Bacterial Sialyltransferases

細菌由来のシアル酸転移酵素

Yamamoto, Takeshi*; Takakura, Yoshimitsu ; and Tsukamoto, Hiroshi

JAPAN TOBACCO INC. Glycotechnology Business Unit, 700, Higashibara, Iwata, Shizuoka 438-0802, Japan

*Corresponding author

FAX: 81-538-33-6046, E-mail: takeshi.yamamoto@ims.jti.co.jp

Key Words: sialyltransferase, marine bacterium, Genus *Photobacterium*, Genus *Vibrio*

Abstract

Although chemical glycosylation has certain advantages compared with enzymatic glycosylation in respect of its high flexibility and wide applicability, the reaction processes are complicated in many cases because the chemical reactions require multiple protection/ de-protection steps.

On the other hand, enzymatic glycosylation using glycosyltransferases is a single step process with high position- and anomer-selectivity and reaction yield. However, glycosyltransferases available for this purpose had been very limited and costly. Since then, progress has been made in the search of prokaryotic glycosyltransferases, increasing the types of enzymes that can be employed in synthesis and modification of sugar chains. Moreover, various studies have been making sugar nucleotides, which are donor substrate for the glycosyltransferases, less and less expensive.

Sialic acids are present in a variety of glycoproteins and glycolipids, often at the non-reducing termini of carbohydrate chains. It has been demonstrated that sialic acids play very important roles in various biological and physiological events. Ample supply of sialosides and sialyl-glycoconjugates is indispensable to the study of their biological functions in detail. Transfer of sialic acids by sialyltransferases to appropriate substrates in the final step under a mild reaction condition can prepare these materials in quantity. Therefore, one of the most important tasks in the study of glycobiology is to provide a large amount of bacterial sialyltransferases with diverse characteristics at low prices.

要 約

化学合成法によるグリコシル化は、糖転移酵素を用いる方法と比較して広い適応性があり、高い柔軟性があるという利点がある。しかしながら、化学合成法によるグリコシル化は、保護・脱保護が必要なことからその工程が必然的に煩雑となるという問題がある。

一方、糖転移酵素を用いるグリコシル化は、反応が一段階で終了し、反応収率が高く立体特異性も高い。しかしながらこれまででは反応に用いる糖転移酵素の種類が限られているという問題があったが、微生物由来の各種糖転移酵素に関する研究の進展により、糖鎖合成/糖鎖修飾に使用可能な酵素の種類は増加しつつある。一方、糖転移酵素の糖供与体基質である糖ヌクレオチドが非常に高価であるという問題も、様々な研究開発により徐々に解決されつつある。

シアル酸は複合糖質糖鎖の非還元末端に存在することが多い糖であり、シアル酸を含む複合糖質が生体内で様々な役割を有していることが多くの研究により示されている。シアル酸転移酵素を用いるシアル化は、反応の最終段階において、簡便かつ温和な条件でシアル酸を目的物に導入することが可能な方法である。そのために安定で大量調製が可能な細菌由来のシアル酸転移酵素は、最も需要の高い糖転移酵素の一つと考えられている。

A. Introduction

All mammalian cells have various carbohydrates on the surface, as sugar chains are covalently bound to many of the membrane proteins and lipids. It has been clearly demonstrated that the carbohydrate moieties of glycoproteins and glycolipids play important roles in a variety of biochemical phenomena, such as cell-cell recognition and differentiation of cells (1, 2). The sugar chain moieties of glycoconjugates are synthesized by a series of glycosyltransferases in the cells (3, 4). In the case of *Homo sapiens*, over 150 kinds of genes

A. はじめに

動物細胞の表層には、糖蛋白質や糖脂質などの複合糖質が存在し、それらの糖質部分は細胞間の認識機構や細胞の分化など重要な生命現象に深く関与していることが明らかにされている(1,2)。それらの複合糖質糖鎖は、いずれも各種の糖転移酵素によって生合成される(3,4)。ヒトの場合、これまでに150種類以上の糖転移酵素遺伝子がクローニングされている。それらの内、一部の酵素については *E. coli* を宿主とした

encoding glycosyltransferases have been cloned so far, and most of them have been produced as recombinant enzymes retaining the activity by protein expression systems using cultured mammalian cells, such as Chinese hamster ovary (CHO) cells. A few mammalian glycosyltransferases have been overexpressed as active enzymes in *Escherichia coli*, but most of those genes could not be expressed as active enzymes in *E. coli*. Therefore, abundant supply of mammalian glycosyltransferases has not been available yet.

It has also been revealed that glycoconjugates, such as lipooligosaccharides (LOS), lipopolysaccharides (LPS) and glycoproteins, are present on the surface of bacteria and viruses (5, 6). In particular, the sugar chain structures of glycoconjugates in human pathogens have well been studied. It has been demonstrated that bacterial pathogens have evolved to escape immune systems of hosts by mimicking surface carbohydrates of the host cells, which are crucial for self/non-self recognition and that the glycoconjugates of the pathogens are involved in the virulence and adhesion to the host cells (7). Glycosylation of proteins has been considered to be specific to eukaryotes until very recently. However, recent progress has revealed that glycoproteins are present in prokaryotes as well (8, 9), although bacterial *N*-linked sugar chains differ structurally from the eukaryotic counterparts. Furthermore, evidence was provided that protein glycosylation pathways similar to those in eukaryotes exist in Gram-negative bacteria. A functional *N*-linked glycosylation pathway of a Gram-negative bacterium was transferred into *E. coli* (10). Therefore, it is likely that bacterial glycosylation capability can be modified so that human-type glycosylated-proteins will be expressed in *E. coli* in the near future. Moreover, studies of glycosyltransferases from diverse bacteria have been quite active lately (11) and a number of types of carbohydrate chains have been synthesized using bacterial enzymes (12, 13).

In general, bacterial enzymes are more stable and productive in *E. coli* expression systems than mammalian enzyme. Furthermore, it has been reported that bacterial glycosyltransferases have broad acceptor substrate specificity compared with mammalian glycosyltransferases. Therefore, bacterial enzymes are expected to serve as good tools for synthesis and modification of glycans (14).

Sialic acids often occur at non-reducing termini of carbohydrate chains of glycoconjugates and are one of the most important monosaccharides (15, 16). Sialylation is reported to make half-lives of protein much longer in mammals. For example, introduction of two more sialylated-glycans by genetic engineering to erythropoietin, which has three of the sialylated-glycans in the native form, extended considerably the half-life in blood compared to the native protein (17). Another example is insulin with sugar chains.

