

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013 年 4 月 11 日(11.04.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/051608 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12N 9/24* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *C12P 21/02* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/075650
- (22) 国際出願日: 2012 年 10 月 3 日(03.10.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-219169 2011 年 10 月 3 日(03.10.2011) JP
- (71) 出願人: 独立行政法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関 1 丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 千葉 靖典(CHIBA Yasunori); 〒3058566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 村上智史(MURAKAMI Satoshi); 〒3058566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 成松 久(NARIMATSU Hisashi); 〒3058568 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第 2 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: COMPOSITE SUGAR CHAIN HYDROLASE

(54) 発明の名称: 複合型糖鎖加水分解酵素

(57) Abstract: [Problem] The present invention provides: a novel endo- β -N-acetylglucosaminidase (Endo-Om); and a gene for the endo- β -N-acetylglucosaminidase (Endo-Om). [Solution] The present invention provides a novel endo- β -N-acetylglucosaminidase (Endo-Om) using a transformant produced by cloning an endo- β -N-acetylglucosaminidase (Endo-Om) gene originated from a methanol-utilizing yeast *Ogataea minuta* IFO10746 strain. The Endo-Om according to the present invention has a specific activity 13-fold higher than that of known Endo-M and a V_{max} value 55-fold higher than that of the known Endo-M, and is useful for the analysis of the structures of sugar chains, including composite sugar chains, in glycoproteins and the modification of the sugar chains. Also provided are an endo- β -N-acetylglucosaminidase (Endo-Cp), an endo- β -N-acetylglucosaminidase (Endo-Pa) and an endo- β -N-acetylglucosaminidase (Endo-Zr) which are produced from *Candida parapolymorpha* DL-1 ATCC26012 strain, *Pichia anomala* ATCC36904 strain and *Zygosaccharomyces rouxii* ATCC2623 strain, respectively, on the basis of an Endo-Om gene sequence, and each of which has a similar level of composite sugar chain cleavage activity and a similar level of composite sugar chain transfer activity to those of Endo-Om.

(57) 要約: 【課題】 本発明は、新規エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(Endo-Om)及びその遺伝子を提供する。【解決手段】 本発明は、メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* IFO10746 株由来のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(Endo-Om)遺伝子をクローニングし、形質転換株を用いて新規なエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(Endo-Om)を提供した。本発明の Endo-Om は、公知の Endo-M と比較して 13 倍もの高い比活性および 55 倍もの高い V_{max} を有し、糖タンパク質における複合型糖鎖も含めた糖鎖構造の解析及び糖鎖修飾にとって有用である。さらに、Endo-Om 遺伝子配列をもとに *Candida parapolymorpha* DL-1 ATCC26012 株、*Pichia anomala* ATCC36904 株、及び *Zygosaccharomyces rouxii* ATCC2623 株から、Endo-Om と同様の複合型糖鎖切断活性及び複合型糖鎖転移活性を有するエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(Endo-Cp)、(Endo-Pa)、及び(Endo-Zr)を提供した。

WO 2013/051608 A1

明 細 書

発明の名称：複合型糖鎖加水分解酵素

技術分野

[0001] 本発明は、複合型糖鎖の加水分解酵素及びその遺伝子に関する。

背景技術

[0002] 糖タンパク質は酵母などの微生物からヒトまで真核生物に見られるほか、近年ではいくつかの細菌でも報告されている。その糖鎖の機能はタンパク質の安定性やプロテアーゼ耐性などに関わるだけでなく、高次構造形成のための折りたたみにも必要である。またタンパク質間の相互作用を制御したり、細胞表面のレクチンと結合しシグナル伝達などを起こすことも知られている。これらの糖タンパク質の解析のために、糖鎖を切り離して糖鎖構造を決定することが必要である。アスパラギン残基に結合したN-型糖鎖を切り離す酵素としてはペプチド：N-グリカナーゼやエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼが知られている。後者のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼはN-型糖鎖の還元末端に存在するキトビオースの間を切断する酵素であり、これまでにArthrobacter由来のEndo-A(非特許文献1、特許文献4)、Streptococcus pneumoniae由来のEndo-D(非特許文献2)、Flavobacterium由来のEndo-F(非特許文献3)、Streptomyces plicatus由来のEndo-H(非特許文献4)、Mycosphaerella由来のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(特許文献3)、イネ由来のEndo-0s(非特許文献5)、Mucor hiemalis由来のEndo-M(特許文献1, 2, 5, 非特許文献6, 7)などが知られている。これらの多くはキトビオースの間を切断する分解活性のほか、糖鎖を転移するトランスグリコシダーゼ活性が存在する。すなわち、これらは糖タンパク質のN-結合型糖鎖に作用して糖鎖を切り出し、該糖鎖をアクセプターである糖質や複合糖質に転移する反応を効率よく触媒する。したがって、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼは、糖タンパク質の糖鎖構造の解析のみならず、複合糖質糖鎖の修飾、ネオグライコプロテイン(Neoglycoprotein)の調製、糖タンパク質の糖鎖

部分の均一化等に有用な酵素群である。

しかしながら、主要な生理活性を示す糖タンパク質が有するアスパラギン結合型糖鎖は、その構造から高マンノース型(マンナン型糖鎖)、混成型及び複合型に分類されるが、複合型糖鎖を切断する活性を有すると報告されているのは、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼのうちで、Endo-M、Endo-F2、Endo-F3、Endo-S、Endo-CEである。

Endo-Mはその諸性質が詳しく調べられており、その基質特異性は高マンノース型のMan8GlcNAc2に対する活性を100%とした際に、複合型2分岐糖鎖(agalacto biantennary PA-sugar)に対して4.4%である(非特許文献6)。また3分岐、アシアロ4分岐のN-型糖鎖を切断できるという記載(非特許文献7)がある一方、PA糖鎖を利用した酵素活性測定においては、アシアロ3分岐、アシアロ4分岐に対する活性は検出されていない(非特許文献6)。またコアフコースが付加した2分岐PA化糖鎖も切断できない。

Endo-F2はElizabethkingia miricola由来の酵素であり、高マンノース型および2分岐複合型糖鎖を加水分解するが、混成型糖鎖の加水分解活性はない(非特許文献8)。Endo-F3もElizabethkingia miricola由来の酵素であり、2分岐または3分岐複合型糖鎖を加水分解するが、高マンノース型、混成型糖鎖の加水分解活性はない(非特許文献8)。Endo-SはStreptococcus pyogenes由来の酵素であり、2分岐複合型糖鎖のみを加水分解するが、高マンノース型、混成型糖鎖の加水分解活性はない(非特許文献9)。Endo-CEはCaenorhabditis elegans由来の酵素であり、高マンノース型および2分岐の複合型糖鎖を加水分解するが、混成型糖鎖を切断するかどうかは不明である(非特許文献10)。

複合型糖鎖の修飾に関しても、従来 of 知見からみて、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼのトランスグリコシダーゼ活性の基質特異性は分解活性と同一であるから、複合型糖鎖をアクセプターに転移することができるのもこれらの酵素のみしかない。

糖タンパク質の糖鎖構造の解析の際にはもちろんのこと、複合糖質糖鎖を

含む様々な糖鎖を有する糖タンパク質を合成するためには、Endo-Mとは基質特異性が異なるエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの提供が切望されており、またさらに複合型糖鎖に対する比活性が高い酵素の提供も望まれていた。

先行技術文献

特許文献

- [0003] 特許文献1：特許公開平 1 1 - 3 3 2 5 6 8 号公報
特許文献2：特許公開平 7 - 5 9 5 8 7 号公報
特許文献3：特許公開平 9 - 1 9 1 8 7 5 号公報
特許文献4：特許公開平 9 - 1 7 3 0 8 3 号公報
特許文献5：WO 2 0 0 8 / 1 1 1 5 2 6 号パンフレット
特許文献6：WO 2 0 0 9 / 0 5 7 8 1 3 号パンフレット
特許文献7：特許第 4 4 6 4 2 6 9 号公報

非特許文献

- [0004] 非特許文献1：Takegawa K et al., (1989) Appl Environ Microbiol. 55 : p3107-3112
非特許文献2：Koide N and Muramatsu T, (1974) J Biol Chem. 249 : p4897-4904
非特許文献3：Elder JH and Alexander S, (1982) PNAS U S A. 79 : 4540-4544
非特許文献4：Robbins PW et al., (1984) J Biol Chem. 259 : p7577-7583
非特許文献5：Kimura Y, (2007) In Comprehensive Glycoscience 3 : p61-78
非特許文献6：Fujita et al., (2004) Arch Biochem Biophys. 432 : p41-49
非特許文献7：Kadowaki S et al., (1990) Agric Biol Chem. 54 : p97-106
非特許文献8：Tarentino AL et al., (1993) J Biol Chem. 268 : p9702-9708
非特許文献9：Goodfellow JJ et al., (2012) J Am Chem Sci. 134 : p8030-8033
非特許文献10：Kato T et al., (2002) Glycobiology 12 : p581-587

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、このような従来におけるこれらのアスパラギン結合型糖タンパク質から糖鎖を遊離させる方法、またトランスグリコシダーゼ活性を用いた複合型糖鎖の転移の問題点を解決するためになされたものである。すなわち、これまでに報告されているエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼとは異なる新規の酵素を取得し、基質特異性や比活性などの点でEndo-Mとは異なるエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼおよびその製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、メタノール資化性酵母*Ogataea minuta* IF010746株の特性を研究する中で、その培養上清中に高いエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(Endo-0m)活性が存在することを見いだした。そこで、当該酵母からEndo-0m遺伝子を単離し、塩基配列及び対応するアミノ酸配列を決定した(配列番号1、2)。本発明のEndo-0mは、従来知られているエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼのどの配列とも相同性(同一性)は低く、公知のMucor属由来Endo-Mとはアミノ酸レベルで33.9%、Endo-F2とは8.8%、Endo-F3とは9.0%、Endo-Sとは14.7%、Endo-CEとは18.9%の同一性であり、データベース上で最も近い配列を有するCandida属由来の機能不明タンパク質(hypothetical protein)ともアミノ酸レベルで53.9%程度の同一性しかない新規酵素である。Endo-0m遺伝子を用いて当該遺伝子を単離した*O. minuta*株を形質転換し、Endo-0m遺伝子の過剰発現株を作製することによってエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性が増加した。この過剰発現株からエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを単離し、諸性質を決定することに成功し、本発明を完成させた。

本発明のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(Endo-0m)は、次の酵素的及び理化学的性質を有する；

(1)作用；アスパラギン結合型糖タンパク質にエンド型に作用し、糖鎖を遊離する。

(2)基質特異性；

1)高マンノース型、混成型、2分岐複合型糖鎖のコア構造に存在するN, N'-ジアセチルキトビオース間を切断してオリゴ糖を生成する。

2)高マンノース型M8A-PA糖鎖に対する活性を100%としたとき、高マンノース型M6B-PA糖鎖に対する活性が約103%、複合型2分岐糖鎖(agalacto biantennary PA-sugar)に対する活性が約15%。

(3)至適pH；約5.5

(4)至適温度；45～50℃

(5)遺伝子；2,319bp(Endo-Mとアミノ酸配列で33.9%の相同性)

(6)分子量；87,398Da(アミノ酸配列より)

(7)1mM 複合型2分岐糖鎖(NGA2-Asn-Fmoc)を基質とした際の比活性； $0.80 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$

(Endo-Mの比活性($0.06 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)の約13倍)

(8)複合型2分岐糖鎖(NGA2-Asn-Fmoc)に対する K_m ； $5539 \mu\text{M}$, V_{max} ； $3.88 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$

(Endo-Mの K_m ($176 \mu\text{M}$)の31倍、Endo-Mの V_{max} ($0.070 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)の55倍)

(9)トランスグリコシダーゼ活性；二分岐複合型(NGA2-Asn-Fmoc)を糖供与体、アクセプターをp-ニトロフェニルグルコースとした際に、有意なトランスグリコシダーゼ活性が確認された。

本発明のEndo-0mは、高マンノース型M8A-PA糖鎖に対する活性を100%としたとき、高マンノース型M6B-PA糖鎖に対する活性が約103%、複合型2分岐糖鎖(agalacto biantennary PA-sugar)に対する活性が約15%で、公知のEndo-Mとは基質特異性が異なっており、またEndo-Mの13倍という高い比活性およびEndo-Mの55倍という高い V_{max} を有している。また、本発明により開発された過剰発現系を用いることで大量生産が可能であるから、高品質の酵素を安価に生産できる。

[0007] さらに、本発明のEndo-0mのアミノ酸配列をもとに近縁の酵母類のNCBIアミノ酸配列データベースに対してBLAST検索を行った結果、部分的に相同性の高

い遺伝子が数種類検出された。これら酵母類由来遺伝子をクローニングして配列決定し、その発現産物を精製して得た酵素液の酵素活性を詳細に検討した結果、これら遺伝子発現酵素液のうち、Candida属の *Candida parapolymorpha* DL-1株由来酵素、*Pichia*属の *Pichia anomala*由来酵素、及び *Zygosaccharomyces*属の *Zygosaccharomyces rouxii*由来酵素が、いずれもEndo-0mと同様の高いエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(ENGase)活性を有する新規酵素であることを見出した。それぞれの酵素を「Endo-Cp」、「Endo-Pa」、及び「Endo-Zr」と命名した。

[0008] すなわち、本発明は以下の通りである。

〔1〕 下記の(1)～(5)のいずれかのアミノ酸配列を含むエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質；

(1)配列番号1, 5, 9又は13に示されるアミノ酸配列、

(2)配列番号1, 5, 9又は13に示されるアミノ酸配列のうち、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加されているアミノ酸配列、

(3)配列番号1, 5, 9又は13に示されるアミノ酸配列と70%以上の同一性を有するアミノ酸配列、

(4)配列番号2, 6, 10又は14に示される塩基配列にコードされたアミノ酸配列、

(5)配列番号2, 6, 10又は14に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドの塩基配列によりコードされたアミノ酸配列。

〔2〕 前記〔1〕に記載のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

〔3〕 下記の(1)～(6)のいずれかの塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(1)配列番号2, 6, 10又は14に示される塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(2)配列番号2, 6, 10又は14に示される塩基配列の相補配列からなるポ

リヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

(3)配列番号3及び4に示される塩基配列を含むプライマーセットにより増幅され、配列番号2と70%以上の同一性を有し、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(4)配列番号7及び8に示される塩基配列を含むプライマーセットにより増幅され、配列番号6と70%以上の同一性を有し、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(5)配列番号11及び12に示される塩基配列を含むプライマーセットにより増幅され、配列番号10と70%以上の同一性を有し、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(6)配列番号15及び16に示される塩基配列を含むプライマーセットにより増幅され、配列番号14と70%以上の同一性を有し、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

。

〔4〕 前記〔2〕又は〔3〕に記載のポリヌクレオチドを含有する、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質を発現するためのベクター。

〔5〕 前記〔4〕に記載のベクターが導入されている、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質発現用形質転換細胞。

〔6〕 前記形質転換細胞が*Ogataea minuta*、*Candida parapolymorpha*、*Pichia anomala*、及び*Zygosaccharomyces rouxii*のいずれかの酵母から選択された酵母細胞を宿主とする形質転換細胞である、前記〔5〕に記載の形質転換細胞。

〔7〕 前記〔5〕又は〔6〕に記載の形質転換細胞を用いることを特徴とする、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質の製造方法。

〔８〕 前記〔１〕に記載のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質を用いることを特徴とする、糖タンパク質からアスパラギン結合型糖鎖を切断する方法。

〔９〕 前記〔１〕に記載のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質を用いることを特徴とする、アスパラギン結合型糖鎖を任意のアクセプター分子に対して転移する方法。

発明の効果

[0009] 本発明におけるエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼEndo-0mは、公知のEndo-Mとは、アミノ酸配列レベルでの同一性は33.9%と低く、高マンノース型M8A-PA糖鎖に対する活性を100%としたとき、高マンノース型M6B-PA糖鎖に対する活性が約103%、複合型2分岐糖鎖(agalacto biantennary PA-sugar)に対する活性が約15%である点で基質特異性も異なる上に、Endo-Mの13倍という高い比活性およびEndo-Mの55倍という高いVmaxを有している点で、明らかに新規酵素であるが、Endo-Mの特性である、複合型糖鎖を加水分解でき、かつ複合型糖鎖に対するトランスグリコシダーゼ活性も有する、という優れた機能はそのまま保持し、その非活性および最大反応速度が顕著に高いという特性も兼ね備えていることから、特に、糖タンパク質における複合型糖鎖も含めた糖鎖構造の解析及び糖鎖修飾などの有用性に大きな期待が持てる。さらに、本発明により開発された過剰発現系を用いることで、この高品質のEndo-0m酵素を大量生産により安価に供給できる。

本発明の他のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼであるEndo-Cp、Endo-Pa及びEndo-Zrも同様の複合型糖鎖切断活性及び複合型糖鎖転移活性を有しており、Endo-0mと同様の用途が期待される。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1はEndo-0m遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列を示す。図中、下線部はGH family 85 ENGaseに高度に保存されている配列。■は推定の活性中心アミノ酸残基。

[図2]図2はEndo-0mと酵母に近い生物種由来のENGaseとの系統樹である。図

中、括弧内の数値はアミノ酸配列の長さとの相同性を示す。Accession No., *Ashbya gossypii*, NP_986144; *Mucor hiemalis* (Endo-M), BAB43869; *Candida parapolymorpha* DL-1 (*Hansenula polymorpha* DL-1), EFW94296; *Pichia anomala*, CAC69142; *Zygosaccharomyces rouxii*, XP_002495262.

