

Crystal Structure-Based Analysis of Human Glucuronyltransferase 1

ヒトGlcAT-IのX線結晶構造

Pedersen, Lars C., Darden ; Thomas A. ; Kakuta, Yoshimitsu*; and Negishi, Masahiko

National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health,
Research Triangle Park, North Carolina USA

FAX: 1-919-541-0696, E-mail: negishi@niehs.nih.gov

*Department of Biology, Graduate School of Science, Osaka University, Toyonaka, Japan

Key Words : *glucuronyltransferase I, heparan/chondroitin biosynthesis, X-ray crystallography, substrate specificity, catalytic mechanism*

Abstract

Glucuronyltransferase I (GlcAT-I) is a key enzyme in heparan/chondroitin biosynthesis (1). The X-ray crystal structure of human GlcAT-1 has been solved in the presence of both UDP and substrate analog. The structure reveals a two sub-domain structure known as the SGC domain. Donor substrate-binding site resides in the N-terminal sub-domain, while acceptor substrate-binding site is located in the C-terminal sub-domain. In addition to conserved residues responsible for the donor binding, various residues that interact with the acceptor molecule have now been identified. The GlcAT-1 provides the structural basis for understanding the structure and function of glycosyltransferases.

要約

GlcAT-Iはヘパラン硫酸/コンドロイチン硫酸合成の鍵となる酵素です(1)。ヒトGlcAT-IのX線結晶構造がUDPと基質類似物の両方を結合した形で決定されています。GlcAT-Iの立体構造は、2つのサブドメインから成るSGCドメインとして知られている構造をとっていました。N末サブドメインが補酵素結合に関与し、C末サブドメインは基質結合に関与します。この酵素ファミリーに広く保存されている側鎖によって、補酵素認識が行われていることが明らかになったことに加えて、基質認識を行っているアミノ酸側鎖も決められました。又、GlcAT-Iの結晶構造は、グリコシルトランスフェラーゼファミリーの機能理解の構造的基盤を我々に与えてくれました。

A. Introduction

The notion that carbohydrates attached to proteins are probably just for stability and that modifications such as sulfation occurs at random could not be further from the truth. As we learn more about proteoglycans bearing heparan and chondroitin sulfates we discover that the structures of the sugars confer specificity to biological signal molecules that regulate cell growth, cell differentiation, blood coagulation, and viral and bacterial infections. The important roles that heparan sulfates play in developmental processes are starting to become clearer. Mice deficient in N-deacetylase/N-sulfotransferase-1 die in the neonatal state from a condition similar to respiratory distress (2). Disruption of N-deacetylase/N-sulfotransferase-2 in mouse causes a severe mast cell defect due to lack of heparin in the secretory granules (3, 4). Disruption of the 2-O-sulfotransferase in mouse results in death in the neonatal period with bilateral renal agenesis and defects of the eye and skull have also been observed (5). Hereditary multiple exostoses, a dominantly inherited genetic disorder characterized by the formation of cartilage-capped tumors or exostoses, have been linked to genes encoding for heparan polymerases, EXT1, EXT2, and sometimes EXT3 (6).

Proteoglycans such as heparan and chondroitin sulfates

A. はじめに

タンパク質に共有結合している糖鎖は、これまでは単にタンパク質を安定化し、その糖鎖に含まれる硫酸基はランダムに配置されていると一般的に考えられてきましたが、実際はかなり違っています。ヘパラン硫酸およびコンドロイチン硫酸を結合したプロテオグリカンの研究が進むにつれて、糖の構造および硫酸基の配置が、細胞成長、細胞の分化、血液凝固、ウイルスまたバクテリアの感染などにおいて、その特異性に関与していることがわかってきました。さらに、生物の発生過程におけるヘパラン硫酸の重要な役割が明らかになってきています。Nデアセチラーゼ/Nスルホトランスフェラーゼ-1遺伝子欠損マウスは、新生児呼吸障害症候群と似た病状で、誕生直後に死にいたりします(2)。Nデアセチラーゼ/Nスルホトランスフェラーゼ-2遺伝子の欠損の場合には、硫酸化されたヘパリンの不足の為、深刻な肥満細胞欠陥を引き起こします(3, 4)。又、ヘパラン硫酸2-O-スルホトランスフェラーゼ遺伝子欠損マウスの場合には、腎臓、眼、骨格の形成不全が見られ、死産か、出生直後に死に至ります(5)。さらに、ヘパラン硫酸ポリマーゼEXT1、EXT2、EXT3は、遺伝性多発性外骨腫の原因遺伝子と考えられています(6)。

ヘパラン硫酸プロテオグリカンおよびコンドロイチン硫酸

are produced by the attachment of glycosaminoglycans at specific serine residues on protein surfaces. Initially, glycosaminoglycans consist of long linear polysaccharides containing disaccharide repeats of approximately 20 to 100 repeats in length. The repeating unit for heparan is $(\alpha(1,4)\text{GlcUA}-\beta(1,4)\text{GlcNAc})_n$, while that of chondroitin is $(\beta(1,4)\text{GlcUA}-\beta(1,3)\text{GalNAc})_n$. Both the glycosaminoglycan chains are attached to the protein via the same linker region, $\text{GlcUA}-\beta(1,3)\text{Gal}-\beta(1,3)\text{Gal}-\beta(1,4)\text{Xyl}-\beta(1-O)\text{-Ser}$.

To provide the structural basis for understanding glycosaminoglycan-synthesizing enzymes, X-ray crystallography is being employed. To date, two crystal structures have been solved for enzymes in the heparan sulfate biosynthesis cascade: sulfotransferase domain (NST-1) of *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase-1 and the catalytic domain of $\beta(1,3)$ glucuronyltransferase I (GlcAT I) (7, 8). From these structures we hope to gain precise details about how these enzymes recognize their specific cofactors and substrates, as well as to understand the catalytic mechanism by which these reactions are carried out.

