

糖苷合成酶

—— 一类新型的寡糖高效合成工具 *

卢丽丽 肖敏** 赵晗 王鹏 钱新民

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

摘要 寡糖是哺乳动物细胞表面糖蛋白和糖脂以及微生物来源的生理活性物质的要素之一, 其应用于医药的巨大潜能至今还没有得到充分体现, 主要原因是合成足够于临床使用的寡糖非常困难. 传统的化学法和酶法在大规模合成寡糖方面都有一定局限性. 近年来, 分子生物学技术大大推动了糖苷酶合成寡糖的研究, 将糖苷酶催化中心亲核体氨基酸定点突变为非亲核体氨基酸, 导致酶的原有水解活性丧失, 只催化糖苷键合成反应, 寡糖产量最高可达 99%, 人工产生了一类新酶——糖苷合成酶(glycosynthases), 随后又产生了硫代糖苷酶(thioglycoligases)和硫代糖苷合成酶(thioglycosynthases). 糖苷合成酶的高通量筛选可用双质粒系统和酵母三杂交系统进行, 其活性的进一步改进可通过亲核体氨基酸位点不同氨基酸取代、其他位点氨基酸突变、反应条件优化等方法进行, 其区域选择性的改变或增强可通过改变糖基受体分子达到. 糖苷合成酶作为一种新型高效的生物催化剂, 对寡糖的工业化合成有着重要意义, 它的出现对糖生物学的发展必将起到巨大的推动作用.

关键词 寡糖合成, 糖苷酶, 糖苷合成酶, 高通量筛选, 性质改进

学科分类号 Q5, Q7, Q93

寡糖(oligosaccharides)在自然界分布广泛、种类繁多, 其作为有机体结构元素及能源物质的生物学意义早已为人们所熟知. 近来研究发现, 寡糖是哺乳动物细胞表面糖蛋白和糖脂以及微生物来源的生理活性物质的要素之一, 具有强大的生物信息传递等功能^[1]. 寡糖作为一种疗法(therapeutics)^[2]应用于医药虽然具有相当大的潜能, 但是至今其重要作用还没有得到充分体现, 其发展缓慢的原因之一是合成足够于临床使用的寡糖非常困难. 糖类化合物上多个可以反应的羟基, 使得化学法合成必须依赖繁琐的选择保护作用及糖基化后的去保护作用才可以达到特异性选择合成的目的, 大大限制了其工业化生产的应用.

与化学法相比, 酶法合成寡糖显示出极大优点, 具有立体选择性(stereo-selectivity)和区域选择性(regio-selectivity), 对反应底物乃至糖苷键的类型、位置均有特定要求. 糖基转移酶(glycosyl transferases)和糖苷酶(glycosidases)是转糖基合成寡糖的两类酶^[3,4]. 糖基转移酶催化的合成反应通常需要活化的核苷磷酸糖作为糖基供体, 现在核苷磷酸糖可以通过用其他多种酶的协同作用连续生成, 但核苷磷酸糖价格的昂贵、所用酶的不易获得以及

多酶反应体系的产率问题限制了该途径实用性的发展. 相对地, 糖苷酶催化的合成反应途径简单, 不需要其他辅助因子, 底物通常为价格便宜的单糖和双糖, 且酶较易获得^[5], 性质稳定. 但是, 糖苷酶所催化的反应处于水解与合成的动态平衡状态, 转糖基产物也可以作为底物被酶重新水解, 产量一般较低. 利用酶反应的热力学及动力学原理加大底物浓度、提高反应温度可以在一定程度上提高产物的产量(10%~40%); 采用高浓度有机溶剂(80%~90%, 体积比)或两相反应体系, 降低水的浓度和活性, 促使反应平衡向糖苷键合成的方向进行, 可进一步提高产量(40%~60%). 但是这些方法都没有改变酶催化可逆反应的本质, 寡糖产量只能在一定范围内得到提高.

近年来, 分子生物学技术的发展和进步大大推动了糖苷酶合成寡糖领域的研究. 科学家对糖苷酶进行分子改造, 在酶催化中心亲核体氨基酸位点用非亲核体氨基酸取代亲核体氨基酸, 产生了一类新

*国家自然科学基金资助项目(30170008), 国家“十五”攻关计划项目(2004BA713B04-06).

** 通讯联系人. Tel: 0531-88365128, E-mail: minxiao@sdu.edu.cn

收稿日期: 2005-10-24, 接受日期: 2005-11-30

型活性酶, 该酶失去原有的水解活性, 只催化糖苷键合成反应, 因此命名为糖苷合成酶 (glycosynthases). 糖苷合成酶的出现, 彻底解决了糖苷酶催化的转糖基反应中产物的水解问题, 寡糖产量大幅度上升, 从根本上提高了糖苷酶的转糖基效率.

1 糖苷酶、糖苷合成酶及其作用机制

糖苷酶即糖苷水解酶 (glycoside hydrolases, GH, EC3.2.1), 是一类水解糖苷键 (glycosidic bonds) 的酶. 目前已知的糖苷酶有 2 500 多种^[6], 根据序列相似性分为 100 个家族 (糖苷酶的分类及相关信息详见网站 <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/index.html>), 每一个家族的酶具有相同的空间结构和反应机制. 许多糖苷酶在催化糖苷键水解的同时, 还具有转糖基活性, 即糖苷键合成活性, 这类酶是合成寡糖的重要工具.

糖苷酶根据催化作用机制的不同分为两类: 构型翻转酶 (inverting enzymes) 和构型保持酶

(retaining enzymes)^[7,8]. 两类酶的催化中心都有一对羧基, 一般来自于谷氨酸或天冬氨酸, 在催化机制中起着重要作用. 构型翻转酶催化中心的一对羧基大约相隔 1.05 nm, 分别作为广义酸 (general acid) 和广义碱 (general base), 通过单置换机制导致构型翻转来催化水解反应 (图 1a). 构型保持酶的一对羧基大约相隔 0.55 nm, 分别作为广义酸碱 (general acid-base) 和亲核体 (nucleophile), 通过双置换机制保持构型不变来催化反应, 反应第一步是酶的糖基化 (glycosylation), 亲核体羧基直接作用于底物, 形成共价键糖基-酶中间物 (glycosyl-enzyme intermediate), 酸碱羧基先进行酸催化, 提供质子, 促使底物离去基团 (leaving group) 的离去, 反应第二步是酶的去糖基化 (deglycosylation), 酸碱羧基再进行碱催化, 激活受体分子, 发生以水为受体的水解反应和以糖为受体的糖苷键合成反应 (图 1b), 后者提供了一条利用糖苷酶合成寡糖的简便途径, 但酶催化反应的可逆性, 导致了寡糖合成效率较低.

