Enzymatic Synthesis of Important Oligosaccharide Units Involved in *N*- and *O*-Linked Glycans

N および *O* 結合型糖鎖に含まれる重要オリゴ糖鎖単位の酵素合成

Murata, Takeomi ; and Usui, Taiich

Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University,
Shizuoka 422-8529, Japan, FAX : 81-54-238-4873, E-mail : actusui@agr.shizuoka.ac.jp

Key Words : *condensation reaction, glycosidase, glycosyltransferase, oligosaccharide unit, transglycosylation*

Abstract

There is a growing appreciation of biologically important oligosaccharide units involved in glycoconjugates. As the functions of oligosaccharides in biology became apparent, the efficient synthesis of these substances has become of greater interest. This review describes practical synthesis of di-, tri- and tetrasaccharide units through mainly glycosidase-mediated transglycosylation. A survey of the studied enzymes: β -D-galactosidase, *N*-acetylhexosaminidase, α -L-fucosidase, β -D-mannanase and α -D-mannosidase, show them to be very useful for the practical synthesis of biologically important oligosaccharides and their derivatives.

要 約

複合糖質に存在する生物学的に重要なオリゴ糖鎖が注目を浴びる中、生物学におけるオリゴ糖の機能が明らかになるにつれてこれらを効率的に構築しようとする動きも高まってきている。本稿では、主にグリコシダーゼによる糖転移反応を活用した二〜四オリゴ糖鎖の実践的合成法を紹介する。ここで研究に用いた一連の酵素； β -D-ガラクトシダーゼ、*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ、 α -L-フコシダーゼ、 β -D-マンナナーゼは生物学的に重要なオリゴ糖および誘導体の実践的合成に極めて有効であることを示す。

A. Introduction

There is high interest at present, in developing synthetic routes to oligosaccharide units involved in glycoconjugates. This is because oligosaccharide components of *N*- and *O*-linked glycans of glycoproteins and glycolipids are information-rich molecules that guide many biological processes (1). Our purpose is to develop efficient synthetic methods to obtain oligosaccharide units in sufficient amounts to elucidate and discover their biological function. Carbohydrate molecules are recognized as particularly challenging targets for regioselective glycosylation by either chemical or enzymatic methods because of their nature, having multiple hydroxyl groups. Chemical methods for obtaining oligosaccharide units have been exclusively developed (2-4), but they involve various elaborate procedures for protection, glycosylation and deprotection. The enzymatic approach for oligosaccharide synthesis has been done in part with glycosyltransferase and glycosidase (5, 6). The glycosidases usually not only hydrolyze glycosidic bonds, but also catalyze the new formation of glycosides. The use of glycosidase-mediated transglycosylation is synthetically useful, since no protection is required and the configuration at the newly formed anomeric center is determined by the specificity of the enzyme. Although glycosyl transfer is usually regioselective, this selectivity is rarely absolute. Transfer to more than one hydroxyl group in the acceptor is usually observed. On the other hand, if the

A. 序

複合糖質関連オリゴ糖鎖の合成ルート開発への関心が益々高まっている。その理由として糖タンパクの *N* および *O* 結合型糖鎖や糖脂質のオリゴ糖鎖部分は様々な生物学的過程を支配している情報に富む分子となっているからである (1)。我々の目的は、オリゴ糖鎖の生物学的機能を明らかにするためにこれらを充分量得るための高効率の構築法を開発することにある。糖質分子は、多くの水酸基を持っているために位置選択的グリコシル化を化学的に酵素的にどちらの方法を用いるにしても、特に難易度の高いテーマとなっている。オリゴ糖鎖を合成するための化学的方法は近年広範に行われてきているが (2-4)、合成に際しては保護、グリコシル化、脱保護といった様々な煩雑な工程を経なければならない。これに対し、一部の糖転移酵素やグリコシダーゼが、オリゴ糖鎖合成の酵素的アプローチに用いられるようになってきた (5, 6)。グリコシダーゼは、通常グリコシド結合を加水分解するばかりでなく新しいグリコシド結合形成反応をも触媒する。グリコシダーゼの糖転移反応を利用した場合は、保護基を必要とせず、そして新しく形成したアノマー配向は酵素の特異性によって決定されるため合成的にも有利な方法となっている。しかしながら、通常グリコシル転移の位置選択性は低く、受容体に存在する複数の水酸基への転移を伴う。一方、仮にこのようなグリコシダーゼによるオリゴ糖合成にお

regioselectivity on glycosidase-mediated formation of oligosaccharide is modified by changing the reaction conditions, it will be applicable to a wide range of glycosidases in the synthesis. Significant attention has been focused on practical synthesis of glycosidase-mediated transformation into biologically important oligosaccharide units.

B. Glycosidase-Mediated Transglycosylation Reaction

This section describes convenient synthesis of di- and trisaccharide units by using regioselective transgalactosylation, trans-*N*-acetylglucosaminylation, transfucosylation and transmannosylation. The regioselectivity could be controlled to some extent by using the following techniques: 1. varying enzyme sources, 2. organic co-solvent system, 3. structural change of the acceptor glycoside and 4. inclusion complex of acceptor glycoside with cyclodextrin.

B-1. Galactosylation

D-Galactose residues are found in the sugar moieties of glycoconjugates. Usual linkages are β -(1 $\rightarrow$ 4) to GlcNAc, β -(1 $\rightarrow$ 3) to GlcNAc and β -(1 $\rightarrow$ 3) to GalNAc in sugar-chain components of glycoproteins and glycolipids. These units are often bearing carbohydrate antigens such as blood group ABO antigens and tumor-associated carbohydrate antigens. This section concerns the enzymatic approach to such β -galactosyl oligosaccharide units using the β -D-galactosidase-catalyzed transglycosylation (Fig. 1).

Zilliken *et al.* have reported the first enzymatic synthesis

ける位置選択性を反応条件を変えることによって制御できるのである、グリコシダーゼをオリゴ糖鎖への合成に幅広く応用することができる。本稿では、グリコシダーゼを触媒素子とした糖転移反応を活用し生物学的に重要なオリゴ糖鎖に変換するための実践的合成に関し主な焦点を置いて言及する。

B. グリコシダーゼを触媒素子とした糖転移反応

ここでは各種位置選択的糖転移反応；ガラクトシル化、*N*-アセチルグルコサミニル化、フコシル化、マンノシル化を活用した二〜三糖の簡易合成を紹介する。この種の糖転移反応の位置選択性は次のように反応系を工夫することによってある程度制御することが出来る：1. 酵素起源を変える、2. 有機溶媒系、3. 受容体グリコシドの構造変化、4. サイクロデキストリンと受容体配糖体との包接複合体。

B-1. ガラクトシル化

ガラクトシル残基は複合糖質の糖鎖に存在し、糖タンパクや糖脂質の糖鎖におけるその結合の様式は、通常 GlcNAc に対しては β -(1-4) や β -(1-3) 結合で GalNAc には β -(1-3) 結合である。これら糖鎖は、ABO 式血液型抗原の様な糖鎖抗原や腫瘍糖鎖抗原の単位ともなっている。ここでは β -D-ガラクトシダーゼの糖転移反応を利用した β -D-ガラクトシルオリゴ糖鎖合成の酵素的アプローチに言及する。(図1)

Zilliken らは、最初に Gal β 1-4GlcNAc (LacNAc, 1) を乳酸

Fig. 1. Preparation of β -galactose-containing disaccharide library utilizing β -D-galactosidase-mediated transgalactosylation. a, β -D-galactosidase from porcine testes and *Bacillus circulans* ATCC31382. b, β -D-galactosidase from *Bacillus circulans* (Biolacta). c, β -D-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*, *Escherichia coli*, and porcine liver.

