



L-六碳糖形成机制的研究进展

陈萌^{1,2} 唐伟^{1,2} 郭正彦¹ 陈义华^{*1,2}

1 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100101

2 中国科学院大学 北京 100049

摘要: 糖及其衍生物在许多初级或次级代谢过程中发挥着重要作用。糖结构与功能的多样性和糖在疾病诊断与治疗中的重要性推动了糖生物学的快速发展。D型糖,尤其是D-六碳糖在糖中占据着主导地位, L-六碳糖也是许多重要糖蛋白复合物、多糖及抗生素的组成成分。了解L-六碳糖的形成机制有助于理性改造糖的结构并开发其应用价值。L-六碳糖通常由3,5位差向异构酶或5位差向异构酶催化D-六碳糖的C5位异构化形成,这种转变赋予了糖在构型上的多样性,并在许多天然产物中起决定生物活性的作用。对3,5位差向异构酶和5位差向异构酶的功能及晶体结构的研究揭示了L-六碳糖的形成机制。本文综述了L-六碳糖形成过程中不同类型的3,5-位差向异构酶和5-位差向异构酶的催化机制,揭示L-六碳糖在生理和医药领域的重要意义。

关键词: L-六碳糖, 生物合成, 差向异构酶, 催化机制

Advances in the formation mechanisms of L-hexoses

CHEN Meng^{1,2} TANG Wei^{1,2} GUO Zheng-Yan¹ CHEN Yi-Hua^{*1,2}

1 State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Saccharides and their derivatives play prominent roles in many primary and secondary metabolic processes. The diversity of their structures and the significance of sugars in diagnosis and treatment of diseases have promoted the fast development of glycobiology. D-sugars, especially D-hexoses have dominated the carbohydrates region, L-hexoses yet are also frequently observed in some important glycoprotein complexes, polysaccharides and antibiotics. Understanding the formation mechanisms of L-hexoses allow rational manipulation of sugar skeletons and further exploration of their applications. L-hexose is usually generated through epimerization of D-hexose by 3,5-epimerase or 5-epimerase. This transformation expands the diversity of sugar configurations and influences the bioactivities of many natural products. The functional and crystallographic studies of 3,5-epimerases and 5-epimerases have provided profound insights into the formation mechanisms of L-hexoses. In this paper, we summarize the catalytic mechanisms of different 3,5-epimerases and 5-epimerases for L-hexose formation. The physiological importance and biomedical prospects of L-hexoses are also discussed.

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31670032, 31870043)

***Corresponding author:** Tel: 86-10-64806121; E-mail: chenjihua@im.ac.cn

Received: 21-01-2019; **Accepted:** 14-03-2019; **Published online:** 24-04-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31670032, 31870043)

***通信作者:** Tel: 010-64806121; E-mail: chenjihua@im.ac.cn

收稿日期: 2019-01-21; **接受日期:** 2019-03-14; **网络首发日期:** 2019-04-24

Keywords: L-hexose, Biosynthesis, Epimerase, Catalytic mechanism

糖普遍存在于生物细胞中,在能量代谢、维护细胞完整性、分子识别、病原毒力、分子防御及信号信息存储等方面起着重要作用^[1-5]。例如在胃癌或大肠癌中,蛋白糖基化异常通常被认为是疾病恶性转化的标志^[6-7]。病毒感染的启动通常涉及对特定细胞表面蛋白糖表型的识别^[8]。同样地,致病菌和宿主之间的糖相互作用在感染的所有阶段都发挥着至关重要的作用^[9]。许多细菌利用糖基化的小分子作为化学武器获得选择性优势,或作为信号分子进行种内和种间信息传递^[2,5,10]。这些糖基化的小分子中有相当一部分在临床上用于治疗细菌和真菌感染、癌症及其他疾病。例如,用于治疗细菌感染的万古霉素,治疗真菌感染的两性霉素以及抗

肿瘤药物阿霉素等^[11]。上述研究成果促进了糖生物学的发展,推动人们去研究糖结构和功能的复杂性,为新型诊断方法、治疗策略和药物开发提供了灵感。

自然界中的糖主要是以 D 型存在,尤其 D-六碳糖的比例最高,但 L-六碳糖也广泛存在,在代谢中发挥了重要的生理功能。代谢中的部分 L-六碳糖如图 1 所示。来源于植物的 GDP-L-半乳糖(1)及 GDP-L-古洛糖(2)是维生素 C 生物合成的前体^[12-13]。L-鼠李糖(3)是细胞壁的主要成分鼠甘半乳糖醛酸的生物合成所必需的,对植物生长至关重要^[14];而源于细菌的 L-鼠李糖是细胞壁脂多糖核心寡糖和 O 抗原以及荚膜多糖的重要成分,与其

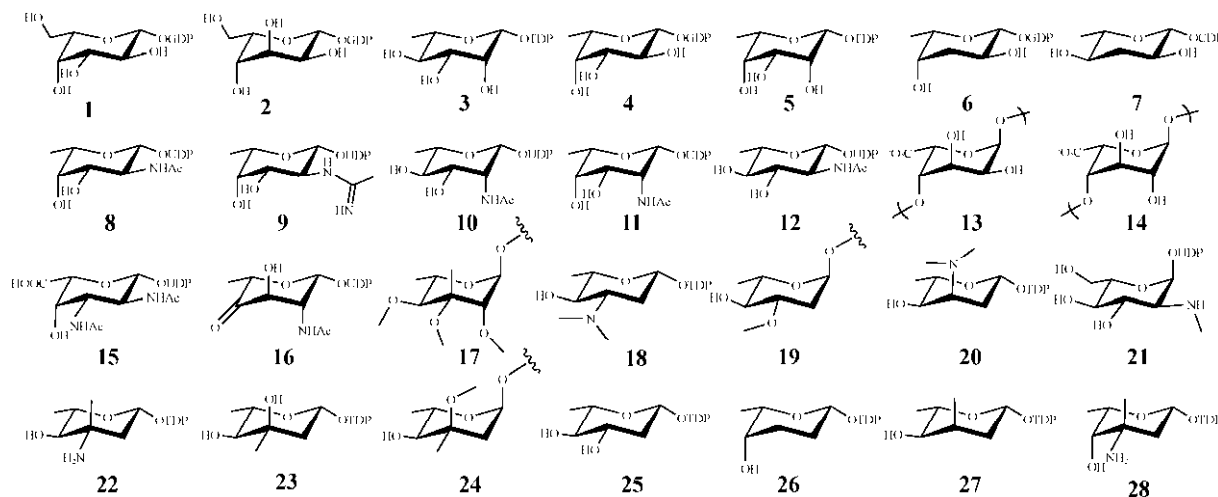


图 1 代谢中的部分 L-六碳糖

Figure 1 L-hexoses involved in metabolism

注: GDP-L-半乳糖(1); GDP-L-古洛糖(2); TDP-L-鼠李糖(3); GDP-L-岩藻糖(4); TDP-6-脱氧-L-塔洛糖(5); GDP-L-可立糖(6); CDP-L-蛔糖(7); UDP-2-乙酰胺-2,6-二脱氧-L-半乳糖(8); UDP-2-乙酰胺亚胺-2,6-二脱氧-L-半乳糖(9); UDP-2-乙酰胺-2,6-二脱氧-L-鼠李糖(10); UDP-2-乙酰胺-2,6-二脱氧-L-塔洛糖(11); UDP-2-乙酰胺-2,6-二脱氧-L-葡萄糖(12); L-古洛糖醛酸(13); L-艾杜糖醛酸(14); UDP-2,3-二乙酰胺-L-半乳糖醛酸(15); UDP-4-酮-6-脱氧-L-艾杜糖胺(16); L-诺加糖(17); TDP-L-诺加霉胺(18); L-齐墩果糖(19); TDP-L-巨霉胺(20); UDP-N-甲基-L-葡萄糖胺(21); TDP-L-异构化万古霉素(22); TDP-L-碳霉糖(23); L-红霉支糖(24); TDP-L-橄榄糖(25); TDP-L-玫红糖(26); TDP-L-洋地黄毒糖(27); TDP-L-万古霉胺(28)。

Note: GDP-L-galactose (1); GDP-L-gulose (2); TDP-L-rhamnose (3); GDP-L-fucose (4); TDP-6-deoxy-L-talose (5); GDP-L-colitose (6); CDP-L-ascarylose (7); UDP-2-acetamido-2,6-dideoxy-L-galactose (8); UDP-2-acetimidoylamino-2,6-dideoxy-L-galactose (9); UDP-2-acetamido-2,6-dideoxy-L-rhamnose (10); UDP-2-acetamido-2,6-dideoxy-L-talose (11); UDP-2-acetamido-2,6-dideoxy-L-glucose (12); L-guluronate (13); L-iduronic acid (14); UDP-2,3-diacetamido-2,3-dideoxy-L-galacturonic acid (15); UDP-4-keto-6-deoxy-L-IdoNAc (16); L-nogalose (17); TDP-L-nogalamine (18); TDP-L-oleandrose (19); TDP-L-megosamine (20); UDP-N-methyl-L-glucosamine (21); TDP-L-epivancosamine (22); TDP-L-mycarose (23); L-cladinose (24); TDP-L-olivose (25); TDP-L-rhodinose (26); TDP-L-digitoxose (27); TDP-L-vancosamine (28).

