Easy Access to Cell Surface Oligosaccharide Mimics: Carbohydrate Module Approach

簡便な細胞表面オリゴ糖鎖ミミックの構築法：糖鎖モジュール化法によるアプローチ

Nishida, Yoshihiro*; Dohi, Hirofumi; and Kobayashi, Kazukiyo

Department of Molecular Design & Engineering, Graduate School of Engineering,
Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603, Japan
FAX: 81-52-789-2528, E-mail:nishida@mol.nagoya-u.ac.jp

Key Words: oligosaccharide mimics, sialyl Lewis^x, Shiga toxins, galactosyl transferases, carbohydrate module

Abstract

Obviously, human oligosaccharides and their mimics possess high potential in applications to medicines and biomaterials. On the other hand, it holds true that the high potential stems from the rather complicated and labile chemical structures. Therefore, it is of major significance to elucidate the key structures encoded in the oligosaccharides for making effective “minimization” and “functionalization.” Moreover, the glycosidic linkages labile to acids and glycosidases may give problems to practical applications. In this review, we wish to describe our mimetic design of the cell surface oligosaccharides based on “key carbohydrate modules” and “carbohydrate module method.”

要 約

ヒトに発現するオリゴ糖及びそのミミックが医薬品や生体材料への応用に対して高いポテンシャルを有することは明らかである。その一方で、そのポテンシャルが複雑で不安定な化学構造から由来することも確かである。よってオリゴ糖の鍵構造を明らかにすることは、効果的な「構造の最小化」及び「機能化」を施す上で重要である。さらにグリコシド結合は酸やグリコシダーゼに対して不安定であるため、応用面で問題をもたらす。本レビューでは、筆者らが行ってきた「鍵糖鎖モジュール化」と「糖鎖モジュール化法」の概念に基づいた糖鎖ミミックの設計について述べる。

A. Introduction

Human cell surface oligosaccharides bound to glycoproteins and glycolipids serve as ligands of many types of carbohydrate-binding proteins involving, for example, microbial adhesion proteins and toxins. This means that the cell surface oligosaccharides provide lead compounds that are promising for developing “sugar-based” medicines and bio-probes in materials. Among them, many efforts have been directed to the mimic design of sialyl Lewis^x (sLewis^x) and the related sialyl oligosaccharides involved in interactions with selectins leading to inflammation and metastasis. The designed artificial selectin ligands and inhibitors to sialidases and CMP-Neu5Ac transferases have high potential in biochemical and medicinal applications. From a viewpoint of the sugar-based medicines and biochemicals, intense interest has been directed to the species-specific interaction of microbial adhesion proteins and toxins with the host cell oligosaccharides. For example, Influenza viruses express both hemagglutinins and sialidases, which are used at the respective stages of adhesion to the host cell and budding from the host cells. Therefore, inhibitory reagents to these viral proteins function potentially as anti-influenza reagents (1). Globotriaoside (Gb3) and the related α 1,4-galactobiosides (Gb2) are recognized highly specifically by Shiga toxins (Stx-1 and

A. はじめに

糖タンパクや糖脂質としてヒト細胞表面に発現するオリゴ糖鎖は、細菌由来の接着タンパク質や毒素のような糖結合タンパク質のリガンドとして働く。このことは、細胞表面のオリゴ糖が「糖鎖ベース」の医薬品や生体プローブを開発するためのリード化合物となりうることを意味する。特に、炎症やガン転移を誘発するセレクチンファミリーと相互作用するシアリルLewis^x (sLewis^x) や関連するシアロオリゴ糖に対するミミックデザインが数多く行われてきた。その中で設計された人工セレクチンリガンドや、シアリダーゼ及びシアリルトランスフェラーゼに対する阻害剤は、生化学あるいは医療分野における応用性が高い。また糖鎖ベースの医薬品や生化学薬品の開発という観点から、ホスト細胞のオリゴ糖鎖と特異的に相互作用する微生物由来の結合タンパク質や毒素に高い関心が注がれてきた。例えば、インフルエンザウィルスはヘマグルチニンとシアリダーゼを発現し、ホスト細胞への接着・脱離を行っている。それゆえ、これらのウィルスタンパク質に対する阻害剤は抗インフルエンザ薬として機能する(1)。グロボトリオース (Gb3) や α 1,4-ガラクトビオシド (Gb2) を有する糖鎖は、大腸菌 O-157 やその関連株によって産生される志賀毒素 (Stx-1, Stx-2) によってきわ

Stx-2) of *E. coli* O-157 and the related strains. Multivalent Gb3 models have potential activity to bind to the Shiga toxins and block their infectious activity.

From a viewpoint of the “sugar-based” biomaterials, intense interest is directed to nano- to micro-sized glycomaterials in the form of tips, arrays, and particles. They can be potentially used for sensing infectious microbes and toxins leading also to diagnosis of infectious diseases. For example, glyco-tips made of Gb3 self-assembled monolayer and Gb2 Langmuir-Blodgett film are applied to quartz-crystal microbalance (QCM) systems for easy and discriminative analyses of Stx-1 and Stx-2 (2, 3).

Obviously, the human oligosaccharides and their mimics possess high potential in applications to medicines and biomaterials. On the other hand, it also holds true that the high potential stems from the rather complicated but defined structures composed of different sugar residues and linkages. In the case of 6-*O*-sulfo sLewis^x, which serves as the most plausible L-selectin ligand, as well as glycosaminoglycans such as heparan sulfates, alternative functional groups in addition to the complicated oligosaccharide structures may have a key role for biological activities. Moreover, it is of importance for the mimic design that the recognition events in nature are based on multivalent interactions associated with glycoproteins and glycolipids. Actually, the binding affinity of free oligosaccharides is enhanced significantly in forms of multivalent models. Therefore, for blocking the receptor proteins such as the selectins and the bacterial toxins, an appropriate functionalization is required.

The main problems in applying the cell surface oligosaccharides may arise from the difficulty in supplying them in sufficient amounts. Therefore, it is of major significance to elucidate the key structures encoded in the targeting oligosaccharides for making effective “minimization.” Additionally, an effective “functionalization” must be conducted taking the geometry of binding sites and subunit structures of the receptor proteins into account. Moreover, the glycosidic linkages labile to acids and glycosidases may give critical problems to practical applications.