This review focuses on the structure of GlcAT I, since the structure is solved in the presence of both the donor and acceptor substrates and provides a complete picture how this enzyme might function. GlcAT I catalyzes the attachment of a GlcUA molecule to the linker region $\text{Gal}-\beta(1,3)\text{Gal}-\beta(1,4)\text{Xyl}-\beta(1-O)\text{-Ser}$ of the proteoglycan to complete the common linker $\text{GlcUA}-\beta(1,3)\text{Gal}-\beta(1,3)\text{Gal}-\beta(1,4)\text{Xyl}-\beta(1-O)\text{-Ser}$ for both heparan and chondroitin. The structure of this enzyme has been solved in the presence of both the co-factor product UDP/Mn^{2+} and a substrate analogue $\text{Gal}-\beta(1,3)\text{Gal}-\beta(1,4)\text{Xyl}$. From this structure the details of how the DXD motif (a common NDP-sugar dependent binding motif), interacts with co-factors such as UDP-GlcUA/Mn^{2+} have been determined. Residues involved in determining substrate specificity have been suggested. Perhaps most importantly the mechanism for GlcAT I, an inverting glycosyltransferase has been proposed.

B. Overall Fold

The overall fold of the catalytic domain (T76-V335) of GlcAT-I can be divided into two sub-domains, the N-terminal cofactor binding domain and the C-terminal substrate-binding domain (Fig. 1). The active site is located in a cleft that extends across both sub-domains. The N-terminal sub-domain is comprised of residues T76-N197 that contains β -strands 1 thru 4 and α -helices 1 thru 3. These elements constitute an a/b domain in which $\beta(1-4)$ form a parallel b-sheet with α -helices on both sides in a configuration reminiscent of a Rossmann fold. Residues N197-V335 constitutes the C-terminal sub-domain primarily comprised of β -strands. Among these strands, the strands 5, 11, 6, and 7 form a mixed b sheet and the β strands 9, 6 and 10 form a continuous b sheet with b strands 1-4. Strand 9

プロテオグリカンは、タンパク表面にある特定のセリン残基とグルコサミノグリカンが共有結合したものです。グルコサミノグリカンは、二糖単位が約20~100回繰り返された長い直鎖状の多糖類から構成されます。ヘパラン硫酸の繰り返し二糖単位は、 $(\beta(1,4)\text{GlcUA}-\beta(1,4)\text{GlcNAc})_n$ で、コンドロイチン硫酸では、 $(\beta(1,4)\text{GlcUA}-\beta(1,3)\text{GalNAc})_n$ になっています。ヘパラン硫酸とコンドロイチン硫酸共に、四糖構造 ($\text{GlcUA}-\beta(1,3)\text{Gal}-\beta(1,3)\text{Gal}-\beta(1,4)\text{Xyl}-\beta(1-O)\text{-Ser}$)のリンカー領域でタンパク質に共有結合しています。

生体内において重要な機能を担っているこれらの酵素の反応メカニズムと基質特異性をよりよく理解する為に、X線結晶構造解析がおこなわれています。今までのところ、ヘパラン硫酸生成過程にかかわる二つの酵素(*N*デアセチラーゼ/*N*スルホトランスフェラーゼ-1のスルホトランスフェラーゼドメイン(NST-1)と3グルクロン酸転移酵素-Iの活性ドメイン(GlcAT-I))の結晶構造が決定されています(7,8)。これらの立体構造は、これらの酵素がどのように補酵素と基質を認識し、どのようなメカニズムで酵素反応を行っているのかについての、詳細な情報を我々に与えてくれます。

補酵素と基質の両方を結合した構造が得られていることから、この総説はGlcAT-Iの話に絞ることにします。この酵素は、プロテオグリカンのリンカー部位の $\text{Gal}-\beta(1,3)\text{Gal}-\beta(1,4)\text{Xyl}-\beta(1-O)\text{-Ser}$ にGlcUAを結合させることで、ヘパラン硫酸とコンドロイチン硫酸の両方に共通のリンカー構造 $\text{GlcUA}-\beta(1,3)\text{Gal}-\beta(1,3)\text{Gal}-\beta(1,4)\text{Xyl}-\beta(1-O)\text{-Ser}$ を作ります。この酵素の立体構造は、補酵素産物 UDP/Mn^{2+} と基質アナログ $\text{Gal}-\beta(1,3)\text{Gal}-\beta(1,4)\text{Xyl}$ との複合体として解かれています。この構造から、基質特異性を決定しているアミノ酸側鎖と酵素反応メカニズムの両方が提案されています。

B.全体構造

GlcAT-Iの活性ドメイン(Thr 76-Val 335)の全体構造は、2つのサブドメインからなり、N末サブドメインが補酵素結合、C末サブドメインが基質結合を担っていると考えられます(図1)。活性部位は両サブドメイン間にあり、N末サブドメイン(Thr 76~Asn 197)は、1, 2, 3, 4による平行シート の両側にヘリックス1, 2, 3を伴った構成をしており、Rossmannフォールドと呼ばれる構造をとっています。C末サブドメイン(Asn 197~Val335)の6(N末側半分), 9, 10は、N末サブドメインと一緒にシートを形成し、残りの5, 6(C末側半分), 7, 8, 11は別のシートを形成しています。多くのNDP糖-グルコシルト

