

The Enzymatic Synthesis of Glycosidic Bonds : “Glycosynthases” and Glycosyltransferases

グリコシド結合の酵素合成 : “グリコシターゼ” と糖転移酵素

Davies, Gideon J.¹ ; Charnock, Simon J.¹ ; and Henrissat, Bernard ²

¹Department of Chemistry, Structural Biology Laboratory, University of York, Heslington, York YO10 5DD, United Kingdom

²Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, CNRS, Universités Aix-Marseille I and II, 31 Chemin Joseph Aiguier, F13402 Marseille cedex 20, France, FAX : 44 1904-410519, E-mail : davies@ysbl.york.ac.uk

Key Words : cellulose, glycoside hydrolase, glycosyltransferase, glycosynthase, mechanism, sequence

Abstract

The last 10 years has witnessed enormous advances in the structural enzymology of enzymatic glycosyl transfer. Developments in molecular biology, coupled with the possibility for “rapid-throughput” protein crystallography have led to a plethora of 3-D structures for glycoside hydrolases. Synergistic application of synthetic chemistry to structural biology has led to the development of numerous oligosaccharide mimics and mechanistic probes. Underpinning much of this work is a classification of carbohydrate-active enzymes (“CAZymes”) which has now been extended to include glycoside hydrolases, carbohydrate esterases, polysaccharide lyases and glycosyltransferases, together with their associated non-catalytic modules. Recently, there have been exciting developments in our understanding of the structures and catalytic mechanisms involved in the synthesis of glycosidic bonds both by Nature’s own catalytic apparatus and by mutant glycoside hydrolases termed “glycosynthases”. Here we review those developments including the structure of the *Bacillus subtilis* SpsA, a “family GT-2” glycosyltransferase, and discuss its relevance to the synthesis of biopolymers such as cellulose, chitin, hyaluronan and the Nod factors.

要 約

過去10年間は、酵素的な糖転移反応の構造酵素学において大きな進歩が示された時代である。分子生物学の進歩と、高速処理の可能なタンパク質結晶学との組み合わせによって、糖質加水分解酵素の3次元構造があふれるほど明らかにされた。合成化学と構造生物学を共同して適用することによって、多数のオリゴ糖疑似化合物や機械的プローブが作られた。この仕事の多くを支えたのは糖質作用性酵素(「CAZymes」)の分類であり、今日では非触媒モジュールと合わせて、糖質加水分解酵素、糖質エステラーゼ、多糖リアーゼおよび糖転移酵素を含む範囲にまで拡張されている。それらの構造とグリコシド結合の合成に関わる触媒メカニズムに対するわれわれの理解は、自然のもつ触媒器械および、「グリコシターゼ」と呼ばれる糖質加水分解酵素変異体によって、最近刺激的に発展した。ここでは「GT-2ファミリー」糖転移酵素である*Bacillus subtilis* SpsAの構造を含めたそれらの発展を総説し、セルロース、キチン、ヒアルロナンおよびNod因子のような生体高分子合成とこの酵素との関連を考察する。

A. Carbohydrate-Active Enzymes and Their Sequence Families

Carbohydrates, in the form of di-, oligo- and polysaccharides and glycoconjugates play numerous roles in living organisms from structure, food storage and utilisation through to cellular signalling. These diverse roles, permitted by the structural and chemical diversity of oligosaccharides (1), are reflected in a spectrum of carbohydrate-active synthetic (glycosyltransferases) and degradative/modifying enzymes (glycoside hydrolases, polysaccharide lyases and carbohydrate esterases). Recent developments and advances in molecular biology (including the many genome projects) have coincided with the advent of “high-throughput” crystallography (made possible

A. 糖質作用性酵素とその配列上のファミリー

2糖、オリゴ糖、多糖や複合糖質などの糖質は、生体内で構造成分として、または食物の貯蔵や利用から細胞の情報伝達まで多数の役割を果たしている。オリゴ糖の構造的、化学的相違(1)によってなされる多様な役割は糖転移酵素と分解/修飾酵素(糖質加水分解酵素、多糖リアーゼ、糖質エステラーゼ)のスペクトルに反映されている。(多くのゲノムプロジェクトを含む)最近の分子生物学の発展と進歩は、(現代のシンクロトロン源、低温結晶学の技術、高速2次元X線検出器と強力な計算法と組み合わせられた高速コンピューターによって可能になった)「高処理量の」結晶学の進歩と一致している。酵素学と合成化学ととも

by modern synchrotron sources, cryo-crystallographic techniques, rapid 2-D X-ray detectors and fast computers coupled to powerful algorithms). Together with enzymology and synthetic chemistry these techniques have together provided a detailed understanding of the reaction mechanism and underlying chemistry involved in glycosyl transfer (reviewed in Refs. 2 and 3). One of the driving forces for the advancement in the glycoside hydrolase field has been the search for new biocatalysts by enzyme companies. In the search for new antibiotics, anti-adhesins and anti-viral agents we are also beginning to see a great commercial and medical interest in the synthetic apparatus- the glycosyltransferases.

This multitude of enzymes poses numerous problems concerning classification. Many systems of nomenclature have been proposed and many remain in use. A sequence-based comparison of glycoside hydrolases was proposed by one of us in 1991 (4). The hydrolase families have been updated regularly (5, 6) and recently reviewed (7). The classification has been expanded to include glycosyltransferases (8), carbohydrate esterases, polysaccharide lyases and all their associated non-catalytic modules (9). Details of the latest classification are available on the web at URL <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/db.html>. A feature of these classifications is that, since sequence similarity is reflected in structural similarity, a classification based upon sequence alone necessarily also provides a wealth of information on the 3-D structure of the protein. We can therefore state, with some confidence, that within a sequence-derived family 3-D structure will be conserved. Furthermore, since the enzymatic reaction mechanism is dictated by the relative locations of functional groups within their 3-D template, the mechanism and stereochemistry of the catalysed reaction is conserved within each family (first described in Ref. 10), with only a few notable exceptions. As we enter into the post-genomic era, the power of this classification as a tool directing “structural genomics”, especially in the complex area of glycobiology, is magnifying.

Carbohydrate-active enzymes are frequently modular (an example is shown in Fig. 1). Indeed, this modularity is one of the most exciting revelations of the past 20 years (11). Typically, the modular structure may simply be a non-catalytic module linked to the catalytic domain, but frequently multi-modular

にこれらの技術により、糖転移反応に関わる基礎的な化学や反応機構の詳細を理解することができた(文献2, 3に総説)。糖質加水分解酵素分野における進歩の推進力の1つは、酵素会社による新しい生体触媒の探索である。新しい抗生物質、抗アドヘジン、抗ウイルス薬を探索する研究の中で我々はまた、合成器械-糖転移酵素にも大きな商業的、医学的な興味を持ちだしている。

多数の酵素は分類に関するおびただしい問題を提起している。多くの命名法のシステムが提案され、その多くが使用され続けている。糖質加水分解酵素の配列に基づく比較が、1991年に我々の中の一人によって提案された(4)。加水分解酵素ファミリーはその後定期的に更新され(5, 6)、最近総説が書かれた(7)。その分類は糖転移酵素(8)、糖質エステラーゼ、多糖リアーゼおよびこれらに結合した全ての非触媒モジュールを含めることによって拡張された(9)。最近の分類の詳細は、<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/db.html>のURLでweb上で見ることができる。これらの分類の特徴は、配列の類似性が構造的類似性に反映されるので、配列だけによる分類から必然的にタンパク質の3次元構造における大切な情報が分かる。だから我々は自信を持って、配列により得られたファミリーの中で3次元構造は保存されていると述べる。さらに、酵素反応機構は3次元鑄型での官能基の相対的な配置によって決まるので、触媒反応の機構と立体化学は、少数の例外が存在するものの、それぞれのファミリーの中で保存されている(10)。ポストゲノム時代に入ったので「構造的ゲノミクス」を指向する道具として、この分類の威力は特に糖鎖生物学の複雑な分野において増大している。

糖質作用性酵素はたびたびモジュール構造をもつ(図1に例)。このモジュール性は過去20年の最も意外な新事実のひとつである(11)。典型的にはモジュール構造は非触媒モジュールが触媒ドメインに結合しているだけのようなのだが、しばしば多数の

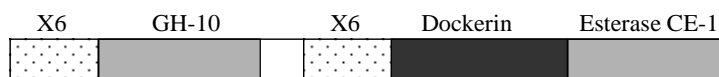


Fig. 1. An example of the, often complex, modularity of carbohydrate-active enzymes: the xylanase Xyn10B from *Clostridium thermocellum*. The enzyme contains two catalytic modules, a family 10 glycoside hydrolase and a family 1 carbohydrate esterase, a single cellulosomal dockerin sequence and two other non-catalytic “X6” domains, at least one of which has recently been shown to be a xylan-binding module (44).

proteins are observed which contain numerous non-catalytic and catalytic modules. Sometimes, but not always, these non-catalytic modules are involved in substrate-binding, but for many the function is, as yet, unknown. Glycosidic bond synthesis is performed by two classes of catalytic domain in the sequence classification: activated-sugar dependent glycosyltransferases and glycoside hydrolases utilising transglycosylation. Prior to examining recent work on Nature's synthetic apparatus, the glycosyltransferases, it is worth reviewing the recent successes in the application of mutant *hydrolytic* enzymes for glycosidic bond synthesis *in vitro*.

B. Glycosynthases: Mutant Hydrolases for Chemoenzymatic Synthesis

One of the most exciting recent advances in the chemoenzymatic synthesis of glycosidic bonds is the development of mutant glycoside hydrolases, termed "glycosynthases" by the Withers group at the University of British Columbia. These engineered enzymes have the potential to deliver specifically designed oligosaccharides on the large-scale required for clinical assessment (12). In order to understand how these mutant enzymes work, however, we must first revisit the catalytic mechanism of retaining glycoside hydrolases.

