



N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶的功能与机制*

芦鑫荣¹⁾ 童永亮¹⁾ 孔维溧¹⁾ 邹琳¹⁾ 沈旦枫¹⁾ 吕绍銜¹⁾ 刘瑞杰²⁾ 张绍兴²⁾
张瑜芯²⁾ 侯琳琳^{3)**} 孙桂芹^{2)**} 陈力^{1)**}⁽¹⁾ 复旦大学基础医学院病原生物学系, 医学分子病毒学教育部/卫生健康委员会重点实验室, 上海 200032;⁽²⁾ 浙江中医药大学医学技术与信息工程学院, 杭州 310053; ⁽³⁾ 青岛农业大学动物医学院, 青岛 266106

摘要 N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶 (endo-beta-N-acetylglucosaminidase, ENGase) 广泛分布于各种生物中, 主要通过降解错误折叠的糖蛋白, 参与细胞和生命的调控。ENGase 也是糖链编辑的有效工具酶, 可专一性水解游离寡糖链及糖肽或糖蛋白上核心五糖的N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 之间的 β -1,4糖苷键。其水解产物是寡糖链和一个GlcNAc, 或带有一个GlcNAc的糖肽或糖蛋白。本文对ENGase的发现、分布、蛋白质结构、酶学反应及生物学功能进行阐述, 为ENGase的生物学研究提供思路, 为糖生物学与糖组学的应用研究奠定基础。

关键词 N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶, N-糖基化, 游离寡糖, 糖链编辑, 糖生物学

中图分类号 Q55

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0268

蛋白质N-糖基化是一种普遍存在于真核细胞的共翻译和翻译后的动态修饰过程。糖链的结构可以增加蛋白质的稳定性, 它的改变对蛋白质的物化性质及生物学功能产生重要的调节作用。此外, 蛋白质N-糖基化可能还直接参与细胞信号传递、宿主-病原体相互作用、病毒附着、炎症及免疫反应等过程, 它的改变可能提示着生理病理的发生发展, 也可作为潜在的治疗靶点, 提示蛋白质N-糖基化的重要性^[1-3]。

糖蛋白上载有的N-糖链信号在该蛋白质的折叠、胞内转运及降解过程中发挥着重要的调控作用。蛋白质合成过程中形成的错误折叠的糖蛋白可对细胞形成负面压力, 这一压力可经内质网糖蛋白折叠质量控制 (endoplasmic reticulum quality control, ERQC) 和内质网相关蛋白质降解途径 (endoplasmic reticulum associated degradation, ERAD) 缓解^[4], 并以此来控制内质网糖蛋白的稳态。现有研究表明, 通过ERAD途径, 人NGLY1基因编码的N-糖苷酶, 可完整切除蛋白质合成过程中形成的错误折叠糖蛋白上的N-糖链, 加速该类错误折叠糖蛋白的降解, 参与蛋白质合成的质控。NGLY1是目前唯一已知的完整去除人糖蛋白

N-糖基化的酶, 其缺陷可导致一种先天性去糖基化障碍 (congenital disorders of glycosylation, CDG/CDDG) 的罕见病, 具有全身多系统的临床症状, 其缺陷可能的表型、发病机制及生物标志物已在多种动物模型中进行研究和阐述^[5-6]。N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶 (ENGase, EC 3.2.1.96) 是另一类胞内蛋白质质量控制的糖苷酶, 可作用于糖蛋白合成与降解的全过程, 也可作用于胞质中游离的寡糖链 (fOSs)^[7-8]。细菌或真菌的ENGase是N-糖链结构分析与编辑的工具, 可用于生物活性糖蛋白或糖肽的重塑或抗体的改造^[9-10]。但是目前对人ENGase (hENGase) 的生物学功能尚不明确, 基础与应用研究也正在进行中。本文将阐述ENGase的发现、不同家族ENGase的分布及生物学功能与应用等内容, 为ENGase的基础及应用研究提供一定的思路。

* 国家重点研发计划 (2021YFC2700801) 资助项目。

** 通讯联系人。

陈力 Tel: 15821138980, E-mail: lichen_bk@fudan.edu.cn

孙桂芹 Tel: 13868116801, E-mail: sunguiqin2001@163.com

侯琳琳 Tel: 15618326458, E-mail: houlinlin1225@163.com

收稿日期: 2023-07-09, 接受日期: 2023-09-18

1 ENGase的发现

1971年, Muramatsu^[11]首先在含有肺炎双球菌 (*Diplococcus pneumoniae*) 的培养液中观察到了ENGase (Endo D) 的水解活性。1974年, Tarentino^[12]首先纯化并表征了来自褶皱链霉菌 (*Streptomyces griseus*) 的ENGase。该内切酶的寡糖产物的分子量相对较大, 所以被命名为高分子质量产物的内切酶, 即Endo H。Koide等^[13]在同一年纯化并表征了来自肺炎双球菌 (*Diplococcus pneumoniae*) 的ENGase (Endo D)。1976年, Tarentino等^[14]报道了母鸡输卵管中的ENGase (Endo HO)。Delmotte等^[15]通过亲和层析纯化并表征了兔血清中的ENGase。1979年, Pierce等^[16]在大鼠肝脏和肾脏中发现了ENGase的活性。1981年, Overdijk等^[17]在人体不同组织中检测到相应酶活性, 揭示该酶在人体中广泛分布。1982年, Tachibana等^[18]从大鼠肝脏酶中纯化分离了该酶, 开展了哺乳动物ENGase的底物特异性的研究。1988年, Kadowaki等^[19]从含有冻土毛霉 (*Mucor hiemalis*) 的土壤样本培养液中观察到了ENGase (Endo M) 的水解活性。1982年, Elder等^[20]从脑膜炎脓毒黄杆菌 (*Flavobacterium meningosepticum*) 中检测到了ENGase (Endo F1) 的活性。1993年, Tarentino等^[21]又从脑膜炎脓毒黄杆菌中鉴定出了Endo F2与Endo F3。

以冻土毛霉来源的Endo M基因序列为模板, 2002年Kato等^[22]在秀丽隐杆线虫的基因组中发现了Endo CE。他们在大肠杆菌中表达的Endo CE进行了功能分析, 第一次报道了动物ENGase酶可

能有转糖基活性。同年, Suzuki实验室^[23]在哺乳动物COS-7细胞中表达了假定的*hENGase*, 并表征了其酶活性, 鉴定出了*hENGase*。除此之外, 还证实了该基因在人脾脏、胸腺等多种组织中表达。植物来源的ENGase的报道依次为水稻^[24]、番茄^[25]和拟南芥^[26]。

2 ENGase的基础研究

2.1 ENGase的分布

ENGase广泛分布于各种生物体中, 包括细菌、真菌、植物、动物和人类, 但在酵母中分布特殊。例如, ENGase存在于小绪方酵母 (*Ogataea minuta*)、拟多形假丝酵母 (*Candida parapolyomorpha*)、异常毕赤酵母 (*Pichia anomala*)、鲁氏接合酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) 的基因组中。但未在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 与博伊丁假丝酵母 (*Candida boidinii*) 基因组中发现^[8]。这一事实表明, 根据ENGase有无, 将酵母分为ENGase阳性及ENGase阴性酵母两大类。ENGase的功能可能与酵母的分化和适应相关。

在碳水化合物活性酶数据库 (Carbohydrate-Active enZyme, CAZy) 中, 目前已鉴定的ENGase分布在糖苷水解酶 (glycoside hydrolases, GH) 家族18或85中。GH18 ENGase仅有水解活性; GH85 ENGase同具有水解活性与合成活性 (转糖基活性)。表1分别列出了部分GH18 ENGase与GH85 ENGase。

Table 1 A summary of partial ENGases

表1 部分ENGases总结

糖苷 水解酶 (GH)	物种 分类	来源	名称	蛋白质ID	PDB	氨基酸 ¹⁾	底物特异性	参考文献
GH18	原核 细菌 生物	褶皱链霉菌 (<i>Streptomyces plicatus</i>)	Endo H	P04067	1EDT	313 (42)	高甘露糖型/杂合型	[12]
		脑膜炎脓毒黄杆菌 (<i>Flavobacterium meningosepticum</i>) ²⁾	Endo F1	P36911	2EBN	339 (50)	高甘露糖型/杂合型	[20]
		脑膜炎脓毒黄杆菌	Endo F2	P36912	/	335 (45)	双触角复合型	[21]
		脑膜炎脓毒黄杆菌	Endo F3	P36913	1EOK	329 (39)	双触角/三触角复合型	[21]

