Conversion of inverting glycoside hydrolases into catalysts for synthesizing glycosides employing a glycosynthase strategy

グライコシンターゼ化による反転型加水分解酵素の グリコシド合成触媒への変換

Kitaoka, Motomitsu¹; Honda, Yuji^{1,2}; Fushinobu, Shinya³;
Hidaka, Masafumi^{1,3}; Katayama, Takane²; and Yamamoto, Kenji⁴

¹National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization,
Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

²Ishikawa Prefectural University, Nonouchi, Ishikawa 921-8836, Japan

³Department of Biotechnology, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

⁴Division of Integrated Life Science, Graduate School of Biostudies, Kyoto University,
Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

Fax: 81-29-838-7321, E-mail: mkitaoka@affrc.go.jp

(Received on December 22, 2008, accepted on January 14, 2009)

Key Words: glycosynthase, inverting hydrolase, glycosylfluoride, Hehre resynthesis-hydrolysis mechanism, reducing end xylose-releasing exo-oligoxylanase, α -fucosidase

Abstract

Reducing-end xylose-releasing exo-oligoxylanase (Rex, EC. 3.2.1.156) is an inverting xylanolytic enzyme, belonging to the glycoside hydrolase (GH) family 8, which hydrolyzes xylooligosaccharides to release xylose (X_1) from its reducing end. Rex hydrolyzes α -xylobiosyl fluoride (α - X_2 F) to yield xylobiose (X_2) only in the presence of X_1 , confirming the Hehre resynthesis-hydrolysis mechanism. A library of mutant Rex at the catalytic base (D263) was constructed by saturation mutagenesis, in which D263C accumulated the highest level of xylotriose (X_3) from α - X_2 F and X_1 . However, F^- releasing activities of the mutants were much less than that of the wild type. Next, Y198 residue of Rex that forms a hydrogen bond with nucleophilic water was substituted with phenylalanine, causing a marked decrease in hydrolytic activity and a small increase in the F^- releasing activity from α - X_2 F in the presence of X_1 . Y198F of Rex accumulated more product during the glycosynthase reaction than D263C. Recently, an inverting α -1,2-fucosidase belonging to GH95 was converted into glycosynthase by mutating a catalytic base residue. In both cases, the catalytic base should be intact.

A. Introduction

Enzymatic synthesis of glycosides (1–6) is a key topic in glycotechnology and does not require complicated organic synthesis procedures such as selective protection

要 約

還元末端キシロース遊離エキソオリゴキシラナーゼ (Rex, EC. 3.2.1.156) は、糖加水分解酵素ファミリー 8 に属する反転型キシラン分解酵素であり、キシロオリゴ糖から還元末端キシロース (X_1) を遊離する反応を触媒する。Rex は X_1 の存在下のみ、 α -キシロビオシルフルオリド (α - X_2 F) を加水分解する、Hehre-合成-加水分解反応を示した。一般塩基触媒残基 (D263) 変異酵素ライブラリーを作製し、グライコシンターゼ活性により α - X_2 F と X_1 からキシロトリオース (X_3) を最も良く蓄積する D263C 変異酵素を選抜した。しかしながら、D263C のフッ素イオン遊離活性は親酵素より低かった。次に、一般塩基触媒残基と共に求核試薬である水を保持している残基である Y198 をフェニルアラニンに変異させたところ、フッ素イオン遊離活性が低下することなく加水分解活性のみに大幅に低下が見られた。Rex の Y198F 変異酵素は D263C よりも X_3 の蓄積が多かった。最近になり、糖加水分解酵素ファミリー 95 に属する α 1,2 フコシダーゼのグライコシンターゼ化が報告された。この場合は、一般塩基触媒残基と相互作用している別の残基に変異を入れることが有効であった。両者ともに、一般塩基触媒残基は変異させない方が良かった。

A. はじめに

グリコシドの有機合成において、水酸基の選択的保護・脱保護は最も煩雑なステップである。酵素を用いたグリコシ

Retaining GHs

Inverting GHs

Fig. 1. Typical reaction mechanisms of retaining and inverting glycoside hydrolases (GHs).

and deprotection of the hydroxyl group. Utilization of hydrolytic enzymes such as glycoside hydrolase, (GH) in glycotecnology is expected due to their wide variations. GHs are generally categorized into two types, retaining and inverting enzymes, based on changes in the anomeric configurations during GH reactions (7-11). Typical reaction mechanisms of both types are similar and use two acidic residues acting as a general acid (a proton donor) and a general base (a nucleophile) as illustrated in Fig. 1. The retaining GH reaction proceeds in two steps: (i) the general acid residue donates a proton to the glycosyl oxygen atom and the base residue directly attacks the anomeric center in concert, producing a covalent-bound intermediate at the base residue with a Walden inversion; and (ii) the intermediate undergoes another inverting hydrolysis resulting in anomeric retention during the overall reaction. The inverting GH reaction differs in that the nucleophilic reagent attacks the anomeric center. In this case, a water molecule, activated by the base residue, attacks the anomeric center to hydrolyze the glycoside with anomeric inversion.

Many retaining GHs are utilized in the production of various glycosides including commercial production, using their transglycosylation activity (12). However, none of the inverting GHs show transglycosylation activity. The

ド合成(1-6)は、往々にしてこれら選択的保護・脱保護のステップを回避することができるため、糖鎖工学の重要な要素の一つに数えられる。なかでも糖加水分解酵素 (GH) は多くの基質特異性を示す酵素が知られているため、糖鎖合成への応用が期待されている。GH は反応前後のアノマー型の変化により保持型および反転型に大別される(7-11)。両者の反応は、一般酸触媒 (プロトン供与体) および一般塩基触媒 (求核体) として働く 2 つの酸性アミノ酸残基の協調作用により触媒されていることは共通している (図 1)。保持型加水分解酵素の反応は以下の二段階により、グリコシド結合と同じアノマー型の生成物を生じる: (ステップ) 一般酸触媒残基がグリコシド結合の酸素原子にプロトンを供与するとともに、一般塩基触媒残基がアノメリック炭素を直接求核攻撃することによる、Walden 反転を伴う一般塩基触媒残基と共有結合した中間体の形成, (ステップ) 共有結合中間体の Walden 反転を伴う加水分解。反転型加水分解酵素の場合は、保持型酵素と比較して求核試薬が異なる。この場合は、一般塩基触媒残基により活性化された水分子がアノマー炭素を求核攻撃することによりアノマー反転を伴った加水分解を完結する。

多くの保持型加水分解酵素は糖転移反応によるグリコシド合成に用いられており、工業化されている例もある(12)。しかしながら、反転型加水分解酵素は糖転移活性を示さな

difference in the occurrence of transglycosylation is due to a mechanistic difference (Fig. 1). In the case of a retaining GH, if the glycosyl-enzyme intermediate is attacked by another alcohol instead of water, transglycosylation occurs. It should be noted that no water molecules participate in this reaction. Considering the transglycosylation reaction by an inverting GH, the inclusion of a dehydration step must be postulated because the reaction is initiated by hydration of the glycosyl linkage. Because the enzymatic reaction must be performed in water, the presence of abundant water molecules prohibits the dehydration step resulting in no transglycosylation. Thus, usages of inverting GHs are limited in hydrolysis, not the production of glycosides by transglycosylation. In this mini-review, a strategy to convert an inverting GH into a catalyst for the syntheses of glycosides is described.