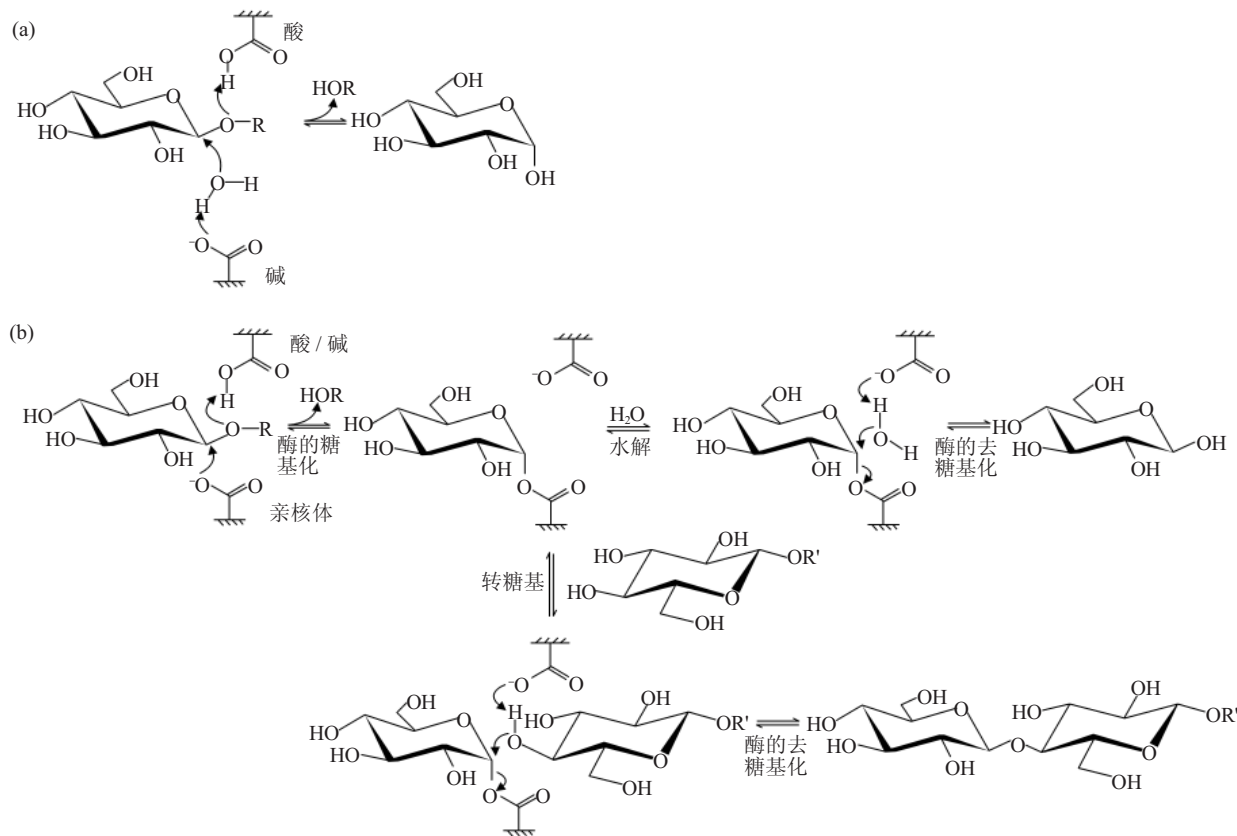


Fig. 1 Reaction mechanism of glycosidases

图 1 糖苷酶作用机制

(a) 构型翻转酶通过单置换机制催化水解反应, 形成的产物构型与底物相反. (b) 构型保持酶通过双置换机制保持构型不变来催化反应, 形成的共价键糖基-酶中间物发生以水为受体的水解反应和以糖为受体的糖苷键合成反应.

近年来研究发现,对构型保持糖苷酶进行基因改造,在酶催化中心亲核体氨基酸位点用非亲核体氨基酸取代亲核体氨基酸,就可以获得糖苷合成酶.这类酶失去了原有的糖苷键水解活性,但能利用活化的糖基供体如氟代糖(glycosyl fluorides)进行糖苷键合成反应,寡糖产量大幅度提高.糖苷合成酶一般遵循构型翻转酶的作用机制(图2),作为糖基供体的氟代糖异头体构型与突变前糖苷酶的天

然底物构型相反,反应时,氟代糖相当于突变前糖苷酶糖基化后形成的糖基-酶中间物,酶催化合成反应的过程与突变前糖苷酶催化的糖基-酶中间物解离过程相似(图1b),生成的产物构型与突变前糖苷酶的天然底物构型相同.糖苷合成酶由于缺少亲核体氨基酸,合成的寡糖产物不会被酶重新水解,产物大量积累,产量大幅度提高.

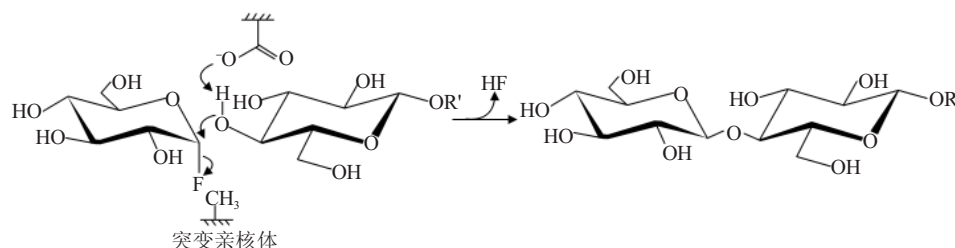


Fig. 2 Reaction mechanism of glycosynthases

图2 糖苷合成酶作用机制

β-糖苷合成酶以α-氟代糖为糖基供体时,α-氟代糖相当于糖基-酶中间物,酶催化合成反应的机制与突变前糖苷酶催化的糖基-酶中间物解离过程相似,形成β-寡糖产物.

2 糖苷合成酶发展概况

1998年5月,加拿大的Withers研究室第一次报道了糖苷合成酶,他们通过点突变技术,在土壤杆菌(*Agrobacterium* sp.) β-葡萄糖苷酶(Abg, EC3.2.1.21)催化中心用丙氨酸取代第358位谷氨酸,造成亲核体羧基变成非亲核体甲基,改变了糖苷酶的作用机制,形成的突变酶Glu358Ala失去了寡糖水解活性,但当加入氟代糖时,能以多种硝基苯单糖苷和双糖苷作为糖基受体进行转糖基反应,合成的β-1,3、β-1,4-二糖和三糖产量可以达到64%~92%,Withers首次把这种亲核体氨基酸突变糖苷酶称为糖苷合成酶^[9].同年11月,西班牙的Planas研究室^[10]报道了第一个内切葡聚糖酶突变的糖苷合成酶,同样采用点突变技术,在地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) β-1,3-1,4-内切葡聚糖酶(EC3.2.1.73)催化中心用丙氨酸取代第134位谷氨酸,产生的突变酶Glu134Ala在氟代双糖存在下,以4-甲基伞形酮葡萄糖苷作为糖基受体合成的β-1,3、β-1,4-三糖产量达90%.与此同时,意大利的Moracci研究室^[11]报道了超高温糖苷合成酶,他们对来源于古细菌硫磺矿硫化叶菌(*Sulfolobus solfataricus*)的β-糖苷酶(Ssβ-gly, EC3.2.1)进行分子改造,用甘氨酸取代第387位谷氨酸,形成的突

变酶Glu387Gly失去了寡糖水解活性,当加入亲核剂叠氮化钠时,酶活性恢复成构型翻转糖苷酶,生成糖基叠氮化物(glycosyl azide),当加入亲核剂甲酸钠时,酶活性恢复成构型保持糖苷酶,可以借助于甲酸钠作为亲核体,以硝基苯单糖苷为底物转糖基合成硝基苯双糖苷(图3).进一步研究发现,该酶以2-硝基苯葡萄糖苷为底物时能形成β-1,6-支链-β-1,3-硝基苯三糖苷,产量达85%,这种三糖结构与从毒蝇鹅膏菌(*Amanita muscaria*)中提取的抗肿瘤物质β-1,6-支链-β-1,3-葡聚糖结构模式相同^[12].

