

アルキンを有する代謝安定型 GM3 アナログの創製と 光反応性基の開発に向けた基礎研究

2015年度

太田 英介

学位論文 博士（理学）

アルキンを有する代謝安定型 GM3 アナログの創製と
光反応性基の開発に向けた基礎研究

2015年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

太田 英介

目次

第 1 章 本研究の背景と目的	1
1-1. 脂質解析における光親和性標識法	2
1-1-1. 脂質	2
1-1-2. 光親和性標識法と脂質解析	2
1-2. ガングリオシド GM3 とその機能	4
1-2-1. GM3 と EGFR	4
1-2-2. GM3 とシアリダーゼ	7
1-3. 炭素連結型 GM3 アナログ	9
1-4. 既存の光親和性 GM3 プローブ	11
1-5. 本研究の目的	13
1-5-1. 脂質の性質を変えないアルキンの導入位置の決定	13
1-5-2. 非疎水性光反応性基の開発	15
参考文献 第 1 章	16
第 2 章 アルキンを有する炭素連結型 GM3 アナログの創製	19
2-1. アルキンを有する GM3 アナログの合成計画	20
2-2. アルキンを有する炭素連結型 GM3 アナログの合成	22
2-2-1. リゾ GM3 アナログの合成法の確立	22
2-2-2. アシル基を持つアクセプターのグリコシル化	27
2-2-3. DMPM 基を持つアクセプターのグリコシル化	31
2-2-4. グリコシル化成績体から GM3 アナログへの変換	33
2-3. 金触媒を利用するグリコシル化に関する考察	37
2-3-1. 金触媒を利用するグリコシル化と F 原子の影響	37
2-3-2. 保護基がグリコシル化に与える影響	39
2-3-3. 金触媒を利用するグリコシル化における反応過程の考察	40
2-4. アルキンを有する GM3 アナログの生物活性評価	43
参考文献 第 2 章	46

第3章 新規光反応性基の開発	49
3-1. 既存の光反応性基の特徴	51
3-2. 光反応性基としての α -ケトアミド	54
3-2-1. 報告されている α -ケトアミドの光反応	55
3-2-2. 期待した α -ケトアミドのラベル化反応	55
3-2-3. α -ケトアミドを用いたラベル化の可能性	57
3-3. 光親和性マンノースプローブの設計	58
3-4. 水中での α -ケトアミドの性質	59
3-4-1. α -ケトアミドを有するマンノースの合成	59
3-4-2. ハイドレート形成に関する検討	61
3-4-3. α -ケトアミドの光分解速度解析	62
3-5. アルキンを有するマンノースプローブの創製	63
3-5-1. アルキンを有するマンノースプローブの合成	65
3-5-2. ITC を利用したマンノースプローブの評価	68
3-6. マンノースプローブを用いた光親和性標識	71
3-6-1. クリックケミストリーの条件最適化	71
3-6-2. 非特異的標識の抑制に向けた検討	74
3-6-3. 5 種類の α -ケトアミドを用いた光親和性標識実験	78
3-6-4. 光親和性標識における pH 依存性	79
3-7. 光親和性標識実験の考察	82
3-7-1. 光分解物の解析	82
3-7-2. Et 体および <i>t</i> -Bu 体の標識効率に関する考察	88
3-7-3. <i>i</i> -Pr 体および Ph 体の標識効率に関する考察	90
3-7-4. Thienyl 体の標識効率に関する考察	91
3-7-5. 一置換 α -ケトアミドの推定ラベル化機構	92
3-8. α -ケトアミドのシクロプロパノール形成反応	93
3-8-1. α -ケトアミドのシクロプロパノール形成反応の背景	93
3-8-2. 窒素原子上の置換基の検討	95
3-8-3. 反応溶媒の検討	98
3-8-4. ケト置換基の検討	99
3-8-5. シクロプロパノールの立体化学の決定	102

3-8-6. シクロプロパノール形成反応における速度論的同位体効果	106
参考文献 第3章	108
第4章 光親和性標識を指向した α -ケトエステルの光反応	111
4-1. 酸素原子に隣接するプロトンのない α -ケトエステル	112
4-2. 一般的な α -ケトエステルの光反応	113
4-3. 炭素-炭素結合形成を伴う α -ケトエステルの光反応	113
4-4. 置換基 R^1 および R^2 の最適化	115
4-5. <i>N,N</i> -Dimethylacetamide とのカップリング反応	116
4-6. 電子移動を経るフタルイミド誘導体の環化反応	117
4-7. アミドおよびエーテルを溶媒とする光反応	119
4-8. アルコールを溶媒とする光反応	122
4-9. アルカンを溶媒とする光反応	123
4-10. カップリングパートナーの等量の検討	124
4-11. Tetrahydro-1,4-diazepine-2,5-dione の合成	126
4-12. 光反応性基としての α -ケトエステル	127
参考文献 第4章	128
第5章 総括	129
Experimental Section	130
General	130
Chapter 2	131
Chapter 3	152
Chapter 4	196
謝辞	216

略語表

便宜上、本論文の全般において以下に示す略号を用いた。

Ac	acetyl
Ar	aromatic substituent
ax.	axial
Bn	benzyl
BOM	benzyloxymethyl
<i>n</i> -Bu	<i>n</i> -butyl
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -butyl
Bz	benzoyl
CAN	ceric ammonium nitrate
calcd	calculated
CBB	Coomassie Brilliant Blue
Cbz	benzyloxycarbonyl
Cer	ceramide
COMU	(1-cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylaminomorpholinocarbenium hexafluorophosphate
Con A	concanavalin A
COSY	correlation spectroscopy
CPME	cyclopentyl methyl ether
CSA	camphor-10-sulfonic acid
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DMAP	4-(dimethylamino)pyridine
DMPM	3,4-dimethoxyphenylmethyl
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DMTST	dimethyl(methylthio)sulfonium triflate
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide
EGFR	epidermal growth factor receptor
ESI	electrospray ionization
eq.	equivalent
Et	ethyl
Gal	galactose

h	hour
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMPA	hexamethylphosphoramide
HPLC	high performance liquid chromatography
IL	interleukin
imid.	imidazole
ITC	isothermal titration calorimetry
LacCer	lactosylceramide
LED	light-emitting diode
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization
Me	methyl
min	minute
MP	<i>p</i> -methoxyphenyl
MS	mass spectrometry
Ms	methanesulfonyl
Neu	neuraminic acid
NEU	neuraminidase
NMM	<i>N</i> -methylmorpholine
NMP	<i>N</i> -methyl-2-pyrrolidone
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear Overhauser effect
Nu	nucleophile
ODS	octadecylsilane
P	protecting group
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
Ph	phenyl
PPTS	pyridinium <i>p</i> -toluenesulfonate
<i>i</i> -Pr	<i>iso</i> -propyl
Py.	pyridine
quant.	quantitative
R	alkyl
rt	room temperature
sat.	saturated
SDS	sodium dodecyl sulfate
SET	single electron transfer
Sia	sialic acid

Sph	sphingosine
TBAF	tetrabutylammonium fluoride
TBAB	tetrabutylammonium bromide
TBDPS	<i>tert</i> -butyldiphenylsilyl
TBS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
temp.	temperature
Tf	trifluoromethanesulfonyl
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
TLC	thin layer chromatography
TMS	trimethylsilyl
TOF	time of flight
Tr	triphenylmethyl (trityl)
Ts	<i>p</i> -toluenesulfonyl
UV	ultraviolet

第1章 本研究の背景と目的

1-1. 脂質解析における光親和性標識法

1-1-1. 脂質

1-1-2. 光親和性標識法と脂質解析

1-2. ガングリオシド GM3 とその機能

1-2-1. GM3 と EGFR

1-2-2. GM3 とシアリダーゼ

1-3. 炭素連結型 GM3 アナログ

1-4. 既存の光親和性 GM3 プローブ

1-5. 本研究の目的

1-5-1. 脂質の性質を変えないアルキンの導入位置の決定

1-5-2. 非疎水性光反応性基の開発

1-1. 脂質解析における光親和性標識法

1-1-1. 脂質

生体膜は主に膜脂質と膜タンパク質から構成され、全ての細胞の境界を形成している。生体膜に存在する主な脂質は、リン脂質、糖脂質、そしてステロールであり、いずれも親水性部と疎水性部を持つ両親媒性分子である。1972 年に Singer と Nicolson によって流動モザイクモデルが提唱されて以降¹、生体膜の構造や機能は精力的に研究されてきたが、膜タンパク質と比べると解析手法の乏しい膜脂質の解析は遅れている^{2,3}。脂質は、構造が単純で、修飾位置が少なく、プローブ設計が難しい。主に水を扱う生化学実験系では両親媒性分子は取り扱いにくい上、ゲノムに直接コードされない脂質は遺伝子操作による制御が困難であり、脂質の機能の多くは未だ明らかになっていない。

1-1-2. 光親和性標識法と脂質解析

生体内での脂質の機能や局在を解析する上で、相互作用する分子の同定は重要な手掛かりとなる。光親和性標識法は、脂質と相互作用するタンパク質の解析に古くから利用されてきた⁴。光親和性標識法は、リガンドと標的タンパク質の親和性を利用する親和性標識の一種であり、共有結合の形成に光照射を利用する (**Figure 1-1**)。リガンドに搭載した光反応性官能基は光照射によって励起され、近傍のタンパク質と共有結合を形成する。カルベンやナイトレン、ラジカルといった高反応性活性種が結合形成に利用されるが、その詳細は第 3 章で後述する。

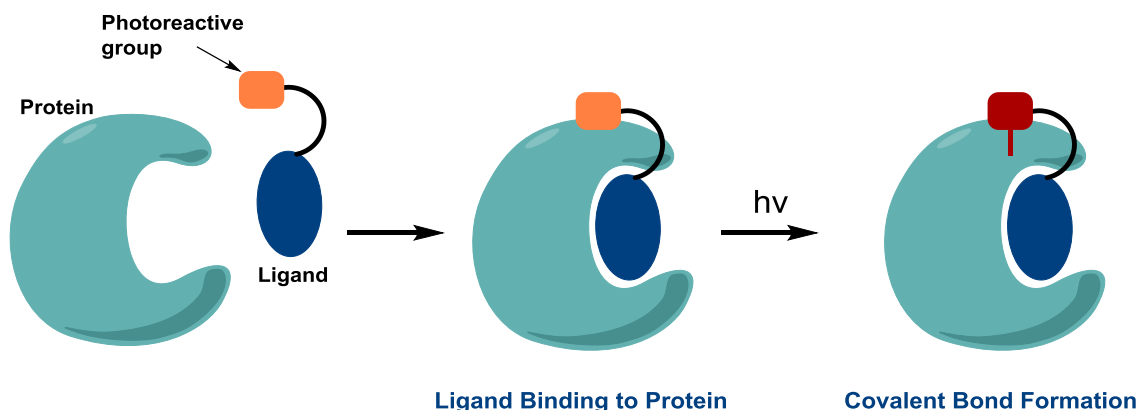


Figure 1-1. Schematic Illustration of Photoaffinity Labeling.

脂質は1分子が特定の膜タンパク質と結合して機能を発揮する場合がある一方で、集合体を形成してシグナル伝達の間を作り出す。例えば、スフィンゴ糖脂質は細胞膜上で一過性のクラスターを形成し、シグナル伝達に関与すると考えられている⁵。人工膜を用いた実験ではスフィンゴ糖脂質を外葉だけに局在させることができず、本来、細胞膜の外側にのみ存在するスフィンゴ糖脂質の相互作用は解析できない⁶。現段階では、生体内の環境を再現しつつ脂質を解析する手段は限られており、生細胞で実施できる光親和性標識は脂質の相互作用解析に有用な手段となる。

一方、光親和性標識を達成するには、元の分子と同じ性質を持つプローブを用意する必要がある。元の分子と異なる性質を持つプローブで得られた解析結果は、実際に起こっている現象とは異なる結論を導く危険性がある。一般的に、活性を保持したプローブを見つけ出すには、構造活性相関などでプローブの構造を最適化する必要があり、この工程に時間を要する場合も多い。しかし、生細胞に光親和性プローブを取り込ませ、より生体内の環境に近い状態で相互作用を解析できる点は、光親和性標識の大きな長所であると言える。

1-2. ガングリオシド GM3 とその機能

1-2-1. GM3 と EGFR

ガングリオシドは一つ以上のシアル酸を含むスフィンゴ糖脂質の一種であり、シアル酸の数や結合様式によって様々な分子種が存在する。代表的なガングリオシドの一つである GM3 は、スフィンゴ糖脂質であるセラミドとシアル酸、ガラクトース、グルコースの三糖から構成される。

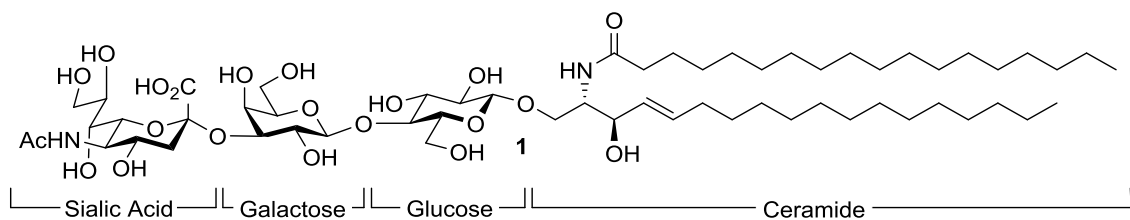


Figure 1-2. Structure of Ganglioside GM3 (1-1)

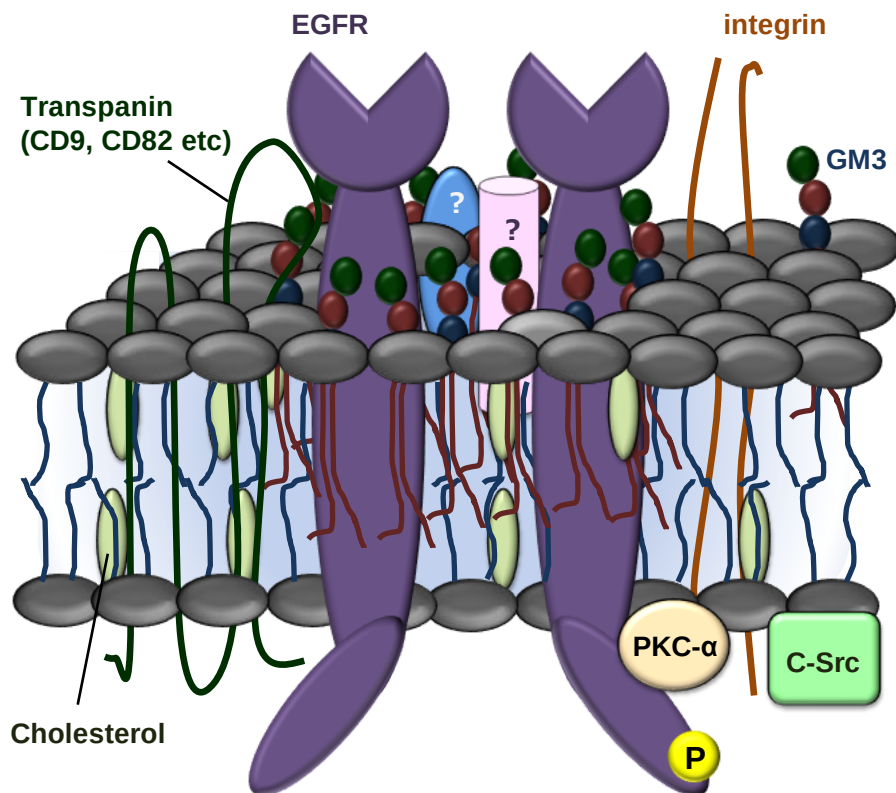


Figure 1-3. Putative Structure of GM3-enriched Microdomain

GM3 は生命維持に深く関わる分子である。主に細胞膜上に局在し、種々のシグナルタンパク質と細胞膜上で“膜マイクロドメイン”を形成し、分化や増殖などのシグナル伝達を制御すると考えられている。

GM3 を含むスフィンゴ糖脂質は、殆どが脂質二重膜の外葉に局在すると考えられている。スフィンゴ糖脂質は細胞外に突き出した糖鎖の水素結合を利用して、お互いに引き合い、コレステロールを含むクラスター（膜マイクロドメイン）を構築すると考えられている。これまでの精力的な研究により、膜マイクロドメインには **Figure 1-3** に示す膜タンパク質が存在すると考えられている⁷⁻⁹。これらのタンパク質の中でも、増殖因子受容体 EGFR は古くから GM3 との関連が示唆されている⁴。

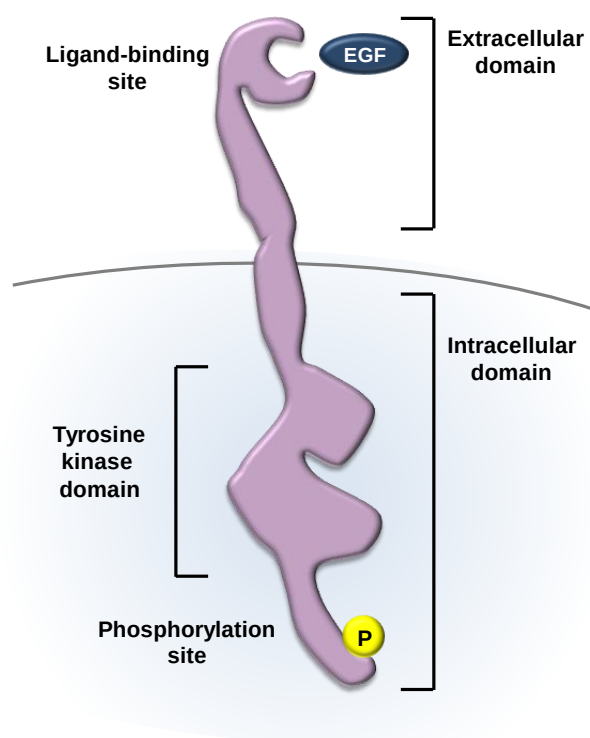


Figure 1-4. Structure of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

EGFR はチロシンキナーゼドメインを有する、分子量 170kDa の膜貫通型糖たんぱく質で、HER/ErbB ファミリーに属する (**Figure 1-4**)。上皮系細胞をはじめとする多くの細胞で発現しており、細胞の分化や増殖において重要な役割を果たしている。上皮成長因子 EGF や TGF- α が細胞外にある EGFR のリガンド結合ドメインに結合すると、構造変化を引き起こし、ホモ二量体を形成する。この

際、細胞内のチロシンキナーゼドメインがチロシン残基をリン酸化（自己リン酸化）することで、細胞増殖に関わる下流のシグナルを活性化する。

GM3 は EGFR と結合してチロシンキナーゼ活性を抑制することで、EGFR の二量化と自己リン酸化を抑制し、細胞増殖を抑えることが知られている¹⁰⁻¹⁴。GM3 の糖鎖構造は EGFR との相互作用において重要な役割を果たす。2002 年 Bremer らは、EGFR の細胞外領域が他のガングリオシド GM1、GM2、GD1a よりも、GM3 と強く相互作用することを報告した¹²。これら 4 種のガングリオシドの内、GM3 のみが分岐のないシアリルラクトース構造を持っている。また、EGFR の GM3 との相互作用サイトは EGF 結合サイトとは独立したものであることも興味深い。

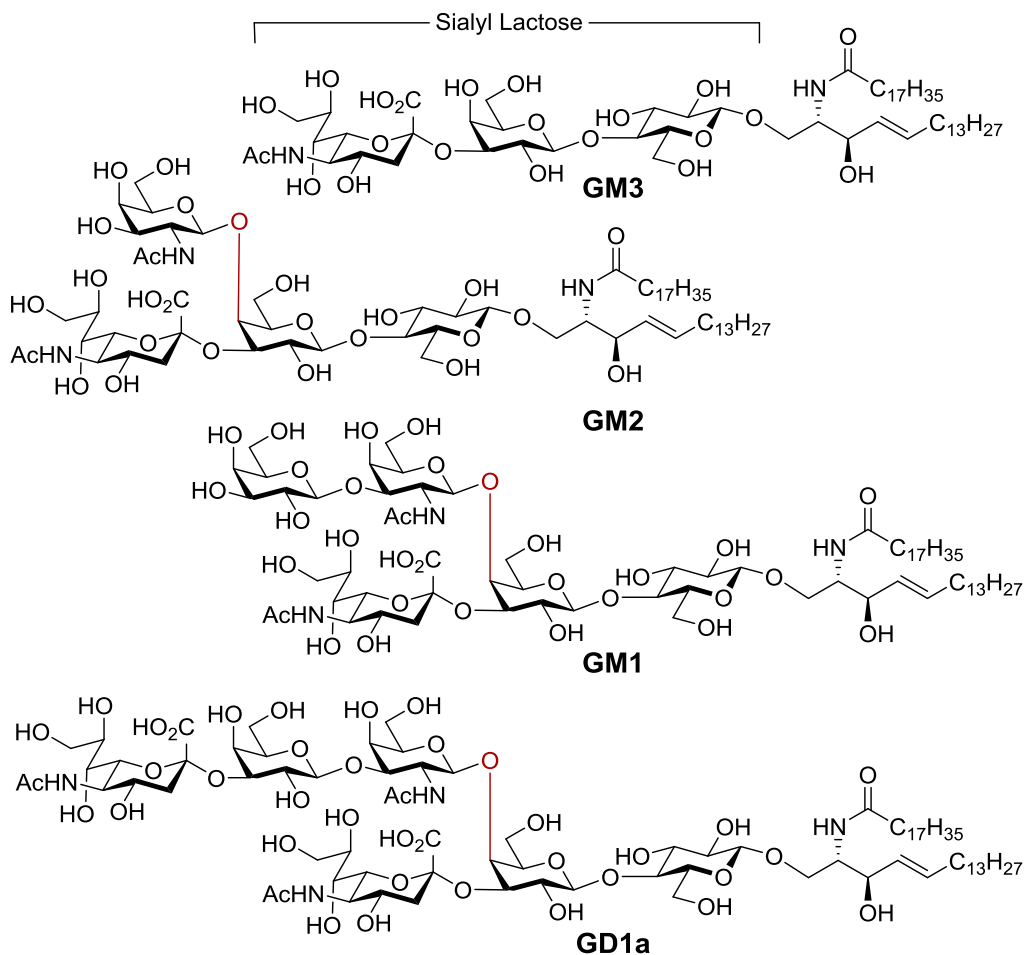


Figure 1-5. Structures of Gangliosides GM3, GM2, GM1, and GD1a

一方 Hakomori らは、GM3 が EGFR の細胞外ドメインに位置する N 型糖鎖と相互作用し、チロシンキナーゼ活性を制御することを報告した。GM3 と N 型糖鎖の末端 GlcNAc との特異的な糖鎖-糖鎖相互作用が、EGF の関与するチロシンキナーゼ活性を制御することが示唆された¹³。

一方、細胞接着因子インテグリンを介した GM3 と EGFR の相互作用も知られている。インテグリンは細胞接着の中心を担う膜タンパク質で、 α サブユニットと β サブユニットからなる。Paller らは内因性 GM3 の蓄積が、EGFR とインテグリン β_1 鎖の相互作用を妨害し、結果として細胞増殖を阻害することを報告した¹⁵。また、PKC- α を介した相互作用も知られる。活性化した PKC- α は細胞質から細胞膜へと移行し、EGFR の Thr654 をリン酸化することで、EGFR シグナリングを抑制した。Paller らは、マイクロドメインにおいて、GM3、caveolin-1、tetraspanin CD82 が EGFR と PKC- α の相互作用を可能にし、その結果 EGFR シグナリングを抑制すると推測した¹⁶。GM3 は細胞膜上で様々なシグナルタンパク質と相互作用するが、特に EGFR との直接的な相互作用では、GM3 の糖鎖構造が認識に関わることが示唆される。

1-2-2. GM3 とシアリダーゼ

ヒトシアリダーゼは、糖鎖の非還元末端からシアル酸残基を加水分解するエキソ型グリコシダーゼであり、現在までに NEU1、NEU2、NEU3、NEU4 の 4 種類が知られている。これらはそれぞれ、細胞内局在や基質特異性、機能が異なっており、中でも、NEU3 はガングリオシドの末端シアル酸のみを加水分解するという独特の基質特異性を有する^{17,18}。GD3、GM3、GM4、GD1a などの非還元末端のシアル酸は加水分解するが、GM2、GM1 などの枝分かれしたシアル酸は加水分解しにくい¹⁹。

また、NEU3 がシアリルラクトースと反応しないことは、セラミド部位が基質の認識に影響することを示唆している。2011 年、Cairo らは種々の GM3 アナログを基質に用いて、NEU3 による加水分解速度を算出した²⁰。シアル酸部位に芳香環を導入したものや、脂肪鎖が短いアナログを用いると、加水分解速度は GM3 と比べ大幅に低下した。この結果から、彼らは NEU3 の基質認識にはシア

ル酸と疎水性のアグリコンの両部位が関わりと推察している。

Table 1-1. General Properties of Human Sialidases.¹⁷

Sialidase	Location	Function	Substrate Specificity
Neu1	Lysosomes	Degradation in Lysosomes Immune Function etc.	Oligosaccharides Glycopeptides
Neu2	Cytosol	Myoblast Differentiation Neural Differentiation	Oligosaccharides Glycopeptides Gangliosides
Neu3	Plasma Membranes	Neural Differentiation Apoptosis, Adhesion	Gangliosides
Neu4	Lysosomes Mitochondria and ER	Neural Differentiation Apoptosis, Adhesion	Oligosaccharides Glycopeptides Gangliosides

細胞膜上に局在する NEU3 は、ガングリオシドと相互作用することでトランスメンブレンシグナリングを制御し、分化や増殖、アポトーシスにおいて重要であると考えられている。特にがんにおける NEU3 の役割は Miyagi らによって精力的に研究されてきた^{17,18}。NEU3 の過剰発現は種々のヒトがんで見出されており、EGFR、FAK、ILK、Shc、integrinβ₄等の、がん細胞で活性化される分子を活性化することで、がんの悪性度を増強させると考えられている。興味深いことに、大腸がん細胞や腎がん細胞では、NEU3 発現上昇とともに、GM3 の代謝で産生されるラクトシルセラミドの蓄積が確認された。このラクトシルセラミドを大腸がん細胞に添加するとアポトーシスが抑制される²¹。

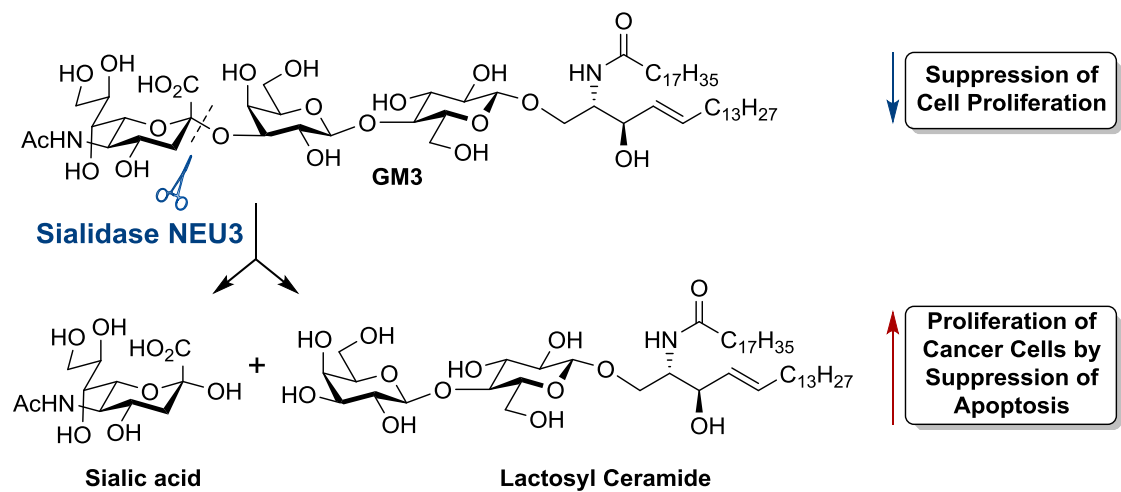


Figure 1-6. Hydrolysis of Gangliosides by Silidase NEU3.

1-2-1 では GM3 が EGFR と相互作用して細胞増殖を抑制することを述べたが、その一方で GM3 の代謝産物であるラクトシルセラミドはアポトーシスを抑制し、がん細胞の増殖に有利に働くと考えられる。つまり、がん細胞における GM3 の役割は NEU3 による代謝の前後で劇的に変化しており、ガングリオシドの糖鎖構造はその生物学的機能に大きな意味を持っている。

1-3. 炭素連結型 GM3 アナログ

代謝による糖鎖の構造変化は、GM3 の生物学的機能の解析をより複雑にしている。GM3 の機能解析には内因性 GM3 の過剰発現や、GM3 合成酵素の欠損などの分子生物学的手法が用いられてきた。これは遺伝子に変異を導入した時の表現型の変化に着目するアプローチである。しかし、生存に必須な遺伝子を壊してしまった場合に変異体が作製できないなど欠点も存在する。一方、この手法と相補的な位置づけとして、低分子化合物を生体に添加し表現型を観察するアプローチが存在する（ケミカルジェネティクス）。しかし、天然型 GM3 を細胞に投与しても、生体内のシアリダーゼによって加水分解されてしまうため、観察している細胞が示す表現型は、必ずしも GM3 の機能を反映していない可能性が考えられる。

そこで、Sodeoka らは GM3 の機能解析を目指し、代謝に安定で、ガングリオシドの構造・性質・生物活性を再現するアナログの創製を進めてきた²²⁻²⁴。生体内で安定な GM3 アナログは、膜マイクロドメインにおけるガングリオシドの役割や機能を解析するプローブへの応用が期待される。

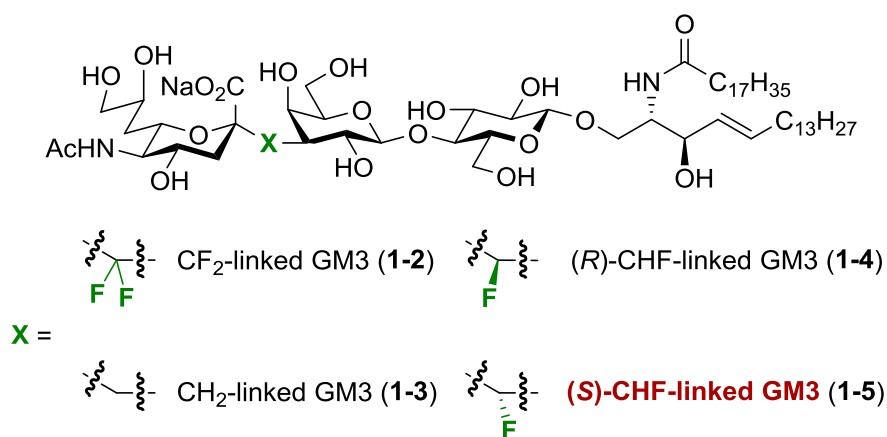


Figure 1-7. Structures of Sialidase-resistant GM3 Analogues (1-2~1-5)

Sodeoka らは GM3 の末端シアル酸がシアリダーゼに切断されることに着目し、シアロシド結合の酸素原子を炭素原子に置き換えた、代謝安定型 GM3 アナログを開発した (**Figure 1-7**)²⁵。異なった炭素連結部を持つ 4 種類のアナログは、Had-1 細胞²⁶ に対する影響に違いが見られた。すなわち、CH₂、CF₂、(S)-CHF、(R)-CHF の 4 種類の炭素連結部を持つアナログの内、(S)-CHF 連結型アナログを添加した際に、最も Had-1 細胞の増殖促進効果が見られた。この結果から、(S)-CHF 体はより GM3 を模倣する上でふさわしいアナログだと結論付けられている。

糖鎖のコンホメーションは二面角 ϕ (C1'-C2'-O-C3) および ψ (H3-C3-O-C2') で記述できる。天然に存在する O-シアロシド結合の二面角 ϕ は ϕ -60°の *exo-gauche* 型と 180°の *exo-anti* 型配座が有利になると考えられている (**Figure 1-8**)。これは、シアロシド結合の酸素原子の非共有電子対が、反結合性軌道 $\sigma^*_{C2'-O}$ と重なるようなコンホメーションが有利になるためで、エキソアノマー効果として知られている。詳細はここでは割愛するが、計算化学と NMR を利用したコンホメーション解析から、(S)-CHF 体の安定配座は ϕ -60°の *exo-gauche* 型であると示唆された²⁵。(S)-CHF 体は天然型が持つ 2 つの安定配座のうち一方を、選択的に再現した。

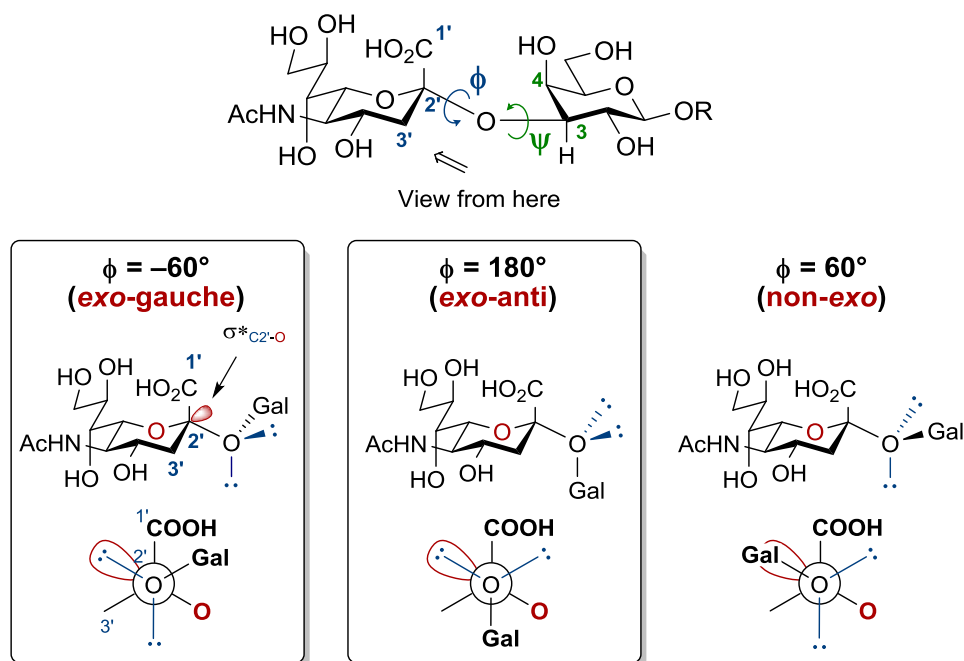


Figure 1-8. *exo*-Anomeric Effect on O-Sialoside bond

1-4. 既存の光親和性 GM3 プローブ

Peng らの報告によれば、既存の光親和性脂質プローブは導入した光反応性基の位置によって3つに大別できる⁴。極性頭部に光親和性基を有する Type 1、疎水性の尾部に光親和性基を有する Type 2、そして二分子の脂質を脂肪鎖側で連結した Type 3 である (Figure 1-9A)。Type 3 は脂肪鎖を連結する位置に光親和性基を持つ。このプローブは Type 2 の欠点を克服するために開発された。尾部に光親和性基を有する Type 2 のリン脂質プローブは、熱揺らぎの影響により、自身の極性頭部付近を標識してしまうことが知られている (Figure 1-9B)²⁷。

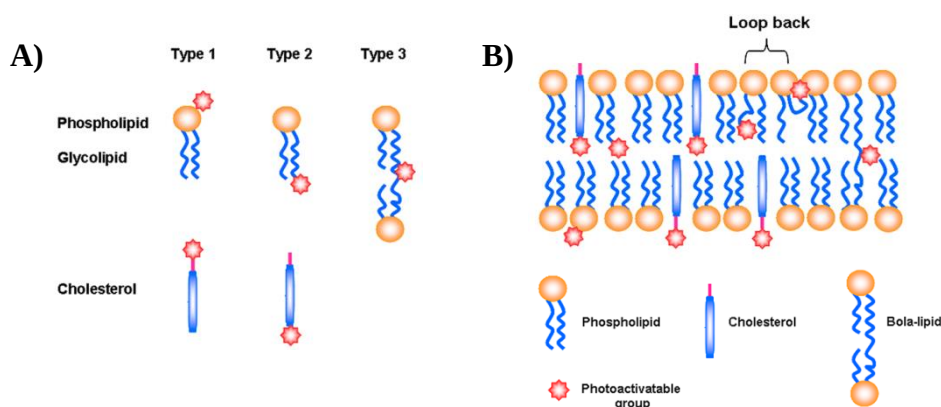
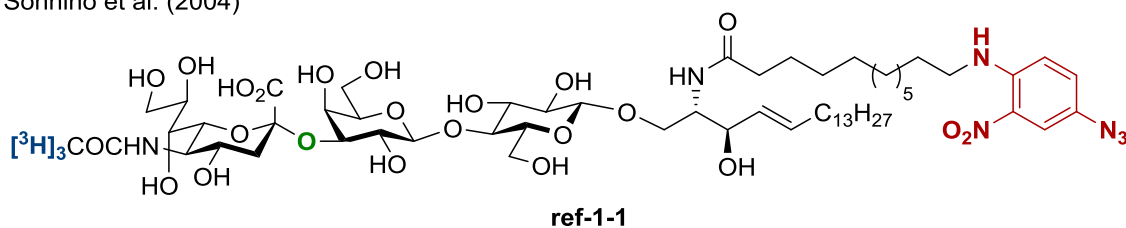


Figure 1-9. (A) Schematic presentation of different photoactivatable lipid probes used for investigating biomembranes. (B) Type 3 probes were developed to avoid the drawback of Type 2 phospholipid probes, which tend to loop back to probe the regions close to the polar head (modified from Peng Xia, Y.; Peng, L. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (10), 7880–7929.).⁴

GM3 と相互作用するタンパク質を生細胞で同定する試みは、10 年以上前から知られている。GM3 の光親和性プローブを用いた標識実験は、これまでに数例の報告があるが、GM3 の結合タンパク質について明確な結論は出ていない (Figure 1-10)²⁸⁻³¹。2003 年、Sonnino らは光反応性基である nitrophenylazide 基を脂肪鎖に、³H をシアル酸のアセトアミド部位にそれぞれ導入した光親和性 GM3 プローブ **ref-1-1** を創製した^{30,31}。光親和性標識実験の結果、GPI アンカータンパク質 TAG-1 が同定されたものの、GM1 や GD3 の光親和性プローブを利用した実験においても TAG-1 が標識されることが分かっており、標識実験の結

果が糖鎖構造を反映したものではないことを自ら述べている。この他にも、**ref-1-1** を用いた光親和性標識実験によって、インスリンレセプターIR や CD9 が GM3 と相互作用するタンパク質として同定されている^{32,33}。しかし、前者は TNF- α 処理によってインスリン抵抗性状態を人為的に作り出した脂肪細胞を用いている。一方、後者は CD9 が過剰発現した HRT18 細胞で標識実験を実施しており、いずれも特異な環境下での相互作用を解析している。また、**ref-1** の開発者自身が述べているように、疎水性が高い光反応性基を脂肪鎖に導入しているプローブは、GM3 本来の性質を失っている可能性があり、標識実験結果の解釈が難しい。なお、Pacuszka らによって開発された **ref-1-2** を用いた光親和性標識においても、GM3 の結合タンパクは同定されていない。

Sonnino et al. (2004)



Pacuszka et al. (1998, 2000)

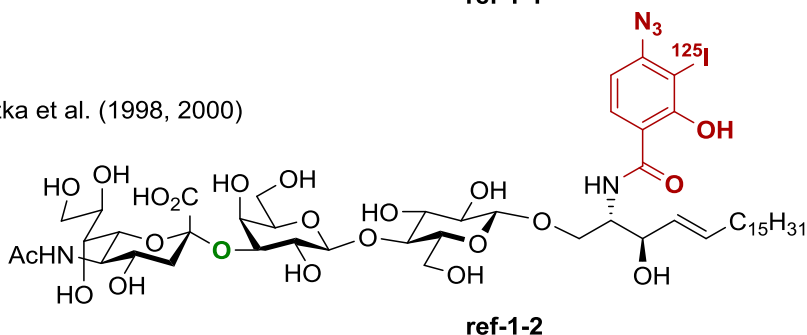


Figure 1-10. Reported Photoaffinity GM3 Probes.

1-5. 本研究の目的

筆者は既存の光親和性 GM3 プローブの問題点として、1) 糖鎖構造が細胞内加水分解酵素によって分解され別の糖脂質に変化してしまうこと、2) 光反応性基を脂肪鎖に導入することで元の脂質の性質を失っていること、そして3) 糖鎖-タンパク質相互作用を解析し易い位置に光反応性基を持たないことに着目した。これらの問題点のうち、代謝に関しては、Sodeoka らによって開発された炭素連結型 GM3 アナログ **1-5** が利用できると思った。**1-5** は GM3 の構造や性質、生物活性を再現する²⁵。残る 2 つの問題点を解決する為、炭素連結型 GM3 アナログの脂肪鎖にコンパクトなアルキンタグを導入し、糖-タンパク質相互作用に影響の少ない非疎水性の光反応性基を糖部に搭載した、新規 GM3 光親和性プローブ **1-6** を設計した (Figure 1-11)。

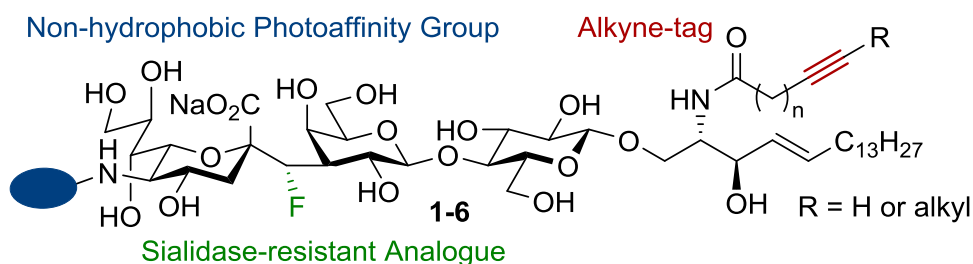


Figure 1-11. Molecular Design of Novel GM3 Photoaffinity Probe (**1-6**)

1-5-1. 脂質の性質を変えないアルキンの導入位置の決定

先に述べたように、脂質の疎水性部位に光親和性基を導入したプローブ (Type 2) は、熱揺らぎの影響を受けて親水性頭部を標識することや、脂質の性質変化を招くことが懸念される。しかし、代謝安定型アナログを利用すればシアロシド結合が代謝によって切断されない為、シアル酸部に光反応性基を導入できる。GM3 の機能を模倣する上で鍵となるのは、解析を容易にする検出基の導入である。光親和性標識後のプローブ-タンパク質複合体を解析するには、蛍光団やビオチンなどの検出基が通常用いられるが、これらの比較的大きな検出基をプローブ分子に直接導入すると、GM3 の性質が変化してしまう事が予想される。

そこでアルキンを分子内にあらかじめタグとして導入し、光親和性標識後にこれらの検出用の官能基をクリックケミストリーによって導入する事を考えた。なお、末端アルキンとの反応にはアジドとの環化付加反応が良く利用される³⁴。一方、内部アルキンを導入した場合には、コバルト錯体を利用した検出法が適用できると考えられる³⁵⁻³⁷。糖脂質の両親媒性を考慮するとアルキンは脂肪鎖に導入するのが好ましいが、前述のようにスフィンゴ糖脂質の脂肪鎖は、クラスター形成に重要な役割を果たしている。近年の報告によれば、脂肪鎖を構成するメチレン基はその位置によって運動性が異なり、アルキンを導入する位置は慎重に検討する必要がある。

Murata らは位置選択的に重水素化した 19 種類のスフィンゴミエリン (SM) と ²H-NMR を利用して、スフィンゴミエリン脂肪鎖の運動性を解析した (Figure 1-12)³⁸。SM のみの二重膜を解析すると、脂肪鎖の運動性は末端にいくにつれて増加するのに対し、SM とコレステロール (1:1) から調製したリポソームを解析した場合は、脂肪鎖の中央付近の運動性が最も低かった。この傾向はスフィンゴシン鎖、ステアシル鎖で共通しており、ラフト膜上ではコレステロールが SM 脂肪鎖中央部と相互作用する可能性を示した。

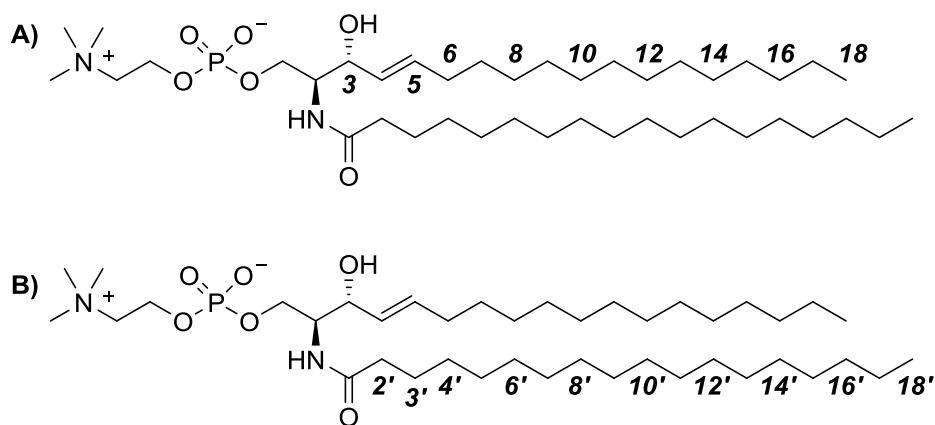


Figure 1-12. *N*-stearoylsphingomyelin that has been site-specifically deuterium-labeled on the sphingosine (A) and stearoyl chains (B).³⁸

以上のことを考慮すると、脂肪鎖に導入したアルキンの位置によって GM3 の性質が変化する可能性は十分に考えられる。しかし、脂肪鎖のどの位置に三重結合を導入すれば、元の脂質の性質を再現できるか明確な指針はなかった。そ

ここで、脂肪鎖に導入するアルキンの位置を決定することを、本研究の第一の目的とした。

1-5-2. 非疎水性光反応性基の開発

GM3 光親和性プローブの創製にあたり、第二の要点となるのは糖部にどのような光反応性基を導入するかである。前述のように、光反応性基を脂質部に導入した GM3、GM1 および GD3 の光親和性プローブは、糖鎖構造が異なるにもかかわらず、同じタンパク質を標識した。このことから、糖鎖-タンパク質相互作用の検出には、糖鎖に光反応性基を導入する必要があることがうかがえる。しかし、既存の光反応性基は疎水性を示すものが多く、導入によって糖鎖の性質変化を誘導する可能性がある。そこで、糖-タンパク質相互作用の解析に適した、非疎水性の新規光反応性基の開発を本研究の第二の目的とした。

参考文献 第 1 章

- (1) Singer, S. J.; Nicolson, G. L. *Science* **1972**, 175 (4023), 720.
- (2) 池ノ内順一; 藤本豊土. In *実験医学* Vol.28 No.8; 羊土社, 2010; pp 1206–1211.
- (3) 花田賢太郎; 深見希代子. In *実験医学* Vol.24 No.7; 羊土社, 2006; pp 900–904.
- (4) Xia, Y.; Peng, L. *Chem. Rev.* **2013**, 113 (10), 7880.
- (5) Simons, K.; Ikonen, E. *Nature* **1997**, 387 (6633), 569.
- (6) Kobayashi, T. *Seikagaku* **2009**, 81 (1), 17.
- (7) Munro, S. *Cell* **2003**, 115 (4), 377.
- (8) Regina Todeschini, A.; Hakomori, S. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, 1780 (3), 421.
- (9) Hakomori, S. *FEBS Lett.* **2010**, 584 (9), 1901.
- (10) Bremer, E. G.; Schlessinger, J.; Hakomori, S. *J. Biol. Chem.* **1986**, 261 (5), 2434.
- (11) Wang, X.-Q.; Sun, P.; O’Gorman, M.; Tai, T.; Paller, A. S. *Glycobiology* **2001**, 11 (7), 515.
- (12) Miljan, E. A.; Meuillet, E. J.; Mania-Farnell, B.; George, D.; Yamamoto, H.; Simon, H.-G.; Bremer, E. G. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (12), 10108.
- (13) Yoon, S.-J.; Nakayama, K.; Hikita, T.; Handa, K.; Hakomori, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103 (50), 18987.
- (14) Kawashima, N.; Yoon, S.-J.; Itoh, K.; Nakayama, K. -i. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284 (10), 6147.
- (15) Wang, X.-Q.; Sun, P.; Paller, A. S. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (49), 48770.
- (16) Wang, X. -q.; Yan, Q.; Sun, P.; Liu, J.-W.; Go, L.; McDaniel, S. M.; Paller, A. S. *Cancer Res.* **2007**, 67 (20), 9986.
- (17) Miyagi, T.; Yamaguchi, K. *Glycobiology* **2012**, 22 (7), 880.

- (18) Miyagi, T.; Wada, T.; Yamaguchi, K.; Shiozaki, K.; Sato, I.; Kakugawa, Y.; Yamanami, H.; Fujiya, T. *Proteomics* **2008**, 8 (16), 3303.
- (19) Oehler, C.; Kopitz, J.; Cantz, M. *Biol. Chem.* **2002**, 383 (11), 1735.
- (20) Sandbhor, M. S.; Soya, N.; Albohy, A.; Zheng, R. B.; Cartmell, J.; Bundle, D. R.; Klassen, J. S.; Cairo, C. W. *Biochemistry* **2011**, 50 (32), 6753.
- (21) Kakugawa, Y.; Wada, T.; Yamaguchi, K.; Yamanami, H.; Ouchi, K.; Sato, I.; Miyagi, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99 (16), 10718.
- (22) Hirai, G.; Watanabe, T.; Yamaguchi, K.; Miyagi, T.; Sodeoka, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (50), 15420.
- (23) Watanabe, T.; Hirai, G.; Kato, M.; Hashizume, D.; Miyagi, T.; Sodeoka, M. *Org. Lett.* **2008**, 10 (19), 4167.
- (24) Sodeoka, M.; Hirai, G.; Watanabe, T.; Miyagi, T. *Pure Appl. Chem.* **2009**, 81 (2), 205.
- (25) 加藤麻理依. Development of sialidase-resistant ganglioside GM3 analogues : a novel approach with focus on the conformational regulation of the flexible sialoside-linkage by fluorine, 東京医科歯科大学, 2013.
- (26) Taki, T.; Ogura, K.; Rokukawa, C.; Hara, T.; Kawakita, M.; Endo, T.; Kobata, A.; Handa, S. *Cancer Res.* **1991**, 51 (6), 1701.
- (27) Delfino, J. M.; Schreiber, S. L.; Richards, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115 (9), 3458.
- (28) Pacuszka, T.; Panasiewicz, M. *Acta Biochim. Pol.* **1998**, 45 (2), 509.
- (29) Pacuszka, T.; Panasiewicz, M. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2000**, 43 (13), 1255.
- (30) Mauri, L.; Prioni, S.; Loberto, N.; Chigorno, V.; Prinetti, A.; Sonnino, S. *Glycoconj. J.* **2004**, 20 (1), 11.
- (31) Loberto, N.; Prioni, S.; Prinetti, A.; Ottico, E.; Chigorno, V.; Karagogeos, D.; Sonnino, S. *J. Neurochem.* **2003**, 85 (1), 224.

- (32) Kabayama, K.; Sato, T.; Saito, K.; Loberto, N.; Prinetti, A.; Sonnino, S.; Kinjo, M.; Igarashi, Y.; Inokuchi, J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (34), 13678.
- (33) Ono, M.; Handa, K.; Sonnino, S.; Withers, D. a; Nagai, H.; Hakomori, S. *Biochemistry* **2001**, *40* (21), 6414.
- (34) Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. *Drug Discov. Today* **2003**, *8* (24), 1128.
- (35) Milne, S. B.; Tallman, K. a; Serwa, R.; Rouzer, C. a; Armstrong, M. D.; Marnett, L. J.; Lukehart, C. M.; Porter, N. a; Brown, H. A. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6* (3), 205.
- (36) Tallman, K. a; Armstrong, M. D.; Milne, S. B.; Marnett, L. J.; Brown, H. A.; Porter, N. a. *J. Lipid Res.* **2013**, *54* (3), 859.
- (37) Egami, H.; Kamisuki, S.; Dodo, K.; Asanuma, M.; Hamashima, Y.; Sodeoka, M. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (22), 7667.
- (38) Matsumori, N.; Yasuda, T.; Okazaki, H.; Suzuki, T.; Yamaguchi, T.; Tsuchikawa, H.; Doi, M.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry* **2012**, *51* (42), 8363.

第2章 アルキンを有する炭素連結型 GM3 アナログの創製

2-1. アルキンを有する GM3 アナログの合成計画

2-2. アルキンを有する炭素連結型 GM3 アナログの合成

2-2-1. リゾ GM3 アナログの合成法の確立

2-2-2. アシル基を持つアクセプターのグリコシル化

2-2-3. DMPM 基を持つアクセプターのグリコシル化

2-2-4. グリコシル化成績体から GM3 アナログへの変換

2-3. 金触媒を利用するグリコシル化に関する考察

2-3-1. 金触媒を利用するグリコシル化と F 原子の影響

2-3-2. 保護基がグリコシル化に与える影響

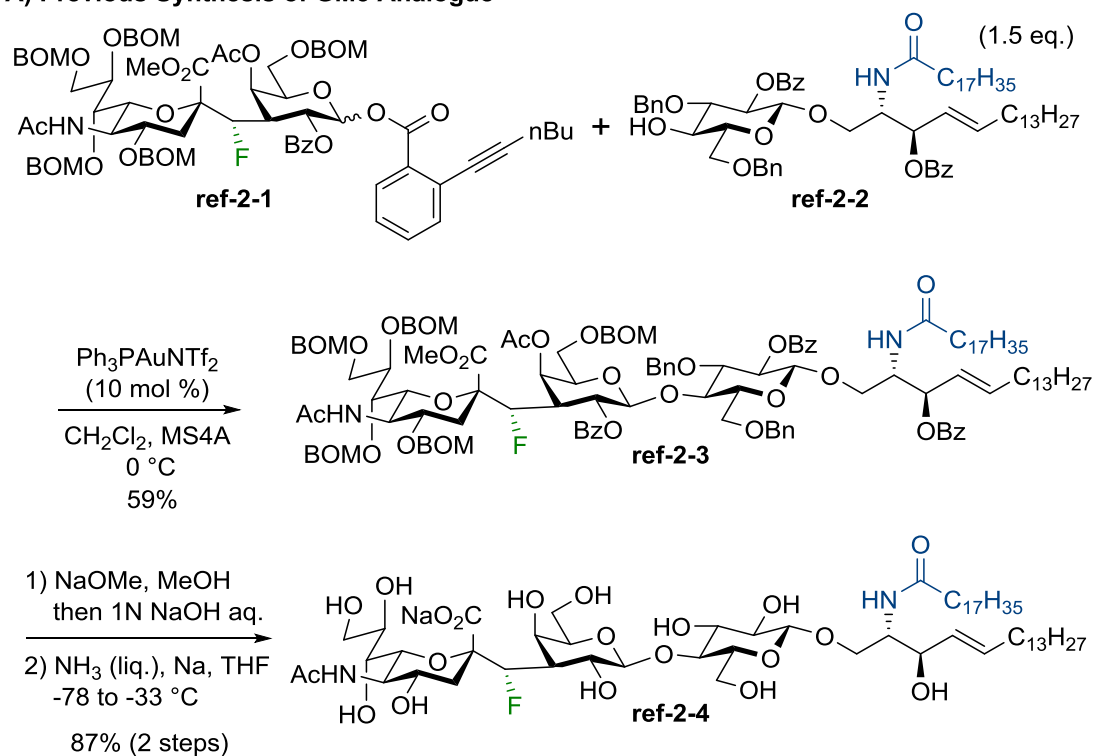
2-3-3. 金触媒を利用するグリコシル化における反応過程の考察

2-4. アルキンを有する GM3 アナログの生物活性評価

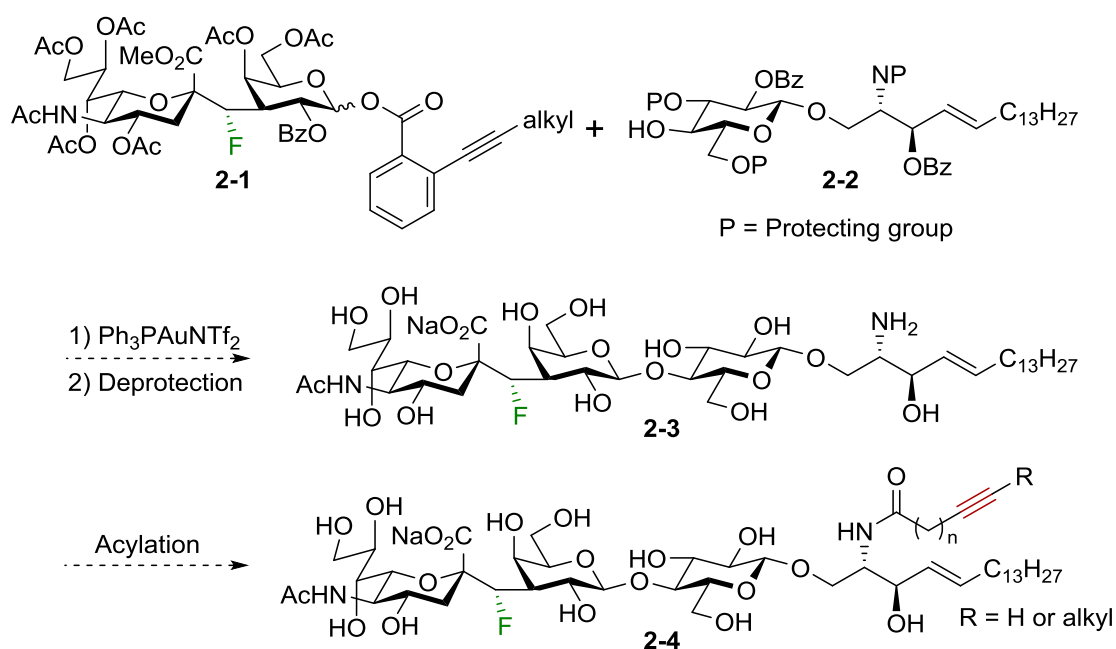
2-1. アルキンを有する GM3 アナログの合成計画

Scheme 2-1 に、従来の GM3 アナログの合成法と新規 GM3 アナログの合成計画を示す。従来の方法では、炭素連結型のシアリルガラクトースドナー **ref 2-1** とグルコシルセラミド **ref 2-2** をそれぞれ合成し、金触媒を利用するグリコシル化によって、GM3 保護体 **ref 2-3** へと導いた。アシル系保護基、ベンジル系保護基を順次除去して、GM3 アナログ **ref 2-4** を合成した¹。本手法をアルキンを持つアナログの合成に応用するためには、以下の方法が適していると考えた。すなわち、シアリルガラクトース **2-1** とアミノ基を適切な保護基で保護したグルコシルスフィンゴシン **2-2** とをグリコシル化した後、全ての保護基を除去する。リゾ GM3 アナログ **2-3** に対してアシル化によってアルキンを導入することを計画した。

A) Previous Synthesis of GM3 Analogue



B) Synthetic Plan for Alkyne-tagged GM3 Analogue

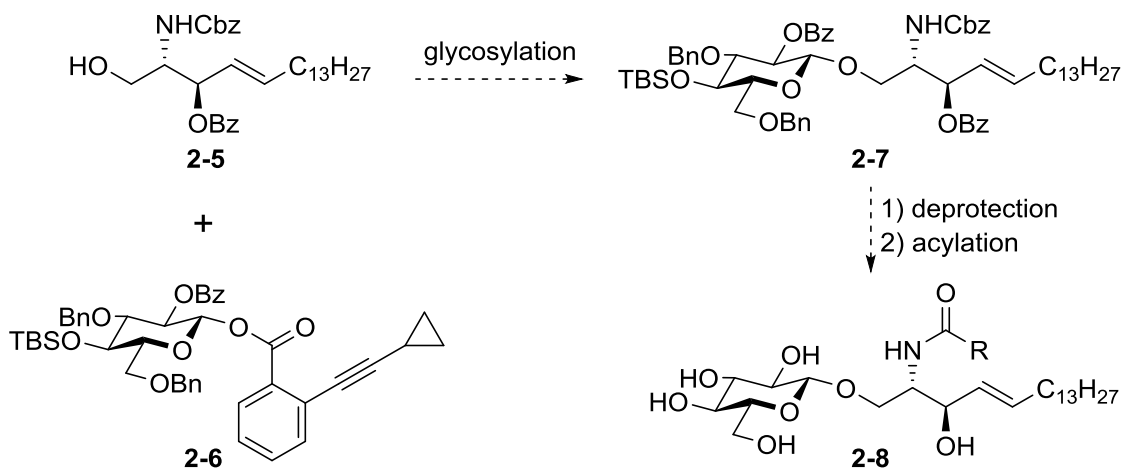


Scheme 2-1. A) Previous Synthesis of GM3 analogue; B) Synthetic Plan for Alkyne-tagged GM3 Analogues.

2-2. アルキンを有する炭素連結型 GM3 アナログの合成

2-2-1. リゾ GM3 アナログの合成法の確立

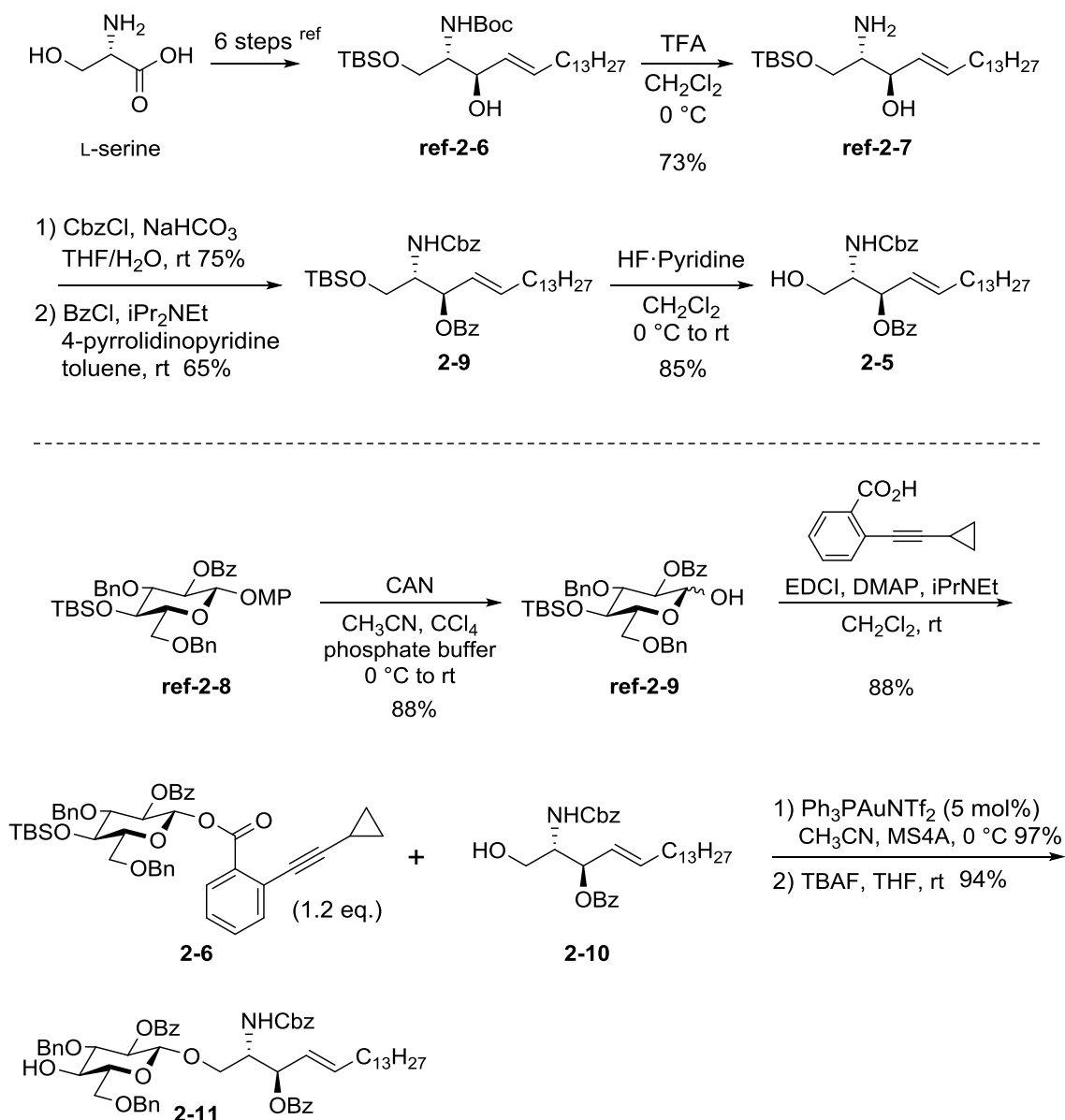
筆者は、まずリゾ GM3 アナログ合成法の確立を目指した。最終工程の **2-3** のアシル化は、複数の遊離水酸基の存在下アシル化を達成する必要がある (**Scheme 2-1**)。そこで、グルコース 3、6 位を Bn 基で保護し、アミノ基を Cbz 基で保護したグルコシルスフィンゴシン **2-7** をモデル基質として設定した (**Scheme 2-2**)。 **2-7** はスフィンゴシン **2-5** とグルコースドナー **2-6** を連結することで得られると考え、**2-5** と **2-6** の合成に着手した。



Scheme 2-2. Synthetic Plan for Glucosylceramide **2-8**.

グルコシルスフィンゴシン **2-5** の合成を示す (**Scheme 2-3**)。Katsumura らの報告²に従い調製した **ref-2-6** に TFA を作用させ、アミノアルコール **ref-2-7** を調製した。アミノ基と水酸基をそれぞれ Cbz 基、Bz 基で保護することでスフィンゴシン保護体 **2-9** へと誘導した。1 級水酸基の TBS 基は、HF・pyridine を作用させることで除去し、スフィンゴシン誘導体 **2-5** を合成した。

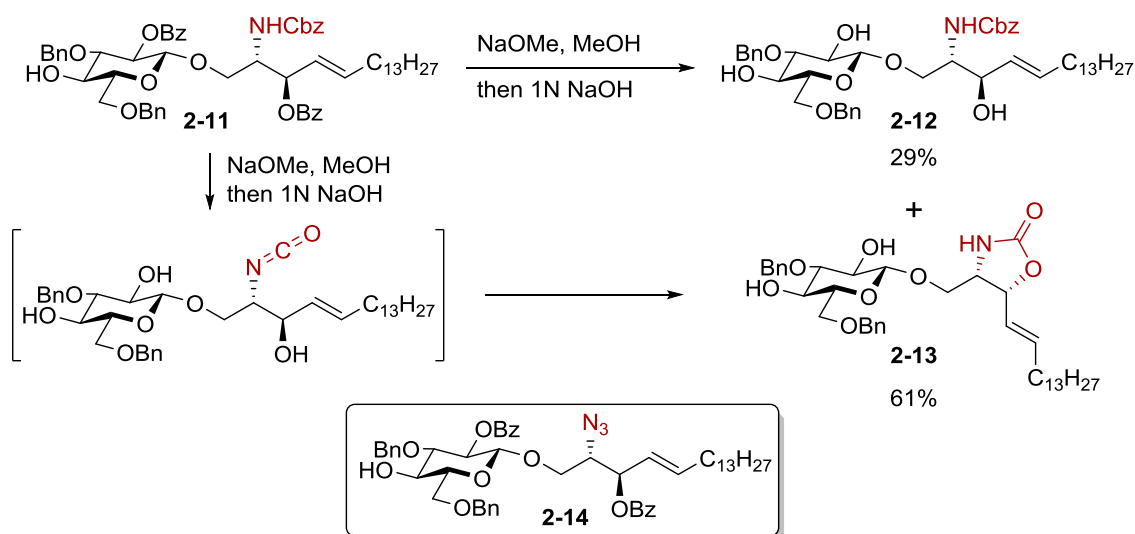
グルコースより 7 工程¹で調製した **ref-2-8** の MP 基を除去し、Yu らが報告したカルボン酸³と縮合させることで、アルキニルベンゾエート **2-6** を合成した。金触媒を用いる **2-10** のグリコシル化は問題なく進行し、高収率でグリコシル化生成物を与えた。グルコース 4 位の TBS 基を TBAF で除去することで、グルコシルアクセプター **2-11** を調製した。



Scheme 2-3. Synthesis of Glycosylsphingosine Derivative **2-11**.

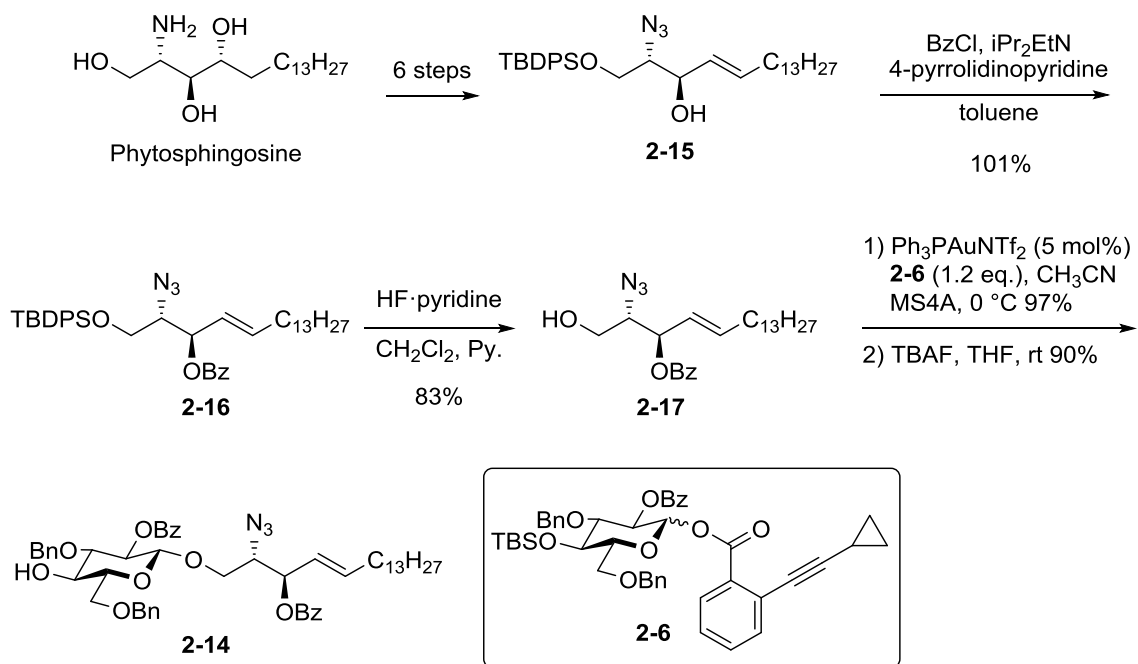
2-11 を用いて加溶媒分解による Bz の除去を試みた (**Scheme 2-4**)。その結果、目的の **2-12** は得られたものの低収率にとどまり、オキサゾリジノン **2-13** を主生成物として与えた。*N*-1 置換のカルバメートは塩基性条件下、イソシアネートが生成することが知られている^{4,5}。**2-13** はイソシアネートに対し、近傍の水酸基が付加することで生成したと考えている。生成したオキサゾリジノンは除去できるものの高温、強塩基条件が必要であった。そこで、カルバメート基をアジ

ド基へと変更したグルコシルスフィンゴシン **2-14** を別途合成することとした。



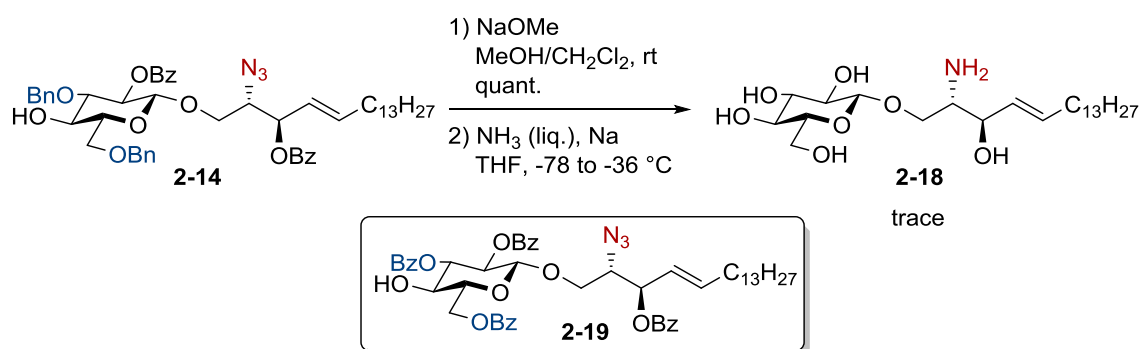
Scheme 2-4. Attempted Cleavage of Cbz Group in Glucosylsphingosine Derivative **2-11**.

2-14 の合成を示す。(Scheme 2-5)。Kim らの報告⁶に従って調製したスフィンゴシン誘導体 **2-15** の2級水酸基を保護し、TBDPS基を除去し、**2-17**を得た。グルコシルドナー**2-6**と**2-17**とを金触媒を用いて連結し、TBAFを作用させることでグルコシルスフィンゴシン **2-14** を合成した。



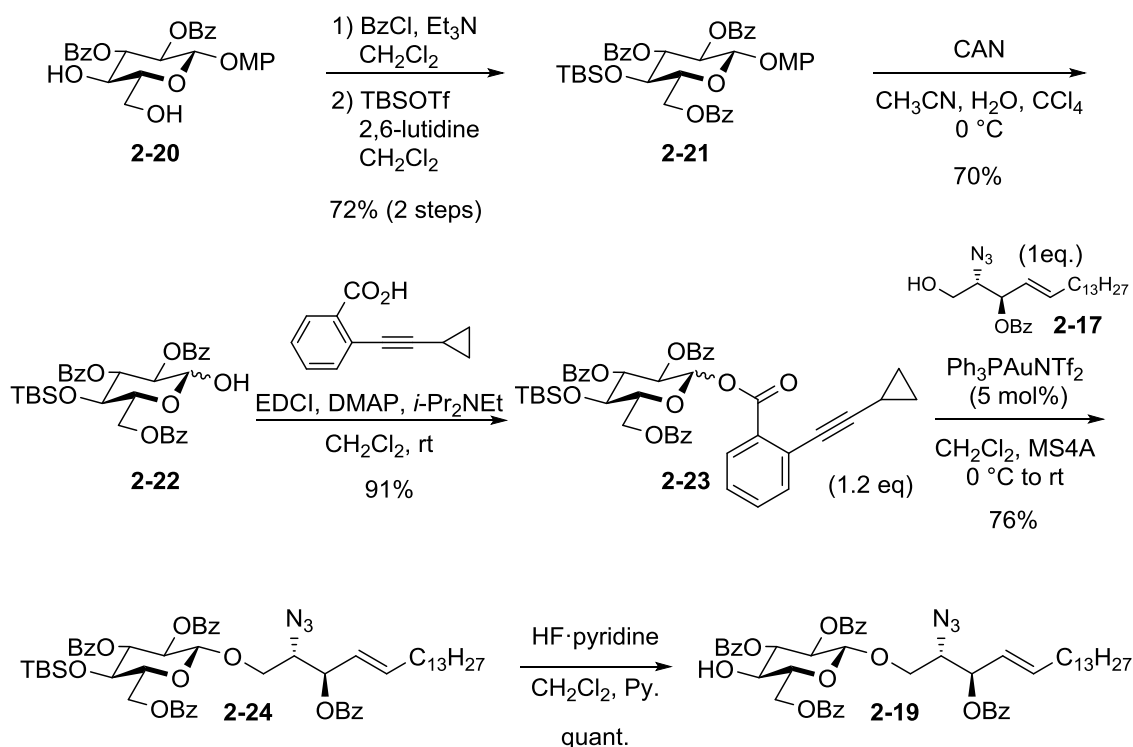
Scheme 2-5. Preparation of Glucosylsphingosine Derivative **2-14**.

グリコシルスフィンゴシン **2-14** を加溶媒分解したところ Bz 基の除去は定量的に進行した (**Scheme 2-6**)。しかし、Birch 還元による Bn 基の除去とアジドの還元を種々検討したが、目的の生成物を殆ど得ることができなかった。また、粗生成物の NMR からはオレフィンが還元されていることが示唆された。そこで、Bn 系保護基の利用を断念し、全ての水酸基をアシル基で保護した **2-19** を新たに調製することとした。



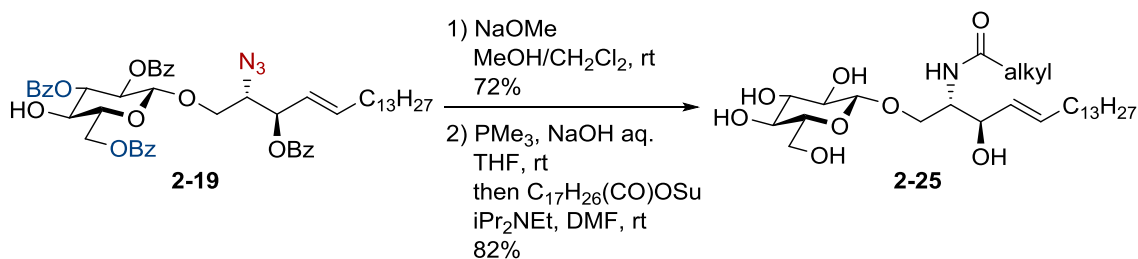
Scheme 2-6. Attempted Synthesis of Glucosylsphingosine **2-14**.

グルコシルスフィンゴシン **2-19** は既知のグルコース **2-20**⁷ より 6 工程で調製した (**Scheme 2-7**)。まず、**2-20** の 6 位水酸基を Bz 基で、4 位水酸基を TBS 基で保護し、**2-21** へ誘導した。メトキシフェニル基を酸化的に除去し、生じた水酸基をアシル化することで、アルキニルベンゾエート **2-23** を合成した。金触媒を利用して、アジドスフィンゴシン **2-17** と連結させた後に、TBS 基を除去することで、目的のグルコシルスフィンゴシン **2-19** を合成した。



Scheme 2-7. Preparation of Glucosylsphingosine Derivative **2-19**.

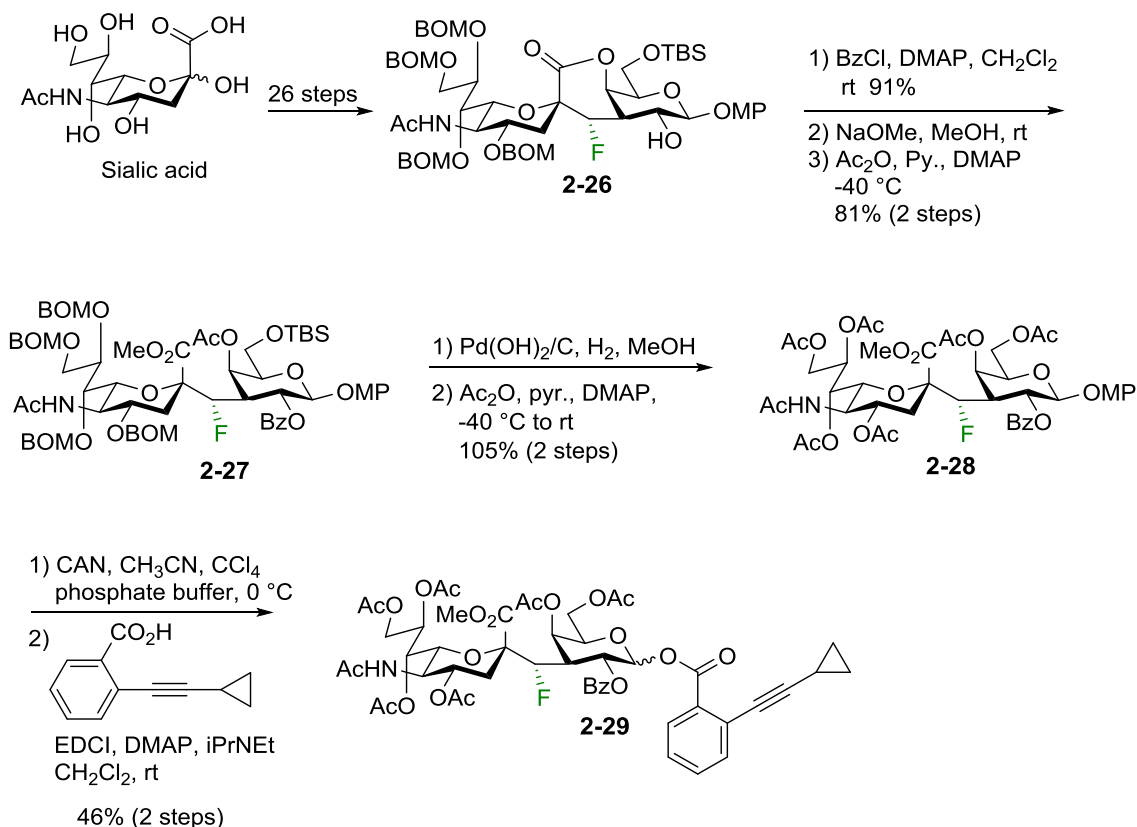
グルコシルスフィンゴシン **2-19** の 4 つの Bz 基は、問題なく除去することができた (**Scheme 2-8**)。アジド基をトリメチルホスフィンで還元し⁸、単離することなく *N*-ヒドロキシスクシンイミドエステルと縮合させることで、グルコシルセラミド **2-25** を合成することに成功した。以上、本条件を用いれば、効率良く脱保護とアシル化が進行することを確認できた。



Scheme 2-8. Synthesis of Glucosylceramide **2-25**.

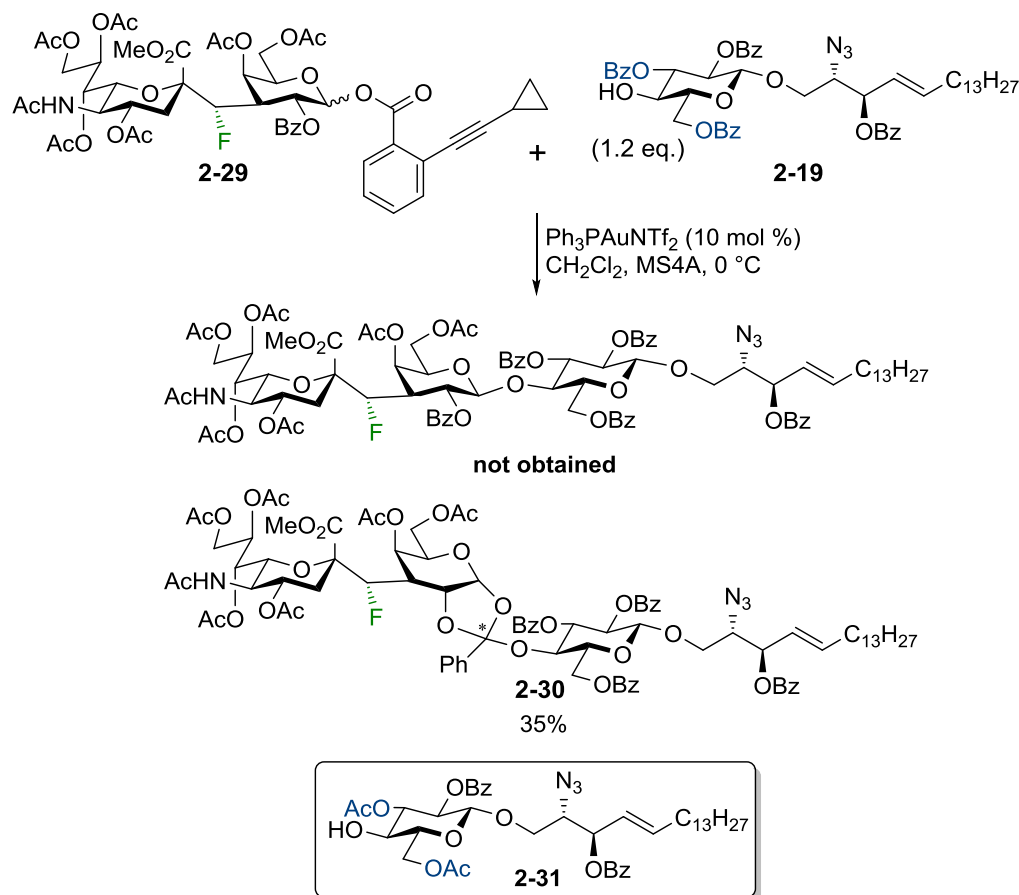
2-2-2. アシル基を持つアクセプターのグリコシル化

鍵反応であるシアリルガラクトースとグルコシルスフィンゴシンとのグリコシル化を検討した。まず、前節で見出したアシル化条件に対応させるため、全ての水酸基をアシル基で保護した炭素連結型シアリルガラクトースドナー**2-29**を調製した (**Scheme 2-9**)。シアリ酸より 26 工程¹で合成したラクトン **2-26** を Bz 基で保護した。ラクトンの加溶媒分解で生じた水酸基が、再度環化しないよう注意深くアセチル化し、**2-27** へと変換した。BOM 基と TBS 基を同時に除去し、生じた水酸基を Ac 基で保護し、**2-28** を合成した。**2-28** のメトキシフェニル基を酸化的に除去し、カルボン酸を縮合させることで、全ての水酸基をアシル基で保護したシアリルガラクトースドナー**2-29** を調製した。



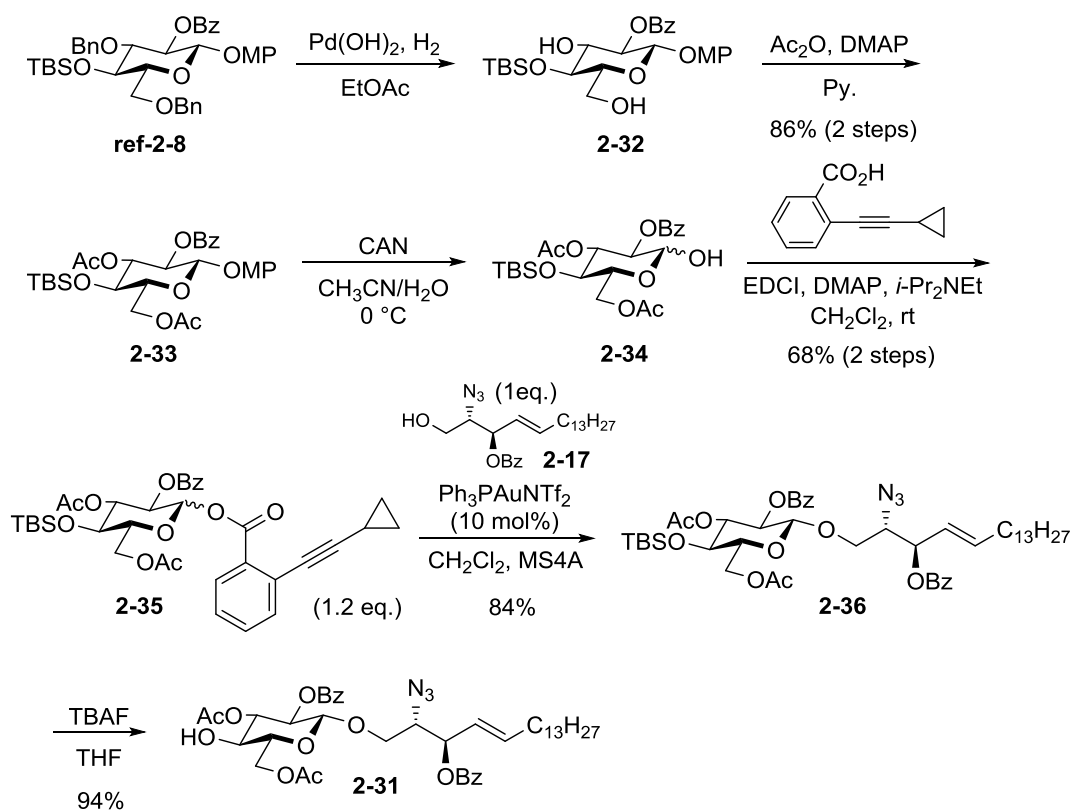
Scheme 2-9. Preparation of Sialylgalactose Donor **2-29**.

