

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：23303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292063

研究課題名(和文) 微生物酵素を用いた革新的な糖鎖付加技術の開発とその機能性糖鎖複合体の合成への応用

研究課題名(英文) Development of the innovative technique for addition of sugar chain using microbial enzymes and its application on the syntheses of functional glycoconjugates

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・教授

研究者番号：70109049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌 *Mucor hiemalis* が生産するエンドグリコシダーゼ Endo-M の特異な糖転移活性を活用して化合物に糖鎖を付加する技術を開発した成果を踏まえて、Endo-M の変異酵素を利用した機能性糖鎖複合体の合成を行った。すなわち、加水分解活性が抑制され糖転移生成物が効率的に得られる変異酵素 N175H を取得し、シアロ糖ペプチドを糖鎖供与体として糖転移反応を行うことにより、酵母で発現したパイオ医薬品ヒト IgG の酵母型糖鎖をヒト型糖鎖に変換することに成功した。また、コアフコースを有する糖鎖に特異的に作用する変異酵素 W251N を取得し、抗がん剤リツキシカンから糖鎖を遊離して細胞傷害活性の促進を試みた。

研究成果の概要(英文)：Endo-M, an endo- α -N-acetylglucosaminidase from the fungus *Mucor hiemalis*, is an endoglycosidase that possesses not only hydrolysis activity which liberates N-glycan leaving the innermost N-acetylglucosamine residue but also transglycosylation activity which transfers N-glycan from a donor onto a hydroxyl group-containing compounds. We generated several Endo-M mutant enzymes with transglycosidase-like activity to synthesize functional glycoconjugates. We found that N175H mutant enzyme showed glycosynthase-like activity and could synthesize a sialo-glycoform of glycoconjugates. Using this mutant, we could change the glycan of the recombinant human IgG from yeast to the sialo-glycan which is compatible to human. Moreover, Endo-M mutant enzyme W251N showed to have altered substrate specificities, exhibiting the hydrolysis activity for a core-1,6-fucosylated glycan. This mutant could act on IgG-derived core-fucosylated glycopeptides of rituximab and that of the human lactoferrin.

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 リンG コアフコース 糖転移反応 糖鎖付加 糖鎖リモデリング オキサゾリン化合物 免疫グロブリン 細胞傷害活性

1. 研究開始当初の背景

最近、バイオ医薬品に関する議論が盛んになってきた。その背景には数年内にバイオ医薬品の特許切れがピークを迎えることがあり、それに関してバイオ医薬品の中でも多数を占める糖タンパク質医薬品の後発品について、先行品と同じ効果を持つかということや安全性の問題がある。なかでも糖タンパク質医薬品の薬効に重要な役割を果たす「糖鎖」の修飾に関わる技術的な課題が挙げられ、先行品との同質性、同等性が追求される上で、付加している糖鎖の均一性が求められる。すなわち、高品質な「バイオシミュラー Bio-similar」の開発が重要であり、そのためには糖鎖の均一性に関わる問題を避けて通ることはできない。

さまざまな化合物に糖あるいは糖鎖が付加されるとその化合物の溶解性や安定性、生理活性などが高められることが知られている。また、細胞内においてゴルジ体および小胞体におけるタンパク質・脂質への糖鎖の付加は輸送や生理活性、安定性、品質管理などに深く関わっている。細胞内での糖鎖の付加は糖ヌクレオチドを糖の供与体基質として糖転移酵素が働き、その糖組成に従って、それぞれの糖転移酵素がそれぞれの糖ヌクレオチドを基質として反応が行われる複雑な過程を経て行われ、その付加反応は数十にもおよび酵素反応を経て行われる。さらに糖鎖はその合成が遺伝子情報に直接に対応していないために非常に多様性がある。

化合物への糖鎖の付加を有機合成の手法によって行うことは、複雑な構造の糖鎖の合成が極めて困難であり、現時点ではほとんど不可能である。一方、単糖の付加に糖加水分解酵素(グリコシダーゼ)の糖転移反応が旧来より活用されている。すなわち、糖加水分解反応は糖が水に転移する反応として捉えることができ、糖加水分解酵素は糖を水酸基を持つ化合物に転移付加する糖転移反応を行う。この糖転移反応を用いることによって、エキソ型グリコシダーゼによるオリゴ糖の合成などが盛んに行われている。しかし、単糖ではなくて糖鎖を丸ごと酵素的に付加しようとする試みは全く考えられていなかった。