生存及致病力密切相关^[15-16]；真菌中含 L-鼠李糖的多糖直接影响宿主-病原体的相互作用，如真菌的黏附、识别、毒力及生物膜形成^[17-18]。L-岩藻糖(4)是血型抗原、细胞表面抗原、多种细菌的荚膜多糖和脂多糖等的重要组成部分，与疾病密切相关。同时，它的生物合成对一些寄生虫的生命周期至关重要^[19-21]。另外，图 1 所示的 L-六碳糖 5-16 主要发现于细菌的荚膜多糖和脂多糖中，作为 O 抗原或多糖的组成部分对菌体感染宿主起着重要的作用^[22]。图 1 所列的其它 L-六碳糖发现于细菌天然产物中。由于糖在结构上的多样性和特殊性，化合物上的糖不仅可以扩展天然产物的化学多样性，还会显著影响化合物的药理和药代动力学特性，如溶解度、分布及代谢稳定性等^[2,10]。由此可见，糖的结构改变已成为一种提高天然产物生物活性的可行策略。目前大约超过 20% 的细菌天然产物是糖基化的，其中许多糖单元是 L-六碳糖，如万古霉素类化合物 Chloroeremomycin 含有 L-Epivancosamine (22)，泰乐菌素含有 L-碳霉糖(23)，红霉素含有 L-红霉支糖(24)等^[23]。特别指出的是，在大环内酯、多肽和氨基糖苷类抗生素中，L-六碳糖的缺失直接导致生物活性的显著降低甚至丧失^[10,24]。

鉴于 L-六碳糖的重要生物功能及应用价值，对其生物合成展开研究十分必要。六碳糖的 D、L 构型实质上是 C5 位立体化学构型的改变，目前已研究清楚的 L-六碳糖是对应的 D-六碳糖通过 3,5 位或 5 位差向异构酶催化转变而来。已报道的 30 多种糖的差向异构酶催化机制可分为 5 种：去质子化/再质子化、酮基中间体、碳碳键裂解、核苷酸消除/再形成、异头碳互变。其中 3,5 位和 5 位差向异构酶的催化机制均为去质子化/再质子化，即需要在异构化位置的邻位碳形成酮基来降低异构化位置质子的 pKa 值以促进其去质子化，使产生的负电荷离开碳负离子转移到邻位碳的羰基氧上形成氧负离子(进一步由二价金属离子稳定)，

在异构化位置的碳与邻位碳之间形成双键使异构化位置的氧处于平面，再质子化过程中可翻转至另一侧(图 2)^[25]。但在 3,5 位及 5 位两类差向异构酶中含多种序列和结构都不同的蛋白，它们催化的具体过程也不尽相同。本文将对已发现 L-六碳糖生物合成相关的 3,5 位和 5 位差向异构酶的催化机制进行综述。

1 3,5 位差向异构酶(3,5-Epimerase)

参与 L-六碳糖生物合成的 3,5 位差向异构酶均被证实属于扩展的短链脱氢还原酶家族蛋白(Short-chain dehydrogenase/reductase, SDR)。该家族蛋白一般含有一个用来结合 NAD(P)(H)的 Rossmann 折叠和保守的催化活性氨基酸位点：天冬酰胺-丝氨酸-酪氨酸-赖氨酸(N-S-Y-K)四联体^[26-27]。SDR 家族差向异构酶的催化机制都是去质子化/再质子化，但每种酶催化的活性氨基酸残基和具体催化过程各不相同。

1.1 鸟苷二磷酸-甘露糖-3,5 位差向异构酶(GDP-D-mannose-3,5-epimerase, GME)

GME 存在于植物体中。它是维生素 C 生物合成途径中非常关键的酶，也参与到植物应激反应对甲基茉莉酸酯的应答中^[13,28]。GME 催化由 GDP-D-甘露糖(29)到 GDP-L-半乳糖(1)的 C4 位氧化、C3/C5 位差向异构化和 C4 位还原四步反应(图 3A)。此外，有研究显示野生型 GME 与 29 的反应产物中，含 80% 的 GDP-4-酮-D-甘露糖(30)、15% 的 GDP-L-半乳糖(1)与 5% 的 GDP-L-古洛糖

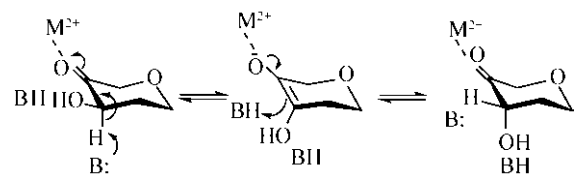
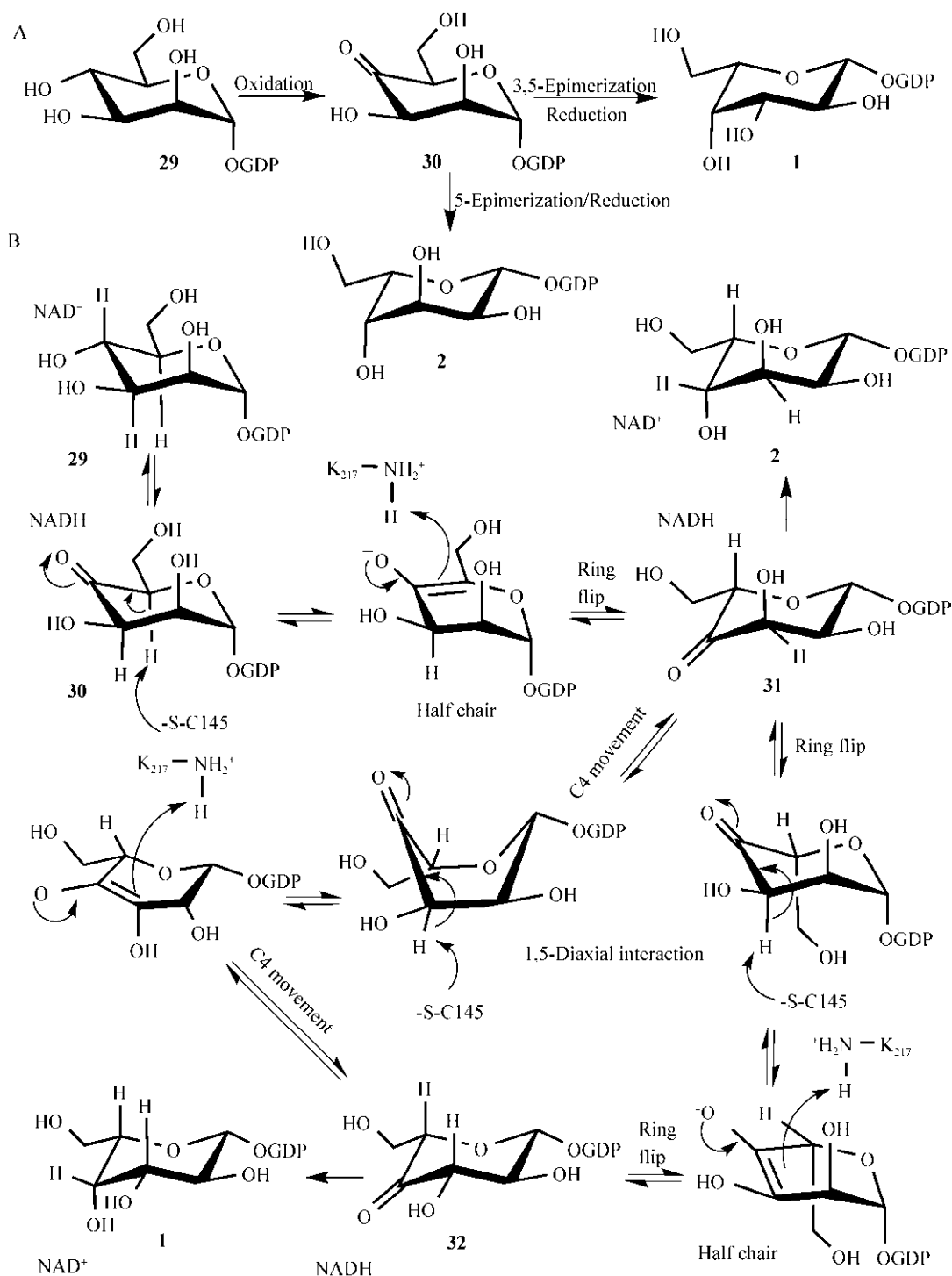


图 2 异构化的去质子化/再质子化机制^[25]

Figure 2 Deprotonation/reprotonation mechanism of epimerization^[25]

注： M^{2+} 是一个二价金属离子或带正电荷的氨基酸残基。

Note: M^{2+} is a divalent metal ion or a positive charged residue.

图3 GME催化的反应及机制^[29]Figure 3 GME catalyzed reaction and its mechanism^[29]

注: A: GME催化的反应; B: GME的催化机制. GDP-L-半乳糖(1); GDP-L-古洛糖(2); GDP-D-甘露糖(29); GDP-4-酮-D-甘露糖(30); GDP-4-酮-L-古洛糖(31); GDP-4-酮-L-半乳糖(32).

Note: A: Catalytic reaction of GME; B: Catalytic mechanism of GME. GDP-L-galactose (1); GDP-L-gulose (2); GDP-D-mannose (29); GDP-4-keto-D-mannose (30); GDP-4-keto-L-gulose (31); GDP-4-keto-L-galactose (32).

(2), GME 可识别 C5 位差向异构化产物还原 C4 位形成 **2**, 而未发现 C3 位单独异构化后的产物 GDP-D-阿卓糖, 据此推测 C5 位先于 C3 位发生差向异构化反应^[12,29]。