グリコシルアクセプター**2-19**を用いて、ドナー**2-29**とのグリコシル化反応を検討したところ、目的のグリコシドは一切得られず、オルトエステルのみを与えた (**Scheme 2-10**)。この原因はグルコース 4、6 位の保護基の嵩高さにあると推測し、新たに Ac 基を有するアクセプター**2-31**を調製して、グリコシル化を検討することとした。



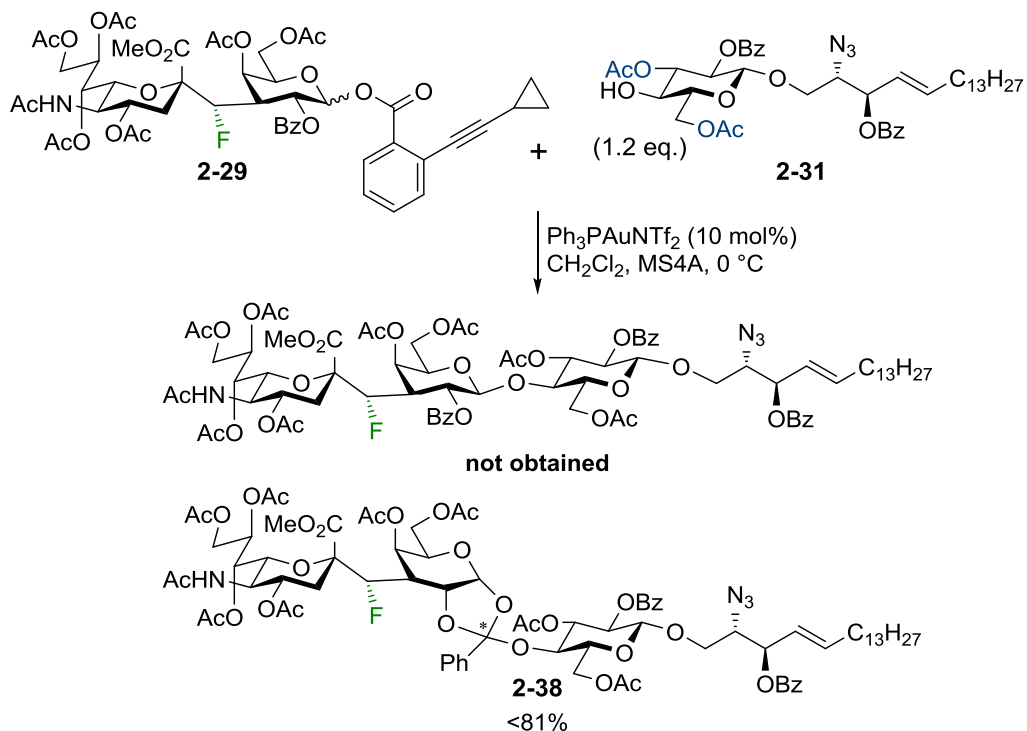
Scheme 2-10. Attempted Glycosylation of Glucosylsphingosine Derivative **2-19**.

2-31の合成を示す。既知のグルコースの Bn 基を加水素分解によって除去し、生じた水酸基を Ac 基で保護した (**Scheme 2-11**)。2-33 の *p*-メトキシフェニル基を酸化的に除去した後に、ラクトールとカルボン酸とを縮合させ、アルキニルベンゾエートへと導いた。グリコシルドナー**2-35**を金触媒で活性化し、**2-17**をグリコシル化することで、**2-36**を合成した。グルコース 4 位の TBS 基を TBAF で除去し、目的のアクセプター**2-31**を合成した。

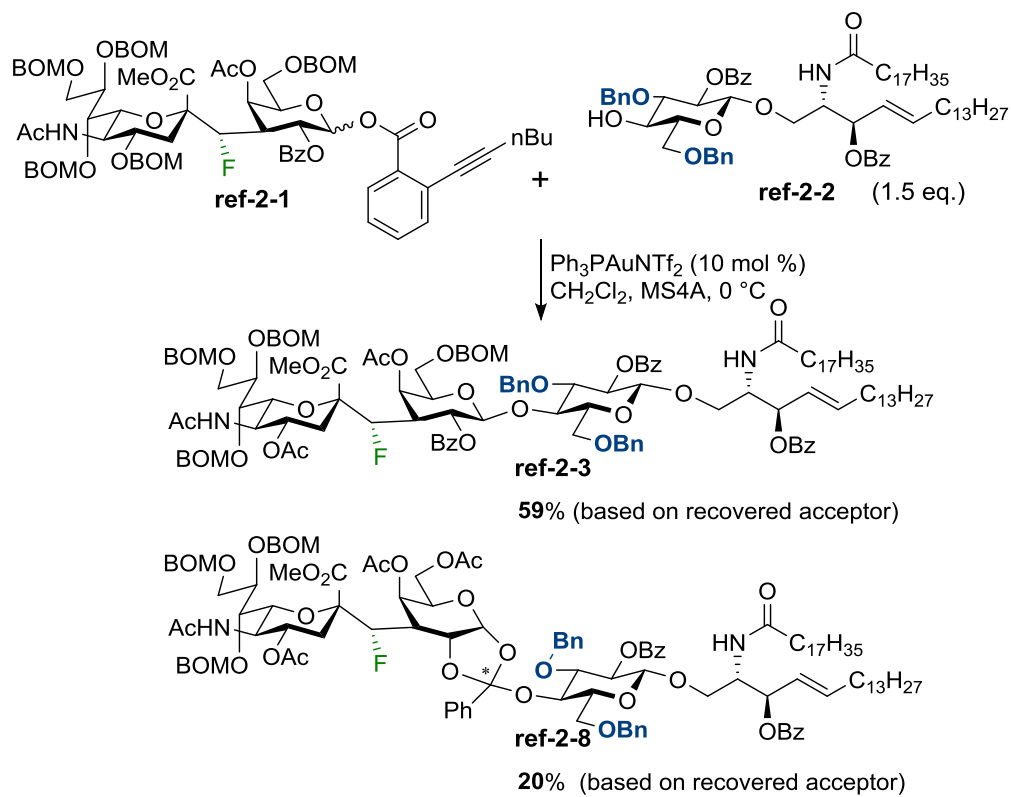


Scheme 2-11. Preparation of Glycosylacceptor **2-31**.

グリコシルアクセプター**2-31**を用いて、ドナー**2-29**とのグリコシル化反応を検討した (**Scheme 2-12**)。その結果、アクセプターの保護基に Ac 基を用いた場合にも目的のグリコシドは得られず、オルトエステルのみを与えた。オルトエステルの収率に違いがあるものの、Bz 基、Ac 基いずれの保護基を用いた時も、グリコシドが得られなかった。このことから、本グリコシル化における支配的な要因は立体的要因ではないと推測した。Sodeoka らが以前に検討した **ref-2-1** のグリコシル化では、Bn 基で保護したアクセプターを用いると、目的のグリコシド **ref-2-3** を 59%、オルトエステル **ref-2-8** を 20% で与えていた (**Scheme 2-13**)¹。今回、電子求引基であるアシル系保護基を用いた場合、目的のグリコシドは得られなかったことから、本グリコシル化には電子供与性の保護基を用いる必要があると推測した。



Scheme 2-12. Attempted Glycosylation of Glucosylsphingosine Derivative **2-31**.

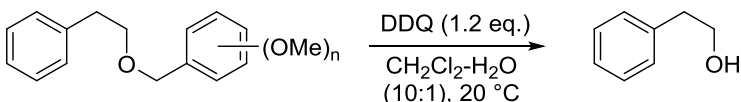


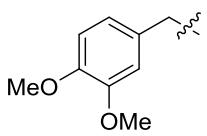
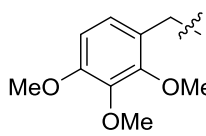
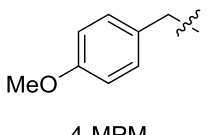
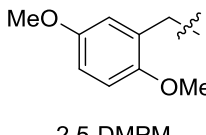
Scheme 2-13. Gold-catalyzed Glycosylation of **Ref-2-2**.

2-2-3. DMPM 基を持つアクセプターのグリコシル化

これまでの検討から、グルコース 3、6 位の保護基はアジド基存在下除去が可能で、Bn 基よりも高い電子供与性を持つものが最適だと考えた。そこで、酸素官能基を有するベンジル基、すなわち 3,4-dimethoxyphenylmethyl (DMPM) 基に着目した。DMPM 基は 1984 年に Yonemitsu らによって開発され、DDQ による酸化開裂が類似の官能基群の中で最も迅速に進行することが報告されている (Figure 2-1A)^{9,10}。また Bn 基に比べ、より電子豊富であると期待されることから、本グリコシル化反応に最適であると判断した。そこで、DMPM 基を有するグルコシルスフィンゴシン **2-39** を新たなグリコシルアクセプターとして設計した (Figure 2-1B)。

A)



Structure	Yield (%)	Time (h)	Structure	Yield (%)	Time (h)
 DMPM	86	< 0.33 <i>Fast</i>	 2,3,4-TMPM	60	0.5
 4-MPM	89	0.33	 2,5-DMPM	95	2.5

adapted from Yonemitsu et al. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, 36, 4244.

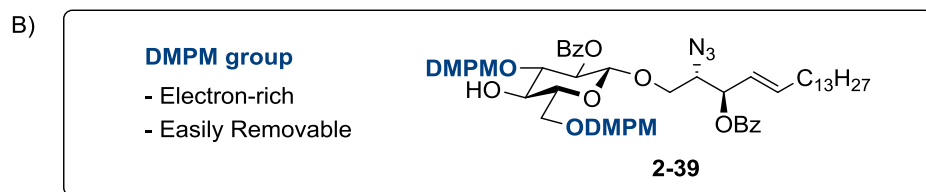
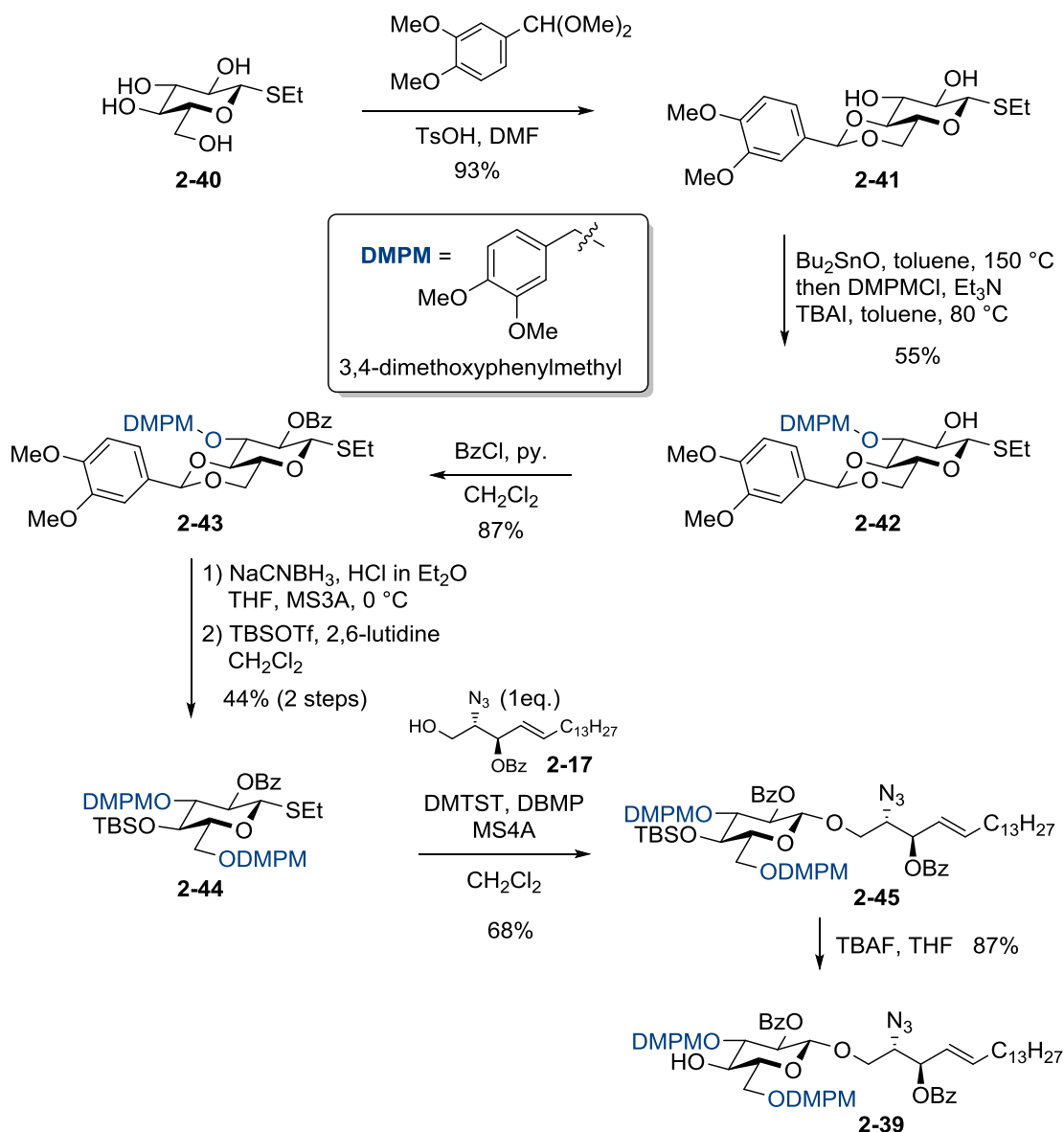


Figure 2-1. A) Cleavage Rate of MPM, DMPM, TMPM ethers with DDQ; B) Glycosyl Acceptor Possessing DMPM Groups **2-39**

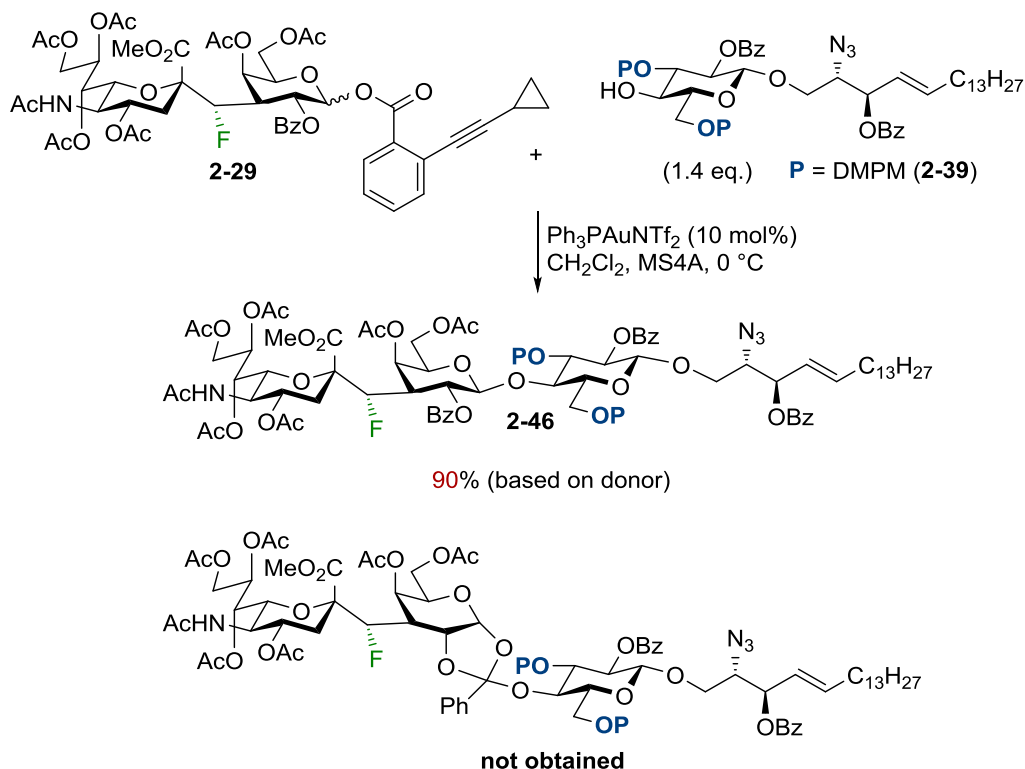
2-39 の合成を示す。アノマーにチオエチル基を持つグルコースをアセタールで保護し、3 位水酸基選択的に DMPM 基を導入した (**Scheme 2-14**)。2-42 の 2 位水酸基を Bz 基で保護した後、アセタールを還元的に開裂させ、生じた水酸基を保護した。DMTST を用いて 2-44 とスフィンゴシン 2-17 とを連結させ、2-45 の TBS 基を除去することで、アクセプター 2-39 を合成した。



Scheme 2-14. Synthesis of Glucosylsphingosine **2-39**.

合成した **2-39** とグリコシルドナー **2-29** を用いて、これまでと同じ条件でグリコシル化させたところ、オルトエステルは一切確認できず、期待通り目的のグリコシド **2-46** を高収率で与えた (**Scheme 2-15**)。先述のように、保護基に Ac

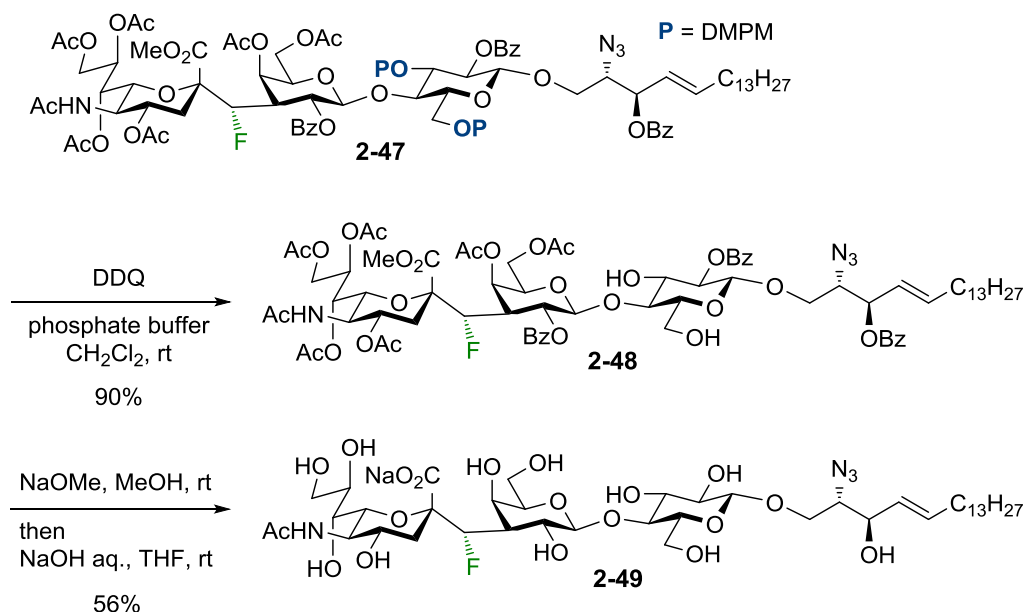
基や Bz 基を用いた場合は、同条件下で選択的にオルトエステルを与えている。つまり、本グリコシル化反応では、アクセプターの保護基によって生成物が支配されており、電子供与性の保護基を用いることで、選択的にグリコシドを与えることがわかった。



Scheme 2-15. Successful Glycosylation of Donor **2-29** and Acceptor **2-39**

2-2-4. グリコシル化成績体から GM3 アナログへの変換

グリコシル化生成物から、目的の GM3 アナログへの誘導を検討した (**Scheme 2-16**)。グリコシル化生成物を DDQ で処理すると、期待通り速やかに DMPM 基が除去され、**2-48** を高収率で得た。全てのアシル系保護基とメチルエステルを一挙に加溶媒分解し、アジドリゾ GM3 アナログ **2-49** へと誘導した。



Scheme 2-16. Synthesis of Azide Lyso-GM3 Analogue **2-49**.

三重結合の位置が異なる脂肪酸の合成を検討した。これまでの検討から、筆者はカルボニル酸素原子と三重結合が 6 原子以内にある場合、カルボン酸が自発的に分解するという知見を得ていた (**Figure 2-3**)。例えば、**2-50** を重クロロホルムに溶解させてしばらくすると、NMR チューブの中で赤色の繊維状物質が生成する。そこで、カルボニル酸素原子と三重結合が 10 原子以上離れた脂肪酸を調製することとした。

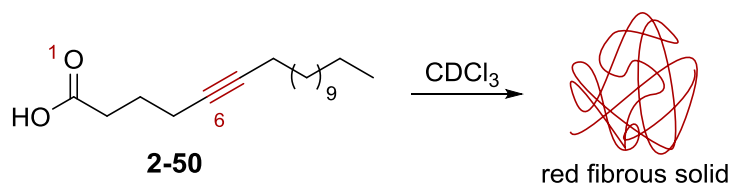
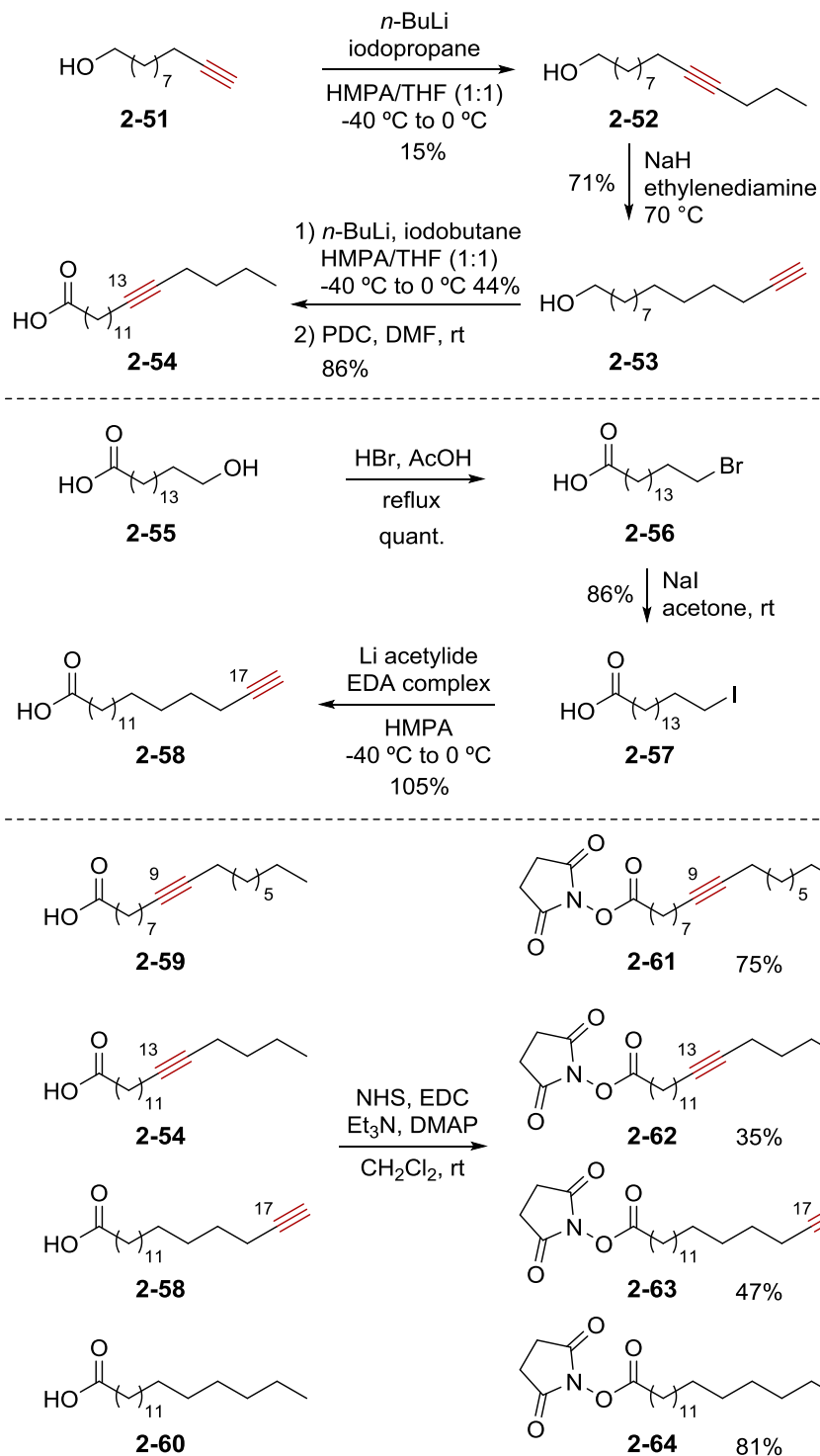


Figure 2-3. Generation of Red Fibrous Solid in CDCl₃.

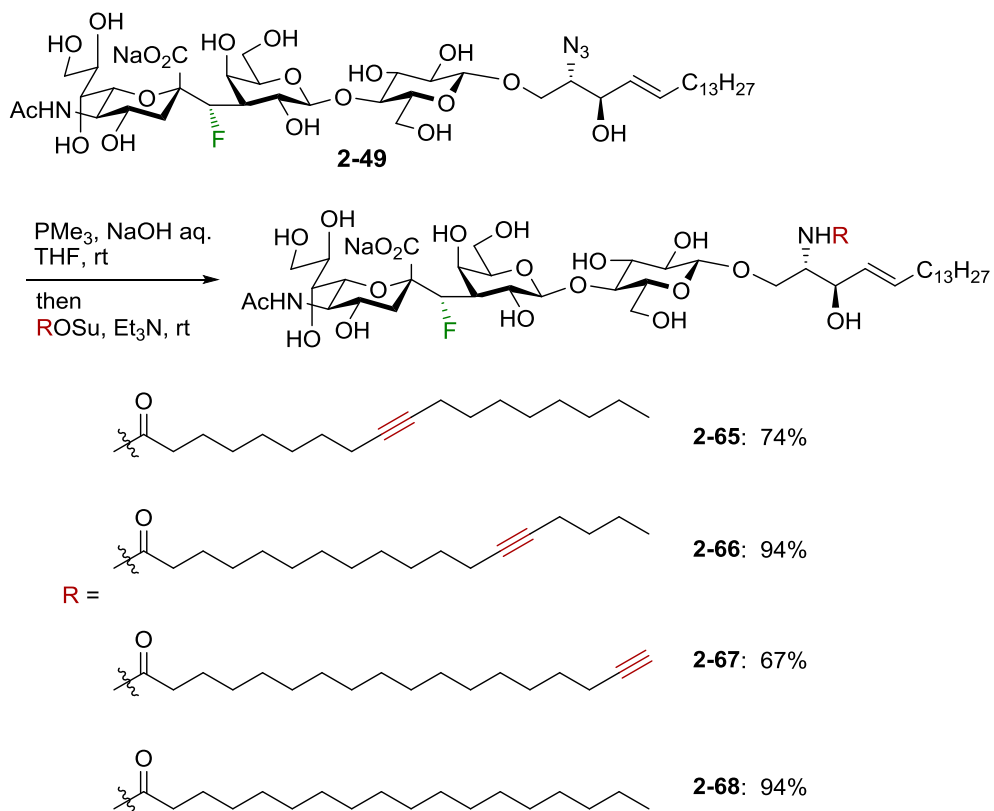
アルキンの位置による活性の違いを評価するため、まずは 9 位、13 位、17 位にアルキンを含む脂肪酸を調製した。以下に活性エステル **2-61**~**2-64** の合成を示す (**Scheme 2-17**)。Undecyn-1-ol **2-51** をアルキル化したのち、アルキンジッパー反応で末端アルキンに異性化させた¹¹⁻¹³。末端アルキン **2-53** を再度アルキル化し、13 位に三重結合を持つカルボン酸 **2-54** を合成した。ヒドロキシカルボン酸 **2-55** をブロモ化した後、NaI を作用させてヨウ素化した。**2-57** にアセチリドを作用させることで、17 位に三重結合を有する **2-58** を合成した。最後に、市販

の **2-59**、**2-60** を含む 4 種類のカルボン酸を *N*-ヒドロキシスクシンイミドと縮合させ、活性エステル **2-61**~**2-64** を合成した。



Scheme 2-17. Synthesis of *N*-Hydroxysuccinimide Esters **2-61**~**2-64**.

調製した *N*-ヒドロキシスクシンイミドエステルを用いて、アジドリゾ GM3 アナログ **2-49** をアシル化した。2-2-1 で見出した条件に従い **2-49** のアジド基を還元し、単離することなく種々の活性エステルを作用させることで、アルキン を有する GM3 アナログの合成を達成した。

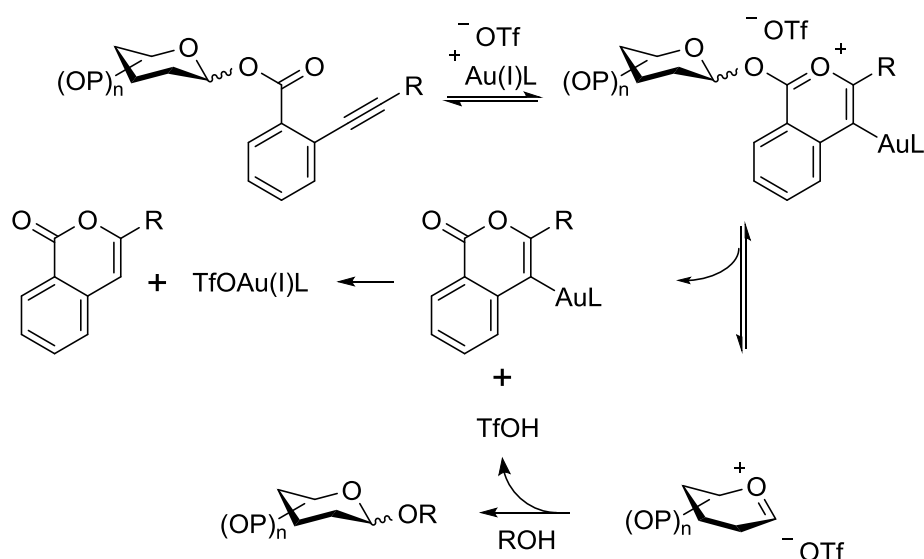


Scheme 2-18. Synthesis of Alkyne-tagged GM3 Analogues **2-65**~**2-68**.

2-3. 金触媒を利用するグリコシル化に関する考察

2-3-1. 金触媒を利用するグリコシル化と F 原子の影響

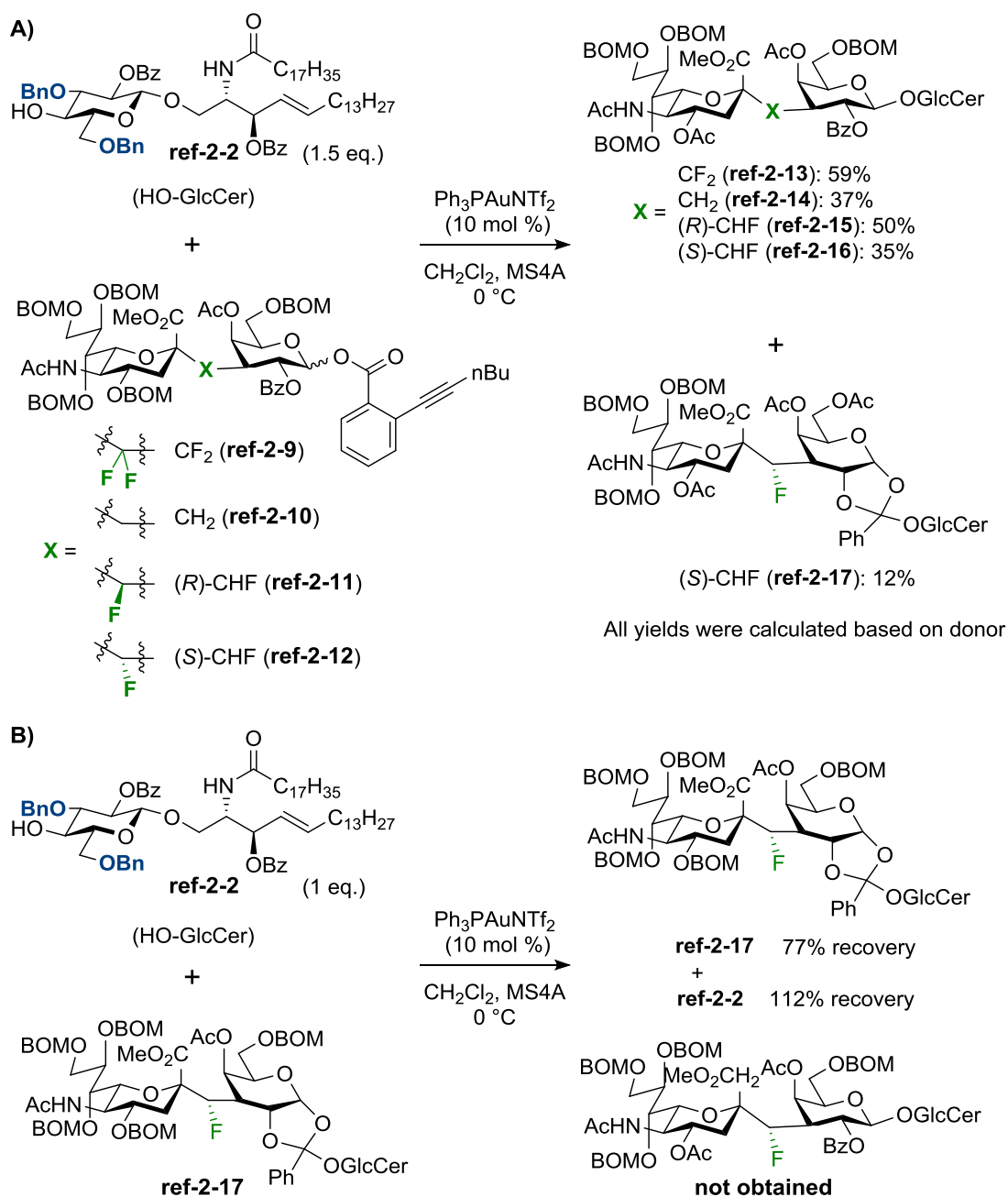
Yu らによって、2008 年に開発された金触媒を用いるグリコシル化反応は、ほぼ中性条件で反応を進行させることが出来る^{3,14-16}。脱離基としてアルキニルベンゾエートを利用し、金錯体によるアルキンの活性化とクマリンの生成を経て、オキソカルベニウムイオンを発生させる手法である (**Scheme 2-19**)。



Scheme 2-19. Plausible mechanism of Gold (I)-catalyzed Glycosylation

Sodeoka らによって得られたこれまでの知見では、本グリコシル化はシアル酸とガラクトースをつなぐ炭素連結部が、反応性に強く影響することが分かっている。 (**Scheme 2-20A**)。すなわち、最も高い電子求引性を有する CF_2 体は 59% で、(R)-CHF 体、 CH_2 体はそれぞれ 50%、37% でグリコシドを与えており、カチオンを不安定化させる F 原子が多い方が、グリコシル化の収率が高かった。このことは、本グリコシル化が単純な $\text{S}_{\text{N}}1$ -like な遷移状態を経るグリコシル化ではないことを示唆している。一方、1 つの F 原子を有する (R)-CHF 体と (S)-CHF に着目すると、グリコシドとオルトエステルの生成比が異なることがわかる。F 原子によるカチオンの不安定だけでなく、F 原子の立体化学も本グリコシル化を左右していることが示唆される。なお、オルトエステル **ref-2-17** を再度グリコシ

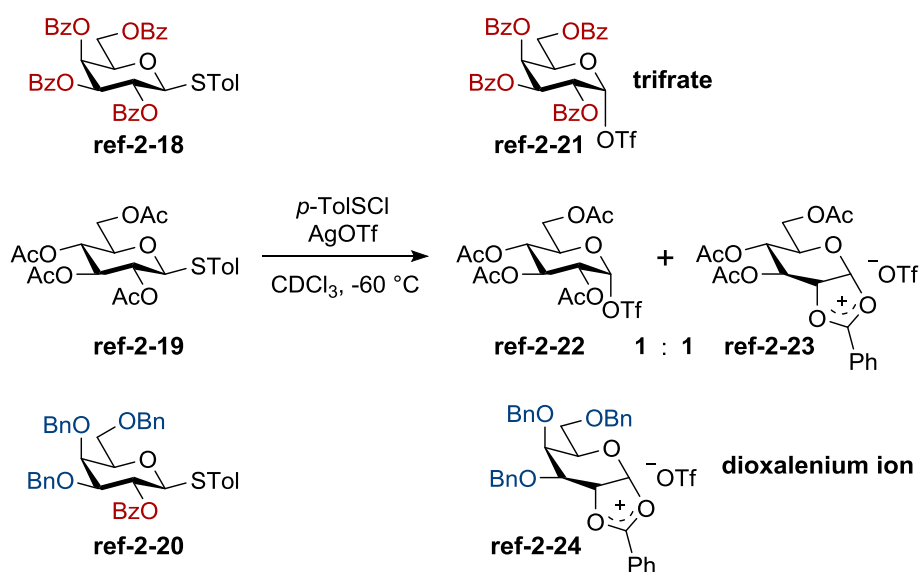
ル化の条件で処理すると、一部分解が見られたものの、グリコシドは全く得られなかった (**Scheme 2-20B**)。この結果は、金触媒を用いる炭素連結型シアリルガラクトースのグリコシル化において、グリコシドが速度論支配生成物であることを示唆している。以上のことから、金触媒を用いるグリコシル化反応では、炭素連結型シアリルガラクトースドナーが有する F 原子の立体電子効果が、遷移状態における活性化エネルギーに影響を及ぼしていると推察される。



Scheme 2-20. A) Gold(I)-catalyzed Glycosylation with Carbon-linked Sialylgalactoses **ref-2-9** ~ **ref-2-12**; B) Treatment of Orthoester **ref-2-17** with Glycosylation Condition

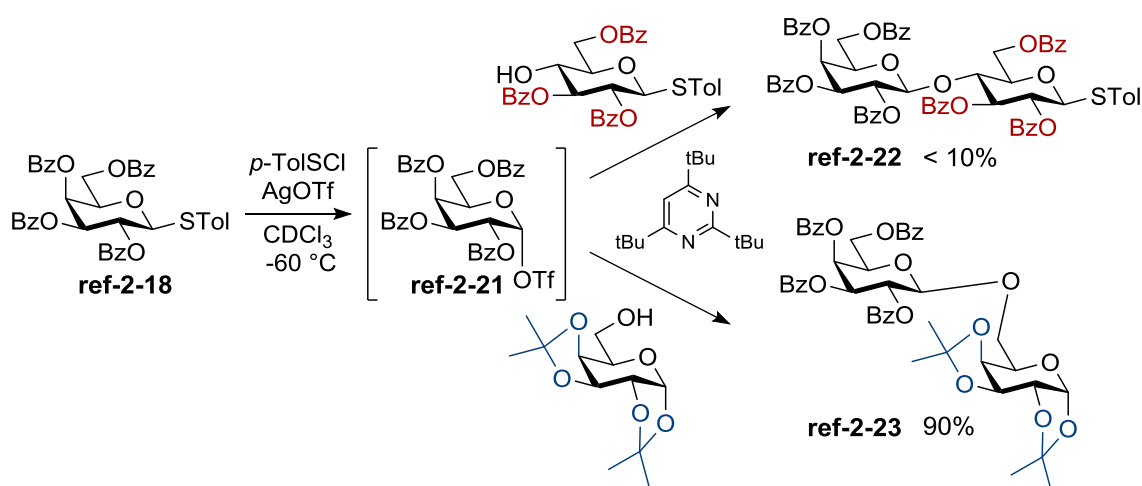
2-3-2. 保護基がグリコシル化に与える影響

ここで、2位の隣接基関与が存在するグリコシル化反応において、ドナーの保護基がどのように反応中間体へ影響を及ぼすかを見てみたい。2008年、Huangらは低温 NMR を用いてグリコシル化における反応中間体を観察することを試みている^{17,18}。保護基の異なる3種類のドナー (**ref-2-18**~**ref-2-20**) に対し、ルイス酸を作用させ、-60 °C における反応中間体を解析したところ、ドナーの保護基によって観測される中間体が異なることがわかった。電子求引性の Bz 基を保護基に用いた場合、グリコシルトリフレート **ref-2-21** が観測され、-20 °C まで昇温しても安定に存在していた。一方、**ref-2-20** をルイス酸で処理するとジオキサレニウムイオン **ref-2-24** を与え、-30 °C まで安定に存在した。また、Ac 基を有するドナー **ref-2-19** を活性化すると、トリフレートとジオキサレニウムイオンが 1 : 1 で生成したが、これらの中間体は相互変換が可能であり、-20 °C へと昇温した場合トリフレートのみピークを与えた。保護基がグリコシル化中間体に及ぼす影響は以下のように説明される。電子求引性の Bz 基がある場合、カチオン性のジオキサレニウムイオンの生成が妨げられる。一方、電子供与性の Bn 基が多数ある場合はジオキサレニウムイオンを十分に安定化できるため、中性のグリコシルトリフレートが生成しなかったと結論付けられている。



Scheme 2-21. Reaction Intermediates Observed with Low-Temperature NMR Study
(adapted from Huang et al. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 7952.).

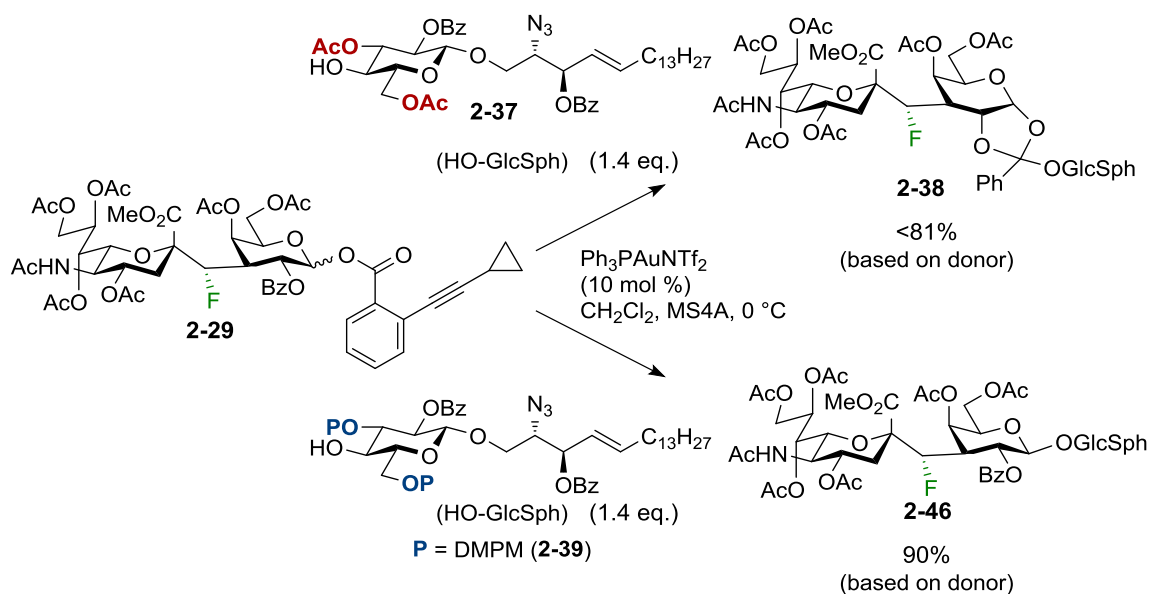
一方、ドナーの保護基だけでなく、アクセプターの保護基もグリコシル化反応に大きく影響することが同じ論文の中で示されている¹⁷。Bz 基を持つドナーから発生させたトリフレート **ref-2-21** に対して、2 種類のアクセプターを作用させたところ、電子求引性の Bz 基を有するアクセプターとの反応は殆ど進行せず、アセトナイドで保護された電子供与性のアクセプターが収率良くグリコシドを与えた (**Scheme 2-22**)。アクセプターに依存してグリコシドの収率が変化していることから、Preactivation 法を用いて発生させたグリコシルトリフレートに対するグリコシル化反応は単純な S_N1 反応ではなく、速度論的な 2 分子反応であることが示唆される。



Scheme 2-22. Influence of Protecting Groups on Acceptors in the Glycosylation with Triflate **ref-2-21** (adapted from Huang et al. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 7952.).

2-3-3. 金触媒を利用するグリコシル化における反応過程の考察

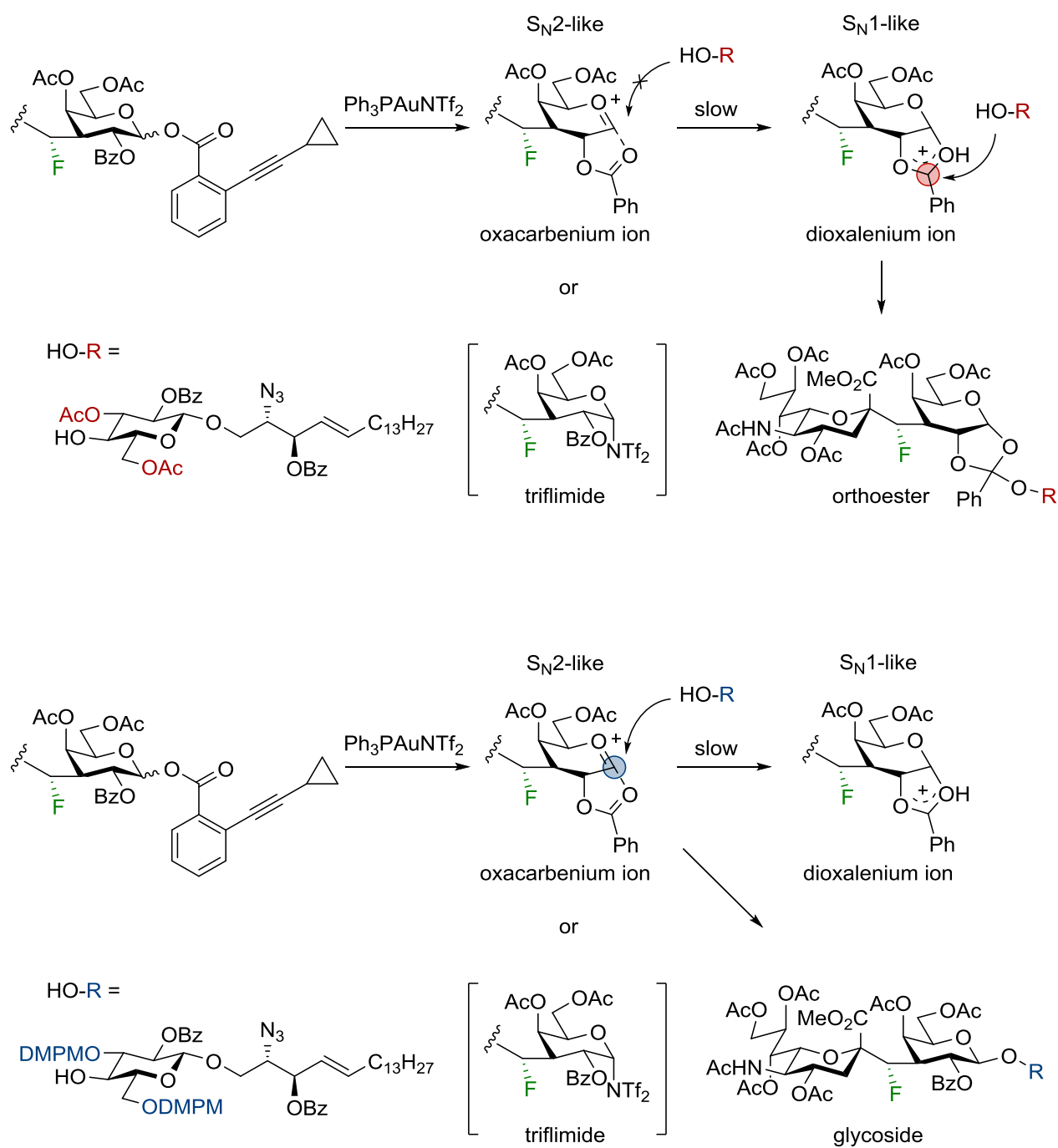
以上を考慮して、本研究におけるグリコシル化反応で見られた現象について考察したい。今回、炭素連結型ガラクトース **2-29** に対するグリコシル化ではアクセプターの保護基によって全く異なる生成物を与えていた。すなわち、アクセプターの保護基として Ac 基を用いた時はオルトエステル **2-38** のみを選択的に与えた一方で、DMPM 基を用いた時は一切オルトエステルの生成が見られず、高収率でグリコシド **2-46** を与えた (**Scheme 2-23**)。



Scheme 2-23. Gold(I)-catalyzed Glycosylation of Donor **2-29**.

この反応過程を以下のように考察した。炭素連結型シアリルガラクトースに金触媒を作用させると、2位の隣接基が関与したオキサカルベニウムイオン、もしくは中性のトリフリミドが生じると考えられる (**Scheme 2-24**)。カチオンがBz基に非局在化した場合は、ジオキサレニウムイオンが生成すると推察される。金触媒の条件では、速度論支配で反応が進行するので、反応の選択性はこれらの中間体から生成物に至る際の活性化エネルギーによって支配されるはずである。電子求引性基を有するアクセプターは一般に求核性が低いと考えられることから、Ac基を持つアクセプターはオキサカルベニウムイオンやトリフリミドとの $\text{S}_{\text{N}}2$ -likeな反応が進行しにくく、ジオキサレニウムイオンに対する $\text{S}_{\text{N}}1$ -likeな反応を経由して、オルトエステルを与えたと推察する。一方で、電子供与性の高いDMPM基を持つアクセプターは選択的にグリコシドを与えたことから、オキサカルベニウムイオンやトリフリミドとの $\text{S}_{\text{N}}2$ -likeな遷移状態が、ジオキサレニウムイオンとの $\text{S}_{\text{N}}1$ -likeな遷移状態よりも優位になったと推察している。

今回、筆者は炭素連結型シアリルガラクトースに対するグリコシル化反応において、DMPM基が高収率でグリコシドを与えることを見出した。本グリコシル化では、保護基の電子的な性質がアクセプターの反応性を変化させ、異なる速度論支配生成物を与えることを示すことが出来た。



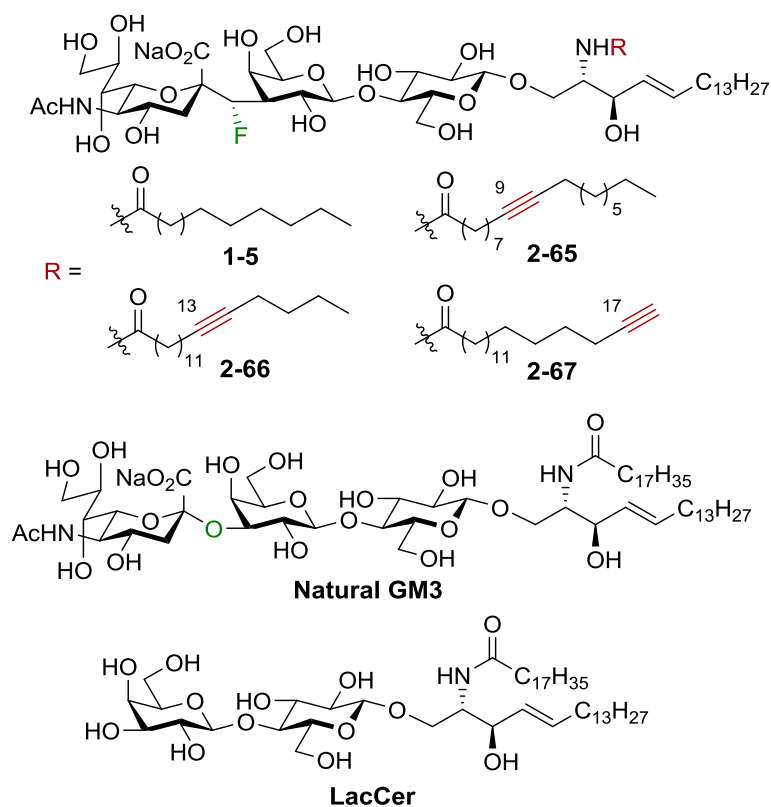
Scheme 2-24. Plausible Mechanism of Gold (I)-catalyzed Glycosylation in This Study

2-4. アルキンを有する GM3 アナログの生物活性評価

アルキンの導入による生物活性への影響を評価するため、合成した GM3 アナログの生物活性試験を実施した。マウス乳がん細胞 FM3A の変異株である Had-1 細胞（ニューカッスル病ウイルス抵抗性変異株）は、GM3 の添加によって細胞増殖が亢進することが知られている¹⁹。そこで、アルキンを有する 3 種の GM3 アナログ（**2-65~2-68**）と (S)-linked GM3 (**1-5**) の Had-1 細胞に対する細胞増殖活性を比較し、どのアナログが飽和脂肪酸を持つ **1-5** と同様の活性を示すかを確かめることとした。（**Figure 2-4A**）。

アルキンを有する 3 種の GM3 アナログ、(S)-linked GM3 および天然型 GM3 を Had-1 細胞に添加後、4 日目の細胞数を比較した（**Figure 2-4B**）。天然型の GM3 を添加するとわずかに増殖促進がみられたが、LacCer ではほとんど効果は認められなかった。これに対し、代謝安定型 GM3 アナログ **1-5** を添加すると、濃度依存的に細胞数が増加し、天然型 GM3 よりも高い増殖促進効果が見られた。このことから、内在性シアリダーゼにより天然型 GM3 が加水分解されている可能性が示唆される。内部アルキン **2-65** や **2-66** の場合、10 μ M の化合物処理では細胞増殖の促進がみられたものの、高濃度では細胞毒性を示した。50 μ M で処理した場合には全ての細胞が死滅しており、内部アルキン誘導体は Had-1 細胞に対して高濃度で毒性を示すことが明らかとなった。一方、末端アルキンを持つ **2-67** を添加した場合は GM3 アナログと同様の生物活性を示し、末端アルキンが生物活性に殆ど影響しないことを見出した。

A)



B)

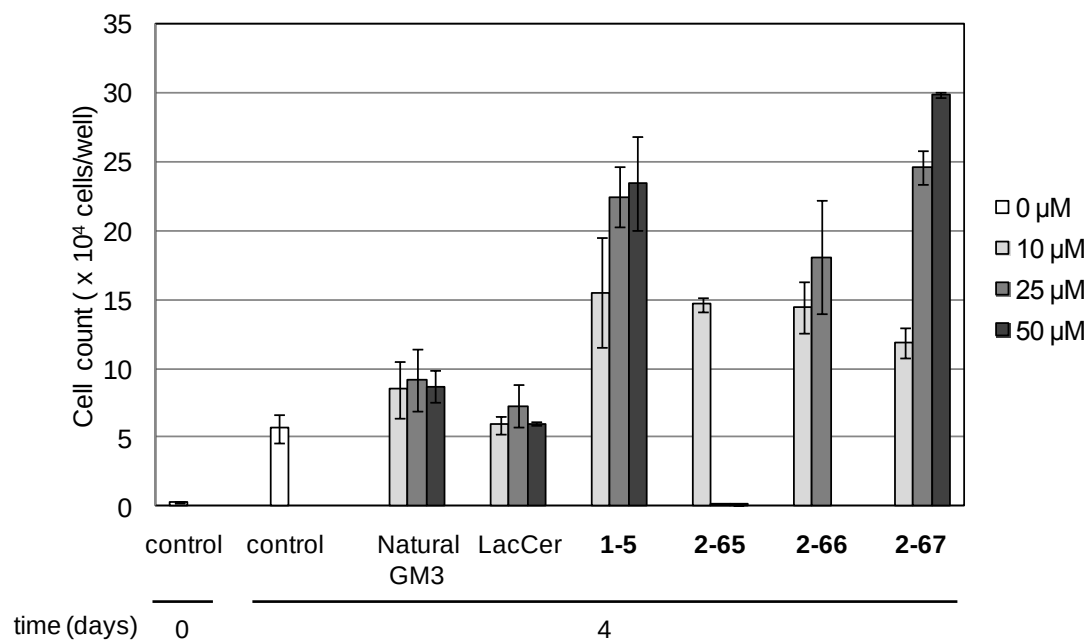


Figure 2-4. The Effect of Sialidase-resistant GM3 Analogues on Cell Proliferation in Had-1 Cells. A) Structures of Glycolipids Used in This Study; B) Cell Count of Had-1 Cells after Treatment with Glycolipids

アルキンの位置の違いが脂肪酸の性質に影響する例として、以下のような報告がある。Porter らは 15a-palmitic acid と 7a-palmitic acid を RAW264.7 細胞に添加し、その代謝物をアルキン-コバルト錯体を利用して解析した (Figure 2-5)²⁰。添加した脂肪酸は代謝によって、主にジパルミトイルグリセロホスファチジルコリン誘導体へと変換され、取りこみ量はわずかに 15a-palmitic acid の方が多かった。脂肪酸を添加した後の脂質抽出液を加水分解し、遊離の脂肪酸を解析すると、15a-palmitic acid の方がより多く細胞に取り込まれていた。また、代謝により 2 炭素増炭した脂肪酸の量は、15a-palmitic acid 由来のものの方が多く、末端アルキンがより代謝を受けやすいことが示されている。

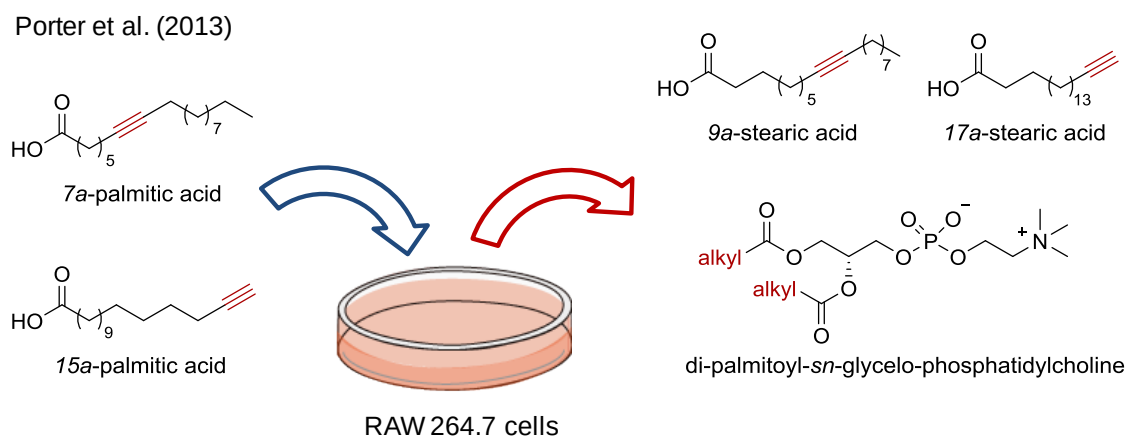


Figure 2-5. Palmitic Acid Possessing Terminal Alkyne is Incorporated More Efficiently into RAW 264.7 Cells than Its Counterpart with Internal Alkyne

第 1 章でふれた Murata らの知見も考慮すると、アルキンの位置の違いは GM3 の細胞膜上での局在や細胞内への取り込みに変化をもたらし、GM3 の生物活性に影響を与えた可能性がある。再現性の確認や条件最適化などの課題を残してはいるものの、今回の生物活性試験では、脂肪鎖上の三重結合の位置が糖脂質の生物活性に影響を及ぼす興味深いデータを示すことができた。

以上の結果から、アルキンを有する炭素連結型 GM3 アナログは、導入した三重結合の位置によって細胞増殖に対する効果が異なり、17 位に三重結合を持つアナログ 2-67 が (S)-CHF-linked GM3 (1-5) と同等の活性を示すことを見出した。

参考文献 第 2 章

- (1) 加藤麻理依. Development of sialidase-resistant ganglioside GM3 analogues : a novel approach with focus on the conformational regulation of the flexible sialoside-linkage by fluorine, 東京医科歯科大学, 2013.
- (2) Yamamoto, T.; Hasegawa, H.; Hakogi, T.; Katsumura, S. *Org. Lett.* **2006**, 8 (24), 5569.
- (3) Li, Y.; Yang, W.; Ma, Y.; Sun, J.; Shan, L.; Zhang, W. D.; Yu, B. *synlett* **2011**, 15 (I), 915.
- (4) Woodcock, D. J. *Chem. Commun.* **1968**, No. 5, 267b.
- (5) Hegarty, a. F.; Frost, L. N. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1972**, 0 (9), 500.
- (6) Kim, S.; Lee, S.; Lee, T.; Ko, H.; Kim, D. *J. Org. Chem.* **2006**, 71 (22), 8661.
- (7) Gu, G.; Adabala, P. J. P.; Szczepina, M. G.; Borrelli, S.; Pinto, B. M. *J. Org. Chem.* **2013**, 78 (16), 8004.
- (8) Noti, C.; de Paz, J. L.; Polito, L.; Seeberger, P. H. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12 (34), 8664.
- (9) Oikawa, Y.; Tanaka, T.; Horita, K.; Yonemitsu, O. *Tetrahedron Lett.* **1984**, No. 47, 5393.
- (10) Nakajima, N.; Abe, R.; Yonemitsu, O. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, 36 (10), 4244.
- (11) Brown, C. A.; Yamashita, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97 (4), 891.
- (12) Brown, C. A.; Yamashita, A. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1976**, No. 23, 959.
- (13) Lumbroso, A.; Abermil, N.; Breit, B. *Chem. Sci.* **2012**, 3 (3), 789.
- (14) Li, Y.; Yang, Y.; Yu, B. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49 (22), 3604.
- (15) Li, Y.; Yang, X.; Liu, Y.; Zhu, C.; Yang, Y.; Yu, B. *Chem. Eur. J.* **2010**, 16 (6), 1871.
- (16) Zhang, Q.; Sun, J.; Zhu, Y.; Zhang, F.; Yu, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50 (21), 4933.

- (17) Zeng, Y.; Wang, Z.; Whitfield, D.; Huang, X. *J. Org. Chem.* **2008**, 73 (20), 7952.
- (18) Frihed, T. G.; Bols, M.; Pedersen, C. M. *Chem. Rev.* **2015**, 115 (11), 4963.
- (19) Taki, T.; Ogura, K.; Rokukawa, C.; Hara, T.; Kawakita, M.; Endo, T.; Kobata, A.; Handa, S. *Cancer Res.* **1991**, 51 (6), 1701.
- (20) Tallman, K. a; Armstrong, M. D.; Milne, S. B.; Marnett, L. J.; Brown, H. A.; Porter, N. a. *J. Lipid Res.* **2013**, 54 (3), 859.

第3章 新規光反応性基の開発

3-1. 既存の光反応性基の特徴

3-2. 光反応性基としての α -ケトアミド

3-2-1. 報告されている α -ケトアミドの光反応

3-2-2. 期待した α -ケトアミドのラベル化反応

3-2-3. α -ケトアミドを用いたラベル化の可能性

3-3. 光親和性マンノースプローブの設計

3-4. 水中での α -ケトアミドの性質

3-4-1. α -ケトアミドを有するマンノースの合成

3-4-2. ハイドレート形成に関する検討

3-4-3. α -ケトアミドの光分解速度解析

3-5. アルキンを有するマンノースプローブの創製

3-5-1. アルキンを有するマンノースプローブの合成

3-5-2. ITC を利用したマンノースプローブの評価

3-6. マンノースプローブを用いた光親和性標識

3-6-1. クリックケミストリーの条件最適化

3-6-2. 非特異的標識の抑制に向けた検討

3-6-3. 5種類の α -ケトアミドを用いた光親和性標識実験

3-6-4. 光親和性標識における pH 依存性

3-7. 光親和性標識実験の考察

3-7-1. 光分解物の解析

3-7-2. Et 体および *t*-Bu 体の標識効率に関する考察

3-7-3. *i*-Pr 体および Ph 体の標識効率に関する考察

3-7-4. Thienyl 体の標識効率に関する考察

3-7-5. 一置換 α -ケトアミドの推定ラベル化機構

3-8. α -ケトアミドのシクロプロパノール形成反応

3-8-1. α -ケトアミドのシクロプロパノール形成反応の背景

3-8-2. 窒素原子上の置換基の検討

3-8-3. 反応溶媒の検討

3-8-4. ケト置換基の検討

3-8-5. シクロプロパノールの立体化学の決定

3-8-6. シクロプロパノール形成反応における速度論的同位体効果

3-1. 既存の光反応性基の特徴

光反応性官能基は、1962 年に Westheimer らが初めてジアゾアセチル基を報告して以降、様々なものが開発されてきた¹⁻³ (Figure 3-1)。ここでは現在でも汎用される代表的な光反応性基を取り上げる。

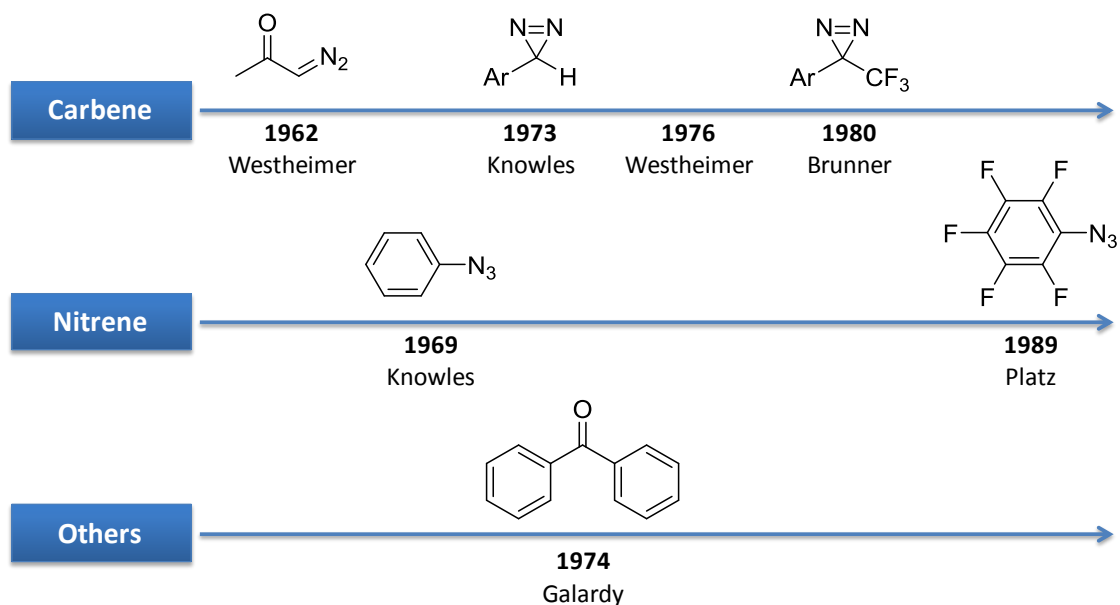
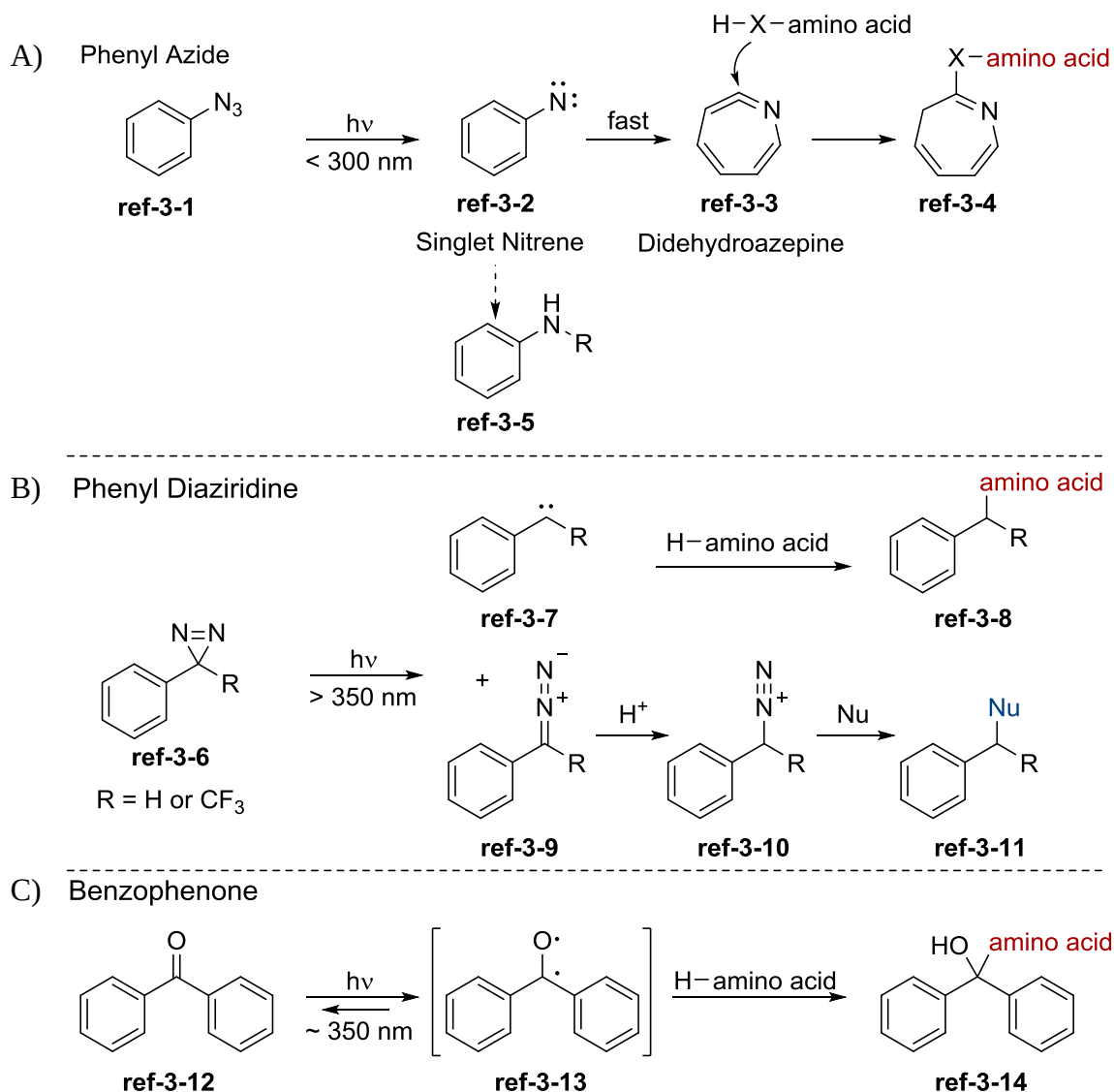


Figure 3-1. The History of Development of Photoreactive Groups.

芳香族アジド

1969 年に、Knowles らによって使用された芳香族アジド基は、紫外線照射により励起され、高反応性活性種であるナイトレンを生じる (Scheme 3-1)⁴。ナイトレンは C-H 挿入反応によってタンパク質をラベル化できるが、形成される結合が不安定であることが知られている⁵。また、短寿命の一重項ナイトレンは、環拡大反応によって即座に、求電子剤として振る舞う低反応性のジデヒドロアゼピン **ref-3-3** へと変換される。リガンドの結合サイト付近に求核性アミノ酸残基があれば、共有結合を生成するが、そうでない場合は、非特異的ラベリングの原因になり得る。芳香族アジドの励起には 300 nm 以下の波長を必要とする。この波長領域の光は芳香族性アミノ酸残基を励起する可能性があり、タンパク質へのダメージが懸念される。しかし、短時間の照射で十分にラベル化される場合もあり、比較的合成が容易なことから、光親和性標識に広く利用されてい

る。



Scheme 3-1. Labeling Reactions of Phenyl Azide (A), Phenyl diaziridine (B), and Benzophenone (C).

ジアジリン

一方、カルベンを生じるジアジリンの歴史は、1973 年の Knowles らの報告に端を発する⁶。カルベンは、C-H 挿入により安定な炭素-炭素結合を形成できる。水とも反応する特徴から、結合サイト以外での非特異的ラベル化を起こしにくいと考えられている。光照射により、芳香族ジアジリン **ref-3-6** はカルベン **ref-3-7** を生じる一方で、ジアゾ化合物 **ref-3-9** を副生する。一般的にジアゾ化合物は、酸性条件下でアルキル化剤として働くため、非特異的なラベル化を引き起こす

ことが問題であった。Brunner らによって開発された trifluoromethylaryldiazirine は CF_3 基を導入することで、ジアゾ化合物への異性化を抑えることに成功した⁷。 CF_3 を導入してもなお光照射で約 35%がジアゾ体へと変換されるため、カルベン生成効率には改善の余地があるものの、タンパク質への影響が少ない 350 nm 以上の波長で励起出来る点は長所である。

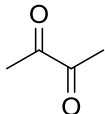
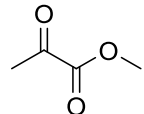
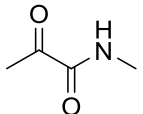
ベンゾフェノン

1974 年には Galardy らによって、初めてベンゾフェノンが生体分子のラベル化に利用された⁸。ベンゾフェノンは 350 nm 程度の波長で励起が可能で、光照射によってビラジカル様の中間体 **ref-3-13** を生じる。酸素ラジカルが標的分子の水素を引き抜いた後、標的分子に生じたラジカルが、炭素ラジカルと結合を形成する。ビラジカルは水と反応しにくく、生成が可逆であるため、効率良く結合形成が進行する。しかし、ベンゾフェノンは立体的に嵩高く、元のリガンドの性質を大きく変えてしまう可能性を持っている。

3-2. 光反応性基としての α -ケトアミド

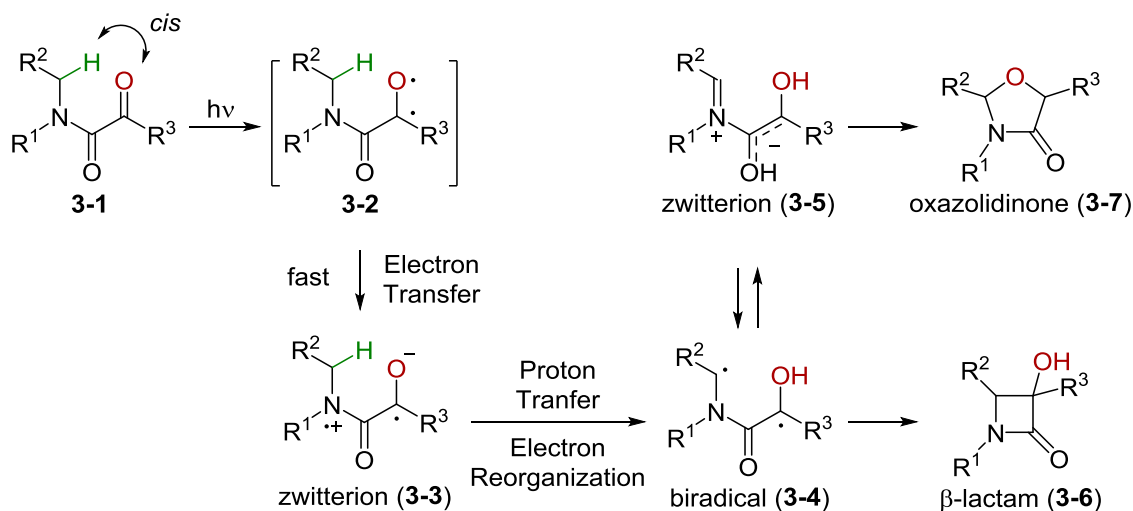
糖－タンパク質相互作用を効率的に解析するには、ベンゾフェノンのような高いラベル化効率を持つ光親和性基を改良し、立体的にコンパクトで非疎水的な官能基が有用であると考えた。そこで、1,2-ジカルボニル化合物の水素引き抜き反応、すなわち、Norrish II 型反応に着目した。1,2-ジカルボニル化合物の光反応は広く研究されており、Norrish I 型、Norrish II 型反応、Paterno-Büchi 反応など様々な反応が知られている⁹。1,2-ジカルボニル化合物は大別すると 1,2-ジケトン、 α -ケトエステル、 α -ケトアミドに分けられる。光反応性基として利用することを考え、生体内加水分解耐性、求電子性、そしてリガンドへの導入のし易さを比較した (Table 3-1)。生体内で利用することを考えると、 α -ケトエステルは細胞内酵素によって分解される可能性がある。1,2-ジカルボニル化合物はその構造からも予想できるように高い求電子性を持つ。光励起にはジカルボニル構造を維持することが必須であり、水中でのハイドレート形成や、求核性アミノ酸の求核攻撃は光反応の効率低下を招く。3つの1,2-ジカルボニルの中では、 α -ケトアミドが最も求電子性が低い。また、 α -ケトエステルや α -ケトアミドはリガンドにアルコールやアミンがあれば、アシル化によって容易に導入することが可能である。以上のことを考慮して、筆者は 1,2-ジカルボニル化合物の中でも α -ケトアミドに焦点を当てた。

Table 3-1. Comparison of 1,2-Dicarbonyl Group.

			
	1,2-diketone	α -ketoester	α -ketoamide
エステラーゼによる分解	分解されない	分解	分解されない
求電子性	非常に高い	高い	やや高い
導入の容易さ	やや煩雑	簡便 (アシル化)	簡便 (アシル化)

3-2-1. 報告されている α -ケトアミドの光反応

二置換の α -ケトアミドの光反応は、Aoyama¹⁰ らおよび Whitten^{11,12} らによって精力的に研究されており、以下のメカニズムで進行すると考えられている (**Scheme 3-2**)。 α -ケトアミド **3-1** は光照射により励起状態 **3-2** へと遷移した後、アミド窒素からの一電子移動により消光する。この時生じた zwitterion **3-3** は proton transfer および electron reorganization を経て biradical **3-4** へと変換される。 **3-4** のラジカル対が結合すれば、環化して β -ラクタム **3-6** を与える一方、二回目の electron transfer で生じる **3-5** から環化することで、オキサゾリジノン **3-7** を与える。

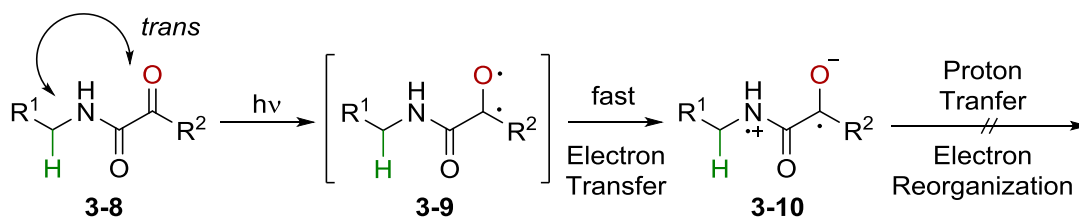


Scheme 3-2. Photochemical Reactions of α -Ketoamide.

3-2-2. 期待した α -ケトアミドのラベル化反応

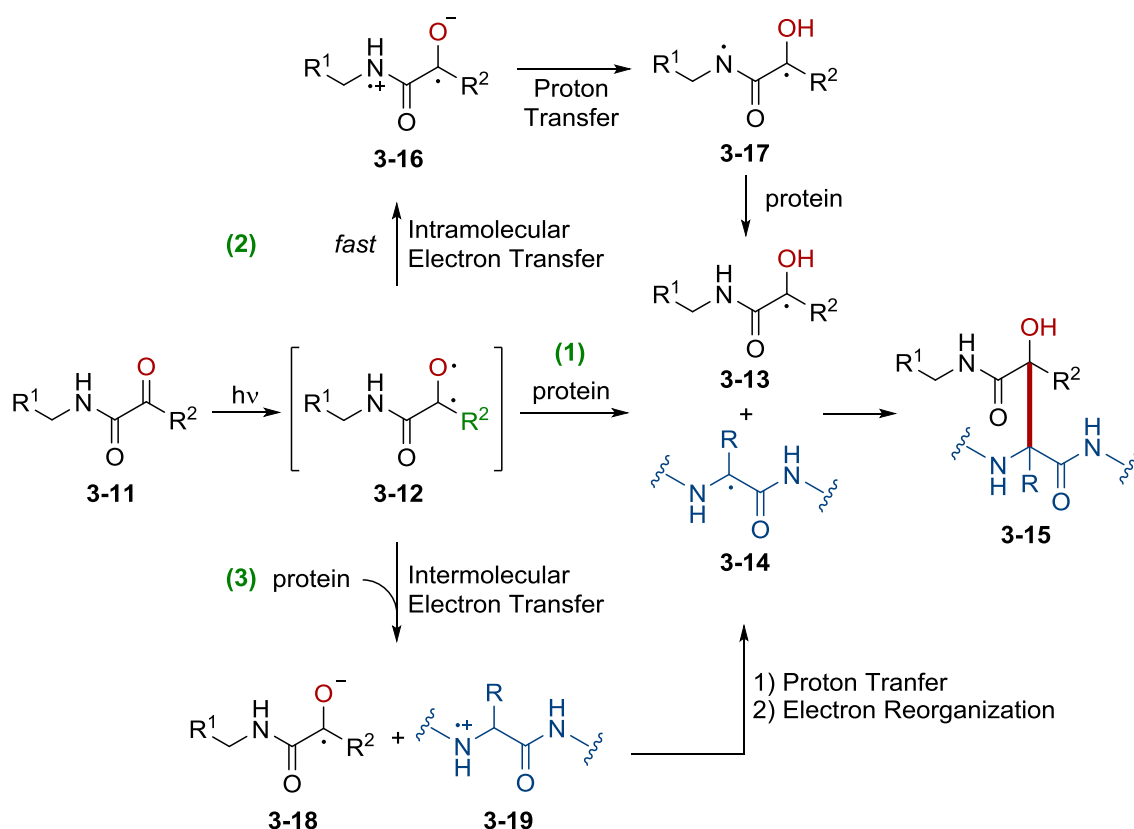
目的とするラベル化反応を達成するには、 α -ケトアミドの分子内環化を抑制する必要がある。そこで、トランスの配座を取ると期待される一置換の α -ケトアミド **3-8** に着目した (**Scheme 3-3**)。一置換の α -ケトアミドを光照射した場合、光励起と一電子移動を経て、zwitterion **3-10** を与えると考えられる。 **3-10** の酸素アニオンは分子内のプロトンを引き抜くことができないため、分子内

環化が抑制されると期待した。



Scheme 3-3. Proposed Mechanism of Photochemical Reactions of Mono-substituted α -Ketoamide.

一置換の α -ケトアミド **3-11** を用いてタンパク質をラベル化する場合、以下のメカニズムで進行すると推測した (**Scheme 3-4**)。第一の可能性は、光照射によって生じるビラジカル様中間体 **3-12** が、タンパク質の水素原子を引き抜く経路である。水素引き抜きで生じたラジカル対 **3-13** と **3-14** がカップリングすれば、タンパク質をラベル化できる。第二の可能性は分子内電子移動を経る経路である。前述のように、**3-12** は窒素原子からの電子移動によって即座に zwitterion **3-16** へと変換される。しかし、プロトン移動を経て生じたビラジカル **3-17** の分子間水素引き抜きが進行すれば、先と同様の経路でタンパク質をラベル化できると考えられる。第三の可能性は、**3-12** に対して、タンパク質からの一電子移動が起こり、イオン対 **3-18** および **3-19** を与える経路である。イオン対はプロトン移動と electron reorganization を経て、ラジカル対 **3-13** および **3-14** へと変換され、タンパク質をラベル化できると考えられる。どの経路でラベル化が進行するかは、カルボニルに隣接する置換基 R^2 に影響される可能性があるため、置換基の異なる α -ケトアミドを数種類合成し確認することとした。



Scheme 3-4. Desired Labeling Reactions with Mono-substituted α -Ketoamides.

