

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19090

研究課題名（和文）均一糖鎖含有バイオ医薬品をワンステップで合成する技術による最適糖鎖構造の探索

研究課題名（英文）Synthesis of neoglycoproteins using oligosaccharide-transfer Activity with immobilized endoglycosidases

研究代表者

竹川 薫（Takegawa, Kaoru）

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：50197282

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では均一な糖鎖構造を有する糖タンパク質を酵素合成するために、糖タンパク質糖鎖の脱糖鎖化に必要な-L-フコシダーゼとエンドグリコシダーゼ(ENGase)を担体に固定化して、効率的に脱糖鎖を行う技術について検討を行った。両酵素ともNHS-Activated Agaroseに固定化後も活性を保持することが確認できた。両固定化酵素を用いてIgGについてLC/MSで測定を行ったところ、脱糖鎖が確認できた。ヒト由来の糖タンパク質の多分岐糖鎖の脱糖鎖が可能な新規ENGaseの検索を試みた。その結果、腸内細菌ゲノムに存在するENGaseが多分岐糖鎖を切断する新規な酵素であることを明らかにできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在市販されているバイオ医薬品の多くが糖タンパク質であるが、最も高い生物活性を示す糖鎖構造については未だ明らかにされていない。そこで、本研究では煩雑な工程であったエンドグリコシダーゼの糖鎖転移反応による糖タンパク質均一糖鎖変換技術を固定化酵素を用いて行うことを目指した。条件検討の結果、固定化酵素による糖タンパク質の脱糖鎖は効率良く行うことが可能になった。

研究成果の概要（英文）：We investigated efficient deglycosylation techniques by immobilizing -L-fucosidase and endoglycosidase (ENGase), which are necessary for deglycosylation of sugar chains from glycoproteins. Both enzymes were found to retain their activity after immobilization on NHS-Activated Agarose. LC/MS measurements confirmed deglycosylation of IgG using both immobilized enzymes. We searched for a novel ENGase capable of deglycosylation of multi-branched glycans of human-derived glycoproteins. We expect that *Barnesiella intestinihominis* possesses ENGases to facilitate the utilization of complex-type N-glycans from host cells.

研究分野：応用微生物学

キーワード：エンドグリコシダーゼ ネオグリコプロテイン 固定化酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在までに日米欧で多数のモノクローナル抗体医薬品が承認されており、その多くががんや自己免疫疾患等の重篤疾患を対象としている。近年、特許期限の切れたバイオ医薬品においては、後続品(バイオシミラー)と先行品の糖鎖構造の差異が生じないように、糖鎖構造を精密に制御する技術が強く求められている。バイオ医薬品を代表する抗体医薬品においても、糖鎖の構造がADCC(抗体依存性細胞障害)活性やCDC(補体依存性障害)活性に大きな影響を与えることも示されている。そこで、抗体分子の不均一な糖鎖構造を均一化するとともに、その複雑な製造・管理プロセスを簡略化することが望まれている。また最近、複数の糖鎖が付加したバイオ医薬品の場合、全体の生物活性は最も活性の低い糖鎖構造に依存することが報告されている。均一糖鎖を有するバイオ医薬品を生産するための最良の方法として、構造が均一な合成N-結合型糖鎖とエンドグリコシダーゼ(ENGase)の糖鎖転移反応を利用する技術が最も実現の可能性が高いと考えられており、ENGaseを用いて均一糖鎖にしたIgG抗体の生物活性について解析した論文が、複数発表された。しかしENGaseを用いた均一糖鎖合成法は複雑な工程を要するため、バイオ医薬品糖タンパク質の脱糖鎖から均一糖鎖までのステップを簡便にする必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖鎖部分が不均一なバイオ医薬品糖タンパク質を2種類の固定化酵素を用いることで、均質な糖タンパク質を簡便に製造する技術を開発することである。糖タンパク質の均一糖鎖への変換技術としてエンドグリコシダーゼ(ENGase)を用いる方法が検討されている。しかし、その工程の複雑さのために多種類の均一糖鎖糖タンパク質の調製は極めて困難である。そこで工程の簡素化を目指し、「脱糖鎖」および「糖鎖変換」を酵素固定化カラムにより実施する。本糖鎖変換システムが完成してN-型糖鎖ライブラリーから、最もバイオ医薬品として生理活性の高い糖鎖構造が同定できれば、バイオ医薬品の使用頻度も減らすことが可能となり、患者への負担の軽減にもつながることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 固定化脱糖鎖用 ENGase と 固定化糖鎖転移用 ENGase の最適反応条件の検討

