

平成21年 4 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19780252

研究課題名（和文） 変異酵素を用いた糖タンパク質糖鎖の効率的な合成法の開発

研究課題名（英文） Efficient synthesis of glycoprotein by using mutant enzymes.

研究代表者

藤田 清貴（FUJITA KIYOTAKA）

鹿児島大学・農学部・助教

研究者番号：20381189

研究成果の概要：

本研究ではエンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼが持つ糖タンパク質の糖鎖をすげ替える能力を変異導入により高めることを目的とし、エンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ-M(Endo-M)の N173A 変異酵素と酵素反応中間体であるオキサゾリン合成基質を組み合わせることにより、効率的な糖鎖転移方法の開発に成功した。また、エンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ-A(Endo-A)の N171G 変異酵素を用いることで、糖タンパク質への糖鎖転移活性を 10 倍高めることに成功した。本変異酵素を利用することにより、糖ペプチド及び糖タンパク質への糖鎖の導入効率を高めることができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,200,000	240,000	3,440,000

研究分野:農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：タンパク質・糖鎖工学

1. 研究開始当初の背景

| エンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ

はタンパク質に位置とアノマーを変えることなく  $\beta$ 1-4 結合で糖転移できるという特別の能力を持つ酵素である。しかし、収率が10%程度でしかないのが欠点であり、転移物が加水分解されてしまうため酵素反応を適切な時期に止める必要がある。このような反応条件設定の難しさのために利用が制限されるため、効率的な糖転移方法の確立が求められていた。そこで、変異酵素の利用および基質を改変して、効率的な糖転移方法の確立を目指した。

## 2. 研究の目的

変異を導入したエンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ-A (Endo-A) およびエンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ-M (Endo-M) を用いて、高い糖転移効率でペプチドやタンパク質に高マンノース型糖鎖および複合型糖鎖を付加させる手法の開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

Endo-A N171G 変異体および Endo-M N175Q 変異体を部位特異的変異導入法で構築し、オキサゾリン酵素反応中間体基質および、天然基質を用いて、その糖転移活性に及ぼす影響を評価した。

## 4. 研究成果

(1) *endo*- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase (Endo-A) の E173A 変異体を用いることで chemical rescue が可能であることを見いだした (図 1)。

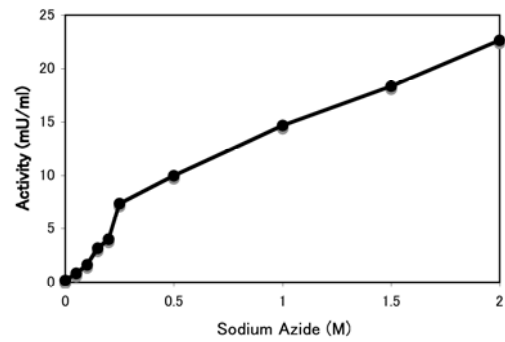


図 1, アジ化ナトリウムでの活性回復

また、生成物の同定を行ったところ、 $\text{Man}_5\text{GlcNAc-}\beta\text{-N}_3$  であることを確認した (図 2)。

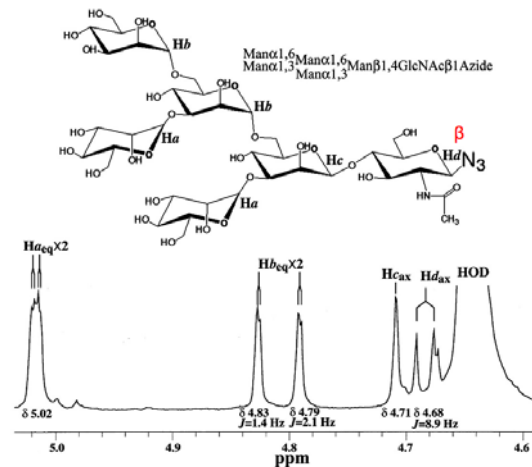


図 2,  $\text{Man}_5\text{GlcNAc-}\beta\text{-N}_3$  の同定

これにより、GH85 に属する *endo*- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase の酸-塩基触媒残基が E173 であることを初めて明らかにすることが出来た (雑誌論文 2)。本成果は、*endo*- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase の反応機構を明らかにする上で極めて重要であり、本酵素反応がオキサゾリン中間体を経て進行することが支持された。