续表1

糖苷 水解酶 (GH)	物种 分类	来源	名称	蛋白质ID	PDB	氨基酸 ¹⁾	底物特异性	参考文献
		化脓链球菌 (<i>Streptococcus pyogenes</i> serotype M1)	Endo S	Q99Y92	4NUY	995 (36)	双触角/三触角复合型	[27]
		婴儿双歧杆菌 (<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15697)	Endo BI-1	B7GPC7	/	545 (36)	高甘露糖型/双触角复 合型/杂合型	[28]
		化脓链球菌 (<i>Streptococcus pyogenes</i> serotype M49)	Endo S2	T1WGN1	6E58	843 (36)	高甘露糖型/双触角复 合型/杂合型	[29]
		多形拟杆菌 (<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>)	Endo BT_ 3987	Q8A0N4	3POH	476 (22)	双触角/三触角复合型	[30]
		停乳链球菌 (<i>Streptococcus dysgalactiae</i>)	Endo Sd	A0A191T6Q6	/	847 (36)	双触角复合型	[31]
		鞘鞍醇杆菌 (<i>Sphingobacterium species</i>)	Endo SB_ 1188	A0A2Z5VGV8	/	327 (29)	双触角复合型	[32]
		多形拟杆菌	Endo BT1044	A0A0P0FQ14	6Q64	364 (20)	双触角/三触角复合型	[33]
真核 生物	真菌	里氏木霉 (<i>Trichoderma reesei</i>)	Endo T	C4RA89	4AC1	359 (17)	高甘露糖型	[34]
		金针菇 (<i>Flammulina velutipes</i>)	Endo FV	D1GA49	/	331 (/)	高甘露糖型/杂合型	[35]
		球孢白僵菌 (<i>Beauveria bassiana</i>)	Endo BB	A0A097F8J4	/	315 (47)	双触角复合型	[32]
		蛹虫草 (<i>Cordyceps militaris</i>)	Endo CoM	G3JPF7	6KPL	315 (18)	双触角复合型	[32]
GH85	原核 生物	肺炎双球菌 (<i>Streptococcus pneumoniae</i>) ³⁾	Endo D	Q93HW0	2W91	1646 (37)	仅核心结构	[11]
		原生节杆菌 (<i>Arthrobacter protophormiae</i>)	Endo A	Q9ZB22	3FHQ	645 (24)	高甘露糖型/杂合型	[36]
		嗜碱芽孢杆菌 (<i>Bacillus halodurans</i> C-125)	Endo BH	Q9KER4	/	878 (26)	高甘露糖型/杂合型	[37]
真核 生物	真菌	冻土毛霉 (<i>Mucor hiemalis</i>)	Endo M	Q9C1S6	/	744	高甘露糖型/双触角复 合型/杂合型	[19]
		小绪方酵母 (<i>Ogataea minuta</i>)	Endo Om	R4WHQ8	/	722	高甘露糖型/双触角复 合型/杂合型	[38]
		灰盖鬼伞菌 (<i>Coprinopsis cinerea</i>)	Endo CC1	A8P7P2	/	787 (75)	高甘露糖型/双触角复 合型/杂合型	[39]
		灰盖鬼伞菌	Endo CC2	D6RKV4	/	689	高甘露糖型/双触角复 合型/杂合型	[39]
		微小根毛霉 (<i>Rhizomucorpusillus</i>)	Endo Rp	A0A8S0P0N9	/	696	高甘露糖型/双触角复 合型	[40]
植物		拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	ENGase85A	F4JZC2	/	701	高甘露糖型	[26]
		拟南芥	ENGase85B	Q9SRL4	/	680	高甘露糖型	[26]
动物		秀丽隐杆线虫 (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	Endo CE	Q19089	/	294	高甘露糖型/杂合型	[22]
		人 (<i>Homo sapiens</i>)	hENGase	Q8NFI3	/	743	高甘露糖型	[17, 23]

¹⁾ 括号内为信号肽长度; ²⁾ 2005年脑膜炎脓毒黄杆菌 (*Flavobacterium meningosepticum*) 更名为脑膜炎伊丽莎白白金菌 (*Elizabethkingia meningoseptica*); ³⁾ 1974年肺炎双球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 更名为肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)。

2.2 ENGase的系统进化分析

不同物种的ENGase具有相似的酶学性质，但基因序列各有特点。本文选取代表物种ENGase基因序列，进行多序列比对后构建进化树（图1）。

进化树分析结果与CAZy分类结果基本一致。除GH85的Endo A和Endo D外，所有的GH18和GH85分别为进化树的两端。Endo A和Endo D分支与Endo F3之间的可信度（Bootstrap）是0.556。

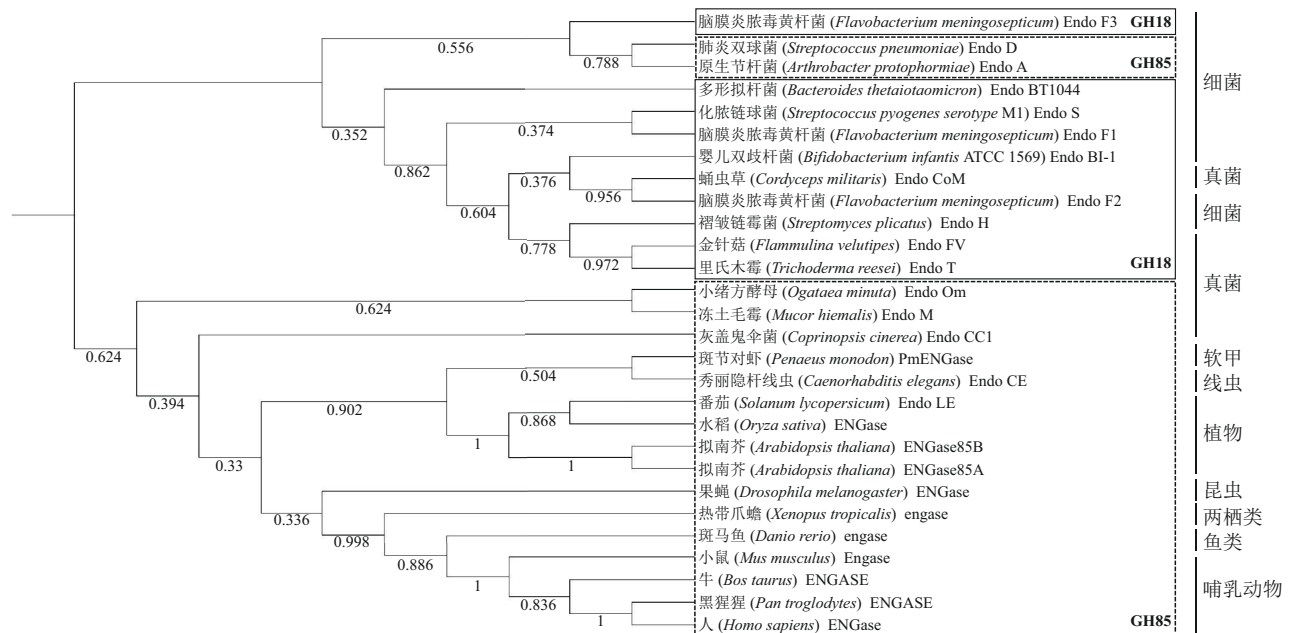


Fig. 1 A phylogenetic tree of ENGase (nodes whose bootstrap above 0.33 are indicated by values)

图1 ENGase的进化树 (可信度高于0.33的分支用数值表示)

2.3 ENGase的酶活性

作为水解酶时，ENGase可以特异性切割fOSs及糖肽或糖蛋白上核心五糖的两个GlcNAc之间的 β -1,4糖苷键，在释放一个N-聚糖链的同时，产生一个GlcNAc或带有一个GlcNAc的糖肽或糖蛋白^[7]；作为合成酶时，可以利用上述产物经转糖基反应合成新的糖蛋白。利用这个反应，可以在体外实现单一糖链糖蛋白的合成（图2）。

糖苷酶的催化机制包括翻转型（inverting）与保留型（retaining）。其中保留型为双向机制，在催化糖苷键水解的同时，还具有转糖基活性。利用糖基转移酶的活性可以合成新的糖苷键，具有一定的应用价值。研究发现，一些GH85 ENGase经定点突变后（如N171A Endo A^[41]与N175A Endo M^[42]），水解活性降低，转糖基活性显著升高。但也有发现，一些位点突变后（如Y205F Endo A^[43]与Y217F Endo M^[42]），不仅能保留水解活性，还能

提高转糖基活性。更有趣的是，虽然GH18 ENGase只有水解活性，但在晶体结构解析和定点突变研究的过程中，也发现了它们具有转糖基的能力，例如D233A /D233Q Endo S^[44]。

2.4 ENGase的结构

GH18 ENGase与GH85 ENGase具有相似的(β/α) 8-TIM桶结构，但活性位点略有不同。GH18 ENGase的活性位点是谷氨酸(Glu)和天冬氨酸(Asp)，GH85 ENGase的活性位点是谷氨酸(Glu)和天冬酰胺(Asn)（图3）。在上百种已进行了酶学表征的ENGases中，仅有少部分获得了晶体结构，hENGase的结构也未得到解析。本课题组已构建hENGase原核表达体系，并验证了酶活性，此外，还通过AlphaFold2预测了hENGase的三维结构，并且通过同源建模与多序列比对，预测并验证了hENGase的催化活性位点，为筛选ENGase抑制剂奠定了基础（待发表）。

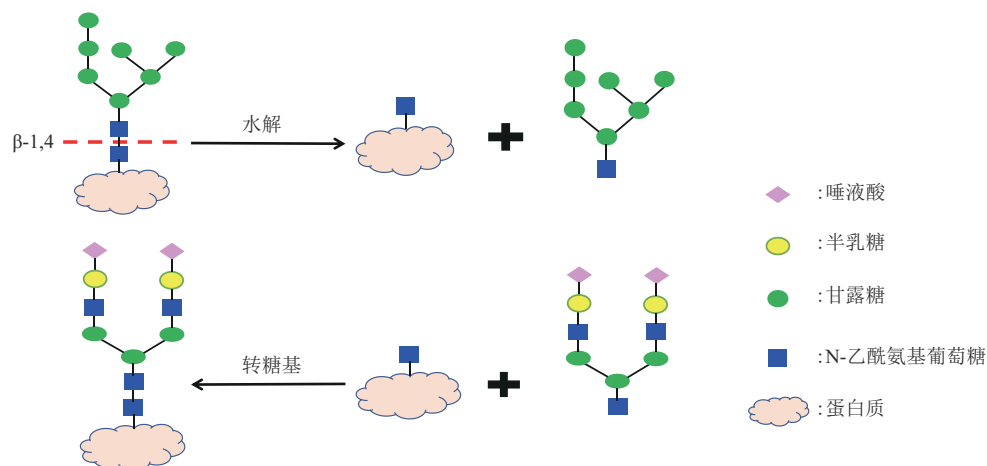


Fig. 2 Schematic diagram of ENGase enzyme activity reaction (take glycoprotein as an example)

图2 ENGase酶活性反应示意图 (以糖蛋白为例)