B. Design of Oligosaccharide Mimic

Considering the problems in supplying cell surface oligosaccharides such as sLewis^x and globosides in sufficient amounts as well as in their low chemical stability, chemical modifications and artificial design will be of key investigative issue in coming studies. For simple saccharides such as those carrying D-glucose (Glc) and lactose (Lac) residues, the functional modifications can be performed in variable ways. For instance, as a popular way for solving the problem of low chemical and enzymatic stability, natural *O*-glycosidic linkages are replaced with C- (4-8) and S- (9-11) linkages. Alternatively, a hydroxyl group at the C-2 position is replaced with an electron-withdrawing fluorine atom (12, 13). The modified compounds may have chemical structures of carbohydrate analogues and

めて特異的に認識される。多価 Gb3 モデルは志賀毒素に対して結合活性を有し、その感染をブロックする。

糖鎖をベースとした生体材料の開発において、チップ、アレイ、微粒子という形でナノもしくはマイクロサイズ化された糖鎖材料が注目を集めてきた。これらは感染性微生物や毒素の検出、そして感染症の診断に用いられている。例えば、Gb3 の自己組織化膜や Gb2 の LB 膜は、簡便かつ高感度に Stx-1 と Stx-2 を検出する水晶発振子システムに応用されている(2,3)。

ヒトに発現するオリゴ糖及びそのミミックが、医薬品や生体材料への応用に対して高いポテンシャルを有することは明らかである。一方、そのポテンシャルが異なる糖残基や結合様式で構成されたかなり複雑だが明確にされた構造に由来することも確かである。現在最も有望な L-セレクトインリガンドとされる 6-*O*-スルホ sLewis^x や、ヘパラン硫酸のようなグリコサミノグリカンの場合、複雑なオリゴ糖鎖の構造に加えて別の官能基が生理活性上重要な役割を有する。さらに糖鎖ミミックの分子設計において、自然界における認識機構は糖タンパク質や糖脂質による多価相互作用に基づいているという事実は重要である。実際に、モノメリックなオリゴ糖鎖の結合親和性は多価モデルを形成することで有意に増幅される。ゆえに、セレクトインや細菌毒素のようなレセプタータンパクをブロックするには適切な機能化が必要である。

細胞表面糖鎖を応用する上での大きな問題点は、十分な量を供給することが難しいことである。よって、標的とするオリゴ糖鎖の鍵構造を見つけることは、そのミミック設計における効果的な「最小化」においてきわめて重要である。加えて、レセプタータンパクの結合部位とサブユニットの構造をそれぞれ考慮に入れ、効果的な「機能化」を施さなければならない。さらに、グリコシド結合が酸やグリコシダーゼに対して不安定であることが、実際に応用する段階で重大な問題点となりうる。

B. オリゴ糖鎖ミミックの設計

sLewis^x やグロボ系糖鎖のような細胞表層のオリゴ糖を供給する場合、その供給量及び不安定性が問題となる。ゆえに、その化学修飾や人工デザインは将来有望な研究課題である。D-グルコースやラクトース骨格を有するような単純な糖に対しては、様々な方法で機能修飾を施すことができる。例えば、化学的条件下及び酵素に対する不安定性を解決する一般的な方法として、天然型である *O*-グリコシド結合を *C*-グリコシド結合(4-8)、または *S*-グリコシド結合(9-11)に置換することが挙げられる。別の方法として、C-2 位の水酸基を電気吸引性基であるフッ素原子に置き換える方法もある(12,13)。このように修飾された化合物は糖鎖アナログもしくは 5-*C* カルバ糖のような疑似

pseudo-sugars like 5-C *carba*-sugars and potentially serve as glycosidase inhibitors.

For higher oligosaccharides, these chemical modifications must be carried out in combination with glycosylation reactions using modified saccharides as either the glycosyl donor or the acceptor. The concept of the mimetic design involves also a broader change of the targeting oligosaccharides. For example, the sugar skeleton may be replaced with amino acids and cyclohexane derivatives to construct artificial glycopeptides and other glycoconjugates.

From the aspect of the mimetic synthesis, the sLewis^x antigen is one of the most extensively studied oligosaccharides. This is a common ligand of three types of selectins (E-, P-, and L-selectins). This means that the sLewis^x structure gives a major basis to drug design of anti-inflammatory and anti-cancer reagents.

From a viewpoint of synthetic chemistry, there are some difficulties in constructing the α -Neu5Ac-(2-3)- and α -L-fucopyranosyl-(1,4) linkages in the tetrasaccharide structures of compounds **1** and **2** (Fig. 1). In these mimetic approaches, the sialyl linkage is replaced with simpler carboxymethyl ($-\text{CH}_2\text{COO}^-$) and *O*-sulfate ($-\text{OSO}_3^-$) groups. These designs are based on X-ray diffraction data of sLewis^x and E-selectin complex, which has disclosed that the carboxylate anion of the sLewis^x provides a major binding interaction with this protein (14, 15).

For the α -L-fucoside that also gives a major interaction, Wong *et al.* applied C- α -L-fucosyl or C- α -D-mannosyl linkages to provide artificial α -L-fucoside-based glycopeptides as selectin blockers ($\text{IC}_{50} = 0.1 \text{ mM}$ for E-selectin) (16). Ishida and Kiso *et al.* designed 3-sulfo-galactoside carrying the α -L-fucoside at the *O*-2 position and *pseudo*-ceramide as the aglycon (100% inhibition at 0.3 mM for P-selectin, and 99% for L-selectin) (17). Our group used allyl α -L-fucopyranoside for easy assembly of an acyclic sLewis^x mimic **3** (18). Kondo *et al.* designed α -L-fucopyranosyl dipeptides (Ser-Glu) and simpler selectin antago-

糖の化学構造を持ち、グリコシダーゼの阻害剤としてよく機能する。

長鎖オリゴ糖に対する化学修飾は、機能化された糖鎖と、糖供与体もしくは受容体を用いたグリコシル化反応を組み合わせるで行わなければならない。糖鎖骨格をアミノ酸やシクロヘキサン誘導体に置き換えて人工糖ペプチドや他の糖コンジュゲートを構築するように、ミミック設計のコンセプトは標的分子を大幅に改変することもある。

ミミック合成という観点からいえば、sLewis^x抗原は最も幅広く研究されたオリゴ糖鎖の一つである。sLewis^x抗原は三種のセレクトリン (E-, P-, L-セレクトリン) に対する共通のリガンドであるため、その構造は抗炎症剤や抗がん剤の薬物設計における基本骨格となっている。

化学合成において sLewis^x 四糖 **1** (図 1) の α -シアリル結合と α -L-フコシド結合の構築は困難を伴うため、ミミックアプローチによってシアリ酸は単純なカルボキシメチル基 ($-\text{CH}_2\text{CO}_2^-$) や *O*-硫酸基 ($-\text{OSO}_3^-$) に置換され、シアリル結合を持たない sLewis^x ミミックの開発へと結びついた。このミミックデザインは sLewis^x-E-セレクトリン複合体の X 線回折データによって、sLewis^x のカルボキシル基のアニオン部位がセレクトリンとの相互作用に重要であることが明らかにされたという事実を基に達成された (14, 15)。

sLewis^x のカルボキシル基と同様にセレクトリンとの相互作用に重要な α -L-フコースについても、Wong らは α -L-フコシル結合の代わりに C- α -L-フコシル及び C- α -D-マンノシル結合を用いることによって、 α -L-フコシドをベースとした人工糖ペプチドセレクトリンブロッカーを開発した ($\text{IC}_{50} = 0.1 \text{ mM}$ for E-selectin) (16)。Ishida や Kiso らは *O*-2 位に α -L-フコシド、そしてアグリコン部位に疑似セラミドを導入した 3-*O*-スルホガラクトースを設計した (100% inhibition at 0.3 mM for P-selectin, and 99% for L-selectin) (17)。我々のグループは、アリル α -L-フコピラノシドを用いて非環状構造を有する sLewis^x ミミック **3** を簡便に構築

Fig. 1. Structures of sialyl Lewis^x tetrasaccharide and their mimetics.

nists carrying an aromatic group (43% inhibition at 30 μ M for P-selectin) (19).

