



## 糖核苷酸的生物合成和应用\*

郝萌 连佳琪 张翠璐 关婉怡\*\*

(河北师范大学分子细胞生物学教育部重点实验室, 河北省分子细胞生物学重点实验室, 河北师范大学生命科学院, 石家庄 050024)

**摘要** 糖基化是生物体中最重要的反应之一, 通过糖基化作用可以形成具有多种生物功能的糖缀合物。糖核苷酸作为 Leloir 型糖基转移酶催化的转糖基反应的糖基供体, 在聚糖和糖缀合物的生物合成中必不可少。然而, 糖核苷酸的成本较高、可用性有限等因素阻碍了生物催化级联反应在工业中大规模的应用。因此, 人们越来越关注糖核苷酸的合成策略, 以实现其在多种领域的广泛应用。目前, 糖核苷酸及其衍生物的化学合成方法已经建立起来, 但合成反应的产量通常很低, 而酶法(化学-酶法)和细胞工厂法在合成糖核苷酸过程中具有显著优势。本文主要围绕哺乳动物中常见的9种糖核苷酸, 概述了其类型和结构、酶法(化学-酶法)和细胞工厂法两种制备方法。伴随糖核苷酸的高效合成, 其多种功能逐渐被发现和应用。本文进一步概述了糖核苷酸在聚糖及糖缀合物合成、糖基转移酶生化性质表征以及生物正交标记策略等方面的应用, 对生物化学、糖生物学的研究以及相关医药产品的研发具有十分重要的意义。

**关键词** 糖核苷酸, 糖基转移酶, 激酶, 焦磷酸化酶

**中图分类号** Q53, Q55

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2023.0197

糖核苷酸(sugar nucleotides)由单糖和核苷单磷酸或核苷二磷酸部分组成<sup>[1]</sup>, 广泛存在于多种生物细胞内, 其在体内外研究中具有重要意义。在生物体内, 糖核苷酸作为糖基化作用的糖基供体, 参与生物体内多种糖代谢途径与重要的糖基化过程<sup>[2]</sup>; 在体外研究中, 糖核苷酸常用于糖基转移酶催化性质与催化机制的研究、参与聚糖及糖缀合物的体外合成等<sup>[3-4]</sup>。目前, 对于天然的糖核苷酸研究比较充分, 哺乳动物中常见的9种糖核苷酸的生物合成途径已被阐明, 通过化学法、酶法(化学-酶法)以及细胞工厂法的策略来合成常见糖核苷酸及其衍生物得以发展<sup>[1, 5-6]</sup>。近年来, 存在于细菌、植物等生物体中的稀有糖核苷酸在体内外的合成途径也逐渐被探索<sup>[7-8]</sup>。虽然非天然的糖核苷酸无法在生物体内合成, 但是其作为碳水化合物合成中糖基转移酶的底物、生化研究中的酶抑制剂、糖缀合物生物合成的组成部分具有巨大的潜力。近年来, 非天然的糖核苷酸也逐渐通过化学法和酶法(化学-酶法)在体外合成<sup>[9]</sup>。

### 1 糖核苷酸的类型和结构

自然界中碳水化合物和糖缀合物的结构复杂, 但在哺乳动物细胞中, 组成寡糖和糖缀合物的主要单糖有9种, 所对应的糖核苷酸如图1所示, 其中, 葡萄糖(glucose, Glc)、半乳糖(galactose, Gal)、*N*-乙酰氨基葡萄糖(*N*-acetylglucosamine, GlcNAc)、*N*-乙酰氨基半乳糖(*N*-acetylgalactosamine, GalNAc)、葡萄糖醛酸(glucuronic acid, GlcA)和木糖(xylose, Xyl)以尿苷二磷酸(uridine 5'-diphosphate, UDP)-糖的形式被激活, 甘露糖(mannose, Man)和岩藻糖(fucose, Fuc)以鸟苷二磷酸(guanosine 5'-diphosphate, GDP)-糖的形式被激活, 以上8种糖核苷酸均在细胞质中合成<sup>[10]</sup>。*N*-乙酰神经氨酸

\* 河北省自然科学基金(C2020205049)资助项目。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 0311-80787576, E-mail: guanwanyi@hebtu.edu.cn

收稿日期: 2023-05-18, 接受日期: 2023-08-09

(*N*-acetylneuraminic acid, Neu5Ac) 以胞苷一磷酸 (cytidine 5'-monophosphate, CMP) -糖的形式被激活, 在细胞核中合成<sup>[10]</sup>。组成常见糖核苷酸的9种单糖除了岩藻糖是L型糖, 其他糖均为D型糖<sup>[11]</sup>。

除了在哺乳动物中常见的9种糖核苷酸, 在细菌、植物等生物体内也存在多种稀有糖核苷酸, 例如植物中存在的UDP-芹菜糖 (UDP-apiose, UDP-Api)、GDP-Gal、腺苷二磷酸葡萄糖 (adenosine-5'-diphosphoglucose, ADP-Glc) 等<sup>[8]</sup>。与真核生物相比, 原核生物使用更广泛的核苷酸来激活糖, 例如脱氧胸苷二磷酸岩藻糖 (deoxythymidine diphosphate-L-fucose, dTDP-Fuc)、dTDP-鼠李糖

(dTDP-rhamnose, dTDP-Rha) 等<sup>[7, 12]</sup>。

近年来, 基于非天然的糖核苷酸重要的生物学意义, 探索高效合成非天然的糖核苷酸的方法引起了越来越多的关注。目前, 大量的非天然的糖核苷酸被合成, 例如, 控制聚糖合成的UDP-*N*-三氟乙酰氨基葡萄糖 (UDP-*N*-trifluoroacetyl glucosamine, UDP-GlcNTFA)<sup>[13]</sup>、应用于酶抑制剂抗癌药物研究中的UDP-4-氟-*N*-乙酰氨基葡萄糖 (UDP-4-fluoro-*N*-acetylglucosamine, UDP-4F-GlcNAc)<sup>[14]</sup>、应用于稳定同位素标记 (stable isotope labels, SILs) 技术的<sup>13</sup>C标记的UDP-GlcA<sup>[15]</sup>以及广泛应用于正交标记策略的由叠氮基和炔基修饰的UDP-GlcNAc和UDP-GalNAc等<sup>[16]</sup>。

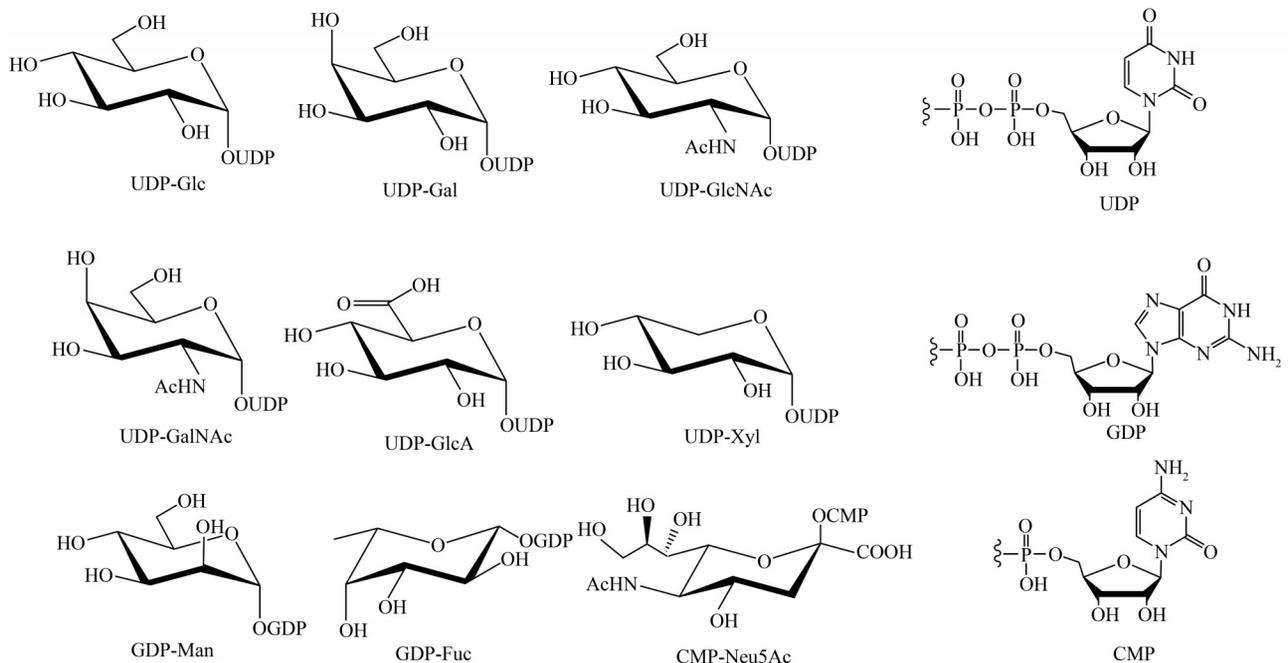


Fig. 1 The structure of the common sugar nucleotides in mammals

图1 哺乳动物中常见的糖核苷酸的结构

## 2 糖核苷酸的制备

糖核苷酸可以通过化学法和酶法 (化学-酶法) 在体外合成或者通过细胞工厂法高效合成。近年来, 糖核苷酸的化学合成方法有了很大的改进。例如, 使用有效的催化剂形成焦磷酸键和开发全新的合成方案<sup>[17-18]</sup>。多种糖核苷酸通过化学方法合成, 尤其是非天然的糖核苷酸<sup>[9]</sup>。但是, 化学合成法需要对化学基团进行保护和脱保护, 步骤复杂, 成本较高, 回收率低。因此, 目前糖核苷酸倾向于使

用酶法 (化学-酶法) 和细胞工厂法实现大规模的制备, 两种方法的特点如表1所示。

Table 1 The methods of sugar nucleotide preparation

表1 糖核苷酸的制备方法

	酶法 (化学-酶法)	细胞工厂法
优点	一锅多酶法简化合成工艺 不涉及转基因菌株, 安全性高 易进行工艺放大	产量高 生产成本低 易进行工艺放大
缺点	成本较高 产率较低	涉及转基因菌株 纯化相对复杂

## 2.1 酶法(化学-酶法)合成糖核苷酸

早期糖核苷酸的酶法或者化学-酶法合成多采用从头合成途径,该途径一般是以常见的单糖(Glc)或者糖核苷酸为起始底物,经过一系列的酶催化最终生成目标糖核苷酸<sup>[19]</sup>。后来通过补救途径合成糖核苷酸的方法也被广泛应用,该途径将单糖直接在激酶作用下进行磷酸化,然后在焦磷酸化酶作用下经过核苷酰转移反应生成相应的糖核苷酸。另外,合成复杂碳水化合物的一锅多酶(one-pot multienzyme, OPME)策略的出现,极大地简化了糖核苷酸的合成过程。与常见糖核苷酸合成相关的酶如表2所示。

### 2.1.1 UDP-Glc及其衍生物的合成

Glc是碳水化合物代谢的核心单糖,UDP-Glc作为Glc的活化形式,是生物体内最常见的糖核苷酸之一,可以转化为UDP-Gal、UDP-GlcA等其他多种糖核苷酸<sup>[8]</sup>。

UDP-Glc体外的酶促合成通常使用UDP-Glc焦磷酸化酶(UDP-Glc pyrophosphorylase, UGPase, EC 2.7.7.9),也称为葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶(glucose-1-phosphate uridylyltransferase, GalU)。Ma等<sup>[20]</sup>利用一锅多酶法,通过己糖激酶(hexokinase, HK, EC 2.7.1.1)、磷酸葡萄糖变位酶(phosphoglucumutase, PGM, EC 5.4.2.2)和UGPase的催化作用以Glc为底物克级合成了UDP-Glc。Lee等<sup>[21]</sup>利用ATP再生系统,使用来自大肠杆菌(*Escherichia coli*) K12的UGPase将UTP和葡萄糖-1-磷酸(glucose-1-phosphate, Glc-1-P)在5 min内高效地转化为UDP-Glc。另外,通过合酶合成糖核苷酸的途径也得到了关注,蔗糖合酶(sucrose synthase, SuSy, EC 2.4.1.13)被广泛用于从蔗糖生产UDP-Glc<sup>[22]</sup>。随着对糖核苷酸合成相关酶底物适应性的研究,UDP-Glc及其衍生物可通过糖激酶和焦磷酸化酶的补救途径高效合成<sup>[23]</sup>。