3-2-3. α -ケトアミドを用いたラベル化の可能性

現在に至るまで、 α -ケトアミドによる光親和性標識の例は報告されていないものの、 α -ケトアミド構造を有する化合物が、光照射によりタンパク質と共有結合形成することは報告されている。Norris II 型反応の抗体触媒に関する Lerner、Jamda らの報告¹³によれば、光励起された α -ケトアミド **ref-3-15** は抗体触媒との間に共有結合を生成する (**Figure 3-2**)。

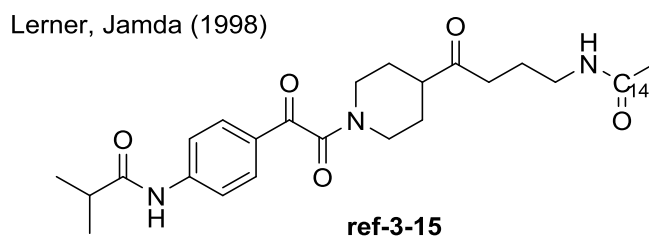


Figure 3-2. Reported Substrate to Form Covalent Bond with Antibody Catalyst

3-3. 光親和性マンノースプローブの設計

以上の作業仮説を基に、 α -ケトアミドが糖-タンパク質相互作用の解析に適用できるかを検討した。糖-タンパク質相互作用のモデルにはマンノシドとコンカナバリン A (Con A) の相互作用を採用し、光親和性マンノースプローブを用いた光親和性標識を計画した。Con A はレクチンと呼ばれる糖結合タンパク質の一種であり、 α -D-マンノシド構造を持つ糖鎖と特異的に相互作用する¹⁴。その性質から、Con A は、糖鎖の構造決定や糖タンパクの検出、分離精製などのツールとして汎用されている。pH 7 付近ではホモ 4 量体、pH 5 付近でホモ 2 量体として存在し、1 サブユニット当たりの分子量は 26.5 kDa である。Con A の各糖結合サイトには Mn^{2+} と Ca^{2+} が 1 つずつ含まれ、糖結合活性に関与している。糖特異性は Schwarz ら¹⁵、Brewer らによって調べられており、単糖の中ではメチル α -D-マンノシド (MeMan) が最も強く結合する。

1975 年 Beppu らは、*p*-アジドフェニル α -D-マンノシド **ref-3-16** を用いた Con A の光親和性標識を報告している (**Figure 3-3**)¹⁶。その後に Hamachi らは光親和性標識法を利用して Con A に蛍光分子を導入し、Con A-蛍光分子複合体が糖鎖のバイオセンサーとして機能することを報告した¹⁷⁻²⁰。このとき光親和性標識には **ref-3-16** の他に芳香族ジアジリンを有する **ref-3-17** が使用されている。

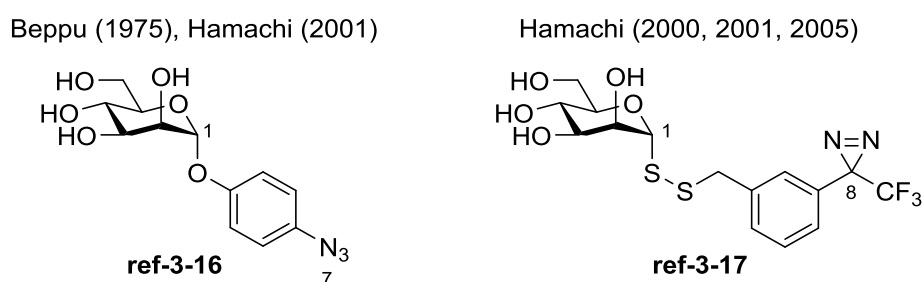


Figure 3-3. Reported Photoaffinity Mannoside Probes for Con A.

これらの報告を参考に、マンノースに α -ケトアミドを搭載した光親和性プローブを以下の指針に基づいて設計した (**Figure 3-4**)。すなわち、Beppu ら、Hamachi らの光親和性プローブに倣い、タンパク質と共有結合を形成する部位をアノマー一位から 8 原子離れた位置に設定した。また、カルボニルに隣接する置換基 R は α -ケト酸が購入可能な Ph (**3-24**)、2-thienyl (**3-25**)、*t*-Bu (**3-26**)、*i*-Pr (**3-27**)、

Et (**3-28**) を選択し、反応性の違いを確認することとした^{10,21}。

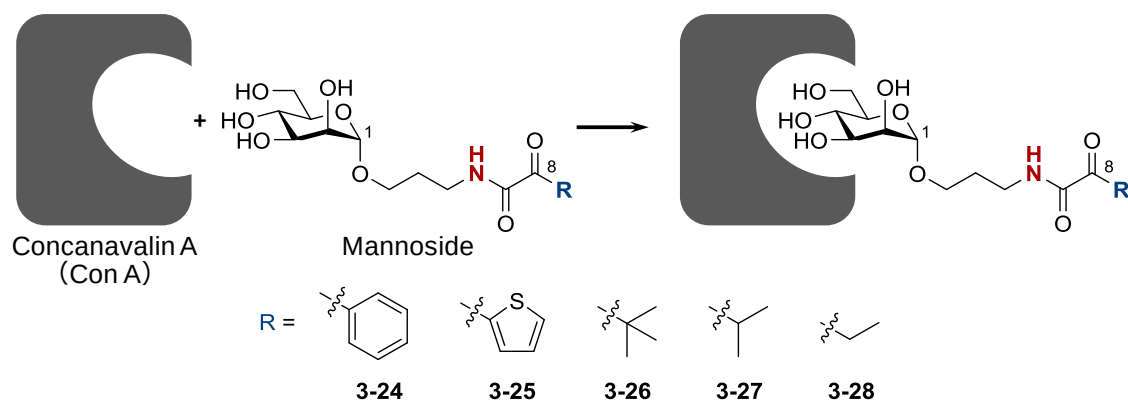
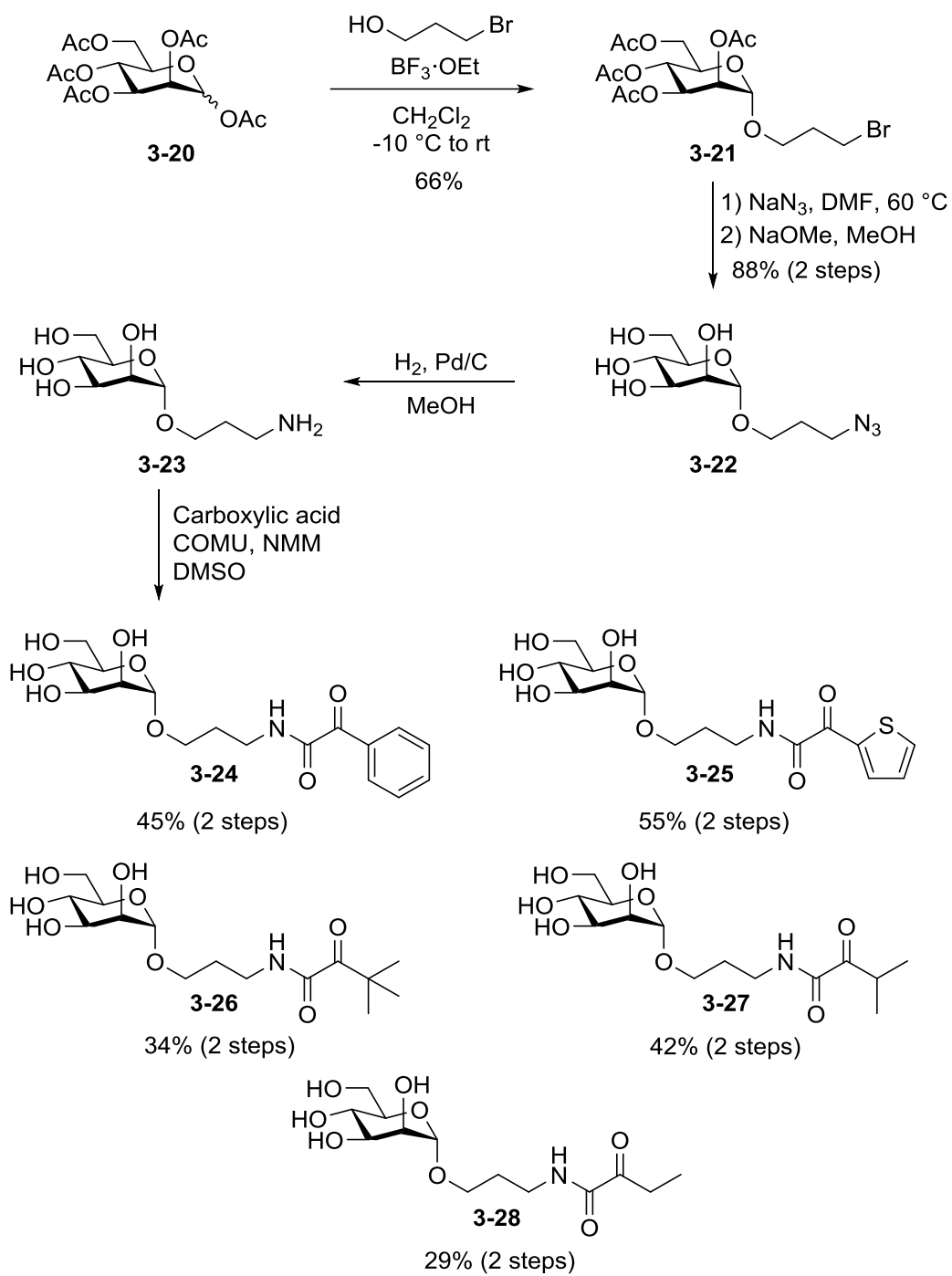


Figure 3-4. Concept for the Design of Photoaffinity Mannose Probe.

3-4. 水中での α -ケトアミドの性質

3-4-1. α -ケトアミドを有するマンノースの合成

まず、水中でのハイドレート形成や光分解を確認するため、 α -ケトアミドを有するマンノースプローブを合成した (**Scheme 3-5**)。ペンタアセテート **3-20** と 3-bromo-1-propanol とをグリコシル化し、ブロモ基の置換と、加水分解を経て **3-22** へと変換した。接触水素化によりアジド基をアミンへと還元し、種々のカルボン酸と縮合させることで5種類のマンノシド **3-24~3-28** を合成した。



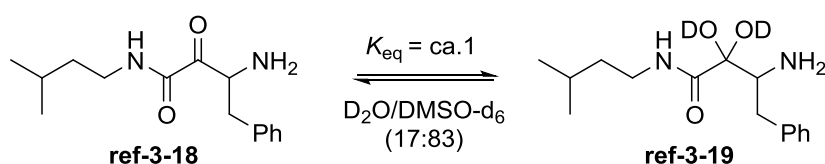
Scheme 3-5. Synthesis of Mannosides **3-24**~**3-28**.

3-4-2. ハイドレート形成に関する検討

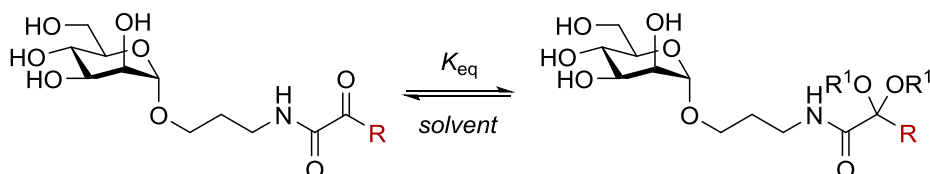
α -ケトアミドのケトン基は求電子性が高く、実際に α -ケトアミド **ref-3-18** は約半分が水中でハイドレートとして存在する (**Figure 3-5A**)²²。 α -ケトアミドはジカルボニル構造が消失すると、光励起されず、高反応性活性種は生じない。そこで、合成した α -ケトアミドがどの程度ハイドレートを形成するかを、NMR を用いて評価することにした。

重水に溶解させた 5 種の α -ケトアミドを加熱した後、¹H-NMR スペクトルをもとに平衡定数 K_{eq} を算出した (**Figure 3-5B**)。その結果、Et 体がもっともハイドレートを形成し易く、*i*-Pr、*t*-Bu、Ph の順にその平衡はケト基に偏っていくことがわかった。一方、thienyl 体ではハイドレートは確認されなかった。なお、重メタノール中での平衡定数は、重水の時と同様の傾向を示した。これらの結果から、 α -ケトアミドはハイドレートが一部存在するものの、水中でもある程度ケト構造を維持することがわかった。

A) Rich et al. (1992)



B)



Substituent R	K_{eq} in D ₂ O	K_{eq} in CD ₃ OD
Ph	0.126	0.212
2-thienyl	< 0.05	< 0.05
<i>t</i> -Bu	0.186	0.212
<i>i</i> -Pr	0.463	0.482
Et	0.585 ^a	0.863 ^a

Condition: The ratio was measured after heating at 100 °C for 4 h.

a) The ratio was measured immediately after preparation of sample.

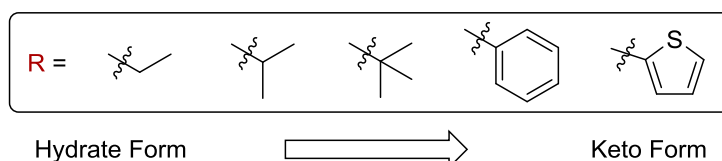


Figure 3-5. (A) Hydrate Formation of Reported α -Ketoamide **ref-3-18**. (B) Evaluation of Hydrate formation

3-4-3. α -ケトアミドの光分解速度解析

前述のように、光励起したベンゾフェノン、近傍に水素引き抜きできる分子がない場合、基底状態へと失活する。一方、光励起された α -ケトアミドは Norrish II 型反応を起こすだけでなく、二つのカルボニル間で開裂が起こる Norrish I 型反応を経由して自己分解する可能性がある。そこで、 α -ケトアミドを持つプローブが、光照射によってどの程度分解するか確認することとした。

合成した 5 種類の α -ケトアミドを光照射し、自己分解反応がどの程度起こるかを解析した (Figure 3-6)。その結果、合成した 5 種類の α -ケトアミドは、一次反応に従って分解することが分かった (See experimental section)。分解速度は置換基 R によって異なるが、thienyl 基を持つ 3-25 以外は、数分以内に原料の半分以上が消失した。一方、3-25 は他のプローブと比較すると大幅に分解速度が遅いことが確認できた。

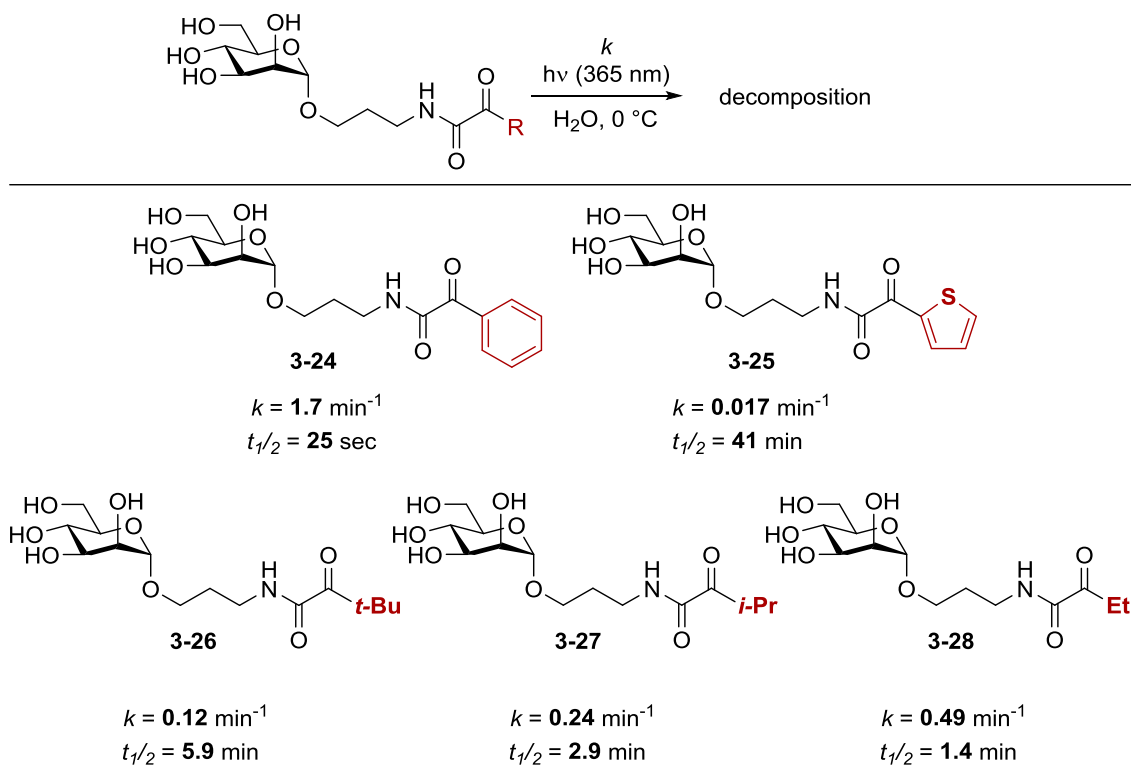


Figure 3-6. Decomposition Ratio and Half-life for Mannosides 3-24~3-28.

3-5. アルキンを有するマンノースプローブの創製

Con A の光親和性標識実験を実施し、 α -ケトアミドが光反応性として利用可能か確認することとした。前述の Beppu ら、Hamachi らは、Con A-プローブ複合体をアフィニティクロマトグラフィーで分離し、マスマスペクトルを用いて解析している。低いラベル化効率でも検出するためには、より感度の高い検出法が適していると推測し、プローブ-タンパク質複合体を蛍光検出することを計画した (Figure 3-7)。つまり、アルキンを有するマンノースプローブで Con A を光親和性標識した後に、クリックケミストリーを利用して蛍光分子を導入する。電気泳動後のゲルを、蛍光検出することで Con A の標識効率を解析しようと考えた。

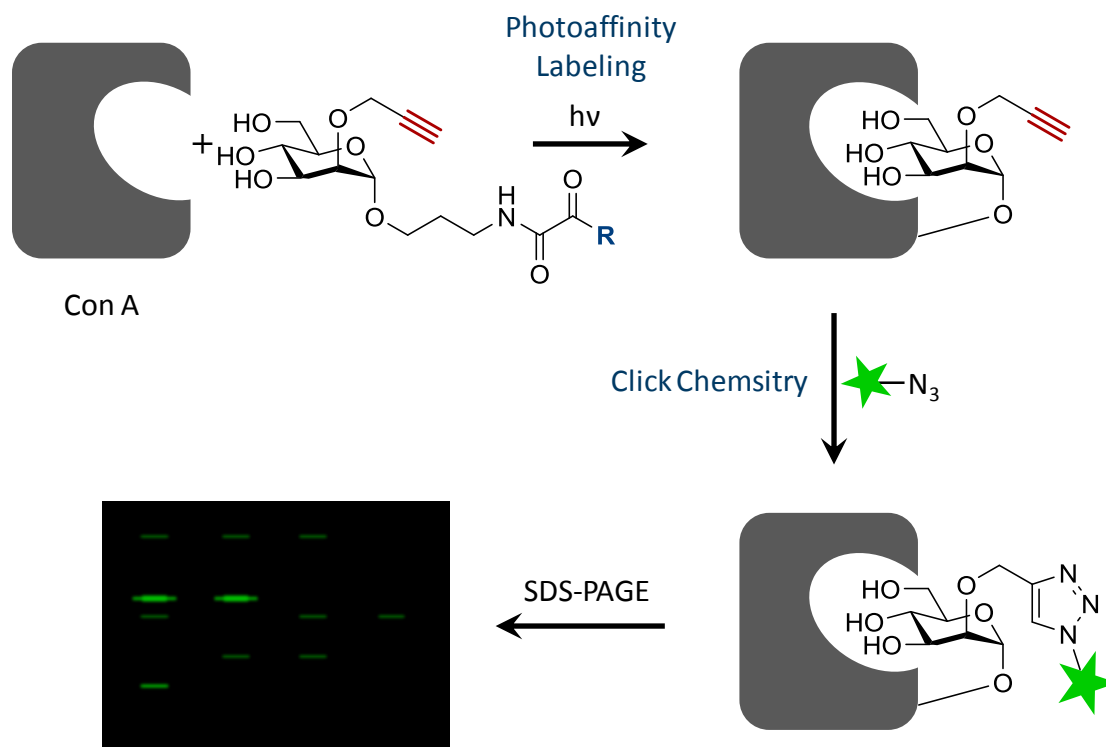


Figure 3-7. Detection of Protein-probe Complex with Click-chemistry.

Con A-プローブ複合体の解析を容易にする、アルキンをプローブに導入した場合、Con A とマンノースの親和性を低下させる可能性がある。前述の Sharon らの報告¹⁴によれば、Con A が属するマメ科レクチンの糖結合サイトにはアスパラギン酸 (Asp)、アスパラギン (Asn)、そして芳香族アミノ酸もしくはロイシ

ン (Leu) が存在し、これらのアミノ酸残基がマンノースおよびグルコースの認識に関わっている。Con A とメチル α -D-マンノシドが結合する際は Asp が 6 位および 4 位水酸基と、Asn が 4 位水酸基と水素結合を形成する。その一方で、2 位水酸基は水素結合に関与しないと考えられている。実際に、メチル α -D-マンノシドと Con A の共結晶構造 (Figure 3-8) を観察すると、マンノシドは還元末端が結合ポケットの外側に向くようにして Con A と結合しており、3、4 および 6 位水酸基が結合ポケットの深い部分に位置している。

以上のことを考慮し、クリックケミストリーに用いるアルキンをマンノース 2 位に導入したケトアミドを設計した (Figure 3-9)。また、アルキンの導入により懸念される Con A との親和性の低下は、レクチンと糖の結合能評価に汎用される ITC を用いて評価することとした。^{14,23}

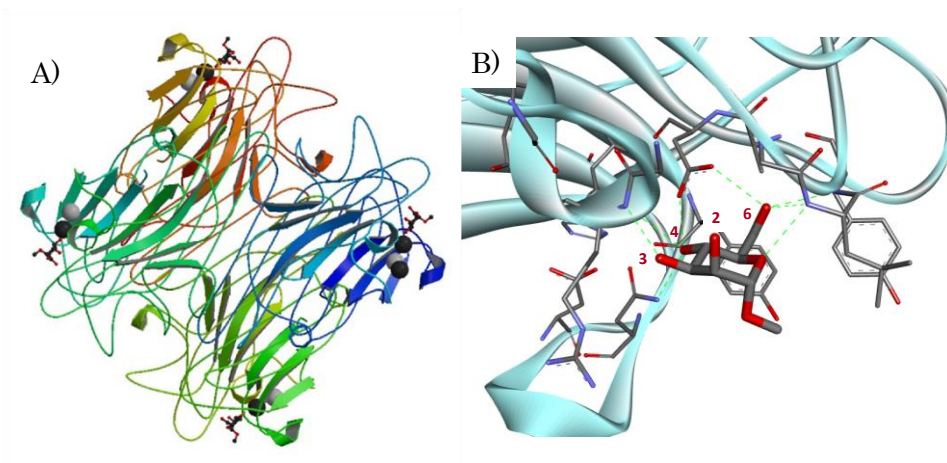


Figure 3-8. The Crystal Structure of Concanavalin A Complexed with Alpha-Methyl-D-Mannoside (PDB ID; 5CNA); A) Whole Structure of Con A-Mannoside Complex B) Magnified View of the Binding Pocket (loop A)

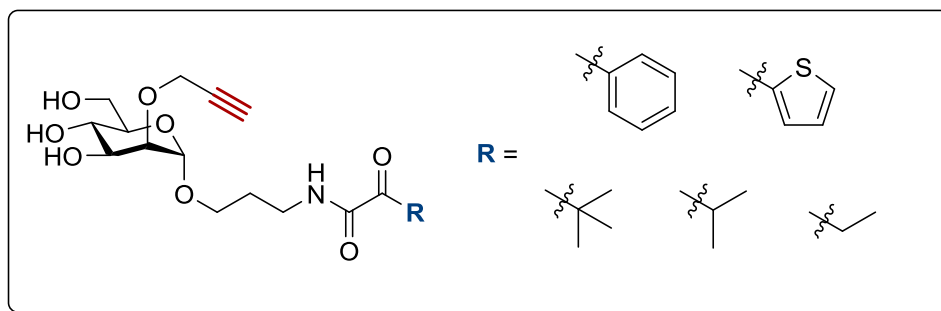
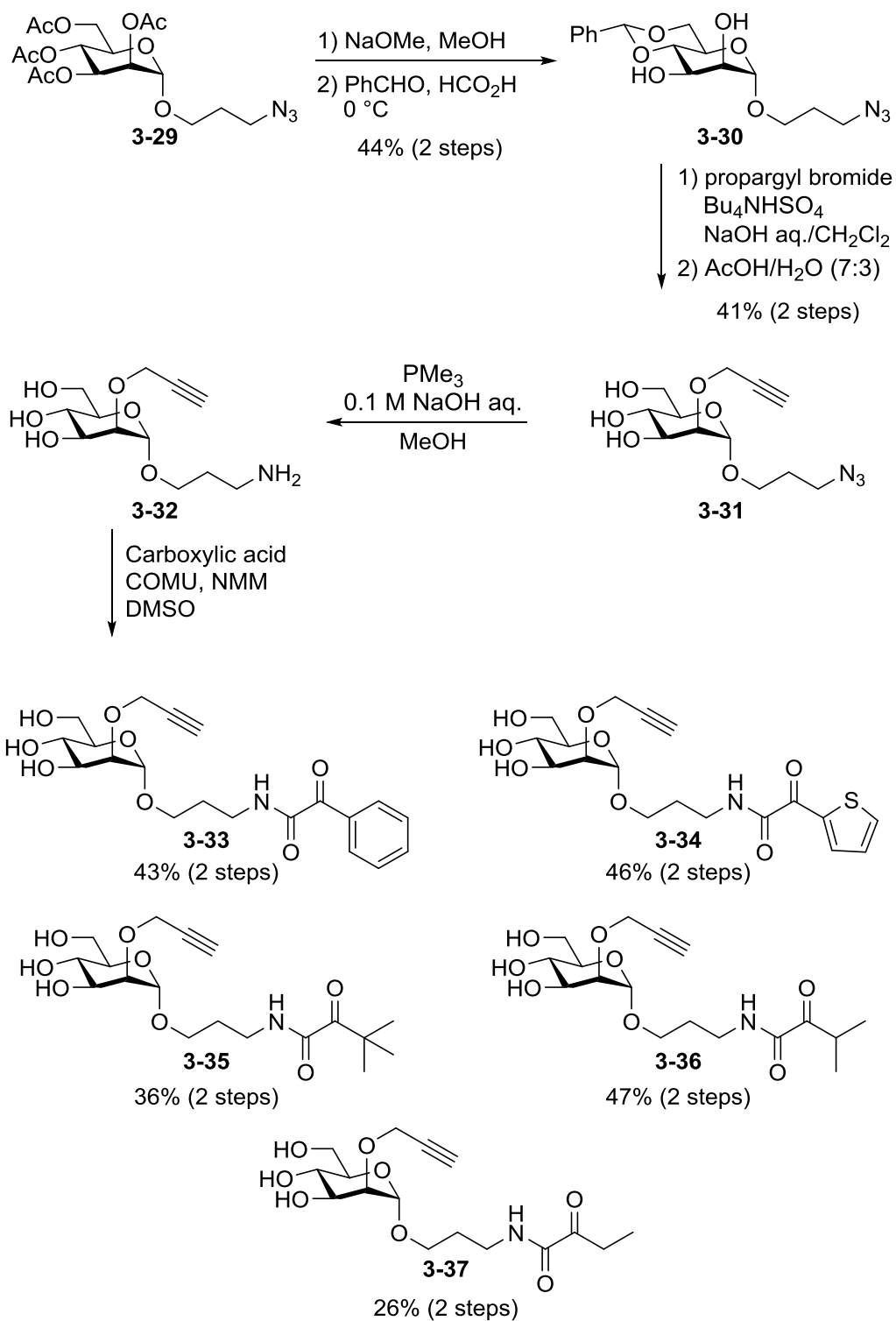


Figure 3-9. Structure of Alkyne-tagged Mannoside Probe.

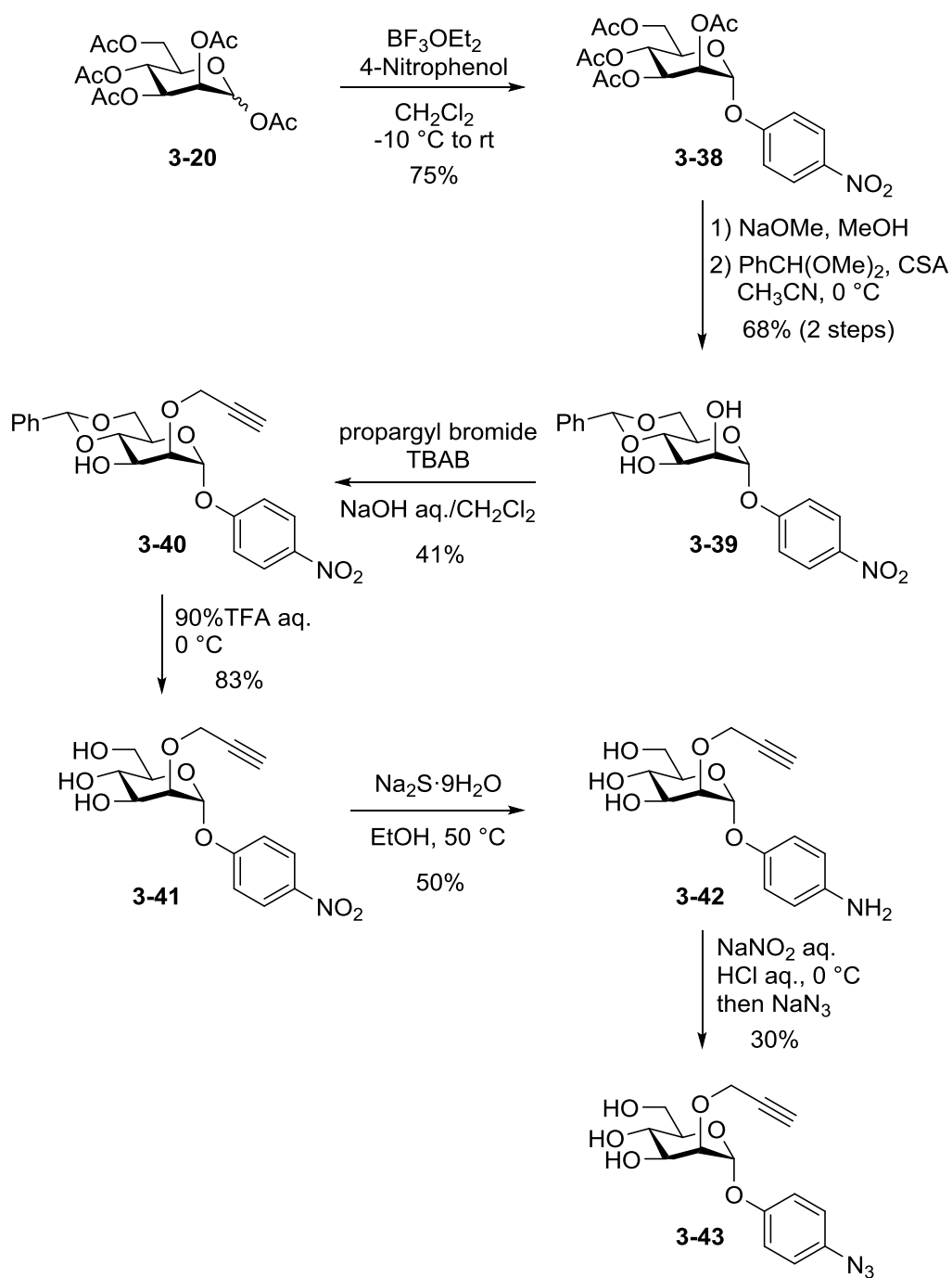
3-5-1. アルキンを有するマンノースプローブの合成

アルキンを持つマンノースプローブの合成を示す (Scheme 3-6)。テトラアセテート **3-29** を加溶媒分解させ、低温で注意深くマンノース 4、6 位水酸基をベンジリデンアセタールで保護した。相間移動触媒を用いて、ジオール **3-30** を位置選択的にアルキル化した後、アセタールを酸加水分解することで **3-31** へと変換した。なお、**3-31** は長期保存すると、分子内でトリアゾールを形成した。**3-31** のアジド基を Wong らの条件²⁴に従って還元し、アミン **3-32** へと変換した。種々のカルボン酸をアミンと縮合させることで、アルキンを有するマンノースプローブ **3-33**~**3-37** を合成した。

また比較のために、 PhN_3 を光反応性基として持つプローブを以下のように合成した (Scheme 3-7)。Beppu らの報告に従い、**3-20** と 4-ニトロフェノールをグリコシル化し **3-38** を調製した。Ac 基を除去して生じた水酸基をアセタールで保護し、ジオール **3-39** へと誘導した。相間移動触媒を利用して、2 位選択的にプロパルギル基を導入し、酸処理することで **3-41** を合成した。種々検討した結果、**3-41** のニトロ基は $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ を作用させることで、選択的に還元できることを見出した。得られたアニリンを二段階でアジドへと変換し、**3-43** を合成した。



Scheme 3-6. Synthesis of Mannose probes **3-33~3-37**.



Scheme 3-7. Synthesis of Alkyne-tagged PhN₃ Probe **3-43**.

3-5-2. ITC を利用したマンノースプローブの評価

マンノースプローブに導入したアルキンが、Con A との結合に及ぼす影響を、ITC (Isothermal Titration Calorimetry : 等温滴定カロリーメトリー) で評価した。ITC は、タンパク質と低分子が相互作用する際に生じる、反応熱を直接測定することで、結合定数 (K_A)、エンタルピー変化 (ΔH)、エントロピー変化 (ΔS) を一度に求められる手法である (Figure 3-10)。

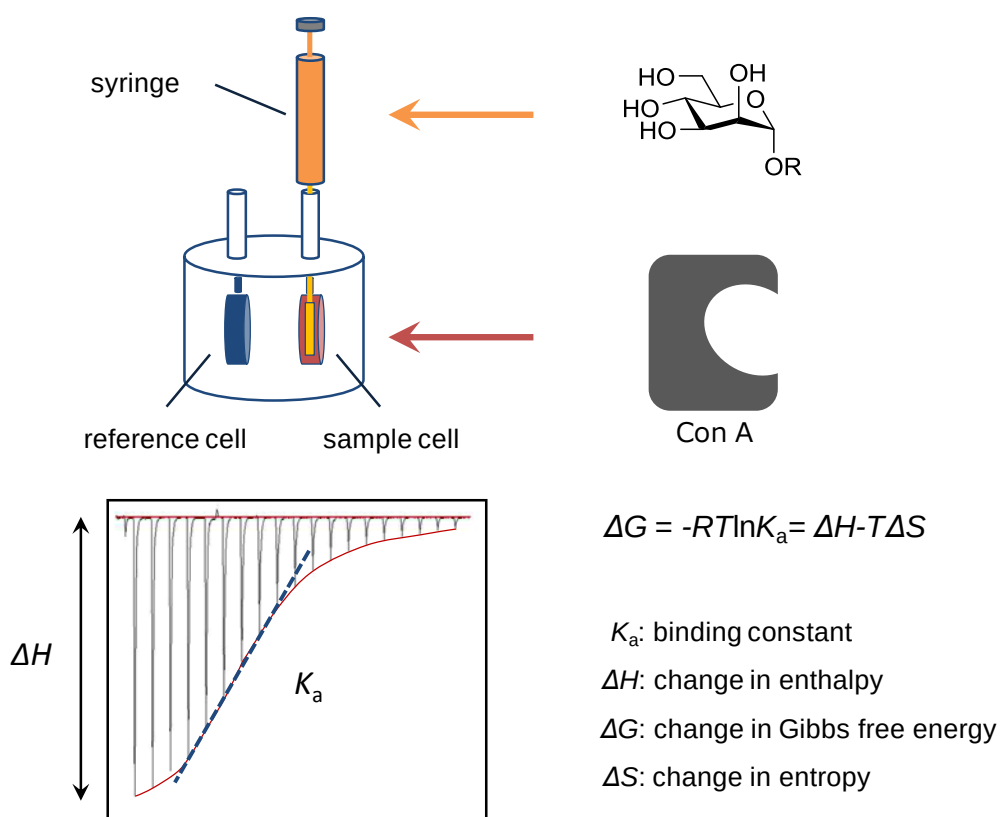
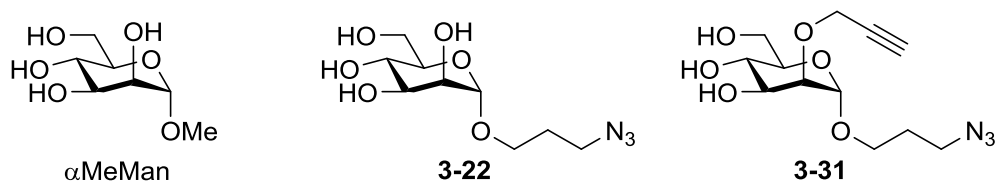


Figure 3-10. Isothermal Titration Calorimetry (ITC).

2 位プロパルギル基の影響を評価するため、ITC を用いて、メチル α -D-マンノシド、テトラオール **3-22** およびトリオール **3-31** と Con A との相互作用を解析した (Table 3-2)。なお、測定のバッファーには、Beppu らが Con A の光親和性標識に使用したものをを用いた¹⁶。測定の結果、メチル α -D-マンノシドは $1.05 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ の結合定数を示し、解析条件が異なる Baron らや Brewer らの文献値と同程度であったことから、本実験系の妥当性を確認できた。また、**3-22** はメチルマ

ンノシドと同等の結合定数を示し、リンカーとして導入したアジドプロピル基が Con A との結合を阻害しないことが示唆された。アルキンを導入したトリオール **3-31** はテトラオールよりもやや高い結合定数を示し、2 位のプロパルギル基が Con A との結合に大きく影響を及ぼさないことが確認できた。

Table 3-2. Thermodynamic Parameters Drived from Titration of Con A with Mannosides.



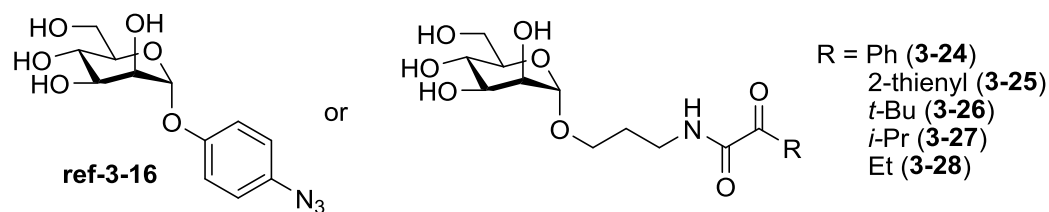
Compound	K_a [$M^{-1} \times 10^4$]	$-\Delta G$ [kcal/mol]	$-\Delta H$ [kcal/mol]	$-T\Delta S$ [kcal/mol]
α MeMan	1.05	5.57	3.90	-1.67
3-22	1.20	5.66	7.10	1.44
3-31	3.91	6.37	6.65	0.276
α MeMan	2.80 ^a	6.07 ^a	5.69 ^a	-0.382 ^a
α MeMan	0.82 ^b	5.3 ^b	8.2 ^b	2.9 ^b

Condition: The buffer was 10mM pH 5.0 acetate buffer containing 1mM $MnCl_2$ and 1mM $CaCl_2$; a) The buffer was 1mM pH 4.5 acetate buffer. (adapted from Baron et al *Biochemistry* **1987**, 26, 3971.); b) The buffer was 0.1M pH 7.2 HEPES buffer containing 1mM $MnCl_2$, 1mM $CaCl_2$, and 0.9M NaCl. (adapted from Brewer et al *Biochemistry* **1994**, 33, 1149.)

続いて、5 種の α -ケトアミド、 α MeMan、および **ref-3-16** の結合定数を比較した (**Table 3-3**)。ref-3-16 は α MeMan よりも 5 倍程度 Con A との結合が強く結合定数 $5.03 \times 10^4 M^{-1}$ を示した。合成した α -ケトアミドは R の置換基によって顕著な差が見られたものの、いずれも α MeMan よりも Con A と強く結合した。芳香環を持つ α -ケトアミドを比較した場合、2-thienyl 基を有する **3-25** の方が、より Con A との相互作用が強かった。一方、アルキル基で置換された α -ケトアミドは嵩高さが増すごとに Con A との結合が強くなり、**3-26** の結合定数は $7.39 \times 10^4 M^{-1}$ であった。これらマンノース誘導体が見せるエンタルピー変化とエントロピー変化に着目すると、相互作用における熱力学特徴を推測できる。低分子-タンパク質間相互作用では、水素結合やファンデルワールス相互作用が負のエンタ

ルピー変化を与え、正のエンタルピー変化は脱水和や構造の柔軟性に起因する^{25,26}。 α MeMan や **ref-3-16** は負の ΔH 、正の ΔS を示しており、相互作用の特徴として、疎水結合による脱水和の影響が考えられる。一方、 α -ケトアミドの与えた負の ΔH 、負の ΔS は一般の抗原抗体間相互作用に見られるプロファイルと一致する²⁶。水素結合やファンデルワールス力による有利なエンタルピー変化と、分子の自由度が制約されることによる不利なエントロピー変化が、互いに補償し合い、系全体として負の ΔG を与えたと推測される。Con A との相互作用において、水素結合やファンデルワールス力の寄与が大きい α -ケトアミドは、非疎水性の光反応性基として望ましい性質を有すると言える。

Table 3-3. Thermodynamic Parameters Derived from Titration of Con A with α -Ketoamides



Compound	K_a [$M^{-1} \times 10^4$]	$-\Delta G$ [kcal/mol]	$-\Delta H$ [kcal/mol]	$-T\Delta S$ [kcal/mol]
α MeMan	1.05	5.57	3.90	-1.67
ref-3-16	5.03	6.52	4.24	-2.28
3-24	1.58	5.82	7.78	1.96
3-25	3.37	6.30	10.5	4.15
3-26	7.39	6.76	9.41	2.65
3-27	1.59	5.83	8.59	2.76
3-28	1.32	5.71	8.01	2.30

Condition: The buffer was 10mM pH 5.0 acetate buffer containing 1mM $MnCl_2$ and 1mM $CaCl_2$.

3-6. マンノースプローブを用いた光親和性標識

3-6-1. クリックケミストリーの条件最適化

Con A-マンノースプローブ複合体の検出法を確立するため、ArN₃ プローブ **3-43** を用いてプロトコルの確立を目指した。MacKinnon と Taunton らの手法を参考に²⁷、以下のように光親和性標識を実施した。Con A と ArN₃ プローブ (Con A モノマーに対して 10 等量) を混合した後、0 °C で 1 時間静置した (**Figure 3-11**)。形成した糖-タンパク質の複合体に 365 nm の光を照射し、Con A をラベル化した。照射後の溶液に蛍光基を持つアジドを加え、SDS 存在下タンパク質-プローブ複合体に蛍光基を導入した。この際、Cu (I) のリガンドには THPTA を用いて、アスコルビン酸ナトリウムを還元剤として使用した。トリクロロ酢酸 (TCA) を用いてタンパク質を沈殿させ、低分子と塩を除去した後に、SDS 電気泳動でタンパク質を分離した。電気泳動後のポリアクリルアミドゲルを、CCD imager で解析し、蛍光バンドを検出した。解析したポリアクリルアミドゲルを、クーマシーブリリアントブルー (CBB) で染色した。染色したゲルを再度 CCD imager を用いて解析することで、各バンドのタンパク質量を定量した。

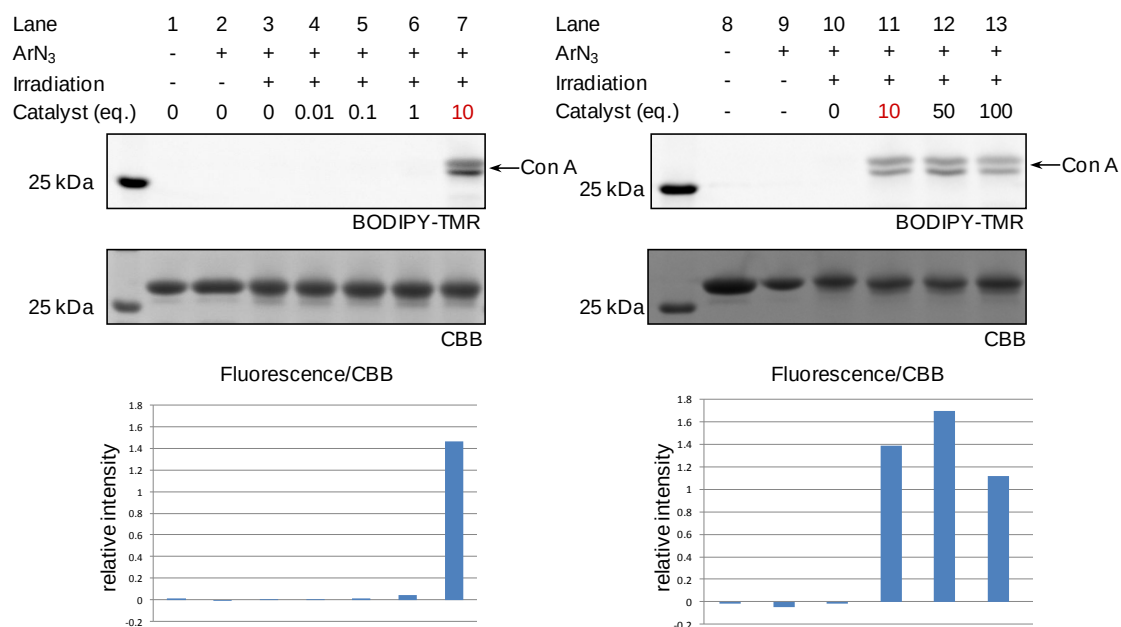


Figure 3-12. Screening of Equivalent of Catalyst (n=1).

蛍光団の等量を最適化した (**Figure 3-13**)。蛍光ラベル化されたタンパク質は、使用するアジドの等量を増やすことで、顕著に増加した (レーン 2~6、7~12)。50 等量以上アジドを用いると、ラベル化タンパク質は徐々に増えるものの、その上昇は緩やかであった。このことから、以下の蛍光ラベル化反応には、50 等量のアジドを用いることとした。

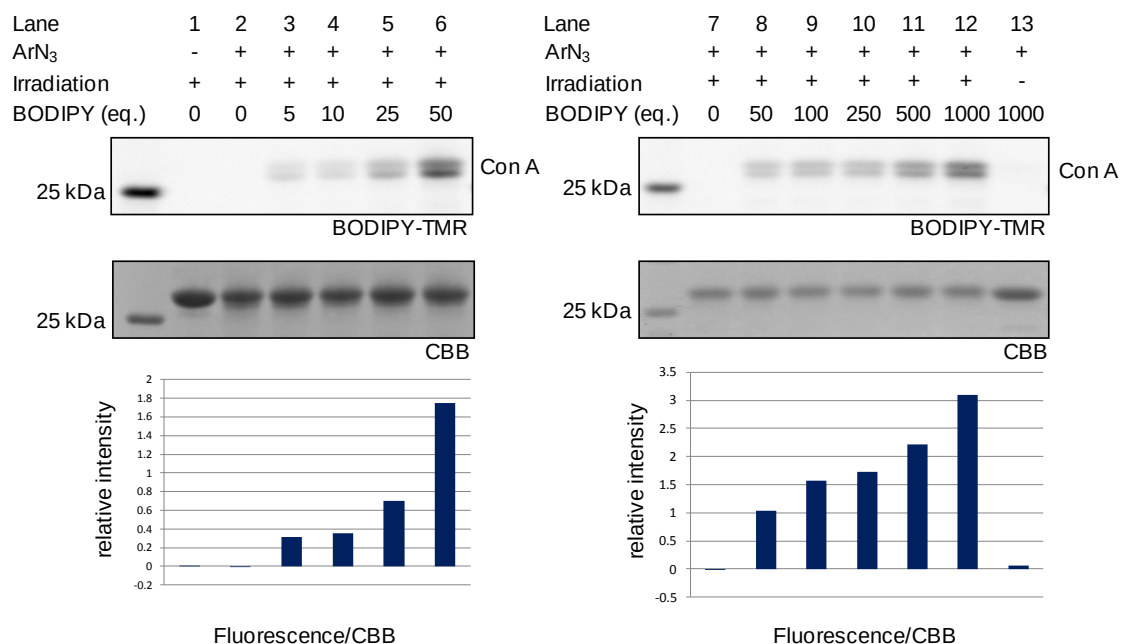


Figure 3-13. Screening of Equivalent of Fluorophore Azide (n=1).

3-6-2. 非特異的標識の抑制に向けた検討

前節で見出した、クリックケミストリーの条件を用いて、 α -ケトアミド **3-33**~**3-37** の標識効率を検討した (Figure 3-14)。光親和性標識は、先と同様のプロトコルで実施し、 ArN_3 プローブの代わりに、 α -ケトアミド **3-33**~**3-37** を用いた。各ケトアミドに対して、照射時間と競争阻害剤である α -D-メチルマンノシド (MeMan) の影響を確かめた。その結果、 α -ケトアミド **3-33**、**3-35**、**3-36** はいずれも照射時間に依存して、蛍光強度が増加した。thienyl 基を持つ **3-34** は、10秒照射したときの蛍光強度が最も高く、それ以上の照射は、蛍光タンパク質量を減少させた。一方、Et 基で置換したプローブ **3-37** は、照射時間や阻害剤の有無にかかわらず、蛍光タンパク質が殆ど検出されなかった。照射時間に依存して蛍光強度が増加する、**3-35** や **3-36** とは対照的な結果が得られた。

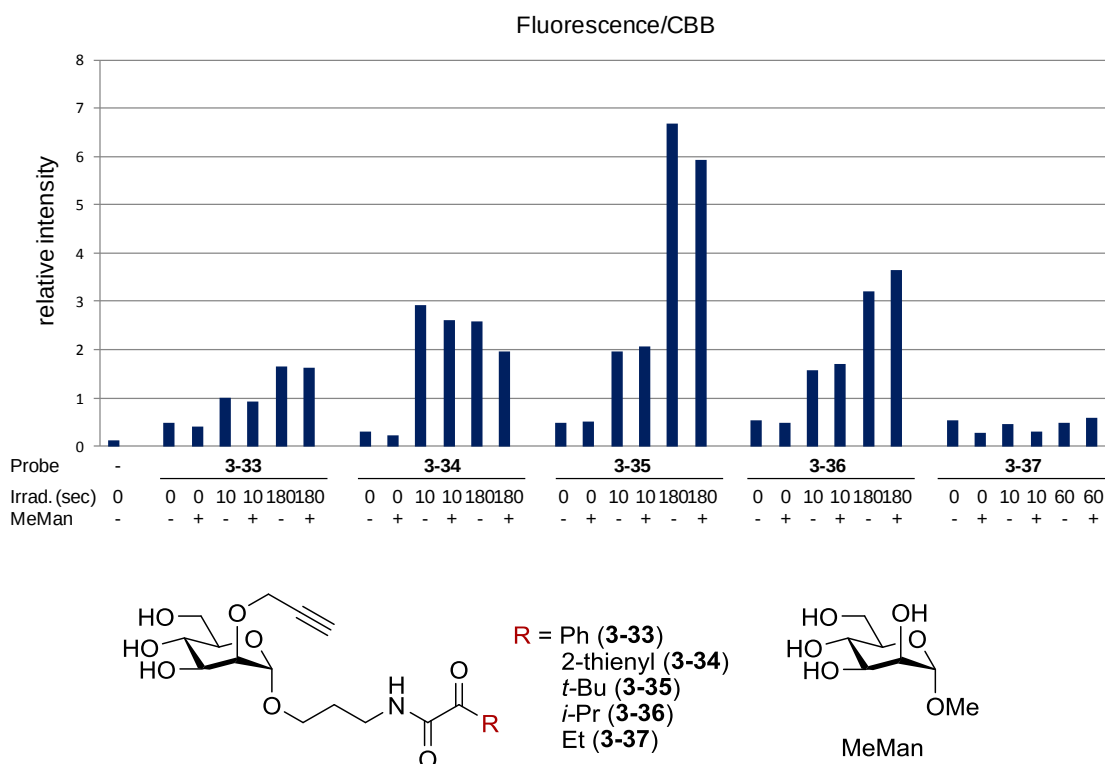


Figure 3-14. Effect of Substituent R on The Photoaffinity Labeling (n =1).

先の検討では、いずれのレーンにおいても、MeMan の添加によって蛍光強度が変化しなかった。プローブに対して 50 倍の競争阻害剤を添加しても、全く競争阻害が見られなかったことから、マンノースプローブは非特異的に Con A と共有結合形成したと推測した。マンノースプローブと Con A と結合形成には 3 つの可能性が考えられる。一つは、Con A の糖結合部位にマンノースプローブが結合し、光照射によって α -ケトアミドが近傍のアミノ酸と共有結合を形成する場合である。この反応が理想としている光親和性標識である。二つ目の可能性は、光照射によって、Con A の糖結合部位以外の場所が標識される場合である。Con A は単量体あたり、1 つの糖結合部位しか持たない。水中での光分解 (3-7 節で後述) では、5 種類全てのケトアミドがいずれも複雑な混合物を与えることを考えると、過剰の α -ケトアミドの光分解によって発生した高反応性活性種が、非特異的ラベリングに関与している可能性が考えられる。もう一つの可能性は、 α -ケトアミドがアミノ酸残基と、安定なヘミアセタールまたはイミンを形成する場合である。 α -ケトアミドはセリンプロテアーゼ阻害剤によく見られる構造で、活性中心のセリンと可逆的な共有結合を形成することが知られている (Figure 3-15) ^{28,29}。ヘミアセタールやイミン形成は平衡反応なので、 α -ケトアミドの等量が多ければ、共有結合した複合体も多くなるはずである。非特異的標識を抑制するため、筆者はプローブの等量を検討することとした。

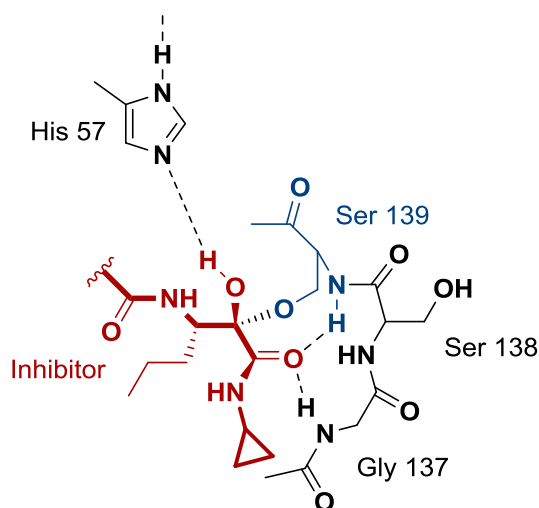


Figure 3-15. α -Ketoamide Inhibitor Forming Covalent Bond to HCV NS3-4A Protease.²⁹

プローブの等量の検討には、蛍光ラベル化 Con A が検出されていた *i*-Pr プローブ **3-36** を利用した (Figure 3-16)。ヘミアセタールやイミン形成が非特異的標識に関わっているならば、 α -ケトアミドの添加が、標識効率に何かしらの影響を与えるはずである。そこで、アルキンを持たないマンノースアナログ **3-27** の有無を各レーンにおいて評価した。光親和性標識の結果、プローブの等量に依存して標識効率が増加し (レーン 1~10)、結合形成が光照射依存的事であることを確認できた (レーン 9~12)。このことから、蛍光 Con A の生成が、ヘミアセタールやイミン形成によるものではないことが示唆された。レーン 1~10 ではマンノースアナログ **3-27** の添加によって蛍光タンパク質量が変化し、マンノースアナログが、プローブ **3-36** と Con A の相互作用を競争阻害することを示した。

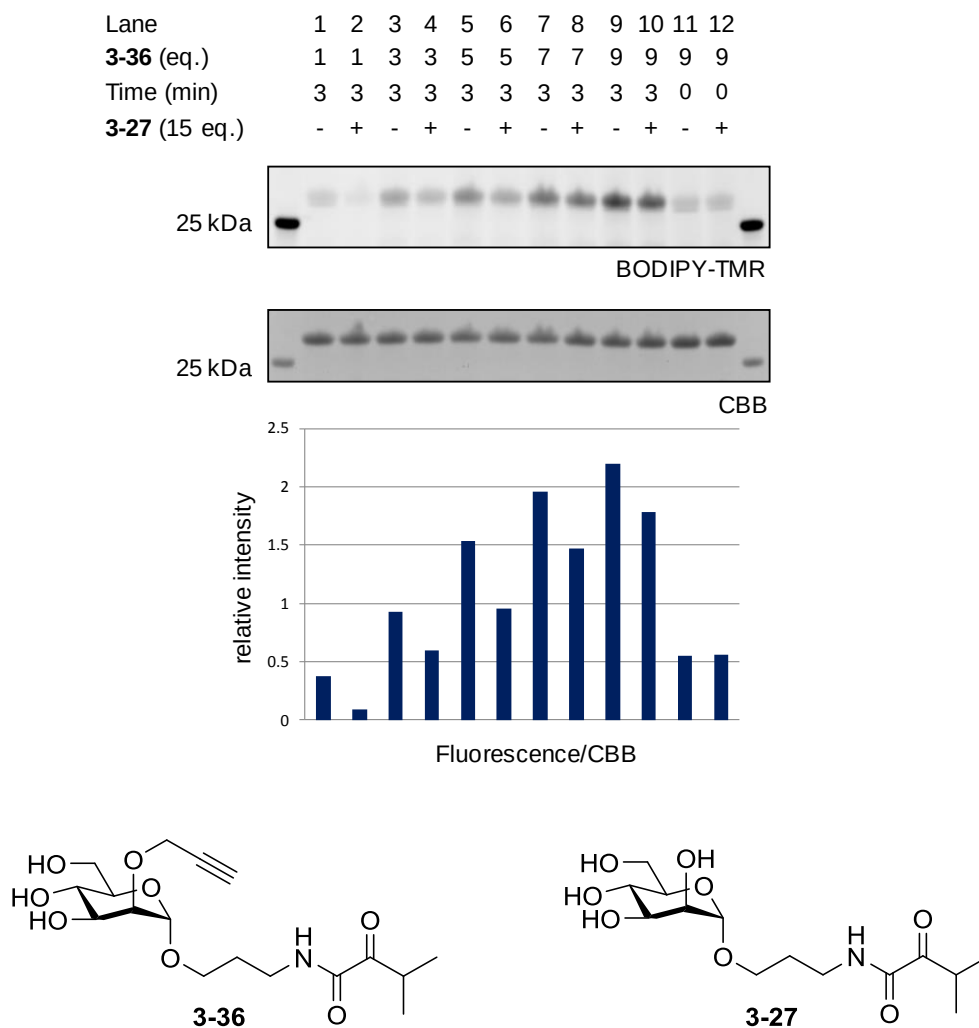


Figure 3-16. Screening of Equivalent of Photoaffinity Probe **3-36** (n =1).

プローブの等量をさらに減らして光親和性標識を検討した (**Figure 3-17**)。プローブを3等量および1等量用いたときの結果をレーン1~11に示した。蛍光 Con A の量は、プローブのみの添加では変化せず (レーン 1、2、7)、光照射によって増加している (レーン 3、7)。MeMan もしくはマンノースアナログ **3-27** の添加によって、同程度蛍光量が減少したことから、マンノース部位が競争阻害に関わることが示唆された (レーン 4、5)。MeMan とマンノースアナログ **3-27** を両方添加した場合は、さらに蛍光強度が減少しており、 α -ケトアミド依存した結合生成が一部存在していることが示唆される。

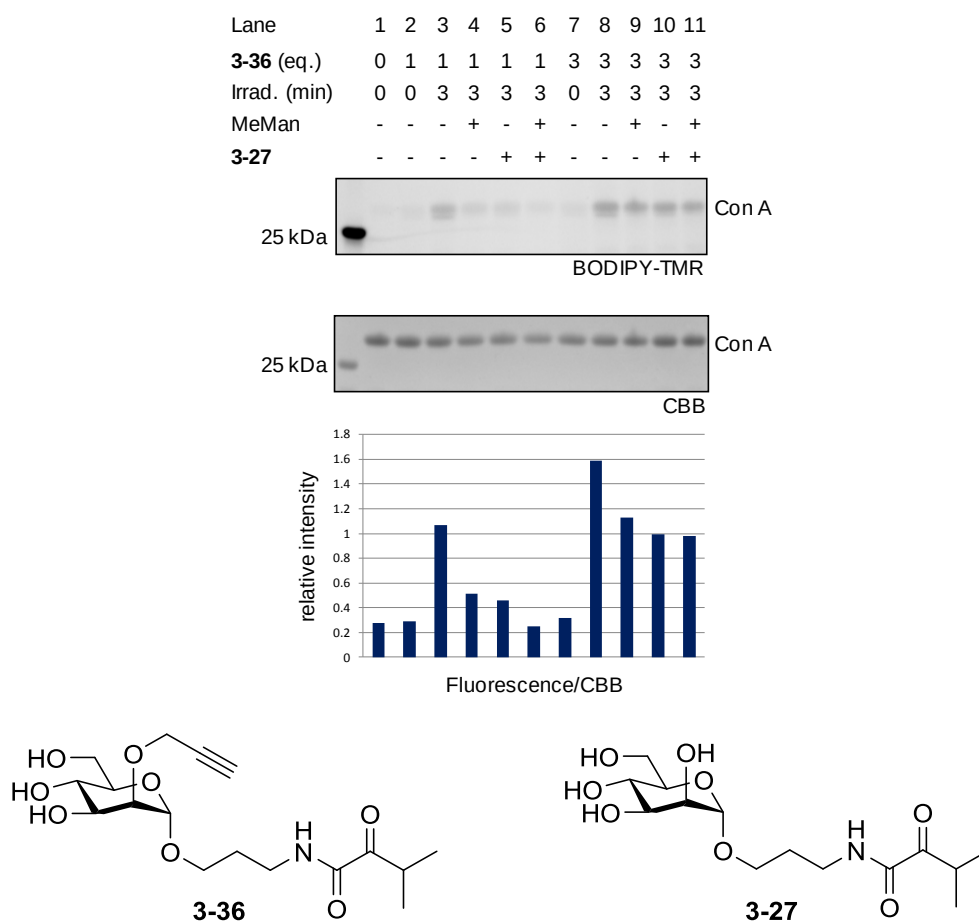


Figure 3-17. Screening of Equivalent of Probe **3-36** (n=1).

3-6-3. 5 種類の α -ケトアミドを用いた光親和性標識実験

これまでの検討で見出した条件をもとに、5 種のプローブ **3-33**~**3-37** と ArN_3 プローブを用いた光親和性標識を実施した (**Figure 3-18**)。Et 基 (レーン 4~6) や *t*-Bu 基 (レーン 16~18) を持つプローブを用いると、蛍光タンパク質は殆ど検出されなかった。一方、thienyl 基を持つプローブ **3-34** は、 ArN_3 に次いで、蛍光強度が高かった (レーン 8)。蛍光強度は ArN_3 の半分程度ではあるが、MeMan による競争阻害がはっきりと確認でき、マンノース構造に由来したラベル化反応が進行したと考えられる (レーン 9)。*i*-Pr 基や Ph 基で置換されたプローブを用いた場合にも、わずかながら蛍光 Con A の生成を確認することが出来た (レーン 1~3、13~15、19~21)。

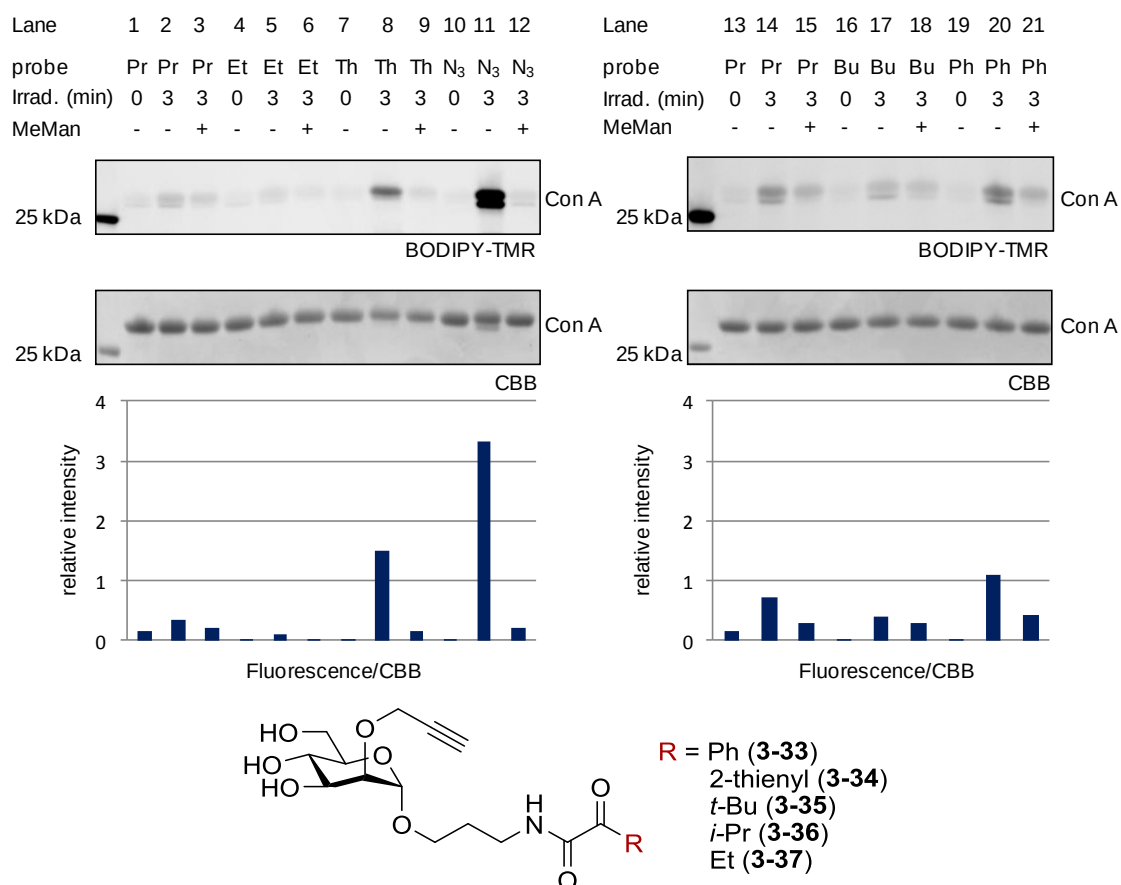


Figure 3-18. The Effect of R Groups on Labeling Efficiency (n =1).

3-6-4. 光親和性標識における pH 依存性

光親和性標識の pH 依存性を確認した。酸性から中性の範囲で pH 依存性を確かめるため、MES バッファーを採用し、5 種類の α -ケトアミドと ArN₃ プローブの光親和性標識を検討した (Figure 3-19 ~ 3-21)。その結果、pH の違いによって標識効率に差が見られた。pH 5.5 のとき、2-thienyl 基を持つ **3-34** が、5 種類の α -ケトアミドのうちで、最も蛍光強度が高かった (Figure 3-19、レーン 8)。Ph 基を持つ **3-33** や *i*-Pr 基を持つ **3-36** を用いた場合には、蛍光強度は減少しており、Et や *t*-Bu 基を有するプローブでは、殆ど蛍光 Con A を検出できなかった (レーン 14、20)。

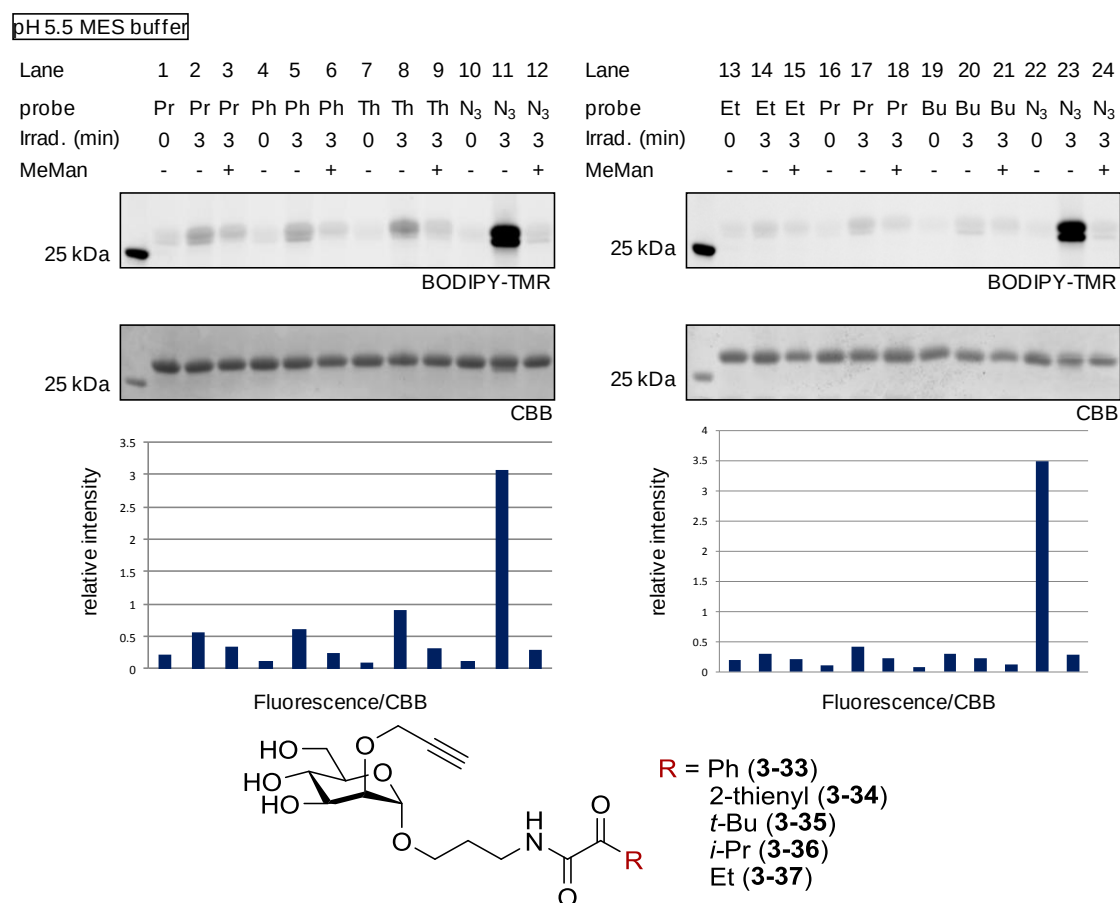


Figure 3-19. The Effect of R Groups in pH 5.5 MES Buffer. (n =2).

一方 pH 6.0 での検討では、Ph 基を持つ **3-33** や *i*-Pr 基を持つ **3-36** が、**3-34** より高い蛍光強度を示した (**Figure 3-20**、レーン 2、5、8)。しかし、MeMan 存在下で光照射した場合の標識効率が、他のプローブと比較するとわずかに高く、非特異的な標識が一部進行したことが示唆される (**Figure 3-20**、レーン 3、6、9、12)。プローブ **3-35**、**3-37** は先と同様に、いずれも蛍光強度が低かった (レーン 14、20)。

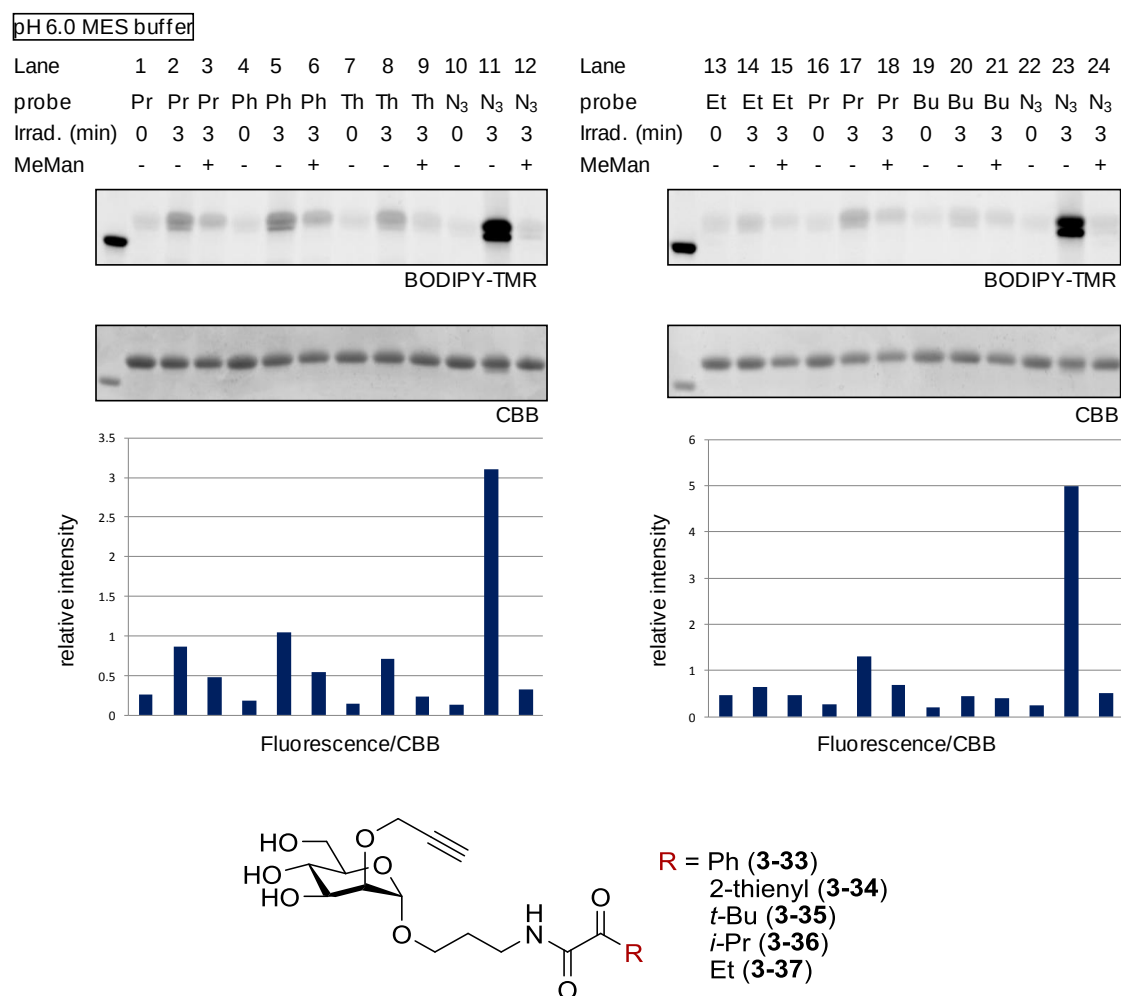


Figure 3-20. The Effect of R Groups in pH 6.0 MES Buffer. (n =2).

pH 7.0 での蛍光タンパク質量は、**3-33** を用いたときに最も高く、蛍光強度の序列は Ph > thienyl > *i*-Pr になった (**Figure 3-21**、レーン 2、5、8)。しかし、MeMan 存在下光照射した場合にも、蛍光強度が依然として高い値を示しており、糖構造に由来しない非特異的なラベリングが進行していることがうかがえる (**Figure 3-21**、レーン 6)。なお、この場合にも **3-35** と **3-37** は蛍光強度が低かった。以上の結果から、 α -ケトアミドの光親和性標識では pH 依存性が存在し、より高い pH では非特異的なラベリングが見られることが分かった。先述のように、Con A は pH 5.0 付近でホモ 2 量体を、pH 7.0 付近でホモ 4 量体を形成するため¹⁴、Con A の会合状態の変化が標識効率に影響しているのかもしれない。なお、Beppu、Hamachi らの報告では、pH 5.0 のアセテートバッファーを用いて Con A の光親和性標識を実施している。

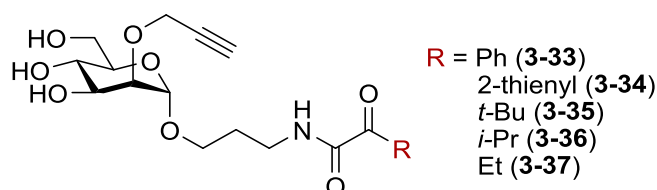
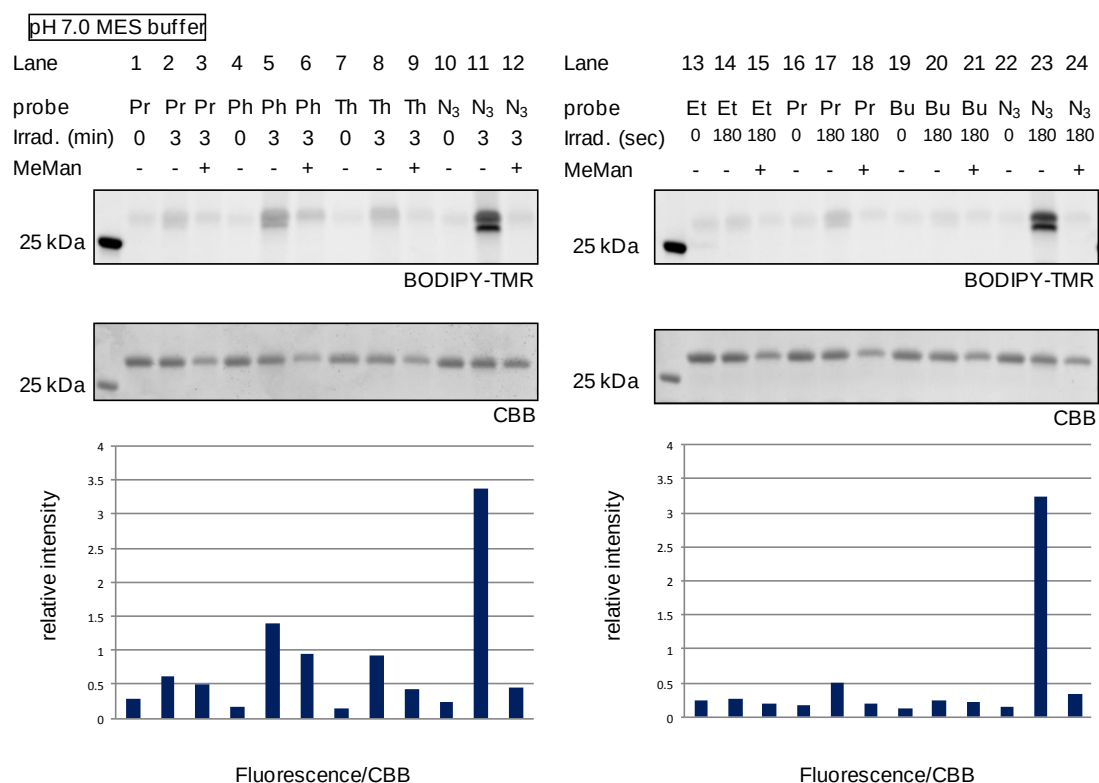


Figure 3-21. The Effect of R Groups in pH 7.0 MES Buffer. (n =2).

3-7. 光親和性標識実験の考察

Figure 3-18 に示した光親和性標識実験では thienyl、Ph、*i*-Pr 体の順に標識効率が高く、一方 *t*-Bu や Et 体を用いた場合は、Con A との結合が殆ど確認できなかった (**Figure 3-22**)。この標識効率の違いを考察するため、5 種類の α -ケトアミド (**3-24~3-28**) の光分解物の同定を試みた。

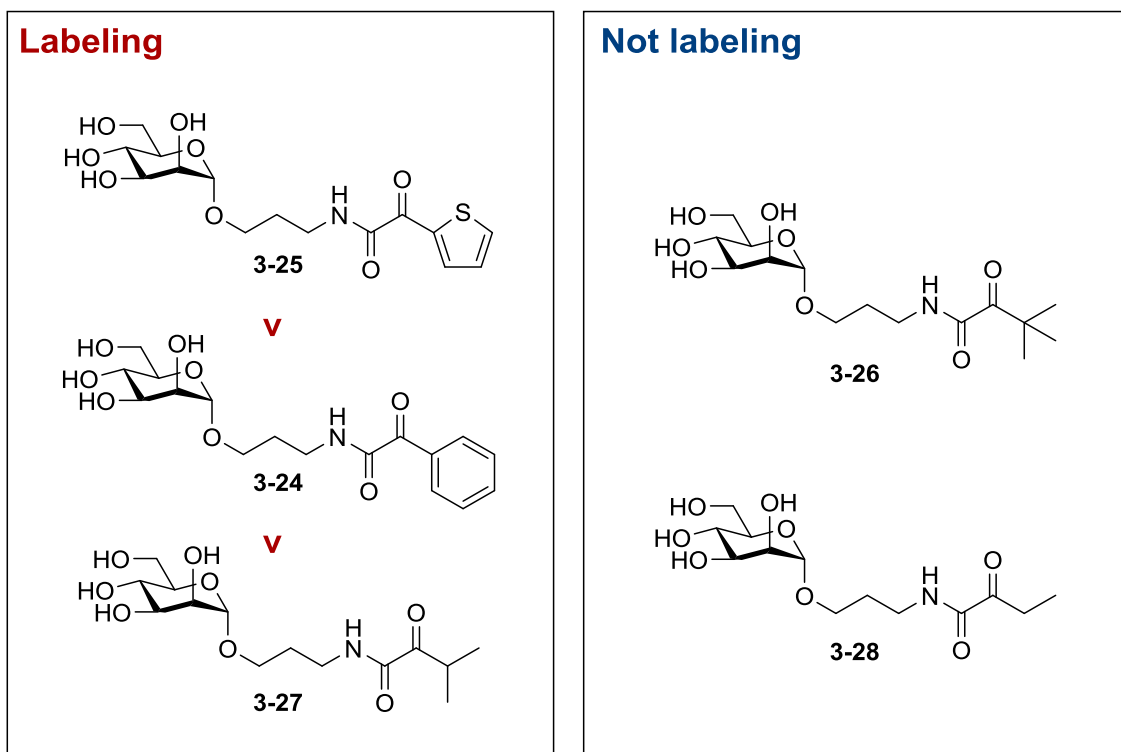


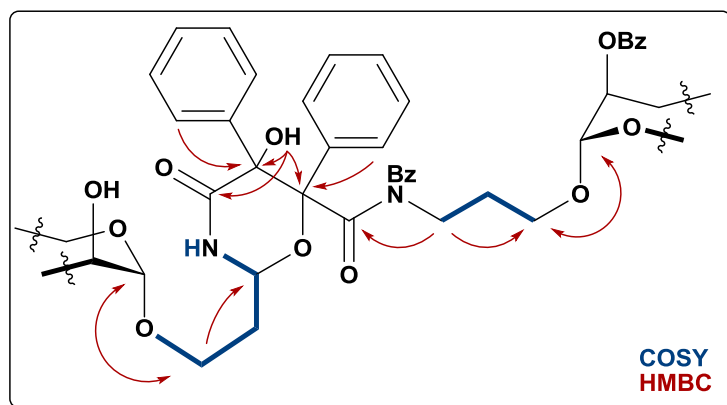
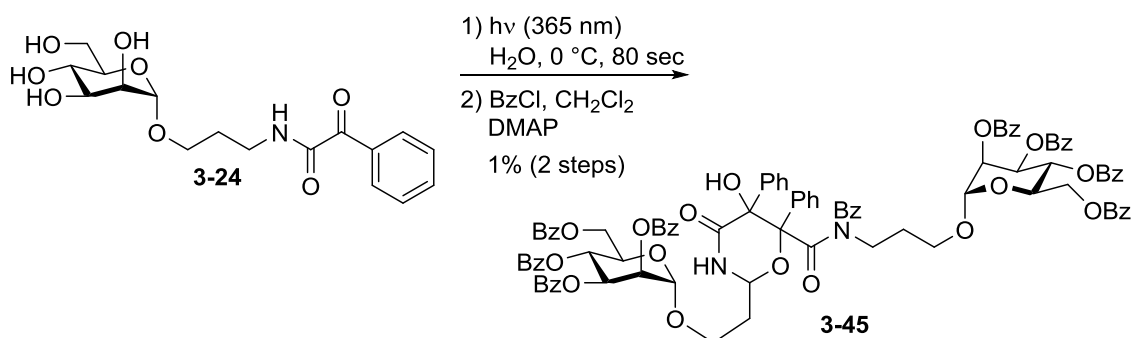
Figure 3-22. The Summary of Photoaffinity Labeling.

3-7-1. 光分解物の解析

5 種類の α -ケトアミド (**3-24~3-28**) を水中で光照射し、原料消失を確認後、HPLC を用いて解析した。各 α -ケトアミドの光分解の結果を以下に示す。

Ph 体 3-24 の光分解物

分解物の HPLC 分析の結果、UV 吸収 (~ 190 nm) を示す分子は殆ど検出されなかった。そこで、分解物を単離し易い構造に誘導することを考えた。種々検討の結果、Bz 化することで分解物を単離することが出来た。各種 NMR スペクトルを用いて決定した構造は、Zehavi らの報告³⁰ と類似の二量体構造であることが分かった (**Figure 3-23**)。



Zehavi (1977)

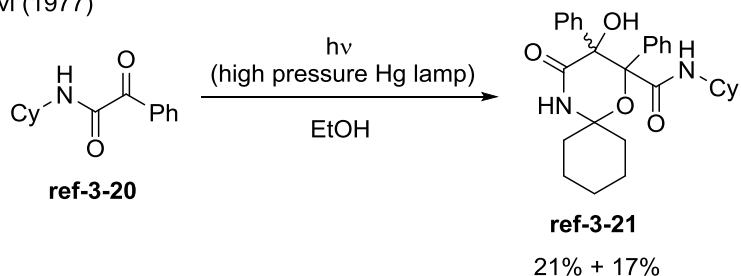


Figure 3-23. Photolysis of α -Ketoamide **3-24**.