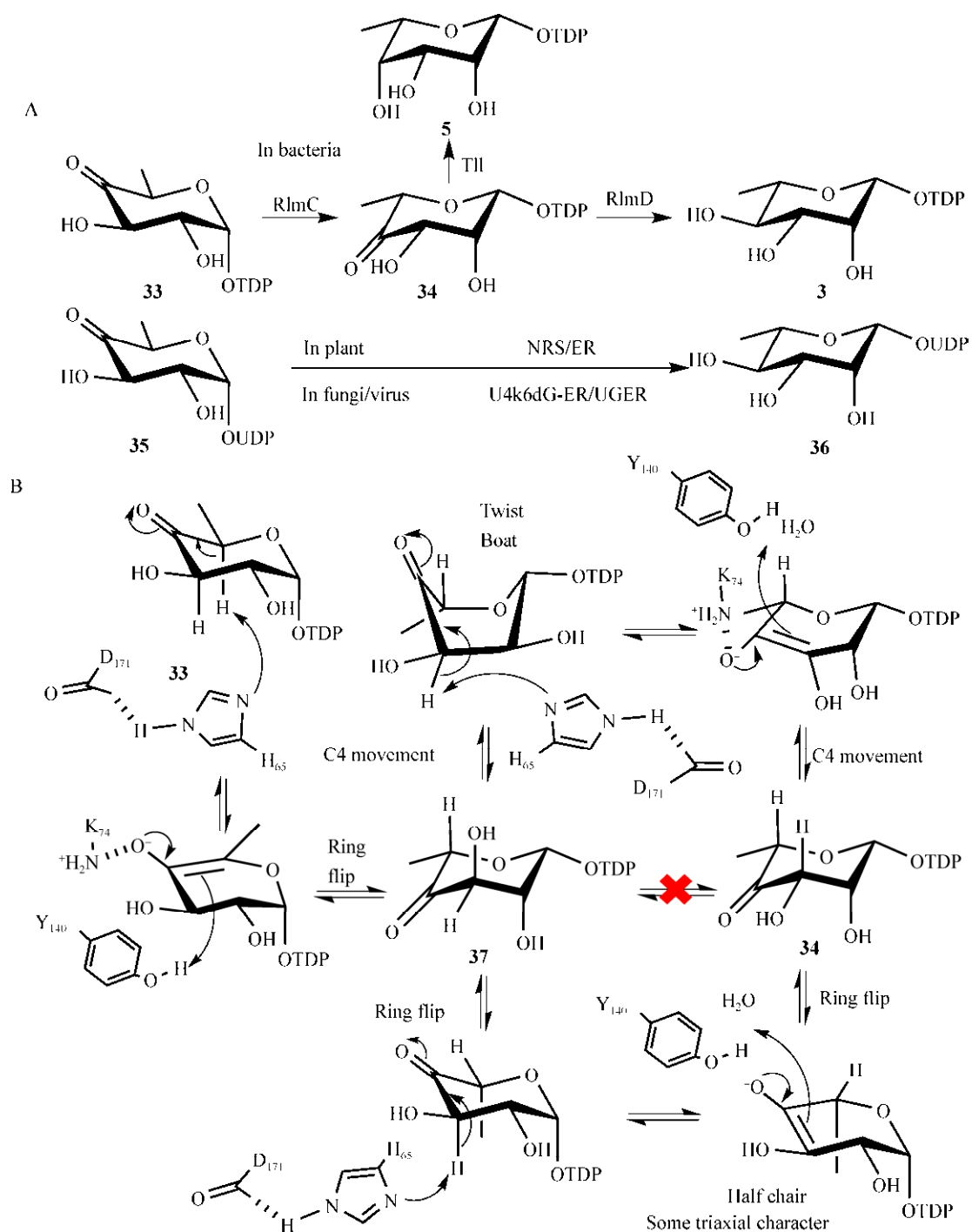
Major 等首次解析了 GME 与底物和产物复合晶体的结构, 并对其催化机理进行了分析^[29]。大量实验证明在 C3、C5 位质子交换引发差向异构化。对于类似 **29** 结构的化合物而言, C3 或 C5 位质子的 pKa 值均大于 30, 在差向异构化过程中直接发生去质子化是难以实现的, 所以在差向异构化前需对糖环进行修饰以降低质子的 pKa 值^[30]。K217A 及 C145A 突变体的酶活性完全丧失, 表明二者是 GME 重要的催化活性氨基酸残基对。根据上述实验综合推测 GME 的催化机制如图 3B 所示。首先, GME 与 NAD⁺ 结合催化 C4 位氧化脱氢生成 **30**, 此时 C3 及 C5 处于羰基的 α 位, pKa 值会降低至 18 左右。C145 作为碱在糖环 C5 位一侧进行去质子化形成烯醇式中间体, 糖环成为半椅式; K217 在糖环对侧质子化, 随后糖环翻转, 改变 C5 位构型得到中间体 GDP-4-酮-L-古洛糖 (**31**)。 **31** 可直接被还原得到 **2**, 还可进一步在 C3 位发生差向异构化, 而此时 GDP-4-酮-L-古洛糖 C3 位质子位于赤道面上, 其 pKa 值大于轴面的质子, 空间位置上不利于去质子化发生, 因此需要降低其 pKa 值。推测有两种途径使 C3-H 位于正确的方向上: 第一种可能的途径为糖环发生翻转, 翻转后 **31** 糖环上 C1 与 C6 位上基团同在轴面上, 易在 C6-O 与 C1-O 间发生双轴冲突, 与晶体结构显示不符, 另外当 C3 位差向异构化发生时, 烯醇式中间体能量非常高, 在过渡期还可能存在 1,3,5 共面, 相互作用会阻碍第二次差向异构化的发生; 第二种可能的途径为 **31** 的 C4 位从平面向上翻转, 形成一种扭船式结构, 使 C3-H 相对于 C4 位于轴面上, C4 位的羰基减少了环的张力, 避免了 C1 与 C4 位相互作用发生, 这种结构能量也很高, 但在一些糖蛋白复合物中已被发现, 因此更有可能

是酶催化的真实机制, 但现在也无法排除第一种途径发生的可能^[29,31]。

1.2 胸苷二磷酸(尿苷二磷酸)-4-酮-6-脱氧-D-葡萄糖-3,5 位差向异构酶 [TDP(UDP)-4-keto-6-deoxy-D-glucose-3,5-epimerase]

胸苷二磷酸-4-酮-6-脱氧-D-葡萄糖-3,5 位差向异构酶存在于细菌中, 命名为 RlmC (炭疽杆菌中为 RfbC), 参与 TDP-L-鼠李糖 (**3**) 和 TDP-6-脱氧-L-塔洛糖 (**5**) 生物合成过程中的 C3/C5 位差向异构化 (图 4A)。尿苷二磷酸-4-酮-6-脱氧-D-葡萄糖-3,5 位差向异构酶存在于植物 (命名为 NRS/ER 或 RhS)、真菌 (命名为 U4k6dG-ER) 及病毒 (命名为 UGER) 中, 参与 UDP-L-鼠李糖 (**36**) 生物合成中 C3/C5 位差向异构化及 C4 位还原的两步反应 (图 4A)^[32-37]。RlmC 和 NRS/ER 的催化机理已被研究清楚, 尽管二者采用类似的催化机制, 但它们催化的活性氨基酸位点却不同。RmlC 催化的活性氨基酸位点分别是 D、H、K 和 Y, 而 NRS/ER 的是 C115 和 K183。虽然真菌和病毒中该类酶的催化机制未见报道, 但预测与 RlmC 和 NRS/ER 的机制相似。由于不同细菌来源 RmlC 催化的活性氨基酸位点是相对保守的, 下面以来源铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的 RmlC 为例介绍该类酶的催化机制^[33,38-40]。

RmlC 的催化机制如图 4B 所示, 由于没有直接的证据, RmlC 催化 C3/C5 位差向异构化的顺序尚属未知, 文中将以 C5 位先异构化进行阐述。D171 增加 H65 碱性形成催化二联体促进去质子化, 形成烯醇式中间体, 再由 K74 稳定。然后, Y140 在对侧质子化, 完成第一步差向异构化得到 TDP-4-酮-6-脱氧-L-艾杜糖 (**37**)。RmlC 的第二步差向异构化过程与 GME 类似, 有糖环翻转和 C4 位翻转两种可能。H65 继续作为碱在异构化位置进行去质子化, 在此之前 H65 必须丢掉第一步差向异构化得到的质子才能继续发挥功能。根据晶体结构显示是由水分子与 H65 形成氢键来协助质

图 4 L-鼠李糖的生物合成途径与 RmlC 的催化机制^[38]**Figure 4** The biosynthetic pathway of TDP-L-rhamnose and the catalytic mechanism of RmlC^[38]

注: A: L-鼠李糖的生物合成途径; B: RmlC 的催化机制. TDP-L-鼠李糖(3); TDP-6-脱氧-L-塔洛糖(5); TDP-4-酮-6-脱氧-D-葡萄糖(33); TDP-4-酮-L-鼠李糖(34); UDP-4-酮-6-脱氧-D-葡萄糖(35); UDP-L-鼠李糖(36); TDP-4-酮-6-脱氧-L-艾杜糖(37).

Note: A: The biosynthetic pathway of L-rhamnose; B: Catalytic mechanism of RmlC. TDP-L-rhamnose (3); TDP-6-deoxy-L-talose (5); TDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose (33); TDP-4-keto-L-rhamnose (34); UDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose (35); UDP-L-rhamnose (36); TDP-4-keto-6-deoxy-L-idose (37).

子的转移。Y140 必须重新被质子化才能提供质子，在异构化位置的对侧再质子化。但是晶体结构显示在 C3 位上存在保守的水分子，可能直接提供质子参与异构化，或协助 Y140 重新获取质子以完成第二步差向异构化得到 TDP-4-酮-L-鼠李糖(34)^[38]。

1.3 鸟苷二磷酸-4-酮-6-脱氧-D-甘露糖差向异构酶/还原酶(GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose epimerase/reductase, GMER)

GMER 又名鸟苷二磷酸-L-岩藻糖合酶(GDP-D-fucose synthase, GFS)，存在于哺乳动物、植物及细菌中，是一个 NADPH 依赖的双功能酶，催化鸟苷二磷酸-4-酮-6-脱氧-D-甘露糖(38)的 C3/C5 位差向异构化和 C4 位还原，最后合成 GDP-L-岩藻糖(4)(图 5)^[41-42]。

GMER 与它的辅因子 NADP⁺及 NADPH 的复合晶体结构已经被解析，但它与底物或产物的晶体结构至今未见报道。建模模拟发现 C109 与 H179 是可能的催化活性氨基酸残基，对 C109 与 H179 分别进行点突变发现突变体的酶活性都显著

降低，说明它们对 GMER 的催化功能是至关重要的^[43-45]。GMER 的结构中包含 SDR 家族典型的 S、Y 和 K 三个保守的活性氨基酸位点，但只有 Y136 参与 C4 位还原反应^[46]。最新研究表明 GMER 的 C109S 突变体与 38 的反应产物中包含 75% 的 GDP-4-酮-6-脱氧-D-阿卓糖(39)，即 C3 位单独差向异构化的产物，可以证明 C3 位先于 C5 位发生异构化；推测 GMER 催化机制如图 5 所示，两步差向异构化反应均以 C109 和 H179 作为催化的活性氨基酸残基：首先在糖 C3 位一侧去质子化，然后在对侧进行质子化得到 39；随后以相同的机制完成 C5 位的差向异构化得到 GDP-4-酮-6-脱氧-L-半乳糖(40)，40 在 Y136 与 NADPH 共同作用下，还原 C4 位生成 4^[47]。

1.4 尿苷二磷酸-4-酮-2,3-二乙酰胺-2,3-二脱氧-D-甘露糖醛酸-3,5 位差向异构酶(UDP-4-keto-2,3-diacetamido-2,3-dideoxy-D-mannuronic acid-3,5-epimerase, WbmF)

百日咳波氏杆菌(*Bordetella pertussis*)和支气管败血波氏杆菌(*Bordetella bronchiseptica*)的 O 抗

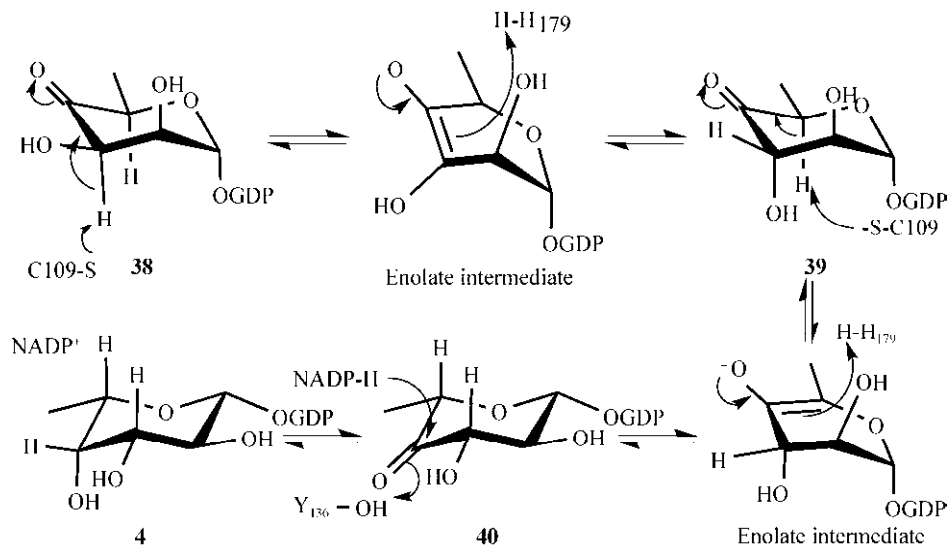


图 5 GMER 的催化机制^[47]

Figure 5 Catalytic mechanism of GMER^[47]

注：GDP-L-岩藻糖(4)；GDP-4-酮-6-脱氧-D-甘露糖(38)；GDP-4-酮-6-脱氧-D-阿卓糖(39)；GDP-4-酮-6-脱氧-L-半乳糖(40)。

Note: GDP-L-fucose (4); GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose (38); GDP-4-keto-6-deoxy-D-altrose (39); GDP-4-keto-6-deoxy-L-galactose (40).

