



Title	免疫調節作用を有するEntamoeba histolytica由来イノシトールリン脂質の合成と生物活性
Author(s)	相羽, 俊彦
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61494
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

免疫調節作用を有する*Entamoeba histolytica*由来
イノシトールリン脂質の合成と生物活性

2017

相羽 俊彦

大阪大学大学院理学研究科

目次

略語表	1
論文概要	3
第一章 序論	
第一節 ナチュラルキラー(NK) T 細胞	5
第二節 CD1d および CD1d リガンド	6
第三節 イノシトールリン脂質	11
第四節 イノシトールリン脂質の合成研究	12
第五節 赤痢アメーバ <i>Entamoeba histolytica</i> 由来 イノシトールリン脂質	14
第二章 イノシトールに対する位置選択的リン酸化反応の開発と EhPIa の合成	
第一節 背景	17
第二節 位置選択的リン酸化反応の開発	20
第三節 EhPIa の合成	27
第四節 結論	29
第三章 アリルおよびアリルオキシカルボニル基を永続的保護基とする新規保護基 戦略による EhPIb および糖鎖含有 EhPIb の合成	
第一節 背景	30
第二節 EhPIb の合成	34
第三節 糖鎖構造を有する EhPIb の合成	37
第四節 結論	45
第四章 赤痢アメーバ由来イノシトールリン脂質の生物活性	
第一節 毒性試験	47
第二節 CD1d と合成イノシトールリン脂質との結合活性の評価	51
第三節 NKT 細胞刺激活性の評価	56
第四節 抗リーシュマニア活性の評価	59

第五章 総括	62
第六章 実験の部	64
参考文献	126
謝辞	133

略語表

AAG	alkylacylglycerol
Ac	acetyl
Alloc	allyloxycarbonyl
BMDC	bone marrow derived dendritic cell
BMM	bone marrow derived macrophage
Bn	benzyl
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
Bz	benzoyl
CAN	ammonium cerium nitrate
CD	cluster of differentiation
Cer	ceramide
CMC	critical micelle concentration
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DCC	dicyclohexylcarbodiimide
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinone
DEAD	diethyl azodicarboxylate
DIAD	diisopropyl azodicarboxylate
DMAP	<i>N,N</i> -dimethylamino pyridine
DMBA	dimethylbarbituric acid
DCE	dichloroethane
DMF	dimethylformamide
EDCI	1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide
ER	endoplasmic reticulum
Et ₃ N	triethylamine
Fmoc	9-fluorenylmethyloxycarbonyl
GalCer	galactosyl ceramide
GlcACer	glucuronosyl ceramide
GlcCer	glucosyl ceramide
GlcDAG	glucosyl diacylglycerol
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GPI	glycosylphosphatidylinositol

HOBt	<i>N</i> -hydroxybenzotriazole
HRP	horseradish peroxidase
IFN	interferon
IL	interleukin
<i>m</i> CPBA	<i>m</i> -chloroperbenzoic acid
Me	methyl
MHC	major histocompatibility complex
MOM	methoxy methyl
Nap	2-naphthylmethyl
<i>p</i> -TsOH	<i>p</i> -toluenesulfonic acid
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PE	phosphatidylethanolamine
PG	protecting group
Ph	phenyl
PI	phosphatidylinositol
PMB	<i>p</i> -methoxybenzyl
PPh ₃	triphenylphosphine
RBC	red blood cells
ROR	RAR-related orphan receptor
TAPS	<i>N</i> -Tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropanesulfonic acid
TBAF	tetrabutylammonium fluoride
TBAI	tetrabutylammonium iodide
TBDPS	<i>tert</i> -butyldiphenylsilyl
TBS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -butyl
TCR	T cell receptor
Tf	trifluoromethanesulfonic
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
TMS	trimethylsilyl
TNF	tumor necrosis factor
WSC	water soluble carbodiimide

論文概要

本論文では、免疫調節活性を有する赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* 由来イノシトールリン脂質について、新たに確立したイノシトールリン脂質の合成戦略に基づき化学合成を行い、生物活性試験を行うことで、免疫調節活性の解析を行った。

Entamoeba histolytica の細胞膜構成成分であるリポペプチドホスホグリカン(*EhLPPG*)は、GPI アンカー型の糖イノシトールリン脂質であり、脂質受容体 CD1d を介してナチュラルキラー (NK) T 細胞を活性化することにより、宿主の免疫調節機能に作用することが報告されている。*EhPIa* および *EhPIb* は、*EhLPPG* の免疫調節作用の最小構造として単離されたイノシトールリン脂質である。これらの分子は、1) リゾ型グリセロ脂質、2) 炭素数 28 あるいは炭素数 30 の長鎖脂肪酸を持つ、といった特徴的な構造を有している。天然より単離された *EhLPPG*、*EhPIa* および *EhPIb* は異なる脂質構造の混合物であること、グリセロール *sn*-2 位の立体が未決定であったことから、詳細な脂質構造と生物活性との相関は明らかとなっていない。また、*EhLPPG* は、GPI 型の糖鎖構造を有しているが、特に糖鎖がイノシトールリン脂質に結合することによる免疫調節活性への影響は明らかとなっていない。そこで、本研究では、グリセロール *sn*-2 位の両立体および *EhLPPG* の糖鎖単位構造を有する *EhPI* を単一の脂質含有構造として化学合成し、生物活性試験を行うことにより、その免疫調節活性の解析を行うこととした。

はじめに、効率的なイノシトールリン脂質合成法の確立を目指し、イノシトールに対する位置選択的リン酸化反応の開発を行った。すなわち、不斉補助基に BINOL、リン原子上にセレンを有するリン酸化剤を適用することで、望むイノシトール一位リン酸化体を高収率で選択的に得ることに成功した。また、Ni 触媒によるアルキル炭素間のカップリング反応を鍵反応とする長鎖脂肪酸合成法を適用することで、グリセロール *sn*-2 位の二つの立体の *EhPIa* の合成を達成した。(第二章)

つぎに、分子内に不飽和結合を有する *EhPIb* および糖鎖構造を有する *EhPIb* の合成を行った。*EhPIb* の合成において、分子内に不飽和結合を有する複雑な複合脂質合成に対する新たな合成戦略を開発した。すなわち、水酸基の永続的保護基にアリル基およびアリルオキシカルボニル基を適用し、最終脱保護において、これらの保護基を高極性溶媒中で遷移金属触媒を用い一挙に除去する戦略である。本戦略を適用することにより、三種の脂質構造を有する *EhPIb* および単糖・四糖構造を有する *EhPIb* の合成を達成した。(第三章)

最後に、合成化合物について、各種生物活性を行い、その免疫調節活性を解析した。CD1d 分子との結合活性試験では、炭素数 30 で *cis* 二重結合を含有した脂肪酸を有する *EhPIa* および *EhPIb* が結合活性を示し、CD1d 分子との直接的な相互作用を示唆する結果が得られ

た。また、NKT 細胞刺激活性試験では、本研究で合成した EhPIb が IFN- γ 誘導活性を示し、単離 *Eh*LPPG の活性と同様の結果が得られたことから、EhPIb が活性構造であることを示すことに成功した。さらに、本研究で合成したイノシトールリン脂質は、抗リーシュマニア活性を示すなど特異な活性を有することが明らかになるなど、赤痢アメーバ由来イノシトールリン脂質の新たな生物活性の発見に貢献した。(第四章)

第一章 序論

第一節 ナチュラルキラー(NK) T 細胞

ナチュラルキラー(NK) T 細胞は、細胞性免疫に関わる自然リンパ球の一種であり、がん細胞やウイルス感染細胞などを攻撃して生体防御にあたる。NKT 細胞は抗原提示細胞による制御を受けており、抗原提示細胞は細胞表層の MHC-class I 様抗原提示分子である CD1d に結合した脂質・糖脂質を、NKT 上の $\alpha\beta$ TCR に提示して、活性化する^{1,2}。NKT 細胞は、発現する $\alpha\beta$ TCR の種類によって、二つに大別される³。すなわち、遺伝子にコードされたインバリエントな TCR α 鎖を有する invariant NKT (iNKT) 細胞と多様な TCR α 鎖を有する diverse (variant) NKT (dNKT or vNKT) 細胞である。マウス iNKT 細胞は、インバリエントな TCR α 鎖として V α 14-J α 18 あるいは V α 10-J α 50⁴、TCR β 鎖は V β 8.1、8.2、7、2 を発現している。一方、ヒト iNKT 細胞は、V α 24-J α 18、V β 11 を発現している。また、iNKT 細胞は、その細胞表層に NK1.1 や Ly49 ファミリータンパク質といった NK 細胞マーカーを発現しており、そのほかにもメモリーT細胞に特徴的な CD25、CD44、CD69 といった分子や、ヘルパーT細胞に特徴的な CD4 あるいは、キラーT細胞に特徴的な CD8 α といった共受容体を発現している。iNKT 細胞は、脾臓、肝臓、胸腺、骨髄に多く存在し、リンパ節、末梢血、脂肪組織、皮膚組織、肺や小腸の粘膜組織にも見られる。また、その存在率は動物種によって異なり、マウスは脾臓細胞の 1-2%、肝臓リンパ球の 20-30%を占めるものの、人においては少なく、末梢血の T 細胞中 0.1-0.2%のみである。

α -Galactosylceramide (α -GalCer)⁵ などの CD1d リガンドによる刺激によって活性化した iNKT 細胞は、様々なサイトカイン、ケモカインの産生や、細胞障害性を示すことで、免疫系において重要なエフェクター作用を示す⁶⁻⁸。その際に産生するサイトカインは、IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-13、IL-17、IL-21、GM-CSF などが同定されている⁹。近年では、ある特定のサイトカイン産生をする iNKT 細胞のサブセットも同定されている。すなわち、Tbet⁺ NKT1 細胞は IFN- γ 、GATA3⁺ NKT2 細胞は IL-4、IL-13、ROR γ t⁺ NKT17 細胞は IL-17a、NKT10 細胞は IL-10 を産生するサブセットであると同定されており、それぞれの細胞は特定の臓器や組織に存在し、増殖・成熟化する^{10,11}。iNKT 細胞は自然免疫受容体からの刺激によって産生されたサイトカインによっても活性化が可能であり^{7,8}(Fig. 1-1)、この経路による iNKT 細胞の活性化によって、CD1d リガンドを持たない微生物に対しても NKT 細胞による免疫応答が可能である。iNKT 細胞は、産生するサイトカインを介して樹状細胞、NK 細胞、B 細胞、ヘルパーT (CD4⁺) 細胞やキラーT (CD8⁺) 細胞の活性化を行うことで、獲得免疫系の活性化やヘルパーT 細胞のバランス(Th1/Th2)に関与していることが明らかとなっている¹²⁻¹⁴。このように iNKT 細胞は、免疫系においてエフ

エクター作用を示すことで、微生物免疫^{8,15}、腫瘍免疫¹⁶、腸管免疫¹⁷、自己免疫疾患¹⁸、移植免疫¹⁹、アレルギー疾患²⁰、炎症性疾患²¹や代謝性疾患^{22,23}など広範な免疫応答や疾患に関与しているとされ、この特徴を利用した疾患治療法の開発も盛んに行われており²⁴⁻²⁸、生体防御において重要な役割を果たす細胞として位置付けられている。

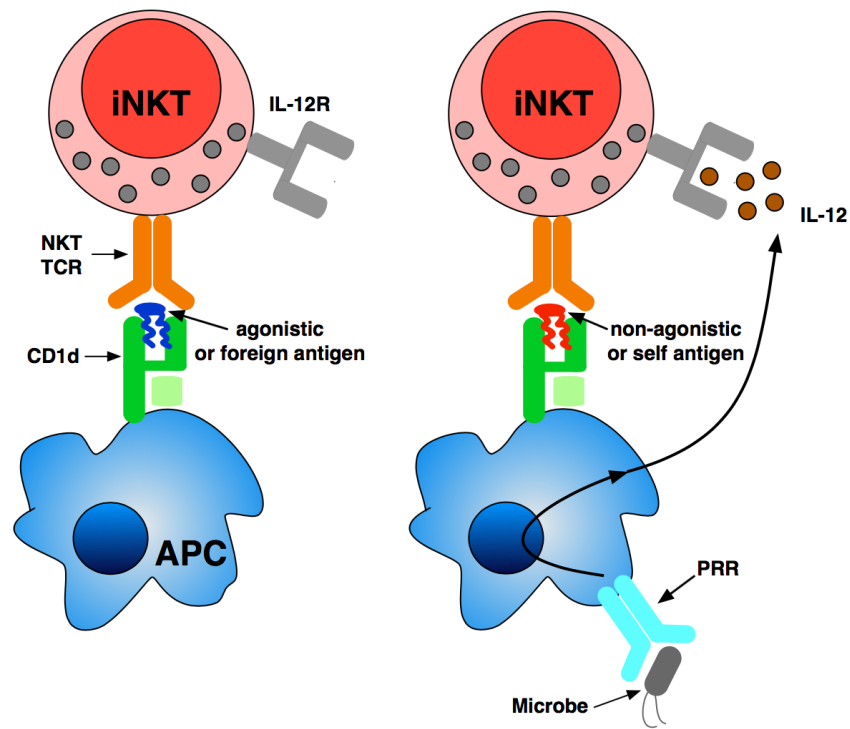


Fig. 1-1 iNKT 細胞の活性化経路²

第二節 CD1d および CD1d リガンド

CD1d は、MHC class I 様抗原提示分子である CD1 ファミリータンパク質の一つであり、抗原提示細胞だけでなく、胸腺細胞、肝臓細胞、腸管上皮細胞、B 細胞など広く組織、細胞に分布しているタンパク質である¹²。これまでに、様々な構造を有するリガンドと、マウスおよびヒト CD1d との複合体の結晶構造が解析されている⁶。CD1d は、A'ポケットと F'ポケットという 2 つの大きな疎水性の抗原結合領域を有しており、代表的リガンドとして知られている α -GalCer の場合は、長鎖アシル基が A' ポケットに、スフィンゴシン部分が F' ポケットに結合しており、親水性のガラクトース部分は二本の α ヘリックスの上部に位置している²⁹(Fig. 1-2)。その他のリガンドについても同様の形式で結合することが明らかとなっている³⁰⁻³²。

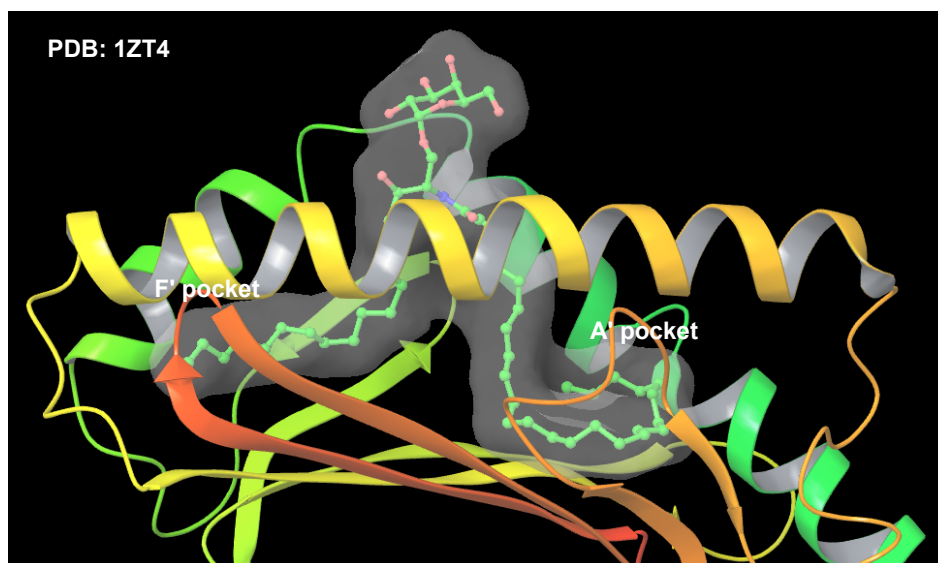


Fig. 1-2 CD1d-リガンド複合体 (PDB: 1ZT4)

CD1d は、他の CD1 分子の発現時と同様に、小胞体(ER)においてフォールディングされ^{33,34}、その際に、タンパク質構造の安定化のため、ER 内のリン脂質をシャペロン脂質として結合させている³⁵。その後、CD1d はゴルジ体を経由して細胞膜に提示された後、チロシンモチーフとアダプタータンパク質である AP-3 と相互作用することにより、エンドサイトーシス経路で再度細胞内に取り込まれ、最終的に後期エンドソームあるいはリソソームに到達する³⁶。これらに到達した CD1d は、サポシン A-D^{37,38}、GM2 activator³⁹、Niemann-Pick C2 型タンパク質⁴⁰ といった脂質輸送タンパク質を介して脂質抗原と結合し、再び細胞膜に提示される(Fig. 1-3)。一方、親水性の高い CD1d リガンドについては異なるリガンド結合経路も提唱されている。すなわち、短いアシル鎖、スフィンゴシン鎖や不飽和結合を含むアシル鎖などの構造を有する α -GalCer 誘導体は、エンドソーム/リソソームへの取込みを介することなく、細胞膜上の CD1d に直接結合する経路も存在することが示されている⁴¹。

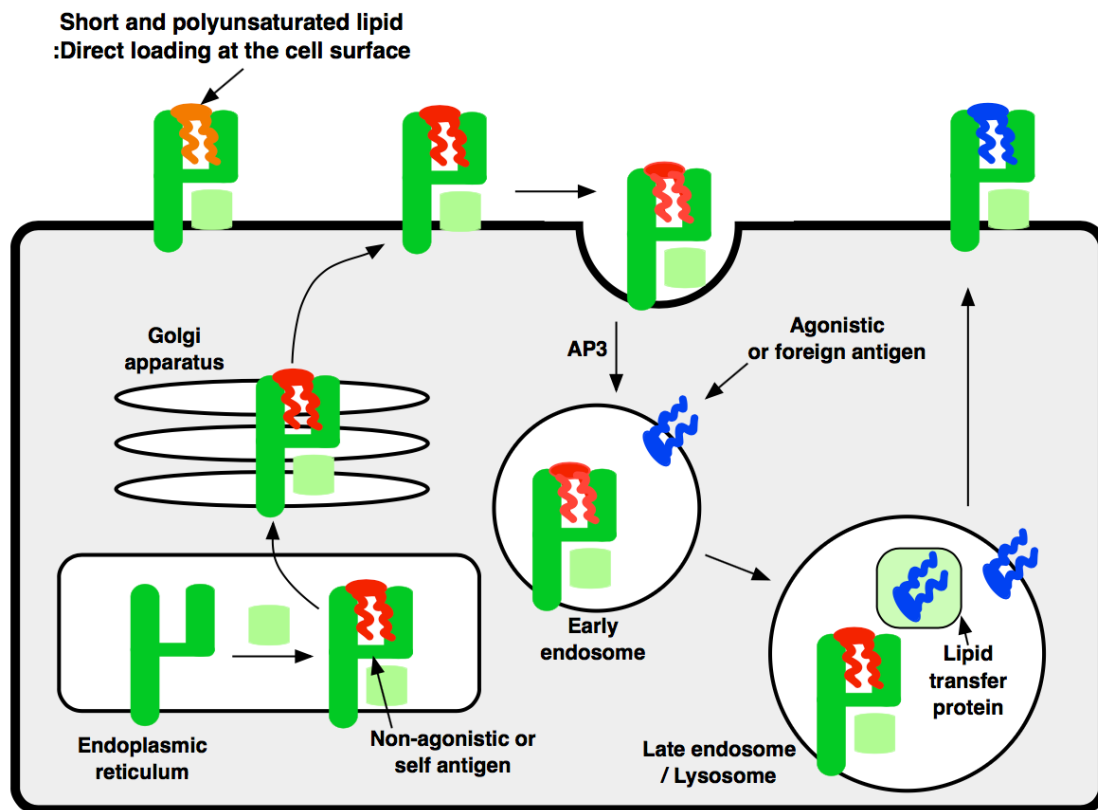
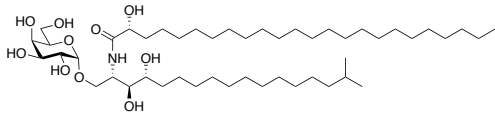
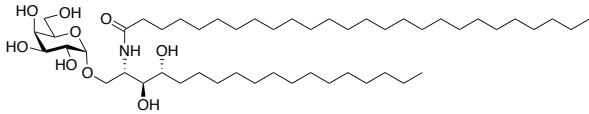
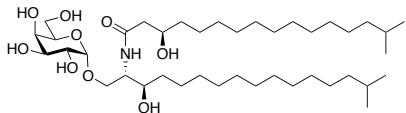
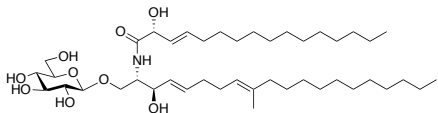
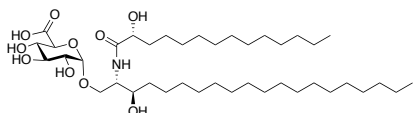
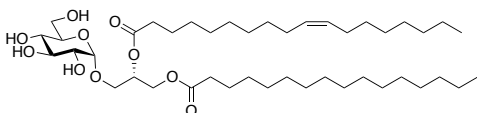
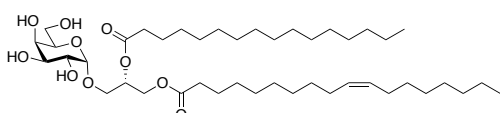
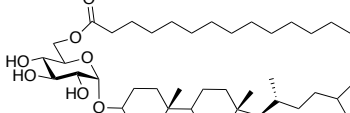
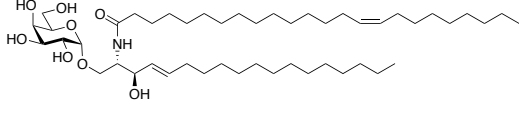
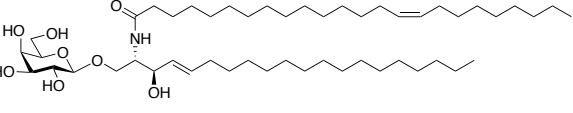
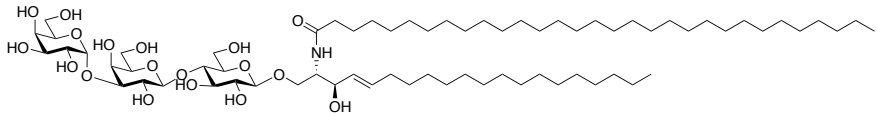
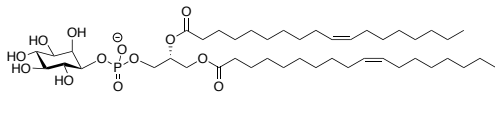
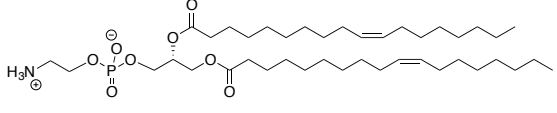
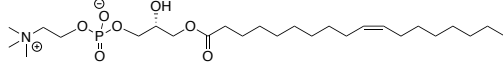
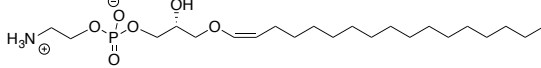


Fig. 1-3 CD1d リガンドの提示機構

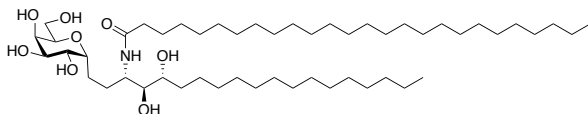
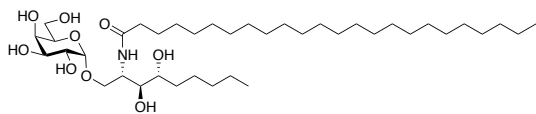
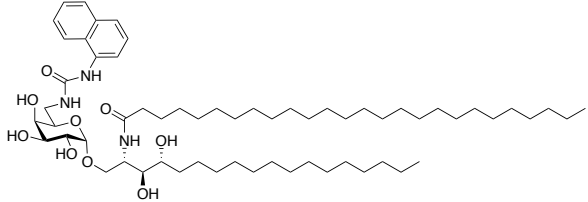
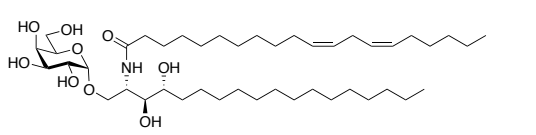
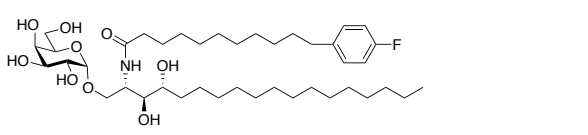
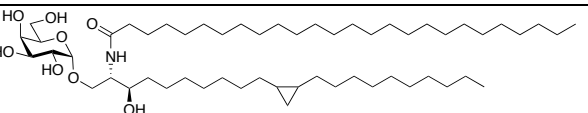
CD1d は、種々の脂質分子と結合することが可能であり、これまでに、スフィンゴ糖脂質、ジアシルグリセロール、リン脂質、リポペプチド、エーテル脂質、小分子やペプチドがリガンドとして同定されている。代表的リガンドとして知られている α -GalCer (KRN7000)⁵は、海綿 *Agelas mauritianus* より単離された agelasphin 9b⁴² より誘導化された糖脂質であり、CD1d に結合し、NKT 細胞を強く活性化する⁴³ ことから NKT 細胞の機能解析に最も使われている脂質リガンドである。このほかに外因性リガンドとして、共生菌 *Bacteroides fragilis*^{44,45} 由来 α -GalCer や *Aspergillus fumigatus*⁴⁶ 由来 β -GalCer, *Sphingomonas* 由来 α -GlcACer⁴⁷, *Streptococcus pneumoniae* 由来 α -GlcDAG⁴⁸ や *Borrelia burgdorferi* 由来 α -GalDAG⁴⁹, *Helicobacter pylori* 由来 cholesteryl α -glycosides⁵⁰, *Leishmania donovani*⁵¹ や *Entamoeba histolytica*⁵² 由来イノシトールリン脂質、*Mycobacterium tuberculosis* 由来イノシトールリン脂質⁵³ が同定されている。内因性リガンドは、 α -、 β -GalCer や GlcCer、isoglobotrihexosylceramide (iGb3)、ganglioside D3 (GD3) といったスフィンゴ糖脂質やホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、リゾ型のホスファチジルコリンが同定されている³⁰⁻³²。

Table 1-1 CD1d リガンド

 agelasphin 9b (<i>Agelas mauritanus</i>)	 α-GalCer (KRN7000)
 α-GalCer (<i>Bacteroides fragilis</i>)	 β-GalCer (<i>Aspergillus fumigatus</i>)
 α-GlcACer (<i>Sphingomonas</i>)	 α-GlcDAG (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)
 α-GalDAG (<i>Borrelia burgdorferi</i>)	 cholesteryl α-glycosides (<i>Helicobacter pylori</i>)
 α-GalCer (mammalian)	 β-GalCer (mammalian)
 iGb3 (mouse)	
 Phosphatidylinositol (PI)	 Phosphatidylethanolamine (PE)
 Lysophosphatidylcholine (LPC)	 Plasmalogen PE

α -GalCer の構造を基盤とした誘導体による構造活性相関研究によって、リガンド構造が iNKT 細胞活性化の強弱だけでなく、iNKT 細胞の産生するサイトカインのバランスにも影響することが明らかとなってきた^{54,55}。近年では、合成化合物だけでなく、天然由来の CD1d リガンドにおいても選択的なサイトカイン誘導を示すものも見つかっている⁵²(Table 1-2)。NKT 細胞のサイトカイン産生バランスを制御することは、がん免疫療法やワクチンアジュバントの開発や、多発性硬化症やクローン病などの自己免疫疾患などの疾患治療法開発の観点から重要であり、選択的に Th1 あるいは Th2 サイトカインを誘導する”バイアスドリガンド”の開発も行われているが⁵⁶、詳細な Th1/Th2 等のバランス制御機構は未だ明らかとなっていない。本研究では、Th1 型サイトカインとして知られる IFN- γ を選択的に誘導する CD1d リガンドとして単離・構造決定された *Entamoeba histolytica* 由来イノシトールリン脂質⁵²に着目し、その化学合成、生物活性の解析を行った。

Table 1-2 Th1/Th2 選択的リガンド

Th1	Th2
 α-C-GalCer	 OCH
 NU-α-GC	 α-GalCer (C20:2)
 7DW-8-5	
 SMC124	

第三節 イノシトールリン脂質

イノシトールリン脂質は、真核生物に広く保存されているリン脂質であり、D-*myo* イノシトールの一位水酸基にリン酸基を介して脂質部分が結合した基本構造を有している⁵⁷。イノシトールリン脂質の脂質構造は多様性に富んでおり、主にジアシルグリセロール、アルキルアシルグリセロール、あるいはセラミドが脂質分子として結合した構造が見出されている(Fig. 1-4)。グリセロールの立体は、生物種によって異なり、一般的に古細菌は *sn*-1 位(*sn*-2(*S*))にリン酸基を有する一方、細菌や真核生物は、*sn*-3 位(*sn*-2(*R*))にリン酸基を有することが知られている⁵⁸。イノシトールリン脂質は、生体膜構成脂質としての機能だけでなく、イノシトール上の水酸基が様々な修飾を受けることによりシグナル伝達やタンパク質の細胞膜への固定化など多様な生理機能を有している⁵⁹。また、イノシトールリン脂質は、CD1d に結合し NKT 細胞を活性化することも報告されていることから免疫機構への関与も示唆されている³¹。

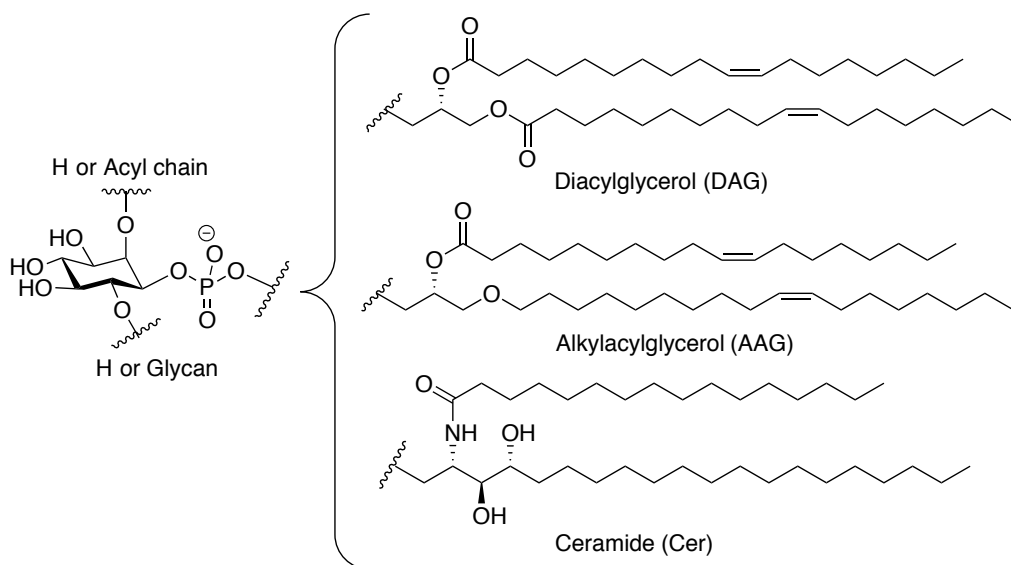
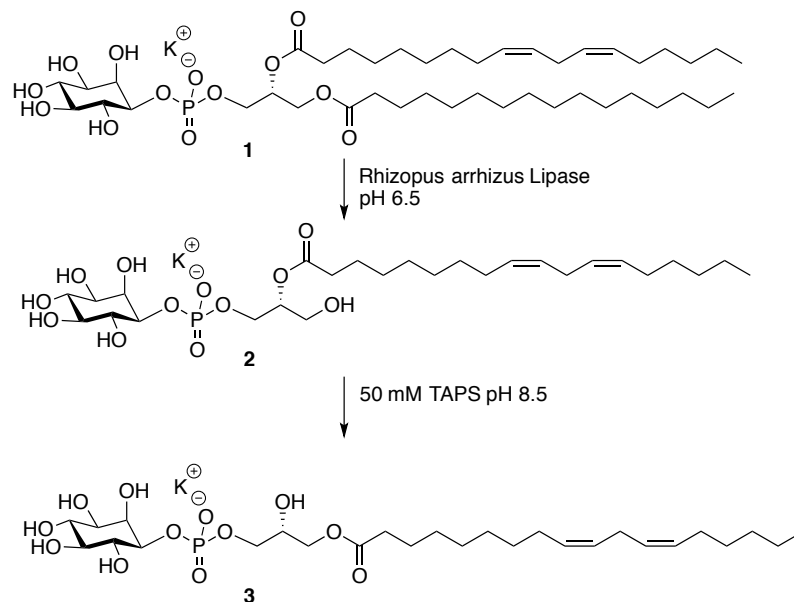


Fig. 1-4 イノシトールリン脂質基本構造

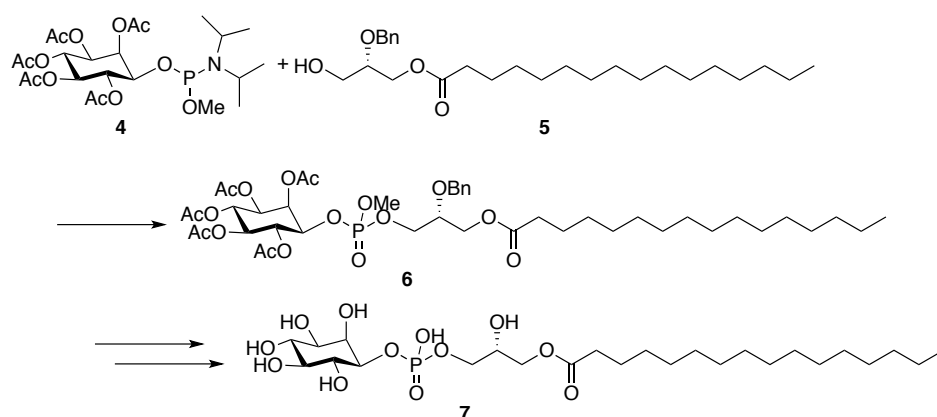
グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)は、タンパク質の C 末端に結合し、その GPI 脂質部位を介してタンパク質を細胞膜に固定化する機能を持つ複合糖脂質である⁶⁰。GPI は、共通構造としてホスホエタノールアミン、3つのマンノース、アセチル化を受けていないグルコサミンおよびイノシトールリン脂質を有しており、全体構造として EtNP-6Man(α 1-2)Man(α 1-6)Man(α 1-4)GlcN(α 1-6)*myo*-inositol-P-lipid を有している。イノシトールに結合する脂質部分の構造は、生物種によって異なるが、ジアシル型、アルキルアシル型、セラミド型が知られている⁶¹。原虫において、GPI は主要な細胞膜構成成分の一つであり、寄生性原虫の病原性因子としても知られている⁶²。また、GPI は原虫の宿主細胞への侵入や免疫応答からの逃避に重要な役割を果たしていることも明らかとなっている^{63,64}。

第四節 イノシトールリン脂質の合成研究

イノシトールリン脂質は、シグナル伝達、細胞膜形成や GPI アンカーとしてタンパク質の細胞膜への固定化など、多様な機能を有しており、その機能解析のため、これまで多くのグループによってイノシトールリン脂質やその誘導体の合成研究が報告されてきた⁶⁵。しかし、リゾ型イノシトールリン脂質の合成については限られた例が知られるのみであった。Vanmiddlesworth らは、大豆由来 1-stearoyl (or palmitoyl)-2-linoleoyl-3-glycero-phosphatidyl-D-*myo*-イノシトール **1** を出発原料とし、酵素法による *sn*-1 の脂肪酸の切断、続く *sn*-2 の脂肪酸の *sn*-1 への転位を経る半合成法によって Lysofungin の合成を達成している(Scheme 1-1)⁶⁶。また、Eibl らは、光学分割法を用いて得たイノシトール誘導体に対し、*sn*-2 位がベンジル基で保護されたアシルグリセロールを縮合した後、保護基を除去することにより lysophosphatidylinositol の合成に成功している(Scheme 1-2)⁶⁷。Vanmiddlesworth らの半合成法においては、出発物質が天然物であるため、原料の量的供給や、脂肪酸の構造が制限されてしまう問題点があった。また、Eibl らの方法は、光学活性なイノシトール中間体の合成において問題となる、水酸基の保護、脱保護の多数の工程が必要であった。そこで、本研究では、リゾ型を含むイノシトールリン脂質の効率的な合成法の開発を目指し、位置選択的リン酸化反応の開発による光学活性イノシトール中間体合成の効率化と、合成の終盤にアシルグリセロールユニットを導入する収束的合成によって誘導体合成の効率化をおこなった。



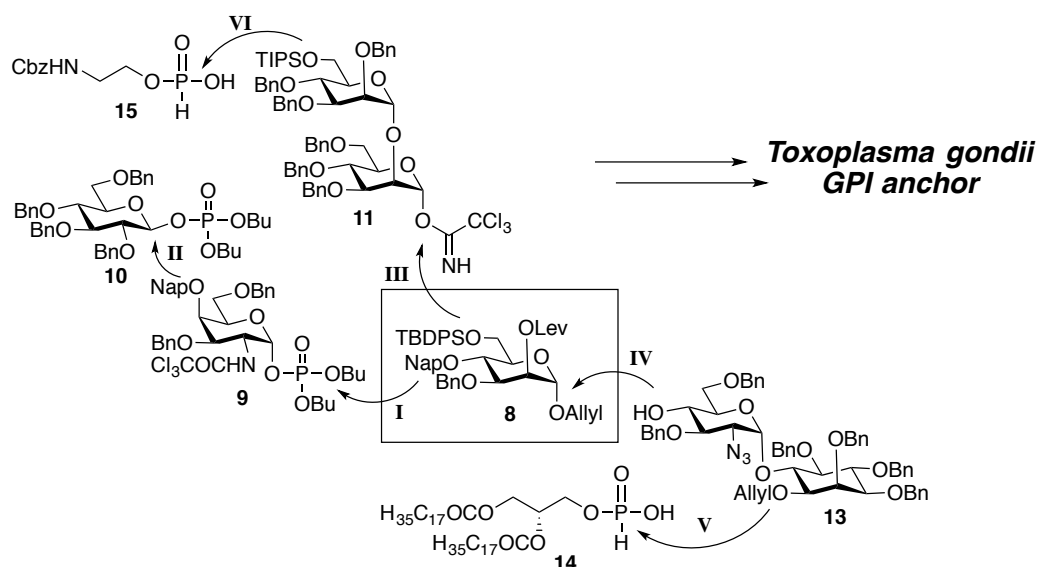
Scheme 1-2 リゾホスファチジルイノシトールの合成 (Vanmiddlesworth らの方法)



Scheme 1-2 リゾホスファチジルイノシトールの合成 (Eibl らの方法)

GPI アンカーは、その構造の複雑さ、寄生性原虫のワクチン⁶⁸や診断薬^{69,70}の開発の観点から化学合成研究が盛んに行われており、これまでに多くのグループによって合成が報告されてきた^{71,72}。Seeberger、Silva らは、*Toxoplasma gondii* の GPI アンカーの合成において、3つの直交的に除去可能な保護基を有するマンノース誘導体 **8** を鍵中間体として、それに対し順次糖鎖部分を導入する収束的な手法によって効率的に GPI 糖鎖部分を合成する合成戦略を開発した (Scheme 1-3)⁷³。本戦略は、様々な GPI 糖鎖部分の誘導体合成にも適用を可能であるが、脂質部分、特に不飽和結合を含む脂肪酸を有する誘導体の合成においては、最終的な保護基の除去に接触水素還元を用いているため適用が困難であった。

本研究では、上記に述べた合成法では困難であった不飽和脂肪酸含有構造など種々の GPI アンカー型糖脂質に展開しうる合成方法を開発し、次節で述べるように赤痢アメーバ感染症に関連する細胞表層分子として同定された不飽和脂肪酸を有する特異な構造を持つ GPI 型イノシトールリン脂質について、アリル基、アリルオキシカルボニル基を用いた保護基戦略を適用した化学合成を行い、合成化合物を用いた生物活性解析へ展開した。



Scheme 1-3 GPI アンカーの化学合成 (Seeberger ら)

第五節 赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* 由来イノシトールリン脂質

赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* (Fig. 1-5) は、腸に寄生する嫌気性寄生性原虫であり、アメーバ性大腸炎やアメーバ性肝膿瘍といった重篤な感染症を引き起こす病原体である⁷⁴。*E. histolytica* 感染により世界中で年間 100,000 人が死亡していると報告されている⁷⁴。近年、Lotter らにより、マウスモデルでのアメーバ性肝膿瘍発症において、*E. histolytica* の主要な細胞膜構成成分であるリポペプチドポスホグリカン(*EhLPPG*)が、CD1d/NKT 細胞や自然免疫応答を介し重要な役割を果たしていることが報告された⁵²。

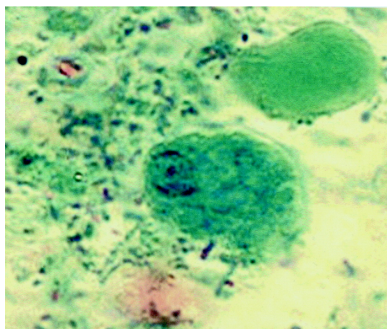


Fig. 1-5 赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* (トロフォゾイト期) Reprinted from Figure 1 (below), The Lancet, 361, Stanley SL Jr., Amoebiasis, 1025, 2003, with permission from Elsevier.

EhLPPG は、GPI アンカー型の複合糖脂質であるが、他の種の GPI と異なり、糖鎖部末端にガラクトースを有している。全体構造は、Gal α Man(α 1-6)Man(α 1-4)GlcN(α 1-6)*myo*-inositol-PO₃-lipid であり、ガラクトースのマンノー

スへの結合位置は未決定である⁷⁵。また、*EhLPPG* は、CD1d 依存的に NKT 細胞を活性化し、脾臓および肝臓リンパ球において IFN- γ 選択的なサイトカイン誘導を示すことが報告された⁵²。EhPIa および EhPIb は、NKT 細胞刺激活性を有する最小構造として単離された *EhLPPG* 末端部のイノシトールリン脂質である (Fig. 1-6)。EhPIb の構造的特徴として、1) 炭素数 28 あるいは分子内に不飽和結合を有する炭素数 30 といった長鎖脂肪酸、2) リゾ型のグリセロール、3) イノシトール 2 位のパルミトイル基が挙げられる。なお、グリセロール *sn*-2 位の立体は、他の原虫の GPI 構造⁷⁶ との比較から *R* 体だと予想されるが、未決定であり、また、長鎖脂肪酸の不飽和結合の位置は構造解析の結果から ω -9 と決定されているが⁷⁷、その幾何異性は未決定であった。EhPIb は *EhLPPG* と同様に、CD1d 拘束的な NKT 細胞活性化による IFN- γ 選択的なサイトカイン誘導を示すことが報告されている。以上の様に、*EhLPPG*、EhPIa、EhPIb は、特徴的な生物活性を示すことが報告されているが、天然より単離されたこれら化合物は異なる脂肪酸エステルの混合物であったこと、グリセロール 2 位の立体が未決定であったことから詳細な脂質構造と生物活性との相関は明らかとなっていなかった。さらに、*EhLPPG* は Gal-Man-Man といった特徴的な GPI 糖鎖構造を有しているがその生物活性への影響も明らかとなっていなかった。そこで、本研究では、EhPI の生物活性の詳細を解析するため、グリセロールの *sn*-2 位の二つの立体、単一脂質構造を有する EhPIa および EhPIb、さらに糖鎖構造を有する EhPIb の化学合成を行った。またその過程において、汎用的なイノシトールリン脂質合成法の確立を指向して、位置選択的リン酸化反応の開発およびアシルおよびアシルオキシカルボニル基を適用する新規保護基戦略の開発を行った。生物活性の解析では、まず、EhPI が有する長鎖脂肪酸が、細胞膜破壊などによる細胞毒性を有することが考えられたため、細胞毒性試験を行った。次に、EhPI の NKT 細胞活性化経路の解析のため、マウス CD1d との結合活性試験を行った。また、脂質構造および糖鎖構造と生物活性の相関を解析するため、合成した脂質構造および糖鎖構造の誘導体を用いて免疫細胞あるいは NKT 細胞のサイトカイン誘導評価を行った。さらに、天然の *EhLPPG* を用いた研究より見出された抗リーシュマニア活性⁷⁸ を、合成した EhPI を用いて解析した。

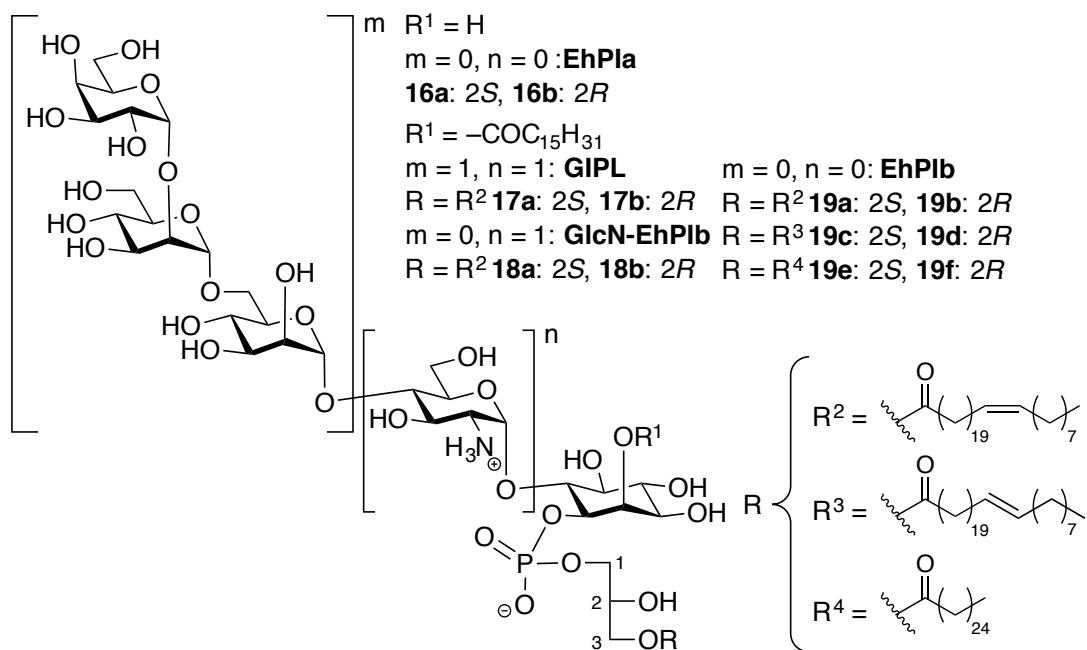


Fig. 1-6 *Entamoeba histolytica* 由来イノシトールリン脂質

第二章 イノシトールに対する位置選択的リン酸化反応の開発と EhPIa の合成

第一節 背景

イノシトールリン脂質は、生体における様々な機能に関与しており、その生理的機能や生物活性の解明のため、数多くのグループによって合成研究が行われてきた⁶⁵。また、イノシトールリン脂質は、水酸基を 6 つもつメソ体の *myo*-イノシトールを基本骨格として有しており (Fig. 2-1)、その特定の位置にリン酸基やその他の官能基を選択的・効率的に導入することは、合成における鍵段階であることから、これまでに位置・立体選択的なリン酸基の導入法が開発がされてきた。

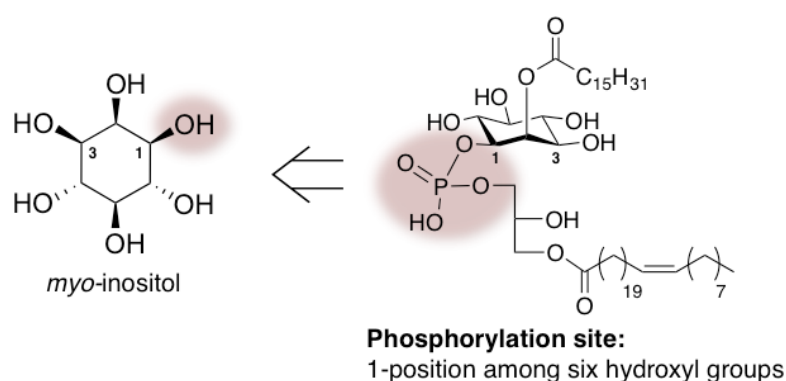
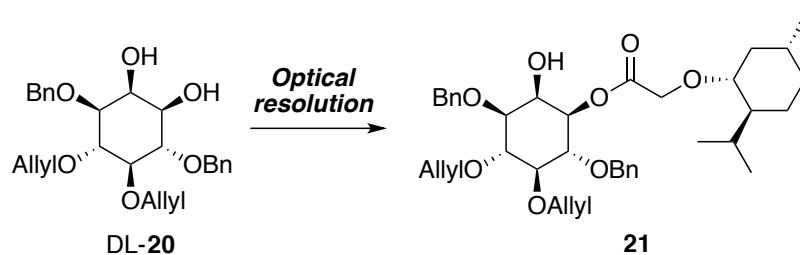


Fig. 2-1 位置特異的なリン酸化

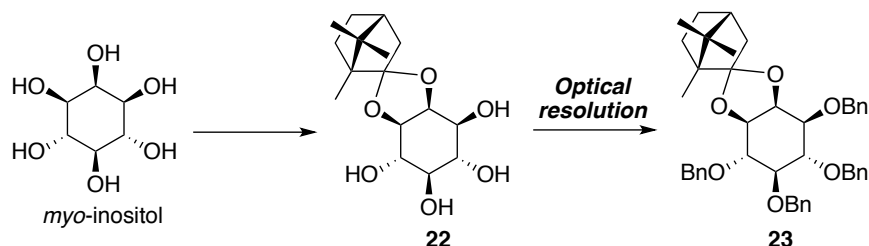
位置選択的なリン酸基の導入について、主に以下の 4 つの手法が開発されてきた (Scheme 2-1, Scheme 2-2)。すなわち、1) 光学分割法による光学活性なイノシトール誘導体の調製、2) キラルプール合成による光学活性イノシトール誘導体の調製、3) 市販の光学活性イノシトール誘導体の利用、4) イノシトールに対する直接的な位置・立体選択的なリン酸化である。1)において、尾崎、渡辺らは、ラセミ体のイノシトール誘導体に対し、光学活性なメントール誘導体を導入し光学分割するキラルなイノシトール誘導体の調製法を報告した⁷⁹。また Bruzik らは、無保護の *myo*-イノシトールに対し、D-camphor dimethyl acetal を作用させ、続いて水酸基のベンジル化を行うことで、光学活性イノシトール誘導体の合成に成功している⁸⁰。2)においては、Bender らは、D-グルコースを光学活性原料とするキラルプール法を用い Ferrier 転位反応を鍵反応として、光学活性イノシトールの合成に成功している⁸¹。3)においては、2,3:5,6-bis-*O*-(1-methylethylidene)-D-*myo*-inositol 1,4-dibutanoate (**27**)を出発原料とするイノシトールリン脂質合成が報告されている^{82,83}。4)において、Miller らは、メソ体の *myo*-イノシトール誘導体に対して、ジフェニルリン酸クロリドをリン酸化剤として光学活性なペプチド触媒を作用させることにより、高エナンチオ選択的に 1 位あるいは 3 位水酸基に

リン酸基を導入することに成功している⁸⁴。また、4、6 位水酸基に対し、光学活性ペプチド触媒存在下アミダイト試薬をリン酸化剤として作用させることで、立体選択的なリン酸基の導入に成功している⁸⁵。さらに近年では、リン酸化試薬上に不斉補助基を導入し、メソ体のイノシトール誘導体に対しリン酸化を行う調製法も報告されている。Jessen らは、マンデル酸誘導体を導入したホスホロアミダイト試薬を用いることで、位置選択性は見られないものの、通常の前製操作によって生成した立体異性体の単離に成功しており^{86,87}、さらにホスホロアミダイト試薬の活性化剤を pentafluorophenol へと変更することで、立体選択性を発現させることを報告している⁸⁸。

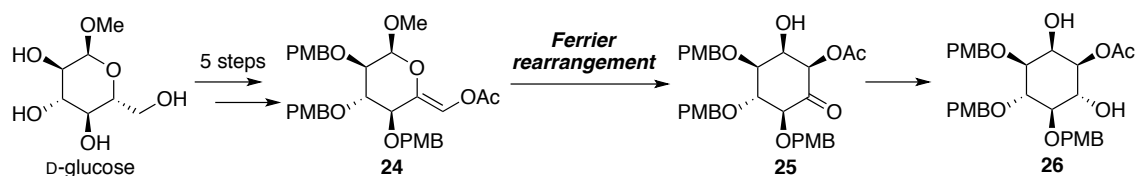
尾崎らの方法 (光学分割)



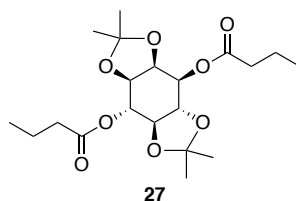
Bruzik らの方法 (光学分割)



Prestwich らの方法 (キラルプール法)

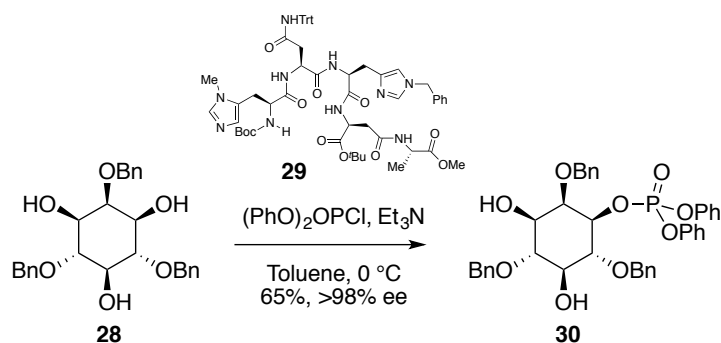


光学活性イノシトール化合物 (市販)

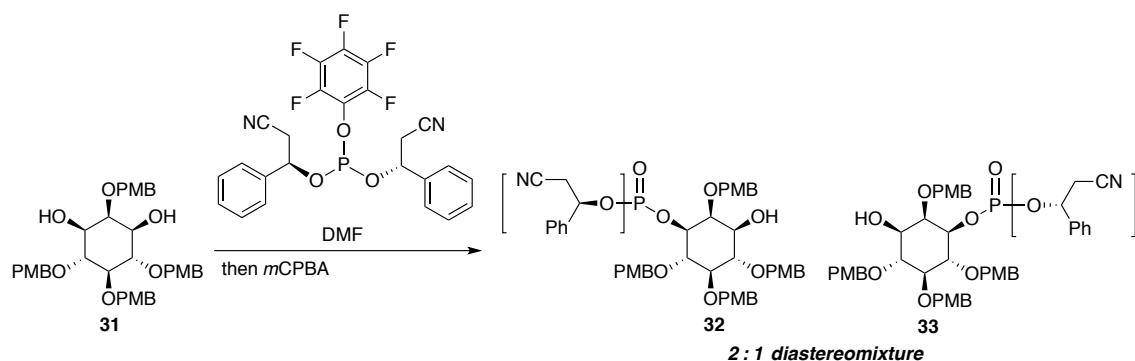


Scheme 2-1 光学活性イノシトール合成法 1

Miller らの方法 (エナンチオ選択的リン酸化法)



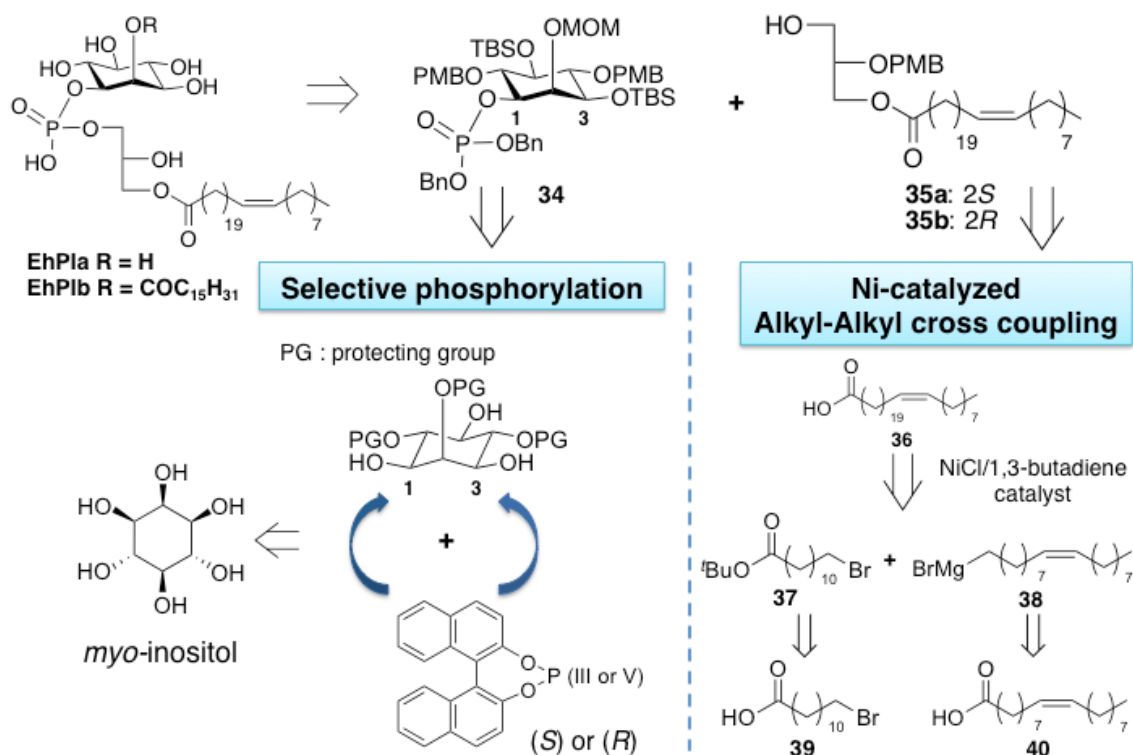
Jessen らの方法 (ジアステレオ選択的リン酸化法)



Scheme 2-2 光学活性イノシトール合成法 2

以上のように、これまでに数多くの位置選択的なリン酸基の導入法が報告されているが、1)、2)においては目的の化合物までに、保護・脱保護工程を含む多くの工程数が必要なこと、3)においては、市販のキラルイノシトール誘導体が高額であり、また、すでに導入されている保護基によって合成ルートが制限されること、4)の Miller らの手法では、基質ごとにペプチド触媒の設計が必要であること、Jessen らの手法では、リン酸基導入の選択性の低さといった改善の余地があった。

以上の背景から、筆者は EhPIa,b の合成において、効率的な新規イノシトールリン脂質合成法の確立を目指し、位置選択的リン酸化反応を鍵反応とする以下のような合成計画を立案した。(Scheme 2-3) すなわち、EhPIa および b は、イノシトールリン酸エステルとアシルグリセロールの二つのフラグメントにわけて合成し、連結させた後、酸性条件で保護基の除去を行うことで合成することとした。また、イノシトールリン酸エステルは、本研究で開発した、位置選択的リン酸化反応によって合成し、アシルグリセロールの長鎖脂肪酸は、神戸らによって開発された Ni 触媒によるアルキル-アルキルクロスカップリング反応⁸⁹を適用し、合成することとした。



Scheme 2-3 *Entamoeba histolytica* 由来イノシトールリン脂質の合成計画

第二節 位置選択的リン酸化反応の開発

当研究室の佐藤らは、次に示すコンセプトに基づき、新規な位置選択的リン酸化反応を立案した。(Fig. 2-2) すなわち、1位、3位、および5位水酸基が遊離のメソ体のイノシトール誘導体に対し、光学活性な 1,1'-bi-2-naphthol (BINOL) を不斉補助基として有する三価および五価リン酸化剤を作用させ、選択的リン酸基を導入する手法である。本反応で用いるリン酸化剤は、市販品より 1 ポット 1 工程ないし 2 工程にて簡便に合成可能である^{90,91}。また、反応基質として設計したイノシトール誘導体は、1位及び3位の水酸基が立体的に空いているため、5位水酸基よりも優先的に反応すると考えた。さらに、生成物である 1位および 3位リン酸化体はジアステレオマーとなるため、通常の精製操作によって望む立体異性体の単離が可能となる。

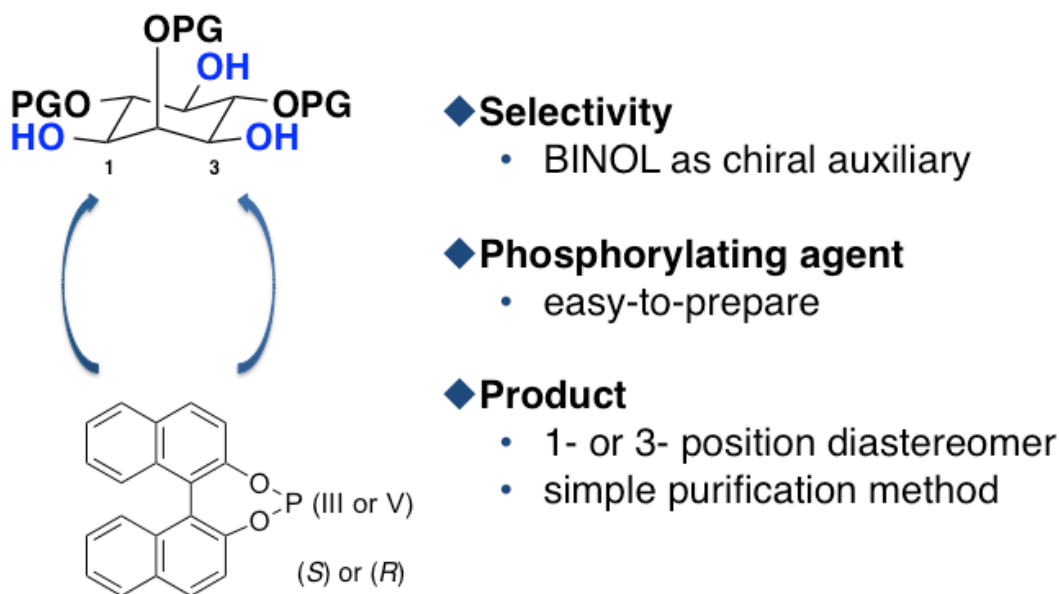
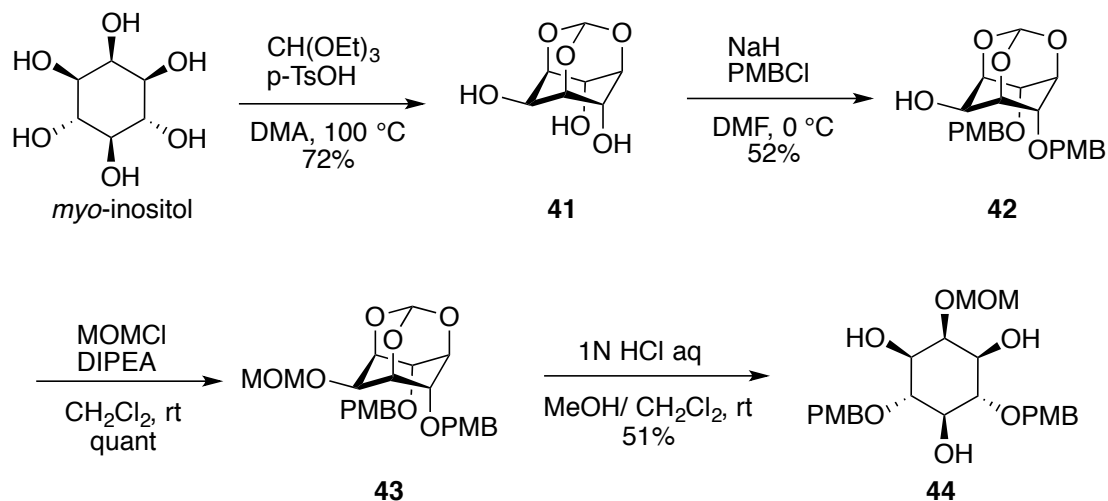


Fig. 2-2 位置選択的リン酸化反応のコンセプト

まず、リン酸化反応の基質となるイノシトール誘導体の合成を行った(Scheme 2-6)。myo-イノシトールを出発原料とし、1,3,5 位水酸基をオルトエステル化⁹²した後に、4,6 位を *p*-メトキシベンジル(PMB)基で、2 位を MOM 基で保護し、オルトエステルを酸性条件で加水分解することで、**44** を得た。



Scheme 2-4 イノシトール誘導体 **44** の合成

当研究室の佐藤は、**44** を基質として、5 価のリン酸化剤である **47** を用いたところ、モノリン酸化体を収率 40% で得たものの、位置選択性は見られなかった(1-P:3-P = 50:50) (Table 1, Entry 1)。次に別のリン酸化手法であるホスホロアミダイト法を適用し、**48** を用いたところ、収率 74%、79:21 の選択性で 1 位リン酸化体 **45** を優先的に得ることに成功した(Entry 2)。本条件により、望む 1 位リン酸化体 **45** を良好な収率で得られたものの、選択性や、**48** の反応性の低さにより過剰量の試薬が必要であること、反応時間を長時間要することなどの理由により、改善の余地があった。まず **48** を用いて種々検討したものの、良好な結果は得られなかった。そこで筆者は、選択性の向上を目指し、さらなる検討を行った。Entry 3, 4 では、反応時間の短縮を指向して、高活性な活性化剤(6-CF₃HOBT⁹³)および、より柔軟な構造をもつ H₈-BINOL を不斉補助基として有するリン酸化剤 **49**⁹⁴ を用いたが、副生成物である過剰なリン酸化体が生じ、目的物の収率、さらに位置選択性が低下する結果となった⁹⁵。

Table 2-1 位置選択的リン酸化反応の検討 1

 (R)-BPC (47) (R)-BPA (48) (R)-H₈-BPA (49)			
Entry	Reagent (eq.)	Time	yield dr (45 : 46)
1	47 (5.0), Et ₃ N (2.0), DMAP(0.5)	1 d	40%, dr (50 : 50)
2	48 (5.0), tetrazole (5.0)	1 d	74%, dr (79 : 21)
3	48 (3.0), HOBT-CF ₃ (6.0)	1 h	53%, dr (75 : 25)
4	49 (5.0), tetrazole (5.0)	2.5 h	49% ^b , dr (90 : 10)

a: Structure was determined by X-ray crystallography. b: contains diphosphate ca. 50%.