The designed sLewis^x mimics, giving structural features largely different from that of the natural structure, serve as potent selectin blockers. This means that the apparently complicated structures of the cell surface oligosaccharides can be remodeled into much simpler mimic compounds. For the mimic design, X-ray crystalline or library assembly of synthetic compounds provided useful bases to determine the key recognition structures encoded in natural structures.

C. Biological Potential of Trehalose 1,1-Linkages

For the design of the functional oligosaccharide mimics tolerable to acidic and enzymatic conditions, the use of trehalose 1,1-linkages seems to be promising. Natural trehalose is a symmetric non-reducing disaccharide having α 1,1 α -linked D-glucose disaccharide. By using enzymes and starches as natural sources, this disaccharide is manufactured by a Japanese Industry (20). As compared with α 1,3- and α 1,4-linked glycosides, the trehalose linkage is considered to have higher chemical and enzymic stability. Thus, it has high potential in applications to medicines and materials.

Several notable biological effects have been disclosed for the trehalose. For example, a recent study has evidenced that the trehalose shows positive effects on delaying the progress of symptoms of Huntington disease associated with the aggregation of polyglutamines in human brains (21). Trehalosamines carrying amino groups in the trehalose skeleton serve as aminoglycoside-based antibiotics (22). Heparin analogues carrying the 1,1-linkage at the reducing end are also designed by a group of Hoffmann-La Roche (23). Wong *et al.* designed dissymmetric α -D-mannosyl-(1,1)- β -D-galactosyl linkage **4** (Fig. 1) as a mimic of the sLewis^x (24). There, such a dynamic structural change is involved that the sLewis^x sequence is replaced with the 1,1-linkage.

Expecting the high biological potential of the trehalose and the related non-reducing 1,1-linked disaccharides, our group has also designed oligosaccharide mimics based on the skeleton of the 1,1-linked disaccharide. We described a close structural

した (18). Kondo らは α -L-フコピラノシルジペプチド(Ser-Glu)や芳香族官能基によって構成された非常に単純な構造を有するセレクトインアンタゴニストを設計した (43% inhibition at 30 μ M for P-selectin) (19).

これらの sLewis^x ミミックは天然型のものとは非常に異なる構造特性を有するが、セレクトインブロッカーとして働く。これは細胞表層オリゴ糖鎖の複雑な構造が、もっと単純なミミック化合物によって再構築されることを意味する。ミミックデザインにおいて X 線結晶解析や合成化合物のライブラリーは、天然型糖鎖に含まれる鍵となる認識構造を決定するときには有益な礎をもたらす。

C.トレハロース 1,1-結合の生物学的ポテンシャル

酸性及び酵素的条件下に耐えうる機能的オリゴ糖鎖ミミックを構築するためには、トレハロース 1,1 結合は有用であるようだ。天然のトレハロースは、二分子のグルコースが α 1,1 α 結合した対称性の非還元性二糖である。日本の企業(林原研究所)が酵素とデンプンを原料として用いたトレハロースの大量生産を行っている (20)。 α 1,3もしくは α 1,4結合型糖鎖と比較すると、トレハロース結合は化学的及び酵素的に安定であると見なされている。よって、トレハロース結合は医薬品や生体材料への応用性が高い。

注目値するいくつかの生理活性がトレハロースから見出されている。例えば最近の研究により、トレハロースがヒト脳内でのポリグルタミン酸の集積によって引き起こされるハンチントン氏病の病状の進行を積極的に遅らせる効果を持つことが明らかになった (21)。また、トレハロース骨格中にアミノ基を有するトレハロサミンはアミノ糖ベースの抗生物質として働く (22)。Hoffmann-La Roche の研究グループは還元末端に 1,1 結合を有するヘパランアナログを設計した (23)。Wong らは非対称性の α -D-マンノシル-(1,1)- β -D-ガラクトシル結合を持つ **4** (図 1) を sLewis^x ミミックとして設計した (24)。このミミックデザインにおいては、sLewis^x の配列を 1,1 結合に置き換えるような非常にダイナミックな構造転換を伴っている。

トレハロースや関連した非還元性 1,1 結合型糖鎖の高い生理活性を期待して、我々も 1,1 結合型二糖骨格を基にオリゴ糖鎖ミミックを設計した。Gb₂ 糖鎖 **5** とトレハロース **7** (図 2) が

Fig. 2. Structural homology in globosyl Gb2 and galacto-type trehalose.

homology between Gb2 **5** and trehalose **7** (Fig. 2), meaning that the trehalose linkages can be applied as artificial ligands of the Shiga toxins produced by *E. coli*.

The Shiga toxins (Stx-1 and Stx-2) are proteins comprising one toxic A-subunit and five receptor binding B-subunits. Both Stx-1 and Stx-2 recognize the neutral Gb2 and Gb3 oligosaccharides, which exist as glycosyl ceramides in human cell surfaces. There have been extensive studies on the molecular design of artificial ligands possessing simple structures and high activity for blocking the toxin-host cell adhesion. Replacement of the ceramide group with simpler groups was the central objective. Previously, we prepared artificial glycopolymers carrying the Gb3 along acrylamide polymer in clusters, which showed potent neutralization activity against the Shiga toxin (Stx-1) (CD_{50} = 1–5 ng/mL for Stx-1, ACHN cells) (25, 26). The Gb3-carrying dendrimers as well as the glycopolymers designed by Matsuoka *et al.* (IC_{50} = 50 nM for Stx-1, and 820 nM for Stx-2, Vero cells) (27, 28) and the starfish models by Kitov *et al.* (IC_{50} = 1.2 μ M for Stx-1, and 1.6 μ M for Stx-2, Vero cells) (29) showed neutralization activity to both Stx-1 and Stx-2. It was also found that an analogous polymer carrying *iso*Gb3 [α -D-Gal-(1,3)- α -D-Gal-(1,4)- β -D-Glc] showed no activity (26). It is obvious that the Gb3-toxin interaction is based on a high species-specific interaction. Uzawa *et al.* (2) and Miura *et al.* (3) applied the specific interaction to develop Shiga-toxin detecting systems utilizing the Gb2 and Gb3 saccharides, respectively. Thus, the natural Gb2 and Gb3 saccharides themselves have high values for medicines and biomaterials. Therefore, extensive efforts are being directed to their practical syntheses based on chemical (30–32) and biological processes (33) in addition to isolation and modification of ones from natural sources (34).

