

機関番号：23303

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20380052

研究課題名（和文） 微生物のエンドグリコシダーゼの変異酵素を活用した糖鎖医薬品の開発と調製法の確立

研究課題名（英文） Development of Glyco-medicines Using Mutant Enzyme of Microbial Endoglycosidase and Establishment of Its Preparation Method

研究代表者

山本 憲二 (YAMAMOTO KENJI)

石川県立大学・生物資源環境学部・客員教授

研究者番号：70109049

研究成果の概要（和文）：

土壌より単離したカビ *Mucor hiemalis* が生産する特異的な糖鎖分解酵素(エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ)はタンパク質より加水分解した糖鎖を化合物に付加する活性(糖転移活性)を持っている。この反応を効率良く行う変異酵素を取得して、機能性を持つ糖鎖複合体の合成に用いた。すなわち、反応中間体(オキサゾリン糖鎖誘導体)を合成し、それを基質として用いた変異酵素による効率的な合成方法を開発するとともに、インフルエンザウィルス感染阻害剤などの医薬品の調製に応用した。

研究成果の概要（英文）：

The endo-β-N-acetylglucosaminidase from *Mucor hiemalis* isolated from soil sample is unique in that it can transfer *en bloc* the oligosaccharide of glycoproteins onto different acceptors, and thereby it enzymatically generates diverse glycoconjugates. We performed mutational studies to obtain the mutant of the enzyme which had significantly diminished hydrolysis activity but had a high transglycosylation activity. We have found that some mutant could efficiently exhibit transglycosylation activity using synthetic sugar oxazoline. Therefore, we used the mutant enzyme to synthesize an efficient binding inhibitor for influenza virus, which is composed of sialyloligosaccharides on chitosan. This compound showed sufficient inhibitory activity against influenza virus infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：応用微生物学、糖鎖工学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：エンドグリコシダーゼ、糖転移活性、オキサゾリン化合物、部位特異的変異酵素、化学-酵素合成、糖鎖医薬品、インフルエンザウィルス、感染阻害剤

1. 研究開始当初の背景

ウイルスや病原性細菌が細胞に接着して

感染する際や細菌が産生する細胞毒素が細胞に侵入する際に目印として最初に認識さ

れるのが宿主細胞の膜表面に存在する糖鎖である。それ故に、認識される糖鎖やそのミミック分子を含む糖鎖化合物は、感染症などの制御に有用であると考えられ、糖鎖医薬品として注目されている。

最近、遺伝子やタンパク質を任意に付加したり改変したりする技術が急激な進歩を遂げ、遺伝子工学やタンパク質工学の分野の発展は医薬品の開発や病気の治療などに大きな貢献をもたらしている。一方、遺伝子が翻訳された後の修飾過程として重要な糖鎖の付加については任意な構造の糖鎖を付加したり改変したりする有効な技術や手段は未だ充分ではない。糖鎖は核酸やタンパク質と並んで生命における「第三の鎖」と呼ばれ、糖鎖工学といわれる研究分野は遺伝子工学やタンパク質工学と並び称されるほど重要な分野と位置づけられているにもかかわらず、その技術や手段は遺伝子工学やタンパク質工学の域にはまだ達していないのが現状である。

私たちはこれまでに土壌より単離同定した糸状菌 *Mucor hiemalis* が生産するエンド型のグリコシダーゼであるエンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ（エンド-M）が強い糖転移活性を有し、糖鎖を適当な化合物（水酸基を有する化合物）に転移付加できることを見出している。本酵素の糖転移活性を利用した糖鎖の付加技術は遺伝子工学やタンパク質工学だけでは実現できない機能の付加技術として糖鎖工学をブレイクスルーする革新的技法と評価され、世界中で注目されている。本方法は、細胞内で多数の糖転移酵素（グリコシルトランスフェラーゼ）が糖ヌクレオチドを糖供与体として、小胞体とゴルジ体において数十にも及ぶ段階を経て行う糖鎖の付加反応を一つの酵素によりワンポットで行うという画期的な方法である。そ

の特異な糖転移活性を活用してヒトインフルエンザウィルスの感染阻害剤や生理活性糖ペプチドの化学-酵素合成など、さまざまな機能性糖鎖複合体を合成した。しかし、本酵素は本来、加水分解酵素であるため、糖転移反応によってひとたび生成した生成物も直ちに分解されてしまうという問題がある。エンド-Mの糖転移活性を利用する方法は、現在、糖鎖を付加する唯一の方法であり、糖鎖医薬品などを創製するためには必須の技法である。その実用化のためにはエンド-Mの酵素の改良と酵素反応の改良が不可欠である。

