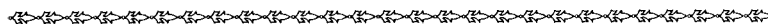


大分子糖蛋白質の極微細構造制御

研究代表者 東海大/理化研 教授 中原 義昭
共同研究者 鳥取大 教育学部 教授 田村 純一

[ポスター発表]

- 1) 分子内アグリコン転移反応を活用した複雑なアスパラギン結合型糖鎖の立体選択的合成
伊藤幸成、大西裕季、Joachim Seifert
- 2) コアクラス 2O-結合型糖鎖および関連化合物の合成 中原義昭、高野穰、渡部純
- 3) 高分子担体上でのオリゴ糖合成効率化:新規反応モニタリング法と
Capture-Release 法の開発 安藤弘宗、眞鍋史乃、伊藤幸成
- 4) シリルリンカーの開発と糖ペプチド固相合成 石井彰、中村和彦
- 5) アリルリンカーの開発と糖ペプチド固相合成 中原悠子、安東純江
- 6) 新規な糖タンパク質構造:C-マンノシルトリプトファンを含有する糖ペプチドの合成
眞鍋史乃、伊藤幸成
- 7) ベンジル保護を用いる糖ペプチドの固相合成 安東純江、久保一介、中原義昭
- 8) ガン転移促進因子EMMPRINのIgドメインI 糖ペプチドの合成 北條裕信
- 9) ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンの合成研究 一柳剛、坂元君年、高谷万紀
- 10) 非天然型糖鎖構造を有するアスパラギン結合型糖鎖の合成 高谷万紀、中原義昭
- 11) 位置特異的硫酸化・リン酸化グリコサミノグリカンオリゴ糖の精密合成
田村純一、西原淳子
- 12) プロテオグリカン大分子の精密合成
田村純一、徳吉美保子、山口明洋、田中絢子、浦島洋文



Synthetic Approaches to the 20kDa molecules of Glycoprotein

Yoshiaki Nakahara
Professor ,Tokai University

The oligosaccharides linked to glycoprotein are now appreciated to participate in a variety of biological events. However, heterogeneity in the oligosaccharide structure as well as low availability of the natural samples has been an obstacle to obtain insight into the molecular level mechanisms played by the oligosaccharides. Chemical synthesis of glycoproteins or their bioactive fragments carrying the oligosaccharide of homogeneous structure is therefore requested.

Our studies were performed on 1) facile synthesis of complex oligosaccharides , 2) novel polymer-supported syntheses of oligosaccharides and glycopeptides, 3) synthesis of the proteoglycan-related glycoconjugates, 4) total synthesis of glycoproteins, and 5) synthesis of unnatural glycans.

大分子糖蛋白質の極微細構造制御 —20 kDa 分子の精密合成をめざして

中原 義 昭
東海大学工学部 教授

研究の概要

天然物全合成研究は従来は比較的低分子についてその骨格形成法や立体化学の制御法などを課題として有機化学の発展に寄与してきた。そしてそれは新規な反応試薬の開発や、微量物質の構造解析法発展をもたらした。一方、新しい医薬リード開拓をめざす興味は海産毒など複雑な構造を持ち取り扱いの難しい天然物をも対象として探索することとなりそれらの全合成研究はさらなる新技術開発を要求するところとなった。本研究課題でとりあげる糖蛋白質はやはりその構造の複雑さのゆえ化学合成分野においては未開拓の研究対象である。蛋白質は大部分が糖鎖をもつ糖蛋白質として存在し、糖鎖には蛋白質の構造維持のみならず認識シグナルとしての機能が付与されている。糖蛋白質はホルモン、免疫グロブリン、サイトカイン、レクチンなど生命現象の重要な場面に登場するが大きな分子であるために、化学的手段による精密合成はいまだ達成されていない。糖鎖を含めて機能がようやく理解されようという今、化学構造的に純粋な糖蛋白質サンプルは生物現象の追究とその制御法確立のため必須である。この研究の目的は、従来別々に発展してきた蛋白質化学と糖鎖化学の技術を融合調和し糖蛋白質や類縁のプロテオグリカンを精密合成する方法を確立することにある。目的達成には有機化学に酵素化学など可能な知識と技術を結集することが必要であり、新発想の技術開発も望まれる。

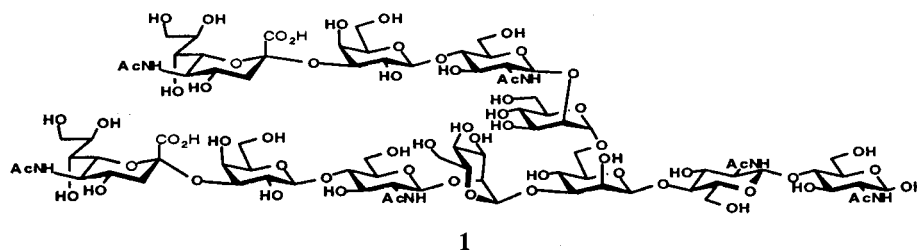
近年のバイオテクノロジーの発展は多くの蛋白質が遺伝子操作技術によって生物工学的手法で合成できることを証明してきた。しかしながら、翻訳後修飾によって導かれる糖蛋白質は現在の生物学的技術では容易には得られない。本研究チームでは従来より糖蛋白質や糖脂質など複合糖質の糖鎖の生物学的機能に着目しその全合成研究で実績をあげてきた。それは、多くの水酸基を有し本来親水性であった糖残基を有機溶媒中で取り扱えるよう疎水性保護基を導入し、位置および立体選択的にグリコシド結合を形成して糖鎖を組み立てるという技術を高度化、先鋭化したものであって、新規な保護基やグリコシル化試薬の開発を重要課題とする。一方、合成した糖鎖を実際に分子レベルの研究に用いるためには糖鎖のみでなくフルサイズの複合糖質分子として提供可能とする必要もある。糖脂質の中心をなすスフィンゴ糖脂質は分子量 1000-2000 程度の比較的 low molecular weight 分子であってそれらの化学合成法がほぼ確立しつつあるのに対し、糖蛋白質は小さなものでも分子量がその 10 倍以上あり精密な有機化学的手法による全合成はほとんどなされていなかった。実際に糖蛋白質の精密合成が可能となればその機能を制御したり任意の構造を人工的に導入する