原中均包含 12–15 个 2,3-二乙酰胺-2,3-二脱氧-L-半乳糖醛酸组分^[48]。推测 L-2,3-二乙酰胺-2,3-二脱氧-D-半乳糖醛酸的生物合成是由 *wbm* 基因簇中的 3 个相邻基因 *wbmF*、*wbmG* 和 *wbmH* 负责^[49]。由于缺乏底物,所以无法对这 3 个基因进行体外酶学的研究,但 King 等通过解析这 3 个蛋白的晶体结构预测了它们的功能和可能的催化活性氨基酸残基:WbmF 的晶体结构与典型的 SDR 类蛋白结构相似,包含与 GMER 和 GME 类似并且保守的 3,5 位差向异构酶催化的活性氨基酸位点 C133、H90 和 N213,但没有典型 SDR 类氧化还原酶功能相关的活性位点,而另外两个蛋白 WbmG 和 WbmH 中有这个活性位点;将 WbmF 与底物进行模拟,结果显示 WbmF 与底物结合位置与推测的活性位点接近,并且具有良好的几何特征,因此推测 WbmF 负责尿苷二磷酸-2,3-二乙酰胺-2,3-二脱氧-L-半乳糖醛酸(15)生物合成途径中尿苷二磷酸-4-酮-2,3-二乙酰胺-2,3-二脱氧-D-甘露糖醛酸(42) C3/C5 位的异构化(图 6)^[49-50]。

1.5 胸苷二磷酸-4-酮-6-脱氧-D-葡萄糖-3,5-位差向异构酶 (TDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose-3,5-epimerase) SnogF 和 StrM

SnogF 是诺加链霉菌(*Streptomyces nogalater*

ATCC 27451)产生的萹环类抗生素诺加霉素中 L-诺加糖及 L-诺加霉素生物合成途径中的 3,5 位差向异构酶^[51]。目前已在体外重构了 L-诺加糖及 L-诺加霉素的生物合成分流途径,把 SnogF 与已知功能的蛋白进行体外的串联反应,证实了 SnogF 可催化 33 和 47 生成 34 和 48 (图 7),进而可得到 L-诺加糖(17)和 L-诺加霉素(18)^[52-53]。

StrM 来自于浅灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*),它被预测是氨基糖苷类抗生素链霉素结构中的链霉糖(44)生物合成过程中的一个 3,5 位差向异构酶^[54]。结合对 Methymycin 生物合成的研究,可知氨基转移酶 DesI 与 StrM 催化的底物是相同的,将 *strM* 和链霉糖合酶基因 *strL* 异源表达至 *desI* 敲除菌株中,分离纯化该菌株的次级代谢产物并进行结构鉴定,证实 StrM 在体内可将 33 转化得到 34 (图 7)^[55]。

1.6 胸苷二磷酸-4-酮-2,6-二脱氧-D-葡萄糖-3,5-位差向异构酶(TDP-4-keto-2,6-dideoxy-D-glucose-3,5-epimerase) OleL

竹桃霉素是抗生链霉菌(*Streptomyces antibioticus*)产生的一种大环内酯类抗生素,L-齐墩果糖(19)是竹桃霉素结构中的重要组成部分。生物信息学预测 OleL 是 L-齐墩果糖生物合成中的 3,5 位差向异构酶^[56]。在大肠杆菌中将 *oleL* 与相

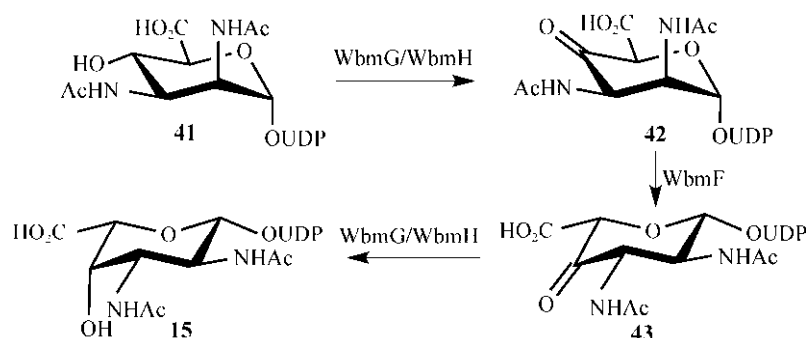


图 6 尿苷二磷酸-4-酮-2,3-二乙酰胺-2,3-二脱氧-D-甘露糖醛酸生物合成途径^[49]

Figure 6 The biosynthetic pathway of UDP-2,3-diacetamido-2,3-dideoxy-L-galacturonic acid^[49]

注:尿苷二磷酸-2,3-二乙酰胺-2,3-二脱氧-D-甘露糖醛酸(41);尿苷二磷酸-4-酮-2,3-二乙酰胺-2,3-二脱氧-D-甘露糖醛酸(42);尿苷二磷酸-4-酮-2,3-二乙酰胺-2,3-二脱氧-D-甘露糖醛酸(43);尿苷二磷酸-2,3-二乙酰胺-2,3-二脱氧-L-半乳糖醛酸(15)。

Note: UDP-2,3-diacetamido-2,3-dideoxy-D-mannuronic acid (41); UDP-4-keto-2,3-diacetamido-2,3-dideoxy-D-mannuronic acid (42); UDP-4-keto-2,3-diacetamido-2,3-dideoxy-D-galacturonic acid (43); UDP-2,3-diacetamido-2,3-dideoxy-L-galacturonic acid (15).

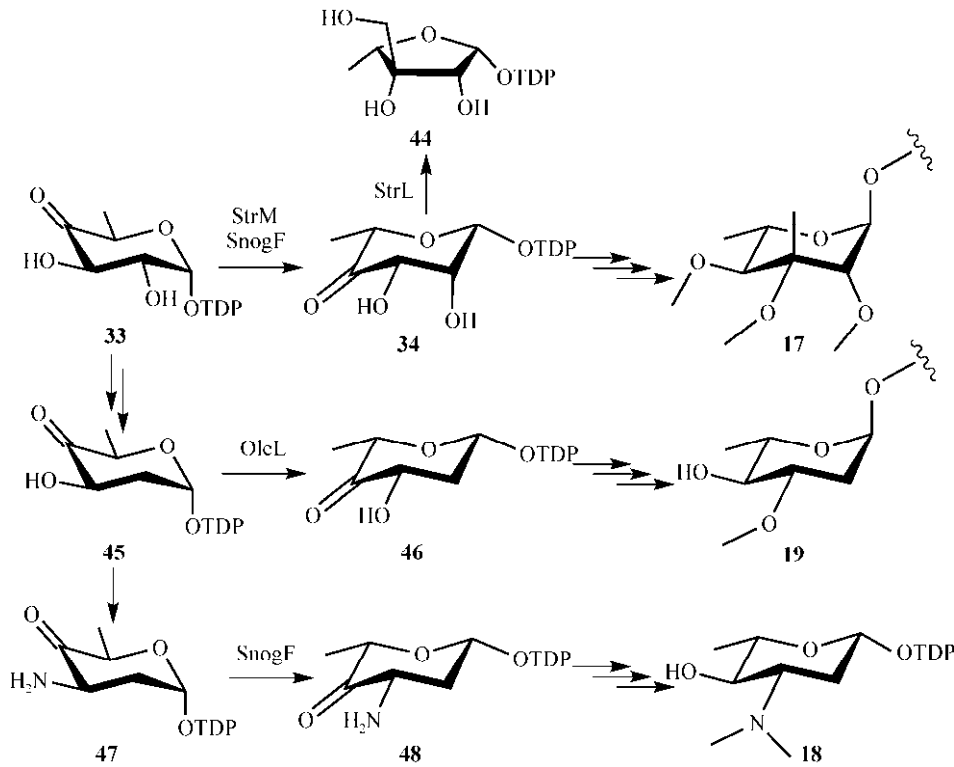


图 7 TDP-链霉菌糖、L-诺加糖、TDP-L-诺加酶胺和 L-齐墩果糖的生物合成途径

Figure 7 The biosynthetic pathways of TDP-streptose, L-nogalose, TDP-L-nogalamine and L-oleandrose

注: L-诺加糖(17); TDP-L-诺加酶胺(18); L-齐墩果糖(19); TDP-4-酮-6-脱氧-D-葡萄糖(33); TDP-4-酮-L-鼠李糖(34); TDP-链霉菌糖(44); TDP-4-酮-2,6-二脱氧-D-葡萄糖(45); TDP-4-酮-L-橄榄糖(46); TDP-4-酮-2,6-二脱氧-3-氨基-D-葡萄糖(47); TDP-4-酮-2,6-二脱氧-3-氨基-L-鼠李糖(48).

Note: L-nogalose (17); TDP-L-nogalamine (18); L-oleandrose (19); TDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose (33); TDP-4-keto-L-rhamnose (34); TDP-streptose (44); TDP-4-keto-2,6-dideoxy-D-glucose (45); TDP-4-keto-L-olivose (46); TDP-4-keto-2,6-dideoxy-3-amino-D-glucose (47); TDP-4-keto-2,6-dideoxy-3-amino-L-rhamnose (48).