of Gal β 1-4GlcNAc (LacNAc, **1**) from lactose and GlcNAc in the presence of extract from *Lactobacillus bifidus*, but its efficiency was low (7). A commercially available β -D-galactosyl transfer from lactose to the secondary hydroxyl group (O-4) over the primary hydroxyl group (O-6) of GlcNAc (8). Compound **1** was readily synthesized and isolated on a gram scale (a yield of 25.3 % based on the lactose added) by chromatography on a carbon-Celite column. Replacement of GalNAc by GlcNAc also occurred preferentially at the O-4 position, regardless of the configuration of the hydroxyl group (9). Further use of *B. circulans* β -D-galactosidase led to the synthesis of β -(1 $\rightarrow$ 4) linked disaccharide glycosides. Gal β 1-4GlcNAc β -pNP (**2**) was efficiently synthesized from lactose and *p*-nitrophenyl β -N-acetylglucosaminide (GlcNAc β -pNP) on a mmole scale with a small amount of isomer Gal β 1-6GlcNAc β -pNP (**3**) by the action of the enzyme in an organic co-solvent system containing 50 % acetonitrile (10). Compound **2** was obtained in a yield of 21.0 % based on the acceptor added and predominated over **3** during the entire course of reaction. On the contrary, at 20 % acetonitrile, much more of **2** over **3** was found in the initial stage of the reaction, but the relation between this yield was reversed in the later stage of the reaction. As a result, **3** was obtained in a yield of 25.5 % based on the acceptor added. This method made it possible to selectively synthesize **2** and **3** by controlling the concentration of organic co-solvent in the reaction system. The galactosyl transfer to the O-6 position of GlcNAc was efficiently done to give Gal β 1-6GlcNAc by the use of β -D-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (8). Similarly, a β -D-galactosidase from *Escherichia coli* regioselectively produced Gal β 1-6GalNAc (**4**) (10) and Gal β 1-6GlcNAc β -SEt (**11**) in 25 and 28 % yields, respectively. A β -D-galactosidase from porcine liver also catalyzed highly regioselective transgalactosylation from Gal β -oNP to the O-6 of, respectively, GlcNAc β -pNP and GalNAc β -pNP acceptors to afford **3** and Gal β 1-6GalNAc β -pNP (**5**), in high yields of 26-28% based on the acceptor added (12).

Convenient synthesis of β -(1-3)-galactosyl disaccharides Gal β 1-3GlcNAc (**6**) (11), Gal β 1-3GalNAc (**7**) and their glycosides have been reported by transglycosylation reaction using β -D-galactosidases from bovine testes (13), porcine testes (14) and *Xanthomonas manihotis* (15). Look *et al.* have demonstrated that modified sugars 6-O-acetyl-glucal and 6-O-acetyl-galactal act as acceptor substrates and formed exclusively β -(1 $\rightarrow$ 3)-linked disaccharides on the *E. coli* β -D-galactosidase-mediated transglycosylation (16). Further efficient synthetic method for β -(1 $\rightarrow$ 3)-linked disaccharide glycosides of Gal-GlcNAc and Gal-GalNAc has been developed by the use of recombinant β -D-galactosidase from *B. circulans* ATCC 31382. β -D-Galactosyl transfer with the enzyme occurred preferentially at O-3 position of *p*-nitrophenyl glycoside acceptors of GlcNAc and GalNAc from Gal β -pNP donor (17). When GalNAc α -pNP

菌 *Lactobacillus bifidus* 菌体抽出物を用い、ラクトースと GlcNAc を基質として酵素的に合成しているがその効率は極めて低いものであった (7)。一方、市販酵素標品である枯草菌 *Bacillus circulans* 由来 β -D-ガラクトシダーゼを用いるとラクトースからのガラクトシル転移は、GlcNAc の O-6 位よりも O-4 位に優先的に進行した (8)。その結果、化合物 **1** を直接活性炭-セライトカラムに供することでグラムスケール (ラクトース当たり 25.3% の収率) で容易に合成・単離出来た。本酵素反応は、受容体糖を GlcNAc から GalNAc に変えても O-4 位の水酸基の配向に関係なく優先的にこの位置に転移した (9)。さらに、*B. circulans* 由来 β -D-ガラクトシダーゼを用い、 β -(1-4) 結合二糖配糖体の合成を行った。ラクトースと *p*-ニトロフェニル β -N-アセチルグルコサミン (GlcNAc β -pNP) を基質として 50% アセトニトリルを含む有機溶媒共存下で酵素反応を行うと、Gal β 1-4GlcNAc β -pNP (**2**) が少量の異性体 Gal β 1-6GlcNAc β -pNP (**3**) を伴い mM スケールで高効率に合成出来た (10)。化合物 **2** は、全反応時間を通じて化合物 **3** よりも優先的で、受容体基質当たり 21.0% の収率で得られた。これとは反対に 20% アセトニトリル添加系では、反応初期には化合物 **3** よりも **2** が優先するが、反応後期ではこの収率の関係は逆転した。結果、化合物 **3** が受容体当たり 25.5% の収率で得られた。本法は反応系での有機溶媒の濃度をコントロールすることで化合物 **2** と **3** の選択的合成が可能であった。酵母 *Kluyveromyces lactis* 由来 β -D-ガラクトシダーゼは、GlcNAc の O-6 位へのガラクトシル基転移反応により効率的に Gal β 1-6GlcNAc を生成した。同様に、細菌 *Escherichia coli* 由来 β -D-ガラクトシダーゼの場合も同様に位置選択的に Gal β 1-6GalNAc (**4**) (10) と Gal β 1-6GlcNAc β -Et (**11**) とを生成し、それぞれの収率は 25% と 28% であった。ブタ肝臓由来 β -D-ガラクトシダーゼもまた Gal β -oNP からそれぞれ GlcNAc β -pNP と GalNAc β -pNP 受容体の O-6 位に高位置選択的にガラクトシル転移し化合物 **3** と Gal β 1-6GalNAc β -pNP (**5**) を受容体当たり 26-28% という高収率で合成できた (12)。

β -(1-3)結合二糖 Gal β 1-3GlcNAc (**6**) (11)、Gal β 1-3GalNAc (**7**) およびこれら配糖体の簡易合成法がウシ精巢 (13)、ブタ精巢 (14) そして細菌 *Xanthomonas manihotis* (15) 由来 β -D-ガラクトシダーゼの糖転移反応を利用し報告されている。Look らは修飾糖 6-O-アセチルグルカルおよび 6-O-アセチルガラクトールを受容体として作用させ、*E. coli* β -D-ガラクトシダーゼによる転移反応を行うと β -(1-3)結合二糖のみを生成して来ることを実証している (16)。さらなる β -(1-3) 結合 Gal-GlcNAc および Gal-GalNAc 二糖配糖体の高効率的合成法が組換え体 *B. circulans* ATCC31882 由来の β -D-ガラクトシダーゼを用い開発されている。本酵素の Gal β -pNP 供与体からの β -D-ガラクトシル転移は、GlcNAc β -pNP および GalNAc β -pNP 受容体の O-3 位に優先的であった (17)。また α 配糖体 GlcNAc α -pNP および GalNAc α -pNP を受容体とし

and GlcNAc α -pNP were used as acceptors, the enzyme showed high potency for regioselective synthesis of Gal β 1-3GalNAc α -pNP (8) and Gal β 1-3GlcNAc α -pNP (9) in high yields of 75.9% and 79.3% based on the acceptors added, respectively (12). However, replacement of Gal β -pNP by GalNAc α -pNP drastically changed the direction of galactosylation. The enzyme formed regioselectively Gal β 1-6Gal β -pNP along with Gal β 1-(6Gal β 1-) $_n$ 6Gal β -pNP ($n=1-4$). No β -(1 $\rightarrow$ 3)-linked galactosyl oligosaccharides were detected during the reaction (12). The regioselectivity greatly depended on the configuration of the existing glycosidic linkage of the acceptor glycoside. This can be tentatively explained by comparing the stereochemical environment between acceptor and the active site of the enzyme with regard to reaction site. Thus, two hydrophobic groups, the 1-*p*-nitrophenyl groups and 2-acetamide in the α -glycosidic acceptor, may bind to the enzyme and position the substrate molecular properly on the active site so that they are located in relation to the hydrophobic site of the enzyme, as shown in Fig. 2 (A, B). This shows that the regioselectivity of β -D-galactosyl transfer to the acceptor catalyzed by the enzyme is strongly determined by the 1,2-*cis* configuration of and 1-*p*-nitrophenyl and 2-acetamido groups, which adopt an orientation favorable to the enzyme. Replacement of β -glycosides of GalNAc and GlcNAc

