Glycosyltransferases in the Synthesis of Oligosaccharide Analogs

糖転移酵素を用いたオリゴ糖類似体の合成

Palcic, Monica M.; and Hindsgaul, Ole

Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada T6G 2G2,

FAX:403-492-7705, E-mail:Ole.Hindsgaul@Ualberta.Ca

Key Words: enzymatic synthesis, glycosyltransferases, oligosaccharide analogs**Abstract**

The glycosyltransferase-mediated synthesis of oligosaccharide analogs is reviewed, with emphasis on the use of modified sugar-nucleotide donors or modified acceptors as substrates. A survey of the most studied enzymes: $\beta(1\rightarrow4)$ -galactosyltransferase, *N*-Acetylglucosaminyltransferase I, $\alpha(1\rightarrow3/4)$ -fucosyltransferases and $\alpha(2\rightarrow3$ or $2\rightarrow6)$ -sialyltransferases, shows them to be very useful for the rapid production of chemically modified di-, tri- and tetrasaccharide analogs.

要 約

この総説では糖転移酵素によるオリゴ糖類似体の合成について概観する。特に、化学修飾された糖スクレオチド供与体、あるいは化学修飾された糖受容体を基質として用いたものに重点を置いた。最もよく研究されている糖転移酵素は $\beta(1\rightarrow4)$ ガラクトース転移酵素、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 I、 $\alpha(1\rightarrow3/4)$ フコース転移酵素、 $\alpha(2\rightarrow3)$ シアル酸転移酵素、および $\alpha(2\rightarrow6)$ シアル酸転移酵素であり、これらは化学修飾された2-4糖類似体を迅速に合成するのに適している。

A. Introduction

Recently there has been increased interest in the preparation of natural and unnatural oligosaccharide structures arising from demonstrations of their role in cellular biological recognition events (1). They serve as attachment sites for the binding of bacteria, viruses, toxins and hormones to mammalian cells, and they function in cell-cell adhesion events. Cell surface carbohydrates also change in characteristic fashion during normal and abnormal cellular development. Oligosaccharides that serve as competitive ligands therefore represent potential drug targets for the treatment of infectious diseases (2), inflammation (3-5) and cancer (6, 7).

While the chemical synthesis of oligosaccharides is well established, it is time consuming and requires specialized expertise (8-10). The combined chemical-enzymatic synthesis of oligosaccharides (11-16) is becoming an increasingly attractive alternative to their preparation by chemical methods alone. With the availability of an increased number of cloned glycosyltransferases (17-20) this approach will become increasingly attractive.

Mammalian oligosaccharides are biosynthesized by glycosyltransferases that catalyze the transfer of a monosaccharide from a nucleotide donor to the hydroxyl group of saccharide acceptors (21) (Fig. 1).

The most common nucleotide donors in mammalian metabolism are UDP-D-glucose (UDP-Glc), UDP-*N*-Acetyl-D-glucosamine (UDP-GlcNAc), UDP-D-galactose (UDP-Gal), UDP-*N*-acetyl-D-galactosamine (UDP-GalNAc), UDP-D-xy-

A. はじめに

細胞上のオリゴ糖が各種の認識現象に深くかかわっていることが明らかになるにつれ(1)、天然および非天然型のオリゴ糖合成に関する興味が高まってきている。オリゴ糖は、バクテリア、ウイルス、毒素、およびホルモンが動物細胞に結合するときの結合部位となる一方、細胞同士の接着においても重要な役割を果たしている。また、細胞の正常あるいは異常な発生の過程で、細胞表層上のオリゴ糖はその形を変化させる。したがって、競争的リガンドとして機能するオリゴ糖は、感染症(2)、炎症(3-5)、あるいは癌(6,7)の治療薬として期待が持たれる。

オリゴ糖の化学合成は確立された技術である一方、時間がかかり特殊な技術を必要とする(8-10)。化学的手法と酵素的手法を併用したオリゴ糖の合成(11-16)は、化学的手法のみによる合成に代わるものとして関心を集めつつある。糖転移酵素のクローニングが進むにつれ(17-20)この手法はますます関心を集めるであろう。

哺乳類が持つオリゴ糖は、糖受容体の水酸基に糖スクレオチドの単糖部分を転移させる糖転移酵素によって生合成されている(21)(図1)。

哺乳動物の代謝経路において見いだされるスクレオチド供与体としては、UDP-D-グルコース(UDP-Glc)、UDP-*N*-アセチル-D-グルコサミン(UDP-GlcNAc)、UDP-D-ガラクトース(UDP-Gal)、UDP-*N*-アセチル-D-ガラクトサミン(UDP-GalNAc)、UDP-

Fig. 1. A generalized glycosyltransferase reaction. All the sugar nucleotides are diphosphates in mammalian oligosaccharide biosynthesis except for CMP-sialic acid.

lose (UDP-Xyl), UDP-D-glucuronic acid (UDP-GlcA), GDP-L-fucose (GDP-Fuc), GDP-D-mannose (GDP-Man), and CMP-sialic acid. Glycosyltransferases have a high degree of specificity for the linkages that they form, catalyzing transfer from donor to acceptor regio- and stereospecifically. Well over one hundred different glycosyltransferases must exist to account for all known oligosaccharide structures.

It has been found that only a few of the hydroxyl groups, *i.e.*, “key polar groups” (22, 23), in the acceptor substrate are usually required for recognition by these enzymes. This phenomenon has been observed in other carbohydrate-protein recognition systems including antibodies, lectins, glycosidases and oxidases (24–27). The approach to discovering the identity of such polar groups is to cause a perturbation at each of the OH groups on an oligosaccharide ligand, replacing them in turn with H (deoxy analogs), OCH₃, NH₂ or other groups. Such acceptor mapping has been performed for the bovine milk β(1→4)-galactosyltransferase (28, 29), cloned α1,3 and α1,4 fucosyltransferases (30), α2,3 and α2,6 sialyltransferases that transfer to type I and type II acceptors (31), α2,3 sialyltransferases that transfer to T-disaccharides (32), *N*-acetylglucosaminyltransferase V (33, 34), *N*-acetylglucosaminyltransferase I (35), *N*-acetylglucosaminyltransferase II (36), core 2 β1,6 *N*-acetylglucosaminyltransferase (32), and the blood group A and B biosynthesizing enzymes (37, 38). Modifications are then frequently tolerated at other positions on the acceptors allowing the preparation of unnatural structures starting with acceptor analogs.

