Glycosynthases : New Tools for Oligosaccharide Synthesis

グリコシンターゼ：オリゴ糖の新規合成手法

Jakeman, David L. ; and Withers, Stephen G.

Department of Chemistry, University of British Columbia, 2036 Main Mall, Vancouver, V6T 1Z1, Canada

FAX: 1-604-822-8869, E-mail:withers@chem.ubc.ca

Key Words : oligosaccharide synthesis, protein engineering, glycosyl transfer, enzyme mechanism, glycosidase, glycosyl transferase**Abstract**

A wealth of knowledge has been amassed on the diverse roles played by oligosaccharides in biological systems. To further understand and exploit the activities of oligosaccharides, access is required to natural and nonnatural oligosaccharides, yet the synthesis of oligosaccharides remains one of the most challenging areas of chemistry. Glycosynthases represent a new class of mutant enzymes that are available to complement chemical synthesis and the use of glycosyl transferases as routes towards oligosaccharides. Glycosynthases are mutant glycosidases with a non-nucleophilic amino acid replacing the catalytic nucleophile. They are hydrolytically inactive, but when presented with an activated donor sugar, that mimics the covalent glycosyl-enzyme intermediate, they efficiently condense donor sugar and acceptor sugar in high yield. This review illustrates the progress made since the discovery of the first glycosynthase in the author's laboratory (JACS, 1998, 120, 5583-5584). Several different glycosidases have been engineered to transfer a range of different donor sugars onto a wide variety of acceptor sugars, providing new synthetic routes to oligosaccharides. Advances have also been made in increasing the rates of transglycosylation of particular glycosynthases. This, in turn, has broadened the range of oligosaccharides accessible *via* glycosynthase methodology.

要 約

生命現象におけるオリゴ糖鎖の多様な働きが次々と明らかにされている。オリゴ糖の持つ生理活性をより深く理解し利用していくためには、天然型および非天然型オリゴ糖を入手する必要がある。したがって、オリゴ糖合成は化学における最も活発に研究されている分野の一つとなっている。ここで紹介するグリコシンターゼは全く新しいタイプの変異酵素であり、有機化学的な方法や糖転移酵素を用いる従来法と共に、オリゴ糖合成に利用することができる。グリコシンターゼとは、糖加水分解酵素の触媒部位の求核性アミノ酸を非求核性アミノ酸で置換した変異体のことであり、加水分解に対して不活性である。しかし、糖受容体の存在下、糖-酵素中間体に類似した構造をもつ糖供与体に作用させると、高収率で糖転移反応を進行させることができる。本総説は、筆者の研究室で開発された一連のグリコシンターゼを用いた最近の結果をまとめたものである (JACS, 1998, 120, 5583-5584)。いくつかの糖供与体をさまざまな糖受容体に転移させることを目的として、数種類の加水分解酵素に対して変異導入を行った。また、あるグリコシンターゼに関しては、糖転移反応速度の向上が図られた。このことによって、グリコシンターゼを利用する広範なオリゴ糖合成が可能となった。

A. Introduction

A facile and universal synthetic route for glycosidic linkage formation has been a long sought after, yet elusive goal, of

A. はじめに

一般的で簡便なグリコシル化反応の確立は、20世紀の合成化学における最も重要かつ困難な課題の一つであった。一般性

Abbreviations : GlcF, α -D-glucosyl fluoride; GalF, α -D-galactosyl fluoride; LamF, α -D-laminaribiosyl fluoride; CelF, α -D-cellobiosyl fluoride; LacF, α -lactosyl fluoride; ManF, α -mannosyl fluoride; Glc-4-NP, 4-nitrophenyl β -D-glucoside; Xyl-4-NP, 4-nitrophenyl β -D-xyloside; 2-Cl-Glc-2,4-DNP, 2,4-dinitrophenyl 2-chloro-2-deoxy- β -D-glucoside; Man-4-NP, 4-nitrophenyl β -D-mannoside; Glc- β -(1-4)-glc-4-NP, 4-nitrophenyl β -D-cellobioside; Glc- β -(1-4)-glc-OPh-4-OMe, 4-methoxyphenyl β -D-cellobioside; GlcNAc-4-NP, 4-nitrophenyl 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucoside; Glc-Ph, phenyl β -D-glucoside; Glc-2-NP, 2-nitrophenyl β -D-glucoside; 2-F-Glc-2,4-DNP, 2,4-dinitrophenyl 2-deoxy-2-fluoro- β -D-glucoside; Glc-MU, 4-methylumbelliferyl β -D-glucoside; Glc-OPh-4-OMe, 4-methoxyphenyl β -D-glucoside; 2-F-Man-2,4-DNP, 2,4-dinitrophenyl 2-deoxy-2-fluoro- β -D-mannoside; Glc- β -(1-6)-glc-4-NP, 4-nitrophenyl β -D-gentiobioside; Glc- β -(1-4)-glc-MU, 4-methylumbelliferyl β -D-cellobioside; Glc- β -(1-3)-glc-MU, 4-methylumbelliferyl β -D-laminaribioside; Glc-OBn, benzyl glucoside; Xyl-OBn, benzyl xyloside; Man-S-4-NP, 4-nitrophenyl 1-thio- β -D-mannoside; Glc- β -(1-4)-glc-OMe, methyl β -D-cellobioside; (C-2'-Br) Glc- β -(1-4)-glc-OMe, methyl 6-bromo-6-deoxy- β -D-cellobioside; GlcNH₂- β -(1-4)-glcNAc, N-acetyl chitobiose; Glc- β -(1-3)-glc-OBn, benzyl laminaribioside; (C-6''-Br)-Glc- β -(1-4)-glcF, 6''-bromo-6''-deoxy- α -D-cellobiosyl fluoride; (C-6''-NH₂)-Glc- β -(1-4)-glcF, 6''-amino-6''-deoxy- α -D-cellobiosyl fluoride; Xyl- α -(1-6)-glc- β -(1-4)-glcF, α -D-xylopyranosyl-(1-6)- α -D-cellobiosyl fluoride; (C-6'''-Br)-Glc- β -(1-4)-glcF, 6'''-bromo-6'''-deoxy- α -D-cellobiosyl fluoride; Abg, *Agrobacterium* sp. β -glucosidase; Blg, *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4- β -glucanase; Ss, *Sulfolobus solfataricus* β -glucosidase; Cel7B, *Humicola insolens* Cel7B; Man2a, *Cellulomonas fimi* β -mannosidase.

synthetic chemistry throughout the twentieth century. The availability of such a scheme would permit the synthesis of one of the most structurally diverse and complex class of molecules. Complex carbohydrates have long been known to play important roles as energy sources and structural elements within cells, and more recently they have been associated with cell differentiation and cell adhesion in inflammatory processes, malignant cell transformations and pathogenesis of various diseases (1–6). To expand our understanding of the various roles that oligosaccharides play in these important cellular events synthetic protocols must be developed that enable straightforward stereoselective syntheses of oligosaccharides.