私たちは土壌より単離した糸状菌 *Mucor hiemalis* のエンド型グリコシダーゼ(糖タンパク質の N-結合型糖鎖に作用して糖鎖を遊離する酵素エンド- α -N-アセチルグルコサミニダーゼ)がエキソ型グリコシダーゼと同様に糖転移活性を有することを初めて見出し、さまざまな化合物への糖鎖の酵素的な付加反応を実現した。エンド-M (Endo-M) と名付けられたこの酵素は市販され、世界中で化合物への糖鎖の付加に用いられている。このように糖加水分解酵素の糖転移活性を利用して化合物へ糖や糖鎖を付加する反応には大きな問題点があり、それは生成した糖転移化合物が糖加水分解酵素自身の基

質にもなって分解され、目的の生成物の収率が大きく減少することである。そこで、酵素の触媒残基を改変し、酵素反応中間体をミミックした基質を用いて糖転移反応を行うことにより、加水分解活性が抑制され、一度生成された糖転移化合物は加水分解されずに蓄積されるという“グライコシターゼ化”の技法が開発された。一方、アミノ糖を含む基質に対して作用する糖加水分解酵素の反応は substrate assisted catalysis という特異な反応機構によって行われる。この反応機構は、通常の糖加水分解酵素が糖-酵素複合体を酵素反応中間体として反応する代わりに、糖のオキサゾリン化合物(複素環化合物)が反応中間体になり、酵素タンパク質の求核残基の代わりに、基質であるアミノ糖の 2-アセトアミド基が求核基となる(従って酵素には求核残基が存在しない)(図1)。すな

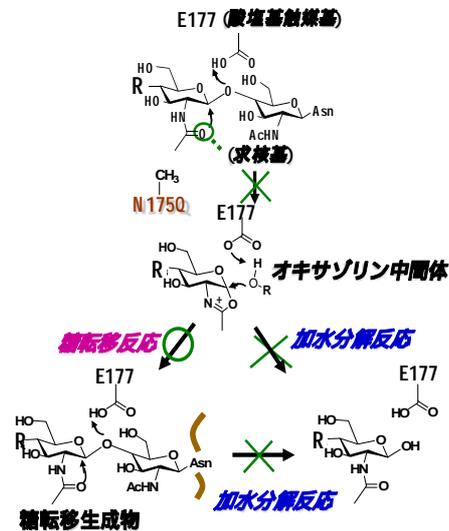


図1. Endo-Mの酵素反応機構

わち、基質が酵素反応をアシストするという機構である。私たちは Endo-M がこの特異なメカニズムによって反応することを見出した。すなわち、この反応機構によって反応が行われる酵素はオキサゾリン化合物を基質とすることにより糖転移反応によって糖転移化合物が生成する一方、加水分解活性に関わるアミノ酸残基を部位特異的の変異によって不活化すれば糖転移生成物は加水分解されずに蓄積されると推定され、反応中間体であるオキサゾリン化合物の形成や安定化に関係すると考えられる Endo-M のアミノ酸残基(N-末端より175番目のアスパラギン残基)を変異することにより“グライコシターゼ”様に変換された酵素を得ることができた。すなわち、N175のアミノ酸置換変異体 N175Q は反応中間体であるオキサゾリン化合物を形成することはできないが、オキサゾリン化合物を基質として反応することにより糖転移化合物を生成し、しかも加水分解活性が抑制されているために糖転移生成物は分解されずに蓄積される。この結果は任意の糖鎖の

オキサゾリン型化合物を用いることによって、任意の糖鎖を有するさまざまな化合物を Endo-M の変異酵素を用いて生成できることを示している。例えば、糖タンパク質医薬品として重要である“均一な糖鎖を有する糖タンパク質”やさまざまな糖鎖化合物を収率良く合成することができる。それ故に、糖タンパク質医薬品の合成には欠かすことができない技法になり得る。このような Endo-M の変異酵素を用いて、生理活性を有するさまざまな糖鎖化合物や糖タンパク質をオキサゾリン型化合物を用いることにより収率良く効率的に、しかも実用化のレベルで生産することが本研究の主な目的である。