こともできる。このような背景と展開の目標をもって本研究チームでは表記のタイトルのもとに研究計画を作成し、

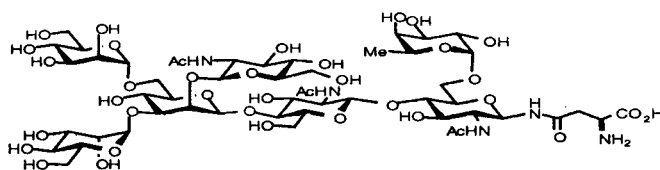
- 1) 糖鎖ユニット合成の効率化と糖蛋白質合成戦略の確立
 - 2) プロテオグリカン分子の設計と合成
 - 3) 生物活性糖蛋白質の全合成
 - 4) 非天然型糖鎖および改変糖ペプチドの合成
- をテーマとして研究を行った。プロテオグリカンに関する研究は鳥取大学教育地域科学部田村助教授のグループが担当し、それ以外のテーマはそれぞれに密接に連携しており、理研グループと東海大グループで共同して推進した。

1) 糖鎖ユニット合成の効率化と糖蛋白質合成戦略の確立 は全体の中心となるものであって糖蛋白質糖鎖合成および糖ペプチドの固相合成の新しい方法論の開発研究を行った。

① 従来より合成が困難であるとされていた β -マンノシドを含むアスパラギン結合型糖鎖誘導体を当研究チームで開発した新規分子内アグリコン転移反応を利用して立体選択的に合成することを可能とした。これにより複合型糖鎖構造の典型であるシアル酸含有11糖 **1** の合成およびアスパラギン結合型糖鎖コア構造に新規に見つめられた GlcNAc- β 1 \rightarrow 2Man 結合を持つ7糖鎖 **2** の合成に初めて成功した。さらに分子内アグリコン転移反応を効率化するための必須な構造の研究にも成果を得た。

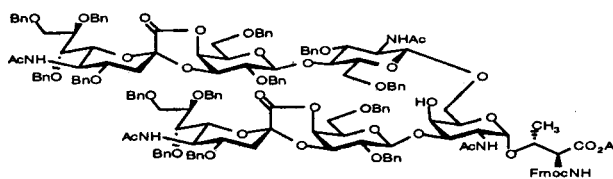


1

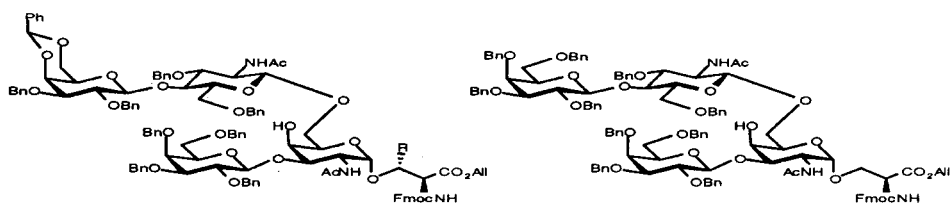


2

② Tリンパ球の活性化や免疫不全疾患に伴ってT細胞表層蛋白質ロイコシアリン糖鎖の構造変化として現れるコア2型シアル酸含有 O-結合型6糖をもつセリンユニット **3** の合成に初めて成功した。また、固相合成に用いるためのコア2型糖鎖ビルディングブロックとして **4**、**5** の合成を行った。



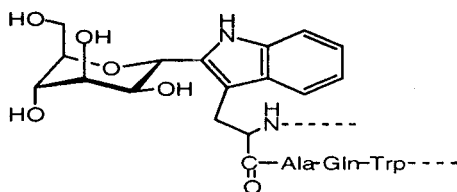
3



4

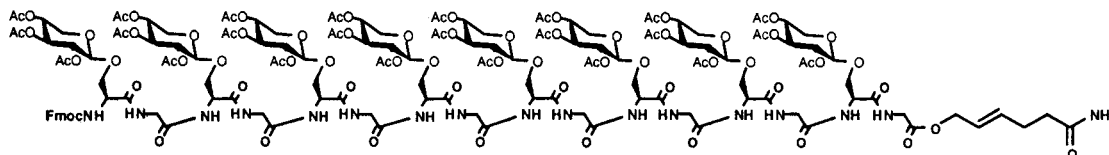
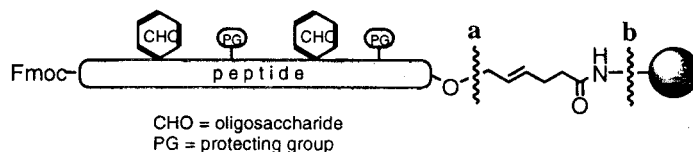
5

③ ヒト RNase や recombinant IL12 より発見されたマンノシルトリプトファン **6** は蛋白質上のトリプトファン残基がマンノースにより C-グリコシド化されたユニークな構造のものでありその立体選択的な化学合成ルートを開発した。



6

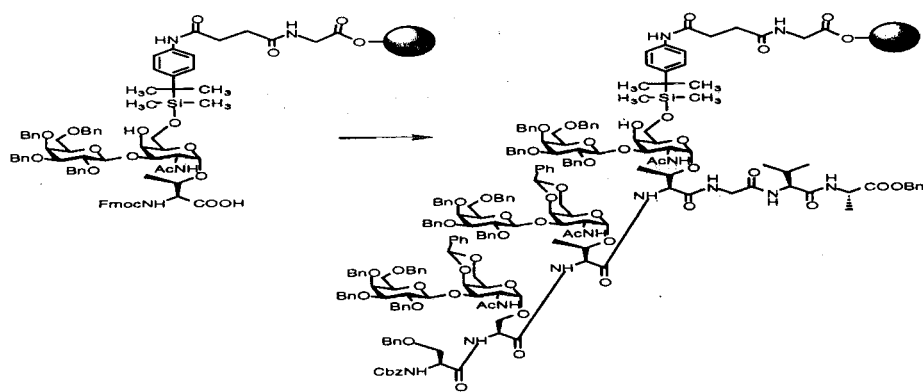
④ 固相上で合成される糖ペプチドブロックを温和な条件で切断することを目的としてパラジウム触媒で切断可能な新規アリルエステル型リンカーを開発した。プロテオグリカンの幹の構造をなすキシロースが結合したセリグリシン **7** をモデルとして合成に用いその有用性を示した。