蛋白質生産系を用いて大量調製が可能であるが、その他大部分の酵素については、*E. coli* を宿主とした蛋白質生産系で活性型酵素として発現させることは困難である。

一方、細菌やウイルスなどにおいてもその細胞表層には、リポオリゴサッカライド(LOS)/リポポリサッカライド(LPS)、糖蛋白質などの形で糖質が存在することが明らかにされている(5,6)。中でもヒトに対して病原性を有する細菌については詳細な研究がなされており、それら病原性細菌は宿主細胞の表面糖鎖構造を模倣することにより免疫系から逃れるように進化してきたこと、またそれらの細胞表層に存在する複合糖質は、宿主への接着などに関与することが明らかにされている(7)。近年まで、蛋白質の糖鎖修飾は真核生物にのみ見られる特徴と考えられていた。しかし、細菌においても糖鎖修飾された糖蛋白質、糖ペプチドが存在すること(8,9)、哺乳動物と比べその糖鎖構造は異なるものの、哺乳動物とよく似た蛋白質の修飾系が存在すること等が最近になり示された(10)。今後、これら研究の進展により、細菌を用いた蛋白質生産系においても、目的とする糖鎖を付加できる可能性がある。また、ヒト型の複合糖質糖鎖の合成に利用することが期待できる糖転移酵素も数多く取得されている(11)。更に、それらを用いて様々な糖鎖が合成されている(12,13)。

一般に、細菌由来の酵素は、哺乳動物由来の酵素と比較して、*E. coli* を宿主とする蛋白質生産系で活性型酵素として大量調製が可能であり、蛋白質として安定な酵素が多い。更にこれまでに明らかにされた細菌由来の糖転移酵素は、哺乳動物由来の糖転移酵素と比較した場合、総じて糖受容体基質特異性が広いことが示されており、各種の有用糖鎖合成のツールとして期待される(14)。

シアル酸は複合糖質糖鎖の非還元末端に存在することが多い糖であり、糖鎖を構成する糖の中でも重要な糖の一つである(15,16)。それを示す具体例の一つとして、次の事例が挙げられる。本来シアル酸含有糖鎖を有する糖蛋白質に、更にシアル酸含有糖鎖を導入した場合、本来の糖蛋白質と比べてシアル酸含有糖鎖数を増加させた改変糖蛋白質の生体内での半減期が長くなることが明らかにされている。より具体的には、例えばエリスロポエチン(EPO)には本来 *N*-結合型糖鎖が3箇所が存在するが、遺伝子工学的手法を用いて *N*-型糖鎖の結合箇所を増加させた糖鎖改変 EPO が開発された。この改変された EPO は、血中での持続時間が増加することが示されている(17)。また、本来糖鎖修飾を受けていない単純蛋白質であるインシュリンにシアル酸を含む糖鎖を付加させることで、

Insulin is composed of two polypeptide chains and not naturally glycosylated. Several types of sialylated insulin were prepared by chemoenzymatic approach and tested for the blood-glucose-lowering activity, and the modified insulin showed prolonged effects compared to the native hormone (18).

In this article, we briefly review recent progress in the study of bacterial glycosyltransferases, focusing on transferases for the important monosaccharide, sialic acids, especially on α 2,3- and α 2,6-sialyltransferases obtained from marine bacteria in our laboratory, which are very useful tools for the syntheses of sialosides.

B. Bacterial Glycosyltransferases

Glycosylation of proteins had generally been thought to be restricted to eukaryotes. However, recent studies have revealed that glycoproteins are present also in prokaryotic organisms (8, 9). Many bacterial glycosyltransferases have now been reported (11). In Table I, bacterial enzymes with confirmed glycosyltransfer activities are listed. Most of the organisms in the table are bacteria pathogenic to animals.

A gene cluster, which appeared to be involved in the glycosylation of multiple proteins, was identified in an enteric pathogen, *Campylobacter jejuni*. Furthermore, it was clearly demonstrated that the transfer of the cluster to *E. coli* resulted in a functional *N*-linked glycosylation pathway in *E.*

その血糖値抑制効果作用を持続的に発現させることも示されている(18)。

我々の研究グループでは、グリコシル化の中でも化学合成では比較的困難なシアリル化に適用することが期待でき、更に大量調製が可能な細菌由来のシアル酸転移酵素について研究を行っている。本稿では、我々の研究グループで最近得られた海洋性細菌由来の α 2,3- 及び α 2,6- シアル酸転移酵素に関する知見を中心に、近年報告された微生物由来の糖転移酵素の進展について簡単に述べる。

B. 細菌由来の糖転移酵素について

これまでは、蛋白質の糖鎖修飾は真核生物にのみ見られる特徴と考えられていた。しかし、研究の進展により、細菌においても糖鎖修飾された糖蛋白質が存在することが明らかにされた(8,9)。また、多くの糖転移酵素が種々の細菌から得られている(11)。

以下に細菌由来の糖転移酵素の内、ヒト型糖鎖の合成に利用可能と考えられる酵素を示す(表I)。それらの多くは、哺乳動物の病原性細菌からクローニングされている。

Campylobacter jejuni において、哺乳動物とよく似た蛋白質の糖鎖修飾系が存在すること等が明らかにされた。具体的に

Table I. Glycosyltransferases produced by bacteria.

Enzyme name	origin	Reference
Sialyltransferase	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	21
	<i>Neisseria meningitides</i>	21
	<i>Campylobacter jejuni</i>	22
	<i>Escherichia coli</i>	23
	<i>Photobacterium damsela</i>	24
	<i>Pasteurella multocida</i>	25
	<i>Haemophilus influenzae</i>	26,27
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	28
Galactosyltransferase	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	31
	<i>Neisseria meningitides</i>	32
	<i>Campylobacter jejuni</i>	33
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	34
	<i>Escherichia coli</i>	35
	<i>Helicobacter pylori</i>	36
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	37
Fucosyltransferase	<i>Helicobacter pylori</i>	38,39,40
	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	41
	<i>Rhizobium</i> sp.	42
N-acetylgalactosaminyltransferase	<i>Neisseria meningitides</i>	43
	<i>Haemophilus ducreyi</i>	44
	<i>Staphylococcus aureus</i>	45
N-acetylglucosaminyltransferase	<i>Neisseria meningitides</i>	43
	<i>Haemophilus influenzae</i>	46

coli (10). A similar gene cluster was also reported for pilin O-glycosylation in *Neisseria meningitidis* (19, 20).

Genes for sialyltransferases were cloned from *N. gonorrhoeae* (21), *N. meningitidis* (21), *C. jejuni* (22), *E. coli* (23), *Photobacterium damsela* (24), *Pasteurella multocida* (25), *Haemophilus influenzae* (26, 27) and *Streptococcus agalactiae* (28). Among these enzymes, their three dimensional structures of α 2,3-sialyltransferase (CstII) from *C. jejuni* and α 2,3-sialyltransferase (Δ 24PmST1) from *P. multocida*, their structures were determined by X-ray crystallography (29, 30). In the case of CstII, it was reported that a histidine and two tyrosine residues were involved in substrate binding and glycosyl transfer (29), and structural difference between CstII and Δ 24PmST1 were reported (30). In addition, a high level production system of multi-functional α 2,3-sialyltransferase (tPm0188Ph) from *P. multocida* was constructed (25).

The genes of galactosyltransferases were cloned from *N. gonorrhoeae* (31), *N. meningitidis* (32), *C. jejuni* (33), *S. agalactiae* (34), *E. coli* (35), *Helicobacter pylori* (36) and *S. pneumoniae* (37). As for fucosyltransferases, genes were cloned from *H. pylori* (38, 39, 40), *Bradyrhizobium* sp. (41) and *Rhizobium* sp. (42). With *N*-acetylglucosaminyltransferases, genes were cloned from *N. meningitidis* (43), *H. ducreyi* (44) and *Staphylococcus aureus* (45). Genes for *N*-acetylglucosaminyltransferases were cloned from *N. meningitidis* (43) and *H. influenzae* (46).