The chemical synthesis of oligosaccharides is a lengthy, highly skilled endeavour that currently lacks experimental simplicity and the requisite selectivity for all but a few specialized laboratories to undertake. One potential solution to this synthetic problem may be the solid phase synthesis of complex carbohydrates (7, 8), which could facilitate their use in biological research in a comparable way to the solid phase synthesis of oligonucleotides (9) and oligopeptides (10). An automated solid phase synthesizer for oligosaccharides will hopefully provide a route into small quantities of complex carbohydrates hitherto unavailable to the research community. However, general use of such a strategy is still far from assured. The problems associated with large-scale industrial synthesis of oligosaccharides are likely to be overcome by choosing chemoenzymatic approaches as synthetic tools. Glycosyl transferases are the enzymes responsible for oligosaccharide synthesis *in vivo*. Glycosyl transfer from a nucleotide diphospho sugar onto a suitable acceptor sugar with release of uridine diphosphate yields the glycosidic linkage. Transferases are highly efficient catalysts for the stereo- and regio-specific generation of glycosidic linkages, yet their pronounced acceptor specificity restricts the use of transferases for the synthesis of a wide array of natural and non-natural oligosaccharides. In contrast, retaining glycosidases, the enzymes that degrade oligosaccharides, are inherently more promiscuous in their substrate profiles than are transferases and have been studied more extensively due to the ease of screening for wild-type glycosidase activity and facile enzyme isolation.

Glycosidases have been grouped into over 80 different families based on amino acid sequence similarity (11, 12). All enzymes within each family cleave the glycosidic linkage with the same stereochemical outcome, by either an inverting or a retaining mechanism. In addition, the enzymes within each family all have the same structural fold yet they may differ in substrate specificity. Retaining glycosidases hydrolyse glycosides through a double-displacement mechanism (Fig. 1a) with an active site that contains two carboxylic acid residues: one residue acts as a nucleophile and the other as an acid / base catalyst. The mechanism of hydrolysis proceeds *via* protonation of the leaving aglycone moiety by the acid / base catalyst and attack by the nucleo-

のあるグリコシル化反応を開発することができれば、構造的に最も多様に複雑な化合物である糖質を合成することが可能になる。糖鎖が細胞のエネルギー源や構築物質として重要な働きをすることは周知のことである。また最近、オリゴ糖が細胞分化、炎症過程における細胞接着、悪性細胞の転移、そしてさまざまな病気の感染に関与することが明らかにされている(1–6)。糖鎖がこのように重要な細胞内の生命現象にどのように関わっているかを理解するためにも、オリゴ糖を簡便かつ選択的に合成する方法の開発が望まれている。

オリゴ糖を有機化学的に合成するためには、長い反応ステップと高度な技術を必要とする。このような化学合成は、少数の専門家によって研究されてはいるものの、一般に実験操作が煩雑であり、選択性も完全なものではない。これらの問題を解決する一つの方策として、糖鎖の固相合成が考えられる(7, 8)。これはオリゴヌクレオチド(9)やオリゴペプチド(10)の固相合成と共に、生物学的研究を行うに当たって極めて有用な道具となり、オリゴ糖の自動固相合成装置が開発されれば、今まで不可能であった複雑な糖鎖の微量合成も可能となる。しかし、このような方法を一般的に用いることは大変難しいのが現状であり、オリゴ糖を大規模スケールで工業的に合成するためには、化学-酵素的アプローチを選択することが解決への近道だと考えられる。ところで、*in vivo*でオリゴ糖を合成する酵素として糖転移酵素が知られている。糖ヌクレオチド二リン酸からウリジン二リン酸が遊離することにより、糖受容体への転移が起こり、グリコシド結合が形成される。糖転移酵素は、グリコシド結合を高い位置および立体特異性で形成させる非常に効率のよい触媒であるが、基質特異性が厳密すぎるため、幅広く天然あるいは非天然オリゴ糖へ適用するには不向きである。これに対し、立体保持型の糖加水分解酵素は、糖転移酵素ほど基質特異性が高くなく、また活性スクリーニングと精製が容易であるため、数多くの研究がなされてきた。

糖加水分解酵素は、アミノ酸配列の相同性から80以上のファミリーに分類される(11, 12)。各ファミリーの酵素は、立体反転機構あるいは立体保持機構のいずれかでグリコシド結合を切断する。また各ファミリーに含まれる酵素は、類似の折りたたみ構造を有するが、基質特異性は異なっている。立体保持型酵素を用いた場合、活性サイトの二つのカルボン酸残基が関与する二重反転機構を経由して、グリコシド結合が切断される(図1a)。カルボン酸残基の一方は求核性残基として働き、もう片方は酸/塩基触媒として働く。まず、酸/塩基触媒により、アグリコン上の酸素原子がプロトン化され、続いて求核性残基のカルボン酸がアノマー炭素を攻撃する。その結果、グリコシド結

Fig. 1. Hydrolysis (1a) and transglycosylation (1b) mechanism of a retaining β -glucosidase.

philic carboxylic acid at C1. Thus, cleavage of the glycosidic linkage affords a glycosyl-enzyme intermediate that can decompose with two possible outcomes. Attack of water on the glycosyl-enzyme intermediate releases a hydrolysed sugar but, if the water molecule is replaced by a competing sugar, then transglycosylation occurs and a new glycosidic linkage is formed (Fig. 1b). The use of transglycosylation reactions to synthesise complex carbohydrates has several advantages over the use of transferases. A wider selection of glycosidases is currently available, glycosidases are intrinsically less specific in substrate choice than transferases, the availability of requisite donors and acceptors is high and cost of substrates is low compared to those for transferases. However, the fact that any oligosaccharide product synthesised by a glycosidase remains a substrate for the enzyme and can undergo hydrolysis results in yields that are often low. Approaches to solving the synthetic conundrum presented by using glycosidases have been, until recently, limited to a case-by-case study, often involving organic co-solvents or product removal to increase yields. Unfortunately, no universal solution was available.

We have mastered the inherent problem of product hydrolysis when using retaining glycosidases run in transglycosylation mode by the engineering of specific mutants to remove the catalytic nucleophile. These mutants fold, maintaining the active site architecture, yet are hydrolytically inactive towards oligo- and polysaccharide substrates because they are incapable of forming the reactive glycosyl-enzyme intermediate. Transfer of a donor sugar onto an acceptor sugar is catalyzed by these mutants provided that they are presented with

合は切断され、糖-酵素中間体が生成する。この中間体は二通りの経路によって分解される。すなわち、糖-酵素中間体に水が攻撃すれば加水分解反応となり、最終的に糖を遊離する。一方、水分子に優先して他の糖が攻撃すれば、糖転移反応となり、この場合は新しいグリコシド結合が形成される(図 1 b)。複雑な糖鎖を合成する際、糖加水分解酵素の転移反応を用いる方が、前述した糖転移酵素を用いるよりも有利な点がある。それは、糖加水分解酵素の方が酵素の選択の幅が広いこと、そして、糖加水分解酵素の方が転移酵素よりも基質特異性に幅があることである。さらに糖供与体および糖受容体も入手しやすく、基質にかかるコストも糖転移酵素の場合に比べ低い。しかし、糖加水分解酵素を用いる方法には以下の問題点がある。つまり、オリゴ糖生成物が加水分解酵素により合成されるということは、生成オリゴ糖も酵素の基質として認識されることを意味する。したがって、生成物は加水分解を受けることになり、結果的に反応収率は低くなることが多い。この合成上の問題点を解決するには、現在のところ状況に応じて対処する他はない。例えば、収率を向上させるために、有機溶媒を添加したり、生成物を除去する工夫がなされているが、残念ながら一般的な解決策は見出されてこなかった。

我々は部位特異的変異技術を用いて立体保持型酵素の求核性触媒残基を除去することにより、糖転移反応における生成グリコシドの加水分解という固有の問題を解決した。変異体の折りたたみ構造は活性サイトの構造を維持しているが、反応時に糖-酵素中間体が形成されないため、オリゴ糖や多糖基質に対し加水分解活性を示さない。また、野生型酵素に対する基質と逆の

Fig. 2. Transglycosylation mechanism of a glycosynthase.