2. 研究の目的

糖鎖をさまざまな生体物質に付加することはそれらの機能や安定性を決定付ける重要な現象である。私たちは微生物のエンド型グリコシダーゼ Endo-M の糖転移活性を活用することにより糖鎖をさまざまな化合物に転移付加できることを見出し、多くの機能性糖鎖複合体を酵素合成した。さらに部位特異的変異酵素を作成して、加水分解活性が抑制され、糖転移反応が促進される変異酵素も取得した。本研究では、本酵素の反応がオキサゾリン型の化合物を中間体として行われることに着目して、加水分解活性が抑制された変異酵素を用いて、オキサゾリン化合物を基質とした効率的な糖転移反応を行い、有用な機能性糖鎖複合体や糖タンパク質のバイオ医薬品を実用化レベルで生産する基盤技術を確認するとともに大量生産を試みることを目的とした。一方、Endo-M は本来の加水分解活性によって作用し得る N-型糖鎖に限られており、多くの動物由来の糖タンパク質に見られるコアフコースを有する N-型糖鎖に対しては全く作用しない。抗体医薬においては CHO など動物細胞によって産生される免疫グロブリン G (IgG) が有するコアフコース含有糖鎖を除去することによって細胞傷害活性 (ADCC 活性) が上昇することが知られている。そこで、コアフコースを有する糖鎖を加水分解して切断除去できるような広い基質特異性を有する変異酵素を取得することも本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究において取得した Endo-M の部位特異的変異酵素は QuikChange キットを用いてプロトコールに従って得た。C-末端にヒスチジンタグを付けた Wild-type の Endo-M の cDNA 断片を含む pET23b プラスミドをテンプレートとして PCR を行い、得られたプラスミドを大腸菌 BL21(DE3) に挿入し、アンピシリンを含む LB 培地にて培養して変異酵素を発現させた。得られた菌体を BugBuster で溶菌した後、遠心上清をニッケルカラムにて分画し、ヒスチジンタグを付けた変異酵素を精製した。

N175H 変異酵素の糖転移活性による反応はシアロ複合型二本鎖糖鎖またはそのオキサゾリン型糖鎖を供与体として行った。受容体としては *p*-Nitrophenyl-*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を用いた。反応生成物の分析には逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) や薄層クロマトグラフィーなどを用いて行った。W251N 変異酵素の加水分解反応はピオチン化した (Mannose)₃(*N*-Acetylglucosamine)₂(L-Fucose); (M3N2F) を基質として反応を行い HPLC によって分析した。基質としてはコアフコースを有する N-型糖鎖を持つリツキサンをペプチダーゼ消化して得た糖ペプチドやヒトラクトフェリンなども用いた。

4. 研究成果

(1) 効率的な糖鎖転移反応を行う変異酵素 N175H の取得とその応用

本研究の目的の一つであるタンパク質に糖鎖を付加する糖転移活性が促進され、加水分解活性が抑制された Endo-M の変異酵素を取得することを試みた結果、従来、取得していた N175Q 変異酵素 (グリコシターゼ) の他に N175H 変異酵素が効率的な糖転移活性を有することを見出した。すなわち、N175Q 変異酵素と同様に、オキサゾリン型糖鎖を供与体として用いることによって、効率的に糖転移生成物を得ることができる酵素である。さらに、オキサゾリン型糖鎖のみならず、シアロ糖ペプチドを糖鎖供与体として糖転移反応が可能であることを見出した。しかも、長時間の糖転移反応により、N175Q 変異酵素よりも高収率で糖転移生成物が得られることを確認した (図 2)。

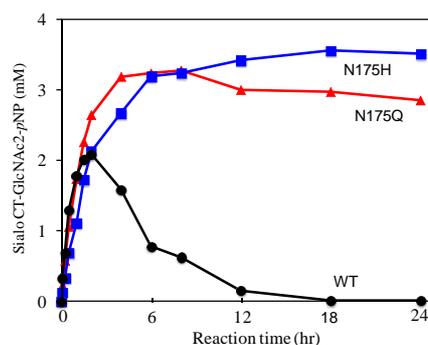


図 2. シアロ糖ペプチドを糖鎖供与体として用いた変異酵素による糖転移反応

(2) 変異酵素を用いた組換え酵母由来ヒト免疫グロブリン G の糖鎖のリモデリング

N175H 変異酵素を用いて、組換え糖タンパク質の糖鎖のリモデリングを試みた。すなわち、産業技術総合研究所の千葉靖典博士より恵与された組換え酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来のヒト IgG について、酵母型の高マンノース型糖鎖をヒト型糖鎖 (シアロ複合型糖鎖) に N175H 変異酵素を用いて変換することを検討した。