C. Screening for Bacterium Producing Sialyltransferase

Our research group has been screening a large number of bacteria for novel glycosyltransferase activities. The screening method of sialyltransferase was as follows. From the many kinds of samples, such as seawater, sea sand and fishes, many bacteria were isolated. Normally, Marine broth 2216 was used as the culture medium. One colony of isolated bacteria on a Marine broth 2216-agar plate were inoculated into 5 ml of Marine broth 2216 medium in a 30 ml test tube and cultivated at 30°C for 12 h on a rotary shaker (150rpm) each. After cultivation, those cells were recovered by centrifugation and suspended in extraction buffer. The suspended cells were sonicated until absorbance at 600 nm became 30% of that of the cell suspension. The sonicated solutions were used as crude enzyme solution. Sialyltransferase activity was routinely assayed by measuring [4,5,6,7,8,9- 14 C]-NeuAc transferred from CMP-[4,5,6,7,8,9- 14 C]-NeuAc as a donor substrate to lactose as an acceptor substrate. The standard reaction mixture consisted of 70 nmol of CMP-[4,5,6,7,8,9- 14 C]-NeuAc (about 650 cpm/nmol), 1.25 μ mol of lactose, and crude enzyme solution in 25 μ l of 20 mM sodium cacodylate buffer (pH 6.0) containing 0.02% Triton X-100. The enzyme reaction was carried out at 30°C for 60

は、*Saccharomyces cerevisiae* が生産するオリゴサッカライド転移酵素のサブユニットと相同性が見られる蛋白質をコードする遺伝子が発見され、更に糖転移酵素と相同性の高いアミノ酸配列をコードする複数の遺伝子がクラスターを形成していることが明らかにされた。この遺伝子クラスターを大腸菌に導入した結果、大腸菌内で *N*-結合型糖鎖が生産されることが明らかにされた(10)。また、*Neisseria meningitidis* においても同様の遺伝子クラスターが報告されている(19,20)。

シアル酸転移酵素は、最も多くの種類の細菌から遺伝子がクローニングされている糖転移酵素である。これまでに *Neisseria gonorrhoeae* (21)、*N. meningitidis* (21)、*C. jejuni* (22)、*E. coli* (23)、*Photobacterium damsela* (24)、*Pasteurella multocida* (25)、*Haemophilus influenzae* (26,27)、*Streptococcus agalactiae* (28) 等から遺伝子が取得されている。これらの内、これまでに *C. jejuni* の α 2,3-シアル酸転移酵素(CstII)及び *P. multocida* 由来のシアル酸転移酵素(Δ 24PmST1)については、それらの結晶構造が解析されている(29,30)。*C. jejuni* の α 2,3-シアル酸転移酵素(CstII)においては、基質の結合と糖転移反応に His 残基と 2 つの Tyr 残基が重要であることが示されている(29)。一方、また、*Pasteurella multocida* 由来の α 2,3-シアル酸転移酵素(Δ 24PmST1)の構造解析結果から、細菌由来の 2 種類のシアル酸転移酵素は、立体構造的に相違があることが報告されている。更に、*P. multocida* 由来の α 2,3-シアル酸転移酵素遺伝子を用いた、極めて高い酵素発現系が構築されている(25)。

ガラクトース転移酵素は、*N. gonorrhoeae* (31)、*N. meningitidis* (32)、*C. jejuni* (33)、*S. agalactiae* (34)、*E. coli* (35)、*Helicobacter pylori* (36)、*Streptococcus pneumoniae* (37) 等から遺伝子が得られている。フコース転移酵素に関しては、*H. pylori* (38,39,40)、*Bradyrhizobium* sp. (41)、*Rhizobium* sp. (42) 等から遺伝子が得られている。*N*-アセチルグルコサミン転移酵素に関しては、*N. meningitidis* (43)、*Haemophilus ducreyi* (44)、*Staphylococcus aureus* (45) 等から遺伝子が得られている。*N*-アセチルガラクトサミン転移酵素に関しては、*N. meningitidis* (43)、*H. influenzae* (46) 等から遺伝子が得られている。各種細菌のゲノム解析の進展に伴い、今後も新たな細菌由来の糖転移酵素が取得されると考えられる。

C. シアル酸転移酵素を生産する細菌の探索

我々のグループでは、様々な細菌を対象に現在もシアル酸転移酵素を含む各種糖転移酵素の探索を実施している。シアル酸転移酵素を有する微生物のスクリーニング方法を簡単に示す。まず、海水、海砂や各種魚類等から各種微生物の単離を行なった。通常、これら微生物の培養には Marine broth 2216 培地を使用した。上記の方法で得られた各種微生物を Marine broth 2216 寒天培地で生育させ、それぞれの微生物を Marine broth 2216 液体培地を用いて、30°C で約 12 時間それぞれ培養した。培養終了後、遠心分離によって菌体を集め抽出緩衝液に懸濁した。その後、この細胞懸濁を超音波により破碎して、粗酵素溶液として用いた。シアル酸転移活性は、糖受容体基質としてラクトースを用いて、 14 C で標識した糖供与体基質 CMP-[4,5,6,7,8,9- 14 C]-シアル酸からラクトースへ転

Fig. 1. Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence. *: Sialyltransferase gene cloned.

min. After the reaction, the reaction mixture was diluted with 5 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) to 2 ml, and applied to a column (0.5 × 2 cm) of Dowex 1X8 (phosphate form). The eluate (2 ml) was collected directly into a scintillation vial for counting. The radioactivity of [4,5,6,7,8,9-¹⁴C]-NeuAc which had transferred to the acceptor substrate in the eluate was measured with liquid scintillation counter and the amount of NeuAc transferred was calculated.

During the course of the study, we have isolated over 20 bacteria that produce sialyltransferase. Bacteria that were probably new species were found among them. A result of phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence of bacteria is displayed in Figure 1. It was evident in our study that many of the bacteria that produced sialyltransferases were classified in genus *Photobacterium* or closely related genus *Vibrio*. For instance, *P. phosphoreum* JT-ISH-467, *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 and *Vibrio* sp. JT-FAJ-16 showed α 2,3-sialyltransferase activity. *P. leiognathi* JT-SHIZ-145 and *P. damsela* JT0160 expressed α 2,6-sialyltransferase activity. These sialyltransferases showed unique acceptor substrate specificity as described in the next section.