a donor sugar of opposite anomeric configuration to the wild-type enzyme's substrate. The activated donor sugar, which must contain a small leaving group, e.g. fluoride, is recognised by the mutant enzyme as an analogue of the covalent glycosyl-enzyme intermediate, and is thus transferred to the acceptor sugar by a mechanism akin to the interception of the glycosyl-enzyme intermediate in a transglycosylation reaction (Fig. 2). Because the mutant enzymes are hydrolytically inactive the products formed by the glycosynthase reaction are isolated in excellent yields (in some instances > 95 %). Since the publication of the first glycosynthase, *Agrobacterium* β -glucosidase (Abg) E358A, (13) several other glycosynthases have been generated (14–19) broadening the range of donor and acceptor sugars. It is also important to note that the activated donor sugars used by glycosynthase enzymes are generally prepared in a three-step procedure that is easily performed in the laboratory and that does not require expensive reagents or catalysts. Thus glycosynthase-mediated catalysis of glycoside formation may provide a cost-effective, large scale, technology for the synthesis of oligosaccharides. This review summarises the wealth of data presented for these mutant enzymes and outlines possible avenues of oligosaccharide synthesis using glycosynthases in the future.

B. Glycosynthase-Mediated Transglycosylation Reactions

The glycosynthases presented in Table I have been developed from bacterial (both mesophilic and thermophilic) and fungal sources, and from both *endo*- and *exo*-acting glycosidases. The mutant enzymes presented are from four different glycosyl hydrolase families and have two structural folds, either a $(\beta/\alpha)_8$ barrel or a β -jelly roll. The glycosynthases currently available synthesise primarily β -(1-4)- linkages, although undoubtedly new enzymes capable of condensing sugars together with other glycosidic linkages will be characterised.

B-1. Glycosynthases Derived From *exo*-Glycosidases

The β -glucosidase from *Agrobacterium* sp. (Abg) provided the first example of a glycosynthase. The wild-type en-

アノマー配向の糖供与体を用いることにより、糖受容体への転移を起こすことができる。フッ化物イオンのような小さな脱離基を持つ活性化糖供与体は、糖-酵素中間体アナログとして変異体に認識される。その結果、この糖供与体は、糖-酵素中間体を經由する反応と同じような機構で、糖受容体に対して糖転移を起こす(図2)。変異体は加水分解活性を持たないため、反応生成物は分解されことなく高収率で単離される(収率95%以上の例あり)。我々が、*Agrobacterium* 由来 β -グルコシダーゼ(Abg)から調製されるグリコシンターゼE358Aを初めて報告して以来(13)、数種のグリコシンターゼが開発され(14–19)、広範な糖供与体と糖受容体に対して適用されてきた。また、グリコシンターゼの基質となる活性な糖供与体は、高価な試薬や触媒を用いずに3ステップで簡単に調製できることも特筆すべきである。グリコシンターゼを触媒とするグリコシル化法は、オリゴ糖合成を経済的に大量生産するための有用な手法となる。本総説では、これらの変異体を用いるグリコシル化反応に関して得られた多くの知見を述べるとともに、グリコシンターゼの将来を展望する。

B. グリコシンターゼによる糖転移反応

表 I に、常温および高熱性のバクテリアとカビ由来のエンド型あるいはエキソ型加水分解酵素から調製したグリコシンターゼを示す。これらの変異体は、4つの異なる加水分解酵素ファミリーに属し、 $(\beta/\alpha)_8$ バレルあるいは β -jelly roll構造を持つ。現在、グリコシンターゼにより構築できるのは、主に β -(1-4)結合であるが、将来的には他のグリコシド結合の構築も可能になるであろう。

B-1. エキソ型グリコシダーゼ由来のグリコシンターゼ

グリコシル化反応に初めて用いられたグリコシンターゼは、 β -グルコシダーゼ(*Agrobacterium* sp. 由来) (Abg)から調製さ

Table I. Glycosynthases: sources and linkages synthesised.

Wild-type enzyme	Mutation	Glycosyl hydrolase		Donor sugar	Linkage(s) synthesised	Reference
		family / GenBank accession # (WT)				
<i>Agrobacterium</i> sp. glucosidase (Abg)	β - E358A	1 / M19033		glcF / galF	β -(1-4)- / β -(1-3)-	(13)
<i>Bacillus licheniformis</i> 1,4- β -glucanase (Blg)	1,3- E134A	16 / X57279		lamF	β -(1-4)-	(15)
<i>Sulfolobus solfataricus</i> glucosidase (Ss)	β - E387G	1 / N. A.		glcF ^a	β -(1-3)- / β -(1-4)- / β -(1-6)-	(14)
<i>Agrobacterium</i> sp. glucosidase (Abg)	β - E358S	1 / M19033		glcF / galF	β -(1-4)- / β -(1-3)-	(16)
<i>Humicola insolens</i> Cel7B	E197A	7 / N. A.		lacF / celF ^b	β -(1-4)-	(17)
<i>Agrobacterium</i> sp. glucosidase (Abg)	β - E358G	1 / M19033		glcF / galF	β -(1-4)-	(18)
<i>Cellulomonas fimi</i> mannosidase (Man2a)	β - E519S	2 / AF126472		manF	β -(1-4)-	(19)

^a External nucleophile of formate used on 2-NP- β -D-glc and 2-NP- β -D-fuc; ^b Cellobiosyl derivatives modified at 6''-Bromo 6''-amino and 6''- α -D-xylopyranosyl-(1-6)- were also substrates; WT = wild-type.

N. A. Not available.

zyme has been characterised as having broad substrate specificity, with preference given to cleaving aryl-glucosides and aryl-galactosides (20). The E358A mutation had been characterised as a correctly folded, yet hydrolytically incompetent mutant enzyme (21, 22), but, when presented with a substrate of the same anomeric configuration as the glycosyl-enzyme intermediate, glycosyl transfer occurs to a suitable acceptor sugar (13). The mutant enzyme Abg E358A was capable of transferring sugars from either α -glucosyl fluoride (glcF) or α -galactosyl fluoride (galF) to a number of different acceptor sugars (Table II; entries 1, 3-5, 7, 9, 11, 14-19, 21). The yields obtained for condensation of galF to all acceptor sugars were very good, although the yields with 2, 4-dinitrophenyl 2-chloro-2-deoxy- β -glucoside and 4-nitrophenyl β -mannoside were significantly lower (64 % and 66 % respectively). The yields were also very good for the transfer of glcF onto various acceptor sugars, (Table II; entries 11, 12, 14-19, 21) indeed, the transfer of donor sugar proceeded so efficiently that the product was, in turn, a suitable acceptor sugar. As a result of repeated donor condensations onto the acceptor sugar a distribution of product yields was observed that could be influenced by carrying out reactions with different donor and acceptor ratios (Table II; entries 16 and 17). The yields were

れた。この野生型酵素は、幅広い基質特異性でアリールグルコシドあるいはアリールガラクトシドを加水分解する(20)。E358Aは、その折りたたみ構造を保持しながら、加水分解活性を示さない変異体である(21, 22)。この変異体に、糖受容体の存在下、糖-酵素中間体と同じアノマー配向を有する基質を作用させると、糖受容体への糖転移反応が起こる(13)。変異体Abg E358Aは、フッ化 α -グルコシル(glcF)またはフッ化 α -ガラクトシル(galF)を、さまざまな糖受容体に転移させることができる(表2; entries 1, 3-5, 7, 9, 11, 14-19, 21)。糖受容体への galFの転移収率は非常に高い。しかし、2, 4-ジニトロフェニル 2-クロロ-2-デオキシ- β -グルコシドおよび4-ニトロフェニル β -マンノシドを用いた場合の収率は低いものであった(それぞれ64%と66%)。糖供与体としてglcFを用いた転移収率も非常に高い(表II; entries 11, 12, 14-19, 21)。糖供与体からの糖転移は非常に起こりやすいため、糖転移生成物は再び糖受容体として使われる。このように糖受容体に糖供与体が繰り返し転移していくため、生成物の収率分布は、糖供与体と糖受容体の比の影響を受ける(表II; entries 16, 17)。受容体に4-NP β -キシロシドを用いた場合の収率は低いけれども、興

Table II. Glycosynthase-mediated transglycosylation reactions using monosaccharide donors.