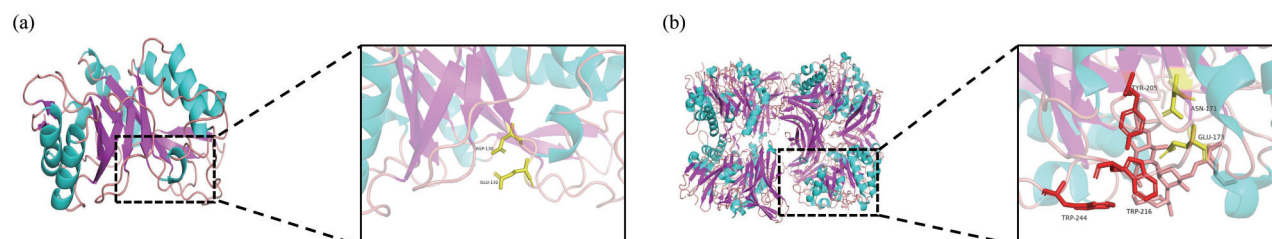


Fig. 3 Structure of ENGase

图3 ENGase的结构

(a) GH18 Endo H (PDB: 1EDT); (b) GH85 Endo A (PDB: 3FHQ)。蓝色为 α 螺旋, 紫色为 β 折叠, 黄色氨基酸为水解活性催化位点, 红色氨基酸为转糖基活性关键位点。

3 ENGase的生物学功能研究

3.1 细菌ENGase

2007年 Sharma 等^[45]发现, 原生节杆菌 (*Arthrobacter protophormiae*) RKJ100 菌株可耐受高浓度 (高达 300 mmol/L) 的邻硝基苯甲酸酯 (O-nitrobenzoate, ONB) 的表型; 2014年 Pandey 等^[46]用转座子突变筛选得到了 ONB 敏感株 TM21。在高 ONB 条件下, RKJ100 菌体发生高渗应激变形, 但该表型在 TM21 株中消失。在 12% NaCl 高盐条件下观察到类似现象, 提示 TM21 株中发生了高渗应急机制突变。序列对比分析发现, TM21 株中的转座子破坏了 *ENGase*, 酶学分析证实, *ENGase* 的转糖基活性丧失。早期研究显示^[47], 不同革兰氏阴性菌在暴露于渗透压休克后, 游离寡糖水平随之变化。因此, *ENGase* 可能是通过水解

活性改变 RKJ100 菌体对高浓度 ONB/NaCl 的抗性。

3.2 真菌ENGase

里氏木霉 (*Trichoderma atroviride*) 是一种根部寄生真菌, 可用于病原真菌的生物防治。里氏木霉表达两个 *ENGase*, 分别是 *Eng18A* (Endo T) 与 *Eng18B*。2012年 Dubey 等^[48]构建了 $\Delta Eng18B$ 敲除株, 与野生型 (WT) 相比, 敲除 $\Delta Eng18B$ 不会影响 *ENGase* 的酶活性, 这可能是因为 *Eng18A* 的存在。此外, 他们还观察到一些 $\Delta Eng18B$ 敲除株与生长发育相关的表型。例如, 生长速率显著降低, 在某些条件培养基上菌落形态发生明显变化、分生孢子形成率提高。在细胞壁压力条件下 (补充有 1 mol/L NaCl 或 0.025% SDS), $\Delta Eng18B$ 敲除株具有较高的生长速率, 增强了对非生物胁迫的抵抗力, 这些表型的共同点是由于细胞壁功能改变所产生的。此外, 他们还发现 $\Delta Eng18B$ 敲除株在液体

培养基中利用几丁质的能力减弱,对某些病原真菌(*Botrytis cinerea*)的拮抗能力下降。

3.3 拟南芥ENGase

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)有两个功能性ENGase基因,分别是*AtENGase85B*(*At3g11040*)和*AtENGase85A*(*At5g05460*)。研究发现,*AtENGase85A*只在茎中表达。单独敲除*AtENGase85A*或*AtENGase85B*,没有发现明显的表型。在双突变体中,检测不到还原端带有一个GlcNAc的游离寡糖,且高甘露糖型游离N-糖链(还原端有两个GlcNAc)的积累^[26, 49]表明ENGase可作用于游离聚糖。

2013年Kim等^[50]检查了两种拟南芥ENGase的突变体对TGG1和TGG2(两种硫代葡萄糖苷葡萄糖水解酶)的N-GlcNAc修饰的影响,发现N-GlcNAc单糖修饰的TGG2在*AtENGase85A*单突变体中显著减少,在双突变体消失。而N-GlcNAc单糖修饰的TGG1在任何突变体中均未受影响。TGG2的数据支持ENGase水解糖蛋白上的聚糖并产生单一N-GlcNAc修饰的蛋白质,TGG1的结果则提示,细胞中的ENGase有底物特异性,并不是所有的糖蛋白都是适合的底物。

3.4 番茄ENGase

1998年Kimura等^[51]对番茄ENGase(Endo-LE)进行了底物特异性分析,发现其最佳作用底物是GN₂-M₆-PA和GN₂-M₅-PA,但不能水解植物中广泛存在的含木糖的N-糖链。Kimura等^[25, 52]以番茄为模型研究了植物ENGase的产物对果实成熟的影响。他们发现,游离N-糖链的含量随番茄的成熟而提高,其中GN₁-M₈与GN₁-M₉的含量较高,同时还发现在果实成熟过程中番茄ENGase活性相对稳定。2022年他们利用CRISPR/Cas9构建了番茄ENGase的敲除株(Δeng),并分析了 Δeng 敲除株游离高甘露聚糖的结构^[53]。结果显示, Δeng 敲除株中的结构是GN₂-fOSs,而不是GN₁-fOSs,但他们始终未能阐明带有一个GlcNAc的高甘露糖型结构在番茄果实成熟中的作用。

早期研究发现,游离N-糖链在植物细胞中以微摩尔浓度普遍存在,并被推测对植物细胞分化或生长具有重要意义^[54]。虽然诸多植物来源的ENGase不能酶切含木糖的N-糖链,提示着植物来源的ENGase不太可能直接参与植物带有木糖的复合型N-糖蛋白/糖肽产生GN₁-fOSs,但由ENGase作用产生的GN₁-fOSs对植物生长发育、分化、适

应及其他生理现象的作用值得深入研究。

3.5 线虫ENGase

秀丽隐杆线虫的ENGase(Eng-1或Endo-CE)底物特异性研究^[22]表明,该酶更倾向于水解高甘露糖型的寡糖链。为阐明线虫fOSs的降解途径,Kato等^[55-56]进一步分析了线虫fOSs的分子结构,发现在野生型线虫中,主要组分是GN₁-fOSs,而在 $\Delta Eng-1$ 敲除株中(*tm1208*)fOSs的总量降低,GN₂-M₅到GN₂-M₉的相对含量显著增加。研究还发现,因线虫缺失胞质中的 α 甘露糖苷酶(MAN2C1),与其他物种不同,GN₁-M₈的fOS底物不经加工,直接进入顺式高尔基体,经 α -1,2甘露糖苷酶处理后形成不含有 α -1,2-连接的GN₁-M₅的游离寡糖链。

为进一步确认fOSs是通过ER-高尔基体产生的,Kato等还分析了高尔基体 α 甘露糖苷酶II缺陷型线虫(*tm1078*)的fOSs。结果表明,突变体线虫中,检测到了带有非还原端GlcNAc的fOSs(GN₁-M₅-GN₁),提示在线虫中N-糖蛋白可能会在高尔基体中进行加工和降解。研究以胞质fOSs分析的结果推论,高尔基体中可能也有糖蛋白质量控制的存在。

3.6 果蝇ENGase

ENGase的酶切产物之一,是带有一个N-GlcNAc的蛋白质。细胞内N-GlcNAc蛋白的聚集,可能会影响蛋白上O-GlcNAc信号。2022年Na等^[57]在利用果蝇肠道研究成体干细胞增殖和分化时,研究了干细胞内PNG1(NGLY1同源蛋白)、OGT(O-糖基转移酶)及ENGase等胞质酶之间的相互作用,以及互作与维持肠道稳态之间的关系。他们发现,在肠道干细胞(intestinal stem cells, ISCs)中特异性敲降PNG1/OGT的果蝇中,ENGase表达升高,ISCs增殖减速。在用雷贝拉唑抑制ENGase的活性后,ISCs增殖增加^[58]。结果提示,果蝇肠道干细胞中ENGase的表达,受PNG1和OGT途径调节,胞内ENGase活性的高低与干细胞稳态相关。

3.7 虾ENGase

研究表明,糖蛋白上的N-聚糖在病毒蛋白和病毒成熟过程中都发挥着重要的作用^[59]。虾白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)感染可导致虾大量死亡。生物信息预测WSSV一些包膜蛋白上有N/O-糖基化修饰位点,但早期研究并没有检测到相应的蛋白质糖基化修饰^[60-61]。2009年Zhao等^[62]发现来自虾的新型C型凝集素1

(C-type Lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei*, LvCTL1) 具有抗 WSSV 的活性。由于凝集素是通过识别聚糖分子起效, Huang 等^[63] 推测了 WSSV 在病毒成熟过程中同时发生了蛋白质的糖基化和去糖基化反应, 以逃逸宿主免疫防御系统。

2020年 Huang 等^[63] 证实了去糖基化可能是由 *ENGase* 发挥作用的。他们发现, 在 WSSV 感染的斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 中 *PmENGase* 表达上调。在 WSSV 攻击试验中, 发现 *PmENGase* 沉默表达后, 虾的累积死亡率和病毒拷贝数显著降低, 表明 *PmENGase* 在 WSSV 复制过程中发挥了一定的作用。谷胱甘肽-S-转移酶融合蛋白沉降技术 (glutathione-S-transferase-pull down, GST-pull down) 和免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP) 实验显示 *PmENGase* 与 WSSV 包膜蛋白 VP41B 有相互作用。这提示, *PmENGase* 除了去糖基化酶的活性, 在 WSSV 的感染过程中还发挥着其他的作用。