D. α 2,6-Sialyltransferase Produced by *P. damsela* JT0160

P. damsela JT0160 had been the only bacterium identified then that naturally had α 2,6-sialyltransferase activity before our large scale screening (47). The only other bacterial protein with α 2,6-sialyltransferase activity had been the α 2,3-sialyltransferase that had been cloned from *N. meningitidis* and modified by substitution of amino acids to convert the enzyme to a bi-functional enzyme with both α 2,3-sialyltransferase and α 2,6-sialyltransferase activity (48). The α 2,6-sialyltransferase of *P. damsela* JT0160 was

移された [4,5,6,7,8,9-¹⁴C]-シアル酸を測定することで検出した。標準的な酵素反応溶液 (25 μ l) は、70 nmol の CMP-シアル酸、1.25 μ mol のラクトースと粗酵素溶液からなる。酵素反応を 30℃、60 分間行ない、その後 5 mM のリン酸緩衝液 (pH 6.8) で 2 ml に希釈した。この希釈された酵素反応溶液を Dowex 1X8 (リン酸型) のカラム (0.5 × 2 cm) に供して、溶出溶液を直接シンチレーションバイアルに集めて、その放射活性を液体シンチレーションカウンターにより検出して、転移された [4,5,6,7,8,9-¹⁴C]-シアル酸量を算出した。

これまでのところ、シアル酸転移酵素については *P. damsela* JT0160 株以外に約 20 菌株程度、シアル酸転移酵素を生産する菌株を単離している。ここに、シアル酸転移酵素を生産する数種類の菌株を含む *Photobacterium* 属細菌を中心とした細菌の系統樹を示す (図 1)。我々の研究によって *Photobacterium* 属細菌、その近縁の *Vibrio* 属の細菌にシアル酸転移酵素を生産する菌株が比較的多いことが明らかになってきた。これら菌株の中には、 α 2,3-シアル酸転移酵素を生産する菌株 (例えば、*Photobacterium phosphoreum* JT-ISH-467 株) と α 2,6-シアル酸転移酵素を生産する菌株 (例えば、*Photobacterium leiognathi* JT-SHIZ-145 株) 等が存在する。これらのシアル酸転移酵素は特徴的な基質特異性を有している酵素が多い。それらの基質特異性について、次項以下で簡単に述べる。

D. *P. damsela* 由来 α 2,6-シアル酸転移酵素

これまでに、本来生体内で α 2,6-シアル酸転移酵素を生産する細菌としては、*P. damsela* が報告されているのみである (47)。*N. meningitidis* が生産する α 2,3-シアル酸転移酵素については、その内部アミノ酸の置換により α 2,6-シアル酸転移活性を示すことが報告されている (48)。*P. damsela* の生産する α 2,6-シアル酸転移酵素は、菌体から酵素を抽出する際に界面活性剤が必須であったことから、菌体内においては膜結合型酵素として存在すると想定された。我々はこの菌株からシア

Table II. Monosaccharide and disaccharide acceptor specificity of sialyltransferase produced by *Photobacterium damsela* JT0160.

Acceptor substrate (20mM)	NeuAc transferred (nmol/min)
Methyl α -D-galactopyranoside	0.12
Methyl β -D-galactopyranoside	0.35
Methyl α -D-glucopyranoside	0.02
Methyl β -D-glucopyranoside	0.03
Methyl α -D-mannopyranoside	0.02
Methyl β -D-mannopyranoside	0.03
Methyl α -D-N-acetylgalactosaminide	0.11
Methyl α -D-N-acetylglucosaminide	0.01
Methyl β -D-N-acetylglucosaminide	0.02
Lactose	3.8
N-acetylactosaminide	2.37

Fig. 2. Enzymatic syntheses of several sialyl-oligosaccharides using α 2,6-sialyltransferase produced by *Photobacterium damsela* JT0160. The structures of oligosaccharides were examined by ^1H and ^{13}C -NMR spectroscopy.

thought to be membrane bound enzyme *in vivo* due to the fact that the enzyme was not extracted from the bacterium without detergent. We have demonstrated that this α 2,6-sialyltransferase had a unique acceptor substrate specificity compared with those of mammalian enzymes. This enzyme recognized both lactose and N-acetylactosamine as good acceptor substrates (Table II). Furthermore, as shown in Figure 2, this α 2,6-sialyltransferase transferred NeuAc to the galactose residue of carbohydrate chains at position 6 of 2'-fucosyl and 3'-sialyl lactose, respectively (49). This α 2,6-sialyltransferase, as shown in Table III, also transferred NeuAc to both asialo-N-linked and asialo-O-linked glycoproteins (50). As to the donor substrates, this enzyme recognized not only CMP-NeuAc but also CMP-KDN (51). The kinetic parameters of this sialyltransferase for donor

ル酸転移酵素を精製して、この酵素が動物由来のシアル酸転移酵素と比較して特長的な基質特異性を有していること、酵素蛋白質の構造が異なること等を明らかにしてきた。具体的には、この細菌由来の酵素はラクトース、N-アセチルラクトサミンのいずれも良い基質とした(表II)(47)。また、この酵素は3'-シアリルラクトース、2'-フコシルラクトース、N-アセチルガラクトサミンへもシアル酸を転移させること(図2)(49)、更に、N-結合型及びO-結合型糖蛋白質へもシアル酸を転移させることが明らかとなった(表III)。種々の糖鎖に対するシアル酸転移反応を行い、この酵素の糖受容体基質特異性を明らかにした(50)。また、この酵素はCMP-KDNを糖供与体基質とすることも明らかにされている(51)。この酵素の糖供与体基質、糖受容体基質に対する反応速度定数を示す(表IV)。このシアル酸転移酵素の糖供与体基質に対する K_m

Table III. Acceptor specificity of sialyltransferase produced by *Photobacterium damsela* JT0160 for glycoproteins.

Acceptor substrate	NeuAc transferred (nmol)		
	Reaction time	5 min	60 min
Asialo-fetuin		3.3	11.2
Asialo- α_1 acid glycoprotein		3.1	10.9
Asialo-bovine submaxillary mucin		0.9	3.5

Table IV. Kinetic parameters of sialyltransferase produced by *Photobacterium damsela* JT0160.

Compound	K_m (mM)	V_{max} (units/mg)
Donor substrate		
CMP-NeuAc	0.32	7.7
Acceptor substrate		
Lactose	6.82	6.4
<i>N</i> -acetyllactosaminide	8.95	9.7
Methyl β -D-galactopyranoside	174	6.4

substrate and acceptor substrates are summarized in Table IV. The kinetic study showed the K_m value for the donor substrate CMP-NeuAc to be 320 μ M, which is slightly higher than that of rat liver α 2,6-sialyltransferase. As to acceptor substrate, its recognition of the non-reducing terminus seemed to be less strict than that of rat liver sialyltransferase. In the case of rat liver α 2,6-sialyltransferase, the K_m value for the lactose is about 33-fold higher than that of *N*-acetyllactosaminide. On the other hand, in the case of α 2,6-sialyltransferase of *P. damsela* JT0160, lactose has almost the same K_m value as *N*-acetyllactosaminide. These results indicate that α 2,6-sialyltransferase of *P. damsela* JT0160 does not recognize the 2-acetamido group in the *N*-acetylglucosaminyl residue. In addition, the structure of α 2,6-sialyltransferase seemed to be quite different from those of the known enzymes. Many mammalian sialyltransferases were cloned and comparison of their amino acid sequences has revealed conserved regions, which were named as the sialyl-motifs in the catalytic domains (52). However, the analysis of the α 2,6-sialyltransferase from *P. damsela* JT0160 did not detect any regions homologous to the cloned mammalian sialyltransferases. The deduced primary sequences of the cloned mammalian sialyltransferases was predicted to carry a short amino-terminal cytoplasmic domain, a signal-membrane anchor domain, a stem region, and a large catalytic domain on the carboxy-terminal side of the mature proteins. On the other hand, when the carboxy-terminus of the α 2,6-sialyltransferase from *P. damsela* JT0160 was truncated, the protein became soluble and still retained the sialyltransferase activity. From this result, it was predicted that the catalytic domain of the enzyme was in the

