

糖鎖磁気ビーズを用いた糖鎖認識タンパク質の同定

戸谷 希一郎^{*1}, 蔵田 紫乃^{*2}

Identification of Glycan-recognizing Proteins Using Oligosaccharide Immobilized Magnetic Beads

Kiichiro TOTANI^{*1}, Shino KURATA^{*2}

ABSTRACT :Oligosaccharides play important roles in various biological events, such as virus infection, immunity, disease, blood type, protein quality control etc. In these processes, the glycan recognizing proteins so called lectins are known as regulatory factors especially in a case of weak flexible binding-dissociation of an oligosaccharide ligand. In order to select unidentified lectin candidates from biological extracts, development of a mild enrichment procedure using oligosaccharide immobilized magnetic beads was conducted. The mild enrichment was found to be effective compared to a conventional batch procedure in a model interaction experiment between maltose-magnetic beads and concanavalin A. Furthermore, selections of Glc1Man9GlcNAc2-specific lectin candidates from mouse liver microsomal extracts were carried out.

Keywords :lectin, synthetic oligosaccharide, magnetic beads

(Received September 24, 2009)

1. はじめに

糖鎖は糖タンパク質や糖脂質の構成成分として細胞内や細胞表面に広く存在し、様々な生命現象の制御を担っている¹⁾。糖鎖が関わる生命現象としてウィルス感染、免疫、疾患、血液型、タンパク質の品質管理などが知られているが、多くの場合、その活動には糖鎖認識タンパク質であるレクチン²⁾が関わっている。このような観点から未知のレクチンを探索し、その機能を明らかにすることは、糖鎖生命現象を理解する上で重要な課題となっている。

ある特定の糖鎖とレクチンの相互作用解析法として、カロリメトリー法、核磁気共鳴法、表面プラズモン共鳴法、水晶発音子マイクロバランス法、フロンタルアフィニティークロマトグラフィー法などが比較的良好に用いられる。しかしながらこれらは、特定のレクチンとの相互作用解析には有効であるが、未知レクチンをエンリッチするのには不適當である。一方、特定の糖鎖や糖タンパ

ク質を固定化したアフィニティービーズと生体抽出液を反応させ、タンパク質混合液中のレクチンを吸着させる方法は、定量性はないがレクチン画分をエンリッチできるため、未知のレクチン候補を絞り込む用途に汎用されている。

アフィニティービーズの使用法として一般的にカラム法とバッチ法が知られている。比較的大量のレクチンを精製するには、操作を自動化できるカラム法が優れているが、フロー系で用いるためアフィニティービーズの必要量は多くなる。一方、バッチ法は手作業を要するが、反応容器内で糖鎖ビーズとレクチンを長時間接触させることができるため吸着効率が高く、アフィニティービーズの必要量が少なくすむ特徴がある。糖鎖リガンドが貴重な場合には、バッチ法は有効な選択肢となる。しかしながら通常のアガロースやラテックス製のビーズに対する遠心操作による回収では、100%のビーズ回収は望めない。そこで遠心に頼らないビーズ回収方法として近年、磁気ビーズが利用される場面が増えてきた³⁾。磁気ビーズは可磁性物質を含むポリマーコアを親水性ポリマーで覆ったものであり、強力磁石によって反応容器の底面に磁気ビーズを簡便かつ高効率に回収することができる。

^{*1} : 成蹊大学理工学部物質生命理工学科准教授
(Associate Professor, Dept of Materials and Life Science,
e-mail: ktotani@st.seikei.ac.jp)

^{*2} : 成蹊大学理工学部 4 年生

通常のバッチ法によるレクチンのエンリッチ工程を図1 A に示した。特定の糖鎖を結合した磁気ビーズを作成し、これをレクチン候補が含まれるタンパク質混合液とともにマイクロチューブ内で転倒混和して糖鎖磁気ビーズ-レクチン複合体を形成させる。この複合体を磁石により沈降させ、不要なタンパク質群を含む液相を除去し、もとの液量までバッファーを加える。その後ふたたび転倒混和、磁石による沈降、液相の除去を繰り返すことによって磁気ビーズに非特異的に吸着したタンパク質を洗浄し、レクチンをエンリッチしていく。レクチンは一般的に抗体などに比べると結合力が弱い、多くの植物レクチン類は比較的強い結合力 ($K_a = 10^7$ to 10^5 M^{-1}) を有している。このようなレクチンに対しては図1 A に示すバッチ法が有効に機能するが、動物の細胞内に存在する結合力の弱い ($K_a = 10^4$ to 10^3 M^{-1}) レクチンは、通常のバッチ法における洗浄工程でビーズからはがれ落ち、エンリッチすることが困難である。このような弱いレクチン活性はこれまで見過されてきたが、近年、弱い結合こそが生体機能を柔軟に調節する重要な因子であるとの認識が高まり、弱いレクチン活性を検出する手法としてフロンタルアフィニティークロマトグラフィー⁴⁾法やフローサイトメーターを利用した手法⁵⁾が開発されている。一方、弱い活性を示す未知のレクチン探索を目指す場合、現在