### 2.1.2 UDP-Gal及其衍生物的合成

Gal是一种普遍存在的单糖,存在于大多数生物的聚糖结构中。UDP-Gal是Gal的活化形式,作为半乳糖基转移酶的底物,用于酶促合成聚糖和糖缀合物。

UDP-Gal可以通过3种方式合成。a.通过UDP-Glc 4-位差向异构酶(UDP-glucose 4-epimerase, UGE, EC 5.1.3.2)催化UDP-Glc转化为UDP-Gal。研究发现,来源于太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)的UDP-Glc 4-位差向异构酶

(CGIUGE)催化效率高且反应条件温和,适合UDP-Gal生产应用,具有很大的开发潜力<sup>[24]</sup>。b.利用半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶(galactose-1-phosphate uridylyltransferase, GalT或称GalPUT, EC 2.7.7.12)将UDP-Glc中的尿苷一磷酸(uridine 5'-monophosphate, UMP)基团转移到半乳糖-1-磷酸(galactose-1-phosphate, Gal-1-P)上,从而合成UDP-Gal。Bülter等<sup>[25]</sup>使用GalT实现了UDP-Gal的克级合成。Liu等<sup>[26]</sup>利用琼脂糖珠固定化的多种酶催化UDP-Gal的克级合成,合成途径涉及GalT等7种酶,包括3个部分:UDP-Gal合成途径、UTP供应途径和ATP再生途径。c.通过补救合成途径合成UDP-Gal,目前主要利用半乳糖激酶(galactokinase, GalK, EC 2.7.1.6)和UDP-糖焦磷酸化酶(UDP-sugar pyrophosphorylase, USP, EC 2.7.7.64)催化生成UDP-Gal。

GalK已经在大肠杆菌<sup>[27]</sup>、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)<sup>[28]</sup>、婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium infantis*)<sup>[29]</sup>等多种生物中鉴定和表达。研究发现,GalK具有广泛的底物特异性,可以磷酸化Glc、Gal、Man等多种单糖及其结构类似物生成相应的糖-1-磷酸(糖-1-P)<sup>[30]</sup>。USP不仅可用于简化UDP-Gal的合成过程,而且这种酶广泛的底物适应性使其可以用于多种糖核苷酸的合成。例如,来源于豌豆(*Pisum sativum* L.)芽的UDP-糖焦磷酸化酶(PsUSP)在UTP存在下合成了UDP-Glc、UDP-Gal、UDP-GlcA和UDP-Xyl等糖核苷酸<sup>[31]</sup>,来源于嗜热古菌强烈热球菌(*Pyrococcus furiosus*) DSM3638的USP,对Glc-1-P、Gal-1-P等糖-1-P均具有耐受性<sup>[32]</sup>。另外,来源于其他植物<sup>[33-34]</sup>、寄生虫<sup>[35]</sup>、细菌<sup>[36]</sup>的USP也被研究。Zou等<sup>[23]</sup>从肺炎链球菌TIGR4中克隆了葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶(SpGalU),联合来自肺炎链球菌TIGR4的半乳糖激酶(SpGalK),并加入商业化的来自酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的无机焦磷酸酶(inorganic pyrophosphatase, PPase, EC 3.6.1.1),成功地利用一锅反应体系合成了UDP-Gal、UDP-Glc及其衍生物,其中UDP-Gal的产率达90%。Muthana等<sup>[36]</sup>克隆了长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)的UDP-糖焦磷酸化酶(BLUSP),结合来自大肠杆菌的半乳糖激酶(EcGalK)、SpGalK等糖激酶和来源于多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)的PPase,开发了一种高效的一锅多酶系统,以快速获得UDP-Gal、

UDP-Glc、UDP-Man 及其衍生物, 其中 UDP-Glc 产率达 99%、UDP-Gal 产率为 86%、UDP-Man 产率为 60%。Liu 等<sup>[37]</sup> 在一锅体系中使用 SpGalK、从拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中克隆的 UDP-糖焦磷酸化酶 (AtUSP) 以及来自酿酒酵母的 PPase 3 种酶, 高效合成了 UDP-Gal、UDP-Glc 等糖核苷酸, 研究发现 AtUSP 对 dUTP 和 dTTP 也具有较大的活性, 并成功合成了 dUDP-Gal 和 dTDP-Glc。Fischöder 等<sup>[38]</sup> 利用来自大肠杆菌的半乳糖激酶 (EcGalK)、来自大麦 (*Hordeum vulgare*) 的 UDP-糖焦磷酸化酶 (HvUSP) 和 PPase, 在重复分批模式中以多克级合成了 UDP-Gal。Wagstaff 等<sup>[39]</sup> 报道了一种一锅多酶方法, 合成了 5 位碱基修饰的 UDP-Glc 和 UDP-Gal, 这种 5 位碱基修饰的糖核苷酸可以作为糖基转移酶抑制剂和糖基转移酶检测的荧光工具。

### 2.1.3 UDP-GlcNAc 及其衍生物的合成

GlcNAc 是生物体内重要的 *N*-乙酰氨基己糖, 存在于多种生物体中。GlcNAc 存在于 *N*-糖基化蛋白的糖链核心结构中、是糖胺聚糖的组成成分, 也是细菌细胞壁骨架的重要组分<sup>[40]</sup>。UDP-GlcNAc 是 GlcNAc 的活化形式, 参与含 GlcNAc 的聚糖及糖缀合物的生物合成过程。

在真核生物和原核生物中, UDP-GlcNAc 由 GlcNAc-1-P 和 UTP 通过 UDP-GlcNAc 焦磷酸化酶 (UDP-GlcNAc pyrophosphorylase, EC 2.7.7.23) 合成。在 GlcNAc 1-位激酶被发现之前, 只有 GlcNAc 6-位激酶被报道, 催化 GlcNAc 合成 GlcNAc-6-P, 然后通过磷酸变位酶和 UDP-GlcNAc 焦磷酸化酶的催化合成 UDP-GlcNAc。能对 GlcNAc 的 C-6 位进行磷酸化的 GlcNAc 激酶在枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)<sup>[41]</sup>、大肠杆菌<sup>[42]</sup> 等多种生物中均被鉴定。2007 年, Nishimoto 等<sup>[43]</sup> 报道了来源于长双歧杆菌的 *N*-乙酰氨基己糖 1-位激酶 (*N*-acetylhexosamine 1-kinase, NahK, EC 2.7.1.157), 其可以将 GlcNAc 直接转化为 GlcNAc-1-P, 简化 UDP-GlcNAc 的合成过程。UDP-GlcNAc 焦磷酸化酶在大肠杆菌<sup>[44]</sup>、枯草芽孢杆菌<sup>[45]</sup> 等原核生物以及酿酒酵母、白色念珠菌等真核生物<sup>[46]</sup> 中均有报道。Zhao 等<sup>[47]</sup> 使用来自长双歧杆菌的 *N*-乙酰氨基己糖 1-位激酶 (BLNahK) 和来自大肠杆菌的 UDP-GlcNAc 焦磷酸化酶 (EcGlmU) 制备了 UDP-GlcNAc 及其类似物。Chen 等<sup>[48]</sup> 克隆了多杀性巴氏杆菌 UDP-

GlcNAc 焦磷酸化酶 (PmGlmU), 并与 BLNahK 和 PPase 以一锅三酶方式有效地合成了 UDP-GlcNAc 及其衍生物, 其中 UDP-GlcNAc 产率达 81%。Morrison 等<sup>[49]</sup> 制备了多种 C-6 位取代的 GlcNAc 衍生物, 利用这些前体, 使用 BLNahK 和 EcGlmU 合成了 C-6 位取代的 UDP-GlcNAc 类似物。Fischöder 等<sup>[38]</sup> 利用 BLNahK 和人 UDP-GalNAc 焦磷酸化酶 (UDP-GalNAc pyrophosphorylase, AGX1, EC 2.7.7.83), 通过重复分批模式实现了 UDP-GlcNAc 的多克级酶促合成。另外, 基于固定化酶技术, 宫雪艳<sup>[50]</sup> 创建了一条以几丁质为原料合成 UDP-GlcNAc 的新途径, 在合成过程中将来自海洋细菌费尼斯弧菌 (*Vibrio furnissii*) 的磷酸化酶 (Vf.ChbP)、BLNahK 以及 AGX1 进行固定化, 使酶的稳定性有所提高, 实现了酶的重复利用, 然后利用固定化酶流动合成了 1.456 g UDP-GlcNAc, 该研究为 UDP-GlcNAc 及其衍生物的合成提供了一种极具潜力的方式。

### 2.1.4 UDP-GalNAc 及其衍生物的合成

GalNAc 是 GlcNAc 的 4-位差向异构体。GalNAc 参与蛋白质 *O*-糖基化, 是人 A 型血抗原决定簇的末端糖单元, GalNAc 在中枢神经系统积累, 参与细胞内信号传导过程<sup>[51]</sup>。GalNAc 的活化形式是 UDP-GalNAc, 在糖基转移酶的作用下合成多种聚糖及糖缀合物。

UDP-GalNAc 可以通过 UDP-GlcNAc 差向异构酶 (UDP-GlcNAc epimerase, EC 5.1.3.7) 对 UDP-GlcNAc 的 4-位进行差向异构化合成, 但是 UDP-GalNAc 和 UDP-GlcNAc 的分离极具挑战性。目前主要利用补救途径合成 UDP-GalNAc 及其结构类似物。NahK 具有广泛的底物特异性, 能够接受 GalNAc 及其类似物作为底物, 产生相应的 GalNAc-1-P 及其类似物<sup>[52-53]</sup>。另外, GlmU 也可以制备 UDP-GalNAc, Guan 等<sup>[54]</sup> 使用 EcGlmU 合成了 UDP-GalNAc 及其衍生物, 但是大部分的 GalNAc-1-P 类似物没有被这种酶接受。当利用 AGX1 时, 成功制备了 UDP-GalNAc 以及 C-2、4、6 位修饰的 UDP-GalNAc 类似物<sup>[55]</sup>。

### 2.1.5 UDP-GlcA 及其衍生物的合成

GlcA 是一类己糖醛酸, UDP-GlcA 作为 GlcA 的活化形式, 主要用于糖胺聚糖的生物合成。另外, *N*-聚糖、*O*-聚糖和鞘糖脂也含有 GlcA<sup>[51]</sup>。UDP-GlcA 也是生物体内合成 UDP-Xyl、UDP-半乳糖醛酸 (UDP-galacturonic acid, UDP-GalA)、

