[*J. Appl. Glycosci.*, Vol. 47, No. 2, p. 253–260 (2000)]

糖質関連酵素化学シンポジウム

酵素法によるオリゴ糖鎖ライブラリーの構築*

村田健臣, 碓氷泰市**

静岡大学農学部応用生物化学科 (422-8529 静岡市大谷 836)

Preparation of Oligosaccharide Units Library Utilizing Enzyme-catalyzed Glycosylation*

Takeomi Murata and Taichi Usui**

*Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University
(836, Ohya, Shizuoka 422-8529, Japan)*

With the growing biological importance of oligosaccharides involved in glycoconjugates, practical synthetic methods for obtaining oligosaccharides have been required. Enzyme-catalyzed oligosaccharide synthesis has been shown to be one of the most effective methods for large-scale oligosaccharide synthesis. This review describes enzyme-catalyzed synthesis of di, tri, and tetrasaccharide units, which are related to biological roles: (1) galactose-containing disaccharides, (2) fucose-containing trisaccharides, (3) core oligosaccharides in mucin-type carbohydrate, and (4) human milk oligosaccharides. Such well-defined oligosaccharide units are useful as substrates for glycosidases and glycosyltransferases, and as starting materials for artificial glycopolymers, which are valuable as probes of carbohydrate-protein interaction.

オリゴ糖鎖は、主に糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質として細胞表層や血中に存在し、情報・調節分子として機能していることが知られている¹⁾。また、細胞内では糖タンパク質の輸送や品質管理にも寄与していることが明らかになってきた²⁾。一方、人間にとって都合の悪いがん細胞やウイルスは、糖鎖を利用して増殖することもわかってきた。このような知見から、オリゴ糖鎖は単に生化学的な対象としてだけでなく、糖鎖に関わる疾患の治療薬あるいはそのリード化合物として認識され始め、現にシアル酸を基盤としたインフルエンザ治療薬が開発されている³⁾。われわれは、こうしたオリゴ糖鎖の生化学的機能と新しい戦略物質としての可能性に興味をもち、実践的で汎用性の高いオリゴ糖鎖合成法の開発に取り組み、オリゴ糖鎖ライブラリーの整備を行ってきた⁴⁾。本稿では、糖関連酵素を駆使したオリゴ二・四糖鎖ライブラリーの構

築について紹介する。

ガラクトシル二糖鎖ライブラリー

N-アセチルラクトサミン (Gal β 1-4GlcNAc) は、複合糖質を構成する代表的な分子認識単位であることが知られ、ウシの初乳中には遊離オリゴ糖として存在していることも報告されている⁵⁾。これまでに本二糖単位は有機合成法や β -1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼの糖転移反応により合成されてきたが、われわれは加水分解酵素を用いより効率的な合成法の開発を行った。*Bacillus circulans* 由来の市販 β -D-ガラクトシダーゼ製剤 (ビオラクタ) を用い、ラクトースを供与体基質、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を受容体基質とし、40% 高基質濃度下での反応を行った。反応液を活性炭-セライトカラムに供し、エタノール濃度勾配により吸着部を溶出後、結晶化により *N*-アセチルラクトサミン (**1**) を一段階のクロマト操作で供与体基質当たり約 25% の収率で得ることができた⁶⁾。さらに本反応では、**1** の分解に伴い構造異性体である *N*-アセチルイソラクトサミン (Gal β 1-6GlcNAc, **2**)

*“Proceeding of the Symposium on Amylases and Related Enzymes, 1999.”

**Corresponding author.

生成量の増加が観察された (Fig. 1a). しかしながら, 反応液中にアセトニトリルを添加することにより, 2 の生成量を抑えることができた⁷⁾ (Fig. 1b).

N-アセチルラクトサミンに加え, Fig. 2 に示すよう

Fig. 1. Time-course of LacNAc and IsoLacNAc formation by the action of β -D-galactosidase from *B. circulans*.