のところ簡便に目的レクチンをエンリッチする手法が確立していない。糖鎖とレクチンの結合は可逆的であり、結合が強い場合にはほぼ複合体の状態が存在している。これに対し結合が弱い場合には平衡が解離状態に傾き、複合体周辺に有意の量の遊離レクチンが存在することになる。この状態で通常のバッチ法での洗浄を行うと遊離レクチンは除去され、これを繰り返すと弱い結合のレクチンは最終的にまったくエンリッチされてこなくなる。そこで我々は系内に糖鎖磁気ビーズと弱いレクチンが存在した場合のレクチン濃度分布に注目し、弱い結合を洗い流してしまうリスクを軽減するマイルドエンリッチ法を提案する(図1 B)。この方法は糖鎖磁気ビーズ-レクチン複合体を磁石で沈降する工程までは通常のバッチ法と同様であるが、液相を除去する際に弱い結合のレクチンがビーズ周辺で結合-解離の平衡を繰り返していることを考慮して、溶液の半分量の上澄みを除去してメスアップする洗浄方法を用いることで、これまで洗い流されていたレクチンのエンリッチを試みる。本稿ではマルトース (Mal) 磁気ビーズとコンカナバリン A (ConA) をモデルとしてマイルドエンリッチ法の有効性を検証し、さらにマウス小胞体画分からの未知レクチン探索に応用したので報告する。

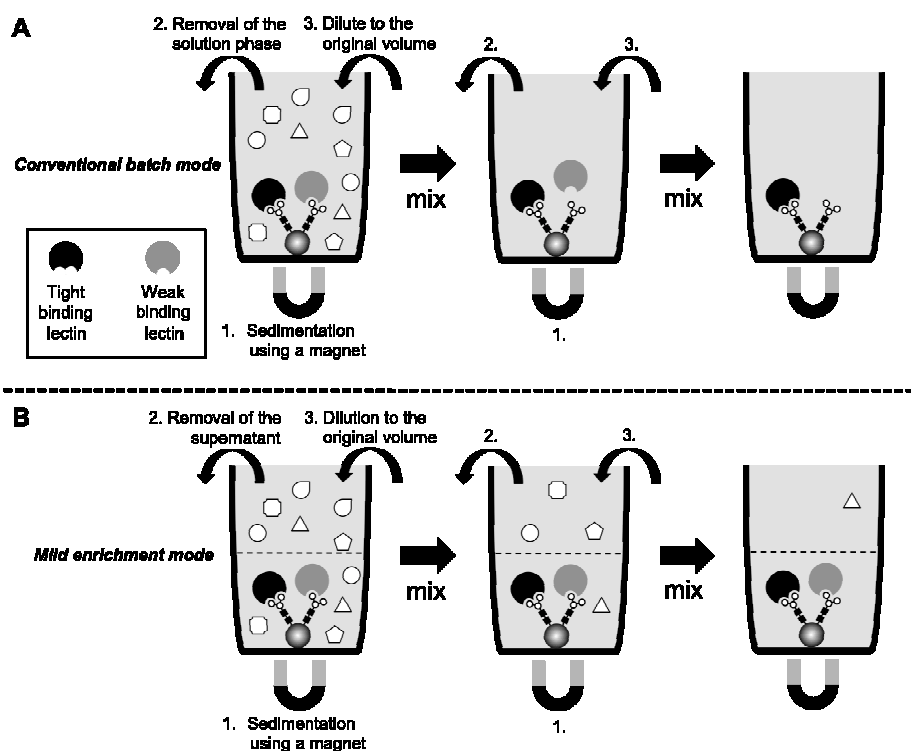


図1 糖鎖磁気ビーズを用いたレクチンエンリッチ法：(A) 通常のバッチ法、(B) マイルドエンリッチ法

2. 実験方法

本研究では磁気ビーズとして Invitrogen 社製 Dynabeads-M280 Tosylactivated を使用した。レクチンは Sigma 社製 ConA および生化学バイオビジネス社製小麦胚芽レクチン (WGA) を使用した。またコントロールタンパク質として SIGMA 社製ウシ血清アルブミン (BSA) を用いた。マウス小胞体画分は SAM マウス研究協議会から分与される SAMR1 および SAMP10 を日本 SLC 社経由で凍結肝臓として入手し、破碎後、遠心分離によって調製した。磁気ビーズ上の固定化する糖鎖は東京化成工業社製マルトースおよび化学合成した Glc1Man9GlcNAc2 (G1M9) 型高マンノース糖鎖を用いた。