Thienyl 体 **3-25** の光分解物

3-25 の光分解物の HPLC 解析でも、UV 吸収を持つ化合物は確認できなかった。ESI-MS と NMR のスペクトルはホルムアミド **3-46** の生成を示唆していたが、誘導体化によっても単離することは出来なかった。そこで、別途ホルムアミド **3-46** を調製し、光分解物の NMR と比較した結果、**3-46** が光分解物の主生成物であることが確認できた (**Figure 3-24**)。同様の脱カルボニル化反応は Bulusu らによって報告されているが、生成機構については触れられていない (**Scheme 3-8**)³¹⁻³³。

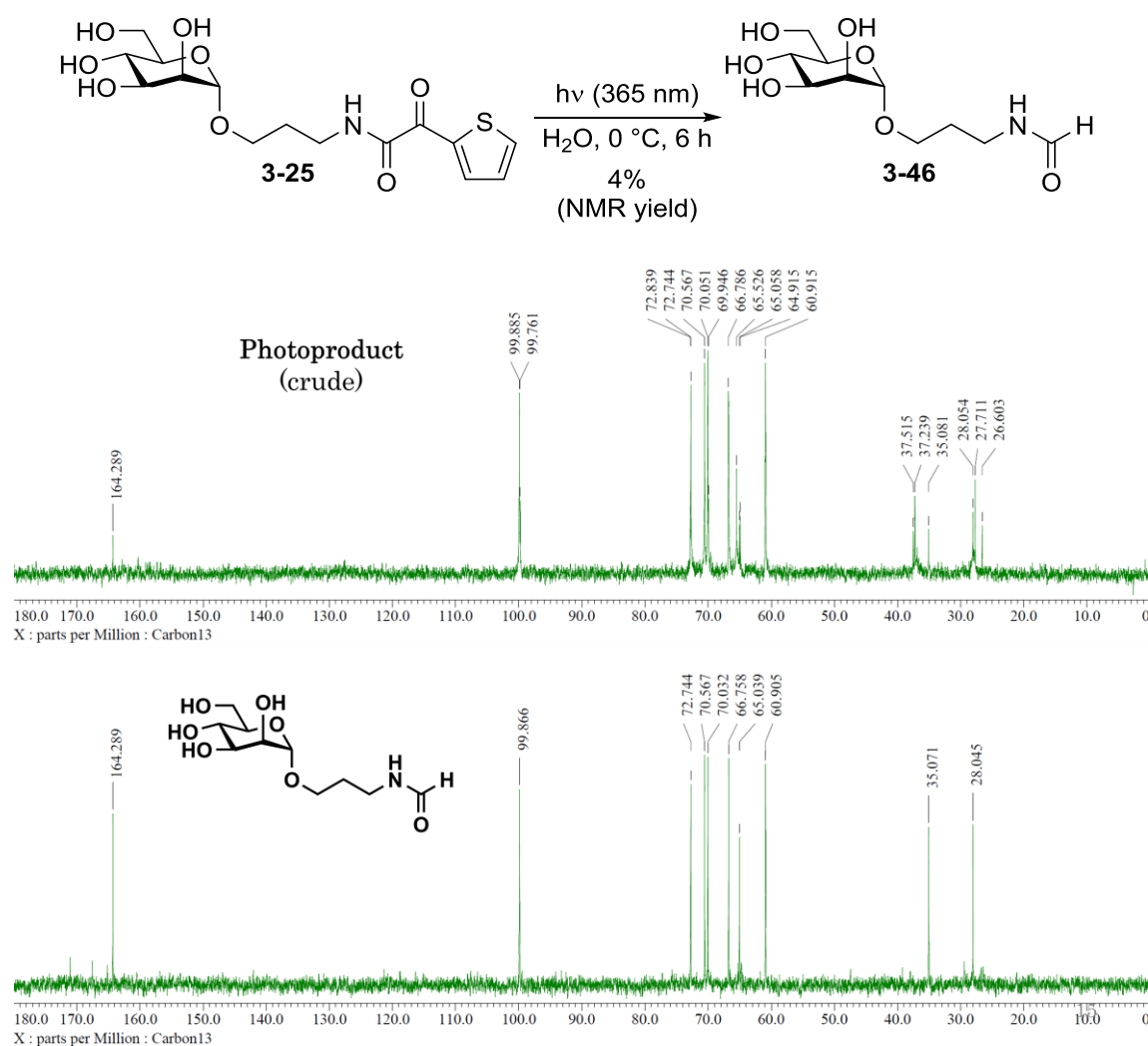
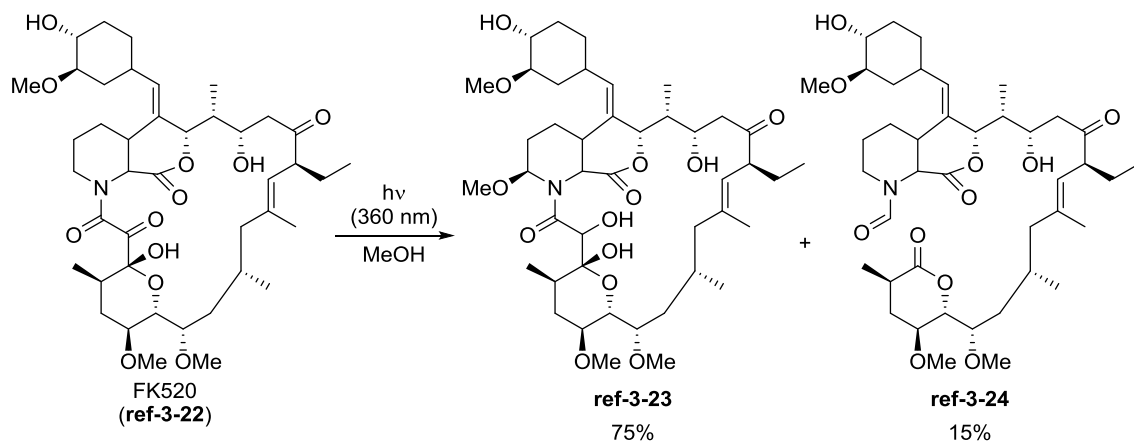


Figure 3-24. Photolysis of α -Ketoamide **3-25**.

Bulusu et al.(1999, 2004, 2009)



Scheme 3-8. Reported Decarbonylation of α -Ketoamide **ref-3-22**.

t-Bu 体の光分解物

α -ケトアミド **3-26** を光照射した場合は、HPLC 上で顕著な吸収を示すピークを 3 つ確認できた。それぞれのピークを分取し構造決定したところ、興味深い光反応生成物を単離することに成功した (**Figure 3-25**)。すなわち、*t*-Bu 基のメチル基から水素引き抜きが起こって生成したと考えられるシクロプロパノール **3-47** を 34% で与えた。また、エナミド **3-48** が生成していることも確認できた。なお、シクロプロパノール形成反応については本章の 3-8 節で後述する。

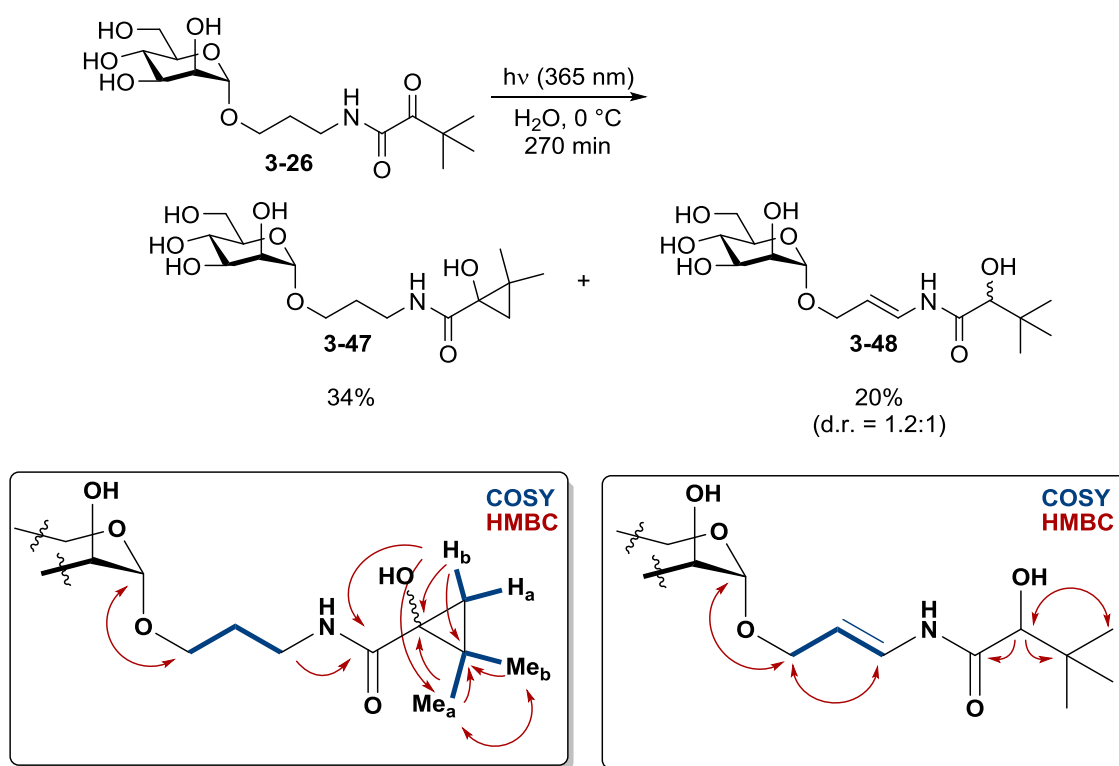
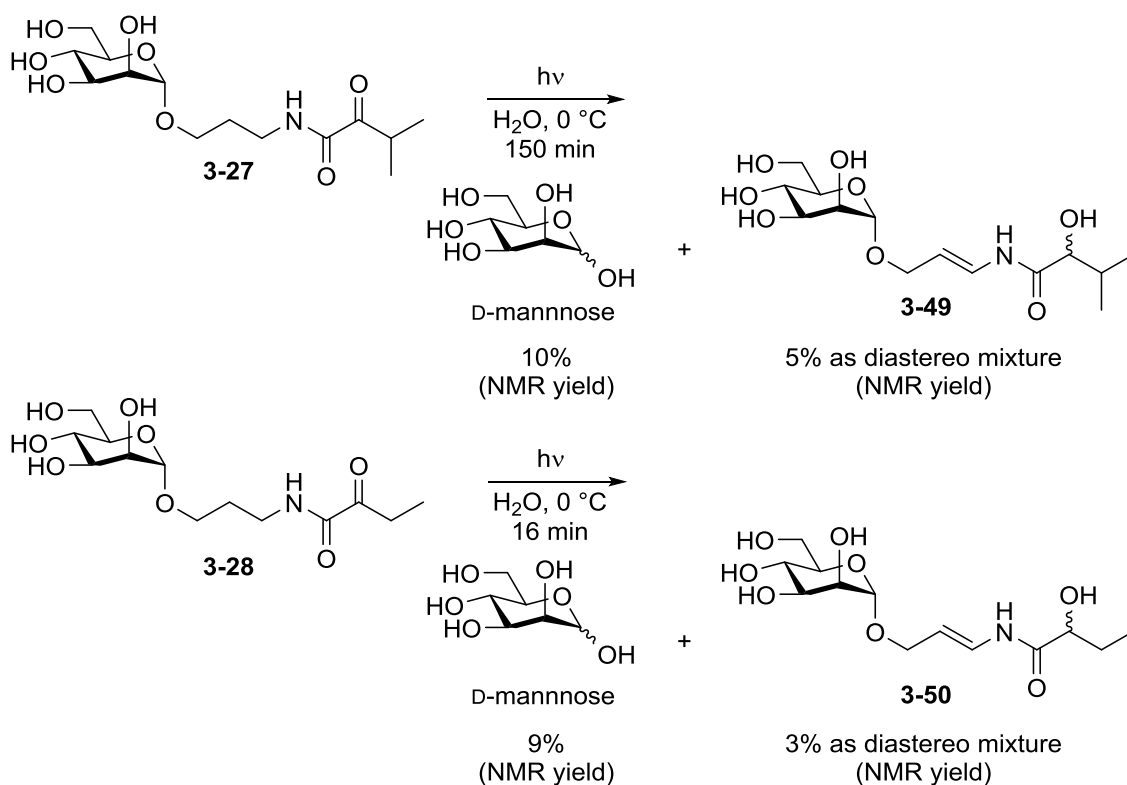


Figure 3-25. Photolysis of α -Ketoamide **3-26**.

i-Pr 体および Et 体の光分解物

同じくアルキル置換基を持つ、**3-27** の光分解ではエナミド **3-49** を与える一方で、D-マンノースも生成した (**Scheme 3-9**)。このときシクロプロパノールの生成は確認できなかった。一方、**3-28** を光照射した場合も、エナミド **3-50** と D-マンノースを与えた。

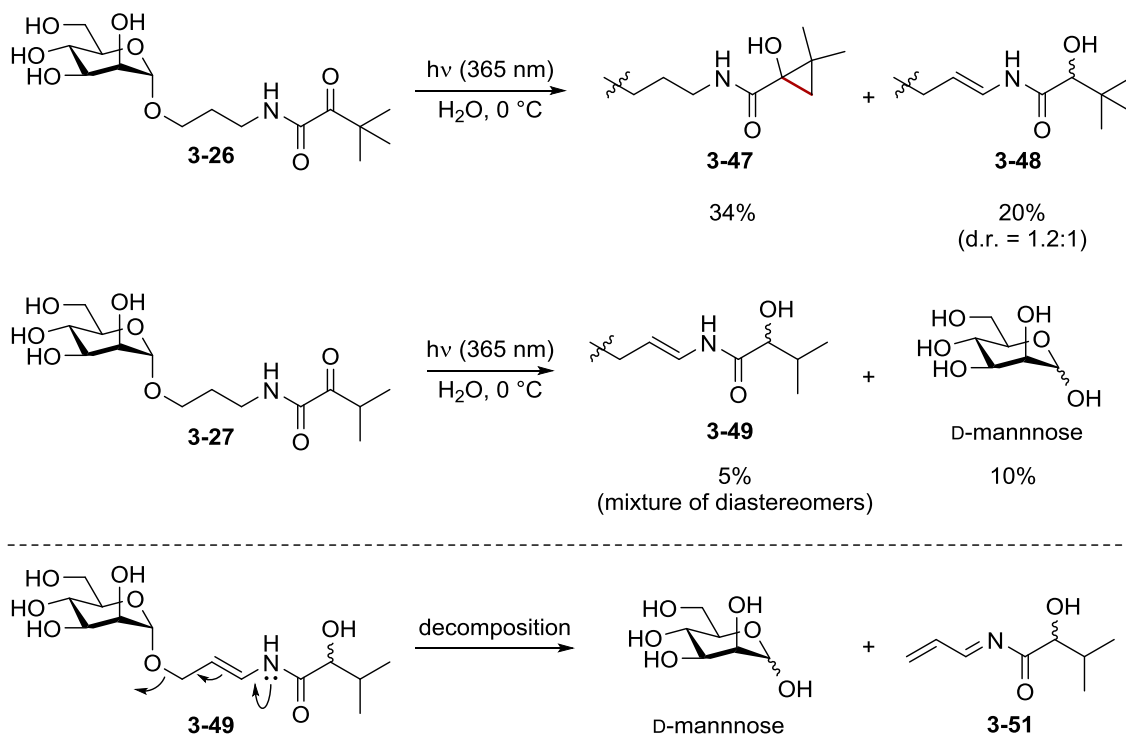


Scheme 3-9. Photolysis of α -Ketoamides **3-27** and **3-28**.

3-7-2. Et 体および *t*-Bu 体の標識効率に関する考察

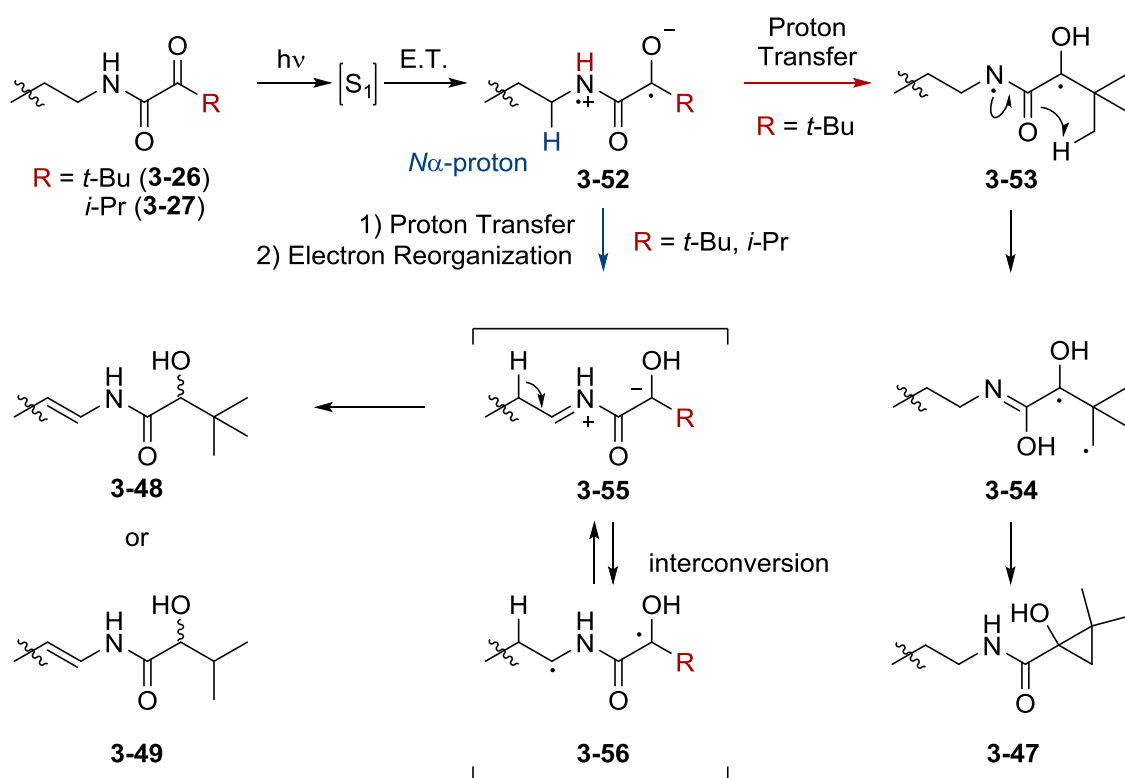
Et 体および *t*-Bu 体をプローブに用いた場合、Con A のラベル化は殆ど進行しなかった (**Figure 3-22**)。3-4 節の検討では、Et 体はハイドレートを形成しやすく、水中での光分解が速かった。このことを考えると、Et 体は光照射によってタンパク質との反応よりも光分解が優先していたため、標識効率が低かったと推測できる。一方、*t*-Bu 体は *i*-Pr 体よりも、ハイドレートを形成しにくく、光分解が遅かったにもかかわらず、Con A との結合が確認できなかった。この理由を、プローブの光分解の結果をもとに考察した。

α -ケトアミド**3-26**を光照射すると、分子内で結合生成が進行したシクロプロパノールとエナミドが生成していた (**Scheme 3-10**)。一方、**3-27**の光分解ではエナミドやD-マンノースが生成した。なお、D-マンノースは、以下に示すメカニズムでエナミド**3-49**から生成したと考えている。*i*-Pr体の光分解ではシクロプロパノールの生成が確認できなかったことから、*t*-Bu体の標識効率が低い原因は、**3-47**を与える分子内反応が、ラベル化反応と競合するためだと推察した。



Scheme 3-10. The Result of Photolysis of α -Ketoamides **3-26** and **3-27**.

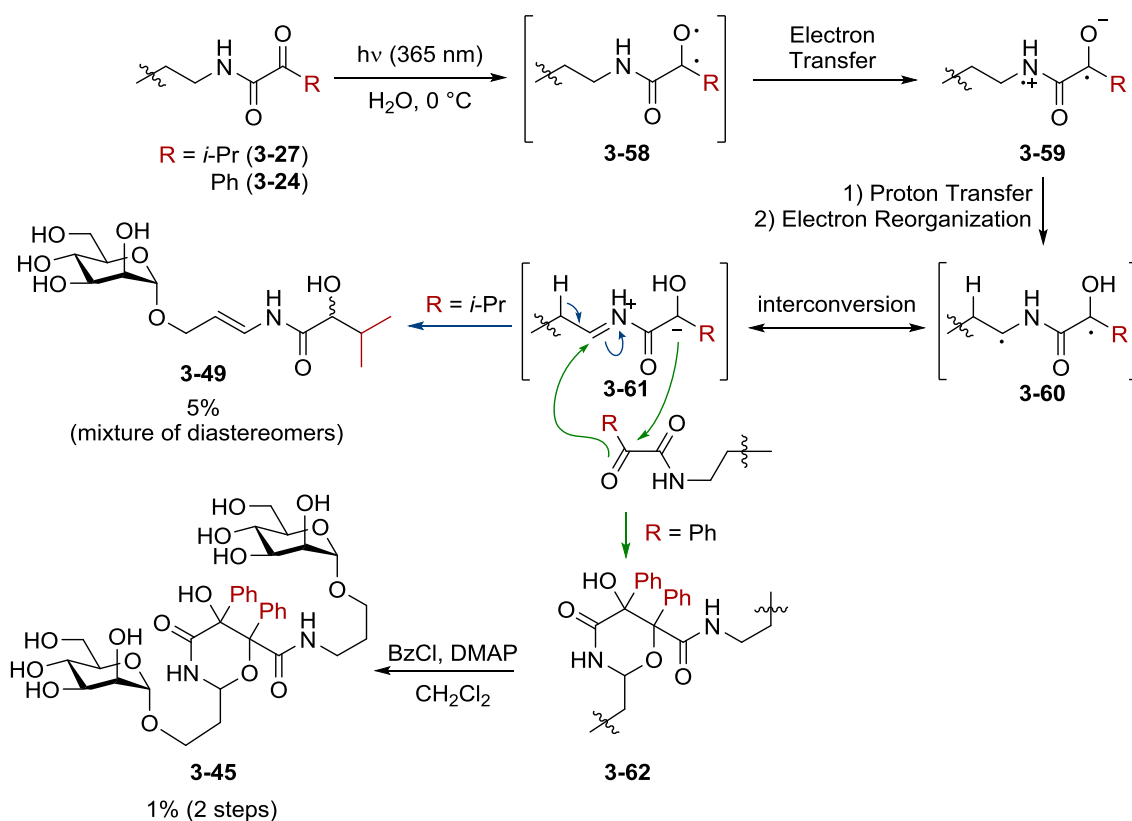
光分解物の生成機構は以下のように考察した (Scheme 3-11)。Whittenらの報告を考慮すると、 α -ケトアミドは光照射による励起と電子移動を経て、zwitterion **3-52**を与えると考えられる。Rの置換基が*t*-Bu基の場合、N原子上のプロトンが酸素アニオンに移動すると、ビラジカル**3-53**を与える。アミジルラジカルによる γ 位の水素引き抜きを経て生じた1,3-ビラジカル**3-54**は、分子内でカップリングし、シクロプロパノール**3-47**を与えたと推測した。一方、**3-52**からN原子 α 位のプロトンが脱離すると、electron organizationを経て、**3-55**もしくは**3-56**へと変換される。**3-55**からE1的にプロトンの脱離が進行し、エナミドが生成したと考えた。



Scheme 3-11. Plausible Mechanism for the Formation of Cyclopropanol **3-47** and Enamides **3-48~3-49**.

3-7-3. *i*-Pr 体および Ph 体の標識効率に関する考察

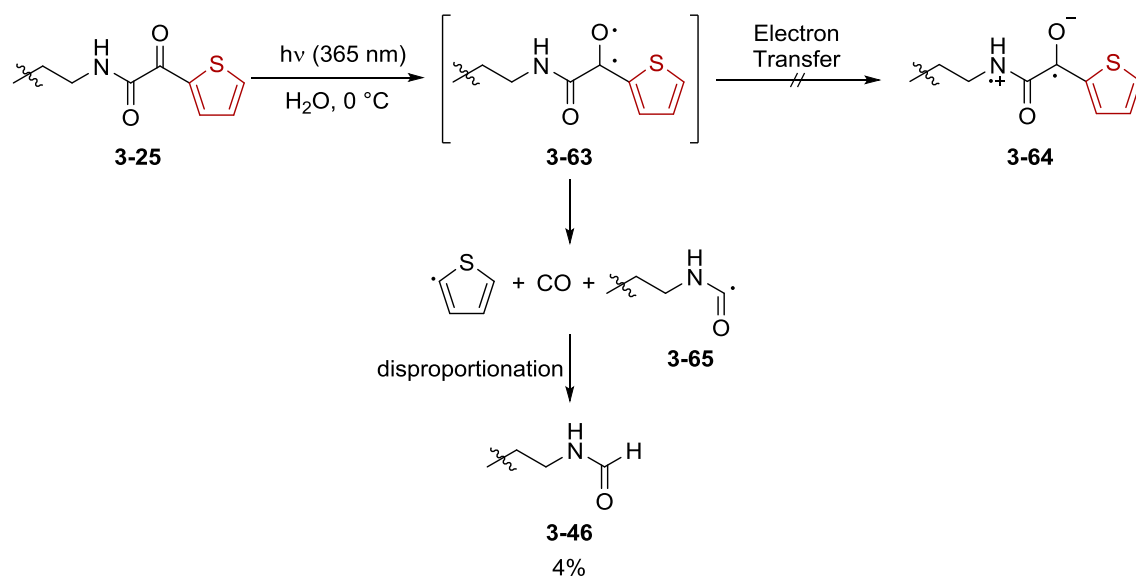
Con A との結合生成が確認できた *i*-Pr 体や Ph 体の光分解では、エナミド **3-49** や二量体 **3-45** の生成が確認できた (Scheme 3-12)。二量体 **3-45** は、エナミドと共通の中間体 **3-61** が、もう一分子の α -ケトアミドと反応することで生成したと考えられる。光分解で生じた **3-49** や **3-45** は、いずれも中間体 **3-58** の電子移動を経て生成したことから、**3-27** や **3-24** のラベル化は、電子移動を経由して進行している可能性が示唆される。



Scheme 3-12. Photolysis of α -Ketoamides **3-24** and **3-27**.

3-7-4. Thienyl 体の標識効率に関する考察

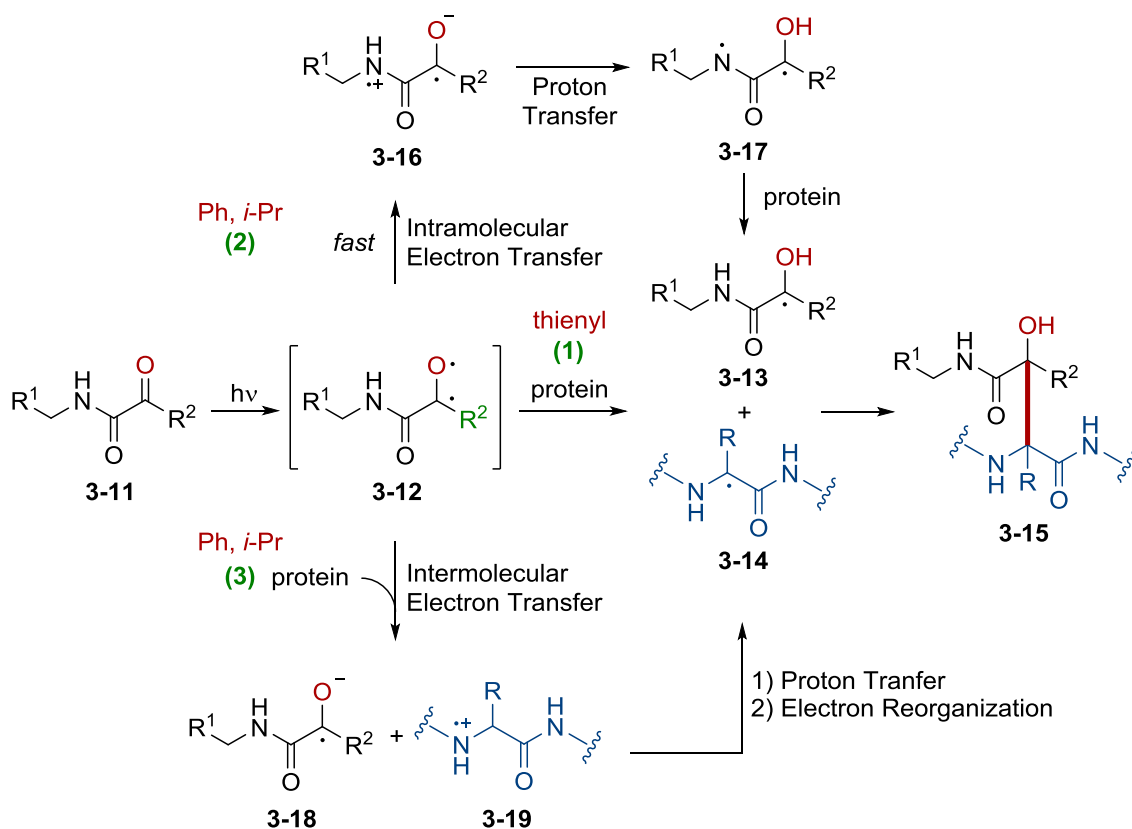
一方、thienyl 体の光分解ではホルムアミド **3-46** の生成が見られた (Scheme 3-13)。このことから、thienyl 体の光反応では電子移動による zwitterion **3-64** の生成が抑制されていることがうかがえる。光照射によって生じた **3-63** は、二つのカルボニル間で開裂が進行する Norrish Type I 様の反応を経て、ホルムアミド **3-46** を与えたと考察した。



Scheme 3-13. Photolysis of α -Ketoamides **3-25**.

3-7-5. 一置換 α -ケトアミドの推定ラベル化機構

以上の結果から、一置換 α -ケトアミドがタンパク質をラベル化する場合の推定経路をまとめた (**Scheme 3-14**)。電子移動を起こしにくい thienyl 体は、**3-12** の電子移動が抑制され、(1) に示す経路でタンパク質をラベル化したと考えている。一方、*i*-Pr 体や Ph 体はビラジカル様中間体 **3-12** から分子内電子移動を経る (2) の経路、もしくはタンパク質からの一電子移動が起こる (3) の経路を経て、ラベル化が進行したと推察した。

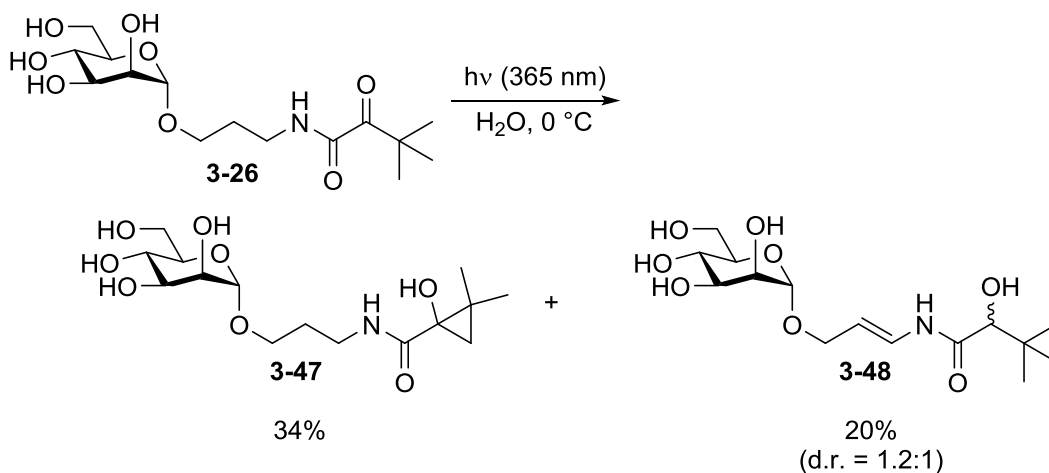


Scheme 3-14. Desired Labeling Reaction with Mono-substituted α -Ketoamide.

3-8. α -ケトアミドのシクロプロパノール形成反応

3-8-1. α -ケトアミドのシクロプロパノール形成反応の背景

本章の最後に、光分解物の解析過程で見出した、新規シクロプロパノール形成反応について述べる。3-7-1で述べたように、*t*-Bu基を有する α -ケトアミドを光照射すると、シクロプロパノール**3-47**とエナミド**3-48**が生成した。



Scheme 3-15. Photolysis of α -Ketoamide **3-26**.

光親和性標識に応用できる、分子間反応を望んでいた筆者にとって、シクロプロパノール形成反応は“副反応”であった。しかし、本反応は修飾が困難な*t*-Bu基上のC-H結合を、光照射のみで活性化でき、ユニークなシクロプロパノール骨格を与える点で興味深い。これまでも、光化学反応を利用した、ケトンのシクロプロパノール形成反応は報告されている (**Figure 3-26**)。しかし、反応基質が特殊で、立体的に制御されたケトン **ref-3-25** もしくは、 γ,δ -不飽和ケトン **ref-3-28**³⁴、 β -アミノケトン **ref-3-31**³⁵⁻³⁷、 β -ヒドロキシケトン **ref-3-33**^{38,39} などに限られている。これらのケトンの β 位に置換された官能基は、ラジカルの安定化に寄与し、1,4-水素引き抜きを容易にしていると考えられる。一方、 α -ケトアミドのシクロプロパノール形成反応は、今まで報告はない。そこで、シクロプロパノールを、より効率的に与える α -ケトアミドを設計し、“副反応”を新規シクロプロパノール形成反応へと展開することとした。

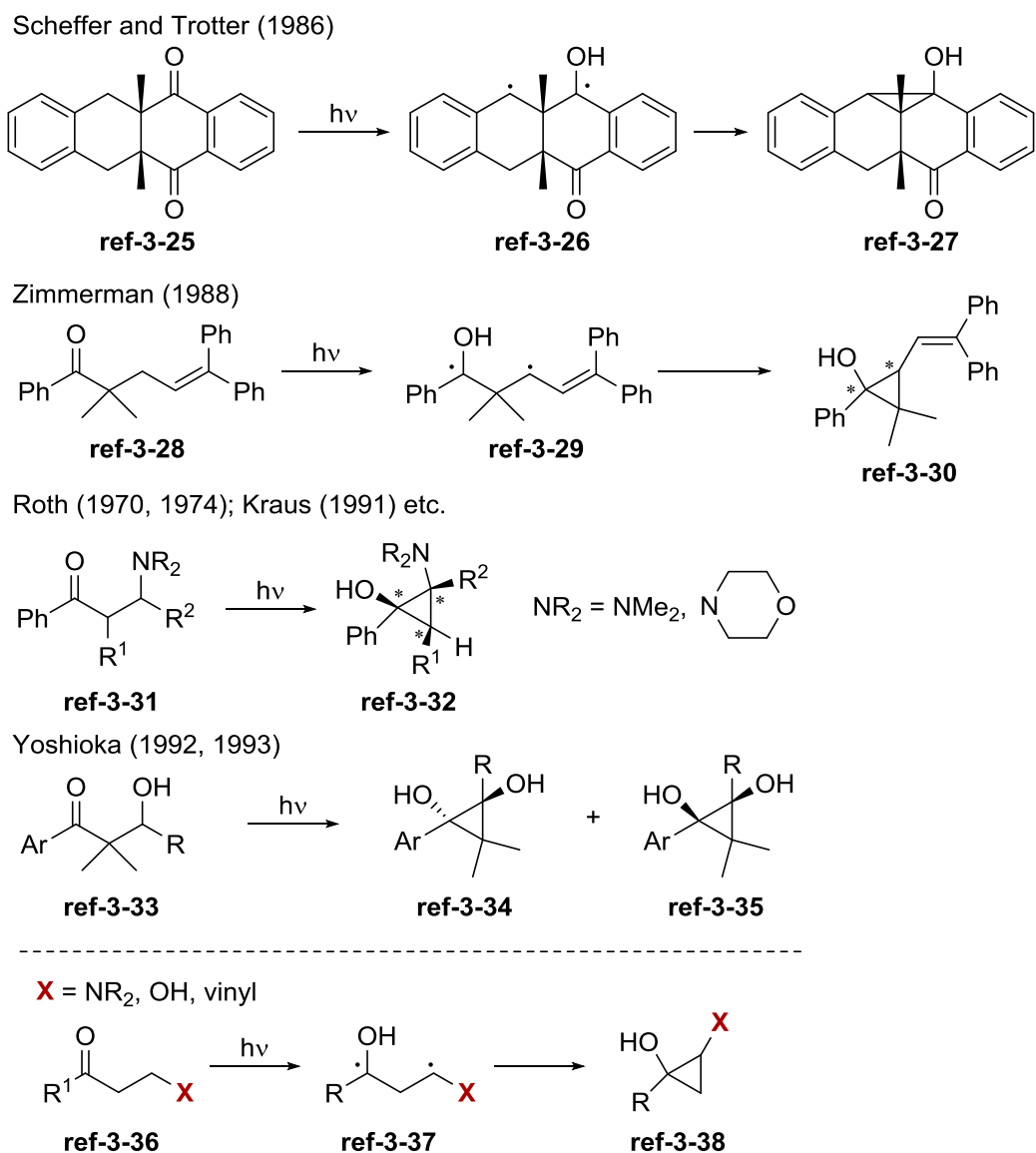
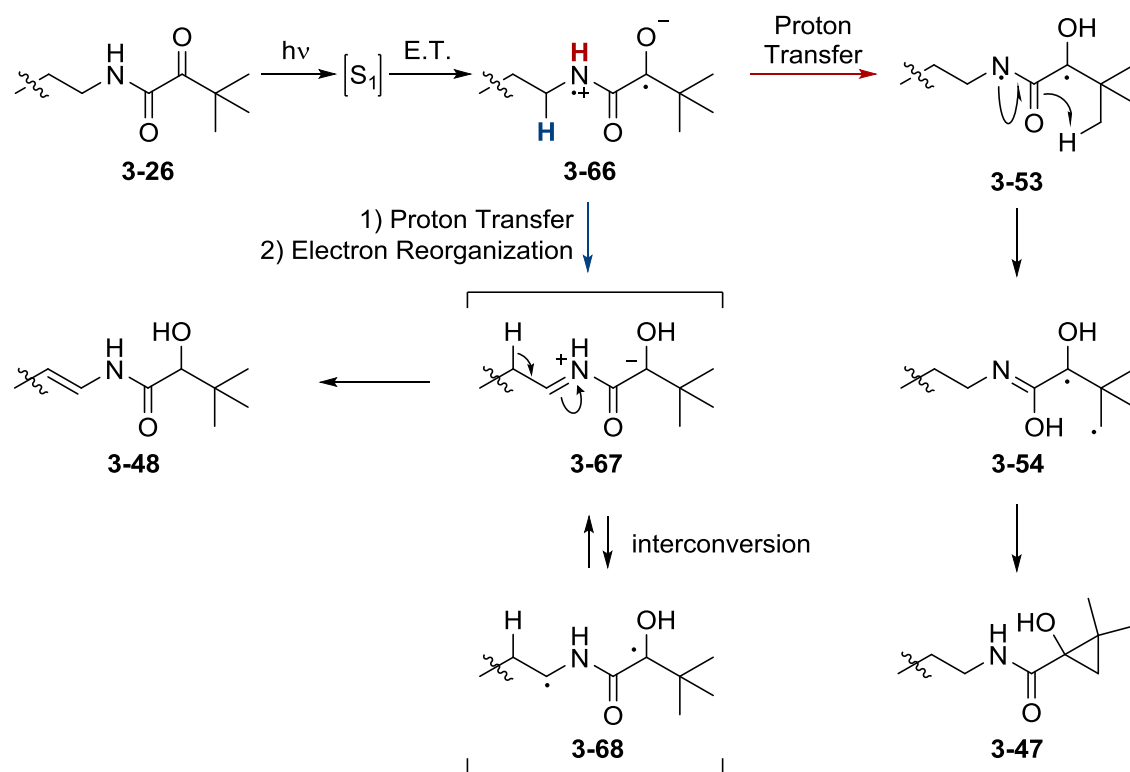


Figure 3-26. Precedents of Cyclopropanol Formation from Ketones.

前節で述べたように、**3-26**の光反応は以下のメカニズムで進行すると推測している。**3-26**を光照射すると、励起状態を経て電子移動が進行しzwitterion **3-66**を生成する。この時、N原子上のプロトンが酸素アニオンに移動すると、アミド γ 位の水素引き抜きと分子内のラジカルカップリングを経て、**3-47**へと変換される。一方、**3-66**からN原子 α 位のプロトンが脱離すると、**3-67**もしくは**3-68**を与えると考えられる。**3-67**のプロトンがE1的に脱離することで、エナミド**3-55**を与えたと推測した。このメカニズムをもとに、筆者はN原子 α 位のプロトン($N\alpha$ -プロトン)に着目した。**3-66**から起こるプロトン移動は、N原子上のプロトンもしくは $N\alpha$ -

プロトンが酸素アニオンに移動する。そこで、 $N\alpha$ -プロトンのない α -ケトアミドを設計して光反応させれば、選択的にシクロプロパノールを与えると期待した。

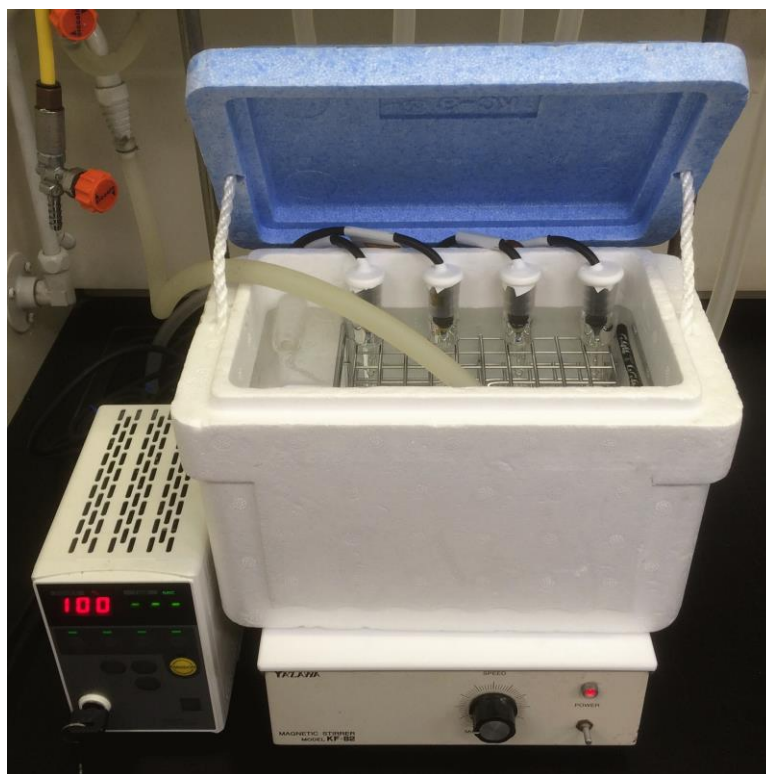


Scheme 3-16. Proposed Mechanism of formation of cyclopropanol **3-47** and enamide **3-48**.

3-8-2. 窒素原子上の置換基の検討

以上の背景を基に、N 原子上の置換基を検討した。光反応を検討する上で、最初の課題は、光をどのように反応溶液に照射するかであった。再現性良く反応させるには、光源が一定の位置に固定されている必要がある。また、反応効率を考慮すると、光源と反応溶液の距離は短い方が好ましい。さらに、光照射に伴う、反応温度の上昇を避けることも重要である。試行錯誤の末、筆者は、**Figure 3-27** に示すような反応容器を考案した。試験管に直接照射ヘッドを入れることで、光軸と照射距離を固定した。試験管は、還流できる水浴に浸し、反応温度を一定に保った。光源には OMROM ZUV-C20H、ZUV-H20MB、ZUV-L8H

を用いて、365 nm の光を照射した。なお、全ての溶媒は窒素ガスで 15 分間バブリングした後に反応に用いた。



Glass Tube Equipped with LED



Spectra of Blue LED lamp

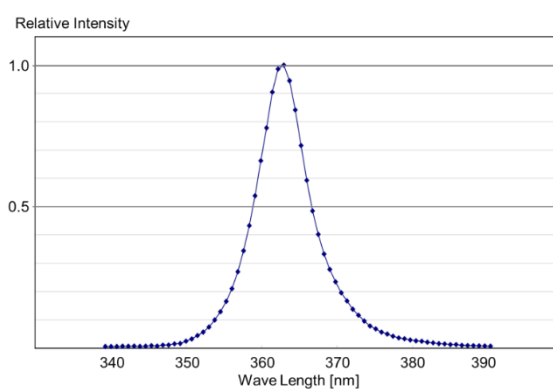


Figure 3-27. Photochemistry Set-up.

N 原子上の置換基に $N\alpha$ -プロトンを持たない t -Bu 基を採用し、MeOH 中で光反応させたところ、エナミドの生成は一切見られず、期待通り、シクロプロパノールを得ることに成功した (Table 3-4)。一方、 n -ヘキシル基を置換基に用いた場合、反応は 1 時間で完結したものの、複雑な混合物を与えた。ベンジル基で置換した、 α -ケトアミド **3-69c** を光照射した場合、目的のシクロプロパノール **3-69c** を僅かに与えたが、脱気しているにもかかわらずベンジル位の酸化が進行し、**3-69d** や **3-70d** を与えた。**3-69d** が生成していたことから、イミド **3-69d** や **3-69e** の光反応を検討したが、わずかにシクロプロパノールの収率が向上するのみであった。また、ヒドロキサメート **3-69f** は全く反応しなかった。一方、トリフェニルメチル基を有する **3-69g** の場合、反応の進行が遅かったものの定量的にシクロプロパノールに変換されることがわかった。NMR を用いた解析では、**3-69g** はメタノール中で一部ヘミアセタールを形成していることがわかった。このことが光反応の進行を遅らせる要因と考えられる。なお、置換基を持たない α -ケトアミド **3-69h** を光照射した場合、意外にも高収率でシクロプロパノールを与えた。

Table 3-4. Effect of Substituent on Nitrogen Atom.

Entry	substrate	R	Time (h)	product	yield (%)
1	3-69a	t -Bu	3	3-70a	71
2	3-69b	$\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$	1	3-70b	7 ^a
3	3-69c	CH_2Ph	1.5	3-70c	13 ^b
4	3-69d	COPh	11	3-70d	28
5	3-69e	$\text{CO}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$	1	3-70e	31
6	3-69f	Ot-Bu	12	3-70f	0 ^c
7	3-69g	CPh_3	12	3-70g	50 ^d
8	3-69h	H	5 min	3-70h	94

a) NMR yield

b) **3-69d** (31%) and **3-70d** (24%) were obtained.

c) starting material was recovered (98%).

d) starting material was recovered (50%).

3-8-3. 反応溶媒の検討

3-69g のシクロプロパノール形成反応における、溶媒を検討した (**Table 3-5**)。ヘミアセタールの形成を考慮して、アセトニトリルや DMF などの、非プロトン性溶媒を検討したところ、予想に反し、反応効率は上がらなかった。一方、嵩高いアルコールを溶媒として用いたところ、いずれも効率良く反応が進行した。特に 2-BuOH を溶媒として用いたとき、99%の収率でシクロプロパノール **3-70g** を与えることを見出した。ベンゼン、トルエン、シクロヘキサンといった炭化水素系の溶媒では基質の分解が見られた。エーテルやその他汎用される溶媒を検討した結果、THF を用いた場合に収率良くシクロプロパノールを与えたが、最終的に、最も効率良く反応が進行した 2-BuOH を本反応における最適な溶媒とした。

Table 3-5. Screening of Solvent for Cyclopropanol Formation.

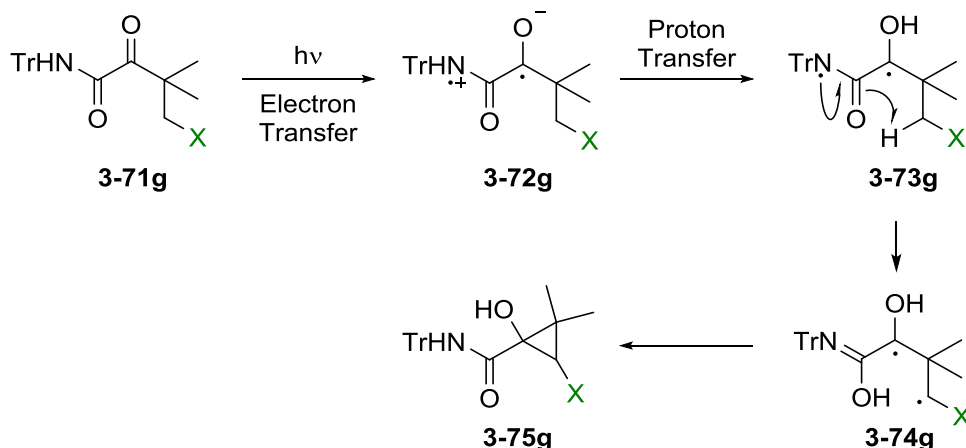
Reaction scheme: **3-69g** $\xrightarrow[\text{Solvent (80 mM)}]{h\nu (365 \text{ nm})}$ **3-70g**

Entry	Solvent	Time (h)	Yield (%) ^a	
			3-70g	Recovery
1	MeOH	12	51	48
2	CH ₃ CN	12	42	58
3	DMF	12	36	63
4	<i>n</i> -BuOH	11	95	4
5	<i>i</i> -PrOH	11	90	n.d.
6	2-BuOH	9	99	n.d.
7	Benzene	12	n.d.	35
8	Toluene	12	n.d.	n.d.
9	Cyclohexane	12	n.d.	n.d.
10	THF	12	77	20
11	Et ₂ O	12	12	n.d.
12	CHCl ₃	12	n.d.	21
13	CH ₂ Cl ₂	12	n.d.	54
14	EtOAc	12	39	40
15	Acetone	12	10	51

a) n.d = not detected

3-8-4. ケト置換基の検討

本反応に最適な N 原子上の置換基と溶媒を見出したので、筆者はケト側の置換基を検討した。筆者が想定するメカニズムでは、**3-73g** のアミジルラジカルはアミド γ 位の水素を引き抜き、炭素ラジカルを生成すると考えている (Scheme 3-17)。もし、 α -ケトアミドに導入した官能基 X が、ラジカルを安定化できれば、X が置換された炭素上で選択的にラジカルが発生すると考えられる。超共役効果の期待できるアルキル基や、非共有電子をもつヘテロ原子などを、置換基 X として導入すれば、シクロプロパノール形成の位置選択性を制御できると推察した。

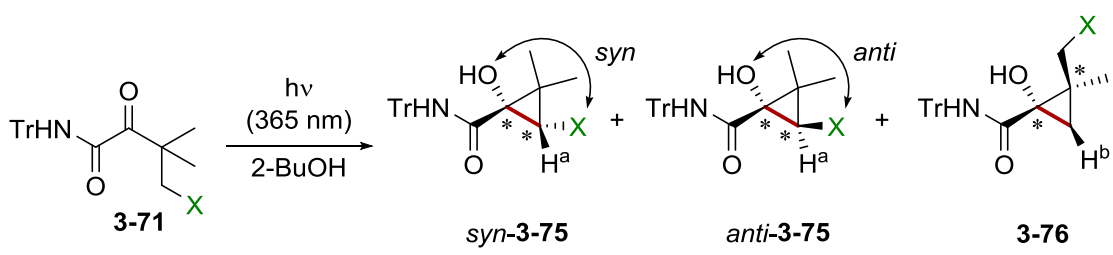
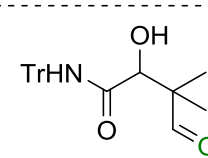
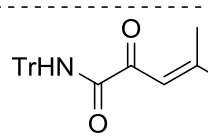


Scheme 3-17. Proposed Mechanism of Cyclopropanol Formation of α -Ketoamide **3-71g**

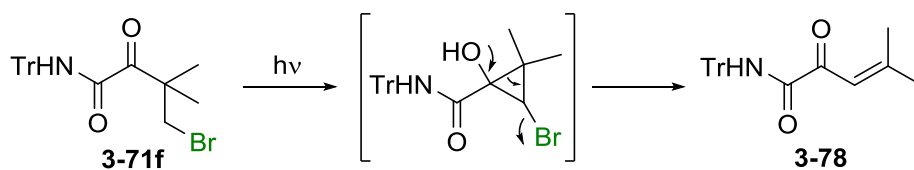
この仮説を基に、ケト側の置換基が異なる基質の光反応を検討した (Table 3-6)。なお、精製を容易にするため、N 原子上の置換基には、UV 吸収の強いトリチル基を採用した。X として Me 基を導入した **3-71a** の光反応では、期待通り、メチル基で置換された炭素上で閉環反応が進行し、**3-75a** を選択的に与えた。このとき生成する 2 種類のジアステレオマー、*syn*-**3-75a** と *anti*-**3-75a** は水酸基と X の相対立体配置を基に命名した。立体配置の決定方法については後述する。なお、**3-71a** の光反応では **3-76a** の生成は一切見られなかった。酸素官能基で置換された、**3-71b** や **3-71c** を光照射した場合にも、反応は選択的に進行し、効率良

く **3-75b** や **3-75c** を与えた。一方、X が OAc 基で置換された、**3-71d** を光反応させると、Me 基の炭素上で閉環反応が進行した **3-76** が選択的に生成した。これらの結果から、置換基 X が、シクロプロパノール形成の位置選択性に、大きく影響することが示唆された。X に水酸基を持つ基質は、シクロプロパノールを全く与えず、ラジカル不均化により、対応するアルデヒド **3-77** を与えた。一方、X が Br 基の場合はエノン **3-78** を与えた。エノンはシクロプロパノールがブロモ基の脱離を伴って開環することで生成したと考えている (Scheme 3-18)。

Table 3-6. Photo-induced Cyclopropanol Formation of α -Ketoamide **3-71**

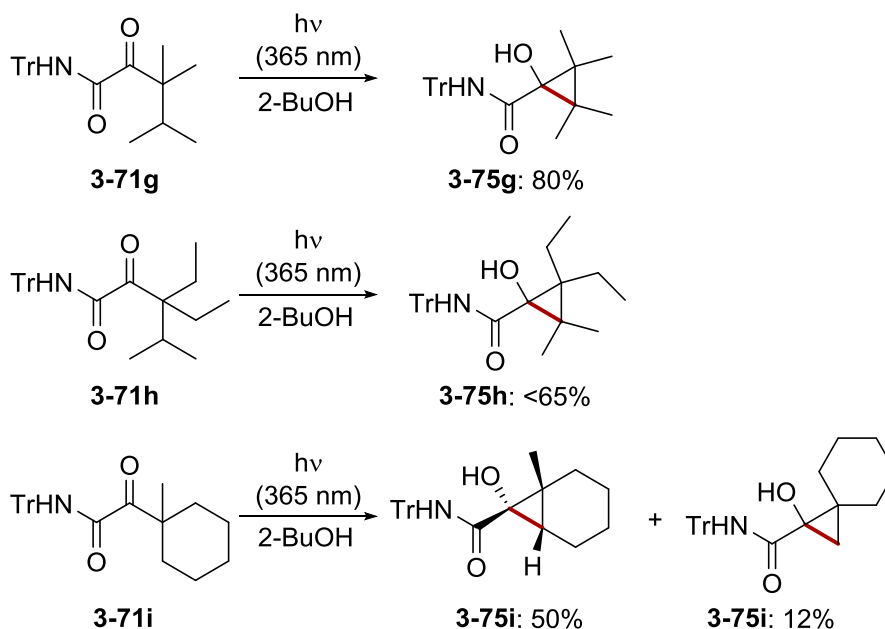
					
			yield (%)		
Entry	substrate	X	syn-3-75	anti-3-75	3-76
1	3-71a	Me	80	17	n.d.
2	3-71b	OBn	88	12	n.d.
3	3-71c	OTBS	68	11	n.d.
4	3-71d	OAc	4	n.d.	80
5	3-71e	OH	 3-77: 54%^a		
6	3-71f	Br	 3-78: 11%^b		

a) starting material was recovered (11%). b) starting material was recovered (14%).



Scheme 3-18. Simultaneous Ring-opening and β -Elimination

本反応はより嵩高い基質にも適用可能で、ユニークな骨格を持つ多置換シクロプロパノールを合成できた (**Scheme 3-19**)。ここでも、反応は置換数の多い炭素上で、選択的に進行していた。アルキル基の超共役効果が反応の位置選択性に影響していることがうかがえる。



Scheme 3-19. Photo-induced Cyclopropanol Formation of α -Ketoamide **3-71**

3-8-5. シクロプロパノールの立体化学の決定

本節では前述のシクロプロパノール **3-75** の相対立体化学の決定について説明したい。本光反応によって生成するシクロプロパノール **3-75a~3-75d** は、三員環上にプロトンを一つしか持たず、相対立体化学の決定が困難であった。筆者らは NMR と DFT 計算を併用して立体化学の決定を試みた。

まず、**3-75a** の立体化学の決定について述べる。*syn-3-75a* と *anti-3-75a* の、水素原子 H^a と Me 基 (Me^A および Me^B) の相対立体化学は NOE 相関を基に決定した (**Figure 3-28**)。 *syn-3-75a* の場合は H^a と Me^A 、および H^b と Me^B の間に強い NOE 相関が見られた。このことから、 H^a と Me^A が *syn* の関係にあると決定した。また、*anti-3-75a* の場合、 H^a と Me^B 、および H^b と Me^A の間に強い相関が観測された。このことから、 H^a と Me^A が *anti* の関係にあると決定した。炭素と水素のカップリング定数 $^3J_{C-H}$ は二面角に依存する。*syn-3-75a* の場合 *syn* の関係にある H^a と Me^A の $^3J_{C-H}$ は、*anti* の関係にある H^a と Me^B の $^3J_{C-H}$ よりも大きくなると考えられるため、HMBC 相関も強くなると推測できる。実際に *syn-3-75a* を解析すると、NOE が観測された H^a と Me^A の間ではっきりとした HMBC 相関が観測できた。*anti-3-75a* を解析した場合にも、NOE が観測された H^a と Me^B との間に HMBC 相関が観測できた。 (**Figure 3-29**)。さらに、 $^3J_{C-H}$ 値を DFT 計算で見積もったところ、HMBC 相関の強弱と $^3J_{C-H}$ の大小が対応することが確認できた (**Figure 3-30**)。この傾向は H^a とカルボニル炭素間にも適用できると考え、相対立体配置の決定に利用した。**3-75a** の major isomer は H^a とカルボニル炭素との間に HMBC 相関が確認できるのに対し、minor isomer は H^a とカルボニル炭素との相関が観測できなかった (**Figure 3-29**)。このことから、major isomer は *syn-3-75a* であると結論付けた。

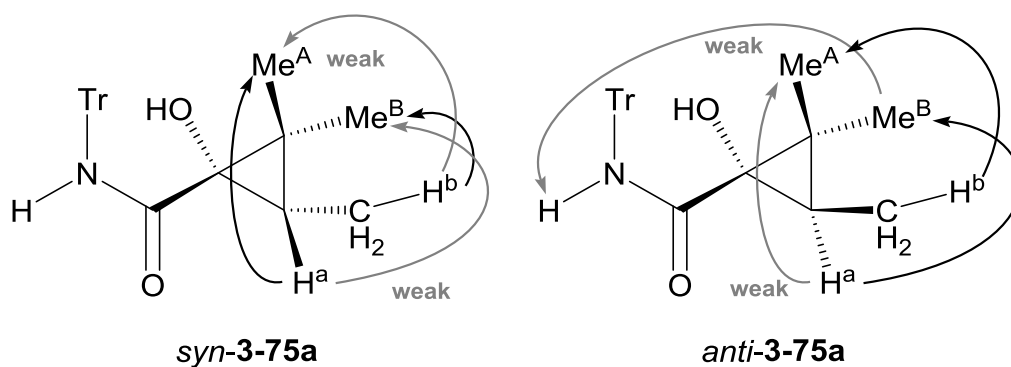


Figure 3-28. NOE effects for *syn*-3-75a and *anti*-3-75a.

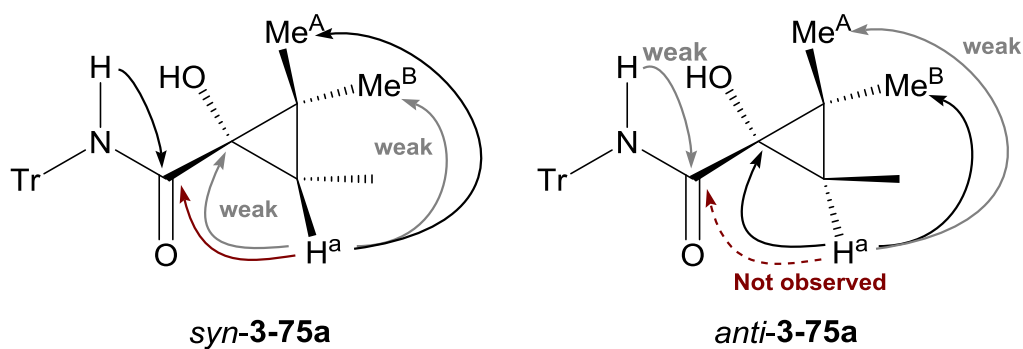


Figure 3-29. HMBC correlations for *syn*-3-75a and *anti*-3-75a.

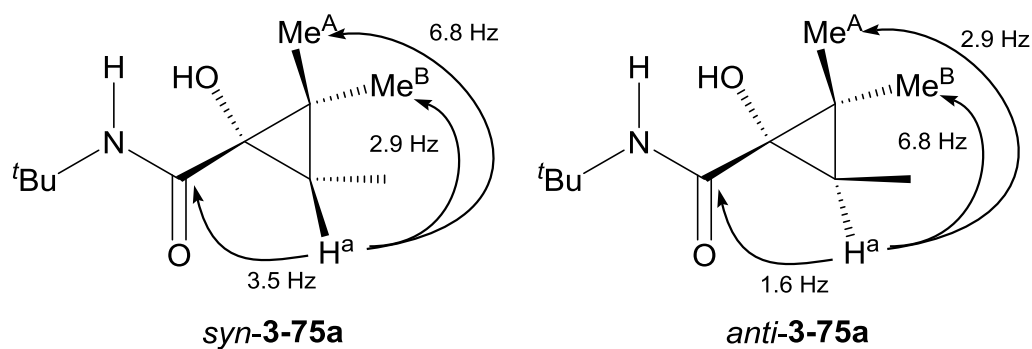


Figure 3-30. Estimated $^3J_{C-H}$ values of *syn*-3-75a and *anti*-3-75a. (DFT calculations were conducted with *t*-Bu-amide analogues. Method; Gaussian 09, MPW1PW91/6-311+(d,p), GIAO method, NMR = mixed).

シクロプロパノール **3-75b~3-75d** の立体化学は先と同様の方法で決定した。**3-75b~3-75d** の major isomer はシクロプロパン上の水素原子とカルボニル炭素との間ではっきりとした HMBC 相関が観測できた。一方で、**3-75b~3-75d** の minor isomer はその相関が見られなかった。代表例として、*syn*-**3-75b** と *anti*-**3-75b** の HMBC 相関と、DFT 計算によって見積もった $^3J_{C-H}$ 値を示す (Figure 3-31, 3-32)。HMBC の強弱と $^3J_{C-H}$ 値の大小がここでも一致していることが確認できる。H^a とカルボニル炭素との間に HMBC 相関が観測できた major isomer を *syn* 体だと結論付けた。

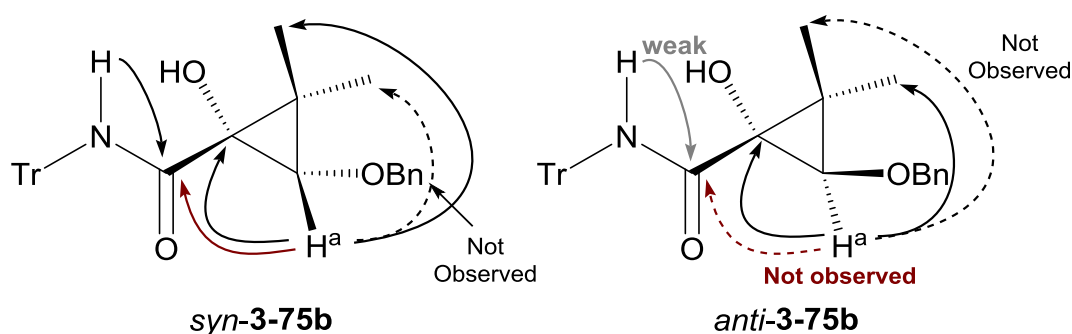


Figure 3-31. HMBC correlations for *syn*-**3-75b** and *anti*-**3-75b**.

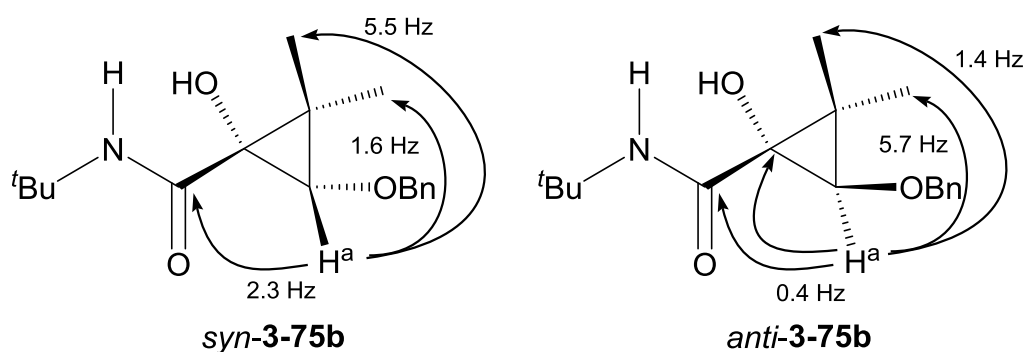


Figure 3-32. Estimated $^3J_{C-H}$ values of *syn*-**3-75b** and *anti*-**3-75b**. (DFT calculations were conducted with *t*-Bu-amide analogues. Method; Gaussian 09, MPW1PW91/6-311+(d,p), GIAO method, NMR = mixed).

3-76d の立体化学に関しても、同様の方法で決定した。まず H^b と H^c を NOE 効果を基に決定した (**Figure 3-33**)。 H^b からアミドのカルボニル炭素への HMBC 相関が、観測されたことから、**3-76d** はアミドとメチル基が *anti* の関係になるような立体化学を持つと決定した。なお、DFT 計算で得られた $^3J_{C-H}$ 値もこの構造を示唆するものであった (**Figure 3-34**)。

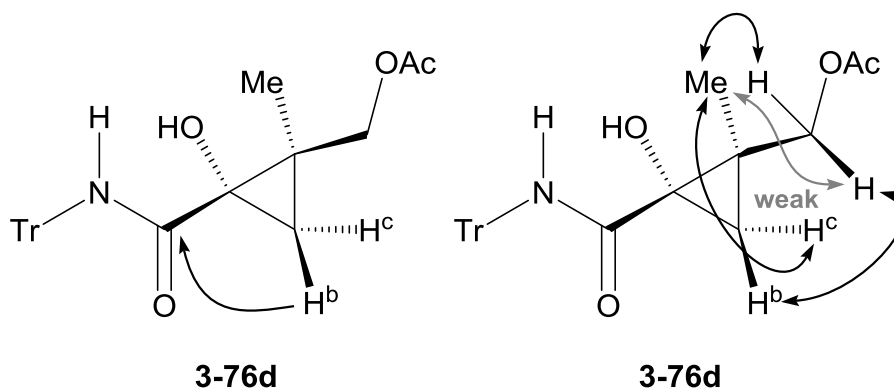


Figure 3-33. Representative HMBC (left) and NOE (right) correlations for **3-76d**.

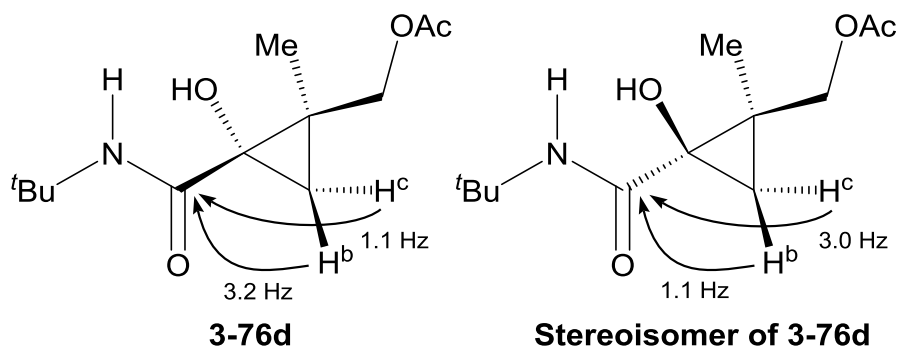
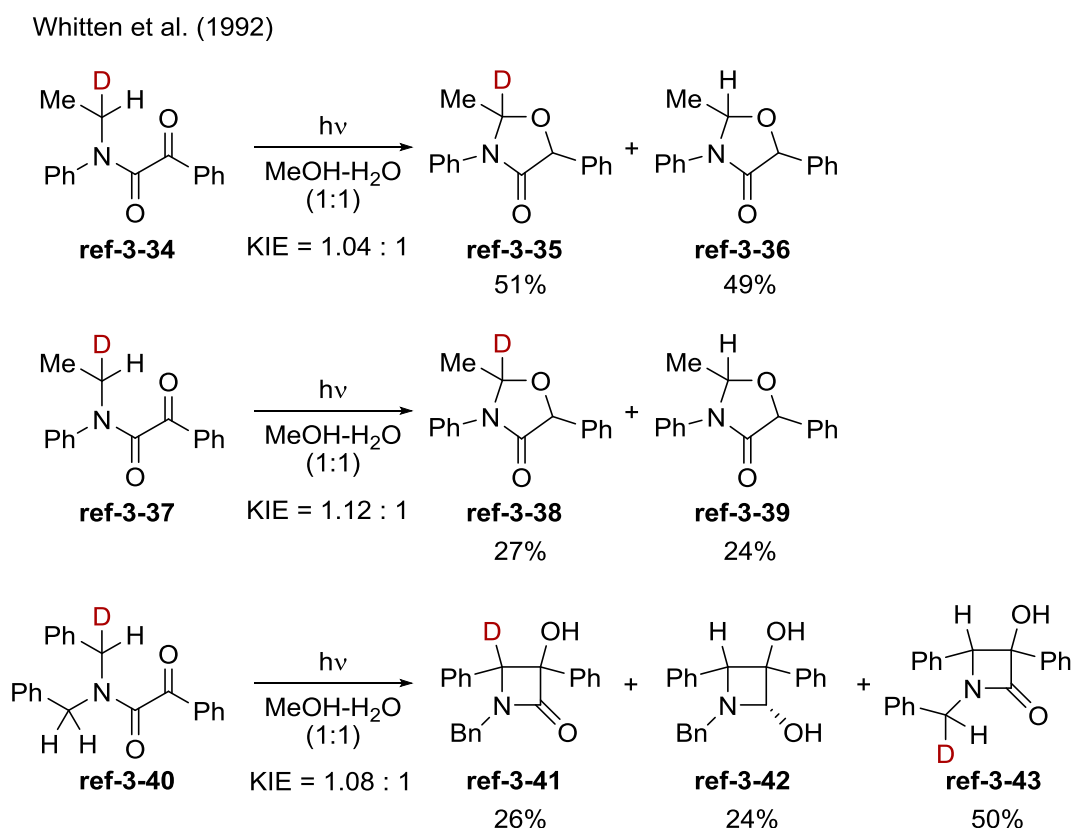


Figure 3-34. Representative estimated $^3J_{C-H}$ values for **3-76d** and its stereoisomer (DFT calculations were conducted with *t*-Bu-amide analogues. Method; Gaussian 09, MPW1PW91/6-311+(d,p), GIAO method, NMR = mixed).

3-8-6. シクロプロパノール形成反応における速度論的同位体効果

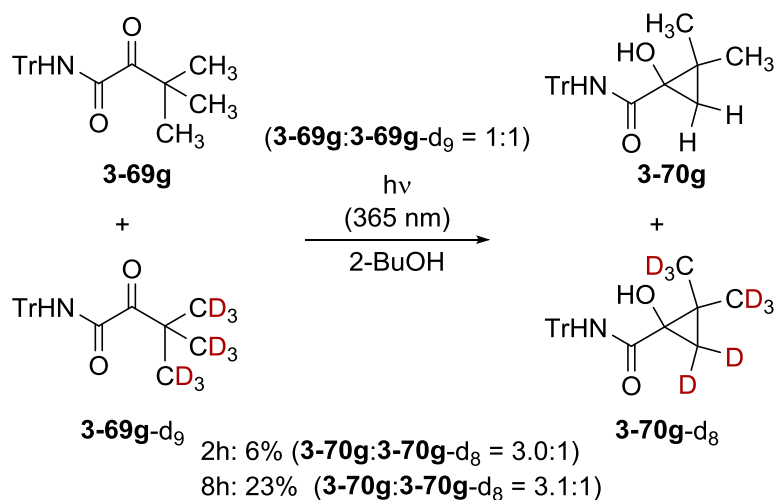
Whitten らの報告によれば、ラクタムやオキサゾリジノンを与える二置換の α -ケトアミドは、 $N\alpha$ -プロトンを重水素化しても、同位体効果は殆ど観測されない (Scheme 3-20)¹¹。このことは、二置換の α -ケトアミドの反応では、水素引き抜き過程が律速段階ではないことを示唆している。



Scheme 3-20. KIE Effect Observed in Photolysis of α -Ketoamide.

本シクロプロパノール形成反応の律速段階を調べるため、重水素された α -ケトアミド **3-69g-d₉** を調製し、MeOH 中での光反応を検討した (Scheme 3-21)。 α -ケトアミド **3-69g** と α -ケトアミド **3-69g-d₉** の混合物 (1 : 1) を 2 時間光照射したところ、シクロプロパノールを 6% で与え、その時の同位体効果は KIE = 3.0:1 であった。また、8 時間照射した場合も同様の同位体効果 KIE = 3.1:1 が観測できた。以上のことから、 γ 位の水素引き抜き反応が、本反応の律速段階に含まれ

ていることが強く示唆された。なお、3-8 節の検討は三瓶悠氏の協力のもと遂行した。



Scheme 3-21. Photolysis of the Mixture of **3-69g** and **3-69g-d₉**.

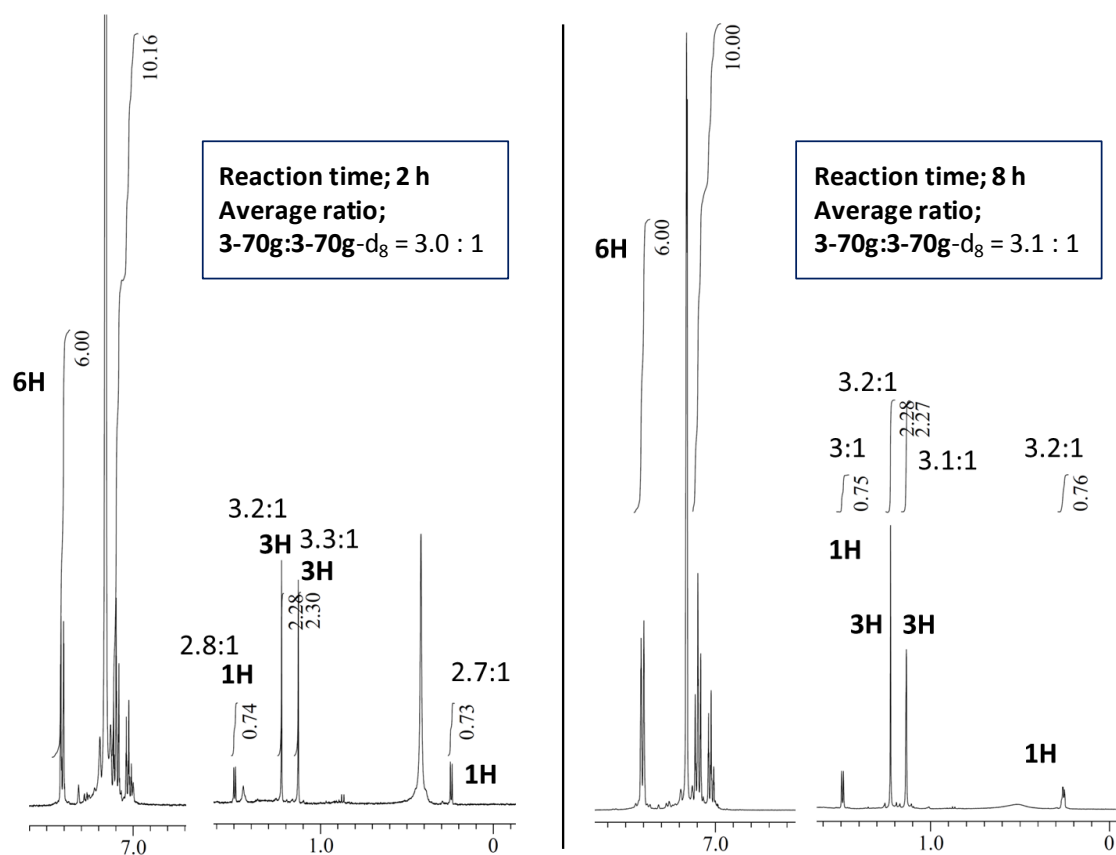


Figure 3-35. H-NMR of the mixture **3-70g** and **3-70g-d₈**.

参考文献 第3章

- (1) Hatanaka, Y.; Sadakane, Y. *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, 2 (3), 271.
- (2) Xia, Y.; Peng, L. *Chem. Rev.* **2013**, 113 (10), 7880.
- (3) Hatanaka, Y. *YAKUGAKU ZASSH* **1994**, 114 (9), 619.
- (4) Fleet, G. W. J.; Porter, R. R.; Knowles, J. R. *Nature* **1969**, 224 (5218), 511.
- (5) YOSHIDA, E.; NAKAYAMA, H.; HATANAKA, Y.; KANAOKA, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, 38 (4), 982.
- (6) Smith, R. A. G.; Knowles, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95 (15), 5072.
- (7) Brunner, J.; Senn, H.; Richards, F. M. *J. Biol. Chem.* **1980**, 255 (8), 3313.
- (8) Galardy, E.; Craig, C.; Jamieson, J. D.; Printz, P. *J. Biol. Chem.* **1974**, 249 (11), 3510.
- (9) Monroe, B. M. Pitts, J. N., Hammond, G. S., Noyes, W. A., Eds.; *Advances in Photochemistry*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 1971; pp 77–108.
- (10) Aoyama, H.; Sakamoto, M.; Kuwabara, K.; Yoshida, K.; Omote, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105 (7), 1958.
- (11) Chesta, C. A.; Whitten, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114 (6), 2188.
- (12) Richard, W. G.; Chesta, C. A.; Whitten, D. G. *Photochem. Photobiol.* **1991**, 54 (4), 557.
- (13) Taylor, M. J.; Hoffman, T. Z.; Yli-Kauhala, J. T.; Lerner, R. A.; Janda, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120 (49), 12783.
- (14) Lis, H.; Sharon, N. *Chem. Rev.* **1998**, 98 (2), 637.
- (15) Schwarz, F. P.; Puri, K. D.; Bhat, R. G.; Surolia, A. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268 (11), 7668.
- (16) Beppu, M.; Terao, T.; Osawa, T. *J. Biochem.* **1975**, 78 (5), 1013.
- (17) Hamachi, I.; Nagase, T.; Shinkai, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122 (48), 12065.
- (18) Nagase, T.; Nakata, E.; Shinkai, S.; Hamachi, I. *Chem. Eur. J.* **2003**, 9 (15), 3660.
- (19) Nagase, T.; Shinkai, S.; Hamachi, I. *Chem. Commun.* **2001**, No. 3, 229.
- (20) Nakata, E.; Koshi, Y.; Koga, E.; Katayama, Y.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (38), 13253.
- (21) Aoyama, H.; Sakamoto, M.; Omote, Y. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1981**,

1357.

- (22) Ocain, T. D.; Rich, D. H. *J. Med. Chem.* **1992**, 35 (3), 451.
- (23) Dam, T. K.; Brewer, C. F. *Chem. Rev.* **2002**, 102 (2), 387.
- (24) Alper, P. B.; Hendrix, M.; Sears, P.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120 (9), 1965.
- (25) 津本 浩平; 宇井 美穂子. *YAKUGAKU ZASSH* **2009**, 129 (11), 1311.
- (26) 織田 昌幸; 円谷 健; 藤井 郁雄. *生物工学会誌* **2011**, 89 (7), 388.
- (27) MacKinnon, A. L.; Taunton, J. In *Current Protocols in Chemical Biology*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2009; Vol. 1, pp 55–73.
- (28) Liu, Y.; Stoll, V. S.; Richardson, P. L.; Saldivar, A.; Klaus, J. L.; Molla, A.; Kohlbrenner, W.; Kati, W. M. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, 421 (2), 207.
- (29) Lin, C.; Kwong, A.; Perni, R. *Infect. Disord. - Drug Targets* **2006**, 6 (1), 3.
- (30) Zehavi, U. *J. Org. Chem.* **1977**, 42 (17), 2821.
- (31) Bulusu, M. A. R. C.; Haidl, E.; Schulz, G.; Waldstätten, P.; Grassberger, M. *Indian J. Chem. -Section B* **1999**, 38 (October), 1159.
- (32) Bulusu, M. a. R. C.; Waldstätten, P.; Schulz, G.; Grassberger, M. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45 (12), 2523.
- (33) Bulusu, M. A. R. C.; Waldstätten, P.; Tricotet, T.; Rochais, C.; Steck, A.; Bacher, M.; Schulz, G.; Meingassner, J. G.; Hiestand, P.; Zenke, G.; Schuler, W.; Wagner, T. *Helv. Chim. Acta* **2009**, 92 (5), 839.
- (34) Zimmerman, H. E.; Nuss, J. M.; Tantillo, A. W. *J. Org. Chem.* **1988**, No. 8, 3792.
- (35) Roth, H. J.; El Raie, M. H. *Tetrahedron Lett.* **1970**, 11 (28), 2445.
- (36) Roth, H. J.; El Raie, M. H.; Schrauth, T. *Arch. Pharm.* **1974**, 307 (8), 584.
- (37) Kraus, G. a; Chen, L. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32 (49), 7151.
- (38) Yoshioka, M.; Miyazoe, S.; Hasegawa, T. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, No. 5, 418.
- (39) Yoshioka, M.; Miyazoe, S.; Hasegawa, T. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, No. 22, 2781.

第4章 光親和性標識を指向した α -ケトエステルの光反応

4-1. 酸素原子に隣接するプロトンのない α -ケトエステル

4-2. 一般的な α -ケトエステルの光反応

4-3. 炭素-炭素結合形成を伴う α -ケトエステルの光反応

4-4. 置換基 R^1 および R^2 の最適化

4-5. *N,N*-Dimethylacetamide とのカップリング反応

4-6. 電子移動を経るフタルイミド誘導体の環化反応

4-7. アミドおよびエーテルを溶媒とする光反応

4-8. アルコールを溶媒とする光反応

4-9. アルカンを溶媒とする光反応

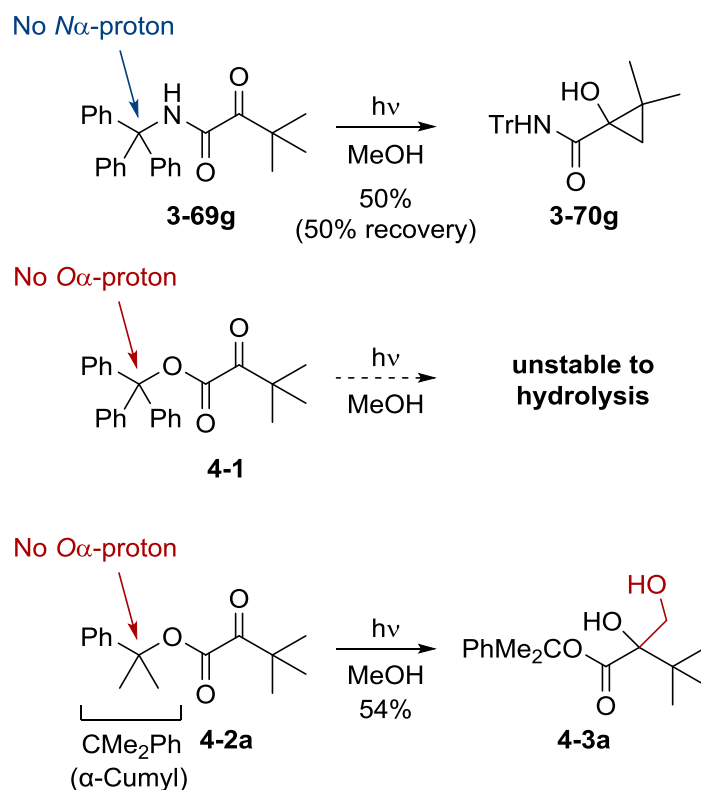
4-10. カップリングパートナーの等量の検討

4-11. Tetrahydro-1,4-diazepine-2,5-dione の合成

4-12. 光反応性基としての α -ケトエステル

4-1. 酸素原子に隣接するプロトンのない α -ケトエステル

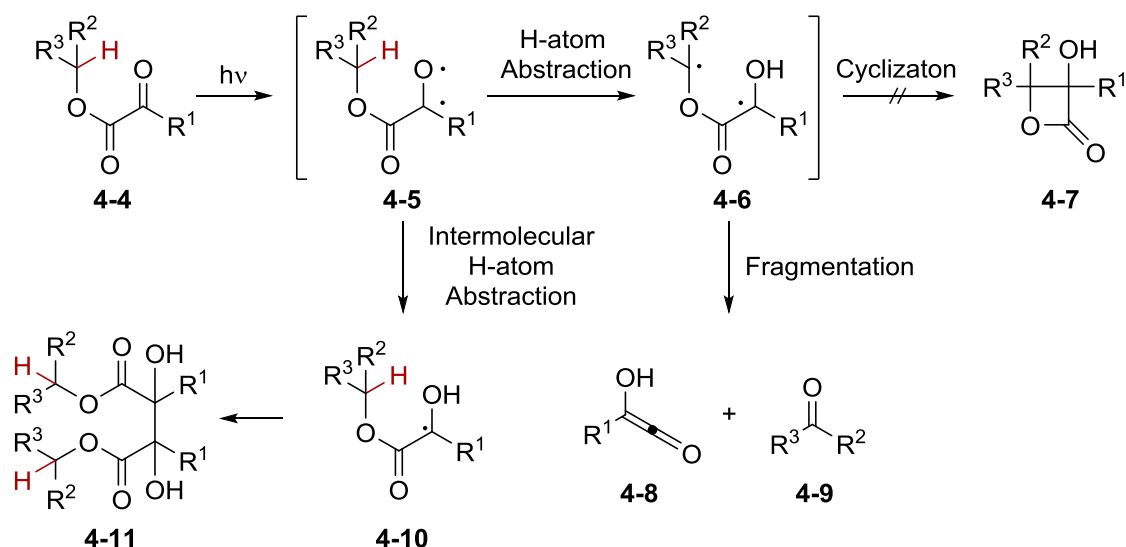
第三章では、N 原子に隣接するプロトン ($N\alpha$ -プロトン) を持たない α -ケトアミド **3-69g** を光照射すると、Norrish II 型反応が抑制され、シクロプロパノール **3-70g** を与えることを新たに見出した (Scheme 4-1)。この知見を α -ケトエステルに応用し、酸素原子に隣接するプロトンのない α -ケトエステルの光反応を検討することとした。 α -ケトアミド **3-69g** に倣いトリチル基を持つ **4-1** を調製したが、不安定であることがわかった。そこで、酸素原子上の置換基に CMe_2Ph (α -cumyl) 基を採用した **4-2a** の光反応を検討した。MeOH 中 **4-2a** を光反応させたところ、シクロプロパノールの生成は一切確認できず、MeOH 付加体 **4-3a** が生成することを見出した。



Scheme 4-1. Photochemical Reaction of α -Ketoamide **3-69g** and α -Ketoester **4-2a**.