[図3] 図3はEndo-0m過剰発現0.minuta株におけるタンパク質の発現と酵素活性の測定結果を示す。A. ウェスタンブロッティングによるEndo-0m過剰発現の確認 B. HPLCによる酵素反応検出結果 C. Endo-0m過剰発現株の比活性

[図4] 図4は組換え型Endo-0mの精製サンプルのSDS-PAGE結果である。

[図5] 図5はEndo-0mと市販のEndo-MのKmとVmaxの測定結果を示す。

[図6] 図6はEndo-0mの至適反応条件(pH、温度)の測定結果を示す。A. 至適pH B. 至適温度

[図7] 図7はEndo-0mのトランスグリコシダーゼ活性の有無の検出結果を示す。A. Endo-0mの糖転移反応図 B. HPLCによる糖転移活性の検出 C. 糖転移反応物のMSパターン

[図8] 図8はEndo-Cp遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列を示す。図中、下線部はGH family 85 ENGaseに高度に保存されている配列。■は推定の活性中心アミノ酸残基。

[図9] 図9はEndo-Cp部分精製酵素液のSDS-PAGEとウェスタンブロッティング、酵素活性測定の結果を示す。A. SDS-PAGE B. ウェスタンブロッティング C. HPLCによる酵素活性の検出

[図10] 図10はEndo-Cpの至適反応条件(pH、温度)の測定結果を示す。A. 至適pH B. 至適温度

[図11] 図11はEndo-Cpのトランスグリコシダーゼ活性の有無の検出結果を示す。A. Endo-0mの糖転移反応図 B. HPLCによる糖転移活性の検出 C. 糖転移反応物のMSパターン

[図12] 図12はEndo-Pa遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列を示す。図中、下線部はGH family 85 ENGaseに高度に保存されている配列。■は推定の活性中心

アミノ酸残基。

[図13]図 1 3 はEndo-Pa部分精製酵素液のSDS-PAGEとウェスタンブロッティング、酵素活性測定の結果を示す。 A. SDS-PAGE B. ウェスタンブロッティング C. HPLCによる酵素活性の検出

[図14]図 1 4 はEndo-Paの至適反応条件(pH、温度)の測定結果を示す。 A. 至適pH B. 至適温度

[図15]図 1 5 はEndo-Paのトランスグリコシダーゼ活性の有無の検出結果を示す。 A. Endo-Paの糖転移反応図 B. HPLCによる糖転移活性の検出 C. 糖転移反応物のMSパターン

[図16]図 1 6 はEndo-Zr遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列を示す。図中、下線部はGH family 85 ENGaseに高度に保存されている配列。■は推定の活性中心アミノ酸残基。

[図17]図 1 7 はEndo-Zr部分精製酵素液のSDS-PAGEとウェスタンブロッティング、酵素活性測定の結果を示す。 A. SDS-PAGE B. ウェスタンブロッティング C. HPLCによる酵素活性の検出

[図18]図 1 8 はEndo-Zrの至適反応条件(pH、温度)の測定結果を示す。 A. 至適pH B. 至適温度

発明を実施するための形態

[0011] 1. 本発明のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼについて

1-1. 「Endo-0m」について

(1) 酵素学的及び理化学的性質；

(1) 作用； アスパラギン結合型糖タンパク質にエンド型に作用し、糖鎖を遊離する。

(2) 基質特異性；

1) 高マンノース型、混成型、2分岐複合型糖鎖のコア構造に存在するN, N'-ジアセチルキトビオース間を切断してオリゴ糖を生成する。

2) 高マンノース型M8A-PA糖鎖に対する活性を100%としたとき、高マンノース型M6B-PA糖鎖に対する活性が約103%、複合型2分岐糖鎖(agalacto biante

nary PA-sugar)に対する活性が約15%。

(3)至適pH； 約5.5

(4)至適温度； 45～50℃

(5)遺伝子； 2,319bp(Endo-Mとアミノ酸配列で33.9%の相同性)

(6)分子量； 87,398 Da(アミノ酸配列より)

(7)1mM 複合型2分岐糖鎖(NGA2-Asn-Fmoc)を基質とした際の比活性； $0.80 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$

(Endo-Mの比活性($0.06 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)の約13倍)

(8) 複合型2分岐糖鎖(NGA2-Asn-Fmoc)に対する K_m ； $5539 \mu\text{M}$, $V_{\max}$ $3.88 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$

(Endo-Mの K_m ($176 \mu\text{M}$)の31倍、Endo-Mの $V_{\max}$ ($0.070 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)の55倍)

(9)トランスグリコシダーゼ活性；二分岐複合型(NGA2-Asn-Fmoc)を糖供与体、アクセプターをp-ニトロフェニルグルコースとした際に、有意なトランスグリコシダーゼ活性が確認された。

[0012] (2)アミノ酸配列及び塩基配列

本発明のエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ(Endo-0m)は、以下の(1)～(5)のいずれかのアミノ酸配列を含むエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質、として表すことができる。好ましくは、酵母由来、特に、Ogataea属酵母由来のタンパク質であることが好ましい。

(1)配列番号1に示されるアミノ酸配列、

(2)配列番号1に示されるアミノ酸配列のうち、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加されているアミノ酸配列、(なお、数個とは1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個を表す。)

(3)配列番号1に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%以上の同一性を有するアミノ酸配列、(なお、好ましくは、80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上の同一性を有するアミノ酸配列である。)

(4)配列番号2に示される塩基配列にコードされたアミノ酸配列、

(5)配列番号2に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとス

トリンジエントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドの塩基配列によりコードされたアミノ酸配列。

ここで、ストリンジエントな条件とは、T.Maniatisら編、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratoryなどに記載の通常のハイブリダイゼーション操作で、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件である。例えば、6×SSC (1×SSCは0.15M NaCl、0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、0.5% SDS、5×デンハルツ [Denhardt's, 0.1%ウシ血清アルブミン (BSA)、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%フィコール400] 及び100 µg/mlサケ精子DNA中で、50℃で4時間～一晩保温を行う条件が挙げられる。よりストリンジエンシーを高めたい場合は、さらに2×SSC、0.5% SDS、25%ホルムアミド、5×デンハルツ及び100 µg/mlサケ精子DNA中で、55℃で4時間～一晩保温を行う条件を適用することができる。一般には、全塩基配列中の15%未満、好ましくは10%未満のミスマッチを許容する条件であるといえることができる。

さらに、本発明のEndo-0m活性を有するタンパク質は、配列番号1に示されるアミノ酸配列をもとに、NCBIのGenBankアミノ酸配列データベースに対するBLAST検索により30%以上、好ましくは40%以上、より好ましくは50%以上、さらに好ましくは70%以上、最も好ましくは80%以上のホモロジーで検出される酵母由来のアミノ酸配列からなり、かつエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質である。特に、Ogataea属酵母由来遺伝子であることが好ましい。

または、配列番号2に示される塩基配列をもとに、NCBIのGenBank塩基配列データベースに対するBLAST検索により、30%以上、好ましくは40%以上、より好ましくは50%以上、さらに好ましくは70%以上、最も好ましくは80%以上のホモロジーで検出される酵母由来の塩基配列からなる遺伝子によりコードされ、かつエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質であると表現することができる。

また、本発明のEndo-0m遺伝子は、上記(1)～(5)のいずれかのアミノ酸配列

を含むエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド、と表現することができるが、以下の(1)~(3)のいずれかのポリヌクレオチドとしても、表すことができる。なお、好ましくは、酵母由来、特に、*Ogataea*属酵母由来のポリヌクレオチドであることが好ましい。

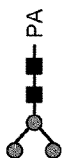
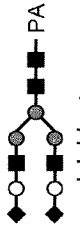
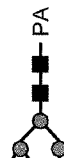
- (1)配列番号2に示される塩基配列を含むポリヌクレオチド、
- (2)配列番号2に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件でハイブリダイズし、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。
- (3)配列番号3及び4に示される塩基配列を含むプライマーセットにより増幅され、配列番号2と70%以上の同一性を有し、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。(なお、好ましくは、80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上の同一性を有する塩基配列である。)

ここで、図2に示されるように、本発明のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(Endo-0m)は、公知のMucor属由来Endo-Mとは、アミノ酸配列レベルで33.9%の同一性しかなく、データベース内での最も近い位置のCandida属由来の機能不明タンパク質ともアミノ酸レベルで53.9%程度の同一性しかない、特異的な配列を有しているから、配列番号1に示されるアミノ酸配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドであれば、きわめてEndo-0m活性を有している蓋然性が高く、配列番号2に示される塩基配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の同一性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチドもまたEndo-0m遺伝子である蓋然性が高いといえる。ポリペプチドやポリヌクレオチドのホモロジー検索は、例えば、日本DNAデータバンク(DNA Databank of JAPAN(DDBJ))等を対象に、FASTAやBLASTなどのプログラムを用いて行うことができる。

[0013] (3)各種糖鎖に対する加水分解活性

本発明のEndo-0m精製酵素液を用いて、各種のPAラベル化された市販の複合糖鎖(TaKaRa-Bio社)に対する加水分解活性を測定した測定結果を、Endo-Mに関する論文(非特許文献6)の測定値と共に下記(表1)に示した。その際の加水分解活性は、HPLCにおける基質のPAラベル化糖鎖およびその加水分解物のピーク面積比から算出し、M8A構造の糖鎖に対する加水分解活性を100%として各種糖鎖に対する相対活性を算出した。

[表1]

Substrate	Endo-Om	Endo-M*	Substrate	Endo-Om	Endo-M*
 M3B	55.9%	19.5%	 sialobiantennary	1.6%	7.0%
 M5A	13.7%	15.4%	 biantennary	4.6%	13.3%
 M6B	103%	74.0%	 fucosyl biantennary	ND	ND
 M8A	100%	100%	 agalacto biantennary	15.1%	4.4%
 M9A	81.3%	66.5%	 agalacto triantennary	ND	ND
 hybrid-type (bisecting GlcNAc)	0.8%	—	 agalacto tetraantennary	ND	ND
 hybrid-type	5.9%	—			

M8Aを基質にしたときの酵素活性を100%として相対活性を算出した。(*)Endo-Mの相対活性はFujita *et al.*, (2004) Arch Biochem Biophys. 432: p41-49 より引用した。●: Mannose, ■: GlcNAc, O: Galactose, ▲: Fucose, ◆: Neu5Ac, ND: Not detected.

上記(表1)の結果から見て、Endo-OmはEndo-Mと同様に高マンノース型糖鎖に対する加水分解活性が高く、さらに混成型糖鎖や2分岐の複合糖鎖を加水分解する。一方で、分岐が3つ以上の複合糖鎖やコアフコース構造を持つ糖

鎖は分解できない。また、いくつかの糖鎖に対する反応性がEndo-Mとは異なっており、特にagalacto biantennary、M3B、M6B、M9A構造の糖鎖に対してはEndo-Mと比較して高い反応性を示す。

[0014] (4) トランスグリコシダーゼ活性

Endo-0mはEndo-Mと同様に、任意のアクセプター分子に対して糖鎖を転移する活性を有している。典型的なアクセプター分子は、グルコースまたはGlcNAcなどの単糖又はその誘導体であるが、それらを有する糖ペプチドや糖タンパク質に対しても転移させることができる。転移させることができる糖鎖は、アスパラギン結合型糖鎖であり、化学合成された糖鎖でも切断された糖鎖でもよい。

Endo-0mのトランスグリコシダーゼ活性を、基質の2分岐複合糖鎖、アクセプター分子(p-ニトロフェニルグルコース)およびEndo-0m精製酵素液を含む反応液を30℃で3時間インキュベートし、反応終了後にHPLCに供することにより検出したところ、加水分解物とは異なる新たなピークが検出され、MS解析によりアクセプター分子に2分岐複合糖鎖が付加された糖転移反応物であることが確認された(図7)。

[0015] 1-2. 「Endo-Cp」について

(1) 酵素学的及び理化学的性質；

(1) 作用； アスパラギン結合型糖タンパク質にエンド型に作用し、糖鎖を遊離する。

(2) 基質特異性；

1) 高マンノース型、混成型、2分岐複合型糖鎖のコア構造に存在するN, N'-ジアセチルキトビオース間を切断してオリゴ糖を生成する。

2) 高マンノース型M8A-PA糖鎖に対する活性を100%としたとき、高マンノース型M6B-PA糖鎖に対する活性が約172%、複合型2分岐糖鎖(agalacto biantennary PA-sugar)に対する活性が約7.0%。

(3) 至適pH； 約5.5

(4) 至適温度； 60℃

- (5) 遺伝子 ; 2,238bp(Endo-Mとアミノ酸配列で38.2%の相同性)
- (6) 分子量 ; 86,500Da(アミノ酸配列より)
- (7) トランスグリコシダーゼ活性 ; 二分岐複合型(NGA2-Asn-Fmoc)を糖供与体、アクセプターをp-ニトロフェニルグルコースとした際に、有意なトランスグリコシダーゼ活性が確認された。

[0016] (2) アミノ酸配列及び塩基配列

本発明のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(Endo-Cp)は、以下の(1)~(5)のいずれかのアミノ酸配列を含むエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質、として表すことができる。好ましくは、酵母由来、より好ましくはCandida属酵母由来、最も好ましくはCandida parapsilomatis由来のタンパク質である。

- (1) 配列番号5に示されるアミノ酸配列、
- (2) 配列番号5に示されるアミノ酸配列のうち、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加されているアミノ酸配列、(なお、数個とは1~20個、好ましくは1~10個、より好ましくは1~5個を表す。)
- (3) 配列番号5に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%以上の同一性を有するアミノ酸配列、(なお、好ましくは、80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上の同一性を有するアミノ酸配列である。)
- (4) 配列番号6に示される塩基配列にコードされたアミノ酸配列、
- (5) 配列番号6に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドの塩基配列によりコードされたアミノ酸配列。(なお、ストリンジントな条件については、上述の通り。)

さらに、本発明のEndo-Cp活性を有するタンパク質は、配列番号5に示されるアミノ酸配列をもとに、NCBIのGenBankアミノ酸配列データベースに対するBLAST検索により30%以上、好ましくは40%以上、より好ましくは50%以上、さらに好ましくは70%以上、最も好ましくは80%以上のホモロジーで検出される酵母由来のアミノ酸配列からなり、かつエンド- β -N-アセチルグルコサ

ミニダーゼ活性を有するタンパク質である。特に、*Candida*属酵母由来遺伝子、とりわけ*Candida parapolymorpha*由来であることが好ましい。

または、配列番号6に示される塩基配列をもとに、NCBIのGenBank塩基配列データベースに対するBLAST検索により、30%以上、好ましくは40%以上、より好ましくは50%以上、さらに好ましくは70%以上、最も好ましくは80%以上のホモロジーで検出される酵母由来の塩基配列からなる遺伝子によりコードされ、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質であると表現することができる。

また、本発明のEndo-Cp遺伝子は、上記(1)～(5)のいずれかのアミノ酸配列を含むエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド、と表現することができるが、以下の(1)～(3)のいずれかのポリヌクレオチドとしても、表すことができる。なお、好ましくは、酵母由来、特に、*Candida*属酵母由来のポリヌクレオチドであることが好ましい。

- (1)配列番号6に示される塩基配列を含むポリヌクレオチド、
- (2)配列番号6に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。
- (3)配列番号7及び8に示される塩基配列を含むプライマーセットにより増幅され、配列番号6と70%以上の同一性を有し、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。(なお、好ましくは、80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上の同一性を有する塩基配列である。)

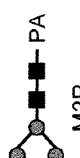
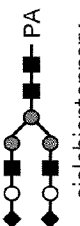
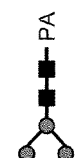
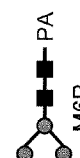
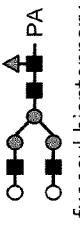
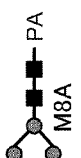
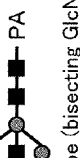
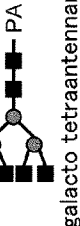
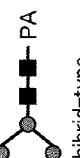
ここで、図2に示されるように、本発明のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(Endo-Cp)は、本発明の*Ogataea minuta*由来「Endo-0m」とは、アミノ酸配列レベルで53.9%の同一性があり、同時に見出された*Pichia anomala*由来の「Endo-Pa」酵素、及び*Zygosaccharomyces rouxii*由来「Endo-Zr」酵素とは、それぞれ42.8%及び31.9%の同一性を有している。また、公知のMuc

or属由来「Endo-M」とは、アミノ酸配列レベルで38.2%の同一性しかない。このように、本発明の「Endo-Cp」は特異的な配列を有しているから、配列番号5に示されるアミノ酸配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドであれば、きわめてEndo-Cp活性を有している蓋然性が高く、配列番号6に示される塩基配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の同一性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチドもまたEndo-Cp遺伝子である蓋然性が高いといえる。ポリペプチドやポリヌクレオチドのホモロジー検索は、例えば、日本DNAデータバンク(DNA Databank of JAPAN(DDBJ))等を対象に、FASTAやBLASTなどのプログラムを用いて行うことができる。

[0017] (3) 各種糖鎖に対する加水分解活性

本発明のEndo-Cp部分精製酵素液を用いて、各種のPAラベル化された市販の複合糖鎖(TaKaRa-Bio社)に対する加水分解活性を測定した測定結果を、Endo-Mに関する論文(非特許文献6)の測定値と共に下記(表2)に示した。その際の加水分解活性は、HPLCにおける基質のPAラベル化糖鎖およびその加水分解物のピーク面積比から算出し、M8A構造の糖鎖に対する加水分解活性を100%として各種糖鎖に対する相対活性を算出した。

[表2]

Substrate	Endo-Cp	Endo-M*	Substrate	Endo-Cp	Endo-M*
 M3B	37.3%	19.5%	 PA sialobiantennary	1.1%	7.0%
 M5A	15.1%	15.4%	 PA biantennary	3.1%	13.3%
 M6B	172%	74.0%	 PA fucosyl biantennary	ND	ND
 M8A	100%	100%	 PA agalacto biantennary	7.0%	4.4%
 M9A	21.6%	66.5%	 PA agalacto triantennary	ND	ND
 hybrid-type (bisecting GlcNAc)	0.4%	—	 PA agalacto tetraantennary	ND	ND
 hibrid-type	4.7%	—			

M8Aを基質にしたときの酵素活性を100%として相対活性を算出した。(*) Endo-Mの相対活性はFujita *et al.*, (2004) Arch Biochem Biophys. 432: p41-49 より引用した。●: Mannose, ■: GlcNAc, O: Galactose, ▲: Fucose, ◆: Neu5Ac, ND: Not detected.