値は 320 μ M であり、これはラット肝臓由来の α 2,6-シアル酸転移酵素と比較するとやや高い値であった。一方、このシアル酸転移酵素の糖受容体基質の認識は、動物由来の酵素と比較してあまり厳密ではないと考えられた。すなわち、ラット肝臓由来の α 2,6-シアル酸転移酵素の場合、ラクトースに対する K_m 値は *N*-アセチルラクトサミニドの K_m 値と比較して約 33 倍程度高いことが報告されているが、この酵素の場合には、ラクトースと *N*-アセチルラクトサミニドの K_m 値はほぼ同様であった。この結果は、*P. damsela* JT0160 由来 α 2,6-シアル酸転移酵素は *N*-アセチルラクトサミニドの 2-acetamido グループを認識していないことを示している。

P. damsela JT0160 由来 α 2,6-シアル酸転移酵素をコードする遺伝子の解析を行なったところ、哺乳動物由来のシアル酸転移酵素の中で保存されているシアリルモチーフ (52) が存在しないことが明らかとなった。またアミノ酸配列の解析結果から、この酵素蛋白質の 3 次元構造は動物由来の糖転移酵素とは異なることが推定された。すなわち、哺乳動物由来のシアル酸転移酵素はいずれも II 型の膜結合トポロジーを有し、アミノ末端に存在する短い細胞質領域、膜結合領域、ゴルジ内腔幹領域と酵素蛋白質のカルボキシ末端部分からなるゴルジ内腔活性領域からなると考えられている。一方、本酵素のカルボキシ末端側に存在する、疎水性が高く大腸菌のピルビン酸酸化酵素と高い相同性を示す領域を欠損させた組換え酵素を大腸菌内で発現させたところ、この組換え酵素が可溶性酵素として生産された。この結果から、*P. damsela* JT0160 が生産する酵素は、そのカルボキシ末端側に膜結合領域が存在し、触媒領域は蛋白質のアミノ末端側に存在すると想定された。次に、この酵素蛋白質が活性を示すために最小のアミ

Fig. 3. Preparation of various truncated sialyltransferases and their enzyme activity. The protein lacking both N-terminal 107 amino acids and C-terminal 176 amino acids retained the enzymatic activity. On the other hand, the deletion of N-terminal 149 amino acids or C-terminal 263 amino acids caused the complete loss of the activity. *: Full length form of *P. damsela* JT 0160 α2,6-sialyltransferase.

amino-terminal side of the protein, and the α-helix structures, which might be formed in the carboxy-terminal regions of the enzyme, seemed to be involved in membrane binding (24).

We then constructed a number of expression vectors, which contained a series of truncated sequences of the sialyltransferase, and proteins were produced in *E. coli* to identify portions of the protein essential for the activity. As shown in Figure 3, four of the truncated proteins showed enzyme activities. The shortest, active truncated enzyme, which lacked 107 amino acids residues from the amino-terminus and 176 amino acids residues from carboxy-terminus of the full-length enzyme was found in the soluble fraction of the lysate of the *E. coli*. The properties of the truncated enzyme were examined further, and the kinetic parameters of this protein for donor and acceptor substrate were similar to those of the native enzyme.

As of April 2006, the α2,6-sialyltransferase from *P. damsela* JT0160 was classified into family GT80 in the CAZy database (53, 54). Only two sialyltransferases with confirmed enzyme activities, α2,6-sialyltransferase from *P. damsela* JT0160 and α2,3-sialyltransferase from *P. multocida*, have so far been classified in family GT80. The way that these bacteria evolved such enzymes is of particular interest.

ノ酸領域を明らかにするために、本酵素遺伝子の配列を基に様々なプライマーを設定、本遺伝子 DNA を鋳型に PCR を行い種々の遺伝子断片を得た後、発現ベクターを構築した。それら発現ベクターで形質転換した大腸菌を培養し、種々の truncated 酵素の活性を調べた。その結果、完全長の酵素蛋白質から、アミノ末端から 107 アミノ酸、カルボキシ末端から 176 アミノ酸までを欠損させた 4 種類の truncated 酵素については、シアル酸転移活性が確認できたが、それ以上欠損させた場合には酵素活性が認められなかった(図 3)。また、酵素活性を有する最も短い truncated 酵素については、酵素蛋白質の精製を行い、酵素の性質を検討した。この truncated 酵素は、糖受容体基質であるラクトース、糖供与体基質である CMP-シアル酸に対して、*P. damsela* JT0160 株から精製された酵素とほぼ同様の親和性を示した。

P. damsela JT0160 由来の α2,6- シアル酸転移酵素は、2006 年 4 月現在、The CAZy database では Family GT80 に分類されている (53, 54)。このグループには、機能が明らかにされている蛋白質としては、本酵素以外には *P. multocida* 由来の α2,3- シアル酸転移酵素が分類されているのみである (25)。本酵素は、これまでに報告されている多くのシアル酸転移酵素とは相溶性が低いことから、*P. damsela* がどのようにこのシアル酸転移酵素活性を獲得したのか興味深い。

E. α2,3-Sialyltransferases Produced by Several Marine Bacteria

The results of the homology analysis of amino acid

E. 海洋性細菌由来 α2,3- シアル酸転移酵素

Photobacterium sp. JT-ISH-224 株由来 α2,3- シアル酸転移酵素、*P. multocida* 由来の α2,3- シアル酸転移酵素並びに *P. dam-*

sequences of α 2,6-sialyltransferase from *P. damsela* JT0160, α 2,3-sialyltransferases from *P. multocida* and α 2,3-sialyltransferases from *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 was shown in Figure 4. In Figure 5, the extent of amino acid sequence homology among α 2,6-sialyltransferase from *P. damsela* JT0160, α 2,3-sialyltransferases from *P. multocida*, from *P. phosphoreum* JT-ISH-467, from *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 and from *Vibrio* sp. JT-FAJ-16 is diagrammed. *Vibrio* sp. JT-FAJ-16 was the first bacterium in genus *Vibrio* that was reported to produce sialyltransferase. Homology between α 2,3-sialyltransferase from *Vibrio* sp. JT-FAJ-16 and the one from *P. phosphoreum* JT-ISH-467 was 64.7% and homology between the ones from *Vibrio* sp. JT-FAJ-16 and from *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 was 64.8% (Figure 5).

sela JT0160 株由来の α 2,6- シアル酸転移酵素のアミノ酸配列の相同性解析結果を示す(図 4)。また、図 5 に *P. phosphoreum* JT-ISH-467 株、*Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株及び *Vibrio* sp. JT-FAJ-16 株由来 α 2,3- シアル酸転移酵素、*P. multocida* 由来の α 2,3- シアル酸転移酵素及び *P. damsela* JT0160 株由来の α 2,6- シアル酸転移酵素の相同性を示す。なお今回示す *Vibrio* sp. JT-FAJ-16 株は *Vibrio* 属細菌としては初めて α 2,3- シアル酸転移酵素を有することが明らかにされた菌株である。

