Substrate Recognition by Sugar Chain-Related Enzymes: Recognition of a Large Area of Substrates and Its Strictness and Tolerance

糖鎖関連酵素の基質認識 —基質の広い領域の認識とその厳密性、寛容性—

Ishimizu, Takeshi ; Hase, Sumihiro

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University

Machikaneyamacho 1-1, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan

FAX: 81-6-6850-5383, E-mail: txi@chem.sci.osaka-u.ac.jp

Key Words: *substrate recognition, glycosidase, glycosyltransferase, sugar chain, pyridylamination*

Abstract

Analysis of the substrate specificity of some sugar chain-related enzymes using homogeneous sugar chains (mainly fluorescently labeled sugar chains) can reveal the *in vivo* substrate of the enzyme. Such analyses have shown that these enzymes have the ability to recognize not only the sites of hydrolysis or glycosyl transfer but also other regions far apart from them. They can recognize a region consisting of pentasaccharides, hexasaccharides and, in some cases, decasaccharides or larger saccharides. The enzymes recognize part of the substrate strictly, and another part of it tolerantly. These analyses have also identified pairs of enzymes with substrate specificities that are complementary to each other. Here we describe some sugar chain-related enzymes with these properties. The biological significance of the recognition of a large substrate area and its strictness and tolerance will be discussed.

要 約

化学的に均一な糖鎖(主に蛍光ラベルされた糖鎖)を用いたいくつかの糖鎖関連酵素の基質特異性解析は、酵素の生体内での基質を明らかにする。その解析により、酵素が加水分解部位あるいは糖転移部位のみならず、その部位からかなり離れた基質部分も認識する場合のあることが明らかになってきた。5糖、6糖、場合によっては10糖以上の単位で糖鎖を認識し、ある部分は厳密に、ある部分はあいまいに認識している。また基質特異性が相補的な酵素の組み合わせがあることも明らかになってきた。これらの一例を記述し、糖鎖関連酵素の厳密なそして寛容な広い領域の基質認識の生物学的意義について議論したい。

A. Introduction

Glycosidases and glycosyltransferases involved in the degradation and biosynthesis of sugar chains have long been studied, and enzymes bearing novel substrate specificities continue to be discovered today. The glycosidases and glycosyltransferases are named according to their specificity for sites of hydrolysis and glycosyl transfer, respectively, on the substrate. They are systematically categorized by an EC number (based on their substrate specificity) (1) or a CAZY number (based on their structure) (2). During the analysis of these enzymes, the following experiments are often carried out: construction of an assay method; extraction and purification of the enzyme from living cells; analysis of substrate specificity; molecular cloning of the corresponding gene; tertiary structural analysis; and functional analysis using a knockout mutant. Of these experiments, analysis of substrate specificity characterizes the enzymes and provides important information on their biological significance.

For the assay of sugar chain-related enzymes, substrates reflecting the names of enzymes are usually used.

A. はじめに

糖鎖の分解、生合成に関わる糖加水分解酵素、糖転移酵素は古くから研究され、現在もこれまでに知られていなかった基質特異性をもつ酵素が発見され続けている。糖加水分解酵素、糖転移酵素の名称は加水分解部位あるいは糖転移部位の基質特異性を反映したものになっている。それらはEC番号(基質特異性に基づく)(1)やCAZY番号(構造情報に基づく)(2)によって系統的に分類されている。研究手法として、活性測定法の確立、生体試料からの抽出・精製、基質特異性解析、遺伝子クローニング、立体構造解析、対応遺伝子の発現打破変異体の機能解析などが行われる。中でも酵素の基質特異性は、その酵素を特徴づけると共に、生物学的意味を探る上で重要な情報となる。

糖鎖関連酵素の活性測定の基質には、その酵素の名称を反映するようなものが用いられる。実際には、基質調製や生成

Simple substrates that differ from the native substrates of the enzymes are often used in practice, in order to facilitate easy preparation of the substrates and analysis of the products. For the assay of exo-type glycosidases, for example, *p*-nitrophenyl derivatives of monosaccharides are often used as substrates. Similarly, heterogeneous polysaccharides are generally used as substrates for the assay of endo-type glycosidases. In addition, derivatives of monosaccharides or disaccharides that retain the structure of the site of glycosyl transfer are often used for the assay of glycosyltransferases. Although analyses using such substrates are convenient and quick, the substrates do not always reflect the *in vivo* substrates of the enzymes. Analyses with such substrates cannot satisfy an analysis of the substrate specificity of an enzyme. Instead, it is necessary to prepare homogeneous sugar chains, which are considered to be the *in vivo* substrates of the enzymes. Analysis of substrate specificity using homogeneous sugar chains can specify the true substrates of an enzyme in a cell and can also provide

産物の解析の簡便さが求められるため、生体内での基質の構造とは離れた比較的簡単な構造のものが用いられる。例えば、エキソ型の糖加水分解酵素では、対応する単糖のパラニトロフェニル誘導体がよく用いられる。エンド型の糖加水分解酵素では、基質の構造が不均一な多糖が用いられることが多い。糖転移酵素の場合、ターゲットにしている糖転移部位の構造を保持した単糖や二糖の誘導体が用いられていることが多い。これらの基質を用いた活性測定は、簡便さや迅速性は備えられるが、必ずしも生体内での基質を反映しているとは限らず、酵素の基質特異性解析の観点からは、不十分である。基質特異性を解析するには、実際の生体内での基質と考えられる、化学的に均一な一連の糖鎖を揃える必要がある。それらの一連の糖鎖を用いた基質特異性解析は、生体内での酵素の基質を特定することにつながり、簡便な基質を用いた解析では明

Fig. 1. Structures and abbreviations of sugar chains used in this article.

information about the function of sugar chain-related enzymes and/or sugar chains. Their functions cannot be predicted from analyses using simple substrates.

In this review, first we outline the methods for preparing homogeneous sugar chains for the analysis of substrate specificity. Then, we describe analysis of the substrate specificity of some sugar chain-related enzymes. This type of analysis has shown that the enzymes act on a large area of their substrates and that they recognize a part of the substrate strictly and another part of it tolerantly.

The structures and abbreviations of the sugar chains described in this article are listed in Fig. 1.

B. Preparation of Sugar Chains as Substrates

B-1. Preparation of Glycopeptides

One method for preparing homogeneous sugar chains used for the analysis of substrate specificity is chemical synthesis. Several *N*-linked sugar chains have been successfully chemically synthesized. One of the reasons for this success has been the establishment of a synthetic method (including enzymatic synthesis) for β -mannoside (3), for which stereochemical control is difficult to achieve during chemical synthesis. Homogeneous glycopeptides are required for analysis of the substrate specificity of the sugar chain-related enzymes that act on glycoproteins. Glycopeptides derived from natural glycoproteins are normally structurally heterogeneous. Because a separation method for natural glycopeptides has not been established, a chemical synthetic method has proved especially effective for the preparation of homogeneous glycopeptides.