上記(表2)の結果から見て、Endo-CpはEndo-Mと同様に高マンノース型糖鎖に対する加水分解活性が高く、さらに混成型糖鎖や2分岐の複合糖鎖を加水分解する。一方で、分岐が3つ以上の複合糖鎖やコアフコース構造を持つ糖

鎖は分解できない。また、いくつかの糖鎖に対する反応性がEndo-Mとは異なり、特にagalacto biantennary、M3B、M6B構造の糖鎖に対してはEndo-Mと比較して高い反応性を示す。

[0018] (4) トランスグリコシダーゼ活性

Endo-CpはEndo-Mと同様に、任意のアクセプター分子に対して糖鎖を転移する活性を有している。典型的なアクセプター分子は、グルコースまたはGlcNAcなどの単糖又はその誘導体であるが、それらを有する糖ペプチドや糖タンパク質に対しても転移させることができる。転移させることができる糖鎖は、アスパラギン結合型糖鎖であり、化学合成された糖鎖でも切断された糖鎖でもよい。

Endo-Cpのトランスグリコシダーゼ活性を、基質の2分岐複合糖鎖、アクセプター分子(p-ニトロフェニルグルコース)およびEndo-Cp部分精製酵素液を含む反応液を30℃で3時間インキュベートし、反応終了後にHPLCに供することにより検出したところ、加水分解物とは異なる新たなピークが検出され、MS解析によりアクセプター分子に2分岐複合糖鎖が付加された糖転移反応物であることが確認された(図11)。

[0019] 1-3. 「Endo-Pa」について

(1) 酵素学的及び理化学的性質；

(1) 作用； アスパラギン結合型糖タンパク質にエンド型に作用し、糖鎖を遊離する。

(2) 基質特異性；

1) 高マンノース型、混成型、2分岐複合型糖鎖のコア構造に存在するN, N'-ジアセチルキトビオース間を切断してオリゴ糖を生成する。

2) 高マンノース型M8A-PA糖鎖に対する活性を100%としたとき、高マンノース型M6B-PA糖鎖に対する活性が約140%、複合型2分岐糖鎖(agalacto biantennary PA-sugar)に対する活性が約54.4%。

(3) 至適pH； 約5.0～5.5

(4) 至適温度； 40℃

- (5) 遺伝子 ; 1,971bp(Endo-Mとアミノ酸配列で33.0%の相同性)
- (6) 分子量 ; 76,050Da(アミノ酸配列より)
- (7) トランスグリコシダーゼ活性 ; 二分岐複合型(NGA2-Asn-Fmoc)を糖供与体、アクセプターをp-ニトロフェニルグルコースとした際に、有意なトランスグリコシダーゼ活性が確認された。

[0020] (2) アミノ酸配列及び塩基配列

本発明のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(Endo-Pa)は、以下の(1)～(5)のいずれかのアミノ酸配列を含むエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質、として表すことができる。好ましくは、酵母由来、特にPichia属酵母由来、とりわけPichia anomala由来のタンパク質であることが好ましい。

- (1) 配列番号9に示されるアミノ酸配列、
- (2) 配列番号9に示されるアミノ酸配列のうち、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加されているアミノ酸配列、(なお、数個とは1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個を表す。)
- (3) 配列番号9に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%以上の同一性を有するアミノ酸配列、(なお、好ましくは、80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上の同一性を有するアミノ酸配列である。)
- (4) 配列番号10に示される塩基配列にコードされたアミノ酸配列、
- (5) 配列番号10に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドの塩基配列によりコードされたアミノ酸配列。(なお、ストリンジェントな条件については、上述の通り。)

さらに、本発明のEndo-Pa活性を有するタンパク質は、配列番号9に示されるアミノ酸配列をもとに、NCBIのGenBankアミノ酸配列データベースに対するBLAST検索により30%以上、好ましくは40%以上、より好ましくは50%以上、さらに好ましくは70%以上、最も好ましくは80%以上のホモロジーで検出される酵母由来のアミノ酸配列からなり、かつエンド- β -N-アセチルグルコサ

ミニダーゼ活性を有するタンパク質である。特に、*Pichia*属酵母由来遺伝子、とりわけ*Pichia anomala*由来遺伝子であることが好ましい。

または、配列番号10に示される塩基配列をもとに、NCBIのGenBank塩基配列データベースに対するBLAST検索により、30%以上、好ましくは40%以上、より好ましくは50%以上、さらに好ましくは70%以上、最も好ましくは80%以上のホモロジーで検出される酵母由来の塩基配列からなる遺伝子によりコードされ、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質であると表現することができる。

また、本発明のEndo-Pa遺伝子は、上記(1)～(5)のいずれかのアミノ酸配列を含むエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド、と表現することができるが、以下の(1)～(3)のいずれかのポリヌクレオチドとしても、表すことができる。なお、好ましくは、酵母由来、特に、*Pichia*属酵母由来、とりわけ*Pichia anomala*由来のポリヌクレオチドであることが好ましい。

- (1)配列番号10に示される塩基配列を含むポリヌクレオチド、
- (2)配列番号10に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。
- (3)配列番号11及び12に示される塩基配列を含むプライマーセットにより増幅され、配列番号10と70%以上の同一性を有し、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。(なお、好ましくは、80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上の同一性を有する塩基配列である。)

ここで、図2に示されるように、本発明のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(Endo-Pa)は、本発明の*Ogataea minuta*由来「Endo-0m」とは、アミノ酸配列レベルで42.5%の同一性があり、同時に見出された*Candida parapolymorpha* DL-1由来の「Endo-Cp」酵素、及び*Zygosaccharomyces rouxii*由来「Endo-Zr」酵素とは、それぞれ42.8%及び30.2%の同一性を有している。ま

た、公知のMucor属由来「Endo-M」とは、アミノ酸配列レベルで33.0%の同一性しかない。このように、本発明の「Endo-Pa」は特異的な配列を有しているから、配列番号9に示されるアミノ酸配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドであれば、きわめてEndo-Pa活性を有している蓋然性が高く、配列番号10に示される塩基配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の同一性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチドもまたEndo-Pa遺伝子である蓋然性が高いといえる。ポリペプチドやポリヌクレオチドのホモロジー検索は、例えば、日本DNAデータバンク(DNA Databank of JAPAN(DDBJ))等を対象に、FASTAやBLASTなどのプログラムを用いて行うことができる。

[0021] (3) 各種糖鎖に対する加水分解活性

本発明のEndo-Pa部分精製酵素液を用いて、各種のPAラベル化された市販の複合糖鎖(TaKaRa-Bio社)に対する加水分解活性を測定した測定結果を、Endo-Mに関する論文(非特許文献6)の測定値と共に下記(表3)に示した。その際の加水分解活性は、HPLCにおける基質のPAラベル化糖鎖およびその加水分解物のピーク面積比から算出し、M8A構造の糖鎖に対する加水分解活性を100%として各種糖鎖に対する相対活性を算出した。

[表3]

Substrate	Endo-Pa	Endo-M*	Substrate	Endo-Pa	Endo-M*
 M3B	152%	19.5%	 sialobiantennary	36.3%	7.0%
 M5A	94.3%	15.4%	 biantennary	40.5%	13.3%
 M6B	140%	74.0%	 fucosyl biantennary	ND	ND
 M8A	100%	100%	 agalacto biantennary	54.4%	4.4%
 M9A	115%	66.5%	 agalacto triantennary	ND	ND
 hybrid-type (bisecting GlcNAc)	4.0%	—	 agalacto tetraantennary	ND	ND
 hybrid-type	35.4%	—			

M8Aを基質にしたときの酵素活性を100%として相対活性を算出した。(※)Endo-Mの相対活性はFujita *et al.*, (2004) Arch Biochem Biophys. 432: p41-49 より引用した。●: Mannose, ■: GlcNAc, O: Galactose, ▲: Fucose, ◆: Neu5Ac, ND: Not detected.

上記(表3)の結果から見て、Endo-PaはEndo-Mと同様に高マンノース型糖鎖に対する加水分解活性が高く、さらに混成型糖鎖や2分岐の複合糖鎖を加水分解する。一方で、分岐が3つ以上の複合糖鎖やコアフコース構造を持つ糖

鎖は分解できない。また、ほとんどの糖鎖でEndo-Mと比較して高い反応性を示す。

[0022] (4) トランスグリコシダーゼ活性

Endo-PaはEndo-Mと同様に、任意のアクセプター分子に対して糖鎖を転移する活性を有している。典型的なアクセプター分子は、グルコースまたはGlcNAcなどの単糖又はその誘導体であるが、それらを有する糖ペプチドや糖タンパク質に対しても転移させることができる。転移させることができる糖鎖は、アスパラギン結合型糖鎖であり、化学合成された糖鎖でも切断された糖鎖でもよい。

Endo-Paのトランスグリコシダーゼ活性を、基質の2分岐複合糖鎖、アクセプター分子(p-ニトロフェニルグルコース)およびEndo-Pa部分精製酵素液を含む反応液を30℃で16時間インキュベートし、反応終了後にHPLCに供することにより検出したところ、加水分解物とは異なる新たなピークが検出され、MS解析によりアクセプター分子に2分岐複合糖鎖が付加された糖転移反応物であることが確認された(図15)。

[0023] 1-4. 「Endo-Zr」について

(1) 酵素学的及び理化学的性質；

(1) 作用； アスパラギン結合型糖タンパク質にエンド型に作用し、糖鎖を遊離する。

(2) 基質特異性；

1) 高マンノース型、混成型、2分岐複合型糖鎖のコア構造に存在するN, N'-ジアセチルキトビオース間を切断してオリゴ糖を生成する。

2) 高マンノース型M8A-PA糖鎖に対する活性を100%としたとき、高マンノース型M6B-PA糖鎖に対する活性が約127%、複合型2分岐糖鎖(agalacto biantennary PA-sugar)に対する活性が約23.6%。

(3) 至適pH； 約4.5～5.0

(4) 至適温度； 40℃

(5) 遺伝子； 1920bp(Endo-Mとアミノ酸配列で29.4%の相同性)

(6)分子量； 73,105Da(アミノ酸配列より)

(7)トランスグリコシダーゼ活性；検出されなかった。

[0024] (2)アミノ酸配列及び塩基配列

本発明のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(Endo-Zr)は、以下の(1)～(5)のいずれかのアミノ酸配列を含むエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質、として表すことができる。好ましくは、酵母由来、特に、*Zygosaccharomyces*属酵母由来、とりわけ*Zygosaccharomyces rouxii*由来のタンパク質であることが好ましい。

(1)配列番号13に示されるアミノ酸配列、

(2)配列番号13に示されるアミノ酸配列のうち、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加されているアミノ酸配列、(なお、数個とは1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個を表す。)

(3)配列番号13に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%以上の同一性を有するアミノ酸配列、(なお、好ましくは、80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上の同一性を有するアミノ酸配列である。)

(4)配列番号14に示される塩基配列にコードされたアミノ酸配列、

(5)配列番号14に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドの塩基配列によりコードされたアミノ酸配列。(なお、ストリンジェントな条件については、上述の通り。)

さらに、本発明のEndo-Zr活性を有するタンパク質は、配列番号13に示されるアミノ酸配列をもとに、NCBIのGenBankアミノ酸配列データベースに対するBLAST検索により30%以上、好ましくは40%以上、より好ましくは50%以上、さらに好ましくは70%以上、最も好ましくは80%以上のホモロジーで検出される酵母由来のアミノ酸配列からなり、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質である。特に、*Zygosaccharomyces*属酵母由来遺伝子であることが好ましい。

または、配列番号14に示される塩基配列をもとに、NCBIのGenBank塩基配

列データベースに対するBLAST検索により、30%以上、好ましくは40%以上、より好ましくは50%以上、さらに好ましくは70%以上、最も好ましくは80%以上のホモロジーで検出される酵母由来の塩基配列からなる遺伝子によりコードされ、かつエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質であると表現することができる。

また、本発明のEndo-Zr遺伝子は、上記(1)～(5)のいずれかのアミノ酸配列を含むエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド、と表現することができるが、以下の(1)～(3)のいずれかのポリヌクレオチドとしても、表すことができる。なお、好ましくは、酵母由来、特に、*Zygosaccharomyces*属酵母由来のポリヌクレオチドであることが好ましい。

- (1)配列番号14に示される塩基配列を含むポリヌクレオチド、
- (2)配列番号14に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。
- (3)配列番号15及び16に示される塩基配列を含むプライマーセットにより増幅され、配列番号14と70%以上の同一性を有し、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。(なお、好ましくは、80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上の同一性を有する塩基配列である。)

ここで、図2に示されるように、本発明のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(Endo-Zr)は、本発明の*Ogataea minuta*由来「Endo-0m」とは、アミノ酸配列レベルで30.6%の同一性があり、同時に見出された*Candida parapsilosis* DL-1由来の「Endo-Cp」酵素、及び*Pichia anomala*由来の「Endo-Pa」酵素とは、それぞれ31.9%及び30.2%の同一性を有している。また、公知の*Mucor*属由来「Endo-M」とは、アミノ酸配列レベルで29.4%の同一性しかない。このように、本発明の「Endo-Zr」は特異的な配列を有しているから、配列番号13に示されるアミノ酸配列と70%以上、好ましくは80%以上、より

好ましくは90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドであれば、きわめてEndo-Zr活性を有している蓋然性が高く、配列番号14に示される塩基配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の同一性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチドもまたEndo-Zr遺伝子である蓋然性が高いといえる。ポリペプチドやポリヌクレオチドのホモロジー検索は、例えば、日本DNAデータバンク(DNA Databank of JAPAN(DDBJ))等を対象に、FASTAやBLASTなどのプログラムを用いて行うことができる。

[0025] (3) 各種糖鎖に対する加水分解活性

本発明のEndo-Zr部分精製酵素液を用いて、各種のPAラベル化された市販の複合糖鎖(TaKaRa-Bio社)に対する加水分解活性を測定した測定結果を、Endo-Mに関する論文(非特許文献6)の測定値と共に下記(表4)に示した。その際の加水分解活性は、HPLCにおける基質のPAラベル化糖鎖およびその加水分解物のピーク面積比から算出し、M8A構造の糖鎖に対する加水分解活性を100%として各種糖鎖に対する相対活性を算出した。

[表4]

Substrate	Endo-Zr	Endo-M*	Substrate	Endo-Zr	Endo-M*
 M3B	85.7%	19.5%	 sialobiantennary	17.3%	7.0%
 M5A	39.8%	15.4%	 biantennary	30.0%	13.3%
 M6B	127%	74.0%	 fucosyl biantennary	ND	ND
 M8A	100%	100%	 agalacto biantennary	23.6%	4.4%
 M9A	33.4%	66.5%	 agalacto triantennary	ND	ND
 hybrid-type (bisecting GlcNAc)	ND	-	 agalacto tetraantennary	ND	ND
 hybrid-type	13.2%	-			

M8Aを基質にしたときの酵素活性を100%として相対活性を算出した。(*)Endo-Mの相対活性はFujita *et al.*, (2004) Arch Biochem Biophys. 432: p41-49 より引用した。●: Mannose, ■: GlcNAc, O: Galactose, ▲: Fucose, ◆: Neu5Ac, ND: Not detected.

上記(表4)の結果から見て、Endo-ZrはEndo-Mと同様に高マンノース型糖鎖に対する加水分解活性が高く、さらに混成型糖鎖や2分岐の複合糖鎖を加水分解する。一方で、分岐が3つ以上の複合糖鎖やコアフコース構造を持つ糖

鎖、bisecting GlcNAcを有する混成型糖鎖は分解できない。また、いくつかの糖鎖に対する反応性がEndo-Mとは異なっており、特に2分岐の複合型糖鎖やM3B、M5A、M6B構造の糖鎖に対してはEndo-Mと比較して高い反応性を示す。

[0026] 2. 本発明のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの取得方法及び製造方法

2-1. Endo-0mの取得方法及び製造方法

(1) 本発明のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(Endo-0m)産生菌株

本発明のEndo-0m産生微生物は、本発明者らの先の出願明細書特許文献6に記載されたメタノール資化性酵母*Ogataea minuta* IF010746株であり、メタノールを唯一の炭素源として生育できる酵母株である。培養方法などの詳細は、特許文献6に記載されるとおりであり、通常の酵母用の培地にメタノールを加えて、通常の酵母の培養条件下で行う。培養後の菌体を回収して破砕し、不純物を除いた上清を粗酵素液として採取することもできるが、産生量が少ないため、Endo-0m遺伝子をクローニングし、もとの酵母株を宿主として形質転換を行い、下記(3)に述べるように、Endo-0m遺伝子過剰発現系を作製した。

[0027] (2) 他の微生物からのEndo-0m及びその遺伝子の採取方法

Ogataea minuta IF010746株を用いた宿主・ベクター系については、特許4464269号(特許文献7)に記載されている。このゲノム配列情報に対し、Endo-Mと相同性の高い遺伝子を検索したところ、部分的に相同性の高い遺伝子を見いだした。そこで*O. minuta*のゲノムDNAを常法により抽出し、プライマー1(配列番号3)とプライマー2(配列番号4)を用いてPCR法によりEndo-0m遺伝子のORF全長配列を増幅した。

プライマー1：

5' -CGATGACAAGGGATCATGGCGCAATCTCAGCTACTGG-3' (配列番号3)

プライマー2：

5' -GCACCGTCTCGGATCTCACACCCAAACCTCACTCC-3' (配列番号4)

得られたPCR断片をTOPO Blunt cloning kit(Invitrogen社)によりサブクロー

ニングし、塩基配列の決定を行なった。

クローニングの結果得られたEndo-0m遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列を図1に示した。Endo-0mのORFは2319塩基からなり、772アミノ酸からなる分子量87,398のタンパク質をコードしていた。

当該方法を本発明のEndo-0m 遺伝子を採取した*Ogataea minuta*の近縁微生物、例えば他のメチル資化性酵母である*Pichia*属酵母などの酵母、又は細菌など微生物由来のDNAライブラリーに対して適用することで、Endo-0m活性を有する酵素遺伝子を採取することができる。

すなわち、このようにして得られたEndo-0m遺伝子は、配列番号2に示す塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつEndo-0m活性を有するタンパク質をコードする遺伝子として表現できる。

また、公知のデータベースを検索することでも本発明のEndo-0m遺伝子を採取することができ、得られたEndo-0m遺伝子は、配列番号2に示す塩基配列に対して70%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相同性(同一性)を有する塩基配列を有しており、対応するEndo-0m活性を有するタンパク質は、配列番号1に示すアミノ酸配列に対して70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相同性(同一性)を有するアミノ酸配列からなると表現できる。ポリヌクレオチド及びタンパク質のホモロジー検索は、例えば、日本DNAデータベース(DNA Databank of JAPAN(DDBJ))等を対象に、FASTAやBLASTなどのプログラムを用いて行うことができる。

[0028] (3) 過剰発現系の構築とEndo-0mの大量生産方法

メタノール資化性酵母*O. minuta*でのEndo-0m過剰発現株の作製は以下のように行った。

まずPCR法によりEndo-0m遺伝子のORF全長配列(2349 bp)を増幅し、精製後、発現用プラスミド p0MEA1にIn-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit(Clontech社)を用いて組み込み、p0MEA1-Endo-0mを構築する。

構築したp0MEA1-Endo-0mを、*O. minuta* TK10-1-2株のコンピテントセルにエレクトロポレーション法を用いて形質転換し、Endo-0m過剰発現*O. minuta*株(Endo-0m/TK10-1-2株)を得る。

Endo-0m/TK10-1-2株に対してEndo-0mの発現誘導を行い、回収した菌体に抽出バッファーとガラスビーズを加え、激しく振とうすることにより細胞を破碎し、遠心分離によって不溶物を除いた上清をEndo-0m粗酵素液とする。

