糖オキサゾリンの一段階合成がもたらす構造明確な糖タンパク質合成

野口 真人；小林 厚志；正田 晋一郎

東北大学大学院工学研究科バイオ工学専攻
FAX: +81-22-795-7293, E-mail: shoda@poly.che.tohoku.ac.jp

(受付日：2015年3月20日，受理日：2015年4月13日)

キーワード：糖オキサゾリン誘導体，糖タンパク質，脱水縮合剤，エンド-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ

要 約

糖オキサゾリン誘導体は、*N*-アセチルグルコサミニダーゼを触媒とする配糖化反応の優れた糖供与体となることが知られている。本稿では、筆者らのグループにおいて開発された水溶性脱水縮合剤を用いる糖オキサゾリンの一段階合成、ならびにそれらを供与体として用いる糖タンパク質に代表される複雑な構造をもつ配糖体の合成について、最近の進歩を紹介する。

A. はじめに

哺乳類においては、発現タンパク質の半数以上が糖鎖による修飾を受けていると言われている。糖タンパク質の糖鎖構造の違いによって、タンパク質の生理活性や安定性が大きく変化する。例えば、付加されたオリゴ糖鎖の構造が、タンパク質の品質管理機構に深く関与していることが近年の研究により明らかになっている。これらの詳細については、以前のTIGGを参照されたい(1–3)。

生体内での糖タンパク質合成は、多数の糖転移酵素と加水分解酵素が関わる多段階の反応を経て達成される。このため、糖鎖構造が完全に均一な糖タンパク質の合成は、高度に制御された生合成システムをもってしても非常に困難である。現在のところ、糖鎖構造が完全に均一な糖タンパク質を調製するためには、化学合成による手法を用いるか、あるいは化学–酵素合成による手法に頼るしかない。化学–酵素合成法は、触媒である酵素がオリゴ糖基質および受容体となるタンパク質部位を認識することができる限り、大きなオリゴ糖を一気にタンパク質に導入することができる点において、化学合成に比べ有利である。

化学–酵素合成法による糖タンパク質合成においては、糖タンパク質に作用するエンド-*N*-アセチルグルコサミニダーゼを触媒として、糖オキサゾリン誘導体を糖供与体として用いることが多い。従来、糖オキサゾリンの合成には、ヒドロキシ基の保護と脱保護を伴う煩雑な多段階のステップが必要であった。化学–酵素法による糖タンパク質合成を汎用的な手法とするために、糖オキサゾリンのより簡便な合成法の開発が強く求められている。本稿では、筆者らの研究室で開発された水溶液中での糖オキサゾリンの一段階合成法を紹介する。また、オリゴ糖オキサゾリンを供与体とする、加水分解活性の低い変異型エンド-*N*-アセチルグルコサミニダーゼを触媒とする糖タンパク質合成の技術革新について述べる。

B. 水溶性脱水縮合剤を用いるオキサゾリン合成

糖オキサゾリン誘導体の合成は、対応するアセトアミド糖の脱水縮合反応とみなすことができる(図1)。筆者らは、脱水縮合剤を利用することで水溶液中における糖オキサゾリン誘導体が合成可能ではないかとの着想を得た。この脱水縮合反応を選択的に進行させるためには、アノマー位ヒドロキシ基と、求電子剤である脱水縮合剤が水溶液中で選択的に反応することが必要である。グルコースのアノマーヒドロキシ基のpK_a値は12.4と報告されており、水に比べてはるかに高い酸性度を有している(4)。このため、グルコースなどのヘミアセタール性ヒドロキシ基は、水溶液中で求核剤として反応することが予想される。実際に、1995年には水–エタノール混合溶媒中、2,4,-ジニトロフルオロベンゼンを求電子剤として用いるジニトロフェニルグリコシドの合成がS. Penadésらによって報告されている(5)。筆者らは水溶性脱水縮合剤である1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)を用いる糖オキサゾリン合成を試みた。その結果、水溶液中で対応する糖オキサゾリンの合成が可能であることがわかったが、反応条件の最適化を行っても収率は低い