た時は、顕著な高位置選択性を示しGal β 1-3GalNAc α -pNP (8) および Gal β 1-3GlcNAc α -pNP (9) をそれぞれ 75.9% と 79.3% の高収率で得ている (12)。しかしながら受容体を GalNAc β -pNP から Gal β -pNP に置き換えるとガラクトシル化の方向は一変した (12)。本酵素反応では極めて高位置選択的に Gal β 1-6Gal β -pNP 二糖を始めとした一連の三～六糖 Gal β 1-(6Gal β -) $_n$ 6Gal β -pNP ($n=1-4$) を生成し、反応の過程で β -(1-3) 結合ガラクトシルオリゴ糖は全く生成してこなかった。本酵素の位置選択性は受容体として用いた配糖体のグリコシド結合配向に著しく依存していた。この位置選択性の変化は、反応サイトでの受容体と本酵素の活性部位の間の立体化学的環境を比較することによって仮に説明できる。即ち、図 2 (A,B) に示すように、 α -グリコシド受容体の二つの疎水基 1 位 *p*-ニトロフェニル基と 2 位アセトアミド基は、本酵素の疎水領域に位置するように結合し、そして活性部位上に本基質分子を適正配置させるという考え方である。このことは本酵素の受容体への β -D-ガラクトシル転移の位置選択性が受容体の 1 位 *p*-ニトロフェニル基と 2 位アセトアミド基との 1,2 シス配位によって強く支配されており、これによって適正配位を取るようになることを示している。また受容体が GalNAc および GlcNAc の α -から β -配糖体に置き換わると *O*-3 位への

Fig. 2. The postulated hydrophobic-acceptor binding-site of β -D-galactosidase that positions the acceptor properly on the active site. Arrows indicate the positions of galactosylation. A, GalNAc α -pNP. B, GlcNAc α -pNP. C, Gal β -pNP positioned unfavorably on the active site. D, Gal β -pNP positioned properly on the active site.

by their corresponding α -glycosides diminishes not only the regioselectivity at *O*-3, but also the efficiency of transglycosylation. The decrease in activity may be attributed to the unsuitable configuration of the *p*-nitrophenyl group to the hydrophobic binding locus in the active site. On the other hand, if this concept is applied to the Gal β -*p*NP acceptor, it will not adopt a favorable orientation along C-1 to C-2, because of an unsuitable configuration of the 1-*p*-nitrophenyl and 2-hydroxyl groups in the hydrophobic binding locus, as shown in Fig. 2(C). In an alternative plan (shown in Fig. 2(D)), when the structural form of Gal β -*p*NP to the binding locus is reversed along C-1 to C-4, the acceptor will be properly located in relation to the hydrophobic site so that it adopts a favorable orientation along C-1 to ring oxygen atoms. This enables us to assume that only *O*-6 of the Gal β -*p*NP acceptor is galactosylated to form the β -(1 $\rightarrow$ 6)-galactosyl-disaccharide glycoside.

The synthesis of possible array of linkages of β -(1 $\rightarrow$ 3), β -(1 $\rightarrow$ 4) and β -(1 $\rightarrow$ 6) of Gal-GlcNAc and Gal-GalNAc except (1-1)-linkage has been done by using some readily available β -D-galactosidases.

B-2. *N*-Acetylglucosaminylation

GlcNAc β 1-2/4/6Man sequences present in *N*-linked glycan and GlcNAc β 1-3/6Gal are characteristic of the lacto- and neolacto-series of glycosphingolipids. This section concerns enzymatic approach to such *N*-acetylglucosaminyl oligosaccha-

位置選択性が減少するばかりか糖転移反応効率も減少した。その活性の減少は、活性部位における疎水領域への *p*-ニトロフェニル基の不適切配位によるものと考えられる。一方、仮にこの概念を Gal β -*p*NP 受容体にあてはめてみると、図 2 (C) に示すように本酵素の疎水領域における 1 位 *p*-ニトロフェニル基と 2 位の水酸基の不適切な配向のため立体的に C-1 位から C-2 位に沿って適正配位を取ることが出来ない。従って、別な考え方として図 2 (D) に示すように結合領域での受容体 Gal β -*p*NP 構造を C-1 位から C-4 位に沿ってその配置を逆転させると本構造が C-1 位から環酸素原子に沿って適正配位するようになる。このことが、なぜ受容体 Gal β -*p*NP の *O*-6 位にのみガラクトシル化され、その結果 β -(1-6) 結合ガラクトシル二糖配糖体を形成するかという考え方が可能となる。

以上のように容易に入手可能な起源の異なる β -D-ガラクトシダーゼを活用して組み合わせ可能な (1-1) 結合を除く β -(1-3)、 β -(1-4)、 β -(1-6) 結合 Gal-GlcNAc および Gal-GalNAc 二糖の合成が行えるようになった。

B-2. *N*-アセチルグルコサミニル化

GlcNAc β 1-2、1-4、1-6 結合 Man 配列は *N* 結合型糖鎖に存在し、そして GlcNAc β 1-3、1-6 Gal 結合配列はスフィンゴ脂質のラクトおよびネオラクト系列に特徴的である。ここではリゾチームや β -*N*-アセチル-D-ヘキソサミニダーゼ (β -NAHase) の糖転移反応を利用してこのような複合糖質に関連した *N*-アセ

Fig. 3. Preparation of *N*-acetylglucosamine-containing oligosaccharide library utilizing lysozyme and β -*N*-acetylhexosaminidase-mediated transglycosylations. a, hen egg lysozyme (**10**), jack bean(**11**), and *Chamelea gallina*(**11**). b, β -*N*-acetylhexosaminidase from *Chamelea gallina*. c, β -*N*-acetylhexosaminidase from *Nocardia orientalis*.

ride units involved in glycoconjugate, using the transglycosylation of lysozyme and β -*N*-acetyl-D-hexosaminidase (β -NAHase) (Fig. 3). Commercially available lysozyme (hen egg white) regioselectively produced GlcNAc β 1-4Man (**10**) from *N,N'*-diacetylchitobiose; (GlcNAc)₂ and Man in a yield of 20.9 % based on the donor added (18). The enzyme is capable of transferring an *N*-acetylglucosaminyl residue from the donor exclusively to the *O*-4 position of the Man moiety. Replacement of *N,N',N'',N'''*-tetraacetylchitotetraose by (GlcNAc)₂ got up in 6-7 fold the rate of formation of **10**. β -NAHases from jack bean and *Chamelea gallina* catalyzed *N*-acetylglucosaminyl transfer from GlcNAc β -pNP to *O*-6 position of Man α -OMe and Gal β -OMe, forming GlcNAc β 1-6Man α -OMe (**11**) and GlcNAc β 1-6Gal β -OMe(**12**) (19, 20). On the other hand, GlcNAc β 1-2Man was synthesized from GlcNAc and Man by using the reverse hydrolysis activity of β -NAHases from both jack bean and *B. circulans* (21). A β -NAHase from *Aspergillus niger* catalyzed the synthesis of GlcNAc β 1-6GalNAc, which was a constituent of core 2 structure of mucin type sugar chain (22).

GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β and GlcNAc β 1-6Gal β 1-4GlcNAc β sequences have been found in human milk oligosaccharides and red blood cell glycosylceramides. The former sequence has been also known to be the common trisaccharide unit of poly(*N*-acetylglucosaminoglycans present in *N*- and *O*-linked glycans involved in glycoproteins. An β -NAHase from *Nocardia orientalis* catalyzed the synthesis of the desired compounds GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -pNP (**13**) and GlcNAc β 1-6Gal β 1-4GlcNAc β -pNP (**14**) with its isomer Gal β 1-4(GlcNAc β 1-6)GlcNAc β -pNP (**15**) through *N*-

チルグルコサミニル化オリゴ糖の酵素的アプローチを紹介する(図 3)。市販ニワトリ卵白リゾチームを用い、*N,N'*-ジアセチルキトビオース；(GlcNAc)₂とマンノースから位置選択的に GlcNAc β 1-4Man(**10**)を供与体当たり 20.9% の収率で合成した(18)。本酵素は、本供与体から *N*-アセチルグルコサミニル基をマンノースの *O*-4 位へのみ転移する活性を有していた。受容体を (GlcNAc)₂から *N,N',N'',N'''*-テトラアセチルキトテトラオースに置き換えると化合物 **10** の形成速度は 6 ~ 7 倍上昇した。ジャック豆や *Chamelea gallina* 由来の β -NAHase を用いた場合、GlcNAc β -pNP からの *N*-アセチルグルコサミニル転移はもっぱら Man α -OMe と Gal β -OMe 受容体の *O*-6 位であり、その結果 GlcNAc β 1-6Man α -OMe (**11**) および GlcNAc β 1-6Gal β -OMe(**12**) (19,20) の形成を触媒した。一方、GlcNAc β 1-2Man 二糖がジャック豆や *B. circulans* 由来 β -NAHase の加水分解反応の逆反応(縮合反応)を利用し GlcNAc と Man とから合成された(21)。カビ *Aspergillus niger* 由来の β -NAHase は、ムチン型糖鎖のコア 2 構造の構成単位である GlcNAc β 1-6GalNAc の合成を触媒した(22)。

GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β や GlcNAc β 1-6Gal β 1-4GlcNAc β の配列は、ヒトミルクオリゴ糖や赤血球膜のグリコシルセラミド中に見出されている。前者は、また *N* および *O* 結合型糖鎖に存在するポリ *N*-アセチラクトサミノグリカンの共通三糖としても知られている単位でもある。放線菌 *Nocardia orientalis* 由来 β -NAHase は、(GlcNAc)₂から Gal β 1-4GlcNAc β -pNP への *N*-アセチルグルコサミニル転移を介して目的の GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -pNP(**13**)と GlcNAc β 1-6Gal β 1-4GlcNAc β -pNP(**14**)の他に異性体 Gal β 1-4(GlcNAc β 1-6)GlcNAc β -pNP(**15**)の三種の配糖体を

Fig. 4. Percentages of *p*-nitrophenyl *N*-acetylglucosaminyl-trisaccharides products formed by β -*N*-acetylhexosaminidase-mediated transglycosylation at different molar ratios of α -CD to *p*-nitrophenyl *N*-acetylglucosamine used as an acceptor substrate. The numbers show the individual transglycosylation compared with the total.

acetylglucosaminyl transfer from (GlcNAc)₂ to Galβ1-4GlcNAcβ-*p*NP. The enzyme formed the mixture of trisaccharides **13**, **14**, and **15** in a ratio of 11 : 33 : 56 (23). In this case, when an inclusion complex of Galβ1-4GlcNAcβ-*p*NP with α-cyclodextrin (α-CD) was used, the regioselectivity of glycosidase-catalyzed formation of the trisaccharide glycosides was substantially changed. In the absence of α-CD, the enzyme transfers *O*-6 of the acceptor moiety preferentially to *O*-6' and reacts only weakly at *O*-3'. On the contrary, in the presence of α-CD, the enzyme transfers much less to *O*-6 of the acceptor, but more to *O*-6' and *O*-3'. Furthermore, as the molar ratio of α-CD to the acceptor rises, the proportion of **13** and **14** was increased, but that of **15** remarkably decreased. When the molar ratios of acceptor to α-CD were acceptor alone, 1 : 1, 1 : 2, and 1 : 5, the proportion of **15** production was 56%, 27%, 13% and 8%, respectively (Fig. 4). It suggests that, with enhancing the probability of the complexation of α-CD with the acceptor, the *N*-acetylglucosaminyl transfer onto *O*-6 at the GlcNAc residue of the acceptor is diminished, due to steric hindrance of the bulky CD region in an inclusion complex. This was also the case for the reaction of an inclusion complex of *p*-nitrophenyl β-lactoside with β-CD (24).

B-3. Fucosylation

L-Fucose is an important constituent of the carbohydrate chains of glycoconjugates involved in a variety of biological events, such as cell-cell recognition and antigenicity. Generally, the configuration of L-fucosyl residues are α-linkage and at non-reducing positions. The most abundant linkages are known to be (1→2) to Gal, (1→3), (1→4), and (1→6) to GlcNAc. Several fucosyl disaccharides have been synthesized through the

11 : 33 : 56 の生成比で合成している (23)。この場合、α-CD と受容体 Galβ1-4GlcNAcβ-*p*NP とを包接複合体として反応を行うと、生成してくる三糖配糖体の位置選択性を事実上変えることが出来た。本酵素反応は α-CD 非存在下では受容体の *O*-6' 位よりも *O*-6 位に優先的で、*O*-3' 位へは僅かにしか転移しなかった。これとは反対に、本酵素は α-CD 存在下で受容体の *O*-6 位に余り転移せずそれよりも *O*-6' 位と *O*-3' 位に優先的に転移するようになった。これとともに受容体に対し反応系での α-CD のモル比を上げていくと化合物 **13** と **14** の生成比は増加し、その反対に化合物 **15** は著しく減少した。即ち、受容体にと α-CD のモル比を受容体単独、1 : 1、1 : 2 そして 1 : 5 でそれぞれ反応させると、化合物 **15** の生成割合は 56、27、13、8 % と減少していった (図4)。このことは α-CD と受容体との複合体形成の確率を上げるにつれて、その包接体における笠高い α-CD 部の立体障害により受容体の GlcNAc 残基 *O*-6 位への *N*-アセチルグルコサミン転移の確率を減少させることを意味している。本反応はまた *p*-ニトロフェニル β-ラクトシド受容体と β-CD との包接複合体の反応にも適用できた (24)。

B-3. フコシル化

L-フコースは、細胞間認識や抗原形成など様々な生物の営みの中で複合糖質の重要な糖鎖構成単位となっている。一般的に L-フコシル残基の配向は α-結合で且つ非還元末端に位置している。最も多く見られる結合の様式は、Gal に対し (1-2) 結合で、GlcNAc には (1-3)、(1-4) そして (1-6) 結合が知られている。いくつかのフコシル二糖は種々の起源の α-L-フコシダーゼの転移反応を活用して合成されてきている (25-27)。

Fig. 5. Fucose-containing trisaccharide library synthesized by α-L-fucosidase-catalyzed transglycosylation. a, α-L-fucosidase from porcine liver (**16-18**) and *Alcaligenes* sp. (**17**). b, α-L-fucosidase from porcine liver (**19**) and *Alcaligenes* sp. (**20**).

transglycosylation reaction by α -L-fucosidases of various origins (25-27). This section concerns enzymatic synthesis of fucosyl trisaccharides, utilizing α -L-fucosidase-mediated transglycosylation (Fig. 5). Porcine liver α -L-fucosidase produced Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc (**16**), which is the determinant of type 2 blood group H antigen, with its isomers Fuc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc (**17**) and Fuc α 1-6Gal β 1-4GlcNAc (**18**) from *p*-nitrophenyl α -L-fucopyranoside and Gal β 1-4GlcNAc (**28**). The enzyme formed the trisaccharides **16**, **17** and **18** in 14% overall yield based on the donor, and in a ratio of 40 : 37 : 23, although it showed a low regioselectivity (Fig. 6A). The enzyme also catalyzed the formation of Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc β -*p*NP (**19**) with Gal β 1-4Glc β -*p*NP acceptor (29). However, no transfer product was observed when lactose instead of Gal β 1-4Glc β -*p*NP was used as an acceptor (25). On the other hand, compound **16** was exclusively synthesized from GDP-Fuc and Gal β 1-4GlcNAc by use of porcine liver α -1,2-fucosyltransferase (30). Compound **16** may become an inhibitor for the infection by *Campyrobacter*, because an albumin-linked **16** is known to bind to the bacteria (31).

