

## Galactosyltransferases : A Structural Overview of Their Function and Reaction Mechanisms

### ガラクトース転移酵素：機能と反応機構の構造的考察

Gastinel, Louis N.

Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques (AFMB)

UMR 6098, CNRS and Universités d'Aix-Marseille I and II 31 Chemin Joseph Aiguier 13402 Marseille Cedex 20, France

FAX: 33-4-91-16-45-36, E-mail : gastinel@afmb.cnrs-mrs.fr

**Key Words** : ABO histo-blood group, galactosyltransferases, glycosyltransferases, nucleotide-binding proteins, xenotransplantation, X-ray crystallography

#### Abstract

Galactosyltransferases are among the most represented enzymes in the glycosyltransferases superfamily. Galactosyltransferases bind UDP- $\alpha$ -D-galactose as the donor substrate and transfer the galactose to acceptor substrates that are as different as glycoproteins, glycosaminoglycans, glycolipids and, to some extent, small lipophilic molecules such as plant hormones. For the past decade, mammalian galactosyltransferases have been the center of interest for glycobiologists focused primarily on the discovery of their genes and on the characterization of their enzyme activity. In 1999, the first picture of the crystallographic structure of bovine  $\beta$ 4GalT1 catalytic domain was revealed at 2.4 Å resolution. This study was the beginning of a new structural approach to glycosyltransferases that focused on the description of their three-dimensional structure at atomic resolution with the objective of interpreting former enzymatic properties and understanding their reaction mechanism. This mini-review is an attempt to describe the current status of the galactosyltransferase structure-function relationship in the context of the glycosyltransferase superfamily. The crystallographic structures of two bovine galactosyltransferases catalytic domains, those of  $\beta$ 4GalT1 and  $\alpha$ 3GalT, will be discussed as well as their reaction mechanism.

#### A. Introduction

Almost every organism contains a broad range of glycans linked to lipids and proteins either *via* an N-type linkage, with the amide group of the Asn residue contained in the Asn-X-Ser/Thr consensus sequence, or *via* an O-type linkage, with the hydroxyl group of Ser or Thr residues (1). These oligosaccharides influence the biological activity of glycoproteins that carry them and their clearance (2). In eucaryotic cells, these oligosaccharides are synthesized by different glycosyltransferases that are clustered in an assembly line located in the Golgi apparatus. In the procaryotic cells, glycosyltransferases are not clustered in a sub-organelle, but their genes are often clustered

#### 要約

ガラクトース転移酵素は糖転移酵素のファミリーの中で最も代表的なものである。ガラクトース転移酵素はUDP- $\alpha$ -D-ガラクトースを供与体としてガラクトースを糖タンパク質、グリコアミノグリカン、糖脂質、あるいは植物ホルモンなどのような脂溶性分子などさまざまなアクセプターに転移する。過去10年間ほ乳類細胞のガラクトース転移酵素は糖質研究者の興味の中心であり遺伝子の発見と酵素反応機構の解明に焦点がおかれてきた。1999年にウシ $\beta$ 4GalT1の触媒ドメインの結晶構造解析の結果が分解能2.4Åで初めて明らかになった。この研究は、原子レベルでの立体構造に着目することにより酵素的性質を解釈し反応機構を理解することをめざす、糖転移酵素の構造的研究の新展開の幕開けとなった。この総説では糖転移酵素のファミリーの流れの中でガラクトース転移酵素の構造-機能相関の現状をとりあげる。2つのウシガラクトース転移酵素、 $\beta$ 4GalT1、 $\alpha$ 3GalT、の触媒ドメインの結晶構造と反応機構を考察する。

#### A. 序論

ほとんどすべての生き物は脂質あるいはタンパク質に結合した多種類の糖鎖をもっており、糖鎖は(Asn-X-Ser/Thr)のコンセンサス配列のアスパラギン残基のアミド基へのN型結合が、SerないしはThrの水酸基へのO型結合をしている(1)。これらの多糖は糖が結合しているタンパク質の生理的機能とタンパク質が除去される過程に影響を及ぼす(2)。真核細胞で多糖はゴルジ装置に集約して局在する糖転移酵素により合成される。原核細胞では糖転移酵素自身が細胞内オルガネラに集積することはないが、糖転移酵素の遺伝子はしばしばひとつの遺伝子座のひ

in an operon belonging to a single locus. They participate in the synthesis of the oligosaccharide components of the surface micro-organism molecular structures that are involved in adhesion and contribute to the micro-organism escape from host immune defenses and their particular tissue localization/invasion (3).

Glycosyltransferases are generally grouped into families and commonly named according to the type of sugar they transfer. N-acetylglucosaminyltransferase, galactosyltransferase, fucosyltransferase and sialyltransferase transfer respectively N-acetylglucosamine, galactose, fucose and sialic acid to different acceptor substrates. Within the glycosyltransferase families, subfamilies of transferases generate specific linkages. For example,  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase,  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase and  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase each transfer galactose from UDP- $\alpha$ -galactose in  $\beta$ 1,4,  $\beta$ 1,3 and  $\alpha$ 1,3 linkage to the acceptor molecules.

An extensive classification of potential activated sugar-dependent glycosyltransferases reveals 51 potential families available at the carbohydrate-active enzymes server CAZY (4). This classification is based on both PSI-BLAST sequence analysis, hydrophobic cluster analysis (HCA) and substrate/product stereochemistry (5).

The glycosyltransferase reaction involves the transfer of a monosaccharide from an activated sugar donor, most frequently UDP-sugar (or GDP- and CMP-) to a particular acceptor substrate, a saccharide, protein, lipid, DNA or even small molecule acceptors. They generally require a divalent cation as a cofactor ( $Mn^{2+}$ ) to get full enzymatic activity.

The glycosylation reaction can proceed with either inversion or retention of stereochemistry at the C1 position of the donor sugar. In the case of inverting glycosyltransferases, a nucleophile of the acceptor is thought to attack the C1 of the donor in a  $S_N2$ -like reaction leading to an inversion of the C1 stereochemistry ( $\alpha$  to  $\beta$ ). Retaining glycosyltransferases presumably proceed through a double displacement mechanism consisting of two inversion steps ( $\alpha$  to  $\beta$  and  $\beta$  to  $\alpha$ ) involving the formation and the subsequent breakdown of a covalent glycosyl-enzyme intermediate (6). In both cases, the glycosyltransferase transition states have been shown to possess oxocarbenium-like properties as has been extensively described for glycosidases (7). In both inverting and retaining glycosyltransferases, a general base (aspartic acid or glutamic acid) located in the catalytic site is thought to assist in deprotonating the nucleophilic hydroxyl.

The probable existence of these mechanistic properties shared by different glycosyltransferases precluded the search and identification of small peptide stretches or motifs detected in different glycosyltransferases. The DXD motif (or sometimes DXH) has been involved in the divalent cation (manganese) mediated interaction with the diphosphate moiety of the nucleotide-sugar donor substrate (8). An other acidic rich short

とつのおペロン内に集まっている。糖転移酵素の関与により合成される微生物の細胞表面の多糖成分は、微生物の宿主の免疫の守備をかいくり特定の臓器に定着・浸潤するのに役立っている(3)。

糖転移酵素はファミリーに分類され通常は転移させる糖の種類に従って名前をつけられている。N-アセチルグルコサミン転移酵素、ガラクトース転移酵素、フコース転移酵素、シアル酸転移酵素はそれぞれN-アセチルグルコサミン、ガラクトース、フコース、シアル酸をアクセプターに転移させる。糖転移酵素のファミリーの中では糖の結合様式に従いさらにサブファミリーへの分類がおこなわれる。たとえば $\beta$ 1,4-ガラクトース転移酵素、 $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素、 $\alpha$ 1,3-ガラクトース転移酵素はガラクトースをUDP- $\alpha$ -ガラクトースから $\beta$ 1,4,  $\beta$ 1,3,  $\alpha$ 1,3結合で基質分子へと結合させる。

糖転移酵素は51のファミリーに分類されており、炭水素代謝酵素サーバー CAZYに公開されている(4)。分類は PSI-BLAST 配列解析、疎水領域解析(HCA), 基質・生成物の立体化学によりおこなわれている(5)。

糖転移反応は活性化された糖供与体(多くの場合にUDP-糖、このほかにGDP-糖、CMP-糖)から単糖が特定のアクセプター、糖やタンパク質、脂質、DNAや低分子量分子に転移するものである。反応が十分進行するためには通常コファクターとして二価イオン(マンガンイオン)を必要とする。

糖転移反応においては供与体の糖のC1位の立体配座が反転する場合と保持される場合とがある。反転する場合には $SN2$ タイプのような反応様式によりアクセプターが求核試薬としてC1位へ攻撃しC1位の立体配座が逆転する。立体配座が保持される場合は、酵素が供与体のC1位に $\beta$ 結合により共有結合して中間体を形成したのち、アクセプターが $\alpha$ 結合をつくるようにC1位を攻撃する。こうしてC1位の立体配座の逆転が連続して2回起こるために元通りの立体配座になるものと考えられる(6)。どちらの場合にも糖転移酵素の遷移状態は、糖分解酵素で詳しく調べられているのと同様なオキソカルベニウムの状態をとる(7)。またどちらの場合にも活性部位の Asp または Glu はヒドロキシルの求核性を高めると考えられている。

異なった糖転移酵素が共通した反応機構をもつらしいという見込みは、異なった糖転移酵素に共通する短いペプチド配列やモチーフの検索と同定をはばんできた。DXD(DXH)モチーフは二価イオン(マンガンイオン)を介した糖供与体の二リン酸部分との相互作用に関与する(8)。また酸性アミノ酸を含む短い配列

sequence WGGE(D) has been recognized to contain the catalytic general base of the  $\beta$ 4GalT family and is also present in the human GalNAc-T4 and *Pasteurella multocida* hyaluronan synthase (9).