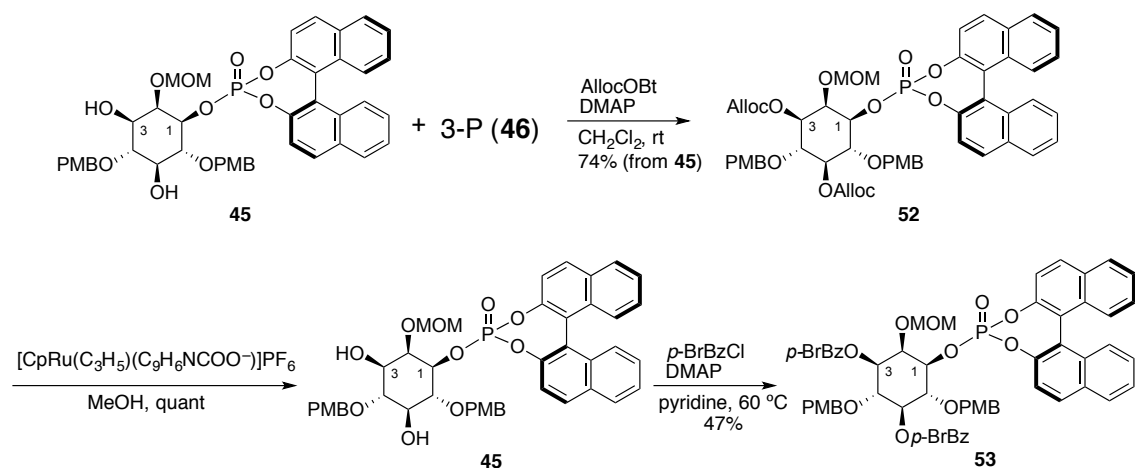
次に筆者は、五価リン酸化剤のリン上の原子に着目し、O、S、Se と変換することで収率および選択性の向上を試みた(Table 2-2)。はじめに、DMAP を塩基として **47** を作用させた

ところ、Table 2-1 と同様に選択性は見られなかった(Entry 2)。次に O から S、Se へと変換したリン酸化剤 **50**、**51** を用いて検討を行った。これらの試薬は、村井らによってラセミ体のアルコールやアミン化合物のキラル誘導化・光学分割試薬として開発された化合物である^{96,97}。また、S、Se は *m*CPBA などを用いる酸化反応によって酸素原子へと変換可能である。まず、硫黄原子を有する **50** を用いた。その結果、目的生成物はわずかしき得られなかった。これは、**50** のジクロロメタン中における溶解性が良くないこと、硫黄原子の酸化が進行しにくかったことが要因と考えられる。しかし、本条件においてわずかながら位置選択性の向上が見られた(67:33)。次に、セレン原子を有する **51** を用いたところ、リン酸化ならびに酸化反応がともに円滑に進行した。その結果、収率および選択性はさらに向上し、収率 74%、88:12 の選択性で望む 1 位リン酸化体 **45** を得ることに成功した。本反応では、リン酸上の原子が O、S、Se と原子半径が大きくなるにつれ、リン酸化反応の選択性が向上した。反応性および選択性の向上は、原子半径の増大による電子的、立体的な要因が反応の遷移状態に影響を及ぼしたためだと考えられる。今後、量子化学計算によって本反応の遷移状態を解析する予定である。なおこの条件は、グラムスケール(20 mmol)にも適用可能であり、本イノシトールリン脂質合成における重要中間体の量的供給も可能とした。また、反応溶媒を THF、トルエンと変更したところ(Entry 5, 6)、リン酸化試薬の溶解性が低下し、収率および選択性の低下が見られたため、CH₂Cl₂ が最適な反応溶媒であると決定した。

Table 2-2 位置選択的リン酸化反応の検討 2

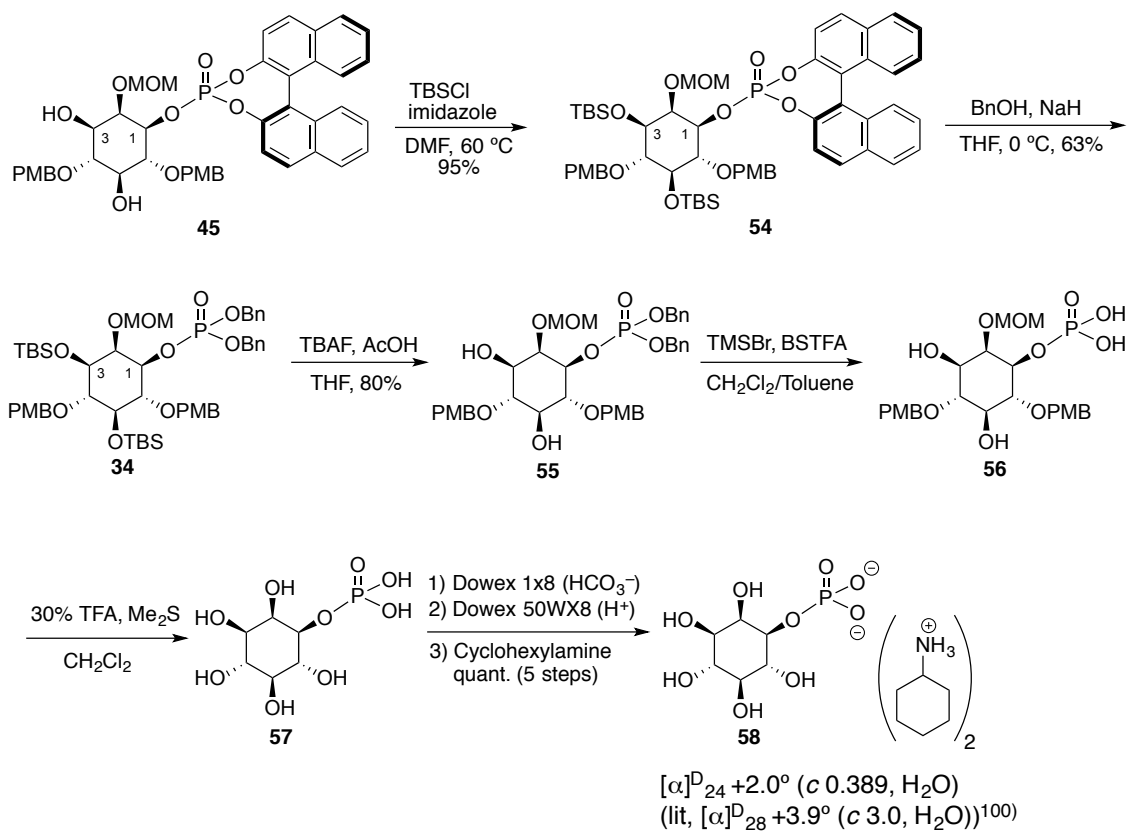
Entry	Reagent (eq.)	Solvent	Temp.	yield	dr (45 : 46)
1	48 (5.0), 1H-tetrazole (5.0)	CH ₂ Cl ₂	r. t.	74	79:21
2	47 (2.0), DMAP (2.0)	CH ₂ Cl ₂	0 °C	56	50:50
3	50 (2.0), DMAP (2.0) then <i>m</i> CPBA (5.0)	CH ₂ Cl ₂	0 °C	4	66:34
4	51 (2.0), DMAP (2.0) then <i>m</i> CPBA (2.0)	CH ₂ Cl ₂	0 °C	74	88:12
5	51 (2.0), DMAP (2.0) then <i>m</i> CPBA (2.0)	THF	0 °C	16	76:24
6	51 (2.0), DMAP (2.0) then <i>m</i> CPBA (2.0)	Toluene	0 °C	3	61:39

次に、ジアステレオマー混合物である **45** および **46** の分離の検討を行った(Scheme 2-3)。**45**、**46** は、再結晶やカラムクロマトグラフィーといった通常の精製操作では分離が困難であったため、**45**、**46** の 3,5 位水酸基に保護基を導入した化合物について分離の検討を行った。種々の保護基の検討の結果、Alloc 基を導入した **52** において、カラムクロマトグラフィーによるジアステレオマーの分離に成功した。続いて、得られた単一の異性体について構造決定を行った。はじめに、X 線結晶構造解析による構造決定を試みた(Scheme 2-7)。結晶化に用いる化合物を調製するため、**52** に対し、北村らによって開発された Ru 触媒^{98,99}を用いて Alloc 基を除去した後、結晶化を促進する *p*-ブロモベンゾイル基を導入し **53** を得た。



Scheme 2-5 *p*-BrBz 化体 **53** の合成

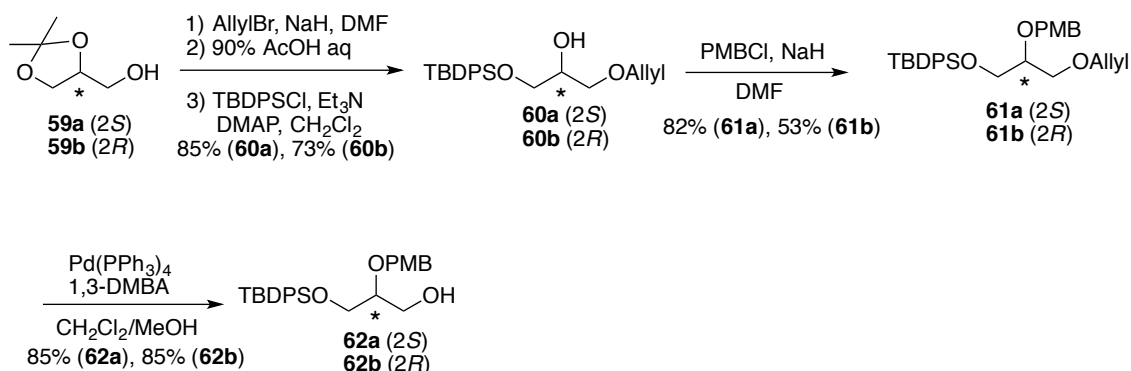
53 をアセトニトリル中で再結晶し結晶を得た後、X 線結晶構造解析を行った。しかしながら、得られた結晶が含溶媒結晶であったために結晶の質が悪く、構造確認はできたものの、決定までは至らなかった。そこで、文献既知のイノシトール-1-リン酸¹⁰⁰へと誘導し、旋光度を文献値と比較することで構造決定を行うこととした(Scheme 2-6)。**45** に対し、TBS 基を導入し、BINOL をベンジルエステルへと変換し **34** を得た。続いて、TBS 基の除去、残る保護基を酸性条件によって除去し、陰イオン交換樹脂および陽イオン交換樹脂をもちいて精製し、ジジクロヘキシルアミン塩とすることで **58** を得た。**58** の旋光度は+2.0 (文献値¹⁰⁰: $[\alpha]_{\text{D}}^{28} + 3.9^\circ$ (*c* 3.0, H₂O))を示し 1 位リン酸化体であると決定した。



Scheme 2-6 イノシトール 1 リン酸 **58** の合成

第三節 EhPIa の合成

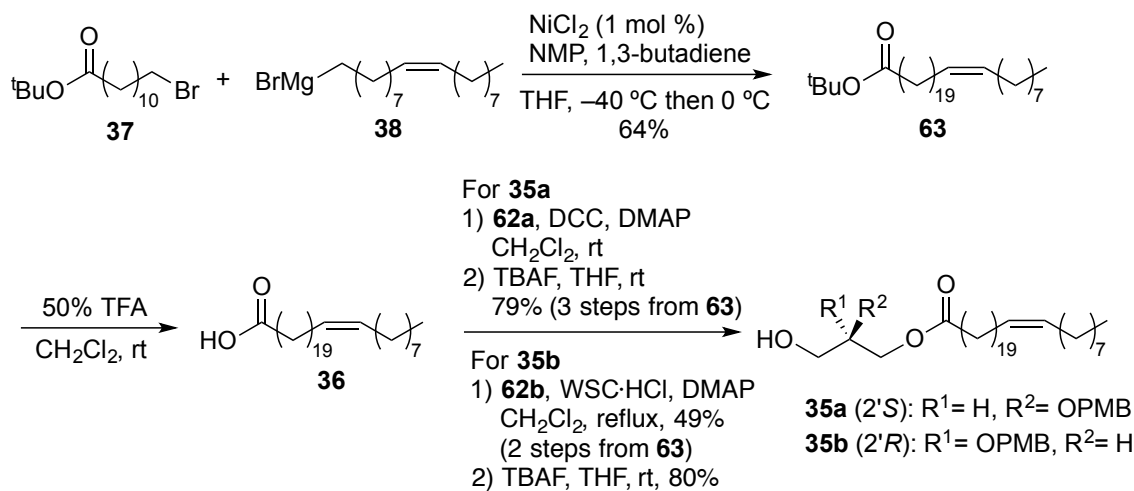
EhPIa および EhPIb は、グリセロール *sn*-2 位の立体が未決定であったことから、*sn*-2 位の *R* および *S* 体の両方を合成し、その構造活性相関を調べる計画とした。そこでまず、グリセロール部分の合成を行った(Scheme 2-7)。市販の光学活性グリセロール誘導体 **59a** より、アリル基の導入、イソプロピリデン基の除去、シリル基の導入の三工程を経て **60a** を得た後、*sn*-2 位への PMB 基、アリル基の除去を経て、アルコール **62a** を得た。逆の立体の **62b** についても同様の工程で合成を行った。



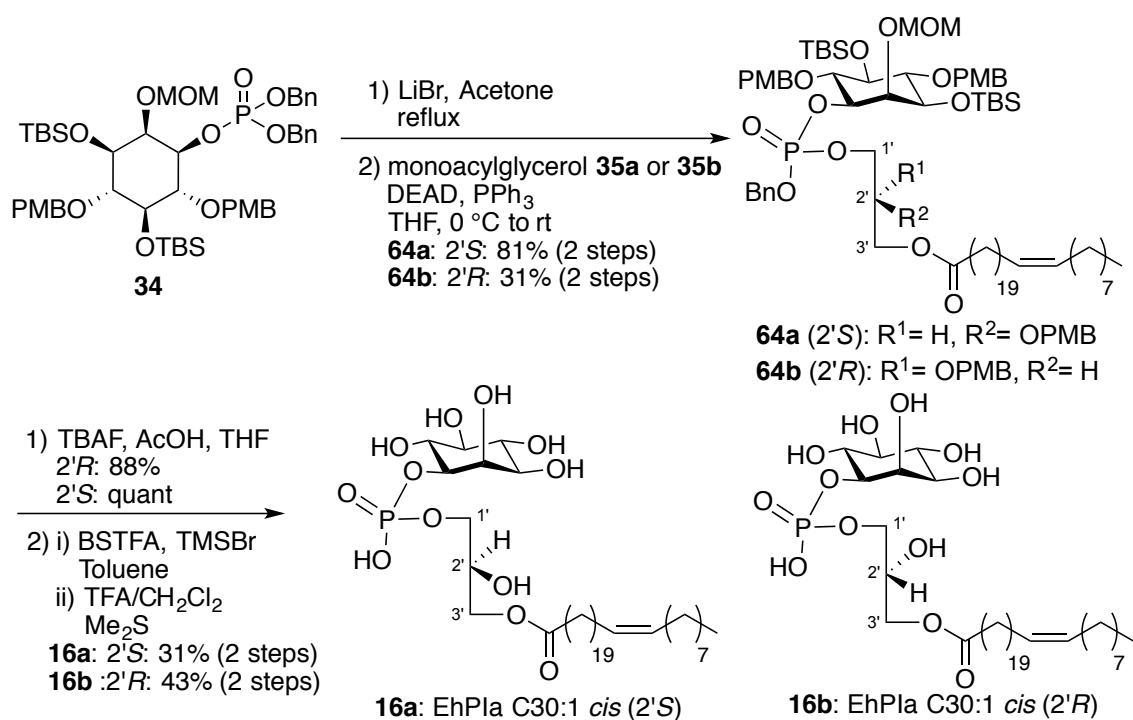
Scheme 2-7 グリセロール誘導体 **62a**、**62b** の合成

次に、Ni 触媒によるアルキル-アルキルクロスカップリング反応⁸⁹を適用した長鎖脂肪酸の合成を行った(Scheme 2-8)。市販の 12-ブロモドデカン酸を *tert*-ブチルエステル **37** とし、オレイン酸を三工程にてグリニャール試薬 **38** とし、カップリング基質の合成をおこなった。続いて、両基質を THF 中 NiCl₂、1, 3-ブタジエン存在下反応させることで望む炭素数 30、*cis* の幾何異性を有する長鎖脂肪酸エステル **63** の合成に成功した。**63** は酸性条件に付すことで、*tert*-ブチル基を除去し、酸型 **36** とした。続いて、**62a** および **62b** と縮合し、シリル基の除去を行いアシルグリセロール **35a** および **35b** の合成を行った。

イノシトールリン酸部位 **34** および、アシルグリセロール **35a** および **35b** を基幹中間体として得たので、続いて EhPIa の合成を行った(Scheme 2-9)。**34** にアセトン溶媒中臭化リチウムを作用させる¹⁰¹ことで、ベンジルエステルを 1 つ除去し、続いて光延条件を用いてアシルグリセロールの縮合¹⁰²を行い、**64a**、**64b** を得た。シリル基を TBAF を用いて除去した後、TMSBr/BSTFA を用いてベンジル基を除去、残る全ての保護基を TFA の酸性条件で除去し、生成物を順相のシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製することで、2 つの異なる立体の EhPIa (**16a**, **16b**)の合成を達成した。



Scheme 2-8 モノアシルグリセロール **35a**, **35b** の合成



Scheme 2-9 EhPIa (**16a**, **16b**)の合成

第四節 結論

本章では、EhPIa の合成において、効率的な新規イノシトールリン脂質合成法の確立を目指し、新規な位置選択的リン酸化反応の開発を行った。その結果、リン上にセレンを有するセレノリン酸クロリド **51** を用いた場合に高収率、良好な選択性で目的とする 1 位リン酸化体を得ることに成功した。さらに、本条件はグラムスケールにも適用可能なことから本合成ルートにおける重要中間体の量的供給も可能とした。また、Ni 触媒によるアルキル-アルキルクロスカップリング反応を適用することで、長鎖脂肪酸の合成に成功した。位置選択的リン酸化反応および長鎖脂肪酸合成法を鍵段階として、グリセロール *sn*-2 位の 2 つの立体を有する EhPIa の合成に成功した。本合成ルートは、効率的に単一の立体のイノシトールリン酸が得られる点、また、アルキル-アルキルクロスカップリング反応により多様な脂肪酸が調整可能なことから、EhPIa だけでなく様々な構造のイノシトールリン脂質合成に適用できると考える。

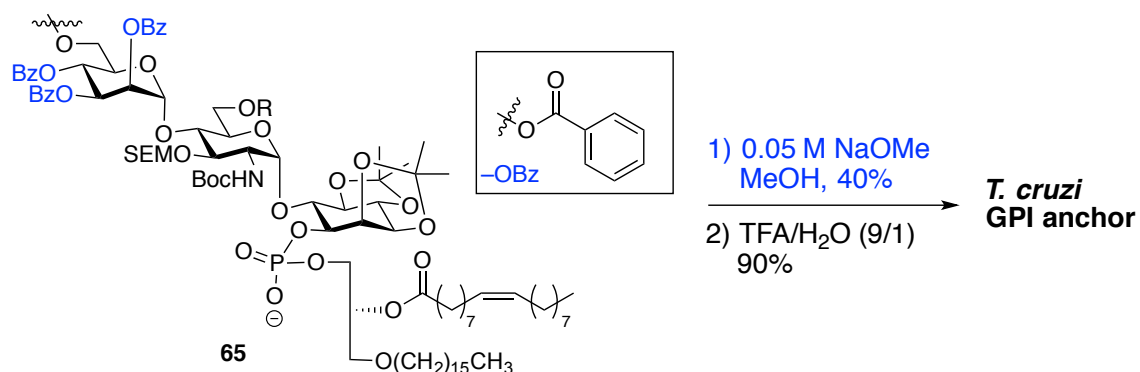
また、本章で合成した EhPIa の生物活性については、第四章で述べる。

第三章 アリルおよびアリルオキシカルボニル基を永続的保護基とする新規保護基戦略による EhPIb および糖鎖含有 EhPIb の合成

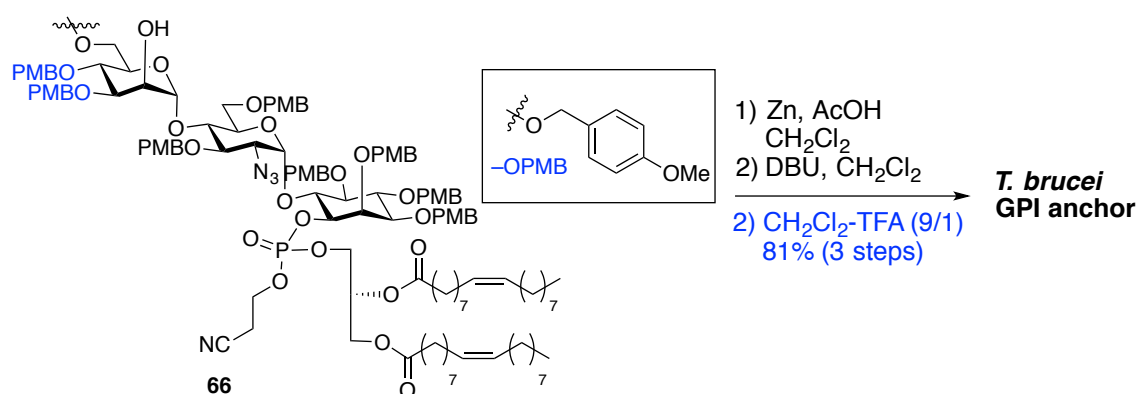
第一節 背景

前章では、イノシトールに対する位置選択的リン酸化反応の開発とそれを鍵段階とする赤痢アメーバ由来イノシトールリン脂質 EhPIa の合成について述べた。本章では、より複雑な構造を有する EhPIb および糖鎖含有 EhPIb の合成を目的とした。EhPIb およびその糖鎖付加体は、その分子内に、不飽和結合、リン酸エステル結合、エステル結合、リゾ型グリセロールおよび糖鎖構造を有している(Fig. 3-1)。近年、そのような複雑な構造を有する複合脂質、特に分子内に不飽和結合を含む複合脂質の合成研究に焦点が当てられている。また、不飽和結合含有脂肪酸を有する複合脂質は、生物活性の鍵構造となっている場合があり、生物活性の解明、構造活性相関研究の観点からも、合成化学による化合物の供給は重要である。

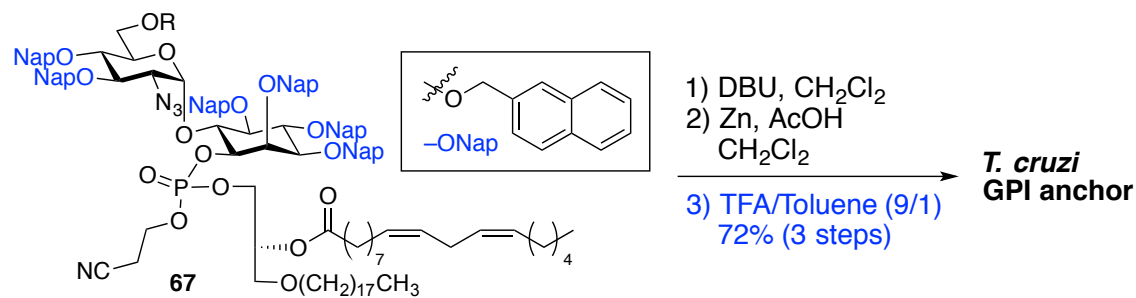
不飽和結合は、接触水素還元条件に不適であることから、糖鎖合成、複合脂質合成で多用されてきたベンジルエーテルを水酸基の永続的保護基とする合成戦略を適用することができない¹⁰³。その観点から、近年、ベンジル基を使用しない新たな保護基戦略の開発が行われてきた。2006年、Nikolaev らは、*Trypanosoma cruzi* の不飽和脂肪酸含有 GPI アンカーの合成において、塩基性条件で除去可能なベンゾイル(Bz)基を糖鎖部分の水酸基の永続的保護基とし、最終的にナトリウムメトキシドを用いて Bz 基を除去し、GPI アンカーの合成に成功している(Scheme 3-1)¹⁰⁴。しかしながら、強塩基性条件による Bz 基の除去は、分子内に存在するエステル結合の分解という副反応を生じ、収率が低下する問題があった。そこで、Guo らは、水酸基の永続的保護基を酸性条件で除去可能な PMB 基とすることでこの問題を解決し、*T. brucei* の不飽和脂肪酸含有 GPI アンカーの合成に成功した(Scheme 3-2)¹⁰⁵。また、Guo らは本手法を多不飽和脂肪酸であるアラキドン酸含有 CD52 抗原の GPI アンカーの合成にも応用している¹⁰⁶。さらに Guo らは、接触水素還元条件に不適であるが、生理機能や生物活性の解明に有用な分子プローブ合成に展開可能な官能基である、アジド基およびアルキン基を導入した GPI アンカーの合成に本手法を適用した¹⁰⁷。しかしながら、PMB 基を多用する保護基戦略では、グリコシル化反応等の酸性条件での反応において、PMB 基の分解という副反応が生じる問題があった¹⁰⁷。そこで、Silva らは、酸性条件で除去可能であるが、PMB 基に比べ耐酸性を有する 2-naphthylmethyl(Nap)基¹⁰⁸を水酸基の永続的保護基として適用し、*T. cruzi* の GPI アンカー部分構造の合成に成功した(Scheme 3-3)¹⁰⁹。しかしながら、Silva の報告では、GPI 糖鎖のグルコサミン部分までの合成であり、多糖構造への展開はされていなかった。



Scheme 3-1 Nikolaev らの方法 (Bz 基)



Scheme 3-2 Guo らの方法 (PMB 基)

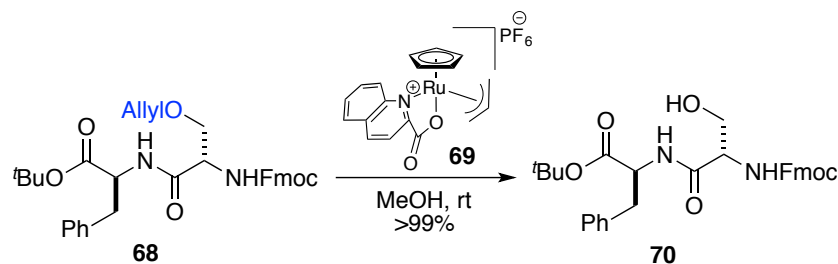


Scheme 3-3 Seeberger らの方法 (Nap 基)

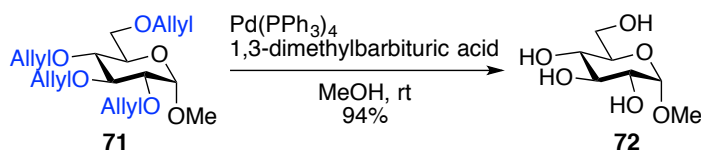
以上の背景から、筆者は、不飽和結合を含む複雑な複合脂質合成における新たな合成戦略として、水酸基の永続的保護基にアリル基およびアリルオキシカルボニル基を適用する保護基戦略を立案した。アリルオキシカルボニル基やアリルエステルを永続的保護基に用いる戦略は Alloc strategy として知られており、核酸合成やペプチド合成に適用された^{110,111}。不飽和脂肪酸を含有する複合糖質の合成例としては、アンタゴニストとして知られる *Rhodobacter sphaeroides* lipid A の全合成¹¹²をはじめ、エーザイの開発したエリトラン¹¹³など不飽和脂肪酸を有するリポド A 誘導体の合成¹¹⁴⁻¹¹⁶に用いられた。及川らは接触

還元条件に不安定な蛍光標識基を有するリポド A の合成に Alloc strategy を適用した¹¹⁷。一般的な糖鎖合成においては、隣接基関与や遠隔関与のないエーテル系保護基を使用する必要性に迫られることがしばしば起こるが、アリルエーテルが永続的保護基に用いられることはほとんどなかった。これは最終脱保護においてアリルエーテルを高収率で切断することが容易ではないと考えられていたことによるものと思われる。

アリル基およびアリルオキシカルボニル基は、耐酸性に優れており、他の保護基(シリル基、アシル基、PMB 基、Nap 基など)と脱保護反応における直交性を有しているという特徴がある。また、アリル基およびアリルオキシカルボニル基は、遷移金属触媒を用いて中性条件で温和に除去が可能であり、近年では、高極性溶媒中におけるアリル基の除去条件も報告されている。北村らは、メタノール溶媒中、キナルジン酸を配位子にもつルテニウム錯体 **69** を用いる、アリル基の除去条件を報告している(Scheme 3-4)⁹⁹。また、根東らは、メタノール溶媒中 1,3-ジメチルバルビツール酸、パラジウム触媒を用いることで、高収率にて多数のアリル基を有する単糖の脱アリル化条件を報告している(Scheme 3-5)¹¹⁸。



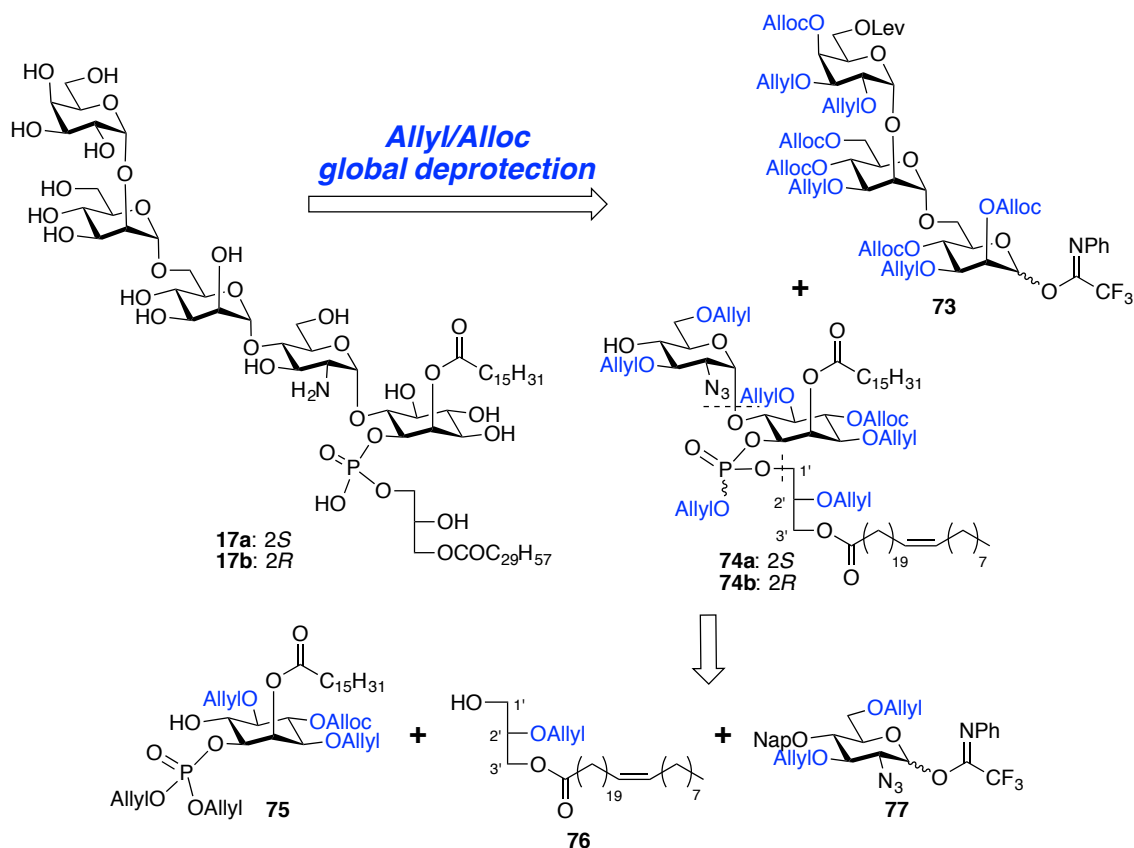
Scheme 3-4 北村らの手法



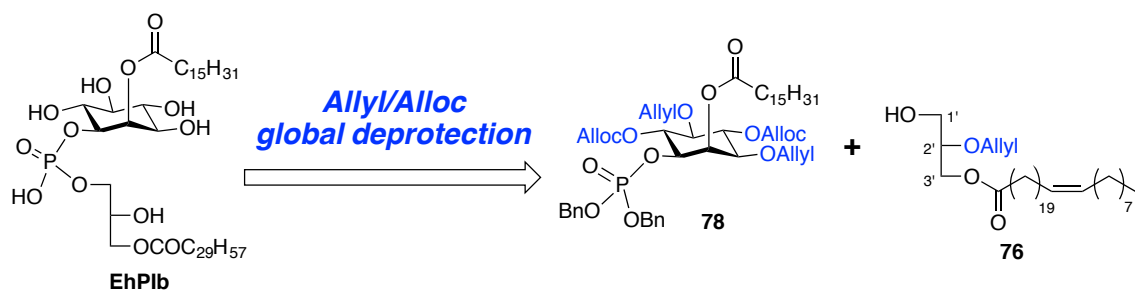
Scheme 3-5 根東らの手法

アリル基およびアリルオキシカルボニル基を永続的保護基とした保護基戦略に基づく、糖鎖含有 EhPIb の合成計画を以下に示す(Scheme 3-6)。すなわち、糖鎖含有 EhPIb(**16a**、**16b**)は、水酸基をアリル基およびアリルオキシカルボニル基で保護した全保護体より、遷移金属触媒を用いて全ての保護基を除去することで合成することとした。全保護体は、三糖中間体 **73** と擬二糖中間体 **74a**、**74b** のグリコシル化反応によって得ることとした。三糖中間体 **74** は、ガラクトース、マンノースよりそれぞれ合成した単糖中間体を順次グリコシル化することにより合成し、擬二糖中間体 **74a**、**74b** は、アジド糖 **77** とイノシトール **75** との α 選択的グリコシル化反応で合成することとした。イノシトール **75** は、前章にて開発した位置選択的リン酸化反応を用いて合成した 1 位リン酸化体 **45** を共通中間体とし合成すること

とした。また、糖鎖を含まない EhPIb については、1 位リン酸化体 **45** より保護基をアリル基やアリルオキシカルボニル基に変換した **76** とアシルグリセロールと縮合の後、遷移金属触媒で保護基を除去することにより合成することとした(Scheme 3-7)。



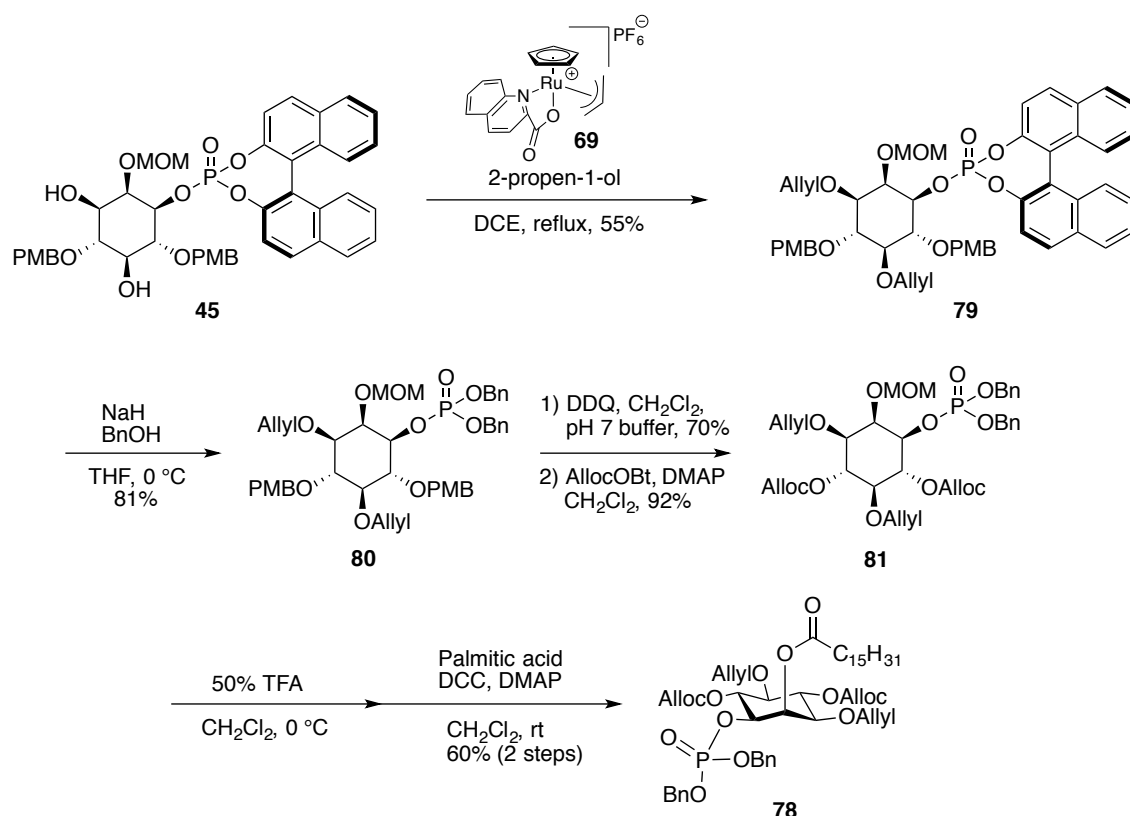
Scheme 3-6 糖イノシトールリン脂質の合成計画



Scheme 3-7 EhPIb の合成計画

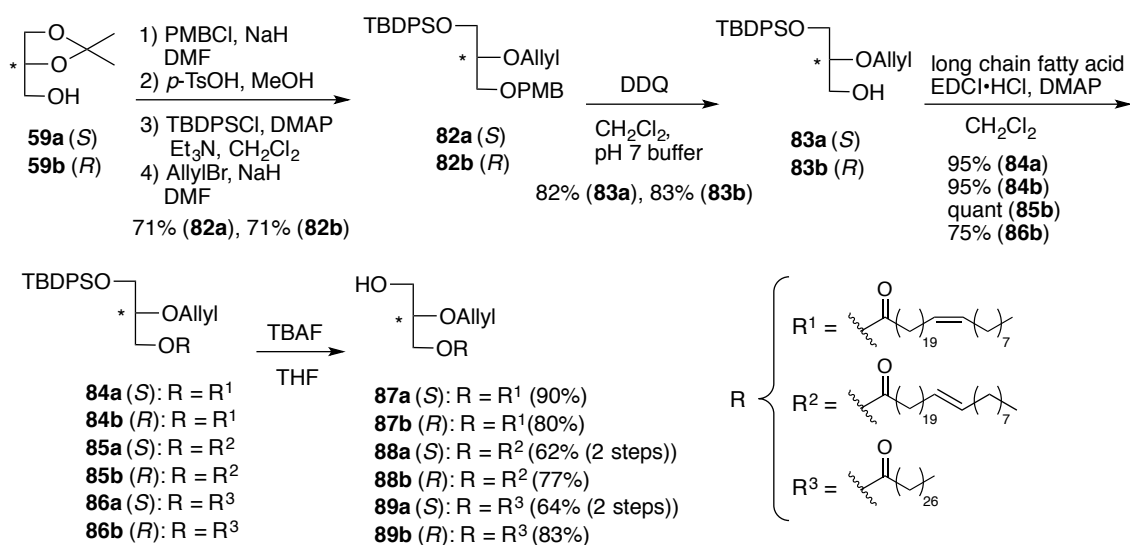
第二節 EhPIb の合成

はじめに、EhPIb のイノシトール中間体 **78** の合成を行った(Scheme 3-8)。まず、1 位リン酸化体 **45** の水酸基のアリル化の検討を行った。強塩基性条件(e.g. NaH/AllylBr)や強酸性条件(e.g. TfOH/ Allyl imidate)はアリル化体を与えなかったが、ルテニウム錯体 **69** を用いた脱水的アリル化反応¹¹⁹のみが目的とする **79** を収率 55% で与えた。続いて、BINOL を塩基性条件にてベンジルエステルへと変換し **80** を得た後、PMB 基を DDQ を用いて除去し、アリルオキシカルボニル基を導入し **81** を得た。MOM 基は、ジクロロメタン中トリフルオロ酢酸(TFA)を作用させることで除去し、TFA を留去したのちにすぐさまパルミチン酸との縮合を行うことで、リン酸基の転位を抑制し、**78** の合成を行った。



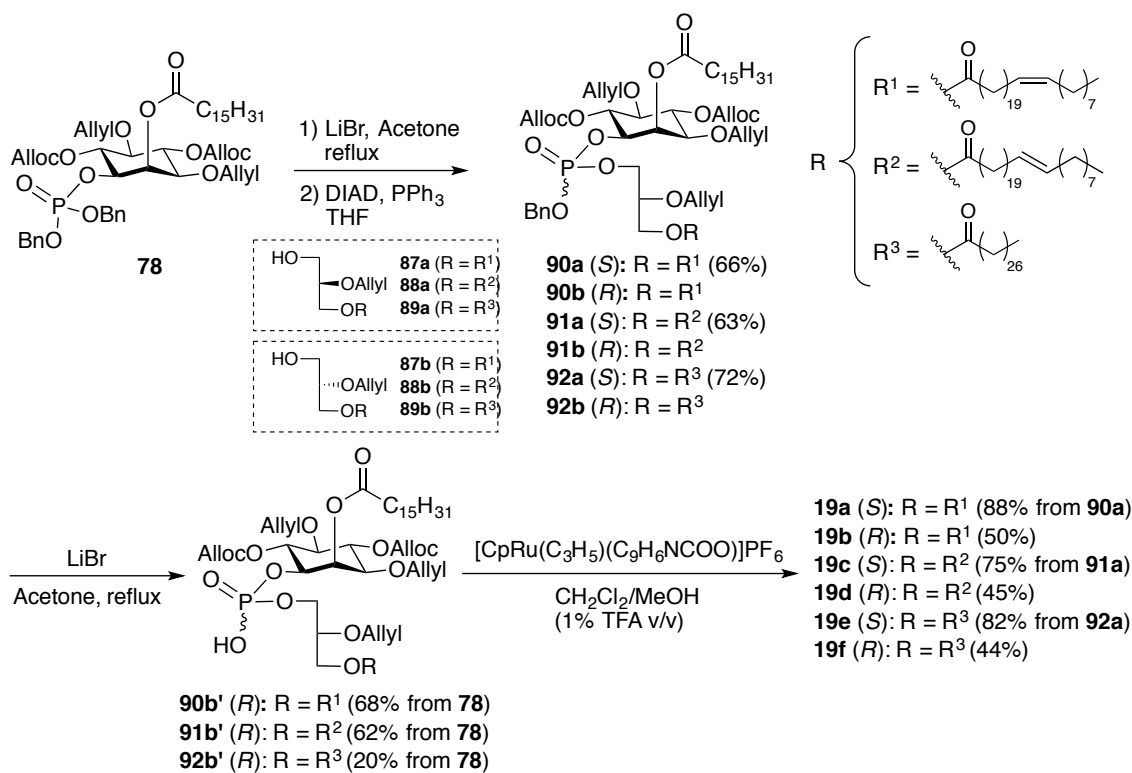
Scheme 3-8 イノシトール **78** の合成

次に、グリセロール部分の合成を行った(Scheme 3-9)。EhPIb の合成においてもグリセロール *sn*-2 位の構造活性相関研究のため、*R* および *S* 体の両方の立体について合成を行った。市販の光学活性グリセロール誘導体 **59a** より、三工程をへて **82a** を合成したのちに *sn*-2 位にアリル基を導入した。PMB 基を DDQ を用いて除去したのちに、前章で合成した長鎖脂肪酸 **30** (C30:1, *cis*) および同様の手法で合成した 炭素数 30・*trans*, 炭素数 28 の長鎖脂肪酸¹²⁰を縮合し、シリル基を除去することで **87a**、**88a**、および **89a** を得た。もう一方の立体のグリセロール部位も同様の手法で合成し、**87b**、**88** および **89b** を得た。



Scheme 3-9 アリル保護モノアシルグリセロールの合成

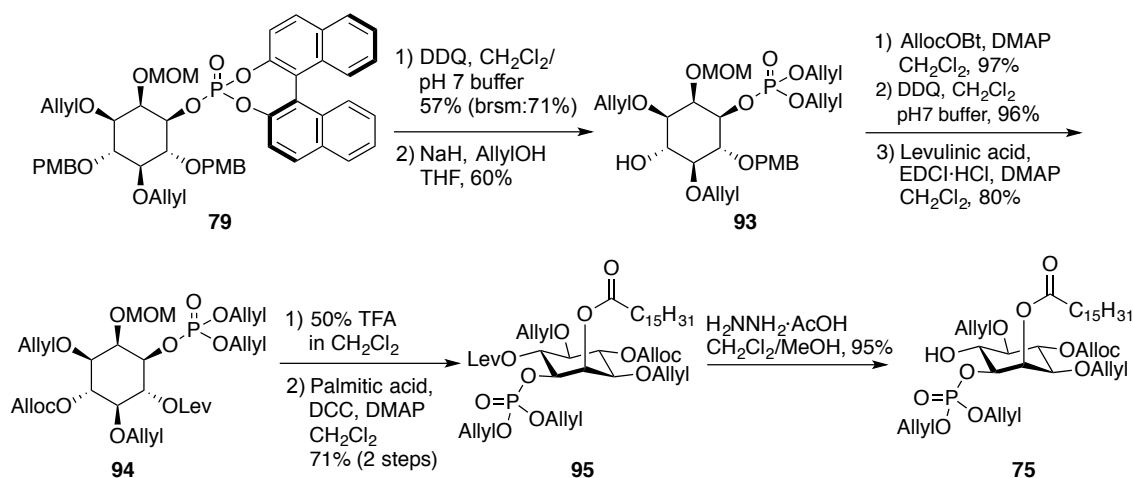
イノシトール中間体 **78** およびアシルグリセロール中間体 **87**~**89** を合成できたので、EhPIb の合成を行った(Scheme 3-10)。**78** のベンジルエステルを LiBr をもちいて片方のみ除去したのちに、光延条件¹⁰²を用いてアシルグリセロールを導入した。つぎに、**90a** のベンジルエステルを除去したのちに、アリル基、アリルオキシカルボニル基の挙除去を試みた。当初、ジクロロメタン、メタノール混合溶媒中ルテニウム錯体 **69** を作用させたとこ、アリルオキシカルボニル基の除去は見られたものの、アリル基の除去は見られなかった。これは、ベンジルエステルの除去の際に生じたリン酸リチウム塩が、配位子のキナルジン酸から触媒の活性に重要なプロトン¹²¹を奪ってしまったためと考えた。そこで、反応溶媒中に TFA を 1% 添加したところ、脱アリル化反応は良好に進行し、生成物を順相のシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて精製し、**19a** を収率 88% で得ることに成功し、EhPIb の合成を達成した。同様の手法を用いて残る 5 つの化合物も脱保護に成功し、計 6 種の EhPIb の合成を達成した。



Scheme 3-10 EhPIb の合成

第三節 糖鎖構造を有する EhPIb の合成

前節の EhPIb の合成において、アリル・アリルオキシカルボニル保護基戦略が実証できたため、続いて糖鎖構造を有する EhPIb の合成を行った。EhLPPG は、Gal-Man-Man-GlcN の糖鎖構造を有している。そこで、糖鎖部分の構造活性相関を見るために、全長の四糖含有 EhPIb とグルコサミンを有する EhPIb について合成することとした。末端のガラクトース-マンノース間の結合位置は未決定であったが、他の GPI 糖鎖構造との相同性から Gal(α 1-2)Man(α 1-6)Man(α 1-4)GlcN を合成することとした。

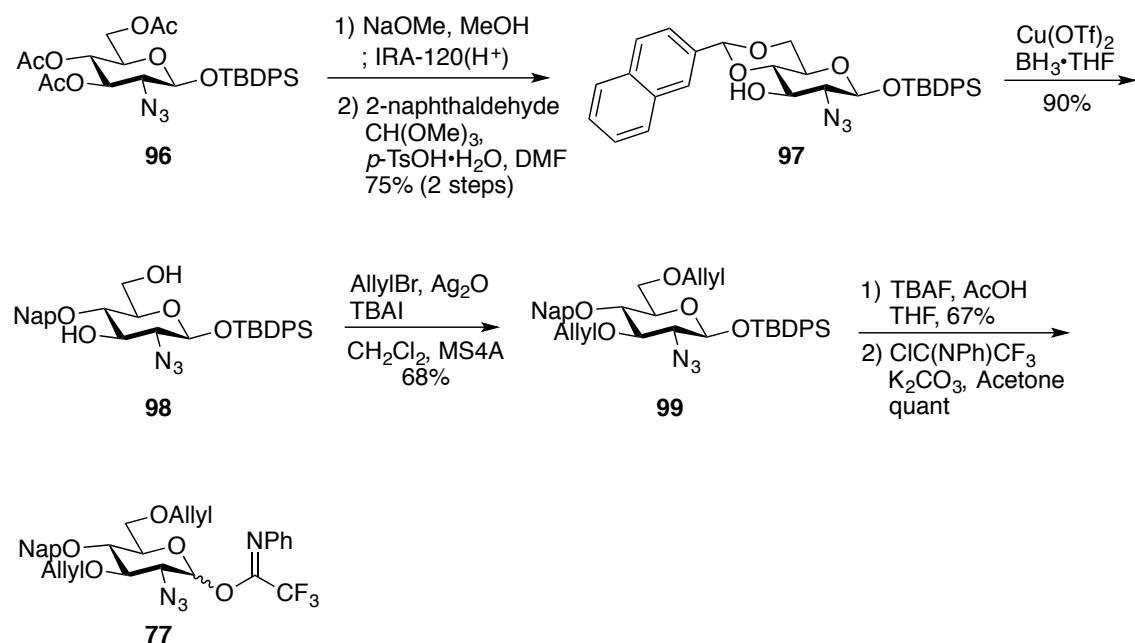


Scheme 3-11 イノシトールアクセプター**75**の合成

はじめに、イノシトール **75** の合成を行った(Scheme 3-11)。化合物 **79** の 4 位 PMB 基の選択的除去は、CH₂Cl₂ 中、0 °C で DDQ を作用させることにより、収率 57%(原料回収収率 71%)で行うことに成功し **93** を得た。これは、分子内の BINOL の立体障害により、6 位 PMB 基に対し DDQ が接近しにくくなったためと考えられる。続いて、塩基性条件にてリン酸エステルを BINOL からアリルエステルへと変換し、アリルオキシカルボニル基の導入、6 位 PMB 基の除去、Lev 基の導入を経て **94** を合成した。MOM 基を酸性条件にて除去したのちに、パルミチン酸の縮合を行い、Lev 基をヒドラジン酢酸を用いて除去することでイノシトール糖受容体 **75** の合成を行った。

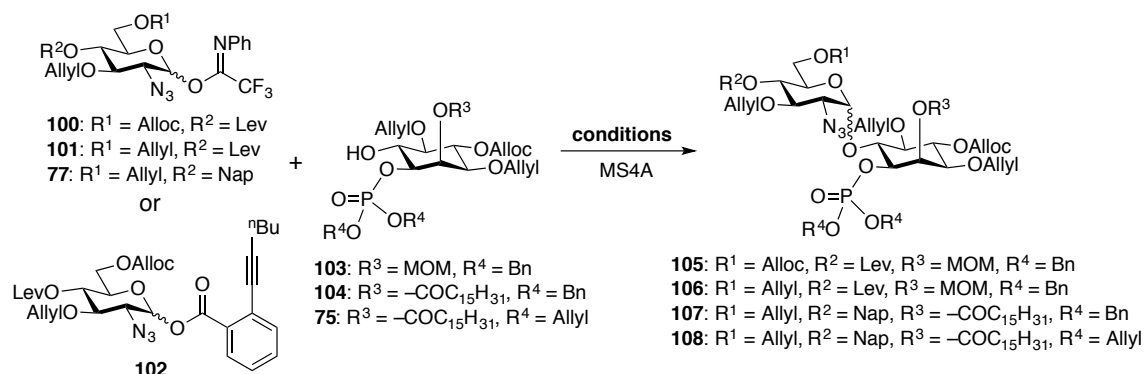
続いて、アジド糖供与体 **77** の合成を行った (Scheme 3-12)。既知の 3, 4, 6-tri-*O*-acetyl-2-azido-1-*tert*-butyldiphenylsilyl-2-deoxy-D-glucose¹²² (**96**) を出発物質とした。はじめに、塩基性条件にて脱アセチル化した後に、2-ナフトアルデヒド、ギ酸トリメチル、*p*-トルエンスルホン酸を用いて、4, 6 位に 2-ナフチルアセタールを形成した。続いて、BH₃、銅トリフラート(Cu(OTf)₂)を用いて、還元的にナフチルアセタールを開裂させ¹²³、ジオール **98** を得た。**98** に対し、酸化銀、臭化アリルを用いて中性条件で 4,6 位にアリル基を導入し

99 を得た。続いて、脱離基の導入を行った。1 位のシリル基を TBAF を用いて除去したのちに、塩基性条件下 *N*-phenyl-trifluoroacetoimidoyl chloride¹²⁴ を作用させ、アジド糖供与体 **77** の合成を行った。



Scheme 3-12 アジド糖ドナー**77** の合成

Table 3-1 グリコシル化反応の検討



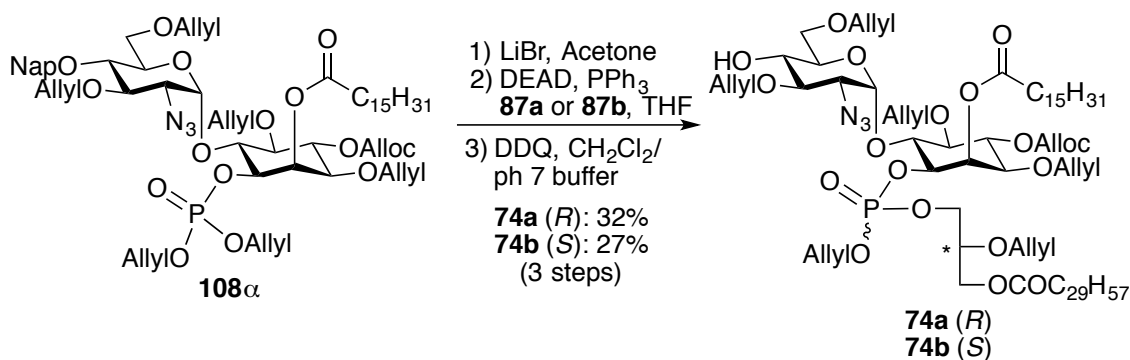
Entry	Donor (eq.)	Acceptor (eq.)	Activator (eq.)	Solvent	Temp.	Yield
1	100 (2.0)	103 (1.0)	TMSOTf (0.2)	Et ₂ O	-20 °C	N. D.
2	102 (3.0)	103 (1.0)	PPh ₃ AuNTf ₂ (0.4)	Et ₂ O	0 °C	105 , α: 21%
3	101 (3.0)	103 (1.0)	TMSOTf (0.2)	CH ₂ Cl ₂	-20 °C	106 , α:31%, β:ca. 24%
4	77 (2.0)	104 (1.0)	TBSOTf (0.2)	CH ₂ Cl ₂ /Et ₂ O	-20 °C	107 , 60% (α: β = 4: 1) ^a
5	77 (2.0)	75 (1.0)	TMSOTf (0.2)	CH ₂ Cl ₂ /Et ₂ O	-20 °C	108 , 81% (α: β = 4: 1)
6	77 (2.0)	75 (1.0)	TBSOTf (0.2)	CH ₂ Cl ₂ /Et ₂ O	-20 °C	108 , 90% (α: β = 9: 1) ^a

^a α/β ratio was determined by NMR analysis., N. D.= Not Detected, rt = room temperature.