The reaction of retaining β -glycoside hydrolases occurs *via* a double-displacement reaction mechanism in which a covalent glycosyl-enzyme intermediate is formed and subsequently hydrolysed *via* oxocarbenium-ion-like transition-states, Fig. 2 (2,3,13,14). A feature of this mechanism is that the covalent glycosyl-enzyme intermediate may be intercepted with non-water nucleophiles, typically other saccharide species, to generate elongated reaction products in a process known as *transglycosylation*. Indeed, for many natural enzymes, this transglycosylation process is their *modus operandi*: examples being cyclodextrin glycosyltransferase (15) and xyloglucan xyloglucosyltransferase. In the pursuit of new and efficient syntheses for biologically-active oligosaccharides (16,17) such transglycosylation processes have been exploited in "classical" chemoenzymatic syntheses (recently reviewed in Ref. 18). The drawback of this approach is that the derived product is necessarily also a substrate for the enzyme and the hydrolytic pathway in 55M water usually prevails. Tight kinetic or thermodynamic control is required if the process is to be even moderately successful.

Recent exciting developments by the Withers group have demonstrated the potential of mutant glycosidases in chemoenzymatic synthesis (12). Replacement of the enzymatic carboxylate nucleophile (always Asp or Glu) of a retaining glycosidase renders the enzyme *hydrolytically inactive*. When combined with activated α -1-F sugars (whose axial fluoride mimics the high-energy covalent intermediate shown in Fig. 2), however, these mutant enzymes are able to synthesise oligosaccha-

非触媒、触媒モジュールを含むマルチモジュールタンパク質がみつけれられている。これらの非触媒モジュールは基質結合に関わっている場合があるけれども、多くの場合機能はまだ知られていない。グリコシド結合の合成は、配列の分類の2種類の触媒ドメインによってなされる：それらは活性化された糖に依存する糖転移酵素、およびトランスグリコシレーションを利用する糖質加水分解酵素である。天然の合成器械である糖転移酵素についての最近の研究を吟味する前に、試験管内におけるグリコシド結合の合成に加水分解酵素変異体を応用して最近成功したことを概説する。

B. グリコシターゼ: 化学的酵素合成のための加水分解酵素変異体

グリコシド結合の化学的酵素合成における最近の最も刺激的な進歩の一つは、British Columbia 大学の Withers のグループによる「グリコシターゼ」と呼ばれる糖質加水分解酵素変異体の開発である。これらの加工された酵素は、特異的に設計されたオリゴ糖鎖を臨床的な評価に必要とされる大スケールでもたす能力がある(12)。しかし、どのように変異体酵素が働くのかを理解するには、保有している糖質加水分解酵素の触媒機構をまず見直さなければならない。

-加水分解酵素の反応は、共有的な糖-酵素中間体が形成された後、オキソカルベニウムイオン様の遷移状態を経て加水分解される2重置換反応機構を経て起こる(図2)(2、3、13、14)。この機構の特徴は、共有的な糖-酵素中間体が非水求核原子、典型的には他の糖類分子によって切断され、グリコシル転移として知られている過程で伸長した反応生成物を生じる。実際、多くの天然酵素がこのグリコシル転移過程の方法をとっていて、例えばシクロデキストリン糖転移酵素(15)、キシログルカンキシログルコシル転移酵素にみられる。生物学的活性オリゴ糖鎖の新しく有効な合成を追求する道すじで(16、17)、そのようなグリコシル転移過程は「古典的な」化学的酵素合成において活用されてきた(最近 18 に総説)。この方法の欠点は得られる生成物が必ず酵素に対する基質にもなり、55M水中での加水分解経路が通常優勢になる。もしこの過程をほどほどに成功させるなら、強い速度論的あるいは熱力学的な調節が必要とされる。

最近のWithersのグループによる刺激的な発展は、化学的酵素合成における変異体グリコシターゼの可能性を示した(12)。グリコシターゼの酵素的カルボキシル求核基(常にAsp、Gluである)を置換すると「酵素の加水分解的不活性」が導かれる。しかし活性化された -1-フッ化糖と組み合わせると(アキシャルなフッ化物が図2のような高エネルギー共有中間体を模倣する)、これらの変異体酵素は実際に非常に高い収率でオリゴ糖を合成する。Glu-AlaあるいはGlu-Ser(下を参照)の変異によって生じた空ス

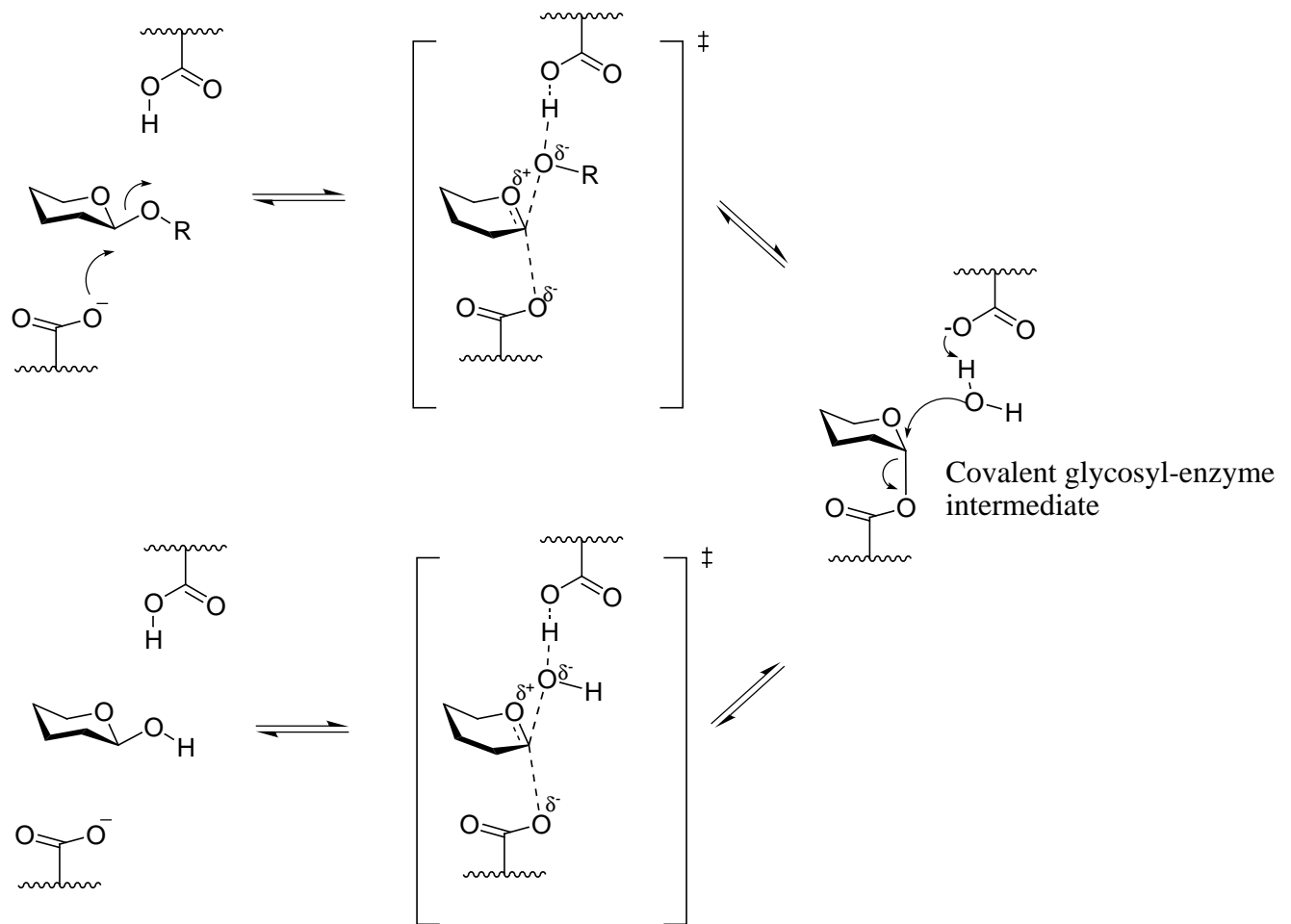


Fig. 2. The retaining mechanism. A covalent glycosyl-enzyme intermediate is formed, and subsequently hydrolysed, *via* oxacarbenium-ion like transition states. A feature of the retaining mechanism is that the covalent intermediate may be intercepted with non-water nucleophiles in a synthetic process known as transglycosylation.

rides in very high yield indeed. The vacant space presented by the Glu-Ala or Glu-Ser mutations is more than adequate to accommodate the axial fluoride substituent of the activated donor sugar, Fig. 3 and the powerful fluoride-ion leaving group pushes the reaction in favour of synthesis. Quantitative (95–100%) yields are not uncommon.

The glycosynthase technology has been further refined, by the group at UBC, to utilise a serine in place of the nucleophile. These 2nd-generation glycosynthases display a far greater catalytic power (presumably due to the H-bond between serine hydroxyl and the departing fluoride ion) which greatly enhances the catalytic repertoire and synthetic utility of the enzymes (19). Other groups have now also developed successful glycosynthase mutants on a variety of different structural templates (20–22). The development of a powerful glycosynthase on an endoglucanase template displaying multiple sugar binding subsites has been used, in conjunction with exploitation of the 3-D structure of the enzyme, to generate a variety of substituted

ペースは、図3のように活性化された糖供与体のアキシャルなフッ化物置換基を受け入れるのに十分すぎる程で、かつ強力なフッ化物イオン放出グループは合成の反応を後押しする。定量的な収率(95~100%)も珍しくない。

グリコシンターゼ技術は、UBLのグループによって、求核基の位置にセリンを利用するところまで更に改良された。これらの2世代目のグリコシンターゼは(おそらくセリンヒドロキシル基と離れたフッ化物イオンとの間の水素結合によって)さらに大きな触媒力を発揮し、これは酵素の触媒レパートリーと合成の有効性を非常に高めている(19)。他のグループも今またさまざまな異なる構造の型をもとにグリコシンターゼ変異体の開発に成功している(20–22)。多数の糖結合サブサイトをもっているエンドグルカナーゼ型をもとに有効なグリコシンターゼが開発され、酵素の3次元構造の活用と組み合わせられて、多様な置換基や分枝を持つオリゴ糖鎖を生成するために用いられてきた(21)。グリコシンターゼは適切に利用されるとき、オリゴ糖と多