关基因同时进行异源表达, 在体内证实了 OleL 可催化 45 转化为 46, 46 的 C4 位进一步被还原成为 TDP-L-橄榄糖(25), 再经后续的修饰得到 19 (图 7)。同时, 还发现 OleL 可识别 33, 催化其 3,5 位异构化得到 34, 34 进一步被还原成为 TDP-L-鼠李糖^[57]。综合上述结果证实 OleL 是一个 3,5 位差向异构酶。

2 5 位差向异构酶(5-Epimerase)

2.1 鸟苷二磷酸-L-可立糖合酶(GDP-L-colitose synthase), ColC

L-可立糖是革兰氏阴性菌脂多糖 O 抗原的组成部分^[58]。ColC 催化 GDP-L-可立糖生物合成的

中间体 GDP-4-酮-3,6-二脱氧-D-甘露糖(49)的 C5 位差向异构化及 C4 位还原, 合成 GDP-L-可立糖(6)。体外生化反应及动力学显示, 49 可被 ColC 催化生成 6。溶剂同位素交换实验也证实差向异构化的产物中引入了一个氘^[59]。NADH 是 ColC 催化必需的辅因子, ColC 对 NADH 的 C4 位具有立体选择性, 这个特征与 NADH 中氢转移的 *Pro-S* 立体特异性是一致的, 说明底物结合在 ColC 活性中心内 NADH 的 *si* 面, ColC 的这个特征与短链乙醇脱氢酶(Short-chain alcohol dehydrogenases, ADHs)家族酶的特征一致^[60]。ColC 催化的活性氨基酸位点是未知的, 但是它与 GMER 具有良好的

序列一致性和相似性, 因此推测 ColC 的催化机理可能与 GMER 类似(图 8)。催化的活性氨基酸残基在 C5 进行位去质子化后重新质子化, 最后 NADH 的 C4 位上的 *Pro-S* 氢转移给 **50**, 将 C4 位还原形成 **6**^[59]。

2.2 尿苷二磷酸-D-N-乙酰葡萄糖胺-5 位反相-4,6 位脱水酶(UDP-D-GlcNAc-5-inverting-4,6-dehydratase), PseB

伪胺酸(Pseudaminic acid, **53**)是致病空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)和幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)鞭毛蛋白中的一个翻译后修饰组分, 对细菌的运动及入侵宿主至关重要^[61-63]。来源幽门螺旋杆菌的 FlaA1 (后命名为 PseB)及空肠弯曲杆菌的 PseB 属于 SDR 家族 4,6 位脱水酶, 可将 UDP-D-GlcNAc (**51**) 转化为 UDP-4-keto-6-deoxy-L-IdoNAc (**52**), 但与典型的 SDR 家族 4,6 位脱水酶不同, PseB 在催化脱水的同时改变了 C5 位的立体构型(图 9), 因此称为 5 位反相-4,6 位脱水酶^[64-65]。

前期对 FlaA1 的体外生化研究和晶体结构等数据表明在催化过程中需要 NADP⁺ 参与底物的瞬态氧化过程, 而且其催化的活性氨基酸位点是 D132、K133、Y141 (空肠弯曲杆菌中对应 D126、K127、Y135), 进一步根据模拟计算推测

了其反应机制^[66]。Y 的功能与其他脱水酶的 Y 一致, 参与第一步 C4 位氧化(图 9, B₁)。D 与 K 突变体的酶活都显著下降, 由此推测是由于 D 和 K 与 C6-OH 形成氢键网络, 当两个催化的活性氨基酸位点突变后破坏了氢键网络, 影响后续的脱水及还原步骤^[66]。对空肠弯曲杆菌 PseB 的研究中发现 PseB 与底物类似物 UDP-6-deoxy-6-fluoro-GlcNAc 的反应效率非常低, 氟的引入破坏了氢键网络, 影响了催化活性, 还说明不饱和双键是在 C5 与 C6 位之间形成的。K 可在第二步脱水过程中作为碱参与电子传递, 使 C5 位去质子化(图 9, B₂), 但 D 的具体功能尚属未知。PseB 脱水酶的活性氨基酸位点突变后不会影响差向异构化的速率, 说明异构化不发生在 PseB 的活性中心内, 或者可能存在其他的活性氨基酸位点参与差向异构化过程, 从 PseB 的结构上无法推测出该活性氨基酸位点。溶剂同位素交换实验也证实 PseB 正逆反应的产物确实都引入一个氘, 综合对 PseB 的研究, 其机制与正向 4,6 位脱水酶类似, 但最后一步还原时, NADPH 将负氢转移给 C6, 糖的 C5 位对侧发生质子化, 改变了 C5 位立体化学构型。但是负责脱水步骤中的活性氨基酸残基 B₃ 和还原时提供质子的 B₄ 仍属未知^[65]。

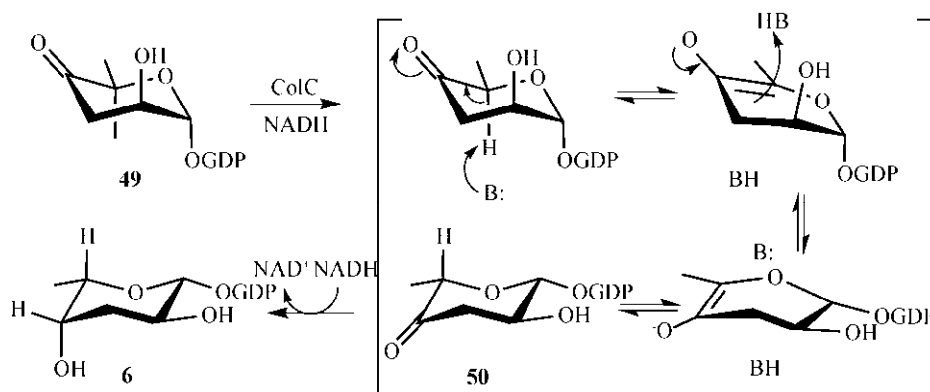


图 8 ColC 的催化机制^[59]

Figure 8 Catalytic mechanism of ColC^[59]

注: GDP-4-酮-3,6-二脱氧-D-甘露糖(**49**); GDP-4-酮-3,6-二脱氧-L-可立糖(**50**); GDP-L-可立糖(**6**)。

Note: GDP-4-keto-3,6-dideoxy-D-mannose (**49**); GDP-4-keto-3,6-dideoxy-L-colitose (**50**); GDP-L-colitose (**6**).

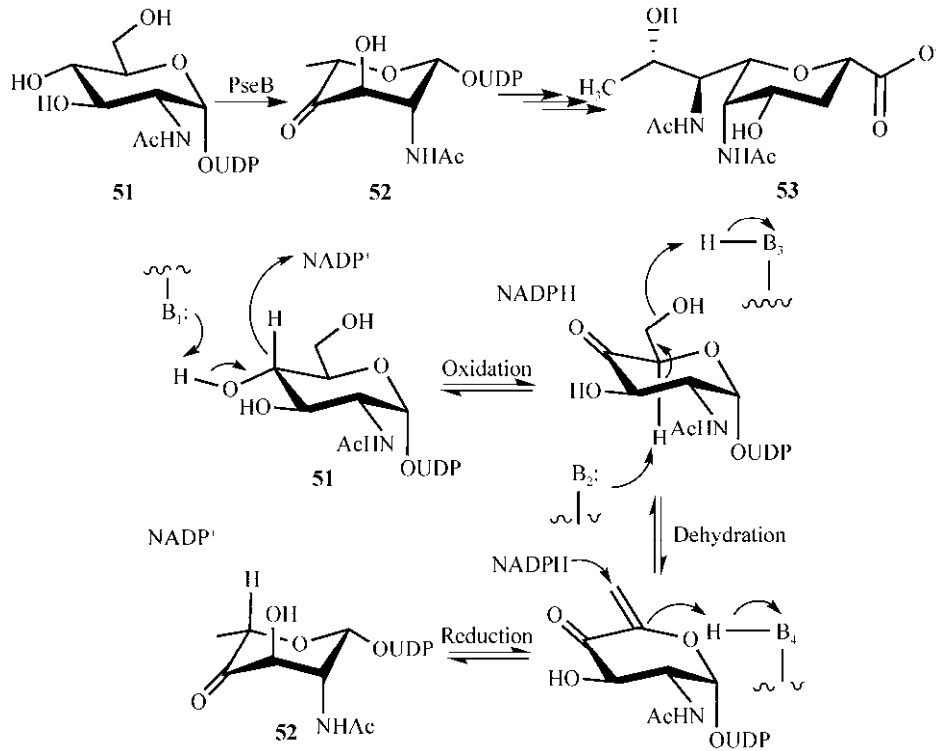


图9 PseB催化的反应及机制^[65]

Figure 9 Catalytic reaction and mechanism of PseB^[65]

注: UDP-D-葡萄糖胺(51); UDP-4-酮-6-脱氧-L-艾杜糖胺(52); 伪胺酸(53).

Note: UDP-D-glucosamine (51); UDP-4-keto-6-deoxy-L-IdoNAc (52); Pseudaminic acid (53).

与 PseB 有相似功能的酶还包括 UDP-2-乙酰胺-2,6-二脱氧-L-半乳糖(8)生物合成途径中的 WbjB (*Pseudomonas aeruginosa*)/Cap5E (*Staphylococcus aureus*)和 UDP-2-乙酰胺-2,6-二脱氧-L-葡萄糖(12)生物合成途径中的 WbvB (*Vibrio cholerae*), 它们均是 5 位-反相-4,6 位脱水酶, 推测它们可能有相同的催化机制^[22,67-68]。

2.3 D-甘露糖醛酸-5 位差向异构酶/硫酸皮肤素-差向异构酶/D-葡萄糖醛酸-5 位差向异构酶 (D-mannuronan-5-epimerase/Dermatan sulfate-epimerase 1/D-glucuronyl-5-epimerase)

D-甘露糖醛酸-5 位差向异构酶(*Azotobacter vinelandii*)、硫酸皮肤素(DS-epimerase 1)-5 位差向异构酶和 D-葡萄糖醛酸-5 位差向异构酶分别为海藻酸盐、硫酸皮肤素(软骨素)和硫酸肝素三类多糖合成过程中的 5 位差向异构酶。D-甘露糖醛

酸-5 位差向异构酶催化 D-甘露糖醛酸转变成 L-古洛糖醛酸, 后两者均催化 D-葡萄糖醛酸(D-GlcA) 转化为 L-艾杜糖醛酸(L-IdoA)^[69-75]。三种酶的催化机制本质上都是去质子化/再质子化, 但是在序列及结构上没有任何的同源性, 而且催化的活性氨基酸位点也不同^[76-77]。首先, 羧酸盐被质子化成为羧酸, 随后在糖醛酸 C5 位去质子化。该步骤的活性氨基酸位点为 D-甘露糖醛酸-5 位差向异构酶中的 Y 或 H, D-葡萄糖醛酸-5 位差向异构酶为 Y。形成的烯醇式中间体与邻近的羧基共振而被稳定, 羧基则由带正电的残基(Y 或 R)稳定; D-甘露糖醛酸-5-差向异构酶中的 H 或 D-葡萄糖醛酸-5-差向异构酶中的 Y 提供质子, 在 C5 位的对侧质子化完成异构化, 改变 C5 位的立体构型^[72,78-81]。