All of the natural sugar nucleotides are now available commercially. Many of them can also be enzymatically prepared using recycling systems to lower their cost when large scale synthesis is required. Provided that the enzyme is available, along with a suitable acceptor, the synthesis of the “natural” oligosaccharide sequences is therefore relatively straightforward since it is the task that the enzyme has evolved to perform. In this article, however, we concentrate on the application of glycosyltransferases for the synthesis of oligosaccharide analogs, *i.e.*, unnatural oligosaccharides. The term “unnatural”, in the present context, is used to indicate that a glycosyltransferase will either transfer a sugar that is different from the one it transfers in nature, or that it will transfer the normal

D-キシロース(UDP-Xyl)、UDP-D-グルクロン酸(UDP-GlcA)、GDP-L-フコース(GDP-Fuc)、GDP-D-マンノース(GDP-Man)、CMP-シアル酸などがある。一般に糖転移酵素はその結合形成に関して非常に高い特異性を持っており、供与体から受容体への転移を位置および立体特異的に触媒する。既知のオリゴ糖の構造を考慮すると、優に100を超える糖転移酵素が存在するはずである。

これらの酵素が受容体基質を認識するにあたっては、通常たった2、3個の水酸基、すなわち“鍵極性基(key polar groups)” (22, 23)、だけが必要であることが判っている。この現象は、抗体、レクチン、糖加水分解酵素、糖酸化酵素などのタンパク質と糖との結合においても見いだされている(24–27)。こういった極性基を見つける際には、オリゴ糖リガンドのそれぞれの水酸基をH(デオキシ類似体)、OCH₃、NH₂などの置換基に変換することによりその形や性質を変えてしまう方法が良く使われる。こうした検索法は、牛乳由来のβ(1→4)ガラクトース転移酵素(28, 29)、クローニングされたα(1→3)およびα(1→4)フコース転移酵素(30)、I型糖鎖あるいはII型糖鎖に作用するα(2→3)およびα(2→6)シアル酸転移酵素(31)、T型二糖に作用するα(2→3)シアル酸転移酵素(32)、N-アセチルグルコサミン転移酵素V(33, 34)、N-アセチルグルコサミン転移酵素I(35)、N-アセチルグルコサミン転移酵素II(36)、2型コアのβ(1→6)N-アセチルグルコサミン転移酵素(32)、AおよびB型血液型物質合成酵素(37, 38)などにおいて適用されている。受容体の鍵極性基以外の置換基を化学修飾してもたいいてい場合は問題がなく、非天然型のオリゴ糖合成に利用できる。

現在すべての天然型糖スクレオチドは購入できる。大量合成の場合は、糖スクレオチドはリサイクリングシステムにより酵素合成でき、コストを下げるのが可能である。酵素は“天然型”オリゴ糖鎖を作るために産まれてきたのだから、適当な受容体と酵素が入手できればこれを合成するのは比較的容易なはずである。しかしこの総説ではオリゴ糖類似体、つまり非天然型オリゴ糖の糖転移酵素を用いた合成に焦点を置く。ここで“非天然”という言葉は、糖転移酵素が天然において転移する単糖と違う糖を転移する場合、あるいは天然型の単糖を天然型と違う受容体に転移する場合に用いる。ラクトアルブミンの存在下ラク

sugar to an acceptor that is different from the natural acceptor. Except for $\beta(1\rightarrow4)$ -galactosyltransferase, which synthesizes lactose in the presence of lactalbumin (21, 28, 39), all mammalian glycosyltransferases act on glycoproteins and glycolipids so that all small molecule oligosaccharide acceptors may be viewed as unnatural. In the present review, however, we do not consider a change in aglycone as creating an unnatural acceptor which we define as having a chemically modified sugar residue. Also, since the objective of the review is to summarize the utility of glycosyltransferases in the preparative synthesis of structurally-defined oligosaccharide analogs, we focus on cases where enzymatic products have been isolated and their structures verified by methods such as NMR-spectroscopy and mass-spectrometry.

Only four systems have been extensively studied with respect to both donor and acceptor modifications. These are bovine $\beta(1\rightarrow4)$ -galactosyltransferase, *N*-acetylglucosaminyltransferase-I, $\alpha3/4$ -fucosyltransferases and the family of sialyltransferases. These are discussed in turn below.

B. $\beta(1\rightarrow4)$ -Galactosyltransferase

UDP-galactose: *N*-acetylglucosaminide $\beta(1\rightarrow4)$ galactosyltransferase (GalT, E. C. 2.4.1.22/38) is the most intensively studied of the glycosyltransferases because it has been commercially available for many years in unit quantities, where a unit is defined as the amount of enzyme catalyzing the conversion of 1 μ mol of substrate to product per min. The enzyme transfers Gal from UDP-Gal to OH-4 of β -linked GlcNAc (Fig. 2) to produce *N*-acetylactosamine. In the presence of the modifier protein α -lactalbumin, its kinetics and specificity is altered to more efficiently use free glucose as the acceptor for the synthesis of lactose in lactating mammary glands.

B-1. Donor Specificity: UDP-Gal

Figure 2 shows that GalT is capable of transferring a large number of modified sugars from UDP. It will transfer 2-deoxy-Gal (40-43) at a rate similar to Gal (43) and galactosamine is also transferred (42). Even GalNAc, where OH-2 has been replaced with a bulky NHAc residue, is transferred at 0.2% of the rate of Gal (44), however, the rate of transfer increases up to 55% of the natural UDP-Gal in the presence of α -lactalbumin for free GlcNAc acceptor (45). This enzyme has frequently been used to synthesize the β GalNAc(1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc sequence found on glycoprotein hormones (46, 47). 3-Deoxy (48), 4-deoxy (49), and 6-deoxy Gal (50, 51), as well as 6-fluoro-Gal (50, 51), Ara (where the CH₂OH group is replaced by H) (49,52) and Glc (45, 49, 53), are also transferred. UDP-GlcNAc is not a substrate (45) and neither is UDP-Man (unpublished data). In only one example was a double substitution examined: GlcNH₂ was transferred with a relative rate of 0.9% compared to that of Gal (45).

UDP-5'-thio-Gal, where the ring oxygen of Gal has

トースを合成する $\beta(1\rightarrow4)$ ガラクトース転移酵素(21、28、39)を除けば、すべての動物細胞の糖転移酵素は糖タンパク質や糖脂質を受容体として作用するので、すべての低分子オリゴ糖受容体は非天然型とも見なせるかもしれない。しかしこの総説では、化学修飾された糖残基を持つ受容体のみを非天然型と定義し、それ以外のアグリコン部分の変化については非天然型と見なさないことにする。また、この総説では構造が明確なオリゴ糖類似体を大量に合成する際の糖転移酵素の利用について述べるので、生成物が単離されその構造がNMRやマスペクトルで確認されたものについてだけとりあげる。

種々の化学修飾が供与体と受容体の両基質について行われた糖転移酵素は、牛乳由来の $\beta(1\rightarrow4)$ ガラクトース転移酵素、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素I、 $\alpha(1\rightarrow3/4)$ フコース転移酵素、シアル酸転移酵素群の4つしかない。これらを順にとりあげていく。

B. $\beta(1\rightarrow4)$ ガラクトース転移酵素

UDP-ガラクトース: *N*-アセチルグルコサミニド $\beta(1\rightarrow4)$ ガラクトース転移酵素(GalT, E. C. 2.4.1.22/38)はかなり古くからユニット単位で購入可能なため最もよく研究されている。(1ユニットは1分間に1mmolの基質を変換するのに要する酵素の量で定義される)この酵素はUDP-Galから β グリコシド結合を持つGlcNAcのOH-4にGalを転移し*N*-アセチラクトサミンを生産する(図2)。エフェクタータンパクである α -ラクトアルブミンが存在すると反応速度や基質特異性が変化し、より容易にグルコースを受容体として認識するようになる。これにより乳腺ではラクトースが合成される。