Use of the transglycosylation by *Alcaligenes* sp. α -L-fucosidase led to the highly regioselective synthesis of trisaccharides containing (1 $\rightarrow$ 3)-linked α -L-fucosyl residue (Fig. 6B). When LacNAc and lactose were acceptors and *p*-nitrophenyl α -L-fucopyranoside was donor, the enzyme formed exclusively **17** and Fuc α 1-3Gal β 1-4Glc (**20**), respectively, in 31% and 54 % yields based on the donor (28). The Fuc α 1-3Gal linkage has not been found in glycoconjugates isolated from diverse sources, but its presence has been reported to occur as part of higher homologues of human milk oligosaccharides (32). Miyauchi *et*

ここでは α -L-フコシダーゼ触媒の糖転移反応によるフコシル三糖の酵素合成を紹介する(図5)。ブタ肝臓由来 α -L-フコシダーゼを用い、*p*-ニトロフェニル α -L-フコピラノシド (Fuc α -*p*NP) と LacNAc から 2 型血液型 H 抗原の構成単位である Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc(**16**)を合成した。この際、構造異性体である Fuc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc(**17**)と Fuc α 1-6Gal β 1-4GlcNAc(**18**)が同時に生成した(28)。本酵素反応での位置選択性は低いものであったが、三糖 **16**、**17**、**18** が供与体当たり全収率 14 % で生成し、その生成比は 40 : 37 : 23 であった(図 6 A)。本酵素はまた *p*-ニトロフェニル β -ラクトシド受容体とすると Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc β -*p*NP (19)の生成を触媒した(29)。しかしながら本受容体の代わりにラクトースを用いると、何の転移生成物も見られていない(25)。一方、ブタ肝臓由来 α -1, 2-フコシル転移酵素を用いると化合物 **16** のみが GDP-Fuc と LacNAc から合成された(30)。化合物 **16** は、アルブミンに結合した **16** 糖鎖が細菌 *Campyrobacter* に結合することが報告されていることから細菌の感染阻止剤として利用できる可能性がある(31)。

細菌 *Alcaligenes* sp.由来 α -L-フコシダーゼによる糖転移反応の活用は、高位置選択的に α -L-フコシル残基が(1-3)結合した三糖合成へと展開した(図 6 B)。本酵素反応で LacNAc およびラクトースを受容体として Fuc α -*p*NP を供与体として反応を行うと、それぞれ化合物 **17** と Fuc α 1-3Gal β 1-4Glc(**20**)とを供与体当たり 31 % と 54 % の収率で得ている(28)。Fuc α 1-3Gal 結合単位は、様々な起源から単離されている複合糖質中には見られないが、その存在はヒトミルクオリゴ糖同族体の一部として報告されている(32)。Miyauchi らは、3'-*O*- α -L-フコシルラクトース-*p*-イソ

Fig. 6. Percentages of fucose-containing trisaccharides synthesized by α -L-fucosidase-catalyzed transglycosylation. A, α -L-fucosidase from porcine liver. B, α -L-fucosidase from *Alcaligenes* sp. The numbers show the individual transglycosylation compared with the total.

al. have reported that antiserum against 3'-*O*- α -L-fucosyllactose-*p*-isothiocyanate-phenethylamin-BSA preferentially reacts with adenocarcinoma and embryonal carcinoma cells (33). It was shown that the unusual oligosaccharide **20** was useful as a probe for investigating biological functions.

B-4. Mannosylation

Trisaccharide Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc (**21**) is known to be the common structural feature at the core region of the *N*-linked glycan. Site-selective glycosylation for the introduction of the β -D-Man residue is a key reaction of synthesizing **21** (34). This section concerns enzymatic synthesis of mannosyl oligosaccharide units by the use of glycosidase-catalyzed transglycosylation (Fig. 7). Transmannosylation from mannotriose (Man β 1-4Man β 1-4Man) to the *O*-4' position at the nonreducing end GlcNAc residue of (GlcNAc)₂ was regioselectively induced through the use of β -D-mannanase from *A. niger*. Starting with mannotriose and (GlcNAc)₂ in acetate buffer pH 4.0, with the enzyme, the desired compound **21** was thus obtained only in a low yield of 3.7 % based on the acceptor (35). Mannobiose (Man β 1-4Man) was also available as a donor substrate for the desired trisaccharide synthesis. It should be noted that the enzyme catalyzes regiospecific formation of the β -(1-4)-linked D-mannosyl trisaccharide. In general, polysaccharide hydrolases such as amylase(36-38), amylomaltase (39) cellulase(40), lysozyme (41, 42), and galactanase (43) exhibit high regioselectivity for the hydroxyl group of the acceptor and this selectivity is much more predictable than that of glycosidases.

On the other hand, α -D-mannosidases have been used for the synthesis of α -D-mannosyl di- and trisaccharides. Man α 1-

チオシアネートフェネチルアミン-BSA に対する抗血清に悪性腫瘍や初期腫瘍細胞と優先的に反応することを報告している(33)。このことは通常では見られない化合物 **20** のようなオリゴ糖が生物学的機能を解析するプローブとして有用であることを示した結果である。

B-4. マンノシル化

三糖 Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc (**21**) は、*N*結合型糖鎖のコア領域に特徴的な共通の構造であることが知られている。従って、化合物 **21** を合成するには β -D-Man 残基導入に対する位置選択的なグリコシル化反応が鍵となる(34)。ここではグリコシダーゼ触媒の糖転移反応を利用したマンノシル化オリゴ糖単位の酵素合成を紹介する(図7)。マンノトリオース (Man β 1-4Man β 1-4Man) から (GlcNAc)₂ の非還元末端 GlcNAc 残基 *O*-4' 位への位置選択的マンノシル転移反応が *A. niger* 由来 β -マンナナーゼを介し行うことが出来た。即ち、本酵素を酢酸緩衝液 pH 4 中でマンノトリオースと (GlcNAc)₂ とで反応させると、目的化合物 **21** が受容体当たり 3.7% という低収率ながら得ることが出来た(35)。マンノビオースも本三糖合成の供与体基質として利用することが出来る。ここでは本酵素が β -(1-4)-結合マンノシル三糖の位置選択的結合を触媒することが出来るということに注目したい。一般的に、アミラーゼ(36-38)、アミロマルターゼ(39)、セルラーゼ(40)、リゾチーム(41,42)、ガラクタナーゼ(43)といった多糖分解酵素は受容体糖の水酸基に対し高選択性を示し、この選択性はグリコシダーゼよりも極めて高いものがある。

一方、 α -D-マンノシダーゼを用い α -D-マンノシル二糖、三糖の合成が行われている。Man α 1-2Man と Man α 1-2Man α 1-2Man

Fig. 7. Enzymatic synthesis of mannose-containing oligosaccharides by enzyme-catalyzed transmannosylation.
a, β -mannanase from *Aspergillus niger*. b, α -D-mannosidase from jack bean.