Glycopeptides have been recently synthesized by solid-phase synthesis using glycosylated amino acids (4, 5). Deacetylation of a glycopeptide in which the hydroxyl groups are blocked with acetyl groups can be conducted under alkaline conditions, but the deacetylation step is accompanied by β -elimination of *O*-linked sugar chains, epimerization of the α -carbon of the amino acid, and transfer of the acetyl group to the α -amino group of the terminal amino acid of a polypeptide on the solid-phase. However, solid-phase synthesis of glycopeptides has been accomplished by using glycosylated amino acids whose hydroxyl groups are blocked with benzyl groups, and by subsequently debenzylating either with catalytic hydrogenation (6) or under low acidic conditions (7, 8). Solid-phase synthesis of glycopeptides using Fmoc amino acid attached sugar chains in which the hydroxyl groups are free has been accomplished by incorporating a mild coupling method using pentafluorophenylester (9-12) or benzotriazolylester (13-16). By this method, glycopeptides consisting of more than 40 amino acid residues have been synthesized (15, 16), and preparation of glycopeptides by the Fmoc method has been put to practical use.

らかにならなかった糖鎖関連酵素および糖鎖の生体内での機能についての情報をもたらす。

本稿ではまず、糖鎖関連酵素の基質特異性解析に用いる均一な糖鎖の調製法について概説する。次いで、糖鎖関連酵素の基質特異性解析の例を紹介する。それらの解析により、いくつかの糖鎖関連酵素が基質の広い領域に作用し、ある部分は厳密に、ある部分は寛容に認識していることが明らかになってきた。

なお、本稿中で用いる糖鎖構造の略号とそれらに対応する構造を図1に示す。

B. 糖鎖基質の調製

B-1. 糖ペプチド基質の調製

糖鎖関連酵素の基質特異性解析に用いる均一な糖鎖基質の調製法の一つは化学合成によるものである。*N*-配糖体糖鎖を例に挙げると、合成時の立体化学制御が困難な β -マンノシル結合の実際的な合成手法(酵素的方法も含めて)(3)が考案されたこともあり、多くの*N*-配糖体糖鎖の合成が可能になってきている。糖タンパク質に作用する糖鎖関連酵素の基質特異性研究では、均一な糖ペプチドを必要とする場合がある。天然の糖タンパク質由来の糖ペプチドは、通常は糖鎖部分の構造に不均一性がある。それらの糖ペプチドの分離法が確立されていないため、糖ペプチドの調製は、化学合成による方法が特に有効である。

近年、糖アミノ酸を用いた固相合成によって、糖ペプチドの合成が行われるようになってきた(4,5)。糖の水酸基がアセチル基で保護された糖ペプチドの脱アセチル化は塩基性条件下で行われるが、*O*-配糖体の β -脱離、アミノ酸 α 炭素上でのエピメリ化、固相上のポリペプチド鎖の末端の α -アミノ基へのアセチル基の転移が伴う。しかし、糖の水酸基をベンジル基で保護した糖アミノ酸をビルディングブロックとして用い、脱ベンジルの際、接触水素化(6)あるいは低酸性条件下(7,8)で行うことで、糖ペプチドの固相合成が達成された。また水酸基が保護されていない糖を結合したFmocアミノ酸を用いた固相合成は、ペンタフルオロフェニルエステル(9-12)あるいはベンゾトリアゾリルエステル(13-16)を用いた穏やかなカップリング法を用いることで達成されている。この方法によるとアミノ酸40残基以上からなる糖ペプチドの合成も可能で(15,16)、Fmoc法による糖ペプチドの合成が実用的なものとなってきている。

Using the transglycosylation activity of endo- β -*N*-acetylglucosaminidase from *Mucor hiemalis* (Endo-M), complex or high-mannose type sugar chains can be introduced to glycopeptides bearing *N*-acetylglucosamine at an asparagine residue (17). A homogeneous complex-type sugar chain attached to asparagine has been prepared from a natural source at the 100-mg scale (18). Using this glycosylated amino acid, a glycopeptide bearing sialic acid, which is labile under acidic conditions, has been synthesized by this method (19). Furthermore, the glycosylated amino acid has been digested by exoglycosidases to obtain a dozen homogeneous complex-type sugar chains attached to asparagine, and their corresponding glycopeptides have also been synthesized (20, 21).

The synthetic glycopeptides have been used for studying the glycosyltransferases involved in the synthesis of sugar chains attached to a specific peptide. For example, the EGF-like domains of serum proteins such as blood coagulation factors contain the specific sugar chain, Xyl α 1-3Xyl α 1-3Glc β , at a serine residue in the consensus sequence (22). The synthetic EGF-like domains in which Glc or Xyl α 1-3Glc is attached at a serine residue (15, 16) are useful for analyzing the substrate specificity of the xylosyltransferases involved in biosynthesis of this sugar chain.

In summary, glycopeptides can be chemically synthesized in principle; however, procedures such as protection and deprotection are complicated, and it is still laborious work to prepare the many glycopeptides required for analyzing the substrate specificity of an enzyme.

B-2. Separation and Preparation of Pyridylaminated Sugar Chains as Substrates

A second method of obtaining homogeneous sugar chains to use as substrates is to prepare them from natural resources. In this approach, the sugar chains are prepared as their pyridylamino derivatives because these derivatives are well resolved by HPLC, especially reversed-phase HPLC. Sugar chains are liberated from glycoproteins by hydrazinolysis, and then the reducing ends of the sugar chains are pyridylaminated by reductive amination (23). If necessary, these sugar chains can be hydrolyzed by using exoglycosidases with known substrate specificities to obtain the targeted sugar chains. Most pyridylaminated sugar chains can be separated by normal phase (size fractionation) and reversed-phase HPLC, and dozens of homogeneous sugar chains can be prepared at a time. As methods for pyridylation of sugar chains have been reviewed elsewhere (24, 25), below we describe practical methods for preparing pyridylaminated sugar chains as substrates for enzyme assay and for separating pyridylaminated sugar chains on HPLC.