从此,一种新型的人工糖苷合成酶出现并得到国际范围的认可.2001年,Withers研究室报道了粪肥纤维单胞菌(*Cellulomonas fimi*) β-甘露糖苷酶(EC3.2.1.25)的丝氨酸突变酶Glu519Ser,合成β-1,3、β-1,4-二糖到六糖的总产量为70%~99%^[13].β-甘露糖苷键用化学法很难合成,用传统的糖苷酶合成产量又很低,因此,甘露糖苷合成酶的出现引起了人们极大的兴趣.2003年,Jahn等^[14]将日本纤维弧菌(*Cellvibrio japonicus*) β-甘露聚糖酶(EC3.2.1.78)改造成糖苷合成酶Glu320Gly,成功地解决了合成长链甘露寡糖的难题.国际上第一个α-糖苷合成酶的报道出现在2002年,是来源于粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*) α-葡萄糖苷

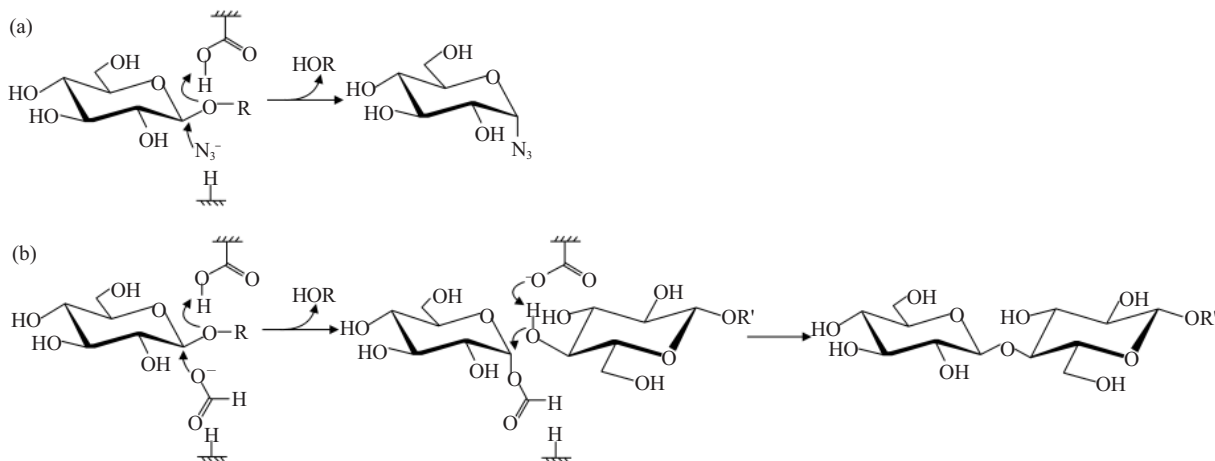


Fig. 3 Reaction mechanism of hyperthermophilic glycosynthase Ssβ-gly Glu387Gly

图3 超高温糖苷合成酶 Ssβ-gly Glu387Gly 反应机制

(a)叠氮化钠为激活剂时,酶活性恢复成构型翻转糖苷酶,生成 α -糖基叠氮化物。(b)甲酸钠为激活剂时,酶活性恢复成构型保持糖苷酶,生成 β -寡糖产物。

酶 (EC3.2.1.20) 的甘氨酸突变酶 Asp481Gly, 该酶在 β -氟代糖存在下,以硝基苯葡萄糖苷和硝基苯木糖苷为受体转糖基形成的 α -1,4-、 α -1,6-二糖产量为29%~82%^[15]。这是目前关于 α -糖苷合成酶的唯一报道,被国际上认为是糖苷合成酶研究领域的重大突破。2002~2003年,澳大利亚的Hrmova和法国的Fairweather等^[16,17]先后报道了大麦(*Hordeum vulgare*) β -1,3-内切葡聚糖酶(EC3.2.1.39)的甘氨酸突变酶Glu231Gly,以氟代二糖为底物合成的 β -1,3-葡聚糖(聚合度30~34)产量为75%,以氟代二糖为糖基供体、以不同的硝基苯糖苷为糖基受体合成的 β -1,3-三糖和四糖产量为55%~90%。该酶合成 β -1,3-聚糖和寡糖的功能,可应用于合成抗细菌、抗病毒、抗肿瘤活性的化合物。2004年,Planas研究室报道了第一个超高温内切糖苷合成酶,是来源于古细菌激烈热球菌(*Pyrococcus furiosus*) β -1,3-内切葡聚糖酶(EC3.2.1.39)的突变酶Glu170Ala,但该酶以氟代昆布二糖为糖基供体、以4-甲基伞形酮单糖苷和双糖苷为糖基受体合成的 β -1,3-、 β -1,4-三糖和四糖产量小于30%,其原因可能是氟代昆布二糖在高温反应条件下不稳定而发生自发水解^[18]。

目前,国际上已经报道的糖苷合成酶共有13种(表1^[9~28]),分别为 β -葡萄糖苷合成酶(β -glucosynthase)、 β -甘露糖苷合成酶(β -mannosynthase)、 β -半乳糖苷合成酶(β -galactosynthase)、 β -葡聚糖苷合成酶

(β -glucansynthase)、 β -甘露聚糖苷合成酶(β -mannansynthase)、 α -葡萄糖苷合成酶(α -glucosynthase)等。它们来源于12种不同的微生物(细菌、真菌和古细菌)及植物,由7种不同糖苷酶家族(GH1、GH2、GH7、GH16、GH17、GH26和GH31)的酶改造获得。表1列举的前13种酶为糖苷合成酶^[9~26],其中1~8种为外切糖苷合成酶(exo-glycosynthases),9~13种为内切糖苷合成酶(endo-glycosynthases)。这些酶都以重组的形式表达,几乎每种酶都能催化产生一类特异的寡糖产物。

目前获得的糖苷合成酶一般都遵循构型翻转酶的作用机制,但在小分子亲核剂甲酸盐存在时,嗜热古细菌来源的突变糖苷酶也能有效地作为构型保持酶催化糖苷键合成反应^[11,12,23]。此时,突变酶遵循双置换机制,甲酸盐的作用相当于突变前糖苷酶亲核体氨基酸的羧基,在酶催化中心与底物形成甲酰葡萄糖苷中间物(formyl glucoside intermediate),然后糖基再被转移到受体分子上形成寡糖^[11](图3b)。而在嗜中温酶催化的反应中,甲酰糖苷中间物可能难以与糖基受体有效反应,因此不能作为构型保持酶来催化糖苷键合成反应。

近年来,Withers研究室又发展了一类新的糖苷键合成工具酶——硫代糖苷酶(thioglycoligases)。2003年,Jahn等^[27]发现*Agrobacterium* sp. β -葡萄糖苷酶的一种突变酶Glu171Ala(表1)能有效合成硫代糖苷(thioglycosides),其催化中心酸碱功能氨基酸被突变成了丙氨酸。这类酶因缺少酸碱功能氨基酸,

Table 1 Examples of glycosynthases, thioglycoligases and thioglycosynthases¹⁾**表 1 糖苷合成酶、硫代糖苷酶和硫代糖苷合成酶举例¹⁾**