Remarkably, all eucaryotic glycosyltransferases cloned so far, contrary to prokaryotic glycosyltransferases, have a similar domain organization probably due to their common Golgi sub-cellular location (10). They are all trans-membrane bound glycoproteins of type II, with a short N-terminal cytoplasmic domain (between 5 to 30 amino acids long), a short single trans-membrane spanning region (10 to 20 amino acids long) followed by a "stem" region linked to a single large domain which contains the catalytic machinery responsible for the sugar transfer, representing around 300 to 400 amino acids. Soluble versions of glycosyltransferases, lacking their N-terminal cytoplasmic part, transmembrane domain and portions of the "stem" region have been demonstrated to keep their enzymatic activity and specificity. These observations led to the preparation of large amounts of soluble glycosyltransferase C-terminal catalytic domains.

We will first review the biological properties of some galactosyltransferases that have been enzymatically well-characterized. The structural properties of an inverting galactosyltransferase, the bovine  $\beta$ 4GalT1, and those of a retaining galactosyltransferase, the bovine  $\alpha$ 3GalT recently solved, will be reviewed to address their reaction mechanism and to discuss their degree of similarity with other glycosyltransferases structures.

## B. Prokaryotic Galactosyltransferases

The surfaces of all microbes are coated with sugar (3). These sugars compose the lipopolysaccharides (LPS) of Gram-negative bacteria (12), the bacteria capsular polysaccharides (CPS) (13), the lipoarabinomannans of mycobacteria and the lipophosphoglycans of *Leshmania*. In the case of pathogens, these sugar-envelopes are responsible for virulence determinants. In most cases, the chemical composition of these complex sugar-envelopes are known and the genes and proteins responsible for their biosynthesis elucidated.

### B-1. The $\beta$ 4galactosyltransferases of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 14

The capsule of *Streptococcus pneumoniae* type 14 has been well characterized (14). The entire cps14 gene cluster consists of 12 open reading genes (cps14A to cps14L) which appear to be arranged as a single transcriptional unit. Comparison with DNA and protein sequences available in data bases allowed the functions of some of these genes to be predicted. The biosynthetic function of some of these gene products was also determined experimentally by analyzing the intermediates in the synthesis of the type 14 tetrasaccharide subunit catalyzed by membrane preparations of *E.coli* expressing isolated pneu-

WGGE(D)は $\beta$ 4GalTファミリーの活性中心を含みヒトGalNAc-T4や*Pasteurella multocida* ヒアルロン酸合成酵素にも存在する(9)。

驚くべきことに、真核細胞の全ての糖転移酵素は類似したドメイン構成をしている。これは原核細胞の場合にはみられないことであり、おそらくは真核細胞の糖転移酵素がゴルジに局在することに起因するものである(10)。すなわち真核細胞の糖転移酵素はII型の膜貫通糖タンパク質であり、短いN末端細胞質尾部(5-30アミノ酸残基)、膜貫通領域(10-20アミノ酸残基)、短い幹領域とそれにつながる糖転移活性の触媒部位を含む300-400アミノ酸残基の大きな領域より構成されている。N末端細胞質尾部、膜貫通領域、および幹領域を欠く可溶性の糖転移酵素は酵素活性と基質特異性を保持していることが明らかになった。それらの発見は触媒部位のC末端活性領域の大量調製への道を開いた。

われわれは酵素学的によく研究されてきたいくつかのガラクトース転移酵素の生物学的性質をまず初めに述べる。反応メカニズムを議論するためにC1位の立体配座の反転を起こすウシ $\beta$ 4GalT1と、最近報告された立体配座の反転を起こさないウシ $\alpha$ 3GalT(11)の構造の特徴を述べ、ほかの糖転移酵素との類似性についても議論する。

## B. 原核細胞の糖転移酵素

微生物の表層は糖におおわれている(3)。これらの糖にはグラム陰性細菌のリポポリサッカライド(LPS)(12)、被膜多糖(CPS)(13)、杵菌のリポアラビノマンナンや*Leshmania*のリポホスホグカンがある。病原体の場合には糖被膜が毒性を決定する。多くの場合において糖被膜の化学構造は知られており生合成に関わる遺伝子やタンパク質もはっきりしている。

### B-1. *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 の $\beta$ 4 ガラクトース転移酵素

*Streptococcus pneumoniae* serotype 14 の被膜はよく研究されている(14)。cps14の遺伝子クラスターは12個のORF(cps14A-cps14L)から構成され単一の翻訳単位であるらしい。データベースに公開されているDNAやタンパク質の配列の比較をもとにこれらの遺伝子のうちいくつかのものの機能が予想された。また遺伝子を大腸菌で発現させて、その膜標品の示す糖転移酵素活性により作られたtype 14の四糖の中間体を解析するという方法

mococcal glycosyltransferases. Cps14G and cps14J are coding for membrane-associated  $\beta$ 1,4galactosyltransferases that are responsible for the formation of the disaccharide Gal $\beta$ 1,4Glc-pp-lipid (lactose on a lipid carrier) and [(Gal- $\beta$ 1,4)GlcNAc-Gal-Glc-]pp-lipid, respectively (14). However, no sequence homology has been found between these streptococcal  $\beta$ 1,4 galactosyltransferases and the corresponding mammalian  $\beta$ 4GalT enzymes. The preparation of soluble variants of these membrane-associated galactosyltransferases should be a prerequisite to begin their structural analysis.

### B-2. The $\alpha$ 1,4galactosyltransferase (LgtC) of *Neisseria meningitidis*

Recently a membrane-associated  $\alpha$ 1,4 galactosyltransferase (LgtC, CAZY GT8 family) from *Neisseria meningitidis* has been cloned and its gene product characterized (15). The LgtC gene is part of an *lgt* operon responsible for the formation of the lipooligosaccharide structures (LOS) (16). LgtC forms the neisserial LOS terminal structure Gal $\alpha$ (1,4)Gal and lacto-N-neotetraose, which can be found also on the surface of human epithelial cells or in host secretions. The presence of these structures in LOS may facilitate the evasion of the host immune system by surface camouflage. Recombinant LgtC lacking its 25 C-terminal amino acid residues was over-expressed in, and purified to homogeneity from *Escherichia coli* and used for enzymatic and X-ray crystallography studies (17).

The LgtC crystal structure was recently reported at 2 Å resolution in complex with manganese and UDP-2-deoxy-2-fluoro-galactose (a donor sugar analog) in the presence and absence of the acceptor sugar analog 4'-deoxylactose (17, 18). The protein of 286 residues consists of an  $\alpha/\beta$  protein with two domains. The large N-terminal domain (residues 1 to 247) has a mixed  $\alpha/\beta$  fold and contains the active site. The first 100 residues of this domain form a nucleotide binding fold consisting of four parallel  $\beta$ -strands surrounded by two  $\alpha$ -helices on each side with significant similarities with inverting glycosyltransferases particularly the bovine  $\beta$ 4GalT1 despite low sequence identity. The small C-terminal domain (residues 248 to 282) is helical and is predicted to mediate membrane attachment of LgtC. The residues interacting with the UDP-galactose are contained within the first 100 residues. Interestingly, LgtC has four DXD motifs, two of which are located within the active site of the enzyme. The manganese necessary to the enzymatic activity is coordinated by the D103ID105 sequence, while the D189QD191 sequence is involved in the acceptor binding.

It is clear from these studies that the presence alone of a DXD sequence is not always indicative of a metal binding site in glycosyltransferases, and such a motif is not sufficient to identify in protein sequence data bases an ORF (Open Reading Frame) as a glycosyltransferase. Despite the presence of the UDP-2-F-galactose donor analog and the 4'-deoxylactose acceptor analog in the complex LgtC structure, no clear view of

により遺伝子の機能が実験的に決定された。cps14G と cps14J はそれぞれ Gal $\beta$ 1,4Glc-pp-脂質、[(Gal $\beta$ 1,4)GlcNAc-Gal-Glc-]pp-脂質の合成に関与する膜結合型の  $\beta$ 4GalT である(14)。しかし *Streptococcus* の  $\beta$ 4GalT とほ乳類の  $\beta$ 4GalT には配列の相同性がない。*Streptococcus* のガラクトース転移酵素の可溶性部分を調製することが構造解析を開始するための必要条件である。

### B-2. *Neisseria meningitidis* の $\alpha$ 1,4ガラクトース転移酵素(LgtC)

最近 *Neisseria meningitidis* から膜結合型  $\alpha$ 1,4ガラクトース転移酵素(LgtC、CAZY GT8 family)がクローニングされ遺伝子産物が解析された(15)。LgtC 遺伝子はリポオリゴサッカライド構造(LOS)の合成に必要な *lgt* オペロンの一部である(16)。LgtC は *Neisseria* の LOS の末端構造である Gal- $\alpha$ (1,4)Gal とラクトNネオテトラオースをつくる。これらの構造はヒトの上皮細胞の表面や宿主の分泌物の中にも見いだされる。LOSが宿主細胞にも共通する構造をもつことにより、宿主の免疫系をかいくぐるのが容易になるのかもしれない。C末端 25 残基を欠く組み換え体 LgtC は大腸菌で大量発現され、均一に精製され酵素学的研究や結晶解析に用いられている(17)。

LgtC の結晶構造は最近 2 Å の分解能で報告された。結晶はマンガンと糖供与体アナログ(UDP-2-デオキシ-2-フルオロ-ガラクトース)との複合体であり、さらにアクセプターとなる糖アナログ(4'デオキシガラクトース)の存在下または非存在下でのものである(17, 18)。286 残基からなるタンパク質は2つのドメインからなる  $\alpha/\beta$  タンパク質である。N末側の大きいドメイン(1 - 247残基)は混合型  $\alpha/\beta$  フォールドを示し酵素活性部位を含む。このドメインの初めの100残基は4つの平行  $\beta$  シートの両脇に  $\alpha$  ヘリックスがあるヌクレオチド結合様式を示しており、この構造は配列の相同性が低いにもかかわらず逆転型反応をおこなうウシ  $\beta$ 4GalT1 ときわめて類似している。C末側の小さいドメイン(248 - 282残基)はヘリックス構造をとりLgtC の膜への結合をおこなうと考えられる。UDPガラクトースとの結合に関与する残基は初めの100残基の中に存在する。興味深いことにLgtCには4つのDXDモチーフがあり、そのうち2つは活性部位内に存在する。酵素活性に必須なマンガンはD103ID105に配位しており、D189QD191はアクセプターの結合に関与する。

これらの研究からDXD配列があるだけでは必ずしも糖転移酵素の金属イオン結合部位の指標になるとは限らないことが明らかになった。またDXD配列を根拠にして配列のデータベースのORFが糖転移酵素であると同定するのも不十分である。糖供与体アナログとアクセプターアナログとの複合体の結晶であっ

the retention mechanism has been demonstrated yet for this enzyme. However, the invariant glutamine residue 189 has been identified as the probable residue implicated in the retention mechanism. Its side chain amide oxygen could take the role of the potential nucleophile but its exact identity remains unclear. Site directed mutagenesis of Gln189 and surrounding residues should possibly clarify this mechanism (17).

