The Transglycosylation Activity of the Recombinant Endo- β -N-Acetylglucosaminidase from *Mucor hiemalis* in Media Containing Organic Solvents

有機溶媒含有系における *Mucor hiemalis* 由来
リコンビナントエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの糖鎖転移活性

Akaike, Eri ; and Yamanoi, Takashi*

The Noguchi Institute, 1-8-1 Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173-0003, Japan

FAX: 81-3-5944-3213, E-mail: tyama@noguchi.or.jp

Key Words: endo- β -N-acetylglucosaminidase, recombinant Endo-M, transglycosylation, organic solvent, disialo biantennary complex-type oligosaccharide

Abstract

We investigated the transglycosylation activity of the recombinant endo- β -N-acetylglucosaminidase (Endo-M) from *Mucor hiemalis* expressed in *Candida boidinii* in media containing organic solvents, using a disialo biantennary complex-type oligosaccharide from the hen egg yolk glycopeptide as the glycosyl donor and *p*-nitrophenyl *N*-acetyl- β -D-glucosaminide as the glycosyl acceptor. The recombinant Endo-M had sufficient transglycosylation activity to transfer the oligosaccharide to *p*NP-GlcNAc in up to 30–40% organic solvents (v/v) such as acetone, dimethyl sulfoxide and methanol. The transglycosylation activity in each organic solvent differed from each other. The investigation of the donor concentrations in the organic solvents revealed that the increase in the concentrations significantly increased the transglycosylation yields. Using the Endo-M transglycosylation system in organic solvents, we successfully demonstrated the transglycosylation reaction to the glycosyl acceptors which were sparingly soluble in water such as artificial *N*-acylated D-glucosamines and a 2-O-glycosylated disaccharide.

要 約

我々は *Candida boidinii* で発現させた糸状菌 *Mucor hiemalis* 由来リコンビナントエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (リコンビナント Endo-M) の有機溶媒含有系における糖鎖転移活性について調べた。糖鎖供与体には鶏卵黄由来の糖ペプチドである二本鎖ジシアロ複合型糖鎖を、糖受容体には *p*-ニトロフェニル *N*-アセチル- β -D-グルコサミンを用いた。リコンビナント Endo-M は 30 ~ 40% (v/v) のアセトン、ジメチルスルホキシド(DMSO)、メタノールを含有する反応系において十分な糖鎖転移活性を有することがわかった。また、これらの有機溶媒中における本酵素の糖鎖転移活性は、それぞれの有機溶媒によって特徴が見られた。有機溶媒含有系において糖鎖供与体の濃度を種々変えたところ、糖鎖転移生成物の収率が著しく向上することも見出した。次に、この有機溶媒中での Endo-M の糖鎖転移反応システムを利用して、*N*-アシルグルコサミン誘導体や 2-O-グリコシル二糖化合物といった水溶性の乏しい化合物を糖受容体に用いた糖鎖転移反応を検討した。その結果、糖鎖転移反応は速やかに進行し、本 Endo-M 反応システムが有効であることを明らかにした。

A. Introduction

Although the addition of an oligosaccharide to an acceptor is important in glycotechnology, no effective procedure is available. Recently, a practical method for adding an oligosaccharide to a peptide to produce a glycopeptide has been developed using the transglycosylation activity of endo- β -N-acetylglucosaminidase. Endo- β -N-acetylglucosaminidases hydrolyze the glycosidic bond in the *N,N'*-diacetylchitobiose moiety of the N-linked sugar chains in glycoproteins. Among them, Endo-A from *Arthrobacter protophormiae*,⁽¹⁾ Endo-M from *Mucor hiemalis* (2) and Endo-CE from *Caenorhabditis elegans* (3) have been found to have transglycosylation activity, that is, they can transfer the oligosaccharide blocks of N-linked sugar chains from a