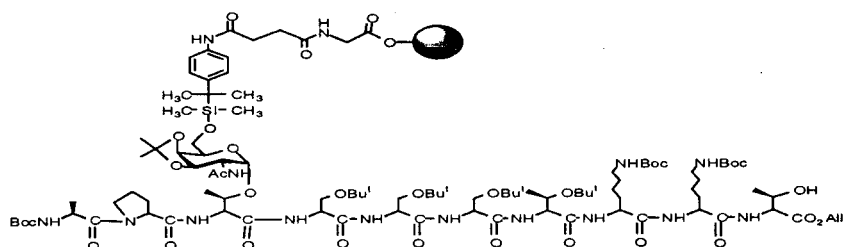
7

⑤ 糖ペプチド側鎖の水酸基を固相に固定するため新しいシリルエーテル型リンカーを開発した。これを用いることで同じ樹脂上でペプチド鎖をN-およびC-末端方向へ伸長可能とするものである。先ず樹脂上で Pd(0)を触媒とする脱アリルエステルによって生成するカルボキシル基を活性化することで C-末端側ペプチドをブロックで縮合する。次に脱 Fmoc 化によって生じるアミノ基に対しN-末端方向へのステップワイズあるいはブロック縮合で目的の糖ペプチドオリゴマーとする手法を提案した。その有効性はグリコホリン A N-末端 **8** とヒトインターロイキン2の N-末端糖ペプチド **9** の合成によって示された。

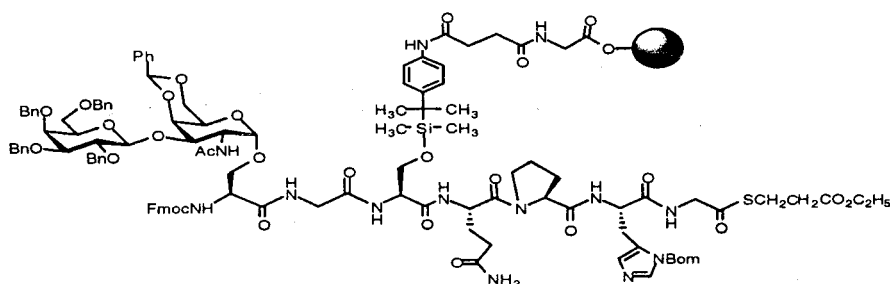
さらに C-末端の固相上での修飾が可能であることを利用してセグメント縮合の重要な中間体となる糖ペプチドチオエステル **10** に良好な収率で変換することができた。これらはいずれも必要な保護基を残したままで樹脂からフルオリドイオンまたは酸触媒で効率良く切断された。



8

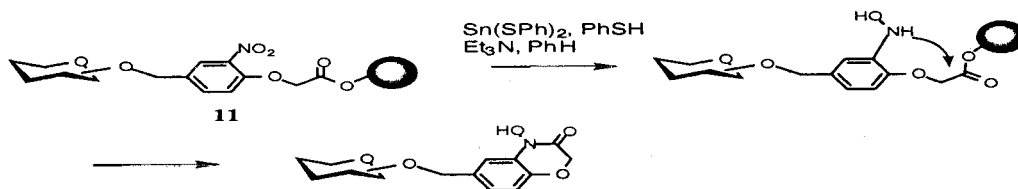


9



10

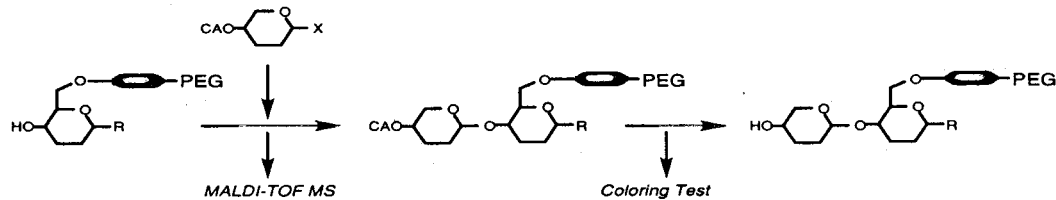
⑥ 糖鎖の迅速合成のため沈殿による精製が可能な高分子量ポリエチレングリコールあるいはショートカラムでの精製が容易な低分子量ポリエチレングリコールを担体としてリンカーを介して固定した糖鎖を液相のグリコシル化反応によって伸長する手法を開発してきたが、合成した糖鎖を効率的に担体から切断するためのニトロベンジル型リンカー **11** を開発した。



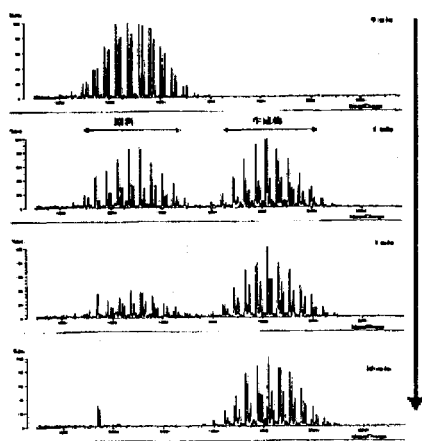
⑦ ポリエチレングリコール担体上でのオリゴ糖合成を簡便にモニタリングするためクロロアセチル基とパラニトロベンジルピリジンによる発色反応と MALDI-TOF MS を用いる新しい方法を開発した。低分子量のポリエチレングリコール上に固定した糖をグリコシル化反応でオリゴ糖とすると、その反応は MALDI-TOF MS 上に現れる原料と生成物のそれぞれの一群のスペクトルを観測することによってその進行を追跡することが出来ることを見いだした。クロロアセチル基を一

時的な保護基として有する糖を供与体として用いることでその脱保護の効率をパラニトロベンジルピリジンとの反応生成物 **12** の呈色で観測した。

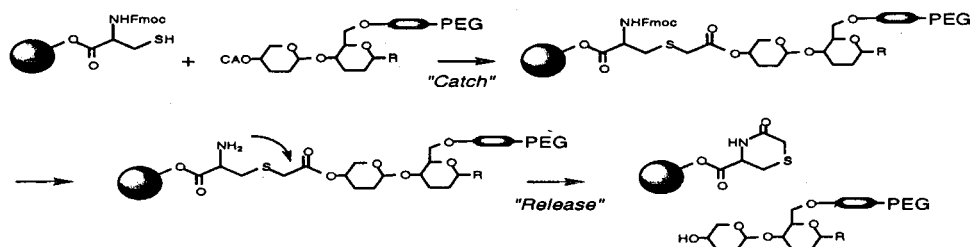
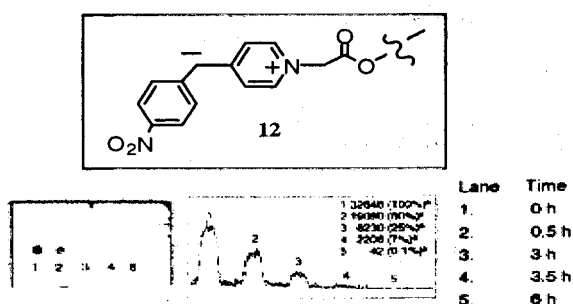
さらにポリエチレングリコール上のクロロアセチル基を持った目的分子のみを釣り上げるためシステインを固定した樹脂を用いた新規な“catch and release”手法によるを考案した。