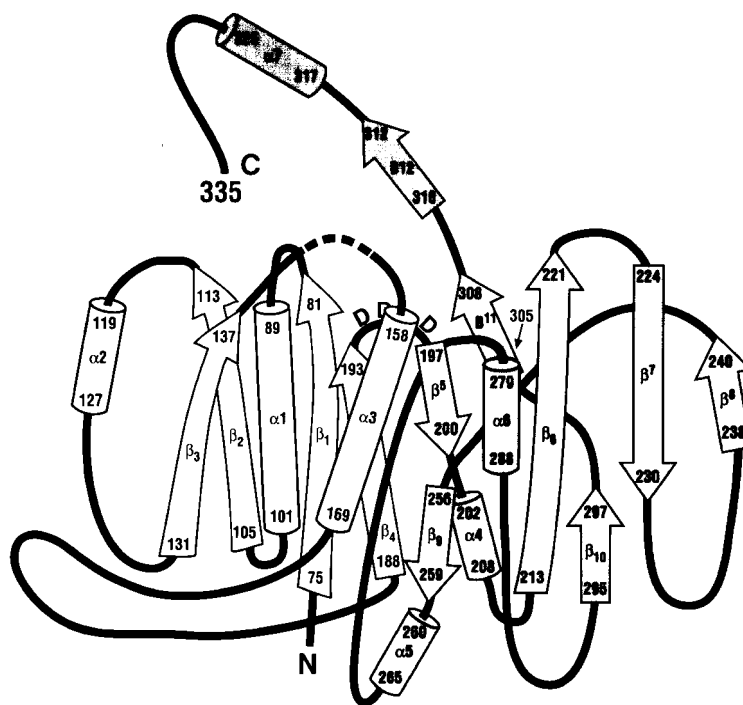


Fig. 1. Secondary structure diagram of the catalytic domain of GlcAT-1. Residues representing the donor and acceptor binding sub-domains are pictured in yellow and blue, respectively. The DXD binding motif is located at the junction of these two sub-domains. Together these sub-domains comprise the SGC domain found in many other glycosyltransferases.

is anti-parallel to the other strands. The conserved DXD motif is found on the random coil between b4 and b5, which connects the two sub-domains.

The overall topology of this enzyme is similar to that of domains in other inverting glycosyltransferases. Residues 2-217 of SpsA from *Bacillus subtilis*, and residues 106-317 of $\beta(1,2)$ -N-acetylglucosaminyltransferase I (GnT I) from rabbit share near identical secondary structural features with residues 76-308 of GlcAT-I (9, 10). This domain has been named the SGC domain. Similar versions of this domain can also be found in the structures of the bovine $\beta(1,4)$ galactosyltransferase I and of *Escherichia coli* N-acetylglucosaminyltransferase (MurG), suggesting broad use of this domain by enzymes in the glycosyltransferase superfamily (9, 11, 12).

From the crystal structure, it appears that GlcAT I may function as a homodimer. The asymmetric unit found in the crystal structure contains two molecules with 4000 \AA^2 of buried surface area between them. These two molecules are related by a non-crystallographic two-fold axis. The orientation of these molecules with respect to one another places both active sites on the same side of the dimer and both N-termini on the opposite site (Fig. 2). The GlcAT-I is a type II membrane protein with the N-terminus extending across the membrane. Thus the

ランスフェラーゼに見られるDXDモチーフは、4と5の間で二つのサブドメインをつなぐ部分に存在します。

GlcAT-Iの立体構造は、他の異性化グルコシルトランスフェラーゼと似ています。GlcAT-I(76-308番)の立体構造は、*Bacillus subtilis* 由来NDPグルコシルトランスフェラーゼであるSpsA(2~217番)と、ウサギ由来NDPグルコシルトランスフェラーゼである(1,2)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼGnTI(106~317番)とほとんど同じ立体構造をしています(9,10)。このドメインは、SGCドメインと呼ばれています。このSGCドメインと似た構造は、グルコシルトランスフェラーゼスーパーファミリーにおいて、牛由来ガラクトシルトランスフェラーゼIと大腸菌由来NアセチルグルコサミニルトランスフェラーゼMurGにも見られます(9, 11, 12)。

結晶構造から、GlcAT-Iはホモダイマーとして機能していると考えられます。この結晶の非対称単位中には、2回軸で関係づけられる2分子のモノマーが存在しており、この2分子がお互いに接している面積は 4000 \AA^2 にもなります。モノマー内で活性部位とN末端部分は分子の反対側にあり、ダイマーとしては、その方向は揃っています(図2)。GlcAT-Iの全長は、N末で膜を貫

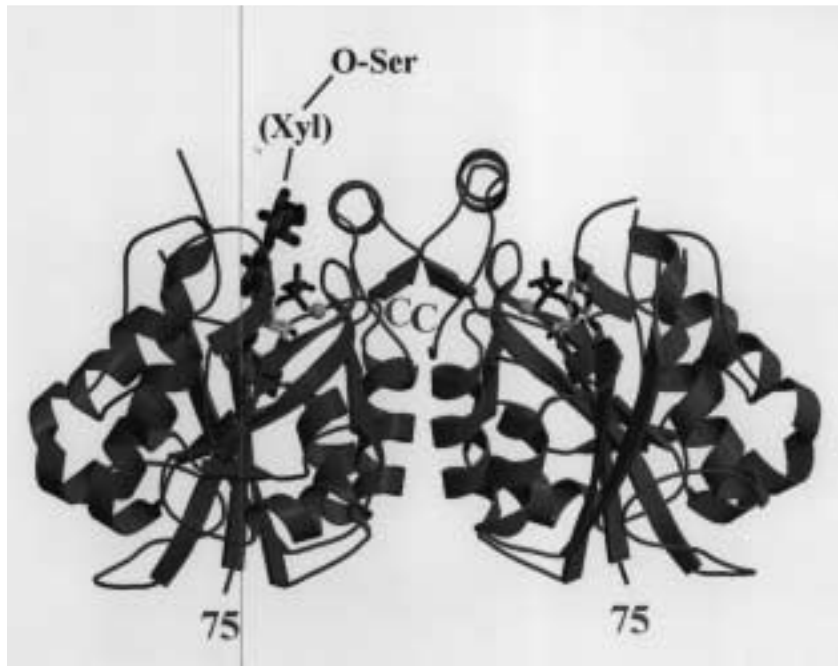


Fig. 2. Cartoon diagram of the proposed GlcAT-1 dimer. One monomer is colored orange and the other green. The UDP molecule is shown with yellow carbon atoms, while carbon atoms for the Xyl-Gal-Gal trisaccharide found in one monomer are colored forest green. The Mn^{2+} ions associated with the UDP molecules are colored chartreuse. A vertical two-fold axis in the plane of the paper exists between the two GlcAT-1 monomers.

proposed homodimer from the crystal structure could have both N-termini bound to the Golgi membrane with both active sites exposed into the Golgi lumen for binding of the substrates.