図1. 脱水反応によるオキサゾリン合成。

スキーム1. 水溶性カルボジイミドを用いるオキサゾリン合成。

ものであった (スキーム1) (6)。

EDCを用いる糖オキサゾリンの一段階合成では、カルボジミドの求電子性および中間体であるイソウレアの脱離能の低さが、収率が低い原因であると考察した。収率向上のため、種々の水溶性脱水縮合剤を検討した結果、ホルムアミジン型の脱水縮合剤である2-クロロ-1,3-ジメチルイミダゾリウムクロリド (DMC) が最もよい収率で糖オキサゾリンを与えることを見出した。DMCが強力な脱水剤であることは、アミドを分子内脱水して対応するニトリルに変換可能であることから明らかである (7)。

ここで開発した糖オキサゾリンの合成においては、

表 1. DMC を用いる糖オキサゾリン誘導体の合成。

Entry	Substrate (mM)	DMC eq.	Base (eq.)	Yield (%)
1	GlcNAc (250)	3	(Me) ₂ NEt (9)	72
2	GlcNAc (250)	3	Et ₃ N (9)	90
3	LacNAc (50)	10	Et ₃ N (30)	90
4	(GlcNAc) ₂ (50)	10	Et ₃ N (30)	77
5	(GlcNAc) ₃ (10)	15	Et ₃ N (45)	75
6	(GlcNAc) ₄ (10)	15	Et ₃ N (45)	83
7	(GlcNAc) ₅ (10)	15	Et ₃ N (45)	69
8	(GlcNAc) ₆ (10)	15	Et ₃ N (45)	81
9	GlcNAc-6-sulfate (125)	3	Et ₃ N (9)	84
10	GlcNAc-6-phosphate (125)	3	Et ₃ N (9)	79
11	Disialooligosaccharide (50)	15	Et ₃ N (45)	92

DMCとトリエチルアミンを過剰量用いることで目的とする糖オキサゾリンを収率よく調製することができる (表1) (8)。本手法は、*N*-アセチルグルコサミンのような単糖だけでなく、*N*-アセチラクトサミンやキトオリゴ糖などのオリゴ糖にも適用可能であった。さらに、従来法では合成が達成されていなかったN結合型糖鎖の一種であるジシアロオリゴ糖も、シアル酸の脱離やラクトン化を伴うことなく対応するオキサゾリン誘導体へと変換可能であった。得られた糖オキサゾリンは、キトオリゴ糖の場合は、逆相HPLCで単離可能であった。また、カルボン酸を有するジシアロオリゴ糖のオキサゾリン誘導体の場合は、Sephadex G-15などの分取ゲルろ過カラムを使用することにより精製可能であった (9)。ここで開発したDMCを用いる反応は、保護・脱保護を含む多段階経路による既存の方法で合成されるオリゴ糖のオキサゾリンの合成にも適用されている一般的性の高い方法論である (10-13)。

DMCによる還元末端選択的な直接活性化法は、オキサゾリン誘導体の合成だけでなく、さまざまな誘導体の合成に適用された。たとえば、還元末端にグルコースを有する糖にDMCを反応させると、1位と6位の間で分子内脱水縮合反応が進行し、対応する1,6-アンヒドロ糖を合成することができる (14)。さらに、アジ化ナトリウムあるいはアリールチオール存在下で遊離糖にDMCを作用させた場合には、対応するアジ化グリコシルおよびチオグリコシドへと効率よく変換することができる (図2) (15-17)。

DMCを用いることで糖オキサゾリンの合成が水溶液中、一段階で可能になったが、DMCの自発的な加水分解がかなり進行することから、低濃度の基質に適用する場合には、DMCを過剰量用いる必要があった。またDMCは潮解性の高い固体であるため、試薬の秤量などの取扱が非常に煩雑であった。さらに、DMCの分解物である1,3-ジメチルイミダゾ