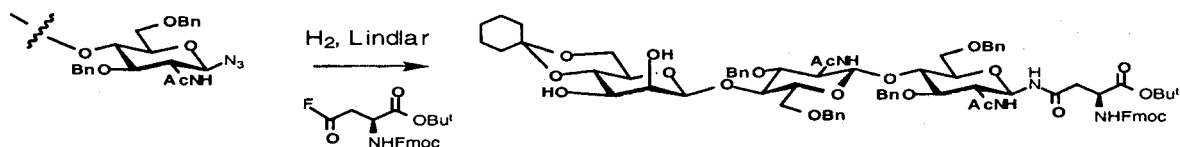
ステップ 1 : MALDI-TOF MS による反応追跡



ステップ 2 : 呈色反応 による反応追跡



⑧ アミノ酸フルオリドを用いる糖ペプチドの新規な方法を開発した。アミノ酸フルオリドは強力なアミノアシル化試薬として知られているが、糖およびペプチドの保護基に影響なく、またリンドラー触媒を用いるアジドの還元的なアスパラギン誘導体 **13** 合成に有効に利用できることを明らかにした。さらに Boc アミノ基を $(i\text{-Pr})_3\text{SiOTf} / \text{DBMP}$ によってシリルカーバメートとした後 $n\text{-Bu}_4\text{NF}$ とアミノ酸フルオリドによって in situ でアシル化する手法を考案した。

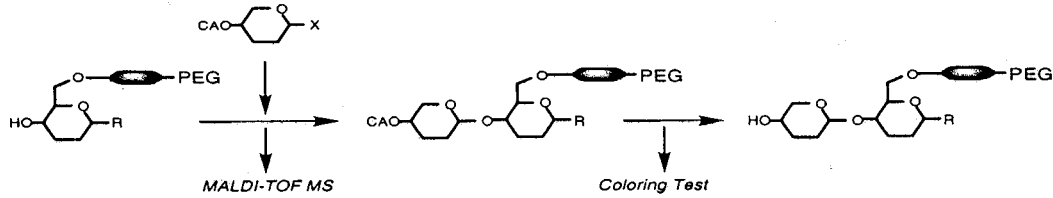


13

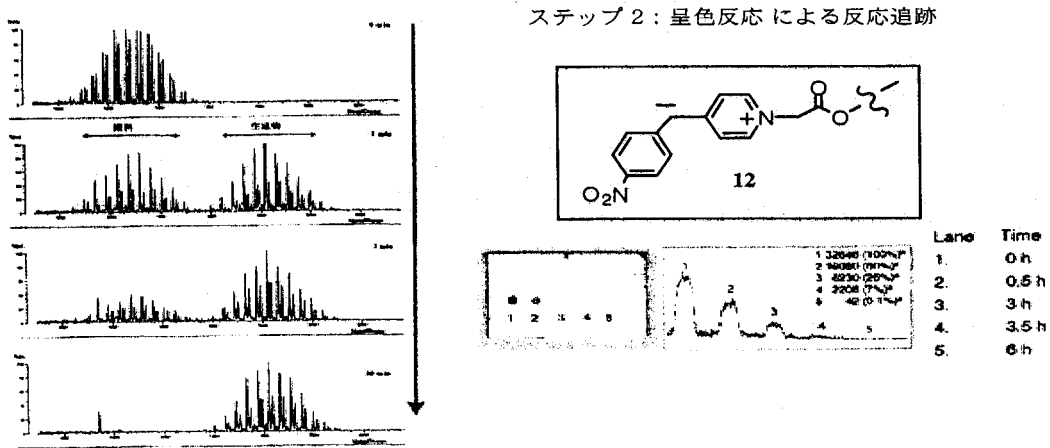
2) プロテオグリカン分子の設計と合成 プロテオグリカンは、一般の糖たんぱく質とは異なり、コアたんぱく質と、その結合部分に位置する特異な 4 糖（結合領域 4 糖）を介して非還元末端側に延びる 2 糖繰り返し多糖によって構成される。結合領域 4 糖による PG の三次元的構造への影響や、生合成機構、また生化学的機能への関与も興味深い。

時的な保護基として有する糖を供与体として用いることでその脱保護の効率をパラニトロベンジルピリジンとの反応生成物 **12** の呈色で観測した。

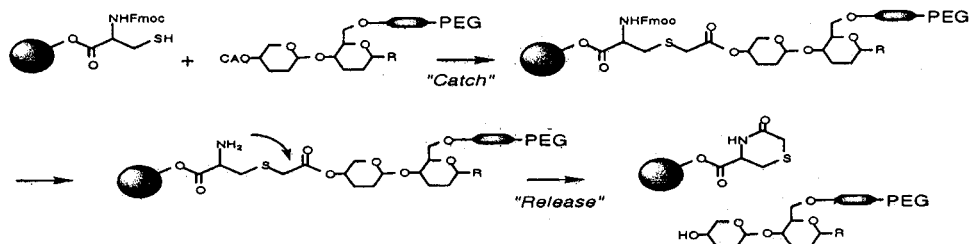
さらにポリエチレングリコール上のクロロアセチル基を持った目的分子のみを釣り上げるためシステインを固定した樹脂を用いた新規な“catch and release”手法によるを考案した。