However, an effective mimic of the galactobiosyl α 1,4-linkage had not been designed. This was ironic since the practical synthesis of the Gb2 and Gb3 is hampered by the difficulty in constructing the key linkage. It can be easily noticed that the trehalose α 1,1 α -linkage has a molecular topology analogous to that of the Gb₂ linkage as can be seen in Fig. 2. A critical difference arises from the configuration at OH-4, which should be

非常に似通った構造相関性を有している、すなわち大腸菌が生産する志賀毒素に対する人工リガンドにトレハロース結合を適用できることを報告した。

志賀毒素 (Stx-I, Stx-II) は毒性を示す 1 つの A サブユニットと、糖鎖結合部位を有する 5 つの B サブユニットから構成されるタンパク質である。Stx-I と Stx-II はともに、ヒト細胞上に糖セラミドの形で存在する中性糖脂質である Gb2 及び Gb3 を認識する。現在までに、単純な構造を持ちなおかつ毒素と宿主細胞の接着を強く阻害する人工リガンドの分子設計が行われ、特にセラミド部位を簡略化することに重点が置かれてきた。我々はアクリルアミドポリマー上に Gb3 糖鎖をクラスター化した人工糖鎖高分子を調製し、志賀毒素 (Stx-1) に対して強力な中和活性を示すことを先駆けて報告した (CD_{50} = 1–5 ng/mL for Stx-1, ACHN cells) (25, 26)。Matsuoka らは Gb3 糖鎖を有するデンドリマー及び人工糖鎖高分子を設計し (IC_{50} = 50 nM for Stx-1, and 820 nM for Stx-2, Vero cells) (27, 28)、Kitov らはヒトデ型モデルが Stx-1 及び Stx-2 両毒素に対して中和活性を有することを示した (IC_{50} = 1.2 μ M for Stx-1, and 1.6 μ M for Stx-2, Vero cells) (29)。*iso*Gb3 糖鎖 [α -D-Gal-(1,3)- α -D-Gal-(1,4)- β -D-Glc] を組み込んだアナログポリマーが志賀毒素に対して中和活性を全く示さなかったことから、Gb3 糖鎖と毒素の相互作用は高い基質特異性に基いていることは明らかである (26)。Uzawa らや Miura らは、この高い基質特異性を利用して Gb2 または Gb3 糖鎖を用いた志賀毒素検出システムをそれぞれ開発した (2, 3)。このように、天然の Gb2 及び Gb3 糖鎖自身も医薬品や生体材料の開発において高い生理活性がある。よって、化学的及び生化学的手法、さらには天然物からの単離・修飾による Gb2 及び Gb3 糖鎖の大量合成法の開発が活発に行われてきた (30–34)。

しかしながら、ガラクトビオシル α 1,4 結合の効果的なミミックは設計されていなかった。皮肉にも鍵となる結合構築の難しさが、Gb2 及び Gb3 糖鎖の大量合成の際に足かせとなっている。図 2 からわかるように、トレハロース α 1,1 α 結合の分子トポロジーはガラクトビオシル α 1,4 結合のものと似ていることに容易に気付くことができる。両者の決定的な違いは、志賀毒素との結合にはアキシアルであるべき 4 位の水酸基である。そ

Fig. 3. Multivalent models of trehalose and galacto-type trehalose.

axial for the Shiga toxins. Accordingly, a *galactose*-type trehalose was designed as an artificial toxin ligand having an advantageous property as we have mentioned above (35). By different biological assays, we have found that the galactose-type trehalose becomes a promising substitute for the globosyl α 1,4-linkage. The neutralization activity of the galactose-type trehalose to Shiga-toxins, particularly to Stx-2, was negligibly weaker than that of the natural Gb2 and Gb3 ligands. On the other hand, the activity was integrated in a form of glycopolymer **10** up to 90% of that of a related Gb2 polymer ($\text{MIC} = 4.1 \times 10^{-5}$ M for Stx-1, Hemagglutinin inhibition assay) (Fig. 3). A glycopolymer **9** carrying trehalose in clusters showed little activity ($\text{MIC} > 5.7 \times 10^{-2}$ M for Stx-1, Hemagglutinin inhibition assay).

Our interest in using the trehalose linkages as the mimic of natural oligosaccharides stems from the discovery of β 1,1-galactosyl transferase reactions catalyzed by bovine β 1,4-galactosyl transferase. When 3-acetamido-3-deoxy-D-glucose (D-Glc-3-NAc) was used as the acceptor substrate, the β 1,1 β -linked disaccharide of β -D-Gal-(1,1)- β -D-Glc-3-NAc **12** was constructed exclusively (Fig. 4) (36).

The observed abnormal reaction indicated that the mammalian enzyme recognizes a partial structure in the acceptor substrates, which is made of a sequence of 3-acetamido-1,2-propanediol. This sequence is involved in both natural GlcNAc and the synthetic D-Glc-3-NAc (*N*-acetyl kannosamine) to direct the bovine enzyme to perform natural β 1,4- and β 1,1-galactosyl transfer reactions, respectively (37, 38). This enzyme does not utilize L-series sugars such as L-Glc and L-Xyl, while the enzyme turns to accepting their 1-acetamido derivatives, *i.e.*, L-Glc-1-NAc and L-Xyl-1-NAc, to give β (1,3)-linked disaccharides, exclusively. Even for an acyclic 3-acetamido-1,2-propanediol, this enzyme gives the corresponding β -D-galactosyl product in a regio- and enantiospecific way, indicating a major site-directed by the key sequence. Here, it is of interest to note that the β -galactosyl compounds produced have a close topology to *N*-acetyl β -lactosamine **11** (LacNAc) and lactose (Fig. 4), suggesting their utility as LacNAc mimics.

We have described that the trehalose and the related 1,1-linked saccharides have high biological potential. Toward practical assembly of these trehaloses and multivalent models, several different approaches have recently appeared (39, 40). In addition to a chemical approach to the α 1,1 α -linked trehaloses

れゆえ、我々はガラクト型トレハロースを上記の有利な性質を付与した人工志賀毒素リガンドとして設計した (35)。我々は異なる生理活性試験によって、ガラクト型トレハロースがグロボシル α 1,4 結合に置換しうることを見出した。その志賀毒素に対する結合親和性、特に Stx-2 に対しては天然の Gb2 及び Gb3 糖鎖に比べて非常に弱かった。しかしながら、ガラクト型トレハロースの親和性は糖鎖高分子 **10** (図 3) にすることで増幅され、対応する Gb2 糖鎖高分子の 90% 以上の活性を示した。($\text{MIC} = 4.1 \times 10^{-5}$ M for Stx-1, Hemagglutinin inhibition assay)。トレハロースを組み込んだ糖鎖高分子 **9** は毒素に対する親和性をほとんど示さなかった ($\text{MIC} > 5.7 \times 10^{-2}$ M for Stx-1, Hemagglutinin inhibition assay)。