C. UDP-sugar binding site

The UDP binds in a cleft at the top of the N-terminal sub-domain. The positioning of the uracil ring is determined by the interactions with D113 and Y84 (Fig. 3). An oxygen atom from the carboxylate group of D113 forms a hydrogen bond with the secondary amine of the uracil ring. The phenol ring of Y84 is located 3.5 Å away from the uracil ring in a parallel ring-stacking interaction. Residues from the DXD motif (D194, D195, and D196) form interactions with both the ribose ring and the catalytically required Mn^{2+} ion. D195 forms two interactions with the ribose ring. A carboxylate oxygen forms a hydrogen bond with the hydroxyl at the C2 position of the ribose while the backbone amide is within hydrogen bonding distance to the hydroxyl at the C3 position. This hydroxyl also is found within hydrogen bonding distance to the carbonyl oxygen of P82. Only two residues are within hydrogen bonding distance to the phosphate groups. Guanidinium groups of both R156 and R310 are in position to interact with the b phosphate moiety.

The Mn^{2+} ion is found bound with octahedral geometry.

通するタイプ II 型の膜タンパク質なので、ダイマーのまま、両 N 末とも膜に結合し、巨大なプロテオグリカン基質と結合するのに適した構造をしていると言えます。

C. UDP結合部位

UDPは Mn^{2+} をリン酸基に配位した形で、GlcAT-IのN末側サブドメイン上部の溝に結合しています。UDPのウラシルリングの位置は、Asp113-ウラシルリング間の水素結合と、Tyr84-ウラシルリング間の平行スタッキング相互作用により決められていると考えられます(図3)。UDPのリボースリングは、DXDモチーフ(Asp194, Asp195, Asp196)のAsp195が、リボースリングのC2位水酸基と水素結合する一方で、主鎖アミド基がC3位水酸基と水素結合しています。UDPのリン酸基については、Arg156-リン酸間とArg310-リン酸間の二つの水素結合が存在しています。

Mn^{2+} は、オクタヘドラルジオメトリーをとってGlcAT-Iと結合しています。DXDモチーフのAsp196側鎖から二つ、水分子二つ、それとリン酸基の合計6つの酸素原子との相互作用

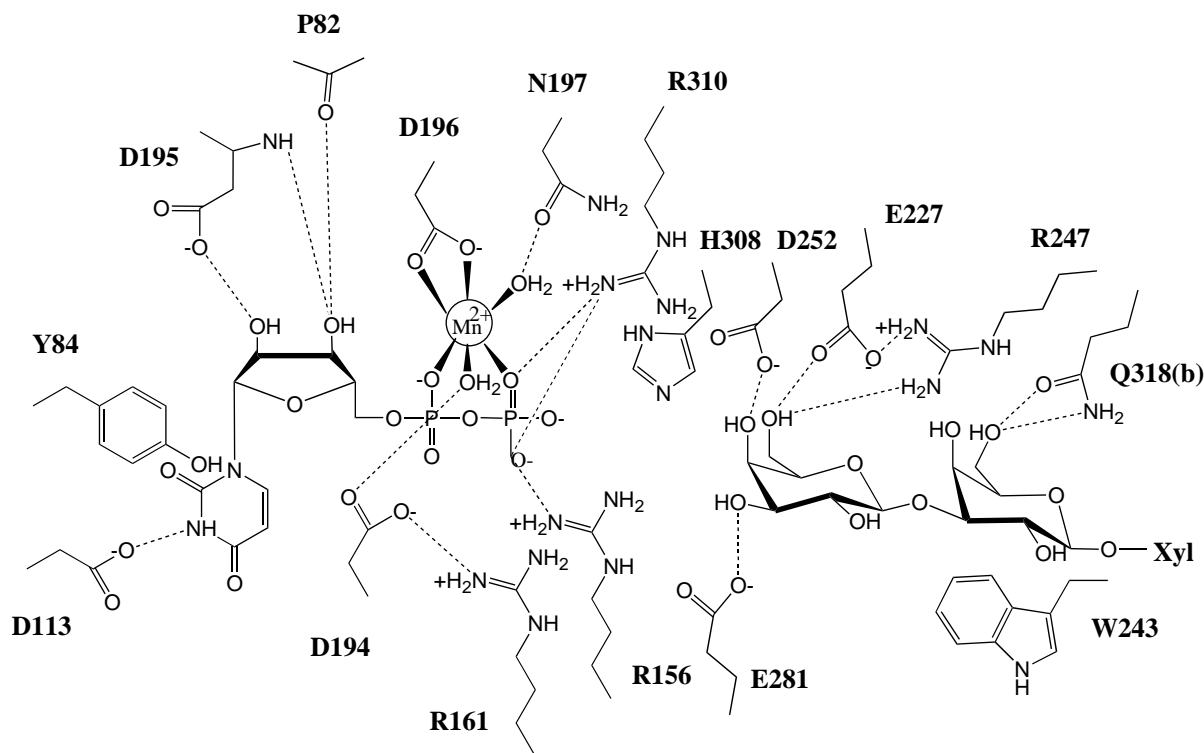


Fig. 3. Two-dimensional diagram of the active site region of GlcAT-1. The picture shows residues that form hydrogen bonding interactions or dictate binding of the UDP or Gal-Gal-Xyl molecules. The UDP/Mn²⁺ are pictured in the right half of the diagram with the Gal-Gal-Xyl on the left half. Residue Q318 (b) is from the other monomer in the proposed dimer. Possible hydrogen bonds are represented with dashed lines.