(a) The enzyme reaction was performed with lactose (66 mg), GlcNAc (54 mg), and β -D-galactosidase (0.5 U) at 40°C in 0.3 mL of 50 mM acetate buffer (pH 6.0). The amounts of 1 (●) and 2 (○) produced as a function of time were examined and samples were analyzed by HPLC during the incubation. (b) Lactose (45 mg), GlcNAc (55 mg), and β -D-galactosidase (0.3 U) at 40°C in 0.5 mL of the same buffer containing 50% CH₃CN. Other conditions were the same as those in (a).

に, ラクトースあるいは *p*-ニトロフェニル β -D-ガラクトピラノシドを供与体基質, GlcNAc あるいは *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) を受容体基質とし, さまざまな起源の β -D-ガラクトシダーゼの糖転移反応を用いることにより Gal-GlcNAc および Gal-GalNAc の (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4), (1 $\rightarrow$ 6) の組み合わせ可能な β -ガラクトシル二糖の位置選択的な合成法を確立している⁸⁻¹⁰⁾. このようなガラクトシル二糖鎖ライブラリーは, すでに糖質加水分解酵素や糖転移酵素の基質特異性解析⁹⁾や人工糖鎖高分子化による糖結合性タンパク質の機能解析においてその有効性が実証されている¹¹⁻¹⁴⁾.

フコシルオリゴ糖

フコシルオリゴ糖は, 血液型抗原やがん抗原の構成単位として知られるほか, ヒトミルク中には遊離の形で存在し¹⁵⁾大腸菌毒素の中和能を有することが報告されている¹⁶⁾. これまでに, 有機合成法や α -1,2-フコシルトランスフェラーゼ¹⁷⁾によりフコシル三糖の合成が行われている. われわれは, 動物および微生物起源の α -L-フコシダーゼを用いた糖転移反応によるフコシル三糖の合成を行った. すなわち, *p*-ニトロフェニル α -L-フコシドを供与体基質, *N*-アセチルラクトサミンを受容体基質とし, モル比 1:12, 総基質濃度約 14% 存在下で, ブタ肝臓抽出液より順次硫酸沈殿, CM-Sephacrose Fast Flow クロマトグラフィーにより部分精製した α -L-フコシダーゼを用いて反応を行った. 反応液を活性炭-セライトクロマトグラフィーにより分離したところ, ABO 式 2 型血液型抗原の構成単位である Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc (3) を供与体基質当たり約 5% の収率で得ることができた (Fig. 3a). この際, 構造異性体である Fuc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc (4)

Fig. 2. Preparation of β -galactose-containing disaccharide library utilizing β -D-galactosidase-mediated transgalactosylation.

および $\text{Fuc}\alpha 1\text{-6Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}$ (5) が同時に得られ、3, 4, 5 の生成比は 40 : 37 : 23 であった¹⁸⁾。しかしながら、Svensson ら¹⁹⁾が報告しているように、本酵素はラクトースを受容体基質として作用しなかった。化合物 3 は、*Campyrobacter* に対する結合性が報告されていることから、感染阻止剤等への応用が期待される²⁰⁾。

一方、*Alcaligenes* sp. 由来の α -L-フコシダーゼを利用すると、きわめて高選択的かつ汎用性の高い α -(1 $\rightarrow$ 3) フコシル化反応が可能であった¹⁹⁾。p-ニトロフェニル α -L-フコピラノシドを供与体基質、ラクトースを受容体基質とし、モル比 1 : 25、総基質濃度約 7% 存在下で、各種クロマトグラフィーにより部分精製した α -L-フコシダーゼを用いて反応を行った。その結果、ラクトースの 3' 位水酸基にフコース残基が高位置選択的に転移した $\text{Fuc}\alpha 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4Glc}$ (6) が供与体基質当たり 34% の高収率で得られた (Fig. 3b)。受容体基質としてメチル β -ラクトシド、メチル 3-O- β -D-ガラクトピラノシル- β -D-グルコピラノシド、N-アセチルラクトサミン、メチル β -N-アセチルラクトサミニドを用いた場合にも、本酵素は、いずれもガラクトー

ス残基の 3 位水酸基にのみフコース残基を転移し、供与体基質当たりそれぞれ約 42, 67, 54, および 67% の高収率であった。このように、本酵素を用いることできわめて実践的な α -(1 $\rightarrow$ 3) フコシル三糖合成法を確立することができた。 $\text{Fuc}\alpha 1\text{-3Gal}\beta$ 単位は、複合糖質糖鎖には見出されていないが、ヒトミルク²¹⁾やある種のがん細胞²²⁾に発現することが報告されていることから、今後の応用展開が期待される。