我々がトレハロース結合を天然オリゴ糖鎖のミミックとして使用することに着目した理由は、ウシ由来の β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼによる β 1,1-ガラクトース転移反応の発見に由来する。3-アセトアミド-3-デオキシ-D-グルコース (D-Glc-3-NAc) を受容体基質として用いた場合、 β 1,1 β 結合した二糖 β -D-Gal-(1,1)- β -D-Glc-3-NAc **12** が優先して生成する (図 4) (36)。

この異常な反応は、哺乳類の酵素は受容体基質の一部の構造、すなわち 3-アセトアミド-1,2-プロパンジオール配列を認識することを示唆した。この配列は天然の基質である GlcNAc と、構成基質である D-Glc-3-NAc (*N*-アセチルカンノサミン) に含まれ、ガラクトシルトランスフェラーゼに通常の β -1,4 転移または β -1,1 転移をそれぞれ誘起する。本酵素は L-グルコースや L-キシロースのような L 糖には用いられなかったが、1-アセトアミド誘導体、すなわち L-Glc-1-NAc や L-Xyl-1-NAc は β -1,3 結合した二糖を優先的に生成する。本酵素は非環状型の 3-アセトアミド-1,2-プロパンジオールに対しても、位置及び立体選択的な反応を経て対応する β -D-ガラクトシル生成物を与える。よって、3-アセトアミド-1,2-プロパンジオール構造が、酵素が認識する主要な特定部位であるといえる。このように合成された β -D-ガラクトシル化合物は、*N*-アセチルラクタサミンやラクトースと似通ったトポロジーを有するため (図 4)、LacNAc ミミックとして用いることができる可能性があるため興味深い。

我々はトレハロースや関連した 1,1 結合型糖鎖が高い生物学的ポテンシャルを持つことを述べてきたが、実用的な 1,1 結合型糖鎖や多価モデルの構築を目指したいいくつかの異なるアプ

Fig. 4. Non-reducing *N*-acetyl lactosamine (LacNAc) mimic **12** derived with bovine lactose synthetase and 3-acetamido-3-deoxy-D-glucose (D-Glc-3NAc).

by Pratt *et al.* (39), enzymic synthesis of the galactose-type trehalose was reported by Chaen *et al.* (40). Enzymic assembly of multivalent trehaloses was also reported by Miura *et al.* (41). The bovine β -galactosyl enzyme allows us to construct the $\beta(1,1)\beta$ -linked saccharides in a regio- and stereospecific manner as we have described. For the dissymmetric $\alpha(1,1)\beta$ -linked saccharides, Wong *et al.* reported a chemical pathway using 1-*O*-silyl-protected acceptor sugars (24, 42). We expect that these synthetic studies will accelerate practical applications of the 1,1-linked saccharides for the “sugar-based” medicines and biomaterials.

D. Carbohydrate Module Method

In nature, the cell surface oligosaccharides play their roles in the form of polymers or clusters of natural glycoproteins and glycolipids forming micro domains in cell membrane. This corresponds to the popular case of the carbohydrate receptor proteins possessing subunit structures and thus multiple binding to cause multivalent binding interactions. This means that synthetic carbohydrate molecules can function more effectively in appropriate multivalent forms except for several cases such as those for enzyme inhibitors and antibiotics. Different types of multivalent glycoconjugates have been proposed and applied, which include glycosyl polymers, dendrimers, mono-layers, liposomes, and particles. On the other hand, few models carry the cell surface oligosaccharides or the mimics possessing higher biological potential. An improved synthetic process and methodology

ローチが近年報告されている。Pratt らによる化学的手法による $\alpha 1,1\alpha$ 結合型糖鎖の合成に加えて (39)、Chaen らはガラクト型トレハロースの酵素的合成法を報告している (40)。Miura らは酵素法によるトレハロース多価モデルの構築を報告した (41)。我々は先に述べたように、ウシ由来の $\beta 1,4$ ガラクトシルトランスフェラーゼによる位置選択的かつ立体選択的な方法で $\beta 1,1\beta$ 結合型糖鎖を合成することに成功した。非対称性 $\alpha 1,1\beta$ 結合型糖鎖については、Wong らは 1-*O*-シリル保護した糖鎖受容体を用いた化学的経路を報告した (24, 42)。これらの合成研究が「糖鎖ベース」の医薬品や生体材料へ向けた 1,1 結合型糖鎖の実応用を加速することを期待したい。

D. 糖鎖モジュール化法

自然界において細胞表面のオリゴ糖鎖は、糖タンパク質や糖脂質が細胞膜上でマイクロドメインを形成することで高分子またはクラスターという形で機能している。すなわちサブユニット構造を有する糖結合タンパク質の一般的な事例に一致し、よって複数の結合が多価結合相互作用を誘発する。このことは、酵素の阻害剤や抗生物質のようないくつかの場合を除いて、合成した糖鎖分子が適切な多価モデルを形成することによってさらに効果的に機能することを意味する。糖鎖高分子、デンドリマー、リポソーム、微粒子といった多種の多価糖鎖モデルが提案及び応用されてきた。その一方で、細胞表面オリゴ糖鎖や高い生理活性を有するミミック分子を組み込んだモデルはほとんど存在しない。このような高レベルの多価糖鎖モデルの実践的な構築には、合成化学的なプロセスや手法の改良が強

Fig. 5. Concept of the “Carbohydrate Module Method” for easy assembly of multivalent oligosaccharide mimics.

is strongly desired toward the practical assembly of these higher multivalent glycoconjugates.

In our synthetic study on artificial glycopolymers, we have taken a radical copolymerization approach that may be termed “glycomodule or carbohydrate module approach” (18, 43) (Fig. 5). For example, an acrylamide-based glycopolymer carrying both α -L-fucopyranoside and 3-*O*-sulfo- β -D-galactopyranoside along the side chain shows potent activity to block L-selectin/sLewis^x tetrasaccharide adhesion. None of the two glycopolymers carrying one of the two sugars shows notable activity. This means that the observed blocking activity is ascribable to the cooperative effects of the two key glycosides embedded in the acrylamide copolymer. Thus, the radical copolymerization provides a easy and highly effective access to sLewis^x mimics and multivalent models.