To obtain a homogeneous sugar chain, it is convenient to use easily obtainable glycoproteins that bear the targeted

また *Mucor hiemalis* 由来のエンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (Endo-M) のトランスグリコシレーション活性を用いて、*N*-アセチルグルコサミンをもつ糖ペプチドにコンプレックス型糖鎖やハイマンノース型糖鎖を導入することができる (17)。天然から 100 mg スケールでアスパラギンに結合したシアル酸含有コンプレックス型糖鎖を調製し (18)、それを用いて酸に不安定なシアル酸を含む糖ペプチドもこの方法により合成された (19)。またそのように調製されたコンプレックス型糖鎖をエキソグリコシダーゼで処理し、十数種類の糖鎖を得て、それぞれに対応する糖ペプチドの合成が達成されている (20, 21)。

これらの合成糖ペプチドは、ある特異な構造のペプチド上に結合した糖の生合成に関わる糖転移酵素の基質特異性研究に用いることができる。例えば、血液凝固因子などの血清タンパク質の EGF 様ドメインのコンセンサス配列上のセリン残基に特異的に Xyl α 1-3Xyl α 1-3Glc β という糖鎖が結合している (22)。合成された Glc あるいは Xyl α 1-3Glc が特定のセリン残基に結合した EGF 様ドメイン (15, 16) は、この糖鎖の生合成に関与するキシロース転移酵素の基質特異性解析に有用である。

このように、糖ペプチドは原理的には化学合成されるようになってきたが、保護・脱保護のプロセス等、操作が煩雑であり、酵素の基質特異性解析で必要とされる一連の数種の糖ペプチドを一度に調製するのは、まだ困難な仕事である。

B-2. ピリジルアミノ化糖鎖基質の分離と調製

均一な糖鎖基質の調製のもう一つの有効な方法は、生物試料から糖鎖を得ることである。逆相 HPLC 上での分離が特に優れていることから、ピリジルアミノ化誘導体として糖鎖を調製する。糖タンパク質からヒドラジン分解により糖鎖部分を切り出し、次いで糖鎖の還元末端を還元アミノ化反応によりピリジルアミノ化する (23)。必要に応じて、基質特異性が明らかなエキソ型グリコシダーゼを用いて加水分解し、目的の糖鎖を得る。ほとんどのピリジルアミノ化糖鎖は順相 (サイズ分画) HPLC および逆相 HPLC により分離され、複数種類の均一な糖鎖を一度に調製できる。糖鎖のピリジルアミノ化についてはこれまでに解説がなされているので、そちらを参照されたい (24, 25)。ここでは、酵素基質としてのピリジルアミノ化糖鎖の調製の実際とその HPLC における分離について触れる。

均一な糖鎖を得るためには、調製しやすく、欲しい糖鎖を主に持っている糖タンパク質があると都合がいい。これら

Fig. 3. Processing pathway of high-mannose type sugar chains by the co-operative action of ER α -mannosidase I and Golgi α -mannosidases IA and IB. Circles and squares represent mannose and *N*-acetylglucosamine residues, respectively.

(35). Three isomers of M8 high-mannose type sugar chains can be separated by reversed-phase HPLC within 20 min (35). This separation of M8 isomers has been applied to analyze the substrate specificity of ER and Golgi α -mannosidases. Removal of mannose from M9A by the ER α -mannosidase I leads to the isomer M8A (39), which in turn is the most favorable substrate for the Golgi α -mannosidases IA and IB (40) (Fig. 3), meaning that the substrate specificities of these α -mannosidases are complementary to each other. The Golgi α -mannosidases IA and IB hydrolyze the α -1,2-mannoside linkages of M8A to give M5A as an end product (40).

Even if multiple products are produced from a homogeneous substrate by an enzyme, the products can be identified from their retention time of HPLC. For example, the *N*-acetylglucosaminyltransferases III, IV, and V transfer *N*-acetylglucosamine to the mannose residues of the sugar chain, Bi; but each transferase produces a different isomer. These isomers can be separated by reversed-phase HPLC; thus, each enzyme can be identified from product analysis (41).

C. Sugar Chain-Related Enzymes Which Recognize a Large Area of the Substrates

C-1. Cytosolic α -Mannosidase

Cytosolic α -mannosidase has been purified from Japanese quail oviduct, rat liver, bovine liver, hen oviduct, and ginkgo seed (42–46). It acts on high-mannose type sugar chains and hydrolyzes α -mannosyl linkages one by one from the non-reducing ends of the sugar chains. The enzyme is activated by a Co^{2+} ion, which changes its substrate specificity (47). In the case of cytosolic α -mannosidases from mammals, the non-activated enzyme hydrolyzes M9A to produce M8C, whereas the Co^{2+} ion-activated enzyme hydrolyzes four α -mannoside linkages of $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}6(\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}3)\text{Man}\alpha$ in M9A one by one to produce M5B as an end product (48) (Fig. 4). This hydrolysis does not depend

utilizing small bodies and Golgi α -mannosidase's substrate specificity was analyzed. Small body α -mannosidase I by M9A from mannose trimming M8A via (39), so M8A Golgi α -mannosidase IA or IB is also a good substrate (40) (Fig. 3). This shows that the substrate specificity of these mannosidases is complementary. And Golgi α -mannosidase IA or IB is M8A's α -1,2-mannoside linkage hydrolyzed by water, and finally produces M5A (40).

また、均一な基質を用いても酵素反応生成物が複数ある場合があるが、HPLCでの保持時間から生成物の同定が行える。例えば、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 III、IV、V は、Bi のマンノース残基に *N*-アセチルグルコサミンを転移し、各酵素は生成物として異なる異性体を与える。それら異性体は逆相 HPLC により分離でき、生成物の解析から酵素の同定を行える (41)。

C. 基質の広い領域を認識する糖鎖関連酵素

C-1. 細胞質 α -マンノシダーゼ

細胞質 α -マンノシダーゼはウズラ輸卵管、ラット肝臓、ウシ肝臓、ニワトリ輸卵管、イチヨウ種子などから精製されている (42–46)。ハイマンノース型糖鎖に作用し、非還元末端から一残基ずつマンノースを切断していく。 Co^{2+} イオン存在下で酵素は活性化されるとともに、基質特異性も変化する (47)。動物由来のものでは、 Co^{2+} イオンによる活性化前は M9A' から M8C' を生成し、 Co^{2+} イオンによる活性化後は M9A' の $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}6(\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}3)\text{Man}\alpha$ 部分の 4 つの α -マンノシド結合を一残基ずつ加水分解し、最終産物として M5B' を生成する (48) (図 4)。この加水分解は結合位置によらず (α -1,2、 α -1,3、 α -1,6 結合が加水分解される)、この酵素の基質特異性

Fig. 4. Processing pathway of high-mannose type sugar chains by the co-operative action of endo- β -N-acetylglucosaminidase and cytosolic α -mannosidase. Circles and squares represent mannose and N-acetylglucosamine residues, respectively. The bold line represents protein.

on the exact linkage positions (*i.e.* the α 1-2, α 1-3, and α 1-6 linkages are hydrolyzed), showing that this enzyme has tolerant substrate specificity. By contrast, the other linkages are hardly hydrolyzed, showing that this enzyme also has strict substrate specificity.