B. The Hehre resynthesis-hydrolysis reaction

Hehre and co-workers reported interesting phenomena associated with inverting GHs. Previously, they reported that β -amylase, an inverting GH, hydrolyzed α - and β -maltosyl fluorides to maltose and F^- (13). It should be noted that β -maltosyl fluoride possesses the opposite anomeric configuration of the normal substrates that are hydrolyzed by the enzyme. Later, various inverting enzymes were found to hydrolyze the so called “wrong” glycosyl fluorides as shown in Table 1 (14–20), suggesting that the reaction is common among inverting GHs (Fig. 2). Instead of simple hydrolysis, the reaction mechanism consists of two steps. In the first step, a new glycoside of the correct anomer forms from the wrong glycosyl fluoride and an acceptor through a Walden inversion. The new glycoside is then hydrolyzed with an anomeric inversion at the same site on the enzyme before it is released from the active center, i.e., the normal reaction of an inverting GH. The mechanism was confirmed by analyzing the reaction of trehalase, which hydrolyzes the

い。糖転移反応の有無は反応機構の違いから説明できる (図 1)。保持型加水分解酵素の場合は、共有結合中間体が水ではなく他のアルコールにより攻撃されれば糖転移反応になる。ここで注目すべきは反応経路に水分子の関与がない点である。一方反転型酵素は、グリコシド結合の水和により反応が始まるため、糖転移反応を仮定すると脱水反応を仮定する必要がある。しかしながら、糖加水分解酵素の反応は水溶液中で行われるために、大量の水分子の存在により脱水反応は事実上起こりえない。以上の理由により反転型加水分解酵素は原理的に糖転移反応を示さず、それらの応用も加水分解に限られていた。本稿では反転型加水分解酵素のグリコシド結合合成触媒への変換について解説する。

B. Hehre-再合成一分解反応

Hehre らは 1970 年代に反転型加水分解酵素による興味深い現象を報告している。この現象は β アミラーゼによる、 α -および β -マルトシルフルオリドのマルトースとフッ素イオンへの加水分解として最初に報告された(13)。ここで注目すべきは、 β -マルトシルフルオリドのアノマー型は β アミラーゼの切断する基質のアノマー型とは逆である点である。後に種々の反転型加水分解酵素が“間違った”フッ化グリコシドを加水分解することが報告され (表 1) (14–20), この現象は反転型加水分解酵素に一般的に見られることが示された(図 2)。この反応は単純な加水分解ではなく、二段階の反応による。第一段階では、加水分解酵素の基質となりうるグリコシドが、“間違った”グリコシルフルオリドとアクセプター分子から Walden 転位を伴い合成される。合成されたグリコシドは酵素の良い基質であるため、酵素の活性中心から出る前に直ちに反転型加水分解を受ける。この反応機構は α -1, α -1 結合を反転型に加水分解する酵素であるトレハラーゼを用いて証明された(20)。この反応機構は後に Hehre-再合成一分解機構

Table 1. List of enzymes reported to exhibit the Hehre resynthesis-hydrolysis reaction

Enzyme	Family	Glycoside hydrolyzed	Wrong fluoride used	Donor acts as acceptor	references
β -amylase	(GH14)	α -maltoside	β -maltosyl fluoride	yes	13
glucoamylase	(GH15)	α -glucoside	β -glucosyl fluoride	yes	22
trehalase	Not assigned	α -glucoside	β -glucosyl fluoride	no	19, 20
β -xylosidase	Not assigned	β -xyloside	α -xylosyl fluoride	yes	18
cellobiohydrolase	GH6	β -cellobioside	β -cellobiosyl fluoride	yes	14, 21
Rex*	GH8	β -xylobioside	α -xylobiosyl fluoride	no	77
α -1,2-fucosidase	GH95	α -fucoside	β -fucosyl fluoride	no	83

* reducing-end-xylose releasing exo-oligoxyranase

A.

B.

Fig. 2. The Hehre resynthesis-hydrolysis reaction. A. The reaction mechanism of inverting GH described as glucoamylase. B. The reaction mechanism of the Hehre resynthesis-hydrolysis reaction.

α -1, α -1 linkage with anomeric inversion (20). This mechanism was later named the “Hehre resynthesis-hydrolysis mechanism” (14,15).

The Hehre resynthesis-hydrolysis mechanism is often difficult to detect because many enzymes recognize glycosyl fluoride not only as a donor but also as an acceptor (13–15,18,21,22), such as β -maltosyl fluoride for β -amylase and β -glucosyl fluoride for glucoamylase. However, reliable experimental evidence for this mechanism was reported for trehalase using β -glucosyl fluoride as the donor and glucose or xylose as the acceptor (19,20). In that case, the reactions were performed at 0°C to avoid spontaneous hydrolysis of β -glucosyl fluoride, which generated glucose as the acceptor molecule.

C. Glycosynthase

The mutant GHs that catalyze the synthesis of glycosides from the glycosyl fluoride of the opposite anomer are called glycosynthases (Fig. 3). In 1998, Withers' group reported the first glycosynthase in which a mutant retaining enzyme, GH1 β -glucosidase from *Agrobacterium* sp., with a mutation of its nucleophilic

と命名された(14,15)。

多くの酵素では、グリコシルフルオリドがドナーとしてだけでなくアクセプターとしても作用する(13–15,18,21,22)。たとえば、 β -マルトシルフルオリドおよび β -グルコシルフルオリドはそれぞれ β アミラーゼおよびグルコアミラーゼに対してアクセプターとしても作用する。そのため、Hehre-再合成-分解機構を実験的に証明することは困難である。反応機構の実験的証拠は β -グルコシルフルオリドをドナー、グルコースあるいはキシロースをアクセプターとしたトレハラーゼの反応解析により得られた(19,20)。この実験では β -グルコシルフルオリドの非酵素的加水分解によるグルコース（アクセプターとして作用）の生成を避けるため反応は0°Cで行われた。

C. グライコシンターゼ

反対のアノマー型のグリコシルフルオリドを基質としてグリコシドを合成する変異加水分解酵素をグライコシンターゼと呼ぶ(図3)。最初の報告は1998年のWithersらによるものである(23,24)。この報告では*Agrobacterium* sp. 由来のGH1に属する β -グルコシダーゼの求核触媒残基(E358)を

Fig. 3. Glycosynthase. A. Reaction of the wild type retaining glycoside hydrolase. B. Reaction of a glycosynthase mutant.

residue (E358), catalyzed the synthesis of various β -glucosides using α -glucosyl fluoride as a donor and various 4-nitrophenyl- β -glycosides as acceptors (23,24). Since then, by substituting their nucleophilic residues, various retaining GHs have been converted into glycosynthases as summarized in Table 2 (15,23–68).

Williams and Withers commented that the glycosynthase technique was developed by mimicking the Hehre resynthesis-hydrolysis mechanism of inverting GHs (15). However, derivatization to glycosynthase has been a technology for retaining GHs only, and no glycosynthase derived from an inverting GH has been reported.