UDP-阿拉伯糖 (UDP-arabinose, UDP-Ara) 等核苷酸的关键前体物质。

UDP-GlcA的生物合成主要有两种途径：一种是广泛存在于真核和原核生物中的UDP-Glc氧化途径，UDP-GlcA由UDP-Glc通过UDP-Glc脱氢酶 (UDP-Glc dehydrogenase, UGDH, EC 1.1.1.22) 的催化作用生成<sup>[56]</sup>；另一种是主要存在于植物体内的肌醇氧化途径，通过葡萄糖醛酸激酶 (glucuronokinase, GlcAK, EC 2.7.1.13) 将GlcA转化为GlcA-1-P，然后经焦磷酸化酶催化生成UDP-GlcA，此途径在低等脊椎动物，如斑马鱼中也有发现<sup>[57]</sup>。UDP-GlcA的体外酶法合成可以基于UDP-Glc氧化途径，即通过UGDH催化UDP-Glc生成UDP-GlcA。UGDH已从许多生物体中分离出来，并进行了鉴定。Broach等<sup>[58]</sup>鉴定和表征了蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 中参与UDP-GlcA生物合成的基因。UGDH在NAD<sup>+</sup>存在下将UDP-Glc转化为UDP-GlcA和NADH。随着GlcAK的克隆和表达，UDP-GlcA可以利用补救途径合成<sup>[59]</sup>。Muthana等<sup>[60]</sup>发现，来源于拟南芥的葡萄糖醛酸激酶 (AtGlcAK) 是一种底物特异性广泛的糖激酶，可以将GlcA、半乳糖醛酸 (galacturonic acid, GalA) 和甘露糖醛酸 (mannosaminuronic acid, ManA) 转化为相应的糖-1-P，利用AtGlcAK、BLUSP和PPase的一锅三酶体系成功合成了UDP-GlcA，产率达80%。Guo等<sup>[61]</sup>对来自于婴儿双歧杆菌的UDP-糖焦磷酸化酶 (BiUSP) 和AtUSP两种酶进行生化表征，制备了207 mg的UDP-GlcA和162 mg的UDP-GalA。

### 2.1.6 UDP-Xyl及其衍生物的合成

Xyl是五碳糖，是构成生物体内糖链结构的重要单糖组分，如动物中Xyl参与构成糖胺聚糖<sup>[62]</sup>，在植物中参与多种多糖的合成，如木聚糖、木葡聚糖和木葡聚糖醛酸<sup>[63]</sup>，Xyl也参与真菌的荚膜多糖的合成<sup>[64]</sup>。UDP-Xyl是Xyl的活化供体形式，作为木糖基转移酶的底物将Xyl添加到受体分子上。

UDP-Xyl的合成主要由UDP-Xyl合酶 (UDP-Xyl synthase, UXS, EC 4.1.1.35)，也称为UDP-GlcA脱羧酶 (UDP-GlcA decarboxylase) 催化UDP-GlcA脱羧反应生成。段旭初<sup>[62]</sup>研究发现，来自海洋嗜热菌 (*Rhodothermus marinus*) 的RmUGD1和RmUXS具有高催化活性、耐高温等特点，利用RmUGD1和RmUXS成功催化UDP-Glc生成了UDP-Xyl。Wang等<sup>[65]</sup>开发了一种化学-酶

法制备UDP-Xyl，其中用化学方法合成了Xyl-1-P，然后利用AtUSP和BiUSP两种UDP-糖焦磷酸化酶合成UDP-Xyl。Wang等<sup>[66]</sup>通过酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的UDP-GlcA脱氢酶 (HasB)，利用NAD<sup>+</sup>驱动的级联反应将UDP-Glc完全转化为UDP-GlcA，在反应体系中加入UXS，合成了多克级的UDP-Xyl。

### 2.1.7 GDP-Man及其衍生物的合成

GDP-Man参与真核N-聚糖、O-甘露糖基化糖蛋白以及细菌细胞表面多糖的合成；GDP-Man也是许多其他天然糖的生物合成的基本代谢中间体，包括GDP-甘露糖醛酸 (GDP-mannuronic acid, GDP-ManA)、GDP-Fuc等<sup>[67]</sup>。

GDP-Man可以通过磷酸甘露糖异构酶 (phosphomannose isomerase, PMI)、磷酸甘露糖变位酶 (phosphomannomutase, PMM)、GDP-Man焦磷酸化酶 (GDP-Man pyrophosphorylase, GMP) 3种酶的作用从果糖-6-磷酸 (Fru-6-P) 衍生而来。Mizanur等<sup>[68]</sup>报道了一种来自强烈热球菌的重组双功能磷酸甘露糖异构酶/GDP-Man焦磷酸化酶 (PFManC)。这种酶的底物特异性非常广泛，可以同时接受腺苷三磷酸 (adenosine 5'-triphosphate, ATP)、鸟苷三磷酸 (guanosine 5'-triphosphate, GTP)、脱氧胸苷三磷酸 (2'-deoxythymidine-5'-triphosphate, dTTP) 等核苷酸和糖-1-P衍生物作为底物。目前发现GDP-Man也可以通过补救途径合成，Li等<sup>[67]</sup>提出了一种高效的一锅三酶系统，用于快速合成GDP-糖及其衍生物。在一锅中使用来自婴儿双歧杆菌的N-乙酰氨基己糖1-位激酶 (BiNahK)、PFManC和PPase 3种酶合成了GDP-Man、GDP-Glc及其衍生物。

### 2.1.8 GDP-Fuc及其衍生物的合成

Fuc是L-构型的6-脱氧己糖，在许多不同的生物体中发现。在哺乳动物中，Fuc参与聚糖和糖缀合物的合成，是蛋白质和脂质修饰中常见的成分，与许多重要的生物学功能有关<sup>[69]</sup>。Fuc也存在于许多植物细胞壁多糖中，在植物的生长发育中发挥重要作用<sup>[70]</sup>。GDP-Fuc作为Fuc的活化形式参与岩藻糖基转移酶的反应。

GDP-Fuc的合成途径通常有两种，一种是遵循生物体内从头合成途径，以GDP-Man为起始物由GDP-Man 4,6-脱水酶 (GDP-Man 4,6-dehydratase, GMD, EC 4.2.1.47)、GDP-4-酮-6-脱氧甘露糖3,5-差向异构酶/4-还原酶 (GDP-keto-6-deoxymannose

3, 5-epimerase/4-reductase, GMER/WcaG, EC 1.1.1.271), 或称为 GDP-Fuc 合成酶 (GDP-Fuc synthetase) 催化形成 GDP-Fuc<sup>[71]</sup>。之后, 在脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*) 中发现了 GDP-Fuc 合成的补救途径, 并发现了 *fkp* 基因, 该基因编码双功能的岩藻糖激酶/GDP-Fuc 焦磷酸化酶 (fucokinase/GDP-Fuc pyrophosphorylase, FKP, EC 2.7.7.30), 同时具有激酶和焦磷酸化酶活性<sup>[72]</sup>。Zhao 等<sup>[47]</sup> 使用 FKP, 通过两步反应, 从 L-Fuc 合成了 150~250 mg 的 GDP-Fuc, 在反应过程中加入酵母 PPase 降解副产物 PPi 来驱动反应前进。FKP 在体外反应中, 对 L-Fuc 的 C-5 位修饰表现出宽松的底物特异性, 从而合成了相应的 GDP-Fuc 的 C-5 位取代的衍生物<sup>[73]</sup>。

### 2.1.9 CMP-Neu5Ac 及其衍生物的合成

唾液酸是一类含 9 个碳原子的单糖衍生物的总称, 其中最常见的是 Neu5Ac<sup>[74]</sup>。在脊椎动物中, 唾液酸主要存在于细胞表面的糖蛋白和糖脂中的碳水化合物结构的最外端, 含唾液酸的结构在多种生理和病理过程中发挥重要作用, 包括细胞-细胞相互作用、炎症、受精、病毒感染、分化、恶性肿瘤和细胞信号转导等; 在细菌中, 唾液酸是细胞外荚膜多糖的组成部分, 这些结构被认为是模拟宿主细胞表面的唾液酸化的碳水化合物, 其存在可以解释细菌逃避宿主免疫防御机制的能力<sup>[75]</sup>。CMP-Neu5Ac 是 Neu5Ac 的活化形式, 在唾液酸转移酶的作用下产生含有唾液酸的寡糖、多糖、糖蛋白和糖脂<sup>[76]</sup>。

与其他常见的糖核苷酸相比, CMP-Neu5Ac 的合成不需要经过糖-1-P 中间体的生成, 可以直接由 Neu5Ac 和 CTP 反应转化为 CMP-Neu5Ac, 由 CMP-Sia 合成酶 (CMP-Sia synthetase, CSS, EC 2.7.7.43) 催化。唾液酸可以由六碳前体, 如 ManNAc, 通过唾液酸醛缩酶 (sialic acid aldolase, NanA, EC 4.1.3.3) 催化合成<sup>[77]</sup>。Yu 等<sup>[75]</sup> 利用大肠杆菌 K12 的 NanA 和不同来源的 CSS 一锅双酶系统合成 100~200 mg 的 CMP-Neu5Ac 及其衍生物, 通过比较 3 种微生物 CSS 的底物灵活性, 发现脑膜炎奈瑟菌 (*Neisseria meningitidis*) CMP-Neu5Ac 合成酶 (NmCSS) 具有最高的表达水平、最灵活的底物特异性和最高的催化效率。之后, Yu 等<sup>[77]</sup> 利

用化学-酶法, 通过对唾液酸的前体 ManNAc/Man 进行修饰生成 ManNAc/Man 类似物, 再利用 NanA、CSS 以及唾液酸转移酶在一锅中将 ManNAc/Man 类似物转化为相应的天然和非天然的唾液酸苷。

### 2.1.10 稀有糖核苷酸的合成

在哺乳动物中出现的 9 种常见糖核苷酸及其衍生物的体外合成已经得到广泛的研究。一些存在于在细菌、植物等生物体中的稀有糖核苷酸在体外也可以通过化学法或酶法 (化学-酶法) 合成。例如, UDP-*N*-乙酰氨基葡萄糖醛酸 (UDP-*N*-acetylglucosaminuronic acid, UDP-GlcNAcA)<sup>[78]</sup> 和 GDP-ManA<sup>[79]</sup> 的化学合成策略已经被报道。然而, 化学合成需要多步反应和复杂的保护、脱保护操作, 往往导致低产量。因此, 酶法 (化学-酶法) 策略也被广泛应用于稀有糖核苷酸的合成。糖核苷酸在生物体内主要通过从头合成途径或补救途径产生。补救途径需要使用激酶和焦磷酸化酶催化糖核苷酸的合成。大多数天然产生的单糖不易获得并且缺乏合适的激酶或焦磷酸化酶, 因此只有少数的糖核苷酸可以通过补救途径来制备。目前自然界中大部分的糖核苷酸都是从常见的糖核苷酸经过从头合成途径产生的。UDP-Glc、UDP-GlcNAc 和 GDP-Man 是常见的 3 种糖核苷酸, 在生物体中可以转化为其他糖核苷酸。近日, Zheng 等<sup>[80]</sup> 利用辅因子驱动的底物盒式反应策略实现了稀有糖核苷酸的高效合成。反应过程首先利用 BLNahK、EcGlmU, 以 GlcNAc 为底物合成 UDP-GlcNAc。然后, 从 UDP-GlcNAc 出发, 利用从不同来源克隆的糖核苷酸合成酶, 通过级联反应实现了 UDP-GlcNAcA、UDP-*N*-乙酰氨基甘露糖醛酸 (UDP-*N*-acetylmannosaminuronic acid, UDP-ManNAcA) 等 12 种稀有糖核苷酸的克级规模合成。另外, Wang 等<sup>[66]</sup> 利用嗜酸性喜温硫杆菌 (*Acidithiobacillus caldus*) 的 SuSy 从蔗糖中大规模制备 UDP-Glc, 利用 NahK、ManC 制备 GDP-Man。然后利用 NADH、NADPH、PLP、AcCoA、NAD<sup>+</sup> 再生系统驱动 UDP-Glc 和 GDP-Man 的酶促反应, 克级合成了 GDP-Rha、GDP-6-脱氧塔罗糖 (GDP-6-deoxy-talose, GDP-6-deoxy-Tal) 等稀有糖核苷酸。