2Man and Man α 1-2Man α 1-2Man are important components of high-mannose type sugar chain. Nilsson has reported that α -D-mannosidase from jack bean induced the transmannosylation to O-2 position of Man residue from Man α -pNP to afford Man α 1-2Man α -OMe, Man α 1-2Man α -pNP (22), and Man α 1-2Man α 1-2Man α -pNP (23) (44). Ajisaka *et al.* have demonstrated the synthesis of Man α 1-2Man and Man α 1-2Man α 1-2Man utilizing *A. niger* α -D-mannosidase-mediated reverse hydrolysis activity (45).

C. Consecutive Synthesis of Oligosaccharide

This section describes preparative synthetic methods for obtaining Gal β 1-3(GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 6)GalNAc α -pNP as a core 2 structure of mucin type carbohydrate, which is an O-linked glycan, and for obtaining lacto-*N*-tetraose and lacto-*N*-neotetraose as common structural features in the core region of glycosphingolipids of the so-called lacto- and neolacto-series. These oligosaccharide units were enzymatically synthesized by consecutive addition of GlcNAc or Gal residue to acceptor sugars.

C-1. Core Structures of Mucin-type Oligosaccharide

Mucin type oligosaccharides are found on serum, cell membrane glycoproteins and high molecular weight mucins. They can present multivalent carbohydrate antigenic or functional determinants for antibody recognition, mammalian cell adhesion and microorganism binding (46, 47). The majority of the mucin-type carbohydrates of serum and membrane glycoproteins are of the core 1 which is Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr. On the other hand, human activated T-cell(48), leukemias (49), and immunodeficiencies (50) have all been associated with stimulation in β -(1-6)-GlcNAc-transferase (EC 2.4.1.102) giving oligosaccharides with predominantly core 2, Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α -Ser/Thr, rather than core 1. Thus, core 2 structure may have numerous roles in cell differentiation and transformation. Accordingly, our interest was directed toward developing a system for selective transfer of the *N*-acetylglucosaminyl residue to the O-6 position of compound 8. Thus, a synthetic method for Gal β 1-3(GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 6)GalNAc α -pNP (24), which is a core 2 oligosaccharide, was established by means of *N. orientalis* β -NAHase-mediated transglycosylation. Compound 8 was firstly synthesized by regioselective β -D-galactosyl transfer from lactose to the O-3 position of GalNAc α -pNP, utilizing β -D-galactosidase from porcine testes. Much more efficient synthesis for obtaining 8 has recently been developed by the use of *B. circulans* ATCC31382 β -D-galactosidase-mediated transglycosylation mentioned above. It has made possible the use of large amounts of 8 as a starting substance for the synthesis of compound 24. A β -NAHase from *N. orientalis* catalyzed the synthesis of 24 with its isomers GlcNAc β 1-6Gal β 1-3GalNAc α -pNP (25) GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAc α -pNP(26) through *N*-acetylglucosaminyl transfer from (GlcNAc) $_2$ to 8 (51). The enzyme formed the trisac-

は高マンノース型結合糖鎖の重要な成分となっている。Nilsson は、ジャック豆の α -D-マンノシダーゼを用い Man α -pNP から Man 残基のO-2位へのマンノシル転移反応を行い、Man α 1-2Man α -OMe、Man α 1-2Man α -pNP (22)、Man α 1-2Man α 1-2Man α -pNP (23) (44)を合成している。Ajisaka らは *A. niger* 由来 α -D-マンノシダーゼの縮合反応を活用しMan α 1-2Manおよび Man α 1-2Man α 1-2Manの合成法を示している(45)。

C. オリゴ糖鎖の逐次合成

ここでは O 結合型糖鎖であるムチンコア 2 糖鎖として Gal β 1-3 (GlcNAc β 1-6) GalNAc α -pNP とラクトおよびネオラクト系列のスフィンゴ糖脂質のコア領域に特徴的な共通構造であるラクト-*N*-テトラオースおよびラクト-*N*-ネオテトラオースの合成法を紹介する。これらのオリゴ糖単位は、受容体糖への GlcNAc もしくは Gal 残基の逐次的付加によって酵素的に合成される。

C-1. ムチン型糖鎖のコア構造

ムチン型糖鎖はムチンの他に血清や細胞膜糖タンパクに見出されている。それらは抗体認識、哺乳動物細胞の接着そして微生物の結合などに対する多価糖鎖抗原や機能的決定基として存在している (46,47)。血清や膜糖タンパクの多くのムチン型糖鎖は、コア 1 である Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr 構造を有している。一方、ヒト活性T細胞 (48)、白血病 (49)そして免疫不全 (50) の場合はすべてコア 1 よりもむしろ優先的にコア 2 Gal β 1-3 (GlcNAc β 1-6) GalNAc α -Ser/Thr のオリゴ糖鎖構造を生成し、 β -(1-6)-GlcNAc 転移酵素活性の促進と関係づけられている。即ち、コア 2 構造は細胞の分化や変換において様々な役割を担っていることが考えられている。従って、我々の興味は化合物 8 の O-6' 位への *N*-アセチルグルコサミン残基の選択的転移の系を開発することにあった。そこでムチンのコア 2 糖鎖である Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α -pNP (24) の合成法が *N. orientalis* 由来 β -NAHase 触媒を用いた糖転移反応を活用し開発された。まず始めに化合物 8 をブタ精巣由来 β -D-ガラクトシダーゼを用いラクトースから GalNAc α -pNP の O-3 位への位置選択的 β -D-ガラクトシル転移反応によって合成した。最近になって本化合物の高効率の合成法が組み換え体 *B. circulans* ATCC31382 由来 β -D-ガラクトシダーゼ触媒を介した糖転移反応によって開発された。これによって化合物 24 の合成のために充分量の化合物 8 を出発物質として利用可能になった。*N. orientalis* 由来 β -NAHase を用い、(GlcNAc) $_2$ から 8 への *N*-セチルグルコサミン転移を介して目的化合物 24 とその構造異性体 GlcNAc β 1-6Gal β 1-3GalNAc α -pNP (25) と GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAc α -pNP (26) とを合成した (51)。本酵素は、供与体 8 当たり三糖

charides **24**, **25**, and **26** in 14% overall yield based on **8** as the acceptor added, and in the ratio of 44 : 32 : 24 (Fig. 8). In this way, *N*-acetylglucosaminyl transfer favored *O*-6 of the acceptor rather than *O*-6', and occurred to a lesser extent at *O*-3'. As a result, compound **24** was enzymatically synthesized by consecutive additions of Gal and GlcNAc residues to GalNAc α -pNP. These reactions were efficient enough to allow the one-pot preparation of the desired cores 1 and 2 oligosaccharide units.

C-2. Lacto-*N*-Tetraose and Lacto-*N*-Neotetraose

Generally, lacto-*N*-tetraose (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc, LNT) and lacto-*N*-neotetraose (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc, LNT) are found as the common structural feature in the core region of glycolipids of the so-called lacto- and neolacto-series (52), and in the terminal position of lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis* (53, 54). They are also well known as human milk oligosaccharide (55). Conventional methods for obtaining lacto-*N*-triose II, LNT and LNT are developed, but they are not always practical (56, 57). A process for synthesizing these oligosaccharides is clearly needed to enable practical use in as short a pathway as possible. The enzymatic method for obtaining lacto-*N*-triose II was first reported on the mmolar scale using β -1,3-*N*-acetylglucosaminyl-transferase (β -1,3-GnT) from human serum (58). However, sufficient amounts of β -1,3-GnT and UDP-GlcNAc are needed for the practical synthesis of lacto-*N*-triose II. For the synthesis, a crude enzyme preparation of β -1,3-GnT was easily obtained as a 25–50 % saturated ammonium sulfate precipitation from bovine serum and UDP-GlcNAc was commercially available in

24, **25**, **26** を全収量 14 %、それぞれの生成比 44 : 32 : 24 で得ている (図 8)。本 *N*-セチルグルコサミニル転移反応は、受容体の *O*-6' 位よりはむしろ *O*-6 位を優先し *O*-3' 位には低率であった。結果として、化合物 **24** が GalNAc α -pNP への Gal そして GlcNAc 残基の逐次的付加により酵素的に合成できた。これらの反応は、目的のムチンコア 1 およびコア 2 糖鎖を充分量得るためのワンポット調製法と成りうるものであった。