図2. 遊離糖のDMCによる誘導化反応。

リジノン (DMI) は高沸点の極性溶媒であることから、水溶液中からの DMI の除去は困難であった。筆者らは、これらの問題点を改善するために、DMC と同様の骨格を有するホルムアミジン型の脱水縮合剤の検討を行った。DMC では活性が強すぎることから、電子供与性基をホルムアミジン骨格に導入することにより、試薬の安定性が向上するのではない

かと考えた。

筆者らは、DMC のエチレン部分をフェニレン基に置換した 2-クロロ-1,3-ジメチルベンズイミダゾリウムクロリド (CDMBI) を開発した(18)。CDMBI は潮解性を示さない安定な固体であり、また、分解物である 1,3-ジメチルベンズイミダゾロンは水に難溶であることから、その除去が容易である。CDMBI の水への溶解性は室温において 1 mL の水に対して 1.2 g 程度であった。このことから、CDMBI を脱水縮合剤として用いた場合においても、水中において 2-アセタミド糖を対応するオキサゾリンに効率よく変換できることがわかった。150 mM 程度の基質濃度の場合、同じ変換効率を達成するのに必要な当量は DMC と変わらないが、50 mM 以下の低濃度領域で顕著な差が現れた (表 2)。また、無機塩基であるリン酸塩や炭酸塩を用いても、効率的に無保護糖をオキサゾリンへと変換可能であった。

CDMBI は、特に難溶解性のオリゴ糖や分子量の大きなオリゴ糖のオキサゾリン化に有効である。キトビオースを用いて 1 mM の濃度で 5 当量の CDMBI を使用した結果、収率 30% 程度で対応するオキサゾリン誘導体が得られた (未発表データ)。このように、CDMBI は DMC に比べて反応性が低いものの、2-アセタミド基とヘミアセタール間の分子内脱水反応により、対応するオキサゾリンを生成するに十分な活性を有していることがわかった。分解物を沈殿として容易に除去できるという利点を活かすことにより、オキサゾリン中間体を単離精製することなく、出発原料からわずか二段階で

表 2. CDMBI を用いる糖オキサゾリン誘導体の合成。

Entry	Substrate (mM)	Condensing Agent (eq.)	Base (eq.)	Yield (%)
1	GlcNAc (150)	CDMBI (3)	Et ₃ N (7.5)	79
2	GlcNAc (150)	CDMBI (3)	Na ₃ PO ₄ (7.5)	81
3	GlcNAc-6-sulfate (125)	CDMBI (5)	K ₂ CO ₃ (15)	88
4	(GlcNAc) ₂ (150)	CDMBI (3)	Na ₃ PO ₄ (7.5)	89
5	Lacto-N-biose (100)	CDMBI (3)	Na ₃ PO ₄ (7.5)	93
6	(GlcNAc) ₂ (10)	CDMBI (5)	Na ₃ PO ₄ (12.5)	90
7	(GlcNAc) ₂ (10)	DMC (5)	Na ₃ PO ₄ (12.5)	48
8	disialooligo saccharide (50)	CDMBI (5)	K ₂ CO ₃ (30)	98
9	disialooligo saccharide (50)	CDMBI (5)	K ₃ PO ₄ 3H ₂ O (15)	91

スキーム 2. CDMBI によるオキサゾリン合成反応液を用いる Endo-M 変異体触媒による単一溶液での配糖化反応。

化学-酵素的配糖化を実現した（スキーム2）。

C. 糖オキサゾリンと変異型 *N*-アセチルグルコサミニダーゼの組み合わせによる高効率な糖転移反応

一般に、糖加水分解酵素触媒による配糖体合成においては、糖転移生成物が酵素による加水分解を受けるため、収率の向上が困難である。この問題の解決策の一つが Withers らによって開発されたグリコシターゼの利用である(19)。このグリコシターゼは、アノマー保持型加水分解酵素の活性サイトに存在する求核性アミノ酸残基を、非求核性アミノ酸に置換することによって調製される。グリコシターゼによる配糖化反応では、目的とするグリコシド結合と逆の立体配置を持つフッ化糖が糖供与体として用いられ、生成物の加水分解を起こすことなく、好収率で対応する配糖体が得られる。詳細については、TIGGの以前の記事を参照されたい(20)。

