

## 微生物のエンドグリコシダーゼの糖転移活性を利用した 生理活性複合糖質の合成

京都大学大学院 生命科学研究所

山本 憲二

### 1. はじめに

糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質はタンパク質や脂質に糖鎖が結合した構造を持ち、動物の諸臓器や植物の各種組織、微生物の細胞膜・細胞壁などに広く存在する生体の構成成分である。これらの複合糖質が果している生理的な役割については近年までほとんど明らかにされていなかった。それらの糖鎖部分は、せいぜいタンパク質部分や脂質部分の構造の保持にのみ役立っているに過ぎないと考えられていたからである。ところが、ヒトのABO式血液型の抗原特異性が赤血球膜上に存在する複合糖質の糖鎖部分に発現していることが見出されて以来、細胞間の認識現象を初めとして、生体の発生や分化、あるいは悪性腫瘍の発症など、さまざまな生命現象に複合糖質の糖鎖が重要な役割を果たしていることが徐々に知られるようになった。そして、ここ数十年の間にこの分野の研究は実に目覚ましく発展し、糖鎖は核酸、タンパク質と並んで「第三の鎖」と呼ばれ、この分野の研究は「糖鎖生物学」「糖鎖工学」として「遺伝子工学」や「タンパク工学」と並び称されるまでになるとともに、ポストゲノムを担う重要なターゲットの分野と位置付けられるようになって来た。

「糖鎖工学」の重要な課題の一つはある物質に糖鎖を付加すること、あるいは糖鎖を改変することによって目的の機能をその物質に賦与しようと言うことである。しかし、遺伝子工学やタンパク工学が遺伝子やタンパク質を“切ったり貼ったり”あるいは“置き換えたり”する技術によって、ある程度それらを改変でき得るようになって来たにもかかわらず、遺伝子工学やタンパク工学だけでは実現できない機能の付加、つまり糖鎖の付加や改変を目的とする糖鎖工学においては、その技術が未だそのレベルには達していない。糖鎖を人為的にタンパク質に付加する手段として、最近ではさまざまな糖転移酵素 (glycosyltransferase) が注目され、その遺伝子クローニングが盛んに行われている。しかし、糖転移酵素は糖ヌクレオチドの存在下で一つの糖のみを受容体に付加することが可能で、糖鎖のような複雑な多糖を合成する手段としては不適である。

最近、私たちは微生物のエンドグリコシダーゼの糖転移活性を用いることによって、従来では不可能と考えられていた「糖鎖を他の化合物に付加する」ことに成功した。ここでは不可能を可能にしたツールである微生物のエンドグリコシダーゼとその糖転移活性を用いた生理活性複合糖質の合成について紹介したい。

### 2. エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ

オリゴ糖や複合糖質の糖鎖の非還元末端から単糖を加水分解して遊離するエキソ型グリコシダーゼとは異なり、エンド型グリコシダーゼは内部の構造を認識して作用し、糖鎖を遊離することができる酵素である。糖鎖とタンパク質あるいは脂質の両方を傷つけることなく遊離することができるためにさまざまな糖鎖の構造解析や機能解析に有用な手段となっている。

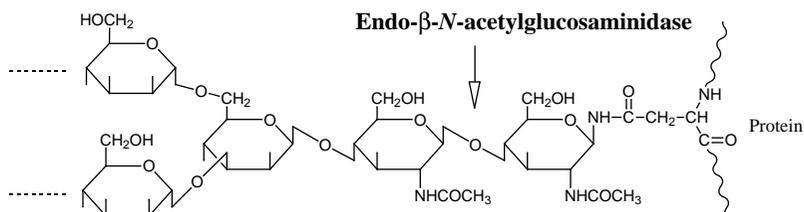


Fig.1. Enzymatic action of Endo-β-N-acetylglucosaminidase.