ムチン型糖鎖コア構造

消化管などに存在するムチンは糖含量が 50–80% の粘液質の糖タンパク質で、細胞表面の保護や細菌感染の防御に役立っている。ムチンに結合する糖鎖のほとんどはムチン型糖鎖と呼ばれ、いずれも GalNAc がセリンあるいはスレオニンに α 結合しており、8 種類のコア糖鎖構造によって分類されている^{23,24)}。ここでは、GalNAc α -pNP を出発原料とし、 β -D-ガラクトシダーゼの糖転移反応によりコア 1 糖鎖構造 (Gal β 1-3GalNAc α -pNP) を合成し、さらに β -N-アセチルヘキソサミニダーゼによりコア 2 糖鎖構造 [Gal β 1-3 (GlcNAc 1 β -6) GalNAc α -pNP] への酵素的変換について紹介する (Fig. 4)。

ブタ精巢から順次硫安沈殿、CM-Sepharose Fast Flow および Sephacryl S-200 により α -N-アセチルヘキソサミニダーゼ活性を除去した部分精製 β -D-ガラクトシダーゼを用い、ラクトースを供与体基質、GalNAc α -pNP を受容体基質とし、モル比 20 : 1、約 14% 高基質濃度での反応を行った。この際、受容体基質の溶解度を上げる目的で β -サイクロデキストリン (β -CD) を反応系に添加し、受容体基質との包接複合体を形成させた状態で糖転移反応を試みた。反応生成物は、Toyopearl HW-40S クロマトグラフィーにより分離精製し、目的化合物の Gal β 1-3GalNAc α -pNP (7) とその構造異性体である Gal β 1-6GalNAc α -pNP (8) が約 3 : 1 の生成比で受容体基質当たりの総収率約 22% で合成できた。 β -CD の使用は、水に対し溶解度の低い GalNAc α -pNP の溶解度を増加させるとともに、Gal β 1-3GalNAc α -pNP の収量を約 2.5 倍に増加させた (Fig. 5)¹⁰⁾。得られた Gal β 1-3GalNAc α -pNP は、糖タンパク質に α 結合した Gal β 1-3GalNAc 単位を特異的に加水分解する *Alcaligenes* sp. 由来のエンド- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼの活性測定基質として優れた基質となり得ることが明らかとなった⁹⁾。

次に得られた Gal β 1-3GalNAc α -pNP を用いてムチン型糖鎖コア 2 構造の酵素合成を行った。*Nocardia*

Fig. 3. Fucose-containing trisaccharide library synthesized by α -L-fucosidase from porcine liver (a) and *Alcaligenes* sp. (b).

Fig. 4. Enzymatic synthesis of Gal β 1-3GalNAc α -pNP (7) and Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α -pNP (9) as mimic units of mucin type oligosaccharide core1 and 2 structures by sequential use of porcine testes β -D-galactosidase and *Nocardiopsis orientalis* β -N-acetylhexosaminidase-catalyzed transglycosylation.

orientalis 由来の β -N-アセチルヘキサミンダーゼを用い、*N,N'*-ジアセチルキトビオースを供与体基質、Gal β 1-3GalNAc α -pNPを受容体基質とし、モル比1:10、総基質濃度約12%存在下での反応を行った。反応液を各種クロマトグラフィーより分離精製し、コア2糖鎖である目的化合物Gal β 1-3[GlcNAc β 1-6]GalNAc α -pNP (9)を受容体基質当たり約6%の収率で得ることができた。このとき、構造異性体であるGlcNAc β 1-6Gal β 1-3GalNAc α -pNPおよびGlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAc α -pNPを同時に調製することができた²⁵⁾。活性化T細胞²⁶⁾やがん細胞²⁷⁾などにおいて、コア1からコア2への変換を司る β -1,6-N-アセチルグルコサミン転移酵素活性の上昇が報告されていることから、これらコア糖鎖の細胞機能調節への関与が示唆されている。

このように合成した、ムチン型糖鎖コア1であるGal β 1-3GalNAc α -pNPは、人工糖鎖高分子合成のための基材として利用された (Fig. 6)。すなわち、Gal

Fig. 5. Time-course of Gal β 1-3GalNAc α -pNP (7) and Gal β 1-6GalNAc α -pNP (8) formation by the action of β -D-galactosidase from porcine testes in the presence (closed symbols) and absence (open symbols) of β -CD.