2. 研究の目的

上記のような背景から、糖鎖医薬品などの機能性糖鎖複合体を効率的かつ多量に合成するためには、糖転移活性が上昇し、加水分解活性が抑制されたエンド-Mの変異酵素を取得することが必要である。そこで、本研究では部位特異的変異酵素を得るとともに、酵素反応中間体を基質とした効率的な酵素反応法を開発し、それをインフルエンザウィルスの捕捉型感染阻害剤や生理活性糖ペプチドなどの機能性糖鎖複合体の多量調製法に応用するとともに、その方法の確立を研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) 部位特異的変異酵素の取得

糖転移活性が著しく上昇し、加水分解活性が著しく抑制された酵素を取得するためにエンド-Mの活性中心 (D177: 177 番目のアスパラギン酸残基) 付近のアミノ酸残基を部位特異的変異させた酵素を検索し、目的の変異酵素を取得した。

①部位特異的変異酵素 Y217F の調製：私たちは既に、エンド-Mの 217 番目のチロシン残基をフェニールアラニンに置換した変異酵

素 (Y217F) がもとの酵素と比較して糖転移活性が著しく上昇し、加水分解活性が著しく抑制された酵素であることを見出している。本変異酵素は次のようにして調製した。pET23b プラスミドベクターに繋いだエンド-Mの遺伝子を鋳型にして部位特異的変異させた遺伝子をPCRによって増幅させ、それを導入した大腸菌 BL21 (DE3) を培養して変異酵素 Y217F を発現させた後、His-Tag カラムによって精製し調製した。

②部位特異的変異酵素 N175A の調製：エンド-Mはオキサゾリン糖鎖化合物を反応中間体として、substrate assisted catalysis 機構により反応が進行することが知られている。そこで、求核残基の代わりとなるオキサゾリン中間体を基質とすることによって糖転移反応を進行させ、糖転移生成物の加水分解を抑制するように反応する変異酵素の取得を企てた。その結果、加水分解活性が低下しているにもかかわらず、反応中間体のオキサゾリン糖鎖化合物を基質とする糖転移活性は保持している変異酵素 N175A (175 番目のアスパラギン残基をアラニンに置換した酵素) を取得した。その調製は変異酵素 Y217F の調製と同様の方法によって行った。

③部位特異的変異酵素 N175Q の調製：変異酵素 N175A について、さらに saturation mutagenesis によって、より高い糖転移活性を有する変異酵素 N175Q (175 番目のアスパラギン残基をグルタミンに置換した酵素) を見出した。グライコシターゼ様の機能を持つ本変異酵素の調製は N175A と同様な方法によって行った。

(2) 反応中間体のオキサゾリン糖鎖化合物の合成

上記のように、エンド-Mはオキサゾリン糖鎖化合物を反応中間体として、substrate assisted catalysis 機構により酵素反応が進

行する。そこで、オキサゾリン糖鎖化合物を基質としてエンド-Mの糖転移反応を行うことによって糖転移生成物を効率的に生成した。オキサゾリン糖鎖化合物の多量合成は次のような方法によって行った。ニワトリ卵黄から得られるシアロ複合型糖鎖を原料として、エンド-Mを作用して得られた *N*-アセチルグルコサミン-残基のみを有する糖鎖にトリエチルアミンと 2-クロロ 1,3-ジメチルイミダゾリニウムクロリドを添加した後、ゲルろ過して、オキサゾリン糖鎖化合物を簡便に多量に化学合成した。また、高マンノース型糖鎖を持つオキサゾリン糖鎖化合物は大豆粉末からカラムクロマトグラフィーによって単離した高マンノース型糖鎖をアセチル化した後、ジクロロエタン、TMS-Br、BF₃Et₂O、コリジンを順次添加して合成し、脱アセチル化して調製した。

(3) エンド-Mの変異酵素を用いたヒトインフルエンザウィルス感染阻害剤の合成

①変異酵素 Y217F の糖転移活性による糖鎖複合体の合成：ニワトリ卵黄からフェノール抽出とカラムクロマトグラフィーによって得た糖ペプチドを、 α -2,6 結合したシアル酸を非還元末端に持つ糖鎖の供与体とし、*p*-ニトロフェニール-*N*-アセチルグルコサミニドを受容体として、変異酵素 Y217F を作用させて糖転移反応を行った。本反応により、*p*-ニトロフェニール基をリガンドとして結合したシアロ糖鎖複合体を糖転移反応生成物として得た。