3.8 鼠 *ENGase*

2006年 Chalkley 等^[64] 用电子转移解离质谱分析了鼠突触 O-糖肽, 报告了 67 个 GlcNAc-糖肽。2013年 Trinidad 等^[65] 表征了鼠突触体中的 N-糖肽, 发现了大量 *Engase* 的产物, 即带有一个 GlcNAc 的 N-糖肽。这个结构占检测到的 N-糖肽的 32%, 提示 *Engase* 反应在细胞内是一个常态现象。

为评估 *Engase* 是否直接参与去糖基化, 2015年 Suzuki 实验室^[66] 在 *Ngly1^{-/-} Engase^{-/-}* 双敲除的小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF cell) 中共表达了 *Engase* 及 *Ngly1* 的报告底物 (RTAΔm)。研究发现, *Ngly1* 缺失可导致 *Engase* 底物的积累, 共表达 *Engase* 后可检测到反应产物的贮积。此外, 他们还分析了敲除小鼠 MEF 细胞中 fOSs 结构和含量^[67], 结果与秀丽隐杆线虫中 $\Delta Eng-1$ 敲除株基本一致^[55], 证明 *Engase* 催化了胞质 GN₂-fOSs 向 GN₁-fOSs 型的转化。在 *Engase^{-/-}* MEF 细胞中, 发现胞质 fOSs 主要由 GN₂-M₈ 与 GN₂-M₉ 组成, 表明 Man2C1 催化的甘露糖水解受阻。这一结果与 Man2C1 在体外对 GN₁-fOSs 表现出比 GN₂-fOSs 更高的底物特异性相一致^[68-69]。这更进一步证实, *Engase* 是哺乳动物细胞中甘露糖苷酶作用的先决条件。

2017年 Suzuki 实验室^[70] 发现, *Ngly1^{-/-}* 会导致小鼠胚胎致死, *Ngly1^{-/-} Engase^{-/-}* 可以降低胚胎致死率。根据以上研究, 他们提出了“N-GlcNAc 毒

性假说”, 即 *Engase* 在细胞质中切割错误折叠的糖蛋白上的聚糖后形成的 N-GlcNAc 蛋白产物, 过量时可以某种方式对小鼠产生有害影响。例如, 蛋白质上的 N-GlcNAc 可诱导聚集体, 或干扰细胞质 O-GlcNAc 信号传导。2020年, 他们对胞质 N/O-GlcNAc 糖肽进行了综合分析^[71], 发现在 *Ngly1^{-/-}* 细胞中的 N-GlcNAc 蛋白水平大幅增加, 而 O-GlcNAc 蛋白没有显著变化, 但在 *Engase^{-/-}* 或 *Ngly1^{-/-} Engase^{-/-}* 细胞中 N-GlcNAc 蛋白很少, 这表明胞质 *Engase* 负责 N-GlcNAc 蛋白的形成。N-GlcNAc 蛋白的过量形成部分解释了 *NGLY1* 缺陷的发病机制。2022年 Mueller 等^[72] 利用 *Ngly1* 缺陷鼠模型和患者样本, 确认 N-GlcNAc 蛋白是 *NGLY1* 缺陷的主要代谢组学特征和生物标志物。

3.9 人 *ENGase*

诸多哺乳动物的研究呈现的间接证据表明, 还原端单一 GlcNAc 的游离寡糖 (GN₁-fOSs) 可以通过 *ENGase* 的水解反应直接从糖蛋白中释放, 但是哺乳动物 *ENGase* 在 fOSs 代谢过程中的作用尚不明确。2010年 Chantret 等^[73] 研究了 *NGLY1* (酵母中命名为 *png1*) 和 *hENGase* 在 fOSs 代谢过程中的作用时发现, *hENGase* 能够在 $\Delta png1$ 的酿酒酵母中, 降解因基因敲除而积累的折叠错误糖蛋白上的糖链, 并且获得了该酶在 HepG2 细胞中去糖基化功能的直接证据, 证明了 *hENGase* 可能在胞质 fOSs 向溶酶体的转运过程中起着重要作用。

2018年 Relic 等^[74] 发现, 饥饿可诱导增强滑膜成纤维细胞中 *hENGase* 的合成或降解。为了测试饥饿对去糖基化反应的可能影响, 在存在或不存在血清以及不同蛋白酶抑制剂 MG132 浓度的情况下培养滑膜成纤维细胞。然后通过蛋白质印迹测试细胞提取物中的 *hENGase*, 结果表明, 细胞内 *hENGase* 的含量在饥饿条件下降解, 降解过程可被蛋白酶抑制剂 MG132 及回补血清阻断。

癌症疫苗接种可引发针对细胞表面特定聚糖或蛋白质表位的免疫反应。移植至裸鼠的肿瘤细胞经产气荚膜梭菌内切- β -半乳糖苷酶^[75] 处理后, 会导致移植细胞的生长抑制, 这可能是由于宿主存在识别经酶处理后暴露在细胞表面的 GlcNAc 残基被免疫系统识别所致。因此推测, 末端 GlcNAc 残基可以被用作“抗肿瘤抗原”^[76-77]。为验证这一假设, Watanabe 等^[78] 使用 *hENGase* 转染小鼠黑色素瘤 B16 细胞进行移植实验后发现, 过表达 *hENGase* 的重组 B16 细胞表面的 GlcNAc 残基量是其亲代细胞

的3倍, 移植肿瘤的大小是野生型移植细胞的1/10左右。*hENGase*在实体B16黑色素瘤肿瘤细胞中的高表达, 可对肿瘤形成进行有效抑制。这一结果提示*hENGase*可能与肿瘤的发生和基因治疗相关。

不同物种*ENGase*的研究显示, *ENGase*的生物学功能呈多样性。目前尚未观察到*ENGase*为必需基因的表型, 提示*ENGase*的主要功能, 可能是分化调节及对营养、压力和病原体等不同环境因子的适应。

4 *ENGase*的应用

4.1 *ENGase*与营养健康

母乳是婴儿生长发育的最佳营养源。人母乳中最重要的营养成分主要有高度多样化的人母乳低聚糖 (human milk oligosaccharides, HMOs) 和乳蛋白。其中HMOs的浓度和组分结构受泌乳阶段和母体遗传因素的影响^[79-80]。目前Li等^[81]已建立在短时间内准确定量23种复杂HMOs的方法学。HMOs在小肠中不能被直接消化吸收, 但在到达结肠后会被益生型双歧杆菌发酵, 从而改善婴儿肠道微生态^[82-83]。此外, 70%乳蛋白是糖蛋白, 其N-聚糖链也可以被肠道微生物利用, 产生乳酸盐、乙酸盐等酸性物质, 调节肠道pH, 减少致病菌的定殖^[83-85]。

婴儿肠道菌群中双歧杆菌和拟杆菌占比较高, 链球菌和肠球菌占比较低^[82, 86]。与其他来源的*ENGase*相比, 分离自婴儿双歧杆菌 (*Bifidobacterium infantis* ATCC 15697) 的Endo BI-1具有两个特点。首先, 它的酶活性不受核心岩藻糖的影响; 其次, 它具有很强的耐热性, 在95°C的条件下也可以保持很好的活性^[28]。经Endo BI-1水解释放的N-聚糖链还能刺激婴儿双歧杆菌的生长, 是一种新型益生元底物^[87]。母乳喂养婴儿的肠道微生态研究发现, Endo BI-1在婴儿双歧杆菌EVC001定植过程中有活性^[88]。因此, Endo BI-1是一种很有前景的功能酶, 可能用于食品的添加^[89-90]。

4.2 *ENGase*与感染免疫

化脓性链球菌是最常见的人类病原体之一, 其感染可引起咽炎、猩红热或严重的侵袭性等疾病, 目前仍在进行疫苗开发等转化研究^[91]。该菌表达了多种可逃避宿主免疫的毒性因子, 其中的Endo S可特异性水解IgG上的N-糖链^[92]。研究发现, Endo S去除N-糖链后, 抗体Fc区的结构从开放趋向封闭,

与FcR III的亲和力降低^[93]。IgG与FcR的结合被弱化后, 调理吞噬杀死细菌的能力会降低, 可提高化脓性链球菌在离体人体血液中的存活率。IgG1 Fc与Endo S复合物的冷冻电镜结构建立了Endo S识别和IgG抗体的特异性去糖基化机制^[94]。这种机制的建立, 为治疗免疫系统疾病打开了一个新的窗口。粪肠球菌的Endo E是一个多结构域的糖苷酶, 有GH20和GH18两个结构域。GH20结构域具 β -1,2-N-乙酰葡萄糖胺酶活性, GH18结构域具*ENGase*活性, 底物包括高甘露糖型及复合型N-糖链。两个糖苷水解酶可以协同方式水解IgG上的N-糖链, 可在糖链代谢和免疫逃避中发挥双重作用^[95-96]。

猪链球菌血清型2 (SS2) 强毒株感染可导致败血症。Ma等^[97]发现, SS2强毒株在猪血清中的增殖能力明显高于低毒株, 并在SS2的基因组中找到了一个载有Endo SS的插入序列。表明该酶可能特异性地助长了细菌在宿主血清中的增殖。随后他们全面分析了该酶在剪切高甘露糖型糖蛋白、血清中细菌的生长及致病性方面的作用。研究发现, Endo SS特有的N-聚糖降解系统可提高SS2在血清中的碳源摄取, 是全身感染期间最佳定植和完全毒力所必需的, 提示Endo SS是一个潜在的治疗靶点。此外, Robb等^[98]报道了肺炎链球菌的毒力与Endo D的活性相关, Endo D有助于肺炎链球菌的生长与毒力。