Endo-0m粗酵素液をSDSサンプルバッファーにて変性後、常法によりウェスタンブロッティングを行い、タンパク質の発現を確認する。

上記のようなEndo-0m過剰発現株を得るために、宿主としては本発明のEndo-0m遺伝子を採取したと同じメチル資化性酵母又は類似の酵母を用いることが好ましいが、大腸菌などの細菌類、昆虫細胞、植物細胞、動物細胞を用いた場合でもベクターとして高発現プロモーターを組み込んだベクターを用いれば同様の過剰発現株が構築できる。またトランスジェニック動物などを用いての生産も可能である。

これら形質転換*O. minuta* Endo-0m過剰発現株などの形質転換細胞株を用いて、通常の形質転換細胞培養条件で、又はメタノール誘導を用いた培養法などを適用することにより、大量生産が可能となる。

[0029] 2-2. Endo-Cpの取得方法及び製造方法

(1) 本発明のエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ(Endo-Cp)産生菌株

本発明のEndo-Cp産生微生物は、メタノール資化性酵母*Candida parapolymorpha* DL-1 ATCC26012株であり、メタノールを唯一の炭素源として生育できる酵母株である。培養方法は通常の酵母用の培地にメタノールを加えて、通常の酵母の培養条件下で行う。培養後の菌体を回収して破碎し、不純物を除いた上清を粗酵素液として採取することもできるが、産生量が少ないため、Endo-Cp遺伝子をクローニングし、大腸菌を宿主として形質転換を行い、下記(3)に述べるように、Endo-Cp遺伝子過剰発現系を作製した。

[0030] (2) 他の微生物からのEndo-Cp及びその遺伝子の採取方法

Candida parapolymorpha DL-1 ATCC26012株のゲノムDNAを常法により抽出

し、プライマー 3 (配列番号 7) とプライマー 4 (配列番号 8) を用いて PCR 法により Endo-Cp 遺伝子の ORF 全長配列を増幅した。

プライマー 3 :

5' -TCGAAGGTAGGCATATGCCTCGAAACACAGCTAA-3' (配列番号 7)

プライマー 4 :

5' -GCTTGAATTCGGATCCTCAAATGTGCATATCGGTACCCT-3' (配列番号 8)

得られた PCR 産物を、大腸菌用タンパク質発現プラスミド pCold I DNA (TaKaRa-Bio 社) に In-Fusion™ HD Cloning Kit (Clontech 社) を用いて組み込み、pCold I-Endo-Cp を構築した。精製したベクターの DNA シーケンスを行い、Endo-Cp 遺伝子の全長塩基配列の決定を行なった。

クローニングの結果得られた Endo-Cp 遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列を図 8 に示した。Endo-Cp の ORF は 2238 塩基からなり、745 アミノ酸からなる分子量 86,500 のタンパク質をコードしていた。

当該方法を本発明の Endo-Cp 遺伝子を採取した *Candida parapolymorpha* DL-1 の近縁微生物、例えば他のメチル資化性酵母である *Pichia* 属酵母などの酵母、又は細菌など微生物由来の DNA ライブラリーに対して適用することで、Endo-Cp 活性を有する酵素遺伝子を採取することができる。

すなわち、このようにして得られた Endo-Cp 遺伝子は、配列番号 6 に示す塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ Endo-Cp 活性を有するタンパク質をコードする遺伝子として表現できる。

また、公知のデータベースを検索することでも本発明の Endo-Cp 遺伝子を採取することができ、得られた Endo-Cp 遺伝子は、配列番号 6 に示す塩基配列に対して 70% 以上、好ましくは 85% 以上、より好ましくは 90% 以上、最も好ましくは 95% 以上の相同性 (同一性) を有する塩基配列を有しており、対応する Endo-Cp 活性を有するタンパク質は、配列番号 5 に示すアミノ酸配列に対して 70% 以上、好ましくは 80% 以上、より好ましくは 90% 以上、最も好ましくは 95% 以上の相同性 (同一性) を有するアミノ酸配列からなると表現できる。ポリ

ヌクレオチド及びタンパク質のホモロジー検索は、例えば、日本DNAデータバンク(DNA Databank of JAPAN(DDBJ))等を対象に、FASTAやBLASTなどのプログラムを用いて行うことができる。

[0031] (3) 過剰発現系の構築とEndo-Cpの大量生産方法

大腸菌でのEndo-Cp過剰発現株の作製は以下のように行った。

上記(2)で述べたpCold I-Endo-Cpをタンパク質発現用の大腸菌コンピテントセル(NEB Express Competent E. coli (High Efficiency), NEW ENGLAND Bio Labs社)に形質転換し、Endo-Cp発現大腸菌株を得る。

Endo-Cp発現大腸菌株に対してEndo-Cpの発現誘導を行い、回収した菌体に抽出バッファーとガラスビーズを加え、激しく振とうすることにより細胞を破碎し、遠心分離によって不溶物を除いた上清をEndo-Cp粗酵素液とする。

Endo-Cp粗酵素液をSDSサンプルバッファーにて変性後、常法によりウェスタンブロッティングを行い、タンパク質の発現を確認する。

上記のようなEndo-Cp過剰発現株を得るために、宿主としては本発明のEndo-Cp遺伝子を採取したと同じCandida属酵母又は類似の酵母を用いることが好ましいが、大腸菌などの細菌類、昆虫細胞、植物細胞、動物細胞を用いた場合でもベクターとして高発現プロモーターを組み込んだベクターを用いれば同様の過剰発現株が構築できる。またトランスジェニック動物などを用いての生産も可能である。

これらEndo-Cp過剰発現大腸菌株などの形質転換細胞株を用いて、通常の形質転換細胞培養条件で大量生産が可能となる。

[0032] 2-3. Endo-Paの取得方法及び製造方法

(1) 本発明のエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ(Endo-Pa)産生菌株

本発明のEndo-Pa産生微生物は、*Pichia anomala* ATCC36904株という酵母株である。培養方法は通常の酵母用の培地を用いて、通常の酵母の培養条件下で行う。培養後の菌体を回収して破碎し、不純物を除いた上清を粗酵素液として採取することもできるが、産生量が少ないため、Endo-Pa遺伝子をクローニングし、大腸菌を宿主として形質転換を行い、下記(3)に述べるように、E

ndo-Pa遺伝子過剰発現系を作製した。

[0033] (2)他の微生物からのEndo-Pa及びその遺伝子の採取方法

Pichia anomala ATCC36904株のゲノムDNAを常法により抽出し、プライマー5 (配列番号11)とプライマー6 (配列番号12)を用いてPCR法によりEndo-Pa遺伝子のORF全長配列を増幅した。

プライマー5：

5' -TCGAAGGTAGGCATATGCAACATGATCATGCTGCCATA-3' (配列番号11)

プライマー6：

5' -GCTTGAATTCGGATCCCTATATAAATATATCCTCGCCTTTG-3' (配列番号12)

得られたPCR産物を、大腸菌用タンパク質発現プラスミド pCold I DNA (TaKaRa-Bio社)にIn-Fusion™ HD Cloning Kit(Clontech社)を用いて組み込み、pCold I-Endo-Paを構築した。精製したベクターのDNAシーケンスを行い、Endo-Pa遺伝子の全長塩基配列の決定を行なった。

クローニングの結果得られたEndo-Pa遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列を図12に示した。Endo-PaのORFは1971塩基からなり、656アミノ酸からなる分子量76,050のタンパク質をコードしていた。

当該方法を本発明のEndo-Pa遺伝子を採取した*Pichia anomala*の近縁微生物、例えばメチル資化性酵母である*Pichia*属酵母などの酵母、又は細菌など微生物由来のDNAライブラリーに対して適用することで、Endo-Pa活性を有する酵素遺伝子を採取することができる。

すなわち、このようにして得られたEndo-Pa遺伝子は、配列番号10に示す塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつEndo-Pa活性を有するタンパク質をコードする遺伝子として表現できる。

また、公知のデータベースを検索することでも本発明のEndo-Pa遺伝子を採取することができ、得られたEndo-Pa遺伝子は、配列番号10に示す塩基配列に対して70%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相同性(同一性)を有する塩基配列を有しており、対応す

るEndo-Pa活性を有するタンパク質は、配列番号9に示すアミノ酸配列に対して70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相同性(同一性)を有するアミノ酸配列からなると表現できる。ポリヌクレオチド及びタンパク質のホモロジー検索は、例えば、日本DNAデータバンク(DNA Databank of JAPAN(DDBJ))等を対象に、FASTAやBLASTなどのプログラムを用いて行うことができる。

[0034] (3) 過剰発現系の構築とEndo-Paの大量生産方法

大腸菌でのEndo-Pa過剰発現株の作製は以下のように行った。

上記(2)で述べたpCold I-Endo-Paをタンパク質発現用の大腸菌コンピテントセル(NEB Express Competent E. coli(High Efficiency), NEW ENGRAND Biolabs社)に形質転換し、Endo-Pa発現大腸菌株を得る。

Endo-Pa発現大腸菌株に対してEndo-Paの発現誘導を行い、回収した菌体に抽出バッファーとガラスビーズを加え、激しく振とうすることにより細胞を破碎し、遠心分離によって不溶物を除いた上清をEndo-Pa粗酵素液とする。

Endo-Pa粗酵素液をSDSサンプルバッファーにて変性後、常法によりウェスタンブロッティングを行い、タンパク質の発現を確認する。

上記のようなEndo-Pa過剰発現株を得るために、宿主としては本発明のEndo-Pa遺伝子を採取したと同じPichia属酵母又は類似の酵母を用いることが好ましいが、大腸菌などの細菌類、昆虫細胞、植物細胞、動物細胞を用いた場合でもベクターとして高発現プロモーターを組み込んだベクターを用いれば同様の過剰発現株が構築できる。またトランスジェニック動物などを用いての生産も可能である。

これらEndo-Pa過剰発現大腸菌株などの形質転換細胞株を用いて、通常の形質転換細胞培養条件で大量生産が可能となる。

[0035] 2-4. Endo-Zrの取得方法及び製造方法

(1) 本発明のエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ(Endo-Zr)産生菌株

本発明のEndo-Zr産生微生物は、Zygosaccharomyces rouxii ATCC2623株という酵母株である。培養方法は通常の酵母用の培地を用いて、通常の酵母の

培養条件下で行う。培養後の菌体を回収して破碎し、不純物を除いた上清を粗酵素液として採取することもできるが、産生量が少ないため、Endo-Zr遺伝子をクローニングし、大腸菌を宿主として形質転換を行い、下記(3)に述べるように、Endo-Zr遺伝子過剰発現系を作製した。

[0036] (2)他の微生物からのEndo-Zr及びその遺伝子の採取方法

Zygosaccharomyces rouxii ATCC2623株のゲノムDNAを常法により抽出し、プライマー7(配列番号15)とプライマー8(配列番号16)を用いてPCR法によりEndo-Zr遺伝子のORF全長配列を増幅した。

プライマー7：

5' -TCGAAGGTAGGCATATGAAACGTATTAATCAGGT-3' (配列番号15)

プライマー8：

5' -GCTTGAATTCGGATCCTTACTTCTTGACTACGAATTTCAAAG-3' (配列番号16)

得られたPCR産物を、大腸菌用タンパク質発現プラスミド pCold I DNA (TaKaRa-Bio社)にIn-Fusion™ HD Cloning Kit(Clontech社)を用いて組み込み、pCold I-Endo-Zrを構築した。精製したベクターのDNAシーケンスを行い、Endo-Zr遺伝子の全長塩基配列の決定を行なった。

クローニングの結果得られたEndo-Zr遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列を図16に示した。Endo-ZrのORFは1920塩基からなり、639アミノ酸からなる分子量73,105のタンパク質をコードしていた。

当該方法を本発明のEndo-Zr遺伝子を採取した*Zygosaccharomyces rouxii*の近縁微生物、例えばメチル資化性酵母である*Pichia*属酵母などの酵母、又は細菌など微生物由来のDNAライブラリーに対して適用することで、Endo-Zr活性を有する酵素遺伝子を採取することができる。

すなわち、このようにして得られたEndo-Zr遺伝子は、配列番号14に示す塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつEndo-Zr活性を有するタンパク質をコードする遺伝子として表現できる。

また、公知のデータベースを検索することでも本発明のEndo-Zr遺伝子を採

取することができ、得られたEndo-Zr遺伝子は、配列番号14に示す塩基配列に対して70%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相同性(同一性)を有する塩基配列を有しており、対応するEndo-Zr活性を有するタンパク質は、配列番号13に示すアミノ酸配列に対して70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相同性(同一性)を有するアミノ酸配列からなると表現できる。ポリヌクレオチド及びタンパク質のホモロジー検索は、例えば、日本DNAデータベース(DNA Databank of JAPAN(DDBJ))等を対象に、FASTAやBLASTなどのプログラムを用いて行うことができる。

[0037] (3) 過剰発現系の構築とEndo-Zrの大量生産方法

大腸菌でのEndo-Zr過剰発現株の作製は以下のように行った。

上記(2)で述べたpCold I-Endo-Zrをタンパク質発現用の大腸菌コンピテントセル(NEB Express Competent E. coli (High Efficiency), NEW ENGLAND Bio Labs社)に形質転換し、Endo-Zr発現大腸菌株を得る。

Endo-Zr発現大腸菌株に対してEndo-Zrの発現誘導を行い、回収した菌体に抽出バッファーとガラスビーズを加え、激しく振とうすることにより細胞を破碎し、遠心分離によって不溶物を除いた上清をEndo-Zr粗酵素液とする。

Endo-Zr粗酵素液をSDSサンプルバッファーにて変性後、常法によりウェスタンブロッティングを行い、タンパク質の発現を確認する。

上記のようなEndo-Zr過剰発現株を得るために、宿主としては本発明のEndo-Zr遺伝子を採取したと同じZygosaccharomyces属酵母又は類似の酵母を用いることが好ましいが、大腸菌などの細菌類、昆虫細胞、植物細胞、動物細胞を用いた場合でもベクターとして高発現プロモーターを組み込んだベクターを用いれば同様の過剰発現株が構築できる。またトランスジェニック動物などを用いての生産も可能である。

これらEndo-Zr過剰発現大腸菌株などの形質転換細胞株を用いて、通常の形質転換細胞培養条件で大量生産が可能となる。

[0038] 3. 本発明のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの用途

本発明のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(Endo-0m)は、高い比活性で複合型糖鎖を切断する活性と共に、グルコースやN-アセチルグルコサミンなどの単糖又はその誘導体、あるいはそれらを有する糖ペプチドや糖タンパク質などの任意のアクセプター分子に対して切断した糖鎖や化学合成した糖鎖を転移する活性を有している。

したがって、本発明のEndo-0mを用いることで、糖タンパク質における複合型糖鎖も含めた糖鎖構造の解析が行える。また、天然には糖鎖が付加しないタンパク質に糖鎖を付加する、あるいは従来付加しない位置にN-型糖鎖を導入するといったネオグリコプロテイン(Neoglycoprotein)の調製や、不均一な糖鎖を一旦切断し、トランスグリコシダーゼ反応を用いて糖タンパク質のN-型糖鎖部分を均一化する、また糖鎖分析装置に対する標準糖タンパク質の作製等、様々な糖鎖修飾に用いることもできる。

本発明の他のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼであるEndo-Cp、Endo-Pa及びEndo-Zrも同様の複合型糖鎖切断活性及び任意のアクセプター分子に対する複合型糖鎖転移活性を有することから、同様の用途が期待される。

[0039] 以下、実施例に則して本発明を更に詳しく説明する。なお、本発明の技術的範囲はこれらの記載によって何等制限されるものではない。また、本明細書中で引用される技術文献の内容は、本明細書の開示内容の一部と見なされる。

実施例

[0040] (実施例1) 0.minuta由来ENGase(Endo-0m)の発見

本発明者らの先の出願明細書(特許文献6)に記載の通り、0.minutaによるヒト糖転移酵素の分泌生産を行なった。分泌されたMGAT5を部分精製し、複合型2分岐糖鎖(NGA2-Asn-Fmoc)を受容体基質、UDP-GlcNAcを供与体基質として反応を行なった。生成産物の解析を行なったところ、糖転移反応による産物以外に、副産物として別のピークが確認された。受容体基質のNGA2-Asn-Fmocをエキソ型のグリコシダーゼで順次消化して標準サンプルを作製し、このピークについて解析を行なったところ、受容体基質の還元末端側に存在するGlc

NAc β 1-4GlcNAcの間が切断されていることが示唆された。複合型 2 分岐糖鎖を効率よく切断する活性はEndo-Mが知られていることから、*O. minuta*にも同様の活性があると考えられたため、遺伝子のクローニングを検討した。

[0041] (実施例 2) *O. minuta*由来ENGase (Endo-0m)遺伝子のクローニング

Ogataea minuta IF010746株を用いた宿主・ベクター系については、特許4464269号(特許文献7)に記載されている。このゲノム配列情報に対し、Endo-Mと相同性の高い遺伝子を検索したところ、部分的に相同性の高い遺伝子を見いだした。そこで*O. minuta*のゲノムDNAを常法により抽出し、プライマー 1 (配列番号 3)とプライマー 2 (配列番号 4)を用いてPCR法によりEndo-0m遺伝子のORF全長配列を増幅した。

プライマー 1 :

5' -CGATGACAAGGGATCATGGCGCAATCTCAGCTACTGG-3' (配列番号 3)

プライマー 2 :

5' -GCACCGTCTCGGATCTCACACCCAAACCTCACTCC-3' (配列番号 4)

得られたPCR断片をTOPO Blunt cloning kit(Invitrogen社)によりサブクローニングし、塩基配列の決定を行なった。

クローニングの結果得られたEndo-0遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列を図 1 に示した。Endo-0mのORFは2319塩基からなり、772アミノ酸からなる分子量87,398のタンパク質をコードしていた。推定等電点は5.59であった。得られたアミノ酸配列を元にNCBIのアミノ酸配列データベースに対してBLAST検索を行った結果、Endo-0mはN末端側約80~410アミノ酸の位置にGH18 Chitinase-like superfamilyに属するGH family 85 ENGaseに高度に保存されている配列を有していた。BLAST検索によりヒットした上位の配列のうち、酵母に近い種について系統樹を作製した結果を図 2 に示した。Endo-M以外の配列については、データベース上、ENGaseである旨のアノテーションは記載されていなかった。Endo-0mはメタノール資化性酵母*Candida parapolymorpha* DL-1(*Hansenula polymorpha* DL-1)由来の推定のENGase(下記実施例 6、Endo-Cp)との相同性が最も高く、53.9%であった。Mucor

hiemalis由来のEndo-Mとの相同性は33.9%であり、N末端側の保存配列以外には全く相同性がなかった。一方、同じメタノール資化性酵母である*Pichia pastoris*や*Candida boidinii*では該当する遺伝子は検出されなかった。さらに*Saccharomyces cerevisiae*でも該当する遺伝子は検出されなかった。