Glycoside Hydrolase Family (GH) 18 や 20、85 に属するキチナーゼやヘキシサミニダーゼ、エンド-*N*-アセチルグルコサミニダーゼなどの活性サイトには、求核性アミノ酸活性残基が存在しない。これらの酵素によるグリコシド結合の加水分解は、基質のアセトアミド基が求核剤として関与し、オキサゾリニウムイオンを経由する“substrate assisted catalysis”と呼ばれる機構で進行する（図3）(21)。最近、オキサゾ

リニウムイオンのアナログである糖オキサゾリンを遷移状態アナログ基質として用いる糖転移反応が数多く報告されている(22, 23)。これらの酵素は、求核性アミノ酸を持たないため、グリコシターゼを調製することができない。糖転移能力を向上させるためには、グリコシターゼとは全く異なる新しい戦略による変異導入が必要であった。

Bacillus circulans WL-12 由来のキチナーゼ A1 は GH 18 に分類され、*N*-アセチラクトサミンのオキサゾリン誘導体を認識する(24)。筆者らの研究室では、キチナーゼ A1 の-2 位のサブサイトに存在する 433 番目のトリプトファン残基をアラニンに変異させることで、加水分解活性を消失させた変異体 (ChiA1 W433A) を取得した(25, 26)。この ChiA1 W433A はキチナーゼの活性測定試薬として汎用される *p*-ニトロフェニルβ-キトビオシドには作用しない。一方でこの ChiA1 W433A は糖オキサゾリンを用いる糖転移活性は保持しており、*N*-アセチラクトサミンのオキサゾリン誘導体を糖供与体、キトビオースを糖受容体とする配糖化反応が進行し、対応する4糖を96%の収率で得ることに成功した。これは、高活性なオキサゾリン基質と低活性な糖加水分解酵素を組み合わせ用いた初めての例である。また、ChiA1 W433A を用い、キトペンタオースオキサゾリン誘導体を糖供与体とし、キトビオースを糖受容体とすることで、均一な難水溶性オリゴ糖であるキトヘプタオースの合成に成功した（スキーム3）

図3. “substrate assisted catalysis”機構で進行するヘキシサミニダーゼの反応機構。

スキーム3. キトペンタオースオキサゾリン誘導体とキトビオースを基質とする低加水分解活性キチナーゼA1によるキトヘプタオース合成。

(26)。このキトヘptaオースの選択的合成は、低加水分解活性変異体の創出と、糖オキサゾリン誘導体の水溶液中での一段階合成の達成により実現可能となった。

D. 糖タンパク質合成への応用

Mucor hiemalis 由来エンド-N-アセチルグルコサミニダーゼ (Endo-M) は、GH85に分類される糖加水分解酵素であるが、さまざまなN結合型糖鎖に作用し、GlcNAc-GlcNAc間のグリコシド結合を切断することが知られている(27)。このEndo-Mは、適切な糖受容体の存在下において高い糖転移活性を示す。このことを利用して、シアル酸を含む糖ペプチドが、ジシアログリコペプチド (SGP) を糖供与体として、合成されている(28-33)。

Endo-Mは二糖であるMan-GlcNAcの糖オキサゾリン誘導体も基質として認識し、GlcNAc受容体の存在下、糖転移反応生成物を与えることがわかった(34)。興味深いことに、三糖であるMan-GlcNAc-GlcNAcはEndo-Mによって認識されないことが判明し、このことは糖転移生成物はEndo-Mにより加水分解されないことを示唆するものである。