B-1. 供与体特異性(UDP-Gal)

図2は種々の修飾UDP-GalがGalTによって転移される様子を示している。2-デオキシ-Gal(40-43)はGal(43)と同様の速度で転移され、ガラクトサミンも基質となる(42)。OH-2が嵩高いNHAcで置換されたGalNAcですらGalの0.2%の速度で転移される(44)。しかし α -ラクトアルブミンが存在すると反応速度が向上し、GalNAcはGalの55%の速度でGlcNAcに転移される(45)。この酵素は糖タンパクホルモンに見られる β GalNAc(1 $\rightarrow$ 4)GlcNAcを合成するのによく使われている(46、47)。3-デオキシ(48)、4-デオキシ(49)、6-デオキシ(50、51)、6-フルオロ-Gal(50、51)や、アラビノース(GalのCH₂OHがHに置換されたもの)(49、52)、Glc(45、49、53)なども転移される。UDP-GlcNAc(45)とUDP-Man(未発表データ)は基質とならない。2箇所の置換基が同時に置換された例は1つだけあり、GlcNH₂がGalに比べて0.9%の速度で転移される(45)。

Galの環酸素が硫黄原子で置換されたUDP-5'-チオ-Galはこ

Fig. 2. Use of GalT in the synthesis of *N*-acetyllactosamine analogs. Groups on the Gal residue where modifications are tolerated by the enzyme are shown inside squares in both the donor and the product. Groups on the GlcNAc residue where modifications are tolerated by the enzyme are circled in both the acceptor and the product. The individual analogs synthesized are shown in the product only and the reference corresponding to each analog is given in brackets adjacent to the specific chemical modification that is tolerated inside the square or the circle. For example, the synthesis of the analog of *N*-acetyllactosamine with a sulfur in the galactose ring was accomplished using a UDP-Gal analog with sulfur in the ring, and unmodified GlcNAc as acceptor, as reported in reference 54.

been replaced with a sulfur atom, remains an active substrate for the enzyme which has been used to synthesize 5'-thio-*N*-acetyllactosamine (54), an analog of *N*-acetyllactosamine which has increased resistance to galactosidases. The "carba" analog of UDP-Gal, where the ring oxygen is replaced by a methylene group, has also been synthesized but is not active as a donor (55).

B-2. Acceptor Specificity: βGlcNAc

As noted above, the enzyme can transfer also to Glc and

の酵素の活性基質であり、5'-チオ-N-アセチラクトサミンの合成に使われている(54)。このN-アセチラクトサミン類似体はガラクトシダーゼに対してより強い耐性を示す。Galの環酸素がメチレンで置換されたUDP-Galの"カルバ"類似体が合成されているが、供与体としては不活性である(55)。

B-2. 受容体特異性: βGlcNAc

先に触れたように、この酵素はグルコースを受容体とする

therefore functions in the synthesis of lactose. The specificity of the enzyme for the acceptor is extremely relaxed as a very large number of modified GlcNAc and Glc analogs are active as acceptors (Fig. 2.). Basically, GalT tolerates substitutions everywhere on the sugar ring as long as OH-4 remains available for glycosylation. The acetamido group can be replaced with a large number of amides (including alkylamido, benzamido *etc.*) (56), propionyl (28) and azido (57) resulting in even better acceptor properties. O-3 can be deoxygenated, O-methylated, O-allylated or oxidized to the ketone and still remain active as an acceptor though the rate of transfer is much slower (58). 6-O-Methylated (29,58) or α -L-fucosylated GlcNAc derivatives (29) remain fully active as acceptors. Addition of α -linked sialic acid to OH-6 of GlcNAc abolishes activity, but this can be restored if the carboxylic acid is present as its methyl ester (29).

The exceptional tolerance of this enzyme for modifications to the GlcNAc (or Glc) moiety is clear and further exemplified by the fact that it will transfer to 5-thio-Glc, 1-deoxy-nojirimycin and glucal which has a flattened conformation with a double bond between C1 and C2 (58). When the artificial acceptor 3-acetamido-3-deoxy-Glc is used, an unusual (1 $\rightarrow$ 1) (trehalose type) of linkage was formed (59). This has also been reported for *N*-acetylglucosamine and *N*-acetyl 5-thioglucoamine as acceptor substrates (60, 61).

Other examples of note are the transfer of galactose to *N*-acetylglucosamine or glucose acceptors bound to resins, including soluble polyacrylamide resins (62, 63), soluble light sensitive polymers (64, 65), silica based solid-supports (66) and polyethylene-polyacrylamide co-polymers for solid-phase glycopeptide synthesis (67).

C. *N*-Acetylglucosaminyltransferase I

UDP-GlcNAc: Mannoside(α 1 $\rightarrow$ 3)-R β (1 $\rightarrow$ 2)-*N*-acetylglucosaminyltransferase I (GlcNAcT-I, E. C. 2.4.1.101) is not commercially available but a synthetically useful partially purified preparation is obtainable from animal tissues (68, 69). The enzyme has been cloned yielding a much cleaner and more useful preparation thus enhancing its application in analog synthesis (35, 70-73). The enzyme requires, as a minimum substrate, a trisaccharide which in the natural glycoprotein substrates is the "tri-Man core": α Man(1 $\rightarrow$ 3)[α Man(1 $\rightarrow$ 6)] β Man-OR (Fig. 3). The reducing end β Man may be changed for β Glc, resulting in a trisaccharide that is easier to synthesize (74). Twelve oligosaccharide analogs have been synthesized using this enzyme.

C-1. Donor Specificity: UDP-GlcNAc

Each of the 3 mono-deoxygenated analogs of UDP-GlcNAc (Fig. 3) was chemically synthesized and found to be active as a donor, producing the expected deoxy-tetrasaccharides (48, 68). The 4-deoxy analog was the poorest sub-

stratum also, ラクトースの合成に関与している。非常に多くの修飾GlcNAcおよびGlc類似体が受容体として活性であることから判るように、この酵素の受容体に対する特異性は非常にゆるい(図2)。グリコシル化が起こるOH-4が残されていれば、GalTは原則として受容体のどの置換基が修飾されていても認識できる。アセタミド基は多くのアミド(アルキルアミド、ベンザミドなど)(56)と交換できるし、プロピオニルアミド基(28)やアジド基(57)に置換すればよりよい受容体となる。GlcNAcのO-3は、デオキシ化、O-メチル化、O-アリル化、あるいは酸化を行ってケトンにしても、反応速度はずっと遅いものの、受容体としてなお活性である(58)。O-6がメチル化された(29, 58)、あるいは α -L-フコース化された(29)GlcNAc誘導体は受容体として通常通りの活性を示す。GlcNAcのOH-6に α -グリコシド結合でシアル酸が結合したものは活性が完全に失われる。しかし、そのカルボン酸をメチルエステルに置き換えると活性は回復する(29)。