来源	GH	突变	合成酶	糖基供体	糖基受体	产物
<i>Agrobacterium</i> sp.	1	E358A	β -glucosynthase	α -Glc/-Gal-F	4-NP-Glc/-Cel	β -(1,3)-, β -(1,4)-di-, trisaccharides
		E358S ^[20]	β -glucosynthase	α -Gal/-Glc-F	4-NP-Glc/-Cel/ -Man/-GlcNAc	β -(1,4)-di-, -tri-, tetrasaccharides
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	1	E387G	β -glycosynthase	2-NP- β -Glc	2-NP- β -Glc	β -(1,3)-, β -(1,4)-, β -(1,6)-(2-NP-)-disaccharides
				α -Glc-F		β -(1,3)-, β -(1,6)-branched -tri-, tetrasaccharides
				2-NP- β -Gal	Xyl- α -4P	Gal- β -(1,3)-Xyl- β -4P ^[21]
<i>Cellulomonas fimi</i>	2	E519S	β -mannosynthase	α -Man-F	4-NP- β -Cel	β -(1,3)-, β -(1,4)-di- to -hexasaccharides
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	31	D481G	α -glucosynthase	β -Glc-F	4-NP- α -Glc/-Xyl/-Man 4-NP- β -Glc	α -(1,4)-, α -(1,6)-disaccharides
<i>Escherichia coli</i>	2	E537S ^[22]	β -galactosynthase	α -Gal-F	4-NP- β -Glc	Gal- β -(1,6)-Glc- β -4-NP
<i>Thermosphaera aggregans</i>	1	E386G ^[23]	β -glycosynthase	2-NP- β -Glc	2-NP- β -Glc	β -(1,3)-, β -(1,4)-, β -(1,6)-(2-NP-)-disaccharides
						β -(1,3)-, β -(1,6)-branched -tri-, tetrasaccharides
					4-MU- β -Glc	Glc- β -(1,3)-Glc- β -MU ^[21]
<i>Pyrococcus furiosus</i>	1	E372A ^[23]	β -glycosynthase	2-NP- β -Glc	2-NP- β -Glc	Gal- β -(1,3)-Xyl- β -4P ^[21]
<i>Thermus nonproteolyticus</i>	1	E338A ^[24]	β -glycosynthase	CMP-3-F-Neu5Ac	Man	β -(1,3)-2-NP-disaccharides
<i>Bacillus licheniformis</i>	16	E134A	β -glucansynthase	Glc- β -(1,3)-Glc-F	4-MU- β -Glc	Oligosaccharides ²⁾
				Glc/Gal- β -(1,4)-Glc- β -(1,3)-Glc-F	Glc- β -(1,4)-Glc- β -MU	Glc- β -(1,3)-Glc- β -(1,4)-Glc- β -MU
						Glc- β -(1,4)-Glc- β -(1,3)-Glc- β -(1,4)-Glc- β -(1,4)-Glc-MU ^[25]
<i>Humicola insolens</i>	7	E197A ^[26]	β -glucansynthase	Gal/Glc- β -(1,4)-Glc- α -F	Mono-,disaccharides	Gal- β -(1,4)-Glc- β -(1,3)-Glc- β -(1,4)-Glc-MU ^[25]
<i>Hordeum vulgare</i>	17	E231G	β -glucansynthase	Glc- β -(1,3)-Glc-F	Glc- β -(1,3)-Glc-F	β -(1,4)-tri-, -tetrasaccharides
				3-Thio- α -laminaribiosyl F	3-Thio- α -laminaribiosyl F	β -(1,3)-glucan β -(1,3)-S-glucan
<i>Cellvibrio japonicus</i>	26	E320G	β -mannansynthase	α -Mannobiosyl F	4-NP-Glc/-Xyl/-Cel/-Man	β -(1,3)-tri- to -heptasaccharides
<i>P. furiosus</i>	16	E170A	β -glucansynthase	α -Laminaribiosyl F	Glc- β -MU	Glc- β -(1,3)-Glc- β -(1,4)-Glc- β -MU
					Glc- β -(1-3)-Glc- β -MU	Glc- β -(1,3)-Glc- β -(1,3)-Glc- β -(1,3)-Glc- β -MU
<i>Agrobacterium</i> sp.	1	E171A ^[27]	β -thioglycoligase	2,4-DNP- β -Glc	4-NP- β -4-thio-Glc/-Xyl	Glc- β -S-(1,4)-Glc- β -4-NP Glc- β -S-(1,4)-Xyl- β -4-NP
<i>C. fimi</i>	2	E429A ^[27]	β -thiomannoligase	2,5-DNP- β -Man	4-NP- β -4-thio-Glc/-Xyl	Man- β -S-(1,4)-Glc- β -4-NP Man- β -S-(1,4)-Xyl- β -4-NP
<i>Agrobacterium</i> sp.	1	E171A,	β -thioglycosynthase	α -Glc-F	4-NP- β -4-thio-Glc	Glc- β -S-(1,4)-Glc- β -4-NP
		E358G ^[28]			4-thio-Glc- β -MU	Glc- β -S-(1,4)-Glc- β -4-MU

¹⁾本表部分内容参考文献[19]. (Glc, 葡萄糖; Gal, 半乳糖; Cel, 纤维二糖; Man, 甘露糖; GlcNAc, N-乙酰葡萄糖胺; Xyl, 木糖; 4P, 4-戊烯-1-醇; NP, 硝基苯; DNP, 二硝基苯; MU, 4-甲基奎宁酮; Neu5Ac, N-乙酰神经氨酸). ²⁾大小及结构尚未测定.

在催化过程中失去了酸碱催化功能, 导致酶的糖基化和去糖基化两步反应速率都降低了. 但用带强离去基团的底物如二硝基苯糖苷作为糖基供体时, 酶的糖基化过程会加快, 但去糖基化仍然很慢. 而用 SH- 糖作为糖基受体时, 酶的去糖基反应明显加快^[29]. SH- 糖亲核性比 OH- 糖强, 形成的糖基-酶中间物不需要酸碱功能氨基酸提供碱催化即可解离. 转糖基产物因离去基团解离能力很弱, 不会被突变酶水解, 可以大量积累, 形成的硫代糖苷产量为 64%~79%^[27]. Withers 等^[27]把这类突变糖苷酶称为硫代糖苷酶. 图 4a 显示了硫代糖苷酶的作用机制, 突变酶在二硝基苯糖苷存在下, 以 SH- 糖为受体转糖基形成的硫代糖苷构型不变, 受体分子中硫的位置严格控制了转糖基反应的区域选择性^[29]. 硫代糖苷酶是制备硫代糖苷的有力工具. 硫代糖苷具有非常重要的研究价值, 它既是稳定的 O- 糖苷

类似物, 可作为竞争性抑制剂研究糖苷酶作用机制, 同时又可作为潜在的疗法, 应用于制药工业.

最近, Withers 研究室将糖苷合成酶和硫代糖苷酶的突变方式相结合, 发展了双突变酶——硫代糖苷合成酶 (thioglycosynthases)^[28], 他们将 *Agrobacterium* sp. β - 葡萄糖苷酶催化中心酸碱功能氨基酸和亲核体氨基酸同时突变去除, 形成双突变酶 Glu171Ala、Glu358Gly (表 1), 以氟代糖为糖基供体、以 SH- 糖为糖基受体合成的硫代糖苷产量为 45%~51%. 与单突变酶相比, 硫代糖苷合成酶催化效率要低一些, 原因可能是酶蛋白只提供适宜底物相互作用的空间结构 (图 4b), 并不直接起催化作用. 然而, 硫代糖苷合成酶因缺少亲核体氨基酸, 不会像硫代糖苷酶那样缓慢水解糖基供体, 而且受体 K_m 值很低, 因此在应用昂贵又有价值的糖基受体时有突出优势.