The enzyme reaction was performed with lactose (69 mg), GalNAc α -pNP (3.3 mg), β -CD (11 mg), and β -D-galactosidase (3.3 mU) for 50 h at 40°C in 0.5 mL of 50 mM acetate buffer (pH 5.5). The amounts of 7 (β 1 $\rightarrow$ 3, ●, ○) and 8 (β 1 $\rightarrow$ 6, ■, □) products as a function of time were analyzed by HPLC during incubation.

Fig. 6. Chemo-enzymatic synthesis of artificial mucins carrying mucin type oligosaccharide core 1 structure (10) or sialyl core 1 structure (11) using condensation reaction and α -2,3-sialyltransferase-catalyzed sialylation reaction.

β -1-3GalNAc α -pNP のニトロ基を還元しアミノ基に変換後、生じたアミノ基とポリグルタミン酸の縮合反応により、側鎖にコア1構造を有する人工糖鎖高分子(10)を得た。次にこの高分子10を受容体基質、CMP-Neu5Acを供与体基質とし、ラット肝臓由来の α -2,3-シアルルトランスフェラーゼを用い、コア1糖鎖構造へのシアル酸付加を試みた。その結果、コア1構造を含むシアルル三糖単位(Neu5Ac α -2,3Gal β -1-3GalNAc α)を側鎖にもつ人工ムチン(11)の構築に成功した。本人工糖鎖高分子10は、寒天ゲル内二重拡散法や表面プラスモン共鳴装置による相互作用解析において、コア1構造を特異的に認識するピーナツレクチン(PNA)およびマッシュルームレクチン(ABA)との反応性を示した。一方、シアル酸が付加した人工ムチン11では、コア1構造をエンド的に認識するABAとの反応性は観察されたが、エキソ的に認識するPNAとの反応性は消失していた。このように、これら人工糖鎖高分子は、側鎖に組み込んだ糖鎖構造を反映したレクチンとの親和性を有しているだけでなく、糖転移酵素の優れた受容体基質として機能することも実証された²⁸⁾。今回合成された人工ムチンは、ロタウイルスなどとの親和性が期待されることから、今後医療・環境材料などへの展開が期待される。

ヒトミルクオリゴ糖

人乳中に存在するラクトース以外の多様なオリゴ糖

はミルクオリゴ糖と総称され、現在までに構造が明らかにされたものだけでも80種類を超えている。これらのオリゴ糖は、いずれもラクトースを還元末端に有しており、その化学構造から10種類の系列に分類されている²⁹⁾。そのうち8種類はラクト-N-テトラオース(LNT, Gal β -1-3GlcNAc β -1-3Gal β -1-4Glc)あるいはラクト-N-ネオテトラオース(LNnT, Gal β -1-4GlcNAc β -1-3Gal β -1-4Glc)の4糖を基本骨格としている。しかしながら、LNTおよびLNnTを基本骨格とした実践的なオリゴ糖の合成^{30,31)}はほとんど試みられていない。そこで、われわれは多様なヒトミルクオリゴ糖鎖ライブラリーを構築するために、ヒトミルクオリゴ糖の基本4糖骨格の合成法の開発を行った(Fig. 7)。

1. LNT および LNnT のステップ合成法

まず、ラクトースを出発原料とし順次N-アセチルグルコサミニル化、ガラクトシル化を行うLNTおよびLNnTのステップ合成法を確立した³²⁾。すなわち、ラクトースを受容体基質、UDP-GlcNAcを供与体基質とし、ウシ血清由来の部分精製 β -1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素を用いて反応を行った。反応液を活性炭-セライトクロマトグラフィーに供し、生成したラクト-N-トリオースII(GlcNAc β -1-3Gal β -1-4Glc, 12)を供与体基質当たり約26%の収率で得ることができた。このように、ラクト-N-トリオースIIの量産が可能となったので、本三糖を受容体基質として、エキソ型糖質加水分解酵素である β -D-ガラクトシダーゼ

Fig. 7. Enzymatic conversion of lactose into lacto-N-triose II (12), lacto-N-tetraose (13) and lacto-N-neotetraose (14) using enzyme-catalyzed glycosylation.