### C. Plant Galactosyltransferases

Plant cell walls are made of complex structures of polysaccharides synthesized by multiple glycosyltransferases. The recently sequenced genome of *Arabidopsis thaliana* revealed a large number of ORFs potentially predicted to code for numerous glycosyltransferases and glycosidases (19). Moreover, galactose transfer has been found to be associated with the modulation of the specific biological function of plant reproduction. Galactosylation of the small lipophilic plant-specific molecules, the flavonols, is required for pollen germination in maize and in *Petunia*. F3GalTase, recently cloned from *Petunia hybrida*, is a flavonol-3-O-galactosyltransferase which transfer galactose from UDP- $\alpha$ -Gal to flavonol (20). The galactosylation of flavonol results in the change of flavonol reactivity and tissue concentration and in the modulation of plant germination. No structural data are available for this galactosyltransferase belonging to the very large superfamily of UDP-glucuronosyltransferases (CAZY GT1 family). Among this superfamily are the enzymes responsible in mammals for the hepatic detoxification of steroids and other small lipophilic compounds (21).

### D. Mammalian Galactosyltransferases

#### D-1. The $\beta$ 4GalT Family

This family of galactosyltransferases (CAZY GT7 family) is quite large by the number of cDNA coding for its respective members, in species as different as mammals, avians, insects and worms (22). The well known and first characterized galactosyltransferase, bovine  $\beta$ 4GalT1 (EC 2.4.1.38), is a trans-Golgi resident, type II membrane-bound glycoprotein which in the presence of manganese as a cofactor catalyses the transfer of galactose from UDP- $\alpha$ -Gal to terminal  $\beta$ -N-acetylglucosamine residues forming the poly- $\beta$ 4-N-acetyllactosamine. The disaccharide Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$  represents the type 2 chain of the core structures of many glycosphingolipids and glycoproteins core structures present in glycoproteins and glycolipids. This "house-keeping" activity occurs among both mammalian and non-mammalian species, including avians and plants (23). One unique feature of the  $\beta$ 4GalT1 in comparison with the other glycosyltransferases is the fact that a modulation of its activity by its specific association with  $\alpha$ -lactalbumin contributes to the synthesis of lactose, the disaccharide Gal $\beta$ 1, 4Glc (lactose synthase, EC 2.4.1.22) (24).

Seven  $\beta$ 4GalT coding genes have been described so far

たのにもかかわらず、この酵素の性質である立体配座を保持することの仕組みは明らかにはならなかった。しかしながら、Gln189は立体配座の保持にかかわる残基ではないかと注目されてきた。Gln189の側鎖のアミド酸素は求核試薬として機能するが、詳細は不明である。Gln189とその周辺の残基の改変によりこの酵素の反応メカニズムが解明されるであろう(17)。

### C. 植物のガラクトース転移酵素

植物の細胞壁は複数の糖転移酵素により合成される複雑な構造の多糖から成る。近年配列が決定された *Arabidopsis thaliana* のゲノムには多種類の糖転移酵素と糖分解酵素をコードすると予想される ORF が数多く見つかった(19)。さらにガラクトースの転移は植物の再生という特殊な生物活性の制御に関与することが発見された。植物に特有な低分子量脂溶性分子、フラボノール、のガラクトシル化はとうもろこしや *Petunia* の花粉の発生に必須である。F3GalTase は最近 *Petunia hybrida* からクローニングされたフラボノール-3-ガラクトース転移酵素でありガラクトースをUDP- $\alpha$ -Galからフラボノールへ転移させる(20)。フラボノールのガラクトシル化はフラボノールの反応性と組織内での濃度を変化させ、植物の発生を調節する。フラボノール-3-ガラクトース転移酵素はUDP-グルクロノシルトランスフェラーゼの大きなスーパーファミリー(CAZY, GT1 family)に属しているが、構造的な情報はない。このスーパーファミリーに属するほ乳類細胞の酵素としてはステロイドやその他の低分子量脂溶性分子の肝臓における無毒化にかかわるものがある(21)。

### D. ほ乳類のガラクトース転移酵素

#### D-1. $\beta$ 4GalTファミリー

このガラクトース転移酵素のファミリーはcDNAの数からみて非常に大きいもので、ほ乳類、鳥類、昆虫、線虫に及ぶ(22)。このうちよく知られていて最初に調べられたのはウシ $\beta$ 4GalT1 (EC2.4.1.38)である。これはトランスゴルジに局在するII型の膜タンパク質であり、マンガンイオン存在下でUDP- $\alpha$ -Galから末端の $\beta$ -N-アセチルグルコサミンにガラクトースを転移し、ポリラクタミンを作る。Gal $\beta$ 1-4GlcNAcの2糖は多くの糖脂質の2型糖鎖であり、また糖タンパク質、糖脂質のコア構造にも存在する。このハウスキーピング活性はほ乳類と、ほ乳類以外の種(鳥や植物)のどちらにも存在する(23)。他の糖転移酵素と比べて $\beta$ 4GalT1の特異な点は、 $\alpha$ -ラクトアルブミンとの特異的な結合により活性が制御されラクトースの合成をおこなうことである(24)。

7つの異なる $\beta$ 4Galのアイソフォームに対する遺伝子が同定

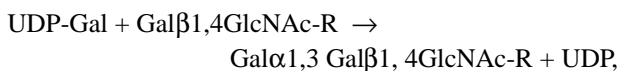
that are responsible for coding seven different  $\beta$ 4GalT isoforms and their enzymatic activities have been characterized showing a strict substrate acceptor specificity (22). Some of the  $\beta$ 4GalT isoforms are tissue specific and their expression modulated in cancerous pathogenesis (25) and autoimmune diseases (26). Moreover, the  $\beta$ 4GalT7 isoform is involved in glycosaminoglycan biosynthesis, and mutated copies of its gene, inactivating the enzyme, are found in a congenital human disorder, the Ehlers-Danlos syndrome (27-29).

### D-2. The $\beta$ 3GalT Family

This family of galactosyltransferase (CAZY GT31 family) is involved in the formation of the disaccharides Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$  (type 1 chain) core structures found in glycosphingolipids and glycoproteins, where they occur in linear or branched repeated structures (22, 30). A human  $\beta$ 3GalT1 sequence was used to identify in the human EST data base several novel members of the  $\beta$ 3galactosyltransferase family because they shared short sequence stretches with high similarity and conserved cysteine residues (22). Actually, nine isoforms of human  $\beta$ 3GalT have been described with at least three of them enzymatically characterized (22). Despite their identical donor substrates and similar acceptor substrates, the  $\beta$ 3GalTs isoforms do not share amino acid sequence similarities with the  $\beta$ 4GalT members. They contain one DXD motif, as the possible D(S/T)D sequence in  $\beta$ 3GalT1, -T2 and -T3 or the DDD sequence in  $\beta$ 3GalT4 or in its *Drosophila* Brainiac homolog. The conserved EDVY(F)V(L)G motif present among these four  $\beta$ 3GalT isoforms could contain the acidic residue identified as the general base involved in their inverting sugar transfer mechanism (30).

### D-3. The $\alpha$ 1,3 Glycosyltransferase Family

$\alpha$ 1,3-galactosyltransferase ( $\alpha$ 3GalT, EC 2.4.1.151, CAZY GT6 family) catalyzes the transfer of galactose from UDP- $\alpha$ -Gal to glycoconjugate acceptors having LacNAc (Gal $\beta$ 1,4GlcNAc) as the nonreducing terminal disaccharide in the presence of Mn<sup>2+</sup> as cofactor, according to the following reaction:



in which R may be a glycoprotein or a glycolipid (31). Both  $\alpha$ 3GalT and its enzymatic product, the Gal $\alpha$ 1,3Gal glycan structure, are expressed by New World primates (platyrrhines) and many non-primate mammals but are absent from the tissues of Old World primates (catarrhines), including *Homo sapiens* (32).

$\alpha$ 3GalT belongs to the  $\alpha$ 1,3glycosyltransferase family like the homologous galactosyltransferases responsible for the synthesis of Forssman and *iso*-globoside glycosphingolipids (44-50 % identity) and the ABO histo-blood group antigens (45% identity). Moreover, the human ABO and Forssman glycosyltransferase genes share the same chromosomal localization (chromosome 9q34) with the human inactive  $\alpha$ 3GalT

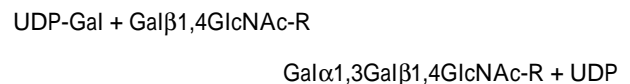
されている。これらは厳密なアクセプター特異性を示す (22)。ある  $\beta$ Gal4Tの発現は組織特異的であり発現は癌化 (25) や自己免疫疾患 (26) により影響を受ける。さらに $\beta$ 4GalT7はグルコサミノグリカンの生合成にかかわるが、この変異体の不活性化された酵素はヒトの先天性疾患(Ehlers-Danlosシンドローム)で見いだされる(27-29)。

### D-2. $\beta$ 3GalTファミリー

このガラクトース転移酵素(CAZY, GT31 ファミリー)は直鎖または繰り返し分岐構造にあらわれるGal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$  (1型)の合成に関与する(22, 30)。ヒト $\beta$ 3GalT1の配列をもとにヒトESTデータベースを検索したところ、いくつかの新規メンバーが見つかった。それらにはよく保存された短い配列やシステイン残基があった(22)。実際9つのアイソフォームが見つかりそのうち少なくとも3つには酵素活性があった(22)。同じ供与体を似たようなアクセプター基質に転移するにもかかわらず $\beta$ 3GalTのアイソフォームと $\beta$ 4GalTの間にはアミノ酸の相同性がない。 $\beta$ 3GalT1, -T2, -T3にはD(S/T)Dが、 $\beta$ 3GalT4 やその*Drosophila* BrainiacのホモログにはDDDがある。4つの $\beta$ 3GalTに存在するEDVY(F)V(L)Gモチーフには反転型糖転移( $\alpha$  to  $\beta$ )にかかわる一般的塩基となる酸性アミノ酸が含まれていると考えられる(30)。