最近山本らは、糖転移活性を向上させた低加水分解活性変異体を開発している。217番目のチロシンをフェニルアラニンにした変異体 (Endo-M Y217F) は、SGPを糖供与体とした場合、野生型と比較して、加水分解活性が72%に減少し、糖転移活性は147%に上昇した(35)。このようにEndo-M Y217FはSGPを糖供与体として用いる糖転移反応の有効な触媒となることがわかった。しかしながら、反応の進行とともに、生成物の加水分解反応がかなり起きてしまうという問題点が残されていた。

一方、175番目のアスパラギンをアラニンに置換した変異体 (Endo-M N175A) はSGPを加水分解する活性がほぼ消失しているにもかかわらず、糖オキサゾリン誘導体を認識し、糖転移反応を進行させることがわかった。この175番目のアスパラギン残基は、反応中間体であるオキサゾリウムイオンを安定化する役割を果たすと考えられている (図4)。このように175番目のアスパラギン残基変異体がオキサゾリン誘導体を糖供与体とする反応に有効であることがわかったので、次に、他の変異体を調製し、加水分解や糖転移能を評価した。その結果、175番目のアスパラギンをグルタミンに

変異させたEndo-M N175QがN-結合型オリゴ糖の転移反応に最も適していることがわかった(36)。Endo-M N175Qを用いることにより、オキサゾリン供与体の糖転移反応をほぼ定量的に進行させることができ、さまざまな糖ペプチドや糖タンパク質合成に応用されている(37-42)。Endo-M N175Qを触媒として用い、CDMBI法により調製された不安定な反応中間体である糖オキサゾリンを精製することなく、単一溶液中での化学-酵素配糖化が実現されている (スキーム2)(18)。Endo-M N175Qは現在市販されている。

Endo-Mは、高マンノース型糖鎖や複合型糖鎖など幅広い基質を認識するが、コアフコースを持つN-結合型糖鎖は認識できなかった。これらの糖タンパク質の糖鎖をリモデリングすることは困難と考えられてきた。*Streptococcus pyogenes* 由来エンド-N-アセチルグルコサミニダーゼ (Endo-S) はフコシル化されたN結合型糖鎖を認識することができる(43)。B. G. Davisらのグループは、Endo-Sの基質特異性を利用して、単一のグライコフォームを持つヒトIgGの調製に成功した。フコシル化されているヒトIgGにEndo-Sを作用させてFuc-GlcNAc-Asn構造へと変換した後に、Man₃GlcNAc四糖のオキサゾリン誘導体を用いてEndo-Sを触媒とする糖転移反応を行うことで、均一な糖鎖構造を有するIgGが調製されている (図5)(44)。

またL. X. Wangらのグループは、Endo-Mにおける糖転移能の効率化を基盤に、低加水分解活性を示すEndo-Sを調製した。Wangらは、233番目のアスパラギン酸をグルタミンまたはアラニンに変異させたEndo-Sが、オキサゾリンを基質とする糖転移反応を効率的に進行することを見出した(45)。Endo-Sは、IgGに対して高い親和性を有しており、IgGの糖鎖構造のリモデリングに極めて有用な酵素である(46)。

Streptococcus pneumoniae 由来エンド-N-アセチルグルコサミニダーゼ (Endo-D) もまた、フコシル化されたN結合型糖鎖を認識して切断することが知られている。このEndo-Dに関しても、Endo-Mの糖転移能の効率化における基本的な戦略に沿って、変異体の開発が行われている(47)。これまで紹介したエンド-N-アセチルグルコサミニダーゼ、Endo-M、Endo-S、Endo-DはいずれもGH 85に分類される糖加水分解酵素である。このことから、糖オキサゾリンの一段階合成