次にイノシトール糖受容体とアジド糖供与体のグリコシル化の検討を行った(Table 3-1)。はじめに、4 位を Lev 基、6 位をアリルオキシカルボニル基で保護した **100** を糖供与体として用い、糖受容体として、リン酸ベンジルエステルを有する **103** を用いた(Entry 1)。その結果、**100** の加水分解体が多く見られ、目的生成物を得ることはできなかった。次に、金触媒を用いて、温和に活性化可能な *o*-ヘキシニルベンゾイル基を脱離基¹²⁵に持つ糖供与体 **102** を用いて反応を行った(Entry 2)。その結果、低収率であるものの、**105** のα体を 21%の収率で得ることに成功した。Entry 2 において目的生成物は得られたものの、その収率は低いものであった。これは、糖供与体の電子求引性の保護基によって、活性化後の中間体であるオキソカルベニウムカチオンが不安定化されており、副反応である加水分解が進行してしまったためであると考えた。そこで、糖供与体上の保護基を電子供与性のエーテル基へと

変更することとした。Entry 3 において、6 位をアリルエーテルとしたところ、グリコシル化の収率は向上したが、選択性はよい結果は得られなかった。次に、4 位を Nap 基へと変換した **77** と、イノシトール 2 位をパルミトイル基とした **104** を用いたところ、グリコシル化の収率は同程度であったが、選択性が $\alpha:\beta = 4:1$ まで向上した(Entry 4)。さらに、リン酸エステルをアリルエステルとした **75** を糖受容体として用いたところ、選択性に変化はなかったものの、収率を 81%に向上させることに成功した(Entry 5)。活性化剤を TBSOTf としたところ、収率および選択性ともに向上し、**108** を収率 90%、 $\alpha:\beta = 9:1$ で得ることに成功した(Entry 6)。なお、 α 体と β 体はシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いてそれぞれを単離した。

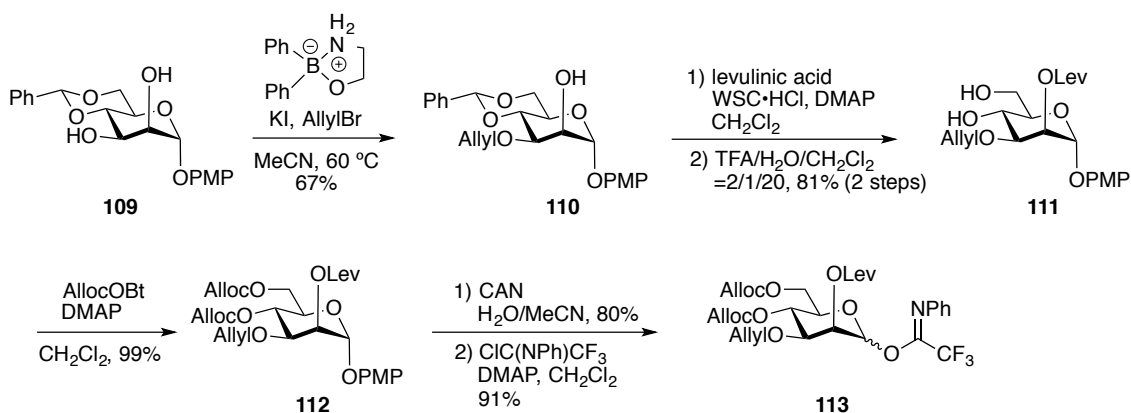
得られた擬二糖中間体 **108 α** のアリルエステルを LiBr/Acetone の条件を用いることで一つ除去し、次に光延条件を用いてアシルグリセロールの導入を行った(Scheme 3-13)。アシルグリセロールは、炭素数 30、*cis* 体の脂肪酸を有し、R 体および S 体のグリセロール部位を有する **87a**、**87b** を導入した。アシルグリセロールを導入したものは、アシルグリセロールと DEAD が反応して生じた副生成物とシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分離が困難であったため、アジド糖 4 位の Nap 基を除去することで **74a** と **74b** を単離した。本反応は、アシルグリセロールの導入段階において反応が進行しにくく、低収率であった。これは、リン酸基に隣接しているアジド糖が立体障害として働き、リン酸基の求核攻撃を阻害しているものと考えられる。



Scheme 3-13 擬二糖中間体 **74a**、**74b** の合成

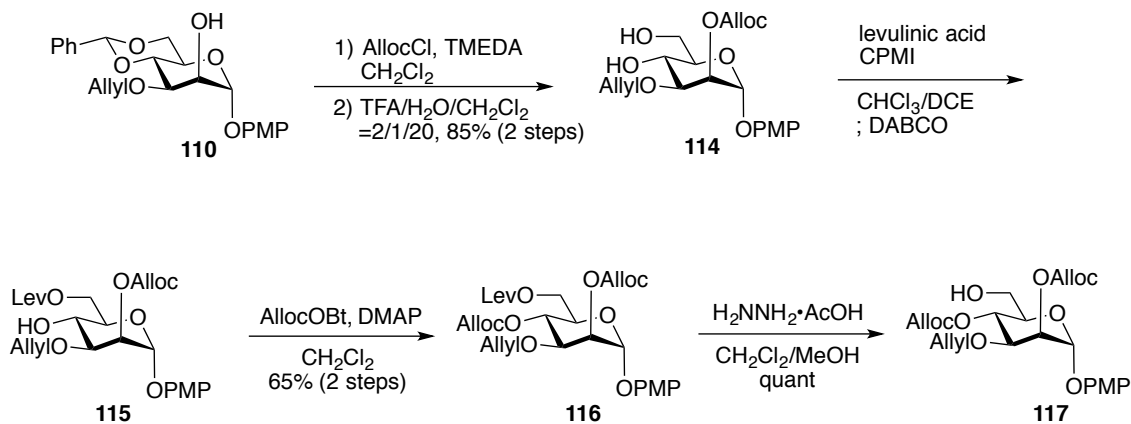
イノシトール部位の合成を終えたので、次に三糖中間体の合成を行った。はじめに、マンノースの単糖中間体 **113** および **117** の合成を行った(Scheme 3-14)。既知の 4,6-*O*-benzylidene-1-*O*-(*p*-methoxyphenyl)-D-mannopyranoside (**109**)より、3 位選択的なアリル基の導入を行った。ジフェニルボリン酸エステルを触媒とするエクアトリアル位選択的なアルキル基の導入反応¹²⁶を適用したところ収率 67%でモノアリル化体 **110** を得ることに成功した。続いて、2 位をレブリン酸エステルとした後に、ベンジリデンを酸性条件で除去し、**111** を得た。4、6 位水酸基をアリルオキシカルボニル基で保護し、CAN を用いて PMP 基を

除去した後に、イミデートへと変換し、**113** を得た。



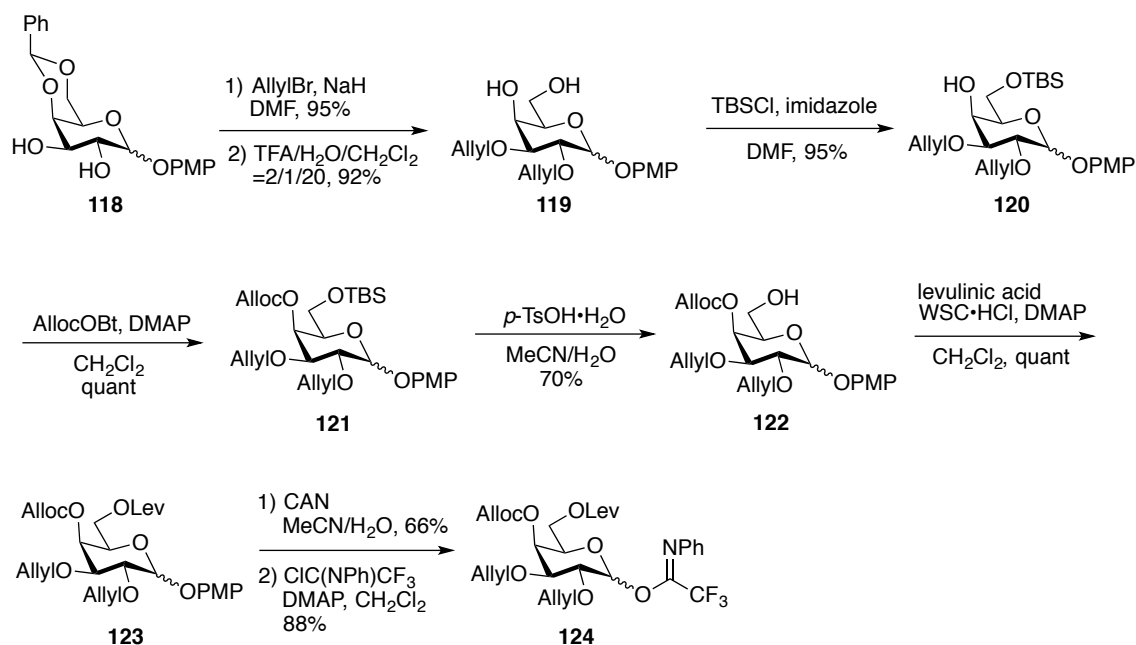
Scheme 3-14 マンノースドナー**113** の合成

次に、アクセプター**117** の合成を行った(Scheme 3-15)。**110** より 2 位水酸基をアリルオキシカルボニル化した後に、酸性条件にてベンジリデンを除去し **114** を得た。続いて、2-chloro-*N*-methyl-pyridinium Iodide を縮合剤として 6 位水酸基をレブリン酸エステルとした後に、4 位にアリルオキシカルボニル基を導入した。最後に Lev 基をヒドラジン酢酸を用いることで除去し糖受容体 **117** を合成した。



Scheme 3-15 マンノースアクセプター**117** の合成

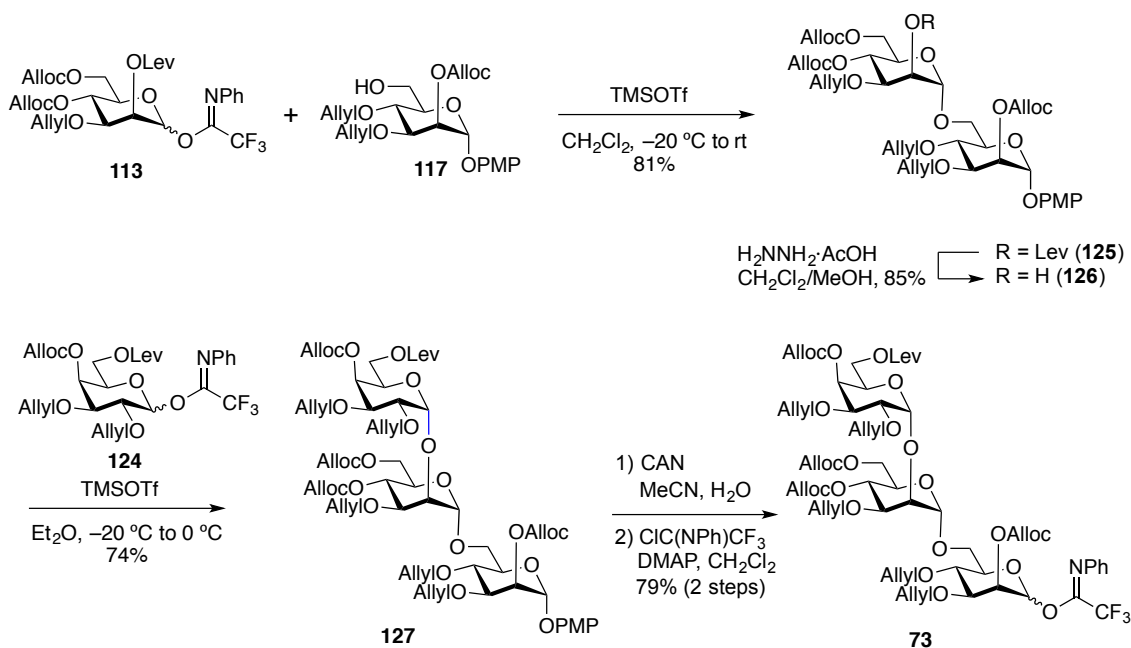
ガラクトース中間体は、既知の 4,6-*O*-benzylidene-1-*O*-(*p*-methoxyphenyl)-D-galactopyranoside¹²⁷ (**118**)を出発物質として合成を行った(Scheme 3-9)。2, 3 位水酸基にアリル基を導入した後に、酸性条件下ベンジリデンを除去し **119** を得た。次に、6 位選択的に TBS 基を導入し、4 位にアリルオキシカルボニル基を導入した。TBS 基は、PMP 基の除去条件に耐えることができなかったため、次に TBS 基の変換を行った。酸性条件にて TBS 基を除去した後に、遊離となった水酸基にレブリン酸を縮合することで **123** を得た。**123** に対し、CAN を用いて PMP 基を除去した後に、イミデートを導入することで **124** の合成を行った。



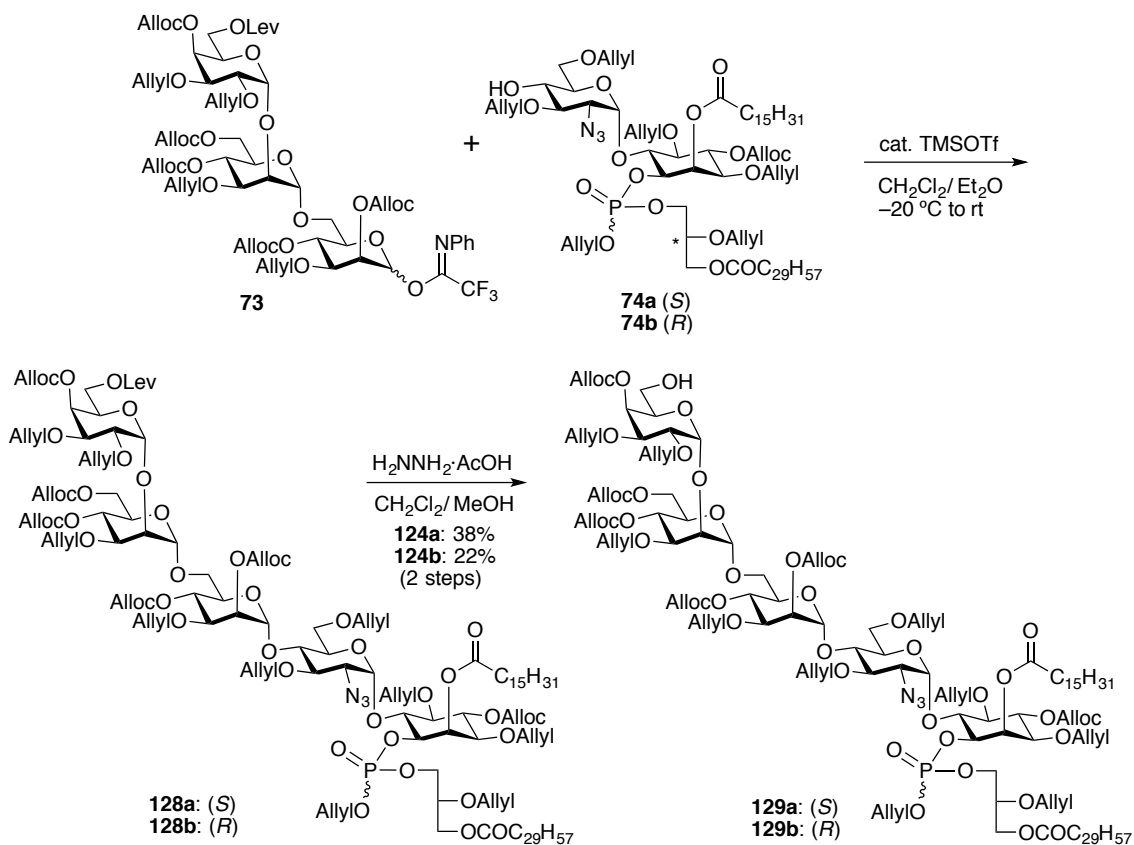
Scheme 3-16 ガラクトースドナー**124**の合成

得られた3つの単糖中間体を、順次グリコシル化を行うことで三糖体**73**の合成を行った(Scheme 3-17)。**117**に対し、TMSOTfを活性化剤として**113**を反応させたところ、二糖体**125**を収率81%で得た。Lev基をヒドラジン酢酸で除去し、生じた2位水酸基に対し、ガラクトースドナー**124**をジエチルエーテル中TMSOTfを活性化剤として反応させ、三糖体**127**を収率74%で得た。**127**のPMP基を除去し、イミデートを導入することで、三糖供与体**73**の合成を行った。

次に、擬二糖中間体**74a**、**74b**と三糖供与体**73**のグリコシル化を行った(Scheme 3-18)。**74a**および**73**をジクロロメタン/ジエチルエーテル混合溶媒中TMSOTfを作用させたところ、全長構造である**128a**の生成を確認した。しかしながら、糖供与体、糖受容体および生成物がTLCにおいて同スポットであったため、ガラクトース6位のLev基を除去した段階で精製し、**129a**を収率38%で得た。また、**74b**および**73**についても同様の反応条件によって反応を行い、Lev基を除去することで**129b**を22%の収率で得た。

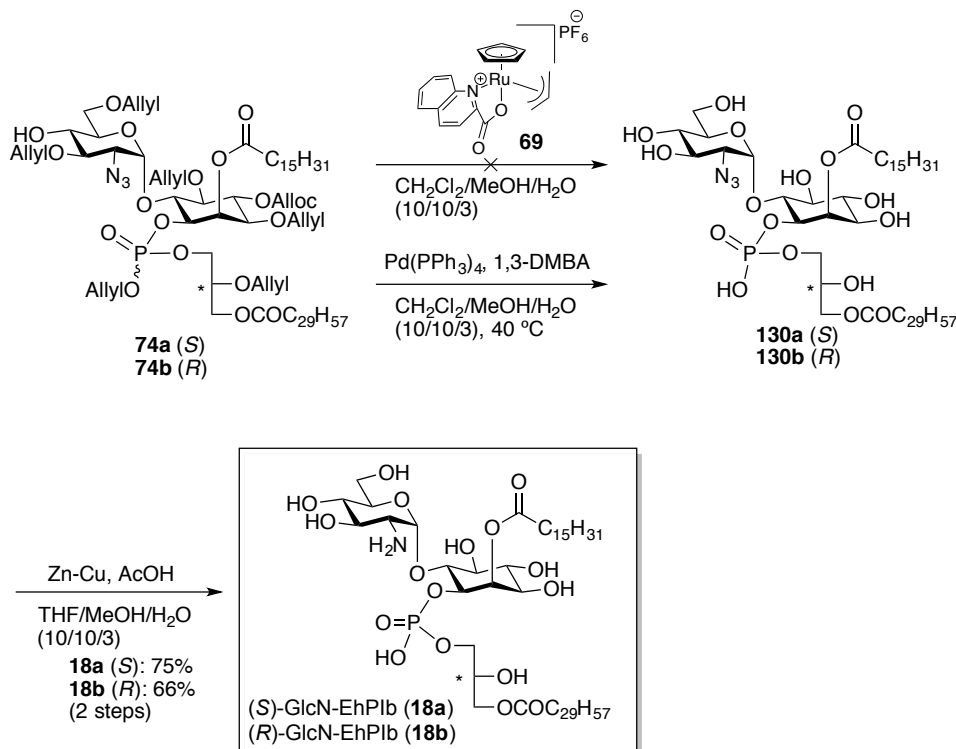


Scheme 3-17 三糖中間体 **73** の合成



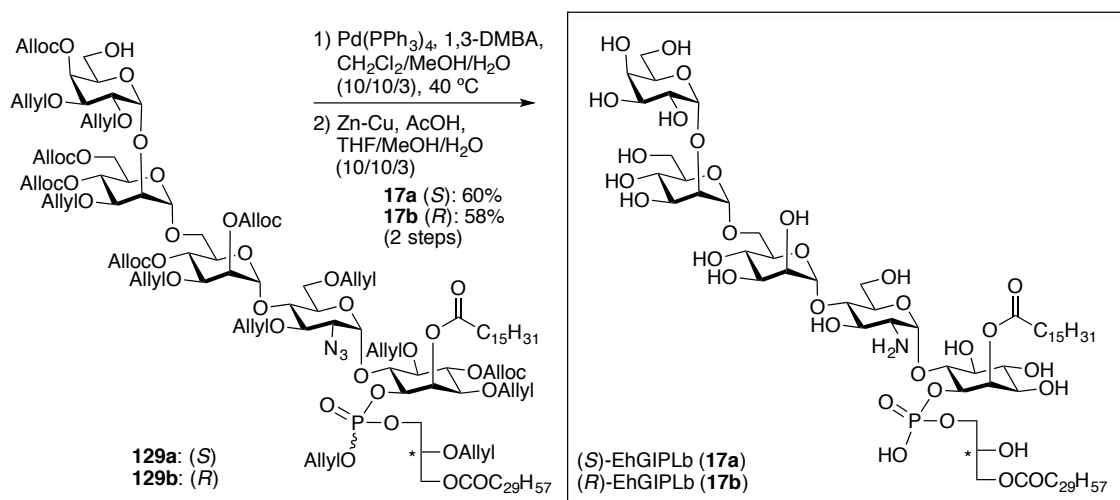
Scheme 3-18 **73**、**74a,b** のグリコシル化反応

次に、導入した保護基の除去の検討を行った(Scheme 3-19)。残る保護基は、アリル系保護基とアジド基であるが、アジド基を還元した際に生じるアミノ基は遷移金属触媒を失活させる懸念があったため、先にアリル系保護基を除去した後に、アジド基を還元する手順をとった。はじめに、擬二糖中間体 **74a** に対し、前節で用いたルテニウム錯体 **69** を用いた。その結果、アリルオキシカルボニル基および一部のアリル基の除去は進行したものの、全てのアリル基を除去することはできなかった。そこで、別の方法としてパラジウム触媒を使用する反応条件¹¹⁸を適用することとした。**74a** に対し、ジクロロメタン/メタノール/水の混合溶媒中、40 °C にて 1,3-ジメチルバルビツール酸をアリルスカベンジャーとし、反応を行ったところ、全てのアリル系保護基の除去は良好に進行した。反応混合物は、LH-20 を用いてクロロホルム/メタノール/水混合溶媒を用いて溶出することで、パラジウム触媒およびアリルスカベンジャーを除去した。続いて、アジド基の還元を行った。THF/メタノール/水混合溶媒に溶解させた脱アリル化体に対し、活性化した亜鉛に酢酸銅を加えることで調製した Zn-Cu を加え反応させたところアジド基の還元は良好に進行した。反応混合物を濾過し、Zn-Cu を除いた後に、LH-20 を用いて精製することで、グルコサミンが付加した EhPIb (**18a**)の合成を達成した。**74b** に対しても同様の反応条件で反応を行うことで、**3b** の合成を達成した。



Scheme 3-19 グルコサミン含有 EhPIb (**18a**、**18b**)の合成

次に、全長構造を有する **129a** について、保護基の最終脱保護の検討を行った(Scheme 3-20)。グルコサミン付加体(**18a** および **18b**)において確立した、保護基の除去条件に則り、反応を行った。**129a** に対し、**18a** と同様の条件で反応を行ったところ、全てのアリル系保護基の除去は良好に進行し、脱アリル化体を得ることに成功した。得られた脱アリル化体に対し、Zn-Cu を用いてアジド基の還元を行うことで、4 糖付加体である **17a** の合成を達成した。別の立体の **129b** についても同様の手順にしたがって保護基の除去を行い、**17b** の合成を達成した。合成した化合物 **17a**、**17b**、**18a**、**18b** については ^1H 、 ^{13}C 、COSY、HSQC、TOCSY および質量分析から構造決定を行った。



Scheme 3-20 四糖構造を有する EhPIb (**17a**、**17b**)の合成

第四節 結論

本章では、分子内に不飽和結合を持つ複雑な複合脂質に対する新たな合成戦略として、アリル基およびアリルオキシカルボニル基を水酸基の永続的保護基とする新規保護基戦略を適用し、EhPIb および糖鎖構造を有する EhPIb の合成を行った。すなわち、第二章において開発した位置選択的リン酸化反応より得られた 1 位リン酸化体を共通中間体とし、ヒドロキシ基の保護基をアリル系保護基へと整え全保護体とした後、最終的にルテニウム触媒 **69** あるいはパラジウム触媒($\text{Pd(PPh}_3)_4$)を作用させることで、高極性溶媒中、中性条件にてアリル系保護基の除去に成功し、EhPIb および糖鎖構造を有する EhPIb の合成を達成した。本合成戦略は、高極性溶媒中、中性条件にて温和に保護基を除去できるという特徴から、本章で標的とした不飽和結合を含む複合脂質だけでなく、他の還元条件に不適な官能基を有するもの、酸および塩基性条件に弱い構造を有する複合脂質合成にも適用可能な汎用的手法であると考ええる。

なお本章にて合成した EhPIb および糖鎖構造を有する EhPIb の生物活性については、第四章で述べる。

第四章 赤痢アメーバ由来イノシトルリン脂質の生物活性

本章では、前章までに合成した赤痢アメーバ由来イノシトルリン脂質(Fig. 4-1)について各種生物活性試験を行うことで、その免疫調節活性を解析することを目的とした。

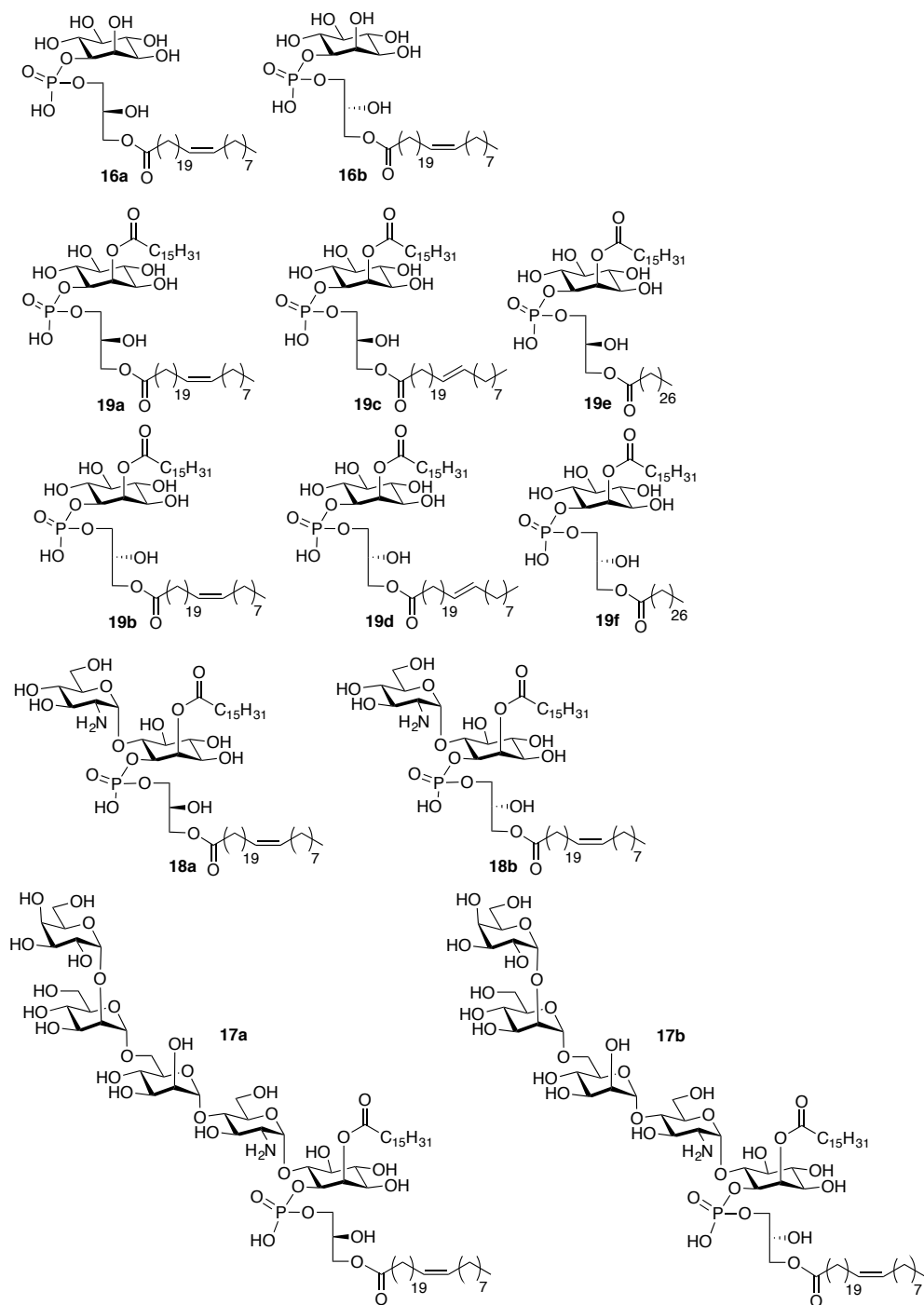


Fig. 4-1 合成イノシトルリン脂質

第一節 毒性試験

本研究において合成したイノシトールリン脂質は、その分子内に炭素数 28 あるいは 30 の長鎖脂肪酸を有しており、炭素数 30 の脂肪酸については不飽和結合を有していることから、脂質二重膜の破壊による溶血作用または細胞毒性がある可能性があった。そこでまず、ヒト赤血球に対する溶血活性を測定した(Fig. 4-2)。ヒト赤血球に対して合成イノシトールリン脂質およびポジティブコントロールとして水を加え培養したところ、**19a** のみがわずかにあるが溶血活性を示したが、他の分子については溶血活性は観測されなかった(Fig. 4-3)。

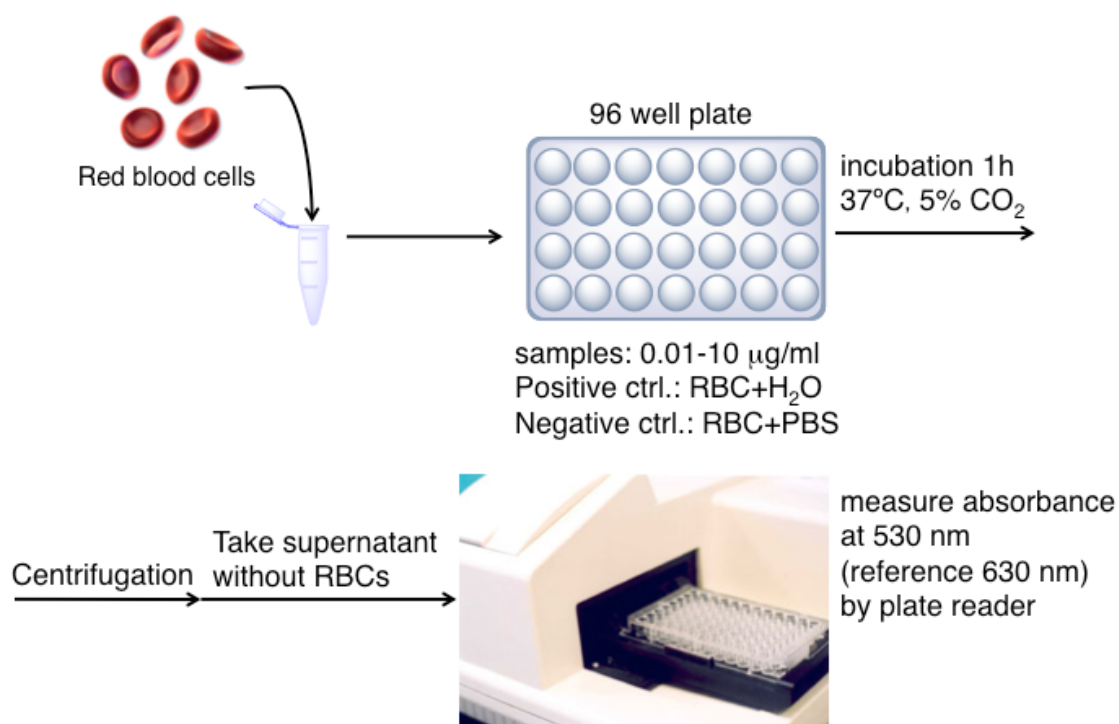


Fig. 4-2 溶血活性試験の概要

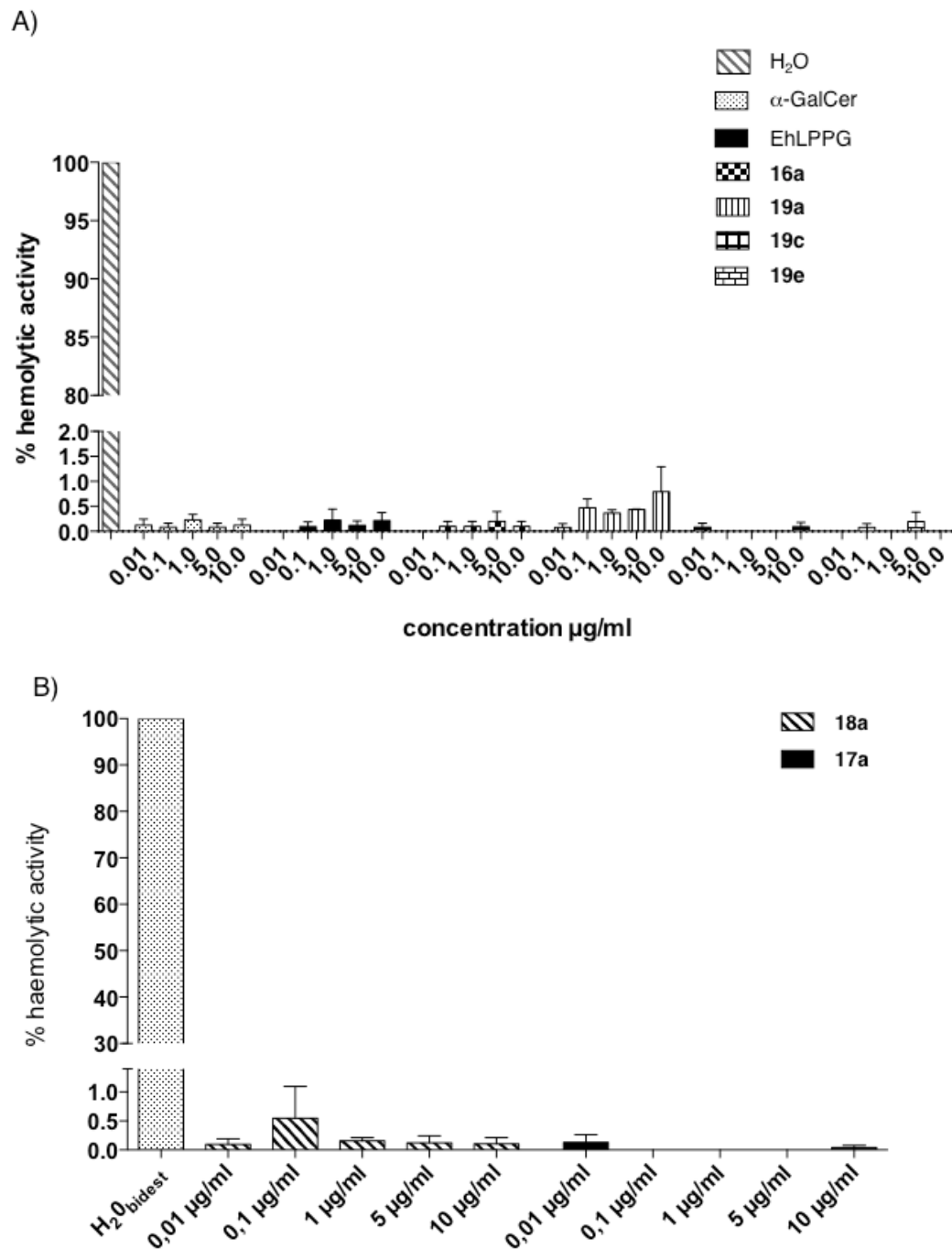


Fig. 4-3 溶血活性試験

健康者より採取・単離した赤血球に対し、PBS で溶解させた各種濃度 (0.01, 0.1, 1, 5, 10 µg/mL) のイノシトールリン脂質(**16a**, **19a**, **19c**, **19e**, **17a**, **18a**)および陽性対象として蒸留水を添加し一時間培養した。縦軸に陽性対象に対する比溶血活性を、横軸に各種濃度の化合物を示した。

次に、生細胞に対する細胞毒性を評価した。マウス脾臓細胞およびヒト末梢血単核急(PBMC)に対する、合成イノシトールリン脂質、 α -GalCer、*Eh*LPPG の時間および濃度依存的な細胞毒性を、死細胞染色した細胞をフローサイトメトリーで測定することにより評価した(Fig. 4-4)。

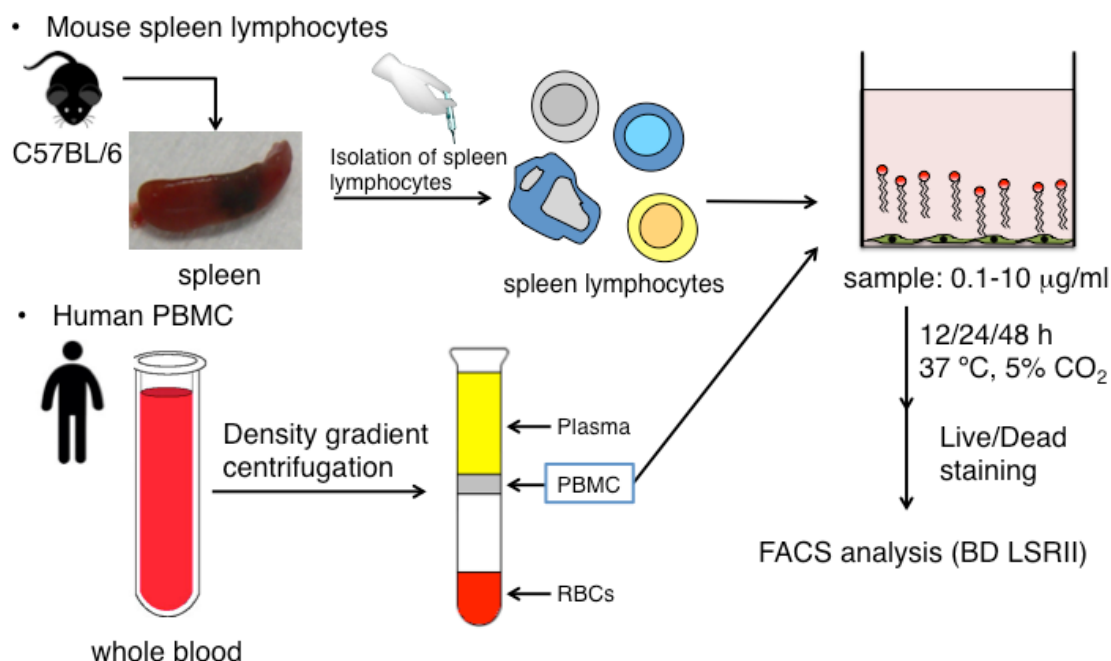
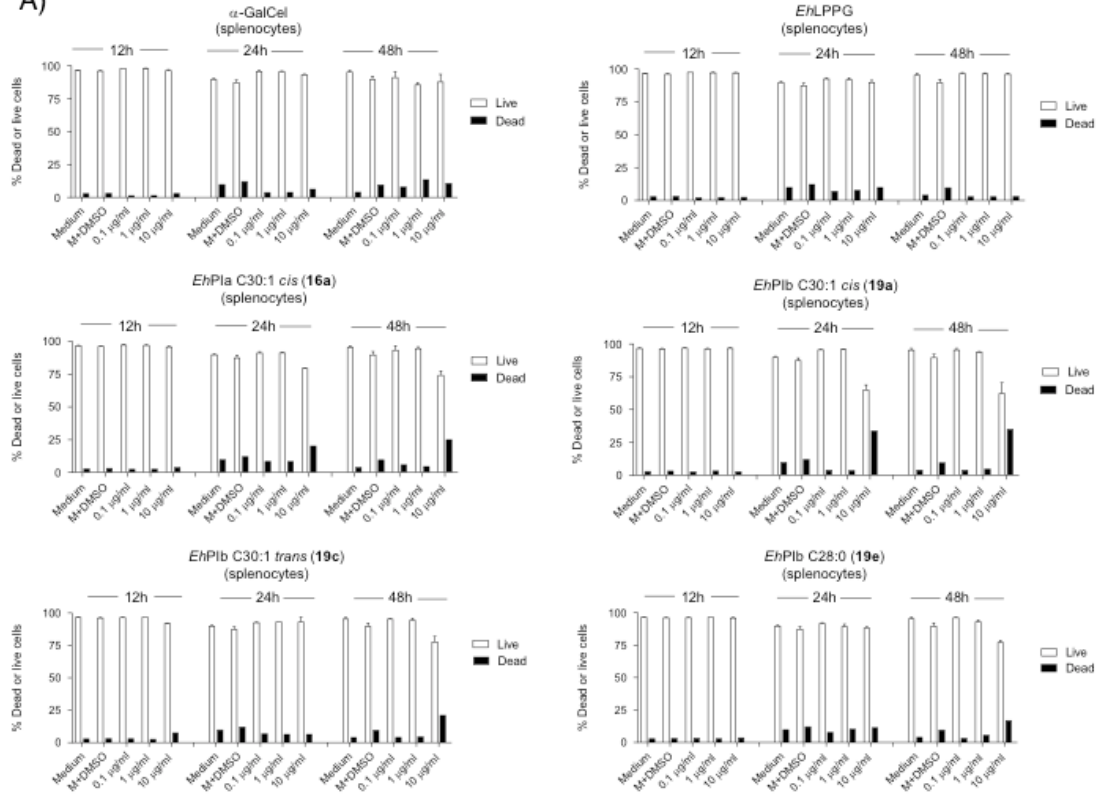


Fig. 4-4 細胞毒性試験の概要

マウス脾臓細胞において、**19a** は、濃度および時間依存的な死細胞の増加が認められ、細胞毒性を有することが示唆された(Fig. 4-2)。一方、ヒト PBMC においては、**19a** の 10 µg/mL の濃度に死細胞の増加が認められたものの、その他の化合物については死細胞が見られなかった(Fig. 4-5)。**19a** は、ジアシル構造および分子内不飽和結合を有していることから、脂質二重膜の破壊によって細胞死を誘導していると考えられる。また、ヒト PBMC よりもマウス脾臓細胞において死細胞の増加が多いことは、実験に用いたマウスが特定の細菌、ウイルス、寄生虫等の病原生物が存在しない SPF(specific pathogen free)環境下で飼育されていることによって、外来抗原に対する感受性が高まっているためと推察される。

A)



B)

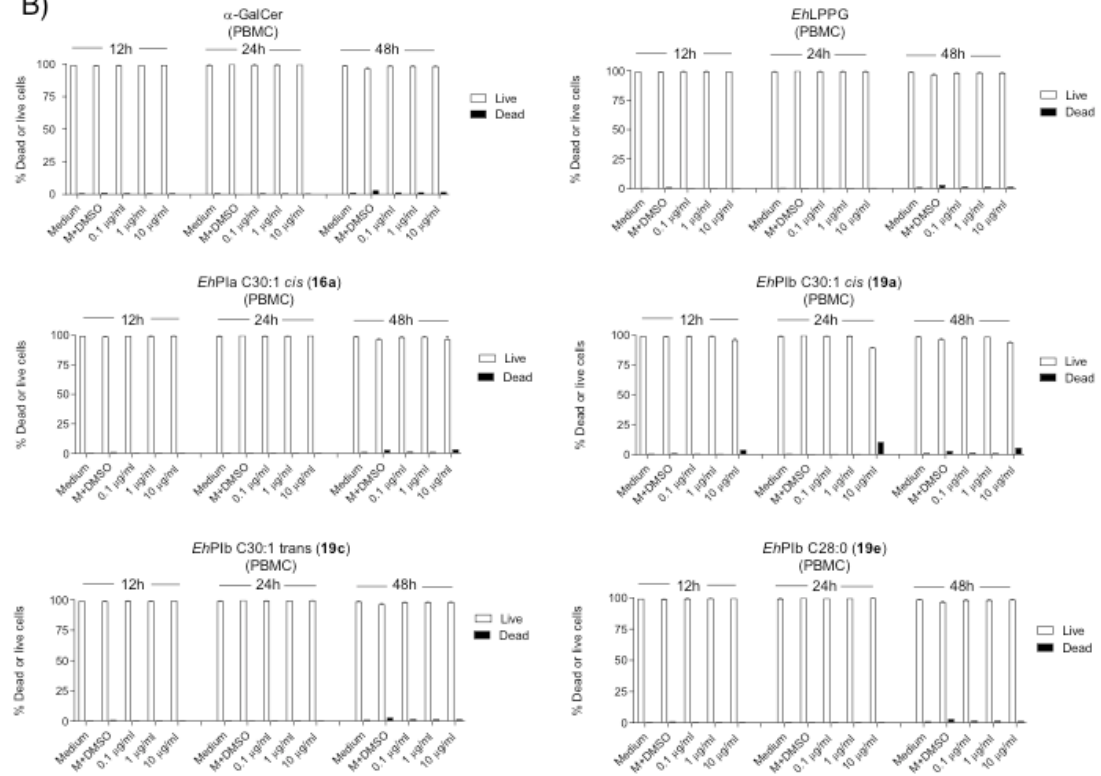


Fig. 4-5 細胞毒性試験

A) マウス脾臓細胞および B) PBMC に対し、陰性対象として培地のみおよび、DMSO を添加した培地を、培地で溶解させた各種濃度(0.1, 1, 10 $\mu\text{g/mL}$)の αGalCer 、*EhLPPG*、合成イノシトールリン脂質(**16a**, **19a**, **19c**, **19e**)を添加し、12、24、48 時間培養した後に、Zombie UVTM Fixable Viability Kit を用いて死細胞を染色し、フローサイトメトリーを用いて生細胞および死細胞を計測した。縦軸に細胞の存在率を、横軸に各種濃度の化合物を示した。

第二節 CD1d と合成イノシトールリン脂質との結合活性の評価

赤痢アメーバ由来イノシトールリン脂質は、Lotter らによって CD1d 依存的に NKT 細胞を活性化することが報告されている。彼らは、*CD1d* KO マウスを用いて NKT 細胞刺激活性に CD1d が必須であることを示しているが、CD1d とイノシトールリン脂質との直接的な相互作用は示されていない。そこで、筆者は CD1d と赤痢アメーバ由来イノシトールリン脂質との結合活性を評価することにより、NKT 細胞活性化機構および構造活性相関を解析することとした。

これまでに、CD1d-脂質リガンド間の相互作用解析の報告はあまり行われていない。Wong、辻らは、この理由として、1) 未標識リガンドを用いて結合活性を評価する手法があまり開発されていないこと 2) 臨界ミセル濃度(CMC)、溶解性、CD1d に対する結合および解離の遅さといった脂質リガンドの物性の悪さをあげている¹²⁸。2008 年、彼らは、CD1d-脂質リガンド間の相互作用を解析する手法として、マイクロアレイ上に固定化した $\alpha\text{-GalCer}$ と CD1d との結合に対する $\alpha\text{-GalCer}$ 誘導体の競合阻害活性を、残存する CD1d を蛍光標識抗 CD1d 抗体で検出することにより測定し、 $\alpha\text{-GalCer}$ 誘導体の結合活性を評価する手法を報告した¹²⁸。さらに彼らは、2009 年に、より簡便でスループット性の良い手法として、競合 ELISA 法をベースにした相互作用解析手法を報告した。本法では、既知の CD1d リガンドであるホスファチジルエタノールアミン¹²⁹のビオチン標識体と CD1d との結合に対する脂質リガンドの競合阻害活性を、残存するビオチン化 PE を酵素標識アビジンを用いて検出することによって測定した¹³⁰。彼らは、本法を用いてマウスおよびヒト CD1d に対する $\alpha\text{-GalCer}$ 誘導体の結合活性評価を行うことで、高活性な $\alpha\text{-GalCer}$ 誘導体を見出すことに成功している¹³¹。

以上の背景のもと、筆者は辻らの報告した競合 ELISA 法による CD1d-脂質リガンド間の相互作用解析法を適用し、CD1d と合成イノシトールリン脂質の結合活性を評価することとした。はじめに、疎水性相互作用によりタンパク質等の分子を吸着させるイムノプレート(Nunc Maxisorp)上にマウス CD1d:IgG 融合タンパク質(mCD1d:mIgG)を固定化する検討を行

った。固定化する抗体として、抗マウス IgG 抗体あるいは抗マウス Fc 抗体を使用したところ、十分な吸光度を示さなかった。そこで、固定化する手法として protein G がプレート表面に固定化されたプレートを適用することとした。実験は次のように行った。すなわち、Protein G 固定化プレートに対し mCD1d:mIgG を添加し一時間室温でインキュベーションした後に、様々な濃度の合成イノシトールリン脂質あるいはポジティブコントロールとして α -GalCer を加え、さらにビオチン化 PE を添加し 37 度で一晩インキュベーションした。プレートを洗浄した後に HRP 標識ストレプトアビジンを加えインキュベーションし、酵素基質(TMB)を添加し、吸光度(450 nm)を測定した(Fig. 4-6)。

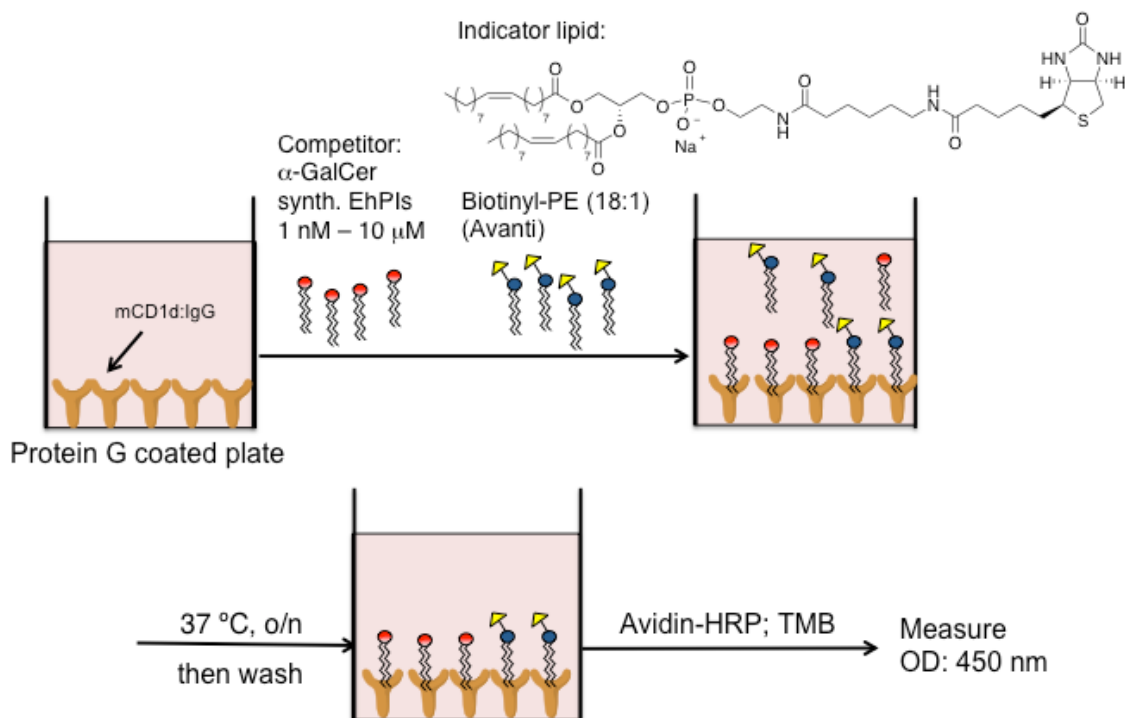
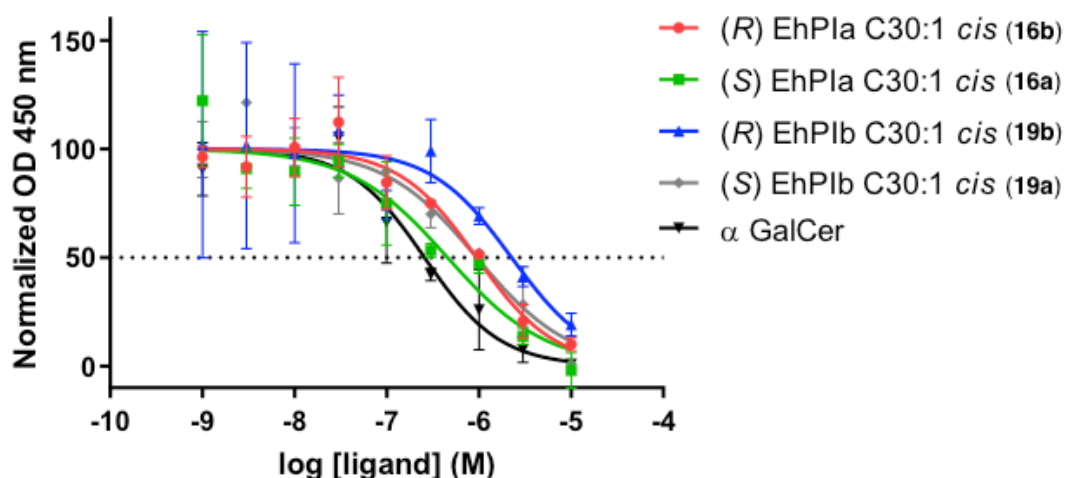