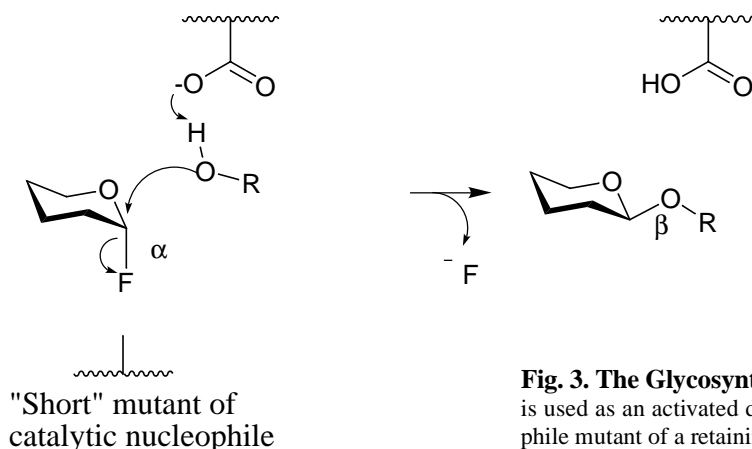


Fig. 3. The Glycosynthase reaction. An α -1-F glycoside is used as an activated donor in combination with a nucleophile mutant of a retaining glycoside hydrolase (12).

and branched oligosaccharides (21). It is likely that glycosynthases, when appropriately harnessed, will open up new horizons for the enzymatic synthesis of oligo and polysaccharides and will rival, and in some instances even surpass, Nature's own synthetic apparatus.

C. Sequences and Families of Activated-Sugar Dependent Glycosyltransferases

The majority of glycosidic bonds in nature are synthesised, not by glycoside hydrolases performing transglycosylation, but by synthetic enzymes utilising activated sugar donors. Typically the activating group is a nucleoside-phospho- or lipid-linked sugar. These enzymes are termed "glycosyltransferases". The catalytic mechanisms of these enzymes is becoming clearer. Most likely a catalytic base is required to activate the sugar acceptor species for nucleophilic attack and an enzymatic carboxylate may be required to coordinate a phosphate-bound divalent metal ion on the activated sugar donor. A mechanistic scheme for inverting glycosyltransferases (analogous to the "glycosynthase" reaction, described above) may easily be proposed, Fig. 4. The reaction mechanism for

糖の酵素的合成の新しい地平線を開くことになるであろうし、自然のもつ合成装置と競争したり、それを超える場合もあるであろう。

C. 活性化糖依存性糖転移酵素の配列とファミリー

自然界のグリコシド結合の大部分はグリコシド転移反応を行う糖質加水分解酵素ではなく、活性化された糖供与体を利用する合成酵素によって合成されている。典型的に、活性化基はヌクレオシド糖リン酸、あるいは脂質結合糖質である。これらの酵素は、「糖転移酵素」と呼ばれている。これらの触媒酵素の反応機構はしだいに明らかになってきている。最も可能性が高いことは、求核攻撃するために触媒塩基が糖受容体を活性化することが必要で、活性化された糖供与体上でリン酸に結合した2価金属イオンに酵素のカルボキシル基が配位結合することも必要とされる。図4のような転化する糖転移酵素の機構的図式(前に述べた「グリコシターゼ」反応と類似)が容易に提案される。しかし、保存されている糖転移酵素の反応機構はまだよ

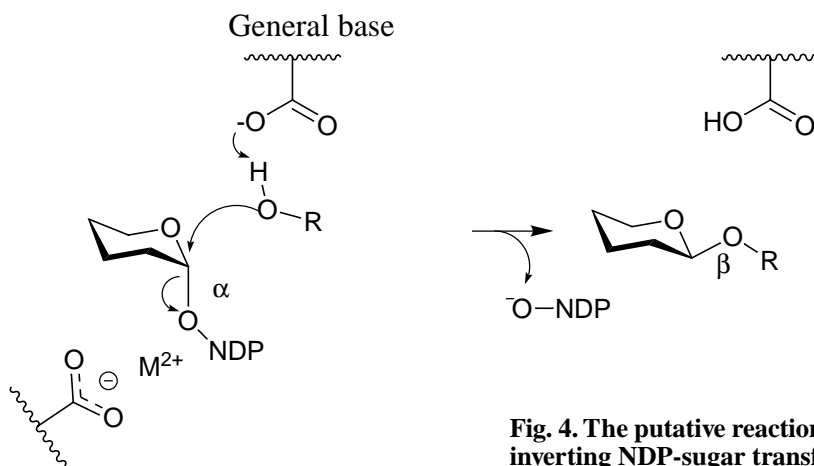


Fig. 4. The putative reaction mechanism for inverting NDP-sugar transferases.

retaining glycosyltransferases, however, remains unclear. At the 3-D level, the activated-sugar dependent glycosyltransferases are just beginning to appear in the public domain. From one structure (23) just 18 months ago, there are already another 6 or 7 known or reported in public. When we look at the sequence resource, however, we can see that a great deal remains unknown.

We have entered the "post-genomic" age. Recent developments in molecular biology have generated an enormous number of open-reading frames for putative glycosyltransferases. Unlike the situation in the glycoside hydrolase field, however (2, 24), the wealth of putative glycosyltransferase sequences is not paralleled by knowledge of the structures, mechanisms or even the substrates for these proteins. For the activated-sugar dependent glycosyltransferases Henrissat has identified 51 families on the basis of their amino-acid sequence similarities, building upon the initial identification of 27 families described in (8). At the time of writing, 3-D structures have been reported for seven of these: the DNA-modifying β -glucosyltransferase from bacteriophage T4 (23); the sporulation specific nucleotide sugar transferase SpsA from *Bacillus subtilis* (25) in glycosyltransferase family GT-2; the bovine β -1,4 galactosyltransferase from family GT-7(26); the MurG enzyme from family GT-28 (27); the rabbit *N*-acetylglucosamine transferase from family GT-13 (46) and the human β -glucuronyltransferase (47) from family GT-43. Of particular recent note are the two structures for retaining glycosyltransferases: the α -1,4-galactosyltransferase LgtC from family GT-8(48) and the bovine α -1, 3-galactosyltransferase from family GT-6 (49) which show interesting similarities to glycogen phosphorylases (28). Enzymes from other families have been crystallised, including the family GT-1 *Amycolatopsis orientalis* GtfB protein. For the majority of glycosyltransferase families, however, there is no 3-D representative. Furthermore, little is known of the function for most of the putative enzymes identified through genomic sequencing.

When one considers the large number of open-reading frames for these enzymes it is perhaps not surprising that sugar donor and acceptor species have been defined for very few enzymes. This reflects the difficulty in obtaining and characterising the glycosyltransferases, many of which are membrane-bound, and the problems in characterising these enzymes. The synthetic obstacles that may have to be overcome to identify the function of some of these enzymes are enormous. One of the great challenges of the moment is the development of functional screens for these enzymes: Hindsgaul's exciting use of frontal affinity techniques may provide part of the answer (29). The sequence classification, however, lends itself to a directed structural genomics approach to glycosyltransferase structure and function. For the study of inverting glycosyltransferases, we initiated such studies on family GT-2: the prototypical inverting glycosyltransferase family.

くわかっていない。3次元のレベルでは活性化糖依存性の糖転移酵素がインターネットの公共ドメインに公開されはじめたばかりである。ちょうど18ヶ月前に一つの構造に始まり(23)、すでに他に6あるいは7つが解明され、あるいは報告されている。しかし、配列の資源を見ると、まだ大部分が未知のままであることに気づく。

我々は、「ポストゲノム」時代へと入った。最近の分子生物学における発展により、推測上の糖転移酵素に対する多数のオープンリーディングフレームが示された。しかし、糖質加水分解酵素の分野と異なり、推測上の糖転移酵素配列から得られるものは、これらのタンパク質の構造やメカニズムあるいは基質に関する知識さえ伴う訳ではない(2, 24)。活性化糖依存的糖転移酵素において、Henrissatはアミノ酸配列類似性を基礎にして、(8)に記された初期の27ファミリーの同定に加えてさらに51ファミリーを同定した。執筆中、3次元構造は以下の7つについて報告された：バクテリオファージT4由来DNA-修飾 β -グリコシル転移酵素(23)；糖転移酵素ファミリーGT-2である、*Bacillus subtilis*由来胞子特異的ヌクレオチド糖転移酵素SpsA(25)；GT-7ファミリーのウシの β -1,4ガラクトシル転移酵素(26)；GT-28ファミリーのMurG酵素(27)；GT-13ファミリーのウサギN-アセチルグルコサミン転移酵素(46)、GT-43ファミリーのヒト β -グルクロニド転移酵素(47)。特に最近、糖転移酵素を保持するこの2つの構造が注目されている；GT-8ファミリー由来 α -1,4ガラクトシル転移酵素 LgtC(48)、GT-6ファミリー由来ウシ α -1,3-ガラクトシル転移酵素(49)、これらはグリコーゲンホスホリラーゼと興味深い類似性を示している(28)。GT-1ファミリー *Amycolatopsis orientalis* GtfBを含む他のファミリーからの酵素は結晶化された。しかし、糖転移酵素ファミリーの大部分では3次元構造の標本はない。さらに、ゲノム配列決定によって同定された推定上の酵素の大部分について機能はほとんど知られていない。

このような酵素の多数のオープンリーディングフレームを考えた時、糖供与体と受容体種がわずかの酵素でしか定義されていないことはおそらく驚くべき事ではない。これは大部分が膜結合している糖転移酵素を手に入れ特性を調べることの難しさや、これらの酵素を特徴付ける際の問題を反映している。これらの幾つかの酵素の機能を同定するために克服しなければならない合成上の障害は大きい。現在の重要な挑戦の一つはこれらの酵素の機能を映し出す技術の発展である：Hindsgaulは前端アフィニティ技術を刺激的に使用してその部分的な答えを示した(29)。しかし配列による分類は、糖転移酵素の構造と機能を指向する構造的ゲノミクスアプローチに役立っている。転化型糖転移酵素の研究のために、始原的な転化型糖転移酵素GT-2ファミリーにおいてわれわれはそのような研究を始めた。

D. Glycosyltransferase Family GT-2

Family GT-2 is one of the largest families of nucleotide-sugar-dependent glycosyltransferases. The majority of the open-reading frames in this family encode enzymes of unknown or putative function, but it also contains some of the most exciting and important enzymes. These range from those involved in the synthesis of major polysaccharides such as cellulose, chitin and hyaluronic acid through to the intricacies of lipopolysaccharides and bacterial cell-surface *O*-antigens. It is also, in evolutionary terms, the most ancient of the inverting glycosyltransferase families since it is the only such family present in all genomes sequenced to date. The majority of family 2 enzymes which have been characterised, although displaying a wide diversity of sugar substrates, use UDP or *d*TDP sugars as the glycosyl-donor species, although the family also contains the GDP-mannose dependent dolichol-phospho-mannose synthases. At the mechanistic level, family GT-2 members are inverting enzymes which use nucleoside-diphospho- α -D-sugars to generate β -linked products, as shown in Fig. 4. For many years an enormous number of questions surrounded this family of enzymes: what was their mechanism, do they indeed use nucleotide-sugars rather than lipid-sugars, what was the role of the conserved residues and, for the polymerising (sometimes called “processive”) members - did they add the sugar at the reducing or non-reducing end of the growing chain? The structure determination of a putative glycosyltransferase, SpsA, from *B. subtilis* shed the first “three-dimensional light” on family 2 (25).