### D-3. $\alpha$ 1,3 糖転移酵素ファミリー

$\alpha$ 1,3 ガラクトース転移酵素(CAZY, GT6)はマンガンイオン存在下でUDP- $\alpha$ -GalのガラクトースをLacNAc(Gal $\beta$ 1,4GlcNAc)を非還元末端にもつ糖アクセプターに転移する。



Rは糖タンパク質または糖脂質である(31)。 $\alpha$ 3GalTとその生成物(Gal $\alpha$ 1,3Galグリカン)は西半球の霊長類(広鼻猿類)と霊長類以外のほ乳類には含まれるが東半球の霊長類(ホモサピエンスを含む狭鼻猿類)には存在しない(32)。

$\alpha$ 3GalTはForssmanやイソグロボシド糖脂質やABO抗原の合成にかかわる糖転移酵素のように $\alpha$ 1,3糖転移酵素のファミリーに属する。ヒトABO抗原やForssman抗原の糖転移酵素遺伝子はヒトでは不活性化している $\alpha$ 3GalTホモログHGT-10と染色体上で同じ場所にあり(9q34)、マウス $\alpha$ 3GalTとも相同な染色体上の

homolog HGT-10, and the same genomic organization with murine  $\alpha 3\text{GalT}$ , which demonstrates a close evolutionary relationship (33-35). The  $\alpha 1,3\text{GalT}$  enzyme has attracted medical attention because it synthesizes the  $\text{Gal}\alpha 1,3\text{Gal}$  epitope. Naturally occurring anti- $\text{Gal}\alpha 1,3\text{Gal}$  antibodies present in human serum present a major barrier to the use of porcine and other non-primate organs for xenotransplantation in humans. Antibody binding to the  $\text{Gal}\alpha 1,3\text{Gal}$  epitopes present on the vascular endothelium of the xenotransplants produces hyperacute graft rejection. This enzyme and its oligosaccharide products, particularly in the context of xenotransplantation, have been the object of two former TIGG reviews (36, 37).

#### D-4. The $\alpha 4\text{GalT}$ family

The P blood group antigens are glycan structures displayed by membrane-associated glycosphingolipids present on red cells and on other tissues, including the urothelium (38, 39). Synthesis of the P antigens involves two different pathways, each of which begins with lactosylceramide  $\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ -ceramide as a common precursor. In one pathway, P antigen biosynthesis begins with an  $\alpha 1,4\text{galactosyltransferase}$  ( $\text{P}^k$  transferase) responsible for the  $\text{P}^k$  antigen, the trisaccharide  $\text{Gal}\alpha 1,4\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ -ceramide. The  $\text{P}^k$  antigen is then modified by a  $\beta 1,3\text{-N-acetyl-galactosaminyltransferase}$ , named the P transferase, to form the P antigen, the tetrasaccharide  $\text{GalNAc}\beta 1,3\text{Gal}\alpha 1,4\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ -ceramide. In the second pathway, the  $\text{P}_1$  antigen biosynthesis involves three sequential glycosylation reactions, starting with lactosylceramide. The lactosylceramide is converted first in lactotriaosylceramide,  $\text{GlcNAc}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ -ceramide, by the action of a  $\beta 1,3\text{-N-acetyl-glucosaminyltransferase}$  and further converted by a particular  $\beta 1,4\text{GalT}$  isoform ( $\beta 4\text{GalT5}$  and/or  $\beta 4\text{GalT6}$ ) in paragloboside, the tetrasaccharide  $\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ -ceramide. The  $\text{P}_1$  antigen is formed by the addition of a galactose in an  $\alpha 1,4$ -linkage to the paragloboside by the  $\text{P}_1$   $\alpha 4\text{galactosyltransferase}$ , forming the pentasaccharide  $\text{Gal}\alpha 1,4\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ -ceramide. It is not yet clear if the  $\text{P}_1$   $\alpha 4\text{galactosyltransferase}$  is identical to the  $\text{P}^k$   $\alpha 4\text{galactosyltransferase}$  (CAZY family GT32).

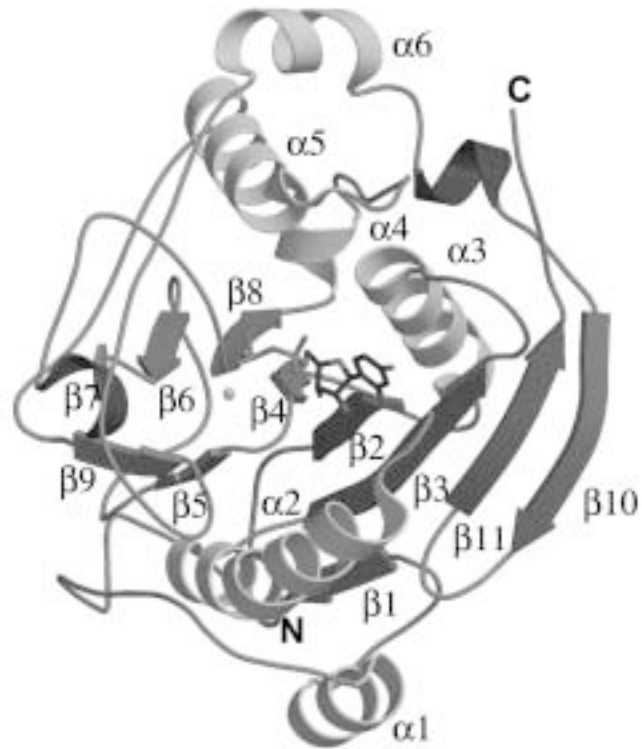
The physiological functions of the P blood group antigens are not known, but these molecules have been implicated in the pathophysiology of urinary tract infections and parvovirus infections (40). A tentative cloning of the human  $\text{P}^k$   $\alpha 4\text{galactosyltransferase}$  cDNA has been performed by using a PSI-BLAST analysis of gene data bases with the coding region of the  $\alpha 4\text{GalT}$  gene of *Neisseria meningitidis* (41). However, the two cDNA sequences identified with relative homology and their gene product isolated, failed to demonstrate any  $\alpha 4\text{galactosyltransferase}$  activity. Data base searches using the coding region of a human  $\alpha 4\text{-N-acetylglucosaminyltransferase}$  (42) identified a novel homologous gene with the same chromosomal location as the observed  $\text{P}_1$  polymorphism. Expression of full

位置にある。これは進化上きわめて近縁であることを示している(33-35)。 $\alpha 1,3\text{GalT}$  は  $\text{Gal}\alpha 1,3\text{Gal}$  エピトープをつくることから医学的に注目を集めている。ヒト血清中に自然にある抗  $\text{Gal}\alpha 1,3\text{Gal}$  抗体はブタやそれ以外の非霊長類からの臓器移植の障害の主要な原因となる。移植臓器の血管内皮細胞の  $\text{Gal}\alpha 1,3\text{Gal}$  エピトープに対する抗体の結合は急性拒絶を引き起こす。この酵素とそのオリゴ糖生成物は、とりわけ移植との関連から以前の TIGG の 2 編の総説にとりあげられている(36, 37)。

#### D-4. $\alpha 4\text{GalT}$ ファミリー

P抗原は赤血球や他の臓器(尿路上皮)の膜上の糖脂質に担われている抗原である(38, 39)。P抗原の合成はラクトシルセラミド、 $\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ -セラミド、を前駆体として2つの経路でおこなわれる。まず第一の経路では $\alpha 1,4$ ガラクトース転移酵素(Pkトランスフェラーゼ)により  $\text{Gal}\alpha 1,4\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ -セラミドができる。それは $\beta 1,3\text{N}$ -アセチルガラクトサミン転移酵素(Pトランスフェラーゼ)により4糖のP抗原( $\text{GalNAc}\beta 1,3\text{Gal}\alpha 1,4\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ -セラミド)になる。第二の経路ではP<sub>1</sub>抗原はラクトシルセラミドから始まる3段階の糖転移反応により作られる。ラクトシルセラミドは $\beta 1,3\text{N}$ -アセチルグルコサミン転移酵素により $\text{GlcNAc}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ -セラミドになり $\beta 1,4\text{GalT}$ のアイソフォーム( $\beta 4\text{GalT5}$ あるいは $\beta 4\text{GalT6}$ )により4糖のパラグロボシド、 $\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ -セラミドになる。さらにP<sub>1</sub>-a4ガラクトース転移酵素により $\alpha 1,4$ 結合でガラクトースが付加されて5糖のP<sub>1</sub>抗原、 $\text{Gal}\alpha 1,4\text{-Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc}$ -セラミドができる。P<sub>1</sub>- $\alpha 4$ ガラクトース転移酵素がPk- $\alpha 4$ ガラクトース転移酵素と同一かどうかはわからない。

P血液抗原の生理的役割はわかっていないが尿道の感染やparvovirusの感染への関与が示唆されている(40)。*Neisseria meningitidis*の $\alpha 4\text{GalT}$ 遺伝子のコーディング部分を用いたPSI-BLASTの解析によりヒトPk $\alpha 4$ ガラクトース転移酵素のcDNAらしきものがクローニングされた(41)。しかしこの方法でとられた2つのcDNA配列からは $\alpha 4$ ガラクトース転移酵素の活性を示すタンパク質は得られなかった。ヒト $\alpha 4\text{N}$ -アセチルグルコサミンのコーディング部分を用いた検索ではP<sub>1</sub>多様性を示す部位と同じ遺伝子座上に新規ホモログが見つかった(42)。得られた遺伝子 $\alpha 4\text{GalT1}$ の全長を昆虫細胞で発現させたところPk合成酵素の活



**Fig. 1. Overall view of the bovine donor substrate-bound  $\beta$ 4GalT1 catalytic domain structure (L131-S402).** Ribbon diagram of the molecule viewed down the open pocket. N and C indicate the N- and C-termini of the molecule. Secondary structure elements are numbered as  $\alpha$  for  $\alpha$ -helices and  $\beta$  for  $\beta$ -strands. Only the electron density visible UDP portion of the UDP-Gal is represented in stick form. The manganese ion is presented as a sphere.

coding constructs of the gene, named  $\alpha$ 4GalT1, in insect cells revealed  $P^k$  synthase activity, but no  $P_i$  activity was demonstrated. Sequence alignment of  $\alpha$ 4GalT1 and  $\alpha$ 4GlcNAc-T revealed one probable DXD motif as the D292TD for  $\alpha$ 4GalT1 and D167TD for  $\alpha$ 4GlcNAc-T sequence (41).