まず、組換えヒト IgG について Endo-H を作用させ、糖鎖の切断効率をヒト IgG 抗体を用いたウェスタンブロットングで調べた。その結果、ヒト IgG の重鎖の糖鎖が遊離したタンパク質が、SDS-PAGE によってもとの重鎖のタンパク質に比べて下方に移動していることを確認した。すなわち、Endo-H を作用した組換え IgG についてはほとんど全ての糖鎖が遊離したことが確認された。そこで、このような糖鎖を除去したヒト IgG を用いて、糖鎖のすげ替えリモデリングを行った。シアロ複合型二本鎖糖鎖を有する卵黄由来糖ペプチドを糖鎖供与体として N175H 変異酵素を用いて酵素反応を行った後、ヒト IgG 抗体を用いたウェスタンブロットングによって調べた結果、シアロ糖鎖が付加された組換え IgG が見出された。また、シアロ酸を認識する SNA レクチンを用いたブロットングによってもシアロ糖鎖が付加されたことが確認され、これらの結果から、酵母で生産された組換え IgG の糖鎖がヒト型糖鎖に変換されたことを明らかにした (図 3)。

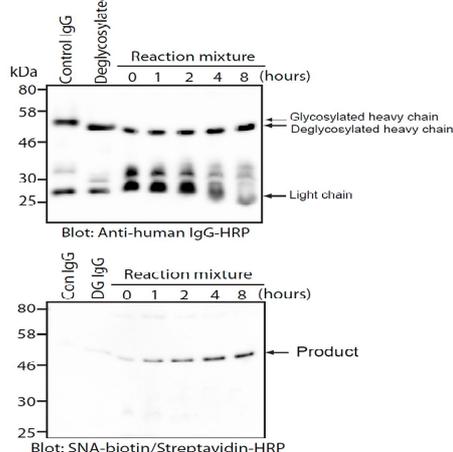


図 3 . 酵母由来の組換えヒト IgG の糖鎖の変異酵素を用いたリモデリング

上 : 糖転移反応の経時的変化のウェスタンブロットング

下 : レクチンブロットング

(3) コアフコースを含む糖鎖に作用する変異酵素の取得とその応用

次にヒト IgG 糖鎖のすげ替えと応用性の拡大を諮るために、Endo-M の基質特異性の改変を試みた。

Endo-M は動物細胞によって生産される糖タンパク質に多く見出される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。しかし、抗体医薬ヒト IgG のコアフコース含有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ことが知られており、Endo-M がこのような糖鎖に対して加水分解活性を発揮することができれば有用性が增大する。そこで、コアフコースを有する短い糖鎖 M3N2F に対して加水分解活性を有する Endo-D (*Streptococcus*

pneumoniae 由来) と全く活性を有しない Endo-A (*Arthrobacter protophormiae* 由来) の酵素タンパク質の構造比較より、コアフコースを有する糖鎖に対して作用する Endo-M の変異酵素の取得を試みた。すなわち、Endo-M と基質特異性が類似している Endo-A は活性中心ポケットが狭くて深い構造をしており、一方、Endo-D は活性中心が広くて浅い。そこで、ポケットを縮めている Endo-A の W244 に相当する Endo-M の W251 に対する部位特異的変異酵素 W251N を作成して、マンノース 3 糖を結合したジアセチルキトピオース (GlcNAc-GlcNAc) に L-フコースが結合したビオチン化合物 (M3N2F-biotin) に作用したところ、加水分解活性を示した (図 4)。得られた生成物は MALDI-TOF/MS 分析によりフコシル N-アセチルグルコサミニルビオチン (FN-biotin) であることを同定した。さらに、コアフコースを有する糖鎖を持つ糖タンパク質である抗がん剤のリツキサンやヒトラクトフェリンの糖鎖をも遊離することを確認した。

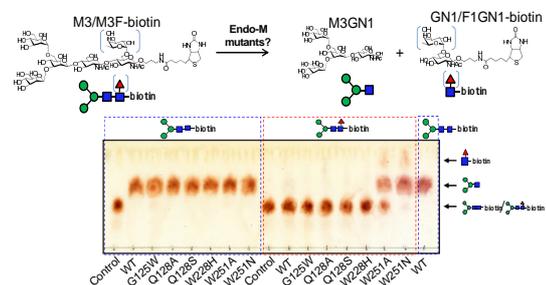


図 4 . M3N2-biotin と M3N2F-biotin に対するさまざまな Endo-M 変異酵素の作用

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Sakaguchi, K., Katoh, T., and Yamamoto, K. 2016. Transglycosidase-like activity of *Mucor hiemalis* endoglycosidase mutants enabling the synthesis of glycoconjugates using a natural glycan donor. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, doi: 10.1002/bab.1433. (査読有)

山本憲二. 2015. 微生物のエンドグリコシダーゼを用いた生理活性物質の合成. *化学と生物*, 53, 252-257. (査読有)

Yamamoto, K. 2013. Recent advances in glycotecnology for glycoconjugate synthesis using microbial endoglycosidases. *Biotechnology Letters*, 35, 1733-1743, doi: 10.1007/s10529-013-1272-9. (査読有)