E. The 3-D structure of SpsA from *Bacillus subtilis*

Whilst many of family 2 enzymes are known to be membrane-bound, SpsA from *B. subtilis*, may be expressed as a soluble protein in *E. coli* (30). It is also one of the smallest family GT-2 enzymes and therefore makes an ideal “precursor” system for the analysis of complex structure-function relationships in glycosyltransferase family 2. The *spsA* gene encodes a putative glycosyltransferase implicated in the production of the mature spore-coat during the spore response of *B. subtilis* (31, 32). It encodes a protein of 256 amino-acids whose substrate specificity is undefined but whose sequence has been classified into family 2. Expression of *spsA* in sporulating *Bacilli* is under control of a σ^K -dependent promoter activated by the GerE protein (31). SpsA may be involved in any aspect of the glycosylation of the spore-coat and sequence comparison gives little indication of its specificity with an extremely diverse array of activities associated with the closest homologues. Sequence similarity is found with enzymes involved in teichoic and colanic acid synthesis, galactose and rhamnose transfer, lipopolysaccharide production and the synthesis of cellulose and chitin. The sugar donor and acceptor specificities of SpsA, however, remain unknown.

D. 糖転移酵素ファミリーGT-2

GT-2ファミリーはヌクレオチド糖依存的糖転移酵素における最も大きなファミリーの一つである。このファミリーのオープンリーディングフレームの大部分はまだ知られていないか又は推定上の機能をもつ酵素をエンコードしているが、これはまた最も面白くて重要な酵素も含んでいる。これらはセルロース、キチン、ヒアルロン酸などの主要な多糖合成に関与する酵素から複雑なりポ多糖や細菌表面のO-抗原に至る物まで含んでいる。それはまた現在調べられた全てのゲノム配列に存在する唯一のファミリーなので、進化において最も祖先の転化型糖転移酵素である。これまでに特徴付けられたファミリー2酵素の大部分は糖基質について広い多様性を示し、またGDP-マンノース依存的ドリコールリン酸マンノース合成酵素も含まれるのであるが、糖供と体種としてUDPまたはdTDP糖を使う。機構のレベルでは図4に示すように、ファミリーGT-2メンバーは β -結合生成物を生産するためにヌクレオチドリン酸- α -D-糖質を使う転化型酵素である。この酵素ファミリーには膨大な数の疑問が多年つきまとった：反応機構はどの様になっているのか、それらは実際に脂質に結合した糖より糖ヌクレオチドを使うのか、保存された残基の役割は何か、重合性(“連続移動性”とも呼ばれる)のメンバーにおいては成長鎖の還元又は非還元末端に糖を付加するのか？*Bacillus subtilis*由来の推定上の糖転移酵素SpsAの構造決定は、ファミリー2において初めて“3次元の光”を投げかけた(25)。

E. *Bacillus subtilis* 由来 SpsA の三次元構造

多くのファミリー2酵素は膜に結合していることが知られているが、*B. subtilis* 由来の糖転移酵素 SpsA は大腸菌で発現させた場合可溶性のタンパク質となる可能性がある(30)。これはGT-2酵素の最も小さなファミリーの一つの酵素であり、それゆえ糖転移酵素ファミリー2の複雑な構造と機能の関係を調べる理想的な「前駆体」システムである。*spsA* 遺伝子は *B. subtilis* が胞子を形成する際、成熟した胞子の殻の形成に関係すると推定される糖転移酵素をコードしている(31, 32)。この遺伝子は256アミノ酸から成るタンパク質をコードしており、この配列の基質特異性は特定されていないが、ファミリー2に分類されている。胞子形成時、*Bacilli* での *spsA* の発現は GerE タンパク質により活性化される σ^K -依存性プロモーターにより制御されている(31)。SpsAは胞子の殻形成における糖付加の全ての局面に関与している可能性があり、最も近い同族体でも活性に非常に多様性があるため、配列の比較から特異性を推測できない。酵素の配列類似性はテイコ酸とコラン酸の合成酵素、ガラクトースとラムノースの転移酵素、リポ多糖生成酵素、セルロースとキチンの合成に関わる酵素などに対して見つかった。しかしSpsAの糖供与体と受容体の特異性はまだ不明である。

The structure of SpsA was solved by X-ray crystallography at a resolution of 1.5Å (25) both in native form and in nucleotide complexes with UDP-Mg and UDP-Mn. It has an overall size of approximately 45 x 40 x 36Å. The 256 amino-acids of SpsA fold into what may be described as two domains (although one could also consider that it is a single extended domain). The first (N-terminal) domain, residues 2–100, forms a typical nucleotide-binding domain of 4 central parallel β-strands flanked on both sides by two α-helices, Fig. 5. The remainder of the structure, residues 101–256, is composed of a mixed β-sheet flanked by three helices on one side and one on the other. The C-terminal domain presents an open groove which may be the binding-site for the acceptor. At the time of structure solution, the only other available structure for an NDP-sugar transferase was the DNA-modifying β-glucosyltransferase from bacteriophage T4 (23). The nucleotide-binding domain of SpsA displays some topological similarity with the T4 enzyme but this similarity does not extend to the mode of nucleotide-binding, the conformation of the nucleotide or the presentation of potential catalytic residues in the vicinity of the distal phosphate.

In the UDP complexes, the uracil moiety binds in a hydrophobic pocket featuring Tyr 11. A number of hydrogen-bonding interactions are important. Asp 39 at the end of strand β-2, hydrogen-bonds with the N3 of the uracil base. Asp 39 is one of two aspartates which are “signature” motifs in family 2 (the other being Asp 99) and whose function has been long speculated upon, especially in the related cellulose synthase system (33). It presumably functions to provide specificity for UDP or dTDP donors. In the Mn-UDP complex, a single Mn²⁺ ion is found located between the two phosphates, which in turn interacts with the protein *via* Asp 99. This strictly invariant residue lies on β-strand 4, as was predicted using hydrophobic cluster analysis (34). It seems likely that the role of this residue is to assist leaving-group departure through coordination of the divalent man-

SpsAの構造は1.5 Åの分解能のX線結晶解析によりネイティブな形のもとUDP-MgとUDP-Mnとのヌクレオチド複合体の両方について解析された(25)。全体の大きさはおよそ45×40×36である。256アミノ酸からなるSpsAは2つのドメイン(ひとつの伸長したドメインであるとも考えられる)に折りたたまれている。この2つのうちN末端側の第1ドメインは2~100残基からなる典型的なヌクレオチド結合ドメインであり、図5のように中央の4つの平行なβ鎖の両脇に2つのαヘリックスが存在する形になっている。101-256残基からなる残りの構造は片側に3つのヘリックス、反対側に1つヘリックスを持つ混合βシートから構成されている。C末端ドメインは受容体との結合部位である可能性のある開いた溝を形成している。構造が解明された当時、NDP-糖転移酵素について得られていた他の構造はバクテリオファージT4由来のDNA修飾性のβ-グルコシル転移酵素のみであった(23)。SpsAのヌクレオチド結合ドメインはT4酵素と位相学的にいくつか似ている点があるが、この類似性はヌクレオチド結合の様式、ヌクレオチドの立体配座、または末端リン酸基周辺の潜在的な触媒活性残基の提示にまで拡張されるわけではない。

UDP複合体では、ウラシル部分が Tyr 11 による疎水性の pocket に結合している。ここでは多数の水素結合の相互作用が重要な役割を持っている。β-2鎖末端のAsp39はウラシル塩基のN3と水素結合している。Asp39はファミリー2の「署名」モチーフである2つのアスパラギン酸のひとつ(もうひとつはAsp99)で、その役割は特に関連したセルロース合成酵素系において推定されてきた(33)。それはおそらくUDPまたはdTDP供与体に対する特異性を与える機能ではないかと考えられている。Mn-UDP複合体において、1つのMn²⁺イオンが2つのリン酸の間に局在しており、このMn²⁺イオンはAsp99を介してタンパク質と相互作用していることがわかった。この厳密に保存されている残基は、疎水的クラスター分析により予測されたように第4β鎖に存在する(34)。この残基は2価のMn²⁺イオンに配位することで