2. 1 糖鎖磁気ビーズの合成

典型的な手法: Mal (100 mg, 0.292 mmol) を飽和炭酸水素アンモニウム水溶液 (2 mL) に溶解し、0°C で 24 時間撹拌した。反応終了後、反応液を減圧濃縮し、水で繰り返し供沸することで系内の炭酸およびアンモニアを除去してグリコシルアミン体を得た。得られたグリコシルアミンをジオキサン:水 (1:1) 混合溶媒 (5mL) に溶解し、氷冷下、炭酸水素ナトリウム (247 mg, 2.94 mmol) および塩化クロロアセチル (12.2μL, 0.15 mmol) を 15 分ごとに 3 回加えた。氷冷下、時間撹拌後、反応液を減圧濃縮し残渣を SepPak®C-18 (Waters Co.) (H₂O to 20% MeOH) にて精製し、クロロアセチル体を得た。次いでクロロアセチル体を 30% アンモニア水溶液 (5 mL) と 24 時間反応後、アンモニアガスを減圧留去し Mal-Gly を 30.8 mg (26%, 3 工程) 得た。Mal-Gly: MALDI-TOF MS calcd. For C₁₄H₂₆N₂O₁₁m/z 398.15, found 398.26.

Dynabeads M-280 Tosylactivated (3 mg), Mal-Gly (50 μg), グリシン (0, 50, 100, 250 or 500 μg), を 0.1M borate pH9.5 (1.3mL) に溶解した。転倒混和しつつ 37 °C で 24 時間インキュベート後、磁石でビーズを沈降させ、バッファーを [PBS pH7.4, 0.1% BSA] に交換した。転倒混和、磁石によるビーズの沈降、バッファーの交換をさらに 3 回繰り返し、糖鎖磁気ビーズを得た。

2. 2 バッチ法によるレクチンの選別

マイクロチューブ内で Mal-磁気ビーズ (0.6 mg) をブロックエース反応液 (1 mg/mL, 1mL) と 4 °C で 60 分間処理後、磁石で沈降し、反応液を除去した。このように表面をコーティングした Mal-磁気ビーズにレクチン類を加えた反応液 [0.1 mg/mL ConA, 0.1mg/mL BSA, 0.1

mg/mL WGA, 0.6mg Mal-磁気ビーズ, 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MnCl₂, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris•HCl pH 7.4] を 1 mL 調製し、4 °C で 60 分間転倒混和後、磁石で Mal-磁気ビーズを沈降・回収した。溶液相の除去、バッファー (1 mM CaCl₂, 0.5 mM MnCl₂, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris•HCl pH 7.4) 1mL による希釈、4 °C で 5 分間の転倒混和、磁石によるビーズの沈降を 10 回繰り返し、非特異的に吸着したタンパク質を洗浄し、Mal-磁気ビーズ上にレクチンをエンリッチした。

2. 3 マイルドエンリッチ法によるレクチンの選別 (一般的な手法)

マイクロチューブ内で Mal-磁気ビーズ (0.6 mg) をブロックエース反応液 (1 mg/mL, 1 mL) と 4 °C で 60 分間処理後、反応液を除去した。このように表面をコーティングした Mal-磁気ビーズにレクチン類を加えた反応液 [0.1 mg/mL ConA, 0.1mg/mL BSA, 0.1 mg/mL WGA, 0.6 mg Mal-磁気ビーズ, 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MnCl₂, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris•HCl pH 7.4] を 1 mL 調製し、4 °C で 60 分間転倒混和後、磁石で Mal-磁気ビーズを沈降・回収した。溶液相の上澄み 0.5 mL 分を除去、バッファー (1 mM CaCl₂, 0.5 mM MnCl₂, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris•HCl pH 7.4) 0.5 mL による希釈、4 °C で 5 分間の転倒混和、磁石によるビーズの沈降を 20 回繰り返し、非特異的に吸着したタンパク質を洗浄し、Mal-磁気ビーズ上にレクチンをエンリッチした。