この酵素がGlcNAcの(あるいはGlc)修飾に対して寛容であることは明らかであり、5-チオ-Glc、1-デオキシノジリマイシンや、C1とC2の間の二重結合のため平たくつぶれたコンホメーションを持つグルカールが転移を受けることからさらに支持される(58)。合成受容体である3-アセタミド-5-デオキシ-Glcを用いると珍しい(1 $\rightarrow$ 1)結合(トレハロース型)が形成される(59)。N-アセチルグントサミンやN-アセチル 5-チオ-グントサミンを受容体としても同様の結果となる(60, 61)。

他の興味深い例として、N-アセチルグルコサミンやグルコースを可溶性ポリアクリルアミド樹脂(62, 63)、可溶性光感受性ポリマー(64, 65)、シリカゲル固相支持体(66)、ポリエチレン-ポリアクリルアミド共重合体(67)などに固定化したものを糖ペプチドの固相合成のために受容体として用いる例がある。

C. *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 I

UDP-GlcNAc: マンノシド(α 1 $\rightarrow$ 3)-R β (1 $\rightarrow$ 2)-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 I (GlcNAcT-I, E. C. 2.4.1.101)は市販されていない。しかし、酵素合成に使用可能な部分精製品は動物組織から調製できる(68, 69)。この酵素はクローニングされており、より容易に精製度が高いものが入手できるのでオリゴ糖類似体合成に活発に利用されている(35, 70-73)。この酵素が生合成において最小限必要とする受容体の構造は"tri-Manコア"、すなわち α Man(1 $\rightarrow$ 3)[α Man(1 $\rightarrow$ 6)] β ManORである(図3)。還元末端の β Manが β Glcに変換された三糖も受容体であり、これは合成が比較的容易である(74)。20例のオリゴ糖類似体がこの酵素を用いて合成されている。

C-1. 供与体特異性 :UDP-GlcNAc

可能な3つのUDP-GlcNAcデオキシ類似体(図3)が化学合成され、それぞれが供与体として活性であることが判り、予想されるデオキシ四糖が合成されている(48, 68)。この中では4-デオ

Fig. 3. Use of GlcNAcT-I in the synthesis of tetrasaccharide analogs. Modifications on the GlcNAc residue that are tolerated by the enzyme are shown inside squares and modifications on the trisaccharide acceptor that are tolerated by the enzyme are shown inside circles. The literature citation describing each modification is given in brackets.

strate.

C-2. Acceptor Specificity: $\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)[\alpha\text{Man}(1\rightarrow6)]\beta\text{Man}$ or Glc-OR

Recombinant GlcNAcT-I has proven especially useful in the synthesis of tetrasaccharide analogs which have been used to assess the specificity of the next GlcNAc-transferase (GlcNAcT-II) acting in the biosynthesis of complex Asn-linked oligosaccharides. GlcNAcT-I readily tolerates substitutions on the $\alpha\text{Man}(1\rightarrow6)$ residue, either deoxygenation or *O*-alkylation. OH-3 of this residue could be modified by 5 different alkyl groups, including a 4,4-azo-pentyl photoaffinity label (35). OH-4 of the $\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)$ residue, the mannose residue to which transfer occurs, could be *O*-methylated and still remain a

キシ類似体の活性が最も低い。

C-2. 受容体特異性: $\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)[\alpha\text{Man}(1\rightarrow6)]\beta\text{Man}$ または GlcOR

クローン化されたGlcNAcT-Iは、Asn型糖鎖の生合成において次に作用するGlcNAc糖転移酵素(GlcNAcT-II)の受容体特異性を調べるための四糖類似体の合成に適している。GlcNAcT-IIは $\alpha\text{Man}(1\rightarrow6)$ 残基上のデオキシ化、*O*-アルキル化などの置換に対しては影響を受けない。この残基のOH-3は4,4-アゾ-ペンチル光親和性ラベルを含む5つの異なるアルキル基によって修飾が可能である(35)。転移を受ける $\alpha\text{Man}(1\rightarrow3)$ 残基のOH-4はメチル化さ

good substrate (35).

D. $\alpha(1\rightarrow3/4)$ -Fucosyltransferases:

GDP-Fuc: $\beta\text{Gal}(1\rightarrow4/3)\text{GlcNAc}$ ($\alpha(1\rightarrow3/4)$ to GlcNAc) fucosyltransferase ($\alpha(1\rightarrow3/4)$ -FucT, E. C. 2.4.1.65) is one of an expanding family of fucosyltransferases designated FucT-III, IV, V, VI and VII that transfer to the secondary alcohol of the GlcNAc residue in $\beta\text{Gal}(1\rightarrow3)\text{GlcNAc}$ and/or $\beta\text{Gal}(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$ sequences (21, 75, 76) (Fig. 4). The products are the blood-group related antigenic determinants termed Lewis-a (Le^a) and Lewis-x (Le^x). The enzymes differ in their ability to utilize both sequences, and in their tolerance for sialic acid substitution at O-3 or fucose substitution at O-2 of the Gal residue in these acceptors. All five FucT's have been cloned, but they are not yet commercially available. The most convenient source for isolation of a preparatively useful enzyme is human milk (77). The milk enzyme preparation contains two FucT's, one acting on both Gal-GlcNAc sequences and the other only to *N*-acetylactosamine, the $\beta(1\rightarrow4)$ linked disaccharide. Since in preparative oligosaccharide and analog synthesis the structure of the acceptor is controlled, use of such a mixture of enzymes does not present any difficulty for preparative synthesis.

D-1. Donor Specificity: GDP-Fuc

The major stumbling block to the use of these enzymes was until recently the lack of a simple method for the synthesis of GDP-Fuc which only became commercially available 3 years ago. Several methods are now in use (14) and the methods are sufficiently mild to allow the synthesis of analogs also. Eight different GDP-Fuc analogs have been shown to transfer (Fig. 4). The simplest analogs are modified at C-6 by either removal of the methyl group (to give GDP-D-Ara) (78) or by addition of a hydroxyl group (to give GDP-L-Gal) (79) which can be further *O*-propylated (80). A doubly-modified derivative where OH-3 has been deoxygenated and C-6 has been hydroxylated (to give 3-deoxy-L-Gal) was also shown to be preparatively useful (79), all using the $\beta\text{Gal}(1\rightarrow3)\beta\text{GlcNAc-OR}$ as the acceptor for the human milk enzyme.

The fact that the Fuc-methyl group could be extended by a much larger *O*-propyl group suggested that this part of the fucose residue was exposed to water, so GDP-Fuc derivatives with very much larger substitutions were prepared and indeed found to be active. Substitution of C-6 of the Fuc residue in GDP-Fuc by an amino-group linked to a blood group B trisaccharide (Fig. 4) gave a compound that was used by the FucT to label red blood cells (80). Essentially any group can be attached at this position as was demonstrated by the transfer to *N*-acetylactosamine of a biotinylated fucose residue and a fucose residue carrying the blood group A trisaccharide attached through a squarate linker (81) (Fig. 4).