エンドグリコシダーゼは1971年に村松が肺炎双球菌の培養液中にマウスの免疫グロブリンの糖鎖を外す酵素として見出したのが最初の発見である<sup>1)</sup>。この酵素はタンパク質のアスパラギン残基に結合する *N*-グリコシド結合糖鎖（アスパラギン結合糖鎖）に作用し、糖鎖とタンパク質との結合部にあるジアセチルキトビオース（*N*-acetylglucosaminyl β-1,4 *N*-acetylglucosaminide; GlcNAc-GlcNAc）部分を切断して糖鎖を遊離する酵素で、エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ（Endo-β-GlcNAc-ase）と呼ばれている。アミダーゼの一種でタンパク質のアスパラギン残基との結合部から糖鎖を遊離するペプチド *N*-グリカナーゼとは異なって、タンパク質側に *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）一残基を残すという特徴的な作用を示す酵素である（Fig.1）。本酵素は微生物のみならず動物や植物の組織など、広い起源に見出されるが、最も良く研究されているのは微生物起源の酵素である。微生物の Endo-β-GlcNAc-ase は、通常三つに分類されるアスパラギン結合糖鎖（高マンノース型、混成型、複合型）の中でもマンノース（Man）のオリゴマーからなる高マンノース型糖鎖と混成型糖鎖（高マンノース型と複合型が混成した糖鎖構造を持つ）に作用する。放線菌 *Streptomyces plicatus* 由来の酵素 Endo-H<sup>2)</sup> は糖鎖生物学や細胞生物学の分野において糖タンパク質糖鎖の解析に最も一般的に用いられているエンドグリコシダーゼであるが、高マンノース型糖鎖に非常に良く作用する一方、動物のほとんどの糖タンパク質に見られる複合型糖鎖には全く作用しない。複合型糖鎖は高マンノース型糖鎖とは異なってシアル酸（NeuAc）やガラクトース（Gal）、GlcNAc、Man など、多様な糖から構成されている。

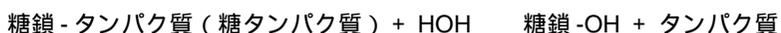
1982年、Elder と Alexander は *Flavobacterium meningosepticum* の培養液中に複合型糖鎖に作用する新奇な Endo-β-GlcNAc-ase（Endo-F）を見出した<sup>3)</sup>。Endo-F は異なった基質特異性を持つ3種類のアイソザイムからなり、その主成分である Endo-F1 は高マンノース型糖鎖にのみ作用する酵素であるが<sup>4)</sup>、他の Endo-F2、Endo-F3 は複合型糖鎖に作用する<sup>5)</sup>。私たちも土壌より単離した糸状菌 *Mucor hiemalis* の培養液中に複合型糖鎖に作用する Endo-β-GlcNAc-ase を見出し、その起源に因んで Endo-M と名づけた<sup>6)</sup>。本酵素は高マンノース型、混成型、複合型のいずれの糖鎖に対しても作用する広い基質特異性を持った酵素で、非還元末端にシアル酸を含むシアロ複合型糖鎖にも作用するという従来の微生物の酵素とは異なった特異性を持っている<sup>7,8)</sup>。

### 3. エンドグリコシダーゼの糖転移活性

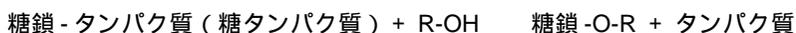
多くのグリコシダーゼはグリコシド結合を分解して糖を遊離する加水分解活性とともに、遊離した糖を水酸基を持つ化合物に転移する糖転移活性を併せ持っている。糖転移反応は

糖の加水分解反応の特別な反応であると考えられる。すなわち，加水分解反応はグリコシダーゼの作用によって基質から遊離した糖が水に転移する反応であると考えられ，一方，糖転移反応は基質から遊離した糖が水の代わりに水酸基を持つ化合物へ転移する反応である<sup>9)</sup>。エキソグリコシダーゼの糖転移活性はさまざまなオリゴ糖の酵素合成に利用されているが，一方，エンドグリコシダーゼの糖転移活性についてはあまり良く知られていない。しかし，エンドグリコシダーゼが糖転移活性を有していれば，糖タンパク質や糖脂質の糖鎖を遊離して水酸基を持つ化合物に転移し付加することができると考えられる。これは糖鎖をさまざまな化合物に付加することが可能であると考えられ，グリコシレーションの手段としてエンドグリコシダーゼの糖転移活性を活用できることを意味する。