Cytosolic α -mannosidase also recognizes the reducing end of sugar chains: the bulkier the structure of the reducing end of sugar chain is, the lower its hydrolysis rate is (48). The hydrolysis rate against sugar chains bearing one GlcNAc residue at the reducing end is 4 to 16 times higher than that against sugar chains bearing N,N' -diacetylchitobiose. Thus, cytosolic α -mannosidase recognizes a large area of substrates including both the reducing end and the non-reducing end of M9A'. Sugar chains bearing one GlcNAc residue at their reducing end, which are good substrates of this enzyme, are generated by the action of endo- β -N-acetylglucosaminidase on glycoproteins. Therefore, cytosolic α -mannosidase and endo- β -N-acetylglucosaminidase, which is also located in cytosol (49), are considered to cooperatively hydrolyze the high-mannose type sugar chains of glycoproteins to accumulate M5B in the cytosol (50-53).

C-2. Endo- β -N-Acetylglucosaminidase

Endo- β -N-acetylglucosaminidase hydrolyzes the glycosyl bond in N,N' -diacetylchitobiose of N-linked sugar chains and liberates sugar chains from glycoproteins. The substrate specificity of this enzyme has been investigated using dansylated asparagine-linked and pyridylaminated sugar chains. Most enzymes discriminate high-mannose, hybrid, and complex type sugar chains, and recognize a large area of the substrate, including the sites of hydrolysis and the non-reducing ends of the sugar chains.

Endo- β -N-acetylglucosaminidases from *Aspergillus oryzae* and *Streptomyces griseus* (Endo-H) hydrolyze high-mannose and hybrid type sugar chains (54, 55). Each enzyme from *Flavobacterium meningosepticum* (Endo-F₁, F₂, F₃) has a different substrate specificity. Endo-F₁ acts on high-

の寛容さを示している。一方、他の結合は切断されにくく、基質特異性の厳密さも兼ね備えている。

この酵素は還元末端の構造も認識し、還元末端が高くなるほど加水分解速度が低下する (48)。還元末端が GlcNAc 一残基の糖鎖に対する加水分解速度は GlcNAc 二残基の糖鎖に対するものに対して、4 ~ 16 倍活性が高い。すなわち、細胞質 α -マンノシダーゼは M9A' の還元末端部分、非還元末端部分の両方を含む広い範囲を認識している。この酵素の基質となる還元末端に GlcNAc を一残基のみもつ糖鎖は、糖タンパク質にエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼが作用することによって生成する。すなわち、細胞質 α -マンノシダーゼは、同じく細胞質に存在するエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (49) と協同で糖タンパク質のハイマンノース型糖鎖を加水分解し、最終産物の M5B' を細胞質に蓄積させると考えられる (50-53)。

C-2. エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ

エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼは N-配糖体の N,N' -ジアセチルキトビオース部分のグリコシド結合を加水分解し、糖タンパク質から糖鎖を遊離する酵素である。この酵素の基質特異性はダンシル化されたアスパラギンに結合した糖鎖あるいはピリジルアミノ化糖鎖を用いて調べられている。その多くはハイマンノース型、ハイブリッド型、コンプレックス型糖鎖を区別しており、加水分解部位のみならず、非還元末端も含めた基質の広い範囲を認識している。

Aspergillus oryzae, *Streptomyces griseus* 由来エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (Endo-H) はハイマンノース型、ハイブリッド型糖鎖を基質とする (54, 55)。 *Flavobacterium meningosepticum* に存在する 3 種類の酵素 (Endo-F₁, F₂, F₃) はそれぞれ異なる基質特異性を持ち、F₁ はハイマンノース型、ハイブリッド型糖鎖に、F₂ はハイマンノース型、バイアンテナ型糖鎖に、F₃ はバイアンテナ、トリアンテナ型糖鎖に作用する (56, 57)。

mannose and hybrid type sugar chains, endo-F₂ acts on high-mannose type and biantennary sugar chains, and endo-F₃ acts on biantennary and triantennary sugar chains (56, 57). The minimum structure of the substrates of endo-H and endo-F₁ is M3C (56). The enzymes from *Arthrobacter protophormiae* and *Clostridium perfringens* (Endo-A, C_{II}) hydrolyze high-mannose type sugar chains (58, 59). The enzyme from *Streptococcus pneumoniae* (Endo-D) recognizes high-mannose and hybrid type sugar chains, and its minimum recognition unit is M3B (60). This enzyme strictly discriminates between M5A and M6B, and acts on M5A but not M6B (60). Endo-C_I from *C. perfringens* has the same specificity (59). By contrast, the enzymes from plants (61-64) and hen oviduct (65) act preferentially on M6B rather than M5A, suggesting that these enzymes recognize the Man α 1-2Man α 1-3Man β structure. The enzyme from human saliva (Endo-HS) specifically hydrolyzes complex type sugar chains (66), whereas the enzyme from *Mucor hiemalis* (Endo-M) has wide substrate specificity and hydrolyzes high-mannose, hybrid, and complex type sugar chains (67, 68).

In summary, endo- β -N-acetylglucosaminidases have highly variable substrate specificity. All of the enzymes recognize a large area of the sugar chains. They recognize the hydrolysis site near the reducing ends of sugar chains strictly, but whereas they recognize the non-reducing ends of sugar chains with a tolerance that is characteristic of the enzyme.

C-3. Endo- β -mannosidase

Endo- β -mannosidase, which hydrolyzes the Man β 1-4GlcNAc linkage of N-linked sugar chains, was discovered in plant tissue (69). When Man α 1-6Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA (PA, pyridylamino group) was used as a substrate for the enzyme, Man α 1-6Man and GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA were produced. Unlike β -mannosidase and endo- β -mannanase, endo- β -mannosidase does not hydrolyze *p*-nitrophenyl β -mannoside and β 1,4-mannohexaose; therefore, this enzyme activity can be detected only by using N-linked sugar chains as substrates (69).

Endo- β -mannosidase can recognize not only the site of hydrolysis, namely the Man β linkage, but also the Man α 1-6Man β linkage and the 2-OH and 3-OH groups of Man β (69-71). The hydrolysis rate of the enzyme against glycopeptides has been found to be faster than that against the corresponding sugar chains, meaning that the enzyme has affinity for the peptide portion of glycopeptides (71). In other words, endo- β -mannosidase has the ability to recognize a large area of the substrate.