D. A model of inverting GH Reducing end xylose-releasing exo-oligoxylanase (Rex) (69–71)

GH8 is a family of inverting hydrolases whose members are mainly cellulase and chitinase. In addition, endo β -1,4 xylanase (pXyl), belonging to this family, was found in a culture supernatant of *Pseudoalteromonas haloplanktis* and characterized (72). The three dimensional structures of two GH8 enzymes were found to have an $(\alpha/\alpha)_6$ barrel structure (clan GH-M) (73,74). The GH8

不活性な残基に置換することにより、 α -グルコシルフルオリドをドナー、4-ニトロフェニルグリコシドをアクセプターとして種々の β -グルコシドを合成している。その後、表 2 に示すように多くの保持型加水分解酵素が求核触媒残基を変異させることによりグライコシンターゼに変換されている(15,23–68)。

Williams と Withers は、グライコシンターゼは反転型加水分解酵素に見られる Hehre-再合成-分解機構を元に設計したとコメントしている(15)。しかしながら、本稿で述べる報告以前にはすべてのグライコシンターゼは保持型加水分解酵素を起原とするものであった。

D. 還元末端キシロース遊離エキソオリゴキシラナーゼ (Rex) : モデルとなる反転型加水分解酵素 (69–71)

GH8 は、主にセルラーゼとキトサナーゼから構成される反転型加水分解酵素のファミリーである。加えて、*Pseudoalteromonas haloplanktis* 由来エンド β 1,4-キシラナーゼ (pXyl) が報告された(72)。GH8 酵素の立体構造は $(\alpha/\alpha)_6$ バレル構造 (clan GH-M) であることが同定された(73,74)。唯一の GH8 キシラナーゼである pXyl は、ゲノム既読好アル

Table 2. List of reported glycosynthases and their origins

Family	Enzyme	Origin	Residue substituted	References
Retaining GHs				
GH1	β -glucosidase (Abg1)	<i>Agrobacterium</i> sp.	E258	24, 37, 47, 50, 61, 64–66
	β -glucosidase	<i>Oryza sativa</i>	E414	35
	β -glucosidase	<i>Streptomyces</i> sp.	E383	40
	β -glucosidase	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	E387	46
	β -glycosidase	<i>Thermus thermophilus</i>	E338	30, 45
GH2	β -mannosidase	<i>Cellulomonas fimi</i>	E519	63
	β -glucuronidase	<i>Escherichia coli</i>	E504	26
GH5	cellulase (Cel5A)	<i>Clostridium cellulolyticum</i>	E307	25
	endo-glycoceramidase	<i>Rhodococcus strain M-777</i>	E351	38
GH7	cellulase (Cel7B)	<i>Humicola insolens</i>	E197	32, 33, 42, 43, 51, 55
GH10	xylanase	<i>Bacillus halodurans</i>	E301	41
	xylanase (Cex)	<i>Cellulomonas fimi</i>	E233	41
	xylanase (Cfx)	<i>Cellulomonas fimi</i>	E235	39
	xylanase	<i>Clostridium sterocorarium</i>	E293	41
	xylanase	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	E265	35
	xylanase	<i>Thermotoga maritima</i>	E259	41
GH16	1,3-1,4- β -glucanase	<i>Bacillus licheniformis</i>	E134	57, 62, 68
	xyloglucan endo-transglycosylase	<i>Populus tremula x tremuloides</i>	E85	36
	laminarinase	<i>Pyrococcus furiosus</i>	E170	52
GH17	β -1,3-glucanase	<i>Hordeum vulgare</i>	E231	53
GH26	mannanase	<i>Cellvibrio japonicus</i>	E320	54
GH31	α -glucosidase	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	D481	60
GH52	β -xylosidase	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	E335	29, 35
Inverting GHs (described in this mini-review)				
GH8	Rex*	<i>Bacillus halodurans</i>	D263, Y198**	77
GH95	α -1,2-fucosidase	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	D766**	83

* reducing end xylose-releasing exo-oligoxyranase

** residue other than the catalytic base

xylanase, pXyl, has the highest amino acid identity (32.6 %) with the protein encoded by the BH2105 gene (GenBank accession number: BAB05824) of *Bacillus halodurans* C-125, an alkalophilic bacterium whose genomic sequence is available (72,75).

The recombinant BH2105 protein did not hydrolyze birch wood xylan as well as any other polymeric substrate for GH8 enzymes (chitosan, lichenan, curdlan, and carboxymethyl cellulose). Various pentasaccharides, including xylopentaose, cellopentaose, laminaripentaose,

カリ性細菌 *Bacillus halodurans* C-125 の BH2105 遺伝子のコードする蛋白と最も高いアミノ酸配列相同性 (32.6%) を示した (72,75)。

BH2105 タンパクは重合度 3 以上のキシロオリゴ糖 (X_n) に作用し初期に X_1 と X_{n-1} を生じ、最終的に X_1 と X_2 にまで分解した。本酵素はキシロビオース (X_2) をほとんど分解しなかった。また、本酵素は 4-ニトロフェニル β -キシロシドおよびキシロビオシドを全く分解しなかった。通常の反転型加

chitopentaose, and chitosanpentaose, were used as substrates and the enzyme showed hydrolytic activity only on xylopentaose (X_5), initially producing X_1 and X_4 , and then X_1 and X_2 (71). It hydrolyzed xylooligosaccharides (X_n) releasing X_1 and X_{n-1} from X_n in the initial stage when $n \geq 3$, but hardly hydrolyzed X_2 . On the other hand, the enzyme exhibited no activity on 4-nitrophenyl- β -xyloside and 4-nitrophenyl- β -xylobioside. The enzyme had no transglycosidation activity as well as other inverting enzymes. It only hydrolyzed Glc-Xyl-Xyl, Xyl-Xyl-Glc, and Glc-Xyl-Glc from a range of β -1,4 linked D-glucose and D-xylose-based trisaccharides (76) at a much lower rate than X_3 . The reducing end specificity was confirmed based on their products. The reducing end specificity is completely different from that of β -xylosidase, which liberates xylose from the non-reducing end.

Considering the above results, GH8 glycosidase from *B. halodurans* C-125 was assigned as a new class of enzyme and called reducing end xylose-releasing exo-oligoxyranase (Rex). The enzyme reaction is clearly different from that of β -xylosidase, and it has been registered as a new enzyme, EC 3.2.1.156, in the Enzyme Nomenclature (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>).