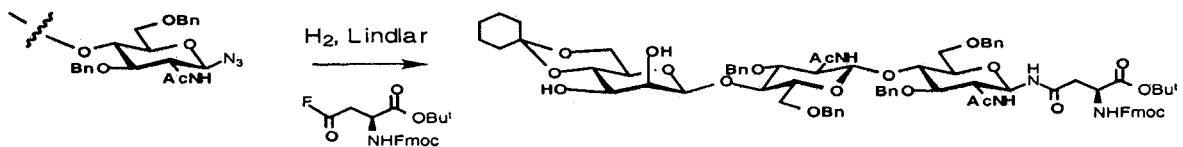
ステップ 1: MALDI-TOF MS による反応追跡



ステップ 2: 呈色反応による反応追跡



⑧ アミノ酸フルオリドを用いる糖ペプチドの新規な方法を開発した。アミノ酸フルオリドは強力なアミノアシル化試薬として知られているが、糖およびペプチドの保護基に影響なく、またリンドラ触媒を用いるアジドの還元的なアスパラギン誘導体 **13** 合成に有効に利用できることを明らかにした。さらに Boc アミノ基を $(i\text{-Pr})_3\text{SiOTf}$ / DBMP によってシリルカーバメートとした後 $n\text{-Bu}_4\text{NF}$ とアミノ酸フルオリドによって *in situ* でアシル化する手法を考案した。

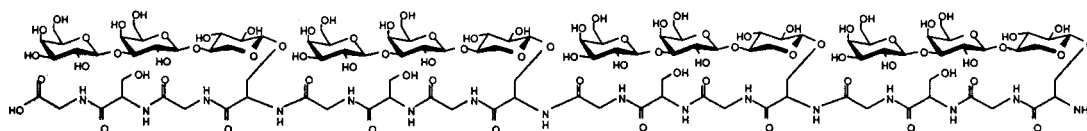


13

2) プロテオグリカン分子の設計と合成 プロテオグリカンは、一般の糖たんぱく質とは異なり、コアたんぱく質と、その結合部分に位置する特異な4糖（結合領域4糖）を介して非還元末端側に延びる2糖繰り返し多糖によって構成される。結合領域4糖によるPGの三次元的構造への影響や、生合成機構、また生化学的機能への関与も興味深い。

① プロテオグリカン大分子の合成： 本研究で合成目標としているプロテオグリカン巨大分子は、1本のペプチド鎖のセリン残基から枝のように多くのグリコサミノグリカン糖鎖が配置した姿をしている。これらを合成するには、構成する糖とアミノ酸の各残基の縮合の順序が種々の保護基の選択や収率に影響を及ぼす。効率的な合成のためには、糖間の縮合に比べてペプチド鎖の伸長の方が比較的高い収率を期待できることから、糖鎖が結合した小断片ペプチドを合成単位とし、ペプチド間の縮合により大分子とする経路を選択した。一つの糖鎖を8~10糖程度とすることが現在のグリコサミノグリカン合成の技術で可能な長さであると考えられるため、糖ペプチド単位の10~13個をペプチド鎖部分で伸長させることにより、20kDaの分子の合成を計画した。糖鎖は還元側から4糖目と5糖目で分割し、「セリルグリシン」、「還元側3糖」、及び「非還元側繰り返し2糖3量体」の三つの部分に分けてそれぞれ合成することとした。

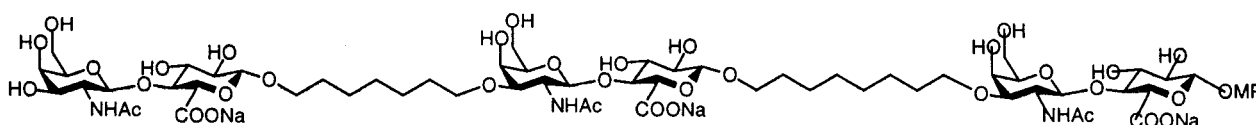
現在までに3糖セリルグリシンを単位とするオリゴマー化を行った。先行する類似の結果から、セリルグリシン2単位に糖鎖を一本持つ3糖テトラペプチドの方が立体的に混みあわず、効率的な縮合ができると判断した。3糖テトラペプチドのN-末端とC-末端の脱保護と縮合を繰り返し、3糖糖鎖を4本有するヘキサデカペプチド **14** を合成するに至った。一方、3糖セリルグリシン誘導体に非還元側へ2糖単位で糖鎖を伸長させ5糖セリルグリシン誘導体まで合成した。



14

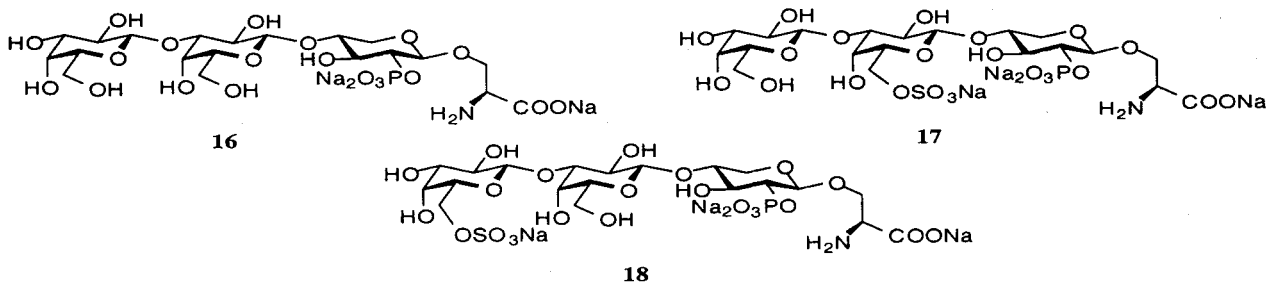
プロテオグリカン分子は一本のペプチド鎖のセリン残基から多くの直鎖状糖鎖（グリコサミノグリカン鎖）が枝状に配置された構造をしている。本研究では非還元側繰り返し糖鎖（6糖）と還元末端3糖の結合した9糖 **14** を合成し、それが10本程度結合したセリルグリシン構造の構築を行った。一方、還元末端9糖にリン酸・硫酸基を位置特異的に有するオリゴ糖セリンの合成を行った（化合物 **15~18**）。リン酸基・硫酸基・カルボキシル基を同時に併せ持つ天然型オリゴ糖としては、合成化学的には初めての例である。これらオリゴ糖に存在するリン酸基・硫酸基は、グリコサミノグリカン糖鎖伸長生合成機構におけるシグナルとしての役割が指摘されている。

② 糖鎖クラスター分子の合成：また、コンドロイチン硫酸の機能性の抽出と長鎖化を指向した、新規直鎖型コンドロイチン硫酸クラスター糖鎖の合成を並行して行った。これはグリコサミノグリカン繰り返し2糖リガンド間を C8 炭化水素で連結した疑似糖鎖である。最長で疑似10糖クラスター **15** の合成を完了した。通常の方法で天然型の10糖を得る場合に比べ、収率には著しい向上があった。また、これら非天然型疑似糖鎖が糖転移酵素の受容体として認識されることが、酵素糖鎖伸長実験により確認された。