4-2. 一般的な α -ケトエステルの光反応

α -ケトエステルの光反応は古くから研究されており、光照射によって以下のような反応経路を辿ると考えられている (**Scheme 4-2**)^{1,2}。 α -ケトエステル **4-4** を光照射すると、カルボニル基が $n\text{-}\pi^*$ 遷移によって励起され、ビラジカル様中間体 **4-5** へと変換される。Norrish Type II 反応として知られる γ 位水素引き抜き反応が起こると、1,4-ビラジカル **4-6** を生成する。先に述べたように、 α -ケトアミドや 1,2-ジケトンでは、4 員環形成反応が見られるが、 α -ケトエステルでは開裂反応が起こり、ヒドロキシケテン **4-8** とケトン **4-9** を与える。一方、**4-5** が分子間で水素を引き抜いた場合は、**4-10** の生成を経て二量化することが報告されている。



Scheme 4-2. Possible Reaction Pathways for Irradiation of α -Ketoester.

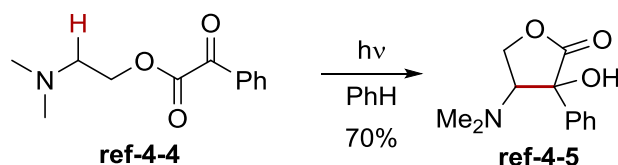
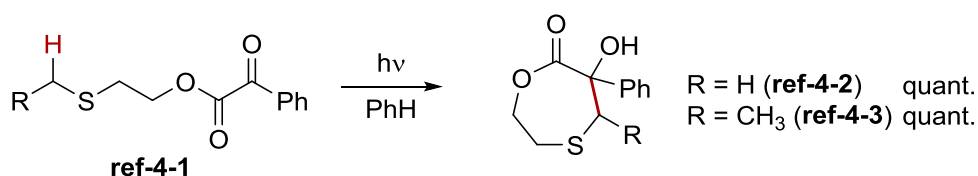
4-3. 炭素-炭素結合形成を伴う α -ケトエステルの光反応

C-H 結合の切断を経る、 α -ケトエステルの光誘起型炭素-炭素結合形成反応は、分子内反応、分子間反応ともに報告例が限られている。

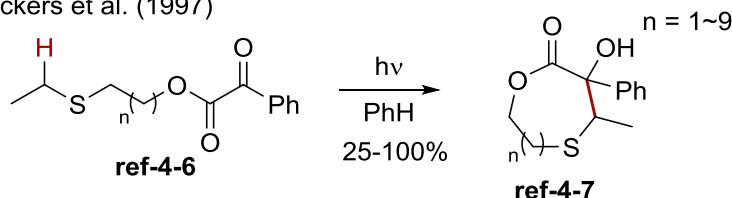
分子内炭素-炭素結合形成反応

Neckers らの報告によれば、メルカプト基やアミノ基で置換された、 α -ケトエステル (**ref-4-1** or **ref-4-4**) を光照射した場合、形式的な 1,8-水素移動もしくは 1,6-水素移動を起こし、環化生成物を与える (**Scheme 4-3**)³。なお、メルカプト基がカルボニルからある程度離れていても環化反応は進行し、最大で環員数 15 のラク톤を合成できることが示されている⁴。また、ケト側の置換基の C-H 結合が関与する、水素引き抜き反応もいくつか報告されている⁵⁻⁸。

Neckers et al. (1997)



Neckers et al. (1997)

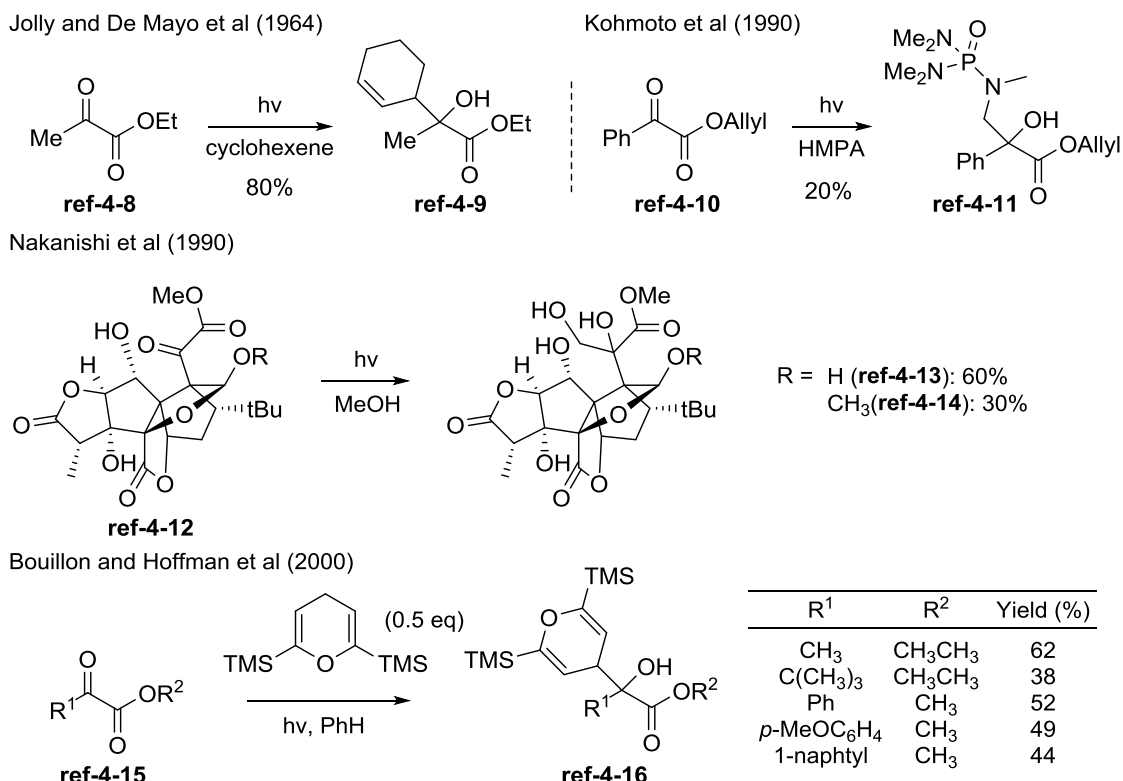


Scheme 4-3. Photo-induced Cyclization of α -Ketoesters to Form C-C Bond.

分子間炭素-炭素結合形成反応

C-H 結合の切断を伴う α -ケトエステルの分子間反応は、現在までに 4 例の報告がある (**Scheme 4-4**)。ピルビン酸エチル **ref-4-8** をシクロヘキセン中で光照射した場合、カップリング反応が進行する⁹。一方、HMPA を溶媒とした場合、N 原子 α 位の C-H 結合の切断を伴って **ref-4-11** が生成する。ユニークな例としては、ギンコライド誘導体 **ref-4-12** に対する光照射によって、MeOH 付加体が生成することも知られている。また、 α -ケトエステル **ref-4-15** と 4H-ピラン誘導体とのカップリング反応も報告されている。しかし、反応例が少なく、基質と反応

剤の組合せが限られている。そこで、筆者は効率良くカップリングが進行する α -ケトエステルを見出し、どのようなカップリングパートナーが利用できるのかを詳細に調べることにした。



Scheme 4-4. Photo-induced Coupling Reaction of α -Ketoesters to Form C-C Bond.

4-4. 置換基 R¹ および R² の最適化

効率良くカップリングが進行する α -ケトエステルを見出すため、置換基 R¹ および R² を検討した (Table 4-1)。R² に O α プロトンを持つ **4-2b** や **4-2c** を照射した場合、即座に原料が消費され、複雑な混合物を与えた。目的の生成物は僅かに得られたものの、収率が低く、ESI-MS を用いた解析では二量体 **4-12** の生成が確認できた。このことから、分子内に水素引き抜き可能な O α プロトンがない場合に、カップリングを優先して起こすことが確認できた。**4-2d** の光反応では 25% でカップリング体を与えるものの、thienyl 基を持つ **4-2e** の場合は目的の生成物は一切確認できなかった。一方、カルボニルの α 位に *i*-Pr 基を有する α -ケトエ

ステルを照射すると、**4-2f** を 68% で与えることを見出した。R¹ を Et 基に置換した **4-2g** の場合、反応の効率は低く、原料を 23% 回収した。なお、反応時間を長くしても、MeOH 付加体の収率は向上しなかった。以上の検討から、MeOH との反応では、R¹ を比較的嵩高いアルキル基とするとカップリングが効率良く進行することが分かった。

Table 4-1. Photo-induced Coupling of α -Ketoesters with MeOH.

Entry	Substrate	R ¹	R ²	Time	Yield (%)	
					Product	Recovery
1	4-2a	<i>t</i> -Bu	CMe ₂ Ph	4 h	54	n.d. ^c
2	4-2b	<i>t</i> -Bu	CH ₂ CH ₂ Ph	20 min	3	n.d. ^c
3	4-2c	<i>t</i> -Bu	CHMePh ^a	5 min	10 (d.r = 1:1) ^b	n.d. ^c
4	4-2d	Ph	CMe ₂ Ph	1 h	25	n.d. ^c
5	4-2e	2-thienyl	CMe ₂ Ph	1 h	0	n.d. ^c
6	4-2f	<i>i</i> -Pr	CMe ₂ Ph	3 h	68	n.d. ^c
7	4-2g	Et	CMe ₂ Ph	1 h	15	23

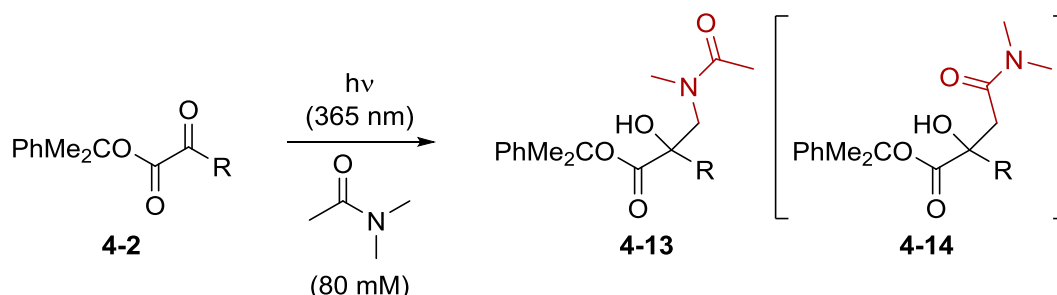
a) (*R*) isomer was used; b) diastereomeric ratio; c) not detected

4-5. *N,N*-Dimethylacetamide とのカップリング反応

α -ケトエステルとカップリングする分子を明らかにするため、**4-2f** の光反応を検討したところ、様々な分子とのカップリングが進行した。特に、*N,N*-ジメチルアセトアミドを溶媒とした時に、最も効率良くカップリングが進行し、 β -アミノ酸誘導体 **4-13f** を合成できることを見出した (**Table 4-2**)。 *N,N*-ジメチルアセトアミドを溶媒に用いると、MeOH とのカップリングの効率が低かった **4-2d** や **4-2g** も良好な収率でカップリング体 **4-13d** および **4-13g** を与えた。本カップリング反応はアセトアミドの *N*-methyl 基で進行しており、カルボニル α 位でカップ

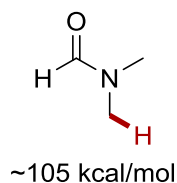
リングした **4-14** は一切確認されなかった。反応に関与する C-H 結合の結合解離エネルギー¹⁰を比較すると、*N*-methyl 基とカルボニル α 位では 10 kcal/mol 程度の差があり、本反応で見られた選択性はやや説明しにくい (**Figure 4-1**)。このことから、本カップリング反応には、水素引き抜き以外の機構が含まれていると推察した。

Table 4-2. Photo-induced Coupling of α -Ketoesters with *N,N*-Dimethylacetamide.



Entry	Substrate	R	Time (min)	Product	Yield (%)
1	4-2f	<i>i</i> -Pr	10	4-13f	85
2	4-2d	Ph	5	4-13d	55
3	4-2g	Et	40	4-13g	52

N,N-dimethylformamide



N,N-dimethylacetamide

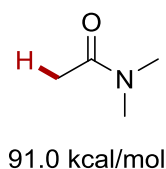


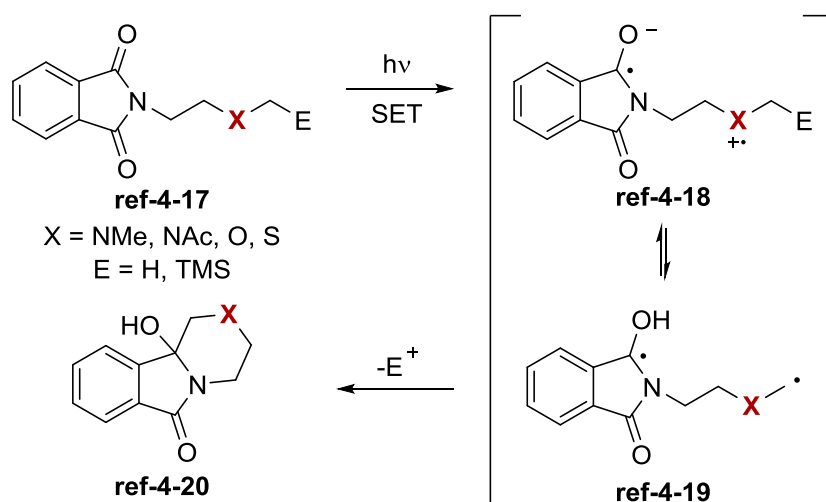
Figure 4-1. C-H Bond Dissociation Energies of Amides.

4-6. 電子移動を経るフタルイミド誘導体の環化反応

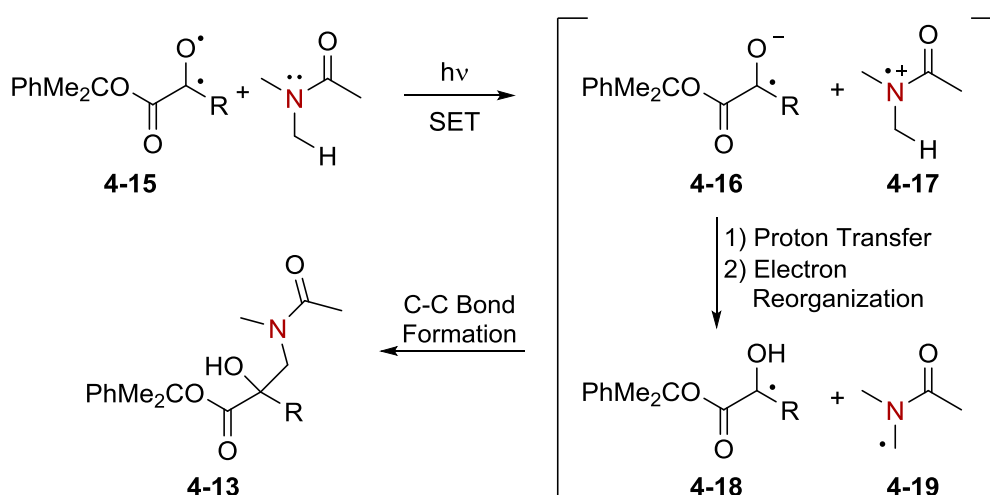
Mariano らは、MeOH 中でフタルイミド誘導体 **ref-4-17** を光照射すると、一電子移動を経て環化反応が進行し、**ref-4-20** を与えることを報告している (**Scheme 4-5A**)¹¹⁻¹⁴。本反応のメカニズムは以下のように説明されている。フタルイミド誘導体 **ref-4-17** を光照射することで、ヘテロ原子 X から、イミドのカルボニル酸素への一電子移動が起こる。zwitterion **ref-4-18** は、脱プロトン化もしくは脱シ

リル化を経て、ビラジカル **ref-4-19** へと変換される。1,6-ビラジカルは分子内でカップリングし、ヘテロ環化合物 **ref-4-20** を与える。この報告をもとに、本カップリング反応では次のような分子間電子移動が進行していると推測した (**Scheme 4-5B**)。α-ケトエステルの光照射により生じたビラジカル **4-15** に対して、*N,N*-ジメチルアセトアミドの N 原子から一電子移動が進行する。生じたイオン対 **4-16**、**4-17** はプロトン移動と electron reorganization を経て、ラジカル対 **4-18**、**4-19** へと変換される。このラジカル対が分子間で結合することで、カップリング体 **4-13** を与えたと推察した。

A) Mariano et al. (1994, 1997, 1998)



B)



Scheme 4-5. A) Photochemical Reaction of Phthalimides Reported by Mariano et al;
 B) Photo-induced Coupling of α-Ketoesters via Intermolecular Electron Transfer.

4-7. アミドおよびエーテルを溶媒とする光反応

N,N-ジメチルアセトアミド以外のアミドを溶媒に用いて光反応を検討したところ、いずれも窒素原子の α 位で反応が進行した (**Figure 4-2**)。溶媒に *N*-メチルアセトアミドを用いた場合は、高収率で付加体 **4-20f** を与えた。窒素原子の α 位にメチレンを持つ 2-ピロリドン溶媒を用いた場合にもカップリング体 **4-21f** は生成し、*N*-メチルピロリドン中の光反応では、メチレン基で反応した **4-22f** およびメチル基で反応した **4-23f** をそれぞれ 57%、17% で与えた。また、本カップリング反応はエーテル溶媒中でも進行した。溶媒として *t*-BuOMe を用いた場合、15 分で反応が完結し、高収率で *t*-Bu エーテル **4-24f** を与えた。アニソールや 1,4-ジオキサン中の反応では、中程度の収率で **4-25f** や **4-26f** が生成した。

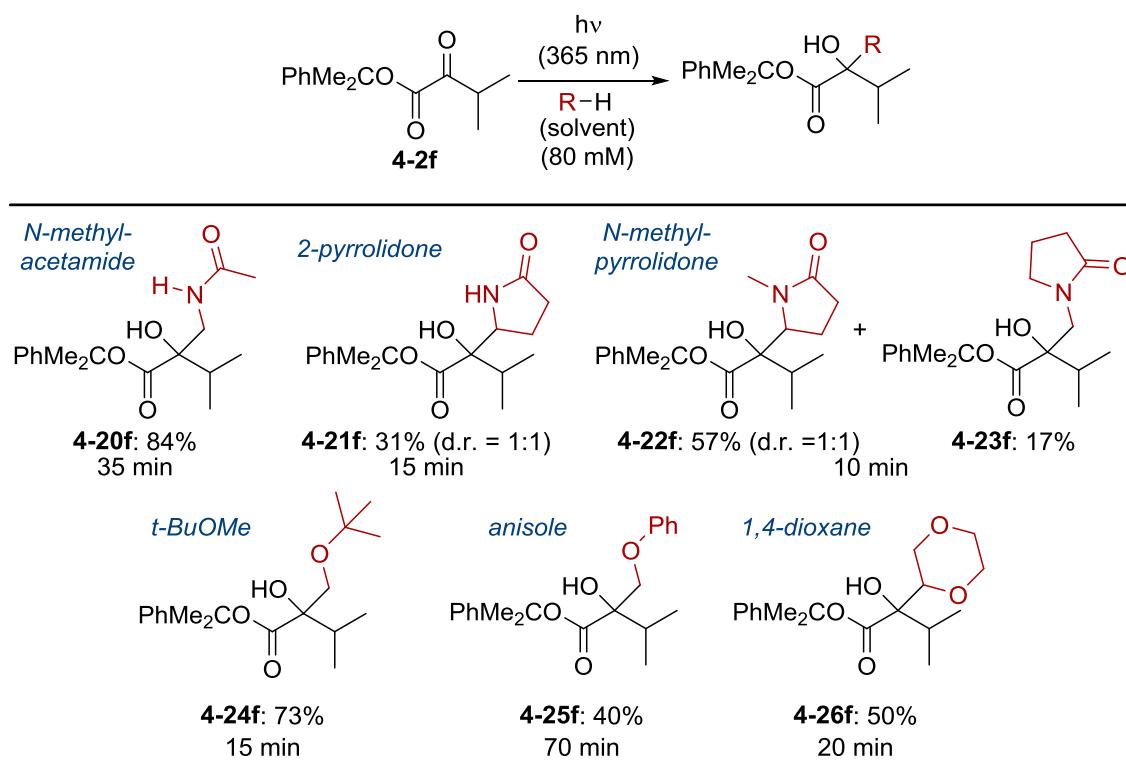
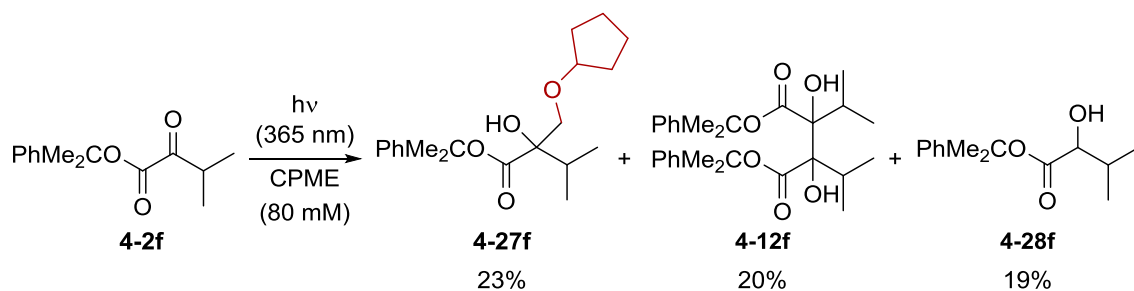
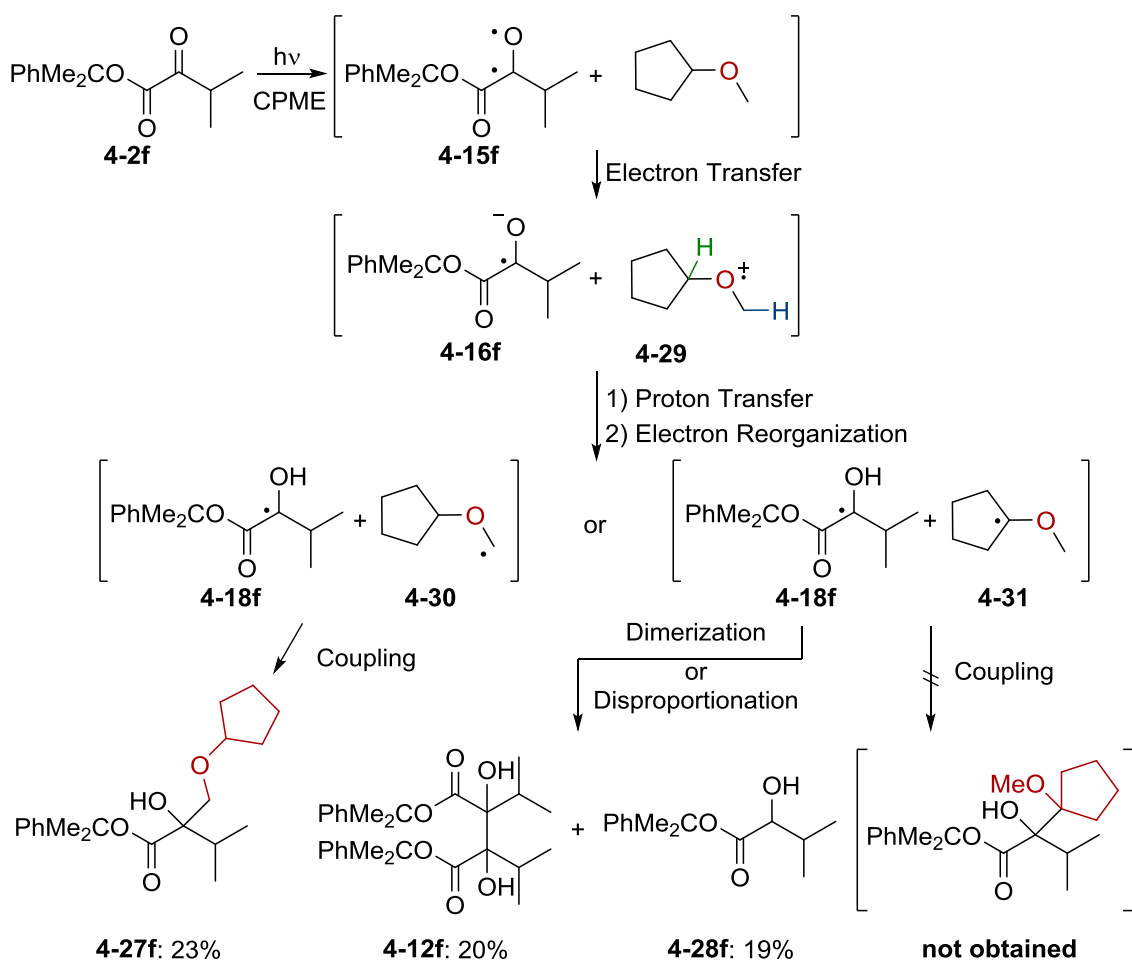


Figure 4-2. Photo-induced Coupling of α -Ketoesters with Amides and Ethers.

シクロペンチルメチルエーテル (CPME) を溶媒に用いた場合は、カップリングがメチル基で進行した **4-27f** のほか **4-12f** および **4-28f** の生成が確認できた (Scheme 4-6)。これらの生成物を与えた反応経路を以下のように考察した (Scheme 4-7)。 α -ケトエステル **4-2f** は光照射によって励起され **4-15f** を与える。**4-15f** が水素引き抜きを起こす可能性は否定できないが、CPME の酸素原子から一電子移動が起これば **4-16f** が生成すると推測した。**4-16f** の酸素アニオンは、酸性度が上昇した CPME のメチル基およびメチン基のプロトンを引き抜き、**4-30** もしくは **4-31** を生成する。一級ラジカル **4-30** は、**4-18f** とのカップリングが進行し **4-27f** を与えたと考えられる。一方、3級ラジカル **4-31** は電子的もしくは立体的要因から、容易には **4-18f** とカップリングできず、二量体 **4-12f** やヒドロキシエステル **4-28f** が生成したと推測した。このことから、 $O\alpha$ -メチン基と α -ケトエステルのカップリング反応は進行しにくいことが示唆された。



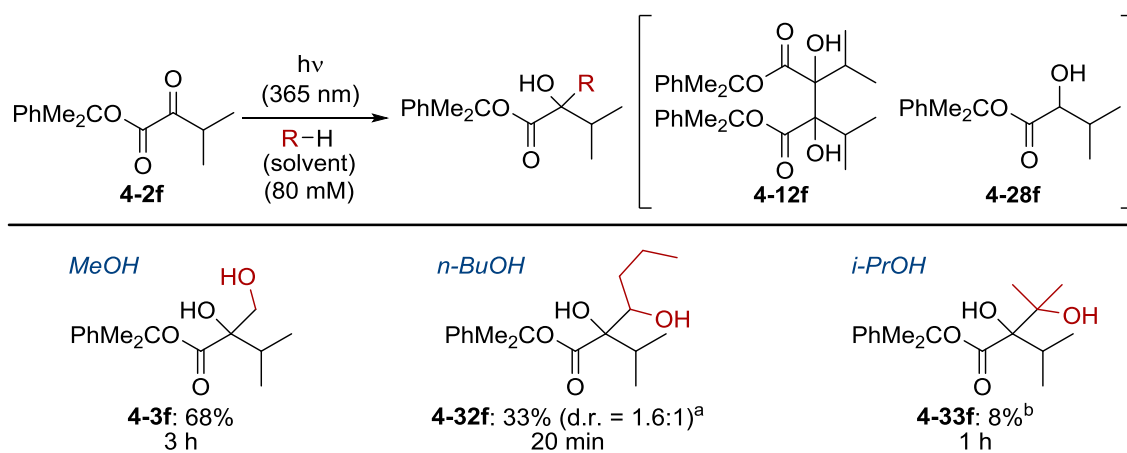
Scheme 4-6. Photo-induced Coupling Reactions of α -Ketoesters with CPME.



Scheme 4-7. Proposed Mechanism for the Coupling Reactions of α -Ketoesters with CPME.

4-8. アルコールを溶媒とする光反応

MeOH 以外のアルコールを溶媒として α -ケトエステルの光反応を検討した (Figure 4-3)。*n*-BuOH を用いた場合には、カップリングよりも二量化が主に進行し、ヒドロキシエステル **4-28f** の生成も確認できた。二級アルコールである *i*-PrOH との反応では、付加体の収率はさらに低下した。先に示した CPME 中での結果を考慮すると、やはり *O* α -メチン基は α -ケトエステルとカップリングしにくいことがうかがえる。

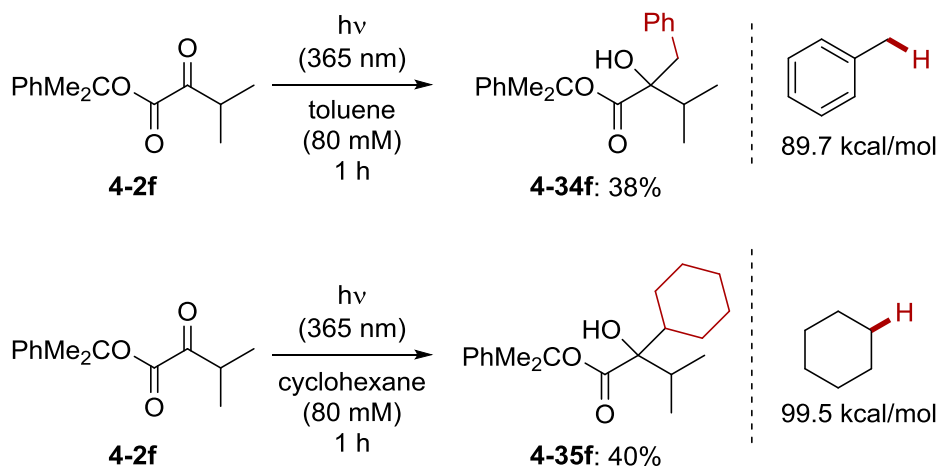


Isolated yields are shown unless otherwise noted; a) **4-12f** (52%, calculated yield) and **4-28f** (5%, calculated yield) were obtained; b) **4-12f** (64%, calculated yield) and **4-28f** (5%, calculated yield) were obtained.

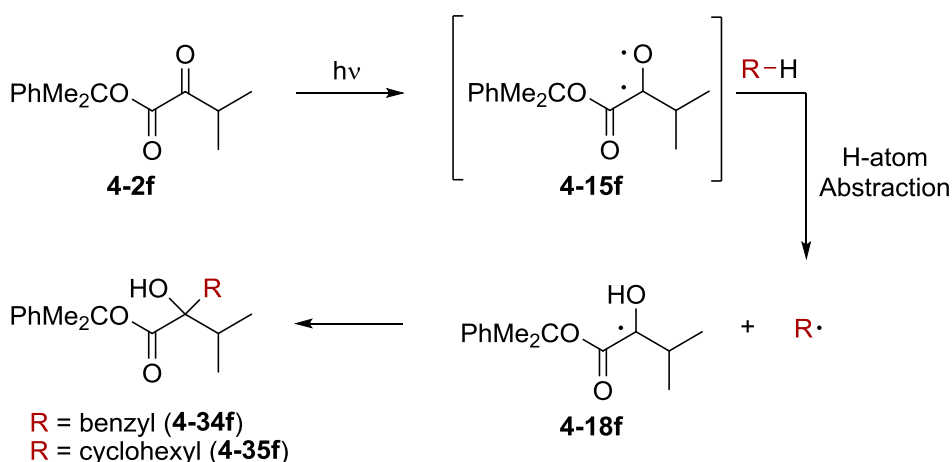
Figure 4-3. Photo-induced Coupling Reactions of α -Ketoesters with Alcohols.

4-9. アルカンを溶媒とする光反応

溶媒に炭化水素を用いて α -ケトエステルの光反応を検討した (Scheme 4-8)。トルエンやシクロヘキサン中でもカップリング反応は進行し、ベンジル位の C-H 結合 (結合解離エネルギー; BDE = 89.7 kcal/mol)¹⁰ だけでなく、シクロヘキサンの C-H 結合 (BDE = 99.5 kcal/mol)¹⁰ も切断できることを示した。ヘテロ原子のない炭化水素との反応では電子移動は起こらず、ビラジカル様中間体 **4-15f** の水素引き抜きを経て、カップリング体が生成したと推測できる (Scheme 4-9)。このことから、本反応はカップリングパートナーによって、異なる経路で反応が進行することが推察される。



Scheme 4-8. Photo-induced Coupling Reactions of α -Ketoesters with Alkanes.



Scheme 4-9. Proposed Reaction Mechanism for the Coupling Reactions of α -Ketoesters with Alkanes.

4-10. カップリングパートナーの等量の検討

これまでの検討では、カップリングパートナーを溶媒量使用していたが、等量を減らすことが出来れば、固体や、合成に多くの工程数を要する分子との反応にも本手法を適用できると期待できる。そこで、 α -ケトエステルとカップリングを起こさず、溶媒として利用可能な分子を調べることとした (Table 4-3)。アセトン、ベンゼン、*t*-BuOH、CH₃CN、*t*-BuOAc、そして CF₃Ph 中で **4-2f** を光反応させたところ、カップリング体は確認できず、原料消失のみが観測された。原料消失速度はアセトンやベンゼンを用いた場合に遅くなることを見出し、これらを本光反応における最適な溶媒とした。

Table 4-3. Solvent Screening for Photolysis of α -Ketoester.

4-2f

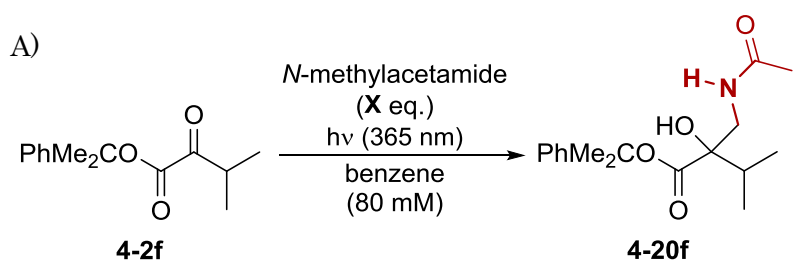
Entry	Solvent	Time (h)	Recovery (%) ^a
1	acetone	1	77
2	benzene	1	80
3	<i>t</i> -BuOH	1	69
4	CH ₃ CN	1	54
5	<i>t</i> -BuOAc	1	44
6	CF ₃ Ph	1	59
7	acetone	3	29
8	benzene	3	47
9	<i>t</i> -BuOH	3	20
10	CH ₃ CN	3	20
11	<i>t</i> -BuOAc	3	10
12	CF ₃ Ph	3	n.d. ^b

a) NMR yield are shown; b) n.d. = not detected.

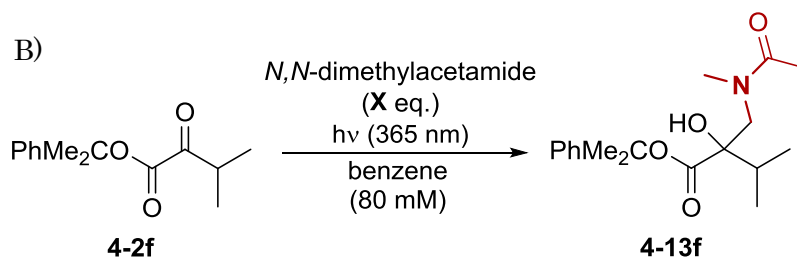
50、15 および 5 等量の *N*-メチルアセトアミド存在下、ベンゼン中で α -ケトエステル **4-2f** を照射したところ、それぞれ 73、70、および 23%で付加体 **4-20f** を与えた (Table 4-4A)。*N*-メチルアセトアミドを溶媒として用いた場合、反応は 35 分で完結したが (Figure 4-1)、その等量を制限すると、いずれのエントリーでも反応時間が大幅に増加した。ベンゼン中で反応させた場合も、一部の原料

が分解したことを考慮すると (Table 4-3)、目的の反応と分解反応とが競争していることが懸念された。そこで、より速くカップリング反応が進行した *N,N*-ジメチルアセトアミドを用いて同様の検討を試みた (Table 4-4B)。15 等量の *N,N*-ジメチルアセトアミド存在下光照射した場合、83%でカップリング体 **4-13f** を得ることに成功した。この時の収率は、溶媒量の *N,N*-ジメチルアセトアミド用いて光反応させた時と同程度であった。また、等量を 5 等量に減らした場合にも、**4-13f** を 67%で与えることが確認できた。

Table 4-4. Coupling Reaction of α -Ketoester with Acetamides in Benzene; A) with *N*-methylacetamide; B) with *N,N*-dimethylacetamide



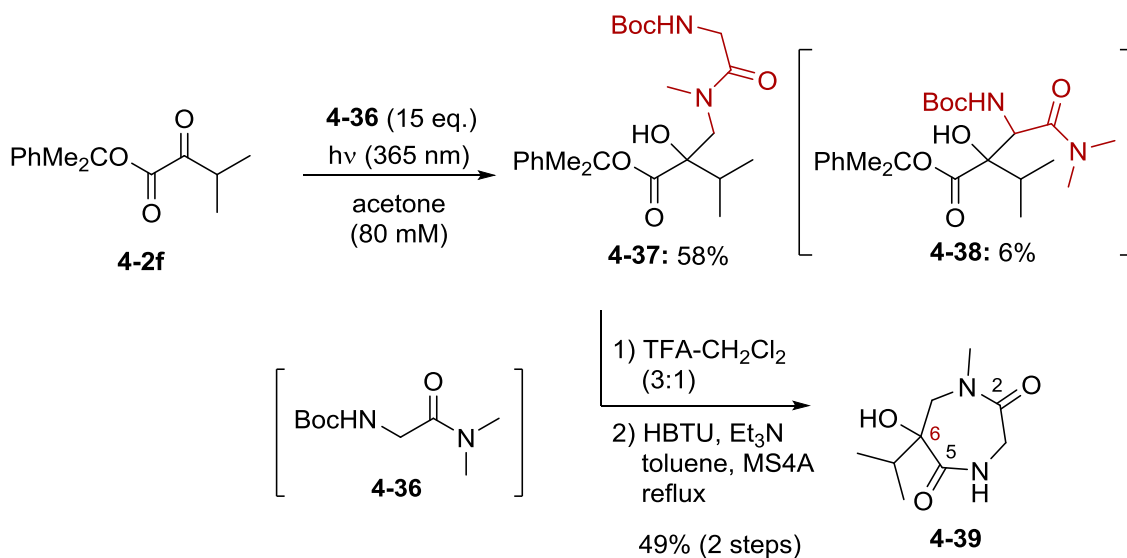
Entry	<i>N</i> -methylacetamide (<i>X</i> eq.)	Time (h)	Yield (%)
			4-20f
1	50	2.5	73
2	15	4	70
3	5	4	23



Entry	<i>N,N</i> -dimethylacetamide (<i>X</i> eq.)	Time (min)	Yield (%)
			4-13f
1	50	20	87
2	15	50	83
3	5	60	67

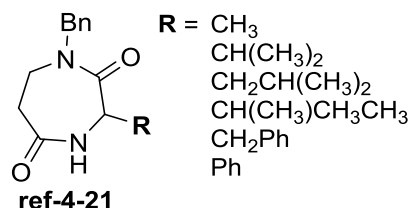
4-11. Tetrahydro-1,4-diazepine-2,5-dione の合成

カップリングパートナーの等量を制限できることが確認できたので、 α -ケトエステル **4-2f** と固体であるグリシン誘導体 **4-36** とのカップリング反応を試みた (**Scheme 4-10**)。溶解性の問題からアセトンを経媒として使用し、15 等量の **4-36** と光反応させた。その結果、アミノ酸の α 位でカップリングした **4-38** を僅かに与えたものの、*N*-メチル基で優先的に反応が進行し、**4-37** を 58% で得ることに成功した。酸処理によって **4-37** の Boc 基とエステルを同時に除去し、単離することなく縮合させることで、tetrahydro-1,4-diazepine-2,5-dione (homo-diketopiperazine) 誘導体 **4-39** の合成を二工程収率 49% で達成した。**4-39** と類似の骨格を持つ化合物の合成は数例の報告があるものの^{15,16}、本手法を利用することで、6 位に 4 置換炭素を有する tetrahydro-1,4-diazepine-2,5-one の合成に成功した。なお、 α -cumyl 基はより温和な条件で除去が可能であることを確認した (**Scheme 4-11**)。



Scheme 4-10. Synthesis of tetrahydro-1,4-diazepine-2,5-dione.

Juaristi et al. (2005)



Stockel-Mascheka and Neubert (2005)

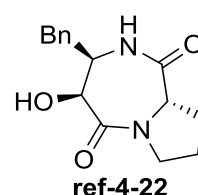
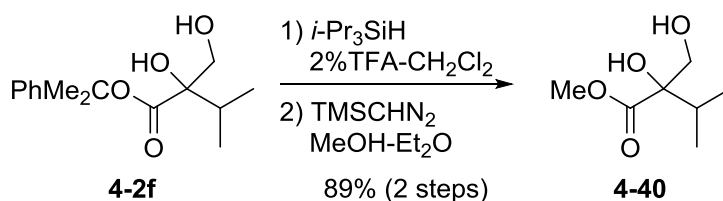


Figure 4-3. Similar Examples of Tetrahydro-1,4-diazepine-2,5-dione Derivatives.



Scheme 4-11. Cleavage of α -Cumyl Group.

4-12. 光反応性基としての α -ケトエステル

本章では、分子間で結合生成できる α -ケトエステルを見出し、反応に利用できるカップリングパートナーを明らかにした。 α -Cumyl 基を有する α -ケトエステルは、様々な分子との反応が進行したことから、3級アルキル基を持つ α -ケトエステル **4-41** はタンパク質のラベル化に応用できると期待される (**Figure 4-4**)。 α -ケトアミドと比較すると、 α -ケトエステルは求電子性が高く、生体内ではイミンやヘミアセタール形成が懸念される。また、エステラーゼによる分解も留意する必要がある。これら問題点はあるものの、今回の検討によって、 α -ケトエステルが新たな光反応性基として利用できる可能性を示すことが出来た。

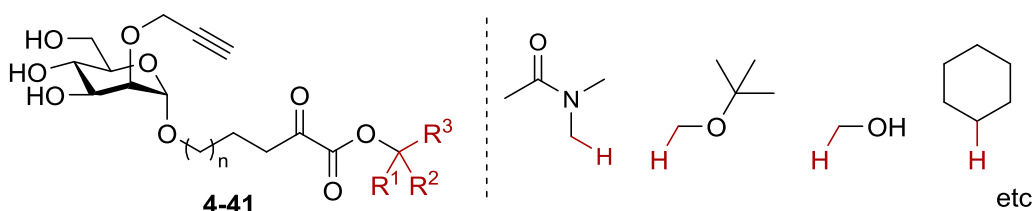


Figure 4-4. Proposed Mannose Probe Possessing α -Ketoester.

参考文献 第4章

- (1) Hu, S.; Neckers, D. C. *J. Org. Chem.* **1996**, 61 (18), 6407.
- (2) Monroe, B. M. Pitts, J. N., Hammond, G. S., Noyes, W. A., Eds.; *Advances in Photochemistry*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 1971; pp 77–108.
- (3) Hu, S. K.; Neckers, D. C. *Tetrahedron* **1997**, 53 (8), 2751.
- (4) Hu, S.; Neckers, D. C. *Tetrahedron* **1997**, 53 (21), 7165.
- (5) Gramain, J. C.; Remuson, R.; Vallee, D. *J. Org. Chem.* **1985**, 50 (5), 710.
- (6) Gramain, J.-C.; Remuson, R.; Vallee-Goyet, D.; Guilhem, J.; Lavaud, C. *J. Nat. Prod.* **1991**, 54 (4), 1062.
- (7) Kraus, G. A.; Wu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114 (22), 8705.
- (8) Pappas, S. P.; Pappas, B. C.; Backwell Jr., J. E. *J. Org. Chem.* **1967**, 32 (10), 3066.
- (9) Jolly, P. W.; de Mayo, P. *Can. J. Chem.* **1964**, 42 (1), 170.
- (10) Luo, Y.-R. *Comprehensive Handbook of Chemical Bond Energies*; Luo, Y.-R., Ed.; CRC Press, 2007.
- (11) Cho, D. W.; Yoon, U. C.; Mariano, P. S. *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44 (3), 204.
- (12) Su, Z.; Mariano, P. S.; Falvey, D. E.; Yoon, U. C.; Oh, S. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120 (41), 10676.
- (13) Yoon, U. C.; Lee, S. J.; Lee, K. J.; Cho, S. J.; Lee, C. W.; Mariano, P. S. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1994**, 15 (2), 154.
- (14) Yoon, U. C.; Kim, J. W.; Ryu, J. Y.; Cho, S. J.; Oh, S. W.; Mariano, P. S. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **1997**, 106 (1-3), 145.
- (15) Jiménez-González, E.; Gabriela Ávila-Ortiz, C.; González-Olvera, R.; Vargas-Caporalí, J.; Dewynter, G.; Juaristi, E. *Tetrahedron* **2012**, 68 (47), 9842.
- (16) Stöckel-Maschek, A.; Stiebitz, B.; Koelsch, R.; Neubert, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13 (16), 4806.

第5章 総括

本研究では、これまでに報告されている GM3 の光親和性プローブの欠点を克服する、理想的な GM3 の光親和性プローブを提案し、その創製に向けた 2 つの課題（代謝安定型 GM3 アナログへのアルキンの導入、糖部に導入できる非疎水性光反応性基の開発）に取り組んだ。

第2章では、代謝安定型 GM3 アナログへのアルキンの導入が、生物活性にもたらす影響を明らかにした。まず、従来の GM3 アナログの合成法を改良し、アルキンを持つ GM3 アナログの合成を達成した。合成に関しては、アルキンの導入と効率的なグリコシル化を可能にする保護基の最適化が重要であった。特に、グリコシル化反応では、保護基によってアクセプターの求核性を向上させることが目的物を得る上で必須であった。合成したアナログの生物活性評価では、アルキンの位置によって Had-1 細胞に対する生物活性が異なることを見出し、GM3 アナログの生物活性に影響を与えないアルキンの位置を決定した。

第3章では、非疎水性の光反応性基として着目した一置換の α -ケトアミドが、光親和性基として機能する可能性を示した。糖-タンパク質相互作用の解析にはマンノースプローブと Concanavalin A を利用し、 α -ケトアミドの標識効率を評価できる実験系の構築に成功した。この評価系は、 α -ケトアミドに限らず、様々な光反応性基の標識効率を評価でき、糖-タンパク質相互作用の解析に適した光親和性基を見出すことが可能だと考えられる。さらに、分解物の解析過程で見出した新規光誘導型シクロプロパノール形成反応について、精査したところ、 $N\alpha$ -プロトンを持たない α -ケトアミドでは、本反応が定量的に進行することを見出した。

第4章では、 $O\alpha$ -プロトンを持たない α -ケトエステルの光反応では、分子間でカップリング反応が進行することを見出した。詳細な検討の結果、カップリングパートナーとしては、アルコールやアミドなど様々な分子を利用でき、ヘテロ原子に隣接する 1 級もしくは 2 級 C-H 結合を直接官能基化することに成功した。また、本光反応はアミノ酸誘導体とのカップリング反応にも応用でき、 α -ケトエステルが光親和性標識に利用可能であることが示唆された。

Experimental Section

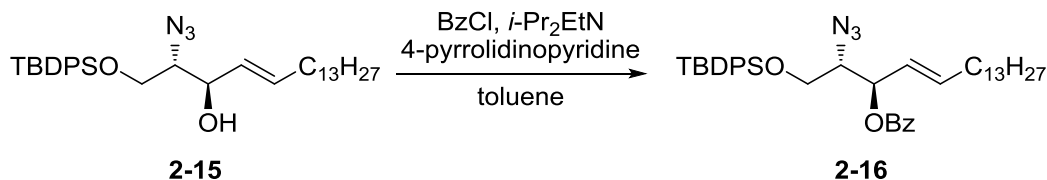
General

NMR spectra were recorded on a JEOL ECS-400 spectrometer at 400 MHz for ^1H -NMR and 100.4 MHz for ^{13}C -NMR, on a JEOL ECA-500 at 500 MHz for ^1H -NMR and 125.8 MHz for ^{13}C -NMR, and on an Agilent VNMR500 at 500 MHz for ^1H -NMR. Chemical shifts were reported in the scale relative to CHCl_3 (7.26 ppm for ^1H -NMR), C_6H_6 (7.16 ppm for ^1H -NMR), CH_3OH (3.31 ppm for ^1H -NMR), $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ (2.50 ppm for ^1H -NMR), CDCl_3 (77.16 ppm for ^{13}C -NMR), CD_3OD (49.00 ppm for ^{13}C -NMR), and $(\text{CD}_3)_2\text{SO}_3$ (39.52 ppm for ^{13}C -NMR) as an internal reference. Optical rotation was measured on JASCO DIP-370 Digital Polarimeter or JASCO P-2200 Polarimeter. IR spectra were measured on Thermo Scientific Nicolet iS5 FT-IR with ZnSe iD3 ATR. MS spectrum was taken on a Bruker Daltonics micrOTOF-QII (ESI) and on a Bruker Daltonics autoflex speed (MALDI). Column chromatography was performed with silica gel 60 (40-50 μm) purchased from KANTO CHEMICAL Co. Anhydrous THF, Et_2O , CH_2Cl_2 , toluene, DMF, and methanol were purchased from KANTO CHEMICAL Co. and purified by Glass Contour Solvent Dispensing System.

Chapter 2

1. Experimental section for synthesis of compounds

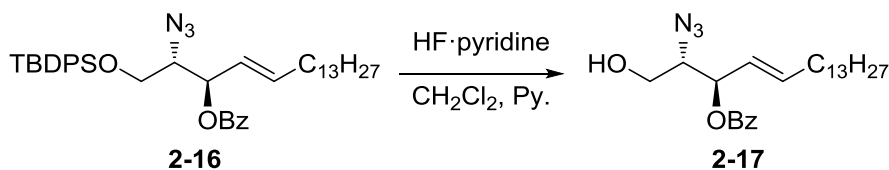
Synthesis of 2-16



To a solution of **2-15** (90.3 mg, 0.159 mmol) in toluene (3.2 ml) were added *i*-Pr₂NEt (138 μ l, 0.795 mmol) and 4-pyrrolidinopyridine (23.6 mg, 0.159 mmol), and BzCl (37 μ l, 320 μ mol). After stirring for 32 h, a saturated aqueous solution of NaHCO₃ was added at 0 °C. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ twice. The combined organic layers were washed with a 1 N aqueous solution of HCl and brine. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **2-16** (113.4 mg, 101%) as a colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, sphH18), 1.08 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 1.21-1.37 (m, 22H, sphH7-H17), 2.03 (m, 2H, sphH6), 3.73-3.76 (m, 2H, sphH1a, sphH1b), 3.83 (dt, *J* = 6.4, 5.1 Hz, 1H, sphH2), 5.51 (br dd, *J* = 15.2, 7.8 Hz, 1H, sphH4), 5.68 (dd, *J* = 7.8, 5.1 Hz, 1H, sphH3), 5.90 (dt, *J* = 15.2, 6.9 Hz, 1H, sphH5), 7.30-7.35 (m, 2H, BzH), 7.37-7.47 (m, 6H, SiPhH), 7.57 (tt, *J* = 7.4, 1.4 Hz, 1H, BzH), 7.63-7.70 (m, 4H, SiPhH), 7.99-8.03 (m, 2H, BzH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 14.27 (sphC18), 19.24 (SiC(CH₃)₃), 22.83 (sphCAlkyl), 26.82 (3C, SiC(CH₃)₃), 28.83 (sphCAlkyl), 29.24 (sphCAlkyl), 29.49 (sphCAlkyl), 29.55 (sphCAlkyl), 29.70 (sphCAlkyl), 29.80 (4C, sphCAlkyl), 32.06 (sphCAlkyl), 32.47 (sphC6), 63.48 (sphC1), 65.88 (sphC2), 74.44 (sphC3), 123.37 (sphC4), 127.89 (2C, ArC), 127.94 (2C, ArC), 128.52 (2C, BzC), 129.86 (2C, BzC), 129.95 (SiPhC), 129.99 (SiPhC), 130.19 (BzC), 132.81 (SiPhC), 132.95 (SiPhC), 133.19 (BzC), 135.68 (4C, SiPhC), 138.61 (sphC5), 165.29 (-COPh).

Synthesis of 2-17

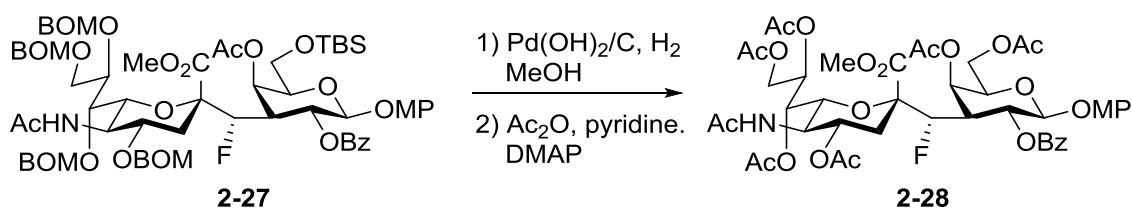


To a solution of **2-16** (90.2 mg, 0.135 mmol) in CH₂Cl₂ (500 μ l) and pyridine (500 μ l) was added hydrogen fluoride pyridine (240 μ l) at 0 °C. After stirring for 14 h at room temperature, a saturated

aqueous solution of NaHCO₃ was added at 0 °C. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ twice. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **2-17** (48.3 mg, 83%) as a colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.88 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, sphH18), 1.21-1.33 (m, 20H, sphH8-H17), 1.38 (m, 2H, sphH7), 1.96 (dd, *J* = 8.0, 4.8 Hz, 1H, -OH), 2.08 (td, *J* = 7.4, 6.9 Hz, 2H, sphH6), 3.63 (ddd, *J* = 11.7, 6.9, 4.8 Hz, 1H, sphH1a), 3.75 (m, 1H, sphH1b), 3.81 (m, 1H, sphH2), 5.60 (m, 1H, sphH4), 5.62 (m, 1H, sphH3), 5.96 (m, 1H, sphH5), 7.46 (dd, *J* = 7.8, 7.4 Hz, 2H, BzH), 7.59 (br t, *J* = 7.4 Hz, 1H, BzH), 8.06 (m, 2H, BzH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 14.26 (sphC18), 22.83 (sphCAlkyl), 28.82 (sphCAlkyl), 29.27 (sphCAlkyl), 29.49 (sphCAlkyl), 29.55 (sphCAlkyl), 29.71 (sphCAlkyl), 29.79 (4C, sphCAlkyl), 32.06 (sphCAlkyl), 32.52 (sphC6), 62.12 (sphC1), 66.33 (sphC2), 74.75 (sphC3) 123.39 (sphC4), 128.64 (2C, BzC), 129.87 (BzC), 129.95 (2C, BzC), 133.49 (BzC), 138.98 (sphC5), 165.65 (-COPh).

Synthesis of 2-28

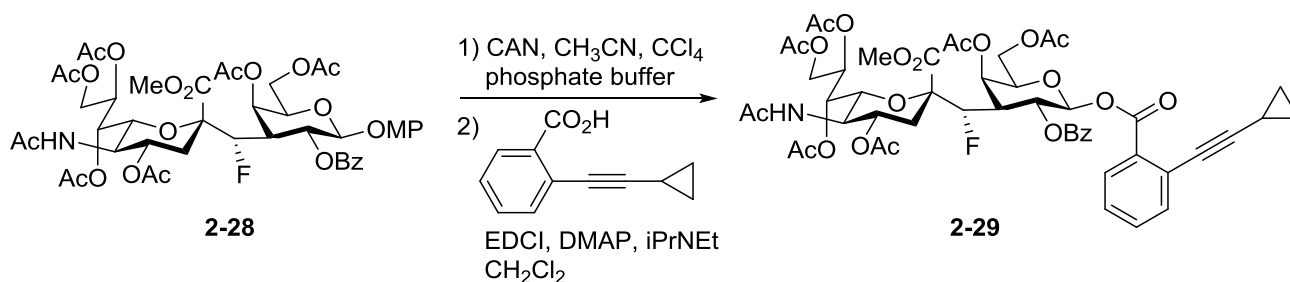


To a solution of **2-27** (130.9 mg, 97.07 μmol) in MeOH (1.9 ml) was added Pd(OH)₂/C (Aldrich 212911, 26 mg) at room temperature. The mixture was stirred under hydrogen atmosphere for 15 h. the reaction mixture was filtered with Celite[®] and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give corresponding hexaol (71.8 mg) as a white amorphous solid. To a solution of crude hexaol (54.2 mg) were added a solution of acetic anhydride (490 μL, 5.18 mmol) and 4-dimethylaminopyridine (4.4 mg, 36 μmol) in pyridine (490 μL, 6.08 mmol) at -40 °C. After stirring for 14 h at 0 °C, the reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for an additional 1.5 h. The mixture was diluted with CH₂Cl₂ and a saturated aqueous solution of NaHCO₃ was added at 0 °C. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ twice. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel column chromatography to give **2-28** (69.6 mg, 105% in 2 steps) as a white amorphous solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.58 (s, 3H, -COCH₃), 1.83 (s, 3H, -NHCOCH₃) , 1.98 (s, 6H, -COCH₃), 2.06 (s, 3H, -COCH₃), 2.17 (brt, *J* = 13.3 Hz, 1H, siaH3ax), 2.206 (s, 3H, -COCH₃), 2.214

(s, 3H, -COCH₃), 2.39 (dd, *J* = 13.1, 4.1 Hz, 1H, *siaH3eq*), 3.30 (m, 1H, *galH3*), 3.71 (s, 3H, MP-OCH₃), 3.83 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.88 (dd, *J* = 10.8, 9.9 Hz, 1H, *siaH5*), 4.00 (dd, *J* = 10.8, 2.1 Hz, *siaH6*), 4.02-4.12 (m, 3H, *galH6a*, *galH6b* and *siaH9b*), 4.20 (dd, *J* = 6.8, 6.4 Hz, 1H, *galH5*), 4.29 (dd, *J* = 12.4, 2.3 Hz, 1H, *siaH9b*), 4.40 (dd, *J* = 46.5, 7.3 Hz, 1H, -CHF-), 4.57 (brd, *J* = 2.3 Hz, 1H, *galH4*), 4.80 (m, 1H, *siaH4*), 5.03 (brd, *J* = 9.9 Hz, 1H, CH₃CONH-), 5.21 (dd, *J* = 10.1, 2.1 Hz, 1H, *siaH7*), 5.32 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, *galH1*), 5.70 (ddd, *J* = 10.1, 6.0, 2.3 Hz, 1H, *siaH8*), 5.78 (dd, *J* = 11.0, 7.6 Hz, 1H, *galH2*), 6.71 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H, MPH), 6.90 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H, MPH), 7.41 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, BzH), 7.53 (tt, *J* = 7.4, 1.4 Hz, 1H, BzH), 8.05 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, BzH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.51 (COCH₃), 20.80 (2C, COCH₃), 20.87 (COCH₃), 20.93 (COCH₃), 21.55 (COCH₃), 23.27 (NHCOCH₃), 33.03 (d, *J* = 7.7 Hz, *siaC3*), 39.98 (d, *J* = 19.3 Hz, *galC3*), 49.19 (*siaC5*), 53.44 (COOCH₃), 55.66 (MP-OCH₃), 62.21 (*galC6*), 62.78 (*siaC9*), 66.96 (*siaC7*), 67.57 (*siaC8*), 67.62 (d, *J* = 10.6 Hz, *galC2*), 68.16 (d, *J* = 3.9 Hz, *galC4*), 69.72 (*siaC4*), 72.49 (*siaC6*), 72.84 (*galC5*), 80.94 (d, *J* = 20.2 Hz, *siaC2*), 90.82 (d, *J* = 199.4 Hz, CHF), 102.49 (*galC1*), 114.40 (MPC), 119.00 (MPC), 128.35 (BzC), 130.01 (BzC), 130.66 (BzC), 132.95 (BzC), 151.65 (MPC), 155.48 (MPC), 165.25 (-COPh), 169.70 (d, *J* = 7.7 Hz, *siaC1*), 170.22 (-NHCOMe), 170.34 (-COMe), 170.38 (-COMe), 170.55 (-COMe), 170.82 (-COMe), 170.86 (-COMe), 171.07 (-COMe); IR (cm⁻¹): 3374, 2959, 1737, 1683, 1669, 1450, 1506, 1450, 1369, 1214, 1175, 1109, 1070, 1035, 948, 829, 752; HRMS-ESI (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₄₅H₅₄FNNaO₂₁, 986.3070; found, 986.3072.

Synthesis of 2-29

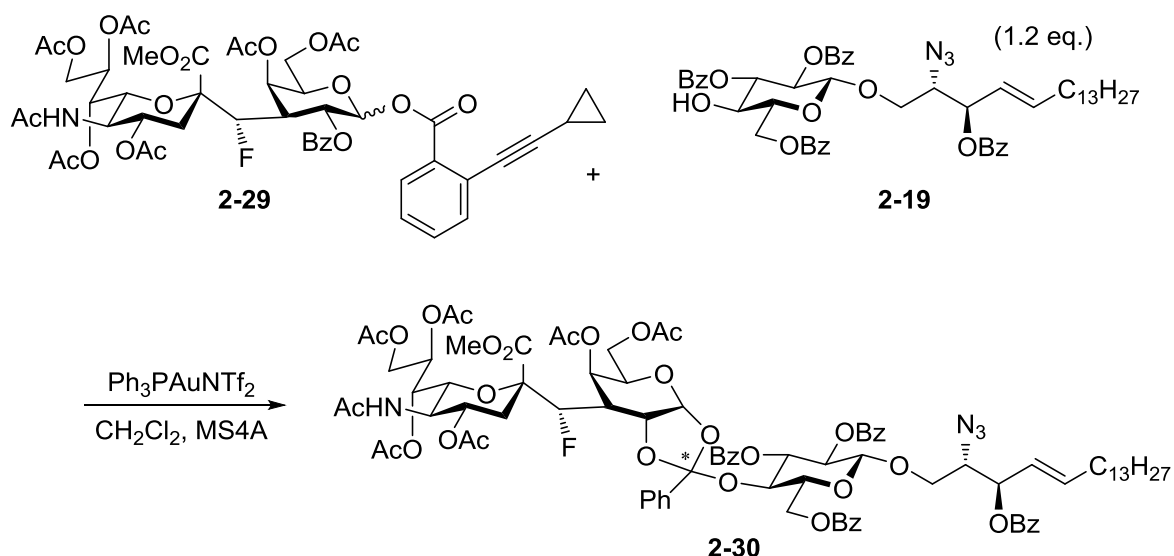


To a solution of **2-28** (40.9 mg, 42.4 μmol) in CH₃CN (680 μL), pH 7.0 phosphate buffer (0.1 M, 150 μL) and CCl₄ (60 μL) was added CAN (58.2 mg, 106 μmol) at 0 °C. After stirring for 3 h at 0 °C, the reaction mixture was diluted with EtOAc and a 1N aqueous solution of Na₂S₂O₃ was added at 0 °C. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with EtOAc twice. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel column chromatography to give lactol. Further purification was carried out by MPLC (column: ULTRA PACK, Silica-40A, 11×300 mm) to give lactol (28.2 mg, 78%) as a white amorphous solid. To a solution of the lactol were added *o*-cyclopropylethynylbenzoic acid (9.2 mg,

49 μmol) in CH_2Cl_2 (330 μL), 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (12.6 mg, 65.8 μmol), DMAP (6.0 mg, 49 μmol), and *i*-Pr₂NEt (14 μL , 82 μmol) sequentially at 0 °C. After stirring for 10 h at room temperature, the reaction mixture was diluted with CH_2Cl_2 and a saturated aqueous solution of NaHCO_3 at 0 °C. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 twice. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The resulting mixture was purified by silica gel column chromatography to give **2-29**. Further purification was carried out by GPC to give **2-29** (23.6 mg, 70%) as a white amorphous solid.

$[\alpha]_D^{27}$ 23.79 (*c* 1.180, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.86 (s, 2H, cyclopropylH), 0.87 (br s, 2H, cyclopropylH), 1.48 (quintet, *J* = 6.4 Hz, 1H, cyclopropylH), 1.63 (s, 3H, -COCH₃), 1.83 (s, 3H, -NHCOCH₃), 1.97 (s, 3H, -COCH₃), 2.06 (s, 3H, -COCH₃), 2.13 (s, 3H, -COCH₃), 2.19 (brt, *J* = 12.9 Hz, 1H, siaH3ax), 2.20 (s, 3H, -COCH₃), 2.24 (s, 3H, -COCH₃), 2.38 (dd, *J* = 12.9, 4.6 Hz, 1H, siaH3eq), 3.43 (m, 1H, galH3), 3.83 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.89 (dd, *J* = 10.6, 10.1 Hz, 1H, siaH5), 4.02 (m, 2H, glcH6a and siaH6), 4.11 (dd, *J* = 11.5, 6.4 Hz, 1H, glcH6b), 4.17 (dd, *J* = 12.4, 5.5 Hz, 1H, siaH9a), 4.27 (dd, *J* = 12.4, 2.3 Hz, 1H, siaH9b), 4.36 (dd, *J* = 6.9, 6.4 Hz, 1H, galH5), 4.43 (dd, *J* = 46.4, 6.9 Hz, 1H, -CHF-), 4.65 (brd, *J* = 2.5 Hz, 1H, galH4), 4.80 (ddd, *J* = 10.6, 4.6, 1.6 Hz, 1H, siaH4), 5.06 (brd, *J* = 10.1 Hz, 1H, CH₃CONH-), 5.25 (dd, *J* = 10.1, 2.3 Hz, 1H, siaH7), 5.73 (ddd, *J* = 10.1, 5.5, 2.3 Hz, 1H, siaH8), 5.82 (dd, *J* = 8.7, 8.3 Hz, 1H, galH2), 6.32 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, galH1), 7.17 (ddd, *J* = 7.8, 7.4, 1.4 Hz, 1H, alkynylBzH5), 7.32 (ddd, *J* = 7.8, 7.4, 0.9 Hz, 1H, alkynylBzH4), 7.33-7.38 (m, 3H, alkynylBzH3 and BzH), 7.47 (brt, *J* = 7.6 Hz, 1H, BzH), 7.83 (dd, *J* = 7.8, 0.9 Hz, 1H, alkynylBzH6), 7.96 (dd, *J* = 7.4, 1.4 Hz, 1H, BzH); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 9.00 (cyclopropylC), 9.05 (cyclopropylC), 20.60 (NHCOCH₃), 20.85 (-COCH₃), 20.88 (-COCH₃), 20.97 (2C, -COCH₃), 21.55 (-COCH₃), 23.31 (-COCH₃), 33.09 (d, *J* = 7.7 Hz, siaC3), 40.07 (d, *J* = 18.9 Hz, galC3), 49.27 (siaC5), 53.48 (COOCH₃), 61.97 (glcC6), 62.81 (siaC9), 66.90 (d, *J* = 10.6 Hz, galC2), 67.01 (siaC7), 67.75 (siaC8), 68.18 (d, *J* = 3.9 Hz, galC4), 69.74 (siaC4), 72.69 (siaC6), 73.52 (galC5), 74.51 (alkynylBzC), 81.01 (d, *J* = 21.2 Hz, siaC2), 91.01 (d, *J* = 198.4 Hz, CHF), 94.19 (galC1), 100.07 (alkynylBzC), 125.63 (alkynylBzC2), 128.38 (BzC), 129.74 (AlkynylBzC1), 129.92 (2C, BzC), 130.27 (BzC), 130.94 (alkynylBzC6), 132.20 (alkynylBzC4), 133.05 (BzC), 134.33 (alkynylBzC3), 163.38 (alkynylBzCO), 165.37 (-COPh), 169.66 (d, *J* = 7.7 Hz, siaC1), 170.31 (2C, -NHCOMe and -COMe), 170.33 (-COMe), 170.74 (-COMe), 171.05 (-COMe), 171.09 (-COMe).

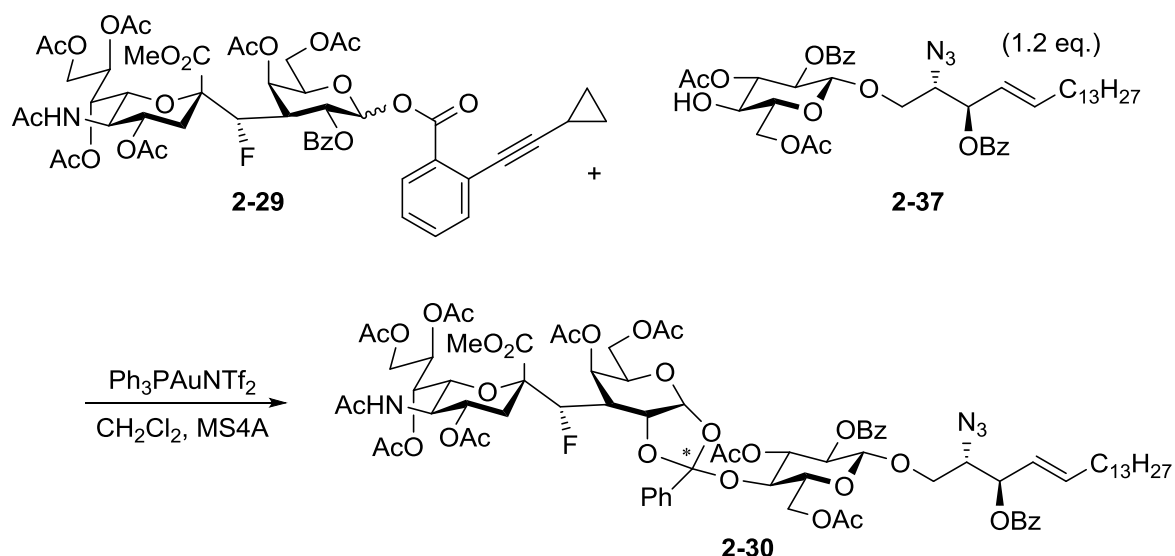
Synthesis of 2-30



To a solution of **2-29** (7.7 mg, 7.0 μmol), **2-19** (7.6 mg, 8.4 μmol), and MS4A in CH_2Cl_2 (100 μL) was added a 0.05 M solution of $\text{Ph}_3\text{PAuNTf}_2$ in CH_2Cl_2 (7 μL , 1.19 μmol) at 0 $^\circ\text{C}$. After stirring for 2 h, the reaction mixture was added triethyl amine at 0 $^\circ\text{C}$. The resulting mixture was filtered through Celite[®] pad. The resulting mixture was diluted with distilled water and extracted with CH_2Cl_2 twice. The combined organic layers were washed with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 and brine. The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **2-30** (4.3 mg, 35%) as a colorless oil.

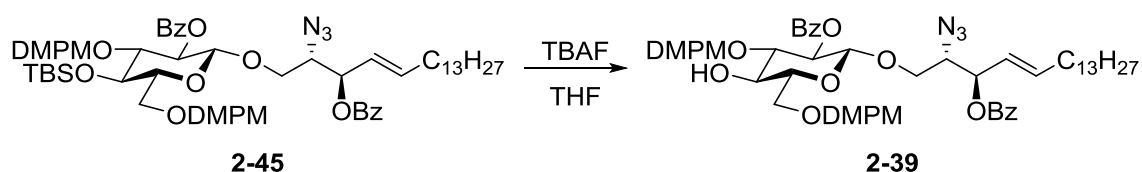
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 3H, sphH18), 1.13-1.33 (m, 22H, sphH7-H17), 1.86 (s, 3H, $-\text{NHCOCH}_3$), 1.87 (m, 2H, sphH6), 1.987 (s, 3H, $-\text{COCH}_3$), 1.993 (s, 3H, $-\text{COCH}_3$), 2.030 (s, 3H, $-\text{COCH}_3$), 2.043 (s, 6H, $-\text{COCH}_3$), 2.08 (s, 3H, $-\text{COCH}_3$), 2.22 (dd, J = 7.1, 3.0 Hz, 1H, siaH3ax), 3.14 (m, 1H, galH3), 3.53-3.62 (m, 2H, siaH5 and sphH1a), 3.71-3.77 (m, 2H, siaH6 and sphH1b), 3.73 (s, 3H, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 3.83-3.95 (m, 4H, sphH2, glcH5, siaH9a, galH6b), 3.98-4.00 (m, 2H, siaH9b, galH6b), 4.12 (t, J = 9.2 Hz, 1H, glcH4), 4.29 (dd, J = 45.5, 7.8 Hz, 1H, $-\text{CHF}-$), 4.43-4.49 (m, 2H, galH2, glcH6a), 4.63 (dd, J = 12.0, 2.8 Hz, 1H, glcH6b), 4.73 (d, J = 7.8 Hz, 1H, glcH1), 4.78 (br s, 1H, galH4), 4.82 (dd, J = 10.8, 4.4 Hz, 1H, siaH4), 4.90-4.98 (m, 1H, siaH8), 5.04 (d, J = 10.1 Hz, 1H, $-\text{CH}_3\text{CONH}-$), 5.15 (d, J = 1.8, 9.2 Hz, 1H, siaH7), 5.36-5.45 (m, 2H, sphH4, glcH2), 5.51 (dd, J = 8.4, 3.6 Hz, 1H, sphH3), 5.64-5.73 (m, 2H, sphH5, glcH3), 5.76 (d, J = 4.6 Hz, 1H, galH1), 7.22-7.25 (m, 5H, BzH), 7.31-7.58 (m, 15H, BzH), 7.90-8.01 (m, 10H, BzH); MALDI-TOF/MS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{90}\text{H}_{107}\text{FN}_4\text{NaO}_{30}$, 1765.685; found, 1765.508.

Synthesis of 2-38



To a solution of **2-29** (7.9 mg, 7.2 μmol), **2-37** (6.8 mg, 8.7 μmol), and MS4A in CH_2Cl_2 (130 μL) was added a 0.05 M solution of $\text{Ph}_3\text{PAuNTf}_2$ in CH_2Cl_2 (14 μL , 0.72 μmol) at 0 $^\circ\text{C}$. After stirring for 4 h, the reaction mixture was allowed to warm to room temperature. After stirring for additional 3 h, the mixture was added triethyl amine at 0 $^\circ\text{C}$. The resulting mixture was filtered through Celite[®] pad and extracted with CH_2Cl_2 twice. The combined organic layers were washed with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 and brine. The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **2-30** (9.5 mg, 81%) as a colorless oil.

Synthesis of 2-39

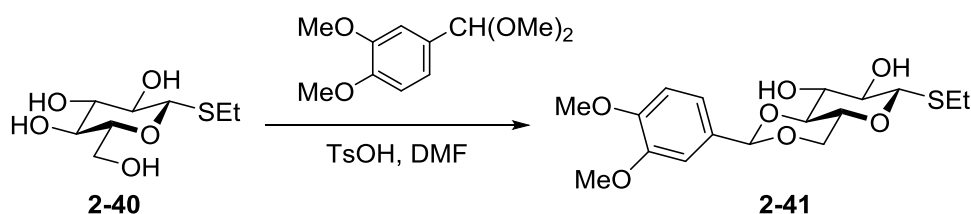


To a solution of **2-45** (37.6 mg, 33.9 μmol) in THF (340 μL) was added a 1 M solution of tetrabutylammonium fluoride in THF (40 μL , 41 μmol) at 0 $^\circ\text{C}$. After stirring for 30 h at room temperature, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **2-39** (32.8 mg, 97%) as a colorless oil.

$[\alpha]_{\text{D}}^{28}$ -13.06 (*c* 1.093, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 3H, sphH18), 1.15-1.33 (m, 22H, sphH7-H17), 1.90 (m, 2H, sphH6), 2.82 (d, J = 2.3 Hz, 1H, -OH), 3.51-3.57 (m, 2H, glcH5, sphH1a), 3.64 (s, 3H, -OCH₃), 3.68 (dd, J = 9.7, 8.5 Hz, 1H, glcH3), 3.73-3.92 (m, 5H, glcH6a, glcH6b, glcH4, sphH1b, sphH2), 3.79 (s, 3H, -OCH₃), 3.87 (s, 3H, -OCH₃), 3.89 (s, 3H,

-OCH₃), 4.48 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, DMPM-CH₂), 4.54 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, DMPM-CH₂), 4.57 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, glcH1), 4.64 (s, 2H, DMPM-CH₂), 5.27 (dd, *J* = 8.5, 7.8 Hz, 1H, glcH2), 5.42 (dd, *J* = 15.2, 7.8 Hz, 1H, sphH4), 5.50 (dd, *J* = 7.8, 3.7 Hz, 1H, sphH3), 5.69 (dt, *J* = 15.2, 6.7 Hz, 1H, sphH5), 6.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, DMPMH), 6.71 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, DMPMH), 6.73 (dd, *J* = 8.0, 1.8 Hz, 1H, DMPMH), 6.81-6.89 (m, 3H, DMPMH), 7.39-7.45 (m, 2H, BzH), 7.55 (m, 1H, BzH), 7.98-8.04 (m, 2H, BzH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 14.27 (sphC18), 22.83 (sphCAlkyl), 28.75 (sphCAlkyl), 29.27 (sphCAlkyl), 29.50 (sphCAlkyl), 29.54 (sphCAlkyl), 29.74 (sphCAlkyl), 29.81 (4C, sphCAlkyl), 32.06 (sphCAlkyl), 32.41 (sphC6), 55.68 (-OCH₃), 55.92 (-OCH₃), 56.02 (-OCH), 56.05 (-OCH), 63.72 (sphC2), 68.01 (sphC1), 70.22 (glcC6), 72.42 (glcC4), 73.17 (glcC2), 73.92 (DMPM-CH₂), 74.33 (glcC5), 74.58 (DMPM-CH₂), 75.06 (sphC3), 82.03 (glcC3), 101.12 (glcC1), 110.79 (DMPMC), 110.09 (DMPMC), 111.24 (DMPMC), 111.32 (DMPMC), 120.56 (DMPMC), 120.66 (DMPMC), 122.63 (sphC4), 128.51 (2C, BzC), 128.56 (2C, BzC), 129.88 (2C, BzC), 129.90 (2C, BzC), 130.13 (DMPMC), 130.13 (BzC), 130.59 (DMPMC), 133.21 (BzC), 133.32 (BzC), 139.04 (sphC5), 148.78 (DMPMC), 148.94 (DMPMC), 149.11 (DMPMC), 149.20 (DMPMC), 165.09 (-COPh), 165.12 (-COPh); IR (cm⁻¹): 2924, 2852, 2101, 1724, 1515, 1461, 1451, 1262, 1068, 1026; HRMS-ESI (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₅₆H₇₃N₃NaO₁₃, 1018.5041; found 1018.5031.

Synthesis of 2-41



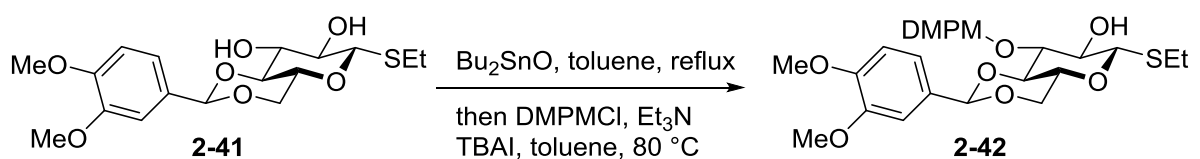
To a solution of **2-40** (2.819 g, 12.57 mmol) in DMF (25 ml) was added veratraldehyde dimethylacetal¹ (3.201 g, 15.08 mmol) and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (239 mg, 1.26 mmol). The reaction mixture was stirred for 18 h and veratraldehyde dimethylacetal (488.1 mg, 2.300 mmol) was added furthermore. After stirring for 22 h, a saturated aqueous solution of NaHCO₃ was added to the reaction mixture. The resulting mixture was extracted with CHCl₃ twice. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **2-41** (1.732 g, 37%) as a white amorphous solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.33 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H, CH₃), 2.60 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, -OH),

¹ Napolitano, E.; Giannone, E. R.; Fiaschi, A.; Marsili, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3653.

2.73-2.80 (m, 3H, CH_2CH_3 , -OH), 3.49-3.60 (m, 3H, glcH2, glcH4, and glcH5), 3.76 (t, $J = 9.9$ Hz, 1H, glcH6a), 3.85 (dd, $J = 8.7, 2.1$ Hz, 1H, glcH3), 3.88 (s, 3H, -OCH₃), 3.91 (s, 3H, -OCH₃), 4.35 (dd, $J = 10.6, 4.6$ Hz, 1H, glcH6b), 4.48 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, glcH1), 5.50 (s, 1H, -CHAr), 6.85 (br d, $J = 8.7$ Hz, 1H, ArH), 7.01-7.05 (m, 2H, ArH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 15.26, 24.69, 55.94 (2C), 68.55, 70.45, 73.27, 74.49, 80.33, 86.42, 101.89, 109.27, 110.74, 119.10, 129.68, 148.84, 149.68.

Synthesis of 2-42



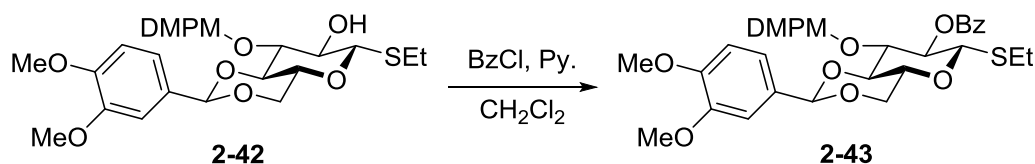
To a solution of **2-41** (134.6 g, 0.3617 mmol) in toluene (14.5 ml) was added dibutyltin oxide (117.1 mg, 0.4704 mmol). After refluxing for 20 h in toluene, the reaction mixture was cooled to room temperature and concentrated *in vacuo*. To a resulting mixture were added toluene (11 ml), triethylamine (190 μ l, 1.09 mmol), DMPMCl² (202.7 mg, 1.086 mmol), and cesium fluoride (55.0 mg, 0.362 mmol) at room temperature. After stirring for 3 h at 40 °C, the reaction mixture was stirred for 17.5 h at 60 °C. The reaction mixture was heated to 80 °C and stirred for 14.5 h. To the mixture was added cesium fluoride (42.6 mg, 0.280 mmol) furthermore at room temperature. After stirring for 9 h at 80 °C, an additional cesium fluoride (40.6 mg, 0.267 mmol) was added at room temperature. After stirring for 4 h at 80 °C, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The resulting residue was purified by silica gel column chromatography to give **2-42** (151.6 mg) including a small amount of impurity. Further purification was carried out by gel permeation chromatography (LC-918, Japan Analytical Industry Co.) to give **2-42** (103.8 mg, 55%) as a white amorphous solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.32 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, CH₃), 2.50 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, -OH), 2.75 (qd, $J = 7.5, 2.8$ Hz, 2H, -CH₂CH₃), 3.50 (m, 1H, glcH4), 3.57 (m, 1H, glcH2), 3.64-3.73 (m, 2H, glcH3 and glcH5), 3.76 (s, 3H, -OCH₃), 3.77 (t, $J = 10.6$ Hz, 1H, glcH6a), 3.86 (s, 3H, -OCH₃), 3.88 (s, 3H, -OCH₃), 3.89 (s, 3H, -OCH₃), 4.35 (dd, $J = 10.6, 5.1$ Hz, 1H, glcH6b), 4.46 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, glcH1), 4.77 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, DMPM-CH₂), 4.90 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, DMPM-CH₂), 5.54 (s, 1H, -CHAr), 6.80 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, ArH), 6.85-6.93 (m, 3H, ArH), 7.03-7.06 (m, 2H, ArH); ¹³C NMR

² O'Byrne, A.; Murray, C.; Keegan, D.; Palacio, C.; Evans, P.; Morgan, B. S. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 539.

(100 MHz, CDCl₃) δ 15.12 (CH₃), 24.40 (-CH₂CH₃), 55.53 (OCH₃), 55.70 (OCH₃), 55.75 (OCH₃), 55.80 (OCH₃), 68.46 (glcC6), 70.53 (glcC4), 72.87 (glcC2), 74.35 (DMPM-CH₂), 80.95 (glcC3), 81.04 (glcC5), 86.50 (glcC1), 101.17 (-CHAr), 108.99 (ArC), 110.55 (ArC), 110.74 (ArC), 111.23 (ArC), 118.54 (ArC), 120.41 (ArC), 129.89 (ArC), 130.68 (ArC), 148.56 (ArC-OCH₃), 148.62 (ArC-OCH₃), 148.88 (ArC-OCH₃), 149.34 (ArC-OCH₃).