The crystal structures of Rex in unliganded and complex forms at 1.35–2.204 Å resolution (PDB accession

水分解酵素と同様に糖転移活性は検出されなかった。本酵素は、グルコースおよびキシロースが β 1,4 結合した構造の三糖ライブラリー (76) のうち、Glc-Xyl-Xyl, Xyl-Xyl-Glc および Glc-Xyl-Glc のみ X_3 より遅い速度で分解した。これらの分解産物から、還元末端の単糖を遊離していることが証明された。還元末端からのキシロース遊離は、非還元末端からキシロースを遊離する酵素である β -キシロシダーゼとは全く異なる酵素であることを示している。

以上の結果から、*B. halodurans* C-125 由来 GH8 酵素は新規酵素、還元末端キシロース遊離エキソオリゴキシラナーゼ (Rex) と同定された。反応は β -キシロシダーゼとは全く異なり、本酵素活性は Enzyme Nomenclature (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>) に EC 3.2.1.156 として登録された。

基質非結合および結合状態の Rex の X 線結晶構造解析を行い、分解能 1.35–2.20 Å の構造 (PDB accession Number: 1WU4, 1WU5, 1WU6) を得た。その結果、Rex は -2 から +1 までの 3 つのサブサイトを持つことが示唆された (69)。Rex の構造は $(\alpha/\alpha)_6$ バレル構造からなる GH8 エンドキシラナーゼである pXyl (73) と類似していた (図 4)。触媒セットも Rex と pXyl の間で良く保存されていた。最も大きな相違点は基質

Fig. 4. Comparison of the structures and the subsite models of Rex and pXyl. The substrate binding grooves are indicated with arrows.

numbers: 1WU4, 1WU5, and 1WU6) revealed the structural aspects of three Rex subsites ranging from -2 to $+1$ (69). The structure of Rex is very similar to that of pXyl (73), the GH8 endo-xylanase composed of an $(\alpha/\alpha)_6$ barrel structure (Fig. 4). The catalytic machinery of Rex is well conserved in pXyl. The most significant difference in the structures of Rex and pXyl was found at the binding cleft. The position corresponding to subsite $+2$ of Rex is blocked by a barrier formed by a kink in the loop before helix α_{10} , and H319 in the loop forms a direct hydrogen bond with the β -hydroxyl of xylose residue bound at subsite $+1$, contributing to the specific recognition of the reducing end xylose.

E. Conversion of Rex into glycosynthase

E-1. Hehre resynthesis-hydrolysis of Rex (77)

Rex is considered to be a suitable enzyme for examining the Hehre resynthesis-hydrolysis mechanism. As Rex hydrolyzes X_3 to release X_1 from the reducing end, it is expected to utilize α -xylobiosyl fluoride (α - X_2 F) as the donor and X_1 as the acceptor. It should be mentioned that X_2 , the hydrolytic product of α - X_2 F, never acts as the acceptor molecule due to the reducing end exo-specificity. Thus, the spontaneous hydrolysis of α - X_2 F does not affect the reaction significantly, and the donor and acceptor are considered to be completely independent during the reaction (Fig. 5A).

Initially, the action of the wild type Rex on α - X_2 F (20 mM) in both the presence and absence of X_1 (20 mM) were examined. The enzyme was inactive on α - X_2 F in the absence of X_1 , but produced X_2 from α - X_2 F in the presence of X_1 (Fig. 5B). These results suggest that the reaction was not a simple hydrolysis of α - X_2 F, but was a Hehre resynthesis-hydrolysis. No X_3 was detected during the reaction suggesting that most of the resulting X_3 would be hydrolyzed into X_1 and X_2 before it escaped from the active center because X_3 was generated at the same position where it was hydrolyzed.

E-2. Mutation of the base residue (77)

First, the base residue, D263, was mutated to convert Rex into glycosynthase following the same procedure used for the retaining GHs. A saturation mutagenesis library of Rex at position D263, regarded as D263X, was constructed and from this mutant library, 120 colonies were randomly selected and each mutant enzyme was purified by His-tag affinity column chromatography. During the screening for α - X_2 F-consuming activity in the presence of X_1 and accumulation of X_3 by a TLC analysis, 71 of the 120 proteins exhibited activity. Nine types of D263X mutants were found in addition to the wild-type. The numbers of clones obtained were D (wild-type), 15; G, 22;

結合クレフトの構造に見られた。Rex のサブサイト $+2$ に相当する場所は α_{10} ヘリックスの前のループのよじれにより塞がれており、またループ上の H319 が $+1$ に結合するキシロースのアノメリック β 水酸基と直接水素結合を形成することにより還元末端のキシロースを認識していた。

E. Rex のグライコシンターゼへの変換

E-1. Rex の Hehre-再合成-分解反応 (77)

Rex は Hehre-再合成-分解反応を解析するためには最も都合の良い酵素と考えられた。Rex の反応は X_3 を加水分解して還元末端の X_1 を遊離するので、Hehre-再合成-分解反応では α -キシロビオシルフルオリド (α - X_2 F) をドナー、キシロースをアクセプターにすると予想された。ここで重要なのは、還元末端特異性から α - X_2 F やその非酵素的分解産物である X_2 の両者ともアクセプターとして作用しないことである。そのため、非酵素的加水分解は反応に影響を与えないため、ドナーとアクセプターを容易に区別して扱うことが可能になる (図 5A)。

Rex の X_1 (20 mM) 存在および非存在下における α - X_2 F (20 mM) に対する反応を調べた。その結果、 X_1 非存在下では何も反応が見られなかったが、 X_1 存在下では α - X_2 F から X_2 を生じた (図 5B)。この結果は、 α - X_2 F の分解が単なる加水分解ではなく Hehre-再合成-分解反応によるものであることを明確に示している。反応中間体として予想される X_3 は検出されなかった。これは、Rex の活性中心に生成した X_3 は本来 Rex の良い基質であるために直ちに加水分解されたものと考えられた。

E-2. 一般塩基触媒残基への変異導入 (77)

Rex をグライコシンターゼに変換するために、まず保持型加水分解酵素と同様に一般塩基触媒残基 D263 への変異を試みた。D263 を任意のアミノ酸残基に変異させた飽和変異ライブラリーを作製し、ランダムに 120 クローンを選抜し His-タグ精製によりそれぞれ精製酵素を得た。 α - X_2 F と X_1 を基質としたときの反応生成物を TLC により確認し、 α - X_2 F 消費活性および X_3 蓄積活性のある変異酵素を選抜したところ、120 中 71 クローンに活性が確認された。それらの DNA をシーケンスした結果、以下の 9 種のアミノ酸置換が見いだされた。D (変異無し), 15; G, 22; A, 12; V, 8; T, 5; L, 3; N, 2; C, 2; P, 1;

Fig. 5. The Hehre resynthesis-hydrolysis reaction catalyzed by Rex. A: Expected reaction: Due to the reducing end-exo specificity, neither α-X₂F⁻ nor X₂ is expected to enter the +1 subsite as the acceptor. B: Actual results: The α-X₂F⁻ reaction by the wild-type Rex was carried out in the absence (lane 1) and presence (lane 2) of X₁ for 1 h with an enzyme concentration of 0.4 μM. Lane “Std” shows α-X₂F, X₁, X₂ and X₃.

A, 12; V, 8; T, 5; L, 3; N, 2; C, 2; P, 1; and S, 1. The wild-type exhibited the highest α-X₂F consumption without accumulation of X₃. Among the mutants, D263C exhibited the greatest production of X₃ followed by D263N (Fig. 6). Thus, D263C and D263N were selected as targets for further analysis of glycosynthase properties.