図4. Endo-Mによる加水分解反応におけるAsn175の役割。

図5. Endo-Sを用いる糖鎖リモデリング法による単一のグライコフォームを持つIgGの調製。

法は、糖鎖工学の分野において、多岐にわたるエンド-N-アセチルグルコサミニダーゼに対して適用可能な一般的な合成手法であることが示された。上述した変異型エンド-N-アセチルグルコサミニダーゼを用いる糖転移反応については、以前のTIGGに詳しく解説されているので、参考にされたい(48)。

E. 今後の展望

水中における糖オキサゾリンの一段階合成は、低活性グリコシダーゼと組み合わせることにより、N-結合型糖タンパク質に代表される複雑な配糖体の合成に必要な不可欠な基盤技術となっている。しかし、その出発原料となるオリゴ糖は、安価かつ大量に入手することが必ずしも容易ではない。たしかに近年の単離技術の発展により、ジシアロ複合型糖鎖(SGP)については、鶏卵卵黄から調製する強力な手法が開発されているが(49)、将来に向けてより糖質科学の基礎研究を推進するためには、これらオリゴ糖原料をより簡単に入手

することのできる体制づくりが期待される。

謝 辞

本稿で紹介した研究は、多くの共同研究者の協力により達成されたものである。水溶液中での糖オキサゾリン誘導体の一段階合成研究には、門川淳一教授(鹿児島大学)、田中知成助教(京都工芸繊維大学)、石原正規博士(大塚化学)、黄偉峻博士のほか多くの共同研究者の協力により行われており厚く御礼申し上げます。変異型Endo-Mを用いる糖転移反応の研究には、共同研究者である山本憲二教授(石川県立大学)、芦田久教授(近畿大学)、梅川碧里助教(立命館大学)、Lai-Xi Wang教授(Maryland University)に感謝いたします。変異型キチナーゼの研究には、渡邊剛志教授(新潟大学)、桑折道済助教(千葉大学)に感謝いたします。また、貴重な糖鎖を提供頂きました北岡本光博士(食品総合研究所)、焼津水産化学工業に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Tanaka, K., and Fukase, K. (2012) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **24**, 47–64.
2. Totani, K. (2010) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **22**, 296–307.
3. Izumi, M., Kiuchi, T., Ito, Y., and Kajihara, Y. (2013) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **25**, 1–12.
4. Thamsen, J., Lund, E. W., Åkerström, Å., Finsnes, E., Sørensen, J. S., and Sørensen, N. A. (1952) *Acta Chem. Scand.* **6**, 270–284.
5. Sharma, S. K., Corrales, G., and Penadés, S. (1995) *Tetrahedron Lett.* **36**, 5627–5630.
6. Kadokawa, J., Mito, M., Takahashi, S., Noguchi, M., and Shoda, S. (2004) *Heterocycles* **63**, 1531–1535.
7. Isobe, T., and Ishikawa, T. (1999) *J. Org. Chem.* **64**, 6984–6988.
8. Noguchi, M., Tanaka, T., Gyakushi, H., Kobayashi, A., and Shoda, S. (2009) *J. Org. Chem.* **74**, 2210–2212.
9. Huang, W., Yang, Q., Umekawa, M., Yamamoto, K., and Wang, L. X. (2010) *ChemBioChem* **11**, 1350–1355.
10. Kumar, R. H. V., Naruchi, K., Miyoshi, R., Hinou, H., and Nishimura, S. (2013) *Org. Lett.* **15**, 6278–6281.
11. Hojo, H., Tanaka, H., Hagiwara, M., Asahina, Y., Ueki, A., Katayama, H., Nakahara, Y., Yoneshige, A., Matsuda, J., Ito, Y., and Nakahara, Y. (2012) *J. Org. Chem.* **77**, 9437–9446.
12. Amin, M. N., Huang, W., Mizanur, R. M., and Wang, L. X. (2011) *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 14404–14417.
13. Zou, G., Ochiai, H., Huang, W., Yang, Q., Li, C., and Wang, L. X. (2011) *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 18975–18991.
14. Tanaka, T., Huang, W. C., Noguchi, M., Kobayashi, A., and Shoda, S. (2009) *Tetrahedron Lett.* **50**, 2154–2157.
15. Tanaka, T., Matsumoto, T., Noguchi, M., Kobayashi, A., and Shoda, S. (2009) *Chem. Lett.* **38**, 458–459.
16. Yoshida, N., Noguchi, M., Tanaka, T., Matsumoto, T., Aida, N., Ishihara, M., Kobayashi, A., and Shoda, S. (2011) *Chem. Asian J.* **6**, 1876–1885.