Entry	Enzyme	Donor	Acceptor	Yield breakdown				Reference
				Total	di-, tri-, tetra-, penta-, hexa-,			
					saccharide product			
				Yield / %				
1	Abg E358A	galF	Glc-4-NP	84				(13)
2	Abg E358S	galF	Glc-4-NP	98				(16)
3	Abg E358A	galF	Xyl-4-NP	81				(13)
				β-(1-3)-				
4	Abg E358A	galF	2-Cl-Glc-2,4-DNP	64				(13)
5	Abg E358A	galF	Man-4-NP	66				(13)
6	Abg E358S	galF	Man-4-NP	80				(16)
7	Abg E358A	galF	Glc-β-(1-4)-glc-4-NP	92				(13)
8	Abg E358S	galF	Glc-β-(1-4)-glc-4-NP	98				(16)
9	Abg E358A	galF	Glc-β-(1-4)-glc-OPh-4-OMe	88				(13)
10	Abg E358S	galF	GlcNAc-4-NP	63				(16)
11	Abg E358A	glcF	Glc-Ph	82	48	34	0	(13)
12	Abg E358A	glcF	Glc-4-NP	72	38	24	10	(13)
13	Abg E358S	glcF	Glc-4-NP	96	0	83	13	(16)
14	Abg E358A	glcF	Glc-2-NP	76	41	29	6	(13)
15	Abg E358A	glcF	2-F-Glc-2,4-DNP	84	38	42	4	(13)
16	Abg E358A	glcF	Glc-MU	83	0	75	8	(13)
				77	0	23	54	
17	Abg E358A	glcF	Glc-OPh-4-OMe	73	44	29	0	(13)
				86	12	66	8	
18	Abg E358A	glcF	Xyl-4-NP	66	12	51	3	(13)
				β-(1-3)-				
19	Abg E358A	glcF	Man-4-NP	79	31	42	6	(13)
20	Abg E358S	glcF	Man-4-NP	59	17	25	17	(16)
21	Abg E358A	glcF	Glc-β-(1-4)-glc-4-NP	92	0	79	13	(13)
				72	0	8	64	
22	Abg E358S	glcF	Glc-β-(1-4)-glc-4-NP	95	0	88	7	(16)
23	Ss-β-Gly	glcF	Glc-2-NP	80				(14)
				β-(1-3)-				
24	Man2a E519S	manF	Man-4-NP	74	21	32 ^a	19 ^b	(19)
25	Man2a E519S	manF	2-F-Man-2,4-DNP	70	7	39 ^a	15 8 1	(19)
26	Man2a E519S	manF	Glc-4-NP	71	22 ^c	36 ^a	13 ^d	(19)
27	Man2a E519S	manF	Xyl-4-NP	94	8 ^c	64 ^a	19 ^f 3	(19)
28	Man2a E519S	manF	Glc-β-(1-4)-glc-4-NP	99		27 ^c	56 ^a 5 1	(19)
29	Man2a E519S	manF	Glc-β-(1-6)-glc-4-NP	91		34 ^c	49 ^g 8 0.5	(19)

^a linked all β -(1-4) and β -(1-4) β -(1-3) in 5 : 2 ratio entry 24; 1 : 1 ratio entry 25; 1 : 15 ratio entry 26;

1 : 2 ratio entry 27; 4 : 1 ratio entry 28

^b linked all β -(1-4) and β -(1-4) β -(1-4) β -(1-3) in 5 : 1 ratio

^c linked β -(1-3)

^d linked β -(1-4) β -(1-4) β -(1-3)

^e linked β -(1-3) and β -(1-4) in 1 : 1 ratio entry 27; 8 : 5 ratio entry 28;

^f linked all β -(1-4) and β -(1-4) β -(1-4) β -(1-3) in 1 : 1 ratio

^g linked β -(1-4) β -(1-3)

once again lower for 4-NP β -xyloside and interestingly reaction of either galF or glcF with 4-NP β -xyloside gave products with a β -(1-3)- linkage. Presumably, the lack of a hydroxymethylene substituent permits an alternative binding orientation of the 4-NP β -xyloside in the enzyme active site, which facilitates deprotonation of the C-3 OH by the acid / base residue E171, and hence attack upon the donor sugar.

The Abg glycosynthase was improved in dramatic fashion by replacing the nucleophilic carboxylic acid with a serine residue rather than the initial alanine (16). Not only did the E358S mutant enzyme exhibit increased rates of transglycosylation, but it also improved the synthetic repertoire of glycosynthases by catalysing reactions that had not been catalysed by the E358A mutant. Thus, the yield observed for the condensation of galF onto 4-NP β -glucoside increased from 84 % with the E358A mutant to 98 % with the E358S mutant (Table II; entries 1 and 2). Similar increases in yield were also observed with the acceptors 4-NP β -cellobioside and 4-NP β -mannoside (Table II; entries 5-8). Undoubtedly, one of the most striking improvements noted with the E358S mutant enzyme was the ability to condense galF and 4-NP β -N-acetylglucosaminide to give 4-NP β -N-acetylglucosaminide in a respectable 63 % yield, in stark contrast to the E358A mutant which is essentially incapable of catalysing the condensation (S. G. Withers, unpublished data). Comparable improvements in yield were also obtained for transfer from glcF (Table II; entries 12, 13, 21 and 22). The only reaction catalysed by E358S not to improve on the total yield observed by E358A glycosynthase was the transfer of glcF onto 4-NP β -mannoside (Table II; entry 19 and 20) although there was an increase in tetrasaccharide product isolated (17 % versus 7 %). Another important discovery with Abg E358S was the observation of standard saturation kinetics, at increasing concentrations of galF, which enabled calculation of both K_m and k_{cat} , unlike the case with Abg E358A where only an apparent k_{cat}/K_m could be observed. The catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of Abg E358S was observed to be 24-fold higher than Abg E358A by measuring fluoride ion release upon the condensation of galF and 4-NP β -glucoside. The Abg E358G mutant was also identified as a glycosynthase (*vide infra*) and the kinetic parameters were measured. We were very pleased to discover that it was even more active than the E358S mutant with a value of k_{cat}/K_m twice that of the E358S mutant enzyme.