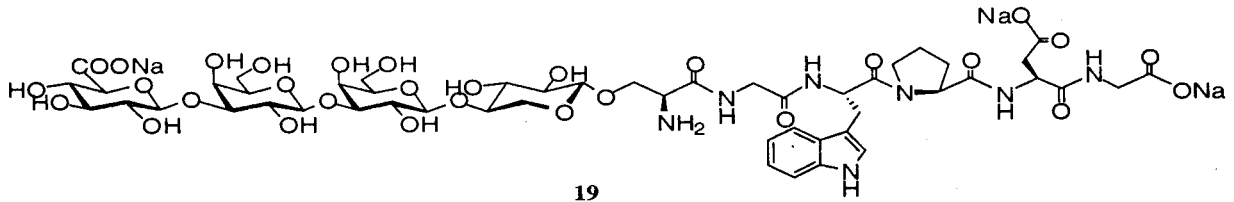


15

③ 生合成を制御する還元末端オリゴ糖ペプチドの合成：「ヘパリン系」と「コンドロイチン系」は、還元末端から5番目の糖転移により、その生合成が分岐する。その生合成分岐のシステムは未だ不明であるが、糖鎖上の酸性基に拠るといふ説と、コアペプチドの環境が左右するといふ説がある。この問題の解決のため、相当するプロテオグリカンの受容体としての妥当性を確認することとした。前者のためキシロース残基の2位とガラクトース残基の6位にそれぞれリン酸基と硫酸基を有する3糖セリン **16**~**18** を得た。これらの酸性糖鎖に酵素的グルクロン酸転移を行ったところ、リン酸基の存在は転移を加速し、非還元側の硫酸基は（リン酸基が存在しても）これを阻害することが判明した。

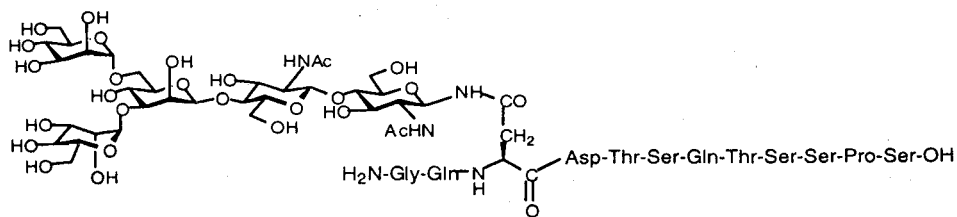


ヘパリン系プロテオグリカンは、糖鎖結合近傍のコアペプチドに疎水性・酸性アミノ酸が多く配置されている。ベータグリカンの Ser₅₃₅ には、ヘパリン系グリコサミノグリカンが伸長しており後者の説の好例であることから、基質となる4糖ヘキサペプチド **19** を合成した。

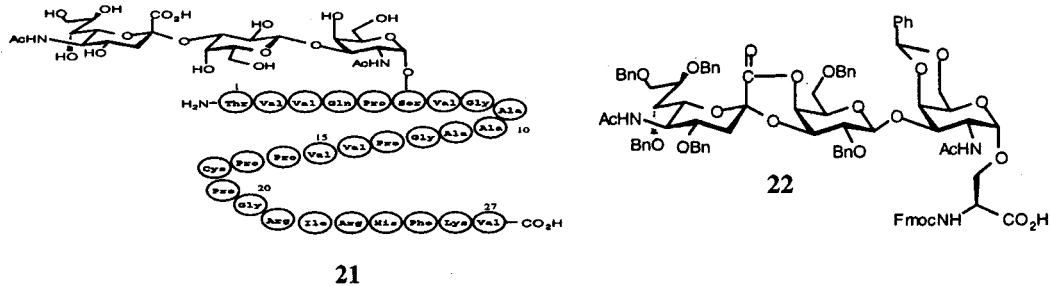


3) 生物活性糖蛋白質の全合成 最終的に 20 kDa サイズの分子を全合成することを目的として研究を行った。

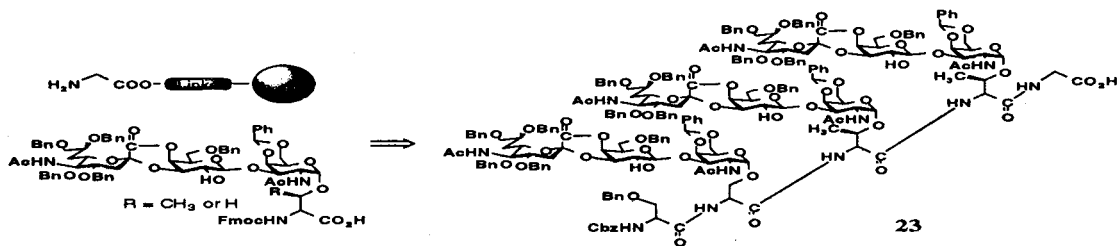
① ベンジル保護を用いる糖ペプチド固相合成によって N-結合型糖鎖をもつ CD52 を合成した。CD52 抗原はヒトリンパ球上に発現する GPI アンカー型糖蛋白質でそのモノクローナル抗体は移植片対宿主反応の制御や骨髄移植拒絶反応を抑制するために広く使われている。CD52 はわずか 12 アミノ酸からなるペプチドであるがその一カ所の糖鎖結合アスパラギン部位にポリラクトサミン糖鎖をもつ大きな分岐複合型糖鎖を有している。この研究では共通のアスパラギン結合型 5 糖コア構造糖鎖を有する分子を標的としてベンジル保護された糖アスパラギンユニットを用いて固相合成を行った。最後にベンジル基は接触還元によって除去した。



