

2P-281 複合型糖鎖を遊離・転移する担子菌 *Coprinopsis cirenerea* 由来のエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼの諸性質の解析

○江島 康成, 竹川 薫
(九大院・生資環)
takegawa@agr.kyushu-u.ac.jp

エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase) は N-結合型糖鎖の根本に存在するジアセチルキトビオース間を加水分解して、糖鎖をエンド型に遊離する酵素である。本酵素は、加水分解活性のみならず、種類の糖鎖の受容体の OH 基に糖鎖を転移する活性も持っており、糖タンパク質の糖鎖部分の改変に利用することができる。本研究では担子菌 *Coprinopsis cirenerea* のゲノムから 2 種類の ENGase 遺伝子を見いだしたので、これらを Endo-CC1、Endo-CC2 と名づけ、その諸性質の解析を行った。2つの遺伝子はそれぞれの菌体より cDNA を調製し、PCR により増幅、pET-23b ベクターに連結して大腸菌で発現させたものを His-trap カラム精製を行った。精製した酵素をダンシル化シアロ複合型糖鎖と反応させると、両酵素ともに ENGase 活性を示した。次に種々の PA 化糖鎖と反応させ、HPLC を用いて基質特異性を調べた。その結果、両酵素とも高マンノース型糖鎖に基質特異性があり、複合型糖鎖にも反応できることが分かった。精製が容易であった Endo-CC1 に関してさらに詳細な解析を行った。糖鎖の受容体として GlnNAc を添加して Endo-CC1 とシアログリコペプチドを反応させ、反応液の TLC 分析を行った結果、糖鎖転移活性を有していることが分かった。さらに Endo-CC1 の 180 番目の Asn を他の 19 種類のアミノ酸に置換したところ、Gln と His に置換した Endo-CC1 変異体は糖鎖転移活性が上昇するということが分かった。以上の結果より、Endo-CC1 は天然の糖タンパク質から不均一な糖鎖を遊離させ、目的の糖鎖を転移するという糖鎖のリモデリング手法に利用可能であることがわかった。

Analyse of Endo-β-N-acetylglucosaminidases derived from *Coprinopsis cirenerea*

○Yasunori Eshima, Kaoru Takegawa
(Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ.)

Key words glycosidase, oligosaccharide

2P-282 ビルビン酸化ガラクトース含有糖鎖を分解する酵素の検索および同定と特性解析

○松藤 仁美, 森 一樹, 田代 康介, 久原 哲, 樋口 裕次郎, 竹川 薫
(九大院・生資環)
takegawa@agr.kyushu-u.ac.jp

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の N-結合型糖鎖には、酸性糖鎖として非還元末端のガラクトースにビルビン酸が付加されたビルビン酸化ガラクトース (PvGal) が存在する。分裂酵母において PvGal の生合成については報告されているが、分裂酵母の PvGal 代謝機構や、他の生物の PvGal 含有糖鎖を分解する酵素に関する報告はこれまで全くない。そこで本研究では、土壌細菌の中から PvGal 含有糖鎖を分解する酵素の探索を行い、その諸性質について明らかにすることを目的とした。酵素検索用の基質として、pNP-β-Gal に分裂酵母のビルビン酸転移酵素 Pvg1p を用いてビルビン酸を付加した pNP-β-PvGal を合成した。土壌サンプルの培養液を粗酵素液として用い、pNP-β-PvGal と反応させたところ、グラム陽性 1 細菌の菌体破砕液に pNP-β-PvGal から pNP を遊離する酵素活性を確認した。16S rRNA 配列解析の結果、本菌は *Bacillus cereus* と近縁であることがわかった。次に、本菌の全ゲノム配列の解読を試みた。全推定 ORFの中から、糖質加水分解酵素と推定される遺伝子について順次大腸菌で発現させたところ、pNP-β-PvGal 分解酵素遺伝子を同定した。さらに大腸菌で発現した本酵素との反応液を薄層クロマトグラフィーで解析したところ、本酵素は pNP-β-PvGal を pNP と PvGal とに分解することが強く示唆された。さらに、本酵素は pNP-β-PvGal 分解活性を示すが pNP-β-Gal 分解活性も有し、PvGal にも特異性を示す GH1 ファミリーに属する新奇の β-ガラクトシダーゼであることが示唆された。

Identification and characterization of enzymes required for the degradation of pyruvylated galactose-containing oligosaccharides

○Hitomi Matsufoji, Kazuki Mori, Kousuke Tashiro, Satoru Kuhara, Yujiro Higuchi, Kaoru Takegawa
(Grad. Sch. Bioresour. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ.)