Another glycosynthase that transfers glcF is derived from the wild-type β -glucosidase from *Sulfolobus solfataricus* (Ss- β -Gly). The wild-type enzyme has a strong, but not exclusive, preference for the hydrolysis of β -(1-3)- linkages and thus the glycosynthase Ss- β -Gly (14) has been reported to catalyse the condensation of glcF and 2-NP β -glucoside in 80 % yield with formation of a β -(1-3)- linkage (Table II; entry 23). No other yields were reported for this mutant enzyme catalysing the transfer of glcF onto other acceptor sugars. However, the mutant en-

zyme深いことに、galFまたは glcFの 4-NP β -キシロシドへの転移反応は β -(1-3) 結合生成物を与える。これはヒドロキシメチレン基の欠落により、酵素の活性サイトにおいて4-NP β -キシロシドが異なった配向で認識されたためと考えられる。また、酸/塩基残基E171によるC-3 OHの脱プロトン化により、糖供与体への求核攻撃が促進されたと考えることもできる。

Abgグリコシンターゼの反応では、グルタミン酸をアラニンに置換した場合(16)よりも、セリン置換体を用いたときに劇的な変化が現れた。すなわち、E358S 変異体では、転移反応率の向上が見られただけでなく、E358A 変異体では起きなかった反応が観察された。E358S 変異体を用いることにより、galFと4-NP β -グルコシドとの反応収率は、E358A変異体を用いた場合(84%)に比べ向上した(98%) (表II; entries 1, 2)。同様な収率の向上は、糖受容体に4-NP β -セロビオシドと4-NP β -マンノシドを用いた時に認められた(表II; entries 5-8)。E358S 変異体を用いた場合の最も興味深い現象は、galFと4-NP β -N-アセチルグルコサミニドの結合により、4-NP β -N-アセチラクトサミニドが得られたことである(63%)。この結果は、本質的にこの結合生成を行うことのできない E358A 変異体と対照的である。さらに、glcFを用いる転移においても収率の向上が認められた(表II; entries 12, 13, 21, 22)。E358Sにすることによって収率の向上が認められなかったのは、glcFと4-NP β -マンノシドとの反応である(表II; entries 19, 20)。しかし、この場合でも四糖生成物は増加している(17% versus 7%)。また、Abg E358Aの場合は k_{cat}/K_m 値のみを明らかにすることができたのに対し、Abg E358Sの場合、galF濃度の増加に伴い、初速度の飽和が観測され、 K_m と k_{cat} を算出することができた。galFと4-NP β -グルコシドの反応において、脱離するフッ素イオンを測定することにより触媒効率(k_{cat}/K_m)を求めると、Abg E358S は Abg E358Aの24倍大きい値であった。Abg E358G変異体もまたグリコシンターゼとして同定されており(以下を参照)、速度論量が測定されている。この酵素は、Abg E358Sの2倍の k_{cat}/K_m 値を示すことから、E358Sより高い糖転活性をもつことが分かった。

glcFを転移させるもう一つのグリコシンターゼ(Ss- β -Gly)は、*Sulfolobus solfataricus* 由来の野生型 β -グリコシダーゼから調製された。野生型酵素は、 β -(1-3)-結合を唯一ではないが、しかし高い選択性をもって加水分解する。グリコシンターゼSs- β -Gly(14)を触媒とする glcFと2-NP β -グルコシドの反応は、 β -(1-3)-結合を与える(80%)(表II; entries 23)。この変異体によるglcFの他の糖受容体への転移は報告されていない。しかし、この変異体

zyme was capable of catalyzing the self-condensation of 2-NP glucoside in formate (3.75 M) to give a number of complex carbohydrates in a total yield of 85 %. Presumably the mechanism for this reaction proceeds by formate acting as a surrogate catalytic nucleophile to displace the 2-nitrophenol from the anomeric carbon, with formation of an α -formyl glycoside that is subsequently attacked by a hydroxyl group on the acceptor sugar. More than six reaction products were observed (di-, tri- and tetra-saccharides) composed of β -(1-3)-, β -(1-6)-, β -(1-4)- glycosidic linkages in both linear and branched arrangements. Use of an external nucleophile and a mutant glycosidase represents another approach to the condensation of glycosides, but the poor regioselectivity observed using Ss- β -Gly as catalyst along with the fact that aryl glycoside acceptors may be hydrolysed under these conditions may hamper the development of this variation of the methodology.

The glycosyl hydrolase family 2 mannosidase from *Cellulomonas fimi* (Man2a) has recently been developed into another glycosynthase (19). The mutant enzyme efficiently condenses α -mannosyl fluoride (manF) onto a variety of acceptor sugars in high yield (Table II; entries 24 – 29). This new enzymatic catalyst provides a tool to effect the synthesis of a β -mannopyranoside linkage, a linkage that remains one of the most chemically challenging to obtain with high regio- and stereoselectivity. The condensation of manF with 4-NP mannoside (entry 24) gave a series of di-, tri- and tetrasaccharides in 74 % total yield. Surprisingly, when the second glycosidic linkage was formed, between manF and the initial product 4-NP mannobioside, an intractable mixture of two products was observed, one containing a β -(1-3)- linkage and the other a β -(1-4)- linkage. Both of these products were subsequently condensed with manF to provide two tetrasaccharide products with a non-reducing terminal β -(1-4)- linkage. A similar mixture of β -(1-3)- and β -(1-4)- linked products was observed in almost all of the reactions catalyzed by glycosynthase Man2a E519S. However, different proportions of each β -(1-3)- and β -(1-4)- linked product were observed. A mixture of oligosaccharides was generated by the second transfer of manF in all reactions (Table II; entries 24 – 28), except that with 4-NP xyloside as acceptor (Table II; entry 27). The reaction catalysed by Man2a E519S between manF and 4-NP β -gentiobioside was unique because it did not generate a mixture of β -(1-3)- and β -(1-4)- products. It afforded only tri- and tetrasaccharide products in high yield (Table II; entry 29). The peculiarity of Man2a E519S glycosynthase in its synthesis of oligosaccharide products with variable regiochemical linkages may hamper the application of this particular mutant enzyme towards effective synthesis of new oligosaccharides, but provides evidence that it should be possible to engineer two different mutant enzymes; one that synthesises β -(1-3)- linkages and another that synthesises β -(1-4)- linkages. The design of two such improved glycosynthases remains

は、ギ酸エステル(3.75M)中、2-NP グルコシドの重縮合触媒となることが判明した(総収率85%)。この反応は、まずアノマー炭素から2-ニトロフェノールが遊離することにより α -ホルミルグリコシドが生成し、これに受容体の水酸基が攻撃する機構により説明できる。生成物は、直鎖型と分岐型 β -(1-3)-、 β -(1-6)-、 β -(1-4)-グリコシド結合を含む六種類以上のオリゴ糖(二糖、三糖、四糖)の混合物である。外からの求核性化学種と変異型加水分解酵素の利用は、グリコシド結合生成の一つの手法となりうる。しかし、位置選択性が低いこと、ならびにアリアルグリコシド受容体が加水分解を受ける可能性があること、などを考慮すると解決すべき問題点も多い。

最近、Family2マンノシダーゼ(*Cellulomonas fimi*由来)(Man2a)から新しいグリコシンターゼが調製された(19)。この変異体は、フッ化 α -マンノシド(manF)をさまざまな糖受容体に効果的に転移させる(表II; entries 24–29)。この新しい変異体は、位置および立体選択的な合成が非常に困難である β -マンノピラノシドを与える道具として利用できる。すなわち、manFと4-NPマンノシドの縮合により、二糖、三糖、四糖が生成する(74%)(entries 24)。この反応では、manFと最初の生成物である4-NPマンノビオシドとの間に二種類のグリコシド結合が生成するが、興味深いことに、その一つは β -(1-3)-結合であり、もう一つは β -(1-4)-結合であった。さらに、これら二つの生成物はmanFと結合し、非還元末端に β -(1-4)-結合をもつ二種類の四糖を与える。このような β -(1-3)-結合と β -(1-4)-結合の生成は、グリコシンターゼMan2a E519Sを用いるほとんどすべての反応で認められた。しかし β -(1-3)-結合と β -(1-4)-結合の割合はそれぞれ異なっている。受容体に4-NPキシロシドを用いた場合を除き(表II; entries 27)、二種類の結合が生成する段階は、第二番目の転移反応である(表II; entries 24–28)。 β -(1-3)-結合と β -(1-4)-結合の混合物が生成しないのは、Man2a E519SによるmanFと4-NPゲンチオビオシドとの反応だけであり、この場合は高収率で三糖と四糖のみが得られる(表II; entries 29)。Man2a E519Sグリコシンターゼが示すこのような位置選択性の低さは、選択的オリゴ糖合成へ応用する際の問題点として指摘される。しかしこの事実は、 β -(1-3)-結合あるいは β -(1-4)-結合のみを選択的に生成する二種類の変異体を別々に設計できる可能性を示している。このような二種類のグリコシンターゼの調製は、 β -マンノピラノシド合成

an important goal in providing a route towards β -mannopyranoside linkages.