Vibrio sp. JT-FAJ-16 株と *P. phosphoreum* JT-ISH-467 株及び *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株由来の α 2,3- シアル酸転移酵素の相同性はそれぞれ 64.7%、64.8% と比較的高かったが、これらと *P. multocida* 由来の α 2,3- シアル酸転移酵素との相同性は

a.	1	MKKILTSLVLSIFILSACNSDNTSLKETVSSNSADVETETTYQLTFIDAPSSFLSHSWEQTCGTFILNESDKQAIISFD	100	a.
b.	1	-----	14	b.
c.	1	-----MLV	27	c.
a.	101	YITNTTLTVVAFPLEVYIDHASLPSLQQLIHIIQAKDEYPSNORFVSWKRVTVADANANKLNIHTYFLKGNNTSP	199	a.
b.	15	IFSLFSTLSWSKTIITLYLDPASLPALNOLMDFTONNED-KTHPRIFGLSRFIPDNIIITQYQNIHFVELKDNRPTEAL	110	b.
c.	28	HNSDGNITKNKTIIEVYVDRATLEPTIQOMTQIINENS--NKKLISWSRYPIINDEELLE--SINGSFFKNN--SEL	119	c.
a.	200	ARHFNENLPPIIOPLYNN-EKVKISHISLYDDGSSEYVSLYQWKDTENKIETLEGEVSLIANYL-AGTSPDAFKMG	297	a.
b.	111	AHSVQLIRPIIAYREKHLDRVSIQRNLNLYDDGSMEYVDI-EKEENKDISAEIKQAEKQLSHYL-LTGKIKFDNPT	208	b.
c.	120	LWAADVNN-IKSIKIEAFGKKEIE-LNFIYDDGSAEYVRLYDFSKLFESEQEVKISLSKDNILSSINGTQFFEN	217	c.
a.	298	ANLHDLRDYLGSSAKQMPWDEFKLSDSQQTLELDIVGFDKEQLQQYSQSPLNFIPTGTTTWAAG-ETKEYYAQQQ	394	a.
b.	209	EFLQPLKEYLEAENYQKMDWTAYQQLTPEQQAFYLTIVGPN-DEVKQSL-EVQQAIFIFTGTTTWEENTDVREY	304	b.
c.	218	LPLRSLKGVLSNNIKQMKWDYFKTFNSQOKDKFYNFTGFNPDEIMEQYKASFNKNFIFVGTNS-----GTAT	310	c.
a.	395	DLFFKGHPAGGVINDIILGSSFPDMINIPAKISFEVLMMTDLFDTVAGIASSLYFTIPADKVNFIIVFTSSDTIT	494	a.
b.	305	KIYFKGHPRGGEINDYIILNNAKNIITNIPAKISFEVLMMTGLLPDKVGGVASSLYFSLPKEKISHIIFTSNKQ	404	b.
c.	311	DLFFKGHP-SATYKQIIDA-HNMIEINKIIFEEALIMTDALPDVAGMGSSVFESLPTVTEENKFLF-----	403	c.
a.	495	FWADHKVNSMEVAIDEACTRIIAKQPTASDLRLVIAIKITITDLERIGDVAESIKAVALSEFSNKQYNLLVLSLES	594	a.
b.	405	FWDSLKQL-----	412	b.
c.	404	LISDLQ-----	409	c.
a.	595	IEVYQEDDRIDQEYESIVRQLMAHMMEDPSSIPNVMKVMWAARSIERVGDRCQNICEYIIYFVKGKDVHRHTKPD	675	a.
b.	412	-----	412	b.
c.	409	-----	409	c.

Fig. 4. Comparison of amino acid sequences of bacterial sialyltransferases. a: α 2,6-sialyltransferase (*Photobacterium damsela* JT-0160), b: α 2,3-sialyltransferase (*Pasteurella multocida*), c: α 2,3-sialyltransferase (*Photobacterium* sp. JT-

Fig. 5. Homology of bacterial sialyltransferases.

Table V. Transfer assay of *Vibrio* sp. JT-FAJ-16 α 2,3-sialyltransferase for mono- and di-saccharides.

Acceptor substrate	NeuAc transferred (nmol)
Gal α -OMe	10.3
Gal β -OMe	8.7
GalNAc α -OMe	4.4
Gal β 1,3-GlcNAc α -OMe	9.4
Lactose	7.6
LacNAc β -OMe	9.6

Incubation time: 14h at 25°C

Table VI. Acceptor specificity of the α 2,3-sialyltransferase produced by *Photobacterium phosphoreum* JT-ISH-467 for oligosaccharides.

Acceptor substrate	NeuAc transferred
Gal β 1,4Glc-PA	+
Gal β 1,3GalNAc β 1,4Gal β 1,4Glc-PA	+
Gal β 1,3GalNAc β 1,4 Neu5Ac α 2,3 Gal β 1,4Glc-PA	+
Gal α 1,4Gal β 1,4Glc-PA	+
GalNAc α 1,3GalNAc β 1,3Gal α 1,4Gal β 1,4Glc-PA	+
Gal β 1,4GlcNAc β 1,2Man α 1,6 Gal β 1,4GlcNAc β 1,2Man α 1,3 Man β 1,4 GlcNAc β 1,4GlcNAc-PA	+

However, homology between the ones from *P. multocida* and from *Vibrio* sp. JT-FAJ-16 was 27.3%, homology between ones from *P. multocida* and from *P. phosphoreum* JT-ISH-467 was 28.6%, and homology between ones from *P. multocida* and from *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 was 29.4%.

Acceptor substrate specificity of α 2,3-sialyltransferase from *Vibrio* sp. JT-FAJ-16 for several mono- and disaccharides is shown in Table V. The anomer selectivity of this enzyme was quite low. This enzyme was able to transfer NeuAc to both methyl α -galactopyranoside and methyl β -galactopyranoside at almost the same level. Furthermore, the enzyme transferred NeuAc to disaccharides, such as lactose and *N*-acetyllactosamine at the same level.

Acceptor substrate specificity of α 2,3-sialyltransferase from *P. phosphoreum* JT-ISH-467 for several oligosaccharides was shown in Table VI. It was also confirmed that this enzyme was able to transfer NeuAc to asialo *N*-linked glycoproteins, such as asialo-fetuin (data not shown).

The optimum pH and temperature for α 2,3-sialyltransferase *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 were 5.0 and 30°C, respectively. Other α 2,3-sialyltransferases from *P. phosphoreum* JT-ISH-467 and *Vibrio* sp. JT-FAJ-16 showed almost the same optimum pH and temperature, respectively.

順にそれぞれ 27.2%、28.6%、29.4% であった。

ここに、*Vibrio* sp. JT-FAJ-16 株の組換え体 α 2,3- シアル酸転移酵素の単糖、2 糖類に対するシアル酸の転移能を示す(表 V)。この酵素は、糖受容体基質のアノマー選択性が極めて低く、メチル- α -ガラクトピラノシド、メチル- β -ガラクトピラノシドにはほぼ同程度シアル酸を転移する。また、表 4 に示す 2 糖類に対してもほぼ同じ程度のシアル酸を転移する特徴的な糖受容体基質特異性を有している。

P. phosphoreum JT-ISH-467 株由来の α 2,3- シアル酸転移酵素の各種糖鎖に対するシアル酸転移活性を示す(表 VI)。この酵素はアシアロフェツインのような糖蛋白質にもシアル酸を転移する。なお、このシアル酸転移酵素の詳細な糖受容体基質特異性は、現在検討中である。

Photobacterium sp. JT-ISH-224 株由来 α 2,3- シアル酸転移酵素の至適温度と pH はそれぞれ 30°C、5.0 である。これら 3 種類の α 2,3- シアル酸転移酵素はいずれもほぼ同様の至適温度及び pH を有していた。

またデータは示さないが、いずれの酵素もその発現レベルは高く、いずれの酵素についても大量供給が可能である。

The expression levels of recombinant genes have not particularly been optimized, but were already very high. In addition, we were able to successfully purify recombinant enzymes to homogeneity with very high yield. Therefore, it is now possible to supply a large amount of α 2,3-sialyltransferases.