れてもまだ良好な基質である(35)。

D. $\alpha(1\rightarrow3/4)$ フコース転移酵素

GDP-Fuc: $\beta\text{Gal}(1\rightarrow4/3)\text{GlcNAc}$ ($\alpha(1\rightarrow3/4)$ to GlcNAc) フコース転移酵素 ($\alpha(1\rightarrow3/4)$ -FucT, E. C. 2.4.1.65) は $\beta\text{Gal}(1\rightarrow3)\text{GlcNAc}$ あるいは $\beta\text{Gal}(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}$ の GlcNAc 残基の二級水酸基に転移を起こす FucT-III、IV、V、VI、VII などと表記される一群のフコース転移酵素の一つである(21、75、76)(図4)。ルイス-a(Le^a)およびルイス-x(Le^x)と呼ばれる血液型関連抗原決定基が生成物となる。2つの受容体に対する特異性、これら受容体のGal残基のO-3におけるシアル酸の置換やO-2におけるフコースの置換に対する許容度などがこれらの酵素の違いとなってあらわれる。5つのFucTはすべてクローニングされているが、市販はされていない。合成用の酵素として一番簡単に単離出来るのは人乳のものである(77)。こうして単離された酵素は2つのFucTを含んでおり、ひとつは上記の2つの受容体両方に作用するものであり、もうひとつは $\beta(1\rightarrow4)$ 結合を持つ二糖である*N*-アセチルラクトサミンだけに作用するものである。オリゴ糖や類似体の合成においては受容体の構造はたいいていの場合単一のものを使うので、このような酵素の混合物を使っても何の支障もきたさない。

D-1. 供与体特異性: GDP-Fuc

GDP-Fucは3年前に市販されるようになったが、最近まで簡単な合成法がなかったことがこれらの酵素を使用する上での一番の障害であった。最近ではいくつかの合成法が見いだされており(14)、これらは類似体の合成を行うのにも充分マイルドな方法である。8つの異なるGDP-Fuc類似体が転移を受けることが判っている(図4)。一番簡単な類似体としては、C-6が除去されたもの(GDP-D-Ara)(78)やC-6に水酸基が付加されたもの(GDP-L-Gal)(79)、さらにその水酸基がプロピル化されたもの(80)などがある。OH-3がデオキシ化されC-6に水酸基が付加され、二重に修飾されたもの(3-デオキシ-L-Gal)も転移することが判っている(79)。受容体には $\beta\text{Gal}(1\rightarrow4)\beta\text{GlcNAc-OR}$ が用いられ、酵素は天然から単離されたものが用いられている。

フコースのメチル基に嵩高いプロピル基がついても活性があることから、この部分は酵素に認識されず水にむき出しになっていることが示唆される。そこでGDP-Fucに非常に大きな置換基がついたものを合成したところ、実際にこれが酵素の基質となることが示されている。血液型関連B型三糖(図4)が結合したアミノ基によりFucのC-6が置換されたGDP-Fucは、FucTにより赤血球細胞をラベルするのに用いられている(80)。ビオチンがついたフコース残基やA血液型三糖がスクアレートを介して結合したフコース残基が*N*-アセチルラクトサミンに転移する例で示されるように、基本的にこの位置にはどんな置換基でも結合することが可能である(81)(図4)。

Fig. 4. Use of FucT in the synthesis of trisaccharide analogs. Modifications on the Fuc residue that are tolerated by the enzyme are shown inside squares and modifications on the disaccharide acceptors that are tolerated by the enzyme are shown inside circles. The literature citation describing each modification is given in brackets. Inset A shows the variety of large substituents that have been attached at C-6 of the Fuc residue in GDP-Fuc and transferred to *N*-acetylglucosamine. Inset B summarizes the results of the systematic study of acceptor specificity by de Vries *et al.* (30) which found that only OH-6 of the Gal residue and the OH group to which the enzyme transfers are essential for acceptor recognition. These “key polar groups” are highlighted.

D-2. Acceptor Specificity: β Gal(1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc and/or β Gal(1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc

Several analogs of β Gal(1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc have been preparatively fucosylated. Most notably, the FucT accepts replacement of the GlcNAc residue in this disaccharide by Glc, by 5-thio-Glc (with sulfur in the ring) and by glucal (57). In addition, the acetamido group can be replaced by a variety of groups including other bulky *N*-acyl groups (82) as well as the azido group (82). Transfer also occurs to other "natural" sequences which may be viewed as analogs; namely β GalNAc(1 $\rightarrow$ 4) β GlcNAc (83).

The acceptor specificity of recombinant FucT-III, IV and V, and some of their truncated forms, has been mapped out in detail using chemically synthesized analogs of both β Gal(1 $\rightarrow$ 3) β GlcNAc and β Gal(1 $\rightarrow$ 4) β GlcNAc glycosides (30). Though preparative reactions were not carried out in that recent study, the summary is included in Fig. 4 to assist potential users of the FucT's in analog synthesis. Basically, substitutions of varying kinds, mostly deoxygenations, are tolerated at all position except at OH-6 of Gal and the OH-group to which the FucT's transfer, i.e. either OH-3 or OH-4 of the GlcNAc residues. As noted earlier, sialic acid substituted at O-3 of Gal, or fucose substituted at O-2 of Gal, are tolerated by some of the FucT's.

E. α (2 $\rightarrow$ 3) and α (2 $\rightarrow$ 6)-Sialyltransferases

There are four enzymes in this group, all of which use CMP-sialic acid (the only monophosphate donor in mammalian cells) as the donor and all transfer to either OH-3 or 6 of terminal Gal residues or OH-6 of GalNAc residues. They are most conveniently distinguished by their ability to utilize either β Gal(1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc and/or β Gal(1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc (*N*-acetylactosamine) sequences commonly found on *N*-linked oligosaccharides as opposed to either OH-3 of the terminal Gal residue in β Gal(1 $\rightarrow$ 3) α GalNAc or OH-6 of α -GalNAc residues found in *O*-linked glycopeptides. The enzymes have E.C. numbers 2.4.99.1, 2.4.99.3, 2.4.99.4 and 2.4.99.6. Their acceptor specificities are shown in Fig.5. The 2,3-sialyltransferase acting on *O*-linked structures (E.C. 2.4.99.1) and the 2,6-sialyltransferase acting on *N*-acetylactosamine (E.C. 2.4.99.4) are commercially available in milliunit quantity.