[0042] (実施例3) Endo-0m過剰発現0.minuta株の作製

メタノール資化性酵母0.minutaでのEndo-0m過剰発現株の作製は以下のように行った。

まず実施例2の通り、上記プライマー1(配列番号3)とプライマー2(配列番号4)を用いてPCR法によりEndo-0m遺伝子のORF全長配列を増幅した。

増幅した2349 bpのPCR産物を精製した後、BamHIで切断した発現用プラスミド pOMEA1にIn-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit(Clontech社)を用いてPCR産物を組み込み、pOMEA1-Endo-0mを構築した。

構築したpOMEA1-Endo-0mをNotIで切断後、0.minuta TK10-1-2株のコンピテントセルにエレクトロポレーション法を用いて形質転換した。形質転換後の菌液をSD-Ade寒天培地(2% D-グルコース、0.67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids(Difco社)、0.5% Casamino acid、0.1mg/ml Uracil、1.5% Agar)に塗布し、30℃で2日間培養することで形質転換体のコロニーを得た。コロニーをプレートから掻きとり、PCR反応液に懸濁する簡易PCR法にて染色体上への組み込みを確認し、Endo-0m過剰発現0.minuta株(Endo-0m/TK10-1-2株)とした。

[0043] (実施例4) Endo-0m過剰発現0.minuta株におけるEndo-0mの発現と酵素活性の確認

Endo-0m/TK10-1-2株を3mlのYPD培地(2% Peptone、1% Yeast Extract、2% グルコース)にまき、30℃で2日間培養を行った。遠心分離により培地上清を除いた後、菌体に3mlのBMMY培地(2% Peptone、1% Yeast Extract、1.34% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids、2% Casamino acid、1% MeOH、0.2mg/ml Adenine1/2硫酸塩、0.1mg/ml Uracil、100mM リン酸カリウムバッファー(pH6.0))を加えて再懸濁し、20℃でさらに2日間培養することでEndo-0

mの発現誘導を行った。回収した菌体に抽出バッファー(50mM リン酸ナトリウムバッファー(pH7.4)、1.25M NaCl、1mM PMSF、1×Complete(Roche社)、5%グリセロール)とガラスビーズを加え、激しく振とうすることにより細胞を破碎した。遠心分離によって不溶物を除いた上清をEndo-0m粗酵素液とした。

ウェスタンブロッティングは以下のように行った。Endo-0m粗酵素液をSDSサンプルバッファーにて変性後、常法によりウェスタンブロッティングを行った。1次抗体としてマウス抗FLAG抗体、2次抗体として抗マウスIgG抗体ホースラディッシュペルオキシダーゼ複合体を用い、検出はECL plusシステム(GE Healthcare社)および化学発光検出器(GE Healthcare社)を用いて行った。

ウェスタンブロッティングの結果を図3のAに示した。Endo-0m過剰発現株ではEndo-0mの分子量である87kDaに相当する位置にFLAG-tagのシグナルが検出され、タンパク質の発現が確認された。

酵素活性測定は以下のように行った。終濃度100mM 酢酸ナトリウムバッファー(pH5.3)、0.5M NaCl、10 μ MのFmocラベル化した2分岐複合型糖鎖(NGA2-Asn-Fmoc)、およびEndo-0m粗酵素液を含む反応液(total volume: 10 μ l)を50℃で1時間インキュベートし、95℃で5分間加熱することにより酵素反応を停止した。反応液をHPLCに供し、基質のNGA2-Asn-Fmocおよびその加水分解物のピーク面積比から酵素活性を算出した。カラムはAsahipak NH2P-50 4E(4.6×250 mm、Shodex社)を使用し、溶媒はアセトニトリル(溶媒A)と200mM TEAA(pH 7.0、GLEN RESEARCH社: 溶媒B)を用いた。流速1.0ml/min、溶媒B: 43%の条件でアイソクラティック溶出を行い、蛍光検出器(励起波長265nm、蛍光波長315nm)にて検出を行った。Endo-0mの酵素活性は上記の反応条件で1分間に1 μ molのNGA2-Asn-Fmocを加水分解する活性を1Unitとして定義した。

HPLCによる酵素反応の検出結果を図3のBに示した。まず基質の2分岐複合糖鎖(NGA2-Asn-Fmoc)を単独でHPLCに供したところ、11.7minの位置にピークが検出された。続いて形質転換前の0.minuta株とEndo-0m過剰発現株の粗酵素液でそれぞれ50 μ g protein/reactionの割合で反応を行い、活性を比較した。Endo-0m過剰発現株では形質転換前の株に比べて基質のピークが大幅に減

少し、加水分解物のGlcNAc-Asn-Fmocのピーク(6.8min)が増大していた。この結果からEndo-0mが0. minutaの持つ2分岐複合型糖鎖を加水分解する酵素の正体であることが確認された。

続いてEndo-0m過剰発現株の比活性を比較した結果を図3のCに示した。形質転換前のTK10-1-2株では、 $10\mu\text{M}$ NGA2-Asn-Fmocを基質とした際に比活性が $15.0[\mu\text{Unit}/\text{mg protein}]$ であったのに対し、Endo-0m過剰発現株では $295\sim 339[\mu\text{Unit}/\text{mg protein}]$ (形質転換前の20~24倍)に増大していた。

[0044] (実施例5) Endo-0mの諸性質の検討

(5-1) Endo-0m精製酵素液の調製と比活性および K_m 、 V_{max} の算出

Endo-0mの諸性質の検討は精製酵素液を用いて行った。実施例4に記載した方法により100ml分の菌液から調製したEndo-0m粗酵素液を透析により平衡化バッファ(20mM リン酸ナトリウムバッファ(pH7.4)、0.5M NaCl、0.5mM PMSF、50mM イミダゾール)に置換した。透析後のEndo-0m粗酵素液をHisTrap HPカラム(GE Healthcare社)に供し、平衡化バッファで洗浄した後、50mM、100mM、200mMイミダゾールを含む平衡化バッファで段階的に溶出することによりタンパク質を溶出した。カラムから溶出されたEndo-0mを含む画分をAmicon Ultra(50,000 NMWL, Millipore社)で限外ろ過濃縮し、さらに20mM リン酸ナトリウムバッファ(pH7.4)、0.5M NaClで透析した後、終濃度10%となるようにグリセロールを加えてEndo-0m精製酵素液とした。実施例4に記した方法により基質濃度を1mMとしたときのEndo-0m精製酵素液の活性を測定し、比活性を算出した。また、種々の濃度のNGA2-Asn-Fmocを基質として活性測定を行い、 K_m と V_{max} を算出した。比較のために同様の方法により市販のEndo-Mの比活性および K_m 、 V_{max} を算出した。なおEndo-Mの至適pHは6.0(非特許文献6)であるため、Endo-Mの活性測定の際は酢酸ナトリウムバッファのpHを6.0とした。

Endo-0mの精製結果を図4に示した。Endo-0mはSDS-PAGE上で単一にまで精製された。精製したEndo-0mの比活性は1mMのNGA2-Asn-Fmocを基質としたときに $0.80\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であった。同測定条件における市販のEndo-Mの比活性は0

.06 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であり、Endo-Mに比べてEndo-0mは約13倍の比活性を有していることが明らかとなった。また、種々の濃度のNGA2-Asn-Fmocを基質として活性測定を行い、 K_m と V_{max} を算出した結果、Endo-0mの K_m は5539 μM 、 V_{max} は3.88 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であり、市販のEndo-Mの K_m (176 μM)の31倍、市販のEndo-Mの V_{max} (0.070 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)の55倍であることが明らかとなった(図5)。

[0045] (5-2) Endo-0mの至適反応条件の検討

Endo-0mの至適反応pHの検討は以下のように行った。終濃度100mMの各種バッファー、0.5M NaCl、10 μM NGA2-Asn-Fmoc、およびEndo-0m精製酵素液を含む反応液(total volume : 10 μl)を50℃で1時間インキュベートし、95℃で5分間加熱することにより酵素反応を停止した。バッファーにはクエン酸ナトリウムバッファー(pH3.5-5.5)、酢酸ナトリウムバッファー(pH4.5-6.0)、リン酸ナトリウムバッファー(pH6.0-7.5)、MOPS-NaOHバッファー(pH6.5-8.0)、Tris-HClバッファー(pH8.0-9.0)を使用した。実施例4に記載した方法により反応液をHPLCに供し、酵素活性を算出した。至適反応温度の検討は実施例4に記載した活性測定法の反応温度を10℃から60℃まで変えることにより行った。

Endo-0mの至適反応条件の測定結果を図6に示した。Endo-0mの至適反応pHは5.5付近、至適反応温度は50℃付近であった。

[0046] (5-3) 各種糖鎖に対する加水分解活性の検討

各種構造のPAラベル化糖鎖に対する加水分解活性の比較は以下のように行った。終濃度100mM 酢酸ナトリウムバッファー(pH5.3)、0.5M NaCl、1 μM の各種PAラベル化糖鎖(TaKaRa-Bio社)、およびEndo-0m精製酵素液を含む反応液(total volume : 10 μl)を30℃で3~12時間インキュベートし、95℃で5分間加熱することにより酵素反応を停止した。反応液をHPLCに供し、基質のPAラベル化糖鎖およびその加水分解物のピーク面積比から酵素活性を算出した。カラムはCosmosil 5C18-ARII(2.0×150mm、ナカライテスク社)を使用し、溶媒は0.1M 酢酸アンモニウムバッファー(pH4.0 : 溶媒A)および0.1M 酢酸アンモニウムバッファー(pH4.0)、0.5% 1-ブタノール(溶媒B)を用いた。流速0.5 m

l/minで24分間かけて溶媒B：5%-50%のリニアグラジエント溶出を行い、蛍光検出器(励起波長 320nm、蛍光波長400nm)にて検出を行った。上記の反応条件で1分間に1 μ molのPAラベル化糖鎖を加水分解する活性を1Unitとして酵素活性を算出し、M8A構造の糖鎖に対する加水分解活性を100%として各種糖鎖に対する相対活性を算出した。

各種構造のPAラベル化糖鎖に対するEndo-0mの加水分解活性の測定結果を表1に示した。比較のためにEndo-Mの過去の論文のデータ(非特許文献6)を引用した。Endo-0mはEndo-Mと同様に高マンノース型糖鎖に対する加水分解活性が高く、さらに混成型糖鎖や2分岐の複合糖鎖を加水分解することができた。一方で、分岐が3つ以上の複合糖鎖やコアフコース構造を持つ糖鎖は分解できないことが明らかとなった。また、いくつかの糖鎖ではEndo-Mとは反応性が異なっており、特にagalacto biantennary、M3B、M6B、M9A構造の糖鎖に対してはEndo-Mと比較して高い反応性を示した。

[0047] (5-4) トランスグリコシダーゼ活性の有無の検討

ENGaseの中には糖鎖を加水分解すると同時に任意のアクセプター分子に対して切断した糖鎖を転移する活性を持つものが知られており、その代表例としてEndo-Mが挙げられる。そこでEndo-0mにも同様の糖転移活性(トランスグリコシダーゼ活性)があるか否かを調べた。

Endo-0mのトランスグリコシダーゼ活性の検出は以下のように行った。終濃度100mM 酢酸ナトリウムバッファー(pH6.0)、2mM NGA2-Asn-Fmoc、50mMのアクセプター分子(p-ニトロフェニルグルコース)およびEndo-0m精製酵素液を含む反応液(total volume : 10 μ l)を30℃で3時間インキュベートし、95℃で5分間加熱することにより酵素反応を停止した。反応液全量を実施例4に記載した方法でHPLCに供し、UV検出器(274nm)で検出を行った。さらに、糖転移反応物と思われるピークを分取し、凍結乾燥後にMilli-Q水に再溶解してMALDI-QIT-TOFMS (A×IMA-QIT、島津製作所)で質量分析を行うことにより、糖転移反応物の同定を行った。

Endo-0mの糖転移活性の検出結果を図7に示した。まず、反応系にアクセプ

ターを加えていない条件では糖転移反応が起こらないため、ドナーのNGA2-Asn-Fmoc(10.8min)と加水分解物であるGlcNAc-Asn-Fmoc(6.6min)のピークのみが検出された。続いてアクセプターを加えた条件では、加水分解物のピークの他に糖転移反応物と思われる新たなピーク(4.15min)が検出された。このピークを分取してMS解析を行った結果、予測された糖転移反応物の分子量と一致する分子イオンピークが検出された($m/z=1389[M+Na-O_2]^+$, $m/z=1405[M+Na-O]^+$, $m/z=1421[M+Na]^+$, $m/z=1437[M+K]^+$)。以上の結果から、Endo-0mは任意のアクセプター分子に対して切断した糖鎖を転移する活性を有していることが示された。

[0048] (実施例6) Candida parapolymorpha DL-1由来ENGase (Endo-Cp)遺伝子のクローニング

Endo-0mのアミノ酸配列を元にNCBIのアミノ酸配列データベースに対してBLAST検索を行った結果、いくつかの酵母において部分的に相同性の高い遺伝子が検出された(図2)。この中でCandida parapolymorpha DL-1(Hansenula polymorpha DL-1)由来の遺伝子は、アミノ酸配列でEndo-0mと53.9%の相同性であったが、データベース上、ENGaseである旨のアノテーションは記載されていなかった。そこでEndo-Cp遺伝子のクローニングとタンパク質発現系の構築を検討した。

Candida parapolymorpha DL-1 ATCC26012株のゲノムDNAを常法により抽出し、プライマー3(配列番号7)とプライマー4(配列番号8)を用いてPCR法によりEndo-Cp遺伝子のORF全長配列を増幅した。

プライマー3:

5' -TCGAAGGTAGGCATATGCCTCGAAACACAGCTAA-3' (配列番号7)

プライマー4:

5' -GCTTGAATTCGGATCCTCAAATGTGCATATCGGTACCCT-3' (配列番号8)

得られたPCR産物を精製した後、Nde IとBamHIで切断した大腸菌用タンパク質発現プラスミド pCold I DNA(TaKaRa-Bio社)にIn-Fusion™ HD Cloning Kit(Clonontech社)を用いてPCR産物を組み込み、pCold I-Endo-Cpを構築した。精製

したベクターのDNAシーケンスを行い、Endo-Cp遺伝子の全長塩基配列の決定を行なった。

クローニングの結果得られたEndo-Cp遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列を図8に示した。Endo-CpのORFは2238塩基からなり、745アミノ酸からなる分子量86,500のタンパク質をコードしていた。推定等電点は5.61であった。Endo-CpはN末端側約75～410アミノ酸の位置にGH18 Chitinase-like superfamilyに属するGH family 85 ENGaseに高度に保存されている配列を有していた。

[0049] (実施例7) Endo-Cp発現大腸菌株の作製

実施例6のpCold I-Endo-Cpをタンパク質発現用の大腸菌コンピテントセル(NEB Express Competent E. coli(High Efficiency), NEW ENGLAND BioLabs社)に形質転換した。形質転換後の菌液を100 μ g/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地(2.5% LB Broth, Miller(Difco社)、1.5% Agar)に塗布し、37℃で一晩培養することで形質転換体のコロニーを得た。コロニーをプレートから掻きとり、PCR反応液に懸濁する簡易PCR法にてEndo-Cp遺伝子の増幅を確認し、Endo-Cp発現大腸菌株とした。

[0050] (実施例8) Endo-Cpの発現誘導と部分精製酵素液の調製

Endo-Cp発現大腸菌株を5mlのLB培地にまき、37℃で一晩培養を行った。菌液全量を500mlのLB培地に加え、37℃で約3時間培養することでOD値が0.5程度になるまで菌体を増殖させた。その後、終濃度1.0mMとなるようにIPTGを添加し、15℃に急冷してコールドショックを与えることによりタンパク質の発現誘導を行った。15℃で48時間の培養を行った後、菌体を回収し、抽出バッファー(50mM リン酸ナトリウムバッファー(pH7.4)、1.25M NaCl、1mM PMSF、1×Complete(Roche社)、5% グリセロール)とガラスビーズを加え、激しく振とうすることにより菌体を破碎した。遠心分離によって不溶物を除いた上清をEndo-Cp粗酵素液とした。Endo-Cp粗酵素液は透析により平衡化バッファー(20mM リン酸ナトリウムバッファー(pH7.4)、0.5M NaCl、0.5mM PMSF、50mM イミダゾール)に置換した。透析後のEndo-Cp粗酵素液をHisTrap HPカラム(GE Healthcare社)に供し、平衡化バッファーで洗浄した後、50mM、100mM、200mM

Mイミダゾールを含む平衡化バッファーで段階的に溶出することによりタンパク質を溶出した。カラムから溶出されたEndo-Cpを含む画分をAmicon Ultra(50,000 NMWL, Millipore社)で限外ろ過濃縮し、さらに20 mM リン酸ナトリウムバッファー(pH7.4)、0.5M NaClで透析した後、終濃度10%となるようにグリセロールを加えてEndo-Cp部分精製酵素液とした。

ウェスタンブロッティングは以下のように行った。Endo-Cp部分精製酵素液をSDSサンプルバッファーにて変性後、常法によりウェスタンブロッティングを行った。1次抗体としてマウス抗Tetra-His抗体、2次抗体として抗マウスIgG抗体ホースラディッシュペルオキシダーゼ複合体を用い、検出はECL plus システム(GE Healthcare社)および化学発光検出器(GE Healthcare社)を用いて行った。

酵素活性測定は以下のように行った。終濃度100mM 酢酸ナトリウムバッファー(pH5.3)、0.5M NaCl、10 μ MのFmocラベル化した2分岐複合型糖鎖(NGA2-Asn-Fmoc)、およびEndo-Cpを含む反応液(total volume : 10 μ l)を30°Cで3時間インキュベートし、95°Cで5分間加熱することにより酵素反応を停止した。反応液をHPLCに供し、基質のNGA2-Asn-Fmocおよびその加水分解物のピーク面積比から酵素活性を算出した。カラムはAsahipak NH2P-50 4E(4.6×250mm、Shodex社)を使用し、溶媒はアセトニトリル(溶媒A)と200mM TEAA(pH7.0、GLEN RESEARCH社：溶媒B)を用いた。流速1.0ml/min、溶媒B：43%の条件でアイソクラティック溶出を行い、蛍光検出器(励起波長265nm、蛍光波長315nm)にて検出を行った。Endo-Cpの酵素活性は上記の反応条件で1分間に1 μ molのNGA2-Asn-Fmocを加水分解する活性を1Unitとして定義した。