の糖転移反応を利用し、LNT および LNT の選択的な合成を行った。o-ニトロフェニル β -D-ガラクトピラノシドとラクト-N-トリオースIIをモル比3:1となるように反応液を調製し、*Bacillus circulans* ATCC31382由来の β -D-ガラクトシダーゼを加え糖転移反応を行った。順次、逆相クロマトグラフィー、活性炭-セライトクロマトグラフィーにより反応混合物からLNTを含む四糖画分を分離した。本四糖画分に含まれるLNTの構造異性体を除去するために、 β -D-ガラクトシダーゼ処理を行った後、再び活性炭-セライトクロマトグラフィーに供し、受容体基質当たり約16%の収率でLNT (13)を得ることができた。

一方、LNT合成のために、ラクトースを供与体基質、ラクト-N-トリオースIIを受容体基質とし、 β -D-ガラクトシダーゼ(ピオラクタ)を酵素源として同様な糖転移反応を行った。その結果、糖転移生成物としてLNTのみが生成し、順次、活性炭-セライトクロマトグラフィーとバイオゲルP-2クロマトグラフィーにより受容体基質当たり約19%の収率でLNT (14)を得ることができた。

以上のように、ラクトースを出発原料とし β -1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素および起源の異なる β -D-ガラクトシダーゼを駆使したLNTおよびLNTの高位置選択的合成法を確立することができた。現在、これらヒトミルク基本四糖を基盤とし、酵素法によるフコシル化やシアリル化ヒトミルクオリゴ糖の調製を進めるとともに、さまざまな生理機能の評価を行って

いる。

2. LNTのブロック合成法

オリゴ糖鎖のブロック合成法は、有機合成法では広く導入されている一般的な方法論であるが、酵素合成法ではあまり試みられていない。ラクトースとラクト-N-ビオースI (Gal β 1-3GlcNAc)を一段階でLNTに導くブロック合成が可能となれば、より効率的な合成法を確立できると考えられる。そこで、LNTのブロック合成法の開発を試みた。すなわち、ラクトースを受容体基質、量産したp-ニトロフェニル β -ラクト-N-ビオシドI⁹⁾を供与体基質とし、モル比10:1、総基質濃度約7%で、*Aureobacterium* sp. L-101由来のラクト-N-ビオシダーゼを用い2糖鎖延長反応を試みた。本酵素は、ラクト-N-ビオースI単位を遊離するエンド型糖質加水分解酵素である。反応液より各種クロマト操作により得た目的化合物LNT (13)を分離し、供与体基質当たり0.6%の収率で得た。本反応は低収率ながら、一段階の反応でLNTを合成できるという新しい反応を見出した³²⁾。このような、酵素法によるオリゴ糖のブロック合成法は、今後重要な合成戦略の一つになり得ると思われる。

おわりに

近年の糖鎖生物学の発展は、複雑なオリゴ糖鎖の有機化学的合成法を編み出してきた先駆者の研究成果によるところが大きい。しかしながら、有機合成法は酵素法に比べると操作が煩雑であったり、時間を要した

Oligosaccharide library

Disaccharide library

R= H or pNP

Gal β 1-3GlcNAc-R Gal β 1-3GalNAc-R
Gal β 1-4GlcNAc-R Gal β 1-4GalNAc-R
Gal β 1-6GlcNAc-R Gal β 1-6GalNAc-R

Trisaccharide library

GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GalNAc-R
GlcNAc β 1-6Gal β 1-4GlcNAc-R GlcNAc β 1-6Gal β 1-4GalNAc-R
Gal β 1-4(GlcNAc β 1-6)GlcNAc-R Gal β 1-4(GlcNAc β 1-6)GalNAc-R
Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc-R Fuc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R
Fuc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R Fuc α 1-3Gal β 1-4Glc-R
Fuc α 1-6Gal β 1-4GlcNAc-R