D-甘露糖醛酸-5 位差向异构酶机制和 D-葡萄糖醛酸-5 位差向异构酶都与裂解酶有高度的相似性^[76], 综合以上推测它们的催化机制如图 10 所示。以 DS-epimerase 1 为例, 在 D-葡萄糖醛酸-5 位差向异构酶的催化机制中, H450 在葡萄糖醛酸 C5 位进行去质子化, 在 Y261 作用下, 糖苷键发生断裂, 在 C4 和 C5 位之间形成双键。H205 在 C5 位质子化, 在 Y261 作用下重新形成糖苷键(图 10A)^[71-79]。而 D-甘露糖醛酸-5 位差向异构酶催化机制存在两种可能, 一种是糖苷键不发生断裂, C5 位质子被夺取后, 在 C5 与 C6 位间形成双键, 然后在 C5 位对侧质子化, 完成差向异构化(图 10B)。而另一种则与 D-葡萄糖醛酸-5 位差向异构酶机制类似, 糖苷键会发生断裂^[73-74]。

2.4 TyIK

TDP-L-碳霉糖(23)中的 L-碳霉糖是一个 2,6 位脱氧的 L-六碳糖, 是弗氏链霉菌(*Streptomyces*

fradiae)产生的大环内酯类抗生素泰乐菌素的关键结构及功能组成部分。该糖和它的衍生物同时也是 Olivomycin、Chromomycin 和红霉素等其它次级代谢产物的结构单元。生物信息学预测 TyIK 是泰乐菌素中 L-碳霉糖生物合成途径中的一个 5 位差向异构酶^[82]。通过原位核磁监测体外酶学反应结果显示, TyIK 与底物 54 反应生成 55, 55 经 TyIC2 还原得到 23。其中, 23 与 54 的结构已经鉴定清楚, 而 55 由于不稳定, 结构是推测的。但结果足以证明 TyIK 参与催化 54 的 C5 位的异构化(图 11)^[83]。Takahashi 等通过体外酶学将 TyIK 与相关的蛋白串联反应一锅法合成了 L-碳霉糖, 也间接证实了 TyIK 的功能是六碳糖的 5 位差向异构酶^[84]。

2.5 KijD11

TDP-L-洋地黄毒糖(27)中的 L-洋地黄毒糖也是一个 2,6 位脱氧的 L-六碳糖, 结构上与 L-碳霉

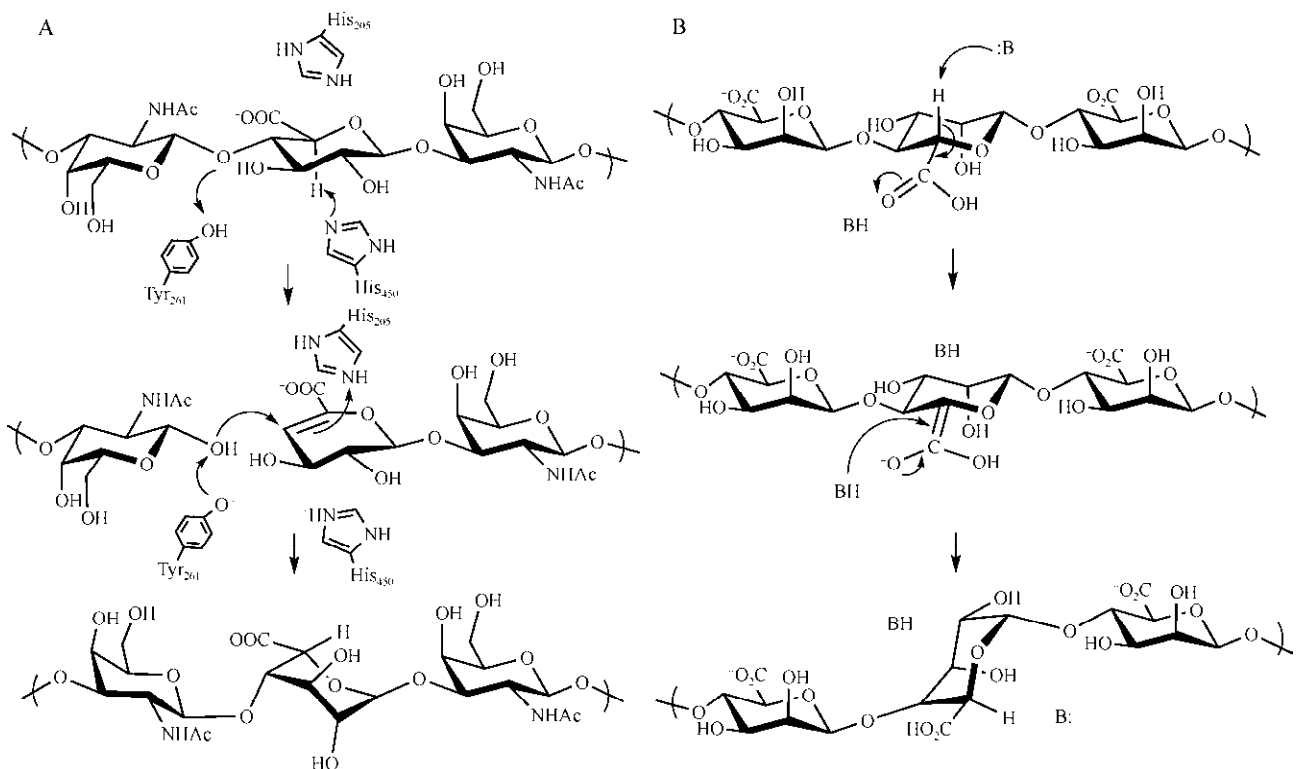


图 10 D-葡萄糖醛酸-5 位差向异构酶^[71]和 D-甘露糖醛酸-5 位差向异构酶的催化机制^[81]

Figure 10 Catalytic mechanisms of D-glucuronyl-5-epimerase^[71] and D-mannuronan-5-epimerase^[81]

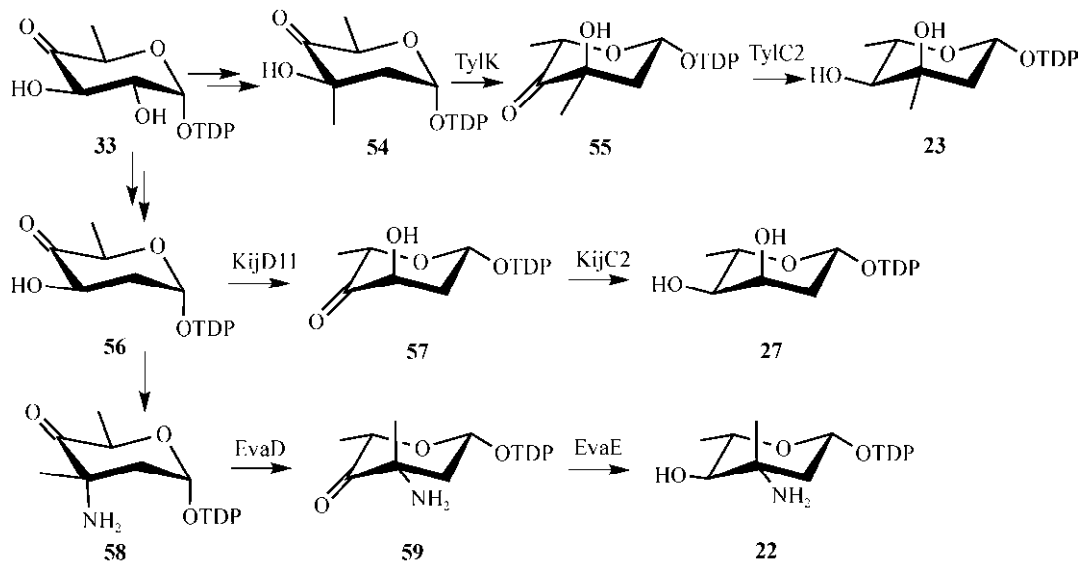


图 11 TDP-L-碳霉糖、TDP-L-洋地黄毒糖和 TDP-L-epivancosamine 的生物合成途径

Figure 11 The biosynthetic pathways of TDP-L-digitoxose, TDP-L-mycarose and TDP-L-epivancosamine

糖的差别在于 C3 位没有被甲基取代。它是 Kijanimitin、杰多霉素(Jadomycin)和 Tetrocarcin 等天然产物结构中的组成部分^[85-86]。KijD11 (*Actinomadura kijaniata*)是 27 生物合成的关键酶。Zhang 等在体外重构了 Kijanimitin 中 L-洋地黄毒糖的生物合成途径,体外酶学反应显示 KijD11 与 56 反应可生成 57, 57 进而被 KijC2 还原成为 27。57 不稳定,会发生降解,通过其降解产物反推确定了其结构^[87]。由此证实 KijD11 是 L-洋地黄毒糖生物合成途径中的一个 5 位差向异构酶。

2.6 EvaD

万古霉素类抗生素的结构中通常包含一个不寻常的 L-2,3,6-三脱氧六碳糖,例如万古霉素结构中的 L-万古霉素胺(28)和 Chloroeremomycin 结构中的 L-Epivancosamine (22)^[88]。EvaD 来自东方拟无枝酸菌(*Amycolatopsis orientalis*),是 L-Epivancosamine 生物合成途径中的一个 5 位差向异构酶。研究者通过 EvaD 晶体结构的解析及相关的生化特征的研究,证明它可以催化 58 的 C5 位差向异构化生成 59 (图 11),并且动力学及溶剂同位素交换实验均表明 EvaD 是一个 5 位差向异构酶^[89-90]。虽然催化

的底物不同,但 EvaD 与来源沙门氏菌的 RmlC 在序列及晶体结构方面都具有很高的相似性,据此推测 EvaD 的催化机制与 RmlC 中的 C5 位差向异构化过程是类似的(图 4B),并且它们催化的活性氨基酸位点也是保守的。在 EvaD 的机制中, D170 提高 H63 的 pKa 值,促进 C5 位去质子化,再由 K73 稳定形成的烯醇式中间体, Y133 在烯醇式中间体的 C5 位对侧质子化,完成 C5 位的差向异构化^[91]。