Table 2 Relevant enzymes applied to the synthesis of common sugar nucleotides

表2 应用于常见糖核苷酸合成的相关酶

糖核苷酸	酶	来源	参考文献
尿苷二磷酸葡萄糖 (UDP-Glc)	己糖激酶 (hexokinase, HK)	酵母 (yeast)	[20]
	磷酸葡萄糖变位酶 (phosphoglucomutase, PGM)	鸡肌肉 (chicken muscle)	[20]
	UDP-Glc焦磷酸化酶 (UDP-Glc pyrophosphorylase, UGPase)	酵母	[20]
	UGPase	大肠杆菌K12 ( <i>Escherichia coli</i> K12)	[21]
	蔗糖合酶 (sucrose synthase, SuSy)	嗜酸性喜温硫杆菌 ( <i>Acidithiobacillus caldus</i> )	[22, 65]
	SuSy	大豆 ( <i>Glycine max</i> (soybean))	[22]
	半乳糖激酶 (galactokinase, GalK)	肺炎链球菌TIGR4 ( <i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4)	[23, 36]
	UDP-糖焦磷酸化酶 (UDP-sugar pyrophosphorylase, USP)	长双歧杆菌 ( <i>Bifidobacterium longum</i> )	[35]
	USP	拟南芥 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	[36]
	葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶 (glucose-1-phosphate uridylyltransferase, GalU)	大肠杆菌K12	[21]
尿苷二磷酸半乳糖 (UDP-Gal)	GalU	肺炎链球菌TIGR4	[23]
	UDP-Glc 4-位差异构酶或UDP-Gal 4-位差异构酶 (UDP-Glc 4-epimerase或UDP-Gal 4-epimerase, UGE或GalE)	太平洋牡蛎 ( <i>Crassostrea gigas</i> )	[24]
	UGE/GalE	酿酒酵母 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	[39]
	半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶 (galactose-1-phosphate uridylyltransferase, GalT或GalPUT)	酵母	[25]
	GalT/GalPUT	大肠杆菌	[27, 39]
	GalK	大肠杆菌	[27, 36, 38]
	GalK	婴儿双歧杆菌 ( <i>Bifidobacterium infantis</i> )	[29]
	GalK	嗜黏蛋白阿克曼菌 ( <i>Akkermansia muciniphila</i> )	[30]
	GalK	肺炎链球菌TIGR4	[23, 28, 36]
	USP	豌豆芽 ( <i>Pisum sativum</i> L. (pea) sprouts)	[31]
尿苷二磷酸N-乙酰氨基 葡萄糖 (UDP-GlcNAc)	USP	强烈炽热球菌DSM 3638 ( <i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638)	[32]
	USP	大麦 ( <i>Hordeum vulgare</i> )	[33-34, 38]
	USP	利什曼原虫 ( <i>Leishmania major</i> )	[35]
	USP	长双歧杆菌	[36]
	USP	拟南芥	[33, 37]
	GalU	肺炎链球菌TIGR4	[23]
	GalU	大肠杆菌	[39]
	N-乙酰氨基己糖-1位激酶 (N-acetylhexosamine 1-kinase, NahK)	长双歧杆菌	[38, 43, 47-48, 50, 80]
	UDP-GlcNAc焦磷酸化酶 (UDP-GlcNAc pyrophosphorylase, GlnU)	大肠杆菌	[47, 80]

续表2

糖核苷酸	酶	来源	参考文献
	GlmU	多杀性巴氏杆菌 ( <i>Pasteurella multocida</i> )	[48]
	UDP-GalNAc焦磷酸化酶 (UDP-GalNAc pyrophosphorylase, AGX1)	人类 ( <i>Homo sapiens</i> )	[38, 50]
	N,N'-二乙酰壳二糖磷酸化酶 (N,N'-diacetylchitobiose phosphorylase, ChbP)	费尼斯弧菌 ( <i>Vibrio furnissii</i> )	[50]
尿苷二磷酸N-乙酰氨基	NahK	长双歧杆菌	[55]
半乳糖 (UDP-GalNAc)	GlmU	大肠杆菌	[54]
	AGX1	人类	[55]
尿苷二磷酸葡萄糖醛酸 (UDP-GlcA)	UDP-Glc 6-脱氢酶 (UDP-Glc 6-dehydrogenase, UGlcDH)	蜡样芽孢杆菌 ( <i>Bacillus cereus</i> )	[58]
	葡萄糖醛酸激酶 (glucuronokinase, GlcAK)	拟南芥	[59-61]
	USP	长双歧杆菌	[60]
	USP	拟南芥	[61]
	USP	婴儿双歧杆菌	[61]
尿苷二磷酸木糖 (UDP-Xyl)	UDP-Glc脱氢酶1 (UDP-Glc dehydrogenase 1, UGD1)	海洋红嗜热菌 ( <i>Rhodothermus marinus</i> )	[62]
	UDP-GlcA脱氢酶 (HasB)	酿脓链球菌 <i>Streptococcus pyogenes</i>	[66]
	UDP-Xyl合酶 (UDP-Xyl synthase, UXS)	海洋红嗜热菌	[62]
	UXS	人类	[66]
	USP	拟南芥	[65]
	USP	婴儿双歧杆菌	[65]
鸟苷二磷酸甘露糖 (GDP-Man)	NahK	婴儿双歧杆菌	[67]
	甘露糖-6-磷酸异构酶/甘露糖-1-磷酸鸟苷酰转移酶 (mannose-6-phosphate isomerase/mannose-1-phosphate guanylyltransferase, ManC)	强烈热球菌	[67-68]
鸟苷二磷酸岩藻糖 (GDP-Fuc)	GDP-Man 4, 6-脱水酶 (GDP-Man 4, 6-dehydratase, GMD)	高山被孢霉 ( <i>Mortierella alpina</i> )	[71]
	GDP-4-酮-6-脱氧甘露糖3,5-差向异构酶/4-还原酶 (GDP-4-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase/4-reductase, GMER/WcaG)	高山被孢霉	[71]
	岩藻糖激酶/GDP-Fuc焦磷酸化酶 (fucokinase/GDP-Fuc pyrophosphorylase, FKP)	脆弱拟杆菌 ( <i>Bacteroides fragilis</i> )	[47, 72-73]
胞苷单磷酸N-乙酰神经 氨酸 (CMP-Neu5Ac)	唾液酸醛缩酶 (sialic acid aldolase, NanA)	大肠杆菌K12	[75, 77]
	CMP-Sia合成酶 (CMP-Sia synthetase, CSS)	脑膜炎奈瑟菌 ( <i>Neisseria meningitidis</i> )	[75, 77]
	CSS	无乳链球菌血清型V ( <i>Streptococcus agalactiae</i> serotype V)	[75]
	CSS	大肠杆菌K1	[75]

## 2.2 细胞工厂法合成糖核苷酸

通过酶法 (化学-酶法) 合成糖核苷酸可以在很大程度上简化合成过程, 但是这些方法也具有局限性, 例如糖核苷酸的合成酶的寻找鉴定、可溶性条件的摸索、酶分离纯化过程的繁琐等都会阻碍糖核苷酸的大量合成<sup>[81]</sup>。细胞工厂法是指将微生物

活细胞作为一个“加工厂”, 通过基因工程技术对其代谢途径定向改造, 然后形成高效的“流水线生产工厂”<sup>[82]</sup>。细胞工厂法可以弥补其他合成方法的不足, 多种糖核苷酸已经通过细胞工厂法高效地合成。例如: Gauttam等<sup>[83]</sup>利用谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 制备UDP-GlcNAc,

过表达编码氨基葡萄糖-6-磷酸合酶、双功能的氨基葡萄糖-1-磷酸乙酰转移酶/*N*-乙酰氨基葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶和磷酸氨基葡萄糖变位酶的基因 *glmS*、*glmU* 和 *glmM* 使最佳工程菌株细胞内 UDP-GlcNAc 的浓度增加到 14 mmol/L UDP-GlcNAc; Lee 等<sup>[84-85]</sup> 过表达 GMP 生物合成过程的代谢酶以及过表达内源性 NADPH 再生酶提高了重组大肠杆菌中 GDP-Fuc 的产量, 其中过表达代谢酶得到 (305.5±5.3) mg/L GDP-Fuc, 过表达 NADPH 再生酶得到 (235.2±3.3) mg/L GDP-Fuc; Zhai 等<sup>[86]</sup> 将脆弱拟杆菌的 GDP-Fuc 合成的补救途径引入大肠杆菌, 并通过过表达参与 GTP 生物合成补救途径的酶, 相比从头合成途径的发酵方法, 该重组大肠杆菌中 GDP-Fuc 的发酵产量有所提高, 最大产率达 122 mg/L。

### 3 糖核苷酸的应用

随着天然糖核苷酸以及非天然糖核苷酸的大规模制备, 其功能也被逐渐研究, 广泛应用于聚糖及糖缀合物合成、糖基转移酶生化性质研究、生物正交标记策略研究、肿瘤治疗研究等多个方面 (表3)。

#### 3.1 糖核苷酸在聚糖及糖缀合物合成中的应用

碳水化合物存在于各种生物体中, 是地球上含量最丰富的有机化合物。它们不仅是多种生物体的结构成分和能源物质, 而且在分子识别和相互作用、对生物过程调控、保护和许多其他事件中发挥重要作用<sup>[87]</sup>。糖核苷酸是所有生物体中碳水化合物合成的关键中间体<sup>[37]</sup>, 可以参与人乳寡糖 (human milk oligosaccharides, HMOs)、糖蛋白中的 *N*-聚糖和 *O*-聚糖、蛋白聚糖等物质的合成。

目前研究表明, HMOs 对婴儿健康具有有益作用, 包括作为抗黏附抗菌素、免疫调节剂和肠道细胞反应调节剂以及提供益生元效应、神经发育和认知效应等<sup>[88-89]</sup>。HMOs 是由 5 种单糖结构单元 (Glc、GlcNAc、Gal、Fuc 和 Neu5Ac) 组成的以游离形式存在的一系列寡糖组分<sup>[90]</sup>。HMOs 可以在其核心结构的不同位置发生不同程度的唾液酸化以及岩藻糖基化, 从而形成一系列结构复杂的人乳寡糖, 目前报道有 200 余种寡糖结构组分<sup>[91-92]</sup>。近年来, Prudden 等<sup>[93]</sup> 通过 *N*-乙酰乳糖胺 β1,6-*N*-乙酰氨基葡萄糖转移酶 (*N*-acetylglucosaminyltransferase, GCNT2) 的作用, 以 UDP-GlcNAc 为底物在 Gal 上连接 β1,6-连接的

GlcNAc, 形成具有分支结构的核心寡糖, 所得到的寡糖链末端可以通过糖基转移酶和糖核苷酸的作用进一步延伸, 最终获得 60 个不对称、多分支的 HMOs, 用于开发聚糖微阵列。利用该聚糖微阵列研究了与聚糖结合蛋白的结合情况, 结果表明, 复杂的 HMOs 结构极大地影响了其与聚糖结合蛋白的结合。