Fig. 4-6 競合 ELISA 法による CD1d 結合活性試験の概要

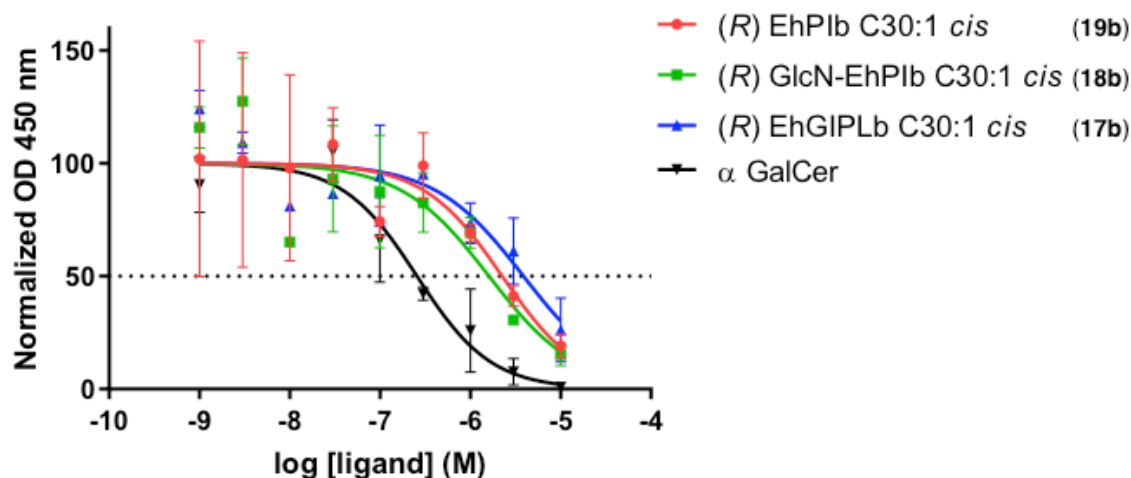
その結果、ポジティブコントロールである α -GalCer は、 IC_{50} : $0.257 \mu M$ を示し、文献値(IC_{50} : $0.260 \mu M^{131}$)とよい一致を示したことから、実験系は妥当であると考えた。炭素数 30、*cis* の長鎖脂肪酸を有する *R* 体および *S* 体の EhPIa (**16a** (*S*), **16b** (*R*)), EhPIb (**19a** (*S*), **19b** (*R*))を比較したところ(Fig. 4-5)、 α -GalCer と比較すると結合活性は低いものの、すべての化合物について競合阻害活性を示し、CD1d との直接的な相互作用を示唆する結果が得られた。また、*R* 体および *S* 体を比較すると *S* 体の方が強く CD1d と結合し、EhPIa と EhPIb を比較すると EhPIa の方が強く CD1d と結合する結果が得られた(Fig. 4-7)。



	16b	16a	19b	19a	αGalCer
IC ₅₀ (μM)	0.944	0.457	2.26	0.947	0.257(0.260 ¹³¹)

Fig. 4-7 競合 ELISA 法によるイノシトールリン脂質とマウス CD1d との結合活性試験 1
 ビオチン化 PE と mCD1d:IgG を各種濃度の合成イノシトールリン脂質 (**16a**, **16b**, **19a**, **19b**)およびαGalCer 存在下培養した後、培養液を除去し mCD1d:IgG と結合しているビオチン化 PE を Avidin-HRP 用いて検出した。縦軸は標準化した 450 nm の吸光度を、横軸に合成化合物の濃度を示した。阻害曲線は prism 7.0 (GraphPad 社)を用いて作成した。各点より非線形近似曲線を作成し、最大値および最小値を求めた後に、各点を標準化し非線形近似曲線より半数阻害濃度(IC₅₀)を求めた。

次に、EhPIb と糖鎖構造を有する EhPIb の比較を行った(Fig. 4-8)。その結果、グルコサミン単糖を有する **18b** がもっとも強く結合し、次に糖鎖構造のない EhPIb (**17b**)、4 糖を有する EhPIb (**19b**)という結果となった。尚、**19d** (炭素数 30、*trans* 体)および **19f** (炭素数 28)は、阻害活性が見られず、CD1d に対する結合活性が非常に弱い、あるいは結合しないという結果が得られた。



	19b	18b	17b	αGalCer
IC ₅₀ (μM)	2.26	1.62	3.89	0.257 (0.260 ¹³¹⁾)

Fig. 4-8 競合 ELISA 法によるイノシトールリン脂質とマウス CD1d との結合活性試験 2
 ビオチン化 PE と mCD1d:IgG を各種濃度の合成イノシトールリン脂質 (17b, 18b, 19b) および αGalCer 存在下培養した後、培養液を除去し mCD1d:IgG と結合しているビオチン化 PE を Avidin-HRP 用いて検出した。縦軸は標準化した 450 nm の吸光度を、横軸に合成化合物の濃度を示した。阻害曲線は Fig. 4-7 と同様の手法で作成した。

以上のように、マウス CD1d と赤痢アメーバ由来イノシトールリン脂質の直接的な相互作用を示唆する結果が得られたものの、低濃度領域において、脂質リガンド-CD1d 間、脂質リガンド-プレート間における非特異的結合に起因するとみられる吸光度のばらつきがみられた。また、ELISA 法は、その工程の中で数回のプレートの洗浄を行う必要があるため、低親和性リガンドは洗浄操作によって除去される可能性があり、低濃度領域におけるばらつきの原因のひとつだと考えられた。

そこで、それらを克服する手法として AlphaScreen 法に着目した。AlphaScreen はパーキンエルマー社によって開発された分子間相互作用解析手法の一つである (Fig. 4-9)。680 nm の光によって励起されたドナービーズは、200 nm の範囲に一重項酸素を放出する。分子間相互作用によってドナービーズ近傍にあるアクセプタービーズは、一重項酸素と反応し、520 nm-620 nm の波長の光を放出する。本手法は、洗浄操作のいらぬ均一系のアッセイであり、時間分解測定および、検出波長が励起波長より波長が短いことから高いシグナル-バックグラウンド比が得られるという特徴を有している。実験は以下のように行った。

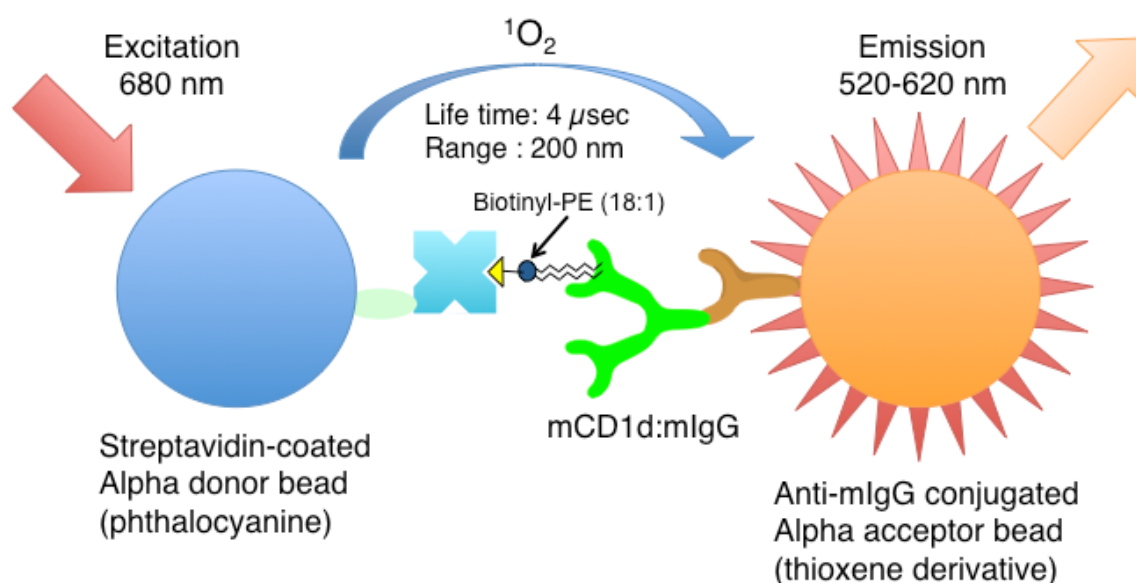


Fig. 4-9 AlphaScreen 法による CD1d 結合活性試験の概要

抗マウス IgG 抗体が結合したアクセプタービーズと mCD1d:mIgG を室温で一時間インキュベーションした後に、様々な濃度のイノシトールリン脂質あるいは α -GalCer とビオチン化 PE を添加し、37 度一晩インキュベーションした。その後、ストレプトアビジンがコートされたドナービーズを添加し一時間インキュベーションした後、Spark 10M (Tecan)を用いて測定した(Fig. 4-9)。その結果、 α -GalCer およびヒト型のホスファチジルイノシトールは阻害活性を示したものの、合成した S 体 **18a** および R 体 **18b** は、阻害活性を示さなかった(Fig. 4-10)。 α -GalCer は、 IC_{50} : $0.189 \mu M$ と、文献値に近い値を示した。ホスファチジルイノシトール¹³²は、S 体のほうが、R 体よりも強く CD1d に結合する結果(S 体: $3.79 \mu M$ vs R 体: $7.14 \mu M$)が得られた。本法を適用することで、3 つのサンプルにおいて低濃度領域におけるばらつきを低減させることに成功した。また、**18a** および **18b** が阻害活性を示さなかったのは、用いた mCD1d:mIgG が 5 nM と低濃度であったために、低親和性と予想される EhPI の結合が検出できなかったためと推察される。

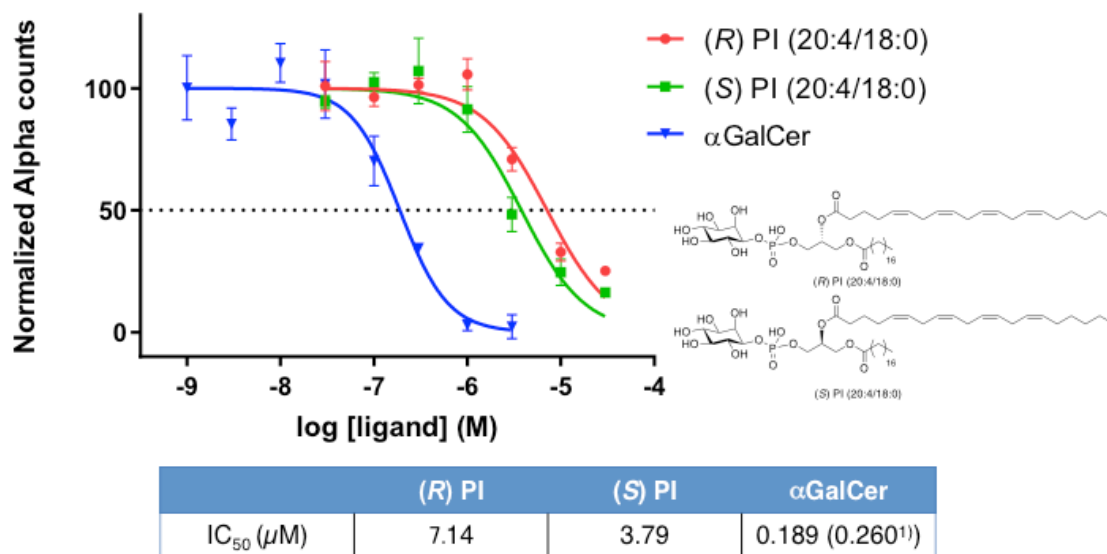


Fig. 4-10 Alphascreen 法を用いた CD1d 結合活性試験

mCD1d:IgG に antimouse IgG ドナービーズを結合させた後、ビオチン化 PE を各種濃度のイノシトールリン脂質およびαGalCer 存在下培養した後、Streptavidin ドナービーズを添加し、一時間培養し、Spark 10M (Tecan)を用いて Alpha counts を測定した。縦軸は標準化した Alpha counts を、横軸にイノシトールリン脂質の濃度を示した。阻害曲線は Fig. 4-7 と同様の手法で作成した。

第三節 NKT 細胞刺激活性の評価

赤痢アメーバ由来イノシトールリン脂質の NKT 細胞刺激活性を評価した。まず、マウス NKT 細胞を用いて、脂質構造の違う EhPIa および EhPIb について、その刺激活性を評価した。すなわち、合成イノシトールリン脂質で刺激した骨髓由来樹状細胞(BMDC)に対し、マウス(C57BL/6)脾臓細胞より単離した NKT 細胞を添加した後、48 時間培養し、培養上清中のサイトカイン IFN-γを ELISA 法により定量した(Fig. 4-11)。その結果、アシル鎖が一つの EhPIa (16a)は、IFN-γ誘導を示さず、3 種の脂質構造を有する EhPIb(19a、19c、19e)全てで IFN-γ誘導を示した(Fig. 4-12)。これは、Lotter らによって報告された単離 EhPIa、EhPIb を用いた結果と同様の傾向を示した。また、このことから、EhPI のマウス NKT 細胞刺激活性においては、二本のアシル鎖は必須であるが、脂質構造は活性にあまり影響しないことを示唆する結果が得られた。

次に、糖鎖構造の異なる EhPIb 17b、18b についてマウス脾臓細胞を用いて、免疫刺激活性を評価した。マウス(C57BL/6)脾臓細胞に、単離 EhLPPG、17b、18b を添加した後、48 時

間培養し、培養上清中の IFN- γ を ELISA 法により定量した(Fig. 4-13)。その結果、四糖を有する **17b** は IFN- γ 誘導活性が低かったものの、グルコサミンを有する **18b** は、天然物である単離 EhLPPG より強い IFN- γ 誘導活性を示した。CD1d-リガンド複合体による NKT 細胞の活性化においては、NKT 細胞の TCR に認識される必要があることから、四糖構造は TCR 認識において立体的な障害となっていることが推察される。

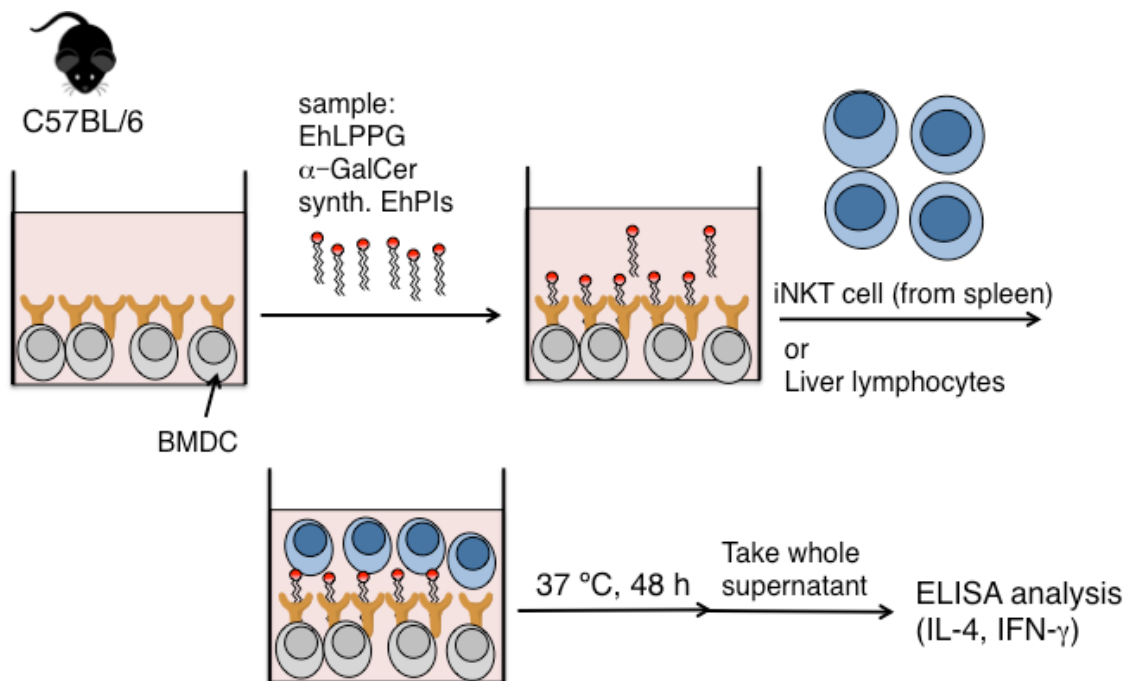


Fig. 4-11 NKT 細胞刺激活性試験の概要

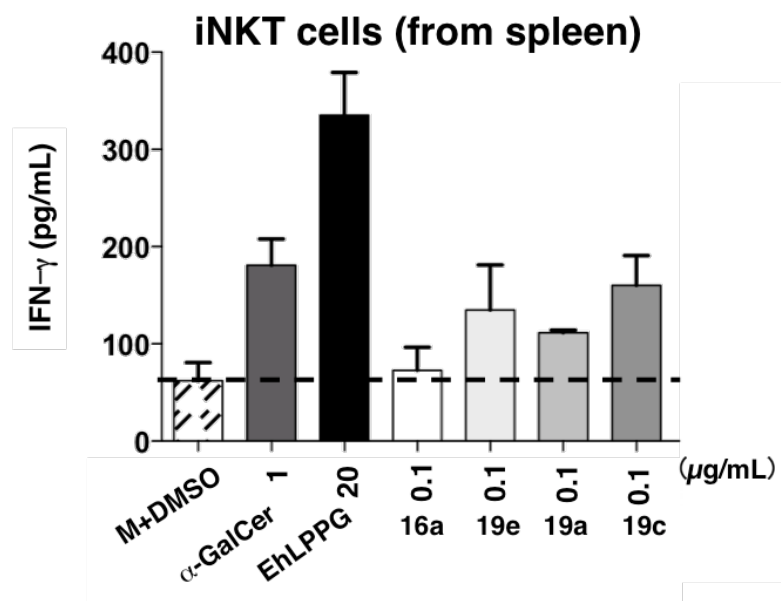


Fig. 4-12 NKT 細胞刺激活性試験 1

C57BL/6 マウスの脾臓より単離した NKT 細胞に対し、合成イノシトールリン脂質(**16a**, **19a**, **19e**, **19c**)、 α -GalCer および *EhLPPG* で刺激した BMDC を添加し 48 時間培養した後、培養上清中の IFN- γ を ELISA 法で測定した。

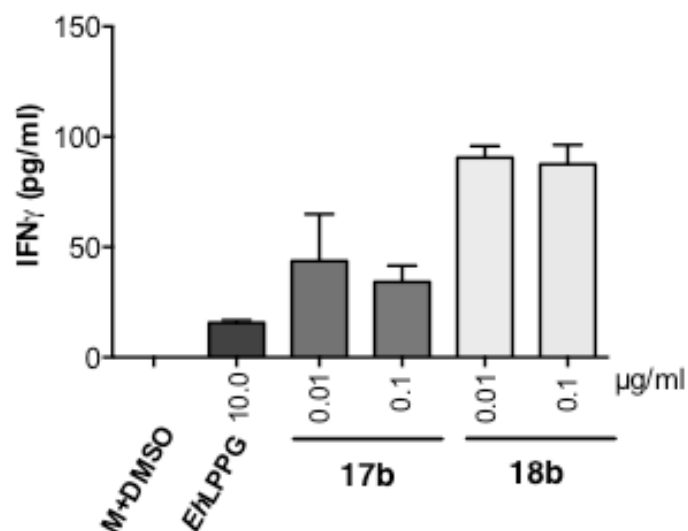


Fig. 4-13 NKT 細胞刺激活性試験 2

C57BL/6 マウスの脾臓細胞に対し、合成イノシトールリン脂質(**17b**, **18b**)、 α -GalCer および EhLPPG で刺激した BMDC を添加し 48 時間培養した後、培養上清中の IFN- γ を ELISA 法で測定した。

第四節 抗リーシュマニア活性の評価

皮膚リーシュマニア症は、寄生性原虫 *Leishmania major* の感染によって引き起こされる感染症である¹³³。熱帯、亜熱帯、南ヨーロッパにおいてよくみられ、年間約 100 万人が新たに感染しているとされ¹³⁴、顧みられない熱帯病(Neglected Tropical Disease: NTD)に指定されているが、現在までに、その有効な治療法は開発されていない。赤痢アメーバ由来イノシトールリン脂質は、共同研究者によって、単離 EhLPPG を用いた生物学的な研究から、皮膚リーシュマニア症の原因である *Leishmania major* 対して、阻害活性を有することが示された¹³⁵。そこで、本研究で合成した EhLPPG 部分構造である EhPIa および EhPIb を用いて、抗リーシュマニア活性を測定することとした。マウス骨髄由来マクロファージ(BMM)に対し、前鞭毛型(promastigote)の *Leishmania major* を感染させた後に、培地中に α -GalCer、単離 EhLPPG、S 体の EhPIa および 3 種の脂質構造を有する EhPI を添加し培養した。培養液を除去後、BMM からゲノム DNA を抽出し、KAPA PEOBE FAST プローブを用いて *Leishmania major* のアクチンおよび BMM の β -アクチンを定量し、その比を用いて *Leishmania major* の減少を定量した(Fig. 4-14)。その結果、 α -GalCer、単離 EhLPPG および炭素数 30、*cis* の脂肪酸を有する EhPIa (**16a**)、EhPIb (**19a**)が BMM に感染した *Leishmania major* を減少させたものの、**19c**、**19e** についてはその活性を示さなかった(Fig. 4-15)。

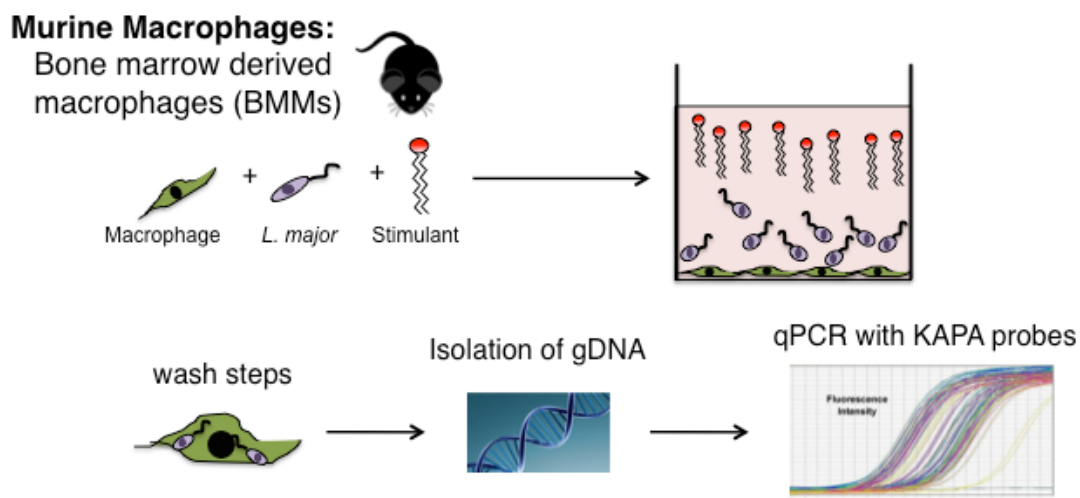


Fig. 4-14 抗リーシュマニア活性試験の概要

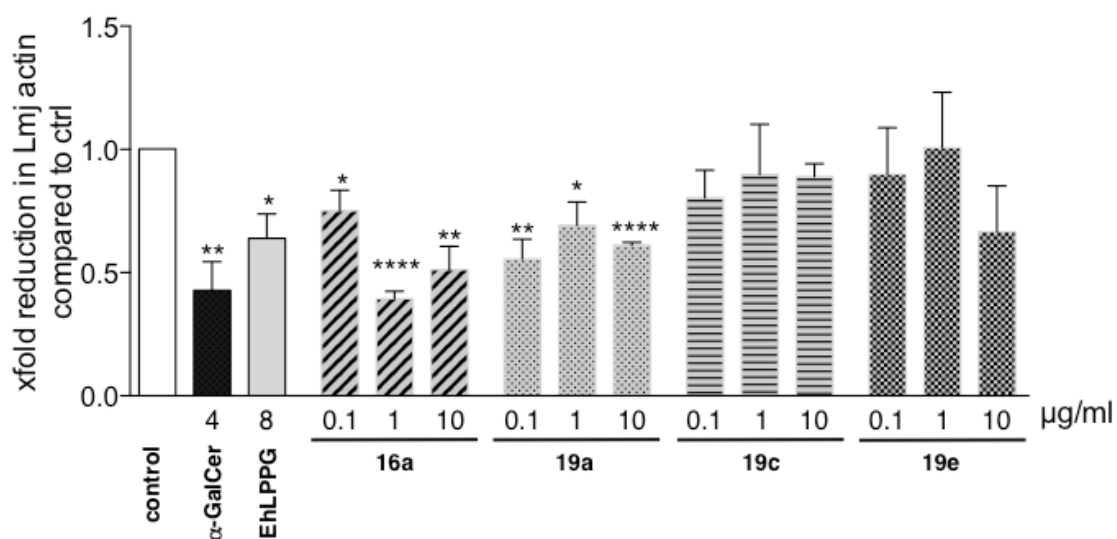


Fig. 4-15 抗リーシュマニア阻害活性試験

Leishmania major を感染させた BMM に対し、各種濃度(0.1, 1, 10 μg/mL)のαGalCer, EhLPPG, 合成イノシトールリン脂質(16a, 19a, 19c, 19e)を添加し、48 時間培養した。培地を除去した後、BMM のゲノム DNA を抽出し、*Leishmania major* のアクチンを定量することで *Leishmania major* の存在量を定量した。

第五節 結論

本章では、前章までに合成した赤痢アメーバ由来イノシトールリン脂質について、毒性試験、マウス CD1d との結合活性試験、NKT 細胞活性化試験、さらに抗リーシュマニア活性試験を行った。毒性試験では、炭素数 30、*cis* の脂肪酸を有する EhPIb (**19a**) が、わずかな赤血球の溶血活性とマウス脾臓細胞および BMDC に対する細胞毒性を示したものの、その他の化合物については細胞毒性を示さなかった。また、マウス CD1d 結合活性試験では、炭素数 30、*cis* の脂肪酸を有する EhPI(**16a**、**16b**、**19a** および **19b**) が、ビオチン化 PE の阻害活性を示し、CD1d タンパクとの直接的な相互作用を示唆する結果が得られた。また、非特異的結合を低減し、スループット性に優れた AlphaScreen 法による CD1d-リガンド相互作用解析法の確立にも成功した。NKT 細胞活性化試験では、脂質鎖を二本有する EhPIb(**19a**、**19c**、**19e**) が IFN- γ 誘導活性を示し、EhPIb が活性本体であることを明らかにするとともに、本活性には二本の脂質鎖が必須であることを示した。また、糖鎖を導入した EhPIb については、4 糖を有すると活性は減弱するものの、グルコサミン単糖の場合は、その活性を保持することが示された。赤痢アメーバ由来イノシトールリン脂質による NKT 細胞の活性化は、CD1d による経路と自然免疫受容体 Toll-like receptor 2 (TLR2) の経路の両者が必須であることが示されていることから、今後 TLR2 の経路などのさらなる生物活性試験を行うことで NKT 細胞活性化機構の解明に繋がると考える。

抗リーシュマニア活性試験においては、炭素数 30、*cis* の脂肪酸を有する EhPI(**16a**、**19a**) が、抗リーシュマニア活性を示したことから、EhLPPG 部分構造が抗リーシュマニア活性を有することを明らかにした。また本活性については、炭素数 28、炭素数 30、*trans* の脂肪酸では活性は見られなかったことから、脂質構造と活性が関連していることを示唆する結果が得られた。本結果により、赤痢アメーバ由来イノシトールリン脂質が、リーシュマニアを病原とする皮膚リーシュマニア症の新たな治療薬となる可能性を示した。

第五章 総括

本研究では、NKT 細胞刺激活性を有する赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* イノシトールリン脂質について、化学合成を行うとともに、その特徴的な生物活性の解析を行うことを目的とした。また、化学合成を行う中で、効率・汎用的なイノシトールリン脂質合成法の確立を目指し、新規位置選択的リン酸化反応および、アリル・アリルオキシカルボニル保護基を永続的保護基とする新規合成戦略の開発を行った。

第二章では、新規位置選択的リン酸化法の開発とイノシトールリン脂質 EhPIa の合成を行った。効率的なイノシトールリン脂質の合成において鍵となる選択的なリン酸基の導入において、メソ体のイノシトール誘導體 **44** に対する非対称化による選択的リン酸化を検討した。リン酸化剤として、(*R*)-BINOL を不斉補助基として、また、リン原子上に酸素、硫黄、セレンを有するリン酸化剤を検討したところ、原子半径の増大にしたがって($O < S < Se$)、選択性が向上することを見出した。最終的に、セレンリン酸化試薬 **51** を適用することで、良好な収率および選択性で望む一位リン酸化体 **45** を得ることに成功した。本法は、グラムスケールにも適用することができ、イノシトールリン脂質およびイノシトールリン酸化合物合成における重要中間体の量的供給も可能とした。合成した一位リン酸化体 **45** は、ジアステレオマー分割の後、保護基の変換を行い、Ni 触媒によるアルキル-アルキルクロスカップリング反応を用いて別途調製した長鎖脂肪酸含有アシルグリセロールを連結し、保護基の除去を行うことで、グリセロール *sn*-2 位の二つの異なる立体を有する EhPIa の合成を達成した。

第三章では、分子内に不飽和結合を有するような複雑な複合脂質合成における新たな合成戦略として、アリル・アリルオキシカルボニル基を水酸基の永続的保護基とする新規保護基戦略を開発し、本戦略を EhPIb および糖鎖構造を有する EhPIb の合成に適用した。まず、糖鎖構造のない EhPIb の合成を行った。第二章において開発した位置選択的リン酸化反応より得られる一位リン酸化体 **45** を共通中間体とし、水酸基をアリル系の保護基で整えた **78** を調製した。最終的な保護基の脱保護は、ルテニウム錯体 **69** を用いて、溶媒中に微量の酸を添加することで良好に進行し、三種の異なる脂質構造を有する EhPIb の合成を達成した。次に、本戦略を、糖鎖構造を有するより複雑な EhPIb の合成へと展開した。**79** より、BINOL の立体障害による選択的な PMB 基の除去を行った後、保護基の変換を行い、アジド糖 **77** との α 選択的グリコシル化を行い、アシルグリセロールの連結を行うことで擬二糖中間体 **108** の合成を行った。また、水酸基をアリル系の保護基で整えた三つの単糖誘導體を調製し、順次グリコシル化反応を行うことで三糖誘導體 **73** を合成し、擬二糖中間体 **74a**、**74b** とグリコシル化を行い糖鎖含有 EhPIb の全保護体(**129a**、**129b**)の調製を行った。最終的な保護基の除去は、パラジウム触媒を用いた場合に良好に進行し、グルコサミンおよび四

糖構造を有する EhPIb の合成を達成した。本合成戦略は、最終的な保護基の除去が温和でほぼ中性条件で行える点で有用であり、分子内に不飽和結合のような還元条件に不耐な官能基を有する複合脂質のみならず、酸および塩基条件に弱い複合脂質合成にも適用可能な戦略であると考ええる。

第四章では、前章までに合成した赤痢アメーバ由来イノシトールリン脂質の生物活性の解析のため、毒性試験、マウス CD1d 結合活性試験、NKT 細胞刺激活性試験および抗リーシュマニア活性試験を行った。毒性試験においては、赤血球の溶血活性試験とマウス脾臓細胞と PBMC の死細胞染色による細胞毒性の評価を行ったところ、C30:1, *cis* の脂肪酸を有する EhPIb (19a)において僅かな溶血活性と細胞毒性が認められた。マウス CD1d 結合活性試験では、既知法である競合 ELISA 法による試験を行った。C30:1, *cis* の脂肪酸を有する EhPIa (16a, 16b)および EhPIb (19a, 19b)は、 α -GalCer よりは弱いものの、競合剤であるピオチン化 PE との結合阻害活性を示し、CD1d と直接的な相互作用を示唆する結果が得られた。NKT 細胞刺激活性試験では、マウス NKT 細胞を用いて脂質構造の異なる EhPIa、EhPIb を用いて脂質構造間の比較し、マウス脾臓細胞を用いて糖鎖構造を有する EhPIb を用いて糖鎖構造間の比較を行った。その結果、アシル鎖が二本の EhPIb (16a, 16c, 16e)が IFN- γ 誘導活性を示し、天然物と同様の結果を示したことから、合成品によって EhPIb が活性本体であることを示した。また、糖鎖構造を比較したところ、四糖構造では活性は減弱したものの、グルコサミン単糖では、天然の EhLPPG より強く IFN- γ を誘導した。本結果は、NKT 細胞の TCR の認識において、グルコサミン構造までは構造的に許容されることを示唆しており、四糖構造は抗原提示細胞内で酵素などにより切断されていると推察される。また、抗リーシュマニア活性試験では、C30:1, *cis* の脂肪酸を有する EhPIa (16a)および EhPIb (19a)が抗リーシュマニア活性を示し、赤痢アメーバ由来イノシトールリン脂質の生物活性の新たな知見が得られた。また、C28:0、C30:1, *trans* の脂肪酸(19c, 19b)では活性が見られなかったことから、この生物活性は脂質構造に関連していることが明らかとなった。

以上、本研究を通して確立した新規位置選択的リン酸化反応およびアリル・アリルオキシカルボニル基による新規保護基戦略は、本研究において合成した赤痢アメーバ由来イノシトールリン脂質のみならず、様々なイノシトールリン脂質、イノシトールリン酸化合物に適用可能な汎用的な手法であると考えられ、生物活性を有するリン酸基含有イノシトール化合物の合成および生物活性研究のさらなる発展につながる意義のある成果だと考える。

また、本研究で合成した赤痢アメーバ由来イノシトールリン脂質による生物活性試験によって、NKT 細胞活性化の活性本体がイノシトールリン脂質であることを強く示唆する結果を得たこと、抗リーシュマニア活性の新たな知見を得たことから、原虫由来細胞表層成分の生物活性の解明に寄与する成果だと考える。

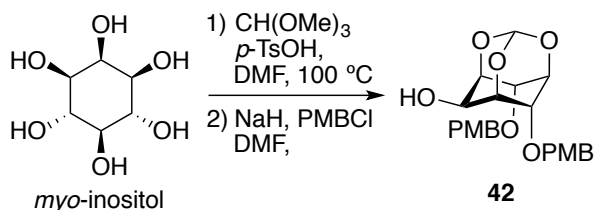
第六章 実験の部

1. Chemistry

General procedure:

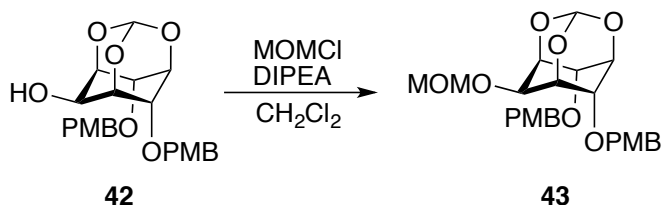
Nuclear magnetic resonance (^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{31}P NMR) spectra were measured at 25 °C in an indicated solvent with JEOL ECA 500 or ECX 400 or Agilent INOVA 600 and analyzed Delta 5.0.5 (JEOL) or Vnmrj 32A (Agilent). The proton chemical shifts in CDCl_3 are reported in parts per million (δ) from tetramethylsilane as an internal standard and coupling constants are in Hertz (Hz). The chemical shifts in other solvent are reported in ppm from the residual proton signal of solvent. The chemical shifts for ^{13}C NMR are reported in ppm from the internal solvent signal (CDCl_3 , δ 77.0). High-resolution mass spectra (HRMS) of synthetic compounds were obtained on an electron spray ionization quadrupole time of flight (ESI-QTOF) mass spectrometer (micrOTOF-QII-HC; BRUKER). Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed on Silica gel 60 F_{254} Plates (Merck, 0.25 mm thickness). Preparative TLC separations were performed on PLC Silica gel 60 F_{254} Plates (Merck, 0.5 or 1.0 mm thickness). Silica gel column chromatography was performed using Silica gel 60 (Merck, 0.040 – 0.063 mm) or Silica gel 60 N [spherical neutral (Kanto Chemical Co., Inc., 40 – 50 μm)] at medium pressure (2 – 4 kgcm^{-2}) using indicated solvent systems. Reagents were purchased from commercial supplier (TCI, nacalai tesque, Wako pure chemical industry, Ltd., Kanto Chemical Co., Inc.) and were used without further purification. Unless otherwise noted, Non-aqueous reactions were carried out under argon atmosphere. Anhydrous dichloromethane was prepared by distillation from calcium hydrate. Anhydrous tetrahydrofuran was prepared by distillation from Na. Anhydrous *N,N*-dimethylformamide, methanol, Toluene were purchased from Wako pure chemical industry, Ltd. and Kanto Chemical Co., Inc.

Experimental procedures and characterization data



4,6-di-*O*-*p*-methoxybenzyl-*myo*-inositol 1,3,5-*O*-orthoformate (**42**)

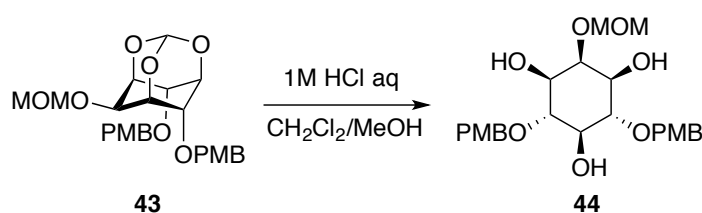
To a suspension of *myo*-inositol (20 g, 111 mmol) in DMF (180 mL) was added *p*-TsOH (2.11 g, 11.1 mmol) and CH(OEt)₃ (27.7 mL, 166 mmol). The mixture was allowed to warm at 110 °C. After stirring for 11 h, the reaction mixture was cooled to ambient temperature and then added triethylamine (1.4 mL, 11.1 mmol) and then concentrated *in vacuo*. The crude mixture was used next reaction without further purification. To the crude mixture DMF (222 mL) was added then cooled to 0 °C. To the mixture NaH (60% oil dispersion) (8.88 g, 222 mmol) was added at 0 °C. After stirring for 30 min, TBAI (2g, 11.1 mmol) and PMBCl (12.6 mL, 92.4 mmol) were added to the reaction mixture. The mixture was slowly warmed up to room temperature and stirred for 11 h. The reaction was quenched with 10% aqueous citric acid, and extracted with Et₂O. The combined organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by silica gel chromatography (Toluene/EtOAc = 3.5/1 to 2:1) to afford **42** (17.1 g, 35% yield for 2 steps) as a white solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 4H), 6.82 (d, *J* = 8.6 Hz, 4H), 5.44 (s, 1H), 4.58 (d, *J* = 11 Hz, 2H), 4.50 (d, *J* = 11 Hz, 2H), 4.40 - 4.39 (m, 1H), 4.33 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 4.19 – 4.18 (m, 2H), 3.81 – 3.80 (m, 7H), 2.98 (d, *J* = 11 Hz, 1H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 159.5, 129.7, 129.5, 113.9, 103.4, 73.5, 73.1, 71.4, 67.9, 61.5, 55.3; HRMS (ESI) calculated for C₂₃H₂₆NaO₈ [M+Na]⁺ 453.1520, found 453.1520



4,6-di-*O*-*p*-methoxybenzyl-2-*O*-methoxymethyl-D-*myo*-inositol 1,3,5-*O*-orthoformate (**43**)

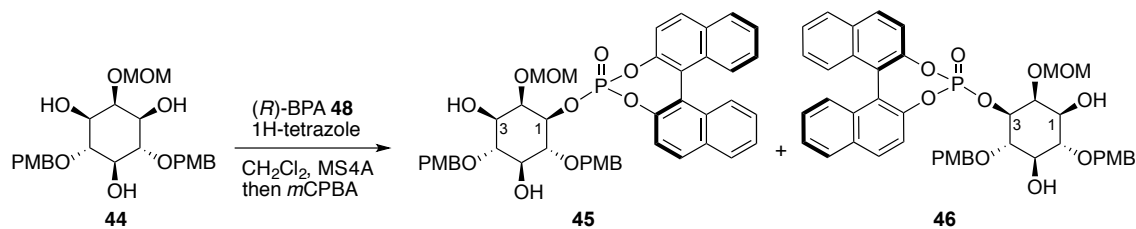
To a solution of **42** (17.0 g, 39.5 mmol) in CH₂Cl₂ (100 mL) at room temperature was added *N,N*-diisopropylethylamine (10.5 mL, 59.2 mmol). After stirring for 10 min, MOMCl (4.5 mL, 59.2 mmol) was added to the reaction mixture. The reaction mixture was stirred for over night, and then extracted with CH₂Cl₂. The combined organic solution was washed with water and brine and dried over

anhydrous Na_2SO_4 , concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by recrystallization (EtOAc/Hexane) to afford **43** (11.54 g). The mother liquor was concentrated under reduced pressure and then purified with silica gel chromatography (Toluene/ethyl acetate = 6/1) to afford **S5** (3.94 g, total 82% yield) as a white solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.12 (d, J = 8.3 Hz, 4H), 6.83 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 5.50 (s, 1H), 4.79 (s, 2H), 4.59 (d, J = 11 Hz, 2H), 4.49 (d, J = 11 Hz, 2H), 4.38 – 4.37 (m, 1H), 4.31 (dd, J = 3.3, 3.4 Hz, 2H), 4.27 – 4.26 (m, 2H), 4.16 (s, 1H), 3.80 (s, 6H), 3.43 (s, 3H); ^{13}C NMR (98 MHz, CDCl_3) δ 159.5, 129.6, 113.9, 103.3, 96.3, 73.4, 71.6, 71.5, 68.1, 67.1, 55.8, 55.4; HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{NaO}_9$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 497.1782, found 497.1788



4,6-di-*O*-*p*-methoxybenzyl-2-*O*-methoxymethyl-*D*-myo-inositol (**44**)

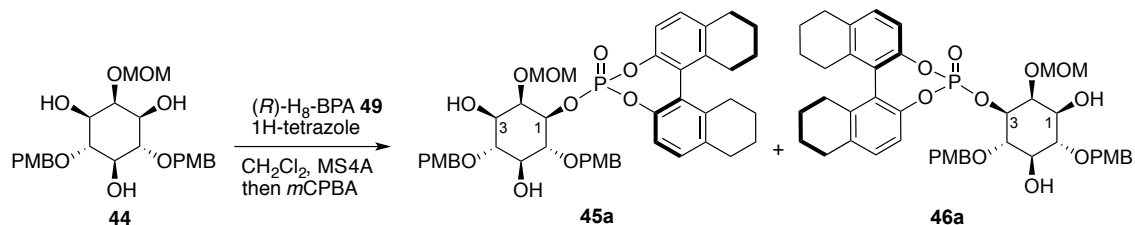
To a solution of **43** (11.54 g, 9.53 mmol) in methanol (432 mL) at room temperature was added 1M HCl aq (48 mL). Precipitate immediately formed upon addition, and dichloromethane was added until the precipitate completely dissolved. The reaction mixture was stirred for 18 h at room temperature. The solution was neutralized with saturated aqueous NaHCO_3 , and then concentrated under reduced pressure to provide the oil containing NaCl salt. The oil was dissolved with ethyl acetate, and then NaCl was removed by filtration. The solvent was removed *in vacuo* to afford the crude mixture. The crude material was purified with column chromatography (Toluene/EtOAc = 5/6 to 2/3) to afford **44** (6.41 g, 56% yield) as a white solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.31 (d, J = 8.4 Hz, 4H), 6.88 (d, J = 8.2 Hz, 4H), 4.83 – 4.77 (m, 6H), 3.96 (s, 1H), 3.80 (s, 6H), 3.58 – 3.49 (m, 5H), 3.45 (s, 3H), 2.96 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 2.49 (s, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 159.4, 130.8, 129.9, 129.8, 114.1, 99.1, 81.7, 75.0, 74.7, 71.5, 56.2, 55.4; HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{NaO}_9$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 487.1939, found 487.1944



General procedure for regioselective phosphorylation: synthesis of 4,6-di-*O*-*p*-methoxybenzyl-2-*O*-methoxymethyl-D-*myo*-inositol-1-((*R*)-1,1'-bi-2-naphthyl) Phosphate (45**) and synthesis of 4,6-di-*O*-*p*-methoxybenzyl-2-*O*-methoxymethyl-D-*myo*-inositol-1-((*R*)-1,1'-bi-2-naphthyl) Phosphate (**46**)**

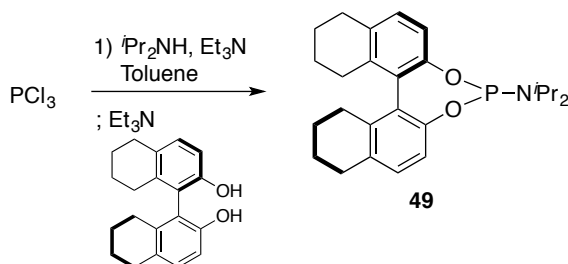
The solution of **44** (500 mg, 1.08 mmol), 1H-tetrazole (377 mg, 5.38 mmol) and MS4A powder in CH₂Cl₂ (15 mL) and the solution of (*R*)-BPA **48** (2.24 g, 5.38 mmol) and MS4A powder in CH₂Cl₂ (15 mL) were stirred for 30 min. Then, the solution of (*R*)-BPA **48** was added to the solution of **44** and 1H-tetrazole via cannula. After stirring for 1 day, the reaction mixture was cooled to 0 °C, and then added *m*CPBA (928 mg, 5.38 mmol). The mixture was stirred for 1 hour, and then filtrated through a pad of Celite®. The mixture was washed with aqueous Na₂S₂O₃, saturated aqueous NaHCO₃ and brine. The organic solution was dried over anhydrous Na₂SO and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified with column chromatography (toluene/ethyl acetate = 2/1) to afford a mixture of **45** and **46** (629 mg, 74% yield, **45** : **46** = 3.8 : 1) as a white foam. **45** (major isomer): ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.01-7.96 (m, 2H), 7.94 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.52-7.45 (m, 3H), 7.43-7.37 (m, 2H), 7.35-7.28 (m, 5H), 6.89-6.85 (m, 4H), 6.59-6.54 (m, 2H), 4.89 (dd, *J* = 9.6, 6.6 Hz, 2H), 4.83 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 4.76 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 4.58-4.52 (m, 1H), 4.45-4.39 (m, 2H), 4.35 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 3.80-3.73 (m, 4H), 3.71-3.66 (m, 3H), 3.60-3.54 (m, 1H), 3.53-3.45 (m, 5H), 3.37-3.30 (m, 1H), 2.54 (s, 1H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 159.5, 159.1, 132.3, 132.3, 131.7, 131.7, 131.1, 130.8, 130.3, 129.9, 129.4, 128.6, 128.6, 127.4, 127.1, 126.9, 126.0, 121.5, 121.3, 120.7, 120.3, 114.0, 113.7, 98.9, 81.0, 80.5, 79.8, 79.8, 79.7, 79.6, 75.1, 74.7, 74.5, 71.0, 56.3, 55.4, 55.3; HRMS (ESI) calculated for C₄₄H₄₃NaO₁₂P [M+Na]⁺ 817.2384, found 817.2391. **46** (minor isomer): ¹H NMR (390 MHz, CDCl₃) δ 8.04 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.52-7.44 (m, 2H), 7.39-7.26 (m, 8H), 7.20-7.15 (m, 1H), 6.92-6.84 (m, 4H), 4.85-4.66 (m, 4H), 4.65-4.57 (m, 2H), 4.50 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.33 (s, 1H), 3.87-3.72 (m, 8H), 3.59-3.46 (m, 3H), 3.28 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 3.11 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 2.56 (s, 1H), 2.35 (s, 1H); ¹³C NMR (98 MHz, CDCl₃) δ 159.4, 159.3, 147.5, 146.2, 132.3, 132.0, 131.7, 131.6, 131.1, 130.7, 130.7, 129.9, 129.4, 129.1, 128.7, 128.5, 128.3, 127.3, 127.1, 127.0, 126.0, 125.4, 121.5, 121.2, 120.6, 120.5, 114.0, 98.7, 81.0, 80.3, 79.6, 79.5, 79.2, 77.4, 74.7, 74.5, 74.4, 71.0, 55.8, 55.4; HRMS (ESI) calculated for

$C_{44}H_{43}NaO_{12}P$ $[M+Na]^+$ 817.2384, found 817.2407.



4,6-di-*O*-*p*-methoxybenzyl-2-*O*-methoxymethyl-D-myo-inositol-1-((*R*)-5,5',6,6',7,7',8,8'-octahydro-1,1'-bi-2-naphthyl) Phosphate (45a) and 4,6-di-*O*-*p*-methoxybenzyl-2-*O*-methoxymethyl-D-myo-inositol-3-((*R*)-5,5',6,6',7,7',8,8'-octahydro-1,1'-bi-2-naphthyl) Phosphate (46a)

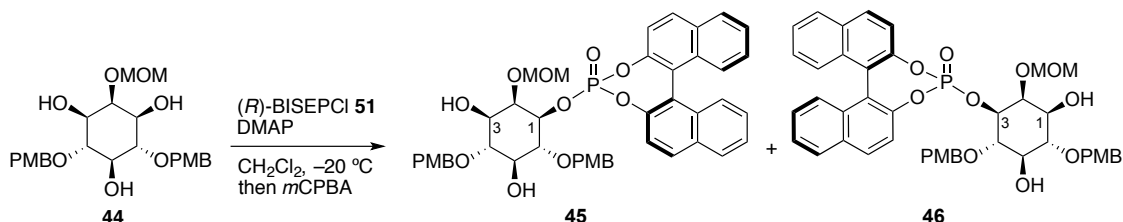
In a manner similar to the synthesis of **45** and **46**, triol **44** (50 mg, 0.11 mmol) was reacted with (*R*)-H₈-BPA **49** (226 mg, 0.54 mmol) to afford **45a** and **46a** (41.9 mg, 49% yield) (**45a**:**46a**:diphosphate = 9:1:9)



(*R*)-5,5',6,6',7,7',8,8'-octahydro-1,1'-binaphthylphosphinite diisopropylamidite (49)

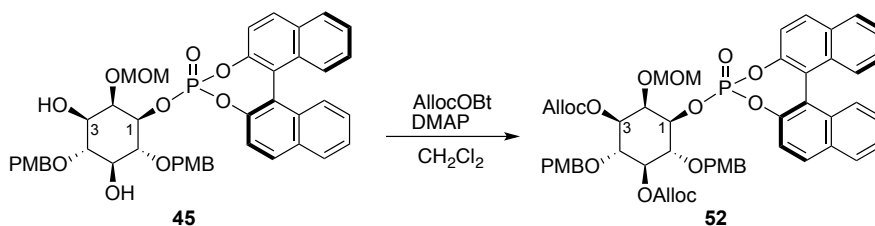
A solution of diisopropylamine (332 μ L, 2.36 mmol) and triethylamine (362 μ L, 2.36 mmol) in Toluene (1.2 mL) was added to a solution of PCl_3 (210 μ L, 2.36 mmol) in Toluene (17 mL). The reaction mixture was warmed up to 70 $^{\circ}C$ and stirred for over night. The reaction mixture was cooled to room temperature and then Et_3N (724 μ L, 4.72 mmol) and (*R*)-2,2'-dihydroxy-5,5',6,6',7,7',8,8'-octahydro-1,1'-binaphthyl (695 mg, 2.36 mmol) were added. The mixture was stirred for 8 h and then evaporated to remove the solvent. The crude mixture was subjected to silica gel column chromatography (eluting with toluene) to afford **49** (807 mg, 80%) as a white solid. 1H NMR (392 MHz, $CDCl_3$) δ 7.04 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 6.98 (d, 2H, J = 7.9 Hz), 6.89 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 3.22-3.33 (m, 2H), 2.71-2.86 (m, 4H), 2.57-2.70 (m, 2H), 2.16-2.32 (m, 2H), 1.70-1.82 (m, 6H), 1.47-1.63 (m, 2H), 1.17 (s, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.14 (s, 3H); ^{13}C NMR (99 MHz, $CDCl_3$) δ 149.70, 148.83, 137.95, 137.29, 133.85, 132.51, 129.54, 129.33, 129.15, 128.67, 128.34, 127.66, 119.04, 118.77, 44.64, 44.50, 29.31, 29.19, 27.93, 27.77, 24.68, 24.63, 24.59, 22.98, 22.86, 22.67; ^{31}P NMR (159 MHz, $CDCl_3$) δ 146.75; HRMS (ESI) calculated for

$C_{26}H_{34}NNaO_2P$ $[M+Na]^+$ 446.2219, found 446.2220.



General procedure for regioselective phosphorylation of *myo*-inositol derivative **44: synthesis of 4,6-di-*O*-*p*-methoxybenzyl-2-*O*-methoxymethyl-D-*myo*-inositol-1-((*R*)-1,1'-bi-2-naphtyl) Phosphate (**45**) and synthesis of 4,6-di-*O*-*p*-methoxybenzyl-2-*O*-methoxymethyl-D-*myo*-inositol-1-((*R*)-1,1'-bi-2-naphtyl) Phosphate (**46**)**

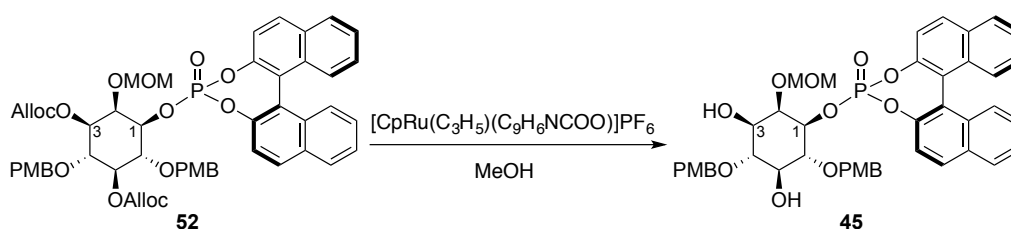
To a stirred solution of **44** (9.51 g, 20.4 mmol) and DMAP (5.0 g, 40.9 mmol) in CH_2Cl_2 (204 mL) at $0\text{ }^\circ\text{C}$ was added (*R*)-BISEPCI **51** (17.6 g, 40.9 mmol). After stirring for overnight at the same temperature, *m*CPBA (75%) (9.4 g, 40.9 mmol) was added to the reaction mixture. The reaction was extracted with EtOAc and the extract was washed with H_2O and brine. The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified with silica gel column chromatography (toluene/EtOAc = 2/1) to afford the mixture of **45** and **46** (12.1 g, 74%, **45**:**46** = 88:12) as a white foam.



3,5-di-*O*-allyloxycarbonyl-4,6-di-*O*-*p*-methoxybenzyl-2-*O*-methoxymethyl-D-*myo*-inositol-1-((*R*)-1,1'-bi-2-naphtyl) Phosphate (52**)**

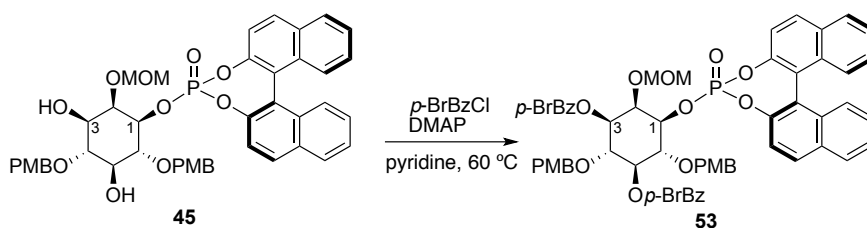
To a solution of AllocOBt (26 g, 119 mmol) and DMAP (7.27 g, 59.5 mmol) in CH_2Cl_2 (120 mL) was added **45** and **46** (8.82 g (**45**:**46** = 3.8:1), 11.1 mmol). The reaction mixture was stirred for over night, and then 10% aqueous citric acid and then extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic phase was washed with brine and dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified with column chromatography elution with toluene/ethyl acetate (6/1) to afford **52** (6.27 g, 74% yield (from **9a**)) as a white foam. 1H NMR (390 MHz, $CDCl_3$) δ 8.03-7.88 (m, 4H), 7.54-7.43 (m, 3H), 7.40 (d,

$J = 8.4$ Hz, 1H), 7.36-7.27 (m, 3H), 7.23-7.13 (m, 3H), 6.87 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.82 (dd, $J = 11.4$, 2.8 Hz, 2H), 6.62 (dd, $J = 11.4$, 2.7 Hz, 2H), 6.02-5.89 (m, 1H), 5.89-5.75 (m, 1H), 5.39 (dd, $J = 17.2$, 1.3 Hz, 1H), 5.32 (dd, $J = 4.8$, 1.2 Hz, 1H), 5.28 (t, $J = 1.5$ Hz, 1H), 5.20 (dd, $J = 10.4$, 1.2 Hz, 1H), 4.95-4.85 (m, 2H), 4.75-4.59 (m, 7H), 4.58-4.49 (m, 3H), 4.37 (s, 2H), 4.04-3.90 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.46 (s, 3H); ^{13}C NMR (98 MHz, CDCl_3) δ 159.3, 159.0, 154.1, 147.6, 147.5, 146.4, 132.4, 132.2, 132.0, 131.7, 131.6, 131.5, 131.1, 130.1, 129.6, 129.1, 128.6, 127.4, 127.0, 126.9, 126.0, 121.3, 120.8, 120.3, 119.3, 119.2, 113.7, 113.5, 98.1, 79.0, 78.3, 76.0, 75.1, 74.7, 69.0, 68.9, 56.3, 55.3; HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{52}\text{H}_{51}\text{NaO}_{16}\text{P}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 985.2807, found 985.2812.



4,6-di-*O*-*p*-methoxybenzyl-2-*O*-methoxymethyl-*D*-*myo*-inositol-1-((*R*)-1,1'-bi-2-naphthyl) Phosphate (45)

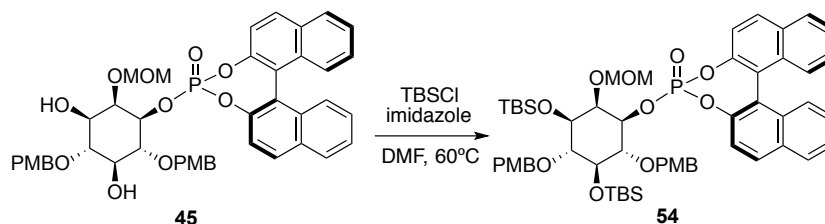
The solution of **52** (1.00 g, 1.04 mmol), and $[\text{CpRu}(\text{C}_3\text{H}_5)(\text{C}_9\text{H}_7\text{NCOO})]\text{PF}_6$ (11 mg, 0.021 mmol) in MeOH (10.4 mL) was stirred at 35 °C. After stirring for 3 hour, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified with silica gel column chromatography (toluene/ethyl acetate = 1/1) to afford **45** (1.1461 g, quant) as a white foam.