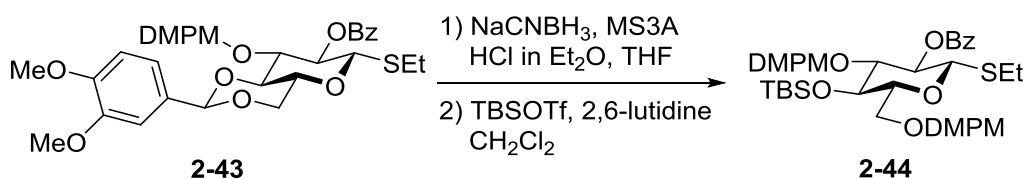
Synthesis of 2-43



To a solution of **2-42** (1.074 g, 2.055 mmol) in CH₂Cl₂ (5.7 ml) was added pyridine (11.4 ml, 141.2 mmol). Benzoyl chloride (715 μ l, 6.17 mmol) was added at 0 °C. After stirring for 18.5 h at room temperature, a saturated aqueous solution of NaHCO₃ was added to the reaction mixture at 0 °C. The resulting mixture was extracted with CH₂Cl₂ twice. The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give α -ketoamide **2-43** (1.286 g, quant.) as a white amorphous solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.22 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH₃), 2.72 (qd, *J* = 7.5, 2.8 Hz, 2H, -CH₂CH₃), 3.44 (s, 3H, -OCH₃), 3.58 (m, 1H, glcH5), 3.75-3.88 (m, 2H, glcH4 and glcH6a), 3.78 (s, 3H, -OCH₃), 3.895 (s, 3H, -OCH₃), 3.902 (s, 3H, -OCH₃), 3.92 (m, 1H, glcH3), 4.41 (dd, *J* = 10.7, 5.0 Hz, 1H, glcH6b), 4.62 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, DMPM-CH₂), 4.63 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, glcH1), 4.77 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, DMPM-CH₂), 5.32 (dd, *J* = 10.1, 8.7 Hz, 1H, glcH2), 5.58 (s, 1H, -CHAr), 6.59 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, DMPMH), 6.63 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, DMPMH), 6.67 (dd, *J* = 8.0, 1.8 Hz, 1H, DMPMH), 6.89 (br d, *J* = 8.7 Hz, 1H, ArH), 7.06-7.09 (m, 2H, ArH), 7.44 (m, 2H, BzH), 7.59 (m, 1H, BzH), 7.97 (m, 2H, BzH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 14.92 (CH₃), 24.18 (-CH₂CH₃), 55.40 (OCH₃), 55.88 (OCH₃), 55.97 (OCH₃), 56.07 (OCH₃), 68.74 (glcC6), 70.86 (glcC5), 72.01 (glcC2), 74.37 (DMPM-CH₂), 79.16 (glcC3), 81.71 (glcC4), 84.44 (glcC1), 101.40 (-CHAr), 109.16 (ArC), 110.53 (ArC), 110.82 (ArC), 111.33 (ArC), 118.75 (ArC), 120.63 (ArC), 128.55 (BzC), 129.74, 129.92 (BzC), 130.06 (ArC), 130.35 (ArC), 133.41 (BzC), 148.66 (ArC-OCH₃), 148.91 (ArC-OCH₃), 148.97 (ArC-OCH₃), 149.64 (ArC-OCH₃), 165.22 (-COPh); MALDI-TOF/MS (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₃₃H₃₈NaO₁₀S, 649.208; found, 649.380.

Synthesis of 2-44

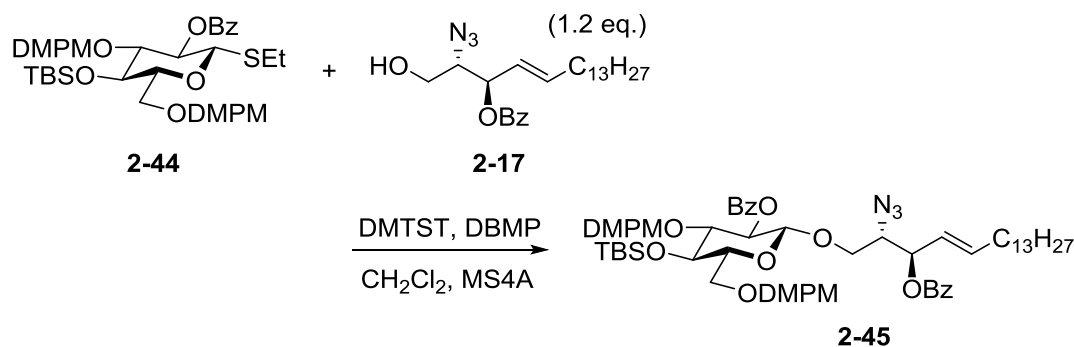


To a solution of **2-43** (1.286 g, 2.052 mmol) in THF (39 ml) was added molecular sieves 3Å. Sodium cyanoborohydride (1.289 g, 20.52 mmol) and a 2.0 M solution of HCl in Et₂O (16 ml, 16 mmol) were added at 0 °C. After stirring for 45 min at same temperature, a saturated aqueous solution of NaHCO₃ was added. The resulting mixture was filtered through Celite[®] and extracted with EtOAc twice. The combined organic layers were washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ and brine. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give secondary alcohol (1.961 g) as a colorless oil. To a solution of secondary alcohol in CH₂Cl₂ (21 ml) was added 2,6-lutidine (960 µL, 8.21 mmol). After stirring for 15 min, *tert*-butyldimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (940 µl, 4.10 mmol) was added at 0 °C. The mixture was stirred for 9 h at room temperature before quenching with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ at 0 °C. The resulting mixture was extracted with CH₂Cl₂ twice. The combined organic layers were washed with a 0.6 M aqueous solution of HCl, and brine. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **2-44** (966 mg, 63% in 2 steps) as a white amorphous solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.02 (s, 3H, SiCH₃), 0.03 (s, 3H, SiCH₃), 0.87 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 1.22 (t, *J* = 7.8 Hz, 3H, CH₃), 2.71 (m, 2H, -CH₂CH₃), 3.50-3.61 (m, 2H, glcH5 and glcH6a), 3.62-3.79 (m, 3H, glcH3, glcH4 and glcH6b), 3.66 (s, 3H, -OCH₃), 3.76 (s, 3H, -OCH₃), 3.87 (s, 3H, -OCH₃), 3.89 (s, 3H, -OCH₃), 4.46 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, DMPM-CH₂), 4.53-4.58 (m, 2H, glcH1 and -CH₂DMPM), 4.61 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, DMPM-CH₂), 4.62 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, DMPM-CH₂), 5.31 (dd, *J* = 9.7, 8.7 Hz, 1H, glcH2), 6.57-6.66 (m, 3H, DMPMH), 6.82 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, DMPMH), 6.87 (dd, *J* = 8.3, 1.8 Hz, 1H, DMPMH), 6.92 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, DMPMH), 7.40 (m, 2H, BzH), 7.53 (m, 1H, BzH), 7.97 (m, 2H, BzH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ -4.61 (SiCH₃), -3.54 (SiCH₃), 15.02 (CH₃), 18.09 (SiC(CH₃)₃), 24.03 (-CH₂CH₃), 26.04 (3C, SiC(CH₃)₃), 55.57 (OCH₃), 55.79 (OCH₃), 55.93 (OCH₃), 56.03 (OCH₃), 69.13 (glcC6), 71.20 (glcC4), 72.91 (glcC2), 73.41 (DMPM-CH₂), 75.33 (DMPM-CH₂), 81.05 (glcC5), 83.62 (glcC1), 84.83 (glcC3), 110.36 (DMPMC), 110.92 (DMPMC), 111.00 (DMPMC), 111.06 (DMPMC), 119.92 (DMPMC), 120.25 (DMPMC), 128.48 (2C, BzC), 129.79 (3C, BzC), 130.58 (DMPMC), 130.96 (DMPMC), 133.29 (DMPMC),

148.31 (DMPMC-OCH₃), 148.62 (DMPMC-OCH₃), 148.78 (DMPMC-OCH₃), 149.12 (DMPMC-OCH₃), 165.39 (-COPh).

Synthesis of 2-45

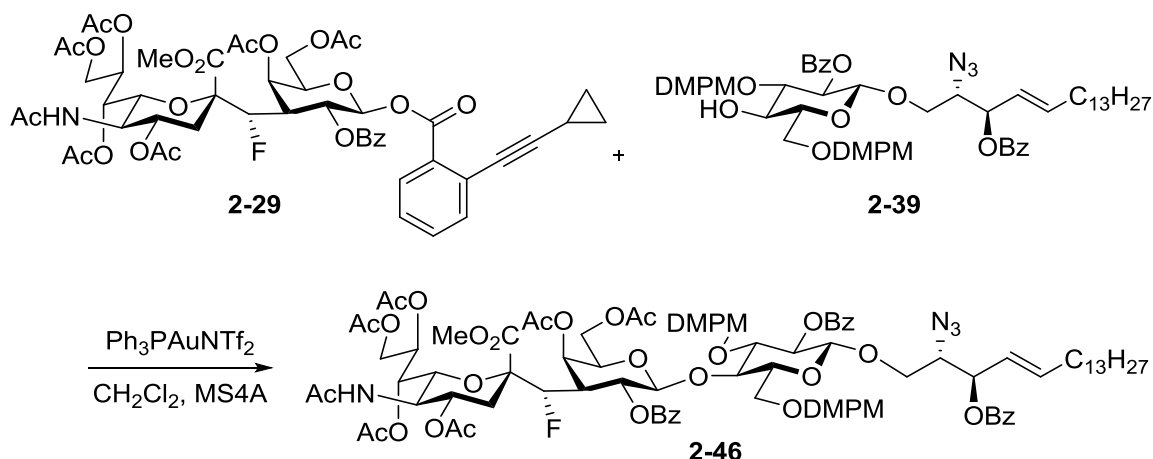


To a solution of **2-44** (77.7 mg, 0.105 mmol), **2-17** (50.0 mg, 0.116 mmol), 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylpyridine (107.8 mg, 0.525 mmol), and MS4A in CH₂Cl₂ (525 μL) was added a 0.65 M solution of DMTST in CH₂Cl₂ (646 μL, 0.420 mmol: prepared from TfOMe (85 μL) and dimethyldisulfide (68 μL) in CH₂Cl₂ (1 ml)) at -40 °C. After stirring for 2 h, further stirring was performed at 0 °C for 12 h. The reaction mixture was added triethyl amine (100 μL) at 0 °C, then diluted with CH₂Cl₂. After filtration through Celite®, a saturated aqueous solution of NaHCO₃ was added to the filtrate. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ twice. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The resulting mixture was purified by silica gel column chromatography to give **2-45** (79.1 mg). Further purification was carried out by MPLC (column: ULTRA PACK, Silica-40A, 11×300 mm) to give **2-45** (57.0 mg, 49%) as a colorless oil.

$[\alpha]_D^{28}$ 8.90 (*c* 1.12, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ -0.01 (s, 3H, -TBSH), 0.02 (s, 3H, -TBSH), 0.84 (s, 9H, -TBSH), 0.87 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, sphH18), 1.14-1.31 (m, 22H, sphH7-H17), 1.88 (m, 2H, sphH6), 3.48-3.58 (m, 3H, glcH5, glcH6 and sphH1), 3.61-3.67 (m, 4H, glcH3 and gal3-O-DMPM-3-OCH₃), 3.69-3.76 (m, 5H, glcH4, glcH6 and gal3-O-DMPM-OCH₃), 3.85 (s, 3H, gal3-O-DMPM-3-OCH₃), 3.85 (s, 3H, gal6-O-DMPM-OCH₃), 3.86 (s, 3H, gal6-O-DMPM-OCH₃), 3.86-3.95 (m, 2H, sphH1 and sphH2), 4.42 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, DMPM-CH₂), 4.53-4.62 (m, 3H, glcH1, DMPM-CH₂), 5.30 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, glcH2), 5.30 (dd, *J* = 15.2, 8.0 Hz, 1H, sphH4), 5.51 (dd, *J* = 8.0, 3.5 Hz, 1H, sphH3), 5.66 (dt, *J* = 15.2, 6.7 Hz, 1H, sphH5), 6.62 (m, 3H, gal3-DMPMH), 6.83 (m, 3H, gal6-DMPMH), 7.38 (m, 2H, BzH), 7.40 (m, 2H, BzH), 7.51 (m, 1H, BzH), 7.53 (m, 1H, BzH), 7.97 (brd, *J* = 8.3 Hz, 2H, BzH), 8.00 (brd, *J* = 8.3 Hz, 2H, BzH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ -4.65 (-OSiCH₃), -3.59 (-OSiCH₃), 14.24 (sphC18), 18.07 (-OSiC(CH₃)),

22.79 (sphCAkyl), 26.00 (3C, -OSiC(CH₃)), 28.71 (sphCAkyl), 29.23 (sphCAkyl), 29.46 (sphCAkyl), 29.50 (sphCAkyl), 29.70 (sphCAkyl), 29.76 (sphCAkyl), 29.79 (sphCAkyl), 32.02 (sphCAkyl), 32.38 (sphC6), 55.56 (gal3-DMPM-OCH₃), 55.77 (gal3-DMPM-OCH₃), 55.88 (gal6-DMPM-OCH), 55.99 (gal6-DMPM-OCH), 63.73 (sphC2), 67.73 (sphC1), 69.05 (glcC6), 71.12 (glcC4), 73.52 (gal6-DMPM-CH₂), 73.91 (glcC2), 75.05 (gal3-DMPM-CH₂), 75.12 (sphC3), 77.01 (glcC5), 83.25 (glcC3), 100.94 (glcC1), 110.35 (gal3-DMPM5C), 110.94 (gal6-DMPM5C), 110.99 (gal6-DMPM2C), 111.08 (gal3-DMPM2C), 119.92 (gal3-DMPM6C), 120.28 (gal6-DMPM6C), 122.55 (sphC4), 128.46 (2C, BzC), 129.78 (BzC), 129.83 (BzC), 130.10 (gal3-DMPM1C), 130.52 (gal6-DMPM1C), 130.78 (2C, BzC), 133.13 (BzC), 133.23 (BzC), 138.97 (sphC5), 148.33 (gal3-DMPMC), 148.64 (gal6-DMPMC), 148.79 (gal3-DMPMC), 149.06 (gal6-DMPMC), 165.04 (-COPh), 165.08 (-COPh); IR (cm⁻¹): 2926, 2854, 2105, 1727, 1593, 1516, 1464, 1452, 1419, 1359, 1316, 1264, 1158, 1139, 1095, 1070, 1028; HRMS-ESI (*m/z*): [M+NH₄]⁺ calcd for, C₆₂H₉₁N₄O₁₃Si, 1127.6351; found 1127.6327.

Synthesis of 2-46



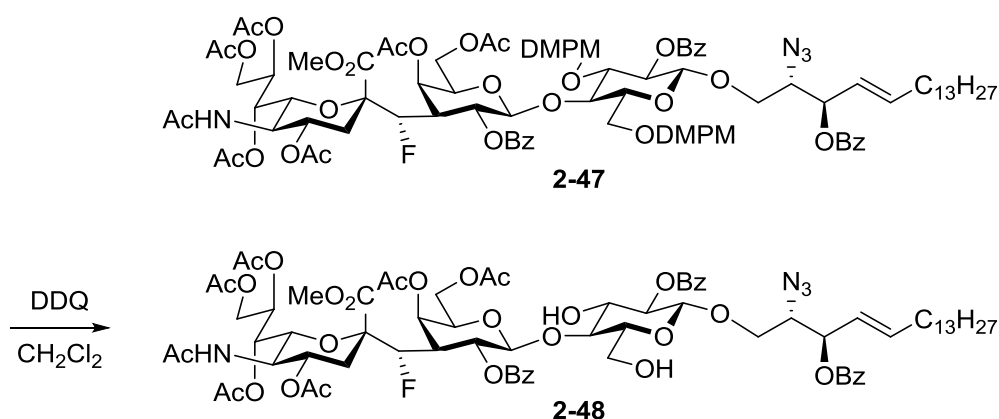
To a solution of **2-29** (13.0 mg, 11.9 μmol), **2-39** (16.4 mg, 16.5 μmol), and MS4A in CH₂Cl₂ (214 μL) was added a 0.05 M solution of Ph₃PAuNTf₂ in CH₂Cl₂ (24 μL , 1.19 μmol) at 0 °C. After stirring for 1 h, the reaction mixture was allowed to room temperature. The reaction mixture was added triethyl amine (50 μL) at 0 °C, and diluted with CH₂Cl₂. The resulting mixture was filtered through Celite® and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **2-46** (19.7 mg, 90% (calculated based on donor)) as a colorless oil.

[α]_D²⁷ 13.6 (*c* 0.985, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.87 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, sphH18), 1.03-1.37 (m, 22H, sphH7-H17), 1.65 (s, 3H, -NHCOCH₃), 1.82 (m, 2H, sphH6), 1.84 (s, 3H, -COCH₃), 1.967 (s, 3H, -COCH₃), 1.972 (s, 3H, -COCH₃), 2.02 (s, 3H, -COCH₃), 2.08 (s, 3H, -COCH₃), 2.18 (s, 3H, -COCH₃), 2.18 (m, 1H, siaH3ax), 2.37 (dd, *J* = 13.1, 4.6 Hz, 1H, siaH3eq),

3.22 (br dd, $J = 9.7, 9.2$ Hz, 1H, galH3), 3.33 (ddd, $J = 9.5, 5.1, 1.8$ Hz, 1H, glcH5), 3.38 (dd, $J = 10.1, 6.0$ Hz, 1H, sphH1a), 3.54 (s, 3H, gal3-O-DMPM-OCH₃), 3.58 (dd, $J = 11.3, 5.1$ Hz, 1H, glcH6a), 3.64 (dd, $J = 11.3, 1.8$ Hz, 1H, glcH6b), 3.73 (dd, $J = 10.1, 6.9$ Hz, 1H, sphH1b), 3.74-3.78 (m, 1H, glcH3), 3.76 (s, 3H, gal3-DMPM-OCH₃), 3.80 (s, 3H, -CO₂CH₃), 3.83 (br dd, $J = 6.0, 1.8$ Hz, 1H, sphH2), 3.84 (s, 3H, gal6-DMPM-OCH₃), 3.85 (s, 3H, gal6-DMPM-OCH₃), 3.83-3.86 (m, 1H, galH6), 3.90 (t, $J = 10.6$ Hz, 1H, siaH5), 3.95-4.08 (m, 2H, galH6b and siaH6), 4.05 (dd, $J = 6.9, 6.4$ Hz, 1H, galH5), 4.14 (dd, $J = 9.5, 8.7$ Hz, 1H, glcH4), 4.17 (dd, $J = 12.7, 5.5$ Hz, 1H, siaH9a), 4.17 (dd, $J = 12.7, 2.3$ Hz, 1H, siaH9b), 4.33 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, gal6-DMPM-CH₂), 4.38 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, glc1H), 4.36 (m, 1H, -CHF-), 4.43 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, gal6-DMPM-CH₂), 4.55 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, gal4H), 4.60 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, gal3-DMPM-CH₂), 4.78 (brdt, $J = 4.6, 10.6$ Hz, 1H, siaH4), 4.87 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, gal3-DMPM-CH₂), 5.08-5.12 (m, 1H, -CH₃CONH-), 5.10 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, galH1), 5.15 (dd, $J = 8.3, 7.8$ Hz, 1H, galH2), 5.27 (dd, $J = 10.1, 2.3$ Hz, 1H, siaH7), 5.34 (dd, $J = 15.2, 7.8$ Hz, 1H, sphH4), 5.42 (dd, $J = 7.8, 3.9$ Hz, 1H, sphH3), 5.58 (dt, $J = 15.2, 6.9$ Hz, 1H, sphH5), 5.56-5.61 (m, 1H, galH2), 5.74 (ddd, $J = 10.1, 5.5, 2.3$ Hz, 1H, siaH8), 6.57 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, gal3-DMPMH), 6.64 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, gal3-DMPMH), 6.78 (dd, $J = 8.1, 1.8$ Hz, 1H, gal3-DMPMH), 6.77 (m, 2H, gal6-DMPMH and gal6-DMPMH), 6.84 (dd, $J = 8.3, 1.8$ Hz, 1H, gal6-DMPMH), 7.365 (dd, $J = 8.1, 7.4$ Hz, 2H, BzH), 7.370 (dd, $J = 8.1, 7.4$ Hz, 2H, BzH), 7.46 (dd, $J = 8.1, 7.4$ Hz, 2H, BzH), 7.49-7.58 (m, 3H, BzH), 7.88 (brd, $J = 8.1$ Hz, 2H, BzH), 7.95 (brd, $J = 8.1$ Hz, 2H, BzH), 8.13 (brd, $J = 8.1$ Hz, 2H, BzH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 14.27 (sphC18), 20.66 (COCH₃), 20.72 (COCH₃), 20.78 (COCH₃), 20.86 (COCH₃), 20.96 (COCH₃), 21.44 (COCH₃), 22.83 (sphCAlkyl), 23.31 (NHCOCH₃), 28.69 (sphCAlkyl), 29.24 (sphCAlkyl), 29.69 (sphCAlkyl), 29.79 (sphCAlkyl), 32.05 (sphCAlkyl), 32.36 (sphC6), 33.16 (d, $J = 7.7$ Hz, siaC3), 39.97 (d, $J = 18.3$ Hz, galC3), 49.23 (siaC5), 53.49 (COOCH₃), 55.57 (gal3-DMPM-3OCH₃), 55.84 (gal3-DMPM-4OCH₃), 56.00 (gal6-DMPM-3OCH₃ and gal6-DMPM-4OCH₃), 61.85 (galC6), 62.45 (siaC9), 63.58 (sphC2), 67.00 (siaC7), 67.42 (siaC8), 67.88 (sphC1), 68.18 (d, $J = 3.9$ Hz, galC4), 68.40 (glcC6), 68.42 (d, $J = 8.7$ Hz, galC2), 69.74 (siaC4), 72.66 (siaC6 and galC5), 72.95 (siaC5 and gal6-DMPM-CH₂), 74.21 (gal3-DMPM-CH₂), 75.11 (sphC3), 75.19 (glcC5), 75.80 (glcC4), 80.02 (glcC3), 80.99 (d, $J = 21.2$ Hz, siaC2), 91.06 (d, $J = 198.4$ Hz, CHF), 100.89 (glcC1), 101.33 (galC1), 110.55 (gal3-DMPM5C), 110.97 (2C, gal6-DMPM2C and gal6-DMPM5C), 111.44 (gal3-DMPM2C), 119.94 (gal6-DMPM6C), 120.50 (gal3-DMPM6C), 122.41 (sphC4), 128.38 (BzC), 128.47 (BzC), 128.58 (BzC), 129.83 (2C, BzC), 129.90 (BzC), 130.05 (BzC), 130.45 (BzC), 131.04 (gal6-DMPM1C), 131.21 (gal3-DMPM1C), 133.11 (BzC), 133.15 (BzC), 133.23 (BzC), 139.00 (sphC5), 148.33 (DMPMC), 148.50 (gal3-DMPMC4), 148.77 (DMPMC), 148.92 (gal3-DMPMC3),

165.00 (-COPh), 165.05 (2C, -COPh), 169.62 (d, $J = 7.7$ Hz, siaC1), 170.31-170.424 (4C, -COMe and -NHCOMe), 170.62 (-COMe), 170.93 (-COMe), 171.12 (-COMe).; ^{19}F NMR (377 MHz, CHCl_3) δ -203.06 (d, $J = 46.1$ Hz, -CHF-); IR (cm^{-1}): 3727, 3702, 3627, 3599, 3367, 2927, 2854, 2104, 1742, 1687, 1666, 1602, 1517, 1452, 1419, 1370, 1317, 1266, 1238, 1176, 1156, 1139, 1110, 1093, 1070, 1036, 971, 946; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ calcd for $\text{C}_{94}\text{H}_{123}\text{FN}_5\text{O}_{32}$, 1852.8135; found 1852.8116.

Synthesis of 2-48

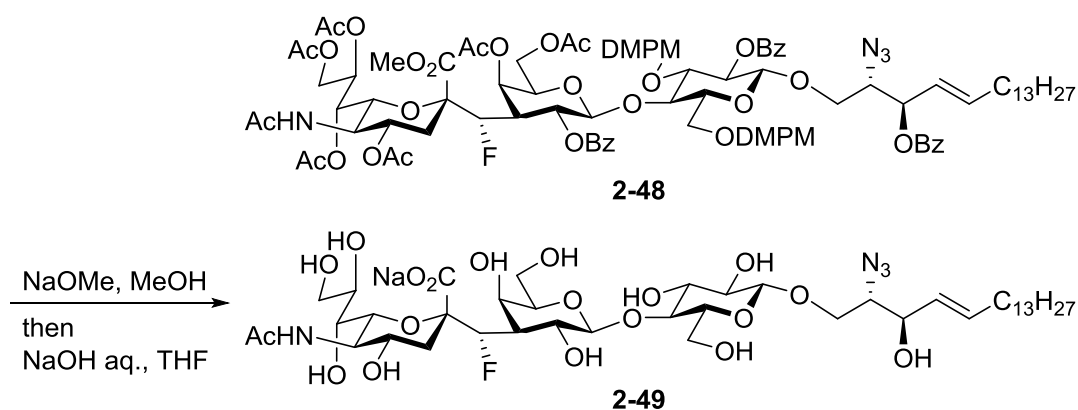


To a solution of **2-47** (13.3 mg, 7.24 μmol) in CH_2Cl_2 (360 μL) and pH 7.0 phosphate buffer (0.1 M, 72 μL) was added a 0.05 M CH_2Cl_2 solution of DDQ (360 μL , 18.1 μmol) at 0 °C. After stirring for 2 h at room temperature, the reaction mixture was diluted with CH_2Cl_2 and a saturated aqueous solution of NaHCO_3 at 0 °C. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with CHCl_3 twice. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by silica gel column chromatography to give **2-48** (9.7 mg, 90%) as a white amorphous solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{26}$ 8.19 (c 0.485, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, sphH18), 1.13-1.32 (m, 22H, sphH7-H17), 1.73 (s, 3H, -COCH₃), 1.84 (s, 3H, -NHCOCH₃), 1.90 (m, 2H, sphH6), 1.95 (s, 3H, -COCH₃), 1.97 (s, 3H, -COCH₃), 2.09-2.18 (m, 1H, siaH3ax), 2.13 (s, 3H, -COCH₃), 2.16 (s, 3H, -COCH₃), 2.22 (s, 3H, -COCH₃), 2.34 (dd, $J = 13.1, 4.1$ Hz, 1H, siaH3eq), 2.84 (brt, $J = 5.5$ Hz, 1H, glc6-OH), 3.24-3.42 (m, 4H, galH3, glcH5 and sphH6), 3.52 (dd, $J = 10.6, 6.2$ Hz, 1H, sphH1a), 3.75 (dd, $J = 10.6, 6.9$ Hz, 1H, sphH1b), 3.79 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.81-3.95 (m, 5H, glcH3, glcH4, galH6a, siaH5 and sphH2), 3.97-4.07 (m, 3H, galH6b, siaH6 and siaH9a), 4.24 (dd, $J = 8.7, 4.1$ Hz, 1H, galH5), 4.36 (dd, $J = 46.4, 7.4$ Hz, 1H, -CHF-), 4.38 (s, 1H, gal3-OH), 4.46 (brs, 1H, gal4H), 4.48 (dd, $J = 12.4, 2.8$ Hz, 1H, siaH9b), 4.51 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, glcH1), 4.74 (brdt, $J = 4.1, 10.6$ Hz, 1H, siaH4), 4.98 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, galH1), 5.07 (brd, $J = 10.1$ Hz, 1H, -CH₃CONH-), 5.14-5.20 (m, 2H, glcH2 and siaH7), 5.42 (dd, $J = 15.2, 8.3$ Hz, 1H, sphH4), 5.54 (dd,

$J = 8.3, 4.1$ Hz, 1H, sphH3), 5.59 (dd, $J = 11.3, 7.8$ Hz, 1H, galH2), 5.73 (dt, $J = 15.2, 6.9$ Hz, 1H, sphH5), 5.84 (ddd, $J = 10.1, 5.5, 2.3$ Hz, 1H, siaH8), 7.37-7.43 (m, 4H, BzH), 7.44-7.60 (m, 5H, BzH), 7.98 (dd, $J = 8.3, 1.4$ Hz, 2H, BzH), 8.04 (dd, $J = 8.3, 1.4$ Hz, 2H, BzH), 8.04 (dd, $J = 8.3, 1.4$ Hz, 2H, BzH), 8.20 (dd, $J = 8.1, 7.4$ Hz, 2H, BzH); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 14.27 (sphC18), 20.54 (COCH_3), 20.77 (COCH_3), 20.88 (COCH_3), 20.95 (COCH_3), 21.02 (COCH_3), 21.54 (COCH_3), 22.83 (sphCalkyl), 23.27 (NHCOCH_3), 28.73 (sphCalkyl), 29.25 (sphCalkyl), 29.49 (sphCalkyl), 29.70 (sphCalkyl), 29.79 (sphCalkyl), 29.82 (sphCalkyl), 32.06 (sphCalkyl), 32.42 (sphC6), 33.18 (d, $J = 8.1$ Hz, siaC3), 39.82 (d, $J = 18.9$ Hz, galC3), 49.07 (siaC5), 53.65 (COOCH_3), 59.93 (glcC6), 62.34 (galC6), 63.53 (sphC2), 63.85 (siaC9), 66.95 (siaC8), 67.56 (d, $J = 8.1$ Hz, galC2), 67.72 (siaC7), 68.07 (d, $J = 3.4$ Hz, galC4), 68.32 (sphC1), 69.67 (siaC4), 72.62 (siaC6), 73.17 (galC5), 73.41 (glcC2), 73.49 (glcC4), 74.70 (glcC5), 75.14 (sphC3), 80.28 (glcC3), 80.96 (d, $J = 21.0$ Hz, siaC2), 90.96 (d, $J = 198.2$ Hz, CHF), 100.96 (glcC1), 102.78 (galC1), 122.40 (sphC4), 128.39 (BzC), 128.51 (2C, BzC), 129.87 (2C, BzC), 129.94 (BzC), 130.01 (BzC), 130.18 (BzC), 130.31 (BzC), 133.05 (BzC), 133.25 (BzC), 133.34 (BzC), 139.10 (sphC5), 165.17 ($-\text{COPh}$), 165.32 (2C, $-\text{COPh}$), 169.67 (d, $J = 7.4$ Hz, siaC1), 170.31 ($-\text{NHCOMe}$), 170.62 ($-\text{COMe}$), 170.75 (2C, $-\text{COMe}$), 170.82 ($-\text{COMe}$), 171.15 ($-\text{COMe}$), 172.16 ($-\text{COMe}$); ^{19}F NMR (377 MHz, CHCl_3) $-\text{203.06}$ (d, $J = 46.1$ Hz, $-\text{CHF}-$); IR (cm^{-1}): 3485, 2925, 2855, 2106, 1741, 1686, 1670, 1602, 1541, 1451, 1371, 1316, 1267, 1226, 1176, 1110, 1070, 1038, 974, 945; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{76}\text{H}_{99}\text{FN}_4\text{NaO}_{28}$, 1557.6328; found 1557.6317.

Synthesis of 2-49

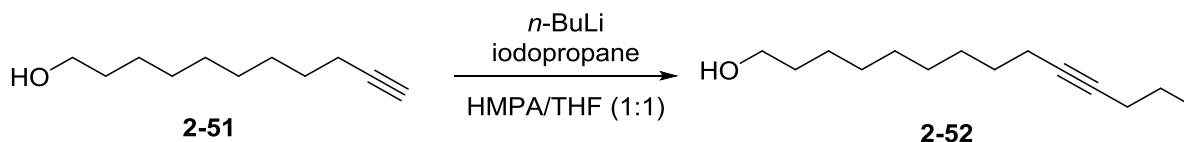


To a solution of **2-48** (9.6 mg, 6.4 μmol) in MeOH (205 μl) was added sodium methoxide (1.4 mg, 25.7 μmol). After stirring for 1 h, THF (100 μl) and a 1N aqueous solution of NaOH (100 μl) were added. The mixture was stirred for 60 h and a 1N aqueous solution of NaOH (100 μl) was added. The reaction was stirred for 8 h, the mixture was concentrated *in vacuo*. The resulting mixture was purified by gel filtration (Sephadex LH-20, eluent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 20/10/1$). Further

purification was carried out by Iatro beads column chromatography (6RS-8060, eluent: CHCl₃/MeOH/H₂O = 65/65/8) to give **2-49** (3.0 mg, 56%).

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 0.90 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, sphH18), 1.26-1.37 (m, 22H, sphH7-H17), 1.41 (m, 2H, sphH7), 1.99 (m, 1H, siaH3ax), 2.01 (s, 3H, -NHCOCH₃), 2.07 (m, 1H, sphH6), 2.51 (tt, *J* = 11.2, 2.9 Hz, 2H, galH3), 2.68 (dd, *J* = 12.6, 4.6 Hz, 1H, siaH3eq), 3.28 (m, 1H, glcH2), 3.41-3.45 (m, 2H, glcH3), 3.50-3.83 (m, 13H, glcH5, glcH4, sphH2, siaH4, galH2, and galH4), 3.86-3.98 (m, 4H), 4.02 (m, 1H), 4.18 (dd, *J* = 7.5, 5.2 Hz, 1H, sphH3), 4.32 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, glcH1), 4.47 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, galH1), 4.84 (m, overlapped with solvent signal, 1H, -CHF-), 5.51 (dd, *J* = 15.5, 7.5 Hz, 1H, sphH4), 5.77 (dt, *J* = 15.5, 6.6 Hz, 1H, sphH5); MALDI-TOF/MS (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₄₂H₇₃FN₄NaO₁₉, 979.475; found, 979.636.

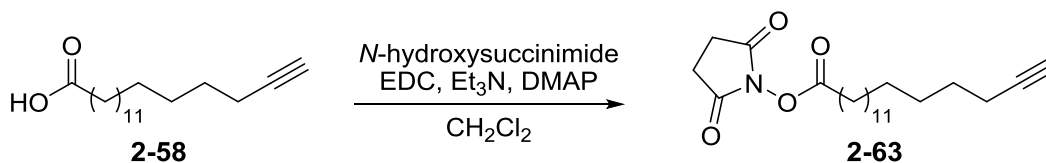
Synthesis of 2-52



To a solution of **2-51** (324.9 mg, 1.931 mmol) in THF (3.2 ml) and HMPA (3.2 ml) was added a 1.6 M solution of *n*-butyllithium (2.41 ml, 3.86 mmol) at -40 °C. After stirring for 10 min, iodopropane (282 μl, 2.90 mmol) was added. After stirring for 10 min, an additional 1.6 M solution of *n*-butyllithium (1.20 ml, 1.92 mmol) was added and stirred for 20 min at the same temperature. The reaction mixture was warmed to 0 °C and stirred for 20 min. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 1.5 h. To the reaction mixture was added *n*-butyllithium (1.21 ml, 1.94 mmol) at -40 °C. After stirring for 10 min, iodopropane (94 μl, 0.96 mmol) was added and the reaction mixture was allowed to warm to room temperature. After stirring for 6 h, distilled water was added. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with Et₂O twice. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **2-52** (183.8 mg, 45%) as a colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.96 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃), 1.20-1.41 (m, 10H, alkyl-CH₂), 1.42-4.61 (m, 6H, CH₂CH₂OH, homopropargyl-CH₂), 2.09-2.17 (m, 4H, propargyl-CH₂), 3.64 (br t, *J* = 6.4 Hz, CH₂OH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 13.56 (CH₃), 18.83 (propargylC), 20.86 (propargylC), 22.65 (CAalkyl), 25.83 (CAalkyl), 28.92 (CAalkyl), 29.18 (CAalkyl), 29.24 (CAalkyl), 29.47 (CAalkyl), 32.87 (CH₂CH₂OH), 63.08 (CH₂OH), 80.16 (C≡C), 80.45 (C≡C).

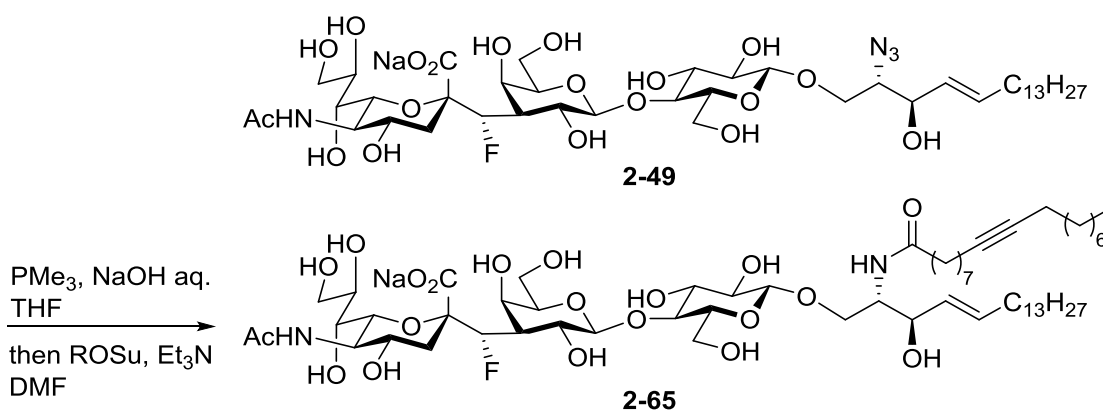
Synthesis of 2-63



To a solution of **2-58** (16.6 mg, 55.4 μmol) in CH_2Cl_2 (500 μl) were added *N*-hydroxysuccinimide (12.8 mg, 111 μmol), triethylamine (23 μl , 160 μmol), and 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (31.9 mg, 0.166 mmol). After stirring for 14.5 h, distilled water was added at 0 $^\circ\text{C}$. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with Et_2O twice. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO_4 , and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **2-63** (9.9 mg, 107%) as a colorless oil.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.23-1.44 (m, 22H, steH4-14), 1.52 (m, 2H, steH15), 1.74 (m, 2H, steH3), 1.94 (t, J = 2.8 Hz, steH18), 2.18 (td, J = 7.1, 2.8 Hz, 1H, steH16), 2.60 (t, J = 7.4 Hz, steH18), 2.84 (br d, J = 4.6 Hz, 2H, OSu- CH_2); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 18.53 (steC16), 24.70 (steC16), 25.72 (steC3), 28.63 (OSu- CH_2), 28.92 (2C, steCAlkyl), 29.22 (steCAlkyl), 29.24 (steCAlkyl), 29.48 (steCAlkyl), 29.64 (steCAlkyl), 29.67 (2C, steCAlkyl), 29.73 (2C, steCAlkyl), 29.76 (steCAlkyl), 31.08 (steC2), 68.16 (steC18), 84.97 (steC17), 168.84 (steC1), 169.34 (2C, OSu-CO).

Synthesis of 2-65

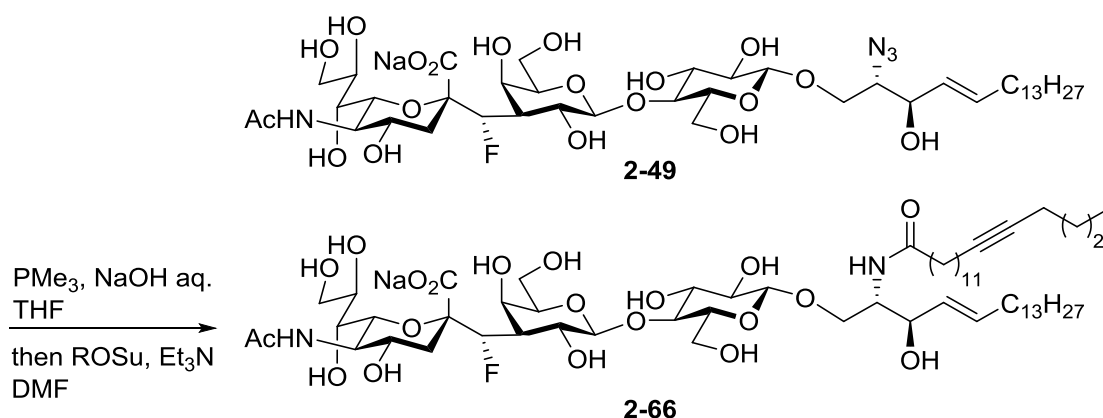


To a solution of **2-49** (1.2 mg, 1.3 μmol) in anhydrous THF (100 μl) were added a 0.1 M solution of NaOH aq. (25 μl , 2.5 μmol) and a 1.0 M solution of trimethylphosphine in THF (3.8 μl , 3.8 μmol) at room temperature. After stirring for 6 h, a 0.1 M solution of **2-61** in THF (25 μl , 2.5 μmol) was added. The reaction mixture was stirred for 9 h. An additional 0.1 M solution of **2-61** in THF (14 μl , 1.4 μmol) was added. After stirring 10 h, a 1.0 M solution of triethylamine in THF (10 μl , 10 μmol)

was added. The mixture was stirred for 30 min. To the reaction mixture was added a 0.1 M solution of **2-61** in THF (5 μ l, 0.5 μ mol). After stirring 2.5 h, the mixture was concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by gel filtration (Sephadex LH-20, eluent: CHCl₃/MeOH/H₂O = 20/10/1). Further purification was carried out by Iatro beads column chromatography (6RS-8060, eluent: CHCl₃/MeOH/H₂O = 65/65/8) to give **2-65** (1.1 mg, 74%).

$[\alpha]_D^{24} +1.27$ (c 0.11, CHCl₃/MeOH = 1:1); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆/D₂O = 96/4) δ 0.841 and 0.843 (t, 6H, *J* = 6.8 Hz, cerH18 and cerH18'), 1.18-1.47 (m, 44H, cerH7-H17 and cerH3'-H7' and H12'-H17'), 1.63 (brt, *J* = 10.5 Hz, 1H, siaH3ax), 1.88 (s, 3H, -NHCOCH₃), 1.92 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, cerH6), 2.02 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, cerH2'), 2.08 (t, *J* = 6.3 Hz, 4H, cerH8' and cerH11'), 2.34 (m, overlapped with solvent signal, 1H, galH3), 2.50 (m, overlapped with solvent signal, 1H, siaH3eq), 3.03 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, glcH2), 3.17 (m, 1H, siaH7), 3.25-3.61 (m, 14H, siaH4, siaH5, siaH6, siaH9a, siaH9b, galH2, galH4, galH5, glcH3, glcH4, glcH5, glcH6a, glcH6b and cerH1a), 3.64-3.80 (m, 4H, siaH8, galH6a, galH6b and cerH2), 3.87 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, cerH3), 3.98 (m, 1H, cerH1b), 4.15 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, glcH1), 4.17 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, galH1), 4.70 (d, *J* = 48.7 Hz, 1H, -CHF-), 5.33 (dd, *J* = 7.5, 14.9 Hz, 1H, cerH4), 5.52 (dt, *J* = 14.9, 6.9 Hz, 1H, cerH5), 7.54 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, cerNH), 8.10 (m, 1H, -NHCOCH₃) ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆/D₂O = 96/4) δ 14.09 (2C, cerC18 and C18'), 18.17 and 18.19 (cerC8' and cerC11'), 22.24 (2C, cerCAlkyl), 22.56 (NDCOCH₃), 25.50 (cerC3'), 28.29 (2C, cerCAlkyl), 28.60 (2C, cerCAlkyl), 28.64 (cerCAlkyl), 28.72 (cerCAlkyl), 28.77 (cerCAlkyl), 28.81 (cerCAlkyl), 28.85 (cerCAlkyl), 28.90 (cerCAlkyl), 29.17 (cerCAlkyl), 29.20 (cerCAlkyl), 29.24 (cerCAlkyl), 31.37 (cerCAlkyl), 31.44 (cerCAlkyl), 31.89 (cerC6), 35.68 (cerC2'), 36.74 (m, siaC3) 45.65 (d, *J* = 18.0 Hz, galC3), 53.00 (cerC2), 53.13 (siaC5), 60.27 (glcC6), 60.45 (galC6), 63.39 (siaC9), 65.01 (d, *J* = 13.5 Hz, galC2), 67.52 (siaC4), 67.99 (galC4), 68.83 (siaC7), 69.21 (cerC1), 70.77 (cerC3), 70.89 (siaC8), 73.26 (glcC2), 74.32 (glcC3), 74.45 (siaC6), 74.86 (glcC5), 78.22 (galC5), 80.32 and 80.37 (cerC9' and cerC10'), 80.65 (glcC4), 82.88 (d, *J* = 16.5 Hz, siaC2), 95.93 (d, *J* = 190.7 Hz, CHF), 103.62 (glcC1), 106.03 (galC1), 131.43 (cerC4), 131.72 (cerC5), 170.84 (d, *J* = 7.5 Hz, siaC1), 172.11 (cerC1'), 172.49 (-NDCONa).; ¹⁹F NMR (377 MHz, DMSO-d₆/D₂O = 96/4) δ -198.89 (br s, -CHF-); IR (cm⁻¹): 3334, 2923, 2853, 1634, 1607, 1377, 1165, 1114, 1065, 1036, 1028; HRMS-ESI (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₆₀H₁₀₄FN₂NaO₂₀, 1215.7142; found 1215.7144.

Synthesis of 2-66

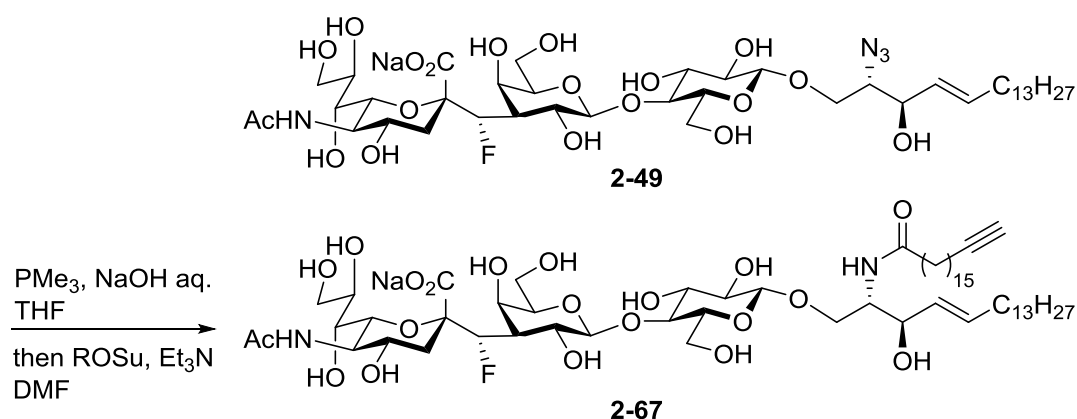


To a solution of **2-49** (1.4 mg, 1.5 μmol) in anhydrous THF (200 μl) were added a 0.1 M solution of NaOH aq. (29 μl , 2.9 μmol) and a 1.0 M solution of trimethylphosphine in THF (4.0 μl , 4.4 μmol) at room temperature. After stirring for 3 h, a 0.1 M solution of **2-62** in THF (44 μl , 4.4 μmol) was added. After stirring for 13 h, to the mixture was added a 1.0 M solution of triethylamine in THF (8.8 μl , 8.8 μmol). After stirring for 10 h, the reaction mixture was concentrated *in vacuo* and purified by gel filtration (Sephadex LH-20, eluent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 20/10/1$). Further purification was carried out by Iatro beads column chromatography (6RS-8060, eluent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 65/65/8$) to give **2-66** (1.6 mg, 90%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} +1.27$ (c 0.16, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 1:1$); ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6/\text{D}_2\text{O} = 96/4$) δ 0.84 (m, 6H, cerH18 and cerH18'), 1.18-1.48 (m, 44H, cerH7-H17 and cerH4'-H17'), 1.64 (dd, $J = 12.0, 10.9$ Hz, 1H, siaH3ax), 1.89 (s, 3H, $-\text{NHCOCH}_3$), 1.92 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H, cerH6), 2.01 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, cerH2'), 2.09 (m, 4H, cerH12' and cerH15'), 2.33 (m, 1H, galH3), 2.50 (m, overlapped with solvent signal, 1H, siaH3eq), 3.03 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, glcH2), 3.17 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, siaH7), 3.29-3.62 (m, 14H, siaH4, siaH5, siaH6, siaH9a, siaH9b, galH2, galH4, galH5, glcH3, glcH4, glcH5, glcH6a, glcH6b and cerH1a), 3.62-3.80 (m, 4H, siaH8, galH6a, galH6b and cerH2), 3.86 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, cerH3), 3.98 (m, 1H, cerH1b), 4.15 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, glcH1), 4.17 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, galH1), 4.70 (d, $J = 47.5$ Hz, 1H, $-\text{CHF}-$), 5.33 (dd, $J = 15.2, 7.2$ Hz, 1H, cerH4), 5.52 (dt, $J = 15.2, 6.9$ Hz, 1H, cerH5), 7.56 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, cerNH), 8.13 (m, 1H, $-\text{NHCOCH}_3$) ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6/\text{D}_2\text{O} = 96/4$) δ 13.56 (cerC18), 14.06 (cerC18), 17.85 (propargylC), 18.15 (propargylC), 21.40 (cerCAlkyl), 22.21 (cerCAlkyl), 22.55 (NDCOCH₃), 25.53 (cerC3'), 28.28 (cerCAlkyl), 28.63 (cerCAlkyl), 28.80 (cerCAlkyl), 28.82 (cerCAlkyl), 28.88 (cerCAlkyl), 29.14 (cerCAlkyl), 29.18 (cerCAlkyl), 29.23 (cerCAlkyl), 30.79 (cerCAlkyl), 31.42 (cerCAlkyl), 31.87 (cerC6), 35.72 (cerC2'), 36.70 (d, $J = 6.0$ Hz, siaC3), 45.63 (d, $J = 18.0$ Hz, galC3), 53.01 (cerC2), 53.13 (siaC5), 60.27 (glcC6), 60.43 (galC6), 63.36 (siaC9), 64.99 (d, $J = 13.5$ Hz, galC2), 67.50 (siaC4), 67.96 (galC4), 68.82 (siaC7), 69.21 (cerC1), 70.74 (cerC3), 70.86 (siaC8), 73.24 (glcC2), 74.30 (glcC3),

74.44 (siaC6), 74.85 (glcC5), 78.19 (galC5), 80.30 (2C, alkyneC), 80.61 (glcC4), 82.84 (d, $J = 16.5$ Hz, siaC2), 96.89 (d, $J = 190.7$ Hz, CHF), 103.61 (glcC1), 105.98 (galC1), 131.41 (cerC4), 131.68 (cerC5), 170.97 (d, $J = 6.0$ Hz, siaC1), 172.12 (cerC1'), 172.47 (-NDCONa); ^{19}F NMR (377 MHz, DMSO- d_6 /D $_2$ O = 96/4) δ -199.12 (m, -CHF-); IR (cm^{-1}): 3350, 2922, 2852, 1633, 1556, 1465, 1377, 1205, 1162, 1065, 1036; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{60}\text{H}_{104}\text{FN}_2\text{NaO}_{20}$, 1215.7142; found 1215.7147.

Synthesis of 2-67



To a solution of **2-49** (1.2 mg, 1.3 μmol) in anhydrous THF (100 μl) were added a 0.1 M solution of NaOH aq. (25 μl , 2.5 μmol) and a 1.0 M solution of trimethylphosphine in THF (3.8 μl , 3.8 μmol) at room temperature. After stirring for 12 h, the reaction mixture was evaporated. To a solution of the crude amine in anhydrous THF (150 μl) were added a 0.025 M solution of **2-63** in THF (200 μl , 5.0 μmol) and a 1.0 M solution of triethylamine in THF (5 μl , 5 μmol). After stirring for 12 h, the reaction mixture was purified by gel filtration (Sephadex LH-20, eluent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 20/10/1$). Further purification was carried out by Iatro beads column chromatography (6RS-8060, eluent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 65/65/8$) to give **2-67** (1.0 mg, 67%).

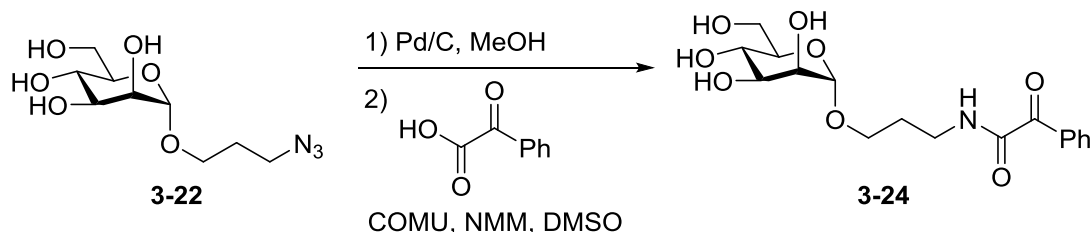
$[\alpha]_D^{24} +4.78$ (c 0.06, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 1:1$); ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 /D $_2$ O = 96/4) δ 0.84 (t, 3H, $J = 6.9$ Hz, cerH18), 1.18-1.34 (m, 44H, cerH7-H17 and cerH4'-H14'), 1.37-1.47 (m, 4H, cerH3' and cerH15'), 1.63 (brs, 1H, siaH3ax), 1.88 (s, 3H, -NHC(=O)CH $_3$), 1.92 (brt, $J = 6.9$ Hz, 2H, cerH6), 2.02 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, cerH2'), 2.12 (ddd, $J = 7.2, 6.9, 2.8$ Hz, 2H, cerH16'), 2.35 (brt, $J = 12.0$ Hz, 1H, galH3), 2.52 (m, overlapped with solvent signal, 1H, siaH3eq), 3.03 (dd, $J = 8.3, 7.9$ Hz, 1H, glcH2), 3.17 (m, 1H, siaH7), 3.25-3.48 (m, 11H, siaH5, siaH9b, galH2, galH4, galH5, glcH3, glcH4, glcH5, and cerH1a), 3.51 (m, 1H, siaH4), 3.59 (m, 2H, siaH6, siaH9a), 3.66 (m, 1H, glcH6a), 3.71 (m, 2H, siaH8, glcH6a), 3.76 (m, 1H, cerH2), 3.87 (dd, $J = 7.9, 7.4$ Hz, 1H, cerH3), 3.98 (dd, $J = 9.6, 4.5$ Hz, 1H, cerH1b), 4.15 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, glcH1), 4.17 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, galH1), 4.70 (d, $J = 48.5$ Hz, 1H, -CHF-), 5.33 (dd, $J = 15.3, 7.4$ Hz, 1H, cerH4), 5.52 (dt, $J = 15.3, 6.9$ Hz, 1H, cerH5), 8.47 (s,

^1H , $-\text{NHCOCH}_3$); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O} = 96/4$) δ 14.07 (cerC18), 17.77 (cerC16'), 22.22 (2C, cerCAlkyl), 22.54 (NDCOCH $_3$), 25.53 (cerC3'), 28.07 (cerCAlkyl), 28.24 (cerCAlkyl), 28.60 (cerCAlkyl), 28.84 (cerCAlkyl), 28.88 (cerCAlkyl), 29.04-29.27 (cerCAlkyl), 31.43 (cerCAlkyl), 31.88 (cerC6), 35.71 (cerC2'), 36.75 (d, $J = 6.0$ Hz, siaC3), 45.54 (m, galC3), 52.98 (cerC2), 53.11 (siaC5), 60.24 (glcC6), 60.42 (galC6), 63.39 (siaC9), 64.97 (d, $J = 15.0$ Hz, galC2), 67.51 (siaC4), 67.96 (d, $J = 6.0$ Hz, galC4), 68.83 (siaC7), 69.22 (cerC1), 70.72 (cerC3), 70.85 (siaC8), 71.14 (cerC18'), 73.24 (glcC2), 74.28 (glcC3), 74.41 (siaC6), 74.83 (glcC5), 78.20 (galC5), 80.66 (glcC4), 82.86 (d, $J = 16.5$ Hz, siaC2), 84.69 (cerC17'), 95.94 (d, $J = 190.7$ Hz, CHF), 103.61 (glcC1), 106.03 (galC1), 131.44 (cerC4), 131.66 (cerC5), 170.68 (d, $J = 6.0$ Hz, siaC1), 172.07 (cerC1'), 172.42 ($-\text{NDCONa}$).; ^{19}F NMR (377 MHz, $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O} = 96/4$) δ -198.75 (br s, $-\text{CHF}-$); IR (cm^{-1}): 3345, 2916, 2849, 1633, 1593, 1555, 1464, 1376, 1161, 1113, 1065, 1034; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{60}\text{H}_{104}\text{FN}_2\text{NaO}_{20}$, 1215.7142; found 1215.7135.

Chapter 3

1. Experimental section for synthesis of compounds

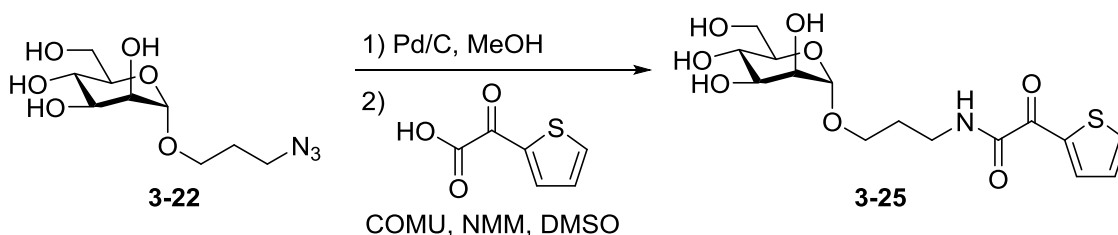
Synthesis of 3-24



To a solution of **3-22** (194.6 mg, 0.7392 mmol) in MeOH (7.4 ml) was added Pd/C (Aldrich 330108, 58.4 mg) at room temperature. The mixture was stirred under hydrogen atmosphere for 8 h. The reaction mixture was filtered through Celite® and concentrated *in vacuo*. To a solution of crude amine (190.7 mg, 0.7392 mmol) in anhydrous DMSO (3.7 ml) was added *N*-methylmorpholine (163 μ l, 1.48 mmol), α -oxo-benzeneacetic acid (133.2 mg, 0.8870 mmol), and COMU (379.7 mg, 0.8870 mmol) sequentially at room temperature. The mixture was stirred for 15h at the same temperature before quenching with distilled water at 0 °C. The resulting mixture was purified by Sep-Pak Vac 20 cc (5 g) C18 cartridge (Waters). Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **3-24** (123.8 mg, 45%) as a colorless oil.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.91 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$), 3.40-3.64 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{O}-\text{a}$, manH5, and manH4), 3.67-3.76 (m, 2H, manH3, manH6a), 3.81-3.89 (m, 3H, manH2, $-\text{CH}_2\text{O}-\text{a}$, manH6b), 4.77 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, manH1), 7.54 (m, 2H, ArH), 7.68 (m, 1H, ArH), 8.10 (m, 1H, ArH); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 30.12 ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$), 37.62 ($-\text{CH}_2\text{NH}-$), 62.93 (manC6), 66.09 ($-\text{CH}_2\text{O}-$), 68.64 (manC4), 72.15 (manC2), 72.63 (manC3), 74.74 (manC5), 101.76 (manC1), 129.80 (ArC), 131.33 (ArC), 134.58 (ArC), 135.53 (ArC), 166.54 ($-\text{NHCOCO}-$), 190.77 ($-\text{NHCOCO}-$).

Synthesis of 3-25

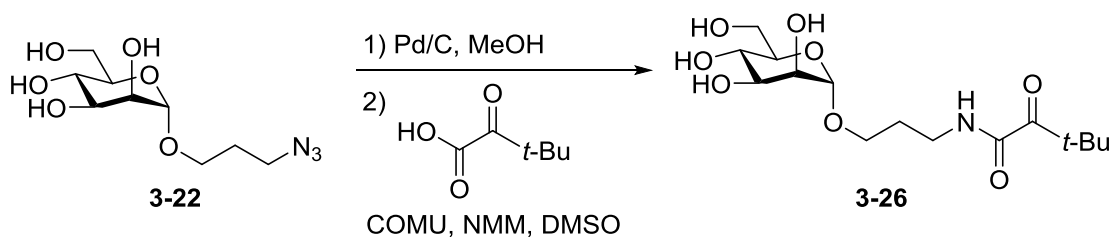


To a solution of **3-22** (249.3 mg, 0.9470 mmol) in MeOH (9.5 ml) was added Pd/C (Aldrich 330108, 74.8 mg) at room temperature. The mixture was stirred under hydrogen atmosphere for 8.5 h.

The reaction mixture was filtered through Celite[®] and concentrated *in vacuo*. To a solution of crude amine in anhydrous DMSO (4.7 ml) was added *N*-methylmorpholine (208 μ l, 1.894 mmol), α -oxo-2-thiopheneacetic acid (177.4 mg, 1.136 mmol), and COMU (486.5 mg, 1.136 mmol) sequentially at room temperature. The mixture was stirred for 15h at the same temperature before quenching with distilled water at 0 °C. The resulting mixture was purified by Sep-Pak Vac 20 cc (5 g) C18 cartridge (Waters). Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **3-25** (195.5 mg, 55%) as a colorless oil.

$[\alpha]_D^{22} +39.44$ (c 0.765, MeOH); ^1H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 1.89 (m, 2H, -OCH₂CH₂CH₂NH-), 3.38-3.56 (m, 4H, -CH₂NH-, -CH₂O-a, and manH5), 3.60 (t, J = 9.5 Hz, 1H, manH4), 3.70 (dd, t, J = 12.0, 5.7 Hz, 1H, manH6a), 3.73 (dd, J = 9.3, 3.4 Hz, 1H, manH3), 3.81-3.87 (m, 3H, -CH₂O-b, manH6b and manH2), 4.76 (br s, 1H, manH1), 7.24 (m, 1H, thienylH4), 7.99 (m, 1H, thienylH3), 8.29 (m, 1H, thienylH5); ^{13}C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 30.00 (-OCH₂CH₂CH₂NH-), 38.07 (-CH₂NH-), 62.96 (manC6), 66.41 (-CH₂O-), 68.69 (manC4), 72.16 (manC2), 72.66 (manC3), 74.74 (manC5), 101.77 (manC1), 129.32 (thienylC4), 138.49 (thienylC5), 138.81 (thienylC2), 139.30 (thienylC3), 163.62 (-NHCOCO-), 180.39 (-NHCOCO-); IR (cm⁻¹): 3366, 2923, 2882, 1684, 1647, 1499, 1408, 1360, 1233, 1131, 1052.

Synthesis of **3-26**

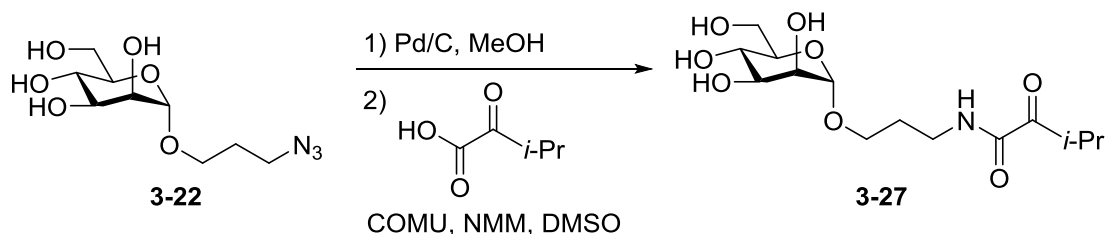


To a solution of **3-22** (382.5 mg, 1.453 mmol) in MeOH (5.0 ml) was added Pd/C (Aldrich 330108, 87.1 mg) at room temperature. The mixture was stirred under hydrogen atmosphere for 15 h. The reaction mixture was filtered through Celite[®] and concentrated *in vacuo*. To a solution of the resulting residue in MeOH (5.0 ml) was added Pd/C (Aldrich 330108, 87.1 mg) at room temperature. The mixture was stirred under hydrogen atmosphere for 23 h. The reaction mixture was filtered through Celite[®] and concentrated *in vacuo*. To the crude amine (129.8 mg, 0.5471 mmol) in anhydrous DMSO (5.0 ml) was added *N*-methylmorpholine (120 μ l, 1.09 mmol), 3,3-dimethyl-2-oxobutanoic acid (94 μ l, 0.77 mmol), and COMU (328.0 mg, 0.7659 mmol) sequentially at room temperature. The mixture was stirred for 15h at the same temperature before quenching with distilled water at 0 °C. The resulting mixture was purified by Sep-Pak Vac 20 cc (5 g)

C18 cartridge (Waters). Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **3-26** (195.5 mg, 55%) as a colorless oil.

$[\alpha]_D^{23} +51.03$ (c 0.605, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.28 (s, 9H, *t*-Bu-CH₃), 1.83 (m, 2H, -OCH₂CH₂CH₂NH-), 3.26-3.40 (m, 2H, -CH₂NH-), 3.46 (m, 1H, -CH₂O-a), 3.52 (m, 1H, manH5), 3.60 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H, manH4), 3.67-3.73 (m, 2H, manH6a, manH3), 3.79 (m, 1H, -CH₂O-b), 3.80-3.85 (m, 2H, manH6b and manH2), 4.75 (br s, 1H, manH1); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 26.66 (3C, *t*-Bu-CH₃), 30.10 (-OCH₂CH₂CH₂NH-), 37.36 (-CH₂NH-), 43.60 (*t*-Bu-C(CH₃)₃), 62.92 (manC6), 66.18 (-CH₂O-), 68.64 (manC4), 72.13 (manC2), 72.63 (manC3), 74.71 (manC5), 101.72 (manC1), 164.96 (-NHCOCO-), 205.65 (-NHCOCO-); IR (cm⁻¹): 3378, 2956, 2930, 2876, 1706, 1669, 1521, 1394, 1366, 1131, 1096, 1058, 1029, 976.

Synthesis of **3-27**

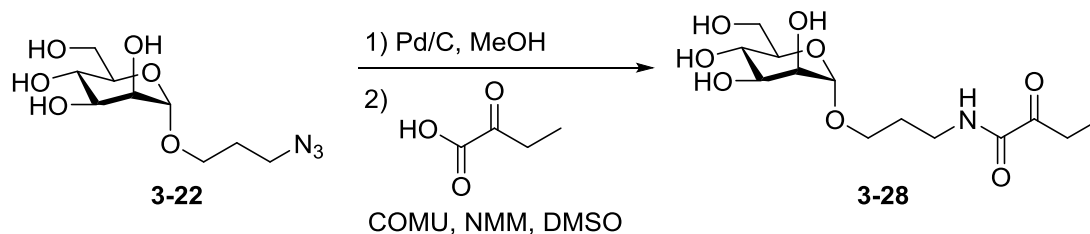


To a solution of **3-22** (162.0 mg, 0.6154 mmol) in MeOH (6.0 ml) was added Pd/C (Aldrich 330108, 48.6 mg) at room temperature. The mixture was stirred under hydrogen atmosphere for 22 h. The reaction mixture was filtered through Celite[®] and concentrated *in vacuo*. To a solution of crude amine in anhydrous DMSO (3.1 ml) was added *N*-methylmorpholine (81 μl , 0.74 mmol), 3-methyl-2-oxo-butanoic acid sodium salt (102.0 mg, 0.7385 mmol), and COMU (316.3 mg, 0.7385 mmol) sequentially at room temperature. The mixture was stirred for 15h at the same temperature before quenching with distilled water at 0 °C. The resulting mixture was purified by Sep-Pak Vac 20 cc (5 g) C18 cartridge (Waters). Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **3-27** (75.2 mg, 36%) as a colorless oil.

$[\alpha]_D^{25} +61.12$ (c 0.95, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.11 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, *i*-Pr-CH₃), 1.84 (m, 2H, -OCH₂CH₂CH₂NH-), 3.29-3.54 (m, overlapped with solvent signal, 5H, *i*-Pr-CH, -CH₂NH-, -CH₂O-a, and manH5), 3.56-3.65 (m, 1H, manH4), 3.67-3.75 (m, 2H, manH3 and manH6a), 3.77-3.85 (m, 3H, -CH₂O-b, manH6b and manH2), 4.74 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, manH1) ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 15.94 and 17.96 (*i*-Pr-CH₃), 30.00 (-OCH₂CH₂CH₂NH-), 35.56 (*i*-Pr-CH), 37.83 (-CH₂NH-), 62.89 (manC6), 66.32 (-CH₂O-), 68.61 (manC4), 71.79 (manC2), 72.59 (manC3), 74.68 (manC5), 101.68 (manC1), 162.85 (-NHCOCO*i*Pr), 202.94 (-NHCOCO*i*Pr); IR

(cm⁻¹): 3365, 2968, 2931, 2877, 1669, 1539, 1131, 1091, 1057, 1029.

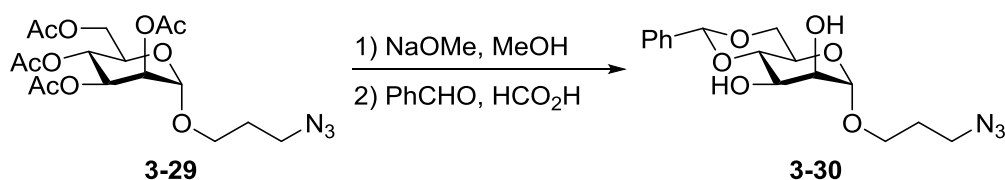
Synthesis of 3-28



To a solution of **3-22** (77.9 mg, 0.296 mmol) in MeOH (3.0 ml) was added Pd/C (Aldrich 330108, 23.4 mg) at room temperature. The mixture was stirred under hydrogen atmosphere for 22 h. The reaction mixture was filtered through Celite[®] and concentrated *in vacuo*. To a solution of crude amine in anhydrous DMSO (1.5 ml) was added *N*-methylmorpholine (39 μ l, 0.35 mmol), 2-oxo-butanoic acid (36.3 mg, 0.355 mmol), and COMU (152.1 mg, 0.355 mmol) sequentially at room temperature. The mixture was stirred for 15h at the same temperature before quenching with distilled water at 0 °C. The resulting mixture was purified by Sep-Pak Vac 20 cc (5 g) C18 cartridge (Waters). Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **3-28** (25.1 mg, 26%) as a colorless oil.

$[\alpha]_D^{23} +49.04$ (c 0.69, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.07 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH₃CH₂-), 1.66-1.92 (m, 2H, -OCH₂CH₂CH₂NH-), 2.87 (q, J = 7.4 Hz, 2H, CH₃CH₂-), 3.24-3.56 (m, overlapped with solvent signal, 4H, -CH₂NH-, -CH₂O-a, and manH5), 3.57-3.64 (m, 1H, manH4), 3.67-3.75 (m, 2H, manH3 and manH6a), 3.77-3.85 (m, 3H, -CH₂O-b, manH6b and manH2), 4.73-4.76 (m, 1H, manH1); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 7.38 (CH₃CH₂), 29.94 (-OCH₂CH₂CH₂NH-), 31.32 (CH₃CH₂-), 37.82 (-CH₂NH-), 62.90 (manC6), 66.35 (-CH₂O-), 68.59 (manC4), 72.08 (manC2), 72.58 (manC3), 74.66 (manC5), 101.65 (manC1), 162.87 (-NHCOCOEt), 200.11 (-NHCOCOEt); IR (cm⁻¹): 3367, 2360, 2343, 1722, 1669, 1539, 1131, 1093, 1057.

Synthesis of 3-30

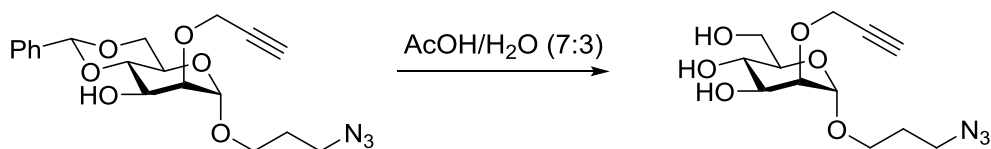


To a solution of **3-29** (4.156 g, 9.207 mmol) in MeOH (90 ml) was added sodium methoxide (2.984 g, 55.24 mmol). After stirring for 15 h, Amberlite IR-120H was added. The resulting mixture was filtered and concentrated *in vacuo*. The resulting residue was used for the next step without

further purification. To a solution of tetraol (3.732 g, 14.18 mmol) in formic acid (19.7 ml) was added benzaldehyde (18.8 ml, 184 mmol) at 0 °C. After stirring for 5 h, Et₃N (80 ml), distilled water, and CH₂Cl₂ were added to the reaction mixture. The resulting mixture was extracted with CH₂Cl₂ twice. The combined organic layers were washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃, a 1 N aqueous solution of HCl, and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **3-30** (1.421 g, 44% in 2 steps).

$[\alpha]_D^{26}$ 37.46 (*c* 0.495, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.89 (quintet, *J* = 4.3 Hz, 2H, -OCH₂CH₂CH₂N₃), 2.61 (br s, 1H, -OH), 2.62 (br s, 1H, -OH), 3.41 (td, *J* = 6.4, 0.9 Hz, 2H, -CH₂N₃), 3.52 (dt, *J* = 10.1, 6.0 Hz, 1H, -CH₂O-a), 3.77-3.87 (m, 3H, -CH₂O-b, manH5, manH6a), 3.94 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H, manH4), 4.05-4.11 (m, 2H, manH3, manH2), 4.29 (m, 1H, manH6b), 4.88 (br s, 1H, manH1), 5.58 (br s, 1H, -CHPh), 7.36-7.41 (m, 3H, PhH), 7.48-7.51 (m, 2H, PhH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 28.89 (-OCH₂CH₂CH₂N₃), 48.39 (-CH₂N₃), 63.38 (manC5), 64.62 (-CH₂O-), 68.67 (manC6), 68.86 (manC3), 70.94 (manC2), 78.91 (manC4), 100.41 (manC1), 102.35 (-CHPh), 126.39 (2C, PhC), 128.48 (2C, PhC), 129.42 (PhC), 137.25 (PhC); IR (cm⁻¹): 3339, 3225, 2900, 2098, 2098, 1136, 1114, 1099, 1069, 1032.

Synthesis of 3-31

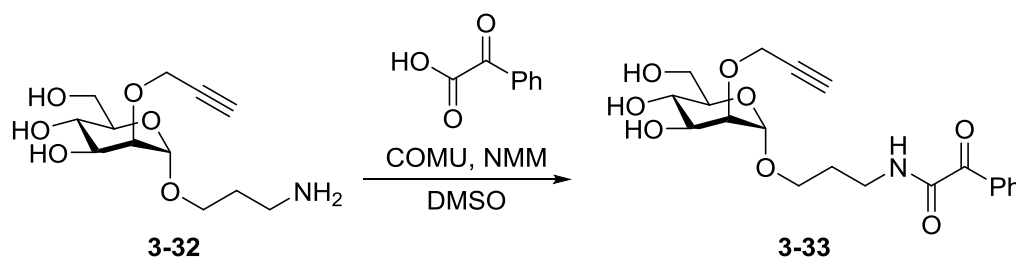


To a solution of **3-30** (52.6 mg, 0.129 mmol) in formic acid (19.7 ml) was added benzaldehyde (18.8 ml, 184 mmol) at 0 °C. After stirring for 5 h, Et₃N (80 ml), distilled water, and CH₂Cl₂ were added to the reaction mixture. The resulting mixture was extracted with CH₂Cl₂ twice. The combined organic layers were washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃, a 1 N aqueous solution of HCl, and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **3-31** (1.421 g, 44% in 2 steps).

$[\alpha]_D^{23}$ 45.48 (*c* 1.815, CH₃OH); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.87 (quintet, *J* = 6.4 Hz, 2H, -OCH₂CH₂CH₂N₃), 2.49 (br s, 1H, -OH), 2.51 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, -C $\equiv$ CH), 2.80 (br s, 1H, -OH), 3.22 (br s, 1H, -OH), 3.40 (m, 2H, -CH₂N₃), 3.47-3.57 (m, 2H, -CH₂O-a, manH5), 3.72-3.88 (m, 6H, manH4, -CH₂O-a, manH6a, manH3, manH6b, manH2), 4.28 (dd, *J* = 16.1, 2.3 Hz, 1H, propargylH), 4.37 (dd, *J* = 16.1, 2.3 Hz, 1H, propargylH), 4.94 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, manH1); ¹³C NMR (100 MHz,

CDCl₃) δ 28.87 (-OCH₂CH₂CH₂N₃), 48.40 (-CH₂N₃), 58.95 (propargylC), 61.89 (manC6), 64.47 (-CH₂O-), 67.79 (manC4), 71.31 (manC3), 72.34 (manC5), 75.59 (-C $\equiv$ CH), 77.85 (-C $\equiv$ CH), 79.59 (manC2), 97.93 (manC1); IR (cm⁻¹): 3392, 3295, 2929, 2883, 2360. 2343, 2098, 1299, 1134, 1099, 1061, 1020.

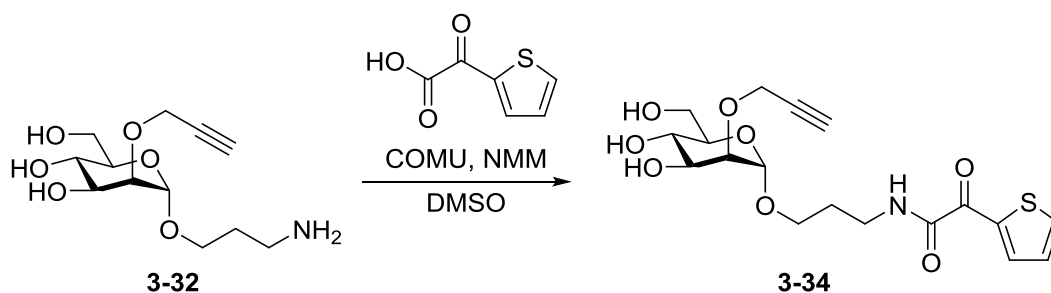
Synthesis of 3-33



To a solution of **3-32** (34.2 mg, 0.124 mmol) in DMSO (1.2 ml) were added *N*-methylmorpholine (27.4 μ l, 0.249 mmol), and α -oxo-benzeneacetic acid (26.1 mg, 0.174 mmol) sequentially at room temperature. COMU (74.5 mg, 0.174 mmol) was added to the mixture at 0 °C. The mixture was stirred for 22 h at the room temperature before quenching with distilled water at 0 °C. The resulting mixture was purified by Sep-Pak Vac 20 cc (5 g) C18 cartridge (Waters). Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **3-33** (19.8 mg, 39%) as a colorless oil.

$[\alpha]_D^{25}$ 40.83 (*c* 1.000, CH₃OH); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.92 (quintet, *J* = 6.4 Hz, 2H, -OCH₂CH₂CH₂NH-), 2.87, (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, -C $\equiv$ CH), 3.40-3.60 (m, 4H, -CH₂N-, -CH₂O-a, manH5, manH4), 3.67 (dd, *J* = 12.0, 6.0 Hz, 1H, manH6a), 3.77-3.89 (m, 4H, -CH₂O-b, manH6b, manH3, manH2), 4.31 (dd, *J* = 16.1, 2.3 Hz, 1H, propargylH), 4.37 (dd, *J* = 16.1, 2.3 Hz, 1H, propargylH), 4.97 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, manH1), 7.51-7.56 (m, 2H, ArH), 7.65-7.70 (m, 1H, ArH), 8.09-8.13 (m, 2H, ArH); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 30.11 (-OCH₂CH₂CH₂NH-), 37.62 (-CH₂NH-), 59.57 (propargylC), 62.97 (manC6), 66.18 (-CH₂O-), 69.00 (manC4), 72.47 (manC3), 74.81 (manC5), 76.12 (-C $\equiv$ CH), 79.44 (manC2), 80.86 (-C $\equiv$ CH), 99.31 (manC1), 129.79 (2C, ArC), 131.35 (2C, ArC), 134.59 (ArC), 135.53 (ArC), 166.50 (-NHCOCOPh), 190.75 (-NHCOCOPh); IR (cm⁻¹): 3388, 3293, 2929, 1663, 1449, 1225, 1133, 1099, 1063, 1024.

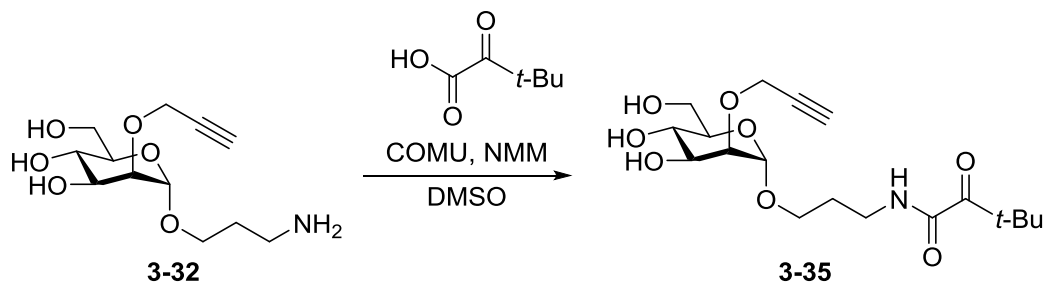
Synthesis of 3-34



To a solution of **3-32** (35.2 mg, 0.127 mmol) in DMSO (1.3 ml) were added *N*-methylmorpholine (32.0 μ l, 0.291 mmol), and α -oxo-2-thiopheneacetic acid (28.0 mg, 0.179 mmol) sequentially at room temperature. COMU (76.7 mg, 0.179 mmol) was added to the mixture at 0 °C. The mixture was stirred for 22 h at the room temperature before quenching with distilled water at 0 °C. The resulting mixture was purified by Sep-Pak Vac 20 cc (5 g) C18 cartridge (Waters). Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **3-34** (22.2 mg, 42%) as a colorless oil.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 40.19 (*c* 1.095, CH₃OH); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.90 (quintet, *J* = 6.4 Hz, 2H, -OCH₂CH₂CH₂NH-), 2.86, (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, -C $\equiv$ CH), 3.38-3.59 (m, 5H, -CH₂N, -CH₂O-a, manH5, manH4), 3.66 (dd, *J* = 11.7, 5.7 Hz, 1H, manH6a), 3.78-3.87 (m, 4H, -CH₂O-b, manH6b, manH3, manH2), 4.31 (dd, *J* = 16.1, 2.3 Hz, 1H, propargylH), 4.37 (dd, *J* = 16.1, 2.3 Hz, 1H, propargylH), 4.96 (br s, 1H, manH1), 7.24 (dd, *J* = 5.1, 3.7 Hz, 1H, ArH), 7.99 (dd, *J* = 5.1, 0.9 Hz, 1H, ArH), 8.29 (dd, *J* = 3.7, 0.9 Hz, 1H, ArH); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 30.03 (-OCH₂CH₂CH₂NH-), 38.01 (-CH₂NH-), 59.59 (propargylC), 62.96 (manC6), 66.44 (-CH₂O-), 69.01 (manC4), 72.46 (manC3), 74.79 (manC5), 76.11 (-C $\equiv$ CH), 79.46 (manC2), 80.87 (-C $\equiv$ CH), 99.32 (manC1), 129.32 (ArC), 138.50 (ArC), 138.75 (ArC), 139.34 (ArC), 163.58 (-NHCOCOPh), 180.34 (-NHCOCOPh); IR (cm⁻¹): 3375, 2927, 1681, 1647, 1536, 1499, 1408, 1360, 1234, 1134, 1100, 1064, 1022.

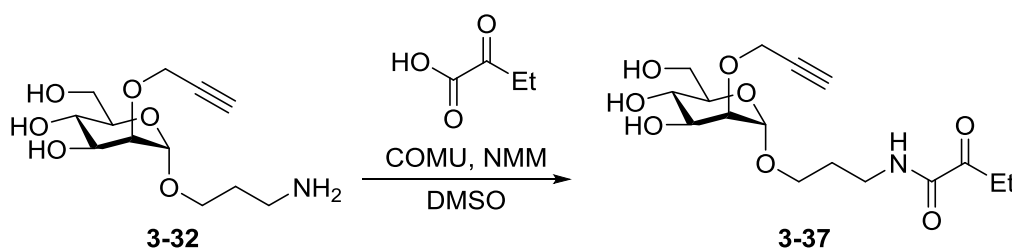
Synthesis of 3-35



To a solution of **3-32** (32.6 mg, 0.118 mmol) in DMSO (1.2 ml) were added *N*-methylmorpholine (28 μ l, 0.25 mmol), and 3,3-dimethyl-2-oxobutyric acid (20 μ l, 0.17 mmol) sequentially at room

(propargylC), 62.97 (manC6), 66.40 (-CH₂O-), 69.01 (manC4), 72.45 (manC3), 74.80 (manC5), 76.13 (-C≡CH), 79.45 (manC2), 80.87 (-C≡CH), 99.30 (manC1), 162.89 (-NHCOCO*i*-Pr), 205.66 (-NHCOCO*i*-Pr); IR (cm⁻¹): 3382, 3299, 2969, 2932, 2877, 1716, 1668, 1532, 1132, 1098, 1065, 1021; HRMS-ESI (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₁₇H₂₇NNaO₈, 396.1634; found 396.1639.

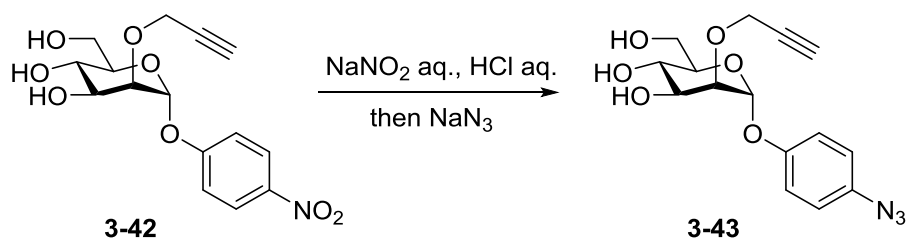
Synthesis of 3-37



To a solution of **3-32** (28.9 mg, 105 μmol) in DMSO (530 μl) was added *N*-methylmorpholine (13.9 μl, 0.116 mmol) at room temperature. 2-Oxo-butanoic acid (12.9 mg, 0.126 mmol) and COMU (53.9 mg, 0.126 mmol) were added to the mixture at 0 °C. The mixture was stirred for 18 h at the room temperature before quenching with distilled water at 0 °C. The resulting mixture was purified by Sep-Pak Vac 20 cc (5 g) C18 cartridge (Waters). Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **3-37** (10.8 mg, 29%) as a colorless oil.

[α]_D²⁸ 42.77 (*c* 1.08, CH₃OH); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.07 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, Et-CH₃), 1.79-1.92 (m, 2H, -OCH₂CH₂CH₂NH-), 2.84-2.91 (m, 3H, Et-CH₂, -C≡CH), 3.31-3.44 (m, 5H, -CH₂N-, -CH₂O-a, manH5, manH4), 3.66 (m, 1H, manH6a), 3.75-3.86 (m, 4H, -CH₂O-b, manH6b, manH3, manH2), 4.31 (m, 1H, propargylH), 4.37 (m, 1H, propargylH), 4.93 (br s, 1H, manH1); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 7.23 (Et-CH₃), 28.89 (-OCH₂CH₂CH₂NH-), 30.49 (Et-CH₂), 37.36 (-CH₂NH-), 58.85 (propargylC), 62.69 (manC6), 66.04 (-CH₂O-), 69.01 (manC4), 71.43 (manC3), 72.25 (manC5), 75.66 (-C≡CH), 77.48 (manC2), 79.47 (-C≡CH), 97.87 (manC1), 160.37 (-NHCOCOEt), 199.99 (-NHCOCOEt); IR (cm⁻¹): 3377, 3295, 2933, 2882, 1670, 1534, 1133, 1099, 1063, 1022; HRMS-ESI (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₁₆H₂₅NNaO₈, 382.1478; found 382.1475.

