

研究成果報告（概要）

1. 研究課題

和文
微生物の特異なエンドグリコシダーゼの構造解析とその有用物質生産への応用
英文
Structural Analysis of Novel Endoglycosidase from Microorganism and Its Application for Production of Useful Compounds

2. 申請者名(代表研究者)

氏名	ローマ字表記
山本 憲二	Kenji Yamamoto
所属大学・機関名	英訳表記
石川県立大学	Ishikawa Prefectural University
研究科専攻名・部課名等	英訳表記
生物資源工学研究所	Research Institute for Bioresources and Biotechnology
役職名	英訳表記
教授	Professor

3. 共同研究者（下段 英訳表記）

氏名	所属機関名・研究科等名・役職
(氏名)	
加藤 紀彦	京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻 助教
.....
(英訳表記)	(英訳表記)
Toshihiko Katoh	Division of Integrated Life Science, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Assistant Professor

5.研究について 1/2

私たちは、これまでに微生物のエンドグリコシダーゼの特異な糖転移活性を活用することにより、タンパク質やペプチドなどに糖鎖を付加する技術を開発して来た。すなわち、土壌より単離同定したケカビ *Mucor hiemalis* が産生する endo- β -*N*-acetylglucosaminidase (Endo-M) は糖タンパク質や糖ペプチドより N-結合型糖鎖 (アスパラギン結合型糖鎖) をタンパク質やペプチドの結合部付近から切断遊離する加水分解活性を有するとともに水酸基を含む化合物を受容体として、遊離した糖鎖を水酸基に転移付加する糖転移活性を有することを見出し、その特異な活性を利用して、生理活性糖ペプチドなどのさまざまな機能性糖鎖複合体を化学-酵素合成した。さらに、Endo-M の活性中心付近のアミノ酸残基について部位特異的変異を行うことにより糖転移活性が促進される一方、加水分解活性が抑制された変異酵素を取得するとともに、糖鎖供与体として酵素反応中間体であるオキサゾリン型糖鎖を用いた場合に高い糖鎖転移能を持つ変異酵素をも取得した。本変異酵素はグライコシターゼ様の効率的な糖鎖付加を行う酵素で、本変異酵素を用いることによってタンパク質やペプチドなどの受容体に糖鎖を効率的に付加する革新的技術を開発した。このような Endo-M の多様な変異酵素による高度に効率化した糖鎖付加技術を発展させることにより、糖鎖のリモデリング (すげ替え) の技術を開発し、この技術を駆使して遺伝子組換え酵母により大量調製された組換え糖タンパク質をヒトに適応したヒト型糖鎖を持つ糖タンパク質に変換する方法を確立した。しかし、Endo-M はその変異酵素も含めて、作用し得る糖鎖の構造が限られており、多分岐構造の糖鎖などに対してはほとんど作用しない。この事実は Endo-M の糖転移活性を利用して多様な糖鎖を持つ有用な糖鎖複合体を合成することが不可能であることを示唆している。そこで、本研究ではこのような問題を克服するために Endo-M の構造を解析して変異を施すことにより、基質特異性が広い変異酵素を取得し、有用物質の生産へ応用しようとするを目的とした。

CHO などの動物細胞によって生産される糖タンパク質性の抗体医薬である免疫グロブリン G (IgG) から非還元末端に L-フコース残基が結合している N-結合型糖鎖を除去すると細胞傷害活性 (ADCC 活性) が飛躍的に高められるという事実は良く知られている。Endo-M がこのような糖鎖を加水分解することができれば有用性は飛躍的に増大するが、コアフコースを有する糖鎖に対しては全く加水分解活性を示さない。そこで、Endo-M 酵素タンパク質を結晶化してその構造解析を行い、その結果を基にして、基質が入り込む活性ポケットを大きくした変異酵素を部位特異的変異によって取得し、コアフコースを有する糖鎖に対して加水分解活性を持つように改変することを企てた。しかし、大腸菌により発現させた His-Tag を付加した精製酵素をさまざまな結晶作成用の緩衝液にて結晶の作成を検討したが結晶化には至らなかった。そこで、既に立体構造が解析され、Endo-M と同じ Glycoside hydrolase (GH) ファミリー (GH85) に属する細菌由来の酵素 Endo-A および Endo-D との活性中心付近の構造や基質特異性を比較した。すなわち、*Arthrobacter protophormiae* 由来の酵素である Endo-A は Endo-M と同じくコアフコースを有する糖鎖に対しては全く作用しないが、*Streptococcus pneumoniae* 由来の酵素である Endo-D はコアフコースを有する短い糖鎖に作用する。3つの酵素について、アミノ酸配列を比較し、Endo-A と Endo-D の X線結晶構造を比較した結果、Endo-A に基質特異性が近似している Endo-M の N-末端より 251 番目の芳香族アミノ酸であるトリプトファンが活性中心のポケットを狭めていることが推察された。そこで、この残基をアラニンやアスパラギン残基に置換した変異酵素 W251A、W251N を取得した結果、これらの酵素は L-フコースがコア部分に結合しているような N-結合型