Endo- β -mannosidase does not act on the sugar chains bearing a Man α 1-3Man β linkage. This substrate specificity is therefore complementary to that of jack bean α -mannosidase, which hydrolyzes a Man α 1-3Man β linkage preferably to a Man α 1-6Man β linkage (36, 72, 73). Endo- β -mannosidase

Endo-H, F₁ の基質の最小単位は M3C である (56)。*Arthrobacter protophormiae*, *Clostridium perfringens* 由来酵素 (Endo-A, C_{II}) はハイマンノース型糖鎖を認識し、加水分解する (58, 59)。*Streptococcus pneumoniae* 由来エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (Endo-D) はハイマンノース型、ハイブリッド型糖鎖を認識し、必要最小単位は M3B である (60)。この酵素は M5A と M6B を厳密に区別し、M5A には作用するが、M6B には作用しない (60)。Endo-C_I でも同様の特異性が見られる (59)。逆に植物由来の酵素 (61-64) やニワトリ輸卵管由来の酵素 (65) は M5A よりも M6B に作用しやすい。すなわちこれらは Man α 1-2Man α 1-3Man β 部分を認識している。コンプレックス型糖鎖に特異的に働くヒト唾液由来エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (Endo-HS) (66) も知られている。*Mucor hiemalis* 由来酵素 (Endo-M) は広い基質特異性を有し、ハイマンノース型、ハイブリッド型、コンプレックス型のいずれにも働く (67, 68)。

これら一群のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼはその基質特異性に多様性があるが、いずれも基質の広い領域を認識している。そして、還元末端は厳密に、非還元末端はそれぞれの酵素に特有の寛容さを持って、基質を認識している。

C-3. エンド- β -マンノシダーゼ

N-配糖体の Man β 1-4GlcNAc 結合をエンド型で加水分解するエンド- β -マンノシダーゼが植物組織より見いだされた (69)。Man α 1-6Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA (PA: ピリジルアミノ基) を基質としたとき、Man α 1-6Man と GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA を生成する。本酵素は β -マンノシダーゼやエンド- β -マンナーゼとは異なり、パラニトロフェニル β -マンノシドに対しても β 1,4-マンノヘキサオースに対しても活性がなく、N-配糖体糖鎖を用いて初めて活性の検出が可能となった (69)。この酵素は加水分解部位の Man β 結合に加えて、Man α 1-6Man β および Man β の 2 位、3 位の水酸基を認識している (69-71)。また糖ペプチドに対する加水分解速度が対応する糖鎖に対するものより速いことから、酵素は糖ペプチドのペプチド部分に親和性がある (71)。すなわちエンド- β -マンノシダーゼも糖鎖の非還元末端から還元末端まで広い領域を認識している。

この酵素は Man α 1-3Man β 結合をもつ糖鎖には作用しない。この基質特異性は Man α 1-6Man β 結合よりも Man α 1-3Man β 結合によく作用する jack bean α -マンノシダーゼの基質特異性 (36, 72, 73) と相補的になっている。すなわち植物細胞中で、エ

Fig. 5. Processing pathway of high-mannose type sugar chains by the co-operative action of jack bean α -mannosidase-like enzyme and endo- β -mannosidase. Circles and squares represent mannose and N-acetylglucosamine residues, respectively. The bold line represents protein.

and jack bean α -mannosidase-like enzyme are considered to cooperatively hydrolyze high-mannose type sugar chains on glycoproteins in a plant cell to generate glycoproteins bearing chitobiose (70, 74) (Fig. 5). Endo- β -mannosidase has strict substrate specificity in that it does not hydrolyze the $\text{Man}\beta$ linkages of sugar chains bearing a $\text{Man}\alpha 1-3\text{Man}\beta$ linkage; however, it also has tolerant substrate specificity as it can hydrolyze the $\text{Man}\beta$ linkages of sugar chains that do not have the $\text{Man}\alpha 1-3\text{Man}\beta$ linkage.

C-4. Glycosyltransferases

Analysis of the substrate specificities of glycosyltransferases by using several homogeneous sugar chains has been rarely carried out. Of the glycosyltransferases that have been analyzed for substrate specificity, three enzymes that recognize a large area of the sugar chains are described below.

N-acetylglucosaminyltransferase V transfers N-acetylglucosamine to the $\text{Man}\alpha 1-6$ residue of the Bi sugar chain via a $\beta 1-6$ linkage. Its substrate specificity has been investigated using pyridylaminated sugar chains. The enzyme prefers Bi and Tri: the reaction rate against sugar chains bearing core fucose ($\text{Fuc}\alpha 1-6\text{GlcNAc}$) was found to be 20% lower than that against Bi and Tri (75). Thus, it seems that the structure of the reducing end of the sugar chain, in addition to the site of glycosyl transfer, influences enzyme activity.

エンド- β -マンノシダーゼと jack bean β -マンノシダーゼ様酵素が協同で働いて、糖タンパク質上のハイマンノース型糖鎖を加水分解し、最終産物としてキトビオースを持つタンパク質を生成すると考えられる(70,74)(図5)。エンド- β -マンノシダーゼも $\text{Man}\alpha 1-3\text{Man}\beta$ 結合をもつ糖鎖には作用しない厳密な特異性と $\text{Man}\alpha 1-3\text{Man}\beta$ 結合をもたない糖鎖であれば加水分解するというやわらかい特異性を有している。

C-4. 糖転移酵素

一連の均一な糖鎖基質を用いた糖転移酵素の基質特異性解析はあまり行われていない。基質特異性解析が行われた酵素のうち、糖鎖基質の広い領域を認識する3つの糖転移酵素について、以下に述べる。

N-アセチルグルコサミン転移酵素VはBiの $\text{Man}\alpha 1-6$ に $\beta 1-6$ 結合でN-アセチルグルコサミンを転移する酵素である。一連のピリジルアミノ化糖鎖で基質特異性が調べられ、BiやTriをよい基質とし、還元末端の GlcNAc に $\text{Fuc}\alpha 1-6$ が結合しているとその活性は20%ほど低下した(75)。糖転移される部位に加え、還元末端近傍の構造も酵素活性に影響を及ぼしていると考えられる。

The β 1,4-galactosyltransferase expressed in mouse brain, unlike the enzyme expressed in other organs, transfers galactose to the GlcNAc residue at the non-reducing end of Bi, BiF and BiB, but not BA-2 (76). BA-2 is a competitive inhibitor of this enzyme. These facts correspond to the fact that BA-1 and BA-2 are specifically expressed in brain tissues (77). The transfer activity against BiB is relatively low, showing that the bisecting GlcNAc affects the transfer reaction. This enzyme also recognizes sugar chains from their reducing end to their non-reducing end, although it is necessary to take into account the difference in the three-dimensional structures of the sugar chains.

The backbone of pectic polysaccharides in the plant cell wall is polygalacturonic acid, a homopolymer of α -1,4-linked galacturonic acid. The substrate specificity of polygalacturonic acid synthase (polygalacturonic acid: α 1-4galacturonosyltransferase) has been investigated using pyridylaminated oligogalacturonic acids, (GalUA)_n-PA (78). The transfer activity against shorter sugar chains, (GalUA)₅₋₁₀-PA, was found to be relatively low, whereas that against longer sugar chains, (GalUA)₁₁₋₁₄-PA, was relatively high. Of the substrates investigated, the best was found to be (GalUA)₁₄-PA. This enzyme also recognizes a wide area of the sugar chains, although the tertiary structure of each (GalUA)_n-PA is not known.