The F⁻ releasing activity using a concentration of 10 mM α-X₂F in the presence of 10 mM X₁, and the hydrolytic activities of the wild type and D263 mutants, using 2.6 mM X₃ are summarized in Table 2. Both D263C and D263N showed approximately 10% of the F⁻ releasing activity as compared to the wild type. The mutations caused marked decrease in hydrolytic activity (4.5×10^{-4} for D263C and 2.9×10^{-3} for D263N). It should be noted that the remaining hydrolytic activity of D263N was 6.4 times higher than that of D263C, whereas their F⁻ releasing activities were almost identical, resulting in a difference in the ratio of F⁻ releasing activity to hydrolytic activity (F/H ratio). Figure 7 shows the time courses for the α-X₂F and X₁ reactions by the enzymes. In the wild-type reaction, F⁻ and X₂ concentrations increased in parallel, but

S, 1. 親酵素が最も高い α-X₂F 消費活性を示したが, X₃ 蓄積活性は見られなかった。X₃ 蓄積活性は D263C が最も高く, 続いては D263N であった (図 6)。そこで, この両変異酵素に対して機能解析を行った。

親酵素および各変異酵素の 10 mM X₁ 存在下の 10 mM α-X₂F からの F⁻ 遊離活性および 2.6 mM 濃度での X₃ 分解活性を表 3 に示した。D263C および D263N とともに, F⁻ 遊離活性は親酵素の約 1/10 であった。変異により大幅な加水分解活性の低下が観察された (D263C, 4.5×10^{-4} ; D263N, 2.9×10^{-3})。両変異酵素の F⁻ 遊離活性はほぼ同じであるが, D263N の残存加水分解活性は D263C の 6.4 倍あるために, F⁻ 遊離活性と加水分解活性の比 (F/H) に大きな違いが見られた。図 7 に親酵素および両変異酵素による α-X₂F および X₁ を基質とした反応の経時変化を示した。親酵素は F⁻ と X₂ が等モル増加するが X₃ は全く検出されなかったが, 両変異酵素では X₃ が検出された。D263N の場合は X₂ 濃度が X₃ 濃度よりも高く, 合成反応活性よりも加水分解活性の方が高いことが示された。対照的に D263C では X₃ 濃度が X₂ 濃度よりも高かった。

Fig. 6. Screening for the glycosynthase activity of D263 mutants. Each lane name indicates the residue substituted for D263; wild type indicated by wt.

Table 3. Activities of each mutant of Rex

	F ⁻ release* (F)	X ₃ hydrolysis** (H)	F/H ratio
Wild type	3.1	31.2	0.1
D263C	0.29	0.014	21
D263N	0.32	0.09	3.6
Y198F	4.7	0.06	78
Y198F/D263C	0.03	0.0006	50
Y198F/D263N	0.23	0.0016	144

* F⁻ releasing activity using the concentrations of 10 mM α -X₂F and 10 mM X₁. The values are given as s⁻¹.

** Hydrolytic activity using 2.6 mM X₃. The values are given as s⁻¹.

Fig. 7. Time courses for α -X₂F⁻ and X₁ reactions. The enzymatic reaction was carried out in 0.1 M MOPS buffer (pH 7.0) at 30°C. Both substrate concentrations were 5.0 mM. A: Wild-type (enzyme concentration was 0.5 μ M); B: Mutant D263C (7.2 μ M); C: Mutant D263N (7.3 μ M). Symbols indicate F⁻ (open squares), X₂ (open circles), and X₃ (closed circles).

X₃ was not detected. On the other hand, X₃ was detected in the reactions catalyzed by the mutants. In the case of D263N, X₂ concentration was higher than that of X₃ in the reaction mixture, indicating that the hydrolytic activity was higher than the transfer activity. In contrast, X₃ concentration was higher than X₂ in the reaction with D263C, indicating that transfer activity was higher than hydrolytic activity. The difference is comparable with the remaining hydrolytic activities of the mutants (Table 3).

E-3. Mutation at the residue supporting the nucleophilic water molecule (78)

Conversion of Rex into glycosynthase was successfully performed by mutating the base residue. However, the D263 mutants retained significant hydrolytic activity that decreased the yield of the synthetic product. Moreover, the F⁻ releasing activities of the mutants were much lower than that of the wild type (Table 3). Mutation at the general base residue of an inverting GH could not remove the hydrolytic activity completely because the water molecule retained some activity as a nucleophilic reagent without the aid of the residue. It is, therefore, still important to reduce the hydrolytic activity of glycosynthase obtained from the inverting GHs.

Collins et al. (72,79) found that a mutation at a conserved tyrosine residue (Y203) in pXyl, which shares 32.6% amino acid identity with Rex, caused a marked decrease in the hydrolytic activity of the enzyme toward xylan. The residue formed a hydrogen bond with a nucleophilic water molecule that formed another hydrogen bond with the general base residue (D281). The pH dependency of the Y203F mutant indicated that the tyrosine residue was not a general base, but was important in locating the nucleophilic water at the proper position (79) (Fig. 8). Thus, mutating the corresponding residue of Rex, Y198, confirmed by both the alignment of amino acid sequences and the structural analysis of Rex, was attempted (69).

The F⁻ releasing and hydrolytic activities of the Y198 mutants and/or D263 mutants are presented in Table 3. The mutation at Y198 drastically decreased hydrolytic activity (from 31.2 to 0.06 s⁻¹), with a small increase in the F⁻ releasing activity. Furthermore, the F⁻ releasing activity of Y198F was 10 times greater than that of the mutants at the general base residue (D263). The F/H ratio was 78, approximately 4 times that of D263C, which was the best glycosynthase mutant of the general base residue. A double mutation was also tested. Y198F/D263N showed 20 times less F⁻ releasing activity than Y198F, but was comparable to that of the corresponding single mutant, D263N. Though the F/H ratio of Y198F/D263N was twice than that of Y198F, Y198F was considered to be the

この違いは残存する加水分解活性の違いと一致していた。

E-3. 求核触媒水分子を保持する残基への変異 (78)

Rex のグライコシンターゼへの変換は一般塩基触媒の変異導入により達成された。しかしながら、D263 変異酵素は有意な加水分解活性を残存するため結果的に生成物の収率低下を引き起こしていた。また、F⁻ 遊離活性も親酵素に比べて大きく低下していた (表 3)。真の求核試薬である水分子が酸性アミノ酸残基による活性化を受けなくともわずかの活性を残すために、反転型加水分解酵素では一般塩基触媒残基に変異を導入しても加水分解活性は完全には除去できないと考えられる。そのため、反転型加水分解酵素の加水分解活性を低下させることは効率的なグライコシンターゼを得るために重要である。

Collins ら (72,79) は、GH8 エンドキシラナーゼであり Rex とアミノ酸配列上 32.6% 相同性を示す pXyl の GH8 に保存されているチロシン残基 (Y203) に変異を導入することによりキシランの加水分解活性が大幅に低下することを見いだした。この残基は一般塩基触媒残基 (D281) とともに求核触媒水分子と水素結合を形成していた。わずかに残存した加水分解活性を元に測定した pXyl-Y203F 変異酵素の pH-活性曲線から、Y203 は一般塩基触媒残基ではなく、触媒水分子を正しい位置に配位するために重要な残基であることが結論された (79)。そこで、一次配列および構造 (69) から同定された Rex の相当残基である Y198 (図 8) に対して変異導入を試みた。

Y198 単変異酵素と Y198, D263 二重変異酵素の F⁻ 遊離活性および加水分解活性を表 3 に示した。Y198 への変異導入により加水分解活性が劇的に低下した (31.2→0.06 s⁻¹) が、F⁻ 遊離活性はわずかに増加した。Y198F の F⁻ 遊離活性は、一般塩基触媒残基 (D263) 変異酵素よりも 10 倍高かった。F/H 比は 78 であり、一般塩基触媒残基の変異で得られる最も良いグライコシンターゼである D263C と比較して 4 倍の数値になった。二重変異酵素では F⁻ 遊離活性の低下が見られた。Y198F/D263N の F⁻ 遊離活性は Y198F の 1/20 であり、D263N のそれと同程度であった。Y198F/D263C F⁻ 遊離活性は非常に低かった。Y198F/D263N の F/H 比は Y198F の二倍であった。しかしながら、Y198F の F/H 比は生成物の蓄積に

Fig. 8. Schematic description of the catalytic residues of Rex.

best glycosynthase mutant based on the sufficient amount of accumulation of X_3 due to its high F^- releasing activity and an adequate F/H value.