エンドグリコシダーゼの加水分解反応：

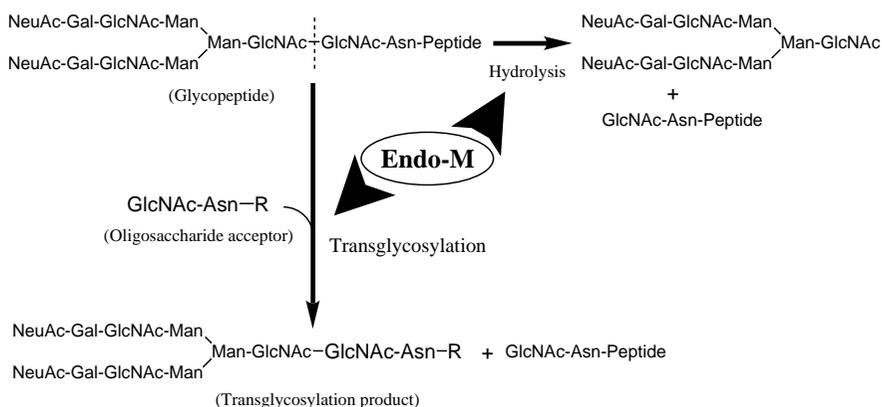


エンドグリコシダーゼの糖転移反応：



エンドグリコシダーゼの糖転移活性は，1986年にTrimbleらによってEndo-Fで初めて見出された<sup>10)</sup>。すなわち，ニワトリ卵白より得られるMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Asnの構造を有するアスパラギン結合高マンノース型糖鎖(GP-V)にEndo-Fを作用すると糖鎖が遊離するとともに，遊離した糖鎖がEndo-F酵素標品の安定化剤として混在していたグリセロールに転移付加することを見出した。その後，竹川らによって*Arthrobacter protophormiae*のEndo-β-GlcNAcase(Endo-A)も糖転移活性を有することが見出された<sup>11)</sup>。Endo-Aは高マンノース型糖鎖にのみ作用する酵素であるが，GlcNAcやグルコースの存在下で糖ペプチドを加水分解すると，加水分解反応によって遊離した糖鎖が単糖に転移付加して，見かけの加水分解活性が上昇するという結果が観察されたことから本酵素の糖転移活性が見出された。

私たちもEndo-Mが糖転移活性を有することを見出した<sup>12)</sup>。すなわち，複合型二本鎖糖鎖を有するヒト血清トランスフェリンの糖ペプチドに本酵素を作用させると糖鎖が遊離される一方，GlcNAcあるいはGlcNAcを含む適当な受容体が存在すると，遊離した糖鎖がその受容体のGlcNAc部分に転移付加することを見出した(Fig.2)。



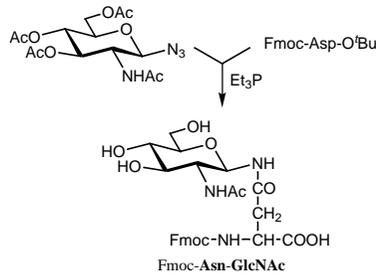
NeuAc: N-acetylneuraminic acid (sialic acid), Gal: galactose, GlcNAc: N-acetylglucosamine, Man: mannose

Fig.2. Enzymatic action of Endo-β-N-acetylglucosaminidase from *Mucor hiemalis* (Endo-M).

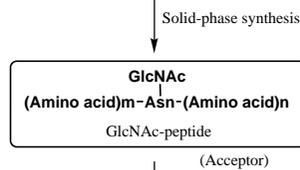
#### 4. 生理活性糖ペプチドの化学-酵素合成

Endo-MはGlcNAcのみならず, GlcNAcにアスパラギンが付いた4-L-アスパルチルグリコシラミンやその誘導体に糖鎖を転移することができる。すなわち, ペプチドやタンパク質のアスパラギン残基にGlcNAcを付けてやればEndo-Mによる糖転移反応によって糖鎖が付加され, 糖ペプチドや糖タンパク質を合成することができる。ペプチドやタンパク質に糖鎖を付けることによって分解酵素からの防御, あるいは安定化や生理活性の付与などが可能となる。そこで, 私たちは生理活性を持つペプチドにEndo-Mを用いて糖鎖を付加することを試みた。その化学-酵素合成法( Chemo-enzymatic method )をFig.3 に示した<sup>13)</sup>。ストラテジーの第一段階はペプチドのアスパラギン残基にGlcNAcを付けた*N*-アセチルグルコサミニルペプチドを合成するための材料であるグリコシルアスパラギンの化学合成である。すなわち, GlcNAcのアジドとFmoc ( 9-fluorenylmethyloxycarbonyl )-アスパラギン酸のブチルエステルを材料としてFmoc-Asn-GlcNAcを合成する<sup>14)</sup>。第二段階は, これをFmoc-Asnに替わる原料として用いてFmoc法によるペプチド固相合成を展開し, *N*-アセチルグルコサミニルペプチドを合成する。第三段階は, この*N*-アセチルグルコサミニルペプチドにEndo-Mの糖転移活性によって糖鎖供与体から糖鎖を転移付加して糖ペプチドを合成する。私たちはこの化学-酵素合成法によって多くの生理活性糖ペプチドの合成に成功した。