17. Tanaka, T., Nagai, H., Noguchi, M., Kobayashi, A., and Shoda, S. (2009) *Chem. Commun. (Camb.)*, 3378–3379.
18. Noguchi, M., Fujieda, T., Huang, W. C., Ishihara, M., Kobayashi, A., and Shoda, S. (2012) *Helv. Chim. Acta* **95**, 1928–1936.
19. Mackenzie, L. F., Wang, Q., Warren, R. A. J., and Withers, S. G. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 5583–5584.
20. Jakeman, D. L., and Withers, S. G. (2002) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **14**, 13–25.
21. Scheltinga, A. C. T., Armand, S., Kalk, K. H., Isogai, A., Henrissat, B., and Dijkstra, B. W. (1995) *Biochemistry* **34**, 15619–15623.
22. Kobayashi, S., Kiyosada, T., and Shoda, S. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 13113–13114.
23. Kobayashi, S., and Makino, A. (2009) *Chem. Rev.* **109**, 5288–5353.
24. Shoda, S., Fujita, M., Lohavisavapanichi, C., Misawa, Y., Ushizaki, K., Tawata, Y., Kuriyama, M., Kohri, M., Kuwata, H., and Watanabe, T. (2002) *Helv. Chim. Acta* **85**, 3919–3936.
25. Kohri, M., Kobayashi, A., Noguchi, M., Kawaida, S., Watanabe, T., and Shoda, S. (2006) *Holzforschung* **60**, 485–491.
26. Yoshida, N., Tanaka, T., Noguchi, M., Kobayashi, A., Ishikura, K., Ikenuma, T., Seno, H., Watanabe, T., Kohri, M., and Shoda, S. (2012) *Chem. Lett.* **41**, 689–690.
27. Kadowaki, S., Yamamoto, K., Fujisaki, M., Izumi, K., Tochikura, T., and Yokoyama, T. (1990) *Agric. Biol. Chem.* **54**, 97–106.
28. Haneda, K., Inazu, T., Mizuno, M., Iguchi, R., Yamamoto, K., Kumagai, H., Aimoto, S., Suzuki, H., and Noda, T. (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 1303–1306.
29. Yamamoto, K., Fujimori, K., Haneda, K., Mizuno, M., Inazu, T., and Kumagai, H. (1998) *Carbohydr. Res.* **305**, 415–422.
30. Haneda, K., Inazu, T., Mizuno, M., Iguchi, R., Tanabe, H., Fujimori, K., Yamamoto, K., Kumagai, H., Tsumori, K., and Munetaka, E. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1526**, 242–248.
31. Saskiawan, I., Mizuno, M., Inazu, T., Haneda, K., Harashima, S., Kumagai, H., and Yamamoto, K. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.* **406**, 127–134.
32. Fujita, K., and Yamamoto, K. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* **1760**, 1631–1635.
33. Tomabechi, Y., and Inazu, T. (2011) *Tetrahedron Lett.* **52**, 6504–6507.
34. Fujita, M., Shoda, S., Haneda, K., Inazu, T., Takegawa, K., and Yamamoto, K. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1528**, 9–14.
35. Umekawa, M., Huang, W., Li, B., Fujita, K., Ashida, H., Wang, L. X., and Yamamoto, K. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 4469–4479.
36. Umekawa, M., Li, C., Higashiyama, T., Huang, W., Ashida, H., Yamamoto, K., and Wang, L. X. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 511–521.
37. Umekawa, M., Higashiyama, T., Koga, Y., Tanaka, T., Noguchi, M., Kobayashi, A., Shoda, S., Huang, W., Wang, L. X., Ashida, H., and Yamamoto, K. (2010) *Biochim. Biophys. Acta* **1800**, 1203–1209.
38. Asahina, Y., Kamitori, S., Takao, T., Nishi, N., and Hojo, H. (2013) *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 9733–9737.
39. Tomabechi, Y., Krippner, G., Rendle, P. M., Squire, M. A., and Fairbanks, A. J. (2013) *Chemistry* **19**, 15084–15088.
40. Asahina, Y., Kanda, M., Suzuki, A., Katayama, H., Nakahara, Y., and Hojo, H. (2013) *Org. Biomol. Chem.* **11**, 7199–7207.
41. Tomabechi, Y., Squire, M. A., and Fairbanks, A. J. (2014) *Org. Biomol. Chem.* **12**, 942–955.
42. Kowalczyk, R., Brimble, M. A., Tomabechi, Y., Fairbanks, A. J., Fletcher, M., and Hay, D. L. (2014) *Org. Biomol. Chem.* **12**, 8142–8151.
43. Collin, M., and Olsén, A. (2001) *EMBO J.* **20**, 3046–3055.
44. Goodfellow, J. J., Baruah, K., Yamamoto, K., Bonomelli, C., Krishna, B., Harvey, D. J., Crispin, M., Scanlan, C. N., and Davis, B. G. (2012) *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 8030–8033.
45. Huang, W., Giddens, J., Fan, S. Q., Toonstra, C., and Wang, L. X. (2012) *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 12308–12318.
46. Trastoy, B., Lomino, J. V., Pierce, B. G., Carter, L. G., Günther, S., Giddens, J. P., Snyder, G. A., Weiss, T. M., Weng, Z., Wang, L. X., and Sundberg, E. J. (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 6714–6719.
47. Fan, S. Q., Huang, W., and Wang, L. X. (2012) *J. Biol. Chem.* **287**, 11272–11281.
48. Wang, L. X. (2011) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **23**, 33–52.
49. Sun, B., Bao, W., Tian, X., Li, M., Liu, H., Dong, J., and Huang, W. (2014) *Carbohydr. Res.* **396**, 62–69.