F. Concept to obtain glycosynthase activity from an inverting GH

The relationship between the F^- releasing activity and the hydrolytic activity of Rex during acquiring the glycosynthase activity was completely different from those in retaining enzymes. In the case of retaining enzymes, the parent enzyme does not possess F^- releasing activity (15,41), and a mutation at the base residue completely eliminates the hydrolytic activity because the base residue directly attacks the carbon 1 (C1) of the hydrolyzed glycoside. Thus, while converting retaining GHs into glycosynthases, it is important to acquire F^- releasing activity through mutations.

In contrast, the water molecule activated by the base residue attacks the C1 of the glycoside in inverting enzymes. The mutation of the base residue cannot completely eliminate the hydrolytic activity because the water molecule retains some activity without the aid of the catalytic residue. The parent enzyme possesses F^- releasing activity, and the mutations at the base residue cause a decrease in this activity. Thus, to convert inverting GHs

十分な数値でありかつ、 F^- 遊離活性が非常に高いため、Y198F を最も効率的なグライコシンターゼと判断した。

F. 反転型加水分解酵素をグライコシンターゼに変換する設計

Rex のグライコシンターゼ活性の獲得に関する F^- 遊離活性と加水分解活性の関係は、保持型加水分解酵素のものと全く異なっていた。保持型加水分解酵素では、親酵素は F^- 遊離活性を示さない(15,41)。また一般塩基触媒残基が求核試薬として直接アノメリック炭素を攻撃しているために、この残基の除去により加水分解が完全に除去される。以上のような状況により、保持型加水分解酵素では一般塩基触媒残基を変異させて F^- 遊離活性の高い変異酵素を探すことが重要である。

対照的に、反転型加水分解酵素では一般塩基触媒残基により活性化された水分子が求核試薬として作用しているために、この残基に変異を入れても活性化されない水分子に幾ばくかの活性が残るために加水分解活性を完全に除去することができない。また、親酵素がもともと F^- 遊離活性を持っており、一般塩基触媒残基への変異導入は F^- 遊離活性の低下をもたらす。反転型酵素のグライコシンターゼ化に重要なことは F^- 遊離活性の低下を防ぎながら加水分解活性を最大限低下させることである。

into glycosynthases, it is important to minimize the decrease in F^- releasing activity, while maximizing the decrease in hydrolytic activity.

A suggested concept for creating a glycosynthase from an inverting GH involves mutating a residue holding the nucleophilic water molecule with the general base residue, while keeping the general base residue intact.

G. Glycosynthase from an inverting GH with atypical reaction mechanism

A second example of a glycosynthase derived from an inverting GH was recently reported to be GH95 α -1,2-L-fucosidase from *Bifidobacterium bifidum* (AfcA) (80). It is the first report of a glycosynthase from an inverting α -glycosidase. This enzyme was the first reported to hydrolyze α -1,2-linked L-fucose specifically at the non-reducing end (81,82). No significant identity in the existing amino acid sequences was detected with any other fucosidases, and the enzyme was classified in a new family, GH95. Because α -1,2-fucosylated sugars are often found in biologically-functional sugar chains, the enzymatic production of such compounds are desired. However, the enzyme is an inverting enzyme and no transglycosylation

以上のことから、反転型加水分解酵素をグライコシンターゼに変換するために、求核試薬として作用する水分子を一般塩基触媒残基と共に保持する残基に変異を導入し一般塩基触媒残基には変異を導入しないような分子設計を行えば良いと結論した。反転型加水分解酵素のグライコシンターゼに変換するための分子設計が可能になったことから、今後これらの酵素のグリコシド合成への応用が期待される。

G. 標準的でない反応機構を示す反転型加水分解酵素のグライコシンターゼ化

反転型加水分解酵素の二例目は、GH95に属する *Bifidobacterium bifidum* 由来 α -1,2-L-フコシダーゼ (AfcA) で報告された(80)。これは、反転型 α グリコシダーゼ由来グライコシンターゼの最初の報告である。この酵素は、非還元末端に α -1,2 結合した L-フコースを特異的に切断する酵素として報告された(81,82)。他の α -フコシダーゼと相同性を示さず、当時新規なファミリー GH95 に分類された。非還元末端が α -1,2 フコシル化された構造は、生化学的に重要な糖鎖にしばしば見られるため、このような糖鎖の酵素的合成法の開発が望まれていた。しかしながら AfcA は反転型酵素であり糖転移活性は検出されなかった。

Fig. 9. Schematic description of the catalytic residues of AfcA.

activity was detected.

Structural analysis of AfcA revealed that the reaction mechanism was different from typical inverting GHs (83). AfcA has an acidic proton donor residue, E566, similar to typical inverting GHs; however, the base residue activating the nucleophilic water is not an acidic amino acid, but an asparagine residue, N423, that is activated by an acidic residue, D766. The catalytic water residue is held by another asparagine residue, N421, apart from N423 (Fig. 9).

These three residues were mutated to glycine and the glycosynthase activities were examined by using beta-fucosyl fluoride as the donor and lactose as the acceptor. The product was detected significantly only in the D766G mutant. The structure of the product was determined to be 2'-fucosyllactose as expected from the specificity of AfcA (80).

In this case, the residue mutated (D766) was not the residue holding the catalytic water molecule with the base residue (N421). Instead, the mutation of the residue activating the base residue was changed, while the base residue, N423, was kept intact. Though the catalytic mechanism of AfcA is different from other typical inverting GHs, it should be noted that the base residue should be intact to obtain the best glycosynthase mutant.

Acknowledgements

This work was supported in part by a grant from the Program for Promotion of Basic Research Activities for Innovative Biosciences (PROBRAIN), Tokyo, Japan.