F. Future Perspective

In recent years, studies on carbohydrate-related enzymes of bacteria has made great progress. It seems to be quite possible that glycoproteins will be produced in further engineered prokaryotes in the near future. In addition, the supply of sugar nucleotides, such as CMP-NeuAc and UDP-Gal, which was a key limiting factor in enzymatic glycosylation, has very much improved. For example, it has been clearly demonstrated that 17 g/l of CMP-NeuAc was produced after 27 h reaction starting with orotic acid and NeuAc through the coupling of recombinant *E. coli* cells overexpressing the genes of CMP-NeuAc synthetase and CTP synthetase, and *Corynebacterium ammoniagenes* (55). Similarly, it has also been demonstrated that 44 g/l of UDP-Gal was produced after 21 h reaction starting with orotic acid and galactose (56). Moreover, several glycosyltransferases having broad acceptor substrate specificity from prokaryote are now available and the number is increasing. Thus, easy enzymatic production of glycans and/or modification of glycoconjugate at low cost have been becoming more and more widely applicable. Novel products in the pharmaceutical, food and other industries are expected to be developed aided by advancing glycotechnology.

Acknowledgements

We would like to thank Ms. H. Kajiwarra and Ms. M. Ichikawa for their technical assistance.

References

1. Varki, A. (1993) *Glycobiology* **3**, 97–130
2. Gagneux, P., and Varki, A. (1999) *Glycobiology* **9**, 747–755
3. Stults, C. L.M., Sweeley, C. C., and Macher, B. A. (1988) in *Methods in Enzymology*, vol. 179, pp.167–214
4. Burda, P., and Aebi, M. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 230–257
5. Wakarchuk, W. W., Gilbert, M., Martin, A., WU, Y., Brisson, J. R., Thibault, P., and Richards, J. C. (1998) *Eur. J. Biochem.* **254**, 626–633
6. Muldon, J., Shashkov, A. S., Moran, A. P., Ferrsi, J. A., Senchenkova, S. N., and Savage, A. V. (2002) *Carbohydr. Res.* **337**, 2223–2229
7. Guerry, P., Szymanski, C. M., Prendergast, M. M., Hickey, T. E., Ewing, C. P., Pattarini, D. L., and Moran, A. P. (2002) *Infect Immun.* **70** (2): 787–793
8. Erickson, P. R., and Herzberg, M. C. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 23780–23783
9. Young, N. M., Brisson, J. R., Kelly, J., Watson, D. C., Tessier, L., Lanthier, P. H., Jarrell, H. C., Cadotte, N., St Michael, F., Aberg, E., and Szymanski, C. M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 42530–42539
10. Wacker, M., Linton, D., Hitchen, P. G., Nita-Lazar, M., Haslam, S. T., North, S. J., Panico, M., Morris, H. R., Dell, A., Wren, B. W., and Aebi, M. (2002) *Science* **298**, 1790–1793
11. Koizumi, S. (2003) *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **15**, 65–74
12. Johnson, K. F. (1999) *Glycoconj. J.* **16**, 141–146
13. Izumi, M., Shen, G. -J., Wacowish-Sgarbi, S., Nakatani, T., Plettenburg, O., and Wong, C. -H. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 10909–10918

これら3種類の α 2,3-シアル酸転移酵素の中では、*Vibrio* sp. JT-FAJ-16株由来 α 2,3-シアル酸転移酵素の生産性が最も高かった。

F. 今後の展望

ここ数年間で微生物由来の糖質関連酵素に関する研究は大きく進展してきた。今後の研究の進展によって、将来微生物を用いた糖蛋白質の生産技術が構築されることも夢ではないと考えられる。また、糖転移酵素を用いる場合に欠点とされていた糖供与体基質についても安価、且つ大量調製が可能になっている。具体的には、CMP-シアル酸合成酵素とCTP合成酵素を発現する組換え大腸菌と *Corynebacterium ammoniagenes* を酵素源として、オロット酸、N-アセチルノイラミン酸を主原料として反応を行ない、反応開始から27時間後に反応溶液1Lあたり17gのCMP-シアル酸が合成されることが示されている(55)。また、同様の方法で、オロット酸とガラクトースを主原料として反応を行ない、反応開始から21時間後に反応溶液1Lあたり44gのUDP-ガラクトースを合成することが示されている(56)。更に本稿で示したとおり、糖受容体基質特異性が広く、大量調製が可能なシアル酸転移酵素も増えつつあり、簡便且つ安価なシアリル化が可能になりつつある。今後、これらの技術を用いた医薬品や機能性食品等が開発され、糖鎖生物学・糖鎖工学がますます発展することを期待したい。