The six inner sphere interactions are from the two carboxylate oxygen atoms of D196 within the DXD motif, two water molecules, and oxygen atoms from both the a and b phosphates. The water molecules are further coordinated through interactions with D194 for one, and N197 and T309 for the other. It is interesting to note that this coordination differs slightly from that of SpsA and GlnT I. The inner sphere of the Mn²⁺ ion for these enzymes involves one interaction with the equivalent residue to D196, two interactions with the phosphates, and three water molecules.

D. Acceptor substrate-binding site

The crystal structure of human GlcAT I is the first NDP-sugar dependent glycosyltransferase to be solved with an acceptor substrate analog. The substrate analog Gal-β(1,3)Gal-β(1,4)Xyl binds in the C-terminal sub-domain portion of the large cleft running across the top of the molecule. The trisaccharide chain is placed almost perpendicular to the UDP molecule with the acceptor Gal (Gal2) buried deep in the pocket and Gal1 near the surface. The binding orientation of the trisaccharide is dictated mainly through interactions with the Gal2

が形成されています。水分子の一つはAsp194と水素結合しており、もう一方の水分子は、Asn197とThr309に水素結合しています。この配位の様子が、SpsAとGlnTIで微妙に異なっているのは興味深いところです。これら二つの酵素では、GlcAT-IのAsp196に対応する側鎖から一つ、水分子三つ、リン酸基から二つの合計6つの酸素原子がMn²⁺に配位しています。

D. 基質結合部位

GlcAT-Iの結晶構造は、基質アナログが結合した形で解かれた初めてのNDPグルコシルトランスフェラーゼです。基質アナログGal- (1,3)Gal- (1,4)Xylは、C末側サブドメインの上部を横断している大きな溝部分に結合しています。この分子は、UDP分子とほとんど垂直に位置しており、Gal2はポケット内深く、Gal1は表面付近に結合しています。Gal2のC3位水酸基は

moiety. The acceptor hydroxyl at the C3 position of Gal2 binds in a position 5.1 Å from an oxygen atom of the b phosphate, which is likely bound to the GlcUA moiety when the complete donor UDP-GlcUA molecule is present in the active site. Conserved residues E227, D252, and E281 all form specific interactions with hydroxyls of the Gal2 moiety. Side-chain atoms from residues E227 and R247 form hydrogen bond interactions with the C6 hydroxyl of the Gal2 moiety. E281 forms a hydrogen bond with the acceptor hydroxyl at the C3 position, while D252 forms a hydrogen bond with the C4 hydroxyl. The location of E281 combined with its conserved nature, indicate that this residue may be a general base in the catalysis.

Interestingly, the only possible hydrogen bond to the Gal1 moiety comes from Q318 of the second monomer in the asymmetric unit. Both the oxygen and nitrogen of the amide group are within hydrogen bonding distance to the C6 hydroxyl of the Gal1 moiety. It is unclear if this is a physiologically relevant interaction, but if it is, it supports the need for dimerization because both monomers would contribute to substrate binding in both active sites. In addition to this interaction, the plane of the side-chain of W243 is parallel to the ring of Gal1 possibly limiting its degrees of freedom through steric interactions. There is no electron density present for the Xyl moiety of the chain. The location of the C1 hydroxyl of Gal1 is at the surface of the GlcAT I suggesting the Xyl moiety may act as a spacer between the large proteoglycan substrate and GlcAT I and therefore forms no specific interactions with the enzyme.

E. Catalytic Mechanism

GlcAT I is an inverting glycosyltransferase. This means that the bridging oxygen, between UDP and GlcUA in UDP-GlcUA, which is in the a configuration, is replaced by a bridging oxygen between GlcUA and the substrate with an oxygen atom in the b configuration. The most likely mechanism for such a reaction would involve attack at the C1 position of GlcUA by the substrate from the opposite side of the leaving group UDP. This would create a stereochemical change at the C1 position. It is believed that such a reaction would involve an oxocarbenium ion like transition state during the catalysis.

The structure of GlcAT I in the presence of UDP and Gal-β(1,3)Gal-β(1,4)Xyl supports the proposed mechanism for inverting glycosyltransferase. The acceptor hydroxyl at the C3 position of Gal2 is located 5.1 Å from the departing bridging oxygen of the UDP-GlcUA molecule. E281 is in position to act as a catalytic base by deprotonating the acceptor hydroxyl, increasing its nucleophilic character. GnT I and SpsA have an aspartic acid (D291 and D191, respectively) at the same position in the structures as E281 supporting the role of these residues as catalytic bases. The Mn²⁺ is believed to help neutralize the negative charge built up on the leaving UDP molecule. Residues R156 and R310 that interact with the phosphates of UDP

リン酸の酸素から5.1 Åであり、実際の反応時に基質分子UDP-GlcUAが結合する場合には、GlcUA部分と相互作用すると予想されます。この3糖の基質アナログ分子は、主にGal2部分でGlcAT-Iに結合しています。Glu277, Asp252, Glu281は、Gal2の水酸基と特異的な相互作用をしています。Glu227とArg247はGal2のC6位と、Asp252はC4位と、Glu281はC3位とそれぞれ水素結合しています。Glu281は、その立体構造における位置とその保存性の高さから、酵素反応メカニズムにおける触媒塩基であると思われる。

Gal1-GlcAT-I間の相互作用は、Gal2-GlcAT-I間に見られる数多くの相互作用と比較して、その数は少ないですが、面白いことにダイマーを形成している隣りのGlcAT-IのGln318と水素結合しています。これが生理的に意味のあるものであるかどうかはわかりませんが、ダイマーであることの必要性を示唆しています。なぜなら、ダイマーになってはじめて基質結合部位が完成することになるからです。この相互作用に加えて、Trp243側鎖は、Gal1のリングと平行に存在することで、Gal1の自由度を制限しています。Xylの電子密度が観測されないのは、これが巨大なプロテオグリカン基質とGlcAT-I間のスペーサーの役割をしているためと考えられます。