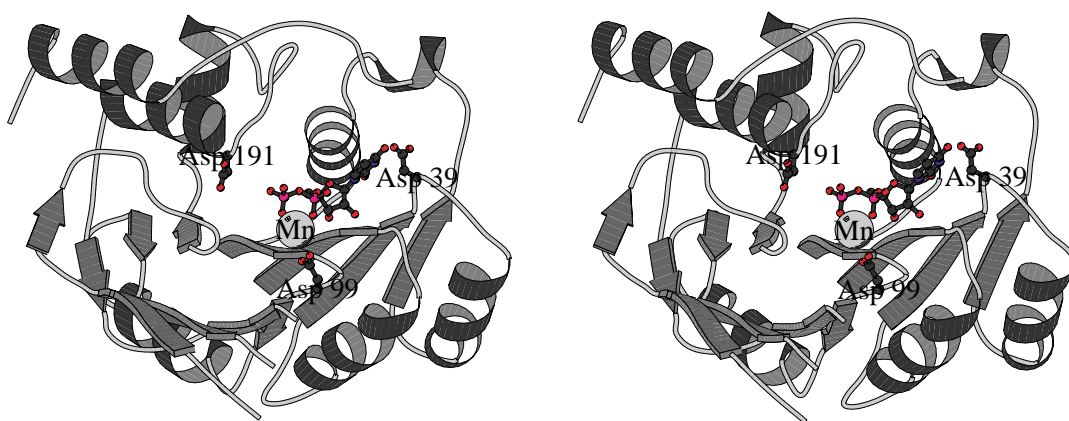


Fig. 5. The 3-D structure of SpsA. This figure was drawn with the MOLSCRIPT program (45).

ganese ion. Mutation of the equivalent of Asp 99 in *Acetobacter xylinum* cellulose synthase led to loss of cellulose synthase activity, implying a critical role in catalysis (33). In SpsA, Asp 99 forms a “DD” motif (Asp 98 binds to the ribose hydroxyls) which is equivalent to the “DxD” motif displayed by many glycosyltransferases (35). We can safely say that the “DxD” motif will frequently be involved in coordinating the divalent metal and/or the ribose in many otherwise unrelated glycosyltransferases. A note of caution is important here. The majority of open-reading frames on the sequence databases contain DxD motifs. Therefore, a DxD motif alone is not indicative of a glycosyltransferases and many of the DxD motifs found in glycosyltransferases may be fortuitous and not involved in Mn²⁺ binding at all. Furthermore, since some “DxD” motifs exist as “DDx”, “DDD” and “DxDD” the exact details of the ribose and metal ion coordination, and the relative importance of each aspartate, will vary in each particular case.

F. SpsA – a Model for Family 2 Glycosyltransferases ?

The Mn-UDP complex of SpsA may be interpreted in light of the known sequence conservation within family 2. The vast majority of sequence conservation in family 2 is in the N-terminal nucleotide-binding domain, residues 2–100. Three clusters of invariance are of interest. These involve residues in direct contact with the NDP donor. Tyr 11 is involved in stacking with the nucleotide base, Asp 39 in UDP binding and Asp 99 sits adjacent to the distal phosphate where it coordinates the leaving-group Mn²⁺ ion, described above, Fig. 6. The inverting mechanism is generally believed to require an additional cata-

脱離基の遊離を助ける働きを持つと考えられる。*Acetobacter xylinum* のセルロース合成酵素中の等価な Asp99 を変異させるとセルロース合成活性が小さくなったことから、触媒において重要な役割を持つことがわかった(33)。SpsAにおいて、Asp99は「DD」モチーフ(Asp98がリボース水酸基に結合する)を形成していて、これは多くの糖転移酵素で見られる「DxD」モチーフと等価である(35)。「DxD」モチーフは他の点では異なる多くの糖転移酵素において、しばしば二価金属やリボースの配位に関わるということが言える。注意しなければならないのはここである。配列データベース中のオープンリーディングフレームの多くはDxDモチーフを含んでいる。よってDxDモチーフだけでは糖転移酵素なのかどうかはわからず、糖転移酵素で見ついている多くのDxDモチーフはMn²⁺イオンが全く結合しない偶然のものであるのかも知れない。さらに、「DxD」モチーフのいくつかは「DDx」、「DDD」、「DxDD」として存在していることにより、リボースや金属イオン配位の詳細や、各アスパラギン酸の相対的な重要性はそれぞれの場合で異なっているであろう。

F. SpsAはファミリー2糖転移酵素のモデルとなるか？

SpsAのMn-UDP複合体についてはファミリー2酵素において保存されている配列を参照することで解明される可能性がある。ファミリー2で保存されている配列の大半はN末端の2-100残基のヌクレオチド結合ドメインに存在している。変異のない3つのクラスターが興味深い。これらはNDP供与体と直接接触する残基を含んでいる。Tyr 11はヌクレオチド塩基とのスタッキングに関与しており、図6に示すようにAsp 39はUDP結合に、またAsp 99は末端リン酸と隣接して上記の脱離基のMn²⁺イオンに配

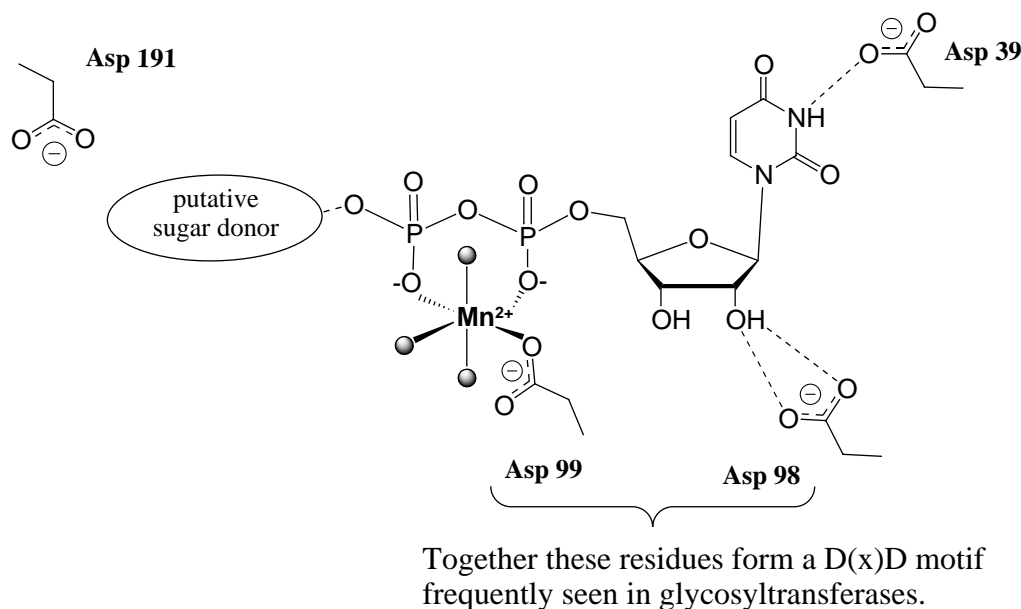


Fig. 6. Selected interactions of SpsA with UDP-Mn. Family GT-2 “signature” conserved aspartates are shown.

lytic base (expected to be a deprotonated Asp or Glu residue) to activate the sugar acceptor species for nucleophilic attack. In SpsA a candidate for a general base is much more difficult to identify. The C-terminal domain is much less conserved than the N-terminal region. Sequence alignments point to Asp 191 as the most likely base, but they may not be interpreted with confidence.

The 3-D structure reveals 4 potential bases in approximately the correct physical location to activate a sugar acceptor. These are the "triad" of Asp 158, His 159 and Cys 160 and Asp 191. None of the residues of the Asp, His, Cys triad appear to be conserved, although we must stress that sequence alignments in this region are difficult to interpret with any great certainty. Geometrically Asp 191 is in an ideal location in the 3-D structure and it interacts with a glycerol molecule in a way that may be analogous to its coordination of the natural sugar acceptor. Additionally, iterative sequence searches with PSI-BLAST (36) suggest that this residue may be conserved throughout family 2, but again sequence alignments may not be interpreted with great confidence. At the time of structure solution (25) we therefore proposed that Asp 191 may function as the base in SpsA. A variety of recent studies lend weight to this proposal. Equivalently positioned bases are found in the family GT-28 bovine β -galactosyltransferase structure (26), in the rabbit N-acetylglucosamine transferase from family GT-13 (46); and in the human β -glucuronyltransferase (47) from family GT-43. The human family GT-43 enzyme shows the sugar acceptor hydrogen-bonding to this base in a perfect position for nucleophilic attack on the sugar donor (47). Site-directed mutagenesis of the *Sinorhizobium meliloti* glucosyltransferase, ExoM, by Geremia and colleagues confirms the roles for the equivalents of Asp 39, Asp 99 and Asp 191 in this related enzyme (37). The structural and functional similarities of the various inverting glycosyltransferase families have recently been reviewed(50, 51). Furthermore, site-directed mutagenesis of the *Sinorhizobium meliloti* glucosyltransferase, ExoM, by Geremia and colleagues confirms the roles for the equivalents of Asp 39, Asp 99 and Asp 191 in this related enzyme (37).

G. Reducing or Non-Reducing End Elongation ?

The enzymatic synthesis of polysaccharides, including the world's most abundant polymer cellulose, remains an extremely controversial area. Two schools of thought exist for the direction of synthesis. Pulse-chase experiments, using (α -linked) UDP-[14 C]Glc together with various membrane fractions from *A. xylinum*, demonstrated that the labelled compound was chased into the water-soluble fraction of the polymer, away from its reducing-end, during synthesis. This was interpreted with a scheme in which cellulose is extended by addition at the *reducing-end* (38). In order to maintain the β -linked stereochemistry of the product, a model in which cellulose synthase transfers

位する。転化機構には糖受容体種を活性化して求核攻撃を起こさせる触媒塩基(脱プロトン化したAspまたはGlu残基)が必要と考えられている。SpsAにおいて一般的な塩基の特定はかなり難しい。N-末端領域に比べ、C-末端ドメインは保存されていない。配列の整合性から、Asp191は塩基として用いられている可能性が最も高いが、確証はない。