D. Concluding Remarks

Analysis of the substrate specificity of sugar chain-related enzymes using large sugar chains can identify the novel substrate specificity of an enzyme. This type of analysis can also elucidate the functions of the enzymes beyond the level of categorization of the enzymes by their substrate specificity. A detailed analysis of substrate specificity will be essential for functional glycobiology studies that aim to elucidate the function of sugar chains and their related enzymes *in vivo*, although practical examples of such analyses are still few. This analysis revealed that pairs of enzymes with complementary substrate specificities cooperatively hydrolyze the sugar chains. These pairs include ER α -mannosidase I and Golgi α -mannosidase I (Fig. 3), cytosolic α -mannosidase and endo- β -N-acetylglucosaminidase (Fig. 4), and endo- β -mannosidase and jack bean α -mannosidase-like enzyme (Fig. 5). The functional analysis of these pairs can be furthered by analyzing the localization of these enzymes in a cell and by biochemical analysis (*e.g.* each of these pairs may form a protein complex.).

Although analyses of substrate specificity using synthetic glycopeptides have been hardly carried out, they will also play a role in glycobiology. One of the target enzymes for these analyses is protein O-fucosyltransferase 1 (OFUT1), which transfers fucose to a consensus sequence in the EGF-

マウス脳に存在する β 1,4-ガラクトース転移酵素は、他の臓器に存在する酵素とは違い、Bi、BiF、BiB の非還元末端の GlcNAc にガラクトースを転移するが、BA-2 にはガラクトースを転移しない (76)。転移が見られない BA-2 は本酵素の競争阻害剤になる。このことは BA-1 および BA-2 が脳に特異的に存在する (77) という実験事実と一致する。BiB に対する転移活性は低く、バイセクティング GlcNAc が存在すると転移反応が抑えられる。これら各糖鎖の立体構造の違いを考慮に入れる必要があるが、本酵素も還元末端から非還元末端まで広い範囲を認識している。

植物細胞壁のペクチン主骨格はガラクトン酸が α 1-4 結合で連なったポリガラクトン酸からなっている。その合成を担うポリガラクトン酸合成酵素 (ポリガラクトン酸: α 1-4 ガラクトン酸転移酵素) についてポリジルアミノ化オリゴガラクトン酸、(GalUA)_n-PA、を用いて基質特異性が調べられている (78)。(GalUA)₅₋₁₀-PA の短い糖鎖に対する転移活性は比較的低く、より重合度の大きい (GalUA)₁₁₋₁₄-PA に対する活性が高い。調べた中では (GalUA)₁₄-PA をもっともよい基質とした。重合度が違う (GalUA)_n-PA の明確な三次元構造情報は無いが、この酵素は明らかに基質の広い範囲を認識している。

D. 終わりに

糖鎖関連酵素の基質特異性解析は、天然のものに近い大きな基質を用いることにより、新しい活性が見えてくる可能性がある。またそれは酵素を基質特異性によって分類するという次元を越えて、それぞれの酵素の生体内での役割解明に迫る。詳細な基質特異性解析はまだ例が少ないが、糖鎖や糖鎖関連酵素の生体内での意味づけを行う機能糖鎖生物学に欠かせないものになってくるであろう。基質特異性解明により、小胞体 α -マンノシダーゼ I とゴルジ α -マンノシダーゼ I (図 3)、細胞質 α -マンノシダーゼとエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (図 4)、エンド- β -マンノシダーゼと jack bean α -マンノシダーゼ様酵素 (図 5)、それぞれの組み合わせにおいて、基質特異性が相補的で、これらが協同で働き、糖鎖の加水分解が行われていることが明らかになった。これらの成果を元に、それぞれの組み合わせにおいての細胞内の局在や発現パターン、生化学的な解析 (タンパク質複合体を作っていることも考えられる) を通して、機能解明指向性の研究を進めていくことができる。

均一な合成糖ペプチドを用いた基質特異性解析はまだほとんど行われていないが、今後糖鎖生物学で重要な位置を占めてくると思われる。Notch の EGF 様ドメインのあるコンセンサス配列上に存在するフコースを転移する OFUT1 を例に

like domain of Notch. It has been reported that OFUT1 facilitates the folding of Notch (79), implying that OFUT1 has an affinity for Notch protein; however, its biochemical analysis has not yet been carried out. Current techniques permit synthesis of an EGF-like domain peptide with fucose attached, and future studies should aim to analyze the substrate specificity of OFUT1 using the EGF-like domain of Notch with or without fucose.

The crystal structure of a hen egg lysozyme and tri-*N*-acetylchitotriose complex has been solved, leading to the model structure of a lysozyme-hexa-*N*-acetylchitohexaose complex (80). Since then, it has been generally accepted that the sugar chain-related enzymes are associated with sugar chains such as hexasaccharides. However, data showing that these enzymes associate with hexasaccharides or larger saccharides has not been produced. In this article, we have described several sugar chain-related enzymes that recognize sugar chains such as hexasaccharides or decasaccharides. The enzymes recognize a large part of the primary structure of the sugar chains, however, data showing how wide an area of the enzyme is involved in substrate recognition are still lacking. With the current progress in structural biology, we hope that further tertiary structural analyses of the enzyme-sugar chain complexes will be carried out.

Analysis of the substrate specificity of sugar chain-related enzymes has also revealed that there are few enzymes that recognize only one substrate, but there are many enzymes that give one end product. As such, functional analysis of the end product in a cell must be carried out. The production of an end product is based on unique characteristics of the sugar chain-related enzymes, which recognize a part of the substrate strictly, and another part of the substrate tolerantly. Tolerant recognition of the sugar chain-related enzymes seems to be a strategy whereby enzymes respond to the microheterogeneity of sugar chains. It appears that this property of substrate recognition by the sugar chain-related enzymes symbolizes living organisms, which are also characterized by their strictness and tolerance. Functional analysis of the sugar chain-related enzymes and/or the sugar chains may provide insight into living organisms with strict and tolerant characters, a feature that has hardly been revealed by molecular biology.