B-2. Glycosynthases Derived From *endo*-acting Glycosidases

The retaining 1,3-1,4- β -glucanase from *Bacillus licheniformis* with the catalytic nucleophile mutated to alanine was the first literature example of a glycosynthase capable of transferring a disaccharide donor sugar (15). The mutant enzyme catalysed the condensation of α -laminaribiosyl fluoride (lamF) onto MUGlc with a high yield of 88 % at pH 7.5 (Table III; entry 30). The condensation of lamF onto 4-methylumbelliferyl β -cellobioside and onto 4-methylumbelliferyl β -laminaribioside was successful, with initial rates 20 % faster and 43 % slower than the reaction with MUGlc, respectively (Table III; entry 31 and 32). No reaction was observed with 4-NP β -galactoside or 4-NP *N*-acetyl- β -glucosaminide as acceptors. In stark contrast to Abg glycosynthases and Cel7B glycosynthase (*vide infra*) no oligomeric products were reported in these reactions. This observation is rather surprising because the mutant enzyme binds competently to a laminaribiosyl moiety in both the glycone and aglycone binding sites and has an extended binding site like many *endo*-glucanases (23, 24). Of course, the rate of reaction for the formation of oligomeric products may be so slow that observation of the products remains problematic. In contrast to Abg glycosynthase, which has a very broad pH profile, E134A β -glucanase has a bell-shaped pH profile with an optimum at approximately pH 7.

A mutant cellulase from *Humicola insolens*, Cel7B E198A, remains the only other glycosynthase reported from an *endo*-glucanase (17). The wild-type enzyme has trans-

における最も重要な課題の一つである。

B-2. エンド型グリコシダーゼ由来のグリコシンターゼ

立体保持型の糖加水分解酵素である1, 3-1, 4- β -グルカナーゼ(*Bacillus licheniformis* 由来)の触媒残基をアラニンに置換した変異体 BlgE134Aを用いて、グリコシンターゼによる二糖供与体の転移が初めて報告された(15)。すなわち、pH7.5の条件下、フッ化 α -ラミナリビオシル(lamF)を糖供与体とする4-メチルウンベリフェリル β -グルコシド(MUGlc)のグリコシル化が高収率で進行する(88%)(表III; entry 30)。また、lamFと4-メチルウンベリフェリル β -セロビオシドおよび4-メチルウンベリフェリル β -ラミナリビオシドを受容体に用いて、反応の初期速度をMUGlcの場合と比較した。その結果、前者では20%速くなり、後者では43%遅くなることが分かった(表III; entry 31, 32)。受容体としてp-ニトロフェニルガラクトシドまたはp-ニトロフェニル*N*-アセチル- β -グルコサミニドを用いた場合、糖転移は起こらなかった。また、AbgグリコシンターゼやCel7Bグリコシンターゼ(下記参照)の場合と異なり、オリゴ糖生成物は得られない。この結果は大変興味深いものである。なぜなら、この変異体は、多くのエンドグルカナーゼ(23, 24)がそうであるように、グリコン結合サイトおよびアグリコン結合サイトを広範囲に有しており、いずれのサイトもラミナリビオシル部分を認識するからである。当然のことながらオリゴ糖生成速度は非常に遅いため、生成物の検出に問題点が残されている。Abgグリコシンターゼの場合は非常に幅広いpHプロファイルを有していたが、E134A β -グルカナーゼでは、pH約7を最大にベル型のpHプロファイルを示した。

エンドグルカナーゼから調製されるグリコシンターゼとして、セルラーゼ(*Humicola insolens* 由来)の変異体 Cel7B E198Aがある(17)。すでに有機溶媒存在下、野生型酵素の糖転移能を

Table III. Glycosynthase-mediated transglycosylation reactions using disaccharide donors (all linkages β -(1-4)-).

Entry	Enzyme	Donor	Acceptor	Total Yield / %	Reference
30	Blg E134A	lamF	Glc-MU	88	(15)
31	Blg E134A	lamF	Glc- β -(1-4)-glc-MU	> 88 ^a	(15)
32	Blg E134A	lamF	Glc- β -(1-3)-glc-MU	< 88 ^a	(15)
33	Cel7B E197A	lacF	Glc-OBn	83 ^b	(17)
34	Cel7B E197A	lacF	Xyl-OBn	51 ^b	(17)
35	Cel7B E197A	lacF	Man-S-4-NP	61 ^b	(17)
36	Cel7B E197A	lacF	Glc- β -(1-4)-glc-OMe	100	(17)
37	Cel7B E197A	lacF	(C-2 ^I -Br) Glc- β -(1-4)-glc-OMe	100	(17)
38	Cel7B E197A	lacF	GlcNH ₂ - β -(1-4)-glcNAc	65	(17)
39	Cel7B E197A	lacF	Glc- β -(1-3)-glc-OBn	100	(17)
40	Cel7B E197A	celF	CelF	Polymerisation to cellulose II	(17)
41	Cel7B E197A	^c	(C-6 ^{II} -Br)-Glc- β -(1-4)-glcF	Polymerisation	(17)
42	Cel7B E197A	^c	(C-6 ^{II} -NH ₂)-Glc- β -(1-4)-glcF	Polymerisation	(17)
43	Cel7B E197A	^c	Xyl- α -(1-6)-glc- β -(1-4)-glcF	Polymerisation	(17)
44	Cel7B E197A	lacF	(C-6 ^{I,II} -Br)-Glc- β -(1-4)-glcF	80	(17)

^a Actual yield not reported; ^b Yield of acetylated product; ^c self-polymerisation of acceptor

glycosylation activity (25, 26) in the presence of organic cosolvents, condensing β -lactosyl fluoride onto a cellobiosyl acceptor in 60 % yield with no formation of higher oligomeric products. The glycosynthase mutant of Cel7B condenses sugars with very high yields and provides convenient access to a range of novel β -(1-4)-linked polysaccharides. To date, this mutant enzyme remains the only glycosynthase that has been crystallised and its X-ray structure determined. The structure of the glycosynthase maintains architectural similarity with the wild-type enzyme (17). The only differences observed are within the active site adjacent to the E197A mutation, where the solvent structure is altered liberating a volume of some 120 Å³ that is more than sufficient to accommodate the axial fluoride. The first series of reactions performed with Cel7B E197A involved the condensation of α -lactosyl fluoride (lacF) onto a β -glucoside, a β -xyloside and a β -mannoside (Table III; entries 33–35) with the yield being greatest for the β -glucoside acceptor. The fact that a product was observed with the β -xyloside and β -mannoside as acceptors confirmed the lack of key polar interactions between either the 6-OH or 2-OH of the glucosyl unit in subsite +1 presented in the wild-type enzyme crystal structure (27). Disaccharide acceptor sugars ranged from methyl β -cellobioside, methyl 6-bromo-6-deoxy- β -cellobioside, *N*-acetyl-chitobiose, and benzyl β -laminaribioside (Table III; entries 36–39) and all were condensed with β -(1-4)-linkages to give the requisite tetrasaccharides in generally excellent yield. The only acceptor amongst those tested that was incapable of condensation with lacF was *N,N'*-diacetyl-chitobiose.