Endo-Cp部分精製酵素液のSDS-PAGE、ウェスタンブロッティングおよび活性測定の結果を図9に示した。SDS-PAGEでは複数のバンドが検出されたが、ウェスタンブロッティングではEndo-Cpの分子量である86.5kDaに相当する位置にHis-tagのシグナルが検出され、タンパク質の発現が確認された(図9 A, B)。2分岐複合型糖鎖(NGA2-Asn-Fmoc)を基質として活性測定を行ったところ、Endo-Cp部分精製酵素液を加えた反応液では基質のピーク(10.8min)が減少し

、加水分解物のGlcNAc-Asn-Fmocのピーク(6.8min)が出現した(図9C)。この結果からEndo-Cpが既知のEndo-Mと同様に2分岐複合型糖鎖を加水分解するENGaseであることが明らかとなった。また、Endo-Cp部分精製酵素液の比活性は120 μ Unit/mgであった。

[0051] (実施例9) Endo-Cpの諸性質の検討

(9-1) Endo-Cpの至適反応条件の検討

Endo-Cpの至適反応pHの検討は以下のように行った。終濃度100mMの各種バッファー、0.5M NaCl、10 μ M NGA2-Asn-Fmoc、およびEndo-Cp部分精製酵素液を含む反応液(total volume: 10 μ l)を30℃で3時間インキュベートし、95℃で5分間加熱することにより酵素反応を停止した。バッファーにはクエン酸ナトリウムバッファー(pH3.5-5.5)、酢酸ナトリウムバッファー(pH4.5-6.0)、リン酸ナトリウムバッファー(pH6.0-7.5)、MOPS-NaOHバッファー(pH6.5-8.0)、Tris-HClバッファー(pH8.0-9.0)を使用した。実施例8に記載した方法により反応液をHPLCに供し、酵素活性を算出した。至適反応温度の検討は実施例8に記載した活性測定法の反応温度を10℃から70℃まで変えることにより行った。

Endo-Cpの至適反応条件の測定結果を図10に示した。Endo-Cpの至適反応pHは5.5付近、至適反応温度は60℃付近であった。

[0052] (9-2) 各種糖鎖に対する加水分解活性の検討

各種構造のPAラベル化糖鎖に対する加水分解活性の比較は以下のように行った。終濃度100mM 酢酸ナトリウムバッファー(pH5.3)、0.5M NaCl、1 μ Mの各種PAラベル化糖鎖(TaKaRa-Bio社)、およびEndo-Cp部分精製酵素液を含む反応液(total volume: 10 μ l)を30℃で3~12時間インキュベートし、95℃で5分間加熱することにより酵素反応を停止した。反応液をHPLCに供し、基質のPAラベル化糖鎖およびその加水分解物のピーク面積比から酵素活性を算出した。カラムはCosmosil 5C18-ARII(2.0×150mm、ナカライテスク社)を使用し、溶媒は0.1M 酢酸アンモニウムバッファー(pH4.0: 溶媒A)および0.1M 酢酸アンモニウムバッファー(pH4.0)、0.5% 1-ブタノール(溶媒B)を用いた。流速0

.5 ml/minで24分間かけて溶媒B : 5%-50%のリニアグラジエント溶出を行い、蛍光検出器(励起波長 320nm、蛍光波長400nm)にて検出を行った。上記の反応条件で1分間に1 μ molのPAラベル化糖鎖を加水分解する活性を1Unitとして酵素活性を算出し、M8A構造の糖鎖に対する加水分解活性を100%として各種糖鎖に対する相対活性を算出した。

各種構造のPAラベル化糖鎖に対するEndo-Cpの加水分解活性の測定結果を表2に示した。比較のためにEndo-Mの過去の論文のデータ(非特許文献6)を引用した。Endo-CpはEndo-Mと同様に高マンノース型糖鎖に対する加水分解活性が高く、さらに混成型糖鎖や2分岐の複合糖鎖を加水分解することができた。一方で、分岐が3つ以上の複合糖鎖やコアフコース構造を持つ糖鎖は分解できないことが明らかとなった。また、いくつかの糖鎖ではEndo-Mとは反応性が異なっており、特にagalacto biantennary、M3B、M6B構造の糖鎖に対してはEndo-Mと比較して高い反応性を示した。

[0053] (9-3) トランスグリコシダーゼ活性の有無の検討

ENGaseの中には糖鎖を加水分解すると同時に任意のアクセプター分子に対して切断した糖鎖を転移する活性を持つものが知られており、その代表例としてEndo-Mが挙げられる。そこでEndo-Cpにも同様の糖転移活性(トランスグリコシダーゼ活性)があるか否かを調べた。

Endo-Cpのトランスグリコシダーゼ活性の検出は以下のように行った。終濃度100mM 酢酸ナトリウムバッファー(pH6.0)、2mM NGA2-Asn-Fmoc、50mMのアクセプター分子(p-ニトロフェニルグルコース)およびEndo-Cp部分精製酵素液を含む反応液(total volume : 10 μ l)を30°Cで3時間インキュベートし、95°Cで5分間加熱することにより酵素反応を停止した。反応液全量を実施例8に記載した方法でHPLCに供し、UV検出器(274nm)で検出を行った。また、糖転移反応物と思われるピークを分取し、凍結乾燥後にMilli-Q水に再溶解してMALDI-QIT-TOFMS (A $\times$ IMA-QIT、島津製作所)で質量分析を行うことにより、糖転移反応物の同定を行った。

Endo-Cpの糖転移活性の検出結果を図11に示した。比較のためにEndo-0m

の結果を合わせて表示した。反応系にアクセプターを加えた条件でEndo-Cpを反応させたところ、Endo-0mと同様に加水分解物のピークの他に糖転移反応物のピーク(4.15min)が検出された。このピークを分取し、MS解析を行った結果、予測された糖転移反応物の分子量と一致する分子イオンピークが検出された($m/z=1389[M+Na-O_2]^+$, $m/z=1405[M+Na-O]^+$, $m/z=1421[M+Na]^+$, $m/z=1437[M+K]^+$)。以上の結果から、Endo-Cpは任意のアクセプター分子に対して切断した糖鎖を転移する活性を有していることが示唆された。

[0054] (実施例 10) Pichia anomala由来ENGase (Endo-Pa)遺伝子のクローニング

Endo-0mのアミノ酸配列を元にNCBIのアミノ酸配列データベースに対してBLAST検索を行った結果、いくつかの酵母において部分的に相同性の高い遺伝子が検出された(図2)。この中でPichia anomala由来の遺伝子は、アミノ酸配列でEndo-0mと42.5%の相同性であったが、データベース上、ENGaseである旨のアノテーションは記載されていなかった。そこでEndo-Pa遺伝子のクローニングとタンパク質発現系の構築を検討した。

Pichia anomala ATCC36904株のゲノムDNAを常法により抽出し、プライマー5(配列番号11)とプライマー6(配列番号12)を用いてPCR法によりEndo-Pa遺伝子のORF全長配列を増幅した。

プライマー5:

5' -TCGAAGGTAGGCATATGCAACATGATCATGCTGCCATA-3' (配列番号11)

プライマー6:

5' -GCTTGAATTCGGATCCCTATATAAATATATCCTCGCCTTTG-3' (配列番号12)

得られたPCR産物を精製した後、Nde IとBamHIで切断した大腸菌用タンパク質発現プラスミド pCold I DNA(TaKaRa-Bio社)にIn-Fusion™ HD Cloning Kit(Clonetech社)を用いてPCR産物を組み込み、pCold I-Endo-Paを構築した。精製したベクターのDNAシーケンスを行い、Endo-Pa遺伝子の全長塩基配列の決定を行なった。

クローニングの結果得られたEndo-Pa遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列を図12に示した。Endo-PaのORFは1971塩基からなり、656アミノ酸からなる

分子量76,050のタンパク質をコードしていた。推定等電点は6.06であった。Endo-PaはN末端側約65～400アミノ酸の位置にGH18 Chitinase-like superfamilyに属するGH family 85 ENGaseに高度に保存されている配列を有していた。

[0055] (実施例 1 1) Endo-Pa発現大腸菌株の作製

実施例 1 0 の pCold I-Endo-Pa をタンパク質発現用の大腸菌コンピテントセル (NEB Express Competent E. coli (High Efficiency), NEW ENGLAND BioLabs 社) に形質転換した。形質転換後の菌液を 100 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 寒天培地 (2.5% LB Broth, Miller (Difco 社)、1.5% Agar) に塗布し、37°C で一晩培養することで形質転換体のコロニーを得た。コロニーをプレートから掻きとり、PCR 反応液に懸濁する簡易 PCR 法にて Endo-Pa 遺伝子の増幅を確認し、Endo-Pa 発現大腸菌株とした。

[0056] (実施例 1 2) Endo-Pa の発現誘導と部分精製酵素液の調製

Endo-Pa 発現大腸菌株を 5ml の LB 培地にまき、37°C で一晩培養を行った。菌液全量を 500ml の LB 培地に加え、37°C で約 3 時間培養することで OD 値が 0.5 程度になるまで菌体を増殖させた。その後、終濃度 1.0mM となるように IPTG を添加し、15°C に急冷してコールドショックを与えることによりタンパク質の発現誘導を行った。15°C で 48 時間の培養を行った後、菌体を回収し、抽出バッファー (50mM リン酸ナトリウムバッファー (pH7.4)、1.25M NaCl、1mM PMSF、1 $\times$ Complete (Roche 社)、5% グリセロール) とガラスビーズを加え、激しく振とうすることにより菌体を破碎した。遠心分離によって不溶物を除いた上清を Endo-Pa 粗酵素液とした。Endo-Pa 粗酵素液は透析により平衡化バッファー (20mM リン酸ナトリウムバッファー (pH7.4)、0.5M NaCl、0.5mM PMSF、50mM イミダゾール) に置換した。透析後の Endo-Pa 粗酵素液を HisTrap HP カラム (GE Healthcare 社) に供し、平衡化バッファーで洗浄した後、50mM、100mM、200mM イミダゾールを含む平衡化バッファーで段階的に溶出することによりタンパク質を溶出した。カラムから溶出された Endo-Pa を含む画分を Amicon Ultra (50,000 NMWL, Millipore 社) で限外ろ過濃縮し、さらに 20mM リン酸ナトリウムバッファー (pH7.4)、0.5M NaCl で透析した後、終濃度 10% となるようにグリ

セロールを加えてEndo-Pa部分精製酵素液とした。

ウェスタンブロッティングは以下のように行った。Endo-Pa部分精製酵素液をSDSサンプルバッファーにて変性後、常法によりウェスタンブロッティングを行った。1次抗体としてマウス抗Tetra-His抗体、2次抗体として抗マウスIgG抗体ホースラディッシュペルオキシダーゼ複合体を用い、検出はECL plusシステム(GE Healthcare社)および化学発光検出器(GE Healthcare社)を用いて行った。

酵素活性測定は以下のように行った。終濃度100mM 酢酸ナトリウムバッファー(pH5.3)、0.5M NaCl、10 μ MのFmocラベル化した2分岐複合型糖鎖(NGA2-Asn-Fmoc)、およびEndo-Paを含む反応液(total volume : 10 μ l)を30°Cで3時間インキュベートし、95°Cで5分間加熱することにより酵素反応を停止した。反応液をHPLCに供し、基質のNGA2-Asn-Fmocおよびその加水分解物のピーク面積比から酵素活性を算出した。カラムはAsahipak NH2P-50 4E(4.6 $\times$ 250 mm、Shodex社)を使用し、溶媒はアセトニトリル(溶媒A)と200mM TEAA(pH7.0、GLENN RESEARCH社：溶媒B)を用いた。流速1.0ml/min、溶媒B : 43%の条件でアイソクラティック溶出を行い、蛍光検出器(励起波長265nm、蛍光波長315nm)にて検出を行った。Endo-Paの酵素活性は上記の反応条件で1分間に1 μ molのNGA2-Asn-Fmocを加水分解する活性を1Unitとして定義した。

Endo-Pa部分精製酵素液のSDS-PAGE、ウェスタンブロッティングおよび活性測定の結果を図13に示した。SDS-PAGEでは複数のバンドが検出されたが、ウェスタンブロッティングでは配列から予測される分子量である76kDaよりもやや下の位置にHis-tagのシグナルが検出され、タンパク質の発現が確認された(図13A, B)。2分岐複合型糖鎖(NGA2-Asn-Fmoc)を基質として活性測定を行ったところ、Endo-Pa部分精製酵素液を加えた反応液では基質のピーク(10.8min)が減少し、加水分解物のGlcNAc-Asn-Fmocのピーク(6.8min)が出現した(図13C)。この結果からEndo-Paが既知のEndo-Mと同様に2分岐複合型糖鎖を加水分解するENGaseであることが明らかとなった。また、Endo-Pa部分精製酵素液の比活性は353 μ Unit/mgであった。

[0057] (実施例 13) Endo-Paの諸性質の検討(13-1) Endo-Paの至適反応条件の検討

Endo-Paの至適反応pHの検討は以下のように行った。終濃度100mMの各種バッファー、0.5M NaCl、10 μ M NGA2-Asn-Fmoc、およびEndo-Pa部分精製酵素液を含む反応液(total volume : 10 μ l)を30℃で3時間インキュベートし、95℃で5分間加熱することにより酵素反応を停止した。バッファーにはクエン酸ナトリウムバッファー(pH3.5-5.5)、酢酸ナトリウムバッファー(pH4.5-6.0)、リン酸ナトリウムバッファー(pH6.0-7.5)、MOPS-NaOHバッファー(pH6.5-8.0)、Tris-HClバッファー(pH8.0-9.0)を使用した。実施例12に記載した方法により反応液をHPLCに供し、酵素活性を算出した。至適反応温度の検討は実施例12に記載した活性測定法の反応温度を10℃から60℃まで変えることにより行った。

Endo-Paの至適反応条件の測定結果を図14に示した。Endo-Paの至適反応pHは5.0-5.5付近、至適反応温度は40℃付近であった。

[0058] (13-2) 各種糖鎖に対する加水分解活性の検討

各種構造のPAラベル化糖鎖に対する加水分解活性の比較は以下のように行った。終濃度100mM 酢酸ナトリウムバッファー(pH5.3)、0.5M NaCl、1 μ Mの各種PAラベル化糖鎖(TaKaRa-Bio社)、およびEndo-Pa部分精製酵素液を含む反応液(total volume : 10 μ l)を30℃で3~12時間インキュベートし、95℃で5分間加熱することにより酵素反応を停止した。反応液をHPLCに供し、基質のPAラベル化糖鎖およびその加水分解物のピーク面積比から酵素活性を算出した。カラムはCosmosil 5C18-ARII(2.0×150mm、ナカライテスク社)を使用し、溶媒は0.1M 酢酸アンモニウムバッファー(pH4.0 : 溶媒A)および0.1M 酢酸アンモニウムバッファー(pH4.0)、0.5% 1-ブタノール(溶媒B)を用いた。流速0.5 ml/minで24分間かけて溶媒B : 5%-50%のリニアグラジエント溶出を行い、蛍光検出器(励起波長 320nm、蛍光波長400nm)にて検出を行った。上記の反応条件で1分間に1 μ molのPAラベル化糖鎖を加水分解する活性を1Unitとして酵素活性を算出し、M8A構造の糖鎖に対する加水分解活性を100%として各種

糖鎖に対する相対活性を算出した。

各種構造のPAラベル化糖鎖に対するEndo-Paの加水分解活性の測定結果を表3に示した。比較のためにEndo-Mの過去の論文のデータ(非特許文献6)を引用した。Endo-PaはEndo-Mと同様に高マンノース型糖鎖に対する加水分解活性が高く、さらに混成型糖鎖や2分岐の複合糖鎖を加水分解することができた。一方で、分岐が3つ以上の複合糖鎖やコアフコース構造を持つ糖鎖は分解できないことが明らかとなった。また、ほとんどの糖鎖でEndo-Mと比較して高い反応性を示した。

[0059] (13-3) トランスグリコシダーゼ活性の有無の検討

ENGaseの中には糖鎖を加水分解すると同時に任意のアクセプター分子に対して切断した糖鎖を転移する活性を持つものが知られており、その代表例としてEndo-Mが挙げられる。そこでEndo-Paにも同様の糖転移活性(トランスグリコシダーゼ活性)があるか否かを調べた。

Endo-Paのトランスグリコシダーゼ活性の検出は以下のように行った。終濃度100mM 酢酸ナトリウムバッファー(pH6.0)、2mM NGA2-Asn-Fmoc、50mMのアクセプター分子(p-ニトロフェニルグルコース)およびEndo-Pa部分精製酵素液を含む反応液(total volume: 10 μ l)を30°Cで16時間インキュベートし、95°Cで5分間加熱することにより酵素反応を停止した。反応液全量を実施例12に記載した方法でHPLCに供し、UV検出器(274nm)で検出を行った。また、糖転移反応物と思われるピークを分取し、凍結乾燥後にMilli-Q水に再溶解してMALDI-QIT-TOFMS(A $\times$ IMA-QIT、島津製作所)で質量分析を行うことにより、糖転移反応物の同定を行った。

Endo-Cpの糖転移活性の検出結果を図15に示した。比較のためにEndo-0mの結果を合わせて表示した。反応系にアクセプターを加えた条件でEndo-Paを反応させたところ、Endo-0mと同様に加水分解物のピークの他に糖転移反応物のピーク(4.15min)が新たに検出された。このピークを分取し、MS解析を行った結果、予測された糖転移反応物の分子量と一致する分子イオンピークが検出された($m/z=1389[M+Na-O_2]^+$, $m/z=1405[M+Na-O]^+$, $m/z=1421[M+Na]^+$, $m/z=14$

37[M+K]⁺)。以上の結果から、Endo-Paは任意のアクセプター分子に対して切断した糖鎖を転移する活性を有していることが示唆された。

[0060] (実施例 1 4) Zygosaccharomyces rouxii 由来 ENGase (Endo-Zr) 遺伝子のクローニング

Endo-0mのアミノ酸配列を元にNCBIのアミノ酸配列データベースに対してBLAST検索を行った結果、いくつかの酵母において部分的に相同性の高い遺伝子が検出された(図2)。この中でZygosaccharomyces rouxii由来の遺伝子は、アミノ酸配列でEndo-0mと30.6%の相同性であったが、データベース上、ENGaseである旨のアノテーションは記載されていなかった。そこでEndo-Zr遺伝子のクローニングとタンパク質発現系の構築を検討した。