Synthesis of 3-43

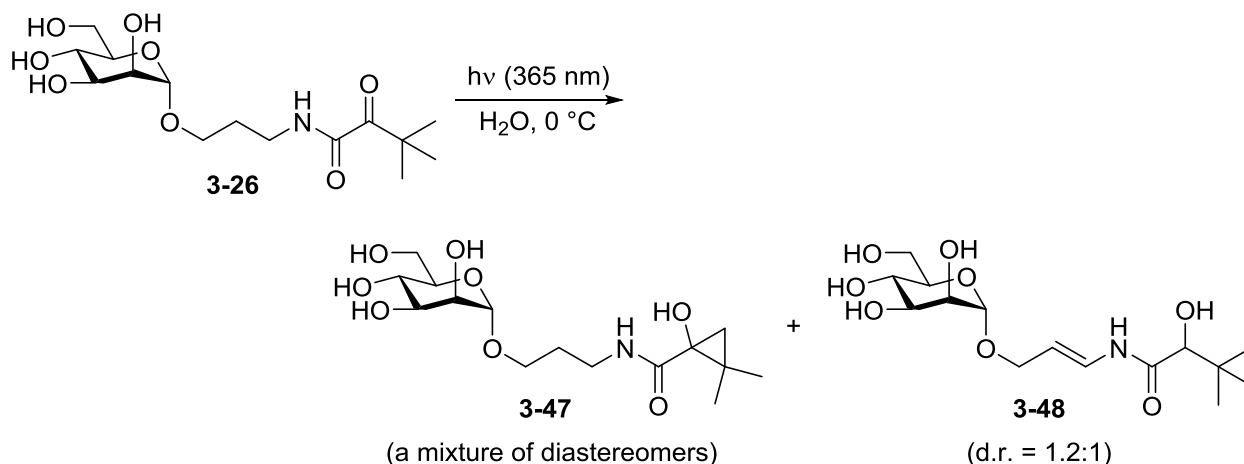


To a solution of **3-42** (13.2 mg, 42.7 μmol) in a 0.4M aqueous solution of HCl (320 μl) was added

a 0.5 M aqueous solution of NaNO₂ (94 μ l, 47 μ mol) at 0 °C. The mixture was stirred for 15 min and added amidesulfuric acid (19.0 mg, 0.196 mmol). After stirring for 5 min, sodium azide (3.1 mg, 47.0 μ mol) was added. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature over 6 h. The mixture was then diluted with MeOH, and added amberlite MB-3. The resulting mixture was filtered and concentrated *in vacuo*. The Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **3-43** (14.0 mg, 98%).

$[\alpha]_D^{24}$ 89.49 (*c* 0.395, CH₃OH); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 2.90 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, -C $\equiv$ CH), 3.56 (m, 1H, manH5), 3.68 (m, 2H, manH6a and manH4), 3.76 (dd, *J* = 12.0, 2.3 Hz, 1H, manH6b), 3.95 (dd, *J* = 9.2, 3.7 Hz, 1H, manH3), 3.98 (dd, *J* = 3.7, 1.4 Hz, 1H, manH2), 4.37 (dd, *J* = 16.1, 2.3 Hz, 1H, propargylH), 4.43 (dd, *J* = 16.1, 2.3 Hz, 1H, propargylH), 5.64 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, manH1), 7.00 (m, 2H, ArH3), 7.16 (m, 1H, ArH2); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 59.79 (propargylC), 62.64 (manC6), 68.61 (manC4), 72.20 (manC3), 75.49 (manC5), 76.36 (-C $\equiv$ CH), 79.15 (manC2), 80.79 (manC6), 98.42 (manC1), 119.43 (ArC2), 121.02 (ArC3), 135.44 (ArC4), 155.31 (ArC1); IR (cm⁻¹): 3381, 3293, 2119, 1502, 1231, 1104, 1071, 1007.

Synthesis of 3-47, 3-48



A degassed 40 mM solution of **3-26** in H₂O (700 μ l) was irradiated with 365 nm LED lamp at 0 °C. Irradiation was continued for 270 min until starting material was consumed. The crude material was purified by HPLC (PEGASIL ODS SP100 4.6 ϕ $\times$ 250 mm,) to give cyclopropanol **3-47** (3.3 mg, 34%), major diastereomer of **3-48** (1.1 mg, 11%), and minor diastereomer of **3-48** (0.9 mg, 9%) as a colorless oil.

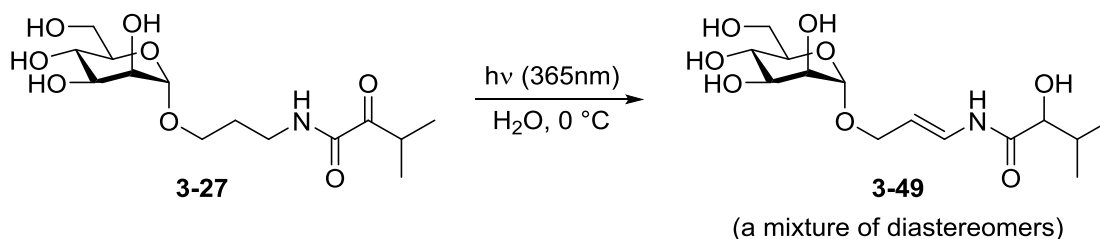
[major diastereomer of **3-47**] ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 0.81 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, cyclopropylHa), 1.11 (s, 3H, CH₃), 1.21 (s, 3H, CH₃), 1.27 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, cyclopropylHb), 1.78-1.89 (m, 2H, -OCH₂CH₂CH₂NH-), 3.25-3.43 (m, 2H, -CH₂NH-), 3.49-3.66 (m, 3H, -CH₂O-a, manH5, manH4), 3.70-3.82 (m, 3H, -CH₂O-b, manH6a, manH3), 3.86 (br d, *J* = 12.4 Hz, 1H, manH6b), 3.93 (m, 1H,

manH2), 4.86 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, manH1); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 18.78 (CH_3), 20.42 (CH_3), 26.10 (cyclopropyl- CH_2), 26.27 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 28.38 ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$), 36.65 ($-\text{CH}_2\text{NH}-$), 60.94 (manC6), 62.07 (α -hydroxyC), 65.44 (CH_2O), 66.79 (manC4), 70.05 (manC2), 70.59 (manC3), 72.73 (manC5), 99.88 (manC1), 175.57 ($-\text{NHCO}$).

[major diastereomer of **3-48**] ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 0.97 (s, 9H, $t\text{-Bu-CH}_3$), 3.54 (ddd, $J = 9.7, 5.5, 2.3$ Hz, 1H, manH5), 3.60 (t, $J = 9.7$ Hz, 1H, manH4), 3.67-3.73 (m, 3H, manH6a, manH3, α -hydroxy-CH), 3.78 (dd, $J = 3.2, 1.8$ Hz, 1H, manH2), 3.85 (dd, $J = 12.0, 2.3$ Hz, 1H, manH6b), 4.02 (ddd, $J = 12.2, 7.6, 1.1$ Hz, 1H, CH_2Oa), 4.21 (ddd, $J = 12.2, 6.2, 1.2$ Hz, 1H, CH_2Ob), 4.81 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, manH1), 5.52 (ddd, $J = 14.3, 7.6, 6.2$ Hz, 1H, NCH=CH-), 6.93 (br d, $J = 14.3$ Hz, 1H, NCH=CH-); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 26.54 (3C, $t\text{-Bu-CH}_3$), 36.08 ($t\text{-Bu-C}(\text{CH}_3)_3$), 62.94 (manC6), 66.91 (CH_2O), 68.66 (manC4), 72.24 (manC2), 72.62 (manC3), 74.72 (manC5), 80.20 (α -hydroxy-CH), 100.30 (manC1), 110.15 (NCH=CH-), 127.00 (NCH=CH-), 173.79 ($-\text{NHCO}$).

[minor diastereomer of **3-48**] ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 0.95 (s, 9H, $t\text{-Bu-CH}_3$), 3.59-3.68 (m, 2H, manH4, manH5), 3.71-3.80 (m, 2H, manH3, manH6a), 3.81-3.92 (m, 3H, manH6b, manH2, α -hydroxy-CH), 4.10 (dd, $J = 12.0, 7.8$ Hz, 1H, CH_2Oa), 4.24 (dd, $J = 12.0, 6.9$ Hz, 1H, CH_2Ob), 4.91 (br s, 1H, manH1), 5.58 (ddd, $J = 14.3, 7.8, 6.9$ Hz, 1H, NCH=CH-), 6.92 (d, $J = 14.3$ Hz, 1H, NCH=CH-); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 25.25 (3C, $t\text{-Bu-CH}_3$), 34.53 ($t\text{-Bu-C}(\text{CH}_3)_3$), 60.90 (manC6), 66.02 (CH_2O), 66.77 (manC4), 70.07 (manC2), 70.57 (manC3), 72.80 (manC5), 79.19 (α -hydroxy-CH), 98.86 (manC1), 110.09 (NCH=CH-), 125.94 (NCH=CH-), 173.44 ($-\text{NHCO}$).

Synthesis of 3-49



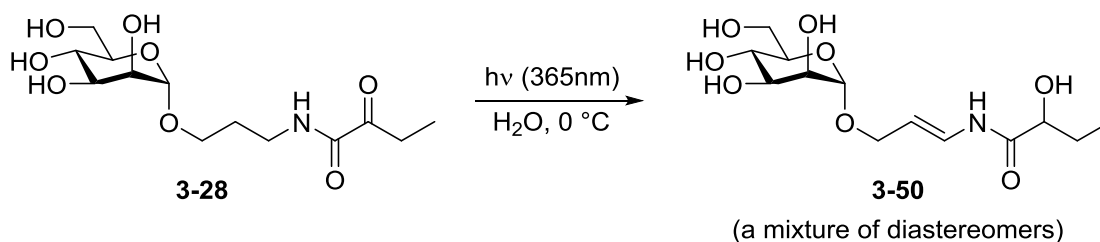
A degassed 40 mM solution of **3-27** in H_2O (700 μl) was irradiated with 365 nm LED lamp at 0 $^\circ\text{C}$. Irradiation was continued for 2.5 h until starting material was consumed. After the mixture was concentrated *in vacuo*, “NMR yield” of the desired enamide (5%) was calculated by ^1H NMR spectrum of the crude material using DMF as an internal standard.

[major diastereomer of **3-49**] ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 0.86 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, $i\text{-Pr-CH}_3$), 1.00 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, $i\text{-Pr-CH}_3$), 2.07 (septet doublet, $J = 6.9, 3.9$ Hz, 1H, $i\text{-Pr-CH}$), 3.54 (ddd, $J =$

9.7, 5.5, 2.3 Hz, 1H, manH5), 3.60 (dd, $J = 9.7, 8.9$ Hz, 1H, manH4), 3.70 (dd, $J = 8.9, 3.7$ Hz, 1H, manH3), 3.71 (dd, $J = 11.5, 5.5$ Hz, 1H, manH6a), 3.78 (dd, $J = 3.7, 1.5$ Hz, 1H, manH2), 3.85 (dd, $J = 11.5, 2.3$ Hz, 1H, manH6b), 3.88 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H, α -hydroxy-CH), 4.03 (ddd, $J = 12.0, 7.4, 0.9$ Hz, 1H, CH₂Oa), 4.21 (ddd, $J = 12.0, 6.4, 1.4$ Hz, 1H, CH₂Ob), 4.81 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, manH1), 5.55 (ddd, $J = 14.3, 7.4, 6.4$ Hz, 1H, NCH=CH-), 6.93 (br d, $J = 14.3$ Hz, 1H, NCH=CH-); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 16.43 (*i*-Pr-CH₃), 19.46 (*i*-Pr-CH₃), 33.25 (*i*-Pr-CH), 62.97 (manC6), 66.86 (CH₂O), 68.68 (manC4), 72.25 (manC2), 72.63 (manC3), 74.74 (manC5), 77.07 (α -hydroxy-CH), 100.34 (manC1), 110.49 (NCH=CH-), 126.94 (NCH=CH-), 174.72 (-NHCO).

[minor diastereomer of **3-49**] ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 0.86 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, *i*-Pr-CH₃), 1.00 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, *i*-Pr-CH₃), 2.07 (septet doublet, $J = 6.9, 3.9$ Hz, 1H, *i*-Pr-CH), 3.54 (ddd, $J = 9.7, 6.0, 2.3$ Hz, 1H, manH5), 3.60 (dd, $J = 9.7, 9.2$ Hz, 1H, manH4), 3.69 (dd, $J = 9.2, 3.2$ Hz, 1H, manH3), 3.71 (dd, $J = 11.5, 6.0$ Hz, 1H, manH6a), 3.77 (dd, $J = 3.2, 1.7$ Hz, 1H, manH2), 3.85 (dd, $J = 11.7, 2.3$ Hz, 1H, manH6b), 3.85 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H, α -hydroxy-CH), 4.03 (ddd, $J = 12.0, 7.4, 0.9$ Hz, 1H, CH₂Oa), 4.21 (ddd, $J = 12.0, 6.4, 1.4$ Hz, 1H, CH₂Ob), 4.81 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, manH1), 5.55 (ddd, $J = 14.3, 7.4, 6.4$ Hz, 1H, NCH=CH-), 6.93 (br d, $J = 14.3$ Hz, 1H, NCH=CH-); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 16.42 (*i*-Pr-CH₃), 19.46 (*i*-Pr-CH₃), 33.26 (*i*-Pr-CH), 62.96 (manC6), 66.88 (CH₂O), 68.68 (manC4), 72.28 (manC2), 72.63 (manC3), 74.74 (manC5), 77.09 (α -hydroxy-CH), 100.34 (manC1), 110.51 (NCH=CH-), 126.94 (NCH=CH-), 174.73 (-NHCO).

Synthesis of 3-50



A degassed 40 mM solution of **3-28** in H₂O (700 μ l) was irradiated with 365 nm LED lamp at 0 °C. Irradiation was continued for 16 min until starting material was consumed. After the mixture was concentrated *in vacuo*, “NMR yield” of the desired enamide (3%) was calculated by ¹H NMR spectrum of the crude material using DMF as an internal standard.

2. Experimental section for kinetic study for photolysis of α -ketoamides in H₂O

1) Experimental procedures

HPLC analysis after photolysis of α -ketoamide 3-24 (Typical procedure for HPLC analysis after photolysis of α -ketoamide 3-24~3-28)

A 40 mM solution of α -ketoamide 3-24 in H₂O (700 μ l) was irradiated with 365 nm LED lamp (OMROM ZUV-C20H, ZUV-H20MB, ZUV-L8H). After each irradiation time (0, 10, 20, 40, 60, 80, and 100 min), an aliquot of reaction mixture (2 μ l) was injected into Shimazu HPLC system (LC-20AP, DGU-20A, CTO-20AC, SPD-M20A) to obtain chromatogram. The peak area of starting material in each irradiation times were analyzed with Shimazu Lcsolution software. The relationships between the peak area and irradiation time was shown in **Figure S2**. Kinetic parameters k and $t_{1/2}$ were calculated from fitted curves in the graph.

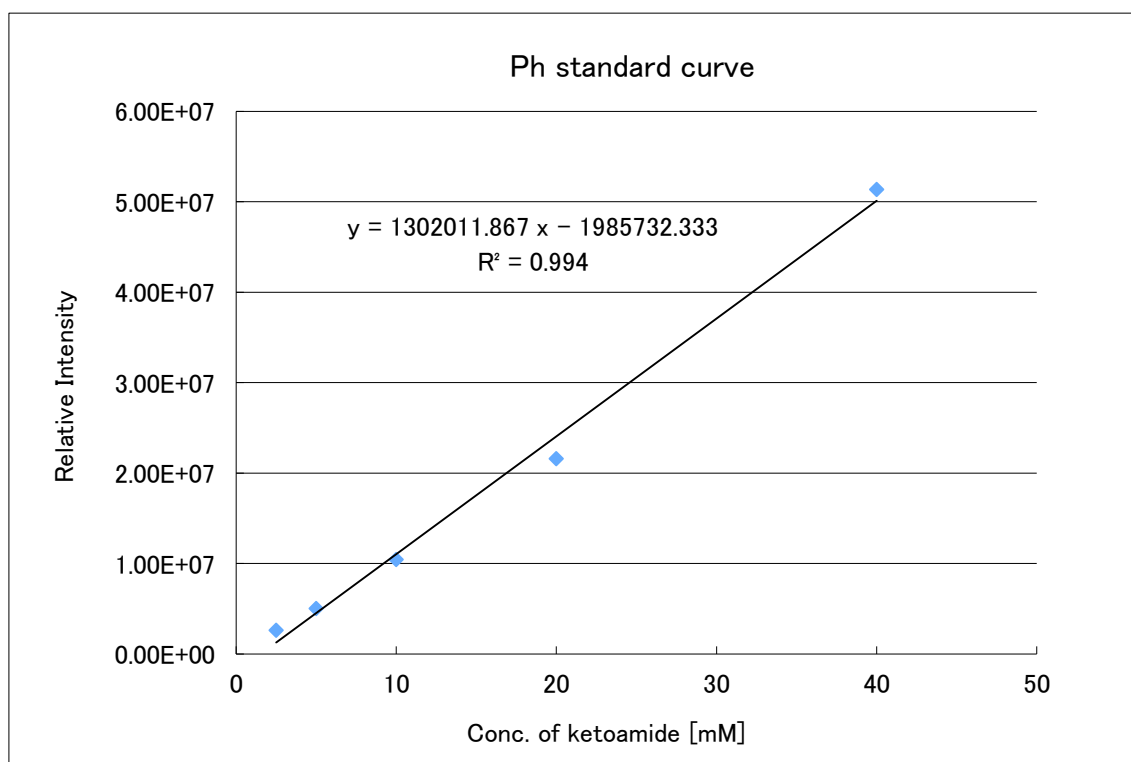


Figure S1. Standard curve of α -ketoamide 3-24.

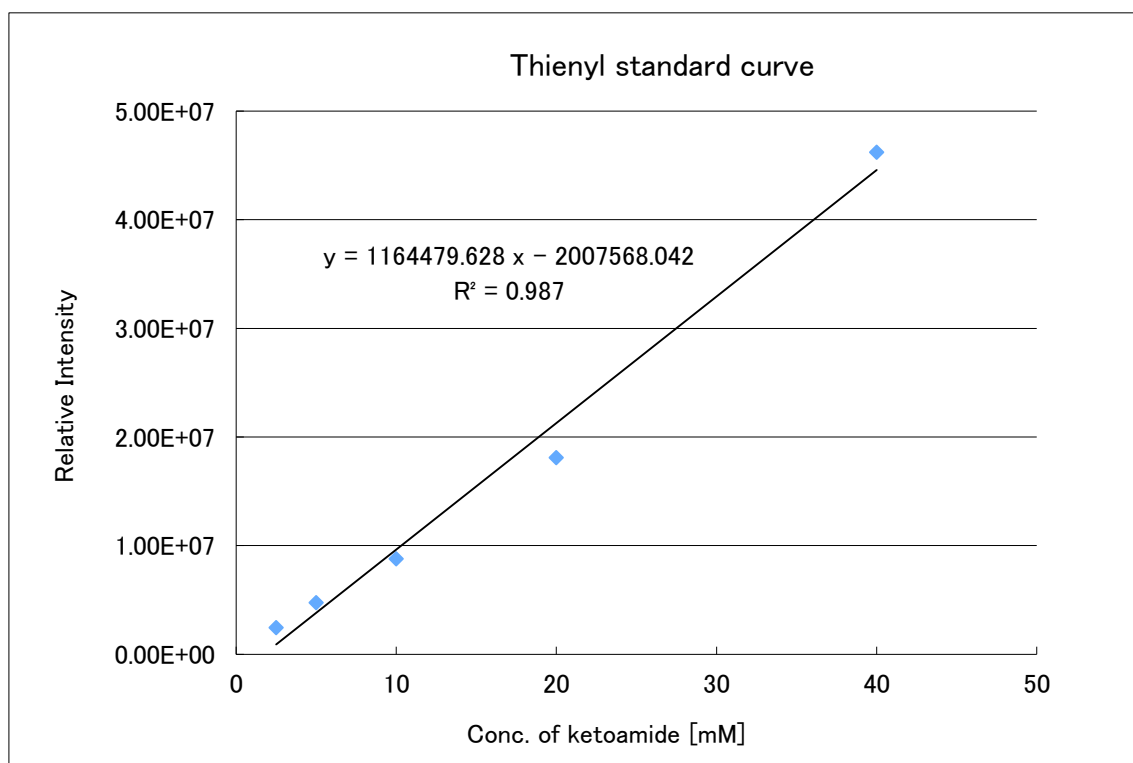


Figure S2. Standard curve of α -ketoamide 3-25.

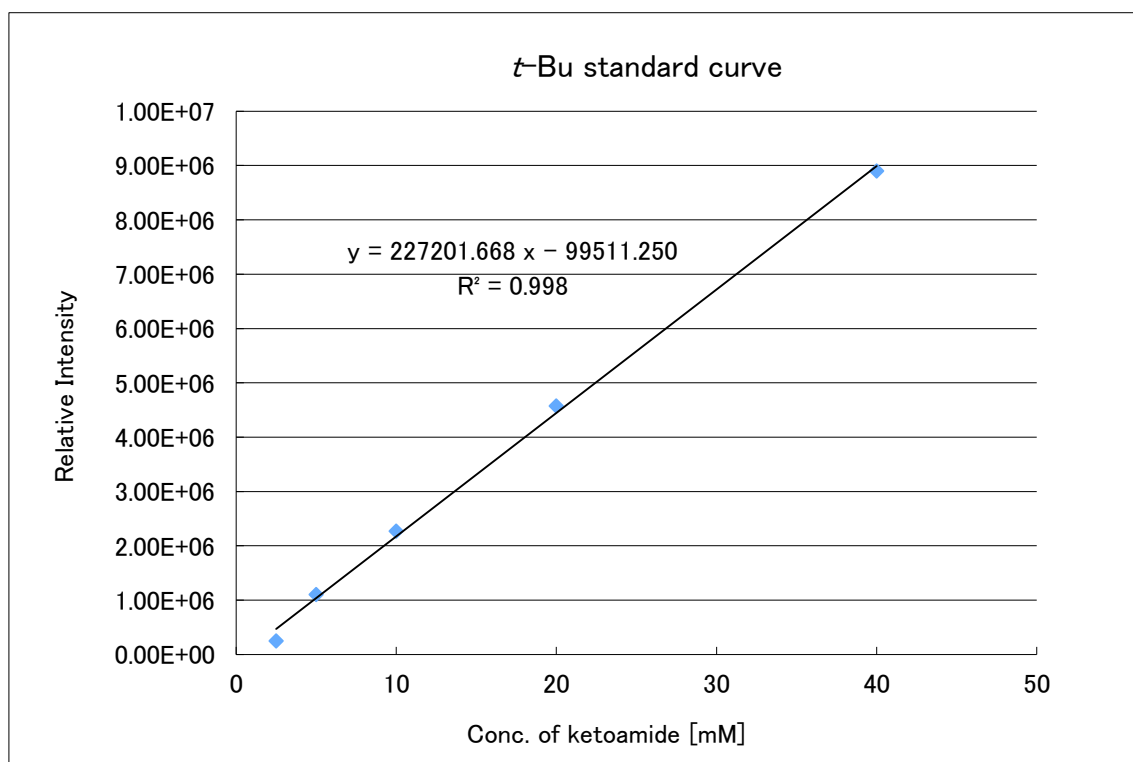


Figure S3. Standard curve of α -ketoamide 3-26.

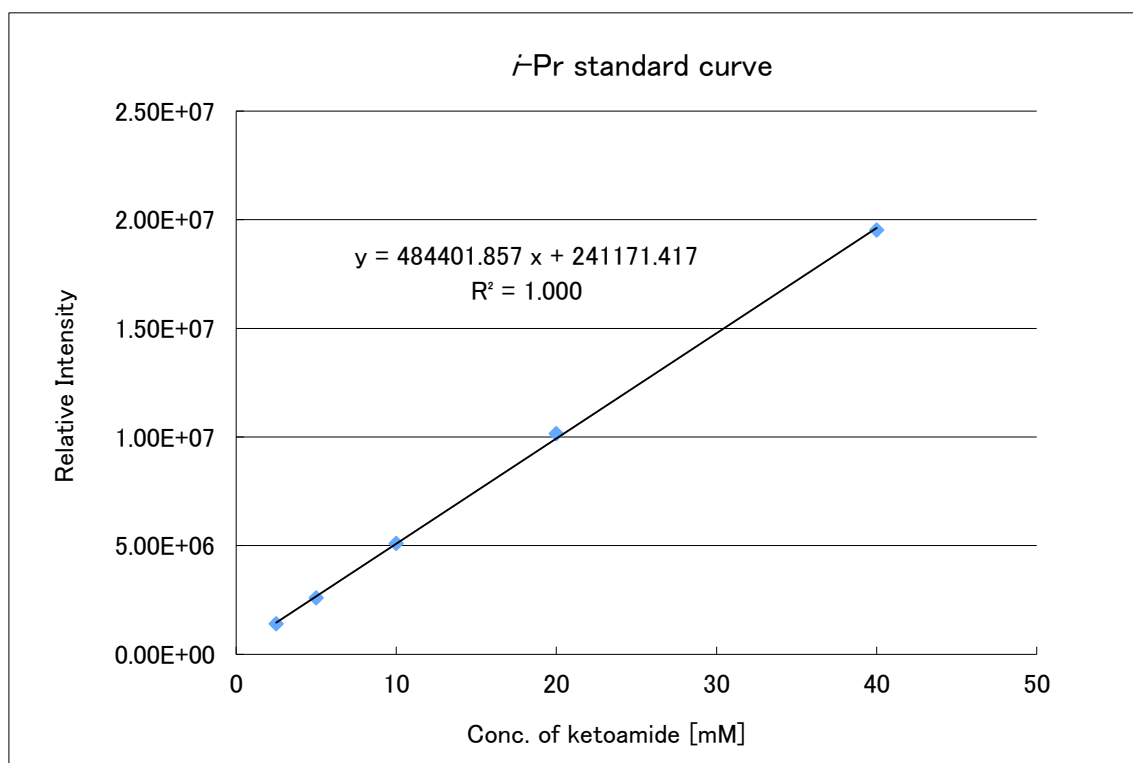


Figure S4. Standard curve of α -ketoamide **3-27**.

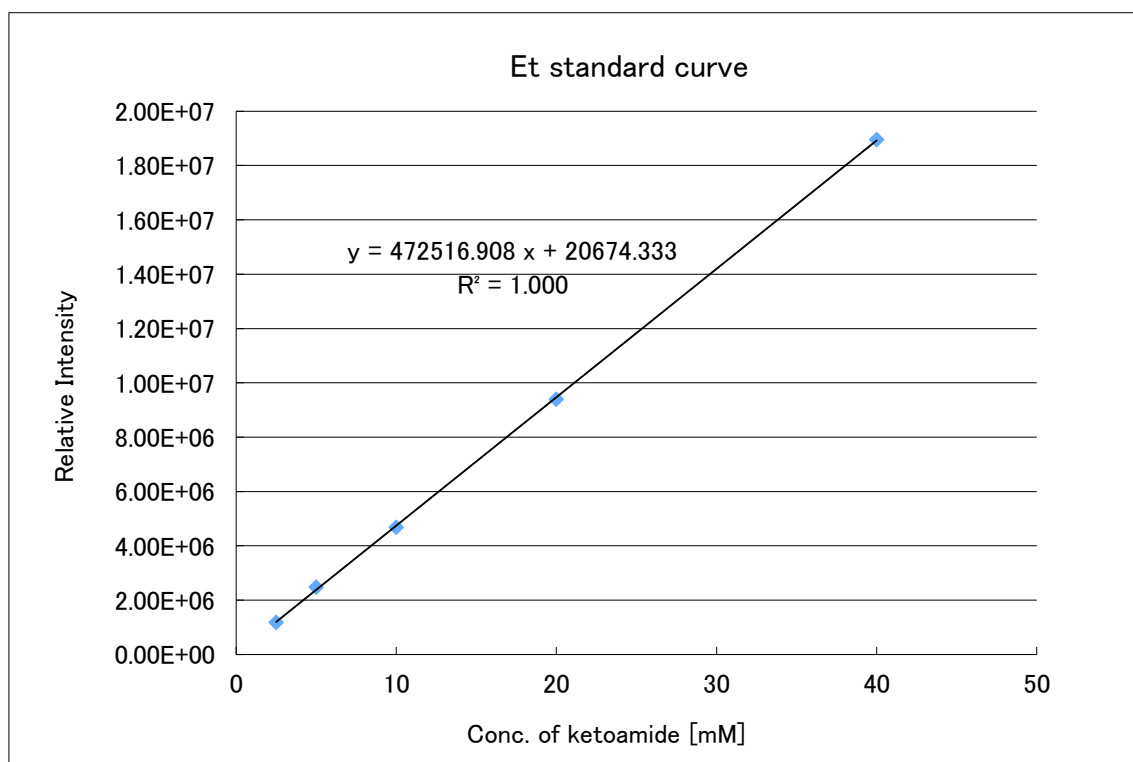
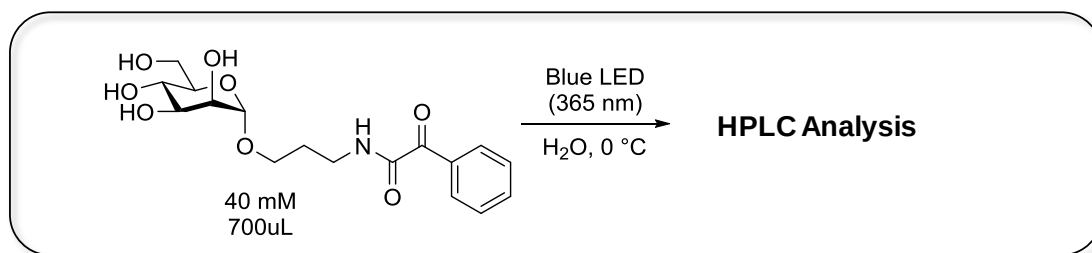


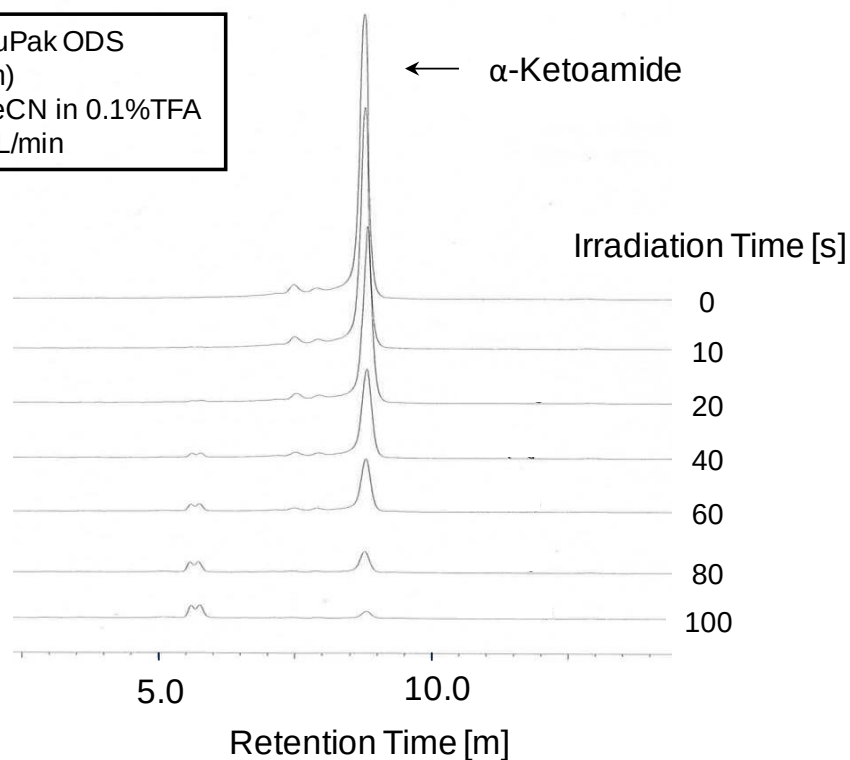
Figure S5. Standard curve of α -ketoamide **3-28**.

2) Chromatograms and fitting curves



A)

Column: SenshuPak ODS
(4.6 ϕ $\times$ 250mm)
Solvent: 16% MeCN in 0.1%TFA
Flow rate: 1.0 mL/min



B)

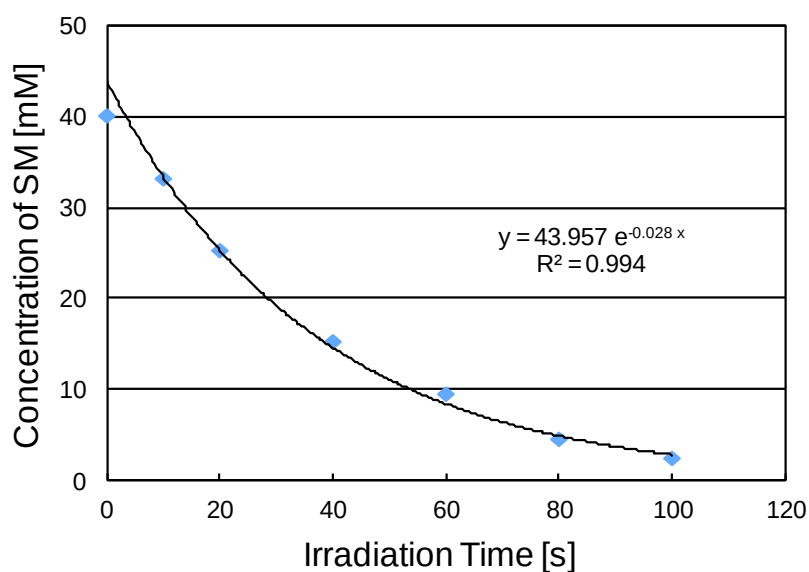


Figure S6. Kinetic Analysis for the Decomposition of Manoside 3-24; A) Chromatograms on Each Irradiation Times; B) Concentration of Starting Material on Each Irradiation Times

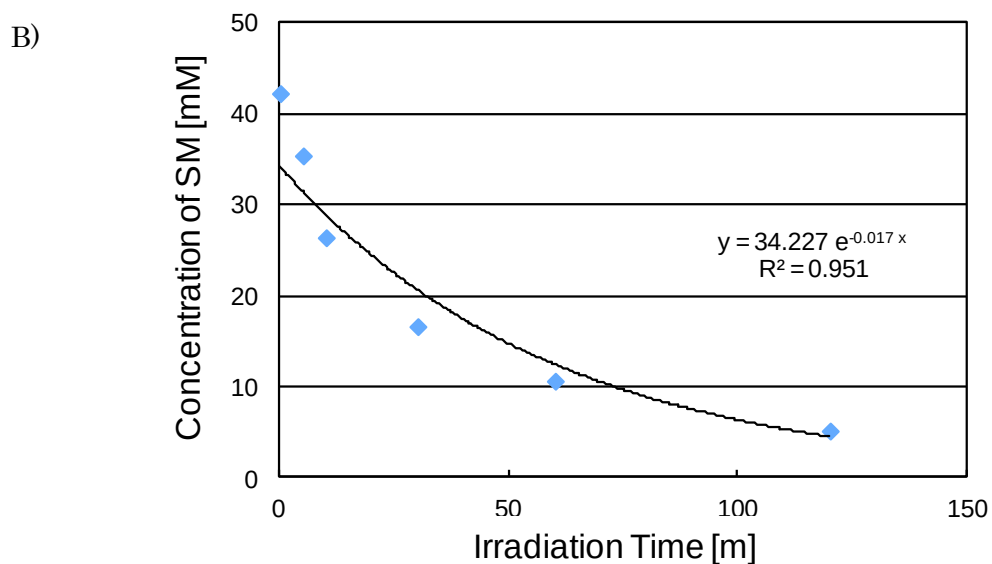
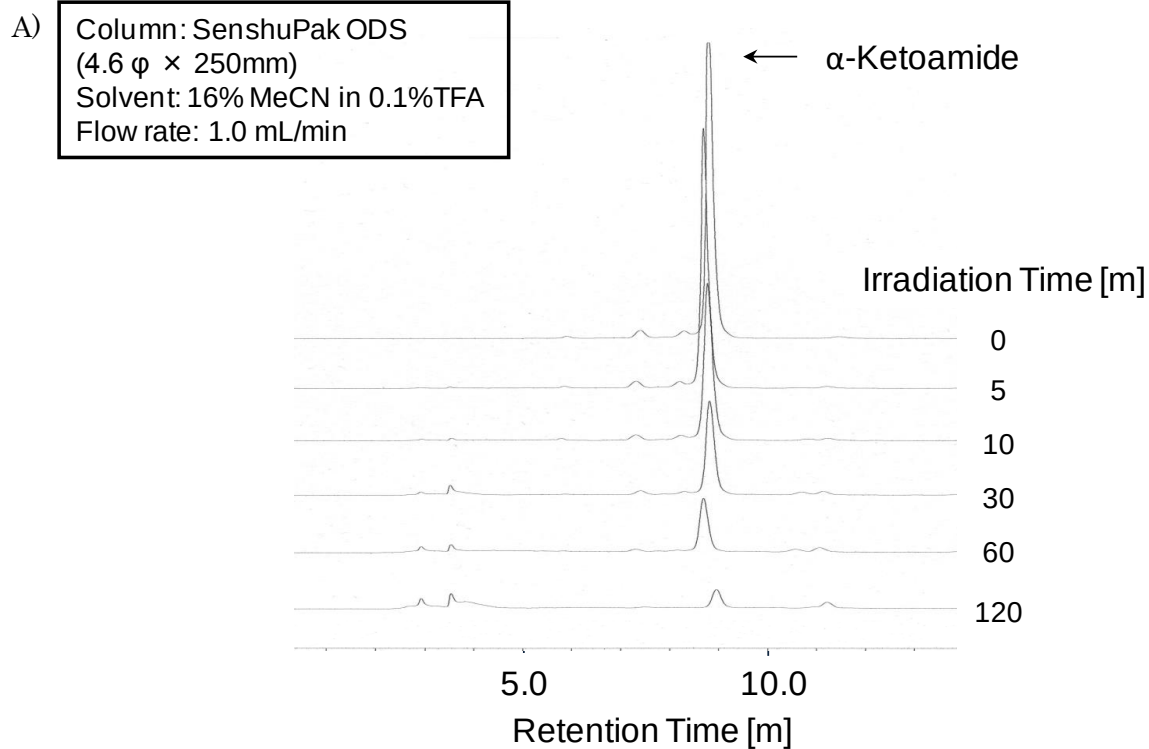
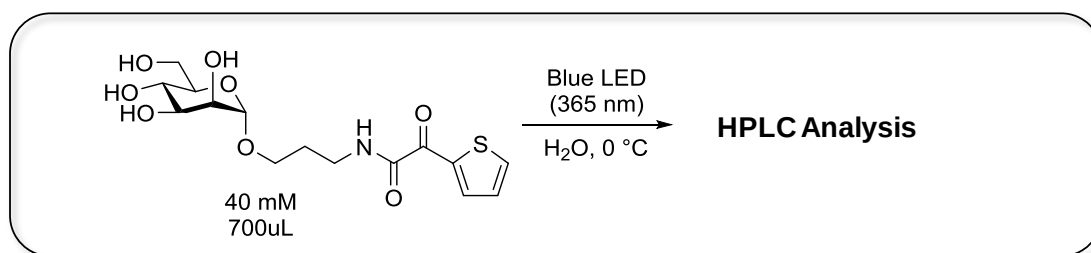


Figure S7. Kinetic Analysis for the Decomposition of Manoside 3-25; A) Chromatograms on Each Irradiation Times; B) Concentration of Starting Material on Each Irradiation Times

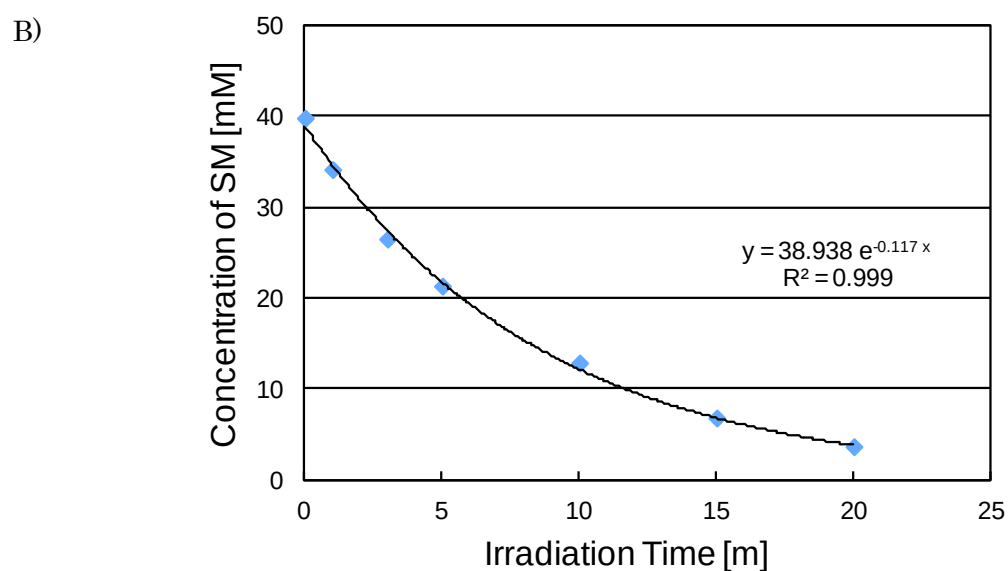
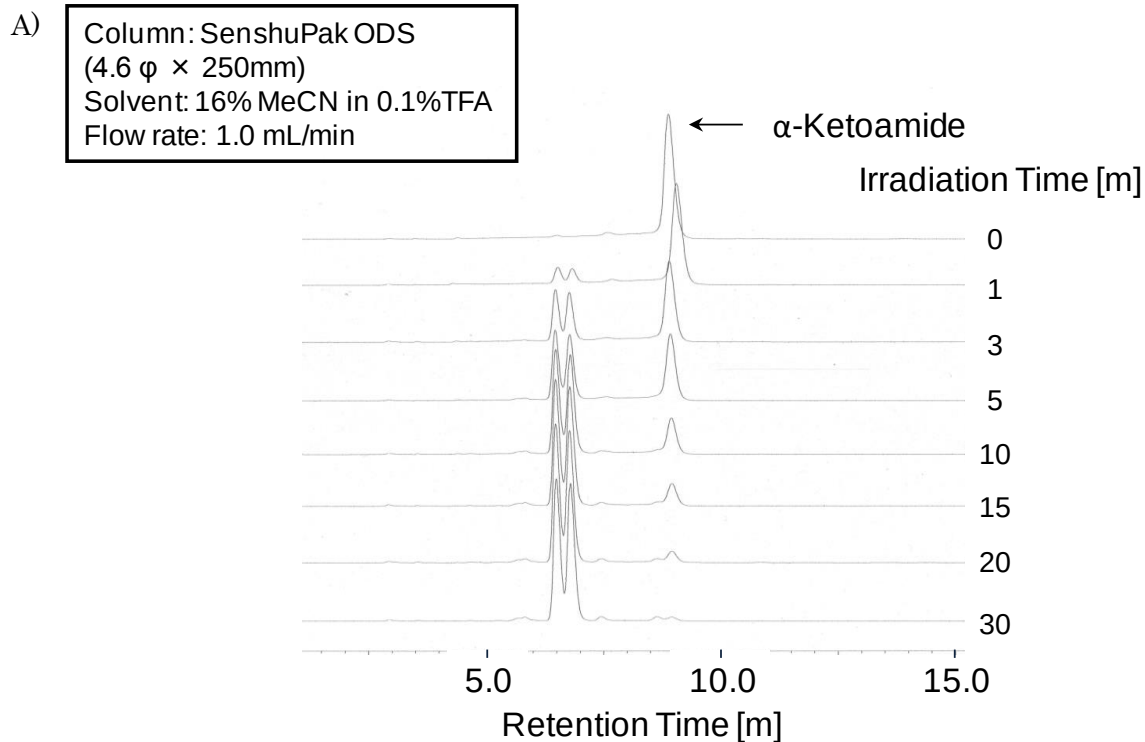
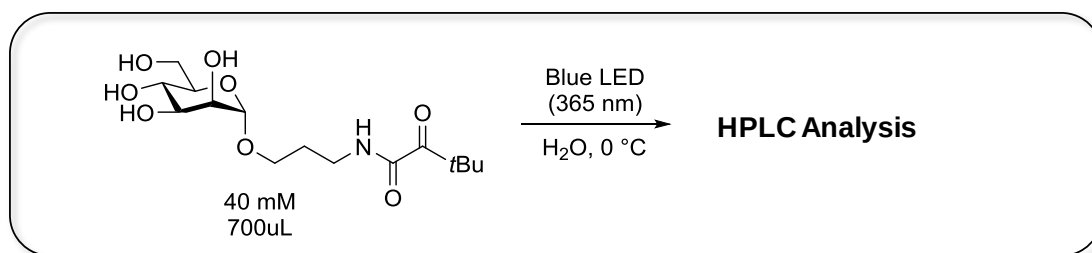


Figure S8. Kinetic Analysis for the Decomposition of Manoside **3-19**; A) Chromatograms on Each Irradiation Times; B) Concentration of Starting Material on Each Irradiation Times

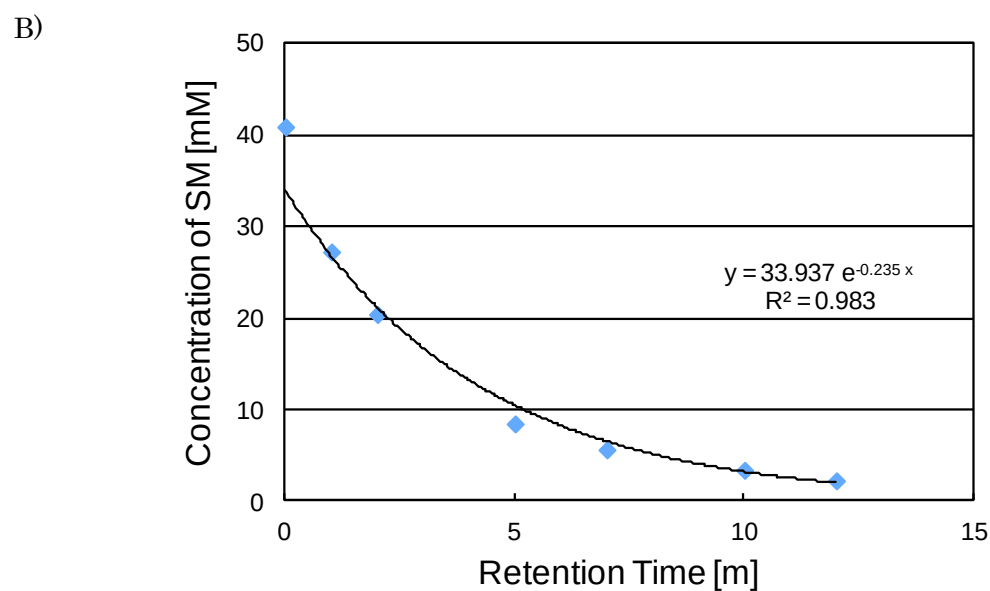
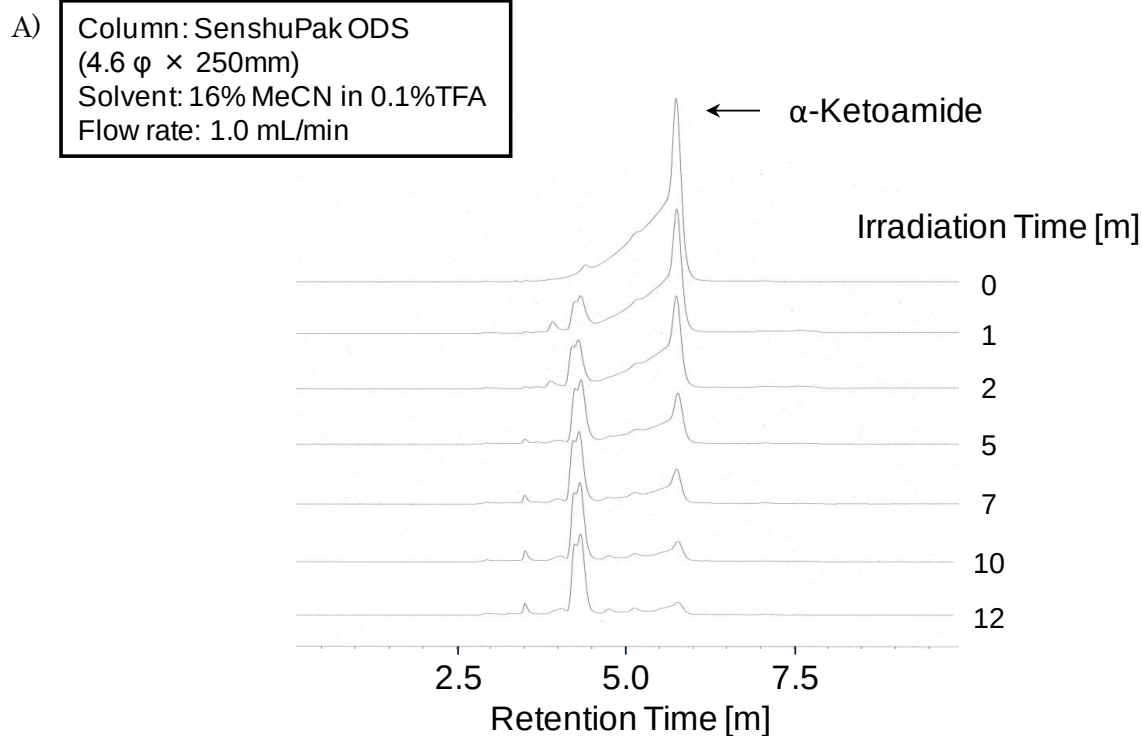
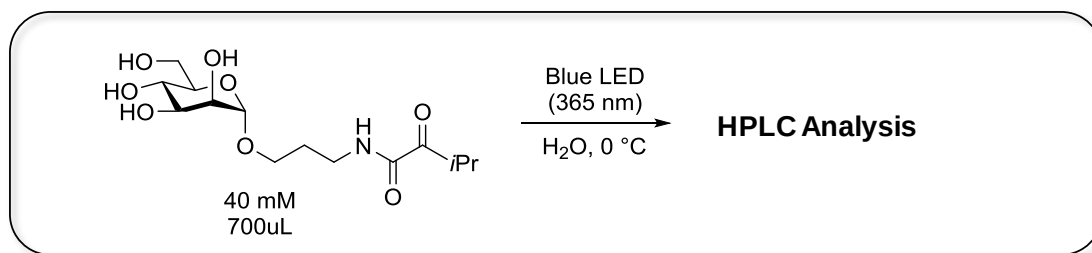


Figure S9. Kinetic Analysis for the Decomposition of Manoside **3-20**; A) Chromatograms on Each Irradiation Times; B) Concentration of Starting Material on Each Irradiation Times

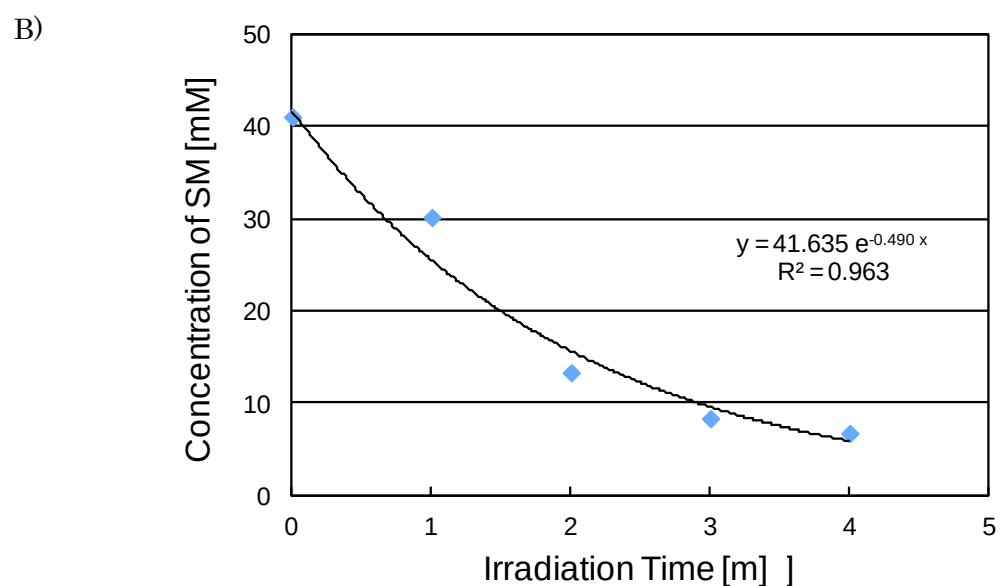
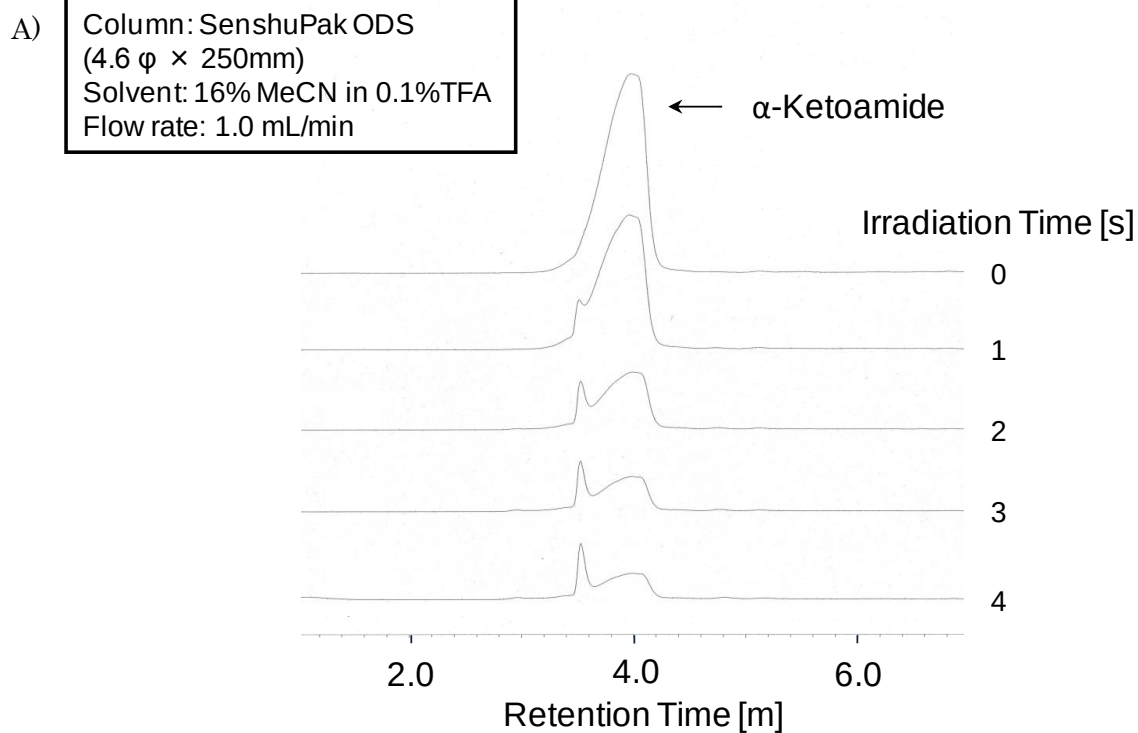
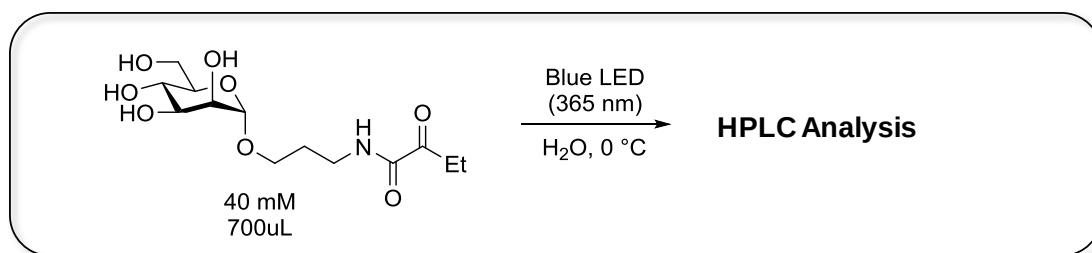


Figure S10. Kinetic Analysis for the Decomposition of Manoside **3-21**; A) Chromatograms on Each Irradiation Times; B) Concentration of Starting Material on Each Irradiation Times.

3. Experimental section for ITC measurement

1) Experimental procedures

The solutions of concanavalin A (purchased from Wako Pure Chemical Industries) were prepared by weight in the buffer A (pH 5.0 acetate buffer containing 1mM MnCl₂ and 1mM CaCl₂). The protein solution was dialyzed for 4h at 0 °C. The dialysis buffer was changed and the solution of Con A was dialyzed for another 5h. The dialysis buffer was changed and the solution of Con A was dialyzed overnight. Solutions of the compounds were prepared in the dialysate. Isothermal titration calorimetry was performed with a GE MicroCal iTC 200. The obtained low data was processed using analyzed with MicroCal Origin softwear. (**Figure S11~S13**)

2) Titration curves

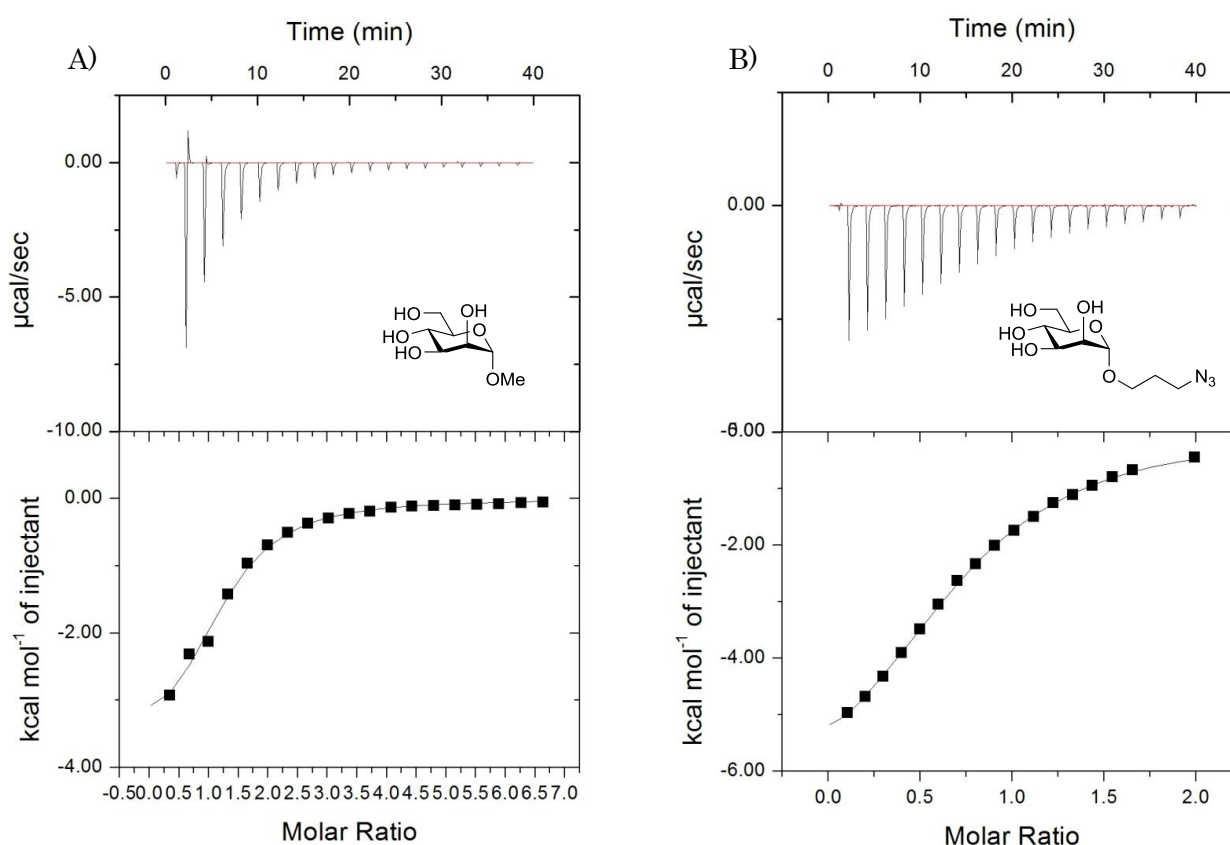


Figure S11. Upper panel represents ITC profiles for the titration of saccharides into a 300 μ M solution of Con A in buffer A at 25°C. Each heat burst curve is the result of a 2 μ L injection from 3 mM solution of saccharides into Con A. Lower panel represents corresponding heat signals versus molar ratio of saccharides to Con A. A) D-methylmannoside; B) 3-22

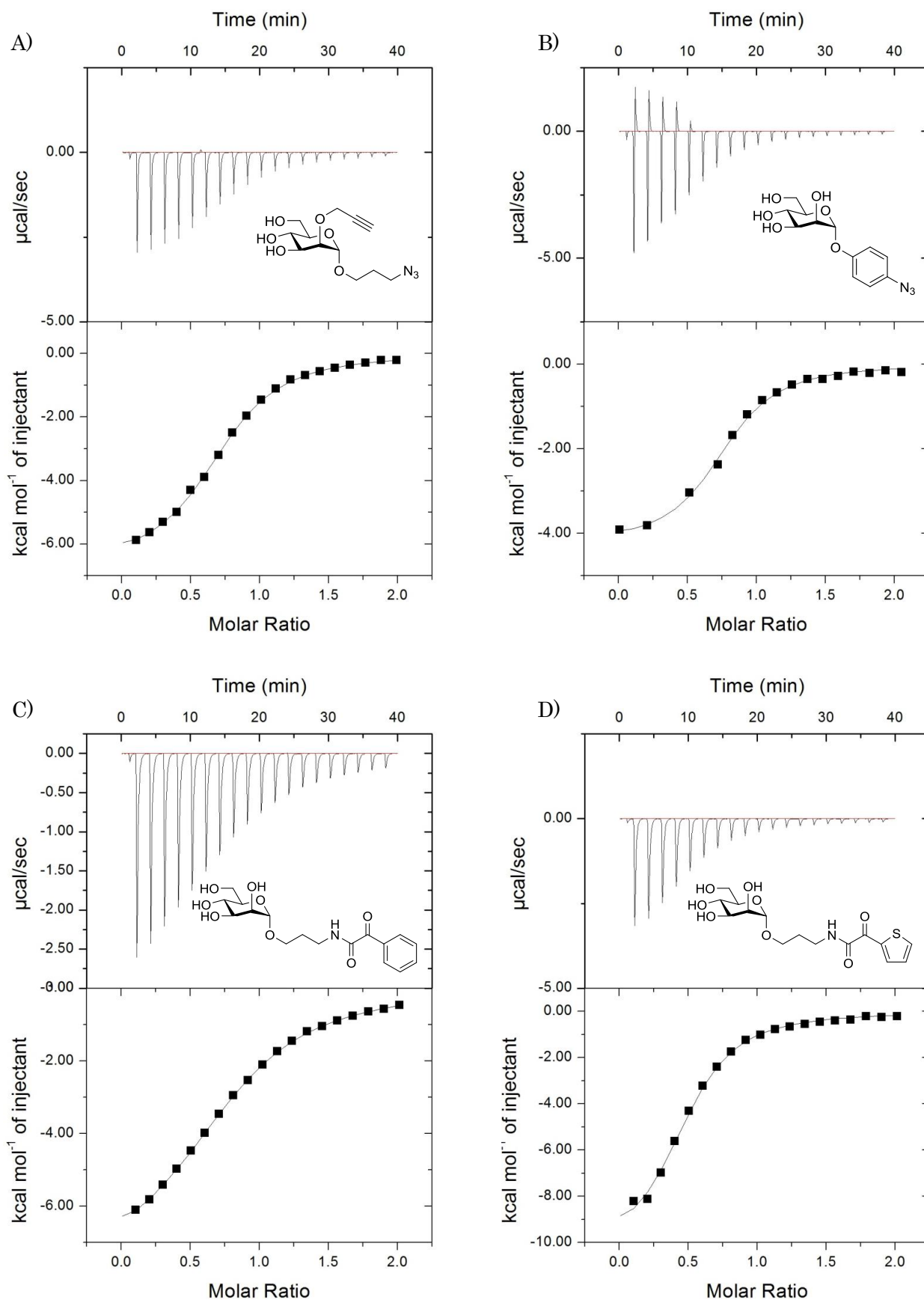


Figure S12. Upper panel represents ITC profiles for the titration of saccharides into a 300 μM solution of Con A in buffer A at 25°C. Each heat burst curve is the result of a 2 μL injection from 3 mM solution of saccharides into Con A. Lower panel represents corresponding heat signals versus molar ratio of saccharides to Con A. A) 3-31; B) ref-3-16; C) 3-24; D) 3-25.

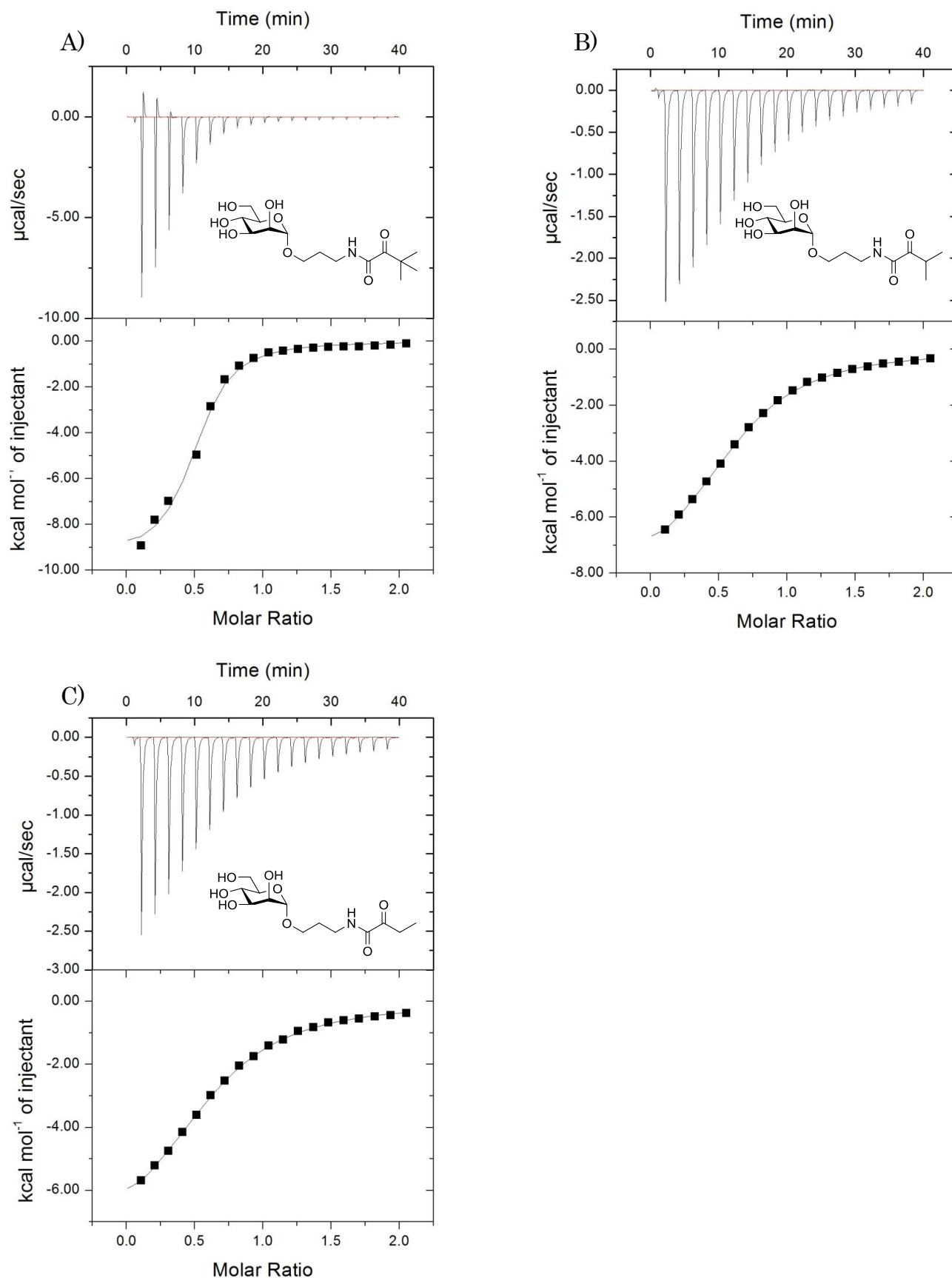
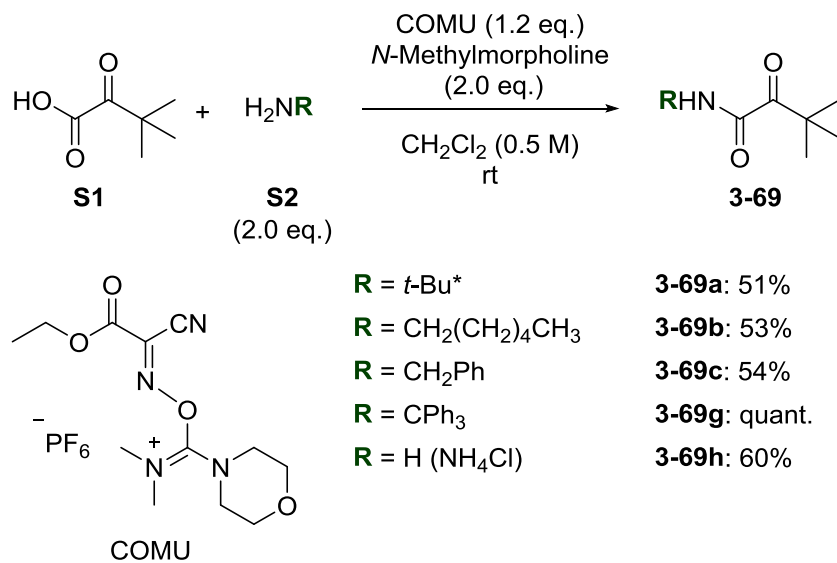


Figure S13. Upper panel represents ITC profiles for the titration of saccharides into a 300 μM solution of Con A in buffer A at 25°C. Each heat burst curve is the result of a 2 μL injection from 3 mM solution of saccharides into Con A. Lower panel represents corresponding heat signals versus molar ratio of saccharides to Con A. A) 3-26; B) 3-27; C) 3-28.

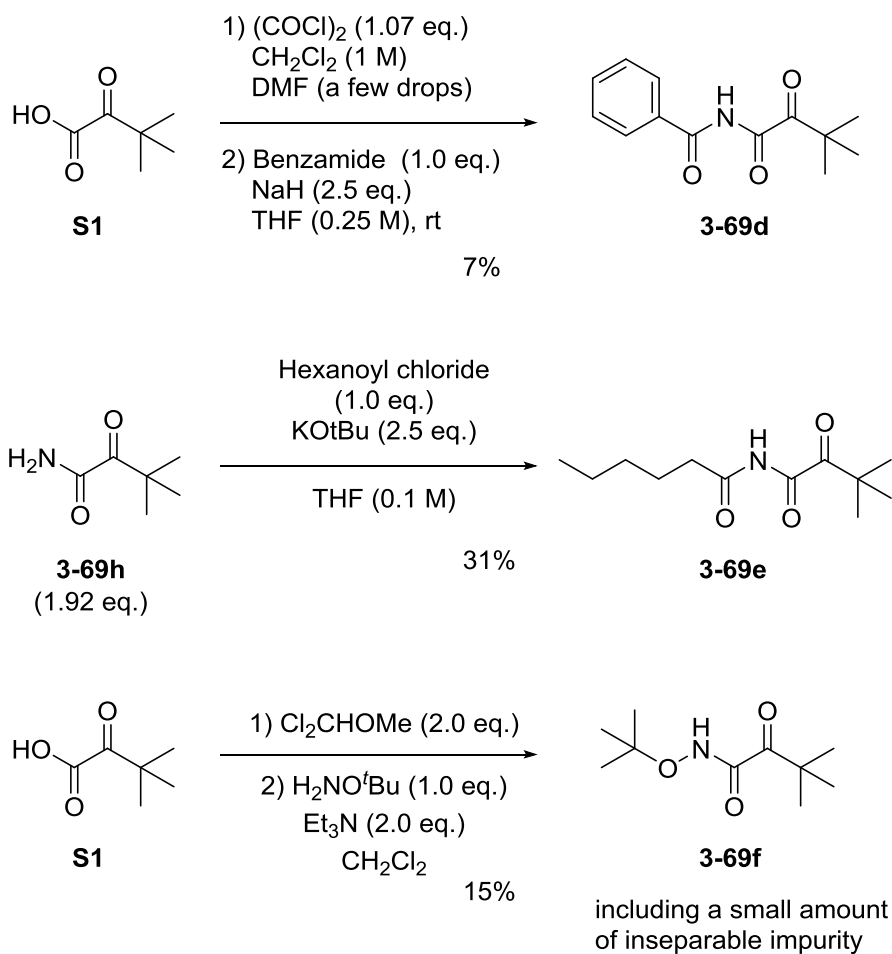
4. Schemes S1~S2: Preparation of substrates 3-69

Scheme S1. Preparation of substrates 3-69a, 3-69b, 3-69c, 3-69g, and 3-69h



*) Reaction concentration: 0.1 M

Scheme S2. Preparation of substrates 3-69d, 3-69e, and 3-69f



5. Experimental section for preparation of **3-69**

1) Experimental procedures

Synthesis of **3-69g** (Typical procedure for synthesis of **3-69a**, **3-69b**, **3-69c**, **3-69g**, and **3-69g**)

To a solution of 3,3-dimethyl-2-oxobutyric acid (**S1**, 133 mg, 1.02 mmol) in CH₂Cl₂ (2 ml) was added *N*-methylmorpholine (224 μ l, 2.04 mmol), trityl amine (530 mg, 2.04 mmol) and COMU (525 mg, 1.23 mmol) sequentially at room temperature. The mixture was stirred for 9 h at the same temperature before quenching with distilled water. The resulting mixture was extracted with CH₂Cl₂ twice. The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give α -ketoamides **3-69g** (332 mg, 87%) as a white amorphous solid.

Synthesis of **3-69d**

To a solution of 3,3-dimethyl-2-oxobutyric acid (**S1**, 500 mg, 3.84 mmol) in CH₂Cl₂ (3.8 ml) was added oxalyl chloride (0.35 ml, 4.11 mmol) and several drops of DMF. After stirring for 2 h, the reaction mixture was evaporated *in vacuo* to give the corresponding acid chloride. To a solution of benzamide (465 mg, 3.84 mmol) in THF (15 ml) was added NaH (60 % dispersion in mineral oil, 384 mg, 9.61 mmol) at 0 °C. After stirring for 30 min, freshly prepared acid chloride was added to the reaction mixture at room temperature. Then, the reaction mixture was stirred for 2 h before quenching with a 1 N aqueous solution of HCl. The resulting mixture was extracted with CH₂Cl₂ twice. The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **3-69d** (63.0 mg, 7%) as a white amorphous solid.

Synthesis of **3-69e**

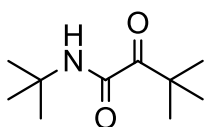
To a solution of 3,3-dimethyl-2-oxobutyramide (**3-69h**, 182 mg, 1.41 mmol) in THF (7 ml) was added hexanoyl chloride (98.8 mg, 734 μ mol) and potassium *tert*-butoxide in THF (1.0 M, 1.76 ml) at 0 °C. The mixture was stirred for 4 h at room temperature before quenching with a saturated aqueous solution of NH₄Cl. The resulting mixture was extracted with EtOAc twice. The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **3-69e** (52.2 mg, 31%, based on hexanoyl chloride) as a colorless oil.

Synthesis of 3-69f

A mixture of 3,3-dimethyl-2-oxobutyric acid (**S1**, 371 mg, 2.85 mmol) and dichloromethyl methyl ether (254 μ l, 2.85 mmol) was stirred for 30 min at 50 °C. The mixture was concentrated *in vacuo*. To a solution of the crude acid chloride in CH_2Cl_2 (285 μ l) was added *O*-(1,1-dimethylethyl)-hydroxylamine hydrochloride (145 mg, 1.15 mmol) and triethylamine (398 μ l, 2.85 mmol). After stirring for 30 min, distilled water and CH_2Cl_2 were added to the reaction mixture. The resulting mixture was extracted with CH_2Cl_2 twice. The combined organic layers were washed with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 , a 1 N aqueous solution of HCl, and brine. The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography, preparative TLC, and gel permeation chromatography (LC-918, Japan Analytical Industry Co.) to give **3-69f** (35.0 mg, 15%) as a mixture with a small amount of some impurities.

2) Compounds data

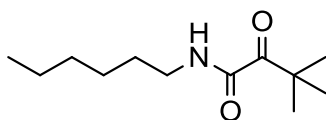
Compound 3-69a



Yield: 98.7 mg (51%), a white amorphous solid (from 137 mg of **S1**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.31 (s, 9H), 1.36 (s, 9H), 6.70 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 26.6 (3C), 28.5 (3C), 43.0, 51.4, 159.6, 204.7; IR (cm^{-1}): 3291, 2973, 1704, 1637, 1558, 1366, 1221, 1077, 869; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{NNaO}_2$, 208.1314; found 208.1323.

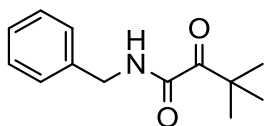
Compound 3-69b



Yield: 104 mg (53%), a colorless oil (from 119 mg of **S1**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.87 (t, J = 6.4 Hz, 3H), 1.25-1.36 (m, 6H), 1.32 (s, 9H), 1.52 (m, 2H), 3.24 (m, 2H), 6.91 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 14.1, 22.6, 26.4 (3C), 26.7, 29.3, 31.5, 39.2, 43.1, 159.9, 203.8; IR (cm^{-1}): 3364, 2958, 2931, 2869, 2860, 1707, 1675, 1521, 1482, 1460, 1366, 1102; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{NNaO}_2$, 236.1627; found 236.1624.

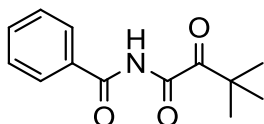
Compound 3-69c



Yield: 91.1 mg (54%), a colorless oil (from 100 mg of **S1**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.36 (s, 9H), 4.45 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 7.22 (br, 1H), 7.25-7.38 (m, 5H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 26.4 (3C), 43.2, 43.3, 127.9, 128.0 (2C), 129.0 (2C), 137.3, 159.7, 203.5; IR (cm^{-1}): 3388, 3315, 1705, 1676, 1516, 1497, 1481, 1456, 1365, 1097, 1077, 950; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NNaO}_2$, 242.1157; found 242.1159.

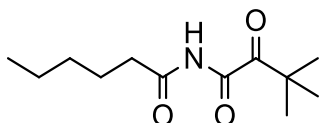
Compound 3-69d



Yield: 63.0 mg (7%), a white amorphous solid (from 500 mg of **S1**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.38 (s, 9H), 7.53 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 7.65 (tt, J = 7.8 Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.87 (dd, J = 7.8, 1.4 Hz, 2H), 9.29 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 26.4 (3C), 42.6, 128.3 (2C), 129.2 (2C), 130.9, 134.1, 165.8, 203.5 (one carbonyl carbon was not observed); IR (cm^{-1}): 3284, 1716, 1703, 1675, 1464, 1304, 1242, 996; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NNaO}_3$, 256.0950; found 256.0948.

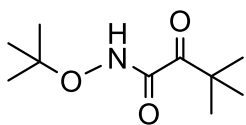
Compound 3-69e



Yield: 52.2 mg (31%), a colorless oil (from 98.8 mg of hexanoyl chloride)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.89 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.29-1.36 (m, 13H), 1.66 (m, 2H), 2.67 (br t, J = 6.9 Hz, 2H), 9.04 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 14.0, 22.5, 23.8, 26.4 (3C), 31.3, 37.3, 42.9, 174.0, 202.4 (one carbonyl carbon was not observed); IR (cm^{-1}): 3267, 2960, 2934, 1734, 1691, 1481, 1464, 1312, 1151, 1049, 998; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NNaO}_3$, 250.1419; found 250.1414.

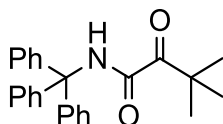
Compound 3-69f



Yield: 35.0 mg (15%) including a small amount of impurity, a white amorphous solid (from 145 mg of **S1**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.29 (s, 9H), 1.33 (s, 9H), 8.72 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 26.2 (3C), 26.4 (3C), 43.5, 83.2, 158.9, 204.0; IR (cm^{-1}): 3191, 3010, 2974, 1706, 1653, 1367, 1182, 994, 885; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NNaO}_2$, 224.1263; found 224.1261.

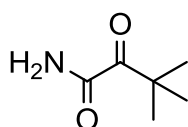
Compound 3-69g



Yield: 332 mg (87%), a white amorphous solid (from 133 mg of **S1**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.28 (s, 9H), 7.16-7.19 (m, 6H), 7.25-7.33 (m, 9H), 8.08 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 26.4 (3C), 43.1, 70.6, 127.4 (3C), 128.2 (6C), 128.7 (6C), 144.0 (3C), 159.5, 204.5; IR (cm^{-1}): 3391, 3090, 2966, 1693, 1490, 1480, 1075, 908; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{NNaO}_2$, 394.1783; found 394.1784.

Compound 3-69h



Yield: 122 mg (72%), a white amorphous solid (from 139 mg of **S1**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.34 (s, 9H), 5.32 (br s, 1H), 6.74 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 26.3 (3C), 42.9, 162.9, 203.5; IR (cm^{-1}): 3395, 2935, 1686, 1057, 1002; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NNaO}_2$, 152.0688 ; found 152.0689.

6. Experimental section for irradiation of 3-69

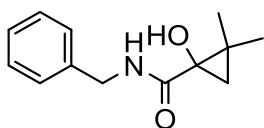
1) Experimental procedures

Photo-reaction of 3-69e (Typical procedure for photo-reaction of 3-69a~3-69g)

A degassed 80 mM solution of **3-69e** in MeOH (700 μ l) was irradiated with 365 nm blue LED as described in Figure S1. Irradiation was continued until starting material was consumed (3 h for **3-69e**). The crude material was purified with silica gel column chromatography to give cyclopropanol **3-70e** (7.4 mg, 71%) as a white amorphous solid.

2) Compounds data

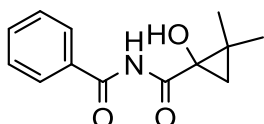
Compound 3-70c



Yield: 1.6 mg (13%), a colorless oil (from 12 mg of **3-69c**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.74 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 1.23 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.50 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 2.60 (br s, 1H), 4.47 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 7.13 (br s, 1H), 7.25-7.36 (m, 5H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 19.5, 21.1, 26.9, 27.9, 43.7, 63.2, 127.6, 128.0 (2C), 128.8 (2C), 138.7, 172.5; IR (cm^{-1}): 3350, 2945, 2925, 1642, 1523, 1497, 1454, 1181; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NNaO}_2$, 242.1157; found 242.1167.

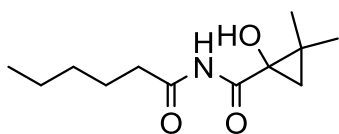
Compound 3-70d



Yield: 3.7 mg (28%), a colorless oil (from 13.1 mg of **3-69d**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.93 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 1.12 (s, 3H), 1.34 (s, 3H), 1.48 (m, 1H), 4.96 (br s, 1H), 7.44 (m, 2H), 7.57 (m, 1H), 7.84 (m, 2H), 9.73 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 19.7, 20.5, 27.5, 29.0, 64.1, 128.0 (2C), 129.1 (2C), 132.7, 133.4, 165.9, 173.2; IR (cm^{-1}): 3373, 2945, 2914, 1734, 1465, 1445, 1227, 1112; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NNaO}_3$, 256.0950; found 256.0956.

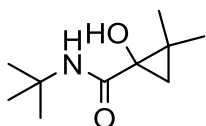
Compound 3-70e



Yield: total 8.0 mg (31%), a colorless oil (from 12.7 mg of **3-69e**: 2 batches)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.88 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.89 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 1.14 (s, 3H), 1.30 (s, 3H), 1.31-1.36 (m, 4H), 1.51 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 1.65 (m, 2H), 2.72 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 3.71 (br s, 1H), 9.15 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 14.1, 19.3, 20.7, 22.5, 24.1, 28.3, 29.1, 31.4, 37.5, 63.5, 172.2, 175.3; IR (cm^{-1}): 3349, 2957, 2933, 2873, 1749, 1696, 1658, 1467, 1380, 1294, 1226, 1207, 1169; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NNaO}_3$, 250.1419; found 250.1416.

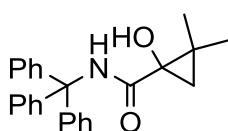
Compound 3-70a



Yield: 7.4 mg (71%), a colorless oil (from 10.4 mg of **3-69a**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.65 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 1.16 (s, 3H), 1.25 (s, 3H), 1.36 (s, 9H), 1.41 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 2.71 (br s, 1H), 6.65 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 19.2, 21.1, 26.1, 26.8, 29.0 (3C), 51.0, 63.5, 171.6; IR (cm^{-1}): 3329, 2973, 2928, 1653, 1522, 1457, 1366, 1218, 1182; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{NNaO}_2$, 208.1314; found 208.1323.

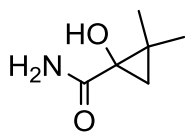
Compound 3-70g



Yield: 10.5 mg (50%), a colorless oil (from 20.8 mg of **3-69g**): 10.2 mg (49%) recovery of **3-69g**

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.63 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 1.08 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.40 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 2.62 (br s, 1H), 7.20-7.31 (m, 15H), 8.10 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 19.3, 21.1, 27.0, 27.4, 64.0, 70.3, 127.1 (3C), 128.0 (6C), 128.9 (6C), 145.1 (3C), 171.2; IR (cm^{-1}): 3388, 3087, 3056, 3021, 3007, 2945, 2869, 1663, 1490, 1451, 1285, 1247, 1213, 1185, 1112; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{NNaO}_2$, 394.1783; found 394.1797.