2. 4 SDS-ポリアクリルアミド電気泳動

反応液、エンリッチ後の上澄み画分、エンリッチ後のビーズ懸濁画分をそれぞれ 2 x サンプルバッファー (0.1 M Tris-HCl pH6.8, 4% SDS, 12% 20 メルカプトエタオール, 10% グルセロール, ブロモフェノールブルー) に希釈し、100 °C 5 分間インキュベート後、ATTO 製 e•PAGEL (15%) プレキャストゲルにローディングし、20mA で泳動した。泳動終了後、関東化学製 Silver Stain KANTO III で染色し、タンパク質の泳動バンドを検出した。

3. 結果と考察

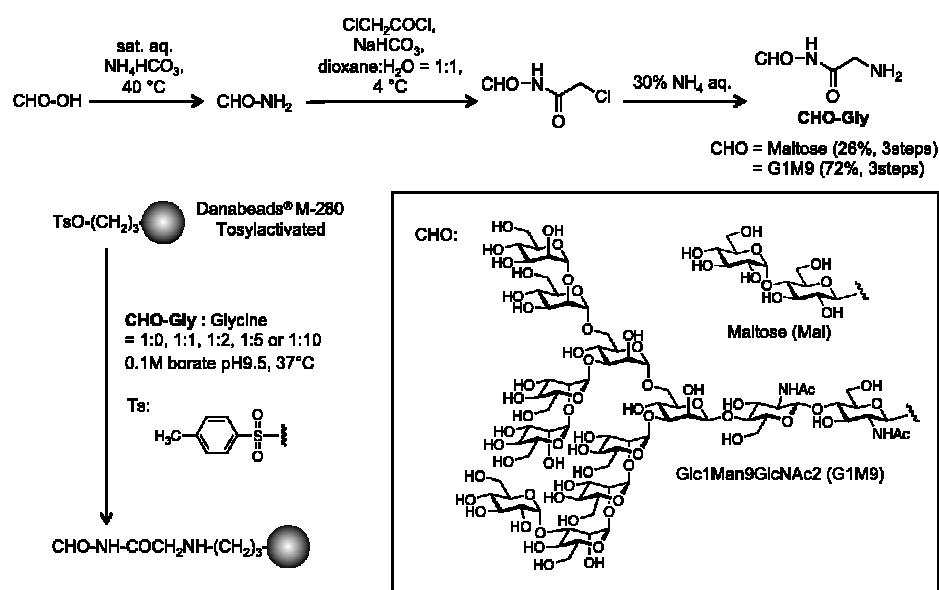
3. 1 糖鎖磁気ビーズの合成

本研究ではマイルドエンリッチ法の有効性を検証するためのモデルとして Mal-磁気ビーズによる ConA のエンリッチを選択した。ConA は分岐した α -Man 構造をもつ高マンノース型糖鎖などに強力に結合するが、Glc α 1-4Glc の結合様式をもつマルトースとは弱く結合することが知られており ($K_a = 10^4 \text{ M}^{-1}$)⁶⁾、比較的弱いレクチン活性のモデルケースとして適している。一方、磁気ビーズとしては、粒子形状が均一かつ表面が滑らかなために非特異的な吸着が少なく、再現性に優れた Invitrogen 社の Dynabeads[®]M280 Tosylactivated を選択した。このビーズは直径約 2.8 μm でほぼ細胞と同等の大きさを有しているため、糖鎖を結合した場合、細胞表面糖鎖を模倣した良いモデルとなることが期待される。またビーズ表面の活性化基としてトシル基がコーティングされており、糖鎖の還元末端にアミノ基を導入しておけば、両者を混ぜるだけで中性条件下でもカップリングすることができる。糖鎖の還元末端にアミノ基を導入するもっとも直接的な方法はグリコシルアミンへの変換である。しかしながら生成するグリコシルアミンは極めて不安定であり、磁気ビーズへの導入前駆体として長期保存可能な鍵中間体にはなり得ない。そこで Mal-グリコシルアミンにリンカーとして単純なアミノ酸であるグリシンを縮合し (Mal-Gly), その N 末端の安定なアミノ基を用いて磁気ビーズとの結合を行うこととした。