挙げる。OFUT1 に基質の Notch タンパク質のフォールディングを助ける働きがあるという (79)。これは OFUT1 が Notch と親和性があることも意味しているが、生化学的な解析はなされていない。現在の技術ではフコースが結合した EGF 様ドメインの合成が可能になってきており、Notch 中の EGF 様ドメインあるいはフコースが結合した EGF 様ドメインを用いた OFUT1 の基質特異性解析が待たれる。

リゾチームとトリ *N*-アセチルキトトライオース複合体の結晶構造が解かれ、ヘキサ *N*-アセチルキトヘキサオースとの複合体のモデル構造が提出されて以来 (80)、糖鎖関連酵素が 6 糖程度の糖鎖と相互作用している、という考えが一般的に受け入れられている感がある。しかし実際に糖鎖関連酵素が 6 糖以上の糖鎖を認識していることを示すデータはほとんど蓄積されていない。本稿では複数の糖鎖関連酵素が 5、6 糖あるいは 10 糖の単位で糖鎖を区別して基質を認識していることを紹介した。糖鎖関連酵素が基質の一次構造上、広い領域を認識しているとは言っても、酵素あるいは糖鎖基質との複合体の立体構造情報が不足しており、酵素のどれくらいの領域が基質認識に関わっているか、示せるデータはほとんどない。現在の構造生物学の進捗に伴って、これらの立体構造解析が進むことが期待される。

基質特異性解析により、一基質しか認識しないというような糖鎖関連酵素は少ないが、一つの構造の最終産物を与える酵素がある、ことも明らかになってきた。その最終産物の機能解析が待たれる。これは、ある部分は厳密に認識し、ある部分の認識には寛容である、という糖鎖関連酵素のユニークな性質に基づく。ある部分の認識に寛容であるのは、糖鎖の不均一性にも対応するかのような糖鎖関連酵素の戦略であるようにも思える。糖鎖関連酵素の基質認識能は、堅さ、やわらかさを兼ね備える生物を象徴しているようであり、糖鎖の機能解析はこれまでに分子生物学によって示されることが少なかった生物らしさに迫るものになるかもしれない。

References

1. Enzyme Nomenclature 1992 of IUBMB. Academic Press, New York, 1992
2. Henrissat, B. (1991) *Biochem. J.* **280**, 309-316
3. Ito, Y., and Ohnishi, Y. (2001) In *Glycoscience: chemistry and chemical biology*. (Fraser-Reid, B.O., Tatsuta, K., and Thiem, J. eds.) Springer-Verlag, Berlin, pp. 1589-1619
4. Hojo, H., and Nakahara, Y. (2000) *Curr. Protein Pept. Sci.* **1**, 23-48
5. Nakahara, Y. (2003) *Trends Glycosci. Glycotech.* **15**, 257-273
6. Nakahara, Y., Nakahara, Y., and Ogawa, T. (1996) *Carbohydr. Res.* **292**, 71-81
7. Takano, Y., Habiro, M., Someya, M., Hojo, H., and Nakahara, Y. (2002) *Tetrahedron Lett.* **43**, 8395-8399
8. Hojo, H., Haginoya, E., Matsumoto, Y., Nakahara, Y., Nabeshima, K., Toole, B.P., and Watanabe, Y. (2003) *Tetrahedron Lett.* **44**, 2961-2964

9. Otvos, L.J., Urge, L., Hollosi, M., Wroblewski, K., Graczyk, G., Fasman, G.D., and Thurin, J. (1990) *Tetrahedron Lett.* **31**, 5889–5892
10. Reimer, K.B., Meldal, M., Kusumoto, S., Fukase, K., and Bock, K. (1993) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**, 925–932
11. Ichiiyanagi, T., Takatani, M., Sakamoto, K., Nakahara, Y., Ito, Y., Hojo, H., and Nakahara, Y. (2002) *Tetrahedron Lett.* **43**, 3297–3300
12. Xue, J., and Guo, Z. (2003) *J. Org. Chem.* **68**, 2713–2719
13. Seitz, O., and Wong, C.H. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 8766–8776
14. Gobbo, M., Biondi, L., Filira, F., Gennaro, R., Benincasa, M., Scolaro, B., and Rocchi, R. (2002) *J. Med. Chem.* **45**, 4494–4504
15. Takemura, T., Hojo, H., Nakahara, Y., Ishimizu, T., and Hase, S. (2004) *Org. Biomol. Chem.* **2**, 133–136
16. Kitamura, M., Hojo, H., Nakahara, Y., Ishimizu, T., and Hase, S. (2004) *Glycoconj. J.* **21**, 197–203
17. Mizuno, M., Haneda, K., Iguchi, R., Muramoto, I., Kawakami, T., Aimoto, S., Yamamoto, K., and Inazu, T. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 284–290
18. Seko, A., Koketsu, M., Nishizono, M., Enoki, Y., Ibrahim, H.R., Juneja, L.R., Kim, M., and Yamamoto, T. (1997) *Biochim. Biophys. Acta.* **1335**, 23–32
19. Yamamoto, N., Ohmori, Y., Sakakibara, T., Sasaki, K., Juneja, L.R., and Kajihara, Y. (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 2537–2540
20. Kajihara, Y., Suzuki, Y., Yamamoto, N., Sasaki, K., Sakakibara, T., and Juneja, L.R. (2004) *Chem. Eur. J.* **10**, 971–985
21. Kajihara, Y., Yamamoto, N., Miyazaki, T., and Sato, H. (2005) *Curr. Med. Chem.* **12**, 527–550
22. Hase, S., Nishimura, H., Kawabata, S., Iwanaga, S., and Ikenaka, T. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 1858–1861
23. Hase, S., Ikenaka, T., and Matsushima, Y. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **85**, 257–263
24. Hase, S. (1994) *Methods Enzymol.* **230**, 225–237
25. Natsuka, S., and Hase, S. (1998) *Methods Mol. Biol.* **76**, 101–113
26. Ohta, M., Hamako, J., Yamamoto, S., Hatta, H., Kim, M., Yamamoto, T., Oka, S., Mizouchi, T., and Matsuura, F. (1991) *Glycoconj. J.* **8**, 400–413
27. Tarutani, M., Norioka, N., Mega, T., Hase, S., and Ikenaka, T. (1993) *J. Biochem.* **113**, 677–682
28. Hase, S., Okawa, K., and Ikenaka, T. (1982) *J. Biochem.* **91**, 735–737
29. Yamaguchi, H., Ikenaka, T., and Matsushima, Y. (1971) *J. Biochem.* **70**, 587–594
30. Minobe, S., Nakajima, H., Itoh, N., Funakoshi, I., and Yamashina, I. (1979) *J. Biochem.* **86**, 1851–1854
31. Rice, K.G., Rao, N.B.N., and Lee, Y.C. (1990) *Anal. Biochem.* **181**, 249–258
32. Hase, S., Ikenaka, K., Mikoshiba, K., and Ikenaka, T. (1988) *J. Chromatogr.* **434**, 51–60
33. Yanagida, K., Ogawa, H., Omichi, K., and Hase, S. (1998) *J. Chromatogr. A.* **800**, 187–198
34. Tomiya, N., and Takahashi, N. (1998) *Anal. Biochem.* **264**, 204–210
35. Hase, S., Natuska, S., Oku, H., and Ikenaka, T. (1987) *Anal. Biochem.* **167**, 321–326
36. Oku, H., Hase, S., and Ikenaka, T. (1990) *Anal. Biochem.* **185**, 331–334
37. Dorland, L., van Halbeek, H., Vliegthart, J.F.G., Lis, H., and Sharon, N. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 7708–7711
38. Mutsaers, J.H.G.M., van Halbeek, H., Vliegthart, J.F.G., Iwase, H., Kato, Y., and Hotta, K. (1985) *Biochim. Biophys. Acta.* **843**, 123–12737.
39. Gonzalez, D.S., Karaveg, K., Vandersall-Narin, A.S., Lal, A., and Moremen, K.W. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 21375–21386
40. Lal, A., Pang, P., Kalelkar, S., Romero, P.A., Herscovics, A., and Moremen, K.W. (1998) *Glycobiology* **8**, 981–995
41. Nishikawa, A., Gu, J., Fujii, S., and Taniguchi, N. (1990) *Biochim. Biophys. Acta.* **1035**, 313–318
42. Oku, H., Hase, S., and Ikenaka, T. (1991) *J. Biochem.* **110**, 29–34
43. Grard, T., Saint-Pol, A., Haeuw, J.-F., Alonso, C., Wieruszkeski, J.-M., Strecker, G., and Michalski, J.-C. (1994) *Eur. J. Biochem.* **223**, 99–106
44. Kumano, M., Omichi, K., and Hase, S. (1996) *J. Biochem.* **119**, 991–997
45. Yamashiro, K., Itoh, H., Yamagishi, M., Natsuka, S., Mega, T., and Hase, S. (1997) *J. Biochem.* **122**, 1174–1181
46. Woo, K.K., Miyazaki, M., Hara, S., Kimura, M., and Kimura, Y. (2004) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 2547–2556
47. Yamagishi, M., Ishimizu, T., Natsuka, S., and Hase, S. (2002) *J. Biochem.* **132**, 253–256
48. Oku, H., and Hase, S. (1991) *J. Biochem.* **110**, 982–989
49. Suzuki, T., Kitajima, K., Inoue, S., and Inoue Y. (1995) *Glycoconj. J.* **12**, 183–193
50. Moore, S.E., and Spiro, R.G. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 12715–12721
51. Kmićek, D., Herman, V., Stroop, C.J.M., Michalski, J.-C., Mir, A.-M., Labiau, O., Verbert, A., and Cacan, R. (1995) *Glycobiology* **5**, 483–494
52. Iwai, K., Mega, T., and Hase, S. (1999) *J. Biochem.* **125**, 70–74
53. Ohashi, S., Iwai, K., Mega, T., and Hase, S. (1999) *J. Biochem.* **126**, 852–858
54. Tarentino, A.L., and Maley, F. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 811–817
55. Hitomi, J., Murakami, Y., Saitoh, F., Shigemitsu, N., and Yamaguchi, H. (1985) *J. Biochem.* **98**, 527–533
56. Trimble, R.B., and Trentino, A.L. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 1646–1651
57. Plummer, Jr., T.H., and Tarentino, A.L. (1991) *Glycobiology* **1**, 257–263
58. Takegawa, K., Nakoshi, M., Iwahara, S., Yamamoto, K., and Tochikura, T. (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 3107–3112
59. Ito, S., Muramatsu, T., and Kobata, A. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* **171**, 78–86
60. Tai, T., Yamashita, K., Ogata-Arakawa, M., Koide, N., Muramatsu, T., Iwashita, S., Inoue, Y., and Kobata, A. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 8569–8575
61. Kimura, Y., Iwata, K., Sumi, Y., and Takagi, S. (1996) *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 228–232
62. Kimura, Y., Matsuo, S., and Takagi, S. (1998) *Biosci. Biotech. Biochem.* **62**, 253–261
63. Kimura, Y., Tokuda, T., Ohno, A., Tanaka, H., and Ishiguro, Y. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1381**, 27–36
64. Kimura, Y., Matsuo, S., Tsurusaki, S., Kimura, M., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1570**, 38–246
65. Kato, T., Hatanaka, K., Mega, T., and Hase, S. (1997) *J. Biochem.* **122**, 1167–1173
66. Ito, K., Okada, Y., Ishida, K., and Minamiura, N. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 16074–16081
67. Yamamoto, K., Kadowaki, S., Fujisaki, M., Kumagai, H., and Tochikura, T. (1994) *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 72–77