### E. Bovine $\beta$ 4GalT1 Catalytic Domain Structure

Crystal structures of both the substrate-free and the substrate-bound  $\beta$ 4GalT1 complexed with UDP-galactose (UDP-Gal) were obtained at 2.4 Å resolution. The overall structure of the  $\beta$ 4GalT1 catalytic domain (Leu131 to Ser402) is presented as a ribbon diagram in Fig. 1, with a bound UDP-Gal (only UDP represented because visible in electron density) in stick form. Briefly, the structure consists of a globular monomer with an  $\alpha/\beta$  fold, its central area containing an eight-stranded mixed twisted  $\beta$ -sheet surrounded by two  $\alpha$ -helices on one side and by four  $\alpha$ -helices on the other side.

The catalytic pocket is large and open to solvent. It contains amino acids interacting with the UDP portion of the UDP-Gal donor substrate on one side and the amino acids containing the probable general base E317 or D318, and those interacting with the acceptor substrate, on the other side. In the short sequence D252VD254 (the  $\beta$ 4GalT1 DXD motif), the D254 is interacting with a manganese ion.

A manual protein-protein docking was attempted using both the  $\alpha$ -lactalbumin crystal structure and the  $\beta$ 4GalT1 crystal structure taken both as rigid molecules. This method allowed a model for their molecular interaction to be proposed, where

性はあったが、 $P_1$  活性はなかった。 $\alpha$ 4GalT1 と  $\alpha$ 4GlcNAcT の配列の比較から D292TD と D167TD がそれぞれの DXD モチーフとなることが明らかになった。

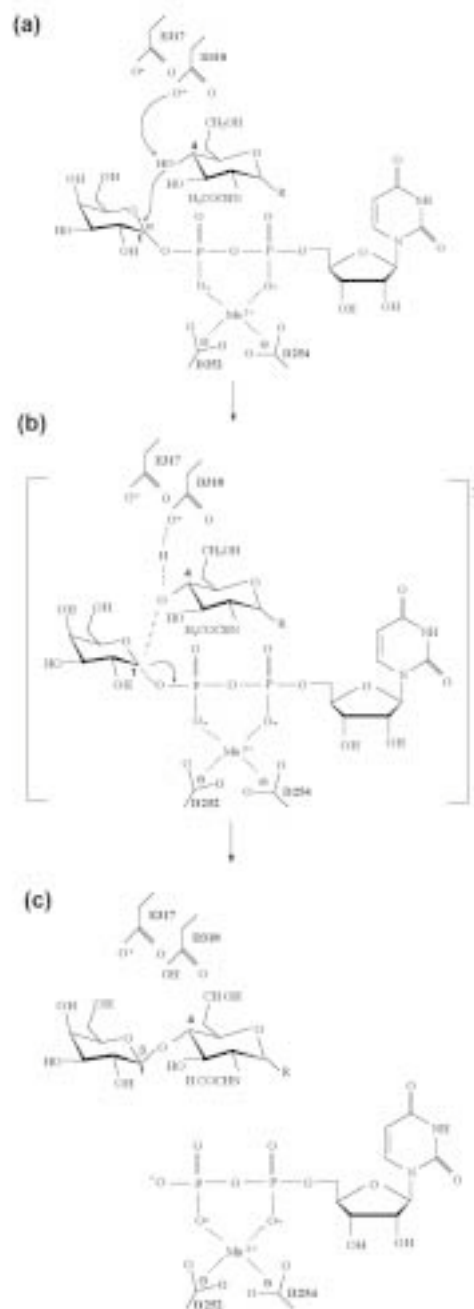
### E. ウシ $\beta$ 4GalT1 触媒ドメインの構造

#### E-1. 全体構造

基質である UDP-Gal と結合した  $\beta$ 4GalT1 と基質なしの  $\beta$ 4GalT1 の両方の結晶構造が 2.4 オングストロームの分解能で得られている。図 1 は  $\beta$ 4GalT1 の触媒ドメイン (Leu131 から Ser402) までの全体構造をリボンダイアグラムで示したものである。結合している UDP-Gal (電子密度が見えている UDP の部分のみ示す) は棒状模型で示してある。構造は球状のモノマーであり、8 本のねじれた  $\beta$  シートの片側に 2 本の  $\alpha$  ヘリックス、もう片側に 4 本の  $\alpha$  ヘリックスがある。触媒部位は溶媒に向かって大きく開いている。

触媒部位の一方には供与体 UDP-Gal の UDP 部分と相互作用するアミノ酸があり、一般的塩基 E317, D318, さらにアクセプターと相互作用するアミノ酸が別の側にある。D252VD254 の短い配列の中の D254 はマンガンイオンと相互作用する。

活性制御因子である  $\alpha$  ラクトアルブミンと  $\beta$ 4GalT1 との相互作用様式については両者を剛体とみなして、それぞれの結晶構造を手作業でつぎ合わせる方法で予測がたてられている。それによると  $\alpha$  ラクトアルブミンは UDP-Gal の結合部位には変化



**Fig. 2. Schematic representation of the  $\beta$ 4GalT1 inverting reaction mechanism.** The acceptor substrate schematized is the terminal  $\beta$ -N-acetylglucosamine residue (GlcNAc-R). Step (b) represents the putative oxocarbenium ion-like intermediate.

$\alpha$ -lactalbumin interacts with amino acids located on the edge of the  $\beta$ 4GalT1 acceptor substrate binding site, resulting in its partial steric hindrance but without altering the UDP-Gal binding site. A crystal of a complex between  $\alpha$ -lactalbumin and bovine  $\beta$ 4GalT1 in the presence of donor and acceptor analogs has been obtained recently by Dr P.K. Qasba's group (NIH, Bethesda, USA). The lactose synthase structure was reported recently in a communication from Dr. B. Ramakrishnan but no information has been published yet (American Society of Glycobiology, Boston, November 2000).

### E-2. The Sugar Transfer Mechanism by Inversion of $\beta$ 4GalT1

Figure 2 shows the sugar transfer mechanism by inversion suggested by the  $\beta$ 4GalT1 structure. The first step (a) con-

を与えずに  $\beta$ 4GalT1 のアクセター結合部位の端に結合し、部分的な立体障害を引き起こすというモデルが提唱された。P. K. Qasbaらのグループにより最近  $\alpha$ ラクトアルブミンとウシ  $\beta$ 4GalT1 の複合体の結晶が供与体2アナログ・アクセターアナログ存在下で得られている。ラクトース合成酵素の構造は B. Ramakrishnan から報告されたがデータはまだ公開されていない。

### E-2. $\beta$ 4GalT1による糖の配座反転のメカニズム

図2は  $\beta$ 4GalT1 の構造により示唆された配座反転を伴う糖転移メカニズムである。第一段階(a)は  $\beta$ 4GalT1 において厳密に保持されている E317 または D318 によるアクセターの C4 位

sists of the deprotonation of the acceptor substrate hydroxyl-group in C4 by a general base, the acidic group of one of the two strictly conserved  $\beta$ 4GalT1 acidic residues E317 or D318. A superposition of the crystal structures of three different inverting glycosyltransferases solved so far, SpsA (1qgq),  $\beta$ 2GnT1 (1fo8) and  $\beta$ 3GlcAT1 (1fgg), suggests that the  $\beta$ 4GalT1 aspartic acid residue D318 is in a favorable position to fill the role of a general base but no direct proof has yet been established. A recent molecular docking study using an acceptor site photoprobe suggests D318 as the general base (43). As a result of this attack, an oxocarbenium-ion-like transition state will be produced, schematized in step (b). The final inversion of the C1 atom stereochemistry of galactose donor substrate, step (c), will result in the formation of the donor-C1- $\beta$ -O-C4-acceptor linkage and the release of UDP. A similar mechanism of inversion has been formulated for  $\beta$ 2GnT1 (only UDP-GlcNAc donor substrate visible in the crystal structure) and  $\beta$ 3GlcAT1 (only UDP and acceptor substrate visible in the crystal structure).

## F. Bovine $\alpha$ 3GalT Catalytic Domain Structure

### F-1. The Overall Protein Structure

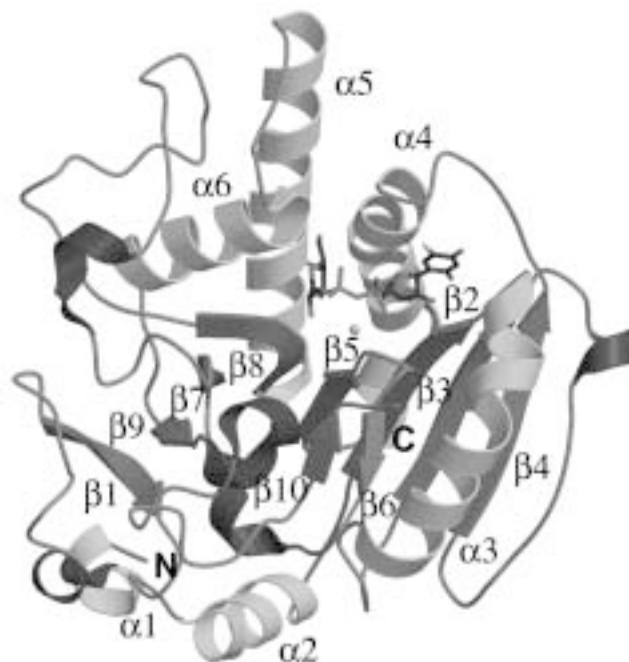
Two  $\alpha$ 3GalT crystal structures have been solved recently from a bacterially produced truncated version (residues Glu80 to Val368) of the active catalytic domain enzyme: the substrate-free  $\alpha$ 3GalT (residues Ser81 to Asn367) solved at 2.3 Å resolution and the substrate-bound  $\alpha$ 3GalT (residues Lys82 to Thr358) with Hg-UDP-galactose solved at 2.5 Å resolution. Figure 3 shows the substrate-bound structure in ribbon diagram as a monomer of globular shape with an  $\alpha/\beta$  fold with Hg-UDP-Gal represented in stick form. The protein consists of a central mixed twisted  $\beta$ -sheet of eight  $\beta$ -strands surrounded by four long  $\alpha$ -