3,5-di-*O*-*p*-bromobenzoyl-4,6-di-*O*-*p*-methoxybenzyl-2-*O*-methoxymethyl-*D*-*myo*-inositol-1-((*R*)-1,1'-bi-2-naphthyl) Phosphate (52)

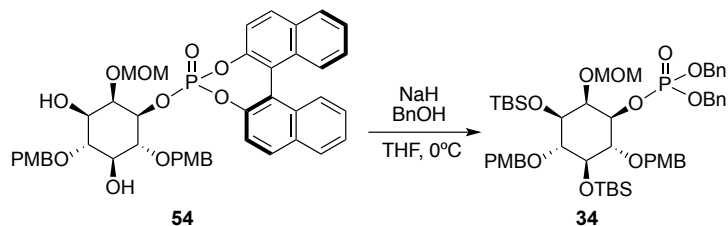
To the solution of **45** (50 mg, 63 μmol) and DMAP (3.8 mg, 32 μmol) in pyridine (5 mL) was added *p*-bromobenzoyl chloride (138 mg, 0.63 mmol). The mixture was stirred for over night at 60 °C. The mixture was cooled to room temperature and diluted with ethyl acetate and then washed with H_2O and brine. The organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 , and filtered, and concentrated *in vacuo*. The crude material was purified with column chromatography (toluene/ethyl acetate = 10/1 to 5/1) to afford **53**

(34 mg, 47% yield) as a white solid. ^1H NMR (390 MHz, CDCl_3) δ 7.84-7.99 (m, 6H), 7.71 (dd, 2H, $J = 6.8, 1.7$ Hz), 7.45-7.58 (m, 7H), 7.39-7.42 (m, 1H), 7.28-7.34 (m, 4H), 6.89 (t, 2H, $J = 8.6$ Hz), 6.68 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 6.49-6.53 (m, 2H), 6.39-6.42 (m, 2H), 5.40 (t, 1H, $J = 9.5$ Hz), 5.12-5.17 (m, 1H), 4.92-4.96 (m, 1H), 4.83-4.88 (m, 1H), 4.76-4.80 (m, 1H), 4.72 (t, 1H, $J = 2.4$ Hz), 4.54 (d, 1H, $J = 11.3$ Hz), 4.41-4.46 (m, 1H), 4.35 (d, 1H, $J = 10.9$ Hz), 4.18-4.24 (m, 2H), 4.07 (t, 1H, $J = 9.6$ Hz), 3.64 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.34 (s, 3H)



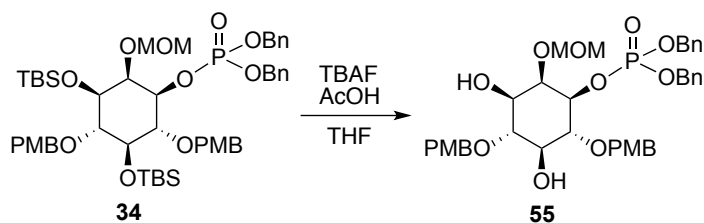
3,5-di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-4,6-di-*O*-*p*-methoxybenzyl-2-*O*-methoxymethyl-*D*-myo-inositol-1-((*R*)-1,1'-bi-2-naphthyl) Phosphate (54)

To a solution of **45** (1.20 g, 1.50 mmol) in DMF (7.5 mL) at room temperature were added *tert*-butyldimethylsilyl chloride (2.27 g, 15.0 mmol) and imidazole (1.23 g, 18.0 mmol). The mixture was allowed to warm to 60 °C. After stirring for 1 day, methanol was added to the reaction, and then extracted with Et_2O and washed with brine. The organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 , and concentrated *in vacuo*. The crude material was purified with column chromatography (toluene/ethyl acetate =15/1) to afford **54** (1.46 g, 95% yield) as a white foam. ^1H NMR (390 MHz, CDCl_3) δ 7.97-7.84 (m, 4H), 7.53-7.40 (m, 3H), 7.32-7.17 (m, 7H), 6.97 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.82 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.51 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 4.93 (s, 2H), 4.87 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H), 4.71 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 4.58-4.48 (m, 2H), 4.40 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 4.33 (s, 1H), 3.80-3.74 (m, 4H), 3.71-3.63 (m, 4H), 3.59-3.53 (m, 1H), 3.53-3.45 (m, 4H), 0.83 (s, 9H), 0.79 (s, 9H), 0.10 (s, 3H), -0.03 (s, 3H), -0.12 (s, 3H), -0.14 (s, 3H); ^{13}C NMR (98 MHz, CDCl_3) δ 158.4, 158.3, 147.6, 147.5, 146.4, 146.4, 132.3, 132.2, 131.9, 131.6, 131.4, 131.3, 131.0, 130.7, 129.7, 129.2, 128.6, 128.5, 128.3, 127.5, 127.3, 127.1, 126.8, 125.9, 125.8, 125.4, 121.4, 121.2, 120.8, 120.6, 113.9, 113.2, 113.2, 98.0, 81.8, 80.4, 80.3, 80.2, 80.2, 78.1, 77.4, 75.1, 74.8, 73.3, 56.2, 55.2, 26.1, 25.2, 18.1, 18.1, -3.8, -4.2, -4.7; HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{56}\text{H}_{71}\text{NaO}_{12}\text{PSi}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1045.4114, found 1045.4130



3,5-di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-4,6-di-*O*-*p*-methoxybenzyl-2-*O*-methoxymethyl-D-*myo*-inositol-1-dibenzyl Phosphate (34)

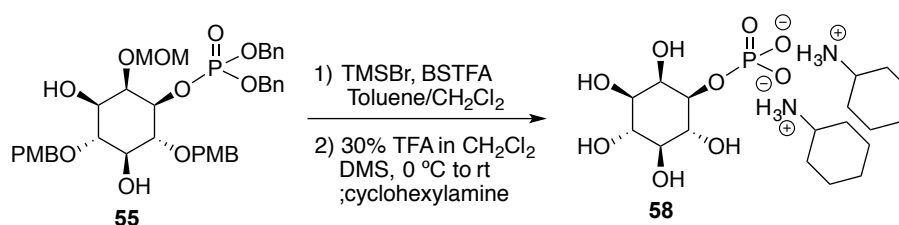
To a suspension of NaH (60% oil dispersion) (35 mg, 0.87 mmol) in THF (2.8 mL) at 0 °C was added benzyl alcohol (100 μ L, 0.96 mmol). After stirring for 30 min, the solution of **54** (297 mg, 0.29 mmol) in THF (3 mL) was added to the reaction at 0 °C. The reaction mixture was warmed up to room temperature, and stirred for 4 h. The reaction was cooled to 0 °C, and then quenched with 10% aqueous citric acid. The mixture was diluted with ethyl acetate. The organic solution was washed with saturated aqueous NaHCO₃ and brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified with column chromatography (toluene/ethyl acetate = 18/1) to afford **34** (175 mg, 63% yield) as a colorless oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.32 – 7.24 (m, 10H), 7.19 – 7.17 (m, 4H), 6.83 – 6.80 (m, 2H), 6.77 – 6.74 (m, 2H), 4.97 – 4.84 (m, 6H), 4.80 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 4.76 – 4.69 (m, 3H), 4.22 – 4.18 (m, 1H), 4.13 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 3.83 – 3.79 (m, 4H), 3.73 (s, 3H), 3.64 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H), 3.51 (dd, *J* = 2.1, 9.6 Hz, 1H), 3.46 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H), 3.40 (s, 3H), 0.81 (s, 9H), 0.78 (s, 9H), –0.03 (s, 3H), –0.05 (s, 3H), –0.07 (s, 3H), –0.13 (s, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 158.8, 158.3, 131.4, 130.9, 129.0, 128.6, 128.5, 128.5, 128.4, 128.0, 127.8, 127.5, 113.4, 113.2, 97.9, 81.8, 80.3, 80.3, 78.2, 78.1, 77.9, 75.1, 75.1, 74.7, 73.5, 69.4, 69.3, 69.1, 69.0, 55.9, 55.2, 26.1, 25.9, 18.1, 18.0, 0.1, –3.8, –3.8, –4.4, –4.8; HRMS (ESI) calculated for C₅₀H₇₃NaO₁₂PSi₂ [M+Na]⁺ 975.4270, found 975.4269



4,6-di-*O*-*p*-methoxybenzyl-2-*O*-methoxymethyl-D-*myo*-inositol-1-dibenzyl Phosphate (55)

To a stirred solution of **34** (55 mg, 57.7 μ mol) in THF (577 μ L) at 40 °C was added TBAF (577 μ L, 0.577 mmol) and AcOH (33 μ L, 0.577 mmol). After the reaction mixture was stirred for 2 h, the reaction was diluted with CHCl₃. Organic phase was washed with H₂O and brine and then filtrated and concentrated

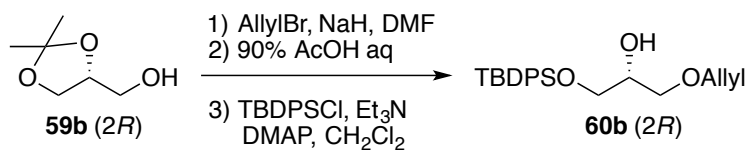
under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography eluting with toluene/ethyl acetate (2/1 to 1/1) to afford **55** (33.5 mg, 80%) as a white solid. ^1H NMR (390 MHz, CDCl_3) δ 7.37-7.22 (m, 14H), 6.90-6.84 (m, 2H), 6.81-6.75 (m, 2H), 5.05-4.96 (m, 4H), 4.83 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 4.74 (dd, J = 10.3, 3.4 Hz, 3H), 4.68 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 4.61 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 4.21 (td, J = 8.1, 2.7 Hz, 1H), 4.12 (t, J = 2.5 Hz, 1H), 3.83-3.75 (m, 4H), 3.73 (s, 3H), 3.53 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 3.49-3.38 (m, 2H), 3.36 (s, 3H), 3.30 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 2.52 (s, 1H); ^{13}C NMR (98 MHz, CDCl_3) δ 159.4, 159.3, 135.7, 130.8, 130.6, 129.9, 129.7, 128.7, 128.7, 128.0, 128.0, 114.0, 113.9, 98.8, 81.1, 80.7, 79.8, 79.8, 77.6, 77.5, 77.1, 76.8, 75.0, 74.6, 71.0, 69.6, 69.6, 69.5, 69.4, 56.0, 55.4, 55.3



D-*myo*-inositol 1-phosphate Dicyclohexylammonium salt (**58**)

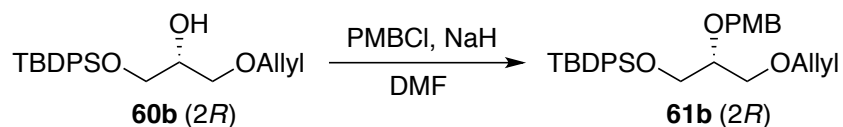
To a stirred solution of **55** (10 mg, 13.8 μmol) in Toluene (300 μL) and CH_2Cl_2 (100 μL) were added BSTFA (36 μL), followed by TMSBr (18 μL). The reaction mixture was stirred for 1 h, and then concentrated under reduced pressure. The residue was dried under highly reduced pressure. To the residue was added CH_2Cl_2 (350 μL) and Me_2S (15 μL) and then cooled to 0 $^\circ\text{C}$. TFA (150 μL) was added to the mixture at 0 $^\circ\text{C}$ and stirred 1 h at room temperature. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The product was purified with Dowex-1X8 (HCO_3^-) anion exchange resin column (eluting with H_2O to 0.1 M NH_4HCO_3 aq to 0.5 M NH_4HCO_3 aq) to afford D-*myo*-inositol 1-phosphate diammonium salt and then acidified with Dowex-50WX8 (H^+). Phosphoric acid was neutralized with cyclohexylammonium (10 μL) and then lyophilized to afford D-*myo*-inositol 1-phosphate dicyclohexylammonium salt (containing cyclohexylammonium salt) **58** (7.78 mg, quant.) as a white solid. ^1H NMR (390 MHz, D_2O) δ 4.07 (t, J = 2.8 Hz, 1H), 3.74 (dt, J = 8.4, 2.8 Hz, 1H), 3.59 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 3.48 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 3.42 (dd, J = 10.0, 2.8 Hz, 1H), 3.18 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 3.04-2.94 (m, 3H), 1.88-1.77 (m, 6H), 1.70-1.59 (m, 6H), 1.54-1.45 (m, 3H), 1.25-1.10 (m, 14H), 1.08-0.95 (m, 3H); ^{13}C NMR (98 MHz, CDCl_3) δ 74.4, 74.3, 72.3, 72.3, 71.7, 70.8, 50.4, 30.3, 24.3, 23.8; $[\alpha]_{\text{D}}^{24} +2.0^\circ$ (c 0.389, H_2O), (lit, $[\alpha]_{\text{D}}^{28} +3.9^\circ$ (c 3.0, H_2O))¹⁾

1) Akiyama, T.; Takechi, N.; Ozaki, S.; Shiota, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1992**, 65, 366.



3-allyl-1-tert-butyldiphenylsilyl-*sn*-glycerol (**60b**)

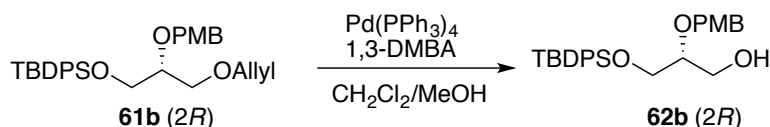
To a stirred solution of (*R*)-(-)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-methanol (2.5 g, 18.9 mmol) in DMF (37 mL) was added NaH (60% oil dispersion) (910 mg, 27.7 mmol). After stirring for 15 min, allyl bromide (2.5 mL, 28.3 mmol) was added to the mixture. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for over night. The mixture was extracted with Et₂O. The combined organic solution was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The residue was directly used in the next step. The residue was dissolved in 90% AcOH aqueous solution (35 mL), and then stirred for over night at 70 °C. The mixture was cooled to room temperature, and then concentrated under reduced pressure with toluene. The crude residue was used in the next step without further purification. To a stirred solution of the crude residue and DMAP (462 mg, 4.16 mmol) in CH₂Cl₂ (95 mL) at room temperature was added Et₃N (13.2 mL, 94.5 mmol) and TBDPSCl (5.3 mL, 20.8 mmol). After stirring for over night, the reaction mixture was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic phase was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The crude mixture was subjected to silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 10/1) to afford **60b** (5.17 g, 73% yield for 3 steps) as a color less oil. ¹H NMR (390 MHz, CDCl₃) δ 7.70-7.62 (m, 4H), 7.47-7.35 (m, 6H), 5.95-5.81 (m, 1H), 5.25 (dd, *J* = 17.2, 1.6 Hz, 1H), 5.18 (dd, *J* = 10.4, 1.0 Hz, 1H), 3.99 (dd, *J* = 5.7, 1.4 Hz, 2H), 3.95-3.86 (m, 1H), 3.72 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.58-3.46 (m, 2H), 2.51 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 1.06 (s, 9H); ¹³C NMR (98 MHz, CDCl₃) δ 135.7, 134.6, 133.3, 130.0, 127.9, 117.3, 72.4, 71.0, 70.9, 64.8, 26.9, 19.4; HRMS (ESI) calculated for C₂₂H₃₀NaO₃Si [M+Na]⁺ 393.1864, found 393.1870



3-allyl-1-tert-butyldiphenylsilyl-2-(4-methoxybenzyl)-*sn*-glycerol (**61b**)

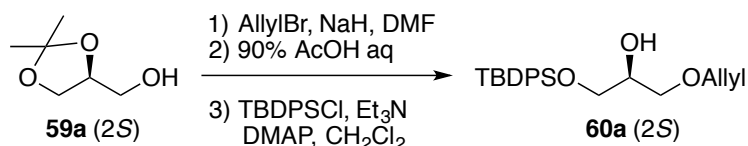
To a stirred solution of **60b** (3.0 g, 8.09 mmol) and PMBCl (1.64 mL, 12.1 mmol) in DMF (40 mL) at 0 °C was added NaH (60% oil dispersion) (390 mg, 9.72 mmol). After stirring for over night at room temperature, the reaction was quenched with ice. The mixture was extracted with Et₂O and the combined organic phase was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 20/1) to afford **61b** (2.11 g, 53% yield) as a color less oil. ¹H NMR (390 MHz, CDCl₃) δ 7.71-7.63 (m, 4H),

7.44-7.32 (m, 6H), 7.24 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.83 (dd, $J = 11.4, 2.7$ Hz, 2H), 5.95-5.83 (m, 1H), 5.29-5.22 (m, 1H), 5.16 (dd, $J = 10.4, 1.3$ Hz, 1H), 4.57 (s, 2H), 3.99 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.78-3.75 (m, 4H), 3.75 (s, 1H), 3.72-3.61 (m, 2H), 3.56 (dd, $J = 9.9, 5.3$ Hz, 1H), 1.05 (s, 9H); ^{13}C NMR (98 MHz, CDCl_3) δ 159.2, 135.8, 135.8, 135.0, 133.7, 133.6, 131.0, 129.8, 129.5, 127.8, 116.9, 113.8, 78.5, 72.5, 72.0, 70.3, 63.7, 55.4, 27.0, 26.7, 19.4; HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{NaO}_4\text{Si}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 513.2432, found 513.2444



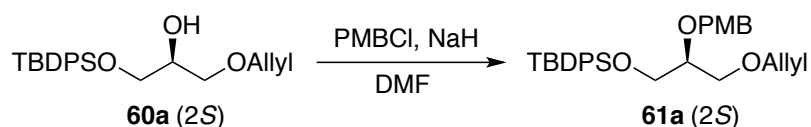
1-tert-butyl-3-(4-methoxybenzyl)-sn-glycerol (**62b**)

To the stirred solution of **61b** (2.00 g, 4.08 mmol) and 1,3-dimethylbarbituric acid (1.27 g, 8.16 mmol) in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1/1) (20 mL) was added $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (94 mg, 81.6 μmol). After the reaction mixture was stirred at 35 °C for over night, the mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was subjected to silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 10:1) to afford **62b** (1.56 g, 85%) as a colorless oil. ^1H NMR (390 MHz, CDCl_3) δ 7.71-7.63 (m, 4H), 7.46-7.33 (m, 6H), 7.20 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.84 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.56 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 4.43 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 3.84-3.55 (m, 8H), 2.14 (dd, $J = 7.1, 5.5$ Hz, 1H), 1.06 (s, 9H); ^{13}C NMR (98 MHz, CDCl_3) δ 159.4, 135.7, 135.7, 133.4, 133.2, 130.5, 129.9, 129.5, 127.9, 114.0, 79.4, 72.0, 63.7, 62.9, 55.4, 27.0, 19.3; HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{NaO}_4\text{Si}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 473.2119, found 473.2127



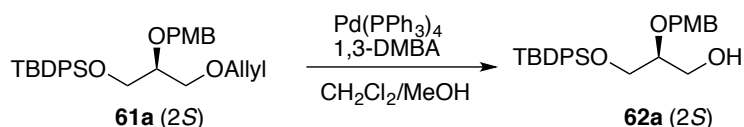
1-allyl-3-tert-butyl-1,3-dioxolane-4-methanol (**60a**)

In a manner similar to the synthesis of **60b**, (*S*)-(+)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolane-4-methanol (10 g, 75.7 mmol) was converted into **60a** (23.7 g, 85% yield for 3 steps) as a colorless oil. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.67 – 7.65 (m, 4H), 7.44 – 7.36 (m, 6H), 5.92 – 5.84 (m, 1H), 5.25 (ddd, $J = 2.5, 7.0, 17$ Hz, 1H), 5.17 (ddd, $J = 1.4, 2.0, 10$ Hz, 1H), 3.99 (ddd, $J = 1.3, 1.3, 5.6$ Hz, 2H), 3.90 – 3.88 (m, 1H), 3.72 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H), 3.35 (td, $J = 4.7, 9.6$ Hz, 2H), 2.51 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 1.06 (s, 9H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 135.6, 134.6, 133.3, 129.9, 127.8, 117.3, 72.4, 71.1, 70.9, 64.9, 50.8, 26.9, 19.3; HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{NaO}_3\text{Si}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 393.1864, found 393.1870



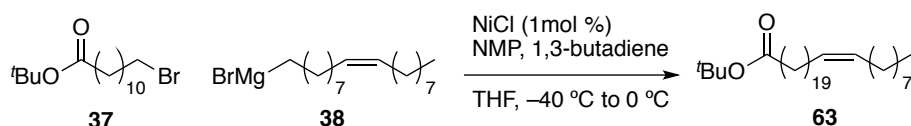
1-allyl-3-*tert*-butyldiphenylsilyl-2-(4-methoxybenzyl)-*sn*-glycerol (**61a**)

In a manner similar to the synthesis of **61b**, **60a** (18.5 g, 50.0 mmol) was converted into **61a** (20 g, 82% yield) as a colorless oil. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.69-7.63 (m, 4H), 7.47-7.32 (m, 6H), 7.26-7.21 (m, 2H), 6.86-6.82 (m, 2H), 5.95-5.82 (m, 1H), 5.29-5.22 (m, 1H), 5.16 (dq, $J = 10.4, 1.5$ Hz, 1H), 4.56 (d, $J = 1.3$ Hz, 2H), 4.03-3.95 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.77-3.61 (m, 4H), 3.55 (dd, $J = 10.1, 5.5$ Hz, 1H), 1.04 (s, 9H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 159.2, 135.7, 135.7, 135.6, 135.0, 129.7, 129.4, 127.9, 127.8, 116.8, 113.8, 78.5, 72.4, 72.0, 70.3, 63.6, 55.4, 26.9, 19.3; HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{NaO}_4\text{Si}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 513.2432, found 513.2443



3-*tert*-butyldiphenylsilyl-2-(4-methoxybenzyl)-*sn*-glycerol (**62a**)

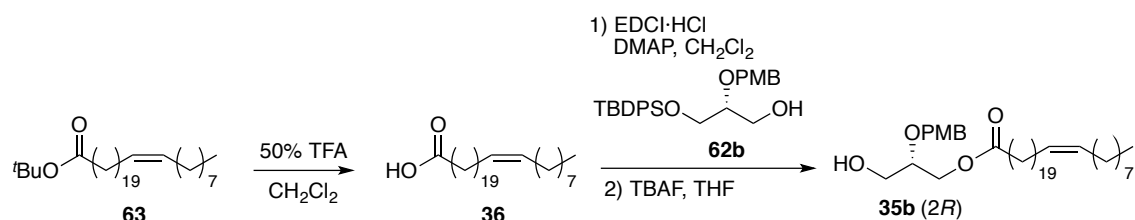
In a manner similar to the synthesis of **62b**, **61a** (1.14 g, 2.30 mmol) was converted into **62a** (0.88 g, 85% yield) as a colorless oil. ^1H NMR (390 MHz, CDCl_3) δ 7.67 (dt, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 4H), 7.48-7.33 (m, 6H), 7.23-7.16 (m, 2H), 6.88-6.81 (m, 2H), 4.56 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 4.44 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 3.83-3.74 (m, 5H), 3.74-3.56 (m, 3H), 2.03 (dd, $J = 7.2, 5.5$ Hz, 1H), 1.05 (s, 9H); ^{13}C NMR (98 MHz, CDCl_3) δ 159.4, 135.7, 135.7, 135.6, 133.3, 133.2, 130.5, 129.9, 129.5, 127.8, 114.0, 79.3, 71.9, 63.6, 63.0, 55.4, 26.9, 19.3; HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{NaO}_4\text{Si}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 473.2119, found 473.2124



tert-butyl *cis*-21-triacontenoate (**63**)

To a stirred solution of LiAlH_4 (2.16 g, 57.0 mmol) in THF (50 mL) at 0°C was added the solution of Oleic acid (12 mL, 38.0 mmol) in THF (12 mL) dropwise over a period of 15 min. The mixture was allowed to warm to room temperature, and stirred for 18 h. The reaction mixture was quenched with H_2O (2 mL), 15% aqueous NaOH (2 mL), and H_2O (6 mL). Then, it was allowed to stir for 1 h. The mixture was filtrated through a pad of celite, concentrated under reduced pressure. The crude oil was directly used for the next step. To the crude oil and CBr_4 (20.2 g, 60.8 mmol) in CH_2Cl_2 (70 mL) at room temperature

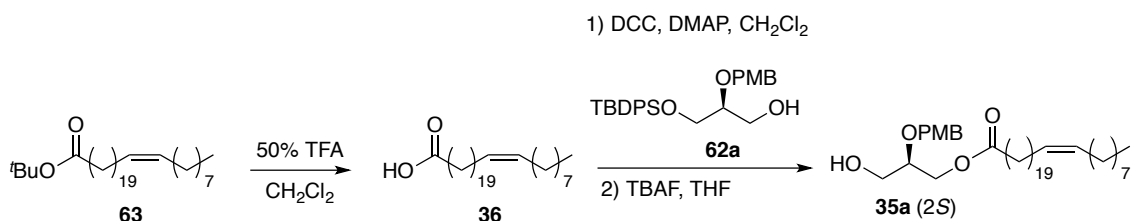
was added the solution of PPh₃ (19.9 g, 76.0 mmol) in THF (30 mL). After stirring for 14 h, solvent was removed under reduced pressure. Hexane was added to the mixture, and removed triphenylphosphineoxide by filtration. The mixture was concentrated *in vacuo*. The crude material was subjected to silica gel column chromatography (Hexane only) to afford alkylbromide (11.2 g, 89% yield for 2 steps) as a colorless oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.38 – 5.31 (m, 2H), 3.40 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.01 (dt, *J* = 6.3, 12 Hz, 4H), 1.89 – 1.82 (m, 2H) 1.44 – 1.39 (m, 2H), 1.36 – 1.27 (m, 20H), 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H). To a stirred solution of alkylbromide (928 mg, 2.80 mmol) were added Mg (146 mg, 6.00 mmol) and a piece of I₂ in THF (2 mL), then heated to reflux temperature. After stirring for 30 min, grignard reagent **3** was cooled to –40 °C. The solution of **37** (671 mg, 2.00 mmol) and NMP (193 μL) in THF (2 mL) was added to the mixture, followed by 1,3-butadiene (44.8 mL) and NiCl₂ (2.6 mg). The mixture was allowed to warm to 0 °C, and stirred for 2 h. The reaction mixture was quenched with saturated aqueous NH₄Cl. AcOEt was added to the mixture, and washed with saturated aqueous NH₄Cl (x3), brine (x2). The organic solution was dried over anhydrous Na₂SO₄, concentrated under reduced pressure. The crude oil was subjected to silica gel column chromatography (Hexane/EtOAc = 30/1) to afford **63** (651 mg, 64% yield) as a white solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.35 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H), 2.20 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.01 (dd, *J* = 12.5, 6.8 Hz, 4H), 1.61–1.53 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.38–1.19 (m, 44H), 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 173.4, 130.0, 79.9, 35.7, 32.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.7, 29.7, 29.6, 29.6, 29.4, 29.2, 28.2, 27.3, 25.2; HRMS (ESI) calculated for C₃₄H₆₆NaO₂ [M+Na]⁺ 529.4955, found 529.4965



2-(4-methoxybenzyl)-3-(*cis*-21-triacontenyl)-*sn*-glycerol (**35b**)

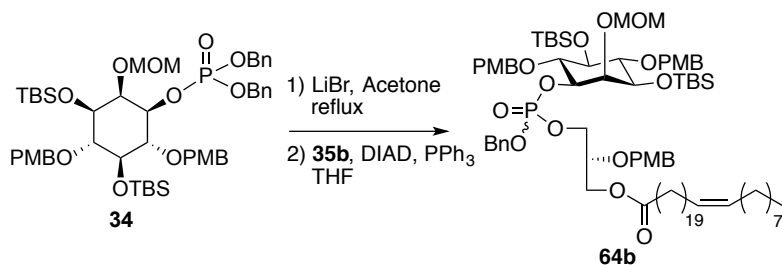
63 (75 mg, 0.15 mmol) was dissolved with TFA (0.75 mL) and CH₂Cl₂ (0.75 mL) at room temperature, and stirred for 1 h. To the mixture was added toluene, and concentrated under reduced pressure. This operation was repeated 3 times. The crude acid **36** was directly used for the next step. To a stirred solution of crude material, **62b** (100 mg, 0.22 mmol) and DMAP (15 mg, 0.12 mmol) in CH₂Cl₂ (6 mL) was added EDCI·HCl (71 mg, 0.37 mmol). After stirring for over night at reflux, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was subjected to silica gel column chromatography (Hex/EtOAc = 20/1) to afford ester (**35b**) (64 mg, 49%) as a colorless oil. To a stirred solution of ester in THF

(1.26 mL) was added TBAF (252 μ L, 0.25 mmol) at room temperature. After stirring for over night, the solvent was removed under reduced pressure. The crude mixture was subjected to silica gel column chromatography (Toluene/ethyl acetate = 5/1 to 4/1) to afford **35b** (70.5 mg, 80% yield) as a white solid. ^1H NMR (390 MHz, CDCl_3) δ 7.30-7.24 (m, 2H), 6.91-6.85 (m, 2H), 5.35 (t, J = 4.6 Hz, 2H), 4.65 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 4.52 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 4.21 (d, J = 4.9 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.71-3.64 (m, 2H), 3.60 (dd, J = 12.6, 7.0 Hz, 1H), 2.32 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.06-1.96 (m, 4H), 1.61 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 1.37-1.20 (m, 44H), 0.88 (t, J = 6.7 Hz, 3H); ^{13}C NMR (98 MHz, CDCl_3) δ 173.9, 159.5, 130.5, 130.0, 129.6, 114.0, 76.9, 71.9, 62.8, 62.1, 55.4, 34.3, 32.0, 29.9, 29.8, 29.8, 29.7, 29.7, 29.6, 29.6, 29.4, 29.4, 29.3, 27.3, 25.0, 22.8, 14.2; HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{41}\text{H}_{72}\text{NaO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 667.5752, found 667.5292



2-(4-methoxybenzyl)-1-(*cis*-21-triacontenyl)-*sn*-glycerol (**35a**)

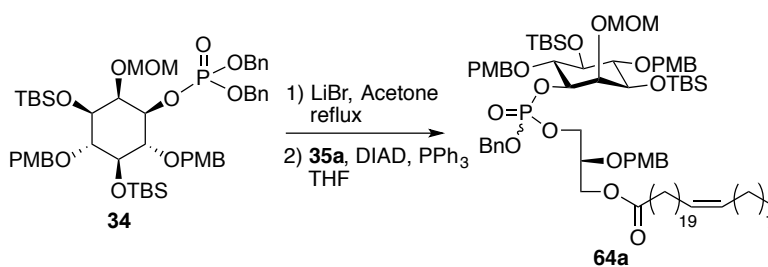
In a manner similar to the synthesis of **35b**, **63** (174 mg, 0.34 mmol) was converted into **35a** (177 mg, 79% yield) as a white solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.28 – 7.25 (m, 2H), 6.89 – 6.86 (m, 2H), 5.38 – 5.31 (m, 2H), 4.64 (d, J = 11 Hz, 1H), 4.52 (d, J = 11 Hz, 1H), 4.21 (d, J = 5.0 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.70 – 3.65 (m, 2H), 3.62 – 3.59 (m, 1H), 2.31 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.03 – 1.98 (m, 4H), 1.65 – 1.59 (m, 2H), 1.34 – 1.25 (m, 44H), 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 173.9, 159.5, 130.0, 130.0, 129.6, 114.0, 71.9, 62.8, 62.1, 55.4, 34.3, 32.0, 29.9, 29.8, 29.8, 29.7, 29.7, 29.6, 29.6, 29.4, 29.4, 29.2, 27.3, 25.0, 22.8, 14.2; HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{41}\text{H}_{72}\text{NaO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 667.5272, found 667.5286



3,5-di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-4,6-di-*O*-4-methoxybenzyl-2-(4-methoxybenzyl)-3-*O*-((*cis*-21-triacontenyl)-*sn*-glycerol-3-benzylphosphate)-2-*O*-methoxymethyl-*D*-*myo*-inositol (**64b**)

To a stirred solution of **34** (120 mg, 0.13 mmol) in Acetone (4 mL) was added LiBr (33 mg, 0.38 mmol). The reaction mixture was refluxed for over night. The mixture was cooled to ambient temperature, and

then concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography eluting with toluene/EtOAc (1:1) to CH₂Cl₂/MeOH (6:1) to afford lithium salt. The salt was passed through the cation exchange resin column (Dowex 50WX8 50-100) to obtain acid form. Fractions containing the desire product was collected and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved with THF (1.0 mL). **35b** (60 mg, 93.0 μmol), PPh₃ (73 mg, 0.28 mmol) was added to the solution. To the mixture was added DIAD (55 μL, 0.28 mmol). After stirring for over night, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column eluted with toluene/EtOAc (5:1) to afford **64b** (43.6 mg, 31%) as a colorless oil. ¹H NMR (390 MHz, CDCl₃) δ 7.35-7.26 (m, 6H), 7.23-7.11 (m, 5H), 6.85-6.71 (m, 6H), 5.34 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H), 5.03-4.67 (m, 8H), 4.53-4.36 (m, 2H), 4.33-3.84 (m, 6H), 3.84-3.75 (m, 7H), 3.75-3.69 (m, 3H), 3.67-3.58 (m, 2H), 3.57-3.44 (m, 2H), 3.44-3.35 (m, 3H), 2.28-2.16 (m, 2H), 2.01 (dd, *J* = 12.0, 6.4 Hz, 4H), 1.60-1.52 (m, 2H), 1.37-1.19 (m, 44H), 0.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.81 (s, 9H), 0.79 (s, 9H), 0.00-0.04 (m, 3H), -0.06 (d, *J* = 3.3 Hz, 6H), -0.11-0.18 (m, 3H); ¹³C NMR (98 MHz, CDCl₃) δ 173.5, 159.4, 158.8, 158.2, 131.4, 130.9, 130.0, 129.9, 129.5, 129.4, 129.2, 129.1, 129.0, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.3, 128.0, 127.8, 127.4, 125.4, 113.9, 113.5, 113.2, 97.8, 81.9, 80.3, 80.3, 78.2, 77.9, 77.8, 77.7, 75.1, 74.8, 74.8, 74.7, 73.4, 71.7, 55.9, 55.3, 34.2, 32.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.6, 29.6, 29.4, 29.4, 29.3, 29.2, 27.3, 26.1, 26.0, 25.0, 22.8, 21.6, 18.1, 14.2, -3.8, -4.3, -4.8; HRMS (ESI) calculated for C₈₄H₁₃₇NaO₁₆PSi₂ [M+Na]⁺ 1511.9075, found 1511.9075

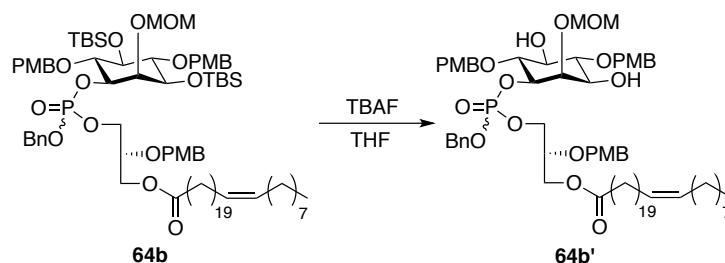


3,5-di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-4,6-di-*O*-4-methoxybenzyl-2-(4-methoxybenzyl)

-3-*O*-((*cis*-21-triacontenyl)-*sn*-glycerol-1-benzylphosphate)-2-*O*-methoxymethyl-D-*myo*-inositol (**64a**)

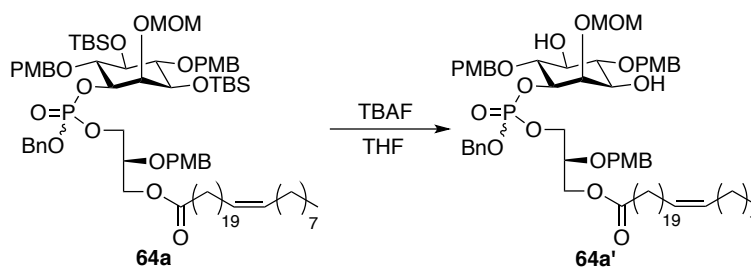
In a manner similar to the synthesis of **65b**, **34** (250 mg, 0.26 mmol) was converted into **64a** (299 mg, 81%) as a colorless oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.35-7.26 (m, 6H), 7.23-7.10 (m, 5H), 6.85-6.73 (m, 6H), 5.40-5.28 (m, 2H), 5.04-4.65 (m, 8H), 4.53-4.34 (m, 2H), 4.32-3.85 (m, 6H), 3.84-3.75 (m, 7H), 3.75-3.70 (m, 3H), 3.67-3.57 (m, 2H), 3.58-3.44 (m, 2H), 3.43-3.35 (m, 3H), 2.28-2.17 (m, 2H), 2.07-1.92 (m, 4H), 1.57-1.50 (m, 2H), 1.37-1.18 (m, 44H), 0.87 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.81 (s, 9H), 0.79 (s, 9H), 0.03-0.01 (m, 3H), -0.03-0.10 (m, 6H), -0.10-0.17 (m, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 173.4, 159.4, 158.8, 158.3, 131.4, 130.9, 130.5, 130.0, 129.9, 129.5, 129.3, 129.0, 128.9, 128.8, 128.8, 128.6,

128.6, 127.9, 127.8, 127.5, 113.8, 113.5, 113.2, 97.8, 81.9, 75.1, 75.0, 74.7, 73.5, 55.9, 55.3, 55.2, 34.2, 32.0, 29.9, 29.8, 29.8, 29.7, 29.6, 29.4, 27.3, 26.1, 25.9, 25.0, 22.8, 18.1, 14.2, -3.8, -4.3, -4.8; HRMS (ESI) calculated for $C_{84}H_{137}NaO_{16}PSi_2$ $[M+Na]^+$ 1511.9075, found 1511.9075



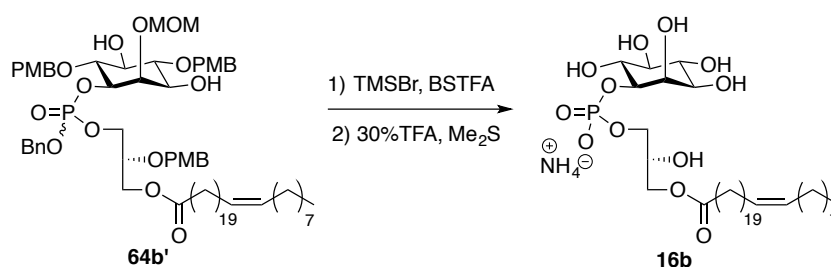
4,6-di-*O*-4-methoxybenzyl-2-(4-methoxybenzyl-3-*O*-((*cis*-21-triacontenyl)-*sn*-glycerol-3-benzylphosphate)-2-methoxymethyl-D-*myo*-inositol (64b')

To a stirred solution of **64a** (43.6 mg, 29.2 μ mol) in THF (600 μ L) at 35 $^{\circ}$ C was added TBAF (293 μ L, 29.3 μ mol) and AcOH (17 μ L, 29.2 μ mol). After the reaction mixture was stirred for 4.5 h, TBAF (293 μ L, 29.3 μ mol) was added and then stirred at 40 $^{\circ}$ C for 5 h. To the mixture was added another TBAF (586 μ L, 58.6 μ mol) and stirred for 5h. The reaction was concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography eluting with toluene/ethyl acetate (2/1) to afford **64b'** (32.6 mg, 88%) as a colorless oil. 1H NMR (390 MHz, $CDCl_3$) δ 7.37-7.23 (m, 9H), 7.23-7.14 (m, 2H), 6.91-6.85 (m, 2H), 6.84-6.76 (m, 4H), 5.40-5.27 (m, 2H), 5.07-4.96 (m, 2H), 4.87-4.79 (m, 1H), 4.79-4.60 (m, 5H), 4.51-4.43 (m, 2H), 4.29-3.95 (m, 6H), 3.81-3.62 (m, 11H), 3.58-3.48 (m, 1H), 3.48-3.30 (m, 5H), 2.30-2.19 (m, 2H), 2.06-1.93 (m, 4H), 1.63-1.49 (m, 2H), 1.38-1.20 (m, 44H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H); ^{13}C NMR (98 MHz, $CDCl_3$) δ 173.6, 159.4, 159.3, 135.8, 135.8, 130.8, 130.6, 130.0, 129.8, 129.6, 129.6, 129.5, 128.7, 128.7, 128.0, 114.0, 113.9, 98.8, 81.0, 80.6, 80.6, 80.5, 80.5, 79.8, 79.7, 77.5, 77.1, 76.8, 75.0, 75.0, 74.9, 74.8, 74.8, 74.6, 71.8, 71.0, 71.0, 69.7, 69.9, 69.5, 66.5, 66.4, 66.4, 66.3, 62.4, 56.0, 55.3, 34.2, 32.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.6, 29.4, 29.3, 27.3, 25.0, 22.8, 14.2; HRMS (ESI) calculated for $C_{72}H_{109}NaO_{16}P$ $[M+Na]^+$ 1283.7345, found 1283.7374



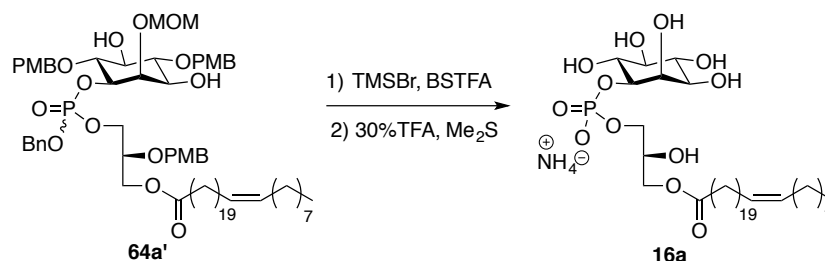
4,6-di-*O*-4-methoxybenzyl-2-(4-methoxybenzyl-3-*O*-((*cis*-21-triacontenyl)-*sn*-glycerol-1-benzylphosphate)-2-methoxymethyl-D-*myo*-inositol (64a')

In a manner similar to the synthesis of **64b'**, **64a** (289 mg, 0.19 μmol) was converted into **64a'** (205.4 mg, 84%) as a colorless oil. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.35-7.26 (m, 6H), 7.23-7.10 (m, 5H), 6.85-6.73 (m, 6H), 5.40-5.28 (m, 2H), 5.04-4.65 (m, 8H), 4.53-4.34 (m, 2H), 4.32-3.85 (m, 6H), 3.84-3.75 (m, 7H), 3.75-3.70 (m, 3H), 3.67-3.57 (m, 2H), 3.58-3.44 (m, 2H), 3.43-3.35 (m, 3H), 2.28-2.17 (m, 2H), 2.07-1.92 (m, 4H), 1.57-1.50 (m, 2H), 1.37-1.18 (m, 44H), 0.87 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.81 (s, 9H), 0.79 (s, 9H), 0.03-0.01 (m, 3H), -0.03-0.10 (m, 6H), -0.10-0.17 (m, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 173.5, 159.4, 159.3, 135.8, 130.8, 130.7, 130.5, 130.0, 129.8, 129.6, 129.6, 129.6, 129.5, 129.1, 128.7, 128.7, 128.3, 128.0, 128.0, 125.4, 114.0, 113.9, 98.7, 81.1, 80.6, 80.5, 79.8, 79.7, 79.2, 77.6, 74.9, 74.9, 74.9, 74.8, 74.8, 74.6, 74.5, 71.8, 71.8, 71.1, 71.0, 69.7, 65.5, 62.4, 62.4, 56.0, 55.4, 55.3, 34.2, 32.7, 32.0, 29.9, 29.8, 29.8, 29.7, 29.6, 29.4, 29.3, 27.3, 24.9, 22.8, 14.2; HRMS (ESI) calculated for $\text{C}_{72}\text{H}_{109}\text{NaO}_{16}\text{P}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1283.7345, found 1283.7345

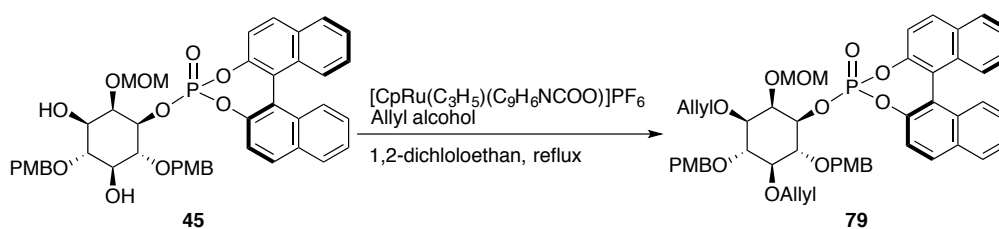


16b: To a stirred solution of **64b'** (5 mg, 3.90 μmol) in Toluene (200 μL) was added BSTFA (31 μL), followed by TMSBr (120 μL). The reaction mixture was stirred for 3.5h, and then concentrated under reduced pressure. To the residue was added MeOH and stirred for 30 min. The mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was dried under highly reduced pressure. To the residue was added CH_2Cl_2 (350 μL) and Me_2S (14 μL) and then cooled to 0 $^\circ\text{C}$. TFA (150 μL) was added to the mixture at 0 $^\circ\text{C}$ and stirred for 5 min and then stirred for 30 min at room temperature. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The product was purified with silica gel column chromatography eluting with $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/2.2\text{M NH}_4\text{OH}$ (25 : 10 : 2) to afford **16a** (1.32 mg, 43% for 2 steps) as a white solid (ammonium salt). ^1H NMR (390 MHz, $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O} = 25:10:2$) δ 5.25-5.27 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$), 4.13 (s, 1H, ino-2), 3.97-4.08 (m, 2H, gly-1x2), 3.79-3.94 (m, 4H, ino-1, gly-2, gly-3x2), 3.65 (t, 1H, $J = 9.6$ Hz, ino-6), 3.53 (t, 1H, $J = 9.6$ Hz, ino-4), 3.35-3.38 (m, 1H, ino-3), 3.17 (t, 1H, $J = 9.0$ Hz, ino-5), 2.26 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, $-\text{COCH}_2-$), 1.91-1.96 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$), 1.49-1.54 (m, 2H, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2-$), 1.17-1.28 (m, 46H, $-\text{CH}_2-$), 0.79 (t, 3H, $J = 5.6$ Hz, $-\text{CH}_3$); ^{13}C NMR (98 MHz, $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O} = 25:10:2$) δ 174.7, 129.8, 76.2, 74.1, 72.3, 71.5, 71.2, 68.5, 66.6, 64.9, 49.0, 48.8, 48.6, 48.4, 48.2, 47.9, 47.7, 33.8, 31.8, 29.7, 29.6, 29.4, 29.4, 29.3, 29.2, 29.2, 29.1, 29.1, 27.0, 24.7, 22.5, 13.8; ^{31}P NMR (158 MHz, $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O} = 25:10:2$) δ 0.027; HRMS (ESI) calculated

for $C_{39}H_{74}O_{12}P$ $[M-H]^-$ 765.4923, found 765.4941



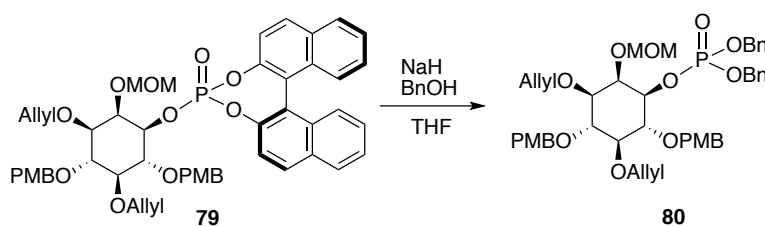
16a: In a manner similar to the synthesis of **16b**, **64a'** (103 mg, 81.6 μ mol) was converted into **16b** (19.7 mg, 31% for 2 steps) as a white solid (ammonium salt). 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3:CD_3OD:D_2O = 5:5:1$) δ 5.25-5.29 (m, 2H, $-CH_2CH=CHCH_2-$), 4.14 (s, 1H, ino-2), 4.05-4.08 (m, 1H, gly-3), 4.00-4.02 (m, 1H, gly-3), 3.88-3.93 (m, 2H, ino-1, gly-2), 3.83 (m, 2H, gly-1), 3.66 (t, 1H, $J = 9.4$ Hz, ino-6), 3.54 (t, 1H, $J = 9.5$ Hz, ino-4), 3.36 (dd, 1H, $J = 10.0, 2.6$ Hz, ino-3), 3.16 (t, 1H, $J = 9.4$ Hz, ino-5), 2.26 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, $-COCH_2-$), 1.91-1.96 (m, 4H, $-CH_2CH=CHCH_2-$), 1.51 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz, $-COCH_2CH_2-$), 1.17-1.24 (m, 46H, $-CH_2-$), 0.79 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, $-CH_3$); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3:CD_3OD:D_2O = 5:5:1$) δ 174.0, 129.6, 129.0, 75.8, 73.7, 71.8, 71.0, 70.7, 70.4, 67.9, 65.9, 64.3, 48.9, 48.0, 33.1, 31.6, 31.0, 29.7, 28.8, 28.8, 28.6, 28.5, 28.4, 28.4, 28.3, 28.3, 26.2, 24.3, 23.9, 21.7, 12.9; ^{31}P NMR (242 MHz, $CDCl_3:CD_3OD:D_2O = 5:5:1$) δ 1.57; HRMS (ESI) calculated for $C_{39}H_{74}O_{12}P$ $[M-H]^-$ 765.4923, found 765.4941



3,5-di-*O*-allyl-4,6-di-*O*-*p*-methoxybenzyl-2-*O*-methoxymethyl-*D*-*myo*-inositol-1-((*R*)-1,1'-bi-2-naphthyl) Phosphate (**79**)

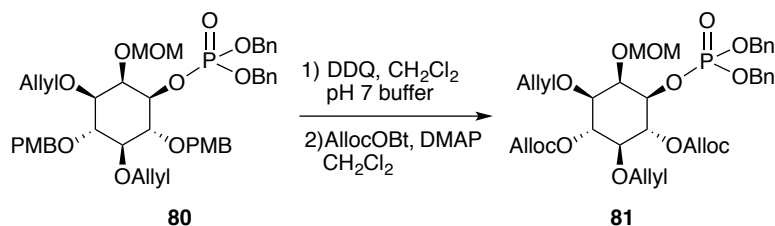
The solution of **45** (2.82 g, 2.93 mmol), allyl alcohol (810 μ L, 11.7 mmol), and $[CpRu(C_3H_5)C_9H_6NCOO]PF_6$ in 1,2-dichloroethane (2.9 mL) was heated to reflux and stirred for 9 h. The reaction mixture was cooled to room temperature and the solvent was removed under reduced pressure. The crude mixture was purified with silica gel column chromatography (toluene/ethyl acetate = 5.5/1) to afford **79** (1.06 g, 41% yield) as a white foam. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.91-8.01 (m, 4H), 7.42-7.55 (m, 4H), 7.23-7.36 (m, 6H), 6.82-6.87 (m, 4H), 6.50-6.52 (m, 2H), 5.89-6.00 (m, 2H), 5.32-5.36 (m, 1H), 5.23-5.30 (m, 1H), 5.19 (dd, 1H, $J = 10.5, 1.4$ Hz), 5.14 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz),

4.90-4.94 (m, 1H), 4.78-4.82 (m, 2H), 4.68 (d, 1H, $J = 10.1$ Hz), 4.50-4.56 (m, 3H), 4.23-4.36 (m, 4H), 4.08-4.13 (m, 1H), 3.78-3.89 (m, 5H), 3.69 (s, 3H), 3.51 (s, 3H), 3.23-3.33 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 159.35, 158.95, 147.72, 147.60, 146.51, 135.23, 134.63, 132.38, 132.27, 131.98, 131.74, 130.94, 130.41, 130.02, 129.41, 129.34, 126.97, 125.96, 121.52, 121.34, 120.88, 117.04, 116.60, 113.90, 113.55, 97.66, 82.53, 80.98, 80.23, 80.16, 79.52, 79.28, 75.78, 75.36, 74.69, 73.68, 71.54, 56.16, 55.39, 55.33; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{51}\text{NaO}_{12}\text{P}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 897.3010; found: 897.3023



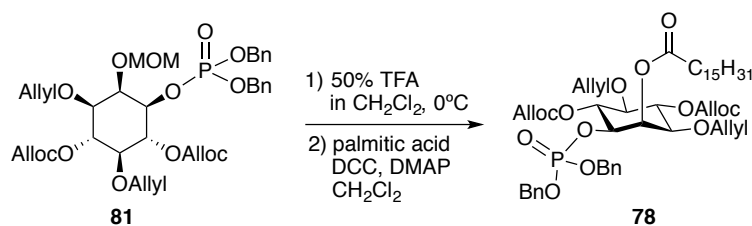
3,5-di-*O*-allyloxy-4,6-di-*O*-*p*-methoxybenzyl-2-methoxymethyl-D-*myo*-inositol-1-dibenzylphosphate (80)

To a suspension of NaH (60% oil dispersion) (100 mg, 2.52 mmol) in THF (16.8 mL) at 0 °C was added benzyl alcohol (288 μL , 2.77 mmol). After stirring for 30 min, the solution of **79** (734 mg, 0.84 mmol) in THF (6 mL) was added to the reaction at 0 °C. The reaction mixture was warmed up to room temperature, and stirred for 1.5 h. The reaction was cooled to 0 °C, and then quenched with 10% aqueous citric acid. The mixture was diluted with ethyl acetate. The organic solution was washed with saturated aqueous NaHCO_3 and brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 , and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified with column chromatography (toluene/ethyl acetate = 5/1) to afford **80** (548 mg, 81% yield) as a colorless oil. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.20-7.34 (m, 14H), 6.83-6.87 (m, 2H), 6.75-6.77 (m, 2H), 5.84-5.99 (m, 2H), 5.24-5.30 (m, 2H), 5.11-5.17 (m, 2H), 4.92-5.05 (m, 4H), 4.76-4.80 (m, 4H), 4.66-4.71 (m, 2H), 4.32 (dddt, 2H, $J = 28.1, 12.4, 5.5, 1.4$ Hz), 4.26 (t, 1H, $J = 2.4$ Hz), 4.05-4.14 (m, 2H), 3.98 (ddt, 1H, $J = 12.6, 5.3, 1.5$ Hz), 3.90 (t, 1H, $J = 9.6$ Hz), 3.83 (t, 1H, $J = 9.6$ Hz), 3.79 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.40 (s, 3H), 3.25 (t, 1H, $J = 9.2$ Hz), 3.16 (dd, 1H, $J = 9.9, 2.4$ Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 154.36, 134.31, 133.92, 131.61, 131.46, 128.68, 128.64, 128.00, 127.94, 119.08, 119.03, 117.34, 117.16, 97.49, 78.21, 77.36, 77.10, 76.85, 76.70, 76.32, 75.39, 75.35, 73.70, 72.68, 71.05, 69.62, 69.56, 68.77, 68.72, 56.01; HRMS (ESI-QTOF) calculated for $\text{C}_{44}\text{H}_{53}\text{NaO}_{12}\text{P}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 827.3167, found 827.3189



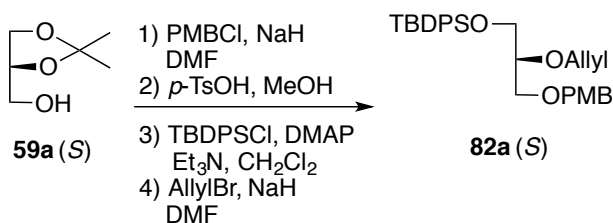
3,5-di-*O*-allyloxy-2-methoxymethyl-D-*myo*-inositol-1-dibenzylphosphate (**81**)

To a stirred suspension of **80** (124 mg, 0.15 mmol) in CH₂Cl₂ (6.8 mL) and pH 7 buffer (760 μL) was added DDQ (140 mg, 0.62 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 6 h and then quenched with saturated aqueous NaHCO₃. H₂O was added to the mixture and extracted with CH₂Cl₂ 3 times. The combined organic phase was washed with brine and dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography eluting with Toluene/ ethylacetate (1/1) to afford 4,6-diol (60.8 mg, 70% yield) as a white solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.36 – 7.34 (m, 10H), 6.01 – 5.84 (m, 2H), 5.33 – 5.24 (m, 2H), 5.20 – 5.17 (m, 2H), 5.14 – 5.04 (m, 4H), 4.66 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 4.37 (tq, *J* = 12.7, 1.43 Hz, 2H), 4.17 – 4.10 (m, 3H), 4.00 (dt, *J* = 9.3, 3.0 Hz, 1H), 3.95 - 3.89 (m, 2H), 3.33 (s, 3H), 3.13 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H), 3.07 (dd, *J* = 9.9, 2.3 Hz, 1H), 2.82 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 2.51 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 135.2, 134.1, 128.7, 128.7, 128.1, 128.1, 117.9, 117.2, 97.4, 82.1, 78.7, 78.6, 73.9, 72.7, 71.9, 71.9, 71.0, 69.9, 69.6, 55.8 HRMS (ESI-QTOF) calculated for C₂₈H₃₇NaO₁₀P [M+Na]⁺ 587.2017, found 587.2039. To a solution of AllocOBT (863 mg, 3.94 mmol) and DMAP (300 mg, 2.46 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was added 4,6-diol (278 mg, 0.49 mmol). The reaction mixture was stirred for 6 h, and then quenched with saturated 10% aqueous citric acid. The reaction mixture was diluted with dichloromethane, and the solution was washed with saturated aqueous NaHCO₃ and brine. The organic solution was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified with column chromatography elution with toluene/ethyl acetate (5/1) to afford **81** (333 mg, 92% yield) as a colorless oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.30-7.36 (m, 10H), 5.89-5.97 (m, 1H), 5.75-5.85 (m, 3H), 5.32-5.38 (m, 2H), 5.22-5.30 (m, 4H), 5.10-5.21 (m, 4H), 5.03 (dd, 4H, *J* = 7.9, 2.7 Hz), 4.73 (s, 2H), 4.65 (dt, 2H, *J* = 5.8, 1.3 Hz), 4.57 (ddt, 1H, *J* = 13.0, 5.7, 1.4 Hz), 4.40 (ddt, 1H, *J* = 13.0, 5.9, 1.4 Hz), 4.26-4.31 (m, 2H), 4.06-4.13 (m, 3H), 3.86 (ddt, 1H, *J* = 12.9, 5.5, 1.5 Hz), 3.43 (t, 1H, *J* = 9.5 Hz), 3.36 (s, 3H), 3.26 (dd, 1H, *J* = 10.1, 2.2 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 154.36, 134.31, 133.92, 131.61, 131.46, 128.68, 128.64, 128.00, 127.94, 119.08, 119.03, 117.34, 117.16, 97.49, 78.21, 77.36, 77.10, 76.85, 76.70, 76.32, 75.39, 75.35, 73.70, 72.68, 71.05, 69.62, 69.56, 68.77, 68.72, 56.01; HRMS (ESI-QTOF) calculated for C₃₆H₄₅NaO₁₄P [M+Na]⁺ 755.2439, found 755.2447



3,5-di-*O*-allyloxy-4,6-di-*O*-allyloxycarbonyl-2-palmitoyl-D-*myo*-inositol-1-dibenzyl phosphate (**78**)