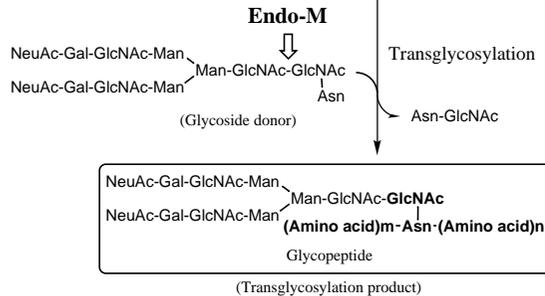
##### 1. Glycosylasparagine synthesis



##### 2. *N*-Acetylglucosaminyl peptide synthesis



##### 3. Transglycosylation reaction of Endo-M

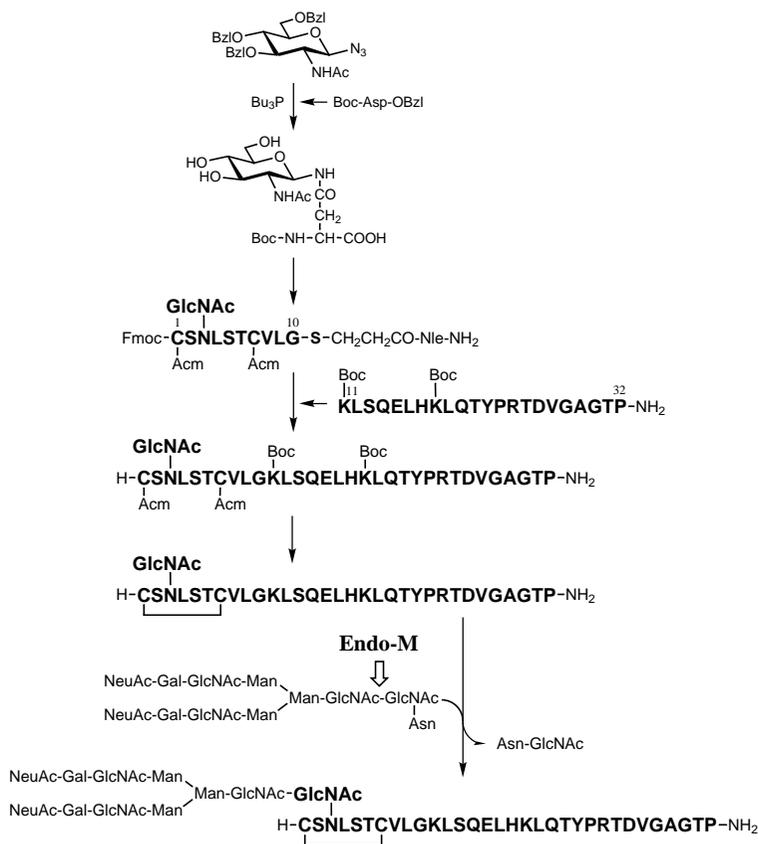


Fmoc-Asp-OtBu: Fmoc-aspartic acid  $\alpha$ -*t*-butyl ester, Et<sub>3</sub>P: triethylphosphine

Fig.3. Strategy of chemo-enzymatic synthesis of glycopeptide.

ペプチド-Tは8つのアミノ酸からなるペプチド (ASTTTNYT)で、HIVが細胞のレセプターへ結合するのを阻害することからエイズの治療薬と考えられている<sup>15)</sup>。私たちはペプチド-Tの安定化と分解酵素からの防御を目的として、上記のストラテジーに従って、Endo-Mの糖転移活性により糖鎖を付加することを試みた。先ず、ペプチド-Tのアスパラギン残基にGlcNAcを付けたN-アセチルグルコサミニルペプチド-Tを合成した。これを受容体とし、シアロ複合型糖鎖を持つヒト血清トランスフェリン糖ペプチドを糖鎖の供与体として、Endo-Mによる糖転移反応によりシアロ複合型糖鎖を導入したペプチド-Tを酵素合成して、HPLCによって単離した<sup>16)</sup>。

従来、ペプチダーゼなどの分解酵素による壊変を防ぐために、ペプチド-Tのセリンやスレオニン残基にグルコースやラクトースを付加した化合物が合成されていた<sup>17)</sup>。そこで、シアロ複合型糖鎖を導入したペプチド-Tについてプロテアーゼによる分解を調べたところ、nativeのペプチド-TやN-アセチルグルコサミニルペプチド-Tに比べて著しく安定であることが示された<sup>16)</sup>。



Bzl: benzyl, Boc-Asp-OBzl: Boc(*tert*-butyloxycarbonyl)-aspartic acid benzyl ester,  $Bu_3P$ : tri-*n*-butylphosphine, Acetylcholine methyl

Fig.4. Procedure for synthesizing calcitonin glycopeptide.