E-1. Donor Specificities: CMP-Sialic Acid

The breakthrough in the study of the donor-specificity of these enzymes came with the finding that CMP-sialic acid synthetase could accept many sialic acid analogs as substrates thereby providing convenient access to the necessary CMP-sialic acid analogs (84, 85). With the analogs then accessible, substrate specificities could be evaluated. Most of the donor-specificity studies regrettably determined only kinetic parameters for the transfer to glycoprotein substrates and the products

D-2. 受容体特異性: β Gal(1 $\rightarrow$ 3)GlcNAcあるいは β Gal(1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc

いくつかの β Gal(1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc類似体についてフコース転移を受けたものが合成されている。この二糖のGlcNAc残基をGlc、5-チオ-Glc(環硫黄類似体)やグルカルに置き換えても活性があるのは注目に値する(57)。さらに、アセタミド基を嵩高い*N*-アシル基やアジド基などに置き換えることも可能である(82)。類似体とも見せる“天然”二糖すなわち β GalNAc(1 $\rightarrow$ 4) β GlcNAcでも転移が起こる(83)。

クローン化されたFucT-III、IV、Vやそれらの活性断片の受容体基質特異性は化学合成された β Gal(1 $\rightarrow$ 3)GlcNAcや β Gal(1 $\rightarrow$ 4)GlcNAcの類似体を用いて調べられている(30)。この最近の研究ではプレパラティブな合成は行われていないが、将来FucTを類似体合成に用いる方のために図4にまとめを描いておいた。基本的には、GalのOH-6やGlcNAcのOH-3あるいはOH-4のように転移を受ける水酸基以外はデオキシ化などの置換に対して許容である。前記したように、GalのO-3がシアル酸で置換されていたり、GalのO-2がフコースで置換されていてもいくつかのFucTについては問題がない。

E. α (2 $\rightarrow$ 3)および α (2 $\rightarrow$ 6)シアル酸転移酵素

これまでに4つのシアル酸転移酵素が用いられており、これらは全てCMP-シアル酸(動物細胞で唯一のモノリン酸供与体)を供与体として末端のGal残基のOH-3か6あるいはGalNAc残基のOH-6に転移する。これらは、*N*-結合オリゴ糖によく見られる β Gal(1 $\rightarrow$ 3)GlcNAcや β Gal(1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc(*N*-アセチラクトサミン)を認識するのか、*O*-結合糖ペプチドに見られる β Gal(1 $\rightarrow$ 3)GalNAcの末端Gal残基のOH-3やGalNAc残基のOH-6を認識するのかにより大まかに分類できる。これらの酵素のE.C.ナンバーは2.4.99.1、2.4.99.3、2.4.99.4と2.4.99.6である。受容体特異性は図5に示してある。*O*-結合オリゴ糖に作用する2,3-シアル酸転移酵素(E.C. 2.4.99.1)と*N*-アセチラクトサミンに作用する2,6-シアル酸転移酵素(E.C. 2.4.99.4)はミリユニット単位で市販されている。

E-1. 供与体特異性: CMP-シアル酸

供与体特異性の研究は、CMP-シアル酸シンターゼが多くシアル酸類似体を受け入れることが発見され、結果としてCMP-シアル酸類似体をより容易に合成出来るようになったことがブレイクスルーとなって始まった(84, 85)。類似体が入手できれば、基質特異性を評価できるということである。残念ながら、多くの供与体特異性の研究は糖タンパク受容体への転移の速度パラメーターのみを求めるものであり、生成物の同定は行

Fig. 5. Use of a family of sialyltransferases in the synthesis of oligosaccharide analogs. The acceptor specificity of each of the enzymes, along with its E.C. number, are presented. Modifications on the sialic acid residue that are tolerated by the enzymes are shown inside squares while modifications on the disaccharide acceptors are shown inside circles. The literature citation describing each modification is given in brackets. Inset A summarizes the results of the systematic study of acceptor specificity by Wlasichuk *et al.* (31) and indicates that only OH-6 (the OH-group to which the enzyme transfers) and an amide grouping are "key polar groups" for 2,6-sialyltransferase while the 2,3-sialyltransferase requires an intact 3,4,6-triol system on the galactose unit.

were not structurally characterized. Nevertheless, important information was gained about the tolerance of these enzymes for derivatives of CMP-sialic acid, and therefore on their potential use in the synthesis of analogs of sialylated oligosaccharides.

While the members of this group of enzymes certainly differ qualitatively in their tolerance for transferring modified sialic acid residues, they do share the same basic donor-recognition pattern (Fig. 5). Numerous substitutions were tolerated at C-9, including the 9-fluoro and 9-azido derivatives and a large number of *N*-acylated analogs like *N*-benzamido and 9-hexanoylamido (85, 86). Even a 9-*N*-fluoresceinyl labeled CMP-sialic acid derivative was a substrate (87). The 9-amino precursor itself was either a very poor or inactive donor. Similarly, 9-*O*-acetyl sialic acid could be transferred, though poorly. CMP-*N*-glycolyl-neuraminic acid was also a good donor (84). 4-Deoxy-sialic acid could also be transferred from the sugar nucleotide by the 2,6-sialyltransferase acting on *N*-acetyl-lactosamine (88). Various *N*-acyl groups are tolerated by some of these enzymes (89).

E-2. Acceptor Specificities

The natural sequences acted on by the sialyltransferases are shown in Fig. 5 and were discussed above. Preparative synthesis using the sialyltransferases have targeted mostly the sialyl-Le^x and related tetrasaccharide analogs as potential anti-inflammatory agents. They have been used in the preparation of both natural and modified structures (90). Numerous substitutions of the *N*-acetyl group in *N*-acetyl-lactosamine are tolerated by the 2,3 sialyltransferase which also accepts lactose and 2-*O*-pivaloyl lactose as acceptors (90). The same situation is found for the 2,3-sialyltransferase acting on *O*-linked disaccharides where an azido group and an *N*-phthalimido group are tolerated by the enzyme. The 2,3-sialyltransferase also acts on lactal further enhancing the utility of the enzyme in the synthesis of analogs (57).

A thorough study on the ability of chemically-modified analogs to act as acceptors has been performed only for the $\alpha(2,3)$ and $\alpha(2,6)$ specific enzymes which act on *N*-linked structures (E.C. 2.4.99.1 and 6) and is summarized in Fig. 5 (31).

F. Conclusions

In all of the cases above, the glycosyltransferases were found to be remarkably flexible in their recognition of both the donor and acceptor substrates. While the rates of transfer are sometimes only near 1 % (or even less) of that of the natural reaction, such rates are nevertheless sufficient for the production of milligram, or larger, quantities of the product oligosaccharide analogs. In each case, however, there were some substitutions that the enzymes simply would not tolerate, most notably the deletion of one of a small number of key-polar groups.

われていない。しかしながら、これらの酵素に対するCMP-シアル酸誘導体の許容度に関する情報が得られており、シアル化されたオリゴ糖類似体を合成する際に有用な情報となるであろう。

これらの酵素のCMP-シアル酸類似体に対する基質特異性はそれぞれ若干違うが、基本的には同様の認識パターンを示す(図5)。9-フルオロ、9-アジド誘導体やN-ベンズアミド、9-ヘキサノイルアミドなどの多くのN-アシル類似体のC-9への置換は許容である(85、86)。9位をフルオレセインアミドでラベルしたCMP-シアル酸ですら基質となる(87)。9-アミノ前駆体自身は不活性あるいは活性の弱い供与体である。CMP-N-グリコリル-ノイラミン酸は良い供与体基質となる(84)。4-デオキシ-シアル酸は2,6-シアル酸転移酵素により相当する糖ヌクレオチドからN-アセチラクトサミンに転移される(88)。様々なN-アシル基はこの酵素に対して許容である(89)。