3 小结

本文对已知 L-六碳糖的生物合成过程中酶催化 L 构型的形成机制进行了综述。六碳糖 3,5 位及 5 位差向异构酶的催化机制都是去质子化/再质子化,但是这些酶催化不同结构 L-六碳糖生成的过程中采取了不同的具体过程。对 3,5 位及 5 位差向异构酶催化机理的研究为 L 型糖的生物合成研究提供了理论指导。另外,这两类酶存在的广泛性,以及它们在结构和催化机制上的多样性也赋予了它们潜在的应用价值。例如,人体内无法合成 L-鼠李糖(3),阻断 L-鼠李糖生物合成可以导致含有这一成分的脂多糖等结构不能正常合成,进而导致

某些致病菌的致病性降低,甚至丧失致病性。因此,合成L-鼠李糖的3,5位差向异构酶RmlC可以作为抗菌药物的靶点进行药物研发^[92-93]。另外,许多糖基化细菌天然产物的L-六碳糖基团往往是该化合物重要的药效基团,例如红霉素、阿维菌素等,L-六碳糖的丢失会导致化合物的生物活性显著降低,这说明了L-六碳糖在药物分子改造中的重要性。了解L-六碳糖生物合成过程及关键酶的催化机制为利用组合生物合成或合成生物学技术通过糖基修饰改造细菌天然产物提供了理论依据。

L-六碳糖广泛存在于生物的初级和次级代谢中,本文所综述的仅是少数已经通过体外研究对L构型的形成机制有所阐释的一小部分例子。还有很大一部分,尤其是天然产物中很多高度脱氧和高度修饰L-六碳糖的形成机制仍然没有得到细致的研究。阻碍相关研究开展的主要困难是相关的糖基底物难以获得。另外,某些D-六碳糖向L-六碳糖反转过程中形成的含有酮基的中间体极不稳定,也阻碍了L-六碳糖形成机制的研究。在当前检测条件下很难快速准确地监测催化反应的中间过程。但是,相信随着有机合成和生物合成研究手段的进步与检测技术的不断发展,将会促进相关研究的深入展开。另外,除了L-六碳糖,少数L-七碳糖的生物合成机制已有报道^[94],但相关酶的异构化的机制尚未研究清楚,是否存在新的催化机制有待进一步探索。

REFERENCES

- [1] Kilcoyne M, Joshi L. Carbohydrates in therapeutics[J]. Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry, 2007, 5(3): 186-197
- [2] Kren V, Martinkova L. Glycosides in medicine: "The role of glycosidic residue in biological activity"[J]. Current Medicinal Chemistry, 2001, 8(11): 1303-1328
- [3] Křen V, Řezanka T. Sweet antibiotics-the role of glycosidic residues in antibiotic and antitumor activity and their randomization[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(5): 858-889
- [4] Dwek RA. Glycobiology: toward understanding the function of sugars[J]. Chemical Reviews, 1996, 96(2): 683-720
- [5] Wrodnigg TM, Sprenger FK. Bioactive carbohydrates and recently discovered analogues as chemotherapeutics[J]. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2004, 4(4): 437-459
- [6] Ferreira JA, Magalhães A, Gomes J, et al. Protein glycosylation in gastric and colorectal cancers: toward cancer detection and targeted therapeutics[J]. Cancer Letters, 2017, 387: 32-45
- [7] Martin-Rendon E, Blake DJ. Protein glycosylation in disease: new insights into the congenital muscular dystrophies[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2003, 24(4): 178-183
- [8] Fontes-Garfias CR, Shan C, Luo HL, et al. Functional analysis of glycosylation of Zika virus envelope protein[J]. Cell Reports, 2017, 21(5): 1180-1190
- [9] Poole J, Day CJ, von Itzstein M, et al. Glycointeractions in bacterial pathogenesis[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(7): 440-452
- [10] Thorson JS, Hosted TJ Jr, Jiang JQ, et al. Natures carbohydrate chemists: the enzymatic glycosylation of bioactive bacterial metabolites[J]. Current Organic Chemistry, 2001, 5(2): 139-167
- [11] Butler MS, Robertson AAB, Cooper MA. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials[J]. Natural Product Reports, 2014, 31(11): 1612-1661
- [12] Wolucka BA, van Montagu M. GDP-mannose 3',5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the *de novo* biosynthesis of vitamin C in plants[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(48): 47483-47490
- [13] Wheeler GL, Jones MA, Smirnov N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants[J]. Nature, 1998, 393(6683): 365-369
- [14] Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling[J]. Phytochemistry, 2001, 57(6): 929-967
- [15] Ma YF, Stern RJ, Scherman MS, et al. Drug targeting *Mycobacterium tuberculosis* cell wall synthesis: genetics of dTDP-rhamnose synthetic enzymes and development of a microtiter plate-based screen for inhibitors of conversion of dTDP-glucose to dTDP-rhamnose[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, 45(5): 1407-1416
- [16] Dong C, Beis K, Giraud MF, et al. A structural perspective on the enzymes that convert dTDP-D-glucose into dTDP-L-rhamnose[J]. Biochemical Society Transactions, 2003, 31(3): 532-536
- [17] Santhanam P, Boshoven JC, Salas O, et al. Rhamnose synthase activity is required for pathogenicity of the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*[J]. Molecular Plant Pathology, 2017, 18(3): 347-362
- [18] Perfect SE, Hughes HB, O'Connell RJ, et al. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions[J]. Fungal Genetics and Biology, 1999, 27(2/3): 186-198
- [19] Becker DJ, Lowe JB. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals[J]. Glycobiology, 2003, 13(7): 41R-53R
- [20] Ma B, Simala-Grant JL, Taylor DE. Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes[J]. Glycobiology, 2006, 16(12): 158R-184R
- [21] Turnock DC, Izquierdo L, Ferguson MAJ. The *de novo* synthesis of GDP-fucose is essential for flagellar adhesion and cell growth in *Trypanosoma brucei*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(39): 28853-28863
- [22] Hao YA, Lam JS. Pathways for the biosynthesis of NDP sugars[A]//Knirel YA, Valvano MA. Bacterial Lipopolysaccharides: Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cells[M]. Vienna: Springer, 2011:

- 195-235
- [23] Elshahawi SI, Shaaban KA, Kharel MK, et al. A comprehensive review of glycosylated bacterial natural products[J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(21): 7591-7697
- [24] Méndez C, Salas JA. Altering the glycosylation pattern of bioactive compounds[J]. *Trends in Biotechnology*, 2001, 19(11): 449-456
- [25] van Overtveldt S, Verhaeghe T, Joosten HJ, et al. A structural classification of carbohydrate epimerases: from mechanistic insights to practical applications[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(8): 1814-1828
- [26] Kavanagh KL, Jörnvall H, Persson B, et al. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65(24): 3895-3906
- [27] Liu ZJ, Sun YJ, Rose J, et al. The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold[J]. *Nature Structural Biology*, 1997, 4(4): 317-326
- [28] Wolucka BA, Goossens A, Inzé D. Methyl jasmonate stimulates the *de novo* biosynthesis of vitamin C in plant cell suspensions[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(419): 2527-2538
- [29] Major LL, Wolucka BA, Naismith JH. Structure and function of GDP-mannose-3',5'-epimerase: an enzyme which performs three chemical reactions at the same active site[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(51): 18309-18320
- [30] Richard JP, Amyes TL. Proton transfer at carbon[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001, 5(6): 626-633
- [31] Vasella A, Davies GJ, Böhm M. Glycosidase mechanisms[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2002, 6(5): 619-629
- [32] Giraud MF, Leonard GA, Field RA, et al. RmlC, the third enzyme of dTDP-L-rhamnose pathway, is a new class of epimerase[J]. *Nature Structural Biology*, 2000, 7(5): 398-402
- [33] Han XD, Qian L, Zhang LW, et al. Structural and biochemical insights into nucleotide-rhamnose synthase/epimerase-reductase from *Arabidopsis thaliana*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2015, 1854(10): 1476-1486
- [34] Shornikov A, Tran H, Macias J, et al. Structure of the *Bacillus anthracis* dTDP-L-rhamnose-biosynthetic enzyme dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase (RfbC)[J]. *Acta Crystallographica Section F*, 2017, 73(12): 664-671
- [35] Yin S, Liu M, Kong JQ. Functional analyses of OcRhS1 and OcUER1 involved in UDP-L-rhamnose biosynthesis in *Ornithogalum caudatum*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 109: 536-548
- [36] Martinez V, Ingwers M, Smith J, et al. Biosynthesis of UDP-4-keto-6-deoxyglucose and UDP-rhamnose in pathogenic fungi *Magnaporthe grisea* and *Botryotinia fuckeliana*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(2): 879-892
- [37] Parakkottil Chothi M, Duncan GA, Armirotti A, et al. Identification of an L-rhamnose synthetic pathway in two nucleocytoplasmic large DNA viruses[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(17): 8829-8838
- [38] Dong CJ, Major LL, Srikanthasan V, et al. RmlC, a C3' and C5' carbohydrate epimerase, appears to operate via an intermediate with an unusual twist boat conformation[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 365(1): 146-159
- [39] Dong CJ, Major LL, Allen A, et al. High-resolution structures of RmlC from *Streptococcus suis* in complex with substrate analogs locate the active site of this class of enzyme[J]. *Structure*, 2003, 11(6): 715-723
- [40] Christendat D, Saridakis V, Dharamsi A, et al. Crystal structure of dTDP-4-keto-6-deoxy-D-hexulose 3,5-epimerase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* complexed with dTDP[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(32): 24608-24612
- [41] Rentmeister A, Hoh C, Weidner S, et al. Kinetic examination and simulation of GDP- β -L-fucose synthetase reaction using NADPH or NADH[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2004, 22(1): 49-56
- [42] Chang S, Duerr B, Serif G. An epimerase-reductase in L-fucose synthesis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263(4): 1693-1697
- [43] Rosano C, Bisso A, Izzo G, et al. Probing the catalytic mechanism of GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose epimerase/reductase by kinetic and crystallographic characterization of site-specific mutants[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 303(1): 77-91
- [44] Rizzi M, Tonetti M, Vigevani P, et al. GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose epimerase/reductase from *Escherichia coli*, a key enzyme in the biosynthesis of GDP-L-fucose, displays the structural characteristics of the RED protein homology superfamily[J]. *Structure*, 1998, 6(11): 1453-1465
- [45] Somers WS, Stahl ML, Sullivan FX. GDP-fucose synthetase from *Escherichia coli*: structure of a unique member of the short-chain dehydrogenase/reductase family that catalyzes two distinct reactions at the same active site[J]. *Structure*, 1998, 6(12): 1601-1612
- [46] Gerratana B, Cleland WW, Frey PA. Mechanistic roles of Thr134, Tyr160, and Lys164 in the reaction catalyzed by dTDP-glucose 4,6-dehydratase[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(31): 9187-9195
- [47] Lau STB, Tanner ME. Mechanism and active site residues of GDP-fucose synthase[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(51): 17593-17602
- [48] Di Fabio JL, Caroff M, Karibian D, et al. Characterization of the common antigenic lipopolysaccharide O-chains produced by *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 97(3): 275-281
- [49] Harmer NJ, King JD, Palmer CM, et al. Cloning, expression, purification and preliminary crystallographic analysis of the short-chain dehydrogenase enzymes WbmF, WbmG and WbmH from *Bordetella bronchiseptica*[J]. *Acta Crystallographica Section F*, 2007, 63(8): 711-715
- [50] King JD, Harmer NJ, Preston A, et al. Predicting protein function from structure-the roles of short-chain dehydrogenase/reductase enzymes in *Bordetella* O-antigen biosynthesis[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 374(3): 749-763
- [51] Torkkell S, Kunnari T, Palmu K, et al. The entire nogalamycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces nogalater*: characterization of a 20-kb DNA region and generation of hybrid structures[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2001, 266(2): 276-288
- [52] Siitonen V, Nji Wandji B, Törmänen AP, et al. Enzymatic synthesis of the C-glycosidic moiety of nogalamycin R[J]. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13(9): 2433-2437