カルシトニン<sup>18</sup>はカルシウム調節ホルモンとして、骨からのカルシウムの溶出を抑制する機能を果たす生理活性ペプチドで、骨粗鬆症に効果があることが知られている。32個のアミノ酸からなるこのペプチドはN-末端から3番目にアスパラギン残基を有する。私たちはこのアスパラギン残基にGlcNAcを導入したペプチドを合成した後、Endo-Mの糖転移活性を用いてシアロ複合型糖鎖を付加し、カルシトニンの糖ペプチドを得た<sup>18</sup>。その化学-酵素合成法の概要をFig.4に示した。まず、GlcNAcを付けたアスパラギン残基を含むN-末端から10残基のアミノ酸からなるFmoc-ペプチド(CSNLSTCVLG)にチオエステルセグメントを付けた化合物とN-末端の11番目から32番目までのアミノ酸からなるBoc-ペプチド(KLSQELHKLQTYPRTDVGAGTP)のアミド化合物を別々に固相合成し、これらをチオエステル法によって縮合して、N-アセチルグルコサミニルカルシトニンを合成した。これにEndo-Mの糖転移活性によってヒト血清トランスフェリン糖ペプチドのシアロ複合型糖鎖を付加した。得られた糖ペプチドを破骨細胞のアクチンリングの形成の障害を指標として、*in vitro*による生理活性を調べたところ、nativeのカルシトニンに比べて生理活性はやや低下するものの、十分な活性が保持されていた<sup>19</sup>。

## 5. グルタミン結合糖鎖を持つ生理活性糖ペプチドの化学-酵素合成

自然界において、糖タンパク質や糖ペプチドのN-グリコシド結合糖鎖は-Asn-X-Thr/Ser-と言う共通のトリペプチド配列のアスパラギン残基に結合することが知られている。しかし、Endo-Mの糖転移活性を利用する化学-酵素合成法を用いれば、アスパラギン残基さえあれば、どのようなアミノ酸配列を持ったペプチドにも糖鎖を付けることが可能である。この点が、この化学-酵素合成法による糖ペプチド合成の最大の利点と考えられる。しかしながら、アスパラギンを構成アミノ酸に持たないペプチドも存在する。

サブスタンスPは知覚ニューロン伝達物質で、血圧を低下させるなどの生理作用を持つ生理活性ペプチドである。11のアミノ酸からなるこのペプチド(RPKPQQFFGLM)はアスパラギンを構成アミノ酸として持たない。このようなペプチドにN-グリコシド結合糖鎖が付加することは自然界においてはありえず、従って、サブスタンスPの糖ペプチドを生合成することは遺伝子操作によっても不可能である。一方、Endo-MはGlcNAc-Asnと同様にGlcNAc-Glnにも糖鎖を付加することができる。そこで、私たちはサブスタンスPの構成アミノ酸としてグルタミンが存在することに着目し、グルタミン残基にGlcNAcを付けたペプチドを合成して、これにニワトリ卵黄より得られるシアロ複合型二本鎖糖鎖を持つ糖ペプチドの糖鎖をEndo-Mの糖転移活性を利用して転移付加し、「グルタミン結合糖鎖」を持つ非天然型の新奇な糖ペプチドを得ることを試みた。すなわち、N-末端から5番目と6番目に存在するグルタミン残基のそれぞれに糖鎖を付加したサブスタンスP糖ペプチドを化学-酵素合成した<sup>20</sup>(Fig.5)。これらの糖ペプチドについてモルモット回腸の縦走筋の収縮活性を測定することにより生理活性を調べたところ、N-末端から5番目のグルタミン残基に糖鎖を導入したサブスタンスP糖ペプチドはnativeのサブスタンスPとほぼ同じ程度の生理活性を有していた。一方、N-末端から6番目のグルタミン残基に糖鎖を導入したサブスタンスP糖ペプチドの生理活性は著しく低下した。サブスタンスPの生理活性に関与する部位はC-末端側にあるとされているので、C-末端側に近い6番目のグルタミン残基に糖鎖が導入されることにより、立体障害が起きて活性が低下すると考えられる。また、サブスタンスPはジペプチジルカルボキシペプチダーゼであるアンジオテンシン変換酵素(ACE)によって分解されるが、サブスタンスPの糖ペプチドはこの酵素によって全く分解されなかった<sup>20</sup>。