三次元構造から、糖受容体を活性化するために物理的にほぼ正しい位置にある潜在的な塩基が4つ見つかった。これらはAsp158、His159、およびCys160の「三つ組」とAsp191である。この部分の配列の整合は困難であるため、確信を持って解釈することができないが、このAsp、His、Cysの三つ組の残基はいずれも保存されていないようである。幾何学的にAsp191は天然の糖受容体に対する配位と類似した形でグリセロール分子と相互作用するのに理想的な三次元構造上の位置にある。加えて、BLASTによる反復配列検索(36)により、この残基はファミリー2全体で保存されていることが示唆されるが、配列の整合からは十分信頼できる解釈はできない。構造が解明された時期に(25)、我々はそこからAsp191がSpsA中で塩基として機能することを提案した。近年の様々な実験からもこの提案を支持する結果が出ている。GT-28ファミリーのウシ β -galactosyltransferase構造(26)、GT-13ファミリーのウサギN-acetylglucosamine transferase(46)、GT-43ファミリーのヒト β -glucuronyltransferase(47)中に等価な位置にある塩基が発見された。ヒトのGT-43ファミリー酵素の構造から、糖受容体がこの塩基に水素結合することで糖供与体に求核攻撃するために完璧な位置になる事が示された(47)。Geremiaとその同僚達による*Sinorhizobium meliloti*のグルコシル転移酵素ExoMの部位特異的突然変異誘発により、この関連酵素におけるAsp39、Asp99、Asp191の等価残基の役割が明らかになった(37)。様々な転化性糖転移酵素ファミリーの構造および、機能的類似性は最近総説が著された(50, 51)。さらに、Geremiaとその共同研究者に依る*Sinorhizobium meliloti*由来のグルコシル転移酵素ExoMの部位指定変異体から、この関連した酵素におけるAsp39、Asp99、およびAsp191の等価物の役割が確証される(37)。

G. 伸長していくのは還元末端か非還元末端か？

世界でもっとも豊富に存在するポリマーであるセルロースなど多糖の酵素合成にはまだ論争のさかんな部分がある。合成の方向性についての考えには2つの学派が存在する。(β -結合した) UDP-[14 C]Glc と*A.xylinum*由来の様々な膜画分を用いたパルス-チェイス実験により、標識化合物は合成中にその還元末端から離れた位置で多糖の水溶性画分中に追跡された。このことからセルロースは還元末端において付加されて伸長していく図式が考えられる(38)。生成物の β -結合立体化学を保つようなモ

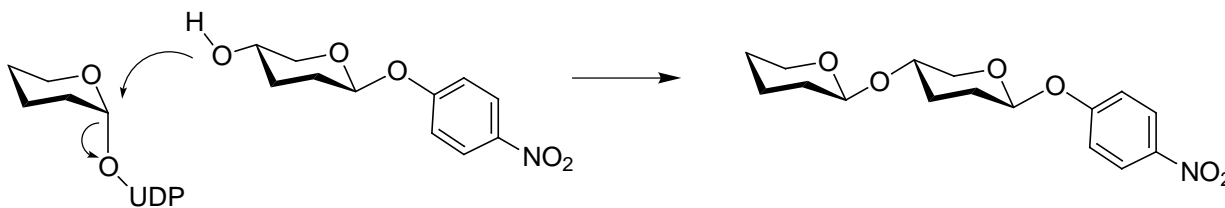


Fig. 7. Family GT-2 catalysed transfer of UDP glycosides to a *p*NP acceptor species demonstrating the direct non-reducing end transfer. This has been shown for the synthesis of *p*NP-chitooligosaccharides by recombinant NodC, for example (41).

glucose between lipid-pyrophosphate intermediates was invoked. Conversely, electron crystallographic analysis of cellulose crystals which were both eroded at their non-reducing end by CBH II and Ag-stained at their reducing-end, demonstrated the orientation of the chains (“parallel-up”) with respect to the long axis of the crystal (39). Following this, the direction of cellulose synthesis could be demonstrated by microdiffraction and tilt experiments alone. These experiments indicate a model in which cellulose is extended at the *non-reducing end*. Similar experiments also suggest a non-reducing end elongation for chitin synthesis (40). Recently, elegant work using *p*NPGlcNAc as an artificial glycosyl acceptor species has conclusively demonstrated that the family 2 nodulation factor, NodC, elongates the polymer at the non-reducing end by direct transfer to O-4 of the acceptor (41), Fig. 7. Lipid intermediates are not used.

At the 3-D level, although one must be cautious since the catalytic function of SpsA has not been demonstrated, the sequence similarity of SpsA to cellulose and chitin synthases and the NodC factor allows us to comment on the two models. The SpsA structure lends no support to a model involving lipid intermediates or elongation at the reducing-end. In order to maintain the correct stereochemistry, the Han and Robyt model demands that cellulose synthase is not a UDP-Glc transferase, but instead is involved in the shuttling of glucose between lipid pyrophosphate intermediates. Whilst similar mechanisms exist for other polymers, their role in cellulose synthesis must be questioned. Cellulose synthase sequences show strong sequence similarity with known NDP-dependent transferases, indeed it is this similarity that is the defining feature of glycosyltransferase family 2 (8). The SpsA structure confirms that the majority of the sequence conservation is observed in residues in intimate contact with the nucleotide moiety (either UDP or *d*TDP in the case of SpsA). Mutation of the equivalents of Asp 39 or Asp 99 results in loss of activity (33). It seems unlikely that family 2 enzymes would display strong similarities to known UDP-sugar transferases and possess invariant and catalytically-essential residues known to bind UDP on other systems, were it not involved in UDP binding itself. The direct observation of growing cellulose and chitin chains (39, 40), taken together with sequence conservation in family 2, the structure of SpsA (25), and direct

デルとして、セルロース合成酵素がグルコースを脂質-ピロリン酸中間体間で転移するという反応モデルがひねり出された。逆に、CBH IIにより非還元末端を侵食され、還元末端で銀染色したセルロース結晶の電子線結晶回折により、結晶の長軸に対する鎖の配向(上向き平行)が示された(39)。その後、セルロース合成の向きが微量回折法と傾斜実験により解明された。これらの実験からセルロースが非還元末端から伸長していくモデルが示唆される。類似した実験からキチン合成においても非還元末端から伸長していく事が示唆された(40)。近年

NPGlcNAcを人工の糖受容体として用いるエレガントな実験により、ファミリー2根粒形成因子NodCが図7のように、受容体のO-4に直接転移させて高分子を非還元末端で伸長させていくことを最終的に示した(41)。その際、脂質中間体は用いられない。

3次元レベルでは、SpsAの触媒機能が例証されていないので慎重になるべきではあるが、SpsAとセルロース、キチン合成酵素やNodC因子との配列相同性によって2つのモデルについてコメントできる。SpsA構造は脂質中間体または還元末端での伸長に関するモデルを支持しない。正しい立体化学を維持するために、HanとRobytのモデルはセルロース合成酵素はUDP-Glc転移酵素ではなく、代わりに脂質ピロリン酸中間体間でグルコースを往復させることに関与していると主張している。類似したメカニズムが他の高分子に対して存在しているが、セルロース合成でのそれらの役割は疑問視されるべきである。セルロース合成酵素は既知のNDP-依存的転移酵素と強い配列類似性を示し、実にそれが糖転移酵素ファミリー2の特徴を定義する類似性である(8)。SpsA構造では大部分の配列保存がヌクレオチド部分(SpsAの場合UDPまたは*d*TDPのどちらか)と親密に接触する残基で観察されるたことが確かになった。Asp39またはAsp99の等価物の突然変異は活性の減少を引き起こした(33)。ファミリー2酵素は既知のUDP-糖転移酵素と強い類似性を示したり、他の系においてUDPと結合することが知られている変異の少ない触媒的必須残基を持っているようには思われず、UDP結合それ自体には関与していないのではないかと。伸長しているセルロースやキチン鎖の直接観測(39、40)、ファミリー2における配列保存、

observation of the direction of polysaccharide elongation on numerous family 2 enzymes (for example 41, 42, 43) therefore strongly supports a model in which family 2 enzymes extend the polymer at the *non-reducing* end by direct transfer of the sugar from the nucleotide-donor to the acceptor.

H. The Polymerising Transferases: One or Two Catalytic Centres ?

The second unresolved controversy in family GT-2 remains the nature and action of the “polymerising” transferases. These enzymes are able to use the product of one addition as the acceptor for the next, and so polymerise the growing polysaccharide chain. Examples are cellulose synthase, chitin synthase, the root nodulation factor NodC and hyaluronan synthases. These enzymes are frequently termed “processive” or “polymerising” transferases in the literature, implying that they physically maintain a growing chain whilst performing numerous catalytic events. Since this has never been conclusively demonstrated and, furthermore, recombinant NodC demonstrably releases single addition products (41), we prefer to use the more conservative term “polymerising” transferases. The question with these enzymes is whether they possess a single catalytic centre or two distinct centres. The dual active centre model is very seductive: it could explain how polymerising enzymes add two monosaccharides in different orientations (to satisfy the 180° rotation between adjacent monosaccharides in the structure of chitin and cellulose) and could also explain the alternating addition of two different monosaccharides with different linkages in hyaluronan. The seductive features of this model have led to its widespread and rapid acceptance. Yet, whilst alluring we should remember that there is, as yet, no experimental evidence to support it, and very much against.

Early sequence work on these enzymes identified two distinct “domains” in the polymerising family 2 transferases termed A and B (34). On the basis of sequence conservation within the respective “domains” (D.....DxD in domain A and D.....QxxRW in domain B) it was postulated that the polymerising transferases possessed two catalytic centres and that it was these two active sites that generated their many unique properties. The dual-addition model is based upon the belief that any single catalytic centre required just two acidic (aspartates in this case) amino acids, one to coordinate a divalent metal ion and another to act as a catalytic base for activation of the sugar acceptor, Fig. 4. Hence, conserved Asp in two distinct “domains” could easily be interpreted in terms of two catalytic centres. Furthermore, the second motif (D.....QxxRW) appeared only to be present in the polymerising enzymes which again suggested that it may represent the second catalytic centre.