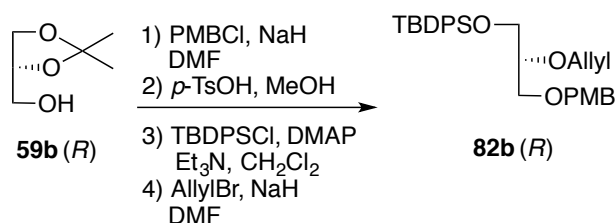
The solution of **81** (100 mg, 0.14 mmol) in CH₂Cl₂ (6.8 mL) was cooled to 0 °C. To the solution was added trifluoroacetic acid 6.8 mL) at 0 °C and stirred for 1h. The solvent removed under reduced pressure and added toluene then concentrated *in vacuo*. The residue was dried under highly vacuum and used for next step without further purification. The residue and palmitic acid (174 mg, 0.68 mmol) and DMAP (16.6 mg, 0.14 mmol) were dissolved with CH₂Cl₂ (1 mL) at room temperature. To the stirred mixture was added DCC (130 mg, 0.68 mmol) and stirred for over night. The mixture was filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography eluting with Toluene/ ethyl acetate (20/1 to 10/1) to afford **78** (84.7 mg, 67% yield) as colorless oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.28-7.35 (m, 10H), 5.93 (ddd, 1H, *J* = 22.7, 10.8, 5.6 Hz), 5.71-5.84 (m, 4H), 5.36 (dd, 1H, *J* = 17.3, 1.3 Hz), 5.23-5.30 (m, 4H), 5.10-5.19 (m, 5H), 4.95-5.05 (m, 4H), 4.66 (d, 2H, *J* = 5.8 Hz), 4.50-4.57 (m, 2H), 4.31 (dd, 1H, *J* = 13.0, 5.8 Hz), 4.08-4.18 (m, 5H), 3.86 (dd, 1H, *J* = 12.8, 5.8 Hz), 3.43-3.51 (m, 2H), 2.31-2.43 (m, 2H), 1.56-1.64 (m, 2H), 1.23-1.30 (m, 24H), 0.88 (t, 3H, *J* = 6.8 Hz); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 177.85, 172.75, 171.27, 154.33, 154.28, 135.65, 135.59, 134.11, 133.72, 131.50, 131.34, 128.58, 128.53, 128.32, 127.93, 127.74, 119.18, 119.13, 117.70, 117.51, 77.95, 77.46, 77.14, 76.81, 76.18, 74.69, 74.23, 73.78, 70.86, 69.59, 69.44, 68.86, 68.82, 67.68, 60.51, 34.22, 33.99, 32.03, 29.81, 29.79, 29.58, 29.47, 29.38, 29.22, 29.09, 25.07, 24.89, 22.79, 21.15, 14.29, 14.23; HRMS (ESI-QTOF) calculated for C₅₀H₇₁NaO₁₄P [M+Na]⁺ 949.4477, found 949.4511



2-allyl-3-*tert*-butyldiphenylsilyl-1-(4-methoxybenzyl)-*sn*-glycerol (**82a**)

To a stirred solution of (*S*)-(+)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-methanol (**59a**) (10 g, 75.7 mmol) in DMF (200 mL) were added NaH (60% oil dispersion) (4.5 g, 0.11 mol) and then PMBCl (12.4 mL, 91.0 mmol) and the mixture was stirred for 4 h. The reaction was quenched with MeOH and the mixture was

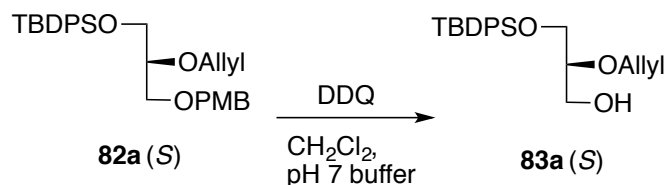
extracted with CH₂Cl₂. The extract was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. To the solution of the residue in MeOH (200 mL) was added *p*-toluene sulfonic acid monohydrate (700 mg, 3.68 mmol). After stirring for 1 h, the reaction was quenched by addition of NaHCO₃ (1 g) and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 1/3) to afford diol (7.9 g, 50% yield, for 2 steps) as a colorless oil. To a stirred solution of the diol (7.9 g, 41.9 mmol), Et₃N (26 mL, 0.19 mol), and DMAP (590 g, 4.83 mmol) in CH₂Cl₂ (74 mL) was added TBDPSCl (11 mL, 42.8 mmol). After stirring for over night, the reaction was extracted with CH₂Cl₂. The extract was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 5/1) to afford *sn*-2 alcohol (14.6 g, 87% yield) as a colorless oil. To a stirred solution of *sn*-2 alcohol (2.0 g, 4.44 mmol) in DMF (13 mL) at 0 °C was added NaH (60% oil dispersion) (242 mg, 5.77 mmol). After stirring for 15 min, allyl bromide (0.60 mL, 6.66 mmol) was added and then the mixture was stirred for 2 d at room temperature. The reaction was quenched with 10% citric acid aq. and extracted with ethyl acetate. The extract was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 10/1) to afford **82a** (1.54 g, 71% yield) as a colorless oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.65-7.67 (m, 4H), 7.34-7.43 (m, 6H), 7.22-7.24 (m, 2H), 6.83-6.87 (m, 2H), 5.84-5.92 (m, 1H), 5.23 (dq, 1H, *J* = 17.2, 1.7 Hz), 5.12 (dq, 1H, *J* = 10.4, 1.4 Hz), 4.47 (dd, 2H, *J* = 16.8, 11.6 Hz), 4.07-4.09 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.73 (t, 2H, *J* = 2.6 Hz), 3.61-3.65 (m, 2H), 3.52-3.56 (m, 1H), 1.03 (s, 9H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 159.21, 135.74, 135.71, 135.37, 133.66, 133.59, 130.59, 129.72, 129.33, 127.75, 116.73, 113.83, 78.82, 73.13, 71.39, 69.92, 63.56, 55.36, 26.90, 19.31; HRMS (ESI-QTOF) calcd for C₃₀H₃₈NaO₄Si [M+Na]⁺, 513.2432; found: 513.2439



2-allyl-1-*tert*-butyldiphenylsilyl-3-(4-methoxybenzyl)-*sn*-glycerol (**82b**)

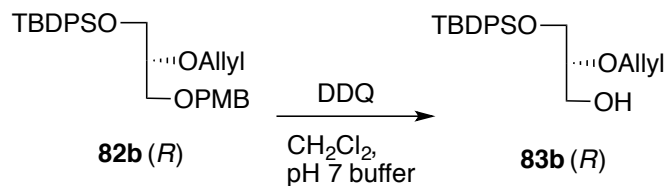
In a manner similar to the synthesis of **82a**, (*R*)-(-)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-methanol (6.0 g, 45.4 mmol) was converted into *sn*-2 alcohol (14.6 g, 42% yield for three steps) as a colorless oil and *sn*-2 alcohol (2.0 g, 4.44 mmol) was converted into **82b** (1.54 g, 71% yield). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.67 (d, 4H, *J* = 6.7 Hz), 7.31-7.42 (m, 6H), 7.23 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz), 6.84-6.87 (m, 2H), 5.88 (dq, 1H, *J* =

22.6, 5.3 Hz), 5.24 (dd, 1H, $J = 17.3, 1.6$ Hz), 5.12 (dt, 1H, $J = 10.4, 0.6$ Hz), 4.47 (dd, 2H, $J = 15.0, 11.7$ Hz), 4.08 (d, 2H, $J = 5.6$ Hz), 3.77 (s, 3H), 3.74 (d, 2H, $J = 5.2$ Hz), 3.62-3.66 (m, 2H), 3.55 (dt, 1H, $J = 11.4, 3.5$ Hz), 1.04 (s, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 159.27, 135.79, 135.77, 135.41, 133.69, 133.62, 130.62, 129.80, 129.40, 127.83, 116.81, 113.87, 78.84, 73.18, 71.44, 69.92, 63.60, 55.38, 26.97, 19.37; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{NaO}_4\text{Si}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 513.2432; found: 513.2438



2-allyl-3-*tert*-butyldiphenylsilyl-*sn*-glycerol (**83a**)

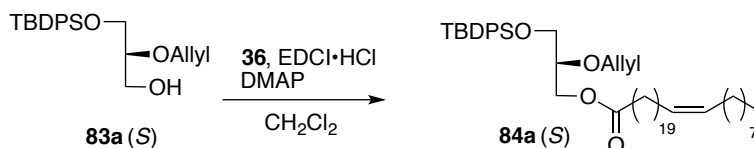
To a stirred mixture of **82a** (0.85 g, 1.73 mmol) in CH_2Cl_2 (50 mL) and pH 7 phosphate buffer (5.5 mL) was added DDQ (787 mg, 3.47 mmol). After stirring for over night, the mixture was extracted with CH_2Cl_2 . The extract was washed with saturated NaHCO_3 aq. and brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 5/1) to afford **83a** (528 mg, 82% yield) as a colorless oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.66-7.68 (m, 4H), 7.37-7.46 (m, 6H), 5.82-5.91 (m, 1H), 5.20-5.26 (m, 1H), 5.13-5.16 (m, 1H), 4.08 (ddt, 1H, $J = 12.7, 5.6, 1.4$ Hz), 3.99 (ddt, 1H, $J = 12.7, 5.7, 1.3$ Hz), 3.73-3.84 (m, 2H), 3.65-3.70 (m, 2H), 3.51-3.58 (m, 1H), 2.05-2.09 (m, 1H), 1.05 (s, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 135.70, 135.67, 134.87, 133.32, 133.20, 129.89, 127.84, 117.24, 79.40, 71.24, 63.53, 62.95, 26.89, 19.25; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{NaO}_3\text{Si}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 393.1856; found: 393.1858



2-allyl-1-*tert*-butyldiphenylsilyl-*sn*-glycerol (**83b**)

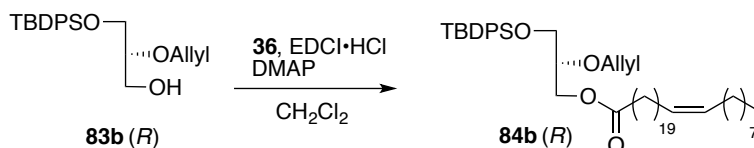
In a manner similar to the synthesis of **83a**, **82b** (5.1 g, 10.4 mmol) was converted into **83b** (3.23 mg, 83% yield) as a colorless oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.64-7.69 (m, 4H), 7.36-7.46 (m, 6H), 5.81-5.91 (m, 1H), 5.22 (dq, 1H, $J = 17.2, 1.6$ Hz), 5.14 (dt, 1H, $J = 10.4, 1.3$ Hz), 4.06-4.11 (m, 1H), 3.99 (ddt, 1H, $J = 12.7, 5.8, 1.3$ Hz), 3.73-3.81 (m, 2H), 3.64-3.71 (m, 2H), 3.51-3.56 (m, 1H), 2.25 (dd, 1H, $J = 7.1, 5.5$ Hz), 1.06 (s, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 135.73, 135.71, 134.92, 133.34, 133.22, 129.93, 127.89, 117.27, 79.51, 71.28, 63.53, 62.92, 26.92, 19.28; HRMS (ESI-QTOF) calcd for

$C_{22}H_{30}NaO_3Si$ $[M+Na]^+$, 393.1856; found: 393.1860



2-allyl-3-*tert*-butyldiphenylsilyl-1-(*cis*-21-triacontenyl)-*sn*-glycerol (**84a**)

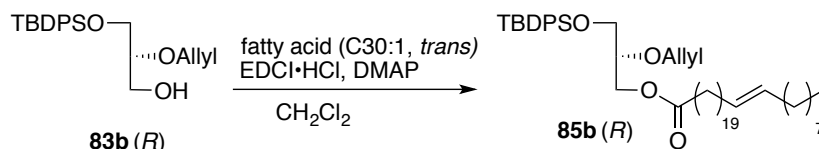
To a stirred solution of **63** (557 mg, 1.10 mmol) in CH_2Cl_2 (5.5 mL) was added trifluoroacetic acid (5.5 mL) and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure and co-evaporated with toluene three times. The resulting **36** was added to the solution of **83a** (488 mg, 1.32 mmol) and DMAP (67 mg, 0.55 mmol) in toluene (5.5 mL). EDCI·HCl (632 mg, 3.30 mmol) was added to the reaction mixture and the mixture was stirred and heated under reflux for over night. The reaction mixture was extracted with ethyl acetate. The extract was washed with water and brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 15/1) to afford **55a** (839 mg, 95%) as a colorless oil. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.66-7.68 (m, 4H), 7.36-7.46 (m, 6H), 5.80-5.90 (m, 1H), 5.32-5.39 (m, 2H), 5.23 (dq, 1H, J = 17.2, 1.6 Hz), 5.14 (ddd, 1H, J = 10.3, 2.9, 1.2 Hz), 4.32 (dd, 1H, J = 11.6, 3.9 Hz), 4.14-4.18 (m, 1H), 3.99-4.08 (m, 2H), 3.68-3.75 (m, 2H), 3.61-3.67 (m, 1H), 2.29 (t, 2H, J = 7.6 Hz), 1.97-2.04 (m, 3H), 1.58-1.67 (m, 2H), 1.24-1.34 (m, 44H), 1.05 (s, 9H), 0.88 (t, 3H, J = 6.8 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 173.82, 135.68, 134.70, 133.31, 130.00, 129.81, 127.79, 117.21, 77.25, 71.30, 63.58, 63.08, 34.35, 32.01, 29.80, 29.58, 29.42, 29.26, 27.31, 26.86, 25.03, 22.78, 19.28, 14.22; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $C_{52}H_{86}NaO_4Si$ $[M+Na]^+$, 825.6188; found: 825.6207



2-allyl-1-*tert*-butyldiphenylsilyl-3-(*cis*-21-triacontenyl)-*sn*-glycerol (**85a**)

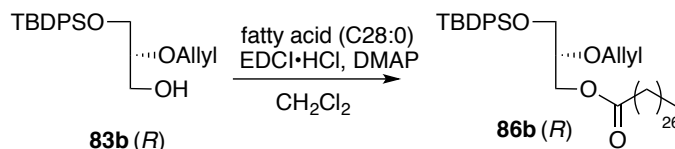
In a manner similar to the synthesis of **84a**, **36** (250 mg, 0.49 mmol), **83a** (274 mg, 0.74 mmol) was converted into **85a** (377 mg, 95%) as a colorless oil. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.66-7.68 (m, 4H), 7.36-7.46 (m, 6H), 5.80-5.90 (m, 1H), 5.32-5.39 (m, 2H), 5.23 (dq, 1H, J = 17.2, 1.6 Hz), 5.14 (dq, 1H, J = 10.4, 1.4 Hz), 4.33 (dd, 1H, J = 11.6, 3.9 Hz), 4.16 (dd, 1H, J = 11.6, 5.6 Hz), 4.04 (dq, 2H, J = 5.6, 1.6 Hz), 4.04 (dq, 2H, J = 5.6, 1.6 Hz), 3.68-3.75 (m, 2H), 3.61-3.67 (m, 1H), 2.25-2.32 (m, 2H), 1.96-2.06 (m, 4H), 1.61 (q, 2H, J = 7.2 Hz), 1.30 (d, 44H, J = 36.7 Hz), 1.04 (s, 9H), 0.86-0.90 (m, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 173.83, 149.35, 135.71, 134.90, 133.41, 133.30, 130.00, 129.82, 127.80, 117.16,

77.23, 71.30, 63.58, 63.06, 34.36, 32.02, 29.88, 29.82, 29.75, 29.68, 29.63, 29.59, 29.43, 29.27, 27.32, 26.87, 25.04, 22.79, 19.28, 14.24; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $C_{52}H_{86}NaO_4Si$ $[M+Na]^+$, 825.6188; found: 825.6212



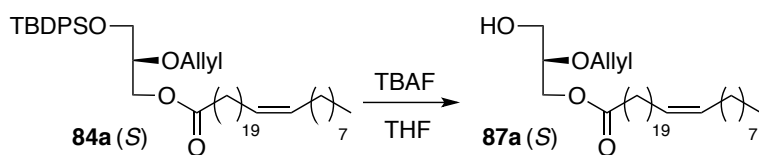
2-allyl-1-tert-butyldiphenylsilyl-3-(trans-21-triacontenyl)-sn-glycerol (85b)

In a manner similar to the synthesis of **84a**, fatty acid (C30:1, *trans*) (75 mg, 0.15 mmol) and **83b** (82 mg, 0.22 mmol) was converted into **85b** (123 mg, quant) as a colorless oil. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.66-7.68 (m, 4H), 7.36-7.45 (m, 6H), 5.80-5.90 (m, 1H), 5.37-5.39 (m, 2H), 5.20-5.26 (m, 1H), 5.14 (dd, 1H, $J = 10.3, 1.3$ Hz), 4.33 (dd, 1H, $J = 11.6, 3.9$ Hz), 4.16 (dd, 1H, $J = 11.6, 5.6$ Hz), 4.03-4.05 (m, 2H), 3.68-3.75 (m, 2H), 3.61-3.67 (m, 1H), 2.29 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 1.96 (dd, 4H, $J = 10.9, 6.0$ Hz), 1.61 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz), 1.25 (s, 44H), 1.05 (s, 9H), 0.88 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz); ^{13}C NMR (99 MHz, $CDCl_3$) δ 173.83, 135.68, 134.89, 133.41, 133.30, 130.46, 129.82, 127.80, 117.15, 77.23, 71.30, 63.58, 63.06, 34.35, 32.72, 32.01, 29.81, 29.77, 29.64, 29.59, 29.42, 29.28, 26.86, 25.03, 22.79, 19.28, 14.23; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $C_{52}H_{86}NaO_4Si$ $[M+Na]^+$, 825.6188; found: 825.6216



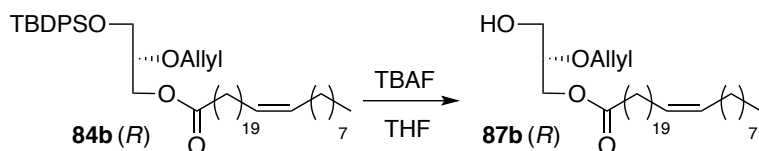
2-allyl-1-tert-butyldiphenylsilyl-3-octacosanoyl-sn-glycerol (86b)

In a manner similar to the synthesis of **84a**, fatty acid (C28:0) and **83b** (173 mg, 0.44 mmol) was converted into **86b** (183 mg, 75%) as a colorless oil. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.66-7.68 (m, 4H), 7.36-7.45 (m, 6H), 5.80-5.90 (m, 1H), 5.23 (dt, 1H, $J = 17.2, 0.7$ Hz), 5.14 (dd, 1H, $J = 10.4, 0.6$ Hz), 4.33 (dd, 1H, $J = 11.6, 3.9$ Hz), 4.16 (dd, 1H, $J = 11.6, 5.6$ Hz), 4.00-4.08 (m, 2H), 3.61-3.75 (m, 3H), 2.29 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 1.60 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz), 1.21-1.31 (m, 48H), 1.05 (s, 9H), 0.88 (t, 3H, $J = 6.7$ Hz); ^{13}C NMR (99 MHz, $CDCl_3$) δ 173.83, 135.71, 135.68, 134.90, 133.41, 133.30, 129.82, 127.80, 117.15, 77.23, 71.30, 63.57, 63.07, 34.36, 32.04, 29.81, 29.58, 29.47, 29.40, 29.26, 26.87, 25.04, 22.80, 19.28, 14.24; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $C_{50}H_{84}NaO_4Si$ $[M+Na]^+$, 799.6031; found: 799.6051



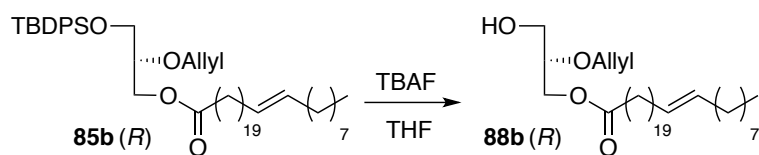
2-allyl-1-(*cis*-21-triacontenyl)-*sn*-glycerol (**87a**)

To a stirred solution of **84a** (300 mg, 0.37 mmol) and AcOH (22 μ L) in THF (3.7 mL) was added TBAF (1 M in THF) (0.82 mL, 0.82 mmol). After stirring for over night, the solvent was removed under reduced pressure. The crude mixture was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 5/1) to afford **87a** (191 mg, 90% yield) as a white solid. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.88-5.95 (m, 1H), 5.34-5.39 (m, 2H), 5.30 (dq, 1H, J = 17.2, 1.6 Hz), 5.21 (dq, 1H, J = 10.4, 1.4 Hz), 4.15-4.20 (m, 3H), 4.09 (ddt, 1H, J = 12.7, 5.8, 1.3 Hz), 3.59-3.73 (m, 3H), 2.33 (t, 2H, J = 7.6 Hz), 1.95-2.03 (m, 4H), 1.61 (q, 2H, J = 7.3 Hz), 1.25-1.34 (m, 44H), 0.88 (t, 3H, J = 6.9 Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 173.91, 134.54, 129.98, 117.68, 71.27, 62.77, 62.10, 34.29, 32.00, 29.86, 29.79, 29.75, 29.70, 29.65, 29.61, 29.55, 29.41, 29.35, 29.22, 27.29, 25.01, 22.77, 14.19; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{68}\text{NaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 580.5010; found: 587.5021



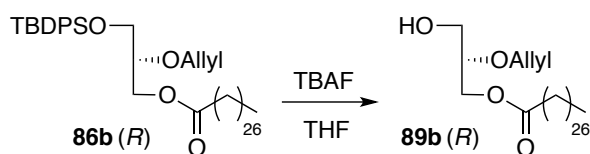
2-allyl-3-(*cis*-21-triacontenyl)-*sn*-glycerol (**87b**)

In a manner similar to the synthesis of **87a**, **84b** (549 mg, 0.68 mmol) was converted into **87b** (310 mg, 80% yield) as a colorless oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.86-5.96 (m, 1H), 5.27-5.38 (m, 3H), 5.19-5.24 (m, 1H), 4.15-4.21 (m, 3H), 4.09 (ddt, 1H, J = 12.6, 5.8, 1.3 Hz), 3.57-3.73 (m, 3H), 2.33 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 2.20-2.09 (1H), 1.97-2.06 (m, 4H), 1.58-1.66 (m, 2H), 1.25 (s, 44H), 0.88 (t, 3H, J = 6.8 Hz); ^{13}C NMR (99 MHz, CDCl_3) δ 173.92, 134.53, 129.98, 117.70, 71.27, 62.78, 62.07, 34.29, 32.01, 29.87, 29.80, 29.71, 29.66, 29.62, 29.57, 29.42, 29.37, 29.22, 27.30, 25.02, 22.78, 14.21; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{68}\text{NaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 580.5010; found: 580.5012



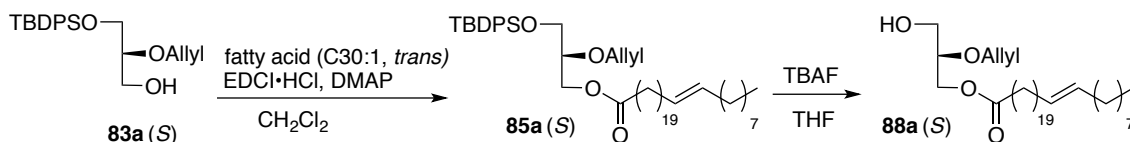
2-allyl-3-(*trans*-21-triacontenyl)-*sn*-glycerol (**88b**)

In a manner similar to the synthesis of **87a**, **85b** (173 mg, 0.22 mmol) was converted into **88b** (94 mg, 77%) as a colorless oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.87-5.97 (m, 1H), 5.37-5.39 (m, 2H), 5.30 (dq, 1H, $J = 17.3, 1.6$ Hz), 5.21 (dq, 1H, $J = 10.3, 1.3$ Hz), 4.15-4.20 (m, 3H), 4.09 (ddt, 1H, $J = 12.7, 5.9, 1.3$ Hz), 3.59-3.70 (m, 3H), 2.33 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 1.96 (dd, 4H, $J = 10.8, 5.9$ Hz), 1.58-1.66 (m, 2H), 1.25-1.32 (m, 44H), 0.88 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz); ^{13}C NMR (99 MHz, CDCl_3) δ 173.94, 134.62, 130.47, 130.44, 117.75, 77.45, 77.13, 76.80, 71.27, 62.75, 62.09, 34.31, 32.72, 32.00, 29.82, 29.79, 29.75, 29.62, 29.56, 29.41, 29.36, 29.26, 29.22, 25.01, 22.78, 14.21; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{68}\text{NaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 587.5010; found: 587.5016



2-allyl-3-(*trans*-21-triacontenyl)-*sn*-glycerol (**89b**)

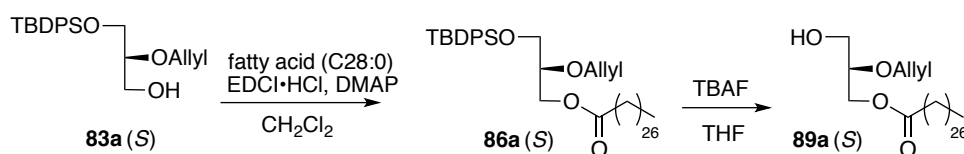
In a manner similar to the synthesis of **87a**, **86b** (174 mg, 0.22 mmol) was converted into **89b** (101 mg, 84%) as a colorless oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.85-5.95 (m, 1H), 5.29 (dq, 1H, $J = 17.2, 1.5$ Hz), 5.20 (dd, 1H, $J = 10.4, 1.3$ Hz), 4.14-4.22 (m, 3H), 4.08 (ddt, 1H, $J = 12.7, 5.9, 1.2$ Hz), 3.58-3.71 (m, 3H), 2.32 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 1.57-1.65 (m, 2H), 1.20-1.28 (m, 48H), 0.87 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz); ^{13}C NMR (99 MHz, CDCl_3) δ 173.93, 134.53, 117.72, 71.27, 62.78, 62.08, 34.29, 32.03, 29.80, 29.71, 29.57, 29.47, 29.37, 29.23, 25.02, 22.79, 14.22; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{66}\text{NaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 561.4853; found: 561.4857



2-allyl-1-(*trans*-21-triacontenyl)-*sn*-glycerol (**88a**)

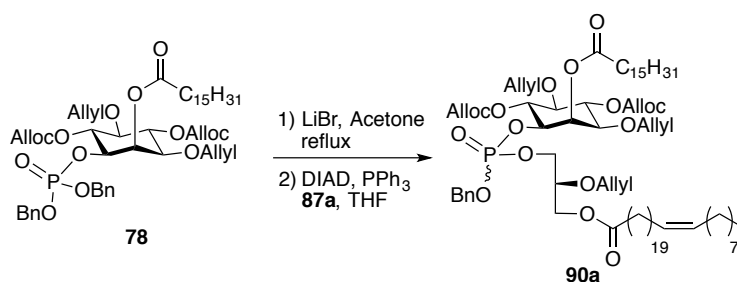
To the solution of fatty acid ($\text{C}_{30}:1$, *trans*) ^tBu ester (253 mg, 0.50 mmol) in CH_2Cl_2 (2.5 mL) was added TFA (2.5 mL) at room temperature and stirred for 1h. The solvent was removed under reduced pressure

and dried under highly vacuumed. The residue and **85a** (370 mg, 1.0 mmol) was dissolved with CH₂Cl₂/toluene (1/1) (5 mL) and then added DMAP (6.25 mg, 51 μ mol) and DCC (400 mg, 1.94 mmol). The mixture was stirred for over night at room temperature. The mixture was filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was roughly purified with silica gel column chromatography (Hexane/ethyl acetate = 5/1). The mixture was dissolved with THF (4 mL) and added TBAF (1 M in THF) (1 mL, 1.0 mmol) and stirred for over night. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified with silica gel column chromatography (Hexane/ethyl acetate = 5/1) to afford **88a** (176 mg, 62% yield for 3 steps) as a white solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.95 – 5.87 (m, 1H), 5.38 (t, *J* = 3.7 Hz, 2H), 5.30 (dq, *J* = 17.2, 1.4 Hz, 1H), 5.21 (dd, *J* = 10.3, 1.1 Hz, 1H), 4.22 – 4.07 (m, 5H), 3.70 – 3.60 (m, 3H), 2.33 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.96 (q, *J* = 6.2 Hz, 4H), 1.62 (quin, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.34 – 1.24 (m, 44H), 0.88 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 173.9, 134.5, 130.4, 117.7, 71.3, 62.8, 62.1, 60.5, 34.3, 32.7, 32.0, 29.8, 29.7, 29.7, 29.6, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.3, 29.2, 25.0, 22.8, 14.3, 14.2, 21.1; HRMS (ESI-QTOF) calculated for C₃₆H₆₈NaO₄ [M+Na]⁺ 587.5010, found 587.5020



2-allyl-1-octacosanoyl-*sn*-glycerol (**89a**)

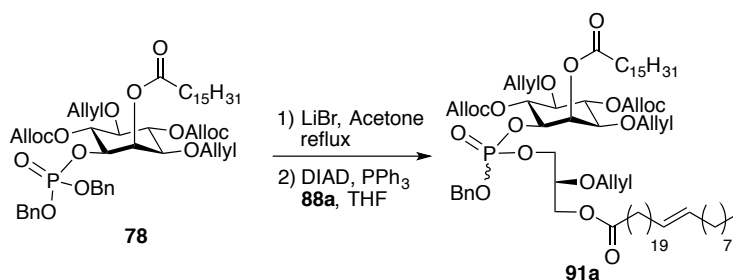
In a manner similar to the synthesis of **88a**, **83a** (200 mg, 0.416 mmol) was converted into **89a** (144 mg, 64% yield for 3 steps) as a white solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.94 – 5.86 (m, 1H), 5.29 (dq, *J* = 17.2, 1.6 Hz, 1H), 5.19 (dq, *J* = 10.3, 1.1 Hz, 1H), 4.19 – 4.14 (m, 3H), 4.08 (ddt, *J* = 12.7, 5.9, 1.3 Hz, 1H), 3.69 – 3.60 (m, 3H), 2.32 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.61 (quin, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.29 – 1.21 (m, 48H), 0.87 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 173.9, 134.5, 117.7, 71.3, 62.8, 62.1, 34.3, 32.1, 29.8, 29.7, 29.7, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 25.0, 22.8, 14.2; HRMS (ESI-QTOF) calculated for C₃₄H₆₆NaO₄ [M+Na]⁺ 561.4853, found 561.4864



3,5-di-allyl-4,6-di-*O*-allyloxycarbonyl-2-allyl-3-*O*-((*cis*-21-triacontenyl)-*sn*-glycerol-3-benzylphosph

ate)-2-palmitoyl-D-myoinositol (90a)

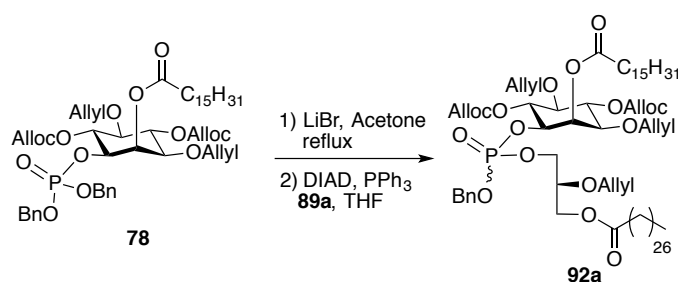
To a stirred solution of **78** (38.1 mg, 41.1 μ mol) in Acetone (2.7 mL) was added LiBr (7.2 mg, 82.2 μ mol). The reaction mixture was refluxed for 1 d. The mixture was cooled to ambient temperature, and then concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography eluting with Toluene/AcOEt (3 : 1) to CH₂Cl₂/MeOH (6 : 1) to afford lithium salt. The salt was passed through the cation exchange resin column (Dowex 50WX8 50-100) to obtain proton form. Fractions containing the desire product was collected and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved with THF (411 μ L). **87a** (46.4 mg, 82.2 μ mol), PPh₃ (21.6 mg, 82.2 μ mol) was added to the solution. The mixture was cooled to 0 °C, and then DIAD (16 μ L, 82.2 μ mol) was added to the reaction mixture. The reaction was warmed to room temperature. After stirring for 1d, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was purified with Preparative TLC (Toluene/AcOEt = 6 / 1) to afford **90a** (37 mg, 60% for 2 steps) (~1:1 diastereomixture) as a colorless oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.30-7.40 (m, 5H), 5.72-5.97 (m, 6H), 4.97-5.38 (m, 18H), 4.28-4.71 (m, 5H), 3.98-4.21 (m, 9H), 3.85-3.90 (m, 1H), 3.64-3.72 (m, 1H), 3.42-3.50 (m, 2H), 2.33-2.44 (m, 2H), 2.29 (dd, 2H, J = 14.9, 7.2 Hz), 1.94-2.03 (m, 4H), 1.56-1.65 (m, 4H), 1.25-1.33 (m, 68H), 0.88 (t, 6H, J = 6.9 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 173.58, 172.60, 154.31, 134.48, 134.11, 133.74, 131.51, 129.98, 128.62, 127.96, 127.77, 119.11, 117.63, 117.49, 77.94, 77.36, 77.10, 76.85, 76.16, 75.08, 74.76, 74.21, 72.39, 71.36, 70.88, 70.39, 69.63, 68.98, 68.86, 68.80, 67.66, 66.34, 62.51, 34.19, 32.02, 29.86, 29.81, 29.65, 29.61, 29.45, 29.41, 29.26, 29.13, 27.29, 25.14, 24.96, 22.78, 22.00, 21.80, 14.20; HRMS (ESI-QTOF) calculated for C₇₉H₁₃₁NaO₁₇P [M+Na]⁺ 1405.9016, found 1405.9041



3,5-di-allyl-4,6-di-O-allyloxycarbonyl-2-allyl-3-O-((trans-21-triacontenyl)-sn-glycerol-3-benzylphosphate)-2-palmitoyl-D-myoinositol (91a)

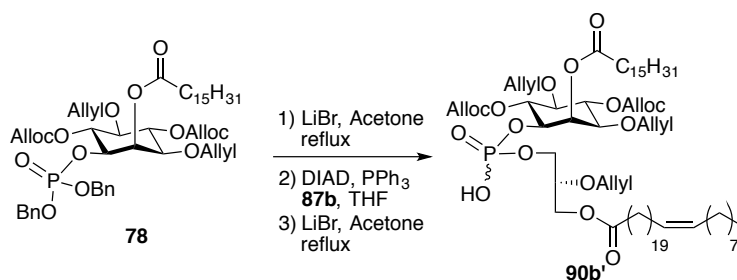
In a manner similar to the synthesis of **90a**, **78** (55 mg, 59.4 μ mol) was converted into **91a** (52.3 mg, 60% for 2 steps) (~1:1 diastereomixture) as a colorless oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.30-7.39 (m, 5H), 5.72-5.97 (m, 6H), 4.97-5.39 (m, 18H), 4.31-4.71 (m, 5H), 3.98-4.21 (m, 9H), 3.85-3.90 (m, 1H), 3.64-3.72 (m, 1H), 3.43-3.51 (m, 2H), 2.35-2.43 (m, 2H), 2.27-2.33 (m, 2H), 1.96 (dd, 4H, J = 11.0, 6.1

Hz), 1.58-1.68 (m, 4H), 1.25-1.32 (m, 68H), 0.88 (t, 6H, $J = 6.9$ Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 173.50, 172.65, 154.31, 134.48, 134.11, 133.74, 131.51, 131.46, 131.36, 130.44, 128.64, 128.62, 127.95, 127.76, 119.22, 119.14, 119.09, 117.67, 117.61, 117.47, 77.93, 77.38, 77.12, 76.86, 76.17, 75.08, 74.75, 74.72, 74.20, 72.35, 71.36, 71.28, 70.87, 70.83, 70.40, 69.63, 68.97, 68.85, 68.80, 62.50, 34.27, 34.18, 32.69, 32.01, 31.98, 29.80, 29.74, 29.62, 29.57, 29.45, 29.39, 29.25, 29.12, 29.08, 25.14, 25.04, 24.96, 22.77, 22.00, 21.80, 14.19; HRMS (ESI-QTOF) calculated for $\text{C}_{79}\text{H}_{131}\text{NaO}_{17}\text{P}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1405.9016, found 1405.9041



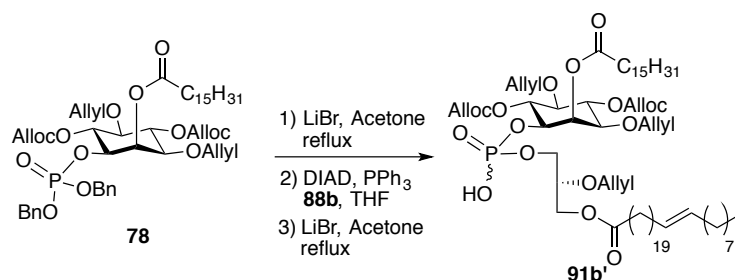
3,5-di-allyl-4,6-di-*O*-allyloxycarbonyl-(2-allyl-1-*O*-((octacosanyl)-*sn*-glycerol-3-benzylphosphate))-2-palmitoyl-D-*myo*-inositol (92a)

In a manner similar to the synthesis of **90a**, **78** (62.5 mg, 67.5 μmol) was converted into **92a** (65.8 mg, 72% for 2 steps) ($\sim 1:1$ diastereomixture) as a colorless oil. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.29-7.40 (m, 5H), 5.71-5.96 (m, 6H), 4.94-5.38 (m, 14H), 4.31-4.70 (m, 5H), 3.98-4.23 (m, 9H), 3.87 (ddd, 1H, $J = 12.9, 5.6, 4.3$ Hz), 3.62-3.72 (m, 1H), 3.42-3.50 (m, 2H), 2.36-2.44 (m, 2H), 2.28 (q, 2H, $J = 7.4$ Hz), 1.53-1.64 (m, 4H), 1.25-1.31 (m, 72H), 0.87 (t, 6H, $J = 6.9$ Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 173.51, 172.60, 154.31, 154.27, 138.00, 134.49, 134.12, 133.75, 131.52, 131.46, 129.12, 128.65, 128.30, 127.96, 127.77, 125.38, 119.10, 117.62, 117.48, 77.94, 77.37, 77.12, 76.97, 76.86, 76.17, 75.09, 74.76, 74.21, 71.36, 71.31, 70.88, 69.63, 68.98, 68.86, 68.80, 67.65, 66.64, 66.52, 66.35, 62.58, 62.51, 34.28, 34.19, 32.02, 29.79, 29.75, 29.59, 29.45, 29.39, 29.25, 29.13, 29.09, 25.14, 25.05, 24.96, 22.78, 21.53, 14.21; HRMS (ESI-QTOF) calculated for $\text{C}_{77}\text{H}_{129}\text{NaO}_{17}\text{P}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1379.8860, found 1379.8861



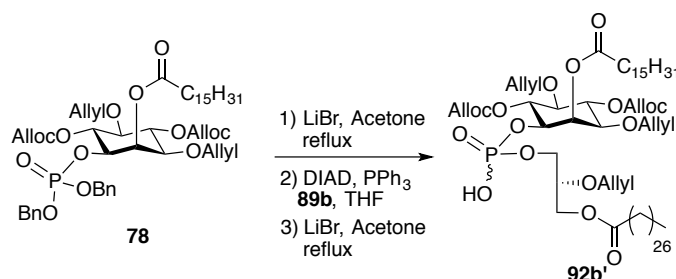
3,5-di-allyl-4,6-di-*O*-allyloxycarbonyl-2-allyl-3-*O*-((*cis*-21-triacontenyl)-*sn*-glycerol-1-benzylphosphate)-2-palmitoyl-*D*-myo-inositol (90b'**)**

To a stirred solution of **78** (25 mg, 27.0 μ mol) in Acetone (1 mL) was added LiBr (23 mg, 0.27 mmol). The reaction mixture was refluxed for over night. The mixture was cooled to ambient temperature, and then concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography eluting with Toluene/AcOEt (3 : 1) to CH₂Cl₂/MeOH (6 : 1) to afford lithium salt. The salt was passed through the cation exchange resin column (Dowex 50WX8 50-100) to obtain proton form. Fractions containing the desire product was collected and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved with THF (500 μ L), **87b** (76 mg, 0.14 mmol), PPh₃ (35 mg, 0.14 mmol) was added to the solution. To the mixture was added DIAD (27 μ L, 0.14 mmol) and stirred for over night. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was purified with preparative TLC (Toluene/AcOEt = 5 / 1) to afford **90a** containing residue. The residue and LiBr (23 mg, 0.27 mmol) was dissolved with acetone (1 mL) and then heated to reflux for over night. The mixture was cooled to ambient temperature, and then concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography eluting with Toluene/AcOEt (3 : 1) to CH₂Cl₂/MeOH (20 : 1) to afford lithium salt (24.1 mg, 68% from **78**) as a colorless oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.73-6.02 (m, 6H), 5.07-5.39 (m, 16H), 4.63-4.69 (br, 4H), 4.10-4.22 (br, 6H), 3.42-3.43 (br, 2H), 2.31-2.45 (m, 4H), 1.99-2.03 (m, 4H), 1.58-1.61 (m, 4H), 1.25-1.25 (m, 72H), 0.88 (t, 6H, *J* = 6.8 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 154.60, 134.35, 131.74, 130.00, 118.68, 117.06, 77.43, 77.11, 76.79, 74.14, 71.29, 70.81, 68.89, 68.53, 50.80, 34.81, 34.39, 32.71, 32.05, 32.01, 29.88, 29.69, 29.62, 29.50, 29.42, 29.19, 27.31, 25.00, 22.79, 14.23, 0.10; HRMS (ESI-QTOF) calculated for C₇₂H₁₂₄Na₂O₁₇P [M+Na]⁺ 1337.8372, found 1337.9303



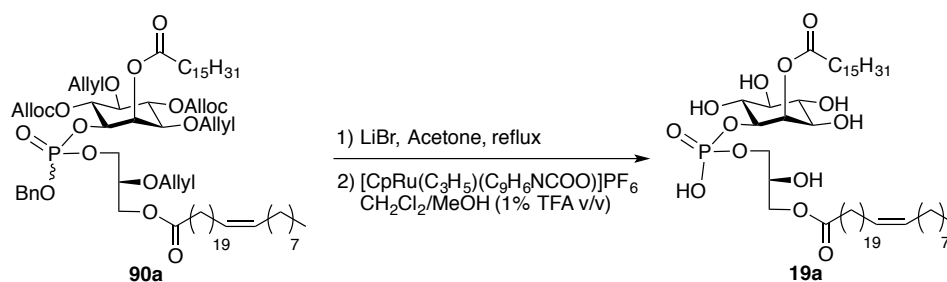
3,5-di-allyl-4,6-di-*O*-allyloxycarbonyl-2-allyl-3-*O*-((*trans*-21-triacontenyl)-*sn*-glycerol-1-benzylphosphate)-2-palmitoyl-*D*-myo-inositol (91b')

In a manner similar to the synthesis of **90b'**, **78** (25 mg, 27.0 μ mol) was converted into **91b'** (21.9 mg, 62% from **78**) as a colorless oil. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 5.67-5.94 (m, 6H), 4.93-5.33 (m, 16H), 4.51-4.60 (m, 4H), 4.04-4.26 (m, 6H), 3.47-3.54 (m, 2H), 2.21-2.32 (m, 4H), 1.90-1.98 (m, 4H), 1.55-1.57 (m, 4H), 1.22-1.34 (m, 72H), 0.83 (t, 6H, J = 6.8 Hz); HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{72}\text{H}_{124}\text{Na}_2\text{O}_{17}\text{P}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1337.8366; found: 1337.8366, calcd for $\text{C}_{72}\text{H}_{124}\text{O}_{17}\text{P}$ $[\text{M}]^-$, 1291.8582; found: 1291.8581.



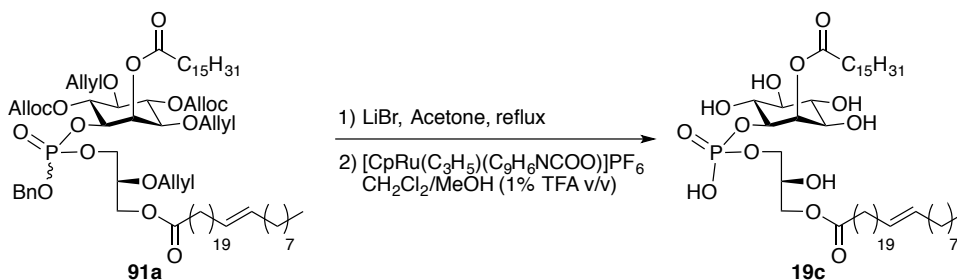
3,5-di-allyl-4,6-di-*O*-allyloxycarbonyl-2-allyl-3-*O*-((octacosanoyl)-*sn*-glycerol-1-benzylphosphate)-2-palmitoyl-*D*-myo-inositol (92b')

In a manner similar to the synthesis of **90b'**, **78** (25 mg, mmol) was converted into **92b'** (6.93 mg, 20% from **78**) as a colorless oil. ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 5.63-5.95 (m, 6H), 5.09-5.36 (m, 14H), 4.62-4.68 (br, 4H), 4.11-4.21 (br, 6H), 3.70-3.70 (br, 2H), 2.36-2.36 (br, 4H), 1.53-1.68 (br, 2H), 1.25-1.25 (m, 72H), 0.88 (t, 6H, J = 6.8 Hz); LRMS (ESI-QTOF) calculated for $\text{C}_{70}\text{H}_{122}\text{Na}_2\text{O}_{17}\text{P}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1311.8215, found 1311.899



(S)-EhPIb C30:1 *cis* (19a)

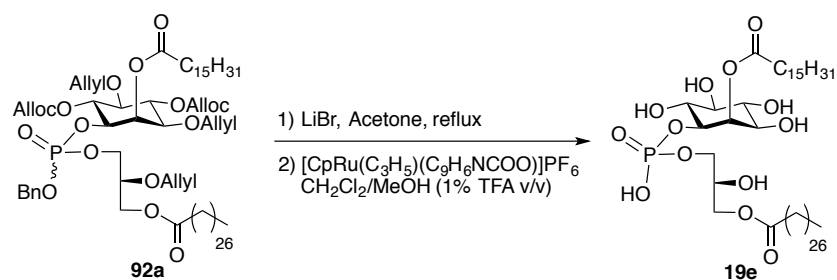
To a stirred solution of **90a** (22.8 mg, 16.4 μ mol) in Acetone (1.1 mL) was added LiBr (28.6 mg, 0.33 mmol) and refluxed for 6 h. After the removal of solvent, the crude mixture was subjected to silica gel column chromatography (Toluene/ethyl acetate = 5/1 to $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ = 6/1) to afford lithium salt. The salt was dissolved in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ = 1/1 containing 1% TFA (vol/vol) (1 mL). $[\text{CpRu}(\text{C}_3\text{H}_5)(\text{C}_9\text{H}_6\text{NCOO})]\text{PF}_6$ (8.6 mg, 1.6 μ mol) was added to reaction mixture. After stirring for 3 h, the solvent was removed under reduced pressure. The crude mixture was purified by silica gel column chromatography ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/2.2 \text{ M NH}_4\text{OH}$ = 45/10/1.4) to afford **19a** (14.6 mg, 88% yield for 2 steps) as a white solid. ^1H NMR (600 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$) δ 5.57-5.58 (m, 1H), 5.36 (t, 2H, J = 4.7 Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$), 4.09-4.17 (m, 3H, ino-1, Gly-3x2), 3.89 (1H, Gly-2), 3.82 (m, 1H, Gly-1), 3.73-3.77 (m, 1H, Gly-1), 3.64 (t, 1H, J = 9.0 Hz, ino-6), 3.54 (dd, 1H, J = 2.4, 9.4 Hz, ino-3), 3.49 (t, 1H, J = 9.5 Hz, ino-4), 3.25 (1H, ino-5), 2.35-2.41 (m, 4H, $-\text{COCH}_2-$), 2.03 (dd, 4H, J = 12.5, 6.7 Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$), 1.59-1.64 (m, 4H, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2-$), 1.28-1.35 (m, 68H, $-\text{CH}_2-$), 0.89 (t, 6H, J = 6.9 Hz, $-\text{CH}_3$); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$) δ 174.43, 174.40, 129.60, 74.06, 72.91, 72.81, 72.57, 72.22, 69.75, 68.54, 66.53, 64.79, 33.92, 33.73, 31.61, 31.58, 30.12, 29.41, 29.38, 29.33, 29.30, 29.27, 29.13, 29.11, 29.05, 29.02, 28.97, 28.94, 28.91, 28.87, 26.83, 26.80, 24.58, 24.53, 22.32, 13.54; ^{31}P NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$) δ 1.21; HRMS (ESI-Q-TOF) calculated for $\text{C}_{55}\text{H}_{104}\text{O}_{13}\text{P}^-$ [M] $^-$ 1003.7220, found 1003.7219



(S)-EhPIb C30:1 *trans* (19c)

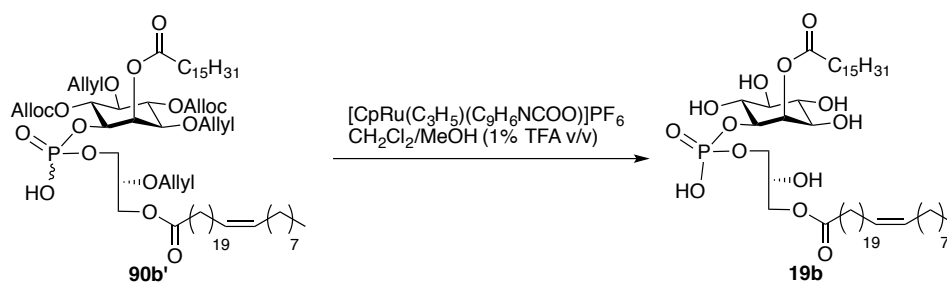
In a manner similar to the synthesis of **19a**, **91a** (10 mg, 7.22 μ mol) was converted into **19c** (5.46 mg,

75% yield for 2 steps) as a white solid. ^1H NMR (600 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$) δ 5.58 (1H, ino-2), 5.39 (t, 2H, $J = 3.7$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$), 4.10-4.17 (m, 3H, ino-1, Gly-3x2), 3.97-4.01 (m, 1H, Gly-2), 3.90-3.96 (m, 1H, Gly-1), 3.83-3.88 (m, 1H, Gly-1), 3.75 (t, 1H, $J = 9.4$ Hz), 3.64 (dd, 1H, $J = 10.8$, 2.4 Hz, ino-3), 3.59 (t, 1H, $J = 9.5$ Hz, ino-4), 3.34 (1H, ino-5), 2.35-2.41 (m, 4H, $-\text{COCH}_2-$), 1.96-2.00 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$), 1.60-1.65 (m, 4H, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2-$), 1.27-1.36 (m, 68H, $-\text{CH}_2-$), 0.89 (t, 6H, $J = 7.0$ Hz, $-\text{CH}_3$); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$) δ 175.18, 174.59, 130.85, 74.93, 74.78, 73.57, 73.38, 72.98, 70.73, 70.49, 69.44, 69.28, 67.36, 65.57, 65.48, 58.88, 57.18, 57.08, 34.68, 34.47, 32.93, 32.34, 32.31, 30.11, 30.01, 29.97, 29.85, 29.76, 29.70, 29.67, 29.63, 29.47, 29.41, 25.32, 25.28, 23.05, 14.25; ^{31}P NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$) δ 1.50; HRMS (ESI-Q-TOF) calculated for $\text{C}_{55}\text{H}_{104}\text{O}_{13}\text{P}^- [\text{M}]^-$ 1003.7220, found 1003.7222



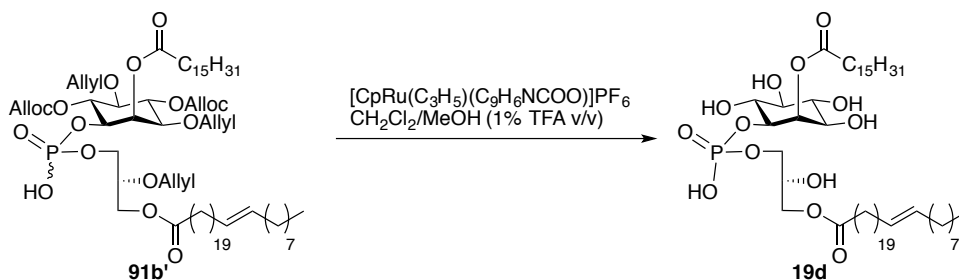
(S)-EhPIb C28:0 (19e)

In a manner similar to the synthesis of **19a**, **92a** (8.8 mg, 6.48 μmol) was converted into **19e** (5.21 mg, 82% yield for 2 steps) as a white solid. ^1H NMR (600 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$) δ 5.59 (dd, 1H, $J = 2.4$, 2.4 Hz, ino-2), 4.10-4.20 (m, 3H, ino-1, Gly-3x2), 3.98-4.01 (m, 1H, Gly-2), 3.93-3.96 (m, 1H, Gly-1), 3.84-3.89 (m, 1H, Gly-1), 3.75 (t, 1H, $J = 9.6$ Hz, ino-6), 3.58-3.65 (m, 2H, ino-4, ino-3), 3.56 (1H, ino-5), 2.35-2.41 (m, 4H, $-\text{COCH}_2-$), 1.61-1.65 (m, 4H, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2-$), 1.28-1.34 (m, 72H, $-\text{CH}_2-$), 0.89 (t, 6H, $J = 7.0$ Hz, $-\text{CH}_3$); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$) δ 174.13, 174.52, 73.94, 73.80, 72.62, 72.36, 72.03, 69.51, 68.25, 66.28, 64.54, 33.66, 33.45, 31.31, 30.89, 28.92, 28.74, 24.31, 24.27, 22.03, 13.17; ^{31}P NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$) δ 1.15; HRMS (ESI-Q-TOF) calculated for $\text{C}_{53}\text{H}_{102}\text{O}_{13}\text{P}^- [\text{M}]^-$ 977.7064, found 977.7063



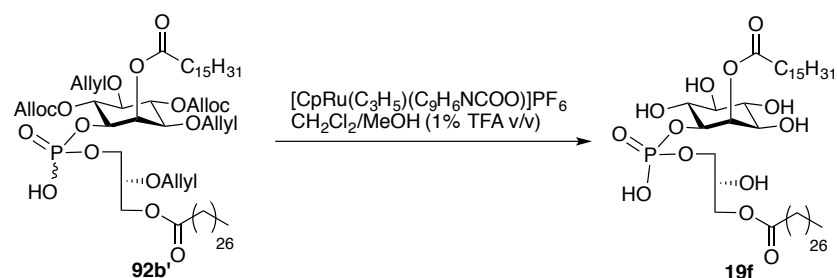
(*R*)-EhPIb C30:1 *cis* (**19b**)

90b' was dissolved in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 1/1$ containing 1% TFA (vol/vol) (500 μL). $[\text{CpRu}(\text{C}_3\text{H}_5)(\text{C}_9\text{H}_6\text{NCOO})]\text{PF}_6$ (1.5 mg, 2.8 μmol) was added to reaction mixture. After stirring for over night, the solvent was removed under reduced pressure. The crude mixture was purified by silica gel column chromatography ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/2.2 \text{ M NH}_4\text{OH} = 45/10/1.4$) to afford **19b** (4.65 mg, 50% yield) as a white solid. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$) δ 5.55 (m, 1H, ino-2), 5.34 (t, 2H, $J = 4.8 \text{ Hz}$, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$), 4.01-4.13 (m, 3H, ino-1, Gly-1x2), 3.94-4.00 (m, 1H, Gly-2), 3.87-3.92 (m, 1H, Gly-1), 3.77-3.85 (m, 1H, Gly-1) 3.65 (t, 1H, $J = 6.8 \text{ Hz}$, ino-6), 3.57-3.62 (m, 2H, ino-3, ino-4), 3.36-3.39 (m, 1H), 1.99-2.04 (m, 4H, $-\text{COCH}_2-$), 1.91-1.95 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$), 1.59-1.62 (m, 4H, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2-$), 1.25-1.36 (m, 68H, $-\text{CH}_2-$), 0.87 (t, 6H, $J = 6.4 \text{ Hz}$, $-\text{CH}_3$); HRMS (ESI-Q-TOF) calculated for $\text{C}_{55}\text{H}_{104}\text{O}_{13}\text{P}^- [\text{M}]^-$ 1003.7220, found 1003.7220



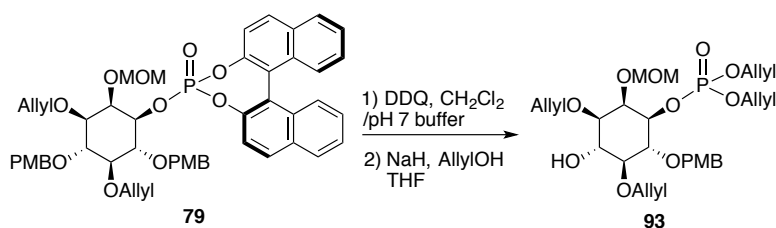
(*R*)-EhPIb C30:1 *trans* (**19d**)

In a manner similar to the synthesis of **19b**, **91b'** (10 mg, 7.6 mmol) was converted into **19d** (3.4 mg, 44%) as a white solid. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$) δ 5.56-5.56 (m, 1H, ino-2), 5.36-5.38 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$), 4.07-4.15 (m, 3H, ino-1, Gly-1x2), 3.95-4.00 (m, 1H, Gly-2), 3.90-3.93 (m, 1H, Gly-1), 3.83-3.86 (m, 1H, Gly-1), 3.72 (t, 1H, $J = 8.8 \text{ Hz}$, ino-6), 3.54-3.59 (m, 2H, ino-3, ino-4), 3.36 (m, 1H, ino-5), 2.32-2.39 (m, 4H, $-\text{COCH}_2-$), 1.93-1.98 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$), 1.58-1.60 (m, 4H, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2-$), 1.25-1.34 (m, 68H, $-\text{CH}_2-$), 0.87 (t, 6H, $J = 6.8 \text{ Hz}$, $-\text{CH}_3$); HRMS (ESI-Q-TOF) calculated for $\text{C}_{55}\text{H}_{104}\text{O}_{13}\text{P}^- [\text{M}]^-$ 1003.7220, found 1003.7220



(*R*)-*EhPIb* C28 (**19f**)

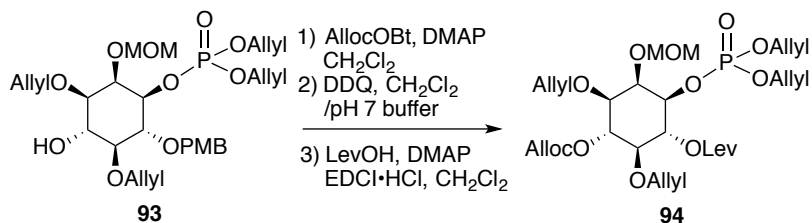
In a manner similar to the synthesis of **19b**, **92b'** (4.3 mg, 3.1 mmol) was converted into **19f** (1.3 mg, 44%) as a white solid. ^1H NMR (392 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$) δ 5.55 (t, 1H, $J = 2.6$ Hz, ino-2), 4.09-4.14 (m, 3H, ino-1, Gly-1x2), 3.94-4.00 (m, 1H, Gly-2), 3.87-3.95 (m, 1H, Gly-1), 3.77-3.85 (m, 1H, Gly-1), 3.72 (t, 1H, $J = 9.9$ Hz, ino-6), 3.54-3.64 (m, 2H, ino-3, ino-4), 3.32 (1H, ino-5), 2.32-2.42 (m, 4H, $-\text{COCH}_2-$), 1.56-1.60 (m, 4H, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2-$), 1.26-1.26 (m, 72H, $-\text{CH}_2-$), 0.87 (t, 6H, $J = 6.6$ Hz, $-\text{CH}_3$); HRMS (ESI-Q-TOF) calculated for $\text{C}_{53}\text{H}_{102}\text{O}_{13}\text{P}^- [\text{M}]^-$ 977.7064, found 977.7063



3,5-di-*O*-allyl-6-*O*-(4-methoxybenzyl)-2-methoxymethyl-D-*myo*-inositol-1-diallyl phosphate (**93**)