The facile polymerisation of α -cellobiosyl fluoride (celF) by Cel7B E197A into a white crystalline precipitate of cellulose II (determined by X-ray diffraction data; Table III; entry 40) prompted the synthesis of novel celF derivatives with altered functional groups at positions where key interactions were not observed from the X-ray data of the wild-type enzyme. The three products observed using 6"-bromo-6"-deoxy- α -cellobiosyl fluoride as donor and acceptor were the tetra- and hexasaccharides, and a precipitate presumed to contain higher oligomers (Table III; entry 41). By contrast, only polymeric species were obtained upon self condensation of 6"-amino-6"-deoxy- α -cellobiosyl fluoride, or of 6"-thioxylosyl- α -cellobiosyl fluoride as determined by size exclusion chromatography. One disaccharide that failed to polymerise was 6,6"-dibromo-6,6"-dideoxy- α -cellobiosyl fluoride. However, upon incubation of this compound with lacF and Cel7B E197A a tetrasaccharide product was observed in good yield (Table III; entry 44)

C. Future Directions

Glycosynthases that efficiently synthesise a variety of oligosaccharides have been generated from both fungal and bacterial genes. Further improvements to these mutant enzymes will lead to a broader spectrum of readily synthesised oligosaccha-

利用することにより、重縮合を伴うことなくフッ化 β -ラクトシルとセロビオシル受容体とのグリコシル化が進行することが報告されている(収率60%)(25,26)。Cel7Bの変異体を用いることにより、非常に高い収率で糖転移が進行し、 β -(1-4)-結合を有するさまざまな新規多糖の合成を容易に達成できるようになった。この変異体は、結晶化に成功し、X線構造解析がなされた唯一のグリコシンターゼである。この変異体は野生型酵素に類似した構造を維持していることが判明した(17)。野生型酵素と異なっている点は、E197A変異部位に隣接する空間が、アキシアル配向のフッ素原子を収容するのに十分な約120Å³に変化していることである。Cel7B E198A変異体を用い、フッ化 α -ラクトシル(lacF)の β -グルコシド、 β -キシロシドおよび β -マンノシドへの糖転移が検討された。その結果、 β -グルコシドを受容体とした場合に最もよい収率で生成物が得られた(表III; entry 33–35)。 β -キシロシド、 β -マンノシドを受容体とする生成物が得られたことから、野生型酵素の+1サブサイトにおける6-OHまたは2-OHとの極性相互作用の欠如を確認することができた(27)。二糖受容体としては、メチル β -セロビオシド、メチル6-ブromo-6-デオキシ- β -セロビオシド、*N*-アセチル-キトビオースおよびベンジル β -ラミナリビオシドが用いられたが(表III; entry 36–39)、ほとんどの場合 β -(1-4)-結合でつながった目的とする四糖が高収率で得られる。この中でlacFと結合できない受容体は、*N,N'*-ジアセチル-キトビオースである。

Cel7B E198Aによるフッ化 α -セロビオシル(celF)の重合により、セルロースIIの白色結晶(X線回折に同定)を簡単に得ることができる(表III; entry 40)。さらに、野生型酵素のX線データを基に、相互作用が存在しないと考えられる水酸基を他の官能基に置き換えたフッ化セロビオシル誘導体を設計・合成した。すなわち、フッ化6"-ブromo-6"-デオキシ- α -セロビオシルを作用させたところ、四糖、六糖、およびより大きなオリゴ糖を含む沈殿が得られた(表III; entry 41)。また、フッ化6"-アミノ-6"-デオキシ- α -セロビオシドまたはフッ化6"-チオキシロシル- α -セロビオシドを用いた場合は、高重合物のみを与えることをサイズ排除クロマトグラフィーにより確認した。また、フッ化6,6"-ジブromo-6,6"-ジデオキシ- α -セロビオシドは重合しないものの、Cel7B E197A存在下、lacF糖供与体と反応させることにより、対応する四糖生成物を高収率で与えた(表III; entry 44)。

C. 将来の展望

オリゴ糖の効率的な合成に用いられるグリコシンターゼは、カビならびに細菌の遺伝子に由来するものである。このような変異体のさらなる改良により、今後、さらにバラエティーに富んだ一連のオリゴ糖合成が可能になるであろう。糖

Fig. 3. A screening assay for glycosynthases catalysing the formation of a glc- β -(1-4)-glc glycosidic linkage using *Cellulomonas fimi* cellulase 5A as a screening enzyme. $n = 1$ or 2 .

rides. Our development of a novel screen to detect active glycosynthase enzymes (18) brought about the discovery of Abg E358G, the most active glycosynthase from *Agrobacterium sp.* The development of screening strategies will facilitate the discovery of other, novel glycosynthases. The screen to select for Abg glycosynthase variants consists of two enzymatic reactions and is shown in Fig. 3. The glycosynthase first condenses glcF and 4-methylumbelliferyl β -D-glucoside (MUGlc) to form a disaccharide. A second enzyme then cleaves the disaccharide releasing methyl umbelliferone. The screen is effective because the second enzyme, an *endo*-cellulase from *Cellulomonas fimi* (Cel5A), will not cleave MUGlc, but will cleave the disaccharide product released by the glycosynthase. A library of Abg mutant enzymes randomized in the gene at the nucleophile position was then screened in bacterial cells harbouring a second plasmid containing Cel5A cellulase, for glycosynthase activity. Active glycosynthase colonies were isolated and gene sequences determined. The mutant enzymes were active when either a C, A, S, or G residue replaced the nucleophile. Screening larger

転移活性を持つグリコシターゼ酵素の新規探索法の開発 (18) により、活性の高い *Agrobacterium sp.* 由来のグリコシターゼ Abg E358G が発見された。スクリーニング法を新たに開発することで、他のグリコシターゼの探索も容易に行えるようになるであろう。Abg グリコシターゼ変異株を選択するためのスクリーニングには、二つの酵素反応が使われている(図3)。まず、グリコシターゼにより glcF と 4-メチルウンベリフェリル β -D-グルコシド(MUGlc) から二糖が生成する。次に、第二の酵素 *Cellulomonas fimi* 由来のエンドセルラーゼ(Cel5A) により生成二糖からメチルウンベリフェロン(MU)が遊離される。この第二の酵素はMUGlc からはMUを遊離せず、グリコシターゼの糖転移により生成した二糖誘導体からのみMUを遊離する。以上のことから、これらの酵素反応をスクリーニングに利用することができる。その後、ランダム変異した Abg 遺伝子を含む第一のプラスミドと Cel5A セルラーゼ遺伝子を含む第二のプラスミドを有する微生物細胞を用いて、グリコシターゼ活性を示す酵素を探索した。いくつかの活性グリコシターゼのコロニーを単離し遺伝子配列を決定したところ、求核残基を C、A、S または G 残基で置換した変異体であることが明らかになった。DNA

libraries of randomized Abg genes generated by techniques such as DNA shuffling, (28) or error prone PCR, (29) should enable further improvements in the catalytic efficiency of Abg glycosynthase.