Tetrasaccharide library

Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc

Artificial glycopolymer library

Poly(Gal β 1-4GlcNAc/Gln-co-Glu)
Poly(Gal β 1-6GlcNAc/Gln-co-Glu)
Poly(GlcNAc/Gln-co-Glu)
Poly[(GlcNAc)₂/Gln-co-Glu]
Poly[(GlcNAc)₃/Gln-co-Glu]

Poly(GalNAc α -pAP/Gln-co-Glu)
Poly(GalNAc β -pAP/Gln-co-Glu)
Poly(Gal β 1-3GalNAc α -pAP/Gln-co-Glu)
Poly(Gal β 1-3GalNAc β -pAP/Gln-co-Glu)
Poly(Gal β 1-6GalNAc α -pAP/Gln-co-Glu)
Poly(Gal β 1-6GalNAc β -pAP/Gln-co-Glu)

Poly(Sia α 2-3Gal β 1-3GalNAc α -pAP/Gln-co-Glu)

Fig. 8. Oligosaccharide and artificial glycopolymer libraries synthesized by enzyme-catalyzed glycosylation.

り、さらには合成のための高いスキルが要求されることもあった。そのため、有機合成法では、オリゴ糖鎖を工学的に展開するための量産化は困難であった。また、近年の環境やエネルギーを取り巻く社会問題から、環境負荷を低減した合成法の開発が求められている。このような背景の下、われわれは酵素触媒を活用した環境調和型のオリゴ糖鎖合成法の開発に取り組み、Fig. 8 に示すようなオリゴ糖鎖および糖鎖高分子ライブラリーを構築してきた。これら複合糖質素材は、これまでのような生理機能を解明するための生化学試薬としてだけでなく、今後、環境医療材料、食品素材としての幅広い応用展開が期待される。