②還元アミノ化反応によるシアロ糖鎖のキトサンへの多価結合：上記によって得られたシアロ糖鎖複合体をキトサンに還元アミノ化反応によって多価結合して、インフルエンザウィルスの捕捉型感染阻害剤としてのシアロ糖鎖ポリマーを得た。

③ヒトインフルエンザ A 型ウィルスを用い

た感染阻害試験：ヒトインフルエンザA型ウイルスのニューカレドニア株やパナマ株などを用いて、イヌ脾臓細胞（MDCK 細胞）に対する本阻害剤の阻害活性を調べた。すなわち、細胞へ感染したウイルスを単クローン抗体を用いた ELISA 法によって蛍光ラベルし、蛍光顕微鏡によりその数を調べた。

（4）トリインフルエンザウイルス感染阻害剤の合成

① α -2,3 結合シアル酸含有糖鎖を持つ感染阻害剤の調製：上記のヒトインフルエンザウイルス阻害剤に細菌由来シアリダーゼを作用し、糖鎖の非還元末端にある α -2,6 シアル酸を除去した。次いで、海洋細菌由来の α -2,3 シアリルトランスフェラーゼをシアル酸供与体である CMP-シアル酸の存在下で作用して再びシアル酸を α -2,3 結合様式で付加し、シアロ糖鎖ポリマーを得た。

② トリインフルエンザウイルスを用いた感染阻害試験：トリインフルエンザウイルス PR8 株などを用いて、MDCK 細胞への感染に対する本阻害剤の阻害活性を調べた。

（5）生理活性糖ペプチドの効率的な化学-酵素合成

多くの生理活性ペプチドは水に難溶であることや、血中半減期が短いなど医薬品として臨床上好ましくない性質を有している。しかし、オリゴ糖の付加によってこれらの性質が緩和することが期待される。そこで、抗 HIV 活性を有する HIV 表層糖タンパク質 gp41 の部分ペプチド（34 アミノ酸残基からなる）の N-末端より 10 残基目のアスパラギン残基に N-アセチルグルコサミンを付加したペプチド（GlcNAc-C34）を固相法により合成し、高マンノース型糖鎖のオキサゾリン誘導体を用いて、N175A 変異酵素による糖転移反応を行い、生理活性糖ペプチドを酵素合成した。さらにグルカゴン、サブスタンス P、PAMP12

などの生理活性ペプチドについても、上記と同様のペプチド合成方法により、GlcNAc を付加したペプチドを合成し、シアロ複合型糖鎖を有するオキサゾリン誘導体と N175Q 変異酵素を用いて、効率的な生理活性糖ペプチドの化学-酵素合成を行った。

4. 研究成果

（1）部位特異的変異酵素を用いたヒトインフルエンザウイルス捕捉型感染阻害剤の合成と評価

エンド-Mの変異酵素 Y217F を用いてヒトインフルエンザウイルス感染阻害剤の効率的な合成を行った。上記の調製方法によって得られたシアロ糖鎖ポリマーについて、イヌ脾臓細胞（MDCK 細胞）へのウイルスの感染阻害を調べたところ、ヒトインフルエンザA型（図1）およびB型ウイルスについて、非常に有効であることがわかった。次いで、最

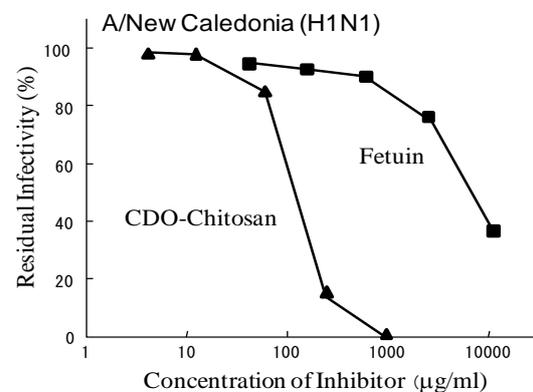


図1 インフルエンザA型ウイルス（ニューカレドニア株）に対する阻害剤の感染阻害効果：シアロ複合型糖鎖を有するウシ血清フェツインをコントロールとして比較した。

適な阻害剤の作成を検討したところ、バックボーンのキトサンの重合度が500でシアロ糖鎖の付加率が15%のシアロ糖鎖ポリマーが最も効率的な感染阻害剤であることが明らかになった。これは分子モデリングによるへ