D. Conclusions

The mutation of a retaining glycosidase to a hydrolytically inactive enzyme by substituting the nucleophilic carboxylic acid with a non-nucleophilic residue has generated a novel class of glycosylation catalysts. These mutant enzymes transfer activated donor sugars onto a wide variety of acceptor sugars with high degrees of stereo- and regioselective control and in very good yield. The synthesis of donor sugars is straightforward, using cheap and readily available starting materials. Glycosynthases, therefore, provide a new route for the large-scale manufacture of oligosaccharides. The glycosynthases described herein have been successful in transferring mono- and disaccharide donor sugars, and in catalysing the formation of β -(1, 4)-, β -(1, 3)- and β -(1, 6)- glycosidic bonds. In part, because of the large database on glycosidases, it is surely only a matter of time before new glycosynthases are reported, thereby broadening the range of donor sugars that can be transferred and providing a means to synthesise other more exotic glycosidic linkages.

Acknowledgements

We thank the Protein Engineering Network of Centres of Excellence of Canada, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Neose Technologies Inc. for financial support.

References

1. Hakomori, S. (1991) *Immunology* **3**, 646–653
2. Higa, H.H., Rogers, G.N. & Paulson, J.C. (1985) *Virology* **144**, 279–282
3. Lasky, L.A. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 113–139
4. Rogers, G.N., Herrier, G. & Paulson, J.C. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 5947–5951
5. Tavakkol, A. & Burness, A.T.H. (1990) *Biochemistry* **29**, 10684–10690
6. Varki, A. (1993) *Glycobiology* **3**, 97–130
7. Plante, O.J., Palmacci, E.R. & Seeberger, P.H. (2001) *Science* **291**, 1523–1527.
8. Haase, W.C. & Seeberger, P.H. (2000) *Curr. Org. Chem.* **4**, 481–511
9. Caruthers, M.H. (1985) *Science* **230**, 281–285
10. Merrifield, R.B. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149–2154
11. (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/>)
12. Davies, G. & Henrissat, B. (1995) *Structure* **3**, 853–859
13. Mackenzie, L.F., Wang, Q.P., Warren, R.A.J. & Withers, S.G. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 5583–5584
14. Trincone, A., Perugino, G., Rossi, M. & Moracci, M. (2000) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**, 365–368
15. Malet, C. & Planas, A. (1998) *FEBS Lett.* **440**, 208–212
16. Mayer, C., Zechel, D.L., Reid, S.P., Warren, R.A.J. & Withers, S.G. (2000) *FEBS Lett.* **466**, 40–44
17. Fort, S., Boyer, V., Greffe, L., Davies, G., Moroz, O., Christiansen, L., Schulein, M., Cottaz, S. & Driguez, H. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 5429–5437
18. Mayer, C., Jakeman, D.L., Mah, M., Karjala, G., Gal, L., Warren, R.A.J. & Withers, S.G. (2001) *Chem. Biol.* In the press.
19. Nashiru, O., Zechel, D.L., Stoll, D., Mohammadzadeh, T., Warren, R.A.J. & Withers, S.G. (2001) *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 417–420
20. Kempton, J.B. & Withers, S.G. (1992) *Biochemistry* **31**, 9961–9969
21. Wang, Q.P., Graham, R.W., Trimbur, D., Warren, R.A.J. & Withers, S.G. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11594–11595
22. Withers, S.G., Rupitz, K., Trimbur, D. & Warren, R.A. (1992) *Biochemistry* **31**, 9979–9985

シャッフリング(28)やエラープローンPCR(29)に代表される遺伝子工学的技術を駆使してAbg遺伝子をランダム変異させ、より大きなライブラリーを作成することにより、Abgグリコシンターゼの触媒効率のさらなる向上が期待される。

D. 結 論

立体保持型加水分解酵素の求核性カルボン酸残基を非求核性の残基に変換した新しいタイプのグリコシル化酵素(グリコシンターゼ)が開発された。この酵素は加水分解不活性であり、活性化された糖供与体をさまざまな糖受容体に、位置および立体選択的に効率よく転移させる。糖供与体は、安価で入手容易な出発原料から簡単に合成することができる。グリコシンターゼを用いる糖転移反応は、オリゴ糖を大量に合成するための新しい手法である。今回紹介したグリコシンターゼを触媒とする単糖供与体および二糖供与体の糖転移反応により、 β -(1, 4)-結合、 β -(1, 3)-結合、あるいは β -(1, 6)-結合を選択的に形成することができる。今後、加水分解酵素の膨大なデータベースを基盤とする新規グリコシンターゼの開発を通して、より広範な糖供与体の使用が可能になり、より多様なグリコシド結合生成へと適用されるのは時間の問題であろう。

東北大学工学部分子化学工学科・生物化学工学科
多和田 恭子、正田晋一郎 共訳

23. Hahn, M., Pons, J., Planas, A., Querol, E. & Heinemann, U. (1995) FEBS Lett. **374**, 221-224
24. Piotukh, K., Serra, V., Borriess, R. & Planas, A. (1999) Biochemistry **38**, 16092-16104
25. Armand, S., Drouillard, S., Schulein, M., Henrissat, B. & Driguez, H. (1997) J. Biol. Chem. **272**, 2709-2713
26. Schou, C., Rasmussen, G., Kaltoft, M.B., Henrissat, B. & Schulein, M. (1993) Eur. J. Biochem. **217**, 947-953
27. MacKenzie, L.F., Sulzenbacher, G., Divne, C., Jones, T.A., Woldike, H.F., Schulein, M., Withers, S.G. & Davies, G.J. (1998) Biochem. J. **335**, 409-416
28. Stemmer, W.P.C. (1994) Nature **370**, 389-391
29. Cadwell, R.C. & Joyce, G.F. (1992) PCR Meth. App. **2**, 28-33

Received on May 8, 2001, accepted on May 29, 2001

Profile of the Authors

David L. Jakeman

Graduated from the University of Sheffield, UK in 1992 with a degree in single honours chemistry and continued studying at Sheffield under the supervision of Prof. G. M. Blackburn and Prof. M. Williamson to obtain his Ph. D. in bioorganic chemistry in 1995. An exciting stay of post-doctoral study under the tutorship of Prof. J. N. S. Evans at Washington State University, USA, studying enzyme intermediates by solid and liquid state NMR spectroscopy ended in August 1998 when Dr. Jakeman moved to the University of British Columbia, Canada, and began working for Prof. S. G. Withers on the rational design of enzyme catalysts for oligosaccharide

synthesis. Dr. Jakeman has recently moved to Halifax, Nova Scotia as an Assistant Professor at Dalhousie University.

Dr. Jakeman's research interests include protein engineering and enzyme design, particularly the design of glycosyl transferases for construction of new carbohydrate-containing antibiotics. His teaching challenges include educating Pharmacy students in the importance of medicinal chemistry and in his limited spare time he enjoys skiing, swimming and football (the English variety).

★★★★★★★

Stephen G. Withers

Steve Withers obtained his undergraduate and PhD degrees in Chemistry from the University of Bristol, United Kingdom, and then moved to Canada in 1977 to work as a postdoctoral fellow in the Biochemistry department at the University of Alberta. In 1982 he took a faculty position in the Chemistry department at the University of British Columbia where he is now the holder of the Khorana chair of chemistry and biochemistry. His research interests focus upon understanding the mechanisms of enzymes involved in the synthesis

and degradation of glycosides. This has led him into the design and synthesis of specific glycosidase inhibitors, as well as the generation of Glycosynthases, a new class of engineered enzymes for synthesis of glycosides.