Viewed in light of the SpsA structure, and other recent evidence, this dual addition model is less convincing. Firstly,

SpsAの構造(25)および多数のファミリー2酵素における多糖伸長方向に関する直接観測(例えば41、42、43)は、それゆえにファミリー2酵素がヌクレオチド供与体から受容体に直接糖転移して非還元末端でポリマーを伸長させるモデルを強く支持している。

H. 重合性転移酵素：触媒中心は1つまたは2つ？

ファミリーGT-2に関する2つめの未解決の論争は“重合性”転移酵素の性質と作用である。これらの酵素は1回の付加による生成物を次へのアクセプターとして使うことが可能で、そうして伸長多糖鎖を重合していく。例として、セルロース合成酵素、チキン合成酵素、根粒形成因子NodC、ヒアルロン酸合成酵素がある。これらの酵素はしばしば文献では“連続移動性”または“重合性”転移酵素と呼ばれており、多数の触媒作用を行う一方で物理的に伸長鎖を保持することを示している。これは確認されておらず、さらにリコンビナントNodCは明白に単一の付加生成物を放出するので(41)、より保守的な用語“重合性”転移酵素を使用することを選んだ。これらの酵素に関する疑問は1つの触媒中心を持つのか、2つの個別の触媒中心を持つかである。二元的な活性型中心モデルは非常に魅力的である：それはどのようにして重合性酵素が異なる配向で2つの単糖を添加するかの説明を可能にし(キチンとセルロース構造における近接した単糖間の180°回転を満足させる)、またヒアルロン酸で2つの異なる単糖が異なる結合で交互に付加することを説明することも可能である。このモデルの魅力的な性質は広く行きわたり、急速に受け入れられた。しかし、魅力的な一方でまだそれを支える実験的な証拠がなく、これに反するものがたくさんあることを忘れてはならない。

これらの酵素についての初期の配列研究は、重合性転移酵素ファミリー2においてAとBと呼ばれる2つの別々の「ドメイン」を同定した(34)。それぞれの「ドメイン」の中での配列保存(ドメインAのD...DxDとドメインBのD...QxxRW)を基礎に、重合性転移酵素は2つの触媒中心を持ち、多くのユニークな性質を生じるのはこれらの2つの活性部位であるということが考えられる。二元的な付加モデルは、図4のようにどちらの触媒中心でもちょうど2つの酸性アミノ酸(この場合アスパラギン酸塩)が必要であり、一方は2価金属イオンに配位結合するため他方は糖受容体の活性化のために触媒塩基として働くという信念に基づいている。この理由から、2つの別々のドメインで保存されたAspは容易に2つの触媒中心であると解釈される。さらに、2番目のモチーフ(D...QxxRW)は重合する酵素にだけ存在することが分かったので、それは2番目の触媒中心であるという可能性が再び示唆された。

SpsAの構造や他の最近の証拠を見るとこの二元的付加モデルの説得力が弱まる。第一に、連続移動性転移酵素のドメイン

domain A of the processive transferases clearly equates to the N-terminal nucleotide-binding domain of SpsA alone. The roles for the D³⁹...D⁹⁸(x)D⁹⁹ motif are clearly demonstrated and the similarity between SpsA and the cellulose, chitin and hyaluronan synthases over this region is convincing. The first tenet of the dual addition model is therefore unsound: a single catalytic centre requires, in this case, more than two acidic amino-acids – the whole of the D...DxD motif is used merely to bind a single UDP-Mn molecule. This leads us to propose that the first domain “A” of cellulose synthase and related family 2 enzymes is simply the nucleotide-binding domain and that it, alone, does not constitute a viable catalytic centre. Furthermore, the clear implication from this is that the catalytic base of SpsA is derived from the C-terminal domain, with strengthening evidence pointing to Asp 191. In this case, the D...DxD...D motifs of the polymerising enzymes most likely only represent a single catalytic centre. Indeed, BLAST searches do indicate, albeit with low confidence, that the “B Domain” D from the D...QxxRW motif of cellulose synthase is equivalent to Asp 191 of SpsA. This leaves just the QxxRW motif of polymerising transferases as unique to them and these authors admit that they can offer little speculation on its function at this time.

Other considerations also lead us to doubt a twin active centre model. Domains A and B of the polymerising enzymes occupy a “space” of approximately 230 amino-acids. Yet this is the same size as the smallest family 2 member. It seems unlikely to these authors that polymerising enzymes squeeze *two* distinct catalytic centres into the same 3-D space that is used by the smallest *single* addition enzyme. What little experimental evidence that exists also argues against a twin catalytic centre model. Furthermore recombinant NodC performs repeated *single* additions (41): both odd and even sized oligosaccharides are released by the enzyme. There is no evidence, in that case, for a concerted dual addition as predicted by the twin active centre model.

Some enzymes, however, do clearly possess two tandem family 2 catalytic domains. The hyaluronan synthase from *Pasturella multicauda* (42) clearly contain two repeats of an SpsA-like enzyme in an approximately 900 amino-acid protein. These enzymes do not display the so-called “processive” QxxRW motif. It is clear that this area of polymer synthesis is extremely complex and it is not surprising that controversy exists, especially with so little experimental information. These authors see no reason to invoke a twin centre model to generate the structural repeating unit of cellulose, with adjacent monosaccharides related by 180°. Yet, the synthesis of hyaluronan does pose problems for a single active-centre model. This polysaccharide contains alternating β-1,4 *N*-acetylglucosamine and β-1,3 glucuronic acid. How such a polysaccharide is synthesised remains a mystery. The 3-D structure of a polymerising family 2 enzyme would help advance the field considerably.

Aは明らかにSpsAだけのN末ヌクレオチド結合ドメインに匹敵する。D³⁹/D⁹⁸(x)D⁹⁹モチーフの役割ははっきりと示されていて、SpsAとセルロース、キチンとヒアルロンン合成酵素の間でこの領域についての類似性は納得がいくものである。最初の二元付加モデルはそれゆえ信頼性がない：単一の触媒中心はこの場合には2以上の酸性アミノ酸を要求する-すなわちD...DxDモチーフ全体がUDP-Mn 1分子を結合するためだけに用いられる。セルロースシンターゼや関連するファミリー-2酵素の第一ドメイン“A”は単にヌクレオチド結合ドメインでそれだけでは活性な触媒中心を形成しない。さらにこのことはSpsAの触媒塩基はC-末端ドメインから得られることをはっきりと意味しており、Asp 191を指し示す証拠が強まる。この場合には、重合酵素のD...DxD...Dモチーフは単一の触媒中心であることだけを示しているようだ。実際、BLAST検索によって低い信頼性ではあるが、セルロースシンターゼの“Bドメイン”のD...QxxRWモチーフのDはSpsAのAsp 191に等価である。このことはQxxRWモチーフだけが重合性転移酵素にユニークなものであって、われわれは現時点ではその機能についてほとんど推定できないことを認める。

他の考察からは2つの活性中心モデルも疑われる。重合酵素のドメインAとBは約230アミノ酸残基の空間を占有する。なんとこれは最小のファミリー-2メンバーと同じサイズである。最小の1つの付加酵素が使用するのと同じ大きさの3次元空間に、重合酵素が2つの別個の触媒中心をつめ込むとは考えにくい。2活性中心モデルについて議論するには実験的な証拠がほとんど得られていない。さらに組み換えNodCは1回の付加を反復して行う(41)：この酵素によってサイズが奇数と偶数の両方のオリゴ糖鎖が遊離される。この場合には2活性中心モデルによって推測されるような協奏する2重付加の証拠はない。

しかしながらいくつかの酵素では2つのタンデムなファミリー-2触媒ドメインを明らかに有する。*Pasturella multicauda*からのヒアルロンンシンターゼ(42)は約900アミノ酸タンパク質中にSpsA様の2回リピートを明らかに含む。これらの酵素はいわゆる“連続移動的”なQxxRWモチーフは示していない。ポリマー合成のこの分野は非常に複雑で、特に実験的情報がほとんどないときには逆説も存在することが驚きではない。隣接する単糖が180度の関係にあるセルロースの構造くり返し単位を生じるのに2中心モデルを呼び出す理由がわれわれには見つからない。ヒアルロンン合成は単一活性中心モデルに対して問題を提起する。この多糖鎖は-1,4*N*-アセチルグルコサミンと-1,3グルクロン酸を交互に含んでいる。このような多糖鎖が合成される道筋には不明な点が残っている。重合性ファミリー-2酵素の3次元構造がこの分野を進歩させるのに相当役立つだろう。

F. Structural Glycobiology – Future Directions

We have reviewed advances in our knowledge of the enzymatic synthesis of di-, oligo- and polysaccharides, both by glycosyltransferases and mutant hydrolytic enzymes termed “glycosynthases”. It is clear that many questions remain unresolved. For example, little is known of the mode of action of retaining glycosyltransferases: do they perform catalysis *via* a covalent intermediate and if so, what is the nature of this intermediate? How do the polymerising transferases work? What are the structures and mechanisms of the remaining 40 or so different sequence-based families, and how many of these will form “clans” of related 3-D structures despite low or insignificant sequence similarity. Recent results suggest a number of these enzymes form clans of related structures. In the post-genomic era, how will we tackle the enormous challenge of functionally characterising the numerous gene products of unknown function and how might we exploit these enzymes for medical and industrial benefit? Evidence from the glycoside hydrolase field suggests that the future lies with a synergistic approach in which bioinformatics is used closely with structural biology, synthetic chemistry and enzymology: the results are keenly anticipated.

Acknowledgements

The author would like to thank Steve Withers, Mike Sinnott and Harry Gilbert for countless useful discussions. Novo-Nordisk A/S and Novo-Nordisk Bioindustry Ltd are acknowledged for support of the York Structural Biology Laboratory and especially for supporting G.J.D. on a trip to Japan. This work is supported by the BBSRC, the Wellcome Trust, the European Union, the CNRS and the Royal Society.