5.研究について 2/2

糖鎖に対しても作用することを見出した。すなわち、コアフコースを有する糖鎖基質（マンノース3糖に結合したジアセチルキトビオース部分にL-フコースが α -1,6-結合したビオチン化合物、M3N2F-biotin：東京化成工業より恵与）に対する加水分解活性が Endo-M の wild type の酵素に比べて著しく高く（図1）、その活性は約350倍上昇していた（表1）。さらに、ほとんどの糖鎖がコアフコースを有する糖鎖であることが報告されている抗がん剤リツキサン（Rituxan、rituximab）をトリプシン消化してペプチド化した糖ペプチドについて W251N 変異酵素を作用し、反応液から HPLC で分離した糖鎖をMSにて構造を解析したところ、コアフコースを有する糖鎖が遊離することが明らかにされた。また、コアフコースを有する糖鎖を含むヒトラクトフェリンに対して W251N 変異酵素を作用させて、遊離した糖鎖をMSにて解析し、その構造を明らかにした。このように W251N 変異酵素は糖タンパク質のコアフコースを持つ糖鎖に対して作用することが示された。一方、W251N 変異酵素はコアフコースを持たない糖鎖に対しては非常に低い加水分解活性しか示さないことを明らかにした（表1）。

W251 変異酵素について、糖転移活性を調べたところ、グライコシターゼとの二重変異体（N175Q/W251N）と糖鎖オキサゾリン基質を供与体とした反応によって、ビオチン化した Fucosyl α 1-6GlcNAc を受容体とした糖転移反応により糖転移産物の生成が認められた。しかしながら、その生成収率は非常に低かった。

以上の結果より Endo-M の W251N 変異酵素は抗体医薬である IgG のコアフコースを持つ糖鎖に作用してこれを除くことにより、ADCC 活性を高めることができると考えられ、本変異酵素が応用面で極めて有用な酵素になり得ることが示された。

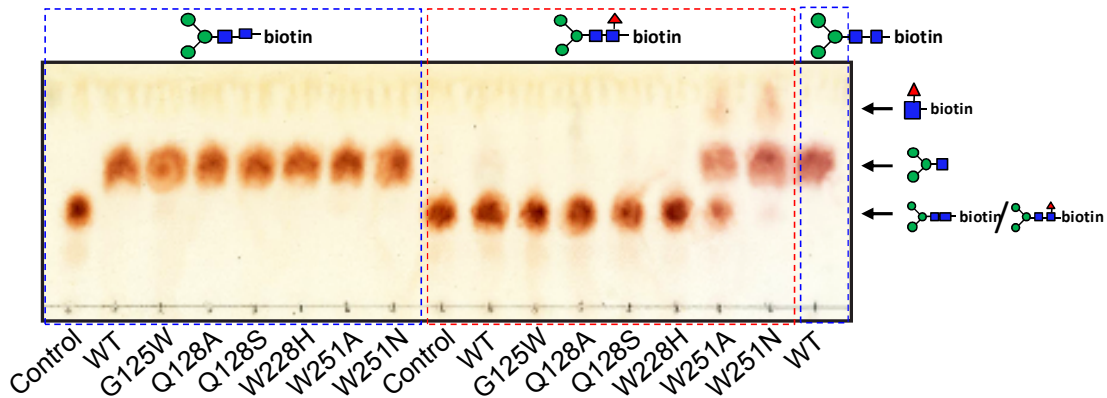


図1 さまざまな Endo-M 変異酵素によるビオチン化糖鎖基質に対する加水分解活性を示した薄層クロマトグラフィー： 反応に用いた糖鎖基質の構造を上段に示した。●：Mannose、■：N-Acetylglucosamine、▲：L-Fucose

表1 Endo-M 変異酵素によるビオチン化糖鎖基質に対する加水分解の比活性と相対活性比

Mutant	Man ₃ GlcNAc ₂ -biotin		Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc ₁ -biotin	
	Specific hydrolysis activity ^a	Relative activity ^b	Specific hydrolysis activity ^a	Relative activity ^b
	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	%	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	%
Wild type	6.49	100	0.0037	0.057
W251A	0.18	2.7	0.13	2.0
W251N	0.16	2.5	1.3	20