はじめに Mal-Gly⁷⁾の合成を行った (スキーム 1)。マルトースを飽和炭酸水素アンモニウム水溶液に溶解し、水溶液中で連続的に発生しているアンモニアによって還元末端をグリコシルアミンへと変換した⁸⁾。グリコシルアミンは容易に加水分解されるため、反応液を減圧濃縮後ただちに塩化クロロアセチルと反応させ、糖鎖の還元末端にクロロアセチル基を導入した。ついでクロロアセチル体をアンモニア水溶液と反応させ、末端のクロロ基をアミノ化することでグリシンへと変換し、Mal-Gly の合成を完了した。本反応は収率が三工程 26%と必ずしも高くないが、これはグリコシルアミンが生成直後から加水分解を始めるためであり、加水分解生成物であるマルトースが 40%程度回収されている。

一方、還元末端の糖残基が N アセチルグルコサミンのようなアミノ糖の場合、二位のアセトアミドの電子吸引力によってグリコシルアミンが安定化される。本研究では高マンノース糖鎖特異的な未知レクチンを選別するために Glc1Man9GlcNAc2 (G1M9)-磁気ビーズを併せて調製した。その際の鍵中間体となる G1M9-Gly⁹⁾は Mal-Gly と同様の手法で合成したが、還元末端が GlcNAc であるため、前述の理由により収率は三工程 72%であった。

つぎに Mal-Gly, G1M9-Gly とともに Dynabeads[®]M280 Tosylactivated と 0.1M borate (pH9.5) 中で、一晚反応させることで磁気ビーズ上に糖鎖を被覆した。この際、糖鎖-Gly と Gly を異なる混合比でビーズとカップリングさせ、糖鎖の被覆率を系統的に制御した磁気ビーズを調製した。



スキーム 1 糖鎖磁気ビーズの合成

3. 2 Mal 磁気ビーズと ConA によるモデル実験

3. 2. 1 磁気ビーズ上の糖鎖被覆率の検討

磁気ビーズ上の最適糖鎖被覆率を決定するために、糖鎖含有量の異なる a-e の 5 種類の Mal-磁気ビーズを用いてマイルドエンリッチ法により ConA の選別実験を行った (図 2)。具体的にはまず ConA と Mal-磁気ビーズの懸濁液 1mL に対し、磁石によるビーズの沈降後、液量の半分を新しいバッファーに交換していくマイルドエンリッチを 20 回繰り返して十分に洗浄した。洗浄後のビーズ懸濁液の上澄み画分およびビーズからの溶出画分を、ビーズ a-e のそれぞれに対して SDS-PAGE で分析したところ、ビーズ a, b, c, d は上澄み画分 (レーン 2, 4, 6, 8) にバンドが検出されず、非特異的な結合を十分に除去できていることが分かった。一方、ビーズ e は 20 回エンリッチ後の上澄み画分にも ConA のバンドが残っており (レーン 10)、リガンド糖鎖の含有量が不十分なことが明らかとなった。一方、溶出画分にはいずれも ConA のバンドが検出されたが (レーン 3, 5, 7, 9, 11), 50 kDa 付近の不純物のバンドが少なく S/N 比の高いビーズ b (レーン 5) が ConA の選別には最適であると結論した。

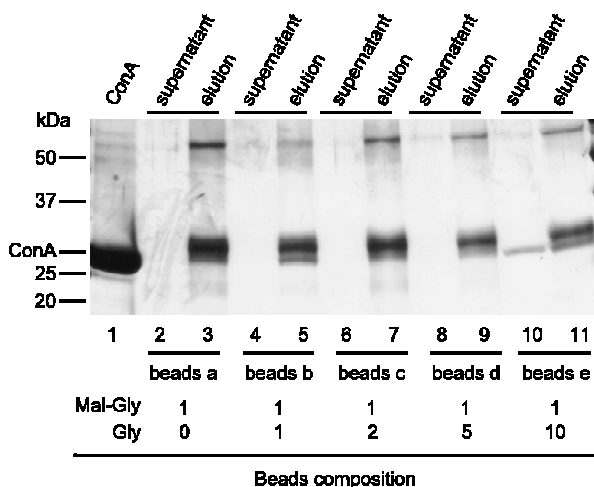


図 2 Mal-磁気ビーズの最適糖鎖被覆率の検討

3. 2. 2 バッチ法とマイルドエンリッチ法の比較

前項で Mal-被覆率を最適化したビーズ b を用いて、ウシ血清アルブミン (BSA), 小麦胚芽レクチン (WGA), ConA のタンパク質混合液から ConA の選別実験を行った。この際、通常のパッチ法とマイルドエンリッチ法のエンリッチ効率を比較し、本法の有効性を検証した (図 3)。

パッチ法の場合 (図 3A), タンパク質と Mal-磁気ビーズの懸濁液 1mL に対して液相の交換による洗浄を 5 回繰り返した後の上澄み画分 (レーン 2 : 5mL 洗浄) および