文 献

- 1) A. Varki: Biological roles of oligosaccharides: All of the theories are correct. *Glycobiology*, **3**, 97-130 (1993).
- 2) J.D. Marth: Initial steps in *N*-glycan processing and control of protein folding. in *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, J. Marth, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. 88 (1999).
- 3) M. Luo, G.M. Air and W.J. Brouillette: Design of aromatic inhibitors of influenza virus neuraminidase. *J. Infect. Dis.*, **165**, S62-S65 (1997).
- 4) T. Murata and T. Usui: Preparation of oligosaccharide units library and its utilization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1059-1066 (1997).
- 5) T. Saito, T. Itoh and S. Adachi: Presence of two neutral disaccharides containing *N*-acetylhexosamine in bovine colostrum as free forms. *Biochim. Biophys. Acta*, **801**, 147-150 (1984).
- 6) S. Sakai, R. Katsumi, H. Ohi, T. Usui and Y. Ishido: Enzymatic synthesis of *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylglucosamine by the use of β -D-galactosidase. *J. Carbohydr. Chem.*, **11**, 553-565 (1992).
- 7) T. Usui, S. Morimoto, Y. Hayakawa, M. Kawaguchi, T. Murata, Y. Matahira and Y. Nishida: Regioselectivity of β -galactosyl-disaccharide formation using the β -D-galactosidase from *Bacillus circulans*. *Carbohydr. Res.*, **285**, 29-39 (1996).
- 8) T. Usui, S. Kubota and H. Ohi: A convenient synthesis of β -D-galactosyl disaccharide derivatives using the β -D-galactosidase from *Bacillus circulans*. *Carbohydr. Res.*, **244**, 315-323 (1993).
- 9) T. Murata, T. Itoh, Y. Hayakawa and T. Usui: Convenient synthesis of β -(1-3)-galactosyl disaccharide α -glycoside and its analogs as mimic units of mucin-type carbohydrate. *J. Biochem.*, **120**, 851-855 (1996).
- 10) X. Zeng, R. Yoshino, T. Murata, K. Ajisaka and T. Usui: Regioselective synthesis of *p*-nitrophenyl glycosides of β -D-galactopyranosyl-disaccharides by use of transglycosylation of β -D-galactosidases. *Carbohydr. Res.*, **325**, 120-131 (2000).
- 11) X. Zeng, T. Murata, H. Kawagishi, T. Usui and K. Kobayashi: Synthesis of artificial *N*-glycopolypeptides carrying *N*-acetylglucosamine and related compounds and their specific interactions with lectins. *Carbohydr. Res.*, **312**, 209-217 (1998).
- 12) X. Zeng, T. Murata, H. Kawagishi, T. Usui and K. Kobayashi: Synthesis of artificial *N*-glycopolypeptides carrying *N*-acetylglucosamine and related compounds and their specific interactions with lectins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1171-1178 (1998).
- 13) A. Tsuchida, S. Akimoto, T. Usui and K. Kobayashi: Synthesis of artificial glycoconjugate polymers starting from enzymatically synthesized oligosaccharides and their interactions with lectins. *J. Biochem.*, **123**, 715-721 (1998).
- 14) K. Kobayashi, E. Tawada, T. Akaike and T. Usui: Artificial glycopolypeptide conjugates: simple synthesis of lactose- and *N,N*-diacetylchitobiose-substituted poly(L-glutamic acid)s through *N*- β -glycoside linkages and their interaction with lectins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1336**, 117-122 (1997).
- 15) A. Kobata: Isolation of oligosaccharides from human milk. *Methods Enzymol.*, **28**, 262-271 (1972).
- 16) D.S. Newburg, L.K. Pickering, R.H. McCluer and T. G. Cleary: Fucosylated oligosaccharides of human milk product suckling mice from heat stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, **162**, 1075-1080 (1990).
- 17) P.R. Rosevear, H.A. Nunez and R. Barker: Synthesis and solution conformation of the type 2 blood group oligosaccharide α -L-Fuc(1-2) β -DGal(1-4) β -DGlucNAc. *Biochemistry*, **21**, 1421-1431 (1982).
- 18) T. Murata, S. Morimoto, S. Watanabe, X. Zeng and T. Usui: Enzymatic synthesis of α -L-fucosyl *N*-acetylglucosamine and α -L-fucosyllactoses. *Carbohydr. Res.*, **320**, 192-199 (1999).
- 19) S.C.T. Svensson and J. Thiem: Purification of α -L-fucosidase by C-glycosylic affinity chromatography, and the enzymic synthesis of α -L-fucosyl disaccharides. *Carbohydr. Res.*, **200**, 391-402 (1990).
- 20) D.S. Newburg: Do the binding properties of oligosaccharides in milk protect human infants from gastrointestinal bacteria?. *J. Nutr.*, **127**, 980S-984S (1997).
- 21) K. Yamashita, Y. Tachibana and A. Kobata: Oligosaccharides of human milk. Isolation and characterization of three new disialylfucosyl hexasaccharides. *Arch. Biochem. Biophys.*, **174**, 582-591 (1976).
- 22) T. Miyauchi, S. Yonezawa, T. Takamura, T. Chiba, S. Tejima, M. Ozawa, E. Sato and T. Muramatsu: A new fucosyl antigen expressed on colon adenocarcinoma and embryonal carcinoma cells. *Nature*, **299**, 168-169 (1982).
- 23) H.F. Hounsell, M.J. Davies and D.V. Renouf: O-linked protein glycosylation structure and function.

Glycoconjugate J., **13**, 19–26(1996).