E. 触媒作用的メカニズム

GlcAT-Iは、異性化グルコシルトランスフェラーゼです。これは、コンフィギュレーションをとっているUDP-GlcUAのUDPとGlcUAの間のブリッジ酸素が、コンフィギュレーションをとったGlcUAと基質間のブリッジ酸素に置き換わることを意味しています。このメカニズムとして、UDPのリーピンググループの反対側から基質によってGlcUAのC1部位が攻撃されることが考えられます。これは、C1位の立体化学的变化を引き起こすでしょう。そのような反応には遷移状態に似たオキソカルベニウムイオンが関与すると考えられています。

UDPとGal- (1,3)Gal- (1,4)Xylを結合したGlcAT-Iの立体構造から、Glu281、Mn²⁺、Arg156、Arg310、His308がこの酵素活性に関わっていると考えられます。Gal2のC3位水酸基は、UDP-GlcUA分子のブリッジ酸素と5.1 Åにあります。Glu281はその位置から、Gal2のC3位の水酸基を脱プロトン化を行う触媒塩基と考えられます。SGCドメインを持ったGlnTIとSpsAの立体構造において、GlcAT-IのGlu281に対応する位置に、それぞれAsp291、Asp191が存在していることも、GlcAT-IのGlu281が触媒塩基であるという考えをサポートしているでしょう。

Mn²⁺とArg156とArg310はUDPのリン酸基と相互作用し、

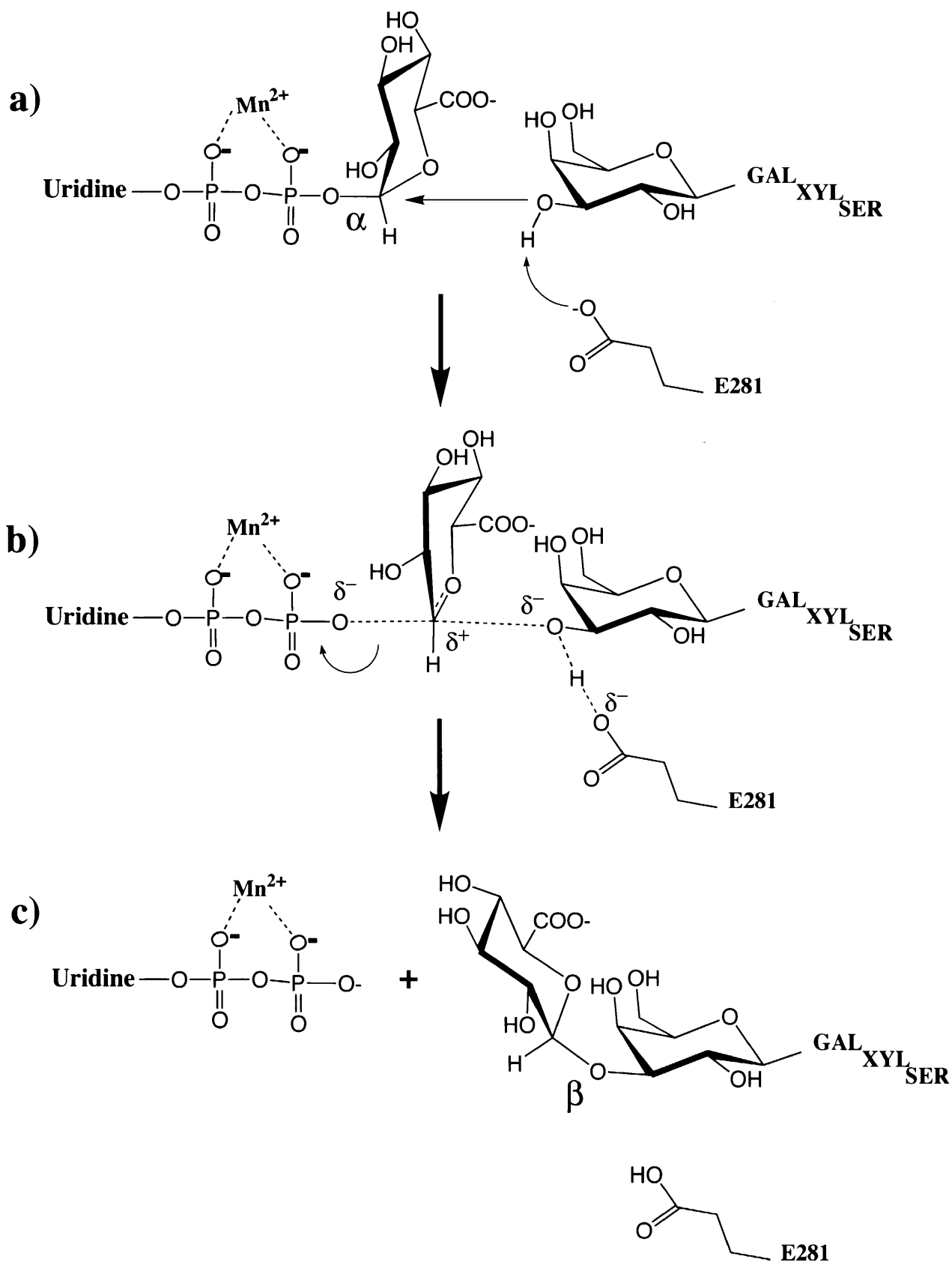


Fig. 4. Schematic representation of the proposed catalytic mechanism.

may also help UDP become a better leaving group. In addition to these residues, H308 is present in the active site located near the UDP and the acceptor hydroxyl of the Gal2 moiety. This histidine is conserved in glycosyltransferases and likely interacts with the GlcUA of the UDP-GlcUA molecule and/or may assist in catalysis.