10 回繰り返した後の上澄み画分 (レーン 3 : 10mL 洗浄) には、有意のバンドは検出されず十分に洗浄が行われていることが分かった。レーン 4 には Mal-磁気ビーズからの溶出画分を示したが、ConA に由来するバンドは痕跡程度にしか検出されなかった。

一方、マイルドエンリッチ法を用いた場合の結果を図 3B に示した。この方法の洗浄工程における 1 回のバッファー交換量はパッチ法の半量であるため、両手法の洗浄量を一致させるべくマイルドエンリッチ法の洗浄回数をパッチ法の 2 倍に設定した。その結果、洗浄後の上澄み画分にタンパク質のバンドが検出されないのに対し (レーン 2 : 5mL 洗浄, レーン 3 : 10 mL 洗浄), レーン 4 のビーズ溶出画分には ConA のバンドがはっきりと現れた。これを図 3A と比較すると溶出画分におけるエンリッチ効率の違いは明確であり, Mal と ConA のような比較的弱い結合に対して, マイルドエンリッチ法の有効性が確認された。

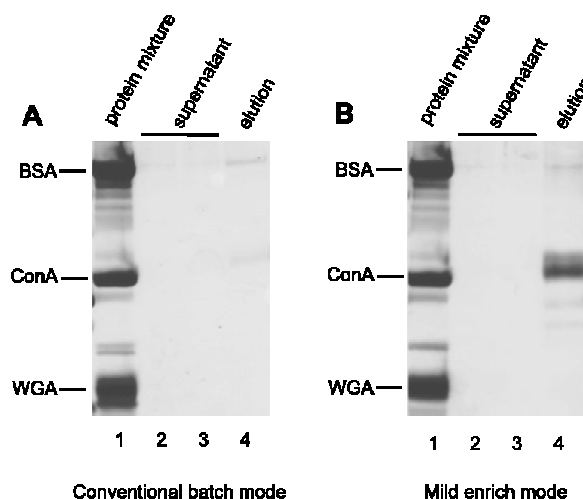


図 3 マイルドエンリッチ法の有効性の検証 : (A) バッチ法, (B) マイルドエンリッチ法

3. 2. 3 生体抽出液からの目的レクチンの選別

本研究の最終的な目的は、生体抽出液などの複雑なタンパク質混合液の中から特定の糖鎖特異的なレクチンを選別することにある。そこで我々の提案するマイルドエンリッチ法が実際の生体抽出液に対して有効であるかを判断するために、動物組織由来のミクロソーム画分に ConA を添加したモデルタンパク質混合液に対し、Mal-磁気ビーズを用いて ConA のエンリッチを試みた (図 4)。ミクロソーム画分としてはマウス (SAMP10 : 老化促進モデル) 肝臓を破碎後、遠心分離¹⁰⁾したペレットを [20 mM Tris-HCl pH7.4, 0.25M Sucrose, 2 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol, protease inhibitor cocktail (Roche), 0.5%

Triton X-100] にて可溶化し用いた。ミクロソーム画分 (1 mg/mL) に ConA (0.1mg) を添加したタンパク質混合液 (1 mL) に Mal-磁気ビーズを加え、マイルドエンリッチ法によって 20 回洗浄を繰り返した後の上澄み画分をレーン 2, ビーズ溶出画分をレーン 3 に示した。その結果, 溶出画分に ConA を含むいくつかのバンドが検出され, Mal 特異的なレクチン候補を選別することができた。これにより本法は複雑な生体抽出液中でも有効にはたらくことが分かった。