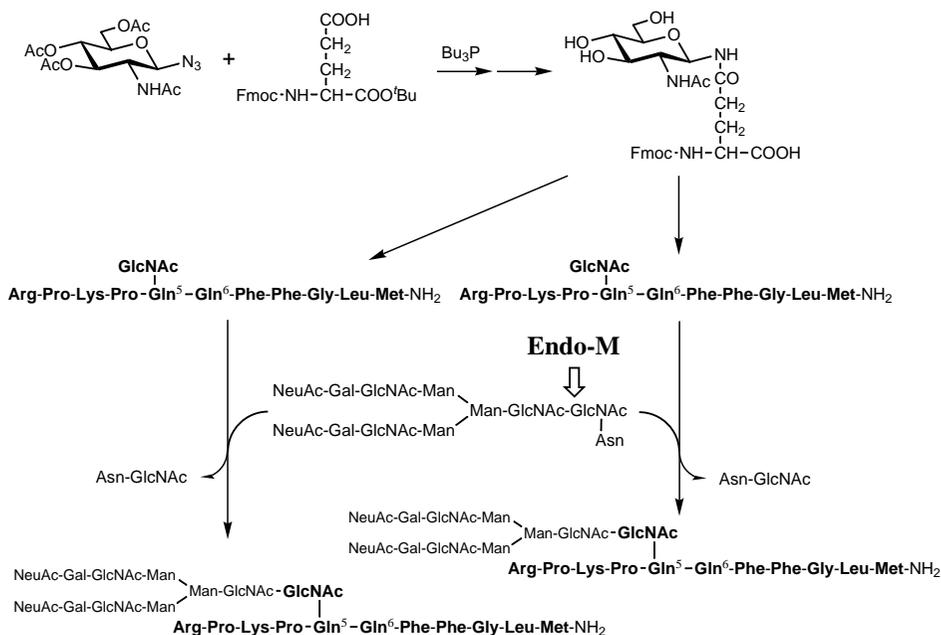


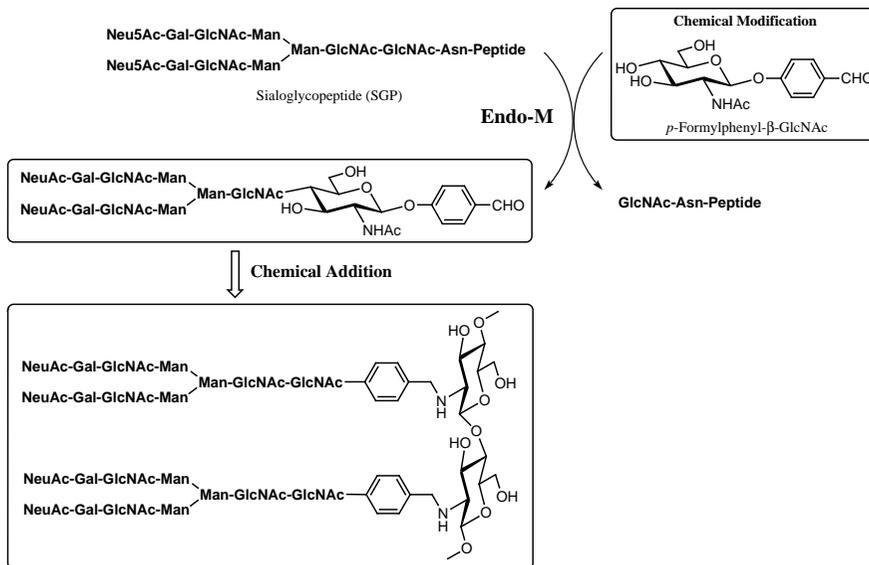
Fig.5. Procedure for synthesizing glycosylated Substance P containing glutamine-linked oligosaccharide.

また、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) が分泌するペプチド系ホルモン様物質である接合因子 ( $\alpha$ -mating factor, WHWLQLKPGQPMY) についてもグルタミン結合糖鎖を有する糖ペプチドを化学-酵素合成した。この接合因子は酵母が分泌するプロテアーゼによって分解されて不活性化される。そこで、Endo-M による糖転移反応によってシアロ複合型二本鎖糖鎖を付加した  $\alpha$ -mating factor 糖ペプチドを合成し、 $\alpha$ -接合型酵母の protease-less 変異株を用いた growth arrest assay によりその活性を調べた。その結果、N-末端より 5 番目にあるグルタミン残基にシアロ糖鎖を付加した  $\alpha$ -mating factor は native の  $\alpha$ -mating factor に比べて活性が低下したが、糖鎖末端のシアリ酸をシアリダーゼによって除いたアシアロ糖鎖を持つ  $\alpha$ -mating factor については活性の低下は見られず、シアリ酸の存在が接合因子と酵母の結合を阻害していることが示唆された。一方、グルタミン残基に GlcNAc を導入した N-アセチルグルコサミン α-mating factor は逆に活性が上昇した<sup>21)</sup>。

## 6. インフルエンザウィルス感染阻害剤の合成

ヒトのインフルエンザはウィルスによって感染することは良く知られており、毎年、流行を繰り返すこの感染症の原因となるウィルスが宿主細胞の膜上にある糖タンパク質や糖脂質の糖鎖末端に存在するシアリ酸を認識して感染することも知られている。なかでも重篤な症状をもたらす A 型ウィルスは  $\alpha$ -2,6 結合したシアリ酸を認識し、受容体であるヘマグルチニン (赤血球凝集因子) を介して結合する。私たちはニワトリ卵黄から抽出して得られる糖ペプチドの複合型二本鎖糖鎖が  $\alpha$ -2,6 結合したシアリ酸を非還元末端に持つことから、この糖