F. Heparan polymerases and chondroitin synthases

Can the GlcAT-1 structure be used to infer structural and catalytic aspects of bifunctional glycosyltransferases such as heparan polymerases (EXTs) and chondroitin synthases CSs)? EXTs catalyze alternative addition of GlcUA and GlcNAc to the non-reducing end of $[\alpha(1,4)\text{GlcUA}-\beta(1,4)\text{GlcNAc}]_n$ repeats in heparan chain elongation. CSs add alternatively GlcUA and GalNAc to the non-reducing end of $[\beta(1,4)\text{GlcUA}-\beta(1,3)\text{GalNAc}]_n$ repeats in chondroitin chain elongation (1). We employed a Clustal X alignment program (13, 14) to predict which residues may be involved in the binding of donor and/or acceptor substrates. The DDD motif of GlcAT-I aligns with the D⁵⁶⁵E⁵⁶⁶D⁵⁶⁷ and D⁵⁴⁸D⁵⁴⁹D⁵⁵⁰ in EXT1 and EXT2, respectively. Residues Y84, D113 of GlcAT-I that form interaction with the uracil base of UDP, are conserved as Y473 and N500, respectively, in the EXT2 enzyme. R532 of the EXT2 aligns with R161 that forms a hydrogen bond to D194 of the DXD motif in GlcAT-1. Thus, the UDP-sugar binding site is identifiable in only the C-terminal half of EXT enzymes.

Similar analysis shows the presence of two DXD motifs in CSs, such as D²⁴⁰C²⁴¹D²⁴² and D⁵²⁰S⁵²¹D⁵²² in the N-terminal and C-terminal halves, respectively, of *Pasterurella multocida* Type F CS (pmCS) (15). In addition to the DXD motif, the other UDP-binding residues are also conserved in each of the two putative binding sites in pmCS. Thus, CSs appear to contain two UDP-binding sites, whereas EXTs may have only one such binding site.

Recently, glucuronyltransferase activity has been located to the N-terminal half of the EXT1 sequence, and D³¹³R³¹⁴D³¹⁵ is implicated as a DXD motif of EXT1 (16). All the reported mutations that decreased the activity of EXT1 (16) would map into the region after D³¹³R³¹⁴D³¹⁵ to where the acceptor substrate binds. Let us examine whether D³¹³R³¹⁴D³¹⁵ is the N-terminal DXD motif. First of all, we have been unable to identify any corresponding DXD motif in the N-terminal half of EXT2. Second, in all known SGC structures, a hydrophobic β sheet always precedes the DXD motif and this is also true in the case of all DXD motifs identified by our present sequence alignments in EXTs and CSs. On the contrary, the residues that precede the putative D³¹³R³¹⁴D³¹⁵ motif in EXT1 are HKDSR. These hydrophilic residues are unlikely be buried in the hydrophobic core of the molecule, suggesting that the D³¹³R³¹⁴D³¹⁵ may not be a DXD motif. Thus, the idea of two SGC domains in EXT enzymes invites a fresh look. EXT enzymes could be composed of a single UDP-

His308は、UDPとGal2の3位水酸基付近に位置しています。従って、Mn²⁺はUDP分子のマイナスチャージを中和し、Arg156とArg310と共にUDPが脱離するのを助けると考えられ、His308は、UDP-GlcUAのGlcUAと相互作用するか、あるいは同時に酵素活性を補助していると思われます。

F. ヘパラン硫酸合成酵素とコンドロイチン硫酸鎖合成酵素

GlcAT-Iの立体構造は、ヘパラン硫酸合成酵素(EXTs)やコンドロイチン硫酸鎖合成酵素(CSs)の様な2つの酵素活性を持ったグルコシルトランスフェラーゼを理解するのに役立つでしょうか？

EXTsはヘパラン硫酸鎖の伸長反応において、GlcUAとGlcNAcを(GlcUA-GlcNAc)_nの非還元末端に交互に付け加えていく酵素であり、CSsはコンドロイチン硫酸鎖の伸長反応において、GlcUAとGalNAcを(GlcUA-GlcNAc)_nの非還元末端に付け加えていく酵素です(1)。ClustalX(13,14)を用いた1次構造アライメントを行った結果、これらの酵素の補酵素と基質結合部位を予想することができました。このアライメントでは、GlcAT-IのDXDモチーフ(Asp194-Asp195-Asp196)は、EXT2のAsp548-Asp549-Asp550、EXT1のAsp565-Glu566-Asp567にそれぞれ対応します。GlcAT-Iにおいて、UDPウラシルリングと相互作用しているTyr84、Asp113は、EXT2のそれぞれTyr473、Asn500に対応します。さらに、GlcAT-IのAsp194(DXDモチーフ)と水素結合して、UDP-GlcUAのGlcUAとの相互作用が予想されるArg161は、EXT2のArg532に対応します。したがって、補酵素(UDP-糖)結合部位は、EXT2のC末側半分のみにあると予想されます。

同様な解析を *Pasterurella multocida* 由来CSs(15)について行った結果、CSsには2つのDXDモチーフ(N末側にあるAsp240-Cys241-Asp242とC末側にあるAsp520-Ser521-Asp522)を予想することができました。さらに、UDPを認識すると考えられるいくつかの側鎖も見つけています。したがって、CSsはN末側とC末側の2カ所のUDP結合部位を持つものに対して、EXTsはC末側に一カ所のみUDP結合部位を持っているようです。