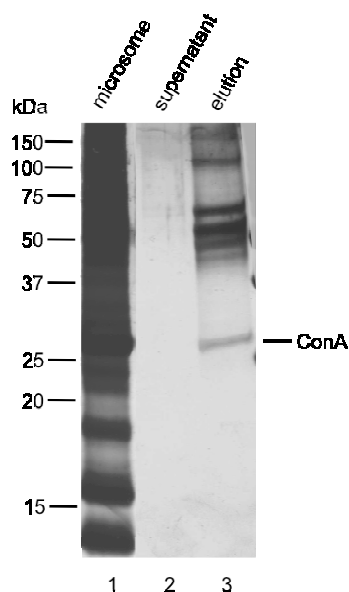


図4 生体抽出液（マウスミクロソーム画分）に対するマイルドエンリッチ法の有効性

3. 3 マウスミクロソーム画分からのG1M9 特異的未知レクチンの選別

3. 3. 1 G1M9 磁気ビーズ上の糖鎖被覆率の検討

前項の検討により Mal-磁気ビーズと ConA の結合をモデルとしてマイルドエンリッチ法の有効性を確認することができた。本項ではマイルドエンリッチ法を生体抽出液からの未知レクチンの選別に応用する。そのためにはレクチン探索の対象となるオルガネラを選択し, その環境に存在する本物の糖鎖リガンドをもつ磁気ビーズを調製しなくてはならない。我々は長年, 小胞体糖タンパク質品質管理機構における糖鎖機能解析に携わってきた¹¹⁾。本機構には多くのレクチンが関わるが, ここ数年でも OS9¹²⁾や Malectin¹³⁾といった新しいレクチンの存在が次々と明らかになり, そのメカニズム全容の解釈にはさらに網羅的なレクチンの探索が必要とされている。そこで本研究ではマウス肝臓由来の小胞体を対象とし, 小胞体型高マンノース糖鎖のひとつである Glc1Man9GlcNAc2

(G1M9) を固定化した磁気ビーズによってレクチン候補の探索を行うこととした。

まずビーズ上の最適な G1M9 被覆率を決定するために, マウス (SAMP10: 老化促進モデル) 肝臓より遠心分離したミクロソーム画分 (小胞体を主成分とする) に対し, 糖鎖被覆率を系統的に変化させた G1M9-磁気ビーズ A-E によるマイルドエンリッチを前項と同様の手法で行い, レクチンの選別を行った (図 5)。糖鎖を持たないビーズ E の溶出画分にバンドが全く検出されないのに対し (レーン 11), G1M9 をもつビーズ A-D には明確なバンドが検出された (レーン 3, 5, 7, 9) ことで, エンリッチされたバンドは G1M9 特異的なレクチンの可能性が高いものと考えられる。またエンリッチされたバンドの明瞭さやコントラストから, 今回の実験条件にはビーズ D が比較的適していることが分かった。

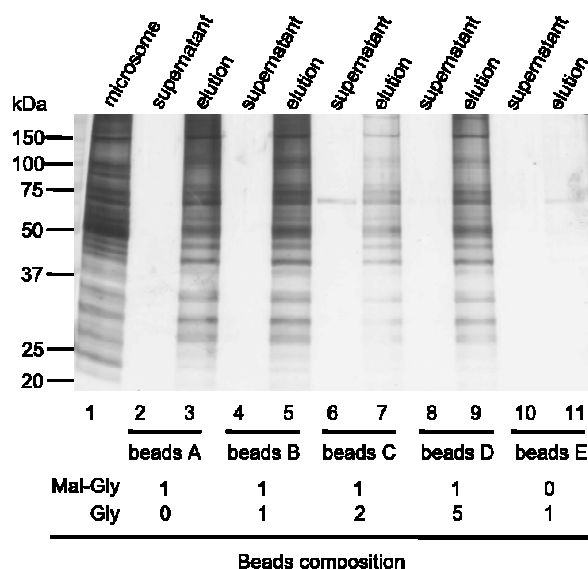


図5 G1M9-磁気ビーズの最適糖鎖被覆率の検討

3. 3. 2 正常老化および老化促進モデルマウス由来の小胞体画分における選別レクチン候補の比較

G1M9-磁気ビーズを用いたマイルドエンリッチによりマウスミクロソーム画分からレクチン候補を選別できたため, つぎに異なるトランスジェニックマウス間での選別レクチン候補の違いを検討した (図 6)。用いたマウスは正常老化モデルマウス (SAMR1) と老化促進モデルマウス (SAMP10: アルツハイマーモデルとして用いられる) である。両マウスの肝臓より抽出したミクロソーム画分 (レーン 1 および 6) に対し, G1M9-磁気ビーズ (ビーズ D: 図 5 参照) によるマイルドエンリッチを行ったところ, レーン 3 および 4 のようなレクチン候補群が選別された。矢印で示したバンドが比較的明瞭なレクチン候

補であるが、例えば a は GIM9 特異的なレクチンシャペロンとして知られているカルネキシン¹⁴⁾ (65 kDa) , b はその可溶性ホモログであるカルレティキュリン¹⁵⁾ (46 kDa) であることが示唆される。両モデルマウス由来のミクロソーム画分から得られたレクチン候補群は概ね一致していたが、矢印 x に示すバンドは SAMP10 のみに検出されたものであり、これがアルツハイマーなどの神経変性疾患に特有のレクチン候補であれば、興味深い結果である。