68. Yamamoto, K. (1994) *J. Biochem.* **116**, 229–235
69. Sasaki, A., Yamagishi, M., Mega, T., Norioka, S., Natsuka, S., and Hase, S. (1999) *J. Biochem.* **125**, 363–367
70. Ishimizu, T., Sasaki, A., Okutani, S., Maeda, M., Yamagishi, M., and Hase, S. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 38555–38562
71. Sasaki, A., Ishimizu, T., and Hase, S. (2005) *J. Biochem.* **137**, 87–93
72. Maley, F., and Trimble, R.B. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 1088–1090
73. Berman, E., and Allerhand, A. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 6657–6662
74. Ishimizu, T., Mitsukami, Y., Shinkawa, Y., Natsuka, S., Hase, S., Miyagi, M., Sakiyama, F., and Norioka, S. (1999) *Eur. J. Biochem.* **263**, 624–634
75. Gu, J., Nishikawa, A., Tsuruoka, N., Ohno, M., Yamaguchi, N., Kangawa, K., and Taniguchi, N. (1993) *J. Biochem.* **113**, 614–619
76. Nakakita, S., Menon, K.K., Natsuka, S., Ikenaka, K., and Hase, S. (1999) *J. Biochem.* **126**, 1161–1169
77. Shimizu, H., Ochiai, K., Ikenaka, K., Mikoshiba, K., and Hase, S. (1993) *J. Biochem.* **114**, 334–338
78. Akita, K., Ishimizu, T., Tsukamoto, T., Ando, T., and Hase, S. (2002) *Plant Physiol.* **130**, 374–379
79. Okajima, T., Xu, A., Lei, L., and Irvine, K.D. (2005) *Science* **307**, 1599–1603
80. Blake, C.C.F., Johnson, L.N., Mair, G.A., North, A.C.T., Phillips, D.C., and Sarma, V.R. (1967) *Proc. R. Soc. London B* **167**, 378–388

Received on May 30, 2005, accepted on July 4, 2005

Profile of the Authors

Takeshi Ishimizu graduated from the Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University in 1993. He received his Ph.D. degree from Osaka University in 1998 under the direction of Emeritus Professor Fumio Sakiyama and Professor Shigemi Norioka. He worked at Pennsylvania State University (Prof. The-hui Kao Lab) as a JSPS research fellow from 1998 to 1999. Now he is working at the laboratory of Professor Sumihiro Hase of Osaka University as an Assistant Professor. His current interests are the biological significance of *N*-glycans in a plant cell and the molecular mechanism of biosynthesis of plant cell wall.

★★★★★★★★

Sumihiro Hase is professor of the Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University. He graduated from the department under the supervision of professor Yoshio Matsushima in 1966, and received his DSc from Osaka University in 1972. He has been working at the same faculty to the present day. His interest is in the structure and function of sugar chains based on molecular science.