References

1. Laine, R.A. (1994) *Glycobiology* **4**, 759–767
2. Davies, G., Sinnott, M.L., and Withers, S.G. (1997) in *Comprehensive Biological Catalysis* (Sinnott, M.L., ed.) Vol. 1, pp. 119–209, Academic Press, London
3. Zechel, D.L., and Withers, S.G. (2000) *Acc. Chem. Rev.* **33**, 11–18
4. Henrissat, B. (1991) *Biochem. J.* **280**, 309–316
5. Henrissat, B., and Bairoch, A. (1993) *Biochem. J.* **293**, 781–788
6. Henrissat, B., and Bairoch, A. (1996) *Biochem. J.* **316**, 695–696
7. Henrissat, B., and Davies, G.J. (1997) *Curr. Op. Struct. Biol.* **7**, 637–644
8. Campbell, J. A., Davies, G.J., Bulone, V., and Henrissat, B. (1997) *Biochem. J.* **326**, 929–942
9. Coutinho, P. M., and Henrissat, B. (1999) in *Recent Advances in Carbohydrate Engineering* (Gilbert, H.J., Davies, G.J., Svensson, B., and Henrissat, B., eds), pp. 3–12, Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K.
10. Gebler, J., Gilkes, N.R., Claeysens, M., Wilson, D.N., Béguin, P., Wakarchuk, W.W., Kilburn, D.G., Miller, R.C., jr, Warren, R.A.J., and Withers, S.G. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 12559–12561
11. Gilkes, N.R., Henrissat, B., Kilburn, D.G., Miller, R.C., Jr., and Warren, R.A.J. (1991) *Microbiol. Rev.* **55**, 303–315
12. Mackenzie, L.F., Wang, Q., Warren, R.A.J., and Withers, S.G. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 5583–5584
13. Koshland, D.E. (1953) *Biol. Rev.* **28**, 416–436
14. Sinnott, M.L. (1990) *Chem. Rev.* **90**, 1171–1202
15. Uitdehaag, J.C. M., Mosi, R., Kalk, K. H., van der Veen, B.A., V., Dijkhuizen, L., Withers, S.G., and Dijkstra, B.W. (1999) *Nature Structural Biology* **6**, 432–436
16. Sears, P., and Wong, C.H. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**(22), 12086–12093
17. Sears, P., and Wong, C.H. (1999) *Angew. Chem Int. Ed. Engl.* **38**(16), 2300–2324
18. Vocadlo, D., and Withers, S.G. (2000) in *Carbohydrates in Chemistry and Biology* (Ernst, G.W., Hart, P., and Sinay, P., eds) Vol. 2, pp. 723–

I. 構造糖鎖生物学—将来の方向

糖転移酵素および“グリコシターゼ”と呼ばれる変異体加水分解酵素の両方による二糖、オリゴ糖および多糖の酵素合成に関するわれわれの知識の進歩について総説した。多くの疑問が未解決である。たとえば、保持されている糖転移酵素の作用機構についてほとんど知られていない：それらは共有的な中間体を介して触媒するのか、もしそうならばその中間体の本質は何か？重合性転移酵素はどのように働くのか？残っている40くらいの配列分類で異なるファミリーの構造と反応機構はどうか、低くまたはわずかな配列類似性にもかかわらずその内のいくつかは関連した3次元構造をもつ一門を形成するのか。最近の結果は多数のこれらの酵素が関連構造をもつ一門を形成することを示唆する。ポストゲノム時代においてわれわれは莫大な遺伝子産物の未知の機能を特性付ける巨大な挑戦にいかにして取り組むのか、またこれらの酵素を医学や産業利益にどのように利用できるのか？糖質加水分解酵素分野から得られた証拠によって、パイオインフォーマティクスと構造生物学、合成化学ならびに酵素学などを相接して利用する協働的なアプローチが将来役立つと示唆された：それらの成果が熱望される。

お茶の水女子大学理学部化学科

山本 麻記子、大橋 友紀、丸山 晶子 共訳

- 844, 4 vols., Wiley-VCH GmbH, Weinheim, Germany
19. Mayer, C., Zechel, D.L., Reid, S.P., Warren, R.A.J., and Withers, S.G. (2000) *FEBS Lett* **466**, 40–44
 20. Malet, C., and Planas, A. (1998) *FEBS Lett.* **440**(1–2), 208–12
 21. Fort, S., Boyer, V., Greffe, L., Cottaz, S., Moraz, O., Davies, G.J., Christiansen, L., Schülein, M., and Driguez, H. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 5429–5437
 22. Trincone, A., Perugino, G., Rossi, M., and Moracci, M. (2000) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**, 365–368
 23. Vrielink, A., Rüger, W., Driessen, H.P.C., and Freemont, P.S. (1994) *EMBO J.* **13**, 3413–3422
 24. Davies, G., and Henrissat, B. (1995) *Structure* **3**, 853 – 859
 25. Charnock, S.J., and Davies, G.J. (1999) *Biochemistry* **38**, 6380–6385
 26. Gastinel, L.N., Cambillau, C., and Bourne, Y. (1999) *EMBO J.* **18**(13), 3546–57
 27. Ha, S., Walker, D., Shi, Y., and Walker, S. (2000) *Prot. Sci.* **9**, 1045–1052
 28. Watson, K. A., McCleverty, C., Geramia, S., Cottaz, S., Driguez, H., and Johnson, L.N. (1999) *EMBO J.* **18**, 4619–4632
 29. Schriemer, D.C., Bundle, D.R., Li, L., and Hindsgaul, O. (1998) *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 3383–3387
 30. Charnock, S.J., and Davies, G.J. (1999) *Acta Cryst.* **D 55**, 677–678
 31. Stragier, P., and Losick, R. (1996) *Annu. Rev. Genet.* **30**, 297–341
 32. Roels, S., and Losick, R. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 6263– 6275
 33. Saxena, I.M., and Brown, R.M. (1997) *Cellulose* **4**, 33–49
 34. Saxena, I.M., Brown, R.M., Fèvre, M., Geremia, R.A., and Henrissat, B. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 1419–1424
 35. Wiggins, C.A.R., and Munro, S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7945–7950
 36. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) *Nucl. Acid. Res.* **25**, 3389–3402
 37. Garinot-Schneider, C., Lellouch, A.C., and Geremia, R.A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 31407–31413
 38. Han, N.S., and Robyt, J.F. (1998) *Carbohydr. Res.* **313**, 125–133
 39. Koyama, M., Helbert, W., Imaj, T., Sugiyama, J., and Henrissat, B. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9091–9095
 40. Sugiyama, J., Boisset, C., Hashimoto, M., and Watanabe, T. (1999) *J. Mol. Biol.* **286**(1), 247–255
 41. Kamst, E., Bakkers, J., Quaadvleig, N.E.M., Pilling, J., Kijne, J.W., Lugtenberg, B.J.J., and Spalink, H.P. (1999) *Biochemistry* **38**, 4045–4052
 42. DeAngelis, P.L. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 26557–26562
 43. Cartee, R.T., Forsee, W.T., Schutzbach, J.S., and Yother, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 3907–3914
 44. Charnock, S.J., Bolam, D.N., Turkenburg, J.P., Gilbert, H.J., Ferreira, L.M.A., Davies, G.J., and Fontes, C.M.G.A. (2000) *Biochemistry* **39**, 5013–5021
 45. Kraulis, P.J. (1991) *J. Appl. Cryst.* **24**, 946–950
 46. Ünligil, U.M., Zhou, S., Yuwaraj, S., Sarkar, M., Schachter, H., and Rini, J. M. (2000) *EMBO J.* **19**, 5269–5280
 47. Pedersen, L.C., Tsuchida, K., Kitagawa, H., Sugahara, K., Darden, T. A., and Negishi, M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 34580–34585
 48. Persson, K., Ly, H.D., Dieckelmann, M., Wakarchuk, W. W., Withers, S. G., and Strynadka, N. C. J. (2001) *Nat. Struct. Biol.* **8**, 166–175
 49. Gastinel, L.N., Bignon, C., Misra, A. K., Hindsgaul, O., Shaper, J. H., and Joziassse, D. H. (2001) *EMBO J.* **20**, 638–649
 50. Ünligil, U.M., and Rini, J.M. (2000) *Curr. Op. Struct. Biol.* **10**, 510–517
 51. Charnock, S.J., Henrissat, B., and Davies, G. J. (2001) *Plant Physiol.* **125**, 527–531.

Received on August 17, 2000, accepted on October 20, 2000

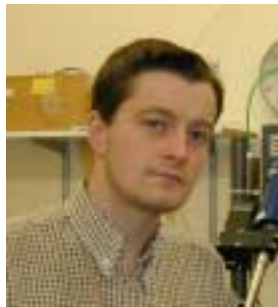
Profile of the Authors



Gideon Davies

Graduated from the Department of Biochemistry at the University of Bristol in 1985. Following this, he completed a Ph.D in Bristol on the cloning and 3-D structure determination glycolytic enzymes with Dr Herman Watson and Dr Len Hall. Following that he moved to the University of York *via* the EMBL Hamburg synchrotron outstation. He has been fortunate to spend research periods in the laboratories of Alwyn Jones in Uppsala and Bernard Henrissat in Grenoble. Gideon Davies is currently a Reader and Royal Society University Research Fellow in the Structural Biology group in the Department of Chemistry at the University of York, U.K. where his group works almost exclusively on carbohydrate-active enzymes. He was recently the “Peter Wall Catalytic Visitor” on a one year sabbatical to the University of British Columbia to work with Steve Withers, Doug Kilburn and Tony Warren. He was recently awarded the “Dextra” Carbohydrate Medal by the Royal Society of Chemistry.

★★★★★★★★



Simon Charnock

Graduated from the Department of Biochemistry, University of Newcastle-upon-Tyne in 1994. He completed a Ph. D with Professor Harry Gilbert on the characterisation of xylanases. Since 1998 he has been a postdoctoral worker in Gideon Davies’s group in York, funded by the BBSRC and the Wellcome Trust and has been fundamental in setting up structural and enzymological studies on glycosyltransferases, binding domains and polysaccharide lyases in the York Laboratory.

★★★★★★★★



Bernard Henrissat

Obtained his PhD in chemistry in 1979 at the University of Grenoble with Dr. Jacques Defaye and Hugues Driguez. In 1985 he completed a D.Sc. in the laboratory of Dr. Henri Chanzy at CERMAV in Grenoble on the enzymatic degradation of cellulose. After a postdoctoral position with Prof. Robert H. Marchessault at the Xerox Research Centre of Canada, he returned to CERMAV as a research staff member. In 1998 he moved to the ‘Architecture and Function of Biological Macromolecules’ (AFMB) laboratory of CNRS in Marseille. Bernard Henrissat received the 1986 award of the French Carbohydrate Society, and a bronze medal of CNRS in 1988. At AFMB, Bernard Henrissat is currently Adjunct Director and head of the group ‘Glycobiology : Genomes and Structures’.