(2) Endo-M のオキサゾリン形成に関わる N175A 変異体を用いて、オキサゾリン中間体を基質として glycosynthase 様の酵素反応を

行なうことで neoglycoconjugate の効率的な合成法の開発に成功した (雑誌論文 1)。

(3) (2) において記載した成果は、これまで糖タンパク質の糖鎖の自由なすげ替えを行なう上で障害となっていた糖転移物の分解を抑えることができる画期的な方法である。ただし、オキサゾリン基質の合成が糖転移物の効率的な合成を行う上での障害となっている。このため、オキサゾリン基質を使わずに糖転移効率を向上させることを目的に変異導入を進めた結果、Endo-A の N171G 変異酵素を用いることで、糖ペプチドに対する転移効率を大幅に高めることに成功した (図 3)。

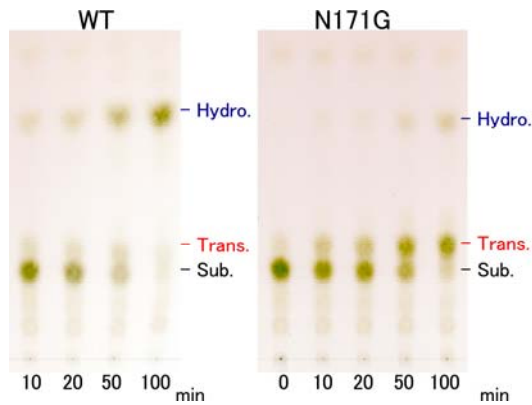


図 3, 糖ペプチドに対する転移効率

さらに、糖タンパク質への糖鎖転移活性を 10 倍高めることに成功した (図 4)。

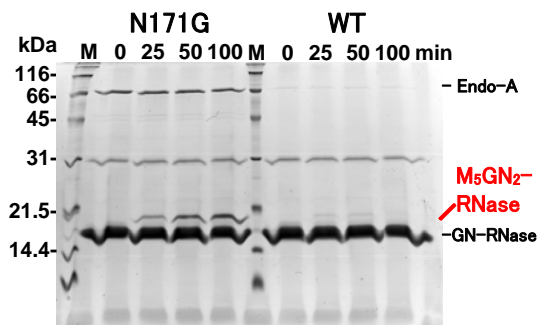


図 4, 糖タンパク質に対する転移効率

本変異体を利用することにより、糖タンパク

質の糖鎖を自由にデザインすることが可能になった (図 5、学会発表 1)。

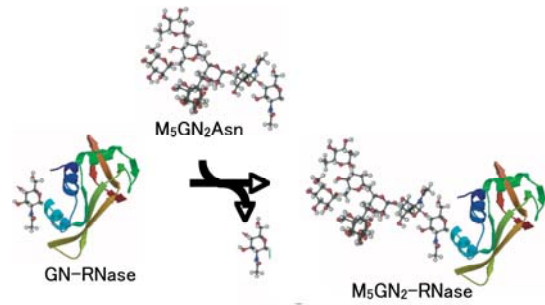


図 5, 糖タンパク質糖鎖のデザイン

本変異体をさらに改良することにより、効率的で安価な糖タンパク質糖鎖の構築法の開発につながることを期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Umekawa, M., Huang, W., Li, B., Fujita, K., Ashida, H., Wang, L. X., and Yamamoto, K.: Mutants of *Mucor hiemalis* endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase show enhanced transglycosylation and glycosynthase-like activities. *J. Biol. Chem.*, **283**, 4469-4479 (2008). (査読有)
2. Fujita, K., Sato, R., Toma, K., Kitahara, K., Suganuma, T., Yamamoto, K., and Takegawa, K.: Identification of the catalytic acid-base residue of *Arthrobacter* endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase by

chemical rescue of an inactive mutant. *J. Biochem.*, **142**, 301-306 (2007). (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

1. 藤田清貴、北原兼文、菅沼俊彦、山本憲二、竹川薫：部位特異的変異導入による endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase A(Endo-A)の糖転移効率の向上. 第 28 回日本糖質学会年会 (つくば, 2008.8.19)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤田 清貴 (FUJITA KIYOTAKA)

鹿児島大学・農学部・助教

研究者番号：20381189

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

無し