Compound 3-70h

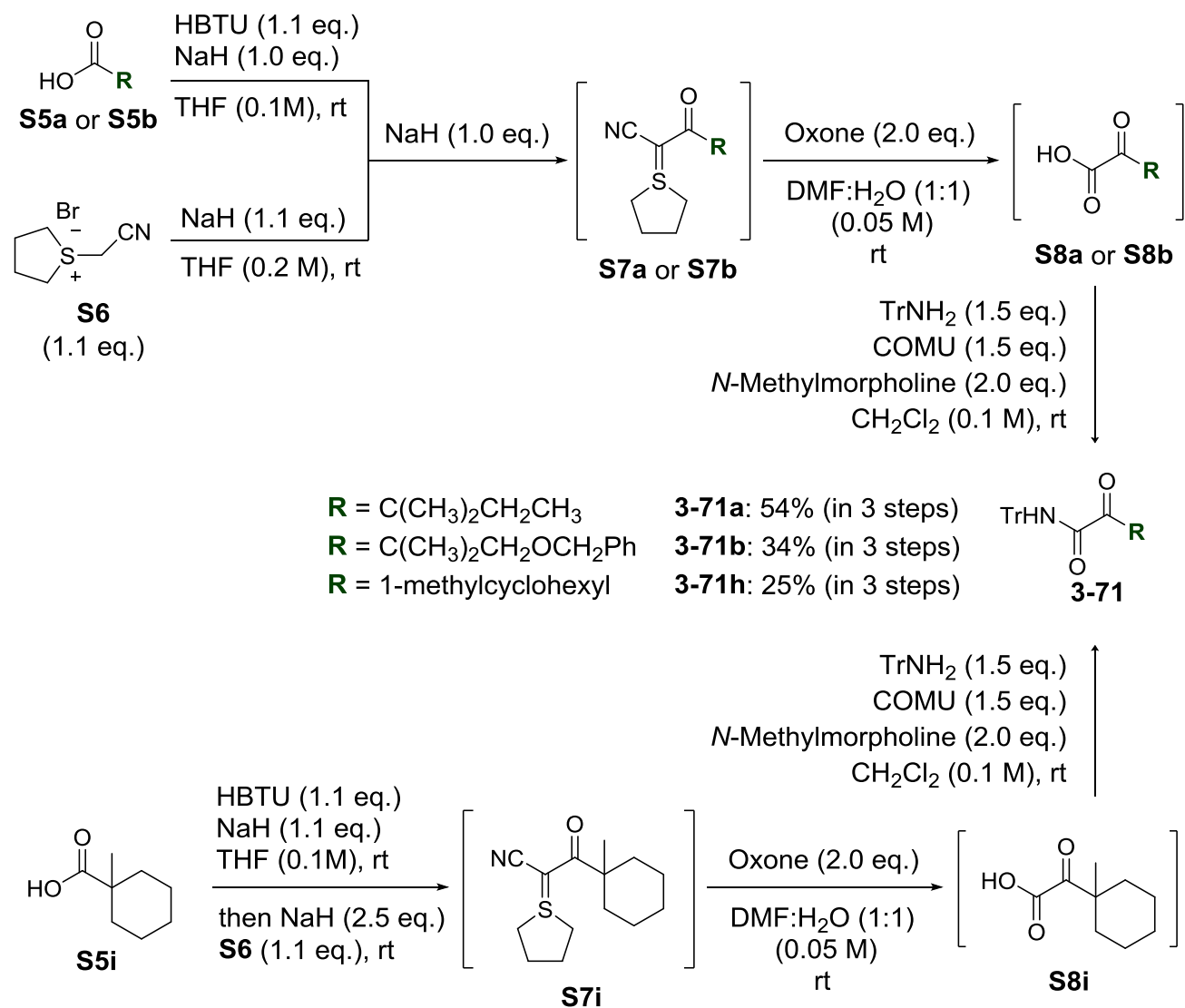


Yield: 6.8 mg (94%), a white amorphous solid (from 7.2 mg of **3-69h**)

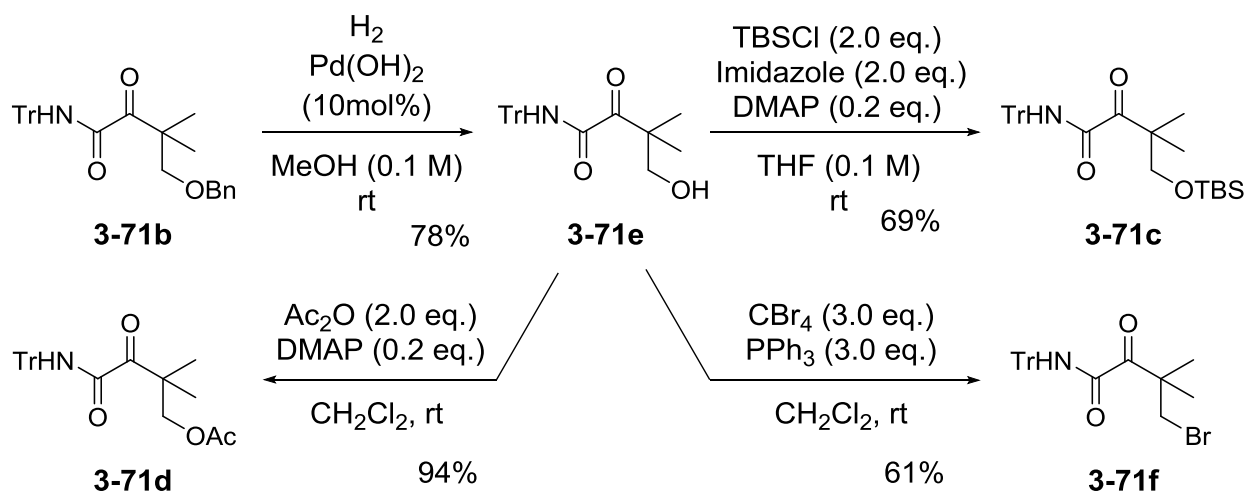
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.77 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 1.22 (s, 3H), 1.29 (s, 3H), 1.48 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 2.60 (br s, 1H), 5.50 (br s, 1H), 6.72 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 19.7, 21.5, 27.3, 27.7, 63.0, 179.0; IR (cm^{-1}): 3440, 3382, 3202, 2987, 2945, 1624, 1420, 1319, 1187, 1117, 1101, 907; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NNaO}_2$, 152.0688; found 152.0691.

7. Schemes S3~S5: Preparation of substrates 3-71

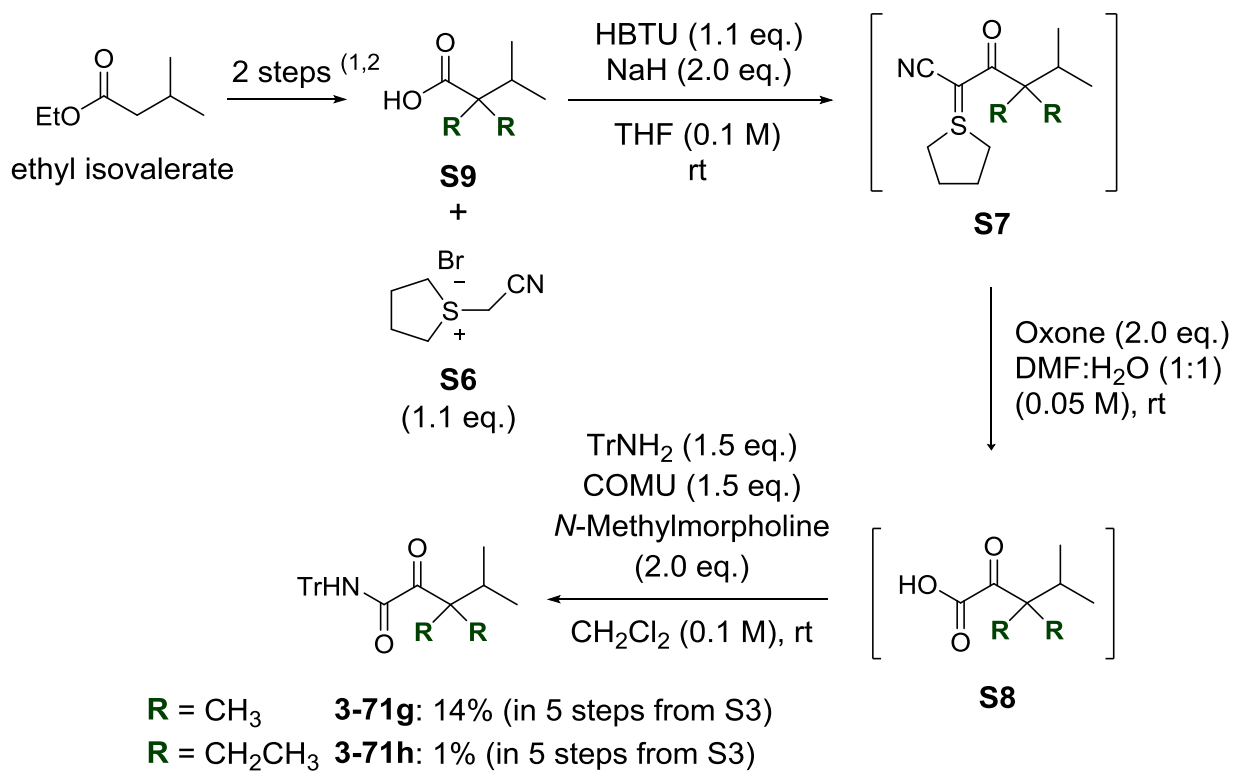
Scheme S3. Preparation of substrates 3-71a, 3-71b and 3-71i



Scheme S4. Preparation of substrates **3-71c**, **3-71d**, **3-71e**, and **3-71f**



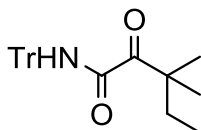
Scheme S5. Preparation of substrates **3-71g** and **3-71h**



8. Experimental section for preparation of 3-71

Sulfur ylide **S7** and α -ketoacid **S8** were prepared by the modified method described in the literature.³

Synthesis of 3-71a



To a solution of 2,2-dimethyl-butanoic acid (**S5a**, 300 mg, 2.58 mmol) in THF (24 ml) was added HBTU (1.08 g, 2.84 mmol) and NaH (60 % dispersion in mineral oil, 103 mg, 2.58 mmol) at 0 °C, and the resulting mixture **A** was stirred for 1 h at room temperature. In a different flask, to a solution of **S6** (591 mg, 2.84 mmol) in THF (12 ml) was added NaH (60 % dispersion in mineral oil, 114 mg, 2.84 mmol) at 0 °C, and the resulting mixture **B** was stirred for 1 h at room temperature. Then, to the mixture **A** was added the mixture **B**. After stirring for 10 min, NaH (60 % dispersion in mineral oil, 103 mg, 2.58 mmol) was added furthermore. After stirring at room temperature for 7 h, the reaction was quenched with distilled water. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* to remove THF, and the resulting residue was extracted with CH₂Cl₂ twice. The combined organic layers were washed with a saturated aqueous solution of NH₄Cl, dried over MgSO₄, and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give sulfur ylide **S7a** (637.4 mg) as a mixture with some impurities.

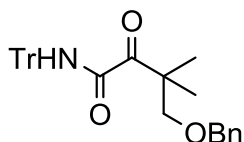
To a solution of **S7a** in DMF-H₂O (v/v = 1:1, 51 ml) was added Oxone (3.18 g, 5.17 mmol) at room temperature. After stirring for 3 h, a 1 N aqueous solution of HCl and EtOAc were added. The organic layer was separated and washed with a 1 N aqueous solution of HCl. The combined aqueous layers were extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated *in vacuo* to give a mixture containing **S8** (yield calculated by NMR: 267 mg, 1.91 mmol). The resulting residue was used for the next step without further purification.

To a solution of crude **S8a** in CH₂Cl₂ (20 ml) was added *N*-methylmorpholine (420 μ l, 3.82 mmol), trityl amine (991 mg, 3.82 mmol), and COMU (982 mg, 2.29 mmol) sequentially at room temperature. The mixture was stirred for 10 h at the same temperature before quenching with distilled water. The resulting mixture was extracted with CH₂Cl₂ twice. The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give α -ketoamide **3-71a** (539.3 mg, 54% in 3 steps) as a white amorphous solid.

³ Ju, L.; Lippert, A. R.; Bode, J. W., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4253-4255

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.76 (t, J = 7.6 Hz, 3H), 1.23 (s, 6H), 1.83 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 7.16-7.20 (m, 6H), 7.24-7.33 (m, 9H), 8.11 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 9.46, 24.0 (2C), 32.3, 47.2, 70.6, 127.4 (3C), 128.2 (6C), 128.7 (6C), 144.1 (3C), 159.5, 204.8; IR (cm^{-1}): 3391, 3087, 3052, 3021, 2966, 2925, 2873, 1692, 1490, 1473, 1448, 1077; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{NNaO}_2$, 408.1940; found 408.1941.

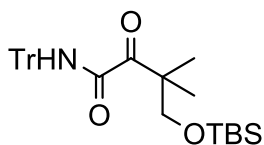
Synthesis of 3-71b



α -Ketoamide **3-71b** was prepared by the similar procedure with preparation of **3-71a** as described above. **Yield:** 417 mg (34% in 3 steps), a white amorphous solid (3.05 g of **S3b** was converted to 1.38 g of **S8b**. Among them, 229 mg of **S8b** was converted to **3-71b**.)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.26 (s, 6H), 3.79 (s, 2H), 4.43 (s, 2H), 7.16-7.20 (m, 6H), 7.22-7.33 (m, 9H), 8.12 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 22.5 (2C), 48.0, 70.4, 73.2, 77.4, 127.3 (2C), 127.4 (3C), 127.6, 128.2 (6C), 128.4 (2C), 128.7 (6C), 138.3, 144.1 (3C), 159.5, 202.6; IR (cm^{-1}): 3395, 3087, 3059, 3025, 2973, 2925, 2862, 1694, 1590, 1490, 1444, 1379, 1365, 1313, 1206, 1154, 1095, 1074, 1026, 1002, 946, 898, 812, 801, 748, 697, 626; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{NNaO}_3$, 500.2202; found 500.2207.

Synthesis of 3-71c

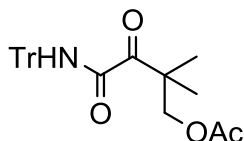


To a solution of **3-71e** (31.1 mg, 80.3 μmol) in THF (0.58 ml) was added TBSCl (2.43 mg, 161 μmol), imidazole (11.0 mg, 161 μmol), and DMAP (2.0 mg, 16.1 μmol) sequentially at room temperature. After stirring for 9 h, the solvent was removed *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography to give **3-71c** (28.0 mg, 69%) as a white amorphous solid.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ -0.01 (s, 6H), 0.83 (s, 9H), 1.21 (s, 6H), 3.94 (s, 2H), 7.16-7.20 (m, 6H), 7.23-7.32 (m, 9H), 8.09 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ -5.42 (2C), 18.3, 21.8 (2C), 26.0 (3C), 49.4, 70.3, 70.5, 127.4 (3C), 128.2 (6C), 128.8 (6C), 144.1 (3C), 159.5, 202.8; IR (cm^{-1}): 3391, 2956, 2925, 1696, 1490, 1473, 1448, 1099, 1071, 836; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for

C₃₁H₃₉NNaO₃Si, 524.2597; found 524.2599.

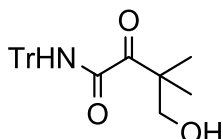
Synthesis of 3-71d



To a solution of **3-71e** (26.9 mg, 69.4 μ mol) in CH₂Cl₂ (0.43 ml) was added Ac₂O (13.1 μ L, 139 μ mol) and DMAP (1.7 mg, 13.9 μ mol) at room temperature. After stirring for 9 h, the mixture was concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **3-71d** (28.1 mg, 94%) as a white amorphous solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.28 (s, 6H), 2.00 (s, 3H), 4.39 (s, 2H), 7.16-7.19 (m, 6H), 7.25-7.33 (m, 9H), 8.12 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.9, 22.1 (2C), 46.8, 70.7, 77.4, 127.5 (3C), 128.3 (6C), 128.7 (6C), 144.0 (3C), 159.0, 170.7, 201.4; IR (cm⁻¹): 3395, 3056, 3021, 2921, 1743, 1694, 1489, 1475, 1448, 1237, 1074, 1035; HRMS-ESI (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₂₇H₂₇NNaO₄, 452.1838; found 452.1839.

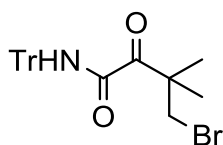
Synthesis of 3-71e



To a solution of **3-71b** (1.91 g, 4.00 mmol) in MeOH (300 ml) was added Pd(OH)₂/C (Aldrich 212911, 56 mg) at room temperature. The mixture was stirred under hydrogen atmosphere for 3.5 h. Then, Pd(OH)₂/C (Aldrich 212911, 112 mg) was added furthermore. After stirring under hydrogen atmosphere for additional 2 h, the reaction mixture was filtered through Celite[®] and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **3-71e** (1.20 g, 78%) as a white amorphous solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.25 (s, 6H), 2.86 (br s, 1H), 3.70 (br s, 2H), 7.15-7.20 (m, 6H), 7.26-7.34 (m, 9H), 8.09 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 21.7 (2C), 49.1, 69.3, 70.9, 127.6 (3C), 128.3 (6C), 128.7 (6C), 143.8 (3C), 160.6, 203.4; IR (cm⁻¹): 3391, 3084, 3059, 3018, 2973, 2935, 2873, 1690, 1491, 1472, 1448, 1213, 1185, 1161, 1073, 1036; HRMS-ESI (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₂₅H₂₅NNaO₃, 410.1732; found 410.1725.

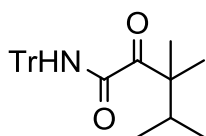
Synthesis of 3-71f



To a solution of **3-71e** (100 mg, 258 μmol) in CH_2Cl_2 (5 ml) was added CBr_4 (257 mg, 774 μmol) and PPh_3 (203 mg, 774 μmol) at room temperature. After stirring for 1.5 h, the solvent was removed *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography to give **3-71f** (71.0 mg, 61%) as a white amorphous solid.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.38 (s, 6H), 3.86 (s, 2H), 7.18-7.22 (m, 6H), 7.27-7.35 (m, 9H), 8.17 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 24.1 (2C), 40.5, 48.3, 70.7, 127.5 (3C), 128.3 (6C), 128.8 (6C), 143.9 (3C), 158.4, 200.4; IR (cm^{-1}): 3392, 3053, 3025, 2974, 1695, 1490, 1471, 1447, 1423, 1250, 1068; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{BrNNaO}_2$, 472.0888 and 474.0868; found 472.0884 and 474.0865.

Synthesis of 3-71g



Carboxylic acid **S5g** was prepared according to the literature procedure from ethyl isovalerate (1.66 ml, 11.1 mmol).^{4,5}

To a solution of the crude **S5g** (approx. 6.32 mmol) in THF (77 ml) was added HBTU (2.64 g, 6.95 mmol) and NaH (60 % dispersion in mineral oil, 278 mg, 6.95 mmol) at 0 $^\circ\text{C}$. After stirring for 30 min at room temperature, **S6** and NaH (60 % dispersion in mineral oil, 623 mg, 15.8 mmol) was added to the reaction mixture at 0 $^\circ\text{C}$. After stirring for 2 h, the reaction was quenched with distilled water. The resulting mixture was extracted with EtOAc twice. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO_4 , and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give sulfur ylide **S7g** (698.2 mg) as a mixture with some impurities.

To a solution of the crude ylide **S7g** (698.2 mg) in DMF- H_2O (v/v = 1:1, 58 ml) was added Oxone (3.59 g, 5.83 mmol) at room temperature. After stirring for overnight, a 1 N aqueous solution of HCl and EtOAc were added to the reaction mixture. The organic layer was separated and washed with a 1

⁴ Hickey, E. R.; Liu, W.; Sun, S.; Ward, Y. D.; Young, E. R. R. US20040180886A1, 2004.

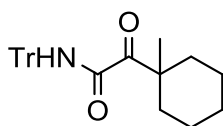
⁵ Giri, R.; Lan, Y.; Liu, P.; Houk, N. K.; Yu, J. -Q. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 14118–26.

N aqueous solution of HCl twice. The combined aqueous layers were extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated *in vacuo* to give a mixture containing **S8g** (yield calculated by NMR: 190 mg, 1.2 mmol). The resulting residue was used for the next step without further purification.

To a solution of crude α -ketoacid (**S8g**, 190 mg, 1.20 mmol) in CH₂Cl₂ (12 ml) was added *N*-methylmorpholine (264 μ l, 2.40 mmol), trityl amine (622 mg, 2.40 mmol), and COMU (617 mg, 1.44 mmol) sequentially at room temperature. The mixture was stirred for 5 h at the same temperature before quenching with a distilled water. The resulting mixture was extracted with CH₂Cl₂ twice. The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give α -ketoamides **3-71g** (311.6 mg, 14% in 5 steps) as a white amorphous solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.78 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H), 1.14 (s, 6H), 2.68 (septet, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.16-7.20 (m, 6H), 7.24-7.33 (m, 9H), 8.18 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 17.8 (2C), 20.3 (2C), 32.5, 50.2, 70.5, 127.4 (3C), 128.2 (6C), 128.7 (6C), 144.1 (3C), 159.4, 204.9; IR (cm⁻¹): 3388, 3087, 3059, 3025, 2959, 2873, 1693, 1489, 1448, 1393, 1379, 1075; HRMS-ESI (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₂₇H₂₉NNaO₂, 422.2096; found 422.2102.

Compound 3-71i



To a solution of 1-methyl-1-cyclohexanecarboxylic acid (**S5i**, 800 mg, 5.63 mmol) in THF (68 ml) was added HBTU (2.35 g, 6.20 mmol) and NaH (60 % dispersion in mineral oil, 248 mg, 6.20 mmol) at room temperature. After stirring for 1 h, **S6** (1.76 g, 8.44 mmol) and NaH (60 % dispersion in mineral oil, 564 mg, 14.1 mmol) were added at room temperature. After stirring for 12 h, the reaction was quenched with distilled water. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* to remove THF, and the resulting residue was extracted with EtOAc twice. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give sulfur ylide **S7i** (2.32 g) as a mixture with impurities.

To a solution of **S7i** (1.50 g) in DMF-H₂O (v/v = 1:1, 73 ml) was added Oxone (4.47 g, 7.28 mmol) at room temperature. After stirring for overnight, a 1 N aqueous solution of HCl and EtOAc were added. The organic layer was separated and washed with a 1 N aqueous solution of HCl. The combined aqueous layers were extracted with EtOAc twice. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated *in vacuo* to give a mixture containing **S8h**

(1.38 g). The resulting residue was used for the next step without further purification.

To a solution of crude **S8i** (798 mg) in CH₂Cl₂ (25 ml) was added *N*-methylmorpholine (473 μ l, 4.20 mmol), trityl amine (1.09 g, 4.20 mmol), and COMU (1.08 g, 2.52 mmol) sequentially at room temperature. The mixture was stirred for 5.5 h at the same temperature before quenching with distilled water. The resulting mixture was extracted with CH₂Cl₂ twice. The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give α -ketoamide **3-71i** (216 mg, 25% in 3 steps) as a white amorphous solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.29-1.61 (m, 8H), 1.31 (s, 3H), 2.17-2.24 (m, 2H), 7.17-7.21 (m, 6H), 7.25-7.34 (m, 9H), 8.06 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 23.1 (2C), 24.3, 26.1, 34.8 (2C), 47.5, 70.6, 127.4 (3C), 128.2 (6C), 128.7 (6C), 144.1 (3C), 159.9, 205.1; IR (cm⁻¹): 3391, 3021, 2933, 2855, 1690, 1490, 1448, 1071; HRMS-ESI (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₂₈H₂₉NNaO₂, 434.2096; found 434.2099.

9. Experimental section for Irradiation of **3-71**

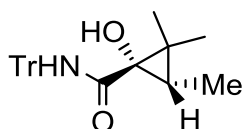
1) Experimental procedures

Photo-reaction of **3-71a** (Typical procedure for photo-reaction of **3-71a~3-71i**)

A degassed 80 mM solution of **3-71a** in 2-BuOH (700 μ l) was irradiated with blue LED as described in Figure S1. Irradiation was continued until starting material was consumed (12 h for **3-71a**). After the mixture was concentrated *in vacuo*, “NMR yield” of the desired cyclopropanol was calculated by ^1H NMR spectrum of the crude material using CH_2Br_2 as an internal standard. The residue was purified with silica gel column chromatography to give cyclopropanol *syn*-**3-75a** (17 mg, 80%) and *anti*-**3-75a** (3.7 mg, 17%).

2) Compounds data

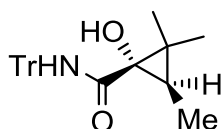
Compound *syn*-**3-75a**



Yield: 17.3 mg (80%), a colorless oil (from 21.6 mg of **3-71a**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.96 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 1.065 (s, 3H), 1.069 (s, 3H), 1.52 (q, J = 6.4 Hz, 1H), 2.21 (br s, 1H), 7.19-7.30 (m, 15H), 8.10 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 6.84, 14.9, 20.9, 26.6, 28.4, 64.3, 70.4, 127.1 (3C), 128.0 (6C), 128.9 (6C), 145.2 (3C), 171.5; IR (cm^{-1}): 3405, 3059, 3025, 2980, 2942, 1714, 1700, 1659, 1597, 1491, 1447, 1204, 1182, 949; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{NNaO}_2$, 408.1940; found 408.1948.

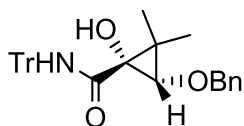
Compound *anti*-**3-75a**



Yield: 3.7 mg (17%), a colorless oil (from 21.6 mg of **3-71a**)

^1H NMR (400 MHz, C_6D_6) δ 0.73 (q, J = 6.4 Hz, 1H), 1.10 (s, 3H), 1.21 (d, J = 6.4 Hz 3H), 1.23 (s, 3H), 7.02 (m, 3H), 7.09 (m, 6H), 7.40 (m, 6H), 8.23 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 7.95, 14.8, 22.9, 30.1, 35.4, 63.8, 70.4, 127.0 (3C), 128.0 (6C), 128.9 (6C), 145.3 (3C), 170.8; IR (cm^{-1}): 3384, 3056, 2949, 2921, 1662, 1490, 1447, 1220, 1165, 1116, 1099, 1081; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{NNaO}_2$, 408.1940; found 408.1937.

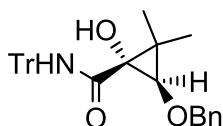
Compound *syn*-3-75b



Yield: 23.5 mg (88%), a colorless oil (from 26.8 mg of **3-71b**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.11 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 2.33 (br, 1H), 3.58 (s, 1H), 4.51 (d, $J = 11.5$, 1H), 4.66 (d, $J = 11.5$, 1H), 7.14-7.40 (m, 15H), 7.94 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 14.1, 18.7, 29.8, 61.7, 66.6, 70.3, 73.9, 127.1 (3C), 128.0 (6C), 128.6, 128.8 (2C), 128.9 (6C), 129.0 (2C), 137.2, 145.1 (3C), 169.7; IR (cm^{-1}): 3409, 3059, 3021, 3007, 2921, 2866, 1684, 1490, 1448, 1230, 1216, 1178, 1154, 1095, 1078, 1029; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for, $\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{NNaO}_3$, 500.2202; found 500.2202.

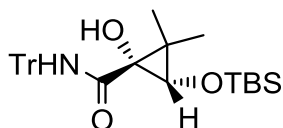
Compound *anti*-3-75b



Yield: 3.2 mg (12%), a colorless oil (from 26.8 mg of **3-71b**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.17 (s, 3H), 1.18 (s, 3H), 3.46 (s, 1H), 4.58 (s, 2H), 7.09-7.33 (m, 15H), 8.25 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 14.7, 19.4, 29.6, 63.1, 70.6, 70.9, 74.5, 127.1 (3C), 128.0 (6C), 128.1, 128.6 (2C), 128.70 (6C), 128.76 (2C), 136.2, 144.6 (3C), 171.0; IR (cm^{-1}): 3333, 3059, 3025, 2928, 2866, 1666, 1524, 1496, 1448, 1271, 1237, 1213, 1192, 1171, 1119, 1095; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for, $\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{NNaO}_3$, 500.2202; found 500.2197.

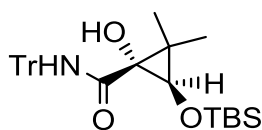
Compound *syn*-3-75c



Yield: 19.1 mg (68%), a colorless oil (from 28.1 mg of **3-71c**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.10 (s, 3H), 0.11 (s, 3H), 0.91 (s, 9H), 1.07 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 2.62 (s, 1H), 3.59 (s, 1H), 7.20-7.32 (m, 15H), 8.08 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ -5.02, -4.89, 14.0, 18.3, 18.4, 25.9 (3C), 29.4, 60.67, 60.70, 70.3, 127.0 (3C), 128.0 (6C), 128.9 (6C), 145.2 (3C), 169.9; IR (cm^{-1}): 3519, 3416, 3059, 3021, 2949, 2925, 2852, 1676, 1491, 1472, 1447, 1254, 1150; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for, $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{NNaO}_3\text{Si}$, 524.2597; found 524.2599.

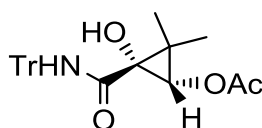
Compound *anti*-3-75c



Yield: 3.1 mg (11%), a colorless oil (from 28.1 mg of **3-71c**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ -0.01 (s, 3H), 0.03 (s, 3H), 0.84 (s, 9H), 1.15 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.86 (br, 1H), 3.51 (s, 1H), 7.20-7.31 (m, 15H), 8.13 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ -5.42, -4.72, 14.9, 18.7, 19.1, 25.8 (3C), 29.2, 62.6, 66.1, 70.9, 127.0 (3C), 128.0 (6C), 128.9 (6C), 144.6 (3C), 171.8; IR (cm^{-1}): 3322, 3059, 3021, 2956, 2925, 2855, 1669, 1521, 1507, 1491, 1472, 1448, 1254, 1146, 1095; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for, $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{NNaO}_3\text{Si}$, 524.2597; found 524.2593.

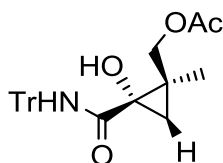
Compound *syn*-3-75d



Yield: 1.2 mg (4%), a colorless oil (from 24.1 mg of **3-71d**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.14 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.71 (s, 1H), 4.11 (s, 1H), 7.19-7.31 (m, 15H), 8.05 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 14.1, 18.2, 20.7, 29.1, 61.8, 62.0, 70.5, 127.2 (3C), 128.1 (6C), 128.9 (6C), 144.9 (3C), 169.2, 171.6; IR (cm^{-1}): 3404, 3056, 3021, 2952, 2919, 2849, 1734, 1669, 1490, 1447, 1369, 1231, 1185, 1079; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for, $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{NNaO}_4$, 452.1838; found 1832.

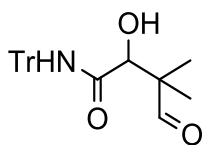
Compound 3-66d



Yield: 19.3 mg (80%), a colorless oil (from 24.1 mg of **3-71d**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.72 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 1.29 (s, 3H), 1.54 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 2.05 (s, 3H), 3.98 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 4.35 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 7.17-7.29 (m, 15H), 8.20 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 16.7, 21.2, 25.3, 29.9, 62.3, 66.0, 70.4, 127.2 (3C), 128.1 (6C), 128.8 (6C), 144.9 (3C), 170.5, 171.1; IR (cm^{-1}): 3398, 3056, 3018, 2928, 1734, 1718, 1663, 1507, 1491, 1448, 1235, 1190, 1027; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for, $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{NNaO}_4$, 452.1838; found 452.1833.

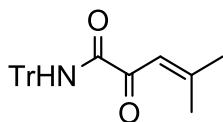
Compound 3-77



Yield: 11.6 mg (53%), a colorless oil (from 21.7 mg of **3-71e**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.01 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 3.39 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.36 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.20-7.32 (m, 15H), 8.02 (br s, 1H), 9.41 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 17.2, 18.8, 50.7, 70.5, 74.3, 127.3 (3C), 128.1 (6C), 128.7 (6C), 144.5 (3C), 170.2, 205.4; IR (cm^{-1}): 3371, 3056, 3021, 2980, 1718, 1668, 1507, 1491, 1448, 1217, 1087; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for, $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{NNaO}_3$, 410.1732; found 410.1737.

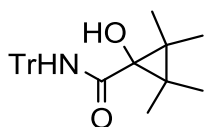
Compound 3-78



Yield: 2.3 mg (11%), a colorless oil (from 25.2 mg of **3-71f**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2.00 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 7.11 (s, 1H), 7.18-7.22 (m, 6H), 7.26-7.33 (m, 9H), 8.53 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 21.9, 28.9, 70.4, 117.2, 127.4 (3C), 128.2 (6C), 128.8 (6C), 144.1 (3C), 161.1, 165.5, 186.0; IR (cm^{-1}): 3381, 3056, 3021, 2918, 1670, 1672, 1613, 1490, 1446, 1378, 1209, 1118, 1057, 1034; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for, $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{NNaO}_2$, 392.1627; found 392.1619.

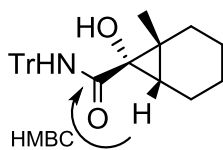
Compound 3-75g



Yield: 17.9 mg (80%), a colorless oil (from 22.4 mg of **3-71g**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.14 (s, 6H), 1.16 (s, 6H), 2.30 (s, 1H), 7.20-7.31 (m, 15H), 8.23 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 17.25 (2C), 17.34 (2C), 31.2 (2C), 64.4, 70.4, 127.0 (3C), 128.0 (6C), 128.9 (6C), 145.4 (3C), 171.2; IR (cm^{-1}): 3405, 3056, 3021, 3007, 2942, 2918, 1669, 1490, 1448, 1258, 1237, 1213, 1195, 1137, 1102; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for, $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{NNaO}_2$, 422.2096; found 422.2087.

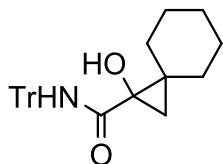
Compound 3-75i



Yield: 11.6 mg (50%), a colorless oil (from 23.1 mg of **3-71i**); Diastereoisomer of **3-75h** was not detected.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.12 (s, 3H), 1.24-1.45 (m, 5H), 1.60 (m, 1H), 1.64 (dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz, 1H), 1.82-1.98 (m, 2H), 2.32 (br s, 1H), 7.18-7.38 (m, 15H), 8.14 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 18.0, 21.1, 21.6, 22.3, 25.5, 26.6, 26.9, 64.8, 70.4, 127.1 (3C), 128.0 (6C), 128.9 (6C), 145.2 (3C), 171.5; IR (cm^{-1}): 3402, 2928, 2852, 2254, 1659, 1490, 1447, 1218, 1254, 1216; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for, $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{NNaO}_2$, 434.2096; found 434.2090.

Compound 3-75i

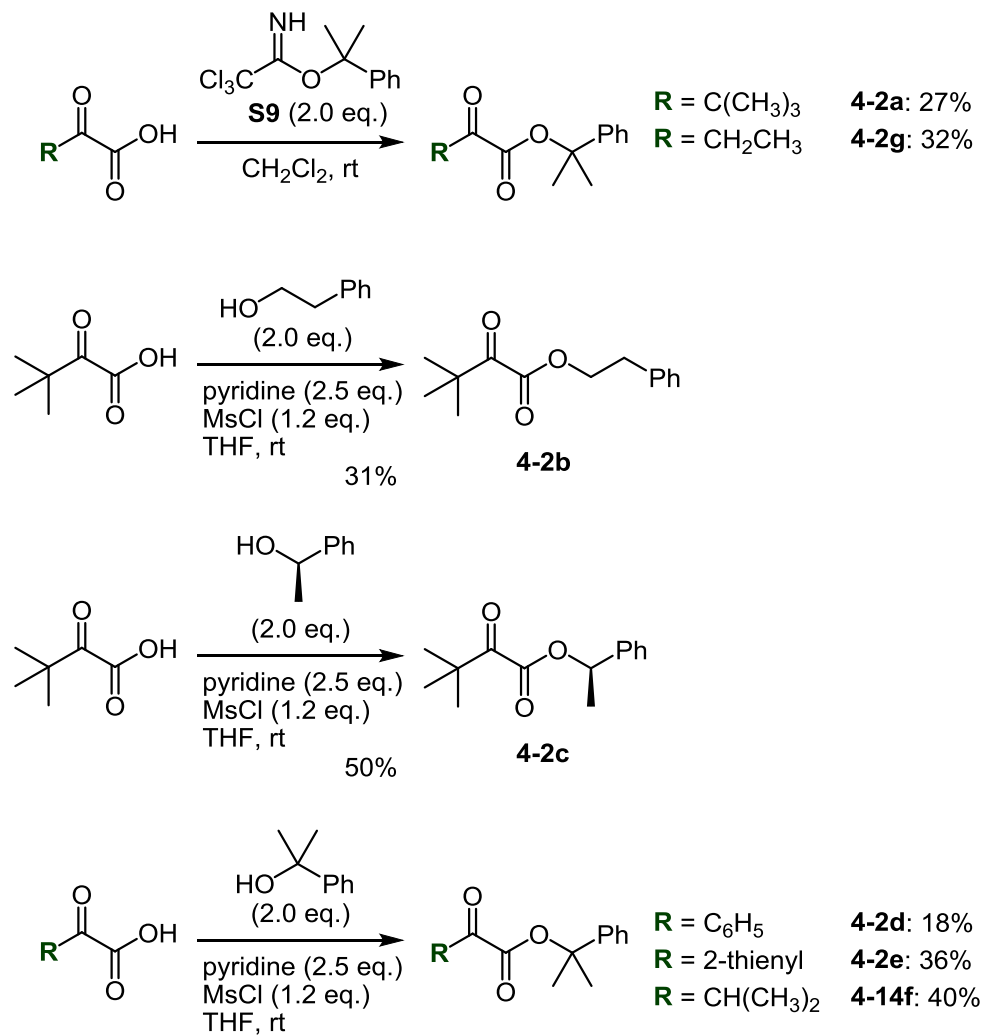


Yield: 2.7 mg (12%), a colorless oil (from 23.1 mg of **3-71i**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.65 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 1.33-1.69 (m, 10H), 1.41 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 2.42 (br s, 1H), 7.19-7.34 (m, 15H), 8.11 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 25.8, 26.3, 26.4, 26.6, 28.7, 31.4, 34.5, 64.1, 70.3, 127.1 (3C), 128.0 (6C), 128.9 (6C), 145.1 (3C), 171.2; IR (cm^{-1}): 3388, 2926, 2852, 1633, 1491, 1447, 1227, 1217, 1182, 1171; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for, $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{NNaO}_2$, 434.2096; found 434.2085.

Chapter 4

1. Scheme S1: Preparation of Substrates 4-2



2. Experimental Section for Preparation of 4-2

1) Experimental Procedures

Synthesis of 4-2f (Typical procedure for synthesis of 4-2b, 4-2c, 4-2d, 4-2e, and 4-2f)

To a solution of 3-methyl-2-oxo-butanoic acid sodium salt (1.03 g, 7.47 mmol) in THF (9.8 ml) were added α,α -dimethoxy benzenemethanol (2.05 g, 15.0 mmol) and pyridine (1.55 ml, 18.7 mmol). The mixture was cooled to 0 °C, and methanesulfonyl chloride (700 μ l, 8.97 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 25 min at room temperature before quenching with distilled water at 0 °C. The resulting mixture was extracted with diethylether twice. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO_4 , and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **4-2f** (699.7 mg, 40%) as a colorless oil.

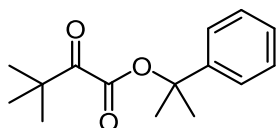
Synthesis of 4-2g (Typical procedure for synthesis of 4-2a and 4-2g)

To a solution of NaH (60 % dispersion in mineral oil, 105 mg, 9.61 mmol) in diethylether (9.5 ml) was added α,α -dimethyl benzenemethanol (3.04 g, 22.3 mmol) at 0 °C. After stirring for 40 min at room temperature, trichloroacetonitrile (2.0 ml, 20.0 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 3 h at room temperature and concentrated *in vacuo*. Hexane (2.5 ml) and MeOH (0.1 ml) were added to the resulting residue. The mixture was filtered through Celite[®] and concentrated *in vacuo* to give **S9**⁶ (4.85 g, 78%).

To a solution of **S9** (1.11 g, 3.94 mmol) in CH_2Cl_2 (4.9 ml) was added 2-oxobutanoic acid (208.4 mg, 2.04 mmol), and the mixture was stirred for 10 h. The reaction mixture was filtered through Celite[®] and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography to give **4-2g** (142.7 mg, 32%) as a colorless oil.

2) Compounds Data

Compound 4-2a



Yield: 129.6 mg (27%), a colorless oil (from 250 mg of 3,3-dimethyl-2-oxobutanoic acid)

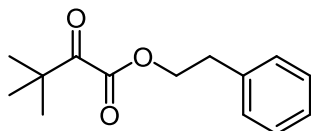
¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.23 (s, 9H), 1.87 (s, 6H), 7.29 (m, 1H), 7.36 (m, 2H), 7.41 (m, 2H);

¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 25.9 (3C), 28.5 (2C), 42.7, 84.9, 124.5 (2C), 127.6, 128.5 (2C), 144.5,

⁴. a) Yue, C; Thierry, J.; Potier, P. *Tetrahedron lett.* **1993**, 34, 323; b) Virta, P.; Karskela, M.; Lönnberg, H. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 1989.

163.1, 202.1; IR (cm⁻¹): 2976, 1734, 1712, 1300, 1244, 1140, 1050, 999; HRMS-ESI (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₁₅H₂₀NaO₃, 271.1310; found 271.1306.

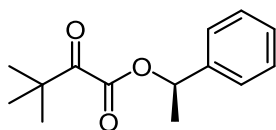
Compound 4-2b



Yield: 110.8 mg (31%), a colorless oil (from 200 mg of 3,3-dimethyl-2-oxobutanoic acid)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.18 (s, 9H), 3.03 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 4.47 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.22-7.25 (m, 3H), 7.31 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 25.7 (3C), 35.0, 42.7, 66.1, 127.0, 128.8 (2C), 129.0 (2C), 137.1, 163.9, 202.1; IR (cm⁻¹): 2969, 1737, 1719, 1290, 1238, 1052, 1008; HRMS-ESI (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₁₄H₁₈NaO₃, 257.1154; found 257.1150.

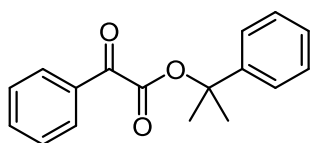
Compound 4-2c



Yield: 92.5 mg (50%), a colorless oil (from 94.2 mg of 3,3-dimethyl-2-oxobutanoic acid)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.21 (s, 9H), 1.64 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 6.03 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H), 7.29-7.40 (m, 5H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 22.1, 25.8 (3C), 42.9, 74.4, 126.4 (2C), 128.5, 128.8 (2C), 140.4, 163.5, 202.2; IR (cm⁻¹): 2976, 1734, 1721, 1286, 1240, 1048, 1004; HRMS-ESI (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₁₄H₁₈NaO₃, 257.1154; found 257.1153.

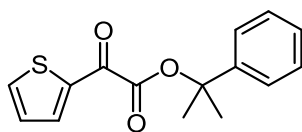
Compound 4-2d



Yield: 325.5 mg (18%), a pale yellow oil (from 996.9 mg of α-oxo-benzeneacetic acid)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.95 (s, 6H), 7.31 (m, 1H), 7.39 (m, 2H), 7.49 (m, 4H), 7.64 (m, 1H), 7.94 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 28.6 (2C), 85.4, 124.5 (2C), 127.7, 128.6 (2C), 129.0 (2C), 130.1 (2C), 132.5, 134.9, 144.5, 163.0, 186.5; IR (cm⁻¹): 3056, 2963, 1738, 1686, 1593, 1451, 1213, 1178; HRMS-ESI (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₁₇H₁₆NaO₃, 291.0997; found 291.0995.

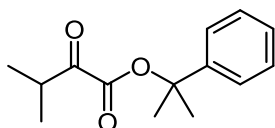
Compound 4-2e



Yield: 71.0 mg (36%), a pale yellow oil (from 103.8 mg of α -oxo-2-thiopheneacetic acid)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.94 (s, 6H), 7.16 (m, 1H), 7.29 (m, 1H), 7.37 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.45 (br d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.78 (br d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 7.98 (br d, $J = 3.7$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 28.6 (2C), 85.5, 124.5 (2C), 127.7, 128.6 (2C), 128.7, 137.1, 137.2, 139.3, 144.4, 160.8, 177.3; IR (cm^{-1}): 1730, 1663, 1410, 1209, 1136, 1056; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{NaO}_3\text{S}$, 297.0561; found 297.0563.

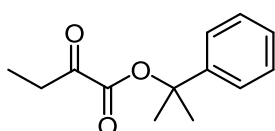
Compound 4-2f



Yield: 699.7 mg (40%), a colorless oil (from 1.03 g of 3-methyl-2-oxo-butanoic acid sodium salt)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.13 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H), 1.87 (s, 6H), 3.18 (septet, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.28 (m, 1H), 7.33-7.42 (m, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 17.1 (2C), 28.4 (2C), 36.9, 84.8, 124.5 (2C), 127.6, 128.6 (2C), 144.5, 161.3, 198.9; IR (cm^{-1}): 2976, 1726, 1273, 1140, 1028; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{NaO}_3$, 257.1154; found 257.1158.

Compound 4-2g



Yield: 142.7 mg (32%), a colorless oil (from 208.4 mg of 2-oxo-butanoic acid)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.11 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.87 (s, 6H), 2.80 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.29 (m, 1H), 7.33-7.42 (m, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 7.07, 28.4 (2C), 32.7, 84.7, 124.4 (2C), 127.6, 128.6 (2C), 144.5, 160.4, 195.9; IR (cm^{-1}): 2980, 1725, 1272, 1139, 1096, 1031; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NaO}_3$, 243.0997; found 243.1000.

3. Experimental Section for Irradiation of **4-2** in MeOH

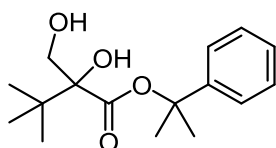
1) Experimental Procedures

Photo-reaction of **4-2f** (Typical procedure for photo-reaction of **4-2a~4-2g**)

A degassed 80 mM solution of **4-2f** in MeOH (700 μ l) was irradiated with 365 nm LED lamp (OMRON ZUV-C20H, ZUV-H20MB, ZUV-L8H) as described **Figure 3-27**. Irradiation was continued until starting material was consumed (3 h for **4-2f**). The crude material was purified by silica gel column chromatography to give **4-3f** (10.2 mg, 68%) as a colorless oil.

2) Compounds Data

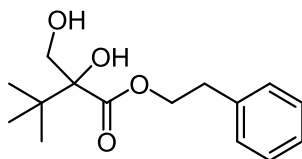
Compound **4-3a**



Yield: 8.5 mg (54%), a colorless oil (from 13.9 mg of **4-2a**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.01 (s, 9H), 1.80 (s, 3H), 1.89 (s, 3H), 3.64 (br s, 1H), 3.75 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 4.09 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 7.27 (m, 1H), 7.32-7.37 (m, 2H), 7.42-7.46 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 25.9 (3C), 27.7, 29.4, 36.6, 63.9, 82.7, 84.7, 124.7 (2C), 127.5, 128.4 (2C), 144.7, 174.3; IR (cm^{-1}): 3488, 2976, 2952, 1718, 1367, 1267, 1221, 1122, 1101; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{NaO}_4$, 303.1572; found 303.1571.

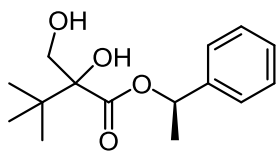
Compound **4-3b**



Yield: 0.5 mg (3%), a colorless oil (from 13.1 mg of **4-2b**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.90 (s, 9H), 1.98 (dd, J = 11.0, 2.8 Hz, 1H), 3.02 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.61 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 3.67 (dd, J = 11.0, 2.8 Hz, 1H), 3.92 (td, J = 11.0, 0.9 Hz, 1H), 4.47 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 7.22-7.25 (m, 3H), 7.29-7.34 (m, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 25.7 (3C), 35.1, 36.5, 63.8, 66.8, 83.2, 126.9, 128.8 (2C), 129.0 (2C), 137.4, 175.5; IR (cm^{-1}): 3502, 2957, 1723, 1267, 1211, 1123; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NaO}_4$, 289.1416; found 289.1418.

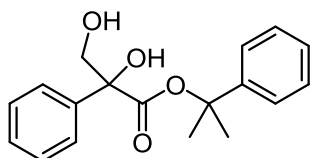
Compound 4-3c



Yield: 1.5 mg (10%) as a mixture of two diastereomers (dr = 1:1), a colorless oil (from 13.1 mg of **4-2c**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , mixture of 2 diastereomers) δ 0.88 (s, 9H), 1.02 (s, 9H), 1.626 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 1.632 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 1.99 (dd, J = 11.2, 2.8 Hz, 1H), 2.08 (dd, J = 11.2, 2.8 Hz, 1H), 3.66 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 3.67 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 3.72 (dd, J = 11.2, 2.8 Hz, 2H), 4.02 (td, J = 11.0, 0.9 Hz, 1H), 4.03 (td, J = 11.0, 0.9 Hz, 1H), 5.988 (q, J = 6.7 Hz, 1H), 5.993 (q, J = 6.7 Hz, 1H), 7.28-7.41 (m, 10H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , mixture of two diastereomers) δ 21.9, 22.4, 25.7 (3C), 25.9 (3C), 36.6, 36.7, 63.7, 63.8, 75.0, 75.4, 82.9 (2C), 126.0 (2C), 126.8 (2C), 128.2, 128.5, 128.7 (4C), 140.5, 140.8, 174.96, 175.03; IR (cm^{-1}): 3503, 2956, 2929, 1718, 1266, 1207, 1122, 1060; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NaO}_4$, 289.1416; found 289.1405.

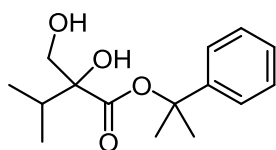
Compound 4-3d



Yield: 4.2 mg (25%), a colorless oil (from 15.0 mg of **4-2d**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.75 (s, 3H), 1.83 (s, 3H), 3.81 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 4.07 (br s, 1H), 4.37 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 7.18-7.27 (m, 5H), 7.35-7.42 (m, 3H), 7.58-7.62 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 28.4, 28.6, 68.2, 79.5, 85.0, 124.3 (2C), 125.7 (2C), 127.5, 128.4 (3C), 128.6 (2C), 138.4, 144.6, 172.5; IR (cm^{-1}): 3474, 2980, 1728, 1267, 1230, 1131, 1101, 1075; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{NaO}_4$, 323.1259; found 323.1261.

Compound 4-3f

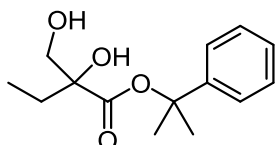


Yield: 10.2 mg (68%), a colorless oil (from 13.1 mg of **4-2f**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.88 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.94 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 1.81 (s, 3H), 1.86 (s,

3H), 2.06 (septet, $J = 6.9$ Hz, 1H), 2.06 (m, 1H), 3.40 (br d, $J = 1.8$ Hz, 1H) 3.76 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 3.88 (br m, 1H), 7.27 (m, 1H), 7.32-7.37 (m, 2H), 7.40-7.43 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 16.5, 17.2, 27.9, 28.9, 32.7, 66.7, 80.9, 84.3, 124.6 (2C), 127.6, 128.4 (2C), 144.8, 174.4; IR (cm^{-1}): 3485, 2969, 1727, 1270, 1225, 1134, 1102, 1077, 1031; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NaO}_4$, 289.1416; found 289.1412.

Compound 4-3g



Yield: 2.1 mg (15%), a colorless oil (from 12.3 mg of **4-2g**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.89 (t, $J = 7.8$ Hz, 3H), 1.64 (m, 1H), 1.76 (m, 1H), 1.81 (s, 3H), 1.84 (s, 3H), 2.11 (dd, $J = 10.1, 3.5$ Hz, 1H), 3.47 (s, 1H), 3.63 (dd, $J = 11.0, 3.5$ Hz, 1H), 3.88 (dd, $J = 11.0, 10.1$ Hz, 1H), 7.28 (m, 1H), 7.33-7.41 (m, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ; 7.39, 28.1, 28.9, 68.0, 78.9, 84.3, 124.5 (2C), 127.6, 128.5 (2C), 144.9, 174.1; IR (cm^{-1}): 3464, 2980, 2931, 1731, 1249, 1134, 1102, 1067; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NaO}_4$, 275.1259; found 275.1251.

4. Experimental Section for coupling reaction of **4-2** with various partners

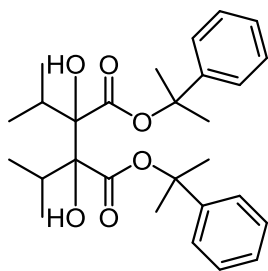
1) Experimental Procedures

Photo-chemical synthesis of 4-32f (Typical procedure for photo-reaction of 4-2d, 4-2f, and 4-2g)

A degassed 80 mM solution of **4-2f** in 1-butanol (700 μ l) was irradiated with 365 nm LED lamp (OMRON ZUV-C20H, ZUV-H20MB, ZUV-L8H) as described in **Figure 3-27**. Irradiation was continued until starting material was consumed (20 min for 1-butanol). The crude material was purified by silica gel column chromatography to give **4-32f** (5.7 mg, 33%) as a colorless oil. The dimers **4-12f** and alcohol **4-28f** was obtained in some cases as a mixture (52% and 5% respectively in the case of the reaction with 1-butanol). The yields of **4-12f** and **4-28f** were determined by ^1H -NMR, unless otherwise noted. The dimers **4-12f** were formed as diastereomeric mixtures, and combined yield of two diastereomers was shown.

2) Compounds Data

Compound 4-12f

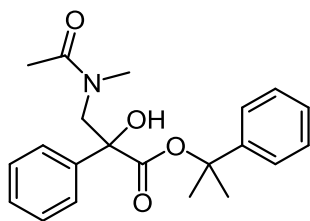


[Diastereomer A] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.92 (d, J = 6.9 Hz, 6H), 1.08 (d, J = 6.9 Hz, 6H), 1.77 (s, 6H), 1.78 (s, 6H), 2.34 (septet, J = 6.9 Hz, 2H), 3.87 (s, 2H), 7.21-7.35 (m, 6H), 7.44 (m, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 18.5 (2C), 19.3 (2C), 27.6 (2C), 28.2 (2C), 33.2 (2C), 84.01 (2C), 84.6 (2C), 125.18 (4C), 127.5 (2C), 128.2 (4C), 144.8 (2C), 173.45 (2C).

[Diastereomer B] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.84 (d, J = 6.9 Hz, 6H), 1.01 (d, J = 6.9 Hz, 6H), 1.82 (s, 6H), 1.86 (s, 6H), 2.39 (septet, J = 6.9 Hz, 2H), 3.72 (s, 2H), 7.21-7.35 (m, 6H), 7.48 (m, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 18.2 (2C), 18.9 (2C), 27.4 (2C), 28.2 (2C), 34.7 (2C), 83.96 (2C), 84.9 (2C), 125.23 (4C), 127.7 (2C), 128.3 (4C), 144.6 (2C), 173.48 (2C).

IR (mixture, cm^{-1}): 3472, 2976, 2938, 2879, 1718, 1385, 1247, 1134, 1101, 1077; HRMS-ESI (mixture, m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{NaO}_6$, 493.2566; found 493.2551.

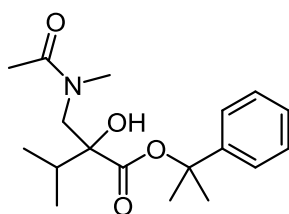
Compound 4-13d



Yield: 11.0 mg (55%), a colorless oil (from 15.0 mg of **4-2d**)

[Major rotamer]: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.74 (s, 3H), 1.76 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.82 (s, 3H), 3.82 (d, $J = 14.3$ Hz, 1H), 4.23 (d, $J = 14.3$ Hz, 1H), 5.71 (br s, 1H), 7.03-7.13 (m, 2H), 7.18-7.22 (m, 3H), 7.30-7.42 (m, 3H), 7.57-7.62 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 22.0, 27.9, 29.0, 39.3, 57.6, 80.3, 83.7, 124.3 (2C), 125.8 (2C), 127.2, 128.1, 128.28 (2C), 128.34 (2C), 140.2, 145.2, 171.9, 174.2; IR (cm^{-1}): 3485, 2979, 1726, 1623, 1496, 1448, 1406, 1258, 1137, 1102, 1076; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NNaO}_4$, 378.1681; found 378.1682.

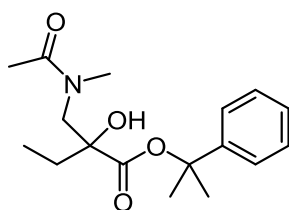
Compound 4-13f



Yield: 15.3 mg (85%), a colorless oil (from 13.1 mg of **4-2f**)

[Major rotamer]: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.86 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.97 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 1.79 (s, 3H), 1.86 (s, 3H), 2.06 (m, 1H), 2.07 (s, 3H), 2.93 (s, 3H), 3.58 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H), 3.85 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H), 4.60 (s, 1H), 7.23-7.47 (m, 5H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 16.1, 17.4, 22.1, 26.9, 28.9, 35.5, 39.1, 55.3, 81.2, 83.6, 125.0 (2C), 127.5, 128.3 (2C), 145.2, 173.1, 174.4; IR (cm^{-1}): 3502, 3326, 2973, 2935, 2876, 1719, 1630, 1406, 1256, 1136, 1102, 1031; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NNaO}_4$, 344.1838; found 344.1835.

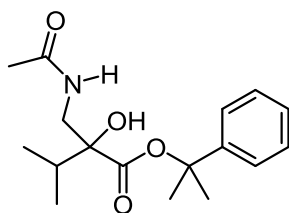
Compound 4-13g



Yield: 8.9 mg (52%), a colorless oil (from 12.3 mg of **4-2g**)

[Major rotamer]: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.87 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 1.66 (dq, $J = 13.8, 7.4$ Hz, 1H), 1.82 (s, 3H), 1.83 (m, 1H), 1.84 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 3.02 (s, 3H), 3.62 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H), 3.77 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H), 4.30 (s, 1H), 7.24-7.44 (m, 5H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 7.6, 22.1, 27.6, 28.6, 30.6, 39.1, 55.7, 79.3, 83.8, 124.7 (2C), 127.5, 128.4 (2C), 145.2, 172.8, 174.1; IR (cm^{-1}): 3504, 3403, 2976, 2932, 1723, 1628, 1496, 1448, 1405, 1366, 1273, 1247, 1174, 1134, 1101; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{NNaO}_4$, 330.1681; found 330.1680.

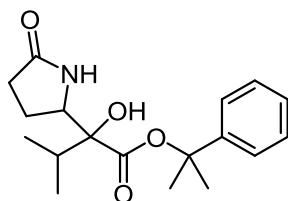
Compound 4-20f



Yield: 14.5 mg (84%), a colorless oil (from 13.1 mg of **4-2f**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.88 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.78 (s, 3H), 1.83 (s, 3H), 1.94 (s, 3H), 2.07 (septet, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.20 (br d, $J = 13.3$ Hz, 1H), 3.41 (s, 1H), 4.11 (dd, $J = 13.3, 8.3$ Hz, 1H), 5.69 (br m, 1H), 7.27 (m, 1H), 7.33 (m, 2H), 7.39 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 16.4, 17.2, 23.5, 27.6, 28.4, 34.0, 44.6, 79.4, 84.5, 124.8 (2C), 127.7, 128.4 (2C), 144.4, 170.2, 174.3; IR (cm^{-1}): 3499, 3319, 2973, 2935, 1727, 1654, 1545, 1449, 1385, 1368, 1274, 1240, 1179, 1133, 1102; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{NNaO}_4$, 330.1681; found 330.1681.

Compound 4-21f

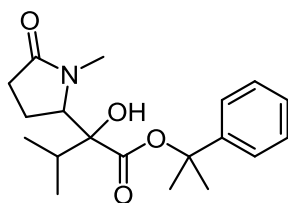


Yield: 5.6 mg (31%, d.r. = 1:1), a colorless oil (from 13.1 mg of **4-2f**)

[Diastereomer A] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.88 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.84 (s, 6H), 2.17 (m, 2H), 2.25-2.37 (m, 3H), 3.44 (s, 1H), 4.01 (dd, $J = 9.0, 5.2$ Hz, 1H), 5.88 (br s, 1H), 7.27-7.38 (m, 5H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 16.5, 17.3, 21.4, 28.0, 28.1, 30.2, 32.4, 59.0, 81.9, 85.2, 124.7 (2C), 128.0, 128.6, 144.1, 173.2, 178.0; IR (cm^{-1}): 3381, 3246, 2969, 2935, 1692, 1465, 1389, 1243, 1132, 1102; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NNaO}_4$, 342.1681; found 342.1682.

[Diastereomer B] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.97 (d, J = 6.9 Hz, 6H), 1.85 (s, 3H), 1.88 (s, 3H), 2.00-2.43 (m, 5H), 3.22 (s, 1H), 4.05 (dd, J = 7.6, 4.8 Hz, 1H), 5.22 (br s, 1H), 7.31 (m, 1H), 7.36-7.43 (m, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 17.0, 17.5, 21.7, 27.9, 28.3, 29.9, 33.5, 57.9, 81.0, 84.9, 124.9 (2C), 128.2, 128.7 (2C), 143.8, 173.4, 178.6; IR (cm^{-1}): 3501, 3208, 2973, 2929, 1693, 1386, 1368, 1274, 1245, 1133, 1101; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NNaO}_4$, 342.1681; found 342.1685.

Compound 4-22f

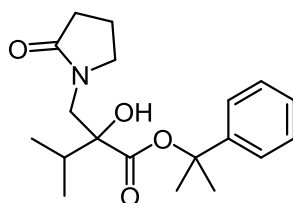


Yield: 10.6 mg (57%, d.r. = 1:1), a colorless oil (from 13.1 mg of **4-2f**)

[Diastereomer A, including impurities] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.79 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.97 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 1.80 (s, 3H), 1.82 (s, 3H), 2.17 (m, 1H), 2.27-2.41 (m, 4H), 2.88 (s, 3H), 3.28 (s, 1H), 3.81 (dd, J = 7.6, 4.4 Hz, 1H), 7.29 (m, 1H), 7.33-7.36 (m, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 16.2, 16.9, 19.6, 27.7, 28.0, 30.1, 31.2, 33.0, 66.0, 82.7, 85.3, 124.7 (2C), 127.9, 128.6 (2C), 144.1, 173.8, 176.1; IR (cm^{-1}): 3505, 2976, 2938, 2880, 1722, 1676, 1449, 1388, 1274, 1240, 1131, 1101; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{NNaO}_4$, 356.1838; found 356.1841.

[Diastereomer B, including impurities] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.92 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.99 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 1.91 (s, 3H), 1.94 (s, 3H), 2.03-2.25 (m, 4H), 2.44 (m, 1H), 2.76 (s, 3H), 3.32 (s, 1H), 4.02 (dd, J = 7.6, 4.4 Hz, 1H), 7.33 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.37 (dd, J = 7.4, 7.8 Hz, 2H), 7.49 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 16.7, 17.4, 20.3, 27.0, 28.2, 29.9, 30.0, 35.1, 63.8, 80.4, 85.7, 125.5 (2C), 128.2, 128.5 (2C), 143.4, 173.6, 176.7; IR (cm^{-1}): 3502, 3388, 2980, 2935, 1717, 1679, 1471, 1450, 1386, 1368, 1274, 1240, 1130, 1101; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{NNaO}_4$, 356.1838; found 356.1834.

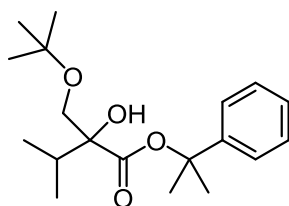
Compound 4-23f



Yield: 3.9 mg (21%), a colorless oil (from 13.1 mg of **4-2f**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.83 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.97 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.79 (s, 3H), 1.79-1.94 (m, 2H), 1.84 (s, 3H), 2.13 (septet, $J = 6.9$ Hz, 1H), 2.34 (dd, $J = 8.3, 7.8$ Hz, 2H), 3.23 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H), 3.29 (ddd, $J = 10.1, 7.6, 6.4$ Hz, 1H), 3.58 (ddd, $J = 10.1, 8.0, 6.0$ Hz, 1H), 3.72 (s, 1H), 4.05 (dd, $J = 13.8$ Hz, 1H), 7.27 (m 1H), 7.34 (dd, $J = 7.8, 7.4$ Hz, 2H), 7.44 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 16.2, 17.3, 18.5, 26.8, 28.8, 30.9, 34.9, 49.55, 49.60, 80.7, 84.3, 125.0 (2C), 127.7, 128.3 (2C), 144.7, 174.3, 176.6; IR (cm^{-1}): 3502, 2969, 2935, 1718, 1685, 1423, 1385, 1273, 1252, 1132, 1102; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{NNaO}_4$, 356.1838; found 356.1842.

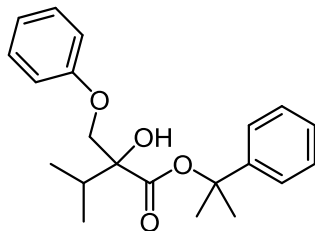
Compound 4-24f



Yield: 13.2 mg (73%), a colorless oil (from 13.1 mg of **4-2f**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.88 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.96 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.19 (s, 9H), 1.81 (s, 6H), 2.10 (septet, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.22 (s, 1H), 3.47 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 3.65 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.25 (m, 1H), 7.33 (m, 2H), 7.43 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 16.6, 17.4, 27.6 (3C), 28.45, 28.49, 33.0, 67.0, 73.3, 79.9, 83.4, 124.7 (2C), 127.2, 128.3 (2C), 145.6, 173.9; IR (cm^{-1}): 3533, 2975, 2931, 2880, 1735, 1469, 1365, 1234, 1197, 1178, 1136, 1101; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{NaO}_4$, 345.2042; found 345.2034.

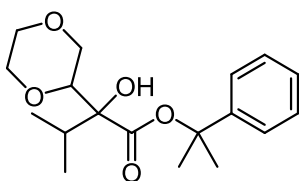
Compound 4-25f



Yield: 7.6 mg (40%), a colorless oil (from 13.1 mg of **4-2f**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.94 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.05 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.76 (s, 3H), 1.82 (s, 3H), 2.24 (septet, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.42 (s, 1H), 4.14 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 4.25 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.91 (br d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.98 (br t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.22-7.35 (m, 7H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 16.5, 17.2, 27.7, 28.9, 32.9, 72.6, 79.4, 84.1, 114.7 (2C), 121.2, 124.6 (2C), 127.5, 128.4 (2C), 129.6 (2C), 144.9, 158.7, 173.4; IR (cm^{-1}): 3516, 2976, 2935, 2873, 1736, 1600, 1497, 1245, 1135; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{NaO}_4$, 365.1729; found 365.1728.

Compound 4-26f

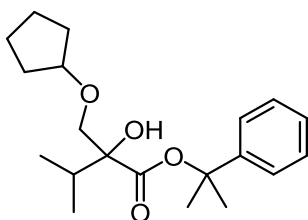


Yield: 9.1 mg (50%, d.r. = 1:1), a colorless oil (from 13.1 mg of **4-2f**).

[Diastereomer A] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.93 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.06 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.82 (s, 3H), 1.87 (s, 3H), 1.96 (septet, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.34 (s, 1H), 3.59 (dd, $J = 11.5, 10.3$ Hz, 1H), 3.59-3.87 (m, 4H), 3.89 (dd, $J = 11.5, 2.3$ Hz, 1H), 4.02 (dd, $J = 10.3, 2.3$ Hz, 1H), 7.28 (m, 1H), 7.34 (m, 2H), 7.43 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 17.1, 17.5, 28.1, 28.7, 32.6, 66.55, 66.62, 67.4, 77.7, 80.5, 84.4, 124.8 (2C), 127.5, 128.3 (2C), 144.9, 173.0; IR (cm^{-1}): 3502, 2966, 2907, 2855, 1731, 1243, 1119; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{NaO}_5$, 345.1678; found 345.1678.

[Diastereomer B] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.90 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.97 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.85 (s, 3H), 1.86 (s, 3H), 2.04 (septet, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.41 (s, 1H), 3.57 (td, $J = 11.4, 2.9$ Hz, 1H), 3.68-3.88 (m, 6H), 7.28 (m, 1H), 7.35 (m, 2H), 7.44 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 16.3, 17.3, 28.1, 28.7, 31.7, 66.6, 67.1, 67.6, 79.4, 80.4, 84.6, 124.9 (2C), 127.7, 128.4 (2C), 144.5, 172.4; IR (cm^{-1}): 3505, 2969, 2880, 1730, 1270, 1239, 1220, 1135, 1117, 1101, 1076; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{NaO}_5$, 345.1678; found 345.1678.

Compound 4-27f

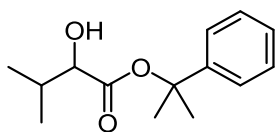


Yield: 4.4 mg (23%), a colorless oil (from 13.1 mg of **4-2f**)

4-12f (2.7 mg, 20% isolated yield) and **4-28f** (2.5 mg, 19% isolated yield) were also obtained.

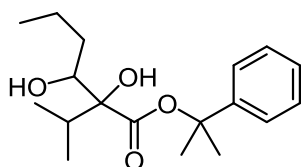
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.87 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.46-1.55 (m, 2H), 1.62-1.75 (m, 6H), 1.80 (s, 3H), 1.82 (s, 3H), 2.09 (septet, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.24 (s, 1H), 3.50 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 3.70 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 3.94 (m, 1H), 7.26 (m, 1H), 7.33 (m, 2H), 7.41 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 16.5, 17.3, 23.77, 23.80, 28.2, 28.6, 32.2, 32.4, 33.0, 73.8, 80.1, 82.5, 83.5, 124.6 (2C), 127.3, 128.3 (2C), 145.5, 173.9; IR (cm^{-1}): 3523, 2964, 2876, 1734, 1449, 1384, 1366, 1239, 1173, 1136, 1102; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{NaO}_4$, 357.2042; found 357.2051.

Compound 4-28f



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.85 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.06 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.81 (s, 3H), 1.84 (s, 3H), 2.16 (septet doublet, $J = 6.9, 3.2$ Hz, 1H), 2.66 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 4.01 (dd, $J = 5.9, 3.2$ Hz, 1H), 7.27 (m, 1H), 7.32-7.39 (m, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 15.8, 19.3, 28.1, 28.9, 32.2, 75.1, 83.6, 124.5 (2C), 127.6, 128.5 (2C), 145.0, 173.9; IR (cm^{-1}): 3505, 2967, 2932, 1729, 1261, 1135, 1100; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NaO}_3$, 259.1310; found 259.1311.

Compound 4-32f



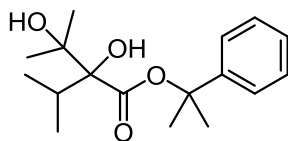
Yield: 5.7 mg (33%, d.r. = 1.6:1), a colorless oil (from 13.1 mg of **4-2f**)

4-12f (52%) and **4-28f** (5%) were also obtained.

[Major diastereomer] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.92 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.94 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.96 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.32-1.48 (m, 2H), 1.56-1.71 (m, 2H), 1.83 (s, 3H), 1.86 (s, 3H), 2.00 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 2.23 (septet, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.40 (s, 1H), 3.81 (ddd, $J = 10.6, 6.4, 1.4$ Hz, 1H), 7.29 (m, 1H), 7.35 (m, 2H), 7.42 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 14.2, 16.4, 17.7, 20.0, 28.0, 28.7, 32.6, 33.7, 74.4, 82.8, 84.4, 124.9 (2C), 127.7, 128.4 (2C), 144.5, 173.8; IR (cm^{-1}): 3474, 2961, 2928, 2873, 1722, 1451, 1385, 1243, 1136, 1101, 1017; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{NaO}_4$, 331.1885; found 331.1885.

[Minor diastereomer] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.93 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.95 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.97 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.19-1.28 (m, 1H), 1.36-1.46 (m, 1H), 1.56-1.71 (m, 2H), 1.85 (s, 3H), 1.87 (s, 3H), 2.15 (septet, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.36 (s, 1H), 3.85 (td, $J = 11.0, 1.8$ Hz, 1H), 7.28 (m, 1H), 7.36 (m, 2H), 7.44 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 14.2, 16.7, 17.1, 19.4, 28.2, 28.6, 32.9, 33.6, 73.3, 82.1, 84.8, 124.9 (2C), 127.7, 128.5 (2C), 144.5, 174.4; IR (cm^{-1}): 3499, 2960, 2935, 2873, 1721, 1385, 1245, 1136, 1077; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{NaO}_4$, 331.1885; found 331.1885.

Compound 4-33f

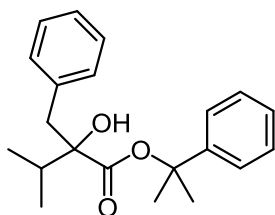


Yield: 1.4 mg (8%), a colorless oil (from 13.1 mg of **4-2f**)

4-12f (64%) and **4-28f** (5%) were also obtained.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.80 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.08 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.43 (s, 3H), 1.876 (s, 3H), 1.879 (s, 3H), 2.36 (septet, $J = 6.9$ Hz, 1H), 2.77 (s, 1H), 3.48 (s, 1H), 7.31 (m, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.45 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 17.9, 18.5, 24.4, 27.0, 27.5, 27.9, 31.9, 74.1, 82.8, 84.8, 125.1, 128.0, 128.4, 144.0, 174.7; IR (cm^{-1}): 3492, 2977, 2935, 2917, 1718, 1385, 1253, 1128, 1101, 1030; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{NaO}_4$, 317.1729; found 317.1726.

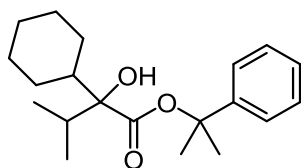
Compound 4-34f



Yield: 7.0 mg (38%), a colorless oil (from 13.1 mg of **4-2f**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.87 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.08 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.63 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 2.15 (septet, $J = 6.9$ Hz, 1H), 2.92 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H), 3.14 (s, 1H), 3.15 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H), 7.23-7.31 (m, 10H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 16.4, 17.6, 27.3, 28.3, 36.4, 42.9, 80.3, 84.1, 124.7 (2C), 126.7, 127.5, 128.1 (2C), 128.4 (2C), 130.5 (2C), 137.2, 145.0, 174.6; IR (cm^{-1}): 3502, 3025, 2969, 2935, 1722, 1262, 1203, 1136, 1029; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{NaO}_3$, 349.1780; found 349.1788.

Compound 4-35f



Yield: 7.2 mg (40%), a colorless oil (from 13.1 mg of **4-2f**)

4-12f (20%) and **4-28f** (1.0 mg, 8% isolated yield) were also obtained.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.89 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.93 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.05-1.39 (m, 5H), 1.48-1.89 (m, 6H), 1.85 (s, 3H), 1.87 (s, 3H), 2.14 (septet, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.24 (s, 1H), 7.26-7.31 (m, 1H), 7.33-7.38 (m, 2H), 7.42-7.46 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 16.4, 17.5, 26.5, 26.71, 26.72, 26.8, 27.6, 27.9, 28.5, 32.2, 43.4, 81.7, 83.8, 125.1 (2C), 127.7, 128.3 (2C), 144.6, 175.4; IR (cm^{-1}): 3516, 2976, 2928, 2848, 1718, 1444, 1382, 1252, 1226, 1133; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{NaO}_3$, 341.2093; found 341.2088.

5. Experimental Section for Irradiation of **4-2f** with *N*-methylacetamide in benzene

Photo-reaction of **4-2f** with 50 eq. of *N*-methylacetamide

To a degassed 115 mM solution of **4-2f** in benzene (486 μ l) was added degassed *N*-methylacetamide (214 μ l, 2.80 mmol). The resulting solution (700 μ l) was irradiated for 150 min with 365 nm LED lamp (OMRON ZUV-C20H, ZUV-H20MB, ZUV-L8H). The crude material was purified by silica gel column chromatography to give **4-20f** (12.5 mg, 73%) as a colorless oil and **4-12f** (0.5 mg, 4%) as a colorless oil.

Photo-reaction of **4-2f** with 15 eq. of *N*-methylacetamide

To a degassed 88.1 mM solution of **4-2f** in benzene (636 μ l) was added degassed *N*-methylacetamide (64 μ l, 0.84 mmol). The resulting solution (700 μ l) was irradiated for 4 h with 365 nm LED lamp. The crude material was purified by silica gel column chromatography to give **4-20f** (12.1 mg, 70%) as a colorless oil and **4-12f** (1.5 mg, 11%) as a colorless oil.

Photo-reaction of **4-2f** with 5 eq. of *N*-methylacetamide

To a degassed 82.5 mM solution of **4-2f** in benzene (679 μ l) was added degassed *N*-methylacetamide (21 μ l, 0.27 mmol). The resulting solution (700 μ l) was irradiated for 4 h with 365 nm LED lamp. The crude material was purified by silica gel column chromatography to give **4-20f** (3.9 mg, 23%) as a colorless oil and a mixture of **4-12f** (13%) and **4-28f** (1%) (total 1.8 mg, the yields were calculated from $^1\text{H-NMR}$).

6. Experimental Section for Irradiation of **4-2f** with *N,N*-dimethylacetamide in benzene

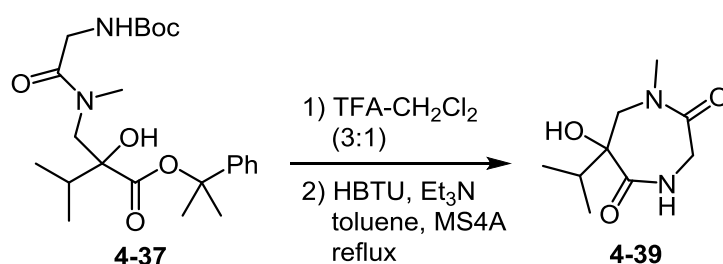
Photo-reaction of **4-2f** with 50 eq. of *N,N*-dimethylacetamide

To a degassed 127 mM solution of **4-2f** in benzene (440 μ l) was added degassed *N,N*-dimethylacetamide (260 μ l, 2.81 mmol). The resulting solution (700 μ l) was irradiated for 20 min with 365 nm LED lamp (OMRON ZUV-C20H, ZUV-H20MB, ZUV-L8H). The crude material was purified by silica gel column chromatography to give **25f** (15.6 mg, 87%) as a colorless oil and **4-12f** (1.0 mg, 8%) as a colorless oil.

Photo-reaction of **4-2f** with 15 eq. of *N,N*-dimethylacetamide

To a degassed 90.0 mM solution of **4-2f** in benzene (622 μ l) was added degassed *N,N*-dimethylacetamide (78 μ l, 0.84 mmol). The resulting solution (700 μ l) was irradiated for 50 min with 365 nm LED lamp. The crude material was purified by silica gel column chromatography to

Synthesis of 4-39

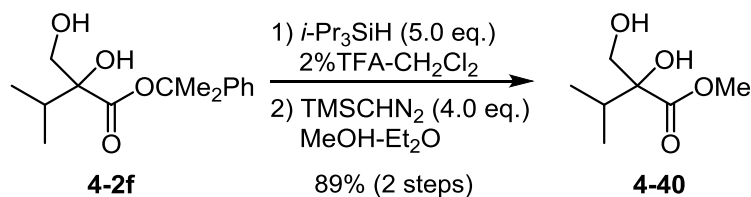


To a solution of **4-37** (12.9 mg, 29.5 μmol) in CH_2Cl_2 (430 μl) was added *i*-Pr₃SiH (30.1 μl , 146 μmol) and trifluoroacetic acid (1.29 ml) at 0 °C. After stirring for 1 h at room temperature, the reaction mixture was diluted with toluene and concentrated *in vacuo* to give the corresponding amino acid (11.0 mg). The resulting residue was used for the next step without further purification.

To a solution of the amino acid in toluene (2.95 ml) was added triethylamine (12.3 μl , 88.5 μmol), molecular sieves 4Å (100 mg), and HBTU (16.8 mg, 44.3 μmol) sequentially at room temperature. After refluxing for 17 h in toluene, the reaction mixture was filtered through Celite® and concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **4-39** (3.2 mg, 49%) as a white amorphous solid.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 0.99 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.03 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 2.16 (septet, *J* = 6.9 Hz, 1H), 3.06 (s, 3H), 3.28 (m, 1H), 3.46 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 4.13 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 4.35 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 16.2, 17.5, 36.6, 37.4, 46.6, 53.4, 80.5, 172.6, 177.9; IR (cm⁻¹): 3321, 2965, 2925, 1735, 1654, 1522, 1469, 1221, 1162, 1087; HRMS-ESI (*m/z*): [M+Na]⁺ calcd for C₉H₁₆N₂NaO₃, 223.1059; found 223.1059.

8. Experimental Section for Deprotection of CMe₂Ph group



To a solution of **4-2f** (7.7 mg, 28.9 μmol) in CH_2Cl_2 (294 μl) was added *i*-Pr₃SiH (28.0 μl , 137 μmol) and trifluoroacetic acid (6.0 μl). After stirring for 40 min, the mixture was concentrated *in vacuo* to give the corresponding carboxylic acid (6.4 mg). To a solution of the carboxylic acid in MeOH-Et₂O (300 μl , v/v = 1) was added a solution of 2.0 M TMSCHN₂ in Et₂O (54.0 μl , 108 μmol). After stirring for 5 min, the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. Further purification was carried out by silica gel column chromatography to give **4-40** (3.9 mg, 89%) as a colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.85 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.93 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 2.00 (septet, *J* = 6.9

Hz, 1H), 2.08 (br s, 1H), 3.43 (br s, 1H), 3.73 (dd, $J = 11.0, 2.3$ Hz, 1H), 3.80 (m, 1H), 3.83 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 16.4, 17.4, 32.7, 53.2, 66.5, 81.4, 176.1; IR (cm^{-1}): 3474, 2966, 1734, 1225, 1163, 1139, 1080; HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{NaO}_4$, 185.0790; found 185.0792

謝辞

本研究を遂行するにあたり、常に最良の実験環境を与えて下さり、多大なる御指導、御鞭撻を賜りました理化学研究所 袖岡有機合成化学研究室 袖岡幹子主任研究員に深く感謝致します。

本論文の執筆にあたり、適切な御助言、御指導を賜り、外研究生の受入に快諾して頂きました慶應義塾大学理工学部 戸嶋一敦教授に深く感謝致します。

本論文の作成に関し、客観的かつ建設的な御意見を賜りました慶應義塾大学理工学部 西山繁名誉教授、千田憲孝教授、末永聖武教授に深く感謝いたします。

学部 4 年生の時より多大なる御指導、御鞭撻を賜るとともに、常に筆者を支えて頂きました慶應義塾大学理工学部 西山繁名誉教授に改めて深く感謝致します。

理化学研究所での研究の機会を与えて頂き、研究全般に渡る数々の御助言と御指導を賜りました理化学研究所 袖岡有機合成化学研究室 平井剛専任研究員に深く感謝致します。

NMR 測定に御協力頂き、有益な御助言を賜りました理化学研究所 越野広雪ユニットリーダーに深く感謝致します。

本研究を進めるにあたり、GM3 アナログの生物活性試験および光親和性標識実験に御協力頂きました大沼可奈氏、代謝安定型 GM3 アナログの合成に関して御指導頂きました加藤麻理依博士、シクロプロパノール形成反応に御協力頂きました三瓶悠氏に深く感謝致します。

本研究に関して、客観的かつ有益な御助言を賜りました理化学研究所 袖岡有機合成化学研究室 瀧田孝介専任研究員、五月女宜裕研究員に深く感謝致します。また、有機化学に関する的確な御助言を賜りました静岡県立大学薬学部 江上寛通 助教に深く感謝致します。

質量分析および生化学実験に関して有益な御助言を賜りました浅沼三和子博士、大金賢司博士に深く感謝致します。

筆者の研究生活において多大なる御指導、御鞭撻を賜りました北里大学薬学部 梶英輔名誉教授、横浜市立大学国際総合科学部 石川裕一準教授、筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構 斉藤毅助教に深く感謝致します。

本研究を進めるにあたり、随所に適切な御助言を賜りました佐藤綾人講師、斉藤竜男助教、Dr. Frédéric Thuaud、Dr Joaquin Javier Barjau Vallet、小沢正晃博士、河村伸太郎博士、山口滋博士はじめ理化学研究所袖岡有機合成化学研究室の皆様、ERATO 袖岡生細胞分子プロジェクトの皆様に深く感謝致します。

日々の勉強会を通して数々の御助言を賜りました森田昌樹博士、清水怜博士、早水健二博士に深く感謝致します。

同じグループとしてともに研究に励んだ王 倩倩博士、関根大介氏、酒井基成氏、野村勇作氏、深澤亮氏、西澤絵里氏、藏本悠太氏、小嶋俊太郎氏、彦根佑哉氏、角本大樹氏、福島翔氏、名取文彦氏に深く感謝致します。

研究生活全般のお世話をして頂きました理化学研究所 袖岡有機合成化学研究室 斉藤泉さんに深く感謝致します。

大学での研究室生活において、多くの時間を共有し、支えて頂きました慶應義塾大学理工学部 天然物合成化学研究室の先輩方、同期、後輩の皆様に深く感謝致します。

最後に学生生活を送るにあたり、暖かく見守ってくださった父、母、弟、友人の皆様に深く感謝致します。

2016 年 2 月 太田 英介