の水酸基のデプロトネーションである。これまでに明らかにされている反転をおこす糖転移酵素(SpsA,  $\beta$ 2GnT1,  $\beta$ 3GlcAT1)の重ね合わせてみると $\beta$ 4GalT1ではD318が適当な位置にあるが、直接的な証明はまだない。最近の光プローブを用いた研究ではD318が一般的塩基であると考えられている(43)。C4位の水酸基の解離により図2(b)に示すようなオキソカルベニウムイオンのような遷移状態がえられる。最後にUDPが脱離して図2(c)に示すように供与体GalのC1の立体化学的反転がおりC1(供与体)- $\beta$ -O-C4(アクセプター)結合ができる。同様の反転メカニズムは $\beta$ 2GnT1や $\beta$ 3GlcAT1について提唱されている。

## F. ウシ $\alpha$ 3GalTの触媒ドメインの構造

### F-1. 全体構造

$\alpha$ 3GalTの2つの結晶構造がバクテリアで発現させた活性をもつ触媒部位(Glu80からVal368まで)を用いて明らかになっている。ひとつは2.3 Åの分解能での基質のない $\alpha$ 3GalT1(Ser81-Asn367)の構造であり、もうひとつは基質(Hg-UDP-Gal)と結合した $\alpha$ 3GalT1(Lys82-Thr358)の構造である。図3は基質と結合した球状モノマーの構造の2次構造をリボンモデルで示したものである。Hg-UDP-Galは棒状モデルで示されている。中央のねじれた8本の $\beta$ シートが長い4本のヘリックスで囲まれた構造をしている。N末(Ser81から)の短い $\alpha$ ヘリックス( $\alpha$ 1)から始まり $\beta$ へ



**Fig. 3. Overall view of the bovine donor substrate-bound  $\alpha$ 3GalT catalytic domain structure.** Ribbon diagram of the molecule viewed down the open pocket. N and C indicate the N- and C-termini of the molecule. Secondary structure elements are numbered as  $\alpha$  for  $\alpha$ -helices and  $\beta$  for  $\beta$ -strands. Hg-UDP-Gal is shown in stick form. The manganese ion is presented as a sphere.

helices. The structure starts at amino acid Ser81 with a short N-terminal  $\alpha$ -helix ( $\alpha$ 1), followed by a  $\beta$ -hairpin containing one  $\beta$ -strand ( $\beta$ 1), and then by a long connecting  $\alpha$ -helix ( $\alpha$ 2). The central  $\beta$ -sheet can be divided into two portions.

The first portion starts from residue Val129 to Met224 defining an N-terminal sub-domain of approximately 100 amino acids. It contains a  $\beta$ -sheet formed by four parallel  $\beta$ -strands in the strand order 4, 3, 2 and 5, surrounded by two long  $\alpha$ -helices ( $\alpha$ 3 and  $\alpha$ 4). This N-terminal sub-domain accounts for the binding of the nucleotide moiety of the nucleotide-sugar donor substrate. The second portion of the central  $\beta$ -sheet consists of two parallel  $\beta$ -strands,  $\beta$ 7 and  $\beta$ 9, flanked by two anti-parallel  $\beta$ -strands  $\beta$ 8 and  $\beta$ 1, and with two long  $\alpha$ -helices on one side,  $\alpha$ 5 and  $\alpha$ 6. A second small  $\beta$ -sheet running almost parallel to the central  $\beta$ -sheet consists of two short anti-parallel  $\beta$ -strands,  $\beta$ 6 and  $\beta$ 10.

Hg-UDP-Gal binds in a much narrower cleft than those observed for  $\beta$ 4GalT1. Its UDP portion binds to amino acids residing entirely in the N-terminal sub-domain with the acidic groups of the two aspartic acid of the D225VD227 sequence (the  $\alpha$ 3GalT DXD motif) coordinating partially a manganese ion. The two negatively charged oxygen atoms of the  $\alpha$  and  $\beta$  diphosphate groups of the UDP moiety complete the manganese ion coordination. The galactose residue is nested in a small pocket formed by residues belonging to the  $\beta$ -strand  $\beta$ 8, H280, A281, A282.

The glycosyltransferases responsible for the synthesis of ABO histo-blood group carbohydrates and certain glycosphingolipids belong to the same  $\alpha$ 1,3-glycosyltransferase family as bovine  $\alpha$ 3GalT because of their sequence similarities. The human A-GT and B-GT transfer N-acetylgalactosamine and galactose respectively to  $\alpha$ 1,2-fucosylated complex-type glycans. Interestingly, both enzymes share strict amino acid sequence identity except at four positions. Two of these four positions, position 266 (Leu in A-GT and Met in B-GT) and 268 (Gly in A-GT and Ala in B-GT), have been found to be critical in defining the donor preference (43). The two bovine  $\alpha$ 3GalT equivalent positions H280 and A282 are located in the  $\beta$ -strand  $\beta$ 8 in a position very close to the galactose residue. Moreover the acidic residue D316 interacts with the galactose by extensive hydrogen bonding and the E317 residue, strictly conserved among all the members of the  $\alpha$ 1,3 glycosyltransferase family, is predicted to be involved as the possible general base.

## F-2. The Sugar Transfer Mechanism by Retention of $\alpha$ 3GalT

Recent kinetic experiments performed with a recombinant bovine  $\alpha$ 3GalT determine that its bi-substrate reaction proceeds by a sequential mechanism (versus a ping-pong or double displacement mechanism) (44). This means that both donor and acceptor substrates bind to the enzyme before any product release. It is not totally clear however if the substrate binding is random or ordered and if ordered, if the donor substrate binds

アピン構造( $\beta$ 1)をとり長い $\alpha$ ヘリックス( $\alpha$ 2)に続く。中央の $\beta$ シートは2つの部分に分かれる。

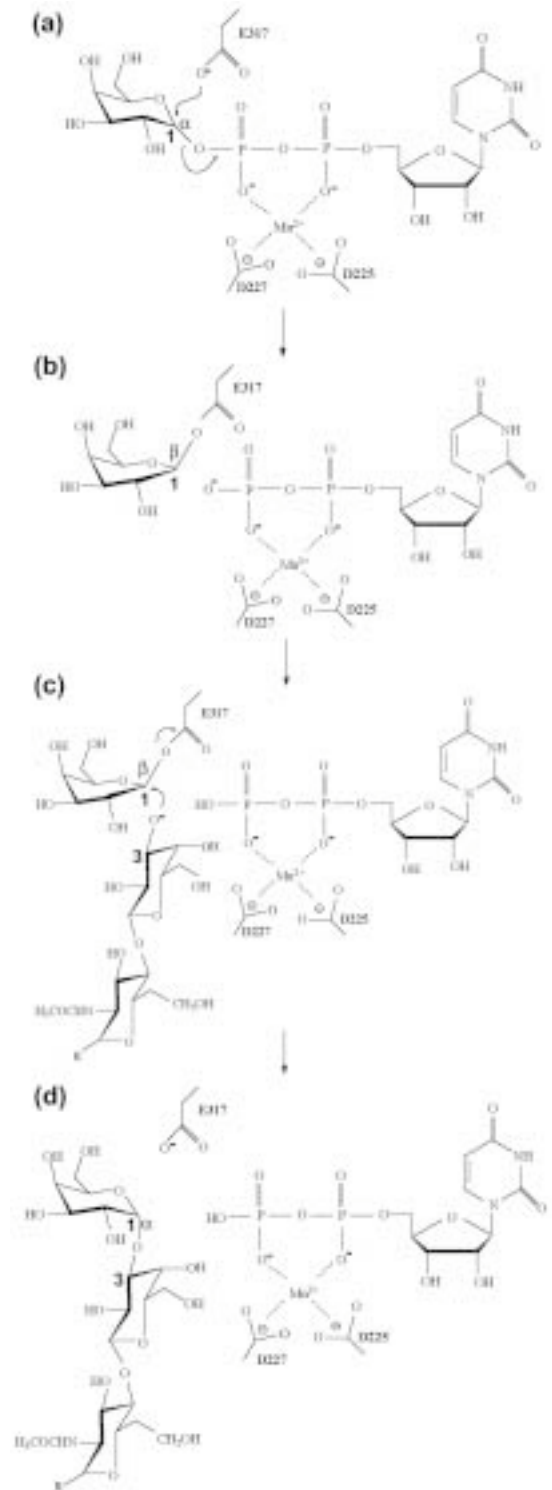
最初は Val129 から Met224 までの約 100 残基からなるN末サブドメインである。これには4本の平行 $\beta$ シート( $\beta$ 4,  $\beta$ 3,  $\beta$ 2,  $\beta$ 5)があり2本の長い $\alpha$ ヘリックス( $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4)で囲まれている。このN末サブドメインは糖ヌクレオチド供与体のヌクレオチド部分の結合部位である。第二は2本の平行 $\beta$ シート( $\beta$ 7,  $\beta$ 9)と、となりあう2本の逆平行 $\beta$ シート( $\beta$ 8,  $\beta$ 1)、そしてその片側の2本の長い $\alpha$ ヘリックス( $\alpha$ 5,  $\alpha$ 6)より構成される。このほかに中央の $\beta$ シートとほぼ平行に短い2本の逆平行 $\beta$ シート( $\beta$ 6,  $\beta$ 10)がある。

Hg-UDP-Gal は  $\beta$ 4GalT1の場合に比べてはるかに狭い隙間に結合している。UDP部分はN末サブドメインの酸性アミノ酸グループであるD225VD227( $\alpha$ 3GalTのDXDモチーフ)の2つのアスパラギン酸残基に結合している。これらのアミノ酸にはマンガンイオンの部分的に配位している。UDPの $\alpha$ 位および $\beta$ 位のリン酸基の負電荷によりマンガンイオンの完全な配位がおこる。ガラクトースは $\beta$ 8のH280, A281, A282によりつくられるポケットにおさまっている。