4.3 *ENGase*与罕见病治疗

研究表明^[70], *Engase*缺失可以降低*Ngly1*缺陷小鼠的致死率, 可以作为NGLY1-CDDG基因治疗的潜在靶点。2017年Bi等^[58]根据Endo A的晶体结构, 与*hENGase*同源比对, 使用FDA批准药物的数据库, 构建了*hENGase*的虚拟药物筛选模型。在第一轮筛选到的13种药物中, 质子泵抑制剂兰索拉唑被确定为潜在的*hENGase*抑制剂。随后, 他们继续测试了另外7种质子泵抑制剂, 有4种显示出抑制活性, 其中雷贝拉唑的抑制效果最好。根据分子相互作用, 他们发现咪唑环和吡啶环在药物-酶的结合能力上发挥着重要的作用。虽然*Engase*缺失是如何影响*Ngly1*缺陷小鼠表型的问题目前并没有很好的解释, 但首次发现*hENGase*小分子抑制剂可能可用于NGLY1-CDDG的治疗, 这是一个非常好的起点, 拓宽了研究者的思路和研究方法, 充分利用天然单体或化合物库, 可能得到更广谱更高效的药物治疗罕见病。

4.4 ENGase与合成生物学

利用ENGase的水解酶与转糖基酶活性,可合成均一糖链的糖肽和糖蛋白。2006年Makimura等^[99]利用Endo M的转糖基活性,将从天然卵黄蛋白制备的带有唾液酸的糖链转移到p-CHOPh-GlcNAc上,合成了流感病毒血凝反应抑制剂,其对流感病毒血凝的抑制活性比卵黄唾液酸糖肽高40倍,比胎球蛋白高300多倍。根据蛋白质上糖链糖型的不同,RNase可以被分为RNase A(无糖基化)、RNase B(高甘露糖型)和RNase C(复合型糖型)3个亚型^[100]。2010年Huang等^[101]以RNase B和含有唾液酸糖链的恶唑啉为底物,利用Endo A与N175A Endo M的酶活性进行一锅式反应,合成了RNase C,实现了RNase B到RNase C的糖型转换,得率高达70%。2016年Priyanka等^[102]用RNase B和恶唑啉13为底物,用Endo A催化合成了带有6-磷酸甘露糖的糖蛋白(M6P)。利用6-磷酸甘露糖受体(M6PR),可帮助蛋白质进入溶酶体,用于溶酶体贮积症的治疗。

抗体糖链的改造是ENGase的一大应用^[103],目前使用的主要是Endo S及其突变体。研究证明,IgG Fc区的N-糖链结构与IgG的功能相关:糖链末端的 α -2,6-唾液酸是人静脉注射免疫球蛋白(intravenous immunoglobulin, IVIG)的活性成分之一,具有抗炎作用;核心岩藻糖会阻碍IgG与Fc γ IIIa受体的结合,调控抗体依赖性细胞毒性(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)^[104]。2012年Huang等^[44]首先通过WT Endo S与D233Q Endo S、D233A Endo S,两步反应实现了利妥昔单抗的去糖基化-再糖基化的改造,获得了高抗炎(完全唾液酸化糖型)与高ADCC(非岩藻糖基化糖型)的单抗。此外,他们还发现Endo S能够选择性水解IVIG Fc区上的糖链,其产物经D233Q Endo S催化反应合成了完全唾液酸化的IVIG(图4)。利妥昔单抗的重塑开启了糖工程应用的新领域和新平台,为开发治疗肿瘤、自身免疫性疾病和传染病的抗体及抗体偶联药物创造了更多的可能性。

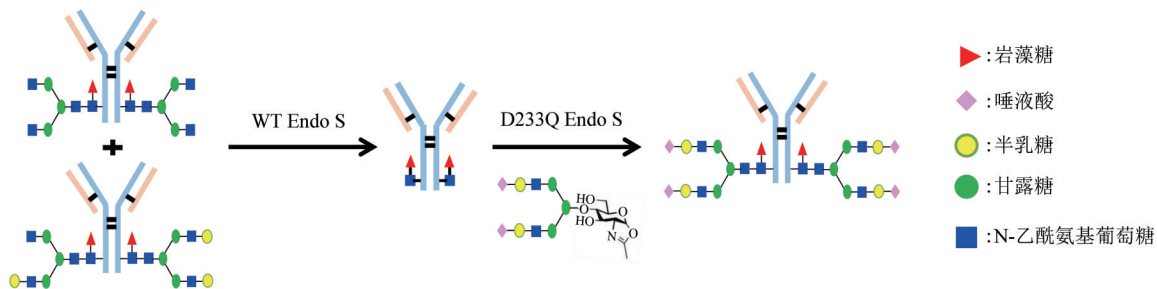


Fig. 4 Endo S for synthesis of homogeneous glycoforms^[44]

图4 使用Endo S合成均质糖型抗体^[44]

5 展 望

糖链是与核酸和蛋白质相似的第三条生命链,参与了包括细胞识别、免疫应答、肿瘤发生发展等生命活动。本文认为,糖链的主要功能是生物快速识别(biological quick recognition, BioQR)或生物二维码。本课题组的前期研究表明,糖链信号与过敏^[105-109]及CDG相关^[110-111],血清N-糖链图谱可表征衰老状况和肝纤维化等生理病理过程^[112]。利用ENGase,可在体内外进行蛋白质和细胞的糖链编辑^[113],在糖链结构解析、抗体偶联药物的开发、靶向肿瘤治疗、CDG药物靶点等糖生物及糖

工程领域有着很好的应用前景^[114-115]。虽然ENGase的研究仍存在不明确的地方,但也提出了一些具体且有趣的科学问题。例如,酿酒酵母为何不需要ENGase?为何某些物种可以同时拥有多个ENGase同功酶?ENGase在系统调控中的作用是什么?有没有可同时水解动物、植物和昆虫底物的通用型ENGase?ENGase相关的基础和应用研究进展,势将推动糖生物学及糖组学的快速发展。

参 考 文 献

- [1] Esmail S, Manolson M F. Advances in understanding N-glycosylation structure, function, and regulation in health and disease. *Eur J Cell Biol*, 2021, **100**(7-8): 151186

- [2] Radovani B, Gudelj I. N-glycosylation and inflammation; the not-so-sweet relation. *Front Immunol*, 2022, **13**: 893365
- [3] Pandey V K, Sharma R, Prajapati G K, *et al.* N-glycosylation, a leading role in viral infection and immunity development. *Mol Biol Rep*, 2022, **49**(8): 8109-8120
- [4] Lemberg M K, Strisovsky K. Maintenance of organellar protein homeostasis by ER-associated degradation and related mechanisms. *Mol Cell*, 2021, **81**(12): 2507-2519
- [5] Pandey A, Adams J M, Han S Y, *et al.* *NGLY1* deficiency, a congenital disorder of deglycosylation: from disease gene function to pathophysiology. *Cells*, 2022, **11**(7): 1155
- [6] Walber S, Partalidou G, Gerling-Driessen U I M. *NGLY1* Deficiency: a rare genetic disorder unlocks therapeutic potential for common diseases. *Israel J Chem*, 2023, **63**(1-2): e202200068
- [7] Fairbanks A J. The ENGases: versatile biocatalysts for the production of homogeneous N-linked glycopeptides and glycoproteins. *Chem Soc Rev*, 2017, **46**(16): 5128-5146
- [8] Suzuki T, Park H, Kitajima K, *et al.* Peptides glycosylated in the endoplasmic reticulum of yeast are subsequently deglycosylated by a soluble peptide: N-glycanase activity. *J Biol Chem*, 1998, **273**(34): 21526-21530
- [9] Doelman W, van Kasteren S I. Synthesis of glycopeptides and glycopeptide conjugates. *Org Biomol Chem*, 2022, **20**(33): 6487-6507
- [10] Manabe S, Yamaguchi Y. Antibody glycoengineering and homogeneous antibody-drug conjugate preparation. *Chem Rec*, 2021, **21**(11): 3005-3014
- [11] Muramatsu T. Demonstration of an endo-glycosidase acting on a glycoprotein. *J Biol Chem*, 1971, **246**(17): 5535-5537
- [12] Tarentino A L. Purification and properties of an endo-beta-N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces griseus*. *J Biol Chem*, 1974, **249**(3): 811-817
- [13] Koide N, Muramatsu T. Endo-beta-N-acetylglucosaminidase acting on carbohydrate moieties of glycoproteins. Purification and properties of the enzyme from *Diplococcus pneumoniae*. *J Biol Chem*, 1974, **249**(15): 4897-4904
- [14] Tarentino A L, Maley F. Purification and properties of an endo-beta-N-acetylglucosaminidase from hen oviduct. *J Biol Chem*, 1976, **251**(21): 6537-6543
- [15] Delmotte F, Kiéda C, Monsigny M. Demonstration of an endo-beta-N-acetyl-glucosaminidase in rabbit serum. *C R Acad Hebd Seances Acad Sci D*, 1976, **283**(9): 1121-1124
- [16] Pierce R J, Spik G, Montreuil J. Cytosolic location of an endo-N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in rat liver and kidney. *Biochem J*, 1979, **180**(3): 673-676
- [17] Overdijk B, van der Kroef W M, Lisman J J, *et al.* Demonstration and partial characterization of endo-N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in human tissues. *FEBS Lett*, 1981, **128**(2): 364-366
- [18] Tachibana Y, Yamashita K, Kobata A. Substrate specificity of mammalian endo-beta-N-acetylglucosaminidase: study with the enzyme of rat liver. *Arch Biochem Biophys*, 1982, **214**(1): 199-210
- [19] Kadowaki S, Yamamoto K, Fujisaki M, *et al.* A novel endo-beta-N-acetylglucosaminidase acting on complex oligosaccharides of glycoproteins in a fungus. *Agric Biol Chem*, 1988, **52**(9): 2387-2389
- [20] Elder J H, Alexander S. Endo-beta-N-acetylglucosaminidase F: endoglycosidase from *Flavobacterium meningosepticum* that cleaves both high-mannose and complex glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, **79**(15): 4540-4544
- [21] Tarentino A L, Quinones G, Changchien L M, *et al.* Multiple endoglycosidase F activities expressed by *Flavobacterium meningosepticum* endoglycosidases F2 and F3. Molecular cloning, primary sequence, and enzyme expression. *J Biol Chem*, 1993, **268**(13): 9702-9708
- [22] Kato T, Fujita K, Takeuchi M, *et al.* Identification of an endo-beta-N-acetylglucosaminidase gene in *Caenorhabditis elegans* and its expression in *Escherichia coli*. *Glycobiology*, 2002, **12**(10): 581-587
- [23] Suzuki T, Yano K, Sugimoto S, *et al.* Endo-beta-N-acetylglucosaminidase, an enzyme involved in processing of free oligosaccharides in the cytosol. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(15): 9691-9696
- [24] Maeda M, Okamoto N, Araki N, *et al.* Purification, characterization, and gene expression of *Rice* Endo-beta-N-acetylglucosaminidase, Endo-Os. *Front Plant Sci*, 2021, **12**: 647684
- [25] Nakamura K, Inoue M, Maeda M, *et al.* Molecular cloning and gene expression analysis of *tomato* endo-beta-N-acetylglucosaminidase, an endoglycosidase involved in the production of high-mannose type free N-glycans during *tomato* fruit ripening. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, **73**(2): 461-464
- [26] Kimura Y, Takeoka Y, Inoue M, *et al.* Double-knockout of putative endo-beta-N-acetylglucosaminidase (*ENGase*) genes in *Arabidopsis thaliana*: loss of ENGase activity induced accumulation of high-mannose type free N-glycans bearing N,N'-acetylchitobiosyl unit. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, **75**(5): 1019-1021
- [27] Collin M, Olsén A. EndoS, a novel secreted protein from *Streptococcus pyogenes* with endoglycosidase activity on human IgG. *EMBO J*, 2001, **20**(12): 3046-3055
- [28] Garrido D, Nwosu C, Ruiz-Moyano S, *et al.* Endo-beta-N-acetylglucosaminidases from infant gut-associated *bifidobacteria* release complex N-glycans from human milk glycoproteins. *Mol Cell Proteomics*, 2012, **11**(9): 775-785
- [29] Sjögren J, Struwe W B, Cosgrave E F, *et al.* EndoS2 is a unique and conserved enzyme of serotype M49 group A *Streptococcus* that hydrolyses N-linked glycans on IgG and alpha1-acid glycoprotein. *Biochem J*, 2013, **455**(1): 107-118
- [30] Cuskin F, Lowe E C, Temple M J, *et al.* Human gut Bacteroidetes can utilize yeast mannan through a selfish mechanism. *Nature*, 2015, **517**(7533): 165-169
- [31] Shadnezhad A, Naegeli A, Sjögren J, *et al.* EndoSd: an IgG glycan hydrolyzing enzyme in *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *dysgalactiae*. *Future Microbiol*, 2016, **11**: 721-736