- 24) Y.S. Kim, J.J. Gum and I. Brockhausen: Mucin glycoproteins in neoplasia. *Glycoconjugate J.*, **13**, 693–707(1996).
- 25) T. Murata, T. Itoh and T. Usui: Enzymatic synthesis of β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)-[β -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 6)]- α -D-GalNAc-OC₆H₄NO₂-p as a carbohydrate unit of mucin-type 2 core. *Glycoconjugate J.*, **15**, 575–582 (1998).
- 26) F. Piller, V. Piller, R.I. Fox and M. Fukuda: Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **263**, 15146–15150(1988).
- 27) I. Brockhausen, P.A. Romero, A. Herscovics: Glycosyltransferase changes upon differentiation of Caco-2 human colonic adenocarcinoma cells. *Cancer Res.*, **51**, 3136–3142(1991).
- 28) X. Zeng, Y. Nakaaki, T. Murata, T. Usui and K. Kobayashi: XV International Symposium on Glycoconjugates (Tokyo Japan). *Glycoconjugate J.*, **16**, p. S 120 (1999).
- 29) 浦島 匡, 斎藤忠夫: ミルクオリゴ糖の生理的意義, バイオサイエンスとインダストリー, **57**, 39–40 (1999).
- 30) S. Sabesan and J.C. Paulson: Combinatorial chemical and enzymatic synthesis of sialyloligosaccharides and characterization by 500-MHz ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2068–2080 (1986).
- 31) T. Takamura, T. Chiba, H. Ishihara and S. Tejima: Chemical modification of lactose. XIII. Synthesis of lacto-N-tetraose. *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 1804–1809 (1980).
- 32) T. Murata, T. Inukai, M. Suzuki, M. Yamagishi and T. Usui: Facile enzymatic conversion of lactose into lacto-N-tetraose and lacto-N-neotetraose. *Glycoconjugate J.*, **16**, 185–195 (1999).

【質問】

千葉大 篠山

ミルクオリゴ糖のブロック合成で使用したラクト-N-ビオシダーゼは, Gal β 1-3GlcNAc β -pNP 以外に GlcNAc β -pNP に作用しませんか. すなわち, Gal β 1-3GlcNAc の二糖単位が基質として必須ですか.

【答】

ラクト-N-ビオシダーゼは, Gal β 1-3GlcNAc 二糖単位をきわめて特異的に遊離する酵素で, GlcNAc β -pNP はもちろん Gal β 1-3GalNAc β -, Gal β 1-4GlcNAc β -などの二糖単位にも作用しません.

【質問】

京都大 山本

糖の6位に特異的にフコシル基が入る活性をもった α -L-フコシダーゼはないか. 特に, 還元末端側の糖の6位にフコシル基を転移付加することはできませんか.

【答】

糖の6位に特異的にフコシル基が入る活性をもった α -L-フコシダーゼは, 現在までのところ見出されていないと思われます. また, α -L-フコシダーゼを用いて還元末端側の糖の6位にフコシル基を転移付加することは, きわめて難しいと思われます. それは, ほとんどの場合, 加水分解酵素の糖転移反応は, 非還元末端糖残基の水酸基への糖付加が起こるからです. N型糖鎖のN-アセチルキトビオースへのフコシル化を触媒する α -1,6-フコシルトランスフェラーゼを用いれば, 非還元末端 GlcNAc 残基へのフコシル基の転移付加は可能かもしれません.

【質問】

鹿児島大 安部

高分子化ライブラリーの構築方法を簡単に教えてください.

【答】

まず, 側鎖に組み込むオリゴ糖誘導体の p-ニトロフェニル基を還元反応によりアミノ基に変換します. 次に, 生じたアミノ基とポリグルタミン酸のカルボキシル基を, ペプチドの合成に汎用されている BOP と HOBt を用いて縮合反応を行いオリゴ糖の高分子化を行っています.

【質問】

京都工繊大 橋本

1) ムチン型糖鎖コア構造において末端の pNP は, 結合位置選択性に必須か.

2) ラクト-N-ビオシダーゼについて, 天然における基質は何か. 糖転移生成物の収量が非常に低い理由は酵素の転移活性が低いのか受容体が悪いのか.

【答】

1) pNP のない糖を受容体基質に用いても, ほとんど結合位置選択性に大きな影響はないと思われます. 合成後に糖関連酵素の基質として用いたり, 高分子化するために利用しやすいということで, pNP 配糖体を用いています.

2) ラクト-N-ビオシダーゼは, ムチンを培地に添加したときに誘導されてくる酵素なので, ムチン型糖鎖に結合した Gal β 1-3GlcNAc 二糖単位が天然の基質であると考えられます. 糖転移生成物の収量が非常に低いのは, 分離精製のステップがかなり煩雑であることが大きな原因になっていると思いますが, 反応条件の検討が必ずしも十分ではないことも一因であると考えております.

(2000年2月8日受付)