糖蛋白 *N*-聚糖通过 *N*-糖苷键共价连接到 Asn 残基处的蛋白质上。真核生物 *N*-聚糖以 GlcNAcβ1-Asn 起始, 在糖蛋白合成的质量控制中起着重要作用<sup>[94]</sup>, 参与细胞表面配体和受体的相互作用。研究表明, 参与 *N*-糖基化的某些糖基转移酶的突变可导致严重的疾病<sup>[95-96]</sup>。Li 等<sup>[97]</sup> 利用核心合成/酶促延伸 (core synthesis/enzymatic extension, CSEE) 方法进行 *N*-聚糖的快速合成, 合成过程首先利用化学法制备 *N*-聚糖核心结构, 然后以 UDP-Gal、GDP-Fuc、CMP-Neu5Ac 糖核苷酸为供体, 通过糖基转移酶催化作用合成 *N*-聚糖。CSEE 策略为快速生产结构化的 *N*-聚糖提供了一种实用的方法, 并有潜力成为解决复杂型和多样性的糖合成的通用方法。另外, 许多糖蛋白携带 *O*-GalNAc 聚糖, 即在 Ser 或 Thr 残基上连接有 GalNAc, 并可进一步被 Gal、GlcNAc、Fuc 和 Sia 延伸, 形成多种结构。黏蛋白是携带 *O*-GalNAc 聚糖最多的一类糖蛋白, 是黏液的主要结构成分, 为上皮表面创造了一个选择性的保护屏障, 也执行广泛的生理功能, 可作为治疗干预的靶点<sup>[98-99]</sup>。Wang 等<sup>[100]</sup> 以 UDP-Gal、UDP-GalNAc、UDP-GlcNAc、GDP-Fuc 等糖核苷酸为底物, 在相应的糖基转移酶的作用下, 利用化学-酶法模块组装 (chemoenzymatic modular assembly, CEMA) 策略, 构建了 83 个结构多样化的 *O*-GalNAc 聚糖, 呈现各种天然聚糖表位, 并用于生成一个独特的合成的黏蛋白 *O*-聚糖的芯片。该芯片是研究聚糖结合蛋白的糖结合特异性和抗黏蛋白抗体探针的有用工具。*O*-Man 糖基化也是一种重要的 *O*-糖基化, 参与蛋白质翻译后修饰, 在大脑和肌肉发育以及正常组织功能中起着重要作用。近年来, 利用高效的化学酶策略以糖核苷酸为底物在糖基转移酶的催化作用下, 合成了结构复杂多样的 *O*-Man 聚糖, 为探索蛋白质-聚糖相互作用提供了理想的探针<sup>[101-102]</sup>。

蛋白聚糖由核心蛋白和一条 (或多条) 共价连接的糖胺聚糖链组成。糖胺聚糖是线性多糖, 由氨基己糖 (GlcNAc 或 GalNAc) 和糖醛酸 (GlcA 或

艾杜糖醛酸, iduronic acid, IdoA) 构成重复的二糖单元组成<sup>[103]</sup>。糖胺聚糖参与各种生理和病理过程, 与多种疾病有关, 例如癌症<sup>[104]</sup>、骨骼和结缔组织的遗传性疾病<sup>[105]</sup>。Gottschalk 等<sup>[106]</sup>利用固定化酶级联反应合成 UDP-GlcA、UDP-GlcNAc, 并利用来自多杀性巴氏杆菌的透明质酸合酶 (hyaluronan synthase, PmHAS) 固定化酶以 UDP-GlcA 和 UDP-GlcNAc 作为供体底物合成了高分子质量的透明质酸 (hyaluronan, HA)。

### 3.2 糖核苷酸在糖基转移酶生化性质研究中的应用

碳水化合物中形成糖苷键的关键酶是糖基转移酶, 大多数糖基转移酶需要糖核苷酸作为供体底物<sup>[36]</sup>。因此, 糖核苷酸也是研究糖基转移酶结构与功能的重要工具。Ohashi 等<sup>[107]</sup>利用表达拟南芥鼠李糖合酶 2 (rhamnose synthase 2) 的基因 *AtRHM2* 的工程裂变酵母, 构建了一个高效的 UDP-Rha 体内合成系统, 并利用构建的 UDP-Rha 合成系统研究了柑橘柚皮素鼠李糖基转移酶的底物偏好及其在裂变酵母类黄酮苷生产中的应用, 为类黄酮糖苷上聚糖部分的工程化合成提供了一个有效的平台。Li 等<sup>[108]</sup>建立了一个高效的异源表达系统对参与三七 (*Panax notoginseng*) 三萜皂苷生物合成的 UDP-糖基转移酶 (UDP-glycosyltransferase, UGT) 的特性进行研究, 发现 UGTPn87 能以 UDP-Glc 和 UDP-Xyl 为底物, 合成具有广泛药理作用、神经保护作用以及肝脏保护作用的新的皂苷。Liu 等<sup>[109]</sup>从来自胸膜肺炎放线杆菌的细胞质可溶性 *N*-糖基转移酶 (ApNGT) 中获得了突变的 ApNGT-P1, 研究发现, 其只能利用 UDP-Glc 作为供体, 为进一步研究提高 *N*-糖基转移酶 (*N*-glycosyltransferase, NGTs) 供体底物选择性提供了可行的途径。Kelly 等<sup>[110]</sup>通过生物合成腺苷二磷酸呋喃核糖 (adenosine diphosphoribofuranose, ADP-Ribf), 研究了在其合成中发挥关键作用的 Ribf-转移酶的结构和功能并鉴定了 Ribf 供体。

### 3.3 糖核苷酸在生物正交标记策略研究中的应用

近年来, 不断发展的生物正交标记策略成为分析聚糖有力的工具。生物正交标记策略中天然单糖类似物携带的生物正交官能团在体内可以通过代谢方式进入聚糖中, 通过生物正交化学反应进一步共价偶联来标记特定的聚糖。目前, 两个最流行的生物正交化学基团是叠氮基和炔基。Zhu 等<sup>[111]</sup>利用 *N*-叠氮乙酰氨基葡萄糖 (*N*-

azidoacetylglucosamine, GlcNAz) 作为拟南芥代拟聚糖标记, 通过 GlcNAc 的补救途径代谢, 将其引入到拟南芥的 *N*-聚糖中, 再用荧光探针通过点击化学标记, 实现了新合成的 *N*-聚糖的代谢途径的可视化研究。Wen 等<sup>[16]</sup>利用化学-酶法制备了由不同生物正交基团修饰的非天然糖核苷酸, 成功合成了 UDP-GlcNAc 和 UDP-GalNAc 的 25 个衍生物, 这项研究将加速酶促生物正交标记策略在聚糖分析中的进一步发展和应用。

### 3.4 糖核苷酸在肿瘤治疗研究中的应用

研究与肿瘤细胞相关的糖基化和聚糖的异常表达对了解肿瘤的发生发展具有重要意义<sup>[112]</sup>。细胞的恶性转化与细胞表面出现的异常糖基化有关。在恶性肿瘤中通常观察到的聚糖结构变化包括黏蛋白的异常表达和糖基化、*N*-聚糖的异常分支以及蛋白质和糖脂上唾液酸的增加<sup>[113]</sup>。Nishimura 等<sup>[14]</sup>合成了 C-4 位带有 1 个氟原子的 GlcNAc 类似物。这些衍生物可以通过外源性添加并穿透细胞, 在人前列腺癌细胞中转化为 UDP-4F-GlcNAc, 非天然的 UDP-4F-GlcNAc 通过干扰天然 UDP-GlcNAc 的己糖胺生物合成途径 (hexosamine biosynthetic pathway, HBP), 抑制了细胞中超分支的 *N*-聚糖的表达水平。这项研究为研发抗前列腺癌药物带来新的希望。癌症细胞的普遍特性是通过 HBP 增加代谢通量, 从而导致 UDP-GlcNAc 水平升高。利用这一特性, Saeui 等<sup>[114]</sup>合成了一系列全乙酰化的己糖胺类似物, 通过在胰腺癌和多形性胶质母细胞瘤 (GBM) 细胞中筛选, 确定了 Ac<sub>4</sub>Glc2Bz (一种苯基修饰的 GlcNAc 类似物) 可作为一种抗增殖性癌症候选药物。Ac<sub>4</sub>Glc2Bz 的生长抑制作用与胰腺癌和 GBM 细胞中 UDP-GlcNAc 水平的降低以及随之出现的 *O*-GlcNAc 修饰的降低有关, 这种 HBP 的靶向治疗方法为应对与癌症相关的糖代谢异常提供了一种新的思路。

### 3.5 糖核苷酸在抗生素合成代谢研究中的应用

抗生素是植物和微生物的次级代谢途径产生的小分子, 具有抗肿瘤、预防心血管疾病、抗病毒等药理活性, 与多种疾病密切相关, 如癌症、阿尔茨海默病和冠状动脉疾病<sup>[115-116]</sup>。抗生素通过糖基化修饰, 可以提高结构多样性、复杂性和特定的生物活性<sup>[117]</sup>。莫诺霉素 A (moenomycin A, MmA) 是一种磷酸糖脂类抗生素, Ostash 等<sup>[118]</sup>表征了其生物合成的完整途径, 利用 UDP-GlcNAc、UDP-GlcA、UDP-GalA 一系列糖核苷酸和糖基转移酶进

行体外酶反应, 确定了糖基转移酶的功能和五糖的组装顺序, 为通过改变特定结构开发出具有更好性

能的磷酸糖脂类似物奠定了基础。

Table 3 Applications of sugar nucleotides

表3 糖核苷酸的应用

应用	举例	涉及的糖核苷酸	参考文献
聚糖及糖缀合物的合成	人乳寡糖	UDP-GlcNAc、UDP-Gal、GDP-Fuc、CMP-Neu5Ac	[93]
	N-聚糖	UDP-Gal、GDP-Fuc、CMP-Neu5Ac	[97]
	O-聚糖	UDP-Gal、UDP-GalNAc、UDP-GlcNAc、GDP-Fuc	[100-102]
	糖胺聚糖	UDP-GlcA、UDP-GlcNAc	[106]
糖基转移酶生化性质的研究	鼠李糖基转移酶	UDP-Rha	[107]
	UDP-糖基转移酶	UDP-Glc、UDP-Xyl	[108]
	N-糖基转移酶	UDP-Glc	[109]
	Ribf-转移酶	ADP-Ribf	[110]
生物正交标记策略的研究	N-叠氮乙酰氨基葡萄糖	UDP-GlcNAz	[111]
	不同生物正交基团(叠氮基和炔基等)	UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc衍生物	[16]
	修饰的糖核苷酸		
肿瘤治疗的研究	前列腺癌	UDP-4F-GlcNAc	[14]
	胰腺癌和多形性胶质母细胞瘤	Ac <sub>4</sub> Glc2Bz	[114]
抗生素合成代谢的研究	莫诺霉素A	UDP-GlcNAc、UDP-GlcA、UDP-GalA	[118]

## 4 总结与展望

糖核苷酸在聚糖及糖缀合物合成、糖基转移酶生化性质表征及生物正交标记策略等方面发挥重要作用。糖核苷酸作为Leloir型糖基转移酶催化的糖基化过程的重要中间体, 参与生物活性寡糖的制备。酶法(化学-酶法)和细胞工厂法等方法制备糖核苷酸最终也是为了规模化制备生物活性糖类, 进而用于更深入地研究多细胞生物的生命过程。对糖核苷酸的研究从未停止。磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)/PEP依赖的丙酮酸激酶(PEP-dependent pyruvate kinase, PK)、聚磷酸盐(polyphosphate, PolyP)/聚磷酸激酶(polyphosphate kinase, PPK)是两种广泛应用于UDP-Gal、GDP-Fuc、GDP-Man等糖核苷酸合成过程的核苷酸的再生系统, 通过核苷酸再生可以降低糖核苷酸的合成成本<sup>[119-121]</sup>; 有机辅因子的再生可以进一步改善糖核苷酸合成的酶模块, 如NAD<sup>+</sup>辅因子广泛应用于UDP-GlcA、UDP-Xyl、GDP-Rha和GDP-Fuc的合成<sup>[122]</sup>; 近年来, 固定化酶技术也被用来解决酶使用过程中纯化过程复杂、易失活等问题, 将SuSy<sup>[123]</sup>、BLNahK、EcGlmU<sup>[124]</sup>以及NmCSS<sup>[125]</sup>等酶进行固定化用于UDP-Glc、UDP-GlcNAc、CMP-Neu5Ac等糖核苷酸的合成; 利用定向进化等手段改造酶以提高酶的稳定性以及酶反

应器的使用都为糖核苷酸的工业化生产提供了可能<sup>[122]</sup>。这些研究主要集中于如何进一步优化糖核苷酸的制备方法, 降低成本。另外, 对糖核苷酸的合成研究还涉及到改进糖核苷酸的纯化工艺、提高产量和纯度等, 最终实现糖核苷酸的工业化生产。