References

1. Nishimoto, M., and Kitaoka, M. (2007) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 2101–2104
2. Totani, K., Yasutake, N., Murata, T., and Usui, T. (2004) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **16**, 383–392
3. Liu, Z., Lu, Y., Zhang, J., Pardee, K., and Wang, P. G. (2003) *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2110–2115
4. Koizumi, S. (2003) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **15**, 65–74
5. Kitaoka, M., and Hayashi, K. (2002) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **14**, 35–50
6. Murata, T., and Usui, T. (2000) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **12**, 161–174
7. Henrissat, B., and Bairoch, A. (1996) *Biochem. J.* **316**, 695–696
8. Davies, G., and Henrissat, B. (1995) *Structure* **3**, 853–859
9. Henrissat, B., and Bairoch, A. (1993) *Biochem. J.* **293**, 781–788
10. Henrissat, B. (1991) *Biochem. J.* **280**, 309–316
11. Sinnott, M. L. (1990) *Chem. Rev.* **90**, 1171–1202
12. Nakakuki, T. (2003) *Trends Glycosci. and Glycotechnol.* **15**, 57–64
13. Hehre, E. J., Brewer, C. F., and Genghof, D. S. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 5942–5950
14. Becker, D., Johnson, K. S., Koivula, A., Schulein, M., and Sinnott, M. L. (2000) *Biochem. J.* **345**, 315–319
15. Williams, S. J., and Withers, S. G. (2000) *Carbohydr. Res.* **327**, 27–46
16. Matsui, H., Blanchard, J. S., Brewer, C. F., and Hehre, E. J. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 8714–8716
17. Nakano, M., Brewer, C. F., Kasumi, T., and Hehre, E. J. (1989) *Carbohydr. Res.* **194**, 139–144
18. Kasumi, T., Tsumuraya, Y., Brewer, C. F., Kersters-Hilderson, H., Claeysens, M., and Hehre, E. J. (1987) *Biochemistry* **26**, 3010–3016
19. Kasumi, T., Brewer, C. F., Reese, E. T., and Hehre, E. J. (1986) *Carbohydr. Res.* **146**, 39–49
20. Hehre, E. J., Sawai, T., Brewer, C. F., Nakano, M., and Kanda, T. (1982) *Biochemistry* **21**, 3090–3097
21. Konstantinidis, A. K., Marsden, I., and Sinnott, M. L. (1993) *Biochem. J.* **291**, 883–888
22. Kitahata, S., Brewer, C. F., Genghof, D. S., Sawai, T., and Hehre, E. J. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 6017–6026
23. Jakeman, D. L., and Withers, S. G. (2002) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **14**, 13–25

AfcAの構造解析の結果から、本酵素の触媒メカニズムは典型的な反転型加水分解酵素のものとは異なっていることが示された(83)。AfcAは酸性アミノ酸残基E566をプロトン供与基としており、この点は通常の反転型加水分解酵素と同様である。一般塩基触媒残基は通常と異なり酸性アミノ酸残基ではなくアスパラギンN423であり、この残基は酸性アミノ酸残基D766により活性化されていた。求核試薬として作用する水はN423と共にもう一つのアスパラギン残基N421により保持されていた(図9)。

これらの3残基をそれぞれグリシンに変換した変異酵素を作製し、 β -フコシルフルオリドをドナーとしラクトースをアクセプターとした反応を調べた。その結果、D766Gに最も強い生成物の蓄積が観測された。生成物は、AfcAの基質特異性から予測されるとおり2'-フコシルラクトースであった(80)。

この場合有効な変異は一般塩基触媒残基と共に水を保持する残基(N421)ではなく、一般塩基触媒残基を活性化している残基(D766)であった。AfcAの触媒機構は通常の反転型加水分解酵素とは異なるが、一般塩基触媒残基を残したままそれに関わる残基に変異を導入することによりグライコシンターゼ化を達成したことは共通する点である。

24. MacKenzie, L. F., Wang, Q. P., Warren, R. A. J., and Withers, S. G. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 5583–5584
25. Tao, H., Peralta-Yahya, P., Decatur, J., and Cornish, V. W. (2008) *Chembiochem* **9**, 681–684
26. Wilkinson, S. M., Liew, C. W., Mackay, J. P., Salleh, H. M., Withers, S. G., and McLeod, M. D. (2008) *Org. Lett.* **10**, 1585–1588
27. Wang, L. X. (2008) *Carbohydr. Res.* **343**, 1509–1522
28. Shaikh, F. A., and Withers, S. G. (2008) *Biochem. Cell Biol.* **86**, 169–177
29. Ben-David, A., Shoham, G., and Shoham, Y. (2008) *Chem. Biol.* **15**, 546–551
30. Marton, Z., Tran, V., Tellier, C., Dion, M., Drone, J., and Rabiller, C. (2008) *Carbohydr. Res.* **343**, 2939–2946
31. Faijes, M., and Planas, A. (2007) *Carbohydr. Res.* **342**, 1581–1594
32. Blanchard, S., Armand, S., Couthino, P., Patkar, S., Vind, J., Samain, E., Driguez, H., and Cottaz, S. (2007) *Carbohydr. Res.* **342**, 710–716
33. Yang, M., Davies, G. J., and Davis, B. G. (2007) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **46**, 3885–3888
34. Hommalai, G., Withers, S. G., Chuenchor, W., Cairns, J. R., and Svasti, J. (2007) *Glycobiology* **17**, 744–753
35. Ben-David, A., Bravman, T., Balazs, Y. S., Czjzek, M., Schomburg, D., Shoham, G., and Shoham, Y. (2007) *Chembiochem* **8**, 2145–2151
36. Piens, K., Henriksson, A. M., Gullfot, F., Lopez, M., Faure, R., Ibatullin, F. M., Teeri, T. T., Driguez, H., and Brumer, H. (2007) *Org. Biomol. Chem.* **5**, 3971–3978
37. Mullegger, J., Chen, H. M., Warren, R. A., and Withers, S. G. (2006) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**, 2585–2588
38. Vaughan, M. D., Johnson, K., DeFrees, S., Tang, X., Warren, R. A., and Withers, S. G. (2006) *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 6300–6301
39. Kim, Y. W., Fox, D. T., Hekmat, O., Kantner, T., McIntosh, L. P., Warren, R. A., and Withers, S. G. (2006) *Org. Biomol. Chem.* **4**, 2025–2032
40. Faijes, M., Saura-Valls, M., Perez, X., Conti, M., and Planas, A. (2006) *Carbohydr. Res.* **341**, 2055–2065
41. Sugimura, M., Nishimoto, M., and Kitaoka, M. (2006) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 1210–1217
42. Faure, R., Saura-Valls, M., Brumer, H., 3rd, Planas, A., Cottaz, S., and Driguez, H. (2006) *J. Org. Chem.* **71**, 5151–5161
43. Tao, H., Peralta-Yahya, P., Lin, H., and Cornish, V. W. (2006) *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 6940–6953
44. Hancock, S. M., Vaughan, M. D., and Withers, S. G. (2006) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**, 509–519
45. Drone, J., Feng, H.-y., Tellier, C., Hoffmann, L., Tran, V., Rabiller, C., and Dion, M. (2005) *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 1997–1983
46. Trincone, A., Giordano, A., Perugino, G., Rossi, M., and Moracci, M. (2005) *Chembiochem* **6**, 1431–1437
47. Kim, Y. W., Chen, H., and Withers, S. G. (2005) *Carbohydr. Res.* **340**, 2735–2741
48. Daines, A. M., Maltman, B. A., and Flitsch, S. L. (2004) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 106–113
49. Watts, A. G., and Withers, S. G. (2004) *Biochem. J.* **380**, e9–10
50. Kim, Y. W., Lee, S. S., Warren, R. A., and Withers, S. G. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 42787–42793
51. Lin, H., Tao, H., and Cornish, V. W. (2004) *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15051–15059
52. van Lieshout, J., Faijes, M., Nieto, J., van der Oost, J., and Planas, A. (2004) *Archaea* **1**, 285–292
53. Fairweather, J. K., Hrmova, M., Rutten, S. J., Fincher, G. B., and Driguez, H. (2003) *Chemistry* **9**, 2603–2610
54. Jahn, M., Stoll, D., Warren, R. A., Szabo, L., Singh, P., Gilbert, H. J., Ducros, V. M., Davies, G. J., and Withers, S. G. (2003) *Chem Commun (Camb)*, 1327–1329
55. Ducros, V. M., Tarling, C. A., Zechel, D. L., Brzozowski, A. M., Frandsen, T. P., von Ossowski, I., Schulein, M., Withers, S. G., and Davies, G. J. (2003) *Chem. Biol.* **10**, 619–628
56. Trincone, A., Giordano, A., Perugino, G., Rossi, M., and Moracci, M. (2003) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 4039–4042
57. Faijes, M., Perez, X., Perez, O., and Planas, A. (2003) *Biochemistry* **42**, 13304–13318
58. Jakeman, D. L., and Withers, S. G. (2002) *Can. J. Chem.* **80**, 866–870
59. Hrmova, M., Imai, T., Rutten, S. J., Fairweather, J. K., Pelosi, L., Bulone, V., Driguez, H., and Fincher, G. B. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 30102–30111
60. Okuyama, M., Mori, H., Watanabe, K., Kimura, A., and Chiba, S. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 928–933
61. Tolborg, J. F., Petersen, L., Jensen, K. J., Mayer, C., Jakeman, D. L., Warren, R. A., and Withers, S. G. (2002) *J. Org. Chem.* **67**, 4143–4149
62. Fairweather, J. K., Faijes, M., Driguez, H., and Planas, A. (2002) *Chembiochem* **3**, 866–873
63. Nashiru, O., Zechel, D. L., Stoll, D., Mohammadzadeh, T., Warren, R. A., and Withers, S. G. (2001) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **40**, 417–420
64. Mayer, C., Jakeman, D. L., Mah, M., Karjala, G., Gal, L., Warren, R. A., and Withers, S. G. (2001) *Chem. Biol.* **8**, 437–443
65. Brun, E., Brumer, H., 3rd, MacKenzie, L. F., Withers, S. G., and McIntosh, L. P. (2001) *J. Biomol. NMR* **21**, 67–68
66. Mayer, C., Zechel, D. L., Reid, S. P., Warren, R. A., and Withers, S. G. (2000) *FEBS Lett.* **466**, 40–44
67. Trincone, A., Perugino, G., Rossi, M., and Moracci, M. (2000) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**, 365–368
68. Malet, C., and Planas, A. (1998) *FEBS Lett.* **440**, 208–212
69. Fushinobu, S., Hidaka, M., Honda, Y., Wakagi, T., Shoun, H., and Kitaoka, M. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 17180–17186
70. Honda, Y., Fushinobu, S., Hidaka, M., Wakagi, T., Shoun, H., and Kitaoka, M. (2005) *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **61**, 291–292
71. Honda, Y., and Kitaoka, M. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 55097–55103
72. Collins, T., Meuwis, M. A., Stals, I., Claeysens, M., Feller, G., and Gerday, C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 35133–35139
73. Van Petegem, F., Collins, T., Meuwis, M. A., Gerday, C., Feller, G., and Van Beeumen, J. (2003) *J Biol Chem* **278**, 7531–7539
74. Guerin, D. M., Lascombe, M. B., Costabel, M., Souchon, H., Lamzin, V., Beguin, P., and Alzari, P. M. (2002) *J. Mol. Biol.* **316**, 1061–1069