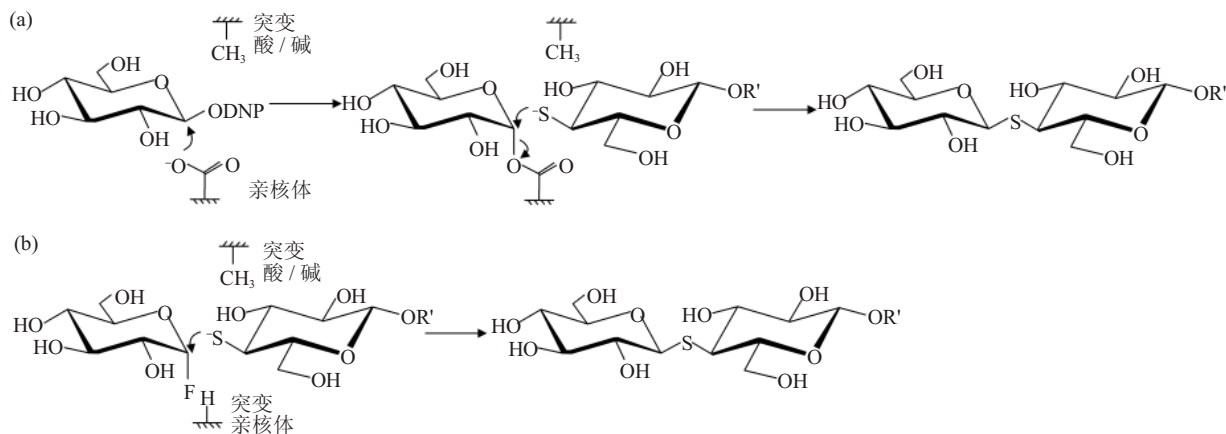


Fig. 4 Reaction mechanism of thioglycosyltransferases and thioglycosynthases

图 4 硫代糖苷酶和硫代糖苷合成酶作用机制

(a) 硫代糖苷酶以二硝基苯糖苷为糖基供体、以 SH- 糖为糖基受体合成硫代糖苷. (b) 硫代糖苷合成酶提供适宜底物相互作用的空间结构, 以氟代糖为糖基供体、以 SH- 糖为糖基受体合成硫代糖苷.

在糖苷合成酶研究取得巨大进展的同时, Withers 研究室又成功地应用 *Agrobacterium* sp. β - 葡萄糖苷合成酶 Glu358Gly 进行了寡糖的固相合成^[30]. 在固相合成过程中, AbgGlu358Gly 能高效催化半乳糖基转移到 PEGA (polyethylene glycol polyacrylamide copolymers) 树脂连接的糖基受体上, 底物转化率达 83%~90%, 产物回收率达 90% 以上. 树脂连接的糖肽也能作为该酶的作用底物, 表明酶受底物空间结构影响较小. 糖苷合成酶固相合成寡糖, 简化了产物的纯化过程, 提高了寡糖产量, 为其应用于大规模的寡糖合成提供了成功的

起点.

3 糖苷合成酶的获得及其筛选

糖苷合成酶是由构型保持糖苷酶催化中心亲核体氨基酸突变成非亲核体氨基酸得到的, 它的获得首先要确定糖苷酶的亲核体氨基酸, 一般可用基于反应机制的抑制剂 (mechanism-based inhibitors)、酶的三级结构分析、定点突变和突变酶的酶学性质研究等方法来确定.

目前, 鉴定糖苷酶亲核体氨基酸最直接有效的方法是采用基于反应机制的抑制剂. 2- 脱氧-2- 氟-

氟代糖、5-氟-氟代糖和2,4-二硝基苯-2-脱氧-2-氟-糖苷是标记和鉴定亲核体氨基酸特别有效的抑制剂,可与糖苷酶在催化中心形成稳定的共价键糖基-酶中间物^[31,32].近年来,电喷雾电离质谱(electrospray-ionization mass spectrometry, ESIMS)的运用,使酶亲核体氨基酸的鉴定很容易进行.在这一方法中,首先利用抑制剂获得糖基-酶中间物,形成标记酶,然后标记酶被酶解成短肽混合物, HPLC 分离,其中催化中心短肽标记有抑制剂,由于标记的肽是混合物中唯一的酯结构,因此利用串联质谱仪(tandem mass spectrometer)的中性丢失扫描(neutral loss scans)就能定位 HPLC 色谱图中的标记肽.纯化标记肽样品,应用 MS/MS 测序通常可以鉴定出唯一标记的谷氨酸或天冬氨酸,即为酶亲核体氨基酸.这一结果可以通过 Edman 降解测序法来进行验证^[31].

另外,也可用定点突变来确定糖苷酶的催化中心氨基酸:将酶序列进行同源性比对,对所有完全同源的谷氨酸或天冬氨酸分别进行定点突变.若突变酶水解简单 O-糖苷的速率大大低于氟代糖,则突变位点为酸碱功能氨基酸.若突变酶完全失活,不能水解与天然底物构型相同的活化底物如氟代糖和二硝基苯糖苷,而当加入外源亲核剂如叠氮化物后,突变酶能被重新激活,但改变作用机制,作为翻转酶作用于活化底物,生成构型相反的糖基叠氮化物,或者突变酶能利用与天然底物构型相反的氟代糖为糖基供体只发生糖苷键合成反应,则突变位点为亲核体氨基酸^[31].

在确定了糖苷酶的亲核体氨基酸后,就可以对

亲核体氨基酸位点进行定点突变,用非亲核体氨基酸取代亲核体氨基酸,或直接在亲核体氨基酸位点进行饱和突变(saturation mutagenesis)来筛选糖苷合成酶.如果用定点突变的方法确定糖苷酶的亲核体氨基酸,则可能同时获得了糖苷合成酶.如果要对糖苷合成酶再进行定向进化(directed evolution),最直接的方法就是在亲核体氨基酸位点进行饱和突变,即亲核体氨基酸被突变成任意氨基酸(突变位点密码子为 NNN, N=A/T/C/G).当对糖苷酶亲核体氨基酸位点进行突变后,由于糖苷合成酶只催化糖苷键合成反应,不能像糖苷酶那样通过带有色基团或荧光基团的水解底物直接筛选,因此需要进一步探索直接有效的筛选方法.

2001 年, Withers 研究室首次用双质粒系统从糖苷酶亲核体氨基酸位点饱和突变文库中成功地筛选到糖苷合成酶^[33].在双质粒筛选系统中,一种质粒携带突变糖苷酶基因,另一种质粒携带筛选酶基因,两种质粒转化同一宿主进行诱导表达.筛选酶不水解带有色基团或荧光基团的单糖苷,只专一性水解糖苷合成酶的转糖基产物,即带有色基团或荧光基团寡糖苷,释放出有色基团或荧光基团.实验时,可用带有色基团或荧光基团的单糖苷作为糖基受体进行筛选(图 5),快速检测糖苷合成酶转糖基活性. Mayer 等^[33]用 *C. fimi* 内切纤维素酶 Cel5A (EC3.2.1.4)作为筛选酶,以氟代糖为糖基供体,以 4-甲基伞形酮葡萄糖苷为糖基受体,成功地在 *Agrobacterium* sp. β -葡萄糖苷酶亲核体氨基酸位点饱和突变文库中筛选到丙氨酸、丝氨酸、甘氨酸和半胱氨酸四种转糖基突变酶.2004 年, Withers 研究