鎖にウイルスを結合させることにより、ウイルスによる細胞への感染を制御できるのではないかと考えた。さらに糖鎖はモノマー単体よりもポリマーの方がモル単位の効果を高める「多価効果」があることが知られているので<sup>22)</sup>、シアロ糖鎖ポリマーはウイルス感染阻害剤として有効な化合物になると考えられる。そこで、糖鎖ポリマーの基剤としてキトサンを用いることを考え、先ず、*p*-Formylphenyl  $\beta$ -GlcNAcを合成し、これを糖鎖受容体として、Endo-Mの糖転移活性により、ニワトリ卵黄の糖ペプチドのシアロ糖鎖を転移付加した。次いで、この糖鎖複合体を還元アミノ化反応によってキトサンに多重合体として付けることにより、シアロ糖鎖多価重合体を合成した (Fig.6)。この合成高分子を用いてインフルエンザウイルス結合阻害試験を行ったところ、その結合阻害は同じ構造のシアロ糖鎖を持つ糖タンパク質フェツインの300倍を越える効果を示した。キトサンもニワトリ卵黄由来糖ペプチドもそれぞれ人体に無害な生体物質であり、原料も豊富に存在することから将来の工業生産においても期待できる優れた材料である。



**Fig.6.** Chemo-enzymatic synthesis of multivalent sialo-oligosaccharides conjugated with chitosan.

## 7. 糖タンパク質の糖鎖に対する単クローン抗体の作成

糖脂質の糖鎖に対する単クローン抗体は糖脂質を抗原として用いることにより作成することが可能であるために比較的数多く作成されている。しかし、糖タンパク質の糖鎖に対する単クローン抗体はタンパク質部分の抗原性が強いためにその作成が困難である。がん細胞の表面膜糖鎖ががん性変異をすることは良く知られており、糖脂質のがん性変異糖鎖については多くの単クローン抗体が作られてがんの診断に用いられている。一方、糖タンパク質糖鎖のがん性変異も知られており、肝がん患者の血清中の糖タンパク質  $\alpha$ -フェトプロテインの

糖鎖はがん性変異することが見出されている<sup>23)</sup>。それ故に、糖タンパク質糖鎖が腫瘍マーカーとして重要な意味を持つようになって来ており、糖タンパク質糖鎖に対する抗体を効率的に作成することが重要になって来た。そこで、私たちはEndo-Mの糖転移活性を用いて糖タンパク質の糖鎖を抗原性の弱い合成脂質に転移付加して、得られたキメラ糖脂質を抗原として用いることにより、効率的な糖タンパク質糖鎖に対する単クローン抗体の作成法を開発した。すなわち、複合型二本鎖糖鎖を有するニワトリ卵黄由来糖ペプチドを糖鎖供与体として、Endo-Mの糖転移活性により複合型二本鎖糖鎖を

-Formylphenyl β-GlcNAcに転移付加し、次いでL-α-フォスファチジルエタノールアミン ジミリストイルを還元アミノ化反応によって付加し、得られた化合物を抗原としてBALB/cマウスを用いて糖鎖に対する単クローン抗体を作成することに成功した。得られた単クローン抗体は糖タンパク質の糖鎖の非還元末端にα-2,6結合したシアル酸を含む複合型二本鎖糖鎖を特異的に認識する抗体であり、アジア糖鎖や高マンノース型糖鎖に対しては全く反応しなかった。さらに糖脂質の糖鎖に対しても全く反応を示さなかった。

## 8. おわりに

エンドグリコシダーゼは糖鎖の構造や機能の解析用手段として広く使われているが、酵素の持つ特異的な活性を活用して、物質生産の手段として利用しようとするのはこれまでは考えられないことであった。しかし、ここに紹介したように、多くの応用が考えられ、物質の大量生産に利用されるようになるのも近いと考えられる。Endo-Mは任意の糖鎖をタンパク質やペプチドに付けることができるほとんど唯一の酵素であり、東京化成工業から市販もされ、用途の拡大が期待される。また、Endo-Mは天然に存在する糖鎖を改変して目的の機能を持つ糖鎖に“リモデリング”するツールとしても考えられている。例えば、組換え酵母に作らせたヒト由来の糖タンパク質は本来の複合型糖鎖ではなく、高マンノース型糖鎖を有するが、この組換え糖タンパク質の糖鎖をEndo-Mを用いて本来のヒト型の複合型糖鎖に改変することが可能である<sup>24)</sup>。このように、エンドグリコシダーゼの用途が広がるに伴って酵素の大量供給が不可欠になる。より良い機能を有するエンドグリコシダーゼの探索とその遺伝子のクローニングが行われることが期待される。