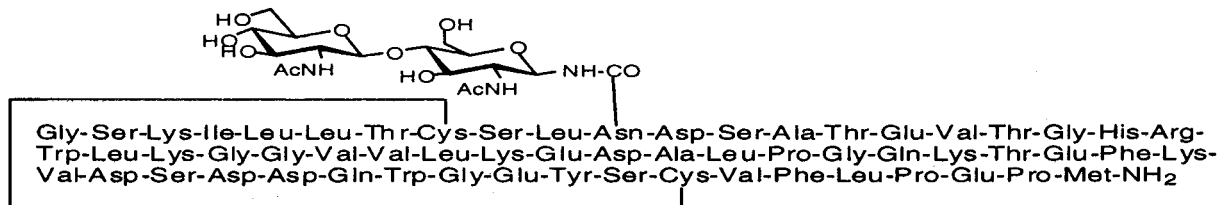
② ヒト $\alpha 2$ HS 糖蛋白質の B 鎖 21 を Fmoc 法によるペプチド自動合成プログラムを用いて合成した。ここでは 3 糖 22 を用いて固相合成し、シアル酸残基をふくむ O-結合型糖鎖の保護基としてベンジル基が使えること、システインを含むペプチド鎖のため接触還元ではなくベンジル基は強酸とソフト求核試薬の組み合わせで除去可能なことを見いだした。



③ 同じく 3 糖 22 を用いグリコホリン A の N-末端シアル酸含有ペптаペプチド 23 を固相合成し強酸とソフト求核試薬で脱保護してこの方法論が有効であることを確認した。また貴重な糖アミノ酸ビルディングブロックを節約して用いるための縮合剤と弱酸で切断される樹脂の検討を行った。

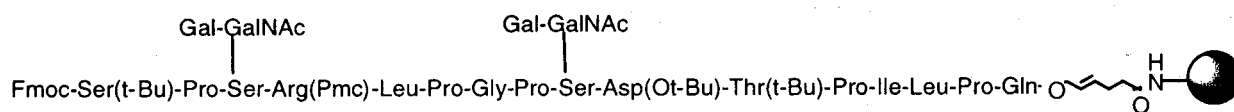


④ ガン細胞由来の EMMPRIN はガン転移機構の重要過程である matrix metalloproteinases (MMP) 産生促進因子でありそのイムノグロブリン様ドメイン I には N-結合型糖鎖が含まれる。Boc 法によって合成した糖鎖ペプチドチオエステルを用い、セグメント縮合によって 61 アミノ酸からなる糖ペプチド 24 を合成した。別途に合成したペプチドのみのサンプルは MMP 2 産生に全く活性を示さないのに対しキトビオースが結合したものは顕著な活性を示した。小さな糖鎖で活性が示されたことは驚きであり、本研究チームがメインテーマとして掲げる「糖鎖の生物機能を分子レベルで研究」するための格好の実験システムを構築することができたこととなる。今後、サンプルの結晶化、さらに大きな糖鎖の導入、構造改変などの研究に発展することが期待される。



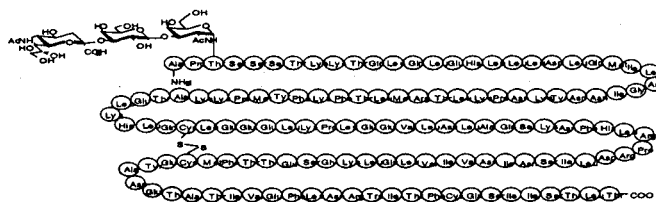
⑤ 大分子の合成標的のひとつとしてヒト絨毛性性腺刺激ホルモン β サブユニット (β hCG: 24 kDa) の合成研究を行った。いくつかのセグメントに分割して固相合成しその縮合を検討した。これまでの方法とは異なって糖鎖無保護のままペプチドを固相合成、さらにセグメント縮合を固

相法あるいは液相法で試みた。C-末端ヘキサデカペプチド配列 (130—145) を含む化合物 **25** はアリルリンカー上で固相合成したセグメント (130—136、137—145) の固相上での Pfp による活性化でセグメント縮合によって合成した。他の全てのセグメントについて合成を行った。



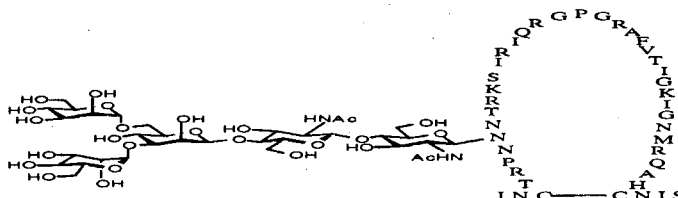
25

⑥ O-結合型 3 糖を結合したヒトインターロイキン 2 (15 kDa) **26** の全合成研究を行った。4 つのセグメントに分割してそれぞれを固相合成した。糖鎖を含む N-末端セグメントはアリルリンカーとシリルリンカーの組み合わせでチオエステルとした。難溶性の C-末端セグメント合成には backbone amide-protection 法の利用も検討した。



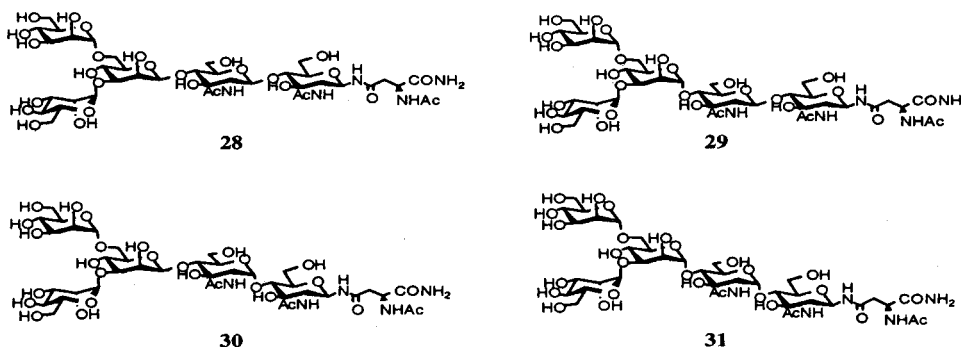
26

⑦ HIV 外被糖蛋白質 GP120 の V3 ループ構造 **27** を標的としてアリルリンカー上で固相合成したベンジル保護された N-結合型 5 糖を含むセグメントを用いてセグメント縮合を行った。糖鎖の切断なしに保護基のベンジル基の除去が可能な酸性条件の検討が重要課題である。



27

4) 非天然型糖鎖および改変糖ペプチドの合成 天然には見いだされていない配列を持った糖鎖サンプルは糖鎖の生物機能を探るための有効なプローブとなるものと考えられる。また難分解性の糖ペプチド誘導体合成にも発展可能である。N-結合型 5 糖をモデルとして Man-GlcNAc および GlcNAc-GlcNAc 部のグリコシド結合に関する立体異性体を合成した。天然型を含めて 4 種の 5 糖性化合物を得た。