For an easy understanding of the “carbohydrate module approach”, a binding model between a branching oligosaccharide and the receptor protein may be used (Fig. 5). In this model, the two glycosidic residues of A and B provide the key carbohydrate structures for the receptor protein. Conventional mimic syntheses may target a branching trisaccharide carrying A, B, and C residues and further its multivalent models (Fig. 5a). The glycomodule approach targets a copolymer-(A+B) carrying the key glycosides (Fig. 5b). The simple copolymer-(A+B) will gain a certain chance to occupy both of the binding sites and thus exhibit higher activity than the polymers carrying one of the two epitope sugars. This means that the copolymerization between the key glycosyl monomer-A and monomer-B provides a simultaneous methodology for both mimicking a targeting oligosaccharide and assembling the multivalent model (Fig. 5c). As a practical application, we undertook the carbohydrate module approach to mimic assembly of 6-*O*-sulfo sialyl Lewis^x (compound 2 in Fig. 1), that serves as a better ligand of L-selectin than natural compound 1. The complicated structure was segmented to 3-*O*-sulfo Lewis^x mimic 3 (Fig. 1) and 6-*O*-sulfo-GlcNAc, which were copolymerized with acrylamide in either an independent or a cooperative manner. Among the glycopolymers, we found that an acrylamide polymer carrying 6-*O*-sulfo-GlcNAc in clusters shows notable blocking activity to the L-selectin ($IC_{50} = 3 \mu M$ for L-selectin). The activity was

く望まれている。

我々は人工糖鎖高分子の合成研究において、ラジカル共重合を用いる「グライコモジュール化法」もしくは「糖鎖モジュール化法」と呼ばれる方法を適用してきた(図5)(18,43)。例えば、 α -L-フコピラノシドと3-*O*-スルホ- β -D-ガラクトピラノシドを側鎖に有するアクリルアミドベースの糖鎖高分子は、sLewis^x四糖のL-セレクトリンに対する接着を強くブロックする。この観察されたブロック活性は、アクリルアミドコポリマーに埋め込まれた二つの鍵糖鎖による協奏効果によるものと説明できる。よってラジカル共重合は、sLewis^xミミックや多価モデルを得るための簡便かつ非常に効果的な手段である。

「糖鎖モジュール化法」をよりわかりやすくするには、枝分かれオリゴ糖鎖とレセプタータンパクの結合モデルを用いるのがよいだろう(図5)。従来のミミック合成は、A、B、C残基を有する枝分かれ三糖、さらにはその多価モデルをターゲットにしている(図5a)。グライコモジュール化法では鍵となる配糖体を持つ共重合体(A+B)を標的にする(図5b)。単純な構造を持つ共重合体(A+B)は結合部位を占有する可能性があるため、1つもしくは2つのエピトープ糖鎖を持つ高分子よりも強力な活性を持つ。ゆえに、鍵となる配糖体モノマーAとモノマーBの共重合は、標的オリゴ糖鎖のミミック化と多価モデルの構築という二つの操作を同時に可能にする方法であるといえる(図5c)。実応用に向けて、我々は糖鎖モジュールアプローチによって、天然のsLewis^x四糖1より優れたL-セレクトリンリガンドである6-*O*-スルホ sLewis^xのミミック構築に着手した。その複雑な構造を3-*O*-スルホ Lewis^xミミック3(図1)と6-*O*-スルホ GlcNAcに断片化し、それぞれ単独もしくは両者を組み合わせてアクリルアミドと共重合を行った。調製した糖鎖高分子の中で、6-*O*-スルホ sLewis^xをクラスター状に組み込んだアクリルアミドポリマーがひととき強いL-セレクトインブロック活性を示した($IC_{50} = 3 \mu M$ for L-selectin)。そのブロック活性は二つの鍵配糖体モジュールを組み込んだ共重合体に匹敵し($IC_{50} = 3 \mu M$ for L-selectin)、このような単純な糖鎖でもL-セレクトインと強い相互作用が可能であることがわかった。この結果は少なくとも、6-*O*-スルホ GlcNAc 骨格が高い生理的ポテンシャルを持つことを明らかにした。

Fig. 6. Structural homology between Neu5Ac 13 and 6-*O*-sulfo-GlcNAc 14.

comparable to that of a copolymer carrying both of the two key glycoside modules ($IC_{50} = 3 \mu M$ for L-selectin), to suggest that such a simple sugar can provide major interactions with this protein. At least, this result has disclosed that the skeleton of the 6-*O*-sulfo-GlcNAc has high biological potential.

The strong activity of the glycopolymer carrying 6-*O*-sulfo-GlcNAc was, however, not surprising when a close structural homology between 6-*O*-sulfo-GlcNAc and Neu5Ac was considered (Fig. 6). Namely, the skeleton of the 6-*O*-sulfo-GlcNAc gives OH, NHAc, and anionic groups in the stereochemistry similar to those of the Neu5Ac. Thus, the polymer may be capable of occupying the binding sites for both 6-*O*-sulfo-GlcNAc and Neu5Ac to induce stronger binding activity than a glycopolymer carrying 3-*O*-sulfo-Lewis^x mimics in clusters. Schmidt *et al.* also applied the relation between GlcNAc and Neu5Ac in their recent study on CMP-Neu5Ac transferase inhibitors (44). It is well known that a WGA lectin recognizes both GlcNAc and Neu5Ac. The seemingly diverse recognition can be rationalized in the same way.

The notable activity of the glycopolymer carrying the 6-*O*-sulfo-GlcNAc has evidenced that the 6-*O*-sulfo-GlcNAc possesses high biological potential. In our recent studies, we are examining the potential for the design of sialidase inhibitors, which has been based on the Neu5Ac and Neu5Ac-2-en structures (45). Moreover, the skeleton of 6-*O*-sulfo-GlcNAc constitutes key carbohydrate modules of glycosaminoglycans like heparan sulfates. This suggests the potential use of the multivalent 6-*O*-sulfo-GlcNAc as artificial cell matrixes for cell culturing and tissue engineering. Moreover, extensive studies have evidenced a triggering role of the glycosaminoglycans in transforming natural prion proteins into the scrapie prion (46). We speculate that the 6-*O*-sulfo-GlcNAc and the multivalent models will provide a useful basis to the drugs and materials design.

We proposed the carbohydrate module approach as a novel methodology for mimicking cell surface oligosaccharides and assembling their multivalent models. Thereafter, we recognized that the synthetic methodology enables us to elucidate key carbohydrate-protein interactions and disclose high biological potential in simple sugars and sugar mimics. Though our modular approach is based on radical copolymerization, a similar approach has been undertaken with alternative assembling methods. For example, Patel and Lindhorst used their sugar-based dendrimers for the assembly of different sugars, while Pochechueva and Bovin *et al.* used polyacrylic acid as the template (47, 48). John and Nagi *et al.* used nano-spheres for the assembly of α -L-fucose and sulfate groups to prepare potent P-selectin ligands (49). Palmacci and Seeberger undertook their modular approach to heparan sulfates (50). Though they are discriminated from each other and also from ours, they seem to be based on a common concept of carbohydrate modules useful for simple and effective design of cell surface oligosaccharide mimics.