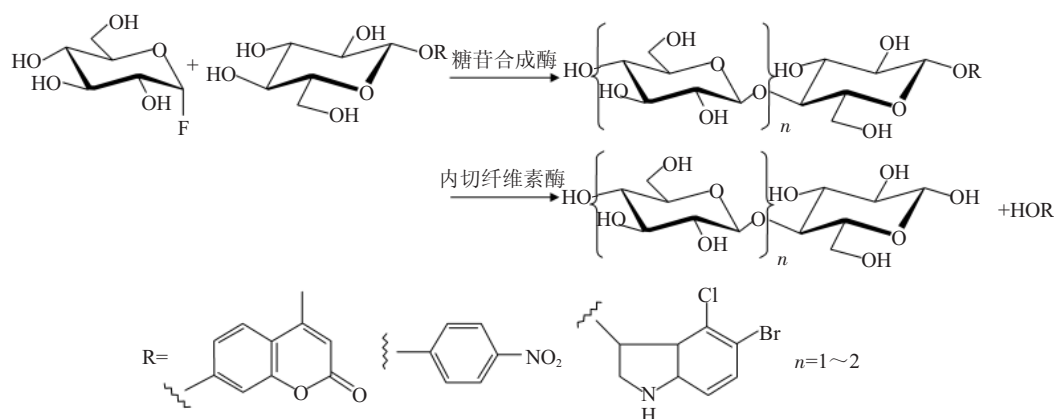


Fig. 5 Mechanism of the two-plasmid system in the glycosynthase screen^[33]

图 5 双质粒系统筛选糖苷合成酶机制^[33]

氟代糖和带荧光基团或有色基团的糖基受体在糖苷合成酶的作用下合成寡糖产物,该产物可被内切纤维素酶专一性水解,释放出荧光基团或有色基团.

室对双质粒系统进行改进, 发展了单质粒系统, 将筛选酶基因和突变糖苷酶基因构建到同一质粒中, 大大简化了筛选过程^[34]. 但由于这两种筛选系统都需要获得特定的寡糖专一性水解酶, 因此对于其他糖苷合成酶的筛选存在一定的局限性.

2004 年, 美国的 Lin 等^[35]首次成功地运用酵母三杂交系统进行糖苷合成酶的高通量筛选, 这是糖苷合成酶筛选方法上的重大突破. 该系统利用地塞米松-甲氨蝶呤 (dexamethasone-methotrexate, Dex-Mtx) 异源二聚小分子, 能促使糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 和二氢叶酸还原酶 (dihydrofolate reductase, DHFR) 在激素结合区域发生聚合的原理, 将 DHFR 基因融合到转录因子 DNA 结合区域 (DNA binding domain, DBD), GR 基因融合到转录因子转录激活区域 (activation

domain, AD). 由于 GR 结合 Dex, DHFR 结合 Mtx, 这样 Dex-Mtx 二聚小分子就能聚合 DHFR 和 GR, 从而促使转录因子 DBD 和 AD 重新组合成有效的转录因子, 激活下游报告基因的表达. Lin 等将糖基供体连接到 Mtx 上, 将糖基受体连接到 Dex 上, 生成筛选用糖基供体 (Mtx- 氟代糖) 和受体 (Dex- 糖受体分子), 二者只有在糖苷合成酶的作用下合成 Dex-oligosaccharide-Mtx, 才能聚合 DHFR 和 GR, 从而促使转录因子 DBD 和 AD 重新组合成有功能的转录因子, 激活报告基因的表达 (图 6), 达到快速简便地筛选糖苷合成酶的目的. Dex-Mtx 酵母三杂交系统在筛选上具有普遍性, 只要合成筛选用糖基供体和受体, 就能高通量筛选任意的糖苷合成酶, 这必将对糖苷合成酶的发展起到巨大的推动作用.

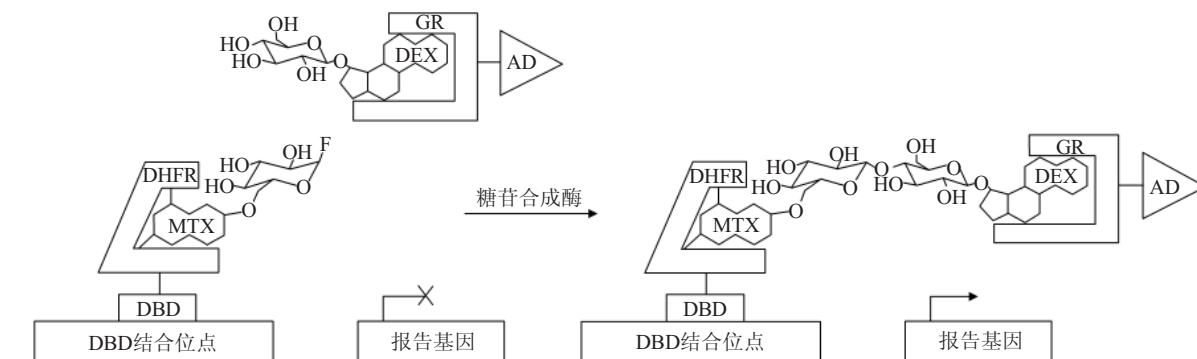


Fig. 6 Mechanism of the Dex-Mtx yeast three-hybrid system in the glycosynthase high-throughput screen^[35]

图 6 Dex-Mtx 酵母三杂交系统高通量筛选糖苷合成酶机制^[35]

Mtx- 氟代糖、Dex- 糖受体分子先分别与 DHFR(耦联 DBD)和 GR(耦联 AD)结合, 然后在糖苷合成酶的作用下合成 Dex-oligosaccharide-Mtx, 聚合 DHFR 和 GR, 促使 DBD 和 AD 重新组合成有效的转录因子, 激活报告基因的表达.

4 糖苷合成酶性质的进一步改进

与糖苷酶相比, 糖苷合成酶催化的糖苷键合成反应效率很高, 是因为酶的突变阻止了产物的水解. 但有时糖苷合成酶催化的合成反应也会较慢, 需要大量的酶蛋白或延长反应时间. 这就需要进一步改进突变酶, 以提高其转糖基效率. 研究发现, 在糖苷酶亲核体氨基酸位点进行不同的氨基酸取代, 可用于筛选高效糖苷合成酶. Withers 研究室在这方面做了大量的工作, 他们发现 *Agrobacterium* sp. β - 葡萄糖苷酶亲核体位点丝氨酸突变酶催化的糖苷键合成速率比丙氨酸突变酶更快, 产量更高, 并且还能有效利用 4- 硝基苯 -N- 乙酰葡萄糖胺作为糖

基受体合成 4- 硝基苯 -N- 乙酰乳糖胺, 产量达 63%^[20], 该成分各种细胞表面抗原的重要前体. 进一步的研究表明, 其他糖苷酶的丝氨酸突变酶糖基化活性也同样得到提高^[13,14,22], 丝氨酸羟基与即将解离的 α - 氟代糖异头氟之间的稳定作用提高了突变酶的活性^[20]. 2001 年, Withers 研究室发现 Abg 亲核体位点甘氨酸突变酶比丝氨酸突变酶具有更高的糖基化活性, 二者作用于相同底物的速率常数 (k_{cat}/K_m) 比为 102:44^[33]. 2003 年, Jahn 等^[14]通过对 *C. japonicus* 甘露聚糖苷合成酶 Glu320Gly 与甘露二糖复合体的 3D 结构分析, 很好地解释了甘氨酸突变酶优越于丝氨酸突变酶的原因: 即单个的水分子替代了亲核基团, 与底物分子的 α 异头 O_1 形成

氢键, 这种溶剂分子参与反应的灵活性可能在促进氟解离方面优于呆板的丝氨酸侧链. 其他研究发现, 构型保持糖苷合成酶的甘氨酸突变酶糖苷键合成效率也很高, 例如, Ss β -gly 甘氨酸突变酶和丙氨酸突变酶作用于相同底物的速率常数比为 56:9^[1]. 构型保持糖苷合成酶催化的第一步反应中必须加入外源亲核剂, 与丙氨酸侧链相比, 甘氨酸侧链降低了空间阻碍, 所以底物会更有效地与外源亲核剂结合, 促进转糖基反应. 最近, Withers 研究室首次对硫代糖苷酶进行了优化, 在 Abg 酸碱功能氨基酸位点进行饱和突变, 获得了高效谷氨酰胺突变酶 AbgGlu171Gln. 该酶以 2,4-二硝基苯糖苷为糖基供体时的反应速率比丙氨酸突变酶提高了 5 倍, 以糖基叠氮化物为糖基供体时的反应速率提高了 100 倍^[6].