ABO式血液型抗原やある種の糖脂質の合成にかかわる糖転移酵素は配列の相同性からみるとウシ $\alpha$ 3GalTと同じ $\alpha$ 1,3ガラクトース転移酵素ファミリーに属する。ヒトA-GTとB-GTは $\alpha$ 1,2フコシル化グリカンにそれぞれN-アセチルグルコサミン、ガラクトースを転移する。興味深いことに両者の酵素は4つの場所を除いて厳密に配列が保存されている。そのうちの2つ、266(A-GTではLeu, B-GTではAla)は供与体の特異性を決定するのに重要であることが知られている。これに相当するウシ $\alpha$ 3GalTの位置はH280とA282であってガラクトースにきわめて近い $\beta$ 8に存在している。さらにD316は水素結合によりガラクトースと相互作用しており、すべての $\alpha$ 1,3糖転移酵素で厳密に保存されているE317は共役塩基であろうと予測されている。

## F-2. $\alpha$ 3GalTの立体配座保持による糖転移のメカニズム

近年の組み換え体 $\alpha$ 3GalTを用いた速度論的実験からこの酵素の2基質反応は連続機構で進行することが明らかになった(ピンポン機構や2置換機構ではなく)(44)。これは供与体とアクセプターは生成物が放出される前に酵素に結合するものである。



**Fig. 4. Schematic representation of the  $\alpha$ 3GalT retaining reaction mechanism.** The steps (a) and (b) are derived from the substrate-bound  $\alpha$ 3GalT structure. The acceptor substrate schematized in steps (c) and (d) is a lactosamine-type glycan (Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R).

first followed by the acceptor substrate or vice versa. Figure 4 schematizes the hypothetical  $\alpha$ 3GalT retaining reaction mechanism. Residue E317 positioned above the  $\beta$ -plane of the sugar donor substrate could play the role of the general base which could attack the C1 atom of the donor substrate galactose inverting (first inversion) its configuration (steps a and b). The acceptor substrate could then be positioned close to the  $\alpha$ -sugar

しかし基質とアクセプターの結合の順番がランダムなのか、決まっているのか、決まっていたらどちらが先なのかはわかっていない。図4は $\alpha$ 3GalTの反応機構の仮説を示している。E317は糖供与体の上に位置し、C1位置を攻撃して立体配座を反転させる(図4(a)(b))。次にアクセプターが3位の解離した酸

plane in order to present the O atom of its deprotonated 3-hydroxyl group at the correct distance, so as to attack the C1 donor sugar atom directly and invert once more its anomeric configuration (second inversion) (steps c and d). The exact mechanism responsible for deprotonation of the 3-hydroxyl group of the acceptor substrate sugar is not yet known. More insights into the reaction mechanism of  $\alpha$ 3GalT will be derived from site directed mutagenesis studies of identified key residues and from co-crystallisations or crystal soaking methods using acceptor substrate analogs.

### G. The Uridine Binding Domain (UBD) Common to Inverting and Retaining Glycosyltransferases

There are few X-ray crystal structures with their pdb (Protein Data Bank) coordinates actually available for the large number of nucleotide-hexose glycosyltransferases that are currently known: the  $\beta$ -glucosyltransferase from phage T4 (1bgt, 1bgu) (46), SpsA from *Bacillus subtilis* (1qgq) (47) and the bovine  $\beta$ 4GalT1 (1fgx, 1fr8) (9). Quite recently, the structures of three more inverting glycosyltransferases were reported:  $\beta$ 1,3GlcAT-1, the human glucuronyltransferase involved in GAG biosynthesis (1fgg) (48), the rabbit GnTI, a  $\beta$ 1,2 N-acetylglucosaminyltransferase (1fo8) (49) and the  $\beta$ 1,4 N-Acetylglucosaminyltransferase of *Escherichia coli* MurG involved in the peptidoglycan biosynthesis (1fok) (50). Finally, the structure of the first prokaryotic retaining  $\alpha$ 4galactosyltransferase LgtC from *Neisseria meningitidis* was reported (1g9r, 1ga8) (17) as well as the bovine  $\alpha$ 3GalT (1g8o, 1g93) (11).

Although no clear structural resemblance between all these glycosyltransferases has been observed and despite a low level of amino acid identity (less than 10%), their three-dimensional structures reveal a certain similarity in the spatial arrangement of those secondary structure elements that are involved in the binding of the UDP moiety. These similarities are particularly significant in the case of the N-terminal 100 amino acid portion of SpsA (residues Val4 to Tyr101), the N-terminal portion of human GlcAT-1 between residues Thr76 and Ser200 and that of GnT I between residues Ile110 and Leu217, the first 100 amino acids residues of LgtC (residues Asp2 to Arg109), the bovine  $\alpha$ 3GalT polypeptide between residues Val129 and Asn231 to a lesser extent the middle portion of the bovine  $\beta$ 4GalT1 (residues Lys181 to Pro257). The topology of the domain which binds to the nucleotide-sugar is quite well conserved with a general central 3, 2, 1, 4 parallel  $\beta$ -strand arrangement surrounded by a variable number of helices on both sides, reminiscent of the mononucleotide binding motif or Rossmann fold. The position of the short DXD sequence which stabilizes the manganese ion and thus indirectly binds the diphosphate moiety of UDP is equivalent in all structures. The D98D99 sequence of SpsA, the D194DD196 sequence of GlcAT-1, the E211DD213 sequence of GnT I, the D252VD254 sequence of  $\beta$ 4GalT1 and the

素原子を正しい位置に提示し、供与体の C1 位置を直接攻撃することにより C1 の立体配座は 2 回目の反転をする (図 4c,d)。3 位の解離の仕組みはわかっていない。さらに詳しい知見は共結晶またはソーキング方法によるアクセプターアナログとの複合体の解析と必須残基の点突然変異の研究から得られるであろう。

### G. 立体配座反転型、保持型糖転移酵素に共通するウリジン結合ドメイン

多くのヌクレオチドヘキソース糖転移酵素が現在知られているが、座標が PDB に公開されているものはほとんどない。公開されているものはファージ T4 の  $\beta$  グルコシルトランスフェラーゼ (1bgt, 1bgu) (46), 枯草菌の SpsA (1qgq) (47), ウシ  $\beta$ 4GalT1 (1fgx, 1fr8) (9) である。きわめて最近、さらに 3 つの反転型糖転移酵素が報告された。GAG 生合成にかかわる  $\beta$ 1,3GlcAT-1 (1fgg) (48), ウサギ GnT1 (1fc8) (49) そしてペプチドグリカン生合成にかかわる大腸菌 MurG  $\beta$ 1, 4N-アセチルグルコサミントランスフェラーゼ (1fok) (50) である。また *Neisseria meningitidis* の LgtC の構造が原核細胞の  $\alpha$ 4 ガラクトース転移酵素としては初めて報告された。ウシ  $\alpha$ 3GalT も報告された (1g8o, 1g93) (11)。

これらの糖転移酵素には構造上の類似性がなくアミノ酸の相同性も 10% 以下と低いが、UDP の結合にかかわる 2 次構造の空間的配置には類似した点がみられる。類似点が特にきわまっているのは SpsA の N 末 100 残基 (Val14-Tyr101), ヒト GlcAT-1 の N 末部分 (Thr76-Ser200), GnT1 の N 末部分 (Ile110-Leu217), LgtC のはじめの 100 残基 (Asp2-Arg109), ウシ  $\alpha$ 3GalT の Val129 から Asn231 であり、 $\beta$ 4GalT1 の中央部分 (Lys181-Pro257) にも若干の類似性がみられる。ヌクレオチド糖結合ドメインのトポロジーはきわめてよく保存されており中央の 3, 2, 1, 4 の平行  $\beta$  シートの配列の両側がヘリックスで囲まれている。これはロスマンフォールドのモノヌクレオチド結合モチーフに似ている。マンガンイオンを安定化し間接的には UDP の二リン酸部分に結合する DXD 配列の位置は全ての構造において等価な位置に存在する。SpsA の D98D99, GlcAT-1 の D194DD196, GnT1 の E211DD213,  $\beta$ 4GalT1 の D252VD254, LgtC の D103ID105 は全て  $\beta$ 4 と  $\beta$ 5 の間にある。 $\alpha$ 3GalT の場合に D225VD227 は  $\beta$ 4 と  $\beta$ 5 と

D103ID105 of LgtC are all located between strands  $\beta$ 4- $\beta$ 5, and the D225VD227 sequence of  $\alpha$ 3GalT between the equivalent  $\beta$ -strands  $\beta$ 5- $\beta$ 6. Taken together, these observations show that both the inverting glycosyltransferases and the retaining enzymes contain a UDP-binding domain of very similar spatial structure, in which key acidic amino acids occupy equivalent positions.

The sub-domain as identified above, including the DXD motif, was termed UDP Binding Domain (UBD) (11). In glycosyltransferases it encompasses virtually all those residues that bind  $Mn^{2+}$  and the UDP portion of the donor substrate. Moreover, residues found interacting with the UDP moiety of the donor substrate are located in approximately the same structural secondary elements in all structures studied. These residues are located at the end of  $\beta$ -strands  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2, in the middle of the  $\alpha$ -helix  $\alpha$ 3 and in the DXD motif between  $\beta$ -strands  $\beta$ 4 and  $\beta$ 5 from the canonical UBD structure (11). The UBD may be an example of convergent evolution, or may point to a common ancestral origin, even though sequence identity between the enzymes is lower than 10%. Alternatively, the glycosyltransferases may be the product of gene fusion involving an ancestral UDP-binding protein. An analysis of intron-exon organization of the different glycosyltransferase genes demonstrates that the portion of the gene encoding the UBD has not been conserved as a single exon, which may argue against exon-shuffling. The UDP-binding module (UBD) seems common to all glycosyltransferases that use a UDP-sugar as donor substrate and should facilitate the identification of additional glycosyltransferases present in the various genomic data banks.