Key words enzyme, pyruvylated galactose

2P-283 グライコシンターゼを用いた均一な糖鎖構造を有する抗体 Fc 領域の生産

○千葉 靖典^{1,3}, 高橋 佳江^{1,3}, 岩城 隼^{2,3}, 石田 秀樹^{2,3},
松崎 祐二^{2,3}, 平林 淳^{1,3}
(¹産総研・創薬基盤, ²東京化成工業, ³次世代バイオ医薬品製造技術研究組合)
y-chiba@aist.go.jp

抗体等のバイオ医薬品の製造プロセスの段階において、細胞株の選抜やスケールアップ時の糖鎖構造の相違を確認するために、糖鎖をより迅速かつ再現性よく解析する技術が求められている。我々は抗体の糖鎖分析の際に用いる手法の適合性を担保するための校正物質の開発を検討している。本演題では、酵母で生産した抗体 Fc 領域の糖鎖を酵素的に処理し、化学合成した糖鎖と付け替えることにより均一な糖鎖構造を有する Fc 領域の調製を検討したので報告する。酵母特異的な糖鎖の合成に関与する *OCH1* 遺伝子を破壊したメタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* (*lindneri*) 株を用いてヒト抗体の Fc 領域の発現を行なった。この Fc 領域に付加する糖鎖は ENGase により切断可能であった。プロテイン A カラムによる精製を行なった結果、250 ml の培養液から約 10 mg の Fc タンパク質を精製することができた。一方、二岐複合型糖鎖を ENGase で切断後、精製し、常法によりオキサゾリン化反応を行なった。またより迅速な処理のため、活性炭カラムを利用した糖鎖の精製法を確立した。このオキサゾリン化糖鎖と糖鎖を切断した Fc タンパク質を混合し、Endo-M 変異体 (グライコシンターゼ) を用いて糖鎖の転移を試みた。その結果、抗体未変性条件下でも 80% 程度の反応収率で糖鎖修飾 Fc タンパク質を得ることが出来た。さらに簡便に反応を進めるため、化学合成した二岐複合型糖鎖を用いて、直接糖鎖を転移する条件を検討した。

Production of IgG Fc region with homogeneous glycan by glycosynthase

○Yasunori Chiba^{1,3}, Yoshie Takahashi^{1,3}, Jun Iwaki^{2,3}, Hideki Ishida^{2,3},
Yuji Matsuzaki^{2,3}, Jun Hirabayashi^{1,3}
(¹BRD, AIST, ²TCI, ³MAB)

Key words antibody, homogeneous glycan, glycosynthase, yeast

2P-284 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

○加藤 紀彦¹, 坂口 広大¹, 千葉 靖典², 片山 高嶺¹, 熊田 純一³,
松崎 祐二³, 山本 憲二¹
(¹石川県大・生物資源研, ²産総研, ³東京化成工業)
yamamoto@ishikawa-pu.ac.jp

【背景と目的】糸状菌 *Mucor hiemalis* 由来の endo-beta-N-acetylglucosaminidase (Endo-M) は、アスパラギン結合型糖鎖のキトビオース部分に作用するエンド型グリコシダーゼである。本酵素は加水分解活性のみならず、遊離した糖鎖を適切な受容体 (転移付加する糖転移活性) をも有するユニークな酵素である。本酵素の変異体 (N175Q: グライコシンターゼ) は、加水分解活性の抑制と、糖オキサゾリン中間体を糖鎖供与体として用いた場合の高い糖転移反応効率のために、均質な糖鎖構造を持つバイオ医薬品を創出するツールとしての応用が試みられている。本研究では Endo-M の部位特異的なアミノ酸置換を行い、実用化が可能となる新規変異体の作成を試みた。

【方法と結果】Endo-M の部位特異的な変異導入は Quick-Change 法によって行った。Endo-M N175H はシアロ複合型糖鎖を有する糖ペプチドを糖鎖供与体として用いた場合、N175Q よりも高い糖転移生成物の収率が示された。一方、W251N はコアフコスを有する基質に対する加水分解活性について WT と比べ約 350 倍の上昇が見出され、さらにビオチン化 Fucosylalpha1-6GlcNAc を受容体とした糖転移反応で糖転移産物の生成が認められた。これら Endo-M 変異体はバイオ医薬品の化学-酵素合成のツールとしての応用が期待できる。本研究は次世代バイオ医薬品製造技術研究組合からの再委託を受けて行った。

Application of microbial endoglycosidase for bio-medicine production

○Toshihiko Katoh¹, Kouta Sakaguchi¹, Yasunori Chiba², Takane Katayama¹,
Jyunichi Kumada³, Yuji Matsuzaki³, Kenji Yamamoto¹
(¹Res. Inst. Bioresour. Biotechnol., ²Ishikawa Pref. Univ., ³AIST, ³TCI)

Key words endo-beta-N-acetylglucosaminidase, bio-medicine