2002 年, Withers 研究室发现糖苷合成酶催化位点以外的氨基酸突变对糖苷键合成效率也有一定的影响. 例如, 大肠杆菌(*Escherichia coli*) β -半乳糖苷合成酶 Glu537Ser 合成 β -1,6-寡糖的产量为 40%~63%, 在催化位点附近进行第二次突变(Gly794Asp)后, 合成的寡糖产量提高到 70%~85%, 二次突变酶的 3D 结构显示, 在突变酶第 794 位引入天冬氨酸降低了空间阻碍, 更利于酶与受体分子作用, 促进转糖基反应^[2]. 2004 年, Withers 研究室又对催化效率高的突变酶 AbgGlu358Gly 进行了随机突变, 利用单质粒筛选系统相继得到两种活性更高的突变酶 1D12 (Glu358Gly, Ala19Thr) 和 2F6 (Glu358Gly, Ala19Thr, Gln248Arg, Met407Val). 这三种突变酶作用于相同底物的速率常数比为 1:7:27^[4]. 其中, 2F6 突变酶不仅合成效率最高, 而且底物利用的范围也扩大了, 能利用 α -氟代木糖, 其 Ala19 和 Met407 位点的突变改变了酶活性中心的构象, 使酶更易与底物反应. 由于现有的将糖苷酶家族 GH3、GH10、GH11、GH39 的 β -木糖苷酶和木聚糖酶改进为木糖苷合成酶(xylosynthases)的试验都不是很成功, 因此以 2F6 为基础衍生出新的木糖苷合成酶对高效合成木糖苷化合物有着重要意义.

科学家在对糖苷合成酶进行分子改造以提高转糖基效率的同时, 也对反应条件进行了优化. 2003 年, Moracci 研究室报道了构型保持糖苷合成酶的转糖基活性在酸性条件下显著提高^[3], 原因是糖苷酶亲核体氨基酸被突变后, 酸碱羧基 pK_a 值会下移, 所以在中性 pH 时, 这一基团呈离子化形式,

使第一步反应速率降低了, 而在 pH 3.0~6.0 的缓冲液中, 酸碱羧基呈质子化的有效催化形式, 寡糖的合成效率相应提高. 这一激活方法一般可应用于极端嗜热古细菌的糖苷合成酶, 其内在的稳定性保证了这些酶在低 pH 值时也能作为寡糖合成的有力工具.

一般来说, 糖苷合成酶具有严格的立体选择性和一定的区域选择性. 到 2004 年 3 月为止, 报道的糖苷合成酶合成的糖苷键型有 β -1,3、 β -1,4、 β -1,6、 α -1,4 和 α -1,6. 随后, 澳大利亚的 Stick 等^[37]利用芳香基醚、酯等作为糖基受体取代芳香基糖苷, 改变了 AbgGlu358Ser 的区域选择性, 并增加了新的糖苷键型. AbgGlu358Ser 在以 α -氟代葡萄糖为糖基供体, 以 4-硝基苯葡萄糖苷为糖基受体时, 主要形成 β -1,4 键产物; 以 4-硝基苯木糖苷为糖基受体时, 主要形成 β -1,3 键产物. Stick 等选择 6-O-苯甲基-葡萄糖、6-O-(4-硝基苯甲基)-葡萄糖、6-O-苯甲酰基-葡萄糖作为糖基受体进行转糖基反应, 结果形成了 β -1,2、 β -1,3 键产物, 扩大了糖苷合成酶合成的糖苷键型范围, 而用 4-O-苯甲基-木糖作为糖基受体时只形成 β -1,2 键产物, 增强了合成这种新糖苷键型的区域选择性. 这一研究为改变或提高其他糖苷合成酶的区域选择性提供了新的思路.

5 展 望

近年来, 寡糖合成取得了巨大进展, 特别是基于聚合物支持的化学法合成碳水化合物以及用微生物全细胞作为合成工厂等化学合成技术, 都是这一领域的重大突破, 更进一步增强了寡糖分子应用于医药的潜能. 但是, 严格控制产物的立体和区域化学结构仍然是化学法大规模合成寡糖的巨大挑战. 与化学法相比, 用糖苷合成酶合成寡糖, 不仅具有立体选择性和区域选择性, 而且效率高、时间短、底物便宜, 因此是寡糖工业化生产的新的选择.

目前人们已获得的糖苷酶数量巨大, 约有 2 500 多种, 而发展的糖苷合成酶却只有 13 种, 显示了糖苷合成酶潜在的生物多样性在很大程度上还未被开发出来. 国际上现有的糖苷合成酶研究结果正预示着这一新的生物催化剂的美好前景. 相信在不久的将来, 这一生物催化剂在寡糖合成领域将会发挥出巨大作用, 其潜在的应用性也将会得到充分体现.