E-2. 受容体特異性

上述したシアル酸転移酵素により認識される天然型糖鎖は図5に示してある。シアル酸転移酵素を用いた合成では、主に抗炎症薬として期待されるシアルLe^xと関連する四糖をターゲットとしている。これらの酵素は天然型と類似体の両方の合成に用いられている(90)。2,3 シアル酸転移酵素ではN-アセチラクトサミンのN-アセチル基の置換に対して許容であり、2-*O*-ピバロイルラクトースも受容体となる(90)。同様のことがO-結合二糖に作用する2,3 シアル酸転移酵素にも見いだされており、アジド基やN-フタルイミド基に置換されたものでも転移を受ける。2,3 シアル酸転移酵素がラクトールにも作用する事はこの酵素が類似体合成に有用であることを示している(57)。

化学修飾された受容体に関する研究は、N-結合糖鎖に作用する $\alpha(2\rightarrow3)$ および $\alpha(2\rightarrow6)$ 特異的酵素(E.C. 2.4.99.1と6)についてのみ行われており、図5にまとめてある(31)。

F. 結 論

糖転移酵素は、上記したすべての場合において供与体、受容体の両方の認識について非常に柔軟性がある。転移速度が天然の基質に比べて1%以下しかない場合もあるが、この程度ならミリグラムスケールのオリゴ糖類似体の合成には十分である。しかし、酵素が受け入れない基質の修飾がそれぞれの場合について存在し、鍵極性基をひとつでも除去した場合には全く認識

As more glycosyltransferases become available, along with better methods for sugar nucleotide synthesis, we expect the same situation to hold, *i.e.* these enzymes will be very useful in the synthesis of a large number, but not all desired oligosaccharide analogs. Glycosyltransferases may therefore be most effectively thought of as synthetic adjuncts in the synthesis of oligosaccharide analogs.

G. Acknowledgments

This review was prepared while on sabbatical leave at the RIKEN Institute. The authors acknowledge the support of Professor Tomoya Ogawa for making this sabbatical leave possible. Funding from the Japan Society for the Promotion of Science and the RIKEN Institute is gratefully acknowledged.

されなくなる。

より多くの糖転移酵素が入手可能となり、糖ヌクレオチドのより良い合成法が開発されても同じ事が言える。すなわち、これらの酵素はほとんどのオリゴ糖類似体の合成に有用だが望む全てのものを合成出来るわけではない。したがって、糖転移酵素はオリゴ糖類似体の合成において補助的なものと考えるのが賢明であろう。

東京工業大学・生命理工学部・生命理学

湯浅 英哉 記

References

- Varki, A. (1993) *Glycobiology* **3**, 97–130
- Karlsson, K.-A. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, in press
- Phillips, M.L., Nudelman, E., Gaeta, F.C.A., Perez, M., Singhal, A.K., Hakomori, S., and Paulson, J.C. (1990) *Science* **250**, 1130–1132
- Walz, G., Aruffo, A., Kolanus, W., Bevilacqua, M., and Seed, B. *Science* **250**, 1132–1135
- Lowe, J.B. (1994) in *Molecular Glycobiology* (Fukuda, M., and Hindsgaul, O., eds.) pp. 163–205, Oxford University Press
- Hakomori, S. (1989) *Adv. Cancer Res.* **52**, 257–331
- Dennis, J.W. (1988) *Cancer Surveys* **7**, 753–794
- Paulsen, H. (1990) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **29**, 823–839
- Sinay, P. (1991) *Pure Appl. Chem.* **63**, 519–528
- Kanie, O., and Hindsgaul, O. (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 674–681
- Toone, E.J., Simon, E.S., Bednarski, M.D., and Whitesides, G.M. (1989) *Tetrahedron* **45**, 5365–5422
- David, S., Auge, C., and Gautheron, C. (1991) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **49**, 175–237
- Drueckhammer, D.G., Hennen, W.J., Pederson, R.L., Barbas, C.F., Gautheron, C.M., Krach, T., and Wong, C.-H. (1991) *Synthesis*, 499–525
- Ichikawa, Y., Look, G.C., and Wong, C.-H. (1992) *Anal. Biochem.* **202**, 215–238
- Wong, C.-H., Halcomb, R.L., Ichikawa, Y., and Kajimoto, T. (1995) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **34**, 521–546
- Crawley, S.C., and Palcic, M.M. (1995) in *Modern Methods in Carbohydrate Synthesis* (Khan, S. H., and O'Neill, R. A., eds.) pp. 492–517, Harwood Academic Publishers
- Paulson, J.C., and Colley, K.J. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 17615–17618
- Kleene, R., and Berger, E.G. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1154**, 283–325
- Lowe, J.B. (1991) *Seminars Cell Biol.* **2**, 289–307
- Schachter, H. (1994) in *Molecular Glycobiology* (Fukuda, M., and Hindsgaul, O., eds.) pp. 88–162, Oxford University Press
- Beyer, T.A., Sadler, J.E., Rearick, J.L., Paulson, J.C., and Hill, R.L. (1982) *Adv. Enzymol.* **52**, 23–175
- Lemieux, R.U. (1989) *Chem. Soc. Rev.* **18**, 347–374
- Du, M.-H., Spohr, U., and Lemieux, R.U. (1994) *Glycononj. J.* **11**, 443–461
- Bundle, D.R., and Young, M.N. (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 666–673
- Glaudemans, C.P.J. (1991) *Chem. Soc. Rev.* **91**, 25–33
- Sierks, M.R., Bock, K., Refn, S., and Svensson, B. (1992) *Biochemistry* **31**, 8972–8977
- Striker, R.T., Nilsson, U., Stonecipher, A., Magnusson, G., and Hultgren, S.J. (1995) *Mol. Microbiol.* **16**, 1021–1029
- Berliner, L.J., Davies, M.E., Ebner, K.E., Beyer, T.A., and Bell, J.E. (1984) *Mol. Cell. Biochem.* **62**, 37–42
- Palcic, M.M., Srivastava, O.P., and Hindsgaul, O. (1987) *Carbohydr. Res.* **159**, 315–324
- deVries, T., Srnka, C.A., Palcic, M.M., Sweidler, S.J., van den Eijnden, D.H., and Macher, B.A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 8712–8722
- Wlasichuk, K.B., Kashem, M.A., Nidra, P.V., Bird, P., Jiang, C., and Venot, A.P. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 13971–13977
- Kuhns, W., Rutz, V., Paulsen, H., Matta, K.L., Baker, M.A., Barner, M., Granovsky, M., and Brockhausen, I. (1993) *Glycoconj. J.* **10**, 381–394
- Kanie, O., Crawley, S.C., Palcic, M.M., and Hindsgaul, O. (1994) *Bioorg. Med. Chem.* **2**, 1231–1241
- Khan, S.H., Duus, J.O., Crawley, S.C., Palcic, M.M., and Hindsgaul, O. (1994) *Tetrahedron: Asymmetry* **5**, 2415–2435
- Reck, F., Springer, M., Paulsen, H., Brockhausen, I., Sarkar, M., and Schachter, H. (1995) *Carbohydr. Res.* **259**, 93–101
- Reck, F., Meinjohanns, E., Springer, M., Wilkens, R., van Dorst, J.A.L.M., Paulsen, H., Moller, G., Brockhausen, I., and Schachter, H. (1994) *Glycoconj. J.* **11**, 210–216
- Lowary, T.L., and Hindsgaul, O. (1993) *Carbohydr. Res.* **249**, 163–195
- Lowary, T.L., and Hindsgaul, O. (1994) *Carbohydr. Res.* **251**, 33–67
- Hill, R.L., and Brew, K. (1975) *Adv. Enzymol.* **43**, 411–490