Zygosaccharomyces rouxii ATCC2623株のゲノムDNAを常法により抽出し、プライマー7(配列番号15)とプライマー8(配列番号16)を用いてPCR法によりEndo-Zr遺伝子のORF全長配列を増幅した。

プライマー7:

5' -TCGAAGGTAGGCATATGAAACGTATTAATCAGGT-3' (配列番号15)

プライマー8:

5' -GCTTGAATTCGGATCCTTACTTCTTGACTACGAATTTCAAAG-3' (配列番号16)

得られたPCR産物を精製した後、Nde IとBamHIで切断した大腸菌用タンパク質発現プラスミド pCold I DNA(TaKaRa-Bio社)にIn-Fusion™ HD Cloning Kit(Clonotech社)を用いてPCR産物を組み込み、pCold I-Endo-Zrを構築した。精製したベクターのDNAシーケンスを行い、Endo-Zr遺伝子の全長塩基配列の決定を行なった。

クローニングの結果得られたEndo-Zr遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列を図16に示した。Endo-ZrのORFは1920塩基からなり、639アミノ酸からなる分子量73,105のタンパク質をコードしていた。推定等電点は6.69であった。Endo-ZrはN末端側約70~400アミノ酸の位置にGH18 Chitinase-like superfamilyに属するGH family 85 ENGaseに高度に保存されている配列を有していた。

[0061] (実施例 1 5) Endo-Zr発現大腸菌株の作製

実施例 14 の pCold I-Endo-Zr をタンパク質発現用の大腸菌コンピテントセル (NEB Express Competent E. coli (High Efficiency), NEW ENGLAND BioLabs 社) に形質転換した。形質転換後の菌液を $100 \mu\text{g/ml}$ のアンピシリンを含む LB 寒天培地 (2.5% LB Broth, Miller (Difco 社)、1.5% Agar) に塗布し、 37°C で一晩培養することで形質転換体のコロニーを得た。コロニーをプレートから掻きとり、PCR 反応液に懸濁する簡易 PCR 法にて Endo-Zr 遺伝子の増幅を確認し、Endo-Zr 発現大腸菌株とした。

[0062] (実施例 16) Endo-Zr の発現誘導と部分精製酵素液の調製

Endo-Zr 発現大腸菌株を 5ml の LB 培地にまき、 37°C で一晩培養を行った。菌液全量を 500ml の LB 培地に加え、 37°C で約 3 時間培養することで OD 値が 0.5 程度になるまで菌体を増殖させた。その後、終濃度 1.0mM となるように IPTG を添加し、 15°C に急冷してコールドショックを与えることによりタンパク質の発現誘導を行った。 15°C で 48 時間の培養を行った後、菌体を回収し、抽出バッファー (50mM リン酸ナトリウムバッファー (pH7.4)、1.25M NaCl、1mM PMSF、1×Complete (Roche 社)、5% グリセロール) とガラスビーズを加え、激しく振とうすることにより菌体を破碎した。遠心分離によって不溶物を除いた上清を Endo-Zr 粗酵素液とした。Endo-Zr 粗酵素液は透析により平衡化バッファー (20mM リン酸ナトリウムバッファー (pH7.4)、0.5M NaCl、0.5mM PMSF、50mM イミダゾール) に置換した。透析後の Endo-Zr 粗酵素液を HisTrap HP カラム (GE Healthcare 社) に供し、平衡化バッファーで洗浄した後、50mM、100mM、200mM イミダゾールを含む平衡化バッファーで段階的に溶出することによりタンパク質を溶出した。カラムから溶出された Endo-Zr を含む画分を Amicon Ultra (50,000 NMWL, Millipore 社) で限外ろ過濃縮し、さらに 20mM リン酸ナトリウムバッファー (pH7.4)、0.5M NaCl で透析した後、終濃度 10% となるようにグリセロールを加えて Endo-Zr 部分精製酵素液とした。

ウェスタンブロッティングは以下のように行った。Endo-Zr 部分精製酵素液を SDS サンプルバッファーにて変性後、常法によりウェスタンブロッティングを行った。1 次抗体としてマウス抗 Tetra-His 抗体、2 次抗体として抗マウス

IgG抗体ホースラディッシュペルオキシダーゼ複合体を用い、検出はECL plus システム(GE Healthcare社)および化学発光検出器(GE Healthcare社)を用いて行った。

酵素活性測定は以下のように行った。終濃度100mM 酢酸ナトリウムバッファー(pH5.3)、0.5M NaCl、10 μ MのFmocラベル化した2分岐複合型糖鎖(NGA2-Asn-Fmoc)、およびEndo-Zrを含む反応液(total volume: 10 μ l)を30°Cで3~12時間インキュベートし、95°Cで5分間加熱することにより酵素反応を停止した。反応液をHPLCに供し、基質のNGA2-Asn-Fmocおよびその加水分解物のピーク面積比から酵素活性を算出した。カラムはAsahipak NH2P-50 4E(4.6 $\times$ 250mm、Shodex社)を使用し、溶媒はアセトニトリル(溶媒A)と200mM TEAA(pH7.0、GLEN RESEARCH社: 溶媒B)を用いた。流速1.0ml/min、溶媒B: 43%の条件でアイソクラティック溶出を行い、蛍光検出器(励起波長265nm、蛍光波長315nm)にて検出を行った。Endo-Zrの酵素活性は上記の反応条件で1分間に1 μ molのNGA2-Asn-Fmocを加水分解する活性を1Unitとして定義した。

Endo-Zr部分精製酵素液のSDS-PAGE、ウェスタンブロッティングおよび活性測定の結果を図17に示した。SDS-PAGEでは複数のバンドが検出されたが、ウェスタンブロッティングではEndo-Zrの分子量である73kDaに相当する位置にHis-tagのシグナルが検出され、タンパク質の発現が確認された(図17A, B)。2分岐複合型糖鎖(NGA2-Asn-Fmoc)を基質として活性測定を行ったところ、Endo-Zr部分精製酵素液を加えた反応液では基質のピーク(10.8min)が減少し、加水分解物のGlcNAc-Asn-Fmocのピーク(6.8min)が出現した(図17C)。この結果からEndo-Zrが既知のEndo-Mと同様に2分岐複合型糖鎖を加水分解するENGaseであることが明らかとなった。また、Endo-Zr部分精製酵素液の比活性は3.3 μ Unit/mgであった。

[0063] (実施例17) Endo-Zrの諸性質の検討

(17-1) Endo-Zrの至適反応条件の検討

Endo-Zrの至適反応pHの検討は以下のように行った。終濃度100mMの各種バッファー、0.5M NaCl、10 μ M NGA2-Asn-Fmoc、およびEndo-Zr部分精製酵素液

を含む反応液(total volume : 10 μ l)を30℃で3時間インキュベートし、95℃で5分間加熱することにより酵素反応を停止した。バッファーにはクエン酸ナトリウムバッファー(pH3.5-5.5)、酢酸ナトリウムバッファー(pH4.5-6.0)、リン酸ナトリウムバッファー(pH6.0-7.5)、MOPS-NaOHバッファー(pH6.5-8.0)、Tris-HClバッファー(pH8.0-9.0)を使用した。実施例16に記載した方法により反応液をHPLCに供し、酵素活性を算出した。至適反応温度の検討は実施例16に記載した活性測定法の反応温度を10℃から60℃まで変えることにより行った。

Endo-Zrの至適反応条件の測定結果を図18に示した。Endo-Zrの至適反応pHは4.5-5.0付近、至適反応温度は40℃付近であった。

[0064] (17-2) 各種糖鎖に対する加水分解活性の検討

各種構造のPAラベル化糖鎖に対する加水分解活性の比較は以下のように行った。終濃度100mM 酢酸ナトリウムバッファー(pH5.3)、0.5M NaCl、1 μ Mの各種PAラベル化糖鎖(TaKaRa-Bio社)、およびEndo-Zr部分精製酵素液を含む反応液(total volume : 10 μ l)を30℃で3~12時間インキュベートし、95℃で5分間加熱することにより酵素反応を停止した。反応液をHPLCに供し、基質のPAラベル化糖鎖およびその加水分解物のピーク面積比から酵素活性を算出した。カラムはCosmosil 5C18-ARII(2.0 $\times$ 150mm、ナカライテスク社)を使用し、溶媒は0.1M 酢酸アンモニウムバッファー(pH4.0 : 溶媒A)および0.1M 酢酸アンモニウムバッファー(pH4.0)、0.5% 1-ブタノール(溶媒B)を用いた。流速0.5ml/minで24分間かけて溶媒B : 5%-50%のリニアグラジエント溶出を行い、蛍光検出器(励起波長 320nm、蛍光波長400nm)にて検出を行った。上記の反応条件で1分間に1 μ molのPAラベル化糖鎖を加水分解する活性を1Unitとして酵素活性を算出し、M8A構造の糖鎖に対する加水分解活性を100%として各種糖鎖に対する相対活性を算出した。

各種構造のPAラベル化糖鎖に対するEndo-Zrの加水分解活性の測定結果を表4に示した。比較のためにEndo-Mの過去の論文のデータ(非特許文献6)を引用した。Endo-ZrはEndo-Mと同様に高マンノース型糖鎖に対する加水分解活性

が高く、さらに混成型糖鎖や2分岐の複合糖鎖を加水分解することができた。一方で、分岐が3つ以上の複合糖鎖やコアフコース構造を持つ糖鎖、bisecting GlcNAcを有する混成型糖鎖は分解できないことが明らかとなった。また、いくつかの糖鎖ではEndo-Mとは反応性が異なっており、特に2分岐の複合型糖鎖やM3B、M5A、M6B構造の糖鎖に対してはEndo-Mと比較して高い反応性を示した。

[0065] (17-3) トランスグリコシダーゼ活性の有無の検討

ENGaseの中には糖鎖を加水分解すると同時に任意のアクセプター分子に対して切断した糖鎖を転移する活性を持つものが知られており、その代表例としてEndo-Mが挙げられる。そこでEndo-Zrにも同様の糖転移活性(トランスグリコシダーゼ活性)があるか否かを調べた。

Endo-Zrのトランスグリコシダーゼ活性の検出は以下のように行った。終濃度100mM 酢酸ナトリウムバッファー(pH6.0)、2mM NGA2-Asn-Fmoc、50mMのアクセプター分子(p-ニトロフェニルグルコース)およびEndo-Zr部分精製酵素液を含む反応液(total volume: 10 μ l)を30°Cで16時間インキュベートし、95°Cで5分間加熱することにより酵素反応を停止した。反応液全量を実施例16に記載した方法でHPLCに供し、UV検出器(274nm)で検出を行った。

HPLCによる解析の結果、Endo-Zrのサンプルでは糖転移反応物のピークは検出されず、トランスグリコシダーゼ活性は確認できなかった(Data not shown)。

[配列フリーテキスト]

配列番号1: Endo-0m AA

配列番号2: Endo-0m (2319 bp)

配列番号3: プライマー1 (Endo-0m primer F)

配列番号4: プライマー2 (Endo-0m primer R)

配列番号5: Endo-Cp AA(Candida parapolymorpha)

配列番号6: Endo-Cp(Candida parapolymorpha)(2238 bp)

配列番号 7 : プライマー 3 (Endo-Cp primer F)

配列番号 8 : プライマー 4 (Endo-Cp primer R)

配列番号 9 : Endo-Pa AA(*Pichia anomala*)

配列番号 10 : Endo-Pa(*Pichia anomala*) (1971 bp)

配列番号 11 : プライマー 5 (Endo-Pa primer F)

配列番号 12 : プライマー 6 (Endo-0m primer R)

配列番号 13 : Endo-Zr AA(*Zygosaccharomyces rouxii*)

配列番号 14 : Endo-Zr(*Zygosaccharomyces rouxii*) (1920 bp)

配列番号 15 : プライマー 7 (Endo-Zr primer F)

配列番号 16 : プライマー 8 (Endo-Zr primer R)

請求の範囲

- [請求項1] 下記の(1)～(5)のいずれかのアミノ酸配列を含むエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質；
- (1)配列番号 1, 5, 9 又は 13 に示されるアミノ酸配列、
- (2)配列番号 1, 5, 9 又は 13 に示されるアミノ酸配列のうち、1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加されているアミノ酸配列、
- (3)配列番号 1, 5, 9 又は 13 に示されるアミノ酸配列と70%以上の同一性を有するアミノ酸配列、
- (4)配列番号 2, 6, 10 又は 14 に示される塩基配列にコードされたアミノ酸配列、
- (5)配列番号 2, 6, 10 又は 14 に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドの塩基配列によりコードされたアミノ酸配列。
- [請求項2] 請求項1に記載のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。
- [請求項3] 下記の(1)～(6)のいずれかの塩基配列を含むポリヌクレオチド；
- (1)配列番号 2, 6, 10 又は 14 に示される塩基配列を含むポリヌクレオチド、
- (2)配列番号 2, 6, 10 又は 14 に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド、
- (3)配列番号 3 及び 4 に示される塩基配列を含むプライマーセットにより増幅され、配列番号 2 と70%以上の同一性を有し、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド、
- (4)配列番号 7 及び 8 に示される塩基配列を含むプライマーセットに

より増幅され、配列番号 6 と 70% 以上の同一性を有し、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

(5) 配列番号 11 及び 12 に示される塩基配列を含むプライマーセットにより増幅され、配列番号 10 と 70% 以上の同一性を有し、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

(6) 配列番号 15 及び 16 に示される塩基配列を含むプライマーセットにより増幅され、配列番号 14 と 70% 以上の同一性を有し、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[請求項4] 請求項 2 又は 3 に記載のポリヌクレオチドを含有する、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質を発現するためのベクター。

[請求項5] 請求項 4 に記載のベクターが導入されている、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質発現用形質転換細胞。

[請求項6] 前記形質転換細胞が *Ogataea minuta*、*Candida parapolymorpha*、*Pichia anomala*、及び *Zygosaccharomyces rouxii* のいずれかの酵母から選択された酵母細胞を宿主とする形質転換細胞である、請求項 5 に記載の形質転換細胞。

[請求項7] 請求項 5 又は 6 に記載の形質転換細胞を用いることを特徴とする、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質の製造方法。

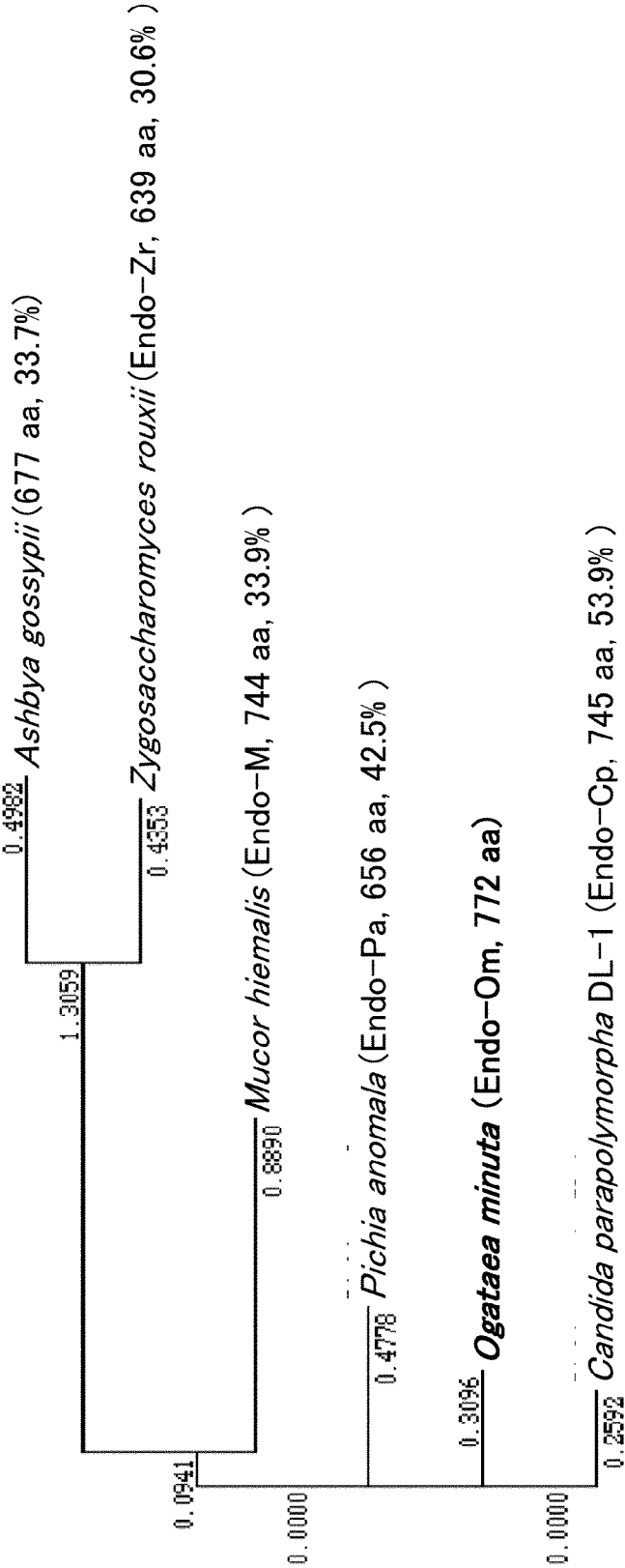
[請求項8] 請求項 1 に記載のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質を用いることを特徴とする、糖タンパク質からアスパラギン結合型糖鎖を切断する方法。

[請求項9] 請求項 1 に記載のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するタンパク質を用いることを特徴とする、アスパラギン結合型糖