C-2. ラクト-*N*-テトラオースとラクト-*N*-ネオテトラオース

一般に、ラクト-*N*-テトラオース (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc, LNT) とラクト-*N*-ネオテトラオース (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc, LNT) は、糖脂質ラクトおよびネオラクト系列コア領域 (52) に、そして淋菌 *Neisseria meningitidis* のリポオリゴ糖の末端部に位置する特徴的な共通構造として見出されている (53, 54)。これらはまたヒトミルクオリゴ糖としてもよく知られている (55)。従来、ラクト-*N*-トリオース II、LNT および LNT の合成法が開発されてきてはいるが、必ずしも実践的とは言えない (56, 57)。従って、これらオリゴ糖鎖の合成法に関しては出来るだけ短い工程で実践可能な方法が望まれている。ラクト-*N*-トリオース II の酵素合成法は最初ヒト血清由来の β -1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 (β -1,3-GnT) を使い、マイクロモルスケールで報告された (58)。しかしながらこのようなラクト-*N*-トリオース II の実践的合成を行うには、充分量の β -1,3-GnT と UDP-GlcNAc とが必須条件となる。本合成に対し β -1,3-GnT 粗酵素標品がウシ血清の 25-50% 硫酸沈殿として容易に得ることが出来、UDP-GlcNAc も最近になって市販品を大量に入手可能になっている。その結果、本酵素を用い UDP-GlcNAc からラク

Fig. 8. Enzymatic synthesis of Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α -pNP (**24**) as a mimic unit of mucin type oligosaccharide core 2 structure and its positional isomers (**25**, **26**) by *N. orientalis* β -*N*-acetylhexosaminidase-catalyzed transglycosylation.

large amounts in recent years. Lacto-*N*-triose II was readily produced by the transfer of GlcNAc from UDP-GlcNAc to lactose by the transferase (Fig. 9) and conveniently isolated by charcoal-Celite chromatography, in a 26% yield based on the donor (59). The resulting lacto-*N*-triose II was subsequently converted into LNT and LNnT utilizing two kinds of β -D-galactosidase-mediated transglycosylations(59). Thus, recombinant β -D-galactosyl transfer from *o*-nitrophenyl β -D-galactoside to the *O*-3'' position of lacto-*N*-triose II (Fig. 9), and commercially available β -D-galactosidase from *B. circulans* did so from lactose to the *O*-4'' position of lacto-*N*-triose II. These methods are suitable for large-scale preparations of LNT and LNnT, because the enzymatic processes are simple and the yields are sufficiently high for a practical method. A further advantage is that the excess of unreacted substrates are recovered by straightforward column chromatography and reutilized for the synthesis. As another method, LNT was directly synthesized from lactose as an initial substance, utilizing lacto-*N*-biosidase (*Aureobacterium* sp.)-mediated transglycosylation with Gal β 1-3GlcNAc β -pNP (Fig. 9), but its efficiency was very low (59).

トースへの GlcNAc 転移によりラクト-*N*-トリオース II が容易に生成(図 9)、そして活性炭-セライトカラムクロマトにより簡便に供与体当たり 26 %の収率で単離出来た(59)。この様にして合成したラクト-*N*-トリオース II は引き続き 2 種類の β -D-ガラクトシダーゼ触媒による糖転移反応を活用し LNT および LNnT とに変換された(59)。即ち、組換え体 *B. circulans* ATCC31382 由来 β -D-ガラクトシダーゼを用いると *o*-ニトロフェニル β -D-ガラクトピラノシドからラクト-*N*-トリオース II の *O*-3'' 位に、そして市販の *B. circulans* 由来 β -D-ガラクトシダーゼはラクトースからラクト-*N*-トリオース II の *O*-4'' 位にそれぞれ位置選択的にガラクトシル転移を引き起こした(図 9)。本法は、酵素合成プロセスが簡単であり且つ実践的にも充分高収率であるので、LNT および LNnT の大量合成に適している。さらなる利点としては、過剰の未反応基質を直接カラムクロマト操作で回収そして再利用できることである。LNT を合成する別な方法として Gal β 1-3GlcNAc β -pNP を供与体として *Aureobacterium* sp. 由来のラクト-*N*-ビオシダーゼ触媒によりラクトースに直接 Gal β 1-3GlcNAc 二糖単位で転移させ LNT を合成した(図 9)。しかしこの転移効率は極めて低いものであった(59)。

Fig. 9. Enzymatic conversion of lactose into lacto-*N*-triose II, LNT and LNnT using enzyme-catalyzed glycosylation. a, β -1,3-N-acetylglucosaminyltransferase from bovine serum. b, β -D-galactosidase from *B. circulans* ATCC31382. c, β -D-galactosidase from *B. circulans* (Biolacta). d, Lacto-*N*-biosidase from *Aureobacterium* sp.

D. Conclusion

The preparation of biologically important oligosaccharide units has been carried out through glycosidase-mediated transglycosylation. In this process, the regioselectivity on transglycosylation can be manipulated to some extent by devising the reaction system. Their total yields were considerable to be sufficiently high for the practical method, because of the simplicity of enzymatic synthesis. Such enzymes are readily available in large amounts. Excess of unreacted substrates are also recovered by straightforward column chromatography and reutilized for the synthesis. The approach described above should be applicable to a wide range of glycosidase-mediated oligosaccharide synthesis. On the other hand, glycosyltransferases are expected to become a useful class of enzymes for synthesis of oligosaccharides, because several kinds of nucleotide sugars have become commercially available in large amounts in recent years.

Such well-defined oligosaccharides would be useful as substrates for glycosidases and glycosyltransferases involved in glycoconjugates processing, as probes for lectin or selectin binding, and as common synthetic intermediates of antigens. Furthermore, the synthetic oligosaccharides are also useful as starting substances for glycopolymers, which are a valuable tool for investigating biological recognition phenomena using lectins. Accordingly, the supply of sufficient amounts of oligosaccharides offers a promising prospect to construct novel glycomaterials.

D. 結論

生物学的に重要なオリゴ糖鎖が、グリコシダーゼの糖転移反応によって調製された。この過程において、糖転移反応の位置選択性は反応系を工夫することによりある程度制御することができた。酵素合成は操作が簡便であることから、本稿で紹介した反応の総収率はいずれも実践的な合成法として十分高いものであると考えられる。ここで用いられた酵素のほとんどは、すでに容易に大量入手ができるようになっている。また、未反応の基質は簡単なカラム操作で回収でき、再利用できる利点もある。このことは、グリコシダーゼによるオリゴ糖鎖の合成に幅広く応用できる。一方、近年いくつかの糖ヌクレオチドが大量に入手可能となったことから、グリコシルトランスフェラーゼが、オリゴ糖鎖合成のための有用な酵素群になることが期待されている。

この様にして合成された構造の明確なオリゴ糖鎖は、複合糖質糖鎖のプロセッシングに關与するグリコシダーゼやグリコシルトランスフェラーゼの基質として、レクチンやセレクトインのプロープとして、あるいは糖鎖抗原の合成中間体として有用であると考えられる。さらに、合成オリゴ糖鎖は、レクチンなどの生物学的な認識反応を研究するための有効なツールになる糖鎖高分子の出発原料になる。従って、十分量のオリゴ糖鎖の供給は、新しいグリコマテリアルの構築を約束するものである。