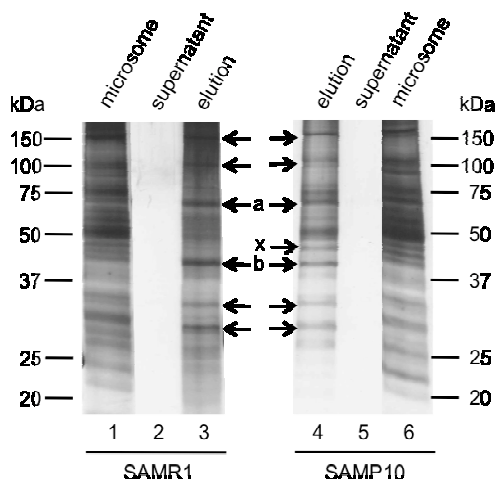


図6 異なるトランスジェニックマウスからエンリッチされるレクチン候補の違い

4. 総括

本研究では糖鎖磁気ビーズを用いたタンパク質混合液からのレクチン選別において、従来のパッチ法で用いられていた液相の完全除去によるビーズ洗浄を、液相の上澄み半量除去による穏やかな洗浄法に改良することで、結合の弱いレクチンも洗い流すことなく濃縮できるマイルドエンリッチ法を提案し、その有効性を実証した。

また本法を生体抽出液からの未知レクチンの選別に応用したところ、いくつかのレクチン候補をエンリッチすることができた。今後、SDS-PAGE上に得られたレクチン候補のバンドを切り出し、酵素消化と質量分析を組み合わせたペプチドマスフィンガープリンティング法によってタンパク質の同定を行うことで、本研究を未知レクチンの発見、同定へと展開していきたい。

参考文献

- 1) (a)R. A. Dwek, *Chem Rev.*, **96**, 683 (1996); (b)W. J. Welch, *Semin. Cell. Dev. Biol.*, **15**, 31 (2004)
- 2) N. Sharon, H. Lis, *Glycobiology*, **14**, 53R (2004)
- 3) M. Brzeska, M. Panhorst, P.B. Kamp, J. Schotter, G. Reiss, A. Pühler, A. Becker, H. Brückl, *J. Biotechnol.*, **112**, 25 (2004)
- 4) H. Tateno, S.N. Tsuruta, J. Hirabayashi, *Nat. Protoc.*, **2**, 2529 (2007)
- 5) N. Kawasaki, I. Matsuo, K. Totani, D. Nawa, N. Suzuki, D. Yamaguchi, N. Matsumoto, Y. Ito, K. Yamamoto, *J. Biochem.*, **141**, 221 (2007)
- 6) F.G. Loontjens, J.P. Van Wauwe, C.K. De Bruyne, *Carbohydr. Res.*, **44**, 150 (1975)
- 7) K. Totani, I. Matsuo, Y. Ito, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 2285 (2004)
- 8) L. M. Lihkoshertov, O. S. Novikova, V. A. Dereviskaja, N. K. Kochetkov, *Carbohydr. Res.*, **146**, C1 (1986)
- 9) K. Totani, I. Matsuo, Y. Ihara, Y. Ito, *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 5220 (2006)
- 10) L. Urbani, R.D. Simoni, *J. Biol. Chem.*, **265**, 1919 (1990)
- 11) (a)K. Totani, Y. Ihara, I. Matsuo, H. Koshino, Y. Ito, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **44**, 7950 (2005); (b)K. Totani, Y. Ihara, I. Matsuo, Y. Ito, *J. Biol. Chem.*, **281**, 31502 (2006); (c) K. Totani, Y. Ihara, I. Matsuo, Y. Ito, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 2101 (2008); (d)K. Totani, Y. Ihara, T. Tsujimoto, I. Matsuo, Y. Ito, *Biochemistry*, **48**, 2933 (2009)
- 12) J.C. Christianson, T.A. Shaler, R.E. Tyler, R.R. Kopito, *Nat. Cell. Biol.*, **10**, 272 (2008)
- 13) T. Schallus, C. Jaech, K. Fehér, A.S. Palma, Y. Liu, J. C. Simpson, M. Mackeen, G. Stier, T. J. Gibson, T. Feizi, T. Pieler, C. Muhle-Goll, *Mol. Biol. Cell.*, **19**, 3404 (2008)
- 14) C. Hammond, I. Braakman, A. Helenius, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 913 (1994)
- 15) J.R. Peterson, A. Ora, P.N. Van, A. Helenius, *Mol. Biol. Cell*, **6**, 1173 (1995)