14. Izumi, M., and Wong, C. -H. (2001) Trends in Glycoscience and Glycotechnology **13**, 345–360
15. Schauer, R. (1982) in Advances in carbohydrate chemistry and biology, 40, pp.131–234, Academic Press, New York
16. Schauer, R. (2004) Zoology **107**, 49–64
17. Elliott, S., Lorenzini, T., Asher, S., Aoki, K., Brankow, D., Buck, L., Buese, L., Chang, D., Fuller, J., Grant, J., Hernday, N., Hokum, M., Hu, S., Knudten, A., Levin, N., Komorowski, R., Martin, F., Navarro, R., Osslund, T., Rogers, G., Rogers, N., Trail, G., and Egrie, J. (2003) Nat. Biotechnol. **21**, 414–421
18. Sato, M., Furuike, T., Sadamoto, R., Fujitani, N., Nakahara, T., Nikura, K., Monda, K., Kondo, H., and Nishimura, S.-I. (2004) J. Am. Chem. Soc. **126**, 14013–14022
19. Jennings, M. P., Virji, M., Evans, D., Foster, V., Srikhanta, Y. N., Steeghs, L., van der, L. P., and Moxon, E. R. (1998) Mol. Microbiol. **29**, 975–984
20. Power, P. M., Roddam, L. F., Dieckelmann, M., Srikhanta, Y. N., Tan, Y. C., Berrington, A. W., and Jennings, M. P. (2000) Microbiology **146**, 967–979
21. Gilbert, M., Watson, D.C., Cunningham, A.M., Jennings, M.P., Young, N.M., and Wakarchuk, W.W. (1996) J. Biol. Chem. **271**, 28271–28276
22. Gilbert, M., Brisson, J.R., Karwaski, M.F., Michniewicz, J., Cunningham, A.M., Wu, Y., Young, M., and Wakarchuk, W.W. (2000) J. Biol. Chem. **275**, 3896–3906
23. Shen, G.J., Datta, A.K., Izumi, M., Koeller, K.M., and Wong, C.-H. (1999) J. Biol. Chem. **274**, 35139–35146
24. Yamamoto, T., Nakashizuka, M., and Terada, I. (1998) J. Biochem. **123**, 94–100
25. Yu, H., Chokhawala, H., Karpel, R., Bingyuan, H. Y., Zhang, J., Zhang, Y., Jia, Q., and Chen, X. (2005) J. Am.Chem. Soc. **127**, 17618–17619
26. Hood, D.W., Cox, A.D., Gilbert, M., Makepeace, K., Walsh, S., Deadman, M.E., Cody, A., Martin, A., Mansson, M., Schweda, E.K.H., Brisson, J.-R., Richards, J.C., Moxon, E.R., and Wakarchuk, W.W. (2001) Mol. Microbiol. **39**, 341–350
27. Jones, P.A., Samuels, N.M., Phillips, N.J., Munson, R.S. Jr., Bozue, J.A., Arseneau, J.A., Nichols, W.A., Zaleski, A., Gibson, B. W., and Apicella, M.A. (2002) J. Biol. Chem. **277**, 14598–14611
28. Chaffin, D.O., McKinnon, K., and Rubens, C.E. (1996) Mol. Microbiol. **45**, 109–122
29. Chiu, C. P. C., Watts, A. G., Lairson, L. L., Gilbert, M., Lim, D., Wakarchuk, W. W., Withers, S. G., and Strynadka, N. C. (2004) Nat. Struct. Biol. **11**, 163–170
30. Ni, L., Sun, M., Yu, H., Chokhawala, H., Chen, X., and Fisher, A. J. (2006) Biochemistry **45**, 2139–2148
31. Gotschlich, E. C. (1994) J. Exp. Med. **180**, 2181–2190
32. Wakarchuk, W.W., Martin, A., Jennings, M.P., Moxon, E.R., and Richards, J.C. (1996) J. Biol. Chem. **271**, 19166–19173
33. Gilbert, M., Brisson, J.R., Karwaski, M.F., Michniewicz, J., Cunningham, A.M., Wu, Y., Young, M., and Wakarchuk, W.W. (2000) J. Biol. Chem. **275**, 3896–3906
34. Watanabe, M., Miyake, K., Yanae K., Kataoka, Y., Koizumi, S., Endo, T., Ozaki, A., and Iijima, S. (2002) J. Biochem. **131**, 183–191
35. Riley, J. G., Menggad, M., Montoya-Peleaz, P. J., Szarek, W. A., Marolda, C.L., Valvano, M.A., Schutzbach, J. S., and Brockhausen, I. (2005) Glycobiology **15**, 605–613
36. Endo, T., Koizumi, S., Tabata, K., and Ozaki, A. (2000) Glycobiology **10**, 809–813
37. Kolkman, M.A.B., Wakarchuk, W.W., Nuijten, P.J.M., and van der Zeijst, B.A.M. (1997) Mol. Microbiol. **26**, 197–208
38. Ge, Z., Chan, N.W.C., Palcic, M.M, and Taylor, D.E. (1997) J. Biol. Chem. **272**, 21357–21363
39. Wang, G., Boulton, P.G., Chan, N.W.C., Palcic, M.M, and Taylor, D.E. (1999) Microbiology **145**, 3245–3253
40. Rasko, D.A., Wang, G., Palcic, M.M, and Taylor, D.E. (2000) J. Biol. Chem. **275**, 4988–4994
41. Quinto, C., Wijfjes, A. H., Bloembergen, G. V., Blok-Tip, L., Lopez-Lara, I. M., Lugtenberg, B. J., Thomas-Oates, J. E., and Spaink, H. P. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 4336–4341
42. Quesada-Vincens, D., Fellay, R., Nasim, T., Viprey, V., Burger, U., Prome, J. C., Broughton, W. J., and Jabbouri, S. (1997) J. Bacteriol. **179**, 5087–5093
43. Jennings, M.P., Hood, D.W., Peak, I.R.A., Virji, M., and Moxon, E. R. (1995) Mol. Microbiol. **18**, 729–740
44. Sun, S., Scheffler, N. K., Gibson, B. W., Wang, J., and Munson, R. S. Jr. (2002) Infect Immun. **70**, 5887–5892
45. Wang, Q. M., Peery, R. B., Johnson, R. B., Alborn, W. E., Yeh, W. K., and Skatrud, P. L. (2001) J. Bacteriol. **183**, 4779–4785
46. Shao, J., Zhang, J., Kowal, P., Lu, Y., and Wang, P. G. (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun. **295**, 1–8
47. Yamamoto, T., Nakashizuka, M., Kodama, H., Kajihara, Y., and Terada, I. (1996) J. Biochem. **120**, 104–110
48. Wakarchuk, W.W., Watson, D., Michael, F. St., Li, J., Wu, Y., Brisson, J.-R., Young, N.M., and Gilbert, M. (2001) J. Biol. Chem. **276**, 12785–12790
49. Kajihara, Y., Yamamoto, T., Nagae, H., Nakashizuka, M., Sakakibara, T., and Terada, I. (1996) J. Org. Chem. **61**, 8632–8635
50. Yamamoto, T., Nagae, H., Kajihara, Y., and Terada, I. (1998) Biosci. Biotechnol. Biochem. **62**, 210–214
51. Kajihara, Y., Akai, S., Nakagawa, T., Sato, R., Ebata, T., Kodama, H., and Sato, K. (1999) Carbohydr. Res. **315**, 137–141
52. Datta, A. K., Sinha, A., and Paulson, J. C. (1998) J. Biol. Chem. **273**, 9608–9618
53. Coutinho, P.M., Deleury, E., Davies, G. J., and Henrissat, B (2003) J. Mol. Biol. **328**, 307–317
54. Campbell, J. A., Davies, G. J., Bulone, V., and Henrissat, B (1997) Biochem. J. **326**, 929–939
55. Endo, T., Koizumi, S., Tabata, K., and Ozaki, A. (2000) Appl. Microbiol. Biotechnol. **53**, 213–217
56. Koizumi, S., Endo, T., Tabata, K., and Ozaki, A. (1998) Nat. Biotechnol. **16**, 847–850

Received on April 28, 2006, accepted on May 31, 2006

Profile of the Authors

Takeshi Yamamoto was born in Hokkaido in 1966. Graduated from Yamagata University, School of Agriculture in 1989 and received his master degree in 1991 from Yamagata University, Graduate School of Agricultural Chemistry. He obtained his Ph.D. degree in 1998 from Iwate University, Graduate School of Agriculture. He has been working for Japan Tobacco Inc. since 1991.

★★★★★★★★★

Yoshimitsu Takakura graduated from Hokkaido University in 1992, started his professional career as researcher at the Japan Tobacco Inc. in the field of plant genetic engineering and microbial biotechnology, and received his Ph. D. from the same University. He is Senior Research Scientist at Glycotechnology Business Unit of Japan Tobacco Inc. His current interests are the development of Bio-sensing device using biologically active molecules and his daughter's growth.

★★★★★★★★★

Hiroshi Tsukamoto received his MS from the Faculty of Agriculture, Okayama University in 1990. He then worked in the plant pathology field as research scientist at Japan Tobacco Inc. for more than 10 years, and received his PhD from the Faculty of Agriculture, Kyoto University in 2000. Since 2003, he has studied glycosyltransferases in microorganisms at Glycotechnology Business Unit, Japan Tobacco Inc.