6-*O*-スルホ GlcNAc を持つ糖鎖高分子がこのように高い活性を示すことは、6-*O*-スルホ GlcNAc と Neu5Ac の構造的ホモロジーを考慮すれば驚くことではない(図6)。すなわち、6-*O*-スルホ GlcNAc 骨格中の水酸基、*N*-アセチル基、そしてアニオン性官能基が Neu5Ac と似た立体化学構造を取っている。よって、本糖鎖高分子は 6-*O*-スルホ GlcNAc と Neu5Ac の結合部位を占有することができ、その結果 3-*O*-スルホ Lewis^x をクラスター状に有する糖鎖高分子よりも強い結合活性を示したのであろう。Schmidt らも最近の CMP-シアリルトランスフェラーゼに関する研究において、この GlcNAc と Neu5Ac の関係を利用した。WGA レクチンが GlcNAc と Neu5Ac の両糖鎖を認識することは周知の事実であるが、多彩そうに見えるこの認識も同様の方法で説明できる。

この 6-*O*-スルホ GlcNAc を持つ糖鎖高分子が注目値する活性を示したことにより、6-*O*-スルホ GlcNAc が高い生物学的ポテンシャルを有することが明らかとなった。我々は最近の研究で、Neu5Ac や Neu5Ac-2-en 構造に基づいたシアリダーゼ阻害剤の設計にむけた 6-*O*-スルホ GlcNAc のポテンシャルについて調べている(45)。さらに、硫酸化 GlcNAc はヘパラン硫酸のようなグリコサミノグリカンの鍵となる糖鎖モジュールである。このことは 6-*O*-スルホ GlcNAc の多価モデルが、細胞培養や組織工学に用いるための人工細胞マトリックスのような幅広い潜在的用途があることを示唆している。また数多くの研究によって、グリコサミノグリカンがプリオンタンパクからスクラピータンパクへの変化を誘発する役割を持つことが明らかになった(46)。我々は 6-*O*-スルホ GlcNAc とその多価モデルが、プリオン病に対する薬剤及び材料設計において有用な土台となることを検討している。

我々は、糖鎖モジュール化法を細胞表面オリゴ糖のミミック化及びその多価モデルの構築する新たな方法論として提唱した。それ以来、我々は化学合成法が糖鎖-タンパク質相互作用において鍵となる相互作用を決定する、そして高い生物学的潜在能力を有する単純な糖鎖もしくはそのミミックを解明する手助けとなると認識した。我々のモジュラーアプローチはラジカル共重合に基づいているが、類似のアプローチも別の構築法によって遂行されつつある。例えば、Patel と Lindhorst は糖鎖ベースのデンドリマーを異なる糖鎖の構築に用いているのに対して、Pochechueva と Bovin らはポリアクリル酸を鋳型に用いている(47,48)。Jhon と Nagi らはナノスフェアを α -L-フコシドと硫酸基の集積化に利用して有効な P-セレクトインリガンドを調製した(49)。Palmacci と Seeberger は彼らのモジュラーアプローチをヘパラン硫酸に対して行っている(50)。これらの研究は我々も含めて、独自に行われてきたが、単純で効果的な細胞表面糖鎖ミミックの設計に有用である糖鎖モジュール化法を共通の概念としているようだ。

E. Conclusion

We have described the biological potential of trehalose 1,1-linkages including the *galacto*-type of trehalose and sulfated sugars such as the 6-*O*-sulfo-GlcNAc. This means that the apparently complicated oligosaccharide structures can be replaced effectively with simple sugars and functional linkages. For elucidating the key structures and interactions, the concept of key carbohydrate modules and carbohydrate module method provide useful bases and methodologies. They will solve the complexity of cell matrix glycoproteins and glycolipids as well as their diverse biological functions.

E. おわりに

我々はここまで、ガラクト型糖鎖を含むトレハロース 1,1 結合糖鎖と、6-*O*-スルホ GlcNAc のような硫酸化糖の生物学的ポテンシャルについて述べてきたが、これは明らかに複雑な構造を持つオリゴ糖鎖が、もっと単純な糖鎖や機能的な結合へと効果的に置き換えることができることを意味する。鍵となる構造や相互作用を見出す際、鍵糖鎖モジュールの概念と糖鎖モジュール化法が有用な基礎と方法を与えてくれる。これらの方法は細胞マトリックス上の糖タンパクや糖脂質、そしてその多様化した生物学的機能の複雑さを解決していくであろう。