A. はじめに

標的となる糖鎖受容体へ糖鎖を付加する技術は糖鎖工学において重要であるが、有効的な方法はこれまで確立されていなかった。近年、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの糖鎖転移活性を用いて、糖鎖をペプチドに導入する糖ペプチドの実用的な合成手法が開発されるに至っている。エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼは糖タンパク質の *N*-結合糖鎖のジアセチルキトビオース部分を加水分解して切断する酵素である。その中で、*Arthrobacter protophormiae* 由来 Endo-A (1)、*Mucor hiemalis* 由来 Endo-M (2)、*Caenorhabditis elegans* 由来 Endo-CE (3) に糖鎖転移活性があることが報告されている。すなわち、糖ペプチドあるいは糖タンパクの *N*-結

glycopeptide or a glycoprotein to suitable acceptors having an N-acetylglucosamine (GlcNAc) residue. Endo-A and Endo-CE can transglycosylate the high-mannose-type oligosaccharides from a glycopeptide or a glycoprotein to the appropriate glycosyl acceptors (4,5). Endo-M can transfer not only the high-mannose-type oligosaccharides, but also the complex-type oligosaccharides to the N-acetylglucosamine moieties of the acceptors.

Endo-A and Endo-M are used as effective tools for the reconstruction and remodeling of oligosaccharides from glycopeptides and glycoproteins. Using the transglycosylation activity of Endo-M, Haneda *et al.* succeeded in adding oligosaccharides to chemically synthesized peptides having N-acetylglucosaminyl-asparagine or -glutamine residues. They chemoenzymatically synthesized biologically important neoglycopeptides having natural N-linked oligosaccharides, such as the glycopeptide derivatives of calcitonin (6), substance P (7), and peptide T (8). This is the only effective method for synthesizing the glycopeptide, and Endo-M has proved to be an efficient tool for the construction of the oligosaccharides (Scheme 1).

Recently, we have conducted several studies on the transglycosylation reaction of the recombinant Endo-M in order to increase the enzyme's utility in glycotechnology. One is the study on the reaction specificity in organic solvents, which we describe in detail in this mini-review. We have also investigated the substrate specificity for oligosaccharide donors, which resulted in an interesting finding that the recombinant Endo-M was able to transfer a bisecting hybrid-type oligosaccharide (in Scheme 1) from an ovalbumin glycopeptide (9). The study on the acceptor specificity has

合糖鎖をブロックで *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 残基に転移させる糖鎖転移活性を有している。Endo-A と Endo-CE は糖ペプチドまたは糖タンパクの高マンノース型糖鎖を転移することができる(4,5)。Endo-M は高マンノース型糖鎖だけでなく、複合型糖鎖を糖鎖受容体の *N*-アセチルグルコサミン残基に転移させることができる。

Endo-A と Endo-M は糖タンパクあるいは糖ペプチドの糖鎖の再構築やリモデリングに有用なツールとして利用されている。Haneda らは Endo-M の糖鎖転移活性を用いて、*N*-アセチルグルコサミニルアスパラギンあるいは、グルタミンを有する化学的に合成されたペプチドへ天然糖鎖を転移させることに成功しており、カルシトニン(6)、サブスタンス P (7)、ペプチド T (8)などの生化学的に重要な糖ペプチドを化学-酵素法により合成している。本手法は効率的に糖ペプチドを合成できる唯一の方法であり、Endo-M は糖鎖構築における有用なツールであることが立証されている(スキーム 1)。

最近、我々は糖鎖工学におけるリコンビナント Endo-M 酵素の利用性を高めるために、本酵素を用いたいくつかの糖鎖転移反応を検討して、その特異性を解明した。その一つは有機溶媒中での反応特性で、本ミニレビューで詳細に述べる。また、我々は本酵素の糖鎖供与体の特異性を検討し、リコンビナント Endo-M はオバルブミン由来の bisecting 混成型糖鎖(スキーム 1 中)を転移させる能力があるという興味深い事実を明らかにした(9)。糖鎖受容体の特異性に関する研究においては、本酵素は C-1 あるいは C-2 が修飾された種々の D-グ

Scheme 1

clarified that the enzyme has a transglycosylation activity to a variety of sugar derivatives of D-glucopyranose and D-glucosamine modified at C-1 or C-2 (10). As the application of the Endo-M transglycosylation to the glycoconjugate synthesis, we also successfully prepared the disialo complex-type oligosaccharide branched cyclodextrins which were expected to be drug carriers (11).