マグルチニンとの構造的相関性によっても証明された。一方、トリインフルエンザウィルスに対する阻害剤については顕著な感染阻害効果は見られなかった。

(2) 部位特異的変異酵素とオキサゾリン糖鎖誘導体を用いた糖転移反応

エンド-Mの特異な substrate assisted catalysis 機構に基づいて、オキサゾリン構造を有する糖鎖供与体を用いた糖転移反応を検討した。すなわち、エンド-Mは酸性アミノ酸からなる酸塩基触媒残基のみを有する一方、基質の *N*-アセチルグルコサミン残基の 2-アセトアミド基が求核残基として機能して、オキサゾリン反応中間体を形成し、酵素反応が進行する。そこで、オキサゾリン反応中間体を基質として糖転移反応を進行させ、加水分解は抑制されるような酵素反応を検討した。変異酵素 N175A を用いてシアロ複合型糖鎖のオキサゾリン誘導体を供与体、*N*-アセチルグルコサミンを付加したエリスロポエチンの部分ペプチドを受容体として糖転移反応を行ったところ、糖転移生成物である糖ペプチドが効率的に生成された。次いで、N-175 残基について、さまざまなアミノ酸に置換した部位特異的変異酵素を作成し、オキサゾリン糖鎖誘導体を用いた糖転移活性を検討したところ、N175Q 変異酵素が最も高い

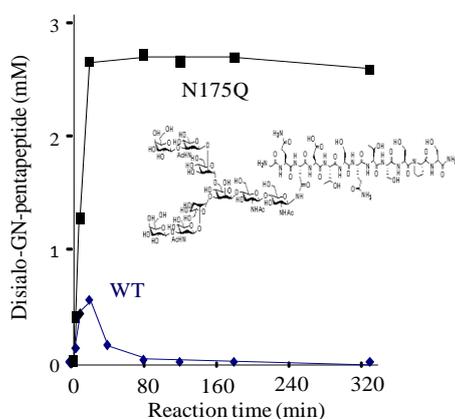


図2 N175Q 変異酵素を用いたエリスロポエチン部分糖ペプチドの酵素合成

糖転移活性を示すことを見出した (図2)。

(3) 部位特異的変異酵素を用いた機能性糖鎖複合体の合成

加水分解活性が抑制されているにもかかわらず、オキサゾリン糖鎖化合物を供与体基質として糖転移反応が進行する変異酵素 N175Q について、血圧降下作用を有する生理活性ペプチドのサブスタンスPおよびPAMP12の糖ペプチドを化学-酵素合成を行った。サブスタンスPの糖ペプチドの生成収率は98%、PAMP12の糖ペプチドの生成収率は95%であった。PAMP12について、nativeのペプチドと糖鎖を付加した糖ペプチドについてプロナーゼを添加し、その酵素分解に対する安定性を調べたところ、糖ペプチドはプロテアーゼに対する高い抵抗性を示した。さらに、高マンノース型糖鎖を有するウシ膵臓リボヌクレアーゼBの糖鎖をエンド-Hによって遊離した後、N175Q 変異酵素とシアロオキサゾリン糖鎖化合物を用いた糖転移反応によってシアロ複合型糖鎖にリモデリングした。シアロ糖鎖を有するリボヌクレアーゼBについてはESI-TOF MSによって同定した。

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5件)

- 1) M.Umekawa, T.Higashiyama, Y.Koga, T.Tanaka, M.Noguchi, A.Kobayashi, S.Shoda, W.Huang, L.-X.Wang, H.Ashida and K.Yamamoto: Efficient Transfer of Sialo-oligosaccharides onto Proteins by Combined Use of a Glycosynthase-like Mutant of *Mucor hiemalis* Endoglycosidase and Synthetic Sialo-complex-type Sugar Oxazoline. *Biochim. Biophys. Acta*, **1800**, 1203-1209 (2010). (査読有)
- 2) M.Umekawa, C.Li, T.Higashiyama,

W.Huang, H.Ashida, K.Yamamoto and L.-X.Wang: Efficient Glycosynthase Mutant Derived from *Mucor hiemalis* Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase Capable of Transferring Oligosaccharide from Both Sugar Oxazoline and Natural *N*-Glycan. *J. Biol. Chem.*, **285**(1), 511-521 (2010). (査読有)