但是, 糖核苷酸的工业化生产仍然面临着很多挑战。酶促反应的低底物浓度和耗时的色谱纯化过程是阻碍糖核苷酸大规模生产的主要因素。首先, 体外合成糖核苷酸的酶促反应底物浓度大多都是在 $\mu\text{mol/L}$ ~ $\text{mmol/L}$ 之间, 合成的产物量有限, 大规模合成需要巨大的反应体积。其次, 底物不能完全转化成产物, 底物、产物、副产物的分子质量极其相似, 而现有的纯化过程主要依靠色谱分离技术, 如离子交换色谱、分子排阻色谱等, 分离规模小且极其耗时。Li等<sup>[126]</sup>研究了一种实用和经济的生产糖核苷酸及其衍生物的方法。通过高浓度的多酶级联反应和快速的无色谱纯化过程, 以克级的规模从相应的单糖生产出12种糖核苷酸及其衍生物, 打破了现有策略的局限性。

糖核苷酸作为碳水化合物合成中糖基转移酶的底物, 是糖生物学蓬勃发展的基础。因此, 通过增大糖核苷酸的酶促反应底物浓度、提高纯化效率等方法, 实现糖核苷酸的大量制备, 使得由人工参与的多步酶级联反应到满足自动化合成复杂聚糖的需求是未来糖核苷酸合成的研究方向。

## 参 考 文 献

- [1] Mikkola S. Nucleotide sugars in chemistry and biology. *Molecules*, 2020, **25**(23): 5755
- [2] Del Val I J, Polizzi K M, Kontoravdi C. A theoretical estimate for nucleotide sugar demand towards Chinese Hamster Ovary cellular glycosylation. *Sci Rep*, 2016, **6**: 28547
- [3] Meech R, Rogers A, Zhuang L, *et al.* Identification of residues that confer sugar selectivity to UDP-glycosyltransferase 3A (UGT3A) enzymes. *J Biol Chem*, 2012, **287**(29): 24122-24130
- [4] Serna S, Yan S, Martin-Lomas M, *et al.* Fucosyltransferases as synthetic tools: glycan array based substrate selection and core fucosylation of synthetic *N*-glycans. *J Am Chem Soc*, 2011, **133**(41): 16495-16502
- [5] Ahmadipour S, Beswick L, Miller G J. Recent advances in the enzymatic synthesis of sugar-nucleotides using nucleotidyltransferases and glycosyltransferases. *Carbohydr Res*, 2018, **469**: 38-47
- [6] Schmölder K, Lemmerer M, Gutmann A, *et al.* Integrated process design for biocatalytic synthesis by a Leloir glycosyltransferase: UDP-glucose production with sucrose synthase. *Biotechnol Bioeng*, 2017, **114**(4): 924-928
- [7] Zamora C Y, Schocker N S, Chang M M, *et al.* Chemoenzymatic synthesis and applications of prokaryote-specific UDP-sugars. *Method Enzymol*, 2017, **597**: 145-186
- [8] Bar-Peled M, O'Neill M A. Plant nucleotide sugar formation, interconversion, and salvage by sugar recycling. *Annu Rev Plant Biol*, 2011, **62**: 127-155
- [9] Qiao M, Li B, Ji Y, *et al.* Synthesis of selected unnatural sugar nucleotides for biotechnological applications. *Crit Rev Biotechnol*, 2021, **41**(1): 47-62
- [10] Zhou X, Yang G, Guan F. Biological functions and analytical strategies of sialic acids in tumor. *Cells*, 2020, **9**(2): 273
- [11] Corfield A P, Berry M. Glycan variation and evolution in the eukaryotes. *Trends Biochem Sci*, 2015, **40**(7): 351-359
- [12] Samuel G, Reeves P. Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. *Carbohydr Res*, 2003, **338**(23): 2503-2519
- [13] Zhang X, Pagadala V, Jester H M, *et al.* Chemoenzymatic synthesis of heparan sulfate and heparin oligosaccharides and NMR analysis: paving the way to a diverse library for glycobiologists. *Chem Sci*, 2017, **8**(12): 7932-7940
- [14] Nishimura S, Hato M, Hyugaji S, *et al.* Glycomics for drug discovery: metabolic perturbation in androgen-independent prostate cancer cells induced by unnatural hexosamine mimics. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, **51**(14): 3386-3390
- [15] Zhang X, Han X, Xia K, *et al.* Circulating heparin oligosaccharides rapidly target the hippocampus in sepsis, potentially impacting cognitive functions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, **116**(19): 9208-9213
- [16] Wen L, Gadi M R, Zheng Y, *et al.* Chemoenzymatic synthesis of unnatural nucleotide sugars for enzymatic bioorthogonal labeling. *ACS Catal*, 2018, **8**: 7659-7666
- [17] Wagner G K, Pesnot T, Field R A. A survey of chemical methods for sugar-nucleotide synthesis. *Nat Prod Rep*, 2009, **26**(9): 1172-1194
- [18] Ahmadipour S, Miller G J. Recent advances in the chemical synthesis of sugar-nucleotides. *Carbohydr Res*, 2017, **451**: 95-109
- [19] 关婉怡. *N*-乙酰氨基葡萄糖/半乳糖核苷酸及类似物的酶法合成与应用研究[D]. 济南: 山东大学, 2011
- Guan W Y. *Enzymatic Synthesis and Application of N-acetylglucosamine/N-acetylgalactosamine Sugar Nucleotide and Their Analogs*[D]. Jinan: Shandong University, 2011
- [20] Ma X, Stöckigt J. High yielding one-pot enzyme-catalyzed synthesis of UDP-glucose in gram scales. *Carbohydr Res*, 2001, **333**(2): 159-163
- [21] Lee H C, Lee S D, Sohng J K, *et al.* One-pot enzymatic synthesis of UDP-D-glucose from UMP and glucose-1-phosphate using an ATP regeneration system. *J Biochem Mol Biol*, 2004, **37**(4): 503-506
- [22] Gutmann A, Nidetzky B. Unlocking the potential of Leloir glycosyltransferases for applied biocatalysis: efficient synthesis of uridine 5'-diphosphate-glucose by sucrose synthase. *Adv Synth Catal*, 2016, **358**(22): 3600-3609
- [23] Zou Y, Xue M, Wang W, *et al.* One-pot three-enzyme synthesis of UDP-Glc, UDP-Gal, and their derivatives. *Carbohydr Res*, 2013, **373**: 76-81
- [24] 宋慧波. 以UDP-葡萄糖为底物合成UDP-半乳糖和UDP-木糖的太平洋牡蛎源相关酶的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2017
- Song H B. Study on *Crassostrea gigas* Originated Enzymes for the Synthesis of UDP-galactose and UDP-xylose from UDP-glucose [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017
- [25] Bültner T, Elling L. Enzymatic synthesis of UDP-galactose on a gram scale. *J Mol Catal B Enzym*, 2000, **8**: 281-284
- [26] Liu Z, Zhang J, Chen X, *et al.* Combined biosynthetic pathway for *de novo* production of UDP-galactose: catalysis with multiple enzymes immobilized on agarose beads. *ChemBioChem*, 2002, **3**(4): 348-355
- [27] Yang J, Fu X, Jia Q, *et al.* Studies on the substrate specificity of *Escherichia coli* galactokinase. *Org Lett*, 2003, **5**(13): 2223-2226
- [28] Chen M, Chen L, Zou Y, *et al.* Wide sugar substrate specificity of galactokinase from *Streptococcus pneumoniae* TIGR4. *Carbohydr Res*, 2011, **346**(15): 2421-2425
- [29] Li L, Liu Y, Wang W, *et al.* A highly efficient galactokinase from *Bifidobacterium infantis* with broad substrate specificity. *Carbohydr Res*, 2012, **355**: 35-39
- [30] 张训莲. *Akkermansia muciniphila* 来源糖核苷酸合成相关酶性质研究及应用探究[D]. 济南: 山东大学, 2020
- Zhang X L. Study on the Properties and Application of Enzymes Related to Sugar Nucleotide Synthesis Derived from *Akkermansia muciniphila* [D]. Jinan: Shandong University, 2020
- [31] Kotake T, Yamaguchi D, Ohzono H, *et al.* UDP-sugar pyrophosphorylase with broad substrate specificity toward various monosaccharide 1-phosphates from pea sprouts. *J Biol Chem*, 2004, **279**(44): 45728-45736
- [32] Mizanur R M, Zea C J, Pohl N L. Unusually broad substrate tolerance of a heat-stable archaeal sugar nucleotidyltransferase for

- the synthesis of sugar nucleotides. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**(49): 15993-15998
- [33] Daniel D, Kleczkowski L A. Substrate specificity and inhibitor sensitivity of plant UDP-sugar producing pyrophosphorylases. *Front Plant Sci*, 2017, **8**: 1610
- [34] Wahl C, Spiertz M, Elling L. Characterization of a new UDP-sugar pyrophosphorylase from *Hordeum vulgare* (barley). *J Biotechnol*, 2017, **258**: 51-55
- [35] Damerow S, Hoppe C, Bandini G, *et al.* *Leishmania major* UDP-sugar pyrophosphorylase salvages galactose for glycoconjugate biosynthesis. *Int J Parasitol*, 2015, **45**(12): 783-790
- [36] Muthana M M, Qu J, Li Y, *et al.* Efficient one-pot multienzyme synthesis of UDP-sugars using a promiscuous UDP-sugar pyrophosphorylase from *Bifidobacterium longum* (BLUSP). *Chem Commun*, 2012, **48**(21): 2728-2730
- [37] Liu J, Zou Y, Guan W, *et al.* Biosynthesis of nucleotide sugars by a promiscuous UDP-sugar pyrophosphorylase from *Arabidopsis thaliana* (AtUSP). *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, **23**(13): 3764-3768
- [38] Fischöder T, Wahl C, Zerhusen C, *et al.* Repetitive batch mode facilitates enzymatic synthesis of the nucleotide sugars UDP-Gal, UDP-GlcNAc, and UDP-GalNAc on a multi-gram scale. *Biotechnol J*, 2019, **14**(4): 1800386
- [39] Wagstaff B A, Rejzek M, Pesnot T, *et al.* Enzymatic synthesis of nucleobase-modified UDP-sugars: scope and limitations. *Carbohydr Res*, 2015, **404**: 17-25
- [40] Heijenoort J V. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology*, 2001, **11**(3): 25R-36R
- [41] Okuyama K, Hamamoto T, Ishige K, *et al.* An efficient method for production of uridine 5'-diphospho-*N*-acetylglucosamine. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, **64**(2): 386-392
- [42] Uehara T, Park J T. The *N*-acetyl-D-glucosamine kinase of *Escherichia coli* and its role in murein recycling. *J Bacteriol*, 2004, **186**(21): 7273-7279
- [43] Nishimoto M, Kitaoka M. Identification of *N*-acetylhexosamine 1-kinase in the complete lacto-*N*-biose I/galacto-*N*-biose metabolic pathway in *Bifidobacterium longum*. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(20): 6444-6449
- [44] Mengin-Lecreux D, Heijenoort J V. Identification of the *glmU* gene encoding *N*-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1993, **175**(19): 6150-6157
- [45] Hove-Jensen B. Identification of *tms-26* as an allele of the *gcaD* gene, which encodes *N*-acetylglucosamine 1-phosphate uridylyltransferase in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1992, **174**(21): 6852-6856
- [46] Mio T, Yabe T, Arisawa M, *et al.* The eukaryotic UDP-*N*-acetylglucosamine pyrophosphorylases. Gene cloning, protein expression, and catalytic mechanism. *J Biol Chem*, 1998, **273**(23): 14392-14397
- [47] Zhao G, Guan W, Cai L, *et al.* Enzymatic route to preparative-scale synthesis of UDP-GlcNAc/GalNAc, their analogues and GDP-fucose. *Nat Protoc*, 2010, **5**(4): 636-646
- [48] Chen Y, Thon V, Li Y, *et al.* One-pot three-enzyme synthesis of UDP-GlcNAc derivatives. *Chem Commun*, 2011, **47**(38): 10815-10817
- [49] Morrison Z A, Nitz M. Synthesis of C6-substituted UDP-GlcNAc derivatives. *Carbohydr Res*, 2020, **495**: 108071
- [50] 宫雪艳. 双酶共固定化制备尿苷二磷酸-*N*-乙酰氨基葡萄糖及其衍生物[D]. 济南: 山东大学, 2022
- Gong X Y. Enzymes Co-immobilization for Biosynthesis of Uridine 5'-diphospho-*N*-acetylglucosamine and Its Analogs[D]. Jinan: Shandong University, 2022
- [51] 杜掘起. 均一软骨素寡糖的酶法合成研究[D]. 济南: 山东大学, 2018
- Du J Q. Enzymatic Synthesis of Homogeneous Chondroitin Oligosaccharides[D]. Jinan: Shandong University, 2018
- [52] Cai L, Guan W, Kitaoka M, *et al.* A chemoenzymatic route to *N*-acetylglucosamine-1-phosphate analogues: substrate specificity investigations of *N*-acetylhexosamine 1-kinase. *Chem Commun*, 2009, **40**(20): 2944-2946
- [53] Cai L, Guan W, Wang W, *et al.* Substrate specificity of *N*-acetylhexosamine kinase towards *N*-acetylgalactosamine derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, **19**(18): 5433-5435
- [54] Guan W, Cai L, Fang J, *et al.* Enzymatic synthesis of UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc analogs using *N*-acetylglucosamine 1-phosphate uridylyltransferase (GlmU). *Chem Commun*, 2009, **45**(45): 6976-6978
- [55] Guan W, Li C, Wang P. Highly efficient synthesis of UDP-GalNAc/GlcNAc analogues with promiscuous recombinant human UDP-GalNAc pyrophosphorylase AGX1. *Chem Eur J*, 2010, **16**(45): 13343-13345
- [56] Klinghammer M, Tenhaken R. Genome-wide analysis of the UDP-glucose dehydrogenase gene family in *Arabidopsis*, a key enzyme for matrix polysaccharides in cell walls. *J Exp Bot*, 2007, **58**(13): 3609-3621
- [57] Gangl R, Behmüller R, Tenhaken R. Molecular cloning of a novel glucuronokinase/putative pyrophosphorylase from zebrafish acting in an UDP-glucuronic acid salvage pathway. *PLoS One*, 2014, **9**(2): e89690
- [58] Broach B, Gu X, Bar-Peled M. Biosynthesis of UDP-glucuronic acid and UDP-galacturonic acid in *Bacillus cereus* subsp. cytotoxicus NVH 391-98. *FEBS J*, 2012, **279**(1): 100-112
- [59] Pieslinger A M, Hoepflinger M C, Tenhaken R. Cloning of glucuronokinase from *Arabidopsis thaliana*, the last missing enzyme of the myo-inositol oxygenase pathway to nucleotide sugars. *J Biol Chem*, 2010, **285**(5): 2902-2910
- [60] Muthana M M, Qu J, Xue M, *et al.* Improved one-pot multienzyme (OPME) systems for synthesizing UDP-uronic acids and glucuronides. *Chem Commun*, 2015, **51**(22): 4595-4598
- [61] Guo Y, Fang J, Li T, *et al.* Comparing substrate specificity of two UDP-sugar pyrophosphorylases and efficient one-pot enzymatic synthesis of UDP-GlcA and UDP-GalA. *Carbohydr Res*, 2015, **411**: 1-5
- [62] 段旭初. *Rhodothermus marinus* 源 UDP-木糖合成通路相关酶的重组表达、酶学特性及应用研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015
- Duan X C. Discovery and Functional Characterization of the UDP-