To a stirred mixture of **79** (1.39 g, 1.59 mmol) in CH_2Cl_2 (36 mL) and pH 7 phosphate buffer (4 mL) at 4 $^\circ\text{C}$ was added DDQ (391 mg, 1.74 mmol). After stirring for 5 h, the reaction was diluted with CH_2Cl_2 . The mixture was washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified with silica gel column chromatography (toluene/ethyl acetate = 5.5/1 to 4:1) to afford de-4-*O*-PMB (680 mg, 57% yield) as a white form and recovered **79** (284 mg, 20% yield). To a stirred suspension of NaH (60% oil dispersion) (108 mg, 2.70 mmol) in THF (9 mL) at 0 $^\circ\text{C}$ was added allyl alcohol (214 μL , 3.15 mmol). After stirring for 30 min, the solution of de-4-*O*-PMB (680 mg, 0.90 mmol) in THF (9 mL) was added to the reaction mixture and the mixture was stirred for 3 h. The reaction was quenched with 10% citric acid aq. and the reaction mixture was extracted with Et_2O . The extract was dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified with silica gel column chromatography (toluene/ethyl acetate = 2/1 to 1/2) to afford **93** (315 mg, 60% yield) as a colorless oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.28-7.32 (m, 2H), 6.83-6.86 (m, 2H), 5.77-6.00 (m, 4H), 5.14-5.35 (m, 8H), 4.70-4.81 (m, 4H), 4.40-4.59 (m, 4H), 4.29-4.39 (m, 3H), 4.17-4.25 (m, 2H),

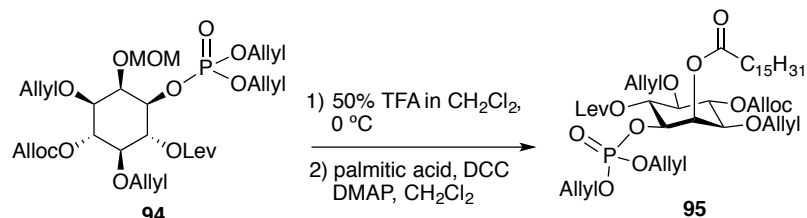
3.93-4.03 (m, 2H), 3.85-3.91 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.41 (s, 3H), 3.24 (t, 1H, $J = 9.1$ Hz), 3.14 (dd, 1H, $J = 9.9, 2.2$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 159.19, 135.23, 134.20, 132.55, 132.48, 130.75, 129.57, 118.29, 118.16, 117.81, 116.85, 113.71, 97.55, 82.55, 79.57, 79.50, 78.55, 78.24, 78.18, 77.45, 77.13, 76.80, 75.34, 74.29, 72.94, 72.43, 70.97, 68.40, 68.35, 68.28, 68.22, 55.90, 55.36; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{NaO}_{11}\text{P}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 607.2279; found: 607.2281



3,5-di-*O*-allyl-4-*O*-allyloxycarbonyl-6-*O*-levulinyl-2-methoxymethyl-*D*-myo-inositol-1-diallyl phosphate (**94**)

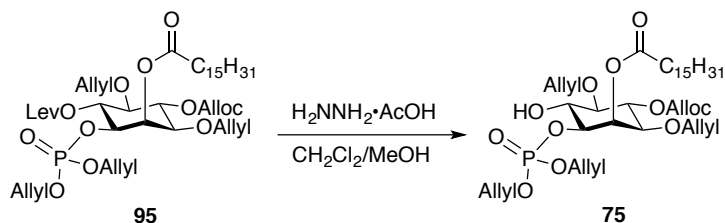
To a stirred solution of **93** (315 mg, 0.54 mmol) and AllocOBt (591 mg, 2.69 mmol) in CH_2Cl_2 (5.4 mL) was added DMAP (328 mg, 2.69 mmol) and the mixture was stirred for 2 h. The reaction was quenched with 10% citric acid aq. and extracted with CH_2Cl_2 . The extract was washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified with silica-gel column chromatography (toluene/ethyl acetate = 5/1 to 2/1) to afford 4-*O*-alloc compound (315 mg, 97% yield) as a colorless oil. To a stirred mixture of 4-*O*-alloc compound (351 mg, 0.53 mmol) in CH_2Cl_2 (11.7 mL) and pH 7 phosphate buffer (1.3 mL) was added DDQ (353 mg, 1.58 mmol). After stirring for 4 h, the reaction mixture was diluted with CH_2Cl_2 and washed with saturated NaHCO_3 aq. and brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography (toluene/ethyl acetate = 2/1) to afford de-6-*O*-PMB compound (277mg, 96% yield) as a colorless oil. To a stirred solution of de-6-*O*-PMB compound (277mg, 0.51 mmol), levulinic acid (205 μL , 2.02 mmol), and DMAP (30.8 mg, 0.25 mmol) in CH_2Cl_2 (5 mL) was added EDCI·HCl (387 mg, 2.02 mmol). After stirring for over night, the reaction mixture was extracted with ethyl acetate. The extract was washed with saturated NaHCO_3 aq., brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography (toluene/ethyl acetate = 2/1) to afford **94** (262 mg, 80% yield) as a colorless oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.76-5.98 (m, 5H), 5.54 (t, 1H, $J = 9.8$ Hz), 5.37 (ddd, 3H, $J = 17.1, 4.4, 1.3$ Hz), 5.11-5.28 (m, 8H), 4.74-4.79 (m, 2H), 4.65 (d, 2H, $J = 5.7$ Hz), 4.50-4.57 (m, 4H), 4.27-4.34 (m, 2H), 4.07-4.17 (m, 3H), 3.92-3.97 (m, 1H), 3.33-3.48 (m, 5H), 2.57-2.80 (m, 4H), 2.18 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 206.31, 171.76, 154.39, 134.43, 133.96, 132.21, 131.60, 119.00, 118.63, 118.49, 117.40, 117.13, 97.39, 78.10, 76.70,

75.63, 75.58, 73.46, 72.79, 71.99, 71.14, 68.68, 68.41, 68.35, 55.97, 37.76, 29.99, 28.12; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $C_{29}H_{43}NaO_{14}P$ $[M+Na]^+$, 669.2283; found: 669.2286



3,5-di-*O*-allyl-4-*O*-allyloxycarbonyl-6-*O*-levulinyl-2-palmitoyl-D-*myo*-inositol-1-diallyl phosphate (95)

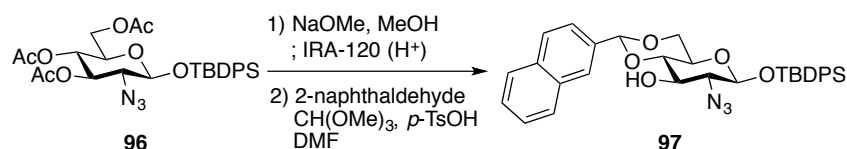
To a stirred solution of **94** (262 mg, 0.41 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL) at 0 °C was added TFA (20 mL). After stirring for 1.5 mL at 0 °C, the solvent and TFA was removed under reduced pressure and then co-evaporated with toluene three times. To the solution of the residue in CH_2Cl_2 (4 mL) was added palmitic acid (520 mg, 2.03 mmol), DMAP (25 mg, 0.20 mmol), and dicyclohexyl carbodiimide (417 mg, 2.03 mmol). After stirring for over night, the mixture was filtered to remove white precipitate and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography (toluene/ethyl acetate = 5/1 to 3/1) to afford **95** (259 mg, 76% yield) as a colorless oil. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5.72-5.98 (m, 6H), 5.46 (t, 1H, J = 9.9 Hz), 5.36 (dq, 3H, J = 17.1, 3.0, 1.5 Hz), 5.20-5.30 (m, 5H), 5.09-5.17 (m, 3H), 4.65 (dt, 2H, J = 5.8, 1.3 Hz), 4.41-4.54 (m, 5H), 4.09-4.16 (m, 3H), 3.87-3.92 (m, 1H), 3.43-3.48 (m, 2H), 2.62-2.83 (m, 4H), 2.41 (td, 2H, J = 7.5, 3.5 Hz), 2.21-2.16 (3H), 1.58-1.64 (m, 2H), 1.24-1.32 (m, 24H), 0.86-0.90 (m, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 206.29, 172.79, 171.71, 154.32, 134.28, 133.77, 132.27, 119.13, 118.60, 118.45, 117.80, 117.55, 77.84, 74.71, 74.09, 73.94, 70.93, 68.82, 68.42, 37.73, 29.80, 29.38, 28.07, 25.10 HRMS (ESI-QTOF) calcd for $C_{43}H_{69}NaO_{14}P$ $[M+Na]^+$, 863.4317; found: 863.4328



3,5-di-*O*-allyl-4-*O*-allyloxycarbonyl-2-palmitoyl-D-*myo*-inositol-1-diallyl phosphate (75)

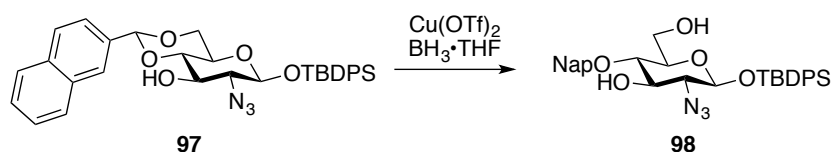
To a stirred solution of **95** (259 mg, 0.31 mmol) in CH_2Cl_2 (15 mL) and MeOH (15 mL) was added hydrazine acetate (62.4 mg, 0.68 mmol). After stirring for over night the mixture was concentrated under

reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography (toluene/ethyl acetate = 4/1) to afford **75** (222 mg, 97% yield) as a white solid. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.71-5.99 (m, 6H), 5.35-5.40 (m, 3H), 5.21-5.29 (m, 5H), 5.16 (q, 2H, J = 5.0 Hz), 5.06 (t, 1H, J = 10.0 Hz), 4.66 (d, 2H, J = 5.4 Hz), 4.51-4.62 (m, 4H), 4.28-4.33 (m, 2H), 4.21 (q, 1H, J = 6.2 Hz), 4.11 (dd, 1H, J = 12.9, 5.1 Hz), 4.03 (td, 1H, J = 9.5, 2.8 Hz), 3.90 (q, 1H, J = 6.2 Hz), 3.45 (dd, 1H, J = 10.2, 2.9 Hz), 3.33 (t, 1H, J = 9.5 Hz), 3.12 (d, 1H, J = 2.9 Hz), 2.37 (td, 2H, J = 7.6, 4.6 Hz), 1.60 (q, 2H, J = 7.2 Hz), 1.27 (d, 24H, J = 13.2 Hz), 0.83-0.88 (m, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 172.75, 154.56, 134.59, 133.87, 132.25, 131.57, 119.07, 118.57, 117.70, 117.48, 79.94, 76.96, 76.49, 76.43, 74.81, 74.33, 72.33, 70.90, 68.91, 68.86, 68.76, 68.67, 68.61, 67.93, 34.29, 32.02, 29.79, 29.58, 29.45, 29.38, 29.10, 25.12, 22.78, 14.22; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{63}\text{NaO}_{12}\text{P}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 765.3949; found: 765.3958



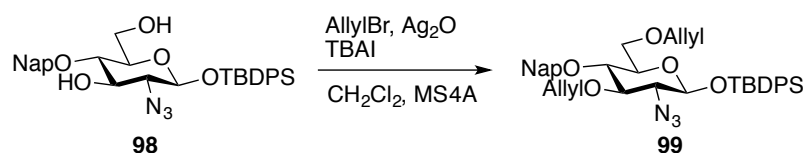
2-azido-1-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl-4,6-*O*-naphthylidene-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (**97**)

To a stirred solution of **96** (2.7 g, 4.74 mmol) in MeOH/toluene (4/1) (25 mL) was added 1 M NaOMe in MeOH (950 μL , 0.95 mmol) and the mixture was stirred for 2 h. To the reaction mixture was added IRA-120 (H^+), and the mixture was filtered and concentrated under reduced pressure. To a solution of the residue in DMF (9.5 mL) were added 2-naphthaldehyde (1.3 g, 9.48 mmol), *p*-toluene sulfonic acid monohydrate (285 mg, 1.66 mmol), and $\text{CH}(\text{OMe})_3$ (1 mL, 9.48 mmol) and the solution was heated to 70 $^\circ\text{C}$. After stirring for over night, the reaction was quenched with Et_3N (250 μL) and the mixture was extracted with Et_2O . The extract was washed with water and brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 6/1) to afford **97** (2.03 g, 74% yield) as colorless oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.89 (s, 1H), 7.79-7.83 (m, 3H), 7.70-7.72 (m, 4H), 7.36-7.52 (m, 9H), 5.61 (s, 1H), 4.52 (d, 1H, J = 7.7 Hz), 4.01 (q, 1H, J = 5.2 Hz), 3.64 (t, 1H, J = 10.3 Hz), 3.52-3.59 (m, 2H), 3.46 (dd, 1H, J = 9.1, 8.0 Hz), 3.04 (dt, 1H, J = 14.0, 4.9 Hz), 2.66 (d, 1H, J = 1.8 Hz), 1.13 (s, 9H); HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{NaO}_5\text{Si}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 580.5010; found: 580.5012



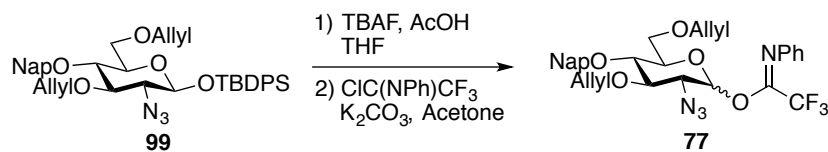
2-azido-1-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl-4-*O*-naphthylmethyl-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (**98**)

97 (500 mg, 0.86 mmol) was dissolved with $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ (4.3 mL, 4.30 mmol) at 0 °C. To the mixture was added $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ (49 mg, 0.13 mmol) and the mixture was stirred at 0 °C for over night. The reaction was quenched with Et_3N (610 μL) and MeOH (1.7 mL) and then the mixture was concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 6/1) to afford **98** (449 mg, 90%) as a colorless oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.78-7.82 (m, 3H), 7.69-7.72 (m, 5H), 7.36-7.49 (m, 9H), 4.89 (d, 1H, $J = 11.6$ Hz), 4.79 (d, 1H, $J = 11.6$ Hz), 4.54-4.57 (m, 1H), 3.33-3.53 (m, 5H), 2.97 (ddd, 1H, $J = 9.2, 5.1, 2.8$ Hz), 2.40-2.42 (m, 1H), 1.11 (s, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 135.76, 135.73, 135.30, 133.93, 133.30, 133.13, 132.48, 130.22, 130.05, 128.56, 128.02, 127.90, 127.82, 127.58, 126.94, 126.36, 126.21, 125.81, 97.01, 77.22, 75.18, 74.84, 69.03, 61.87, 26.85, 19.11; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{NaO}_5\text{Si}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 606.2395; found: 606.2409



3,6-O-allyl-2-azido-1-O-tert-butylidiphenylsilyl-4-O-naphthylmethyl-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (99**)**

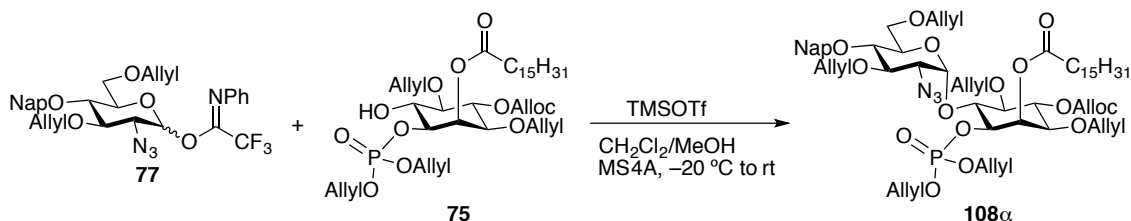
The mixture of **98** (100 mg, 0.17 mmol), allyl bromide (74 μL , 0.86 mmol), tetra-butyl ammonium iodide (6.3 mg, 17.1 μmol), and activated MS4A (350 mg) in CH_2Cl_2 was stirred for 30 min at room temperature. To the mixture was added Ag_2O (230 mg, 0.99 mmol) and the mixture was stirred for over night under dark. To the mixture were added allyl bromide (37 μL , 0.43 mmol) and Ag_2O (115 mg, 0.50 mmol) and the mixture stirred for 1d. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified with silica gel column chromatography to afford **99** (77 mg, 68% yield) as a colorless oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.71-7.81 (m, 9H), 7.31-7.48 (m, 10H), 5.91-6.01 (m, 1H), 5.71-5.81 (m, 1H), 5.25-5.31 (m, 1H), 5.07-5.18 (m, 3H), 4.94 (d, 1H, $J = 11.2$ Hz), 4.77 (d, 1H, $J = 11.3$ Hz), 4.27-4.35 (m, 3H), 3.88 (ddt, 1H, $J = 13.1, 5.4, 1.5$ Hz), 3.76 (ddt, 1H, $J = 13.1, 5.5, 1.5$ Hz), 3.61-3.65 (m, 1H), 3.52 (dd, 1H, $J = 11.3, 4.0$ Hz), 3.42-3.46 (m, 1H), 3.21 (dd, 1H, $J = 9.9, 9.0$ Hz), 2.97 (ddd, 1H, $J = 9.9, 4.0, 1.7$ Hz), 1.12 (s, 9H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 136.09, 136.07, 135.76, 134.94, 134.83, 133.43, 133.38, 133.09, 132.67, 130.03, 129.77, 128.25, 128.01, 127.80, 127.71, 127.45, 126.62, 126.24, 126.06, 125.97, 117.30, 116.74, 96.91, 83.00, 77.71, 75.07, 74.99, 74.33, 72.56, 68.82, 68.35, 26.91, 19.27. HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{NaO}_5\text{Si}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 686.3021; found: 686.3025



N-phenyltrifluoroacetoimidoyl 3,6-*O*-allyl-2-azido

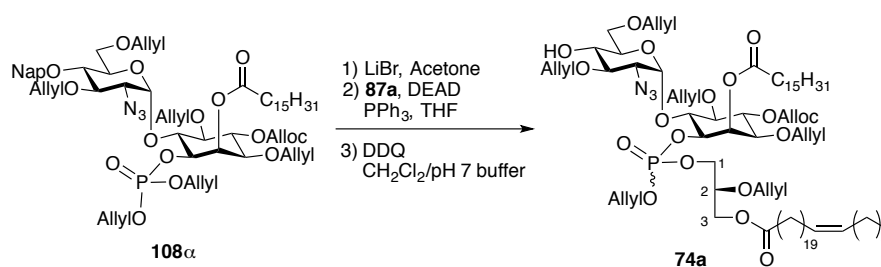
-4-*O*-naphthylmethyl-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (**99**)

To a stirred solution of **99** (100 mg, 0.15 mmol) and AcOH (43 μ L, 0.75 mmol) in THF (3.5 mL) at -10 °C was added TBAF (1 M in THF) (380 μ L, 0.38 mmol). After stirring for 3 h at -10 °C, H₂O was added to the reaction mixture and the mixture was extracted with CHCl₃. The extract was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 3/1) to afford hemiacetal. The hemiacetal and K₂CO₃ (17 mg, 0.12 mmol) were dissolved with acetone (770 μ L) and then added ClC(NPh)CF₃ (24 μ L, 0.15 mmol). After stirring for 2.5 h, the reaction was filtered and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 10/1) to afford **77** (61 mg, quant) as a colorless oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.76-7.86 (m, 4H), 7.36-7.57 (m, 3H), 7.25-7.34 (m, 2H), 7.08-7.12 (m, 1H), 6.83-6.90 (m, 2H), 5.83-6.07 (m, 2H), 5.16-5.36 (m, 5H), 4.98-5.08 (m, 1H), 4.80-4.86 (m, 1H), 4.32-4.47 (m, 2H), 3.63-4.07 (m, 7H), 3.40 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 143.34, 135.40, 134.45, 134.32, 133.39, 133.17, 128.90, 128.40, 128.03, 127.84, 126.81, 126.36, 126.22, 125.96, 124.59, 119.41, 117.80, 117.68, 117.53, 95.78, 82.81, 80.14, 75.91, 75.47, 75.27, 74.55, 73.47, 72.57, 68.02, 65.26, 62.87. C₃₁H₃₁F₃N₄NaO₅ [M+Na]⁺, 619.2139; found: 619.2143.



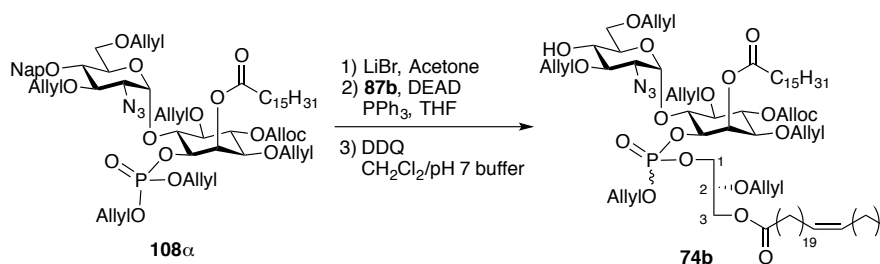
108α: **77** (47.3 mg, 79.3 μ mol) and **75** (29.4 mg, 39.6 μ mol) were co-evaporated with toluene three times and dried highly under vacuum. The residue was dissolved with Et₂O/CH₂Cl₂ (1/1) (420 μ L) and MS4A (50 mg) was added. The mixture was then cooled to -20 °C. To the mixture was added TBSOTf (0.1 M in Et₂O/CH₂Cl₂ (1/1)) (79.2 μ L, 7.92 μ mol) at -20 °C and the mixture was stirred at room temperature for 3 h. The reaction was quenched with Et₃N (20 μ L) and then the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography (toluene/ethyl acetate = 15/1 to 10/1) to afford α/β mixture of **108** (41.1 mg, 90% yield, α/β = 9/1) and then separated α/β mixture (hexane/ethyl acetate = 4/1 (0.5% HFIP)) as colorless oil. α -anomer (**108α**): ¹H NMR (400 MHz,

CDCl₃) δ 7.79-7.86 (m, 3H), 7.75 (s, 1H), 7.40-7.51 (m, 4H), 5.71-6.03 (m, 8H), 5.52 (d, 1H, J = 3.7 Hz), 5.33-5.39 (m, 3H), 5.23-5.30 (m, 6H), 5.13-5.20 (m, 4H), 5.00-5.08 (m, 3H), 4.81 (d, 1H, J = 11.6 Hz), 4.47-4.65 (m, 7H), 4.35-4.37 (m, 2H), 4.18-4.26 (m, 3H), 4.11-4.18 (m, 2H), 4.06 (dd, 1H, J = 12.7, 5.6 Hz), 3.85-3.91 (m, 3H), 3.76-3.81 (m, 1H), 3.63-3.71 (m, 2H), 3.43 (dd, 1H, J = 10.2, 2.6 Hz), 3.34-3.39 (m, 1H), 3.27 (dd, 1H, J = 10.1, 3.7 Hz), 2.35-2.44 (m, 2H), 1.61 (dd, 2H, J = 14.3, 7.0 Hz), 1.26-1.35 (m, 24H), 0.88 (t, 3H, J = 6.8 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.49, 154.56, 136.17, 134.68, 134.49, 133.89, 133.35, 132.96, 132.34, 131.54, 128.03, 127.89, 127.79, 126.23, 125.95, 125.90, 125.57, 119.12, 118.61, 118.49, 118.11, 117.63, 117.50, 96.99, 79.52, 78.69, 78.02, 77.61, 75.24, 74.79, 74.68, 74.17, 72.46, 70.73, 70.33, 68.77, 68.70, 68.54, 68.49, 68.21, 68.16, 63.03, 34.22, 32.02, 29.80, 29.76, 29.61, 29.46, 29.38, 29.11, 25.06, 22.78, 14.23; HRMS (ESI-QTOF) calcd for C₆₁H₈₈N₃NaO₁₆P [M+Na]⁺, 1172.5794; found: 1172.5829

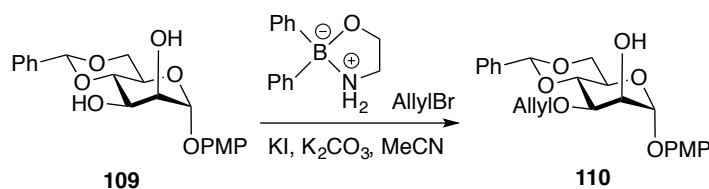


74a: To a stirred solution of **108α** (30 mg, 26.1 μ mol) in acetone (1 mL) was added lithium bromide (11 mg, 0.13 mmol) and the mixture was heated to reflux. After stirring for 11 h, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography (toluene/ethyl acetate = 3/1 then CH₂Cl₂/MeOH = 6/1) to afford Li salt. The Li salt was dissolved minimal amount of MeOH and passed through Dowex 50WX to convert to acid form. The resulting phosphoric acid, **87a** (44 mg, 78.2 mmol), and PPh₃ (34 mg, 0.13 mmol) were dissolved with THF (500 μ L). To the mixture was added DEAD (60 μ L, 0.13 mmol) and the mixture was heated to 40 °C. After stirring for over night, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was roughly purified with silica gel column chromatography (toluene/ethyl acetate = 25/1 to 10/1) to afford oil containing desired material. The oil was dissolved with CH₂Cl₂ (900 μ L) and pH 7 phosphate buffer (100 μ L). To the mixture was added DDQ (17.5 mg, 78.2 mmol) and the mixture was stirred for over night. The reaction was extracted with CH₂Cl₂. The extract was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography (toluene/ethyl acetate = 10/1 to 5/1) to afford **74a** (12.8 mg, 32% yield, ~1:1 diastereomixture) as a colorless oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.73-6.05 (m, 8H), 5.45-5.46 (m, 1H), 5.13-5.39 (m, 14H), 5.05 (t, 1H, J = 9.8 Hz), 4.46-4.65 (m, 5H), 4.32-4.39 (m, 2H), 3.97-4.29 (m, 15H), 3.88 (dd, 1H, J = 13.0, 5.8 Hz), 3.71-3.78 (m, 4H), 3.58-3.64 (m,

1H), 3.44 (dt, 1H, $J = 10.2, 2.5$ Hz), 3.36 (td, 1H, $J = 9.7, 1.9$ Hz), 3.18 (dd, 1H, $J = 9.9, 3.4$ Hz), 2.77 (d, 1H, $J = 9.1$ Hz), 2.30-2.41 (m, 4H), 2.01 (dd, 4H, $J = 12.0, 6.4$ Hz), 1.61 (s, 4H), 1.25 (68H), 0.86-0.90 (m, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 173.58, 172.49, 154.55, 134.81, 134.47, 134.32, 134.00, 133.89, 132.33, 131.54, 129.99, 119.13, 118.65, 118.02, 117.76, 117.49, 97.20, 97.12, 79.01, 78.79, 75.05, 74.71, 73.91, 73.81, 72.63, 72.47, 72.29, 71.36, 71.30, 70.75, 69.92, 69.80, 69.56, 68.78, 62.52, 62.47, 34.22, 32.02, 29.81, 29.61, 29.41, 29.27, 29.14, 27.30, 25.16, 24.97, 22.78, 14.21; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{83}\text{H}_{142}\text{N}_3\text{NaO}_{19}\text{P}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1538.9867; found: 1538.9813



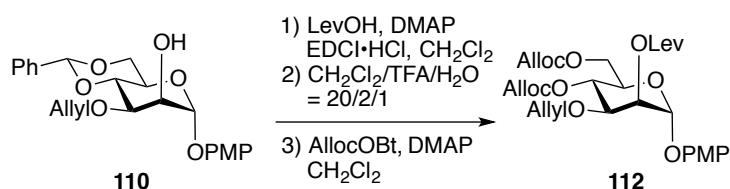
74b: In a manner similar to the synthesis of **74a**, **108α** (30 mg, 26.1 μmol) was converted into **74b** (11 mg, 28% yield, ~1:1 diastereomixture) as a colorless oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.71-6.05 (m, 8H), 5.45 (d, 1H, $J = 3.3$ Hz), 5.12-5.38 (m, 14H), 5.05 (t, 1H, $J = 9.9$ Hz), 4.49-4.69 (m, 5H), 3.98-4.37 (m, 15H), 3.88 (dd, 1H, $J = 12.8, 5.9$ Hz), 3.72-3.76 (m, 4H), 3.55-3.64 (m, 1H), 3.44 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz), 3.35-3.40 (m, 1H), 3.18 (s, 1H), 2.82 (s, 1H), 2.30-2.45 (m, 4H), 1.99-2.02 (m, 4H), 1.61 (s, 4H), 1.25-1.35 (m, 68H), 0.86-0.92 (m, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 173.57, 172.45, 154.54, 134.80, 134.43, 134.32, 133.99, 133.88, 132.36, 131.53, 129.98, 119.11, 118.64, 118.03, 117.74, 117.46, 97.18, 78.99, 78.79, 78.48, 77.45, 77.13, 76.80, 75.04, 74.71, 73.91, 73.81, 72.62, 72.30, 70.74, 69.80, 69.52, 68.77, 64.23, 62.62, 62.46, 62.33, 34.21, 32.01, 29.85, 29.80, 29.65, 29.60, 29.40, 29.26, 29.12, 27.29, 25.14, 25.05, 24.96, 22.77, 14.49, 14.21; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{83}\text{H}_{142}\text{N}_3\text{NaO}_{19}\text{P}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1538.9867; found: 1538.9890



3-*O*-allyl-1-*O*-(*p*-methoxyphenyl)-4,6-*O*-benzylidene- α -D-mannopyranoside (**110**)

110: The solution of **109** (2.38 mg, 6.35 mmol), 2-aminoethyl diphenyl borinate (143 mg, 0.64 mmol), KI (1.05 g, 6.35 mmol), K_2CO_3 (0.97 g, 6.99 mmol) and allyl bromide (8.22 mL, 95 mmol) in MeCN (31 mL) was warmed up to 60 $^\circ\text{C}$. After stirring for 1 day, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate

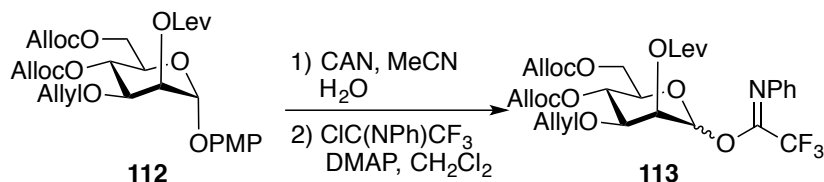
and washed with water and brine. Combined organic phase was dried over Na₂SO₄, and filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 2/1) to afford (1.49 g, 57%) as colorless oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.47-7.49 (m, 2H), 7.35-7.39 (m, 3H), 6.97-6.99 (m, 2H), 6.82-6.85 (m, 2H), 5.90-6.00 (m, 1H), 5.59 (s, 1H), 5.51 (s, 1H), 5.34 (dd, 1H, *J* = 17.2, 1.5 Hz), 5.22 (d, 1H, *J* = 10.4 Hz), 4.37 (dd, 1H, *J* = 12.8, 5.3 Hz), 4.23-4.28 (m, 2H), 4.19 (dd, 1H, *J* = 10.2, 4.7 Hz), 4.12 (t, 1H, *J* = 9.5 Hz), 3.95-4.04 (m, 2H), 3.79-3.84 (m, 1H), 3.73-3.76 (m, 3H), 2.91 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 155.22, 149.91, 137.57, 134.61, 128.35, 126.17, 117.80, 117.66, 114.74, 101.77, 98.86, 78.82, 75.15, 72.18, 70.12, 68.80, 63.98, 55.75; HRMS (ESI-QTOF) calcd for C₂₃H₂₆NaO₇ [M+Na]⁺, 437.1571; found: 437.1574



3-*O*-allyl-4,6-*O*-allyloxycarbonyl-1-*O*-(*p*-methoxyphenyl)-2-*O*-levulinoyl- α -D-mannopyranoside (112)

To a stirred solution of **110** (2.18 g, 5.26 mmol) in CH₂Cl₂ (21 mL) were added DMAP (321 mg, 2.63 mmol), levulinic acid (1.64 mL, 15.8 mmol), and EDCI·HCl (3.5 g, 18.4 mmol). After stirring for 9 h, the reaction mixture was extracted with CH₂Cl₂. The extract was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved with CH₂Cl₂ (46 mL) and H₂O (2.3 mL) and cooled to 0 °C. To the reaction mixture was added TFA (4.6 mL) at 0 °C and stirred for 1.5 h. The reaction was quenched with saturated NaHCO₃ aq. and the mixture was extracted with CH₂Cl₂. The extract was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 1/3) to afford diol (1.82 g, 82% yield for steps) as a colorless oil. To a stirred solution of the diol (1.39 g, 3.77 mmol) in CH₂Cl₂ (25 mL) were added AllocOBt (4.96 g, 22.6 mmol) and DMAP (2.76 g, 22.6 mmol). After stirring for 2 h, the reaction mixture was washed with saturated NaHCO₃ aq. and brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 2/1) to afford **112** (1.92 g, 99% yield) as a colorless oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.95-6.99 (m, 2H), 6.76-6.83 (m, 2H), 5.79-6.00 (m, 3H), 5.45 (dd, 1H, *J* = 3.1, 2.0 Hz), 5.24-5.39 (m, 6H), 5.15-5.20 (m, 1H), 5.07 (t, 1H, *J* = 10.0 Hz), 4.59-4.70 (m, 4H), 4.34 (dd, 1H, *J* = 11.9, 5.4 Hz), 4.22-4.28 (m, 1H), 4.10-4.17 (m, 2H), 3.95-4.08 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 2.68-2.80 (m, 4H), 2.20 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.43, 171.86, 155.49, 154.79, 154.36, 149.79, 134.14, 131.61,

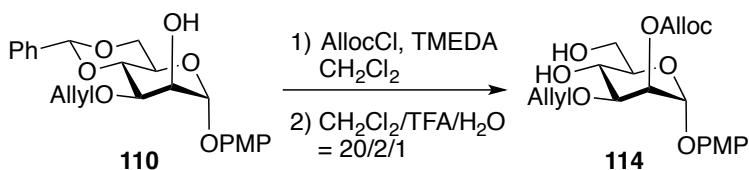
131.38, 119.14, 118.85, 118.02, 117.50, 114.74, 96.91, 74.34, 71.69, 70.83, 68.98, 68.83, 68.72, 68.56, 65.99, 55.69, 38.05, 29.85, 28.23; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $C_{29}H_{36}NaO_{13}$ $[M+Na]^+$, 615.2048; found: 615.2059



N-phenyltrifluoroacetimidoyl

3-*O*-allyl-4,6-*O*-allyloxycarbonyl-2-*O*-levulinoyl- α -D-mannopyranoside (**113**)

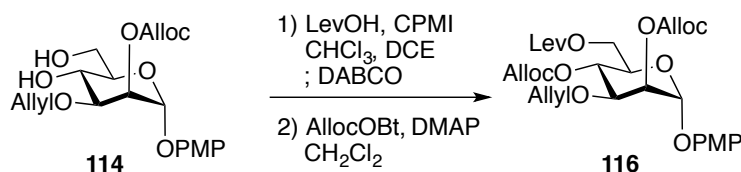
To a stirred solution of **112** (144 mg, 0.17 mmol) in MeCN (3.5 mL) and H_2O (3.5 mL) was added CAN (445 mg, 0.81 mmol) and the mixture was stirred for 3 h. The mixture poured into brine and extracted with ethyl acetate. The extract was washed with water, dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 2/1) to afford the desired alcohol containing material as yellow oil. The oil and $ClC(NPh)CF_3$ (82 μ L, 0.52 mmol) were dissolved in CH_2Cl_2 (4.3 mL). To the mixture was added DMAP (48 mg, 0.39 mmol) and the mixture was stirred for 4.5 h. The solvent was removed under reduced pressure. The crude mixture was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 5/1 to 4/1) to afford **113** (117 mg, 91% yield) as a colorless oil. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.29-7.33 (m, 2H), 7.09-7.14 (m, 1H), 6.82-6.86 (m, 2H), 5.75-5.99 (m, 3H), 5.34-5.45 (m, 3H), 5.23-5.31 (m, 4H), 5.19 (ddd, 1H, J = 10.4, 7.6, 1.5 Hz), 4.97-5.09 (m, 1H), 4.59-4.73 (m, 4H), 4.28-4.42 (m, 2H), 3.93-4.16 (m, 3H), 2.67-2.82 (m, 4H), 2.19 (d, 3H, J = 1.8 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 206.22, 206.05, 171.60, 154.78, 154.24, 143.02, 133.85, 133.72, 131.51, 131.23, 129.42, 128.87, 124.67, 120.58, 119.44, 119.33, 119.07, 118.02, 93.72, 75.86, 73.95, 72.96, 71.27, 71.11, 70.77, 70.65, 69.21, 69.16, 68.85, 67.23, 66.19, 65.96, 65.83, 53.54, 38.11, 37.98, 29.82, 28.10; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $C_{30}H_{34}F_3NNaO_{12}$ $[M+Na]^+$, 680.1925; found: 680.1933



3-*O*-allyl-2-*O*-allyloxycarbonyl-1-*O*-(*p*-methoxyphenyl)- α -D-mannopyranoside (**114**)

To a stirred solution of **110** (1.8 g, 4.35 mmol) in CH_2Cl_2 (14 mL) was added TMEDA (664 μ L, 13.0

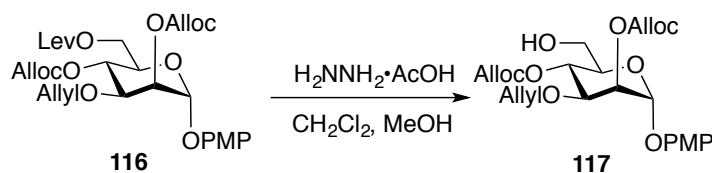
mmol) and then AllocCl (1.4 mL, 13.0 mmol). After stirring for over night, the reaction was quenched with 10% citric acid aq. and the mixture was extracted with CH₂Cl₂. The extract was washed with saturated NaHCO₃ aq., water, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved with CH₂Cl₂ (38.7 mL) and H₂O (1.9 mL) and then cooled to 0°C. To the mixture was added TFA (3.87 mL) and the mixture was stirred for 1 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was subjected to silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 1/1) to afford **114** (1.52 g, 85% yield for 2 steps) as a colorless oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.96-7.00 (m, 2H), 6.81-6.85 (m, 2H), 5.89-5.99 (m, 2H), 5.49 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 5.31-5.40 (m, 2H), 5.27-5.30 (m, 2H), 5.22-5.25 (m, 1H), 4.64-4.65 (m, 2H), 4.27 (ddt, 1H, *J* = 12.5, 5.5, 1.4 Hz), 4.06-4.11 (m, 1H), 3.99 (td, 1H, *J* = 9.3, 2.3 Hz), 3.91 (dd, 1H, *J* = 9.4, 3.1 Hz), 3.81-3.87 (m, 3H), 3.77 (s, 3H), 2.77 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz), 2.11 (t, 1H, *J* = 6.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 155.46, 154.54, 149.84, 134.23, 131.32, 119.35, 118.13, 118.05, 114.79, 97.25, 72.73, 71.77, 70.86, 69.06, 66.77, 62.47, 55.73; HRMS (ESI-QTOF) calcd for C₂₀H₂₆NaO₉ [M+Na]⁺, 433.1469; found: 433.1467



3-*O*-allyl-2,4-di-*O*-allyloxycarbonyl-6-*O*-levulinoyl-1-*O*-(*p*-methoxyphenyl)-α-*D*-mannopyranoside (**116**)

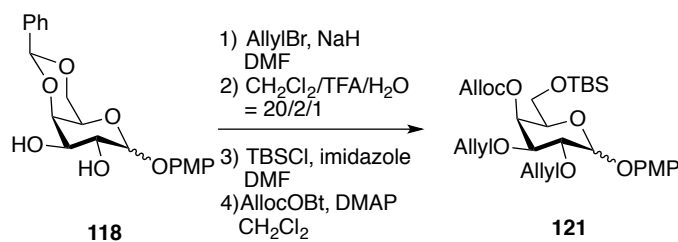
To a stirred solution of **114** (1.28 g, 3.12 mmol) and levulinic acid (635 μL, 6.24 mmol) in 1,2-dichloroethane (10 mL) and chloroform (2 mL) was added 2-chloro-1-methylpyridinium iodide (1.59 g, 6.24 mmol) and the mixture was stirred for 30 min. To the reaction mixture was added DABCO (1.14 g, 9.36 mmol) and the mixture was stirred for 9 h. The reaction mixture was filtered through a pad of Celite and washed with water, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 2/1) to afford 6-*O*-levulinoyl ester. The resulting compound and DMAP (1.14 g, 9.33 mmol) were dissolved in CH₂Cl₂ (15 mL) and then cooled to 0 °C. To the mixture was added AllocOBt (2.04 g, 9.33 mmol) at 0 °C and the mixture was stirred for over night. The mixture was quenched with 10% citric acid aq. and extracted with CH₂Cl₂. The extract was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 2.5/1) to afford **116** (1.20 g, 65% yield) as a colorless oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.95-7.00 (m, 2H), 6.81-6.84 (m, 2H), 5.82-5.99 (m, 3H), 5.44-5.53 (m, 1H), 5.25-5.41 (m, 6H), 5.20 (d, 1H, *J* = 10.4 Hz), 5.11 (t, 1H, *J* =

9.9 Hz), 4.56-4.71 (m, 4H), 4.15-4.30 (m, 3H), 4.04-4.09 (m, 3H), 3.77 (s, 3H), 2.72 (t, 2H, $J = 6.7$ Hz), 2.55-2.62 (m, 2H), 2.16 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 206.57, 172.30, 155.53, 154.49, 154.25, 149.65, 134.11, 131.37, 131.28, 119.35, 119.17, 117.94, 117.63, 114.74, 96.69, 74.45, 72.20, 71.54, 71.18, 69.11, 69.06, 68.98, 62.58, 55.72, 37.93, 29.89, 28.00; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{NaO}_9$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 433.1469; found: 433.1467



3-*O*-allyl-2,4-di-*O*-allyloxycarbonyl-1-*O*-(*p*-methoxyphenyl)- α -D-mannopyranoside (**117**)

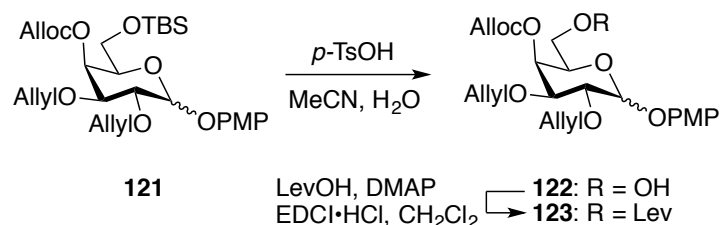
To a stirred solution of **116** (1.16 g, 1.96 mmol) in CH_2Cl_2 (98 mL) and MeOH (98 mL) was added hydrazine acetate (216 mg, 2.35 mmol) and the mixture was stirred for 12 h. The solvent was removed under reduced pressure. The crude mixture was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 2.5/1) to afford **117** (1.09 g, quant) as a colorless oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.97-7.01 (m, 2H), 6.77-6.87 (m, 2H), 5.83-5.99 (m, 3H), 5.54 (d, 1H, $J = 10.8$ Hz), 5.39-5.40 (m, 1H), 5.25-5.36 (m, 6H), 5.20 (d, 1H, $J = 10.4$ Hz), 5.12 (t, 1H, $J = 10.0$ Hz), 4.57-4.73 (m, 4H), 4.22 (dd, 1H, $J = 13.0, 5.3$ Hz), 4.03-4.15 (m, 2H), 3.87-3.91 (m, 1H), 3.74-3.80 (m, 3H), 3.64-3.73 (m, 2H), 2.30 (t, 1H, $J = 6.9$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 155.48, 155.00, 154.53, 149.67, 134.24, 131.27, 119.31, 117.85, 117.58, 114.81, 96.77, 74.18, 72.40, 71.67, 71.37, 71.26, 69.09, 61.31, 55.72; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{NaO}_{11}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 517.1680; found: 517.1688



2,3-di-*O*-allyl-4-*O*-allyloxycarbonyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-1-*O*-(*p*-methoxyphenyl)- $\alpha\beta$ -D-mannopyranoside (**121**)

To a stirred mixture of **118** (6.33 g, 16.9 mmol) in DMF (37 mL) at 0 °C was added NaH (1.72 g, 43.0 mmol) and allyl bromide (3.5 mL, 20.7 mmol). After stirring for 6h, the reaction was quenched with H_2O and extracted with diethyl ether. The extract was washed with H_2O and brine, and dried over Na_2SO_4 , and concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography

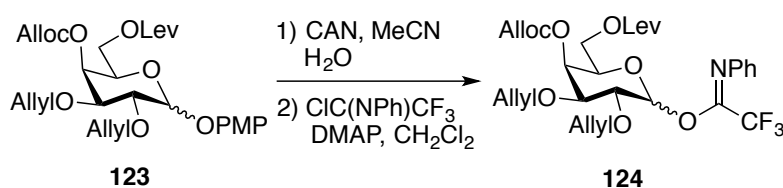
(hexane/ethyl acetate = 3/1 to 2/1) to afford di-allyl ether (7.27 g, 95%) as a white solid. To a stirred mixture of di-allyl ether (2.0 g, 4.40 mmol) in CH₂Cl₂ (38 mL) and H₂O (1.9 mL) at 0 °C was added TFA (3.8 mL). After stirring for 3 h, the reaction was quenched with saturated NaHCO₃ aq. and extracted with CH₂Cl₂. The extract was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 1/1) to afford diol (1.48 g, 93% yield) as a colorless oil. To a stirred solution of the diol (1.23 mg, 3.36 mmol) in DMF (22.4 mL) were added imidazole (576 mg, 8.39 mmol) and TBSCl (1.27 g, 8.39 mmol). After stirring for 30 min, the reaction was quenched with MeOH and extracted with Et₂O. The extract was washed with water, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 8/1) to afford 6-O-TBS ether (1.53 g, 95% yield) as a colorless oil. The TBS ether (1.46 g, 3.04 mmol) and DMAP (1.1 g, 9.12 mmol) were dissolved in CH₂Cl₂ (20 mL) and then cooled to 0 °C. To the mixture was added AllocOBt (2.00 g, 9.12 mmol) at 0 °C and the mixture was stirred for over night. The mixture was quenched with 10% citric acid aq. and extracted with CH₂Cl₂. The extract was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 8/1) to afford **121** (1.86 g, quant, α/β = 1/1 mixture) as a colorless oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.03-7.07 (m, 2H), 6.98-7.02 (m, 2H), 6.78-6.83 (m, 4H), 5.85-5.99 (m, 6H), 5.44 (d, 1H, *J* = 3.8 Hz), 5.33-5.35 (m, 2H), 5.24-5.39 (m, 12H), 5.24-5.32 (m, 7H), 5.13-5.18 (m, 4H), 4.78 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 4.62-4.65 (m, 6H), 4.41 (ddt, 1H, *J* = 12.5, 5.6, 1.3 Hz), 4.22-4.33 (m, 4H), 4.06-4.17 (m, 4H), 4.00 (dd, 1H, *J* = 10.1, 3.1 Hz), 3.82 (dd, 1H, *J* = 10.0, 3.7 Hz), 3.68-3.76 (m, 9H), 3.62-3.66 (m, 3H), 3.50 (dd, 1H, *J* = 9.6, 3.4 Hz), 0.87 (s, 9H), 0.85 (s, 9H), 0.02 (s, 3H), 0.02 (s, 3H); HRMS (ESI-QTOF) calcd for C₂₉H₄₄NaO₉Si [M+Na]⁺, 587.2647; found: 587.2658



2,3-di-*O*-allyl-2-*O*-allyloxycarbonyl-6-*O*-levulinoyl -1-*O*-(*p*-methoxyphenyl)-αβ-*D*-mannopyranoside (**121**)

To a stirred solution of **121** (1.66 g, 2.94 mmol) in CHCl₃ (20 mL) and MeOH (10 mL) was added *p*-toluene sulfonic acid monohydrate (253 mg, 1.47 mmol). After stirring for 5 h, the reaction was quenched with saturated NaHCO₃ aq. and the mixture was extracted with CHCl₃. The extract was washed

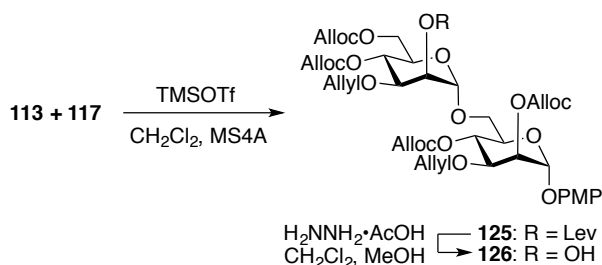
with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 2/1) to afford **α-122** (552 mg, 39% yield) and **β-122** (552 mg, 39% yield) as a colorless oil, respectively. To a stirred solution of **α-122** (452 mg, 1.00 mmol), levulinic acid (292 μL, 2.88 mmol) and DMAP (70 mg, 0.58 mmol) in CH₂Cl₂ (4.6 mL) was added EDCI•HCl (661 mg, 3.45 mmol). After stirring for over night, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 2/1) to afford **α-123** (514 mg, 93% yield) as a colorless oil. **α-123**: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.02-7.07 (m, 2H), 6.80-6.85 (m, 2H), 5.86-6.00 (m, 3H), 5.47 (d, 1H, *J* = 3.6 Hz), 5.27-5.40 (m, 5H), 5.15-5.20 (m, 2H), 4.64-4.66 (m, 2H), 4.12-4.33 (m, 7H), 4.00 (dd, 1H, *J* = 10.0, 3.4 Hz), 3.84 (dd, 1H, *J* = 10.0, 3.6 Hz), 3.77 (s, 3H), 2.41-2.72 (m, 4H), 2.15 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.47, 172.27, 155.34, 154.78, 150.83, 134.88, 134.64, 131.51, 118.99, 118.66, 117.43, 117.11, 114.59, 97.53, 75.40, 75.13, 72.90, 72.19, 71.32, 68.90, 67.17, 62.52, 55.71, 37.87, 29.85, 27.84; **β-123**: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.98-7.02 (m, 2H), 6.79-6.84 (m, 2H), 5.85-6.01 (m, 3H), 5.26-5.40 (m, 5H), 5.22 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz), 5.17 (td, 2H, *J* = 10.4, 1.7 Hz), 4.79 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz), 4.65 (d, 2H, *J* = 5.3 Hz), 4.41 (ddt, 1H, *J* = 12.5, 5.7, 1.4 Hz), 4.15-4.34 (m, 5H), 4.10 (ddt, 1H, *J* = 12.8, 5.6, 1.4 Hz), 3.82-3.86 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.70 (dd, 1H, *J* = 9.6, 7.8 Hz), 3.52 (dd, 1H, *J* = 9.6, 3.4 Hz), 2.73-2.76 (m, 2H), 2.57 (t, 2H, *J* = 6.2 Hz), 2.17 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.61, 172.42, 155.49, 154.85, 151.49, 135.12, 134.54, 131.51, 118.80, 117.36, 116.88, 114.54, 102.87, 78.58, 78.03, 74.30, 71.48, 70.89, 70.62, 68.84, 62.14, 55.74, 38.00, 29.87, 27.93; HRMS (ESI-QTOF) calcd for C₂₈H₃₆NaO₁₁ [M+Na]⁺, 571.2150; found: 571.2153



***N*-phenyltrifluoroacetoimidoyl 2,3-di-*O*-allyl-4-*O*-allyloxycarbonyl-6-*O*-levulinoyl-**αβ**-D-mannopyranoside (**124**)**

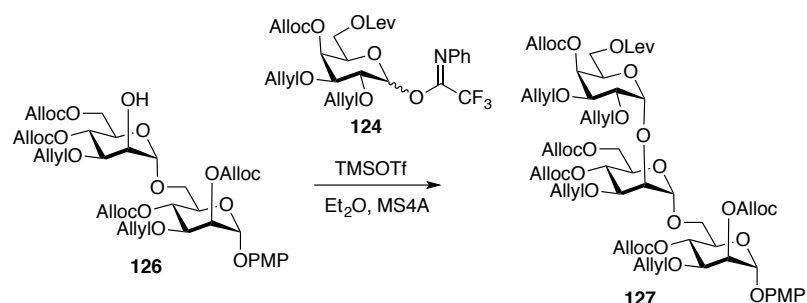
To a stirred solution of **123** (100 mg, 0.18 mmol) in MeCN (2.3 mL) and H₂O (2.3 mL) was added CAN (300 mg, 0.55 mmol). After stirring for over night, the reaction mixture was poured into brine and extracted with ethyl acetate. The extract was washed with water, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 2/3) to afford hemiacetal (53.5 mg, 66% yield) as yellow oil. To the solution of the oil and ClC(NPh)CF₃ (51 μL, 0.33 mmol) in CH₂Cl₂ (2.2 mL) was added DMAP (30 mg, 0.24 mmol).