40. Thiem, J., and Wiemann, T. (1991) *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* **30**, 1163–1164
41. Thiem, J., and Wiemann, (1992) *Synthesis* 141–145
42. Wong, C.-H., Wang, R., and Ichikawa, Y. (1992) *J. Org. Chem.* **57**, 4343–4344
43. Srivastava, G., Hindsgaul, O., and Palcic, M. M. (1993) *Carbohydr. Res.* **245**, 137–144
44. Palcic, M.M., and Hindsgaul, O. (1991) *Glycobiology* **1**, 205–209
45. Do, K.-Y., Do, S.-I., and Cummings, R.D. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 18447–18451
46. Chiu, M.H., Tamura, T., Wahhwa, M.S., and Rice, K. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 16195–16202
47. Hooper, L.V., Hindsgaul, O., and Baenziger, J.U. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 16327–16332
48. Hindsgaul, O., Kaur, K.J., Gokhale, U.B., Srivastava, G., Alton, G., and Palcic, M.M. (1991) *ACS Symp. Ser.* **466**, 38–50
49. Berliner, L.J., and Robinson, R.D. (1982) *Biochemistry* **21**, 6340–6343
50. Kodama, H., Kajihara, Y., Endo, T., and Hashimoto, H. (1993) *Tetrahedron Lett.*, **34**, 6419–6422
51. Kajihara, Y., Endo, T., Ogasawara, H., Kodama, H., and Hashimoto, H. (1995) *Carbohydr. Res.* **269**, 273–294
52. Arlt, M., and Hindsgaul, O. (1995) *J. Org. Chem.* **60**, 14–15
53. Andree, P.J., and Berliner, L.J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **544**, 489–495
54. Yuasa, H., Hindsgaul, O., and Palcic, M.M. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 5891–5892
55. Yuasa, H., Palcic, M. M., and Hindsgaul, O. *Can. J. Chem.*, in press
56. Oehrlein, R., Ernst, B., and Berger, E.G. (1992) *Carbohydr. Res.* **236**, 335–338
57. Ichikawa, Y., Lin, Y.-C., Dumas, D.P., Shen, G.-J., Garcia-Junceda, E., Williams, M.A., Bayer, R., Ketcham, K., Walker, L. E., Paulson, J. C., and Wong, C.-H. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 9283–9298
58. Wong, C.-H., Ichikawa, Y., Krach, T., Gautheron-Le Narvor, C., Dumas, D.P., and Look, G.C. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 8137–8145
59. Nishida, Y., Wiemann, T., Sinnwell, V., and Thiem, J. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 2536–2537
60. Nishida, Y., Wiemann, T., and Thiem, J. (1992) *Tetrahedron Lett.* **33**, 8043–8046
61. Nishida, Y., Wiemann, T., and Thiem, J. (1993) *Tetrahedron Lett.* **34**, 2905–2906
62. Nishimura, S.-I., Lee, K.B., Matsuoka, K., and Lee, Y.C. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 249–254.
63. Matsuoka, K., and Nishimura, S.-I. (1995) *Macromolecules* **28**, 2961–2968
64. Wiemann, T., Taubken, N., Zehavi, U., and Thiem, J. (1994) *Carbohydr. Res.* **257**, C1–C6
65. Kopper, S. (1994) *Carbohydr. Res.* **265**, 161–166
66. Schuster, M., Wang, Wang, P., Paulson, J. C., and Wong, C.-H. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 1135–1136
67. Meldal, M., Auzanneau, F.-I., Hindsgaul, O., and Palcic, M. M. (1994) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1849–1850
68. Srivastava, G., Alton, G., and Hindsgaul, O. (1990) *Carbohydr. Res.* **207**, 259–276
69. Kaur, K. J., Alton, G., and Hindsgaul, O. (1991) *Carbohydr. Res.* **210**, 145–153
70. Sarkar, M., Hull, E., Nishikawa, Y., Simpson, R.J., Moritz, R.L., Dunn, R., and Schachter, H. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 234–238
71. Kumar, R., Yang, J., Larsen, R.D., and Stanley, P. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9948–9952
72. Kumar, R., Yang, J., Eddy, R.L., Byers, M. G., Shows, T. B., and Stanley, P. (1992) *Glycobiology* **2**, 383–393
73. Nishiu, J., Kioka, N., Fukada, T., Sakai, H., and Komano, T. (1995) *Biosci. Biotech. Biochem.* (1995) **59**, 1750–1752
74. Kaur K.J., and Hindsgaul, O. (1991) *Glycoconj. J.* **8**, 90–94
75. Macher, B.A., Holmes, E.H., Swiedler, S.J., Stults, C.L.M., and Srnka, C.A. (1991) *Glycobiology* **1**, 577–584
76. Mollicone, R., Reguigne, I., Fletcher, A., Aziz, A., Rustam, M., Weston, B. W., Kelly, R. J., Lowe, J. B., and Oriol, R. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 12662–12671
77. Palcic, M. M. (1994) *Methods Enzymol.* **230**, 300–316
78. Gokhale, U.B., Hindsgaul, O., and Palcic, M.M. (1990) *Can. J. Chem.* **68**, 1063–1071
79. Stangier, K., Palcic, M.M., and Thiem, J. (1994) Abstract B 2.70 of the XVII th International Carbohydrate Symposium, Ottawa Canada July 17–22
80. Srivastava, G, Kaur, K. J., Hindsgaul, O., and Palcic, M. M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 22356–22361
81. Hallgren, C., and Hindsgaul, O. (1995) *J. Carbohydr. Chem.* **14**, 453–464
82. Nikrad, P.V., Kashem, M.A., Wlasichuk, K.B., Alton, G., and Venot, A.P. (1993) *Carbohydr. Res.* **250**, 145–160
83. Bergwerff, A.A., van Kuik, J.A., Schiphorst, W.E.C.M., Koeleman, C.A.M., van den Eijnden, D.H., Kamerling, J.P., and Vliegenthart, J.F. G. (1993) *FEBS Lett.* **334**, 133–138
84. Higa, H.H., and Paulson, J.C. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 8838–8849
85. Gross, H.J., Bunsch, A., Paulson, J.C., and Brossmer, R. (1987) *Eur. J. Biochem.* **168**, 595–602
86. Gross, H.J., Rose, U., Krause, J. M., Paulson, J.C., Schmid, K., Feeney, R.E., and Brossmer, R. (1989) *Biochemistry* **28**, 7386–7392
87. Gross, H.J., and Brossmer, R. (1988) *Eur. J. Biochem.* **177**, 583–589
88. Gross, H.J., and Brossmer, R. (1987) *Glycoconj. J.* **4**, 145–156
89. Sticher, U., Gross, H.J., and Brossmer, R. (1991) *Glycoconj. J.* **8**, 45–54
90. Ito, Y., Gaudino, J.J., and Paulson J. C. (1993) *Pure Appl. Chem.* **65**, 753–762

Received on October 16, 1995, accepted on October 20, 1995