Fan *et al.* have investigated the transglycosylation and hydrolytic activities of Endo-A in organic solvents and revealed that the addition of organic solvents, such as acetone, *N,N'*-dimethylformamide, or dimethyl sulfoxide, to the reaction mixture could enhance the transglycosylation activity and suppress the hydrolytic activity (12,13). Recently, S. Kojima *et al.* have also reported that the Endo-M transglycosylation system in an organic solvent (20 % v/v acetonitrile) was useful for preparing the tris-bipyridine ruthenium complexes carrying a disialo complex-type oligosaccharide, which can bind to the type A influenza virus (Scheme 2) (14). However, the detailed transglycosylation activity of Endo-M in the presence of organic solvents has not yet been determined.

We then investigated the transglycosylation activity of Endo-M in organic solvents and clarified that the recombinant Endo-M expressed in *Candida boidinii* was stable in the

ルコピラノースや D- グルコサミン誘導体に対しても十分な糖鎖転移活性を有していることを明らかにした(10)。さらに、Endo-M の糖転移反応を複合糖質合成に応用した研究では、薬剤輸送キャリアと期待されるジシアロ複合型糖鎖分岐シクロデキストリンの合成に成功している(11)。

Fan らは、有機溶媒中での Endo-A の糖鎖転移活性と加水分解活性を検討している。アセトン、*N,N'*-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドなどの有機溶媒を反応系中に添加すると Endo-A の糖鎖転移活性が向上し、加水分解活性は抑制されることが明らかにされている(12,13)。また最近、S. Kojima らも、タイプ A のインフルエンザウイルスに結合性のジシアロ複合型糖鎖を有するトリスピリテニウム複合体の合成に有機溶媒中(20% v/v アセトニトリル)での Endo-M 糖鎖転移反応システムが有効であることを報告している(スキーム 2)(14)。しかし、有機溶媒存在下での Endo-M の糖鎖転移活性の詳細な特性についてはほとんど明らかにされていない。

そこで我々は、有機溶媒中での Endo-M の糖鎖転移活性を調べたところ、*Candida boidinii* で発現させたリコンビナント Endo-M は、アセトン、メタノール、ジメチルスルホキシドの

Scheme 2

Scheme 3

presence of organic solvents such as acetone, methanol, and dimethyl sulfoxide, and it did not lose its transglycosylation activity (Scheme 3) (15). Using the Endo-M transglycosylation system in organic solvents, we could successfully demonstrate the transglycosylation reaction to several glycosyl acceptors sparingly soluble in water (10). In this review, we describe the specificities of the transglycosylation reaction of the recombinant Endo-M in the presence of organic solvents and the utilization of its transglycosylation system in organic solvents to the water-insoluble glycosyl acceptors.

B. General Transglycosylation Method with the Recombinant Endo-M

Recombinant Endo-M was obtained from the cell extract of *Candida boidinii* (protease deficient (pep4) strain) (16). The glycosyl donor, a sialoglycopeptide having a disialobiantennary complex-type oligosaccharide: H-Lys-Val-Ala-Asn[(NeuAc-Gal-GlcNAc-Man)₂-Man-GlcNAc₂]-Lys-Thr-OH, called SGP, was prepared from hen egg yolk according to the reported method (17).

The transglycosylation reaction was performed with a reaction mixture composed of 0.1 μmol of pNP-β-D-GlcNAc, 0.2 μmol of SGP, and 1.48 mU of Endo-M in a total volume of 10 μL of 60mM potassium phosphate buffer (pH 6.25) containing 0–50% of various organic solvents (v/v). After incubation for 0.5–3 h at 25 °C, the reaction was terminated by the addition of 490 μL of a 0.2% trifluoroacetic acid solution.

The transglycosylation was done at a low temperature to obtain reliably reproducible data when low boiling organic solvents were used. We have ascertained that the transglycosylation activity of the recombinant Endo-M in water at 25 °C was almost similar to that at 37 °C.

Analyses of the transglycosylation products were done using HPLC. The transglycosylation products were confirmed by a MALDI-TOF mass spectrometric analysis.