梅川碧里、芦田久、Lai-Xi Wang、山本憲二. 2013. 糸状菌由来エンドグリコシダーゼ (Endo-M) の新規なグライコシンターゼ様変異体の創製と糖鎖複合体の効率的合成への応用. *日本応用糖質科学会誌*, 3, 143-150. (査読有)

〔学会発表〕(計 1 1 件)

加藤紀彦・山本憲二 : 部位特異的変

異導入によるエンドグリコシダーゼの糖鎖特異性の改変、2016年度日本農芸化学会大会シンポジウム、2016年3月29日、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

石田秀樹・西川宣秀・太田尚志・石原幹生・飯野健太・三郎丸みゆき・飯田純一・羽生正人・丹治嵩裕・湯浅徳行・岩城隼・加藤紀彦・山本憲二・松崎祐二：産業化を指向したN型糖鎖の系統的化学合成と Endo-M 変異体による糖鎖転移、第 67 回日本生物工学会大会、2015年10月27日、鹿児島市城山観光ホテル（鹿児島・鹿児島市）

加藤紀彦・坂口広大・千葉靖典・片山高嶺・熊田純一・松崎祐二・山本憲二：バイオ医薬品の創出に向けた微生物エンドグリコシダーゼの応用、第 67 回日本生物工学会大会、2015年10月27日、鹿児島市城山観光ホテル（鹿児島・鹿児島市）

加藤紀彦・片山高嶺・熊田純一・松崎祐二・山本憲二：部位特異的変異導入による Endo-M の基質特異性の改変、第 34 回日本糖質学会年会、2015年8月2日、東京大学（東京都）

山本憲二：部位特異的変異によるエンド-M酵素の機能改変、理研シンポジウム、2015年7月31日、理化学研究所和光キャンパス（埼玉・和光市）

山本憲二：微生物のエンドグリコシダーゼを用いた機能性糖鎖化合物の合成と糖鎖の改変、公開セミナー：エンド型グリコシダーゼから糖鎖科学を展望する、2015年4月21日、弘前大学（青森・弘前市）

山本憲二：微生物のエンドグリコシダーゼを用いた生理活性物質の合成、2015年度日本農芸化学会大会シンポジウム、2015年3月29日、岡山大学（岡山・岡山市）

山本憲二：微生物のエンドグリコシダーゼを用いた糖鎖の付加と改変、第 12 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム、2014年12月4日、東京医科歯科大学（東京都）

熊田純一、羽生正人、丹治嵩裕・湯浅徳行・岩城隼・加藤紀彦・山本憲二・松崎祐二：Endo-M および Glycosynthase による産業応用を指向した均一構造のN-結合型糖鎖を導入した糖タンパク質の生産、第 33 回日本糖質学会年会、2014年8月11日、名古屋大学（愛知・名古屋市）

坂口広大、加藤紀彦、山本憲二：変異酵素 Endo-MN175H の酵素学的解析と効率的な糖転移反応の検討、2014年度日本農芸化学会大会、2014年3月29日、明治大学生田キャンパス（神奈川・川崎市）

坂口広大、山本憲二：Mucor hiemalis 由来 endo-beta-N-acetylglucosaminidase (Endo-M) の変異酵素の解析とその応用、第 65 回日本生物工学会大会、2013年9月20日、広島国際会議場（広島・広島市）

〔図書〕(計4件)

梅川碧里、芦田久、山本憲二 エヌティーエス、糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック、2015、pp405-407

山本憲二 エヌティーエス、糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック、2015、pp453-456

熊田純一、松崎祐二、山本憲二 シーエムシー出版、抗体医薬における細胞構築・培養・ダウンストリームのすべて、2015、10

Yamamoto, K. Springer, Glycoscience: Biology and Medicine, 2014、9

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：エンドM変異体、及びN結合型糖鎖含有蛋白質の製造法

発明者：山本憲二、加藤紀彦

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2015-037187

出願年月日：2016年2月28日

国内外の別：国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

石川県立大学生物資源工学研究所応用微生物学研究室 Home page
<http://ribb.ishikawa-pu.ac.jp/amb/index.htm>

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・教授

研究者番号：70109049

(2)研究分担者

片山 高嶺 (KATAYAMA, Takane)

石川県立大学・生物資源環境学部・准教授

研究者番号：70346104

(平成25年度まで)

加藤 紀彦 (KATOH, Toshihiko)

石川県立大学・生物資源環境学部・助教

(H26~H27.9)

京都大学大学院・生命科学研究科・助教

(H27.10~)

研究者番号：40724612

(平成26年度より)