最近、glucuronyltransferase活性がEXT1のN末側に存在している、Asp313-Arg314-Asp315がDXDモチーフであるという予想が報告されています(16)。同じ論文において、EXT1のミュートーションの実験が行われており、変異をおこすと酵素活性を低下させる残基は、すべてAsp565-Glu566-Asp567のC末側(つまり基質結合部位と予想される領域)にあると報告されています(16)。しかし、この解釈は、EXT1には2つのドメインが存在していることを前提にしています。ここで、EXT1のAsp313-Arg314-Asp315が本当にDXDモチーフであるかどうかを検証してみましょう。まず第一に、EXT2のN末側半分には、DXDモチーフを見つけることができません。二つ目として、他のすべてのSGCドメインの立体構造では、DXDモチーフの直前は疎水性シートになっているのですが、EXT1のAsp313-Arg314-Asp315の直前にある残基は、His-Lys-Asp-Ser-Argであり、これらの親水性側鎖が疎水性コアに埋もれているとは、どうも考えることはできません。このことは、Asp313-Arg314-Asp315がDXDモチーフではないことを意味しそうです。したがって、EXTが2つのSGCドメインを持つという考えは、再考の余地がありそうです。EXTが2つの基質結合部位のすぐ側に、共通の補酵素(UDP-糖)結合部位を「一つだけ」持っていると考えてみましょう。もしそうであるなら、EXT1のglucuronyltransferase活性はN末半分にあるという報告(16)は、N末半分はヘパラン硫酸

sugar binding site that is flanked by two acceptor-binding sites. If so, given the report that glucuronyltransferase activity belongs to the N-terminal half of EXT1 (16), the N-terminal half bears the binding site of heparan chain with GlcNAc for the non-reducing end, while that with the GlcUA resides within the C-terminal half for *N*-acetylglucosaminyl transferase activity. In supporting this intra-molecular localization of the two activities in EXTs, EXTL2 sequence nicely aligns with the C-terminal half of EXT2. EXTL2, a single SGC domain protein with 330 residues, catalyzes *N*-acetylglucosaminyl transferase activity (1). This structural analysis of EXT enzymes is of course very speculative. Future experiments may show that EXT, after all, is also a two SGC domain protein. Or the N-terminal half of EXTs may form a distinct domain structure for glucuronyltransferase activity. Nevertheless, the GlcAT-I structure provides us with molecular basis for understanding heparan/chondroitin biosynthesis.

のGlcNAcの非還元末端の結合部位で、C末半分は*N*-acetylglucosaminyl transferase活性を持っていると解釈することになります。ここで考えた、EXTsの持つ2つの酵素活性の分子内での局在性を支持する事実として、EXTL2のアミノ酸配列はEXT2のC末半分とよく似ていることが上げられます。(EXTL2は330残基からなるただ一つのSGCドメインを持った酵素で、*N*-acetylglucosaminyltransferase活性を持っています(1)。

もし、これらのことが事実ならば、EXTsは一つのSGCドメインを持ち、CSsは2つのSGCドメインを持っていることになります。この考えの根拠として、EXTとCSは異なったタイプの転移反応を行っているということが上げられます。EXTが行う2つの転移反応は、一つは異性化を伴い、もう一つは異性化を伴わないものであるのに対して、CSの場合は2つとも異性化を伴います。GlcAT-Iの立体構造をもとにしたEXTsに対するこれらの考察は、もちろん単なる予想にすぎません。今後進められる実験によって、EXTsは2つのSGCドメインを持つことが明らかになるかもしれません。それにもかかわらず、GlcAT-Iの結晶構造が、ヘパラン硫酸とコンドロイチン硫酸の生合成メカニズムについて、我々の理解を大きく前進させたことは明らかです。

References

1. Sugahara, K., and Kitagawa, H. (2000) *Curr. Opin. Struc. Biol.* **10**, 518–527
2. Ringvall, M., Ledin, J., Holmborn, K., van Kuppevelt, T., Ellin, F., Eriksson, I., Olofsson, A., Kjellen, L., and Frosberg, E. (2000) *J. Bio. Chem.* **275**, 25926–25930 (2000)
3. Frosberg, E., Pejler, G., Ringvall, M., Lunderius, C., Tomasini-Johansson, B., Kusche-Gullberg, M., Eriksson, I., Ledin, J., Hellman, L., and Kjellén, L. (1999) *Nature* **400**, 773–776
4. Humphries, D.E., Wong, G.W., Friend, D.S., Gurish, M.F., Qiu, W.T., Huang, C., Sharpe, A.H., and Stevens, R.L. (1999) *Nature* **400**, 773–776
5. Bullock, S.L., Fletcher, J.M., Beddington, R.S.P. & Wilson, V.A. (1998) *Genes & Development* **12**, 1894–1906
6. Lind, T., Tufaro, F., McCormick, C., Lindahl, U., and Lidholt, K. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 26265–26268
7. Kakuta, Y., Sueyoshi, T., Negishi, M., and Pedersen, L.C. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 10673–10676
8. Pedersen, L.C., Tsuchida, K., Kitagawa, H., Sugahara, K., Darden, T.A. and Negishi, M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 34580–34585
9. Ünligil, U.M., Zhou, S., Yuwaraj, S., Sarkar, M., Schachter, H. and Rini, J.M. (2000) *EMBO J.* **19**, 5269–5280
10. Charnock, S.J. & Davies, G.J. (1999) *Biochemistry* **38**, 6380–6385
11. Gastinel, L.N., Cambillau, C., and Bourne, Y. (1999) *EMBO J.* **18**, 3546–3557
12. Ha, S., Walker, D., Shi, Y., and Walker, S. (2000) *Protein Sci.* **9**, 1045–1052
13. Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1998) *Trends Biochem. Sci.* **23**, 403–405
14. Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. (1997) *Nuc. Acids Res.* **24**, 4876–4882
15. DeAngelis, P.L., and Padgett–McCue, A.J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 24124–24129
16. Wei, G., Bai, X., Gabb, M.M.G., Bame, K.J., Koshy, T.I., Spear, P.G., and Esko, J.D. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 27733–27740

Received on March 2, 2001, accepted on March 12, 2001