C. Transglycosylation Activity and Stability of the Recombinant Endo-M in Various Organic Solvents

We examined the transglycosylation activity of the recombinant Endo-M in various organic solvents using 10 mM of pNP-β-D-GlcNAc and 20 mM of SGP (Scheme 3). The reaction mixture was incubated with the enzyme at 25 °C for 1 h (or 3 h) in various 30% organic solvents (v/v) such as acetone, butanone, acetonitrile, dioxane, *N,N*-dimethylformamide (DMF), dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol, or tetrahydrofuran (THF). These results are shown in Table I. In the 30% acetone solution, the yield of the transglycosylation product was found to reach 41% (34%) of the total amount of pNP-β-D-GlcNAc as the acceptor. Moreover, the yields of the transglycosylation products reached 31% (21%) and 37% (25%) in DMSO and methanol,

有機溶媒の存在下で安定であり、かつ糖鎖転移活性が損なわれないという事実を見出した(スキーム 3)(15)。この有機溶媒中での Endo-M 糖鎖転移反応システムを用いて、難水溶性のいくつかの化合物への糖鎖転移反応にも成功した(10)。本ミニレビューでは、有機溶媒存在下でのリコンビナント Endo-M の糖鎖転移反応の特性、および有機溶媒中での Endo-M 糖鎖転移反応システムの水溶性の乏しい化合物への利用について述べる。

B. リコンビナント Endo-M を用いた糖鎖転移反応の一般的方法

リコンビナント Endo-M は *Candida boidinii* (プロテアーゼ欠損株(pep4))の細胞抽出物より得た(16)。糖鎖供与体は、2 本鎖ジシアロ複合型糖鎖を有するシアログリコペプチド、H-Lys-Val-Ala-Asn[(NeuAc-Gal-GlcNAc-Man)₂-Man-GlcNAc₂]-Lys-Thr-OH (SGP)を文献の方法に従い鶏卵黄から調製した(17)。糖鎖転移反応は pNP-β-D-GlcNAc を 0.1 μmol、SGP を 0.2 μmol、Endo-M 酵素を 1.48 mU 用い、0 ~ 50% の有機溶媒を含有する 60 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 6.25)を用いて、全量を 10 μl にして行った。25 °C で 0.5 ~ 3 時間反応させた後、0.2% トリフルオロメタンスルホン酸を 490 μL 添加して反応を停止した。

低沸点の有機溶媒を使用した時に、信頼性のある再現性データを得るために糖鎖転移反応は、25 °C という低い温度で行った。ちなみに、我々は 25°C の水溶液中でのリコンビナント Endo-M の糖鎖転移活性は 37°C で行った反応とほとんど変わらないということを確認している。

糖鎖転移生成物の分析は HPLC で行い、同定は MALDI-TOF マススペクトルで行った。

C. 様々な有機溶媒中でのリコンビナント Endo-M の糖鎖転移活性と安定性

糖鎖受容体に 10 mM pNP-GlcNAc、糖鎖供与体に 20 mM SGP を用い、種々の有機溶媒中での Endo-M 酵素の糖鎖転移活性を検討した(スキーム 3)。反応基質は 30% (v/v)有機溶媒含有水溶液中で、25°C で 1 時間(あるいは 3 時間)攪拌した。有機溶媒はアセトン、ブタノン、アセトニトリル、ジオキサン、*N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、メタノール、テトラヒドロフラン(THF)を用いた。その結果を表 I に示す。30% アセトン含有溶液中における転移反応生成物の収率は、添加した糖鎖受容体である pNP-β-D-GlcNAc の全量から換算して 41% (34%)に達することがわかった。さらに、DMSO およびメタノール溶液を用いた糖鎖転移生成物の収率は、それぞれ 31% (21%)、37% (25%)

Table I. The yields of the transglycosylation product incubated for 1 h and 3 h in the presence of various 30% organic solvents (v/v).

organic solvent	transglycosylation yield (%)	
	1 h	3 h
none	37	15
acetone	41	34
butanone	0	0
acetonitrile	0	0
dioxane	0	0
DMF	0	0
DMSO	31	21
methanol	37	25
THF	0	0

Acceptor: pNP- β -D-GlcNAc. Donor: SGP

respectively. We could not observe the transglycosylation product in 30% acetonitrile solution, although Kojima *et al.* reported the transglycosylation in 20% acetonitrile (14). On the other hand, the yield was 37% (only 15%) for the reaction in an aqueous solution.

Thus, the recombinant Endo-M showed sufficient transglycosylation activity in several organic solvents. Furthermore, all evidence points to the fact that the recombinant Endo-M is likely to be extremely stable in these organic solvents.