After stirring for 8 h, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 4/1) to afford **124** (65 mg, 88% yield, ~1:1.1 of $\alpha\beta$ mixture) as a colorless oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.27-7.32 (m, 2H), 7.11 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz), 6.83 (d, 2H, $J = 7.4$ Hz), 5.83-6.02 (m, 3H), 5.17-5.40 (m, 8H), 4.65 (dt, 2H, $J = 4.3, 1.4$ Hz), 4.06-4.26 (m, 7H), 3.85-3.88 (m, 1H), 3.53 (s, 1H), 2.47-2.78 (m, 4H), 2.18 (s, 1.5 H), 2.14 (s, 1.36 H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 206.57, 206.50, 172.36, 172.31, 154.68, 154.63, 151.18, 143.51, 134.60, 134.51, 134.37, 134.31, 131.42, 129.43, 128.84, 126.37, 124.40, 120.59, 119.49, 119.28, 119.12, 119.04, 117.50, 117.40, 117.21, 78.61, 74.83, 74.44, 74.32, 72.81, 71.62, 71.42, 71.25, 70.63, 69.21, 69.01, 68.97, 62.19, 61.73, 37.94, 29.85, 29.81, 27.88; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{F}_3\text{NNaO}_{10}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 636.2027; found: 636.2030

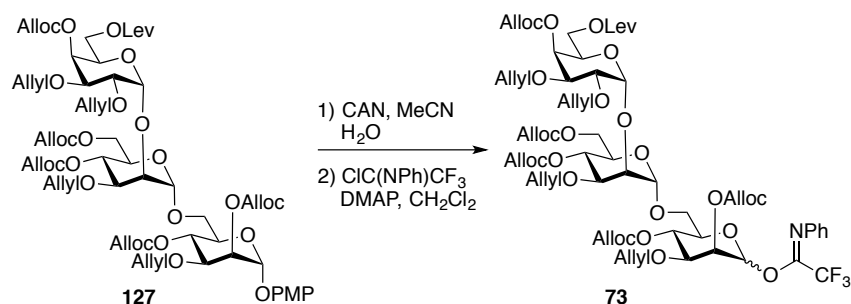


126: **113** (117 mg, 0.18 mmol) and **117** (68 mg, 0.14 mmol) were co-evaporated with toluene three times and dried highly under vacuum. The residue was dissolved with CH_2Cl_2 (1.4 mL) and MS4A (100 mg) was added and then the mixture was cooled to -20°C . To the mixture was added TMSOTf (5 μL , 0.27 μM) at -20°C and then the mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. The reaction was quenched with pyridine and then the mixture was concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 4/1 to 3/1 to 2/1) to afford **125** (107 mg, 81% yield) as a colorless oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.97-7.01 (m, 2H), 6.86-6.90 (m, 2H), 5.71-5.99 (m, 6H), 5.51 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz), 5.07-5.40 (m, 14H), 4.96-5.06 (m, 2H), 4.77 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz), 4.59-4.73 (m, 9H), 4.19-4.34 (m, 3H), 3.96-4.08 (m, 5H), 3.72-3.84 (m, 5H), 3.51 (dd, 1H, $J = 10.8, 1.6$ Hz), 2.74-2.79 (m, 2H), 2.62-2.67 (m, 2H), 2.18 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 206.50, 171.65, 155.29, 154.90, 154.51, 154.31, 149.65, 134.15, 134.04, 131.73, 131.48, 131.43, 131.33, 119.31, 119.18, 119.04, 118.84, 117.56, 117.37, 117.33, 114.86, 97.37, 96.17, 77.37, 74.64, 74.38, 72.19, 71.69, 71.60, 71.14, 70.73, 70.02, 69.09, 69.00, 68.87, 68.72, 68.48, 68.31, 66.45, 66.15, 55.64, 38.08, 29.83, 28.28; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{46}\text{H}_{58}\text{NaO}_{22}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 985.3312; found: 985.3333. To a stirred solution of **125** (85 mg, 88.3 μmol) in CH_2Cl_2 (4.4 mL) and MeOH (4.4 mL) was added hydrazine acetate (12 mg, 0.13 mmol). After stirring for 7 h, the solvent was removed under reduced pressure. The crude material was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 3/1 to 2.5/1) to

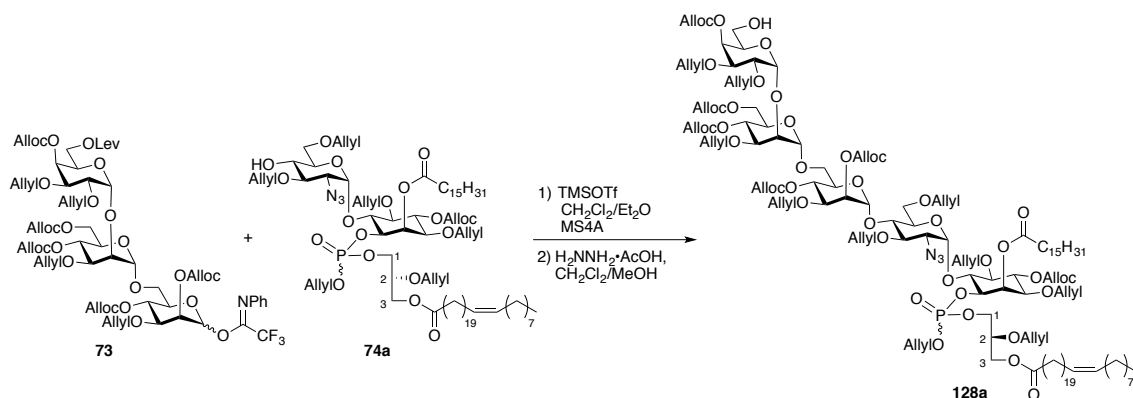
afford **126** (76 mg, quant) as a colorless oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.95-7.00 (m, 2H), 6.84-6.89 (m, 2H), 5.78-5.98 (m, 6H), 5.51 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz), 5.32-5.40 (m, 5H), 5.25-5.30 (m, 6H), 5.13-5.23 (m, 3H), 5.10 (t, 1H, $J = 10.0$ Hz), 5.01 (t, 1H, $J = 9.9$ Hz), 4.89 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz), 4.59-4.73 (m, 8H), 4.27-4.31 (m, 2H), 4.22 (ddt, 1H, $J = 13.0, 5.3, 1.4$ Hz), 3.93-4.10 (m, 7H), 3.83 (q, 1H, $J = 5.6$ Hz), 3.75 (s, 3H), 3.68 (dd, 1H, $J = 9.5, 3.3$ Hz), 3.56 (dd, 1H, $J = 11.2, 1.7$ Hz), 2.46 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 155.34, 154.89, 154.55, 154.50, 154.24, 149.62, 134.15, 133.98, 131.72, 131.48, 131.29, 119.39, 119.10, 118.84, 117.74, 117.59, 117.47, 114.83, 98.94, 96.32, 76.64, 74.74, 72.17, 71.91, 71.48, 71.17, 71.11, 70.13, 69.10, 68.99, 68.88, 68.70, 68.19, 68.06, 66.39, 66.00, 55.67 HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{41}\text{H}_{52}\text{NaO}_{20}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 887.2944; found: 887.2948



127: **124** (65 mg, 0.11 mmol) and **126** (76 mg, 87.9 μmol) were co-evaporated with toluene three times and dried highly under vacuum. The residue was dissolved with Et_2O (1.0 mL) and MS4A (140 mg) was added and the mixture was then cooled to -20°C . To the mixture was added TMSOTf (3.2 μL , 0.18 μmol) at -20°C and then the mixture was stirred at 0°C for 3.5 h. The reaction was quenched with Et_3N (60 μL) and then the mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 3/1 to 2.5/1) to afford **127** (84 mg, 74% yield) as colorless oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.97-7.00 (m, 2H), 6.85-6.89 (m, 2H), 5.76-6.00 (m, 9H), 5.50 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz), 5.37-5.40 (m, 3H), 5.23-5.35 (m, 14H), 5.03-5.21 (m, 8H), 4.58-4.72 (m, 10H), 4.18-4.30 (m, 5H), 4.11-4.17 (m, 4H), 3.99-4.10 (m, 6H), 3.92 (ddd, 2H, $J = 12.7, 5.2, 1.7$ Hz), 3.78-3.88 (m, 3H), 3.73 (d, 3H, $J = 4.7$ Hz), 3.65-3.70 (m, 1H), 3.54-3.59 (m, 1H), 2.67-2.72 (m, 2H), 2.53 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 2.15 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 206.50, 172.44, 155.34, 154.86, 154.75, 154.49, 154.39, 154.23, 149.68, 135.43, 134.74, 134.46, 134.14, 131.73, 131.58, 131.47, 131.29, 119.45, 119.09, 118.93, 118.88, 117.56, 117.43, 117.06, 116.75, 116.55, 114.87, 99.00, 98.43, 96.38, 77.36, 75.87, 74.91, 74.73, 72.60, 72.24, 72.17, 71.40, 71.33, 71.09, 70.96, 70.23, 69.15, 68.97, 68.86, 68.75, 67.08, 66.48, 66.05, 62.81, 55.66, 37.81, 29.88, 27.84; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{62}\text{H}_{80}\text{NaO}_{29}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1311.4677; found: 1311.4684

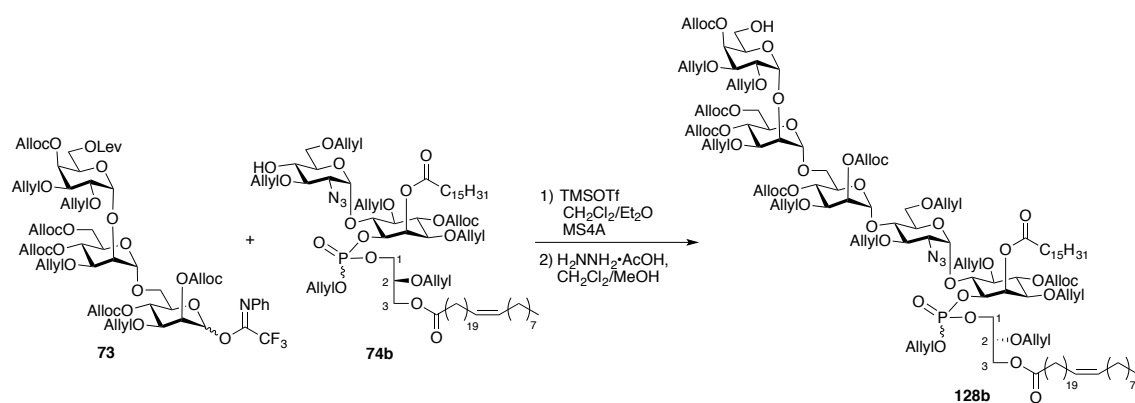


73: To a stirred mixture of **127** (50 mg, 38.7 mmol) in MeCN (500 μ L) and H₂O (500 μ L) at 0 °C was added CAN (64 mg, 0.12 mmol) and the mixture was stirred for 2.5 h at room temperature. The reaction mixture was poured into brine and extracted with ethyl acetate. The extract was washed with H₂O, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The residue was roughly purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 3/1 to 1/1) to afford the hemiacetal. The hemiacetal was dissolved with CH₂Cl₂ (690 μ L). To the solution was added DMAP (9.5 mg, 77.4 μ mol) followed by ClC(NPh)CF₃ (16.5 μ L, 0.10 mmol) and the mixture was stirred for 6 h. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 20/1) to afford **73** (26 mg, 49% yield for 2 steps) as a colorless oil. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.29-7.33 (m, 2H), 7.12 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 6.82-6.88 (m, 2H), 5.79-5.99 (m, 9H), 5.04-5.39 (m, 26H), 4.58-4.75 (m, 10H), 3.83-4.25 (m, 19H), 3.63-3.69 (m, 2H), 2.51-2.76 (m, 4H), 2.04-2.11 (m, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 207.23, 206.44, 172.41, 154.84, 154.75, 154.33, 154.26, 154.00, 142.90, 135.43, 134.76, 134.43, 133.86, 131.68, 131.59, 131.44, 131.15, 129.00, 124.83, 119.56, 119.41, 119.08, 118.81, 118.06, 117.35, 116.71, 116.55, 99.07, 98.74, 76.06, 74.90, 74.70, 74.45, 72.54, 72.24, 72.06, 71.33, 70.84, 70.45, 69.32, 69.11, 68.74, 67.04, 66.56, 65.88, 62.64, 60.46, 37.83, 31.00, 29.78, 27.79, 21.12, 14.27; HRMS (ESI-QTOF) calcd for C₆₃H₇₈F₃NNaO₂₈ [M+Na]⁺, 1376.4555; found: 1376.4533



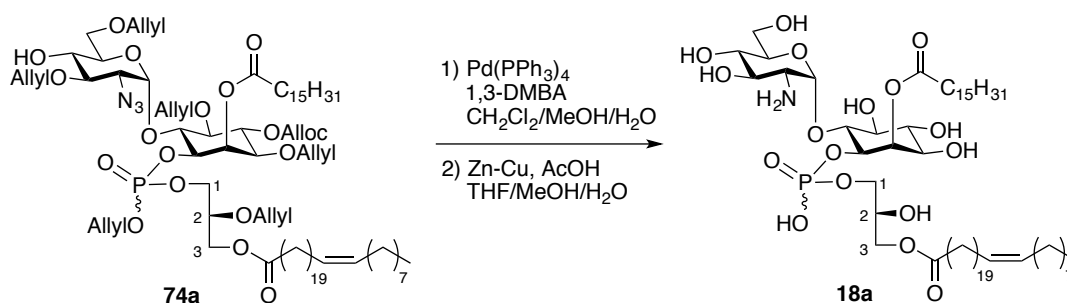
128a: To a stirred solution of **74a** (14 mg, 9.22 μ mol), **73** (25 mg, 18.4 μ mol), and MS4A (30 mg) in CH₂Cl₂/Et₂O (1/1) (250 μ L) was added 0.1 M TMSOTf in CH₂Cl₂ (46 μ L) at 0 °C then the mixture was

warmed up to room temperature. After stirring for 4 h, the reaction was quenched with Et₃N (10 μ L) and the mixture was then filtered through a pad of celite and concentrated. To the solution of the residue in CH₂Cl₂/MeOH (9/1) (400 μ L) was added hydrazine acetate (1.70 mg, 18.4 μ mol). After stirring for 2 h, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified with amino silica gel column chromatography (toluene/ethyl acetate = 6/1 to 3/1) to afford **128a** (9.15 mg, 38% yield for 2 steps, ~1:1 diastereomixture) as a colorless oil. ¹H NMR (700 MHz, CDCl₃) δ 5.77-5.98 (m, 17H), 5.47-5.51 (m, 2H), 5.06-5.38 (m, 38H), 4.74 (q, 1H, *J* = 6.3 Hz), 4.60-4.67 (m, 12H), 4.38-4.43 (m, 2H), 4.23-4.31 (m, 8H), 4.04-4.22 (m, 24H), 3.91-4.01 (m, 6H), 3.76-3.86 (m, 6H), 3.72 (dd, 1H, *J* = 9.7, 3.5 Hz), 3.61 (d, 2H, *J* = 15.5 Hz), 3.44-3.47 (m, 1H), 3.37 (td, 1H, *J* = 9.6, 4.1 Hz), 3.26 (dd, 1H, *J* = 10.2, 3.5 Hz), 2.41 (td, 2H, *J* = 14.9, 6.8 Hz), 2.34 (dd, 2H, *J* = 12.8, 7.5 Hz), 2.04 (q, 4H, *J* = 6.3 Hz), 1.64 (d, 5H, *J* = 22.1 Hz), 1.28 (68H), 0.90 (t, 7H, *J* = 6.9 Hz); ¹³C NMR (175 MHz, CDCl₃) δ 173.53, 173.51, 154.84, 154.44, 154.01, 135.42, 134.74, 134.60, 134.45, 134.38, 134.28, 134.17, 134.06, 133.92, 133.72, 131.77, 131.70, 131.59, 131.47, 131.41, 131.31, 129.91, 119.53, 119.17, 119.09, 118.98, 118.92, 118.83, 118.19, 117.77, 117.72, 117.56, 117.48, 117.36, 117.20, 117.15, 117.09, 99.02, 98.84, 98.72, 90.29, 76.02, 75.73, 75.05, 74.84, 74.28, 73.71, 73.21, 72.39, 72.22, 71.77, 71.24, 71.02, 69.98, 69.02, 68.92, 68.76, 68.71, 68.57, 67.91, 67.64, 67.44, 67.39, 66.58, 66.49, 66.38, 66.27, 53.46, 34.15, 31.96, 29.88, 29.80, 29.71, 29.60, 29.55, 29.44, 29.36, 29.21, 29.06, 27.23, 24.90, 22.72, 14.17; HRMS (ESI-QTOF) calcd for C₁₃₃H₂₀₈N₃Na₂O₄₄P [M+Na₂]²⁺, 1314.1826; found: 1314.1834



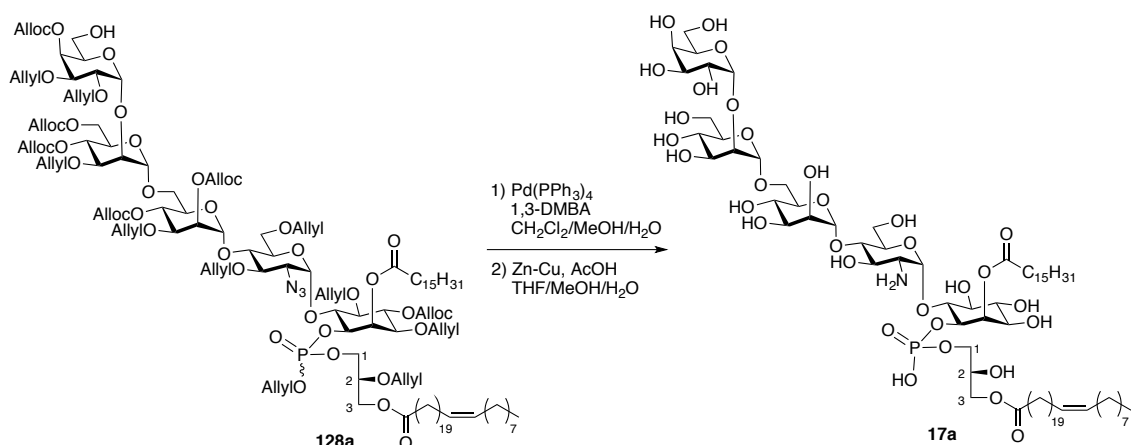
128b: In a manner similar to the synthesis of **128a**, **74b** (10 mg, 6.60 μ mol) was converted into **128b** (3.8 mg, 22% yield for 2 steps, ~1:1 diastereomixture) as a colorless oil. ¹H NMR (700 MHz, CDCl₃) δ 5.77-6.00 (m, 17H), 5.47-5.51 (m, 2H), 5.06-5.40 (m, 38H), 4.74 (dd, 1H, *J* = 13.3, 5.7 Hz), 4.62-4.68 (m, 12H), 4.37-4.43 (m, 2H), 4.23-4.34 (m, 8H), 4.05-4.21 (m, 24H), 3.89-4.09 (m, 6H), 3.75-3.88 (m, 6H), 3.72 (dd, 1H, *J* = 9.5, 3.8 Hz), 3.61 (d, 2H, *J* = 12.4 Hz), 3.45-3.48 (m, 1H), 3.36-3.39 (m, 1H), 3.24-3.27 (m, 1H), 2.33-2.45 (m, 4H), 2.04 (q, 4H, *J* = 6.5 Hz), 1.63-1.66 (m, 4H), 1.28 (68H), 0.90 (t, 6H, *J* = 6.9

Hz); ^{13}C NMR (175 MHz, CDCl_3) δ 173.44, 170.63, 154.84, 154.39, 135.36, 135.30, 134.76, 134.44, 134.30, 134.14, 133.86, 133.70, 131.77, 131.70, 131.60, 131.49, 131.41, 131.28, 129.91, 119.53, 119.18, 119.10, 119.04, 118.98, 118.92, 118.83, 118.67, 118.06, 117.73, 117.68, 117.57, 117.49, 117.41, 117.23, 117.15, 117.08, 116.73, 99.05, 98.89, 98.76, 89.48, 76.06, 75.75, 75.22, 75.11, 74.98, 74.86, 74.79, 74.74, 74.55, 74.31, 73.36, 72.49, 72.38, 72.25, 72.19, 72.14, 71.84, 71.77, 71.29, 71.26, 71.15, 71.05, 70.99, 70.90, 70.67, 70.59, 70.51, 70.42, 70.00, 69.25, 69.05, 68.93, 68.89, 68.84, 68.76, 68.72, 68.65, 68.60, 68.53, 68.26, 67.80, 67.75, 67.66, 67.48, 67.09, 66.56, 66.51, 65.75, 53.47, 34.15, 31.96, 29.80, 29.76, 29.71, 29.60, 29.55, 29.49, 29.40, 29.36, 29.28, 29.21, 29.16, 29.10, 29.05, 27.23, 24.97, 24.90, 22.72, 14.17; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{133}\text{H}_{208}\text{N}_3\text{Na}_2\text{O}_{44}\text{P}$ $[\text{M}+\text{Na}_2]^{2+}$, 1314.1826; found: 1314.1868

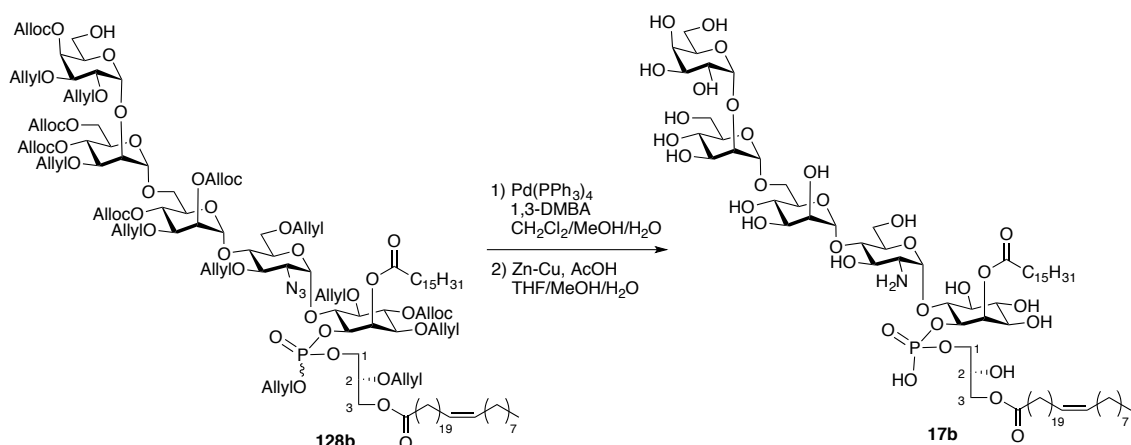


GlcN-EhPIb C30:1 *cis* (**18a**)

To a stirred solution of **74a** (2.48 mg, 1.68 μmol) and 1,3-dimethylbarbituric acid (3.8 mg, 24.4 mmol) in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (10/10/3) (300 μL) was added $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (1.8 mg, 1.63 μmol) and the mixture was stirred at 40 $^\circ\text{C}$ for 2 h. The reaction mixture was directly subjected into LH-20 size exclusion resin column ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ = 5/5/1) to remove reagents. The desired product-containing fraction was concentrated under reduced pressure. To the solution of the residue in $\text{THF}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (10/10/3) (300 μL) were added AcOH (1 drop) and Zn-Cu couple (prepared from 50 mg of Zn) and the mixture was vigorously stirred for 1 h. The mixture was filtered and purified with LH-20 size exclusion resin column ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ = 5/5/1) to afford **18a** (1.43 mg, 75% yield for 2 steps) as a white solid. ^1H NMR (700 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ = 60/35/4) δ 5.56-5.57 (m, 1H, inositol-2), 5.54-5.54 (m, 1H, GlcNH₂-1), 5.36 (t, 2H, J = 4.7 Hz, *sp*²-CH), 4.35 (td, 1H, J = 9.6, 3.1 Hz, inositol-1), 4.17 (dd, 1H, J = 11.5, 4.6 Hz, Glycerol-1), 4.10-4.14 (m, 2H, Glycerol-1, GlcNH₂-5), 3.97-4.00 (m, 1H, Glycerol-2), 3.92 (t, 1H, J = 9.5 Hz, inositol-6), 3.88-3.83 (m, 3H, GlcNH₂-3, GlcNH₂-6, Glycerol-3), 3.77 (dd, 1H, J = 12.2, 4.5 Hz, GlcNH₂-6), 3.65-3.59 (m, 2H, inositol-3, inositol-4), 3.45 (t, 1H, J = 9.7 Hz, GlcNH₂-4), 3.41 (t, 1H, J = 9.0 Hz, inositol-5), 3.16 (dd, 1H, J = 10.0, 3.1 Hz, GlcNH₂-2), 2.37-2.45 (m, 4H, -CO-CH₂-), 2.04 (dd, 4H, J = 12.7, 6.8 Hz, -CH₂CH=CHCH₂-), 1.63-1.64 (m, 4H, -CO-CH₂-CH₂-), 1.43-1.28 (m, 68H, -CH₂-), 0.90 (t, 6H, J = 7.0 Hz, -CH₂-CH₃); ^{13}C NMR (175 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$) δ 174.68, 173.79, 129.7



17a: To a stirred solution of **128a** (1.87 mg, 0.72 μmol) and 1,3-dimethylbarbituric acid (3.4 mg, 21.7 mmol) in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (10/10/3) (300 μL) was added $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (1 mg, 0.87 μmol) and the mixture was stirred at 40 $^\circ\text{C}$ for 1 h. The reaction mixture was directly subjected into LH-20 size exclusion resin column ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ = 10/10/3) to remove reagents. The desired product-containing fraction was concentrated under reduced pressure. To the solution of the residue in $\text{THF}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (10/10/3) (300 μL) were added AcOH (1 drop) and Zn-Cu couple (prepared from 30 mg of Zn) and the mixture was vigorously stirred for 1.5 h. The mixture was filtered and purified with LH-20 size exclusion resin column ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ = 10/10/3) to afford **17a** (0.71 mg, 60% yield for 2 steps) as a white solid. ^1H NMR (700 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ = 60/35/4) δ 5.56 (1H, inositol-2), 5.50 (1H, GlcNH_2 -1), 5.36 (2H, sp^2 -CH), 5.22-5.20 (2H, Gal-1, Man-1), 5.06 (1H, Man-1), 4.31 (1H, inositol-1), 4.20 (1H, GlcNH_2 -5), 4.17, 4.12 (2H, Glycerol-1), 4.06 (1H, GlcNH_2 -3), 4.01 (Glycerol-2), 3.99, 3.93 (2H, Glycerol-3), 3.89, 3.85 (1H, GlcNH_2 -6), 3.80 (1H), 3.71 (1H, GlcNH_2 -6), 3.68 (1H), 3.64 (1H), 3.61, 3.57, 3.59 (1H, inositol-4), 3.41 (1H, inositol-5), 3.12 (1H, GlcNH_2 -2), 2.43 ($-\text{CO}-\text{CH}_2-$), 2.37 ($-\text{CO}-\text{CH}_2-$), 2.04 (4H, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$), 1.63 (4H, $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1.34-1.28 (68H, $-\text{CH}_2-$), 0.90 (6H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); ^{13}C NMR (175 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ = 60/35/4) δ 129.8 (sp^2 -CH), 101.6 (Gal-1), 98.2 (Man-1), 80.1, 73.1 (inositol-5), 72.4, 71.2 (GlcNH_2 -3), 70.3, 70.3, 69.4, 68.5 (Glycerol-2), 67.1 (GlcNH_2 -5), 67.1, 66.2 (Glycerol-3), 65.7 (inositol-1), 65.1 (Glycerol-1), 62.3, 61.0 (GlcNH_2 -6), 50.4 (GlcNH_2 -2), 33.8 (2C, $-\text{CO}-\text{CH}_2-$), 31.6, 29.4, 27.0 (2C, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$), 22.5, 13.9 (2C, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{79}\text{H}_{145}\text{NO}_{32}\text{P} [\text{M}]^-$, 1650.9493; found: 1650.9464



17b: In a manner similar to the synthesis of **128a**, **128b** (1.70 mg, 0.66 μ mol) was converted into **17b** (0.64 mg, 59% yield for 2 steps) as a white solid. ^1H NMR (700 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O} = 60/35/4$) δ 5.52 (1H, inositol-2), 5.49 (1H, GlcNH_2 -1), 5.33 (2H, sp^2 -CH), 5.20 (1H, Gal-1), 5.18 (1H, Man-1), 5.04 (1H, Man-1), 4.33 (1H, inositol-1), 4.21 (1H, GlcNH_2 -5), 4.08 (1H, Glycerol-1), 4.03 (1H, GlcNH_2 -3), 3.97, 3.96 (1H, Glycerol-2), 3.90 (1H), 3.89 (1H, Man), 3.86 (1H, inositol-6), 3.83 (2H, GlcNH_2 -6, Gly-3), 3.77 (1H), 3.76 (1H, GlcNH_2 -6), 3.75 (1H, Man), 3.69 (2H), 3.66 (1H, GlcNH_2 -4), 3.62 (1H, inositol-3), 3.60 (1H, inositol-4), 3.39 (1H, inositol-5), 3.21 (1H, GlcNH_2 -2), 2.39 (2H, $-\text{CO}-\text{CH}_2-$), 2.36 (2H, $-\text{CO}-\text{CH}_2-$), 2.00 (4H, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$), 1.59 (4H, $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1.45-1.25 (68H, $-\text{CH}_2-$), 1.14 (6H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); ^{13}C NMR (175 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O} = 60/35/4$) δ 130.0 (sp^2 -CH), 101.8 (Gal-1), 101.1 (Man-1), 98.4 (Man-1), 95.5 (GlcNH_2 -1), 80.3, 77.9 (inositol-6), 73.0 (inositol-2), 72.8 (inositol-4), 72.4 (Man), 71.1 (2C, GlcNH_2 -3, GlcNH_2 -5), 71.0, 70.4, 70.0 (Man), 69.1 (2C, Glycerol-2, inositol-3), 66.8 (Glycerol-3), 67.4 (GlcNH_2 -4), 61.0 (GlcNH_2 -6), 65.0 (Glycerol-1), 61.4, 54.3 (GlcNH_2 -2), 31.9, 33.9 (2C, $-\text{CO}-\text{CH}_2-$), 29.6, 27.0 (2C, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$), 24.9 (2C, $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 22.4, 13.7 (2C, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); ^{31}P NMR ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O} = 60/35/4$) δ 5.71; HRMS (ESI-QTOF) calcd for $\text{C}_{79}\text{H}_{145}\text{NO}_{32}\text{P} [\text{M}]^-$, 1650.9493; found: 1650.9498

2. Biology

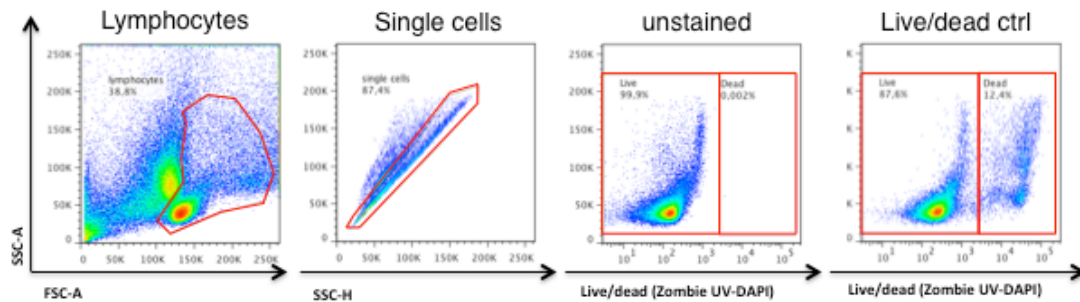
Hemolytic activity on human whole blood.

α GalCer, *Eh*LPPG and synthetic compounds were diluted in PBS and distributed in 96 well plates in concentrations ranging from 0.1 to 20 μ g/ml. An equal volume of red blood cells (RBCs) obtained from EDTA-preserved peripheral blood of a healthy donor was added. After incubation for 1h at 37°C, RBCs were centrifuged at 800 x g, RT, 10 min. The absorbance of the supernatant was measured at 530 nm in an ELISA counter (MRXe, Dynex, Magellan Bioscience) with the reference filter set at 630 nm. Percentage hemolytic activity of each stimulant was estimated as $(A-A_0/A_{max}-A_0) \times 100$ where A_0 is the background hemolysis obtained by the incubation of RBCs with PBS and A_{max} is the 100% hemolysis achieved upon incubation of RBCs in distilled water.

Cytotoxicity on murine splenocytes and human PBMCs.

For the administration of the cytotoxicity on murine splenocytes and human PBMCs, murine spleen cells were collected from perfused mouse spleen and submitted to erythrolysis and human PBMCs were isolated by density gradient centrifugation. 1×10^6 splenocytes or human PBMCs were distributed in 96 well plates and stimulated with 0.1, 1.0 and 10.0 μ g/ml α GalCer, *Eh*LPPG and synthetic compounds for 12, 24 or 48h. After incubation cells were harvested and stained with live dead staining (Zombie UVTM Fixable Viability Kit, BioLegend) after manufacturers instructions. Data acquisition was performed on a BD LSRII flow cytometer.

- Murine spleen lymphocytes



- PBMC

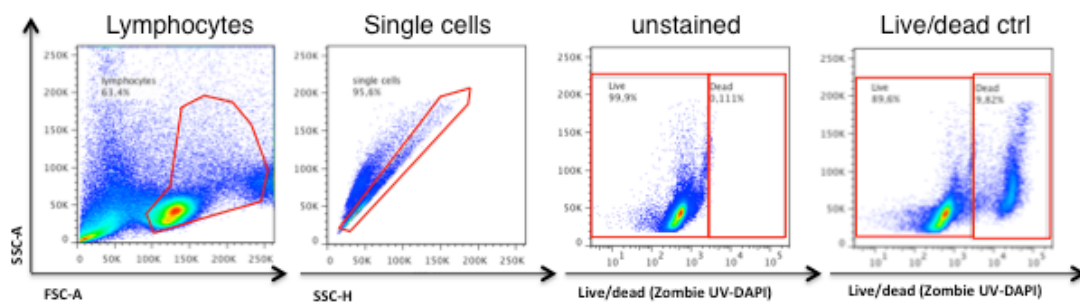


Fig. S1 Gating strategy of cytotoxicity test on murine splenocytes and human PBMCs.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based competitive binding assay

Pierce protein G coated 96 well plates (Thermo Fisher Scientific) were washed with 200 μ L of PBST (PBS containing 0.05% Tween-20) three times. 50 μ L of mouse CD1d:Ig fusion protein (BD bioscience) (10 μ g/mL in PBS) for 1h at room temperature. 25 μ L of Serially diluted inositol phospholipids and α -galactosylceramide (GalCer) with PBS were added to the plates and then added 25 μ L of 18:1 biotinyl PE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(Biotinyl), Avanti Polar Lipids) (8 μ g/mL in PBS) and incubated for overnight at 37 $^{\circ}$ C. After washing the plates with PBST three times, mCD1d:Ig-biotinyl PE complex was detected with HRP-labeled Avidin (Biolegend). Inhibition curves were constructed using GraphPad Prism software (ver. 7.02, GraphPad).

Competitive binding assay using Alphascreen® technology

Affinities between synthetic inositol phospholipid and mouse CD1d molecule was measured by competitive binding assay, using 18:1 Biotinyl PE [1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(Biotinyl) (Avanti Polar Lipids)], as an indicator, utilizing Alphascreen® technology (Perkin Elmer). 5 nM of mCD1d:mIgG dimer (BD Bioscience) and 10 μ g/mL of antimouse IgG acceptor bead (Perkin Elmer) were added to 1/2 AREAPLATE-96 (Perkin Elmer) and

incubated for 1 h in dark at room temperature. Synthetic inositol phospholipids were serially diluted (10 μ M to 1 nM) with PBS containing 0.005% tween-20 and then added into wells and incubated for 12 h at 37 °C. After addition of 2 μ M of 18:1 Biotinyl PE into wells, the plates was incubated for 12 h at 37 °C. 18:1 Caproylamine PE [1,2- dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(hexanoylamine) (Avanti Polar Lipids)] was used as a positive control. 10 μ g/mL of Streptavidin donor bead (Perkin Elmer) was added into each wells and incubated for 1 h at room temperature in dark. Biotinyl PE-CD1d complex was detected with Spark 10M (Tecan). Inhibition curves were constructed using GraphPad Prism software (version 7.0; GraphPad).

Titration assay: Biotinyl PE (Avanti Polar Lipids) (0.3, 1, 3, 10 μ M) (in PBS containing 0.005% tween-20) was incubated with mCD1d:IgG (BD Bioscience) (3, 10, 30, 100 nM) in PBS at 37 °C for 12 h in 1/2 AREAPLATE-96. To the each well were added Streptavidin donor beads and antimouse IgG acceptor bead and incubated for 1 h in the dark. Alpha counts were measured with Spark 10M (Tecan).

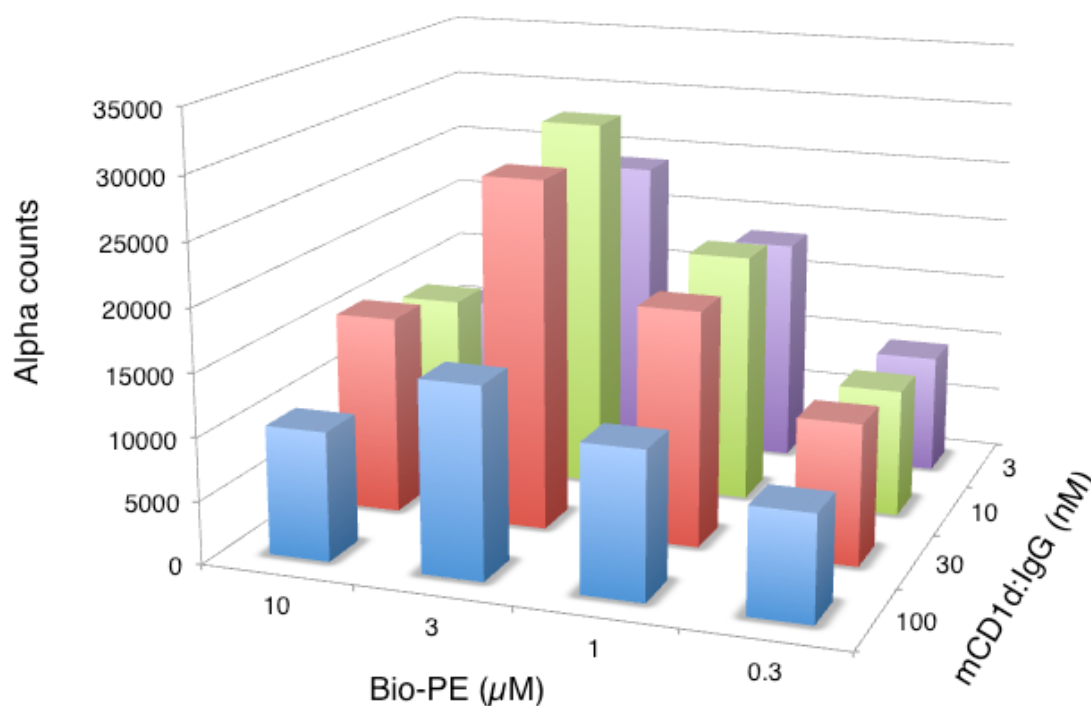


Fig. S2 Titration assay for determination of Biotinyl PE and mCD1d:IgG concentration

Mouse NKT cells or spleen cell stimulation assay

NKT cell or spleen cells were isolated from C57BL/6 mice, seeded at a concentration of 2×10^5 /well and incubated with isolated *Eh*LPPG or synthetic inositol phospholipids at indicated concentrations for 48 h. IFN- γ induction in the supernatant was determined by ELISA.

***In vitro* infection models using murine macrophages.**

Murine bone marrow derived macrophages (BMM) were isolated from tibias and femurs of 6- to 10-week-old female BALB/c mice and cultured for 10 days in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Sigma) supplemented with 10% heat inactivated FCS (Sigma), 5% horse serum (Sigma), 30% L929 supernatant. For infection, BMM were harvested, washed and seeded into 24-well plates (Sarstedt) at a density of 2×10^6 cells/well. The macrophages were incubated for 72 h at 37°C and 5% CO₂ to allow adhesion of the cells. Adherent BMM were infected with stationary phase promastigotes at a multiplicity of infection of 10 parasites per macrophage. After 4 h of incubation at 37°C in IMDM, non-phagocytosed parasites were removed by multiple washing steps with warm PBS and BMMs for 24-well plates were treated with 4.0 µg/ml αGalCer 8.0 µg/ml *Eh*LPPG and 0.1, 1.0 or 10 µg/ml synthetic compounds. for 48h. After incubation the medium supernatants were removed. BMM in 24-well plates were washed twice and the cells were collected and subjected to genomic DNA (gDNA) isolation (QIAmp gDNA Kit, QIAGEN). gDNA was used to determine the parasite burden via a probe PCR for detection of *Leishmania* actin.

参考文献

- (1) Bendelac, A.; Savage, P. B.; Teyton, L. *Annu. Rev. Immunol.* **2007**, *25*, 297.
- (2) Brennan, P. J.; Brigl, M.; Brenner, M. B. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 101.
- (3) Godfrey, D. I.; MacDonald, H. R.; Kronenberg, M.; Smyth, M. J.; Van Kaer, L. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 231.
- (4) Uldrich, A. P.; Patel, O.; Cameron, G.; Pellicci, D. G.; Day, E. B.; Sullivan, L. C.; Kyparissoudis, K.; Kjer-Nielsen, L.; Vivian, J. P.; Cao, B.; Brooks, A. G.; Williams, S. J.; Illarionov, P.; Besra, G. S.; Turner, S. J.; Porcelli, S. A.; McCluskey, J.; Smyth, M. J.; Rossjohn, J.; Godfrey, D. I. *Nat. Immunol.* **2011**, *12*, 616.
- (5) Morita, M.; Motoki, K.; Akimoto, K.; Natori, T.; Sakai, T.; Sawa, E.; Yamaji, K.; Koezuka, Y.; Kobayashi, E.; Fukushima, H. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2176.
- (6) Rossjohn, J.; Pellicci, D. G.; Patel, O.; Gapin, L.; Godfrey, D. I. *Nat. Rev. Immunol.* **2012**, *12*, 845.
- (7) Brigl, M.; Bry, L.; Kent, S. C.; Gumperz, J. E.; Brenner, M. B. *Nat. Immunol.* **2003**, *4*, 1230.
- (8) Van Kaer, L.; Parekh, V. V.; Wu, L. *Front. Immunol.* **2015**, *6*.
- (9) Coquet, J. M.; Chakravarti, S.; Kyparissoudis, K.; McNab, F. W.; Pitt, L. A.; McKenzie, B. S.; Berzins, S. P.; Smyth, M. J.; Godfrey, D. I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 11287.
- (10) Lee, Y. J.; Wang, H. G.; Starrett, G. J.; Phuong, V.; Jameson, S. C.; Hogquist, K. A. *Immunity* **2015**, *43*, 566.
- (11) Constantinides, M. G.; Bendelac, A. *Curr. Opin. Immunol.* **2013**, *25*, 161.
- (12) Singh, N.; Hong, S.; Scherer, D. C.; Serizawa, I.; Burdin, N.; Kronenberg, M.; Koezuka, Y.; Van Kaer, L. *J. Immunol.* **1999**, *163*, 2373.
- (13) Fujii, S.; Shimizu, K.; Smith, C.; Bonifaz, L.; Steinman, R. M. *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 267.
- (14) Hermans, I. F.; Silk, J. D.; Gileadi, U.; Salio, M.; Mathew, B.; Ritter, G.; Schmidt, R.; Harris, A. L.; Old, L.; Cerundolo, V. *J. Immunol.* **2003**, *171*, 5140.
- (15) Zajonc, D. M.; Girardi, E. *Front. Immunol.* **2015**, *6*.
- (16) Robertson, F. C.; Berzofsky, J. A.; Terabe, M. *Front. Immunol.* **2014**, *5*.
- (17) Olszak, T.; Neves, J. F.; Dowds, C. M.; Baker, K.; Glickman, J.; Davidson, N. O.; Lin, C. S.; Jobin, C.; Brand, S.; Sotlar, K.; Wada, K.; Katayama, K.; Nakajima, A.; Mizuguchi, H.; Kawasaki, K.; Nagata, K.; Muller, W.; Snapper, S. B.; Schreiber, S.; Kaser, A.; Zeissig, S.;

Blumberg, R. S. *Nature* **2014**, 509, 497.

- (18) Novak, J.; Lehuen, A. *Cytokine* **2011**, 53, 263.
- (19) Kohrt, H. E.; Pillai, A. B.; Lowsky, R.; Strober, S. *Eur. J. Immunol.* **2010**, 40, 1862.
- (20) Iwamura, C.; Nakayama, T. *Curr. Opin. Immunol.* **2010**, 22, 807.
- (21) Swain, M. G. *Digest. Dis.* **2010**, 28, 7.
- (22) Tard, C.; Rouxel, O.; Lehuen, A. *Biomed. J.* **2015**, 38, 484.
- (23) Bondarenko, S.; Catapano, A. L.; Norata, G. D. *J. Innate Immun.* **2014**, 6, 3.
- (24) Carreno, L. J.; Saavedra-Avila, N. A.; Porcelli, S. A. *Clin. Transl. Immunol.* **2016**, 5.
- (25) Van Kaer, L. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, 5, 31.
- (26) Shissler, S. C.; Bollino, D. R.; Tiper, I. V.; Bates, J. P.; Derakhshandeh, R.; Webb, T. J. *Immunogenetics* **2016**, 68, 623.
- (27) Cerundolo, V.; Silk, J. D.; Masri, S. H.; Salio, M. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, 9, 28.
- (28) Van Kaer, L.; Wu, L.; Parekh, V. V. *Immunology* **2015**, 146, 1.
- (29) Koch, M.; Stronge, V. S.; Shepherd, D.; Gadola, S. D.; Mathew, B.; Ritter, G.; Fersht, A. R.; Besra, G. S.; Schmidt, R. R.; Jones, E. Y.; Cerundolo, V. *Nat. Immunol.* **2005**, 6, 819.
- (30) Pellicci, D. G.; Clarke, A. J.; Patel, O.; Mallevaey, T.; Beddoe, T.; Le Nours, J.; Uldrich, A. P.; McCluskey, J.; Besra, G. S.; Porcelli, S. A.; Gapin, L.; Godfrey, D. I.; Rossjohn, J. *Nat. Immunol.* **2011**, 12, 827.
- (31) Mallevaey, T.; Clarke, A. J.; Scott-Browne, J. P.; Young, M. H.; Roisman, L. C.; Pellicci, D. G.; Patel, O.; Vivian, J. P.; Matsuda, J. L.; McCluskey, J.; Godfrey, D. I.; Marrack, P.; Rossjohn, J.; Gapin, L. *Immunity* **2011**, 34, 315.
- (32) Lopez-Sagaseta, J.; Sibener, L. V.; Kung, J. E.; Gumperz, J.; Adams, E. J. *Embo J.* **2012**, 31, 2047.
- (33) Vartabedian, V. F.; Savage, P. B.; Teyton, L. *Immunol. Rev.* **2016**, 272, 109.
- (34) Van Kaer, L.; Wu, L.; Joyce, S. *Trends Immunol.* **2016**, 37, 738.
- (35) De Silva, A. D.; Park, J. J.; Matsuki, N.; Stanic, A. K.; Brutkiewicz, R. R.; Medof, M. E.; Joyce, S. *J. Immunol.* **2002**, 168, 723.
- (36) Jayawardena-Wolf, J.; Benlagha, K.; Chiu, Y. H.; Mehr, R.; Bendelac, A. *Immunity* **2001**, 15, 897.
- (37) Zhou, D. P.; Cantu, C.; Sagiv, Y.; Schrantz, N.; Kulkarni, A. B.; Qi, X. Y.; Mahuran, D. J.; Morales, C. R.; Grabowski, G. A.; Benlagha, K.; Savage, P.; Bendelac, A.; Teyton, L. *Science* **2004**, 303, 523.
- (38) Kang, S. J.; Cresswell, P. *Nat. Immunol.* **2004**, 5, 175.

- (39) Kolter, T.; Sandhoff, K. *Annu. Rev. Cell Dev. Bi.* **2005**, *21*, 81.
- (40) Schrantz, N.; Sagiv, Y.; Liu, Y.; Savage, P. B.; Bendelac, A.; Teyton, L. *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 841.
- (41) Bai, L.; Sagiv, Y.; Liu, Y.; Freigang, S.; Yu, K. O. A.; Teyton, L.; Porcelli, S. A.; Savage, P. B.; Bendelac, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 10254.
- (42) Natori, T.; Koezuka, Y.; Higa, T. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5591.
- (43) Kawano, T.; Cui, J. Q.; Koezuka, Y.; Toura, I.; Kaneko, Y.; Motoki, K.; Ueno, H.; Nakagawa, R.; Sato, H.; Kondo, E.; Koseki, H.; Taniguchi, M. *Science* **1997**, *278*, 1626.
- (44) An, D. D.; Oh, S. F.; Olszak, T.; Neves, J. F.; Avci, F. Y.; Erturk-Hasdemir, D.; Lu, X.; Zeissig, S.; Blumberg, R. S.; Kasper, D. L. *Cell* **2014**, *156*, 123.
- (45) Brown, L. C. W.; Penaranda, C.; Kashyap, P. C.; Williams, B. B.; Clardy, J.; Kronenberg, M.; Sonnenburg, J. L.; Comstock, L. E.; Bluestone, J. A.; Fischbach, M. A. *PLoS Biol.* **2013**, *11*.
- (46) Albacker, L. A.; Chaudhary, V.; Chang, Y. J.; Kim, H. Y.; Chuang, Y. T.; Pichavant, M.; DeKruyff, R. H.; Savage, P. B.; Umetsu, D. T. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1297.
- (47) Kinjo, Y.; Wu, D.; Kim, G. S.; Xing, G. W.; Poles, M. A.; Ho, D. D.; Tsuji, M.; Kawahara, K.; Wong, C. H.; Kronenberg, M. *Nature* **2005**, *434*, 520.
- (48) Kinjo, Y.; Illarionov, P.; Vela, J. L.; Pei, B.; Girardi, E.; Li, X. M.; Li, Y. L.; Imamura, M.; Kaneko, Y.; Okawara, A.; Miyazaki, Y.; Gomez-Velasco, A.; Rogers, P.; Dahesh, S.; Uchiyama, S.; Khurana, A.; Kawahara, K.; Yesilkaya, H.; Andrew, P. W.; Wong, C. H.; Kawakami, K.; Nizet, V.; Besra, G. S.; Tsuji, M.; Zajonc, D. M.; Kronenberg, M. *Nat. Immunol.* **2011**, *12*, 966.
- (49) Kinjo, Y.; Tupin, E.; Wu, D.; Fujio, M.; Garcia-Navarro, R.; Benhnia, M. R. E. I.; Zajonc, D. M.; Ben-Menachem, G.; Ainge, G. D.; Painter, G. F.; Khurana, A.; Hoebe, K.; Behar, S. M.; Beutler, B.; Wilson, I. A.; Tsuji, M.; Sellati, T. J.; Wong, C. H.; Kronenberg, M. *Nat. Immunol.* **2006**, *7*, 978.
- (50) Chang, Y. J.; Kim, H. Y.; Albacker, L. A.; Lee, H. H.; Baumgarth, N.; Akira, S.; Savage, P. B.; Endo, S.; Yamamura, T.; Maaskant, J.; Kitano, N.; Singh, A.; Bhatt, A.; Besra, G. S.; van den Elzen, P.; Appelmelk, B.; Franck, R. W.; Chen, G. W.; DeKruyff, R. H.; Shimamura, M.; Illarionov, P.; Umetsu, D. T. *J. Clin. Invest.* **2011**, *121*, 57.
- (51) Amprey, J. L.; Im, J. S.; Turco, S. J.; Murray, H. W.; Illarionov, P. A.; Besra, G. S.; Porcelli, S. A.; Spath, G. F. *J. Exp. Med.* **2004**, *200*, 895.
- (52) Lotter, H.; Gonzalez-Roldan, N.; Lindner, B.; Winau, F.; Isibasi, A.; Moreno-Lafont, M.; Ulmer, A. J.; Holst, O.; Tannich, E.; Jacobs, T. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*.
- (53) Fischer, K.; Scotet, E.; Niemeyer, M.; Koebernick, H.; Zerrahn, J.; Maillet, S.; Hurwitz,

- R.; Kursar, M.; Bonneville, M.; Kaufmann, S. H.; Schaible, U. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 10685.
- (54) Laurent, X.; Bertin, B.; Renault, N.; Farce, A.; Specia, S.; Milhomme, O.; Millet, R.; Desreumaux, P.; Henon, E.; Chavatte, P. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 5489.
- (55) Birkholz, A. M.; Kronenberg, M. *Biomed. J.* **2015**, *38*, 470.
- (56) Hossain, M. I.; Hanashima, S.; Nomura, T.; Lethu, S.; Tsuchikawa, H.; Murata, M.; Kusaka, H.; Kita, S.; Maenaka, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 3687.
- (57) Irvine, R. F. *J. Lipid Res.* **2016**, *57*, 1987.
- (58) Caforio, A.; Driessen, A. J. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**.
- (59) Michell, R. H. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **2008**, *9*, 151.
- (60) Englund, P. T. *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 121.
- (61) Kinoshita, T.; Fujita, M. *J. Lipid Res.* **2016**, *57*, 6.
- (62) Guha-Niyogi, A.; Sullivan, D. R.; Turco, S. J. *Glycobiology* **2001**, *11*, 45r.
- (63) Sacks, D.; Sher, A. *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 1041.
- (64) Gazzinelli, R. T.; Denkers, E. Y. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, *6*, 895.
- (65) Best, M. D.; Zhang, H. L.; Prestwich, G. D. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 1403.
- (66) Vanmiddlesworth, F.; Lopez, M.; Zweerink, M.; Edison, A. M.; Wilson, K. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4753.
- (67) Filthuth, E.; Eibl, H. *Chem. Phys. Lipids* **1992**, *60*, 253.
- (68) Gotze, S.; Reinhardt, A.; Geissner, A.; Azzouz, N.; Tsai, Y. H.; Kurucz, R.; Silva, D. V.; Seeberger, P. H. *Glycobiology* **2015**, *25*, 984.
- (69) Kamena, F.; Tamborrini, M.; Liu, X. Y.; Kwon, Y. U.; Thompson, F.; Pluschke, G.; Seeberger, P. H. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 238.
- (70) Gotze, S.; Azzouz, N.; Tsai, Y. H.; Gross, U.; Reinhardt, A.; Anish, C.; Seeberger, P. H.; Silva, D. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13701.
- (71) Nikolaev, A. V.; Al-Maharik, N. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 970.
- (72) Yu, S. C.; Guo, Z. W.; Johnson, C.; Gu, G. F.; Wu, Q. Y. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 1006.
- (73) Tsai, Y. H.; Gotze, S.; Azzouz, N.; Hahm, H. S.; Seeberger, P. H.; Silva, D. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9961.
- (74) Stanley, S. L. *Lancet* **2003**, *361*, 1025.
- (75) Moody-Haupt, S.; Patterson, J. H.; Mirelman, D.; McConville, M. J. *J. Mol. Biol.* **2000**, *297*, 409.

- (76) Almeida, I. C.; Gazzinelli, R. T. *J. Leukocyte Biol.* **2001**, *70*, 467.
- (77) Lotter, H. *et al.* unpublished result
- (78) Lotter, H. *et al.* unpublished result
- (79) Ozaki, S.; Watanabe, Y.; Ogasawara, T.; Kondo, Y.; Shiotani, N.; Nishii, H.; Matsuki, T. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3157.
- (80) Bruzik, K. S.; Salamonczyk, G. M. *Carbohydr. Res.* **1989**, *195*, 67.
- (81) Bender, S. L.; Budhu, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9883.
- (82) Mentel, M.; Laketa, V.; Subramanian, D.; Gillandt, H.; Schultz, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3811.
- (83) Wu, M. X.; Chong, L. S.; Capolicchio, S.; Jessen, H. J.; Resnick, A. C.; Fiedler, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7192.
- (84) Sculimbrene, B. R.; Miller, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10125.
- (85) Jordan, P. A.; Kayser-Bricker, K. J.; Miller, S. J. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 20620.
- (86) Capolicchio, S.; Thakor, D. T.; Linden, A.; Jessen, H. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6912.
- (87) Capolicchio, S.; Wang, H. C.; Thakor, D. T.; Shears, S. B.; Jessen, H. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 9508.
- (88) Duss, M.; Capolicchio, S.; Linden, A.; Ahmed, N.; Jessen, H. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 2854.
- (89) Iwasaki, T.; Higashikawa, K.; Reddy, V. P.; Ho, W. W. S.; Fujimoto, Y.; Fukase, K.; Terao, J.; Kuniyasu, H.; Kambe, N. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 2956.
- (90) Kato, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 254.
- (91) deVries, A. H. M.; Meetsma, A.; Feringa, B. L. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2374.
- (92) Lee, H. W.; Kishi, Y. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 4402.
- (93) Ohkubo, A.; Aoki, K.; Seio, K.; Sekine, M. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 979.
- (94) Zhang, F. Y.; Chan, A. S. C. *Tetrahedron Asymmetry* **1998**, *9*, 1179.
- (95) Aiba, T.; Sato, M.; Umegaki, D.; Iwasaki, T.; Kambe, N.; Fukase, K.; Fujimoto, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 6672.
- (96) Murai, T.; Matsuoka, D.; Morishita, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4584.
- (97) Murai, T.; Hayashi, T.; Yamada, K.; Maekawa, Y.; Minoura, M. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 12473.

- (98) Kitamura, M.; Tanaka, S.; Yoshimura, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4975.
- (99) Tanaka, S.; Saburi, H.; Ishibashi, Y.; Kitamura, M. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1873.
- (100) Akiyama, T.; Takechi, N.; Ozaki, S.; Shiota, K. *B Chem Soc Jpn* **1992**, *65*, 366.
- (101) Mahmoodi, N. O. *Phosphorus Sulfur* **2002**, *177*, 2887.
- (102) Xu, Y. J.; Sculimbrene, B. R.; Miller, S. J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4919.
- (103) Tsai, Y. H.; Liu, X. Y.; Seeberger, P. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11438.
- (104) Yashunsky, D. V.; Borodkin, V. S.; Ferguson, M. A. J.; Nikolaev, A. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 468.
- (105) Swarts, B. M.; Guo, Z. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6648.
- (106) Burgula, S.; Swarts, B. M.; Guo, Z. W. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1194.
- (107) Swarts, B. M.; Guo, Z. W. *Chem Sci* **2011**, *2*, 2342.
- (108) Gaunt, M. J.; Yu, J. Q.; Spencer, J. B. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4172.
- (109) Lee, B. Y.; Seeberger, P. H.; Silva, D. V. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 1586.
- (110) Hayakawa, Y.; Kato, H.; Uchiyama, M.; Kajino, H.; Noyori, R. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2400.
- (111) Grieco, P.; Gitu, P. M.; Hruby, V. J. *J. Pept. Res.* **2001**, *57*, 250.
- (112) Christ, W. J.; McGuinness, P. D.; Asano, O.; Wang, Y.; Mullarkey, M. A.; Perez, M.; Hawkins, L. D.; Blythe, T. A.; Dubuc, G. R.; Robidoux, A. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3637.
- (113) Christ, W. J.; Rossignol, D. P.; Kobayashi, S.; Kawata, T. US Patent 5, 935-938, 1999.
- (114) Shiozaki, M.; Watanabe, Y.; Iwano, Y.; Kaneko, T.; Doi, H.; Tanaka, D.; Shimozato, T.; Kurakata, S. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 5101.
- (115) Shiozaki, M.; Doi, H.; Tanaka, D.; Shimozato, T.; Kurakata, S. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 205.
- (116) Shiozaki, M.; Doi, H.; Tanaka, D.; Shimozato, T.; Kurakata, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3011.
- (117) Oikawa, M.; Furuta, H.; Suda, Y.; Kusumoto, S. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5199.
- (118) Tsukamoto, H.; Suzuki, T.; Kondo, Y. *Synlett* **2007**, 3131.
- (119) Saburi, H.; Tanaka, S.; Kitamura, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1730.
- (120) Sho Nakagawa Master thesis, Osaka Univ. 2014
- (121) Tanaka, S. J.; Saburi, H.; Hirakawa, T.; Seki, T.; Kitamura, M. *Chem. Lett.* **2009**, *38*, 188.
- (122) Christina, A. E.; Blas Ferrando, V. M.; de Bordes, F.; Spruit, W. A.; Overkleeft, H. S.; Codee, J. D.; van der Marel, G. A. *Carbohydr. Res.* **2012**, *356*, 282.

- (123) Shie, C. R.; Tzeng, Z. H.; Kulkarni, S. S.; Uang, B. J.; Hsu, C. Y.; Hung, S. C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 1665.
- (124) Yu, B.; Sun, J. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 4668.
- (125) Li, Y.; Yang, X.; Liu, Y.; Zhu, C.; Yang, Y.; Yu, B. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 1871.
- (126) Lee, D.; Williamson, C. L.; Chan, L.; Taylor, M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8260.
- (127) Ohlsson, J.; Magnusson, G. *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 49.
- (128) Liang, P. H.; Imamura, M.; Li, X. M.; Wu, D.; Fujio, M.; Guy, R. T.; Wu, B. C.; Tsuji, M.; Wong, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12348.
- (129) Rauch, J.; Gumperz, J.; Robinson, C.; Skold, M.; Roy, C.; Young, D. C.; Lafleur, M.; Moody, D. B.; Brenner, M. B.; Costello, C. E.; Behar, S. M. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 47508.
- (130) Shiratsuchi, T.; Schneck, J.; Kawamura, A.; Tsuji, M. *J. Immunol. Methods* **2009**, *345*, 49.
- (131) Li, X.; Fujio, M.; Imamura, M.; Wu, D.; Vasan, S.; Wong, C. H.; Ho, D. D.; Tsuji, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 13010.
- (132) Nakagawa, S. Master thesis, Osaka Univ. 2014
- (133) Scott, P.; Novais, F. O. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16*, 581.
- (134) Alvar, J.; Velez, I. D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; den Boer, M.; Team, W. L. C. *PLoS One* **2012**, *7*.
- (135) Lotter H. *et al.* unpublished result

謝辞

本研究を遂行および本論文の執筆に際し、格別なご指導、ご鞭撻を賜りました、大阪大学大学院理学研究科 深瀬浩一教授、慶應義塾大学理工学部 藤本ゆかり教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、日々有益なご助言、ご指導、また議論をして下さいました、慶應義塾大学理工学部 井貫晋輔助教に深く感謝致します。

本論文を審査して頂き、有益なご教示、ご助言を賜りました大阪大学大学院理学研究科 梶原康宏教授、大阪大学蛋白質研究所 北條裕信教授に深謝致します。

本研究の遂行に際し、有益なご教示、ご助言を下さいました、大阪大学理学研究科 樺山一哉准教授、真鍋良幸助教、下山敦史助教に深く感謝致します。

生物活性試験を行うに際し、約三ヶ月間受け入れてくださり、研究、実験のご指導、ご助言を下さいました、Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine Dr. Hanna Lotter、Prof. Egbert Tannich に深く感謝致します。また、実際に実験指導をして下さいました、Dr. Hannah Bernin に深く感謝致します。また、ともに実験を行いました Siew-Ling Choy, Melina Mühlenpfordt に感謝いたします。

長鎖脂肪酸合成法に関して有益なご助言を賜りました、大阪大学工学研究科 岩崎孝紀助教、神戸宣明教授に深く感謝いたします。

ルテニウム触媒をご供与して頂き、また触媒に関する有益なご助言を下さいました、名古屋大学創薬科学研究科 北村雅人教授、名古屋大学物質科学国際研究センター 田中慎二助教に深謝致します。

硫黄およびセレン含有リン酸化試薬をご供与して頂き、また有益なご助言下さいました、岐阜大学工学部 村井利昭教授、前川侑輝氏に深く感謝致します。

合成化合物の高分解能 NMR 測定を行なっていただきました、分子科学研究所 加藤晃一教授、谷中冴子博士、北陸先端科学技術大学院大学 山口拓実准教授、大阪大学理学研究科技術部 稲角直也博士に深く感謝致します。

位置選択的リン酸化反応の計算化学による考察について、実際に計算やご助言を下さいました、シュレーディンガー株式会社 吉留大介氏、市原収博士に深く感謝致します。

リン酸化体の X 線結晶構造解析を行なって下さいました、株式会社創晶 安達宏昭博士に深謝いたします。

なお、本研究を遂行するにあたり、日本学術振興会特別研究員(DC1)、科学研究費補助金(特別研究員奨励費 14J01609)のご援助を頂きました。ここに記して感謝いたします。

最後に、家族をはじめ研究生活を支えて下さいました方々深く感謝致します。