著者情報

野口真人：東北大学大学院工学研究科バイオ工学専攻助教。経歴：2005年東北大学大学院工学研究科博士課程修了博士（工学）。2005年東北大学大学院工学研究科バイオ工学専攻助手、2007年より現職。専門：糖化学、有機合成化学。

小林厚志：日本大学工学部生命応用化学科准教授。経歴：1994年東京農工大学農学部応用生物科学科卒業。1997年東京農工大学大学院農学研究科応用生物科学専攻修士課程修了。2000年東京工業大学大学院生命理工学研究科バイオテクノロジー専攻博士後期課程修了。2000年工業技術院生命工学工業技術研究所博士研究員。2001年独立行政法人食品総合研究所博士研究員。2003年東北大学大学院工学研究科助手。2007年東北大学大学院工学研究科助教。2015年より現職。専門：糖鎖工学、酵素工学。

正田晋一郎：1981年東大理博（向山光昭教授）。有機合成化学。フッ化グリコシル化法の開発など。1981–1986年東京大学助手。その後、1984–1986年スイス連邦工科大学博士研究員（Dieter Seebach教授）。1986年より東北大工学部（小林四郎教授）の下で、フッ化糖、糖オキサゾリンを用いるグリコシル化反応の開発に従事（高分子合成）。1999年より東北大学大学院工学研究科バイオ工学専攻（機能高分子化学分野）教授。研究対象は、糖質合成、新しいグリコシル化法の開発、巨大分子合成、機能性オリゴ糖・多糖の精密合成など。