガラクトース含有二糖，三糖，四糖の合成およびおその生物活性に関する研究, Mie University, 1991.
- (14) Okada, Y.; Asakura, N.; Bando, M.; Ashikaga, Y.; Yamada, H. Completely β -Selective Glycosylation Using 3,6-*O*-(*O*-Xylylene)-Bridged Axial-Rich Glucosyl Fluoride. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (16), 6940–6943.
<https://doi.org/10.1021/ja301480g>.
- (15) Goto, R.; Inokawa, S.; Sera, A.; Ohtani, S. 単糖類の化学; 丸善, 1998.

- (16) Suzuki, K.; Nagasawa, T. Recent Progress in *O*-Glycoside Synthesis-Methodological Aspects. *J. Synth. Org. Chem. Japan* **1992**, *50* (5), 378–390.
<https://doi.org/10.5059/yukigoseikyokaishi.50.378>.
- (17) Dohi, H.; Nishida, Y. Odorless Access to Thioglycosides for Oligosaccharide Synthesis: Their Design and Advanced Procedures for Thioglycosidation. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2014**, *26* (151), 119–130.
<https://doi.org/10.4052/tigg.26.119>.
- (18) Escopy, S.; Singh, Y.; Demchenko, A. V. Palladium(II)-Assisted Activation of Thioglycosides. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19* (9), 2044–2054.
<https://doi.org/10.1039/d1ob00004g>.
- (19) Inagaki, S.; Ikeda, H.; Yamamoto, H. フロンティア軌道論で理解する有機化学; 化学同人, 2018.
- (20) Chao, C. S.; Lin, C. Y.; Mulani, S.; Hung, W. C.; Mong, K. K. T. Neighboring-Group Participation by C-2 Ether Functions in Glycosylations Directed by Nitrile Solvents. *Chem. - A Eur. J.* **2011**, *17* (43), 12193–12202.
<https://doi.org/10.1002/chem.201100732>.
- (21) Yasomane, J. P.; Demchenko, A. V. From Stereocontrolled Glycosylation to Expedient Oligosaccharide Synthesis. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2013**, *25* (141), 13–42. <https://doi.org/10.4052/tigg.25.13>.
- (22) Imamura, A.; Matsuzawa, N.; Sakai, S.; Udagawa, T.; Nakashima, S.; Ando, H.; Ishida, H.; Kiso, M. The Origin of High Stereoselectivity in Di-*tert*-Butylsilylene-Directed α -Galactosylation. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (19), 9086–9104. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b01685>.
- (23) Imamura, A.; Ando, H.; Ishida, H.; Kiso, M. DTBS Effect: The Unique Sterically

- Driven Director for α -Galactosylation. *Heterocycles* **2008**, 76 (2), 883–908.
[https://doi.org/10.3987/REV-08-SR\(N\)4](https://doi.org/10.3987/REV-08-SR(N)4).
- (24) Kumagai, D.; Miyazaki, M.; Nishimura, S. I. Cyclic Di-*tert*-Butylsilylenediyl Ether Group as a Convenient Protective Group for the Glycoconjugate Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42 (10), 1953–1956. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)00044-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)00044-2).
- (25) Feige, U.; Stirm, S. On the Structure of the *Escherichia Coli* C Cell Wall Lipopolysaccharide Core and on Its ϕ X174 Receptor Region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, 71 (2), 566–573.
- (26) Saito, H. Application and Dynamics of Studies NMR on Carbohydrates Conformation to Determine of Polysaccharides. *J. Synth. Org. Chem. Japan* **1979**, 37 (11), 935–946.
- (27) Inagaki, M.; Kazusa, M.; Hamano, T.; Kojima, H.; Kato, M. Contribution of Negatively Charged Phosphate and KDO Residues on Lipopolysaccharide to the Binding and Conformational Change of Spike G and H Proteins of Bacteriophage ϕ X174. *Nova science publishers, inc.* 2009, pp 337–351.
- (28) Inagaki, M.; Wakashima, H.; Kato, M.; Kaitani, K.; Nishikawa, S. Crucial Role of the Lipid Part of Lipopolysaccharide for Conformational Change of Minor Spike H Protein of Bacteriophage ϕ X174. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, 251 (2), 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.014>.
- (29) Inagaki, M.; Tanaka, A.; Suzuki, R.; Wakashima, H.; Kawaura, T.; Karita, S.; Nishikawa, S.; Kashimura, N. Characterization of the Binding of Spike H Protein of Bacteriophage ϕ X174 with Receptor Lipopolysaccharides. *J. Biochem.* **2000**, 127 (4), 577–583. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022643>.

- (30) Inuki, S.; Aiba, T.; Kawakami, S.; Akiyama, T.; Inoue, J. I.; Fujimoto, Y. Chemical Synthesis of D-Glycero-D-Manno-Heptose 1,7-Bisphosphate and Evaluation of Its Ability to Modulate NF- κ B Activation. *Org. Lett.* **2017**, *19* (12), 3079–3082. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b01158>.
- (31) Wang, C. C.; Lee, J. C.; Luo, S. Y.; Kulkarni, S. S.; Huang, Y. W.; Lee, C. C.; Chang, K. L.; Hung, S. C. Regioselective One-Pot Protection of Carbohydrates. *Nature* **2007**, *446* (7138), 896–899. <https://doi.org/10.1038/nature05730>.
- (32) Inagaki, M.; Kato, M.; Ohsumi, Y.; Kaitani, K.; Nishikawa, S.; Kashimura, N. Simple Preparation of Large Amount of Lipopolysaccharide with Receptor Activity for Bacteriophage ϕ X174 from Escherichia Coli C Strain. *Bull. Fac. Bioresources, Mie Univ.* 1995, pp 33–40.
- (33) Suzuki, R.; Inagaki, M.; Karita, S.; Kawaura, T.; Kato, M.; Nishikawa, S.; Kashimura, N.; Morita, J. Specific Interaction of Fused H Protein of Bacteriophage ϕ X174 with Receptor Lipopolysaccharides. *Virus Res.* **1999**, *60* (1), 95–99. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(98\)00145-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(98)00145-2).
- (34) Inagaki, M.; Ooe, K. 第7章 バクテリオファージ由来スパイクGタンパク質5量体 及びその製造方法. 2006–240117, 2006.
- (35) Parnak, J.; Czerniak, K.; Biedziak, A.; Marcinkowska, K.; Praczyk, T.; Erfurt, K.; Chrobok, A. Herbicidal Ionic Liquid s Derived from Renewable Sources. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 52781–52789. <https://doi.org/10.1039/c6ra06703d>.
- (36) Meng, S.; Zhong, W.; Yao, W.; Li, Z. Stereoselective Phenylselenoglycosylation of Glycals Bearing a Fused Carbonate Moiety toward the Synthesis of 2-Deoxy- β -Galactosides and β -Mannosides. *Org. Lett.* **2020**, *22* (8), 2981–2986. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c00732>.

- (37) Français, A.; Urban, D.; Beau, J. M. Tandem Catalysis for a One-Pot Regioselective Protection of Carbohydrates: The Example of Glucose. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, *46* (45), 8662–8665.
<https://doi.org/10.1002/anie.200703437>.
- (38) Ishiwata, A.; Sakurai, A.; Ito, Y. Accelerated *O*-Glycosylation under Frozen Conditions and Its Application to the Synthesis of Complex Glycans. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2012**, *24* (138), 179–189.
<https://doi.org/10.4052/tigg.24.179>.