References

1. von Itzstein, M., Wu, W.-Y., Kok, G. B., Pegg, M. S., Dyason, J. C., Jin, B., Phan, T. V., Smythe, M. L., White, H. F., Oliver, S. W., Colman, P. M., Varghese, J. N., Ryan, D. M., Woods, J. M., Bethell, R. C., Hotham, V. J., Cameron, J. M., and Penn, C. R. (1993) *Nature* **363**, 418–423
2. Uzawa, H., Kamiya, S., Minoura, N., Dohi, H., Nishida, Y., Taguchi, K., Yokoyama, S.-I., Mori, H., Shimizu, T., and Kobayashi, K. (2002) *Biomacromolecules* **3**, 411–414
3. Miura, Y., Sasao, Y., Kamiyama, M., Sakaki, A., Iijima, S., and Kobayashi, K. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1673**, 131–138
4. Caravano, A., Mengin-Lecreux, D., Brondello, J.-M., Vincent, S. P., and Sinaÿ, P. (2003) *Chem. Eur. J.* **23**, 5888–5898
5. Palomo, C., Oiarbide, M., Landa, A., González-Rego, M. C., García, J. M., González, A., Odriozola, J. M., Martín-Pastor, M., and Linden, A. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 8637–8643
6. Wellner, E., Gustafsson, T., Bäcklund, J., Holmdahl, R., and Kihlberg, J. (2000) *Chem. Bio. Chem.* **1**, 272–280
7. Sinaÿ, P. (1997) *Pure & Appl. Chem.* **69**, 459–463
8. Du, Y., and Linhardt, R. J. (1998) *Tetrahedron* **54**, 9913–9959
9. Eisele, T., Toepfer, A., Kretzschmar, G., and Schmidt, R. R. (1996) *Tetrahedron Lett.* **37**, 1389–1392
10. Rich, J. R., and Bundle, D. R. (2004) *Org. Lett.* **6**, 897–900
11. Rye, C. S., and Withers, S. G. (2004) *Carbohydr. Res.* **339**, 699–703
12. Burkart, M. D., Vincent, S. P., Düffels, A., Murray, B. W., Ley, S. V., and Wong, C.-H. (2000) *Bioorg. Med. Chem.* **8**, 1937–1946
13. Murray, B. W., Wittmann, V., Burkart, M. D., Hung, S.-C., and Wong, C.-H. (1997) *Biochemistry* **36**, 823–831
14. Graves, B. J., Crowther, R. L., Chandran, C., Rumberger, J. M., Li, S., Huang, K.-S., Presky, D. H., Familletti, P. C., Wolitzky, B. A., and Burns, D. K. (1994) *Nature* **367**, 532–538
15. Simanek, E. E., McGarvey, G. J., Jablonowski, J. A., and Wong, C.-H. (1998) *Chem. Rev.* **98**, 833–862
16. Wong, C.-H., Moris-Varas, F., Hung, S.-C., Marron, T. G., Lin, C.-C., Gong, K. W., and Weitz-Schmidt, G. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 8152–8158
17. Ikami, T., Kakigami, T., Baba, K., Hamajima, H., Jomori, T., Usui, T., Suzuki, Y., Tanaka, H., Ishida, H., Hasegawa, A., and Kiso, M. (1998) *J. Carbohydr. Chem.* **17**, 453–470
18. Sasaki, K., Nishida, Y., Tsurumi, T., Uzawa, H., Kondo, H., and Kobayashi, K. (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 4463–4467
19. Fukunaga, K., Tsukida, T., Moriyama, H., and Kondo, H. (2001) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 2365–2367
20. Maruta, K., Nakada, T., Kubota, M., Chaen, H., and Sugimoto, T. (1995) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 1829–1834
21. Tanaka, M., Machida, Y., Niu, S., Ikeda, T., Jana, N. R., Doi, H., Kurosawa, M., Nekooki, M., and Nukina, N. (2004) *Nat. Med.* **10**, 148–154
22. Dolak, L. A., Castle, T. M., and Laborde, A. L. (1980) *J. Antibiot.* **33**, 690–694
23. Wessel, H. P., Tschopp, T. B., Hosang, M., and Iberg, N. (1994) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **4**, 1419–1422
24. Hiruma, K., Kajimoto, T., Weitz-Schmidt, G., Ollmann, I., and Wong, C.-H. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 9265–9270
25. Nishida, Y., Dohi, H., Uzawa, H., and Kobayashi, K. (1998) *Tetrahedron Lett.* **39**, 8681–8684
26. Dohi, H., Nishida, Y., Mizuno, M., Shinkai, M., Kobayashi, T., Takeda, T., Uzawa, H., and Kobayashi, K. (1999) *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 2053–2062
27. Matsuoka, K., Terabatake, M., Esumi, Y., Terunuma, D., and Kuzuhara, H. (1999) *Tetrahedron Lett.* **40**, 7839–7842
28. Watanabe, M., Matsuoka, K., Kita, E., Igai, K., Higashi, N., Miyagawa, A., Watanabe, T., Yanoshita, R., Samejima, Y., Terunuma, D., Natori, Y., and Nishikawa, K. (2004) *J. Infect. Dis.* **189**, 360–368
29. Kitov, P. I., Sadowska, J. M., Mulvey, G., Armstrong, G. D., Ling, H., Pannu, N. S., Read, R. J., and Bundle, D. R. (2000) *Nature* **403**, 669–672
30. Dohi, H., Nishida, Y., Tanaka, H., and Kobayashi, K. (2002) *Synlett.* **39**, 8681–8684
31. Hashimoto, S.-I., Sakamoto, H., Honda, T., Abe, H., Nakamura, S.-I., and Ikegami, S. (1997) *Tetrahedron Lett.* **38**, 8969–8972
32. Nicolaou, K. C., Caulfield, T. J., and Kataoka, H. (1990) *Carbohydr. Res.* **202**, 177–191
33. Koizumi, S., Endo, T., Tabata, K., and Ozaki, A. (1998) *Nat. Biotechnol.* **16**, 847–850
34. Liu, M.-Z., Fan, H.-N., Lee, Y. C. (2001) *Biochimie* **83**, 693–698
35. Dohi, H., Nishida, Y., Furuta, Y., Uzawa, H., Yokoyama, S.-I., Ito, S., Mori, H., and Kobayashi, K. (2002) *Org. Lett.* **4**, 355–357
36. Nishida, Y., Wiemann, T., and Thiem, J. (1992) *Tetrahedron Lett.* **33**, 8043–8046
37. Nishida, Y., Tamakoshi, H., Kitagawa, Y., Kobayashi, K., and Thiem, J. (2000) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **39**, 2000–2003
38. Nishida, Y., Tamakoshi, H., Kobayashi, K., and Thiem, J. (2001) *Org. Lett.* **3**, 1–3
39. Pratt, M. R., Leigh, C. D., and Bertozzi, C. R. (2003) *Org. Lett.* **5**, 3185–3188

40. Chaen, H., Nakada, T., Murai, N., Nishimoto, T., Fukuda, S., Sugimoto, T., Kurimoto, M., and Tsujisaka, Y. (2001) *J. Appl. Glycosci.* **48**, 135–137
41. Miura, Y., Wada, N., Nishida, Y., Mori, H., and Kobayashi, K. (2004) *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **42**, 4598–4606
42. Hiruma, K., Kanie, O., and Wong, C.-H. (1998) *Tetrahedron* **54**, 15781–15792
43. Nishida, Y., Uzawa, H., Toba, T., Sasaki, K., Kondo, H., and Kobayashi, K. (2000) *Biomacromolecules* **1**, 68–74
44. Schwörer, R., and Schmidt, R. R. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 1632–1637
45. Sasaki, K., Nishida, Y., Uzawa, H., and Kobayashi, K. (2003) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 2821–2823
46. Pan, K.-M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E., and Prusiner, S. B. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10962–10966
47. Patel, A., and Lindhorst, T. K. (2001) *J. Org. Chem.* **66**, 2674–2680
48. Pochechueva, T. V., Galanina, O. E., Bird, M. I., Nifantiev, N. E., and Bovin, N. V. (2002) *Chem. Biol.* **9**, 757–762
49. John, A. E., Lukacs, N. W., Berlin, A. A., Palecanda, A., Bargatze, R. F., Stoolman, L. M., and Nagy, J. O. (2003) *FASEB J.* **17**, 2296–2298
50. Palmacci, E. R., and Seeberger, P. H. (2004) *Tetrahedron* **60**, 7755–7766

Received on October 30, 2004, accepted on December 27, 2004

Profile of the Authors

Yoshihiro Nishida is Associate Professor in the Dept. Molecular Design and Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya University. He obtained his PhD in 1985 from the Faculty of Agriculture of Tohoku University and moved to RIKEN for one year while serving at Tohoku University. He joined a fellowship program by AvH at the Institute of Organic Chemistry of the University of Hamburg (Prof. Hans Paulsen and Joachim Thiem, 1991–1992) and then moved to Nagoya University in 1996. He is at present in the field of glyco-engineering, synthetic glycoconjugates, and the “sugar-based” drug and biomaterial design.

★★★★★★★★

Hirofumi Dohi received his B. Sc. (1997) and Ph. D. (2002) from the Graduate School of Engineering, Nagoya University, under the direction of Prof. Kazukiyo Kobayashi. After spending half a year at the same laboratory as a research associate, he joined Prof. Pierre Sinäy's group at Ecole Normale Supérieure as a Postdoctoral Fellow and studied synthesis and evaluation of novel glycosyltransferase inhibitors for two years. From 2003, he has been a fellow of JSPS and is now working at Prof. Hisanori Shinohara's laboratory at Nagoya University. His main research interests are design and synthesis of bioactive carbohydrate derivatives and development of new methodologies for carbohydrate synthesis.

★★★★★★★★

Kazukiyo Kobayashi is professor of the Dept. of Molecular Design and Dept. of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Nagoya University. He received his PhD from the Graduate School of Engineering, Osaka University in 1969, then worked at the School of Agriculture, Nagoya University, and moved to his present position in 1996. He has been engaged in an interdisciplinary field including polymer science and glycoscience since 1974. His interest is in artificial glycoconjugate polymers: polymeric and supramolecular materials expressing biological functions of carbohydrates, especially via glycocluster or multivalent effects.