3) W.Huang, C.Li, B.Li, M.Umekawa, K.Yamamoto, X.Zhang and L.-X.Wang : Glycosynthases Enable a Highly Efficient Chemoenzymatic Synthesis of *N*-Glycoproteins Carrying Intact Nature *N*-Glycans. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**(6), 2214-2223 (2009). (査読有)

4) M.Umemura, M.Itoh, Y.Makimura, K.Yamazaki, M.Umekawa, A.Masui, Y.Matahira, M.Shibata, H.Ashida and K.Yamamoto : Design of a Sialylglycopolymer with a Chitosan Backbone Having Efficient Inhibitory Activity against Influenza Virus Infection. *J. Med. Chem.*, **51**, 4496-4503 (2008). (査読有)

5) M.Umekawa, W.Huang, B.Li, K.Fujita, H.Ashida, L.-X.Wang and K.Yamamoto : Mutants of *Mucor hiemalis* Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase Show Enhanced Transglycosylation and Glycosynthase-like Activities. *J. Biol. Chem.*, **283**(8), 4469-4479 (2008). (査読有)

[学会発表] (計 1 1 件)

- 1) 山本憲二: Endo-M 変異酵素を用いた機能性糖鎖複合体の効率的な合成、グライコバイオロジクス研究会、2010年12月11日、大阪千里ライフサイエンスセンター
- 2) 東山貴幸ら: グライコシンターゼ様エンドグリコシダーゼ変異酵素を用いたシアロ糖ペプチドの合成、日本農芸化学会 2010年度大会、2010年3月28日、東京大学
- 3) 山本憲二: ひとつだけの酵素を用いた効

率的な糖鎖の付加とリモデリング、第7回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム、2009年12月7日、大阪千里ライフサイエンスセンター

4) 東山貴幸ら: 糸状菌由来エンドグリコシダーゼの機能改変と糖鎖複合体合成への応用、日本生物工学会大会第61回大会、2009年9月24日、名古屋大学

5) 三谷 誠司ら: ノイラミニダーゼ阻害剤によるインフルエンザウイルス捕捉型感染阻害剤の効果促進、日本生物工学会大会第61回大会、2009年9月24日、名古屋大学

6) 梅川碧里ら: 微生物由来エンドグリコシダーゼの機能改変と機能性糖鎖複合体の合成への応用、第29回日本糖質学会、2009年9月11日、高山飛騨生活文化センター

7) M.Umekawa et al.: Improvement of a Novel Glycosynthase-like Mutant of *Mucor hiemalis* Endoglycosidase for Efficient Syntheses of Glycoconjugates、15th European Carbohydrate Symposium、2009年7月20日、ウィーン大学、オーストリア国

8) 梅村 舞子 ら: シアロ糖鎖を活用したインフルエンザウイルス捕捉型感染阻害剤のデザイン、日本農芸化学会関西支部講演会、2009年2月7日、京都

9) 梅川 碧里 ら: 糸状菌由来 endo- β -*N*-acetylglucosaminidase が有する特異な糖転移機能の解析とグライコシンターゼ化、日本農芸化学会関西支部講演会、2009年2月7日、京都

10) M. Umekawa et al. : Development of a Novel Glycosynthase Mutant of Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase from *Mucor hiemalis*、24th International Carbohydrate Symposium、2008年7月29日、オスロ、ノルウェー国

11) M. Umemura et al. : Simple Synthesis of

Influenza Virus Binding-Inhibitor Composed of
Only Sugar Chains from Natural Compounds、
24th International Carbohydrate Symposium、
2008年7月29日、オスロ、ノルウェー国

〔図書〕(計3件)

- 1) 山本憲二：シーエムシー出版、糖鎖化学の基礎と実用化 エンド型グリコシダーゼを用いた糖ペプチドの化学-酵素合成、2010、pp. 31-39
- 2) 山本憲二：科学技術振興機構、糖鎖を知る ひとつだけの微生物酵素を用いて糖鎖を付ける方法、2010、pp. 18-25
- 3) 梅川碧里、山本憲二：シーエムシー出版、複合糖質の化学と最新応用技術、2009、pp. 96-103

〔その他〕

ホームページ

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/molecule/ammbio/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 憲二 (YAMAMOTO KENJI)
石川県立大学・生物資源環境学部・客員教授
研究者番号：70109049

(2) 研究分担者

芦田 久 (ASHIDA HISASHI)
京都大学大学院・生命科学研究科・准教授
研究者番号：40379087

(3) 連携研究者

()

研究者番号：