The mass value of the transglycosylation product of pNP-(GlcNAc)₂-Man-(Man-GlcNAc-Gal-NeuAc)₂ was determined by a MALDI-TOF mass spectrometric analysis. pNP-(GlcNAc)₂-Man-(Man-GlcNAc-Gal-NeuAc)₂: found m/z [M-H]⁻ 2340.7, calcd for C₉₀H₁₄₁N₇O₆₄ [M-H]⁻ 2342.8.

D. The Effect of the Acetone Concentration on the Transglycosylation Activity of the Recombinant Endo-M

The effect of the acetone concentration (0–50%) on the

であった。先に述べたように、Kojima らは 20% アセトニトリル含有水溶液中において糖鎖転移反応を報告しているが(14)、我々は 30% アセトン含有系では転移生成物を確認できなかった。一方で、有機溶媒を添加しない水系での反応は 37% (僅か 15%) の収率でしかなかった。

このことから、リコンビナント Endo-M は、有機溶媒中においても十分な糖鎖転移活性を有していることが明らかになった。このような事実から、本酵素は上のこの有機溶媒中で極めて安定性が高いことも示唆された。

糖鎖転移生成物は、MALDI-TOF 質量分析により確認した。生成物である pNP-(GlcNAc)₂-Man-(Man-GlcNAc-Gal-NeuAc)₂ の分子量の実測値は m/z [M-H]⁻ 2340.7、理論値は C₉₀H₁₄₁N₇O₆₄ [M-H]⁻ 2342.8. である。

D. アセトンの濃度変化がリコンビナント Endo-M の糖鎖転移活性に及ぼす効果

リコンビナント Endo-M の糖鎖転移活性に及ぼすアセトン

Fig. 1. The effect of the acetone concentration in the range of 0–50% (v/v) on the transglycosylation activity. (○, 0%; ×, 10%; □, 20%; ◇, 30%; △, 40%; ▲, 50%)

transglycosylation activity of the recombinant Endo-M was investigated. These results are shown in Fig. 1. According to the reaction process results, it appeared that the degradation of the product scarcely occurred in the organic solvent, although it occurred rather rapidly in aqueous solution. The yields of the transglycosylation product reached about 40% after a 1-h incubation in 10–30% acetone concentrations. The enzyme had sufficient transglycosylation activity in up to 30% acetone concentrations.

However, it might be expected that the enzyme was inactivated after a 1-h incubation. In order to investigate whether the enzyme was active after a 1-h incubation, pNP- β -D-GlcNAc and SGP were added to the reaction mixture incubated with the enzyme in a 30% acetone concentration for 1-h. The yield of the transglycosylation product reached 40% 2 hours after adding the substrates. This result showed that the enzyme was active after incubation in the 30% acetone for 1-h.

E. The Transglycosylation Activity of the Recombinant Endo-M in DMSO and Methanol

The effect of the DMSO and methanol concentrations (0–50%) on the transglycosylation activity of the recombinant Endo-M was also investigated. In these organic solvents, the enzyme indicated sufficient transglycosylation activity in up to 40% concentrations. The yields of the transglycosylation product reached about 30% after 3 hours. These results are summarized in Fig. 2.

F. The Effect of the Oligosaccharide Donor (SGP) Concentration on the Transglycosylation Yield

The effect of the sugar-chain donor concentration on the yield of the transglycosylation product was examined.

濃度 (0 ~ 50% 含有) の効果について検討した。その結果を図 1 に示す。反応時間が経過するにつれて、水系の反応では糖鎖転移生成物の速やかな減少が見られたのに対し、有機溶媒を添加した反応系では生成物の減少がそれほど顕著に見られないことがわかった。10 ~ 30% アセトン含有系では、転移生成物の収率は、1 時間反応後に約 40% に達した。本酵素が 30% までのアセトン含有系において十分な糖鎖転移活性をもつことがわかった。しかし、反応の 1 時間後には酵素が失活している可能性も考えられた。そこで、1 時間後に Endo-M が失活しているかどうかを調べるために、30% アセトン含有系で酵素を 1 時間曝した反応系に、pNP- β -D-GlcNAc と SGP を加える実験を行った。その結果、これらの基質を加えてから、2 時間後に糖鎖転移生成物の収率は 40% に達した。このことから、本酵素を 30% アセトン含有系に 1 時間入れておいても酵素活性は損なわれないことがわかった。