- [32] Huang Y, Higuchi Y, Kinoshita T, *et al.* Characterization of novel endo- β -N-acetylglucosaminidases from *Sphingobacterium* species, *Beauveria bassiana* and *Cordyceps militaris* that specifically hydrolyze fucose-containing oligosaccharides and human IgG. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 246
- [33] Briiliūtė J, Urbanowicz P A, Luis A S, *et al.* Complex N-glycan breakdown by gut *Bacteroides* involves an extensive enzymatic apparatus encoded by multiple co-regulated genetic loci. *Nat Microbiol*, 2019, **4**(9): 1571-1581
- [34] Stals I, Samyn B, Sergeant K, *et al.* Identification of a gene coding for a deglycosylating enzyme in *Hypocrea jecorina*. *FEMS Microbiol Lett*, 2010, **303**(1): 9-17
- [35] Hamaguchi T, Ito T, Inoue Y, *et al.* Purification, characterization and molecular cloning of a novel endo-beta-N-acetylglucosaminidase from the basidiomycete, *Flammulina velutipes*. *Glycobiology*, 2010, **20**(4): 420-432
- [36] Takegawa K, Nakoshi M, Iwahara S, *et al.* Induction and purification of endo-beta-N-acetylglucosaminidase from *Arthrobacter protophormiae* grown in ovalbumin. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**(12): 3107-3112
- [37] Fujita K, Takami H, Yamamoto K, *et al.* Characterization of endo-beta-N-acetylglucosaminidase from alkaliphilic *Bacillus halodurans* C-125. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, **68**(5): 1059-1066
- [38] Murakami S, Takaoka Y, Ashida H, *et al.* Identification and characterization of endo- β -N-acetylglucosaminidase from methylotrophic yeast *Ogataea minuta*. *Glycobiology*, 2013, **23**(6): 736-744
- [39] Eshima Y, Higuchi Y, Kinoshita T, *et al.* Transglycosylation activity of glycosynthase mutants of endo- β -N-acetylglucosaminidase from *Coprinopsis cinerea*. *PLoS One*, 2015, **10**(7): e0132859
- [40] Nishizawa H, Iwamoto M, Ono Y. Identification and characterization of a novel thermo-stable endo- β -N-acetylglucosaminidase from *Rhizomucorpusillus*. *J Biosci Bioeng*, 2022, **134**(4): 295-300
- [41] Huang W, Li C, Li B, *et al.* Glycosynthases enable a highly efficient chemoenzymatic synthesis of N-glycoproteins carrying intact natural N-glycans. *J Am Chem Soc*, 2009, **131**(6): 2214-2223
- [42] Umekawa M, Li C, Higashiyama T, *et al.* Efficient glycosynthase mutant derived from *Mucor hiemalis* endo-beta-N-acetylglucosaminidase capable of transferring oligosaccharide from both sugar oxazoline and natural N-glycan. *J Biol Chem*, 2010, **285**(1): 511-521
- [43] Yin J, Li L, Shaw N, *et al.* Structural basis and catalytic mechanism for the dual functional endo-beta-N-acetylglucosaminidase A. *PLoS One*, 2009, **4**(3): e4658
- [44] Huang W, Giddens J, Fan S Q, *et al.* Chemoenzymatic glycoengineering of intact IgG antibodies for gain of functions. *J Am Chem Soc*, 2012, **134**(29): 12308-12318
- [45] Sharma N K, Pandey J, Gupta N, *et al.* Growth and physiological response of *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 toward higher concentrations of o-nitrobenzoate and p-hydroxybenzoate. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, **271**(1): 65-70
- [46] Pandey J, Khan F, Mahajan V, *et al.* Evidence for vital role of endo- β -N-acetylglucosaminidase in the resistance of *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 towards elevated concentrations of o-nitrobenzoate. *Extremophiles*, 2014, **18**(3): 491-500
- [47] Bouchart F, Delangle A, Lemoine J, *et al.* Proteomic analysis of a non-virulent mutant of the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* deficient in osmoregulated periplasmic glucans: change in protein expression is not restricted to the envelope, but affects general metabolism. *Microbiology*, 2007, **53**(3): 760-767
- [48] Dubey M K, Ubhayasekera W, Sandgren M, *et al.* Disruption of the *Eng18B* ENGase gene in the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* affects growth, conidiation and antagonistic ability. *PLoS One*, 2012, **7**(5): e36152
- [49] Fischl R M, Stadlmann J, Grass J, *et al.* The two endo- β -N-acetylglucosaminidase genes from *Arabidopsis thaliana* encode cytoplasmic enzymes controlling free N-glycan levels. *Plant Mol Biol*, 2011, **77**(3): 275-284
- [50] Kim Y C, Jähren N, Stone M D, *et al.* Identification and origin of N-linked β -D-N-acetylglucosamine monosaccharide modifications on *Arabidopsis* proteins. *Plant Physiol*, 2013, **161**(1): 455-464
- [51] Kimura Y, Tokuda T, Ohno A, *et al.* Enzymatic properties of endo-beta-N-acetylglucosaminidases from developing tomato fruits and soybean seeds: substrate specificity of plant origin endoglycosidase. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **381**(1): 27-36
- [52] Nakamura K, Inoue M, Yoshiie T, *et al.* Changes in structural features of free N-glycan and endoglycosidase activity during tomato fruit ripening. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, **72**(11): 2936-2945
- [53] Okamoto N, Maeda M, Yamamoto C, *et al.* Construction of tomato plants with suppressed endo- β -N-acetylglucosaminidase activity using CRISPR-Cas9 mediated genome editing. *Plant Physiol Biochem*, 2022, **190**: 203-211
- [54] Kimura Y, Matsuo S. Free N-glycans already occur at an early stage of seed development. *J Biochem*, 2000, **127**(6): 1013-1019
- [55] Kato T, Kitamura K, Maeda M, *et al.* Free oligosaccharides in the cytosol of *Caenorhabditis elegans* are generated through endoplasmic reticulum-golgi trafficking. *J Biol Chem*, 2007, **282**(30): 22080-22088
- [56] Ashida H, Kato T, Kawahara A, *et al.* Enzymes involved in generation and degradation of the free oligosaccharides in the cytosol of *Caenorhabditis elegans*. *J Appl Glycosci*, 2009, **56**(2): 137-143
- [57] Na H J, Abramowitz L K, Hanover J A. Cytosolic O-glcNAcylation and PNG1 maintain *Drosophila* gut homeostasis by regulating proliferation and apoptosis. *PLoS Genet*, 2022, **18**(3): e1010128
- [58] Bi Y, Might M, Vankayalapati H, *et al.* Repurposing of Proton Pump Inhibitors as first identified small molecule inhibitors of