The UBD shared by numerous glycosyltransferases reminds us to some extent of the nucleotide binding domain common to other nucleotide binding proteins, particularly those with an NAD-binding domain (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) found in NAD-dependent dehydrogenases, such as LDH, GAPDH and LADH. In those enzymes, despite the absence of amino acid sequence homology, all NAD binding domains have similar three-dimensional structures with a central  $\beta$ -sheet of six parallel  $\beta$ -strands with  $\alpha$ -helices on both sides (51).

等価な  $\beta$ 5 $\beta$ 6の間にある。これらのことから反転型酵素においても保持型酵素においてもUDP結合ドメインの高次構造はきわめて類似しており、結合に必須なアミノ酸は相当する位置に存在しているといえる。

DXDを含むサブドメインはUDP結合ドメイン(UBD)とよばれる(11)。糖転移酵素のUBDはマンガンイオンとUDPを結合するアミノ酸を全て含んでいる。さらに、UDPとの相互作用が知られている残基はほぼ同じ2次構造上の位置に存在する。これらの残基はUBD構造の中の  $\beta$ 1 $\beta$ 2の端、 $\alpha$ 3の中央、 $\beta$ 4 $\beta$ 5の間(DXDモチーフ)にある。配列上の相同性は10%以下ではあるが、UBDは進化上保存されてきたか、もしくは共通の先祖をもつものかもしれない。あるいは祖先となるUDP結合タンパク質が遺伝子融合を繰り返して糖転移酵素ができたものかもしれない。しかしイントロン-エキソン編成の解析ではUBDはひとつのエキソンとして保存されてきたのではないと推論される。これは糖転移酵素がエキソンのシャッフルで派生したという説を支持しない。UBDはUDP-糖を供与体とする全ての糖転移酵素に共通するものであると考えられるので、ゲノムデータバンクにおいて糖転移酵素を同定するのに役立つ。

UBDは他のヌクレオチド結合タンパク質のヌクレオチド結合ドメイン、とりわけNAD結合ドメイン(LDH, GAPDH, LADH)のようなNAD依存性デヒドロゲナーゼに似ている。これらのデヒドロゲナーゼではアミノ酸配列の相同性はないがNAD結合部位の3次構造は互いに類似しており、中央の6本の平行 $\beta$ シートが両側の $\alpha$ ヘリックスにはさまれている(51)。

東京医科歯科大学  
横山 三紀訳

## References

1. Gagneux, P., and Varki, A. (1999) *Glycobiology* **9**, 747-755
2. Dennis, J.W., Granovsky, M., and Warren, C.E (1999) *Bioessays* **21**, 412-421
3. Mengeling, B.J and Turco, S.J (1998) *Curr. Opin. Struct. Biol* **8**, 572-577
4. Carbohydrate-Active Enzymes Server on World Wide Web URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/db.html>
5. Campbell, J.A., Davies, G.J., Bulone, V., and Henrissat, B (1998) *Biochem. J.* **329**, 719-723
6. Unligil, U.M., and Rini, J.M (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol* **10**, 510-517
7. Davies, G.J., Sinnott, M.T., and Withers, S.G. (1998) *Comprehensive Biological Catalysis: A Mechanistic Reference*, vol **1**, edited by Sinnott, M.L., San Diego, Academic Press, 119-209
8. Wiggins, C.A.R., and Munro, S. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7945-7950
9. Gastinel, L.N. Cambillau, C., and Bourne, Y. (1999) *EMBO J.* **18**, 3546-3557
10. Paulson, J.C., and Colley, K.J. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 17615-17617
11. Gastinel, L.N., Bignon, C., Misra, A.K., Hindsgaul, O., Shaper, J.H., and Joziase, D.H (2001) *EMBO J.* **20**, 638-649
12. Knirel, Y.A., Kocharova, N.A., Hynes, S.O., Widmalm, G., Andersen, L.P., Jansson, P-E., and Moran, A.P. (1999) *Eur. J. Biochem.* **266**, 123-131
13. Kolkman, M.A.B., van der Zeijst, B.A.M., and Nuijten, P.J.M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 19502-19508

14. Kolkman, M.A.B., Wakarchuk, W.W., Nuijten, P.J.M., and van der Zeijst, B.A.M. (1997) *Mol. Microbiol.* **26**, 197–208
15. Lougheed, B., Ly, H.D., Wakarchuk, W.W., and Withers, S.G. (2000) *J. Biol. Chem.* **274**, 37717–37722
16. Wakarchuk, W.W., Martin, A., Jennings, M.P., Moxon, E.R., and Richards, J.C. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 19166–19173
17. 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
18. Davies, G.J. (2001) *Nat. Struct. Biol.* **8**, 98–100
19. Li, Y., Baldauf, S., Lim, E.K and Bowles, D.J (2000) *J. Biol. Chem* **276**, 4338–4343
20. Miller, K.D., Guyon, V., Evans, J.N.S., Shuttleworth, W.A., and Taylor, L.P. (1999) *J. Biol. Chem* **274**, 34011–34019
21. Tukey, R.H., and Strassburg, C.P (2000) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 581–616
22. Amado, M., Almeida, R., Schwientek, T., and Clausen, H. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1473**, 35–53
23. Shaper, N.L., Meurer, J.A., Joziassse, D.H., Chou, T-D.D., Smith, E.J., Schnaar, R.L., and Shaper, J.H (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 31389–31399
24. Brodbeck, U., Denton, W.L., Tanahashi, N., and Ebner, K.E. (1967) *J. Biol. Chem* **242**, 1391–1397
25. Udagawa, Y., Aoki, D., Ito, K., Uejima, T., Uemura, M., and Nozawa, S. (1998) *Eur. J. Cancer* **34**, 489–495
26. Delves, P.J. (1998) *Autoimmunity* **27**, 239–253
27. Okajima, T., Fukumoto, S., Furukawa, K., and Urano, T (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 28841–28844
28. Almeida, R., Levery, S.B., Mandel, U., Kresse, H., Schwientek, T., Bennett, E.P., and Clausen, H (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 26165–26171
29. Quentin, E., Gladen, A., Roden, L., and Kresse, H (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1342–1346
30. Amado, M., Almeida, R., Carneirao, F., Levery, S.B., Holmes, E.H., Nomoto, M., Hollingsworth, M.A., Hassan, H., Schwientek, T., Nielsen, P.A., Bennett, E.P., and Clausen, H. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 12770–12778
31. Blanken, W.M., and Van den Eijnden, D.H. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 12927–12934
32. Galili, U., Shohet, S.B., Kobrin, E., Stults, C.L., and Macher, B.A. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 17755–17762
33. Joziassse, D.H (1992) *Glycobiology* **2**, 271–277
34. Yamamoto, F., MacNeill, P.D., and Hakomori, S. (1995) *Glycobiology* **5**, 51–58
35. Xu, H., Storch, T., Yu, M., Elliott, S.P., and Hasslam, D.B. (1999) *J Biol Chem* **274**, 29390–29398
36. Galili, U., and Masahiro, T. (1999) *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **11**, 317–327
37. Galili, U., Thall, A., and Macher, B.A. (1990) *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **2**, 303–318
38. Marcus, D.M., Kundu, S.K., and Suzuki, A. (1981) *Semin. Hematol.* **18**, 63–71
39. Yang, Z., Bergstrom, J., and Karlsson, K.A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 14620–14624
40. Lomberg, H., and Eden, C.S. (1989) *FEMS Microbiol. Immunol.* **1**, 363–370
41. Steffensen, R., Carlier, K., Wiels, J., Levery, S.B., Stroud, M., Cedergren, B., Nilsson Sojka, B., Bennett, E.P., Jersild, C., and Clausen, H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 16723–16729
42. Nakayama, J., Yeh, J.C., Misra, A.K., Ito, S., Katsuyama, T., and Fukuda, M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8991–8996
43. Hatanaka, Y., Ishiguro, M., Hashimoto, M., Gastinel, L.N., and Nagakomi, K (2001) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 411–413
44. Seto, N.O., Compston, A., Evans, S.V., Bundle, D.R., Narang, S.A., and Palcic, M.M. (1999) *Eur. J. Biochem.* **259**, 770–775
45. Zhang, Y., Wang, P.G and Brew, K (2000) *J. Biol. Chem.* (in press)
46. Vrieland, A., Ruder, W., Dreissen, H.P.C., and Freemont, P.S. (1994) *EMBO J.* **13**, 3413–3422
47. Charnock, S.J., and Davies, G.J. (1999) *Biochemistry* **38**, 6380–6385
48. Pedersen, L.C., Tsuchida, K., Kitagawa, H., Sugahara, K., Darden, T.A., and Negishi, M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 34580–34585
49. Unligil, U.M., Zhou, S., Yuwaraj, S., Sarkar, M., Schachter, H., and Rini, J.M. (2000) *EMBO J.* **19**, 5269–5280
50. Sha, A., Walker, D., Shi, Y., and Walker, S. (2000) *Proteine Science* **9**, 1045–1052
51. Rossman, M.G., Moras, D., and Olsen, K.W. (1974) *Nature* **250**, 194–199

Received on March 9, 2001, accepted on March 28, 2001

#### Profile of the Author



#### Louis Gastinel

Scholar from Ecole Normale Supérieure (ENS, Paris) from 1978 to 1982, Louis Gastinel received his Ph.D. degree in Immunology under the direction of Professor Jean-François Bach at the University of Jussieu (Paris 7) in Paris, France, in 1986. He joined the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) in 1983 with a permanent research position. He worked as a post-doctor during two years under the direction of Dr Charles Auffray in the Embryology Institute of Nogent sur Marnes (Institute Director: N. Le Douarin) where he became familiar with protein structure science. In 1990, he moved as a post-doctor and HHMI research fellow to the California Institute of Technology, Pasadena, USA, where he performed crystallographic studies under the direction of Professor Pamela J. Bjorkman. In 1993, he moved to La Jolla to work for two years on an immunosuppression project, in a rationale drug design company, Agouron Pharmaceutical Inc. In 1995, he returned to France as a CNRS senior researcher (CR1) and joined the AFMB laboratory (Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques) in Marseille, France, headed by Dr C. Cambillau. Since his return, he has been in Structural Glycobiology particularly in glycosyltransferase structures. He succeeded here in solving the first crystal structure of a mammalian glycosyltransferase, the bovine  $\beta$ 4GalT1 and is currently involved in structural studies of other glycosyltransferases of medical interest.