- xylose Biosynthesis Pathway Enzymes Originated From *Rhodothermus marinus*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015
- [63] Gu X, Glushka J, Yin Y, *et al.* Identification of a bifunctional UDP-4-keto-pentose/UDP-xylose synthase in the plant pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* strain GM11000, a distinct member of the 4,6-dehydratase and decarboxylase family. *J Biol Chem*, 2010, **285**(12): 9030-9040
- [64] Bal-Peled M, Griffith G L, Doering T L. Functional cloning and characterization of a UDP-glucuronic acid decarboxylase: the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* elucidates UDP-xylose synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(21): 12003-12008
- [65] Wang J, Greenway H, Li S, *et al.* Facile and stereo-selective synthesis of UDP- $\alpha$ -D-xylose and UDP- $\beta$ -L-arabinose using UDP-sugar pyrophosphorylase. *Front Chem*, 2018, **6**: 163
- [66] Wang S, Zhang J, Wei F, *et al.* Facile synthesis of sugar nucleotides from common sugars by the cascade conversion strategy. *J Am Chem Soc*, 2022, **144**(22): 9980-9989
- [67] Li L, Liu Y, Wan Y, *et al.* Efficient enzymatic synthesis of guanosine 5'-diphosphate-sugars and derivatives. *Org Lett*, 2013, **15**(21): 5528-5530
- [68] Mizanur R M, Pohl N L B. Phosphomannose isomerase/GDP-mannose pyrophosphorylase from *Pyrococcus furiosus*: a thermostable biocatalyst for the synthesis of guanidinediphosphate-activated and mannose-containing sugar nucleotides. *Org Biomol Chem*, 2009, **7**(10): 2135-2139
- [69] Schneider M, Al-Shareffi E, Haltiwanger R S. Biological functions of fucose in mammals. *Glycobiology*, 2017, **27**(7): 601-618
- [70] Gonçalves B, Maugarny-Calès A, Adroher B, *et al.* GDP-L-fucose is required for boundary definition in plants. *J Exp Bot*. 2017, **68**(21-22): 5801-5811
- [71] Ren Y, Perepelov A V, Wang H, *et al.* Biochemical characterization of GDP-L-fucose *de novo* synthesis pathway in fungus *Mortierella alpina*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, **391**(4): 1663-1669
- [72] Coyne M J, Reinap B, Lee M M, *et al.* Human symbionts use a host-like pathway for surface fucosylation. *Science*, 2005, **307**(5716): 1778-1781
- [73] Wang W, Hu T, Frantom P A, *et al.* Chemoenzymatic synthesis of GDP-L-fucose and the Lewis X glycan derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(38): 16096-16101
- [74] 韦安稳, 汪淑晶. 唾液酸在疾病中作用的研究进展. *大连医科大学学报*, 2015, **37**(6): 610-614  
Wei A W, Wang S J. *Journal of Dalian Medical University*, 2015, **37**(6): 610-614
- [75] Yu H, Yu H, Karpel R, *et al.* Chemoenzymatic synthesis of CMP-sialic acid derivatives by a one-pot two-enzyme system: comparison of substrate flexibility of three microbial CMP-sialic acid synthetases. *Bioorg Med Chem*, 2004, **12**(24): 6427-6435
- [76] Mizanur R M, Pohl N L. Bacterial CMP-sialic acid synthetases: production, properties, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **80**(5): 757-765
- [77] Yu H, Chokhwalwa H A, Huang S, *et al.* One-pot three-enzyme chemoenzymatic approach to the synthesis of sialosides containing natural and non-natural functionalities. *Nat Protoc*, 2006, **1**(5): 2485-2492
- [78] Rejzek M, Mukhopadhyay B, Wenzel C Q, *et al.* Direct oxidation of sugar nucleotides to the corresponding uronic acids: TEMPO and platinum-based procedures. *Carbohydr Res*, 2007, **342**(3-4): 460-466
- [79] Zhang Q, Howell P L, Overkleeft H S, *et al.* Chemical synthesis of guanosine diphosphate mannuronic acid (GDP-ManA) and its C-4-O-methyl and C-4-deoxy congeners. *Carbohydr Res*, 2017, **450**: 12-18
- [80] Zheng Y, Zhang J, Meisner J, *et al.* Cofactor-driven cascade reactions enable the efficient preparation of sugar nucleotides. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, **61**(20): e202115696
- [81] 翟娅菲. ABO血型抗原的生物法合成及其与肠道菌关系的研究[D]. 济南: 山东大学, 2015  
Zhai Y F. *Studies on The Biosynthesis of ABO Blood Group Antigens and Their Relationship With Gut Microbiota*[D]. Jinan: Shandong University, 2015
- [82] 王晓雨, 白静, 王志颖, 等. Globo系列糖抗原Gb4的细胞工厂法克级合成. *河北师范大学学报: 自然科学版*, 2021, **45**(5): 512-521  
Wang X Y, Bai J, Wang Z Y, *et al.* *Journal of Hebei Normal University: Natural Science*, 2021, **45**(5): 512-521
- [83] Gauttam R, Desiderato C K, Radoš D, *et al.* Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of UDP-N-acetylglucosamine. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, **9**: 748510
- [84] Lee W H, Shin S Y, Kim M D, *et al.* Modulation of guanosine nucleotides biosynthetic pathways enhanced GDP-L-fucose production in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, **93**(6): 2327-2334
- [85] Lee W H, Chin Y W, Han N S, *et al.* Enhanced production of GDP-L-fucose by overexpression of NADPH regenerator in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, **91**(4): 967-976
- [86] Zhai Y, Han D, Pan Y, *et al.* Enhancing GDP-fucose production in recombinant *Escherichia coli* by metabolic pathway engineering. *Enzyme Microb Technol*, 2015, **69**: 38-45
- [87] Na L, Li R, Chen X. Recent progress in synthesis of carbohydrates with sugar nucleotide-dependent glycosyltransferases. *Curr Opin Chem Biol*, 2021, **61**: 81-95
- [88] Bode L. The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Hum Dev*, 2015, **91**(11): 619-622
- [89] Vandenplas Y, Berger B, Carnielli V P, *et al.* Human milk oligosaccharides: 2'-fucosyllactose (2'-FL) and Lacto-N-neotetraose (LNnT) in infant formula. *Nutrients*, 2018, **10**(9): 1161
- [90] Chen X. Human milk oligosaccharides (HMOs): structure, function, and enzyme-catalyzed synthesis. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 2015, **72**: 113-190
- [91] Zhang P, Zhu Y, Li Z, *et al.* Recent advances on Lacto-N-neotetraose, a commercially added human milk oligosaccharide in infant formula. *J Agric Food Chem*, 2022, **70**(15): 4534-4547
- [92] 谭玉洁. 人乳寡糖的多酶级联合成研究[D]. 济南: 山东大学, 2021  
Tan Y J. *Multienzyme Cascade Synthesis of Human Milk*