本研究は、京都大学農学部食品工学科および京都大学大学院生命科学研究科において行われたものです。御指導頂きました柘倉辰六郎名誉教授、熊谷英彦名誉教授をはじめ、御協力頂きました多くの方々に深謝致します。また、(財)野口研究所の羽田勝二博士、稲津敏行博士、水野真盛博士には糖ペプチドの合成など多大の御協力を頂きました。厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) T. Muramatsu, *J. Biol. Chem.*, **246**, 5535 (1971).
- 2) A. L. Tarentino, F. Maley, *J. Biol. Chem.*, **249**, 811 (1974).
- 3) J. H. Elder, S. Alexander, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4540 (1982).
- 4) R. B. Trimble, A. L. Tarentino, *J. Biol. Chem.*, **266**, 1646 (1991).
- 5) T. H. Plummer, A. L. Tarentino, *Glycobiology*, **1**, 257 (1991).
- 6) S. Kadowaki, K. Yamamoto, M. Fujisaki, K. Izumi, T. Tochikura, T. Yokoyama, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 97 (1990).
- 7) K. Yamamoto, S. Kadowaki, M. Fujisaki, H. Kumagai, T. Tochikura, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 72 (1994).

- 8) K. Yamamoto, *J. Biochem.*, **116**, 229 (1994).
- 9) J. Edelman, *Adv. Enzymol.*, **17**, 189 (1956).
- 10) R. B. Trimble, P. H. Atkinson, A. L. Tarentino, T. H. Plummer, F. Maley, K. B. Tomer, *J. Biol. Chem.*, **261**, 12000 (1986).
- 11) K. Takegawa, S. Yamaguchi, A. Kondo, H. Iwamoto, M. Nakoshi, I. Kato, S. Iwahara, *Biochem. Int.*, **24**, 849 (1991).
- 12) K. Yamamoto, S. Kadowaki, J. Watanabe, H. Kumagai, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **203**, 244 (1994).
- 13) K. Yamamoto, *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 493 (2001).
- 14) T. Inazu, K. Kobayashi, *Synlett*, 869 (1993).
- 15) C. B. Pert, J. M. Hill, R. M. Berman, W. G. Robey, L. O. Arthur, F. W. Ruscetti, W. L. Farrar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 9254 (1986).
- 16) K. Yamamoto, K. Fujimori, K. Haneda, M. Mizuno, T. Inazu, H. Kumagai, *Carbohydr. Res.*, **305**, 415 (1998).
- 17) M. Marastoni, S. Spisani, R. Tomatis, *Arzneim. Forsch. /Drug Res.*, **44**, 984 (1994).
- 18) M. Mizuno, K. Haneda, R. Iguchi, I. Muramoto, T. Kawakami, S. Aimoto, K. Yamamoto, T. Inazu, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 284 (1999).
- 19) K. Haneda, T. Inazu, M. Mizuno, R. Iguchi, K. Yamamoto, H. Kumagai, S. Aimoto, H. Suzuki, T. Noda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 1303 (1998).
- 20) K. Haneda, T. Inazu, M. Mizuno, R. Iguchi, H. Tanabe, K. Fujimori, K. Yamamoto, H. Kumagai, K. Tsumori, E. Munekata, *Biochim. Biophys. Acta*, **1526**, 242 (2001).
- 21) I. Saskiawan, M. Mizuno, T. Inazu, K. Haneda, S. Harashima, H. Kumagai, K. Yamamoto, *Arch. Biochem. Biophys.*, **406**, 127 (2002).
- 22) G. B. Sigal, M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 3739 (1996).
- 23) K. Yamashita, K. Taketa, S. Nishi, K. Fukushima, T. Ohkura, *Cancer Res.*, **53**, 2970 (1993).
- 24) 藤田清貴, 山本憲二, *化学と生物*, **41**, 244 (2003).

---

**執筆者紹介** 山本 憲二 (やまもと けんじ) 京都大学大学院 生命科学研究所 教授

[ご経歴] 1976年 京都大学大学院農学研究科博士課程修了, 同年 京都大学農学部食品工学科助手, 1980年6月~1981年9月 米国ルイジアナ州チュレーン大学に博士研究員として留学, 1991年 京都大学農学部食品工学科助教授, 1997年 改組により同大学大学院農学研究科応用生命科学専攻助教授, 1999年 京都大学大学院生命科学研究所統合生命科学専攻教授, 現在に至る。1987年 農芸化学奨励賞, 2004年 有馬啓記念バイオインダストリー協会賞受賞。

[ご専門] 応用微生物学, 糖鎖生物学, 応用酵素学