E. DMSO とメタノール含有系でのリコンビナント Endo-M の糖鎖転移活性

次に、DMSO とメタノール (0 ~ 50%) 含有系でのリコンビナント Endo-M の糖鎖転移活性を調べた。本酵素は、これらの有機溶媒を 40% 濃度で含有する反応系においても十分な糖鎖転移活性を持つことがわかった。3 時間反応後の糖鎖転移収率は約 30% にまで達した。これらの結果は図 2 に示した。

F. 糖鎖供与体 (SGP) の濃度が糖鎖転移収率へ及ぼす効果

糖鎖供与体 SGP の濃度が糖鎖転移収率に及ぼす効果を調べた。これらの結果は表 II にまとめた。40 mM SGP を用

Fig. 2. The effect of the organic solvent concentration on the transglycosylation activity. (■, 40% DMSO; ◆, 40% MeOH)

Table III. The application of the Endo-M transglycosylation system in organic solvents to various sugar derivatives (1–3) sparingly soluble in water and the mass values of the obtained transglycosylation products.

Acceptor	Transglycosylation yield (%)	Found m/z [M-H] ⁺	Calcd for [M-H] ⁺
1	17	2332.2	2333.8
2	24	2312.0	2313.8
3	38	2579.2	2580.9

The incubation with the sugar derivative (10 mM) and SGP (20 mM) was carried out at 37 °C for 3 h in potassium phosphate buffer (pH 6.25) containing 30% DMSO.

were chosen on the basis of the assumption that Endo-M would have a transglycosylation activity for sugar derivatives of D-glucopyranose and D-glucosamine modified at C-1 or C-2 (Scheme 4). The enzymatic reaction was carried out with 10 mM of the glycosyl acceptor and 20 mM of SGP in 30% DMSO solution for 3 h. The reaction was done at 37 °C in order to increase the solubilities of these glycosyl acceptors. These enzymatic reactions in 30% DMSO successfully produced the transglycosylation products with satisfactory yields. The mass values of the transglycosylation products were determined by MALDI-TOF mass spectrometric analyses. These results are listed in Table III.

H. Conclusion

As described above, the enzymatic reactions using the recombinant Endo-M expressed in *Candida boidinii* proceeded in media containing 30–40% of organic solvents such as acetone, DMSO, and methanol. This means that the recombinant Endo-M is stable in the presence of these organic solvents without losing its transglycosylation activity, and is applicable to compounds sparingly soluble in water. Using the Endo-M transglycosylation system in organic solvents, we could successfully demonstrate the transfer of a disialo complex-type oligosaccharide to several water-insoluble compounds. The recombinant Endo-M has recently become commercially available from Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd. We believe our study will contribute to the utilization of Endo-M for the syntheses of various useful glycoconjugates.

Acknowledgement

We are gratefully indebted to Professor Kenji Yamamoto (Kyoto University) for the kind gift of the recombinant Endo-M and for his very helpful discussions.

References

1. Takegawa, K., Yamaguchi, S., Kondo, A., Kato, I., and Iwahara, S. (1991) *Biochem. Int.* **25**, 829–835
2. Yamamoto, K., Kadowaki, S., Watanabe, J., and Kumagai, H. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 244–252
3. Kadowaki, S., Yamamoto, K., Fujisaki, M., Izumi, K., Tochikura, T., and Yokoyama, T. (1990) *Agric. Biol. Chem.* **54**, 97–106
4. Takegawa, K., Nakoshi, M., Iwahara, S., Yamamoto, K., and Tochikura, T. (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 3107–3112
5. Kato, T., Fujita, K., Takeuchi, M., Kobayashi, K., Natsuka, S., Ikura, K., Kumagai, H., and Yamamoto, K. (2002) *Glycobiology* **12**, 581–587

ルコサミンの C-1 または C-2 を化学的に修飾した糖誘導体に対して糖鎖転移活性を発現するとの仮説に基づき、これらの化合物を選んだ(スキーム 4)。酵素反応は 10 mM 糖鎖受容体、20 mM 糖鎖供与体 SGP を用いて、30% DMSO 含有系で 3 時間攪拌し、反応温度はこれら糖鎖受容体の溶解性を高めるため 37 °C で行った。30% DMSO 含有系において、本反応はいずれの化合物でも十分な収率で糖鎖転移生成物を与えることがわかった。糖鎖転移生成物の同定は MALDI-TOF 質量分析で行った。これらの結果は表 III に示した。