主な発表論文

- 1) Z.-W. Guo, Y. Nakahara, Y. Nakahara, and T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **308** (1997) 373-377.
- 2) Z.-W. Guo, Y. Nakahara, Y. Nakahara, and T. Ogawa, *Bioorg. Med. Chem.*, **5** (1997) 1917-1924.
- 3) Y. Nakahara, Y. Nakahara, Y. Ito, and T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.*, **38** (1997) 7211-7214.
- 4) Z.-W. Guo, Y. Ito, Y. Nakahara, and T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **306** (1998) 539-544.
- 5) S. Ando, J. Aikawa, Y. Nakahara, and T. Ogawa, *J. Carbohydr. Chem.*, **17** (1998) 633-645.
- 6) A. Dan, M. Lergenmüller, M. Amano, Y. Nakahara, T. Ogawa, and Y. Ito, *Chemistry-A Euro. J.*, **4** (1998) 2182-2190.
- 7) Y. Nakahara, Y. Nakahara, Y. Ito, and T. Ogawa, *Carbohydr. Res.*, **309** (1998) 287-296.
- 8) H. Kitagawa, K. Tsutsumi, M. Ujikawa, F. Goto, J. Tamura, K. W. Neumann, T. Ogawa and K. Sugahara, *Glycobiology*, **7** (1997) 531-537.
- 9) H. Kitagawa, M. Ujikawa, K. Tsutsumi, J. Tamura, K. W. Neumann, T. Ogawa and K. Sugahara, *Glycobiology*, **7** (1997) 905-911.
- 10) J. Tamura, K. W. Neumann, S. Kurono and T. Ogawa, *Carbohydr. Res.*, **305** (1998) 43-63.
- 11) H. Kitagawa, Y. Tone, J. Tamura, K. W. Neumann, T. Ogawa, S.Oka, T. Kawasaki and K. Sugahara, *J. Biol. Chem.*, **273** (1998) 6615-6618.
- 12) J. Tamura, Y. Miura and H. H. Freeze, *J. Carbohydr. Chem.*, **18** (1999) 1-14.
- 13) Y. Ito, Y. Ohnishi, T. Ogawa, and Y. Nakahara, *Synlett*, (1998) 1102-1104.
- 14) K. Nakamura, N. Hanai, M. Kanno, A. Kobayashi, Y. Ohnishi, Y. Ito, and Y. Nakahara, *Tetrahedron Lett.*, **40** (1999) 515-518.
- 15) L. Singh, Y. Nakahara, Y. Ito, and Y. Nakahara, *Tetrahedron Lett.*, **40** (1999) 3769-3772.
- 16) S. Nadanaka, H. Kitagawa, F. Goto, J. Tamura, K. Neumann, T. Ogawa, and K. Sugahara, *Biochem. J.*, **340** (1999) 353-357.
- 17) J. Tamura and J. Nishihara, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9** (1999) 1911-1914.
- 18) K. Nakamura, A. Ishii, Y. Ito, and Y. Nakahara, *Tetrahedron*, **55** (1999) 11253-11266.
- 19) H. Tsuda, S. Yamada, H. Miyazono, K. Morikawa, K. Yoshida, F. Goto, J. Tamura, K. W. Neumann, T. Ogawa and K. Sugahara, *Eur. J. Biochem.*, **262** (1999) 127-133.
- 20) S. Manabe and Y. Ito, *J. Am. Chem. Soc.*, **121** (1999) 9754-9755.
- 21) Y. Ito, M. Gerz, and Y. Nakahara, *Tetrahedron Lett.*, **41** (2000) 1039-1042.
- 22) L. Singh, Y. Nakahara, Y. Ito, and Y. Nakahara, *Carbohydr. Res.* **325** (2000) 132-142.
- 23) J. Seifert, M. Lergenmüller, and Y. Ito, *Angew. Chem. Int. Ed.* **39** (2000) 531-534.
- 24) H. Hojo and Y. Nakahara, *Curr. Protein and Peptide Sci.* **1** (2000) 43-68.
- 25) A. Ishii, H. Hojo, A. Kobayashi, K. Nakamura, Y. Nakahara, Y. Ito, and Y. Nakahara, *Tetrahedron*, **56** (2000) 6235-6243.
- 26) Y. Nakahara, S. Ando, M. Itakura, N. Kumabe, H. Hojo, Y. Ito, and Y. Nakahara, *Tetrahedron Letters*, **41** (2000) 6489-6493.
- 27) S. Manabe, Y. Nakahara, and Y. Ito, *Synlett*, 1241-1244 (2000).
- 28) Y. Ohnishi, H. Ando, T. Kawai, Y. Nakahara, and Y. Ito, *Carbohydr. Res.*, **328** (2000) 263-276.
- 29) S. Ando, Y. Nakahara, Y. Ito, T. Ogawa, and Y. Nakahara, *Carbohydr. Res.*, **329** (2000) 773-780.
- 30) M. Takatani, T. Nakama, S. Manabe, Y. Nakahara, Y. Ito, and Y. Nakahara, *Glycoconj. J.*, **17** (2000) 361-375.
- 31) Y. Nakahara, S. Ando, Y. Ito, H. Hojo, and Y. Nakahara, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65** (2001) 1358-1368.
- 32) H. Hojo, J. Watabe, Y. Nakahara, Y. Nakahara, Y. Ito, K. Nabeshima, and B. P. Toole, *Tetrahedron Lett.*, **42** (2001) 3001-3004.
- 34) Y. Ito, H. Ando, M. Wada, T. Kawai, Y. Ohnishi, and Y. Nakahara, *Tetrahedron*, **57** (2001) 4123-4132.
- 35) H. Ando, S. Manabe, Y. Nakahara, and Y. Ito, *J. Am. Chem. Soc.*, **123** (2001) 3848-3849.
- 36) J. Tamura and J. Nishihara, *J. Org. Chem.*, **66** (2001) 3074-3083.
- 37) J. Tamura, H. Urashima, K. Tsuchida, H. Kitagawa, and K. Sugahara, *Carbohydr. Res.*, **332** (2001) 41-51.
- 38) H. Kitagawa, N. Egusa, J. Tamura, M. Kusche-Gullberg, U. Lindahl and K. Sugahara, *J. Biol. Chem.*, **276** (2001) 4834-4838.
- 39) B.-T. Kim, H. Kitagawa, J. Tamura, T. Saito, M. Kusche-Gullberg, U. Lindahl, and K. Sugahara, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98** (2001) 7176-7181.