75. Takami, H., Nakasone, K., Takaki, Y., Maeno, G., Sasaki, R., Masui, N., Fuji, F., Hirma, C., Nakamura, Y., Ogasawara, N., Kuhara, S., and Horikoshi, K. (2000) *Nucleic Acids Res.* **28**, 4317–4331
76. Shintate, K., Kitaoka, M., Kim, Y. K., and Hayashi, K. (2003) *Carbohydr. Res.* **338**, 1981–1990
77. Honda, Y., and Kitaoka, M. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 1426–1431
78. Honda, Y., Fushinobu, S., Hidaka, M., Wakagi, T., Shoun, H., Taniguchi, H., and Kitaoka, M. (2008) *Glycobiology* **18**, 325–330
79. Collins, T., De Vos, D., Hoyoux, A., Savvides, S. N., Gerday, C., Van Beeumen, J., and Feller, G. (2005) *J. Mol. Biol.* **354**, 425–435
80. Wada, J., Honda, Y., Nagae, M., Kato, R., Wakatsuki, S., Katayama, T., Taniguchi, H., Kumagai, H., Kitaoka, M., and Yamamoto, K. (2008) *FEBS Lett.* **582**, 3739–3743
81. Katayama, T., Sakuma, A., Kimura, T., Makimura, Y., Hiratake, J., Sakata, K., Yamanoi, T., Kumagai, H., and Yamamoto, K. (2004) *J. Bacteriol.* **186**, 4885–4893
82. Katayama, T., Fujita, K., and Yamamoto, K. (2005) *J. Biosci. Bioeng.* **99**, 457–465
83. Nagae, M., Tsuchiya, A., Katayama, T., Yamamoto, K., Wakatsuki, S., and Kato, R. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 18497–18509

Profile of the Authors

Motomitsu Kitaoka is head of Enzyme Laboratory at National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization. He received his Ph.D. from Faculty of Agriculture, The University of Tokyo in 1993. His research interests are mechanism of enzymatic reaction and development of methods to produce oligosaccharides industrially.

Yuji Honda is Associate Professor at Ishikawa prefectural University. He received his Ph.D. from the College of Agriculture, Osaka Prefecture University in 2000. His research interests are enzyme reaction mechanisms and enzyme engineering for synthesis of various oligosaccharides.

Shinya Fushinobu is Assistant Professor in the Laboratory of Enzymology at Department of Biotechnology, The University of Tokyo. He received his Ph.D. from the Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo in 1999. His research interests are the structure and function of enzymes, especially about carbohydrate-active enzymes.

Profile of the Authors

Masafumi Hidaka is a postdoctoral fellow in the Laboratory of Enzymology at Department of Biotechnology, The University of Tokyo. He received his Ph.D. from the Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo in 2005. He worked as a JSPS research fellow at National Food Research Institute (NFRI). His research interests are the structural insights into mechanism of enzymatic reaction, especially about carbohydrate-active enzymes.

Takane Katayama is Associate Professor at Ishikawa Prefectural University. He received his Ph.D. from the Graduate School of Agriculture, Kyoto University in 1999. His research field is applied microbiology.

Kenji Yamamoto is Professor of Graduate School of Biostudies, Kyoto University. He received his Ph.D from the Faculty of Agriculture, Kyoto University, in 1979. His research interests are production and application of microbial enzymes related to biosynthesis and catabolism of sugar chain in glycoconjugates and oligosaccharides.