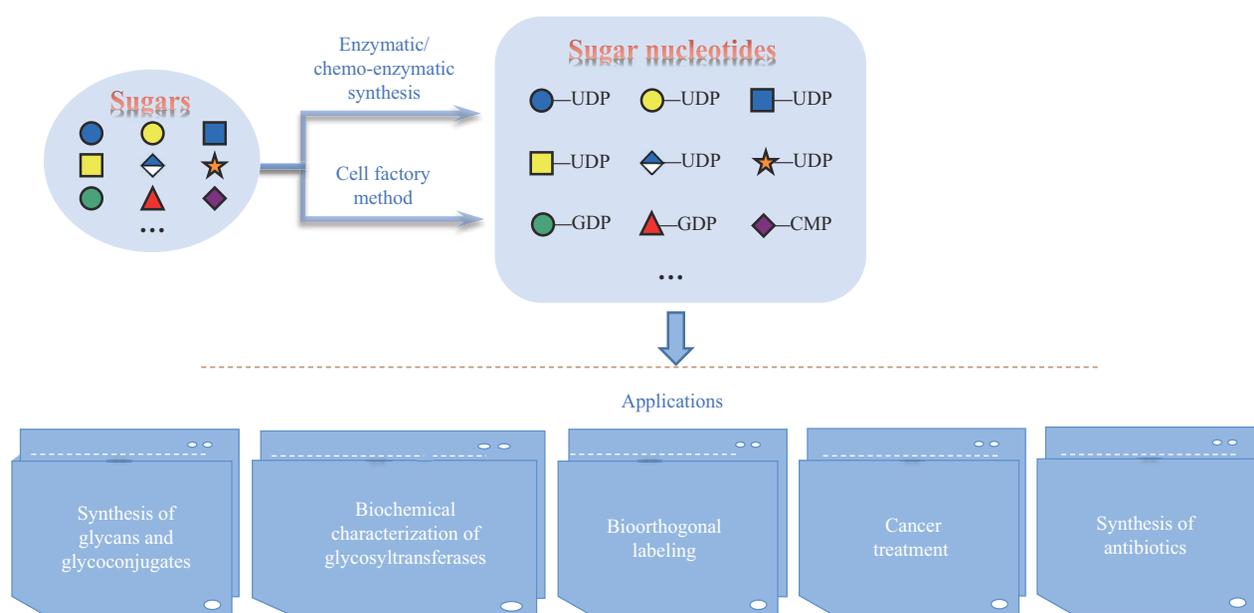
- Oligosaccharides[D]. Jinan: Shandong University, 2021
- [93] Prudden A R, Liu L, Capicciotti C J, *et al.* Synthesis of asymmetrical multiantennary human milk oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, **114**(27): 6954-6959
- [94] Tannous A, Pisoni G B, Hebert D N, *et al.* N-linked sugar-regulated protein folding and quality control in the ER. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, **41**: 79-89
- [95] Bieberich E. Synthesis, processing, and function of N-glycans in N-glycoproteins. *Adv Neurobiol*, 2014, **9**: 47-70
- [96] Rudman N, Gornik O, Lauc G. Altered N-glycosylation profiles as potential biomarkers and drug targets in diabetes. *FEBS Lett*, 2019, **593**(13): 1598-1615
- [97] Li L, Liu Y, Ma C, *et al.* Efficient chemoenzymatic synthesis of an N-glycan isomer library. *Chem Sci*, 2015, **6**(10): 5652-5661
- [98] Zhang Y, Sun L, Lei C, *et al.* A sweet warning: mucin-type O-glycans in cancer. *Cells*, 2022, **11**(22): 3666
- [99] Dhanisha S S, Guruvayoorappan C, Drishya S, *et al.* Mucins: structural diversity, biosynthesis, its role in pathogenesis and as possible therapeutic targets. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2018, **122**: 98-122
- [100] Wang S, Chen C, Gadi M R, *et al.* Chemoenzymatic modular assembly of O-GalNAc glycans for functional glycomics. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 3573
- [101] Meng C, Sasmal A, Zhang Y, *et al.* Chemoenzymatic assembly of mammalian O-mannose glycans. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, **57**(29): 9003-9007
- [102] Wang S, Zhang Q, Chen C, *et al.* Facile chemoenzymatic synthesis of O-mannosyl glycans. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, **57**(30): 9268-9273
- [103] 付玄. 均一透明质酸的酶法合成策略及生物学功能评价[D]. 济南: 山东大学, 2017
- Fu X. Enzymatic Synthesis of Homogeneous Hyaluronan and Related Biological Functions[D]. Jinan: Shandong University, 2017
- [104] Nikitovic D, Berdiaki A, Spyridaki I, *et al.* Proteoglycans-biomarkers and targets in cancer therapy. *Front Endocrinol*, 2018, **9**: 69
- [105] Paganini C, Costantini R, Furga A S, *et al.* Bone and connective tissue disorders caused by defects in glycosaminoglycan biosynthesis: a panoramic view. *FEBS J*, 2019, **286**(15): 3008-3032
- [106] Gottschalk J, Abmann M, Kuballa J, *et al.* Repetitive synthesis of high-molecular-weight hyaluronic acid with immobilized enzyme cascades. *ChemSusChem*, 2022, **15**(9): e202101071
- [107] Ohashi T, Hasegawa Y, Misaki R, *et al.* Substrate preference of citrus naringenin rhamnosyltransferases and their application to flavonoid glycoside production in fission yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, **100**(2): 687-696
- [108] Li Y, Li J, Diao M, *et al.* Characterization of a group of UDP-glycosyltransferases involved in the biosynthesis of triterpenoid saponins of *Panax notoginseng*. *ACS Synth Biol*, 2022, **11**(2): 770-779
- [109] Liu Z, Li K, Liu X, *et al.* Production of microhomogeneous glycopeptide by a mutated NGT according FuncLib with unique sugar as substrate. *Enzyme Microb Technol*, 2022, **154**: 109949
- [110] Kelly S D, Williams D M, Nothof J T, *et al.* The biosynthetic origin of ribofuranose in bacterial polysaccharides. *Nat Chem Biol*, 2022, **18**(5): 530-537
- [111] Zhu Y, Wu J, Chen X. Metabolic labeling and imaging of N-linked glycans in *Arabidopsis thaliana*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, **55**(32): 9301-9305
- [112] Fuster M M, Esko J D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*, 2005, **5**(7): 526-542
- [113] Läubli H, Borsig L. Altered cell adhesion and glycosylation promote cancer immune suppression and metastasis. *Front Immunol*, 2019, **10**: 2120
- [114] Saeui C T, Shah S R, Fernandez-Gil B I, *et al.* Anticancer properties of hexosamine analogs designed to attenuate metabolic flux through the hexosamine biosynthetic pathway. *ACS Chem Biol*, 2023, **18**(1): 151-165
- [115] Kopustinskiene D M, Jakstas V, Savickas A, *et al.* Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*, 2020, **12**(2): 457
- [116] Badshah S L, Faisal S, Muhammad A, *et al.* Antiviral activities of flavonoids. *Biomed Pharmacother*, 2021, **140**: 111596
- [117] Vasudevan U M, Lee E Y. Flavonoids, terpenoids, and polyketide antibiotics: role of glycosylation and biocatalytic tactics in engineering glycosylation. *Biotechnol Adv*, 2020, **41**: 107550
- [118] Ostash B, Doud E H, Lin C, *et al.* Complete characterization of the seventeen step moenomycin biosynthetic pathway. *Biochemistry*, 2009, **48**(37): 8830-8841
- [119] Mahour R, Lee J W, Grimpe P, *et al.* Cell-free multi-enzyme synthesis and purification of uridine diphosphate galactose. *ChemBioChem*, 2022, **23**(2): e202100361
- [120] Mahour R, Marichal-Gallardo P A, Rexer T F T, *et al.* Multi-enzyme cascades for the *in vitro* synthesis of guanosine diphosphate L-fucose. *ChemCatChem*, 2021, **13**(8): 1981-1989
- [121] Tsai T I, Lee H Y, Chang S H, *et al.* Effective sugar nucleotide regeneration for the large-scale enzymatic synthesis of Globo H and SSEA4. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(39): 14831-14839
- [122] Frohnmeier H, Elling L. Enzyme cascades for the synthesis of nucleotide sugars: updates to recent production strategies. *Carbohydr Res*, 2023, **523**: 108727
- [123] Orrego A H, Trobo-Maseda L, Rocha-Martin J, *et al.* Immobilization-stabilization of a complex multimeric sucrose synthase from *Nitrosomonas europaea*. Synthesis of UDP-glucose. *Enzyme Microb Technol*, 2017, **105**: 51-58
- [124] 吕海超, 贾哲康, 张文, 等. 尿苷二磷酸糖固定化酶合成法研究. *生物技术进展*, 2022, **12**(2): 270-280
- Lü H C, Jia Z K, Zhang W, *et al.* *Curr Biotechnol*, 2022, **12**(2): 270-280
- [125] Schelch S, Koszagova R, Kuballa J, *et al.* Immobilization of CMP-sialic acid synthetase and  $\alpha$ 2, 3-sialyltransferase for cascade synthesis of 3'-sialyl  $\beta$ -D-galactoside with enzyme reuse. *ChemCatChem*, 2022, **14**(9): e202101860
- [126] Li S, Wang S, Wang Y, *et al.* Gram-scale production of sugar nucleotides and their derivatives. *Green Chem*, 2021, **23**(7): 2628-2633

## Biosynthesis and Application of Sugar Nucleotides\*

HAO Meng, LIAN Jia-Qi, ZHANG Cui-Lu, GUAN Wan-Yi\*\*

(Ministry of Education Key Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Hebei Key Laboratory of Molecular and Cellular Biology,  
College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China)

### Graphical abstract



**Abstract** Glycosylation is one of the most important reactions in living organisms as it results in the formation of glycoconjugates with diverse biological functions. Sugar nucleotides are structurally composed of sugar and nucleoside diphosphate or monophosphate, which are widespread within a variety of biological cells. As glycosyl donors for the transglycosyl reactions catalyzed by Leloir-type glycosyltransferases, sugar nucleotides are essential for the synthesis of glycans and glycoconjugates. However, high costs and limited availability of nucleotide sugars prevent applications of biocatalytic cascades on an industrial scale. Therefore, attentions on synthetic strategies of sugar nucleotides have been increasing to achieve their wide applications in various fields. The 9 common sugar nucleotides in mammals have been fully studied with large-scale synthesis through chemical, enzymatic (chemo-enzymatic) and cell factory strategies. In addition to common sugar nucleotides, many rare sugar nucleotides are present in plants and bacteria. Although unnatural sugar nucleotides cannot be

\* This work was supported by a grant from Hebei Natural Science Foundation (C2020205049).

\*\* Corresponding author.

Tel: 86-311-80787576, E-mail: guanwanyi@hebtu.edu.cn

Received: May 18, 2023 Accepted: August 9, 2023

synthesized in organisms, they have great potential in research as substrates for glycosyltransferases in carbohydrate synthesis, as enzyme inhibitors in biochemical studies, and as components of glycoconjugate biosynthesis. Therefore, increasing attention has been paid to explore the efficient synthesis of unnatural sugar nucleotides. Currently, strategies for chemical synthesis of sugar nucleotides have been greatly improved, such as the use of effective catalysts for forming pyrophosphate bonds and the development of entirely new synthesis protocols. Multiple sugar nucleotides, especially unnatural sugar nucleotides, are synthesized chemically. However, chemical synthesis requires tedious protection and deprotection steps, resulting in complex steps, high cost and low yield. In contrast, enzymatic (chemo-enzymatic) and cell factory methods have significant advantages such as high yield, easy operation and easy process scale-up in the preparation of sugar nucleotides. Hence, they are prominent strategies for sugar nucleotide preparation. Herein, the biosynthesis and application of sugar nucleotides are reviewed, mainly focusing on the 9 sugar nucleotides common in mammals. The early strategies for enzymatic synthesis of sugar nucleotides generally used *de novo* synthesis pathway. With the discoveries of enzymes involved in salvage pathway of sugar nucleotide synthesis and the development of one-pot multienzyme (OPME) method, the synthesis of sugar nucleotides was greatly simplified. Cell factory method employs the microbial living cells as a “processing plant” by engineering their metabolic pathways through genetic engineering technology. The cell factory method has high yield, and has been applied for efficient synthesis of several sugar nucleotides. Moreover, the strategy of gram-scale synthesis of multiple rare sugar nucleotides by cascade reactions from common sugar nucleotides using sugar nucleotides synthases cloned from different sources was illustrated. In recent years, the synthesis cost of sugar nucleotides has been further reduced through various ways, such as regeneration of nucleotides, regeneration of organic cofactors, and application of immobilized enzyme technology. Furthermore, through the continuous improvement of sugar nucleotide purification process, the use of high concentration of multi-enzyme cascade and rapid non-chromatographic purification process, the synthesis of multiple sugar nucleotides and their derivatives from monosaccharides was achieved, which gradually broke the limitations of the existing strategy. With the efficient synthesis of sugar nucleotides, their applications in various fields have been increasingly explored, including the synthesis of glycans and glycoconjugates, biochemical characterization of glycosyltransferases and bioorthogonal labeling strategies, which are of great significance to the research of biochemistry, glycobiology and the development of related pharmaceutical products.

**Key words** sugar nucleotide, glycosyltransferase, kinase, pyrophosphorylase

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2023.0197