References

- Varki, A. (1993) *Glycobiology* **3**, 97-130
- Ding, Y., Kanie, O., Labbe, J., Palcic, M. M., Ernst, B., and Hindsgaul, O. (1995) *Adv. Exp. Med. Biol.* **376**, 261-269
- Kanie, O., Itoh, Y., and Ogawa, T. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 12073-12074
- Ding, Y., Labbe, J., Kanie, O., and Hindsgaul, O. (1996) *Bioorg. Med. Chem.* **4**, 683-692
- Ichikawa, Y., Look, G.C., and Wong, C. H. (1992) *Anal. Biochem.* **202**, 215-238
- Murata, T., and Usui, T. (1997) *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 1059-1066
- Zilliken, F., Smith, P. N., Rose, C. S., and Gyorgy, P. (1955) *J. Biol. Chem.* **217**, 79-82
- Sakai, S., Katsumi, R., Ohi, H., Usui, T., and Ishido, Y. (1992) *J. Carbohydr. Chem.* **11**, 553-565
- Usui, T., Kubota, S., and Ohi, H. (1993) *Carbohydr. Res.* **244**, 315-323.
- Hedbys, L., Larsson, P.-O., Mosbach, K., and Svensson, S. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 8-15
- Hedbys, L., Johansson, E., Mosbach, K., Larsson, P.-O., Gunnarsson, P., Svensson, S., and Lönn, H. (1989) *Glycoconjugate J.* **6**, 161-168
- Zeng, X., Yoshino, R., Murata, T., Ajisaka, K., Usui, T. (2000) *Carbohydr. Res.* **325**, 120-131
- Hedbys, L., Johansson, E., Mosbach, K., and Larsson, P.-O. (1989) *Carbohydr. Res.* **186**, 217-223
- Murata, T., Itoh, T., Hayakawa, Y., and Usui, T. (1996) *J. Biochem.* **200**, 851-855
- Fujimoto, H. (1997) *J. Carbohydr. Chem.* **16**, 967-970.
- Look, G.C., Ichikawa, Y., Shen, G.-J., Cheng, P.-W., and Wong, C. H. (1993) *J. Org. Chem.* **58**, 4326-4330
- Fujimoto, H., Miyasato, M., Ito, Y., Sasaki, T., and Ajisaka, K. (1998) *Glycoconjugate J.* **15**, 155-160
- Matahira, Y., Ohno, K., Kawaguchi, M., Kawagishi, H., and Usui, T. (1995) *J. Carbohydr. Chem.* **14**, 213-225
- Nilsson, K. G. I. (1989) *Carbohydr. Res.* **188**, 9-17
- Nilsson, K. G. I. (1990) *Carbohydr. Res.* **204**, 79-38
- Fujimoto, H., Isomura, M., Miyazaki, T., Matsuo, I., Walton, R., Sakakibara, T., and Ajisaka, K. (1997) *Glycoconjugate J.* **14**, 75-80
- Singh, S., Scigelova, M., Vic, G., and Crout, D. H. G. (1996) *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1921-1926
- Murata, T., Tashiro, A., Itoh, T., and Usui, T. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1335**, 326-334
- Matahira, Y., Tashiro, A., Sato, T., Kawagishi, H., and Usui, T. (1995) *Glycoconjugate J.* **12**, 664-671
- Svensson, S. C. T. and Thiem, J. (1990) *Carbohydr. Res.* **200**, 391-402
- Vetere, A., Galateo, C., and Paoletti, S. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**, 358-361
- Ajisaka, K., Fujimoto, H., and Miyasato, M. (1998) *Carbohydr. Res.* **309**, 125-129
- Murata, T., Morimoto, S., Zeng, X., Watanabe, S., and Usui, T. (1999) *Carbohydr. Res.* **320**, 192-199
- Zeng, X., Morimoto, S., Murata, T., and Usui, T. (1999) *Carbohydr. Res.* **320**, 192-199

30. Rosevear, P.R., Nunez, H. A., and Barker, R. (1982) *Biochemistry* **21** 1421–1431
31. Newburg, D.S. (1997) *J. Nutr.* **127**, 980S–984S
32. Yamashita, K., Tachibana, Y., and Kobata, A. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* **174**, 582–591
33. Miyauchi, T., Yonezawa, S., Takamura, T., Chiba, T., Tejima, S., Ozawa, M., Sato, E., and Muramatsu, T. (1982) *Nature* **299** 198–169
34. Ogawa, T., Kitajima, T., and Nukada, T. (1983) *Carbohydr. Res.* **123**, C5–C7
35. Usui, T., Suzuki, M., Sato, T., Kawagishi, H. Adachi, K., and Sano, H. (1994) *Glycoconjugate J.* **11**, 105–110
36. Usui, T., Murata, T., Yabuuchi, Y., and Ogawa, K. (1993) *Carbohydr. Res.* **250**, 57–66
37. Ogawa, K., Murata, T., and Usui, T. (1991) *Carbohydr. Res.* **212**, 289–294
38. Ogawa, K., Nakakuki, T. and Usui, T. (1991) *J. Carbohydr. Chem.* **10**, 877–886
39. Palmer, T. N., Ryman, B. E., and Whelan, W. J. (1976) *Eur. J. Biochem.* **69**, 105–115
40. Kobayashi, S., Kainuma, K., Kawasaki, T. and Shoda, S., (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 3079–3084
41. Usui, T., Hayashi, Y., Nanjo, F., and Ishido, Y. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **953**, 179–184
42. Usui, T., Matsui, H., and Isobe, K. (1990) *Carbohydr. Res.* **203**, 65–77
43. Fujimoto, H., Nakano, H., Isomura, M., Kitahata, S., and Ajisaka, K. (1997) *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 1258–1261
44. Nilsson, K. G. I. (1987) *Carbohydr. Res.* **167**, 95–10
45. Ajisaka, K. Matsuo, I., Isomura, M., Fujimoto, H., Shirakabe, M., and Okawa, M. (1995) *Carbohydr. Res.* **270**, 123–130
46. Hounsell, H. F., Davies, M.J., and Renouf, D.V. (1996) *Glycoconjugate J.* **13**, 19–26
47. Kim, Y. S., Gum, J.J., and Brockhausen, I. (1996) *Glycoconjugate J.* **13**, 693–707
48. Piller, F., Piller, V., Fox, R.I., and Fukuda, M. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 15146–15150
49. Brockhausen, I., Romero, P. A., and Herscovics, A. (1991) *Cancer Res* **51**, 3136–3142
50. Higgins, E. A., Siminovitch, K. A., Zhuang, D., Brockhausen, I., Dennis, J. W., (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 6280–6290
51. Murata, T., Itoh, T., and Usui, T. (1998) *Glycoconjugate J.* **15**, 575–582
52. Macher, B. A. and Sweeley, C.C. (1978) *Methods Enzymol.* **50**, 236–250
53. Tsai, C. M. and Civin, C.I. (1991) *Infect. Immun.* **59**, 3604–3609
54. Wakarchuk, W., Martin, A., Jennings, M., Moxon, E. R., Richards, C. R. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 19166–19173
55. Kobata, A. (1972) *Methods Enzymol.* **28**, 262–271
56. Sabesan, S. and Paulson, J.C. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 2068–2080
57. Takamura, T., Chiba, T., Ishihara, H., and Tejima, S. (1980) *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 1804–1809
58. Yates, A.D. and Watkins, W. M. (1983) *Carbohydr. Res.* **120**, 251–268
59. Murata, T., Inukai, T., Suzuki, M., Yamagishi, M., and Usui, T. (1999) *Glycoconjugate J.* **16**, 189–195

Received on May 15, 2000, accepted on 26,2000

Profile of the Authors

Takeomi Murata

Research associate of Applied Biological Chemistry at Shizuoka University. He received his Ph. D. in agriculture from Gifu University in 1998. His research focuses on the enzymatic synthesis of human milk oligosaccharides and on their biological function.

★★★★★★★★

Taiichi Usui

Professor of Applied Biological Chemistry at Shizuoka University. He received his Ph. D. in agriculture from Tohoku University in 1975. His research interests include practical enzymatic synthesis of important oligosaccharides involved in glycoconjugate and the development of oligosaccharide units as biomaterials of life science.