- endo- β -N-acetylglucosaminidase (ENGase) for the treatment of *NGLY1* deficiency, a rare genetic disease. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, **27**(13): 2962-2966
- [59] Watanabe Y, Bowden T A, Wilson I A, *et al.* Exploitation of glycosylation in enveloped virus pathobiology. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2019, **1863**(10): 1480-1497
- [60] van Hulten M C, Westenberg M, Goodall S D, *et al.* Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. *Virology*, 2000, **266**(2): 227-236
- [61] Xie X, Xu L, Yang F. Proteomic analysis of the major envelope and nucleocapsid proteins of white spot syndrome virus. *J Virol*, 2006, **80**(21): 10615-10623
- [62] Zhao Z Y, Yin Z X, Xu X P, *et al.* A novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* possesses anti-white spot syndrome virus activity. *J Virol*, 2009, **83**(1): 347-356
- [63] Huang J Y, Wang H C, Chen Y C, *et al.* A shrimp glycosylase protein, PmENGase, interacts with WSSV envelope protein VP41B and is involved in WSSV pathogenesis. *Dev Comp Immunol*, 2020, **108**: 103667
- [64] Chalkley R J, Thalhammer A, Schoepfer R, *et al.* Identification of protein O-glcNAcylation sites using electron transfer dissociation mass spectrometry on native peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(22): 8894-8899
- [65] Trinidad J C, Schoepfer R, Burlingame A L, *et al.* N- and O-glycosylation in the murine synaptosome. *Mol Cell Proteomics*, 2013, **12**(12): 3474-3488
- [66] Huang C, Harada Y, Hosomi A, *et al.* Endo- β -N-acetylglucosaminidase forms N-GlcNAc protein aggregates during ER-associated degradation in *Ngly1*-defective cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(5): 1398-1403
- [67] Harada Y, Masahara-Negishi Y, Suzuki T. Cytosolic-free oligosaccharides are predominantly generated by the degradation of dolichol-linked oligosaccharides in mammalian cells. *Glycobiology*, 2015, **25**(11): 1196-1205
- [68] Kumano M, Omichi K, Hase S. Substrate specificity of bovine liver cytosolic neutral alpha-mannosidase activated by Co^{2+} . *J Biochem*, 1996, **119**(5): 991-997
- [69] Yamashiro K, Itoh H, Yamagishi M, *et al.* Purification and characterization of neutral alpha-mannosidase from hen oviduct: studies on the activation mechanism of Co^{2+} . *J Biochem*, 1997, **122**(6): 1174-1181
- [70] Fujihira H, Masahara-Negishi Y, Tamura M, *et al.* Lethality of mice bearing a knockout of the *Ngly1*-gene is partially rescued by the additional deletion of the *Engase* gene. *PLoS Genet*, 2017, **13**(4): e1006696
- [71] Maynard J C, Fujihira H, Dolgonos G E, *et al.* Cytosolic N-GlcNAc proteins are formed by the action of endo- β -N-acetylglucosaminidase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, **30**(4): 719-724
- [72] Mueller W F, Zhu L, Tan B, *et al.* GlcNAc-Asn is a biomarker for *NGLY1* deficiency. *J Biochem*, 2022, **171**(2): 177-186
- [73] Chantret I, Fasseu M, Zaoui K, *et al.* Identification of roles for peptide: N-glycanase and endo-beta-N-acetylglucosaminidase (*Engase1p*) during protein N-glycosylation in human HepG2 cells. *PLoS One*, 2010, **5**(7): e11734
- [74] Relic B, Charlier E, Deroyer C, *et al.* Serum starvation raises turnover of phosphorylated p62/SQSTM1 (Serine 349), reveals expression of proteasome and N-glycanase1 interactive protein RAD23B and sensitizes human synovial fibroblasts to BAY 11-7085-induced cell death. *Oncotarget*, 2018, **9**(88): 35830-35843
- [75] Fushuku N, Muramatsu H, Uezono M M, *et al.* A new endo-beta-galactosidase releasing Gal alpha 1-3Gal from carbohydrate moieties of glycoproteins and from a glycolipid. *J Biol Chem*, 1987, **262**(21): 10086-10092
- [76] Watanabe S, Misawa M, Matsuzaki T, *et al.* A novel glycosylation signal regulates transforming growth factor beta receptors as evidenced by endo-beta-galactosidase C expression in rodent cells. *Glycobiology*, 2011, **21**(4): 482-492
- [77] Huflejt M E, Vuskovic M, Vasiliu D, *et al.* Anti-carbohydrate antibodies of normal sera: findings, surprises and challenges. *Mol Immunol*, 2009, **46**(15): 3037-3049
- [78] Watanabe S, Haraguchi S, Nakamura S, *et al.* Novel cancer vaccination system based on human endo-B-N-acetylglucosaminidase gene delivery. *J Glycobiol*, 2014, **3**(1): 100106
- [79] McGuire M K, Meehan C L, McGuire M A, *et al.* What's normal? Oligosaccharide concentrations and profiles in milk produced by healthy women vary geographically. *Am J Clin Nutr*, 2017, **105**(5): 1086-1100
- [80] Cheng Y J, Yeung C Y. Recent advance in infant nutrition: human milk oligosaccharides. *Pediatr Neonatol*, 2021, **62**(4): 347-353
- [81] Li J, Bi Y, Zheng Y, Cao C, *et al.* Development of high-throughput UPLC-MS/MS using multiple reaction monitoring for quantitation of complex human milk oligosaccharides and application to large population survey of secretor status and Lewis blood group. *Food Chem*, 2022, **397**: 133750
- [82] Frese S A, Hutton A A, Contreras L N, *et al.* Persistence of supplemented *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* EVC001 in breastfed infants. *mSphere*, 2017, **2**(6): e00501-17
- [83] Duman H, Kaplan M, Arslan A, *et al.* Potential applications of endo- β -N-acetylglucosaminidases from *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis* in designing value-added, next-generation infant formulas. *Front Nutr*, 2021, **8**: 646275
- [84] Wang J, Chen M S, Wang R S, *et al.* Current advances in structure-function relationships and dose-dependent effects of human milk oligosaccharides. *J Agric Food Chem*, 2022, **70**(21): 6328-6353
- [85] Duar R M, Henrick B M, Casaburi G, *et al.* Integrating the ecosystem services framework to define dysbiosis of the breastfed infant Gut: the role of *B. infantis* and human milk oligosaccharides. *Front Nutr*, 2020, **7**: 33
- [86] Ma J, Li Z, Zhang W, *et al.* Comparison of gut microbiota in exclusively breast-fed and formula-fed babies: a study of 91 term infants. *Sci Rep*, 2020, **10**(1): 15792
- [87] Karav S, Parc A L, de Moura Bell J M, *et al.* Oligosaccharides