参 考 文 献

- 1 Palcic M M. Biocatalytic synthesis of oligosaccharides. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, **10** (6): 616~624
- 2 Zopf D, Roth S. Oligosaccharide anti-infective agents. *Lancet*, 1996, **347** (9007): 1017~1021
- 3 Crout D H, Vic G. Glycosidases and glycosyl transferases in glycoside and oligosaccharide synthesis. *Curr Opin Chem Biol*, 1998, **2** (1): 98~111
- 4 Sears P, Wong C H. Toward automated synthesis of oligosaccharides and glycoproteins. *Science*, 2001, **291**(5512): 2344~2350
- 5 Scigelova M, Singh S, Crout D H G. Glycosidases—a great synthetic tool. *J Mol Catal B: Enzym*, 1999, **6** (5): 483~494
- 6 Daines A M, Maltman B A, Flitsch S L. Synthesis and modifications of carbohydrates, using biotransformations. *Curr Opin Chem Biol*, 2004, **8** (2): 106~113
- 7 McCarter J D, Withers S G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr Opin Struct Biol*, 1994, **4** (6): 885~892
- 8 Rye C S, Withers S G. Glycosidase mechanisms. *Curr Opin Chem Biol*, 2000, **4** (5): 573~580
- 9 Mackenzie L F, Wang Q, Warren R A J, et al. Glycosynthases: mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis. *J Am Chem Soc*, 1998, **120** (22): 5583~5584
- 10 Malet C, Planas A. From β -glucanase to β -glucansynthase: glycosyl transfer to α -glycosyl fluorides catalyzed by a mutant endoglucanase lacking its catalytic nucleophile. *FEBS Lett*, 1998, **440** (1~2): 208~212
- 11 Moracci M, Trincon A, Perugino G, et al. Restoration of the activity of active-site mutants of the hyperthermophilic β -glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*: dependence of the mechanism on the action of external nucleophiles. *Biochemistry*, 1998, **37** (49): 17262 ~ 17270
- 12 Trincon A, Perugino G, Rossi M, et al. A novel thermophilic glycosynthase that effects branching glycosylation. *Bioorg Med Chem Lett*, 2000, **10** (4): 365~368
- 13 Nashiru O, Zechel D L, Stoll D, et al. β -Mannosynthase: synthesis of β -mannosides with a mutant β -mannosidase. *Angew Chem Int Ed*, 2001, **40** (2): 417~420
- 14 Jahn M, Stoll D, Warren R A J, et al. Expansion of the glycosynthase repertoire to produce defined manno-oligosaccharides. *Chem Commun*, 2003, (12): 1327~1329
- 15 Okuyama M, Mori H, Watanabe K, et al. α -Glucosidase mutant catalyzes " α -glycosynthase"-type reaction. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, **66** (4): 928~933
- 16 Hrmova M, Imai T, Rutten S J, et al. Mutated barley (1,3)- β -D-glucan endohydrolases synthesize crystalline (1,3)- β -D-glucans. *J Biol Chem*, 2002, **277** (33): 30102~30111
- 17 Fairweather J K, Hrmova M, Rutten S J, et al. Synthesis of complex oligosaccharides by using a mutated (1,3)- β -D-glucan endohydrolase from barley. *Chemistry*, 2003, **9** (11): 2603~2610
- 18 van Lieshout J, Faijes M, Nieto J, et al. Hydrolase and glycosynthase activity of endo-1,3-beta-glucanase from the thermophile *Pyrococcus furiosus*. *Archaea*, 2004, **1** (4): 285~292
- 19 Perugino G, Trincon A, Rossi M, et al. Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. *Trends Biotechnol*, 2004, **22** (1): 31~37
- 20 Mayer C, Zechel D L, Reid S P, et al. The E358S mutant of *Agrobacterium* sp. β -glucosidase is a greatly improved glycosynthase. *FEBS Lett*, 2000, **466** (1): 40~44
- 21 Trincon A, Giordano A, Perugino G, et al. Glycosynthase-catalysed syntheses at pH below neutrality. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, **13** (22): 4039~4042
- 22 Jakeman D L, Withers S G. On expanding the repertoire of glycosynthases: mutant β -galactosidases forming β -(1,6)-linkages. *Can J Chem*, 2002, **80** (8): 866~870
- 23 Perugino G, Trincon A, Giordano A, et al. Activity of hyperthermophilic glycosynthases is significantly enhanced at acidic pH. *Biochemistry*, 2003, **42** (28): 8484~8493
- 24 杨雪鹏, 杨寿钧, 韩北忠, 等. 非解脲脲热菌 HG102 耐热 β -糖苷酶的结构与功能研究. *生物工程学报*, 2005, **21** (1): 84~91
Yang X P, Yang S J, Han B Z, et al. *Chin J Biotech*, 2005, **21**(1): 84~91
- 25 Fairweather J K, Faijes M, Driguez H, et al. Specificity studies of *Bacillus* 1,3-1,4- β -glucanases and application to glycosynthase-catalyzed transglycosylation. *Chem Biochem*, 2002, **3**(9): 866~873
- 26 Fort S, Boyer V, Greffe L, et al. Highly efficient synthesis of β -(1 $\rightarrow$ 4)-oligo- and -polysaccharides using a mutant cellulase. *J Am Chem Soc*, 2000, **122** (23): 5429~5437
- 27 Jahn M, Marles J, Warren R A J, et al. Thioglycoligases: mutant glycosidases for thioglycoside synthesis. *Angew Chem Int Ed*, 2003, **42** (3): 352~354
- 28 Jahn M, Chen H, Mullegger J, et al. Thioglycosynthases: double mutant glycosidases that serve as scaffolds for thioglycoside synthesis. *Chem Commun*, 2004, (3): 274~275
- 29 Jahn M, Withers S G. New approaches to enzymatic oligosaccharide synthesis: glycosynthases and thioglycoligases. *Biocatal Biotransfor*, 2003, **21** (4~5): 159~166
- 30 Tolborg J F, Petersen L, Jensen K J, et al. Solid-phase oligosaccharide and glycopeptide synthesis using glycosynthases. *J Org Chem*, 2002, **67** (12): 4143~4149
- 31 Williams S J, Withers S G. Glycosyl fluorides in enzymatic reactions. *Carbohydr Res*, 2000, **327** (1~2): 27~46
- 32 Withers S G. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carb Polymers*, 2001, **44** (4): 325~337
- 33 Mayer C, Jakeman D L, Mah M, et al. Directed evolution of new glycosynthases from *Agrobacterium* β -glucosidase: a general screen to detect enzymes for oligosaccharide synthesis. *Chem Biol*, 2001, **8** (5): 437~443
- 34 Kim Y W, Lee S S, Warren R A J, et al. Directed evolution of a glycosynthase from *Agrobacterium* sp. increases its catalytic activity dramatically and expands its substrate repertoire. *J Biol Chem*, 2004, **279** (41): 42787~42793
- 35 Lin H, Tao H, Cornish V W. Directed evolution of a glycosynthase via chemical complementation. *J Am Chem Soc*, 2004, **126** (46): 15051~15059
- 36 Mullegger J, Jahn M, Chen H M, et al. Engineering of a

thioglycoligase: randomized mutagenesis of the acid-base residue leads to the identification of improved catalysts. *Protein Eng Des Sel*, 2005, **18** (1): 33~40

37 Stick R V, Stubbs K A, Watts A G. Modifying the regioselectivity of glycosynthase reactions through changes in the acceptor. *Aust J Chem*, 2004, **57** (8): 779~786

Glycosynthases: a Novel Efficient Synthetic Tool for Oligosaccharides*

LU Li-Li, XIAO Min**, ZHAO Han, WANG Peng, QIAN Xin-Min

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract Oligosaccharides are one of the essential physiological constituents of glycoproteins and glycolipids on mammalian cell surfaces and microbial metabolites. They have considerable potential as therapeutics but are only now slowly assuming this important role. One of the reasons for their slow development has been the considerable difficulty in synthesizing oligosaccharides on the scale necessary for their clinical evaluation. Classical chemical and enzymatic methods both have limitations in synthesizing large-scale oligosaccharides. In recent years, the rapid progress on molecular biotechnology has promoted the development of retaining glycosidases in oligosaccharides synthesis, which led to the production of a novel class of enzymatic activities termed the glycosynthases. These new enzymes are retaining glycosidase mutants in which the catalytic nucleophile has been converted to a non-nucleophilic residue, synthesizing oligosaccharides in high yields (the highest yields reach 99%) without any hydrolysis. Furthermore thioglycoligases and thioglycosynthases have been developed subsequently in the past three years. Glycosynthases can be screened in high-throughput assay by the two-plasmid system and the yeast three-hybrid system respectively. Their activity can be significantly enhanced by substituting alternative residues for nucleophile, additional random mutations and optimizing reaction conditions. Their regioselectivity can be modified through changes in receptors.

Key words oligosaccharides synthesis, glycosidases, glycosynthases, screening in high-throughput assay, improvement of characteristics

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation (30170008) and The Mega-projects of Science Research for the 10th Five-year Plan of China (2004BA713B04-06).

**Corresponding author. Tel: 86-531-88365128, E-mail: minxiao@sdu.edu.cn

Received: October 24, 2005 Accepted: November 30, 2005