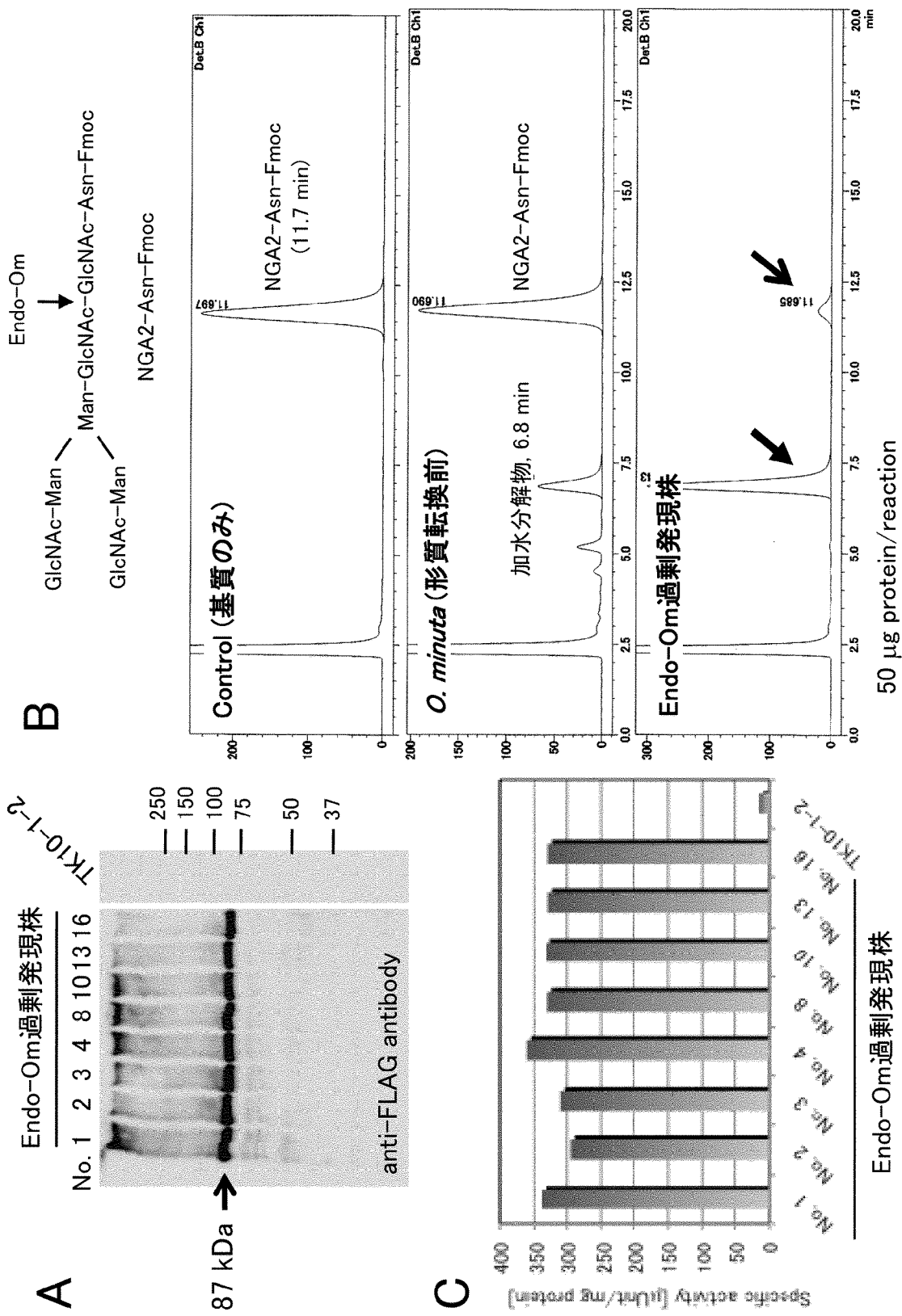
鎖を任意のアクセプター分子に対して転移する方法。

[illegible]

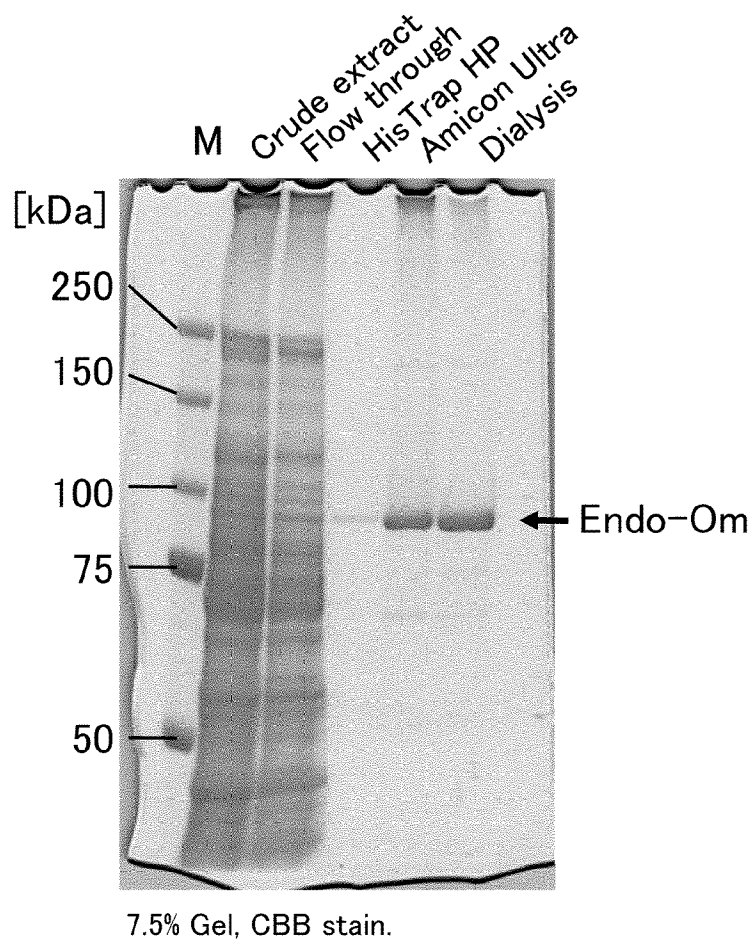
[図2]



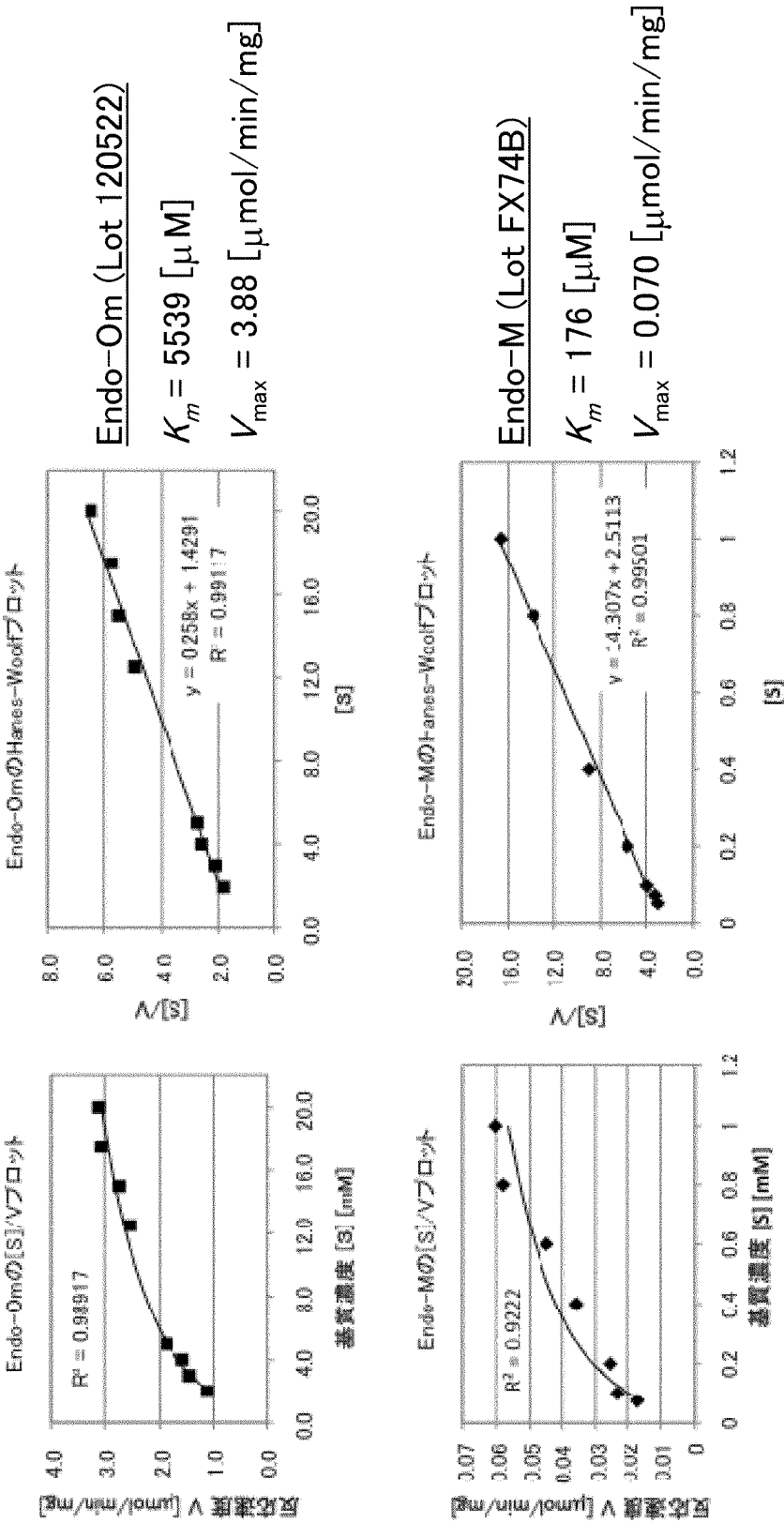
[図3]



[図4]

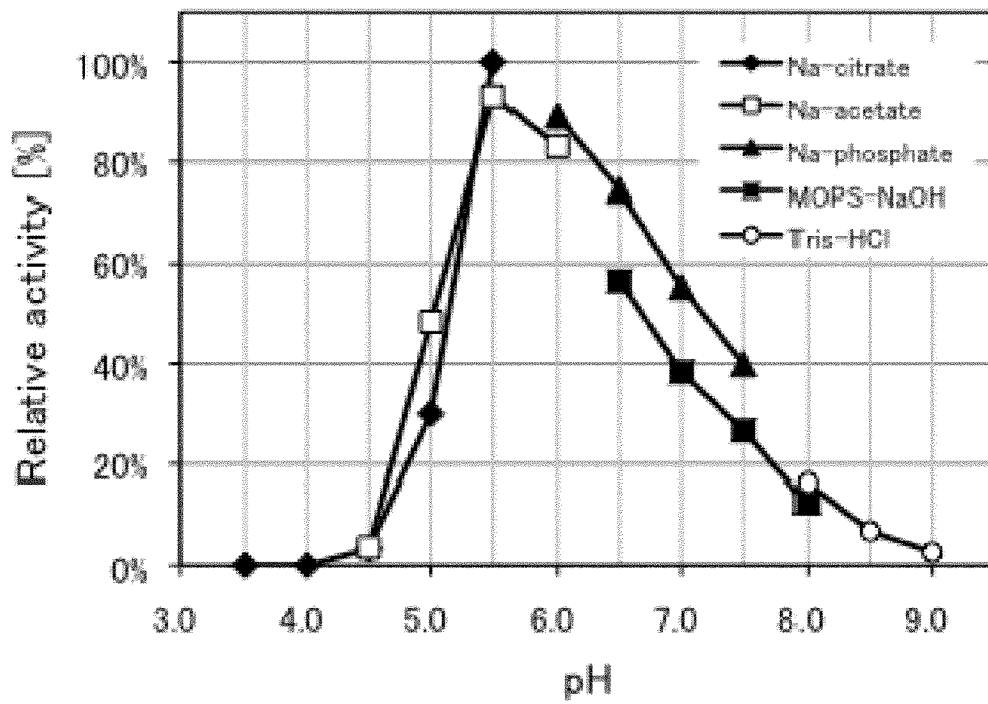


[図5]

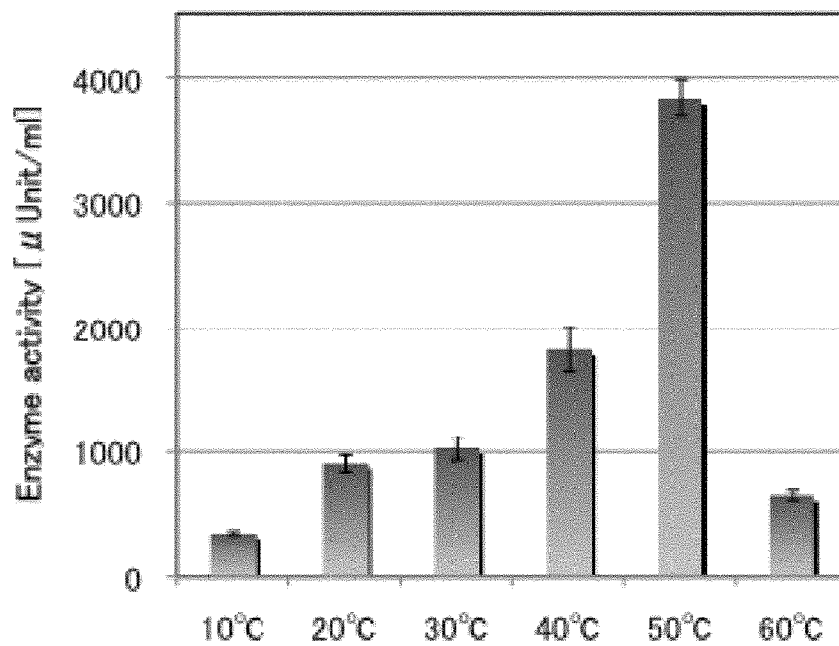


[図6]

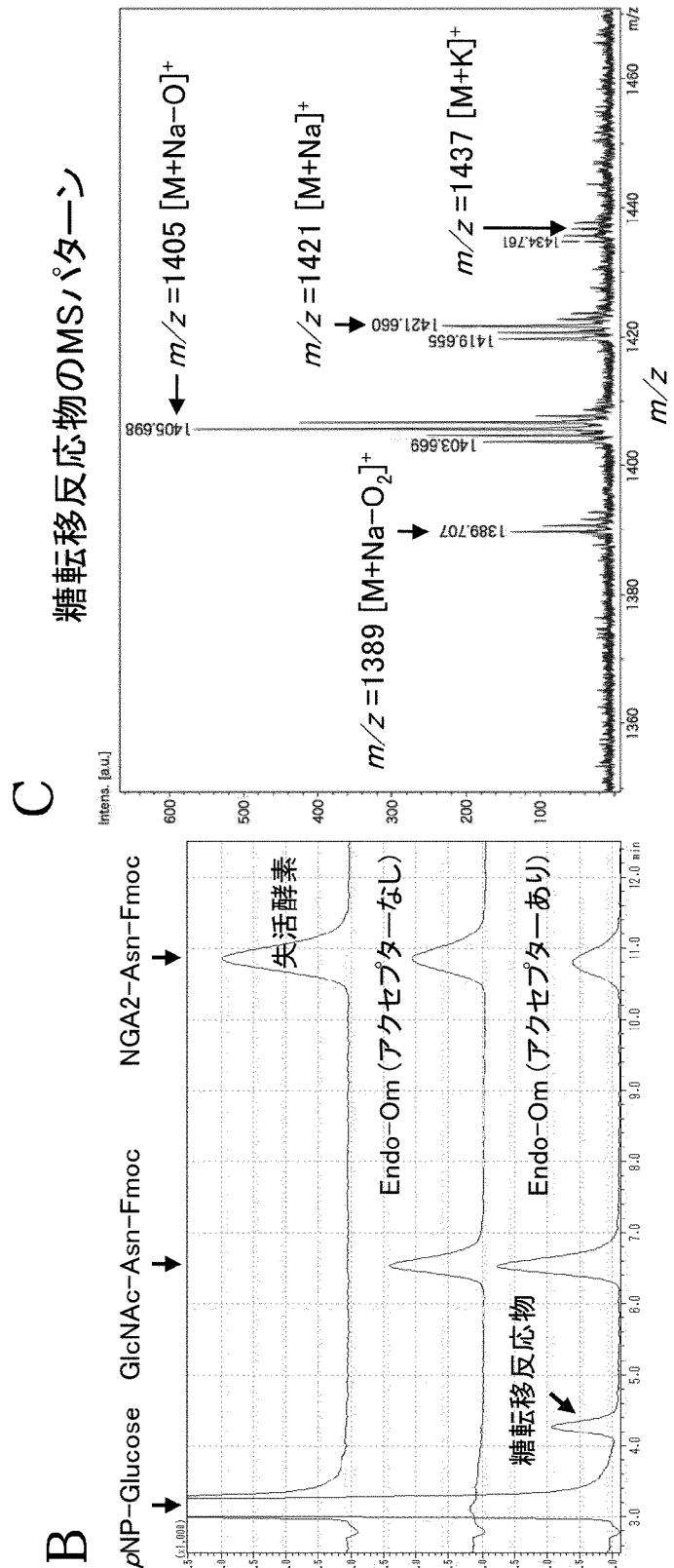
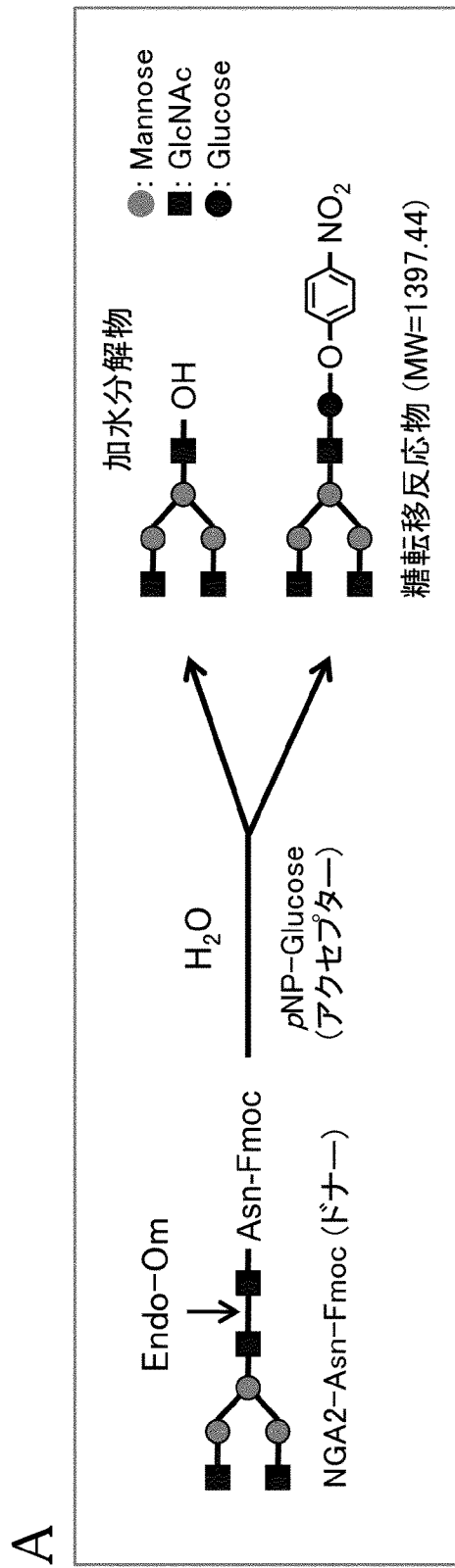
A. 至適pH



B. 至適温度