・脱糖鎖用 ENGase IgG抗体などのバイオ医薬品は、主にCHO細胞を宿主として生産されていることから、その糖鎖根元部分のGlcNAc残基にフコースが結合している。このコアフコース含有N-結合型糖鎖を切断するENGaseは報告例が少なく、化膿レンサ球菌由来のENGase(Endo-S)が現在最も脱糖鎖によく用いられている。我々もコアフコース含有糖鎖を特異的に切断するENGase(Endo-CoM)を冬虫夏草ゲノムに見出して、その詳細な基質特異性と立体構造を明らかにした(JBC 17143-54, 2019)。そこで、糖タンパク質からの脱糖鎖に用いるENGase酵素としては、複合型糖鎖および高マンノース型糖鎖を切断可能なEndo-CC(PLoS One, e0132859, 2015)と、フコース含有糖鎖を切断可能なEndo-CoM(Sci Rep, 10, 246, 2018)を固定化する。切断する糖タンパク質として、最も汎用性の高い市販IgG抗体タンパクを用いる。Endo-CoMを活性化セファロースゲルに固定化させてカラムに充填後、IgGタンパクを完全に脱糖鎖できる反応条件(脱糖鎖可能なタンパク量、バッファー、反応温度、流速等)を検討する。

・糖鎖転移用 ENGase 糖鎖を付加するENGaseとしては、これまでに申請者らが試験管での糖鎖転移に関する条件検討を行ってきた、ウシグソヒトヨタケ由来のENGase(Endo-CC)変異体を用

いる。付加させるヒト適応型均一糖鎖については、ヒトの糖タンパク質に普遍的に存在する2本鎖シアリル化複合型糖鎖含有ペプチド(SGP)を卵黄から大量調製が可能であるため、本糖鎖をオキサゾリン化して使用する。

(2) ENGase とフコシダーゼを固定化したカラムによる GlcNAc-タンパク質の効率的生産
多くの IgG 抗体医薬品の糖鎖には、コアフコースが結合している。コアフコースは IgG 抗体の ADCC などの生物活性を低下させるため、除去することが望ましい。そこで市販の IgG 抗体タンパクから Endo-CoM を用いて IgG のフコース含有糖鎖を切断し、腸内細菌(*Bifidobacterium*)由来の α -L-フコシダーゼ等を用いて脱フコシル化を行う。最終的には ENGase 固定化ゲルと混合、または2つのカラムを別々に通過させることで *N*-結合型糖鎖の除去とコアフコースの除去を同時に可能なカラムの検討を行う。

(3) 多分岐複合型糖鎖を切断可能な ENGase の検索
これまで当研究室で報告した ENGase(Endo-CC, Endo-CoM)は、複合型糖鎖の中で広く動物細胞表面に存在する3本鎖や4本鎖などの多分岐糖鎖を切断することができない。そこでゲノムデータベースから既知の ENGase とはドメイン構造が異なる新たな ENGase の探索を行い、その基質特異性を解析する。得られた新規 ENGase の中で多分岐複合型糖鎖を切断可能な酵素の同定を試みる。

4. 研究成果

(1) ENGase の担体への固定化
Endo-CoM は CNBr Activated Sepharose 4B (これ以降 CNBr ビーズと記載)と Pierce NHS-Activated agarose Dry Resin (これ以降 NHS-agarose ビーズと記載)に固定化を行った。固定化率の算出は、各担体のメーカー元のプロトコルを参照し、推奨濃度の酵素溶液とカップリング反応を行った後の SDS-PAGE の結果から画像解析により面積の差を求めることで算出を行った。CNBr ビーズ固定化後の上清では、かなり濃縮をかけた後のもので薄くバンドが確認でき、NHS-agarose ビーズでは固定化後上清に Endo-CoM のバンドがみられなかったことから、これらの担体にはほぼ 100% Endo-CoM を固定化することができた。