- released from milk glycoproteins are selective growth substrates for infant-associated *Bifidobacteria*. *Appl Environ Microbiol*, 2016, **82**(12): 3622-3630
- [88] Karav S, Casaburi G, Arslan A, *et al*. N-glycans from human milk glycoproteins are selectively released by an infant gut symbiont *in vivo*. *J Funct Foods*, 2019, **61**: 103485
- [89] Karav S, Parc A L, de Moura Bell J M, *et al*. Kinetic characterization of a novel endo- β -N-acetylglucosaminidase on concentrated bovine colostrum whey to release bioactive glycans. *Enzyme Microb Technol*, 2015, **77**: 46-53
- [90] Bunyatratchata A, Parc A L, de Moura Bell J M L N, *et al*. Release of bifidogenic N-glycans from native bovine colostrum proteins by an endo- β -N-acetylglucosaminidase. *Enzyme Microb Technol*, 2023, **162**: 110138
- [91] Brouwer S, Rivera-Hernandez T, Curren B F, *et al*. Pathogenesis, epidemiology and control of Group A *Streptococcus infection*. *Nat Rev Microbiol*, 2023, **21**(7): 431-447
- [92] Indraratna A D, Everest-Dass A, Skropeta D, *et al*. The exploitation of human glycans by Group A *Streptococcus*. *FEMS Microbiol Rev*, 2022, **46**(3): fuac001
- [93] Collin M, Svensson M D, Sjöholm A G, *et al*. EndoS and SpeB from *Streptococcus pyogenes* inhibit immunoglobulin-mediated opsonophagocytosis. *Infect Immun*, 2002, **70**(12): 6646-6651
- [94] Trastoy B, Du J J, Cifuentes J O, *et al*. Mechanism of antibody-specific deglycosylation and immune evasion by *Streptococcal* IgG-specific endoglycosidases. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 1705
- [95] Keffeler E C, Iyer V S, Henderson A J, *et al*. Activity of CcpA-regulated GH18 family glycosyl hydrolases that contributes to nutrient acquisition and fitness in *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*, 2021, **89**(11): e0034321
- [96] García-Alija M, Du J J, Ordóñez I, *et al*. Mechanism of cooperative N-glycan processing by the multi-modular endoglycosidase EndoE. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 1137
- [97] Ma J, Zhang Z, Pan Z, *et al*. *Streptococcus suis* uptakes carbohydrate source from host glycoproteins by N-glycans degradation system for optimal survival and full virulence during infection. *Pathogens*, 2020, **9**(5): 387
- [98] Robb M, Hobbs J K, Woodiga S A, *et al*. Molecular characterization of N-glycan degradation and transport in *Streptococcus pneumoniae* and its contribution to virulence. *PLoS Pathog*, 2017, **13**(1): e1006090
- [99] Makimura Y, Watanabe S, Suzuki T, *et al*. Chemoenzymatic synthesis and application of a sialoglycopolymer with a chitosan backbone as a potent inhibitor of human influenza virus hemagglutination. *Carbohydr Res*, 2006, **341**(11): 1803-1808
- [100] Becker R R, Halbrook J L, Hirs C H. Isolation and characterization of ovine ribonuclease A, B, and C from pancreatic secretion. *J Biol Chem*, 1973, **248**(22): 7826-7832
- [101] Huang W, Yang Q, Umekawa M, *et al*. *Arthrobacter* endo-beta-N-acetylglucosaminidase shows transglycosylation activity on complex-type N-glycan oxazolines: one-pot conversion of ribonuclease B to sialylated ribonuclease C. *Chembiochem*, 2010, **11**(10): 1350-1355
- [102] Priyanka P, Parsons T B, Miller A, *et al*. Chemoenzymatic synthesis of a phosphorylated glycoprotein. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, **55**(16): 5058-5061
- [103] Trastoy B, Du J J, García-Alija M, *et al*. Sculpting therapeutic monoclonal antibody N-glycans using endoglycosidases. *Curr Opin Struct Biol*, 2022, **72**: 248-259
- [104] Mimura Y, Saldova R, Mimura-Kimura Y, *et al*. Importance and monitoring of therapeutic immunoglobulin G glycosylation. *Exp Suppl*, 2021, **112**: 481-517
- [105] Li T, Li M, Hou L, *et al*. Identification and characterization of a core fucosidase from the bacterium *Elizabethkingia meningoseptica*. *J Biol Chem*, 2018, **293**(4): 1243-1258
- [106] Hou L, Li T, Chen H, *et al*. Identification and characterization of a novel glycoprotein core xylosidase from the bacterium *Elizabethkingia meningoseptica*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, **517**(2): 390-397
- [107] 郭雅萌, 侯琳琳, 沈旦枫, 等. 作用于种属差异性表位的细菌 α -半乳糖苷酶(emgalase)的鉴定和研究. *微生物与感染*, 2019, **14**(3): 153-162
- Guo Y M, Hou L L, Shen D F, *et al*. *Microorganisms and Infection*, 2019, **14**(3): 153-162
- [108] Shen D, Lu X, Li W, *et al*. Identification and characterization of an α -1,3 mannosidase from *Elizabethkingia meningoseptica* and its potential attenuation impact on allergy associated with cross-reactive carbohydrate determinant. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, **672**: 17-26
- [109] Li T, Ye J, Wang L, *et al*. Bacterial fucosidase enables the production of Bombay red blood cells. *bioRxiv*, 2019. doi: 10.1101/695213
- [110] Abuduxikuer K, Zou L, Wang L, *et al*. Novel *NGLY1* gene variants in Chinese children with global developmental delay, microcephaly, hypotonia, hypertransaminasemia, alacrimia, and feeding difficulty. *J Hum Genet*, 2020, **65**(4): 387-396
- [111] Abuduxikuer K, Wang L, Zou L, *et al*. Updated clinical and glycomic features of mannosyl-oligosaccharide glucosidase deficiency: two case reports. *World J Clin Cases*, 2022, **10**(21): 7397-7408
- [112] Wang L, Liu Y, Gu Q, *et al*. Serum N-glycan markers for diagnosing significant liver fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis B patients with normal alanine aminotransferase levels. *Engineering*, 2023, **26**: 151-158
- [113] Tang F, Zhou M, Qin K, *et al*. Selective N-glycan editing on living cell surfaces to probe glycoconjugate function. *Nat Chem Biol*, 2020, **16**(7): 766-775
- [114] Katoh T, Yamamoto K. Innovative preparation of biopharmaceuticals using transglycosylation activity of microbial endoglycosidases. *J Appl Glycosci*, 2021, **68**(1): 1-9
- [115] Critcher M, O'Leary T, Huang M L. Glycoengineering: scratching the surface. *Biochem J*, 2021, **478**(4): 703-719

Endo-beta-N-acetylglucosaminidase: Possible Functions and Mechanisms*

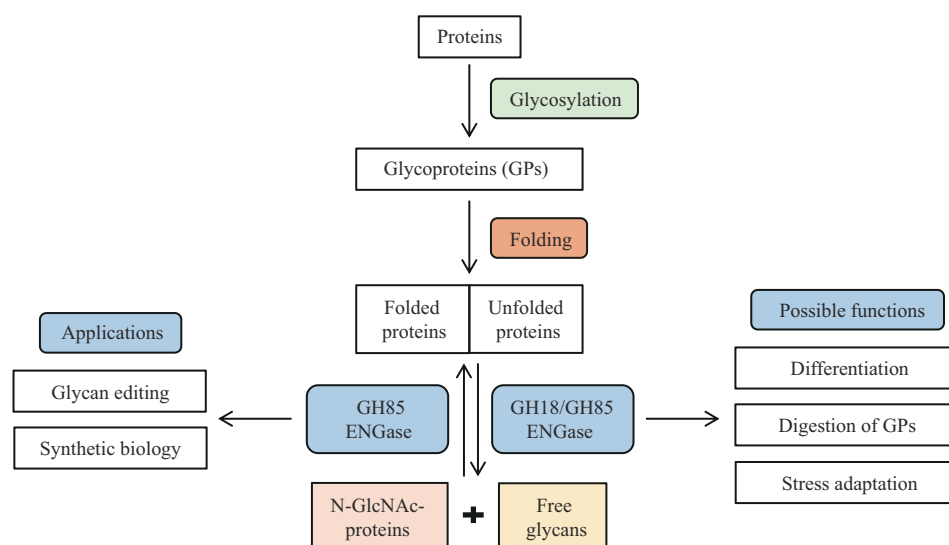
LU Xin-Rong¹⁾, TONG Yong-Liang¹⁾, KONG Wei-Li¹⁾, ZOU Lin¹⁾, SHEN Dan-Feng¹⁾,
LÜ Shao-Xian¹⁾, LIU Rui-Jie²⁾, ZHANG Shao-Xing²⁾, ZHANG Yu-Xin²⁾, HOU Lin-Lin^{3)**},
SUN Gui-Qin^{2)**}, CHEN Li^{1)**}

¹⁾Key Laboratory of Medical Molecular Virology of Ministries of Education and National Health Committee, Department of Medical Microbiology and Parasitology, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China;

²⁾School of Medical Technology and Information Engineering, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

³⁾College of Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266106, China)

Graphical abstract



Abstract Endo-beta-N-acetylglucosaminidase (ENGase) is widely distributed in various organisms. The first reported ENGase activity was detected in *Diplococcus pneumoniae* in 1971. The protein (Endo D) was purified and its peptide sequence was determined in 1974. Three ENGases (Endo F1–F3) were discovered in *Flavobacterium meningosepticum* from 1982 to 1993. After that, the activity was detected from different species of bacteria, yeast, fungal, plant, mice, human, *etc.* Multiple ENGases were detected in some species, such as *Arabidopsis thaliana* and *Trichoderma atroviride*. The first preliminary crystallographic analysis of ENGase was conducted in 1994. But to date, only a few ENGases structures have been obtained, and the structure of human

* This work was supported by a grant from National Key Research and Development Program of China (2021YFC2700801).

** Corresponding author.

CHEN Li. Tel: 86-15821138980, E-mail: lichen_bk@fudan.edu.cn

SUN Gui-Qin. Tel: 86-13868118601, E-mail: sunguiqin2001@163.com

HOU Lin-Lin. Tel: 86-15618326458, E-mail: houlinlin1225@163.com

Received: July 9, 2023 Accepted: September 18, 2023

ENGase is still missing. The currently identified ENGases were distributed in the GH18 or GH85 families in Carbohydrate-Active enZyme (CAZy) database. GH18 ENGase only has hydrolytic activity, but GH85 ENGase has both hydrolytic and transglycosylation activity. Although ENGases of the two families have similar (β/α)8-TIM barrel structures, the active sites are slightly different. ENGase is an effective tool for glycan detection and glycan editing. Biochemically, ENGase can specifically hydrolyze β -1,4 glycosidic bond between the two N-acetylglucosamines (GlcNAc) on core pentasaccharide presented on glycopeptides and/or glycoproteins. Different ENGases may have different substrate specificity. The hydrolysis products are oligosaccharide chains and a GlcNAc or glycopeptides or glycoproteins with a GlcNAc. Conditionally, it can use the two products to produce a new glycopeptides or glycoprotein. Although ENGase is a common presentation in cell, its biological function remains unclear. Accumulated evidences demonstrated that ENGase is a none essential gene for living and a key regulator for differentiation. No ENGase gene was detected in the genomes of *Saccharomyces cerevisiae* and three other yeast species. Its expression was extremely low in lung. As glycoproteins are not produced by prokaryotic cells, a role for nutrition and/or microbial-host interaction was predicted for bacterium produced enzymes. In the embryonic lethality phenotype of the *Ngly1*-deficient mice can be partially rescued by *Engase* knockout, suggesting down regulation of *Engase* might be a solution for stress induced adaptation. Potential impacts of ENGase regulation on health and disease were presented. Rabeprazole, a drug used for stomach pain as a proton inhibitor, was identified as an inhibitor for ENGase. ENGases have been applied *in vitro* to produce antibodies with a designated glycan. The two step reactions were achieved by a pair of ENGase dominated for hydrolysis of substrate glycoprotein and synthesis of new glycoprotein with a free glycan of designed structure, respectively. In addition, ENGase was also been used in cell surface glycan editing. New application scenarios and new detection methods for glycobiological engineering are quickly opened up by the two functions of ENGase, especially in antibody remodeling and antibody drug conjugates. The discovery, distribution, structure property, enzymatic characteristics and recent researches in topical model organisms of ENGase were reviewed in this paper. Possible biological functions and mechanisms of ENGase, including differentiation, digestion of glycoproteins for nutrition and stress responding were hypothesised. In addition, the role of ENGase in glycan editing and synthetic biology was discussed. We hope this paper may provide insights for ENGase research and lay a solid foundation for applied and translational glycomics.

Key words ENGase, N-glycosylation, free oligosaccharides (fOSs), glycan editing, glycobiology

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0268