- [53] Ma TL. *In vitro* reconstitution of TDP-2-deoxynogalamine[D]. Austin: Doctoral Dissertation of the University of Texas at Austin, 2014
- [54] Pissowotzki K, Mansouri K, Piepersberg W. Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: molecular structure and putative function of genes *strELMB2N*[J]. Molecular and General Genetics, 1991, 231(1): 113-123
- [55] Yamase H, Zhao LS, Liu HW. Engineering a hybrid sugar biosynthetic pathway: production of L-rhamnose and its implication on dihydrostreptose biosynthesis[J]. Journal of the American Chemical Society, 2000, 122(49): 12397-12398
- [56] Aguirrezabalaga I, Olano C, Allende N, et al. Identification and expression of genes involved in biosynthesis of L-oleandrose and its intermediate L-olivose in the oleandomycin producer *Streptomyces antibioticus*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000, 44(5): 1266-1275
- [57] Rodríguez L, Aguirrezabalaga I, Allende N, et al. Engineering deoxysugar biosynthetic pathways from antibiotic-producing microorganisms: a tool to produce novel glycosylated bioactive compounds[J]. Chemistry & Biology, 2002, 9(6): 721-729
- [58] Johnson DA, Liu HW. Deoxysugars: occurrence, genetics, and mechanisms of biosynthesis[A]//Comprehensive Natural Products Chemistry[M]. Oxford: Elsevier, 1999, 3: 311-365
- [59] Alam J, Beyer N, Liu HW. Biosynthesis of colitose: expression, purification, and mechanistic characterization of GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose-3-dehydrase (ColD) and GDP-L-colitose synthase (ColC)[J]. Biochemistry, 2004, 43(51): 16450-16460
- [60] Leriche C, He XM, Chang CWT, et al. Reversal of the apparent regioselectivity of NAD(P)H-dependent hydride transfer: the properties of the difluoromethylene group, a carbonyl mimic[J]. Journal of the American Chemical Society, 2003, 125(21): 6348-6349
- [61] Schoenhofen IC, McNally DJ, Vinogradov E, et al. Functional characterization of dehydratase/aminotransferase pairs from *Helicobacter* and *Campylobacter*: enzymes distinguishing the pseudaminic acid and bacillosamine biosynthetic pathways[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(2): 723-732
- [62] Schirm M, Soo EC, Aubry AJ, et al. Structural, genetic and functional characterization of the flagellin glycosylation process in *Helicobacter pylori*[J]. Molecular Microbiology, 2003, 48(6): 1579-1592
- [63] Josenhans C, Labigne A, Suerbaum S. Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(11): 3010-3020
- [64] Creuzenet C, Schur MJ, Li JJ, et al. FlaA1, a new bifunctional UDP-GlcNAc C₆ dehydratase/C₄ reductase from *Helicobacter pylori*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(45): 34873-34880
- [65] Morrison JP, Schoenhofen IC, Tanner ME. Mechanistic studies on PseB of pseudaminic acid biosynthesis: a UDP-N-acetylglucosamine 5-inverting-4,6-dehydratase[J]. Bioorganic Chemistry, 2008, 36(6): 312-320
- [66] Ishiyama N, Creuzenet C, Miller WL, et al. Structural studies of FlaA1 from *Helicobacter pylori* reveal the mechanism for inverting 4,6-dehydratase activity[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(34): 24489-24495
- [67] Mulrooney EF, Poon KKH, McNally DJ, et al. Biosynthesis of UDP-N-acetyl-L-fucosamine, a precursor to the biosynthesis of lipopolysaccharide in *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(20): 19535-19542
- [68] Shah BS, Ashwood HE, Harrop SJ, et al. Crystal structure of a UDP-GlcNAc epimerase for surface polysaccharide biosynthesis in *Acinetobacter baumannii*[J]. PLoS One, 2018, 13(1): e0191610
- [69] Svanem BIG, Skjåk-Bræk G, Ertesvåg H, et al. Cloning and expression of three new *Azotobacter vinelandii* genes closely related to a previously described gene family encoding mannuronan C-5-epimerases[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(1): 68-77
- [70] Ertesvåg H, Høidal HK, Hals IK, et al. A family of modular type mannuronan C-5-epimerase genes controls alginate structure in *Azotobacter vinelandii*[J]. Molecular Microbiology, 1995, 16(4): 719-731
- [71] Pacheco B, Maccarana M, Goodlett DR, et al. Identification of the active site of DS-epimerase 1 and requirement of N-glycosylation for enzyme function[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(3): 1741-1747
- [72] Li JP. Glucuronyl C5-epimerase: an enzyme converting glucuronic acid to iduronic acid in heparan sulfate/heparin biosynthesis[J]. Progress in Molecular Biology and Translational Science, 2010, 93: 59-78
- [73] Jerga A, Raychaudhuri A, Tipton PA. *Pseudomonas aeruginosa* C5-mannuronan epimerase: steady-state kinetics and characterization of the product[J]. Biochemistry, 2006, 45(2): 552-560
- [74] Jerga A, Stanley MD, Tipton PA. Chemical mechanism and specificity of the C5-mannuronan epimerase reaction[J]. Biochemistry, 2006, 45(30): 9138-9144
- [75] Rehm BH. Alginate production: precursor biosynthesis, polymerization and secretion[A]//Alginates: Biology and Applications[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009: 55-71
- [76] Gacesa P. Alginate-modifying enzymes[J]. FEBS Letters, 1987, 212(2): 199-202
- [77] Hannesson HH, Hagner-McWhirter A, Tiedemann K, et al. Biosynthesis of dermatan sulphate. Defructosylated *Escherichia coli* K4 capsular polysaccharide as a substrate for the D-glucuronyl C-5 epimerase, and an indication of a two-base reaction mechanism[J]. Biochemical Journal, 1996, 313(2): 589-596
- [78] Wolfram F, Kitova EN, Robinson H, et al. Catalytic mechanism and mode of action of the periplasmic alginate epimerase AlgG[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(9): 6006-6019
- [79] Qin Y, Ke JY, Gu X, et al. Structural and functional study of D-glucuronyl C5-epimerase[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(8): 4620-4630
- [80] Li K, Bethea HN, Liu J. Using engineered 2-O-sulfotransferase to determine the activity of heparan sulfate C₅-epimerase and its mutants[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(15): 11106-11113
- [81] Rozeboom HJ, Bjerkan TM, Kalk KH, et al. Structural and

- mutational characterization of the catalytic α -module of the mannuronan C-5-epimerase AlgE4 from *Azotobacter vinelandii*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(35): 23819-23828
- [82] Bate N, Butler AR, Smith IP, et al. The mycarose-biosynthetic genes of *Streptomyces fradiae*, producer of tylosin[J]. *Microbiology*, 2000, 146(1): 139-146
- [83] Takahashi H, Liu YN, Chen HW, et al. Biosynthesis of TDP-L-mycarose: the specificity of a single enzyme governs the outcome of the pathway[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(26): 9340-9341
- [84] Takahashi H, Liu YN, Liu HW. A two-stage one-pot enzymatic synthesis of TDP-L-mycarose from thymidine and glucose-1-phosphate[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(5): 1432-1433
- [85] Sharif EU, O'Doherty GA. Biosynthesis and total synthesis studies on the jadomycin family of natural products[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2012, 2012(11): 2095-2108
- [86] Wang LR, White RL, Vining LC. Biosynthesis of the dideoxysugar component of jadomycin B: genes in the *jad* cluster of *Streptomyces venezuelae* ISP5230 for L-digitoxose assembly and transfer to the angucycline aglycone[J]. *Microbiology*, 2002, 148(4): 1091-1103
- [87] Zhang H, White-Phillip JA, Melançon CE, et al. Elucidation of the kijanimicin gene cluster: insights into the biosynthesis of spirotronate antibiotics and nitrosugars[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(47): 14670-14683
- [88] van Wageningen AMA, Kirkpatrick PN, Williams DH, et al. Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic[J]. *Chemistry & Biology*, 1998, 5(3): 155-162
- [89] Chen HW, Thomas MG, Hubbard BK, et al. Deoxysugars in glycopeptide antibiotics: enzymatic synthesis of TDP-L-epivancosamine in chloroeremomycin biosynthesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(22): 11942-11947
- [90] Merkel AB, Temple GK, Burkart MD, et al. Purification, crystallization and preliminary structural studies of dTDP-4-keto-6-deoxy-glucose-5-epimerase (EvaD) from *Amycolatopsis orientalis*, the fourth enzyme in the dTDP-L-epivancosamine biosynthetic pathway[J]. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 2002, 58(7): 1226-1228
- [91] Merkel AB, Major LL, Errey JC, et al. The position of a key tyrosine in dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose-5-epimerase (EvaD) alters the substrate profile for this RmlC-like enzyme[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(31): 32684-32691
- [92] Kantardjieff KA, Kim CY, Naranjo C, et al. *Mycobacterium tuberculosis* RmlC epimerase (Rv3465): a promising drug-target structure in the rhamnose pathway[J]. *Acta Crystallographica Section D*, 2004, 60(5): 895-902
- [93] Babaoglu K, Page MA, Jones VC, et al. Novel inhibitors of an emerging target in *Mycobacterium tuberculosis*; substituted thiazolidinones as inhibitors of dTDP-rhamnose synthesis[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2003, 13(19): 3227-3230
- [94] McCallum M, Shaw GS, Creuzenet C. Comparison of predicted epimerases and reductases of the *Campylobacter jejuni* D-*altro*- and L-*gluco*-heptose synthesis pathways[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(27): 19569-19580