H. まとめ

以上述べたように、*Candida boidinii* で発現させたリコンビナント Endo-M は、30 ~ 40% 濃度のアセトン、DMSO、メタノールを含む反応系において糖鎖転移反応を進行させる能力を持つことがわかった。このことは、リコンビナント Endo-M がこれらの有機溶媒存在下で糖鎖転移活性を損なうことなく、安定であり、また水溶性の乏しい化合物を糖鎖受容体に利用できることを示している。有機溶媒中での Endo-M 糖鎖転移反応システムを利用して、水溶性の乏しい化合物へのジシアロ複合型糖鎖の転移に成功した。リコンビナント Endo-M 酵素は現在、東京化成工業株式会社により販売されている。Endo-M 酵素が今後、様々な有用な複合糖質の合成に利用されるに際し、我々の研究が大いに役立つものと確信している。

謝 辞

リコンビナント Endo-M 酵素をご提供、ならびに研究をご指導いただきました山本憲二教授(京都大学)に深く感謝致します。

6. Haneda, K., Inazu, T., Mizuno, M., Iguchi, R., Yamamoto, K., Kumagai, H., Aimoto, S., Suzuki, H., and Noda, T. (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 1303–1306
7. Haneda, K., Inazu, T., Mizuno, M., Iguchi, R., Tanabe, H., Fujimori, K., Yamamoto, K., Kumagai, H., Tsumori, K., and Munekata, E. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1526**, 242–248
8. Haneda, K., Inazu, T., Mizuno, M., Yamamoto, K., Fujimori, K., and Kumagai, H. (1996) *Peptide Chemistry*; Kitada, C. (1997) *Protein Research Foundation*, pp 13–16
9. Osumi, K., Makino, Y., Akaike, E., Yamanoi, T., Mizuno, M., Noguchi, M., Inazu, T., and Yamamoto, K., Fujita, K. (2004) *Carbohydr. Res.* **339**, 2633–2635
10. Yamanoi, T., Tsutsumida, M., Oda, Y., Akaike, E., Osumi, K., Yamamoto, K., and Fujita, K. (2004) *Carbohydr. Res.* **339**, 1403–1406
11. Yamanoi, T., Yoshida, N., Oda, Y., Akaike, E., Tsutsumida, M., Kobayashi, N., Osumi, K., Yamamoto, K., Fujita, K., Takahashi, K., and Hattori, K. (2005) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 1009–1013
12. Fan, J.-Q., Takegawa, K., Iwahara, S., Kondo, A., Kato, I., Abeygunawardana, C., and Lee, Y.C. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 17723–17729
13. Fan, J.-Q., Quesenberry, M.S., Takegawa, K., Iwahara, S., Kondo, A., Kato, I., and Lee, Y.C. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 17730–17735
14. Kojima, S.; Hasegawa, T., Yonemura, T., Sasaki, K., Yamamoto, K., Makimura, Y., Takahashi, T., Suzuki, T., Suzuki, Y., and Kobayashi, K. (2003) *Chem. Commun.*, 1250–1251
15. Akaike, E., Tsutsumida, M., Osumi, K., Fujita, M., Yamanoi, T., Yamamoto, K., and Fujita, K. (2004) *Carbohydr. Res.* **339**, 719–722
16. Fujita, K., Kobayashi, K., Iwamatsu, A., Takeuchi, M., Kumagai, H., and Yamamoto, K. (2004) *Arch. Biochem. Biophys.* **432**, 41–49
17. 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

Received on September 29, 2005, accepted on December 14, 2005

Profile of the Authors

Eri Akaike graduated from the Faculty of Biotechnology and Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology, and received her masters degree in 2001. She joined the Noguchi Institute in 2001. Now she is working at the laboratory of Dr. Takashi Yamanoi in the Noguchi Institute and investigates transglycosylation reaction using endoglycosidases.

★★★★★★★★

Takashi Yamanoi graduated from the Department of Chemistry, Tokyo University of Science in 1985 (MS), and started his career in the carbohydrate field as the research scientist at the Noguchi Institute. He obtained his Ph.D. from Tokyo University of Science in 1995. He has been a chief Scientist of the Synthetic Carbohydrate Chemistry Laboratory at The Noguchi Institute since 2002, and also teaches as a part-time lecturer in Meiji University.