Endo-CoM の加水分解活性の測定には抗 CD20 モノクローナル抗体である Rituximab を使用した。Rituximab はフコシル化された不均一な二分岐複合型糖鎖を持ち、Endo-CoM は、還元末端側に存在する GlcNAc 間を加水分解し、糖鎖をエンド型に遊離させることができる。NHS-agarose ビーズでは、固定化前の Endo-CoM と反応させた時の結果と同様に糖鎖の切断が起きていることが確認でき、固定化後もその活性が残存していることが分かった(図1)。一方、CNBr ビーズ固定化 Endo-CoM は糖鎖を切断することができなかつた。この結果から Endo-CoM の固定化には NHS-agarose ビーズが適していると判断した。

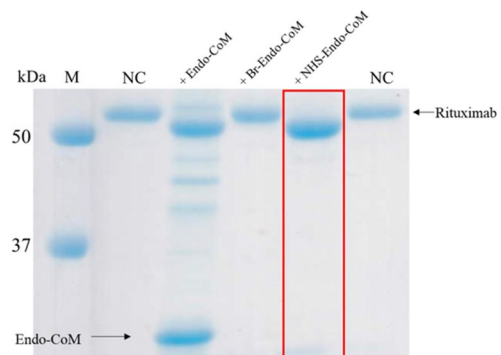


図1 固定化 Endo-CoM による IgG 抗体の脱糖鎖

(2) フコシダーゼの担体への固定化

フコシダーゼでは、Endo-CoM と同様 CNBr ビーズと NHS-agarose ビーズ、Dynabeads の 3 種類に加えて、NHS-Activated Sepharose 4 Fast Flow (これ以降 NHS-sepharose ビーズと記載) の 4 種類に固定化を行った。固定化率の算出は、CNBr ビーズでは固定化前後の上清を回収してその活性を pNP-Fuc を用いた実験で吸光度を測定し、そこから比活性を算出することで算出した。それ以外は Endo-CoM と同様 SDS-PAGE を行った後、画像解析により算出した。その結果、CNBr ビーズでは Endo-CoM と同様ほぼ 100% フコシダーゼを固定化することができた。また、NHS-agarose ビーズと NHS-sepharose ビーズでは、CNBr ビーズのように 100% 固定化することはできなかったが、87% 程度固定化することができた。

タンパクの固定化は安定性が增强することがあるため、NHS-agarose ビーズあるいは NHS-sepharose ビーズに固定化したフコシダーゼにおいて、熱安定性の測定を行い、固定化前のフコシダーゼと比較を行った。NHS-agarose ビーズあるいは NHS-sepharose ビーズの両方で熱安定性が向上していることが分かった(図 1)。酵素反応は 30-37 °C で行うため、固定化酵素として繰り返しの使用を想定した時に、この熱安定性の向上は大きな利点になることが示唆された。

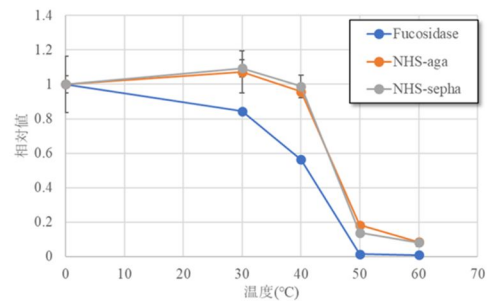


図 2 固定化酵素(NHS-aga と NHS-sepa) を各温度で 10 分間保温して残存活性を測定した

(3) 多分岐複合型糖鎖を切断可能な ENGase の検索

我々はグラム陰性細菌である *Bacteroides nordii* が保有する ENGase (Endo-BN) が多分岐の複合型糖鎖を切断できることを報告した。しかし Endo-BN は大腸菌で発現させた場合に、不溶性画分に多くタンパク質が得られることから、さらに類似の酵素の検索をデータベースから行った。Endo-BN と相同性の高い遺伝子をバクテリアゲノムから検索を行ったところ、腸内細菌 *Barnesiella intestinhominis* ゲノムに ENGase 候補遺伝子 (Endo-BIN1-3) を 3 種類見出した。Endo-BIN 遺伝子 DNA を *B. intestinhominis* 菌体から PCR により増幅させて大腸菌プラスミド pCold-ProS2 に導入した。得られた各プラスミドを *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus へ形質転換して、発現・精製を試みた。精製したタンパク質を SDS-PAGE によって分析したところ、これら 3 種類の ENGase タンパク質を可溶性画分にほぼ単一バンドとして調製することができた。

精製した 3 種類の ENGase と PA 化糖鎖と反応させ ENGase 活性を有するか調べた。3 種類の ENGase のうち、Endo-BIN2 と Endo-BIN3 は PA 化糖鎖を切断することがわかったが、Endo-BIN1 はどの PA 化糖鎖に対しても活性を示さなかった。活性を示した Endo-BIN2 と Endo-BIN3 の基質特異性について各種 PA 化糖鎖により解析を行った(図 3)。両酵素はオリゴ(高)マンノース型糖鎖に対する活性はなく、複合型

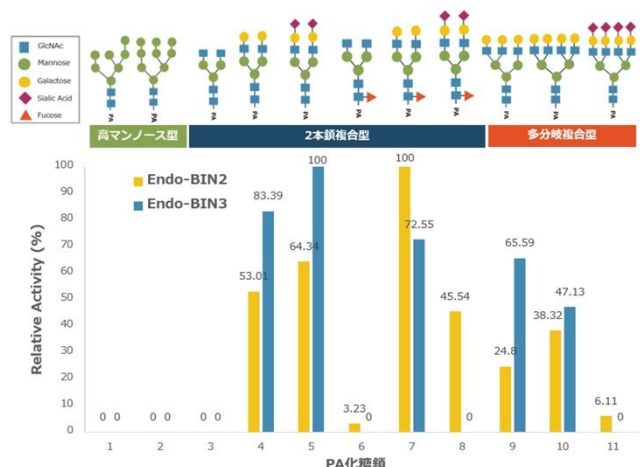


図 3 Endo-BIN2 と BIN3 の糖鎖切断活性比較

糖鎖のみ活性を示すことがわかった。複合型糖鎖の中では、2本鎖複合型糖鎖に対する酵素活性が一番高く、3本鎖、4本鎖の多分岐の複合型糖鎖をも加水分解できるという特徴を有していた。また糖鎖末端にシアル酸が存在すると活性が低下することもわかった。以上の結果より、大腸菌で可溶性タンパク質として調製が可能な多分岐複合型糖鎖を切断できる新規 ENGase を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Doi K, Mitani A, Nakakita S, Higuchi Y, Takegawa K	4. 巻 137
2. 論文標題 Characterization of novel endo-β-N-acetylglucosaminidases from intestinal <i>Barnesiella intestinihominis</i> that hydrolyze multi-branched complex-type N-glycans.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Biosci Bioeng	6. 最初と最後の頁 101-107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2023.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bienes KM, Tautau FAP, Mitani A, Kinoshita T, Nakakita S, Higuchi Y, Takegawa K	4. 巻 133
2. 論文標題 Characterization of novel endo-β-N-acetylglucosaminidase from <i>Bacteroides nordii</i> that hydrolyzes multi-branched complex type N-glycans.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2022.03.011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 土井佳奈子、樋口裕次郎、竹川薫
2. 発表標題 <i>Barnesiella</i> 属腸内細菌が保有する3種類のENGaseについての解析
3. 学会等名 令和5年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Doi K, Higuchi Y, Takegawa K
2. 発表標題 Analysis of the Utilization Mechanism of Complex Type N-glycan by Intestinal Bacteria <i>Barnesiella</i>
3. 学会等名 GLyco 26 (Taiwan) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土井佳奈子、樋口裕次郎、竹川薫
2. 発表標題 Barnesiella属腸内細菌のENGaseを用いたN-型複合型糖鎖の資化機構解析
3. 学会等名 第42回日本糖質学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土井佳奈子、中山二郎、樋口裕次郎、竹川薫
2. 発表標題 複合型糖鎖を資化するBarnesiella属腸内細菌の解析
3. 学会等名 日本生物工学会支部大会福岡
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土井佳奈子、篠田あかり、中山二郎、竹川 薫
2. 発表標題 Barnesiella属腸内細菌ゲノムに存在するエンドグリコシダーゼの諸性質に 関する研究
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kanao Doi, Yujiro Higuchi, Kaoru Takegawa
2. 発表標題 Characterization of novel ENGases from <i>B. intestinhominis</i> that hydrolyze complex type N-glyca
3. 学会等名 JSBBA West 5th Student Forum
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本田明梨、木下崇司、竹川薫
2. 発表標題 3種の固定化酵素による均一糖鎖含有糖タンパク質合成システムの構築
3. 学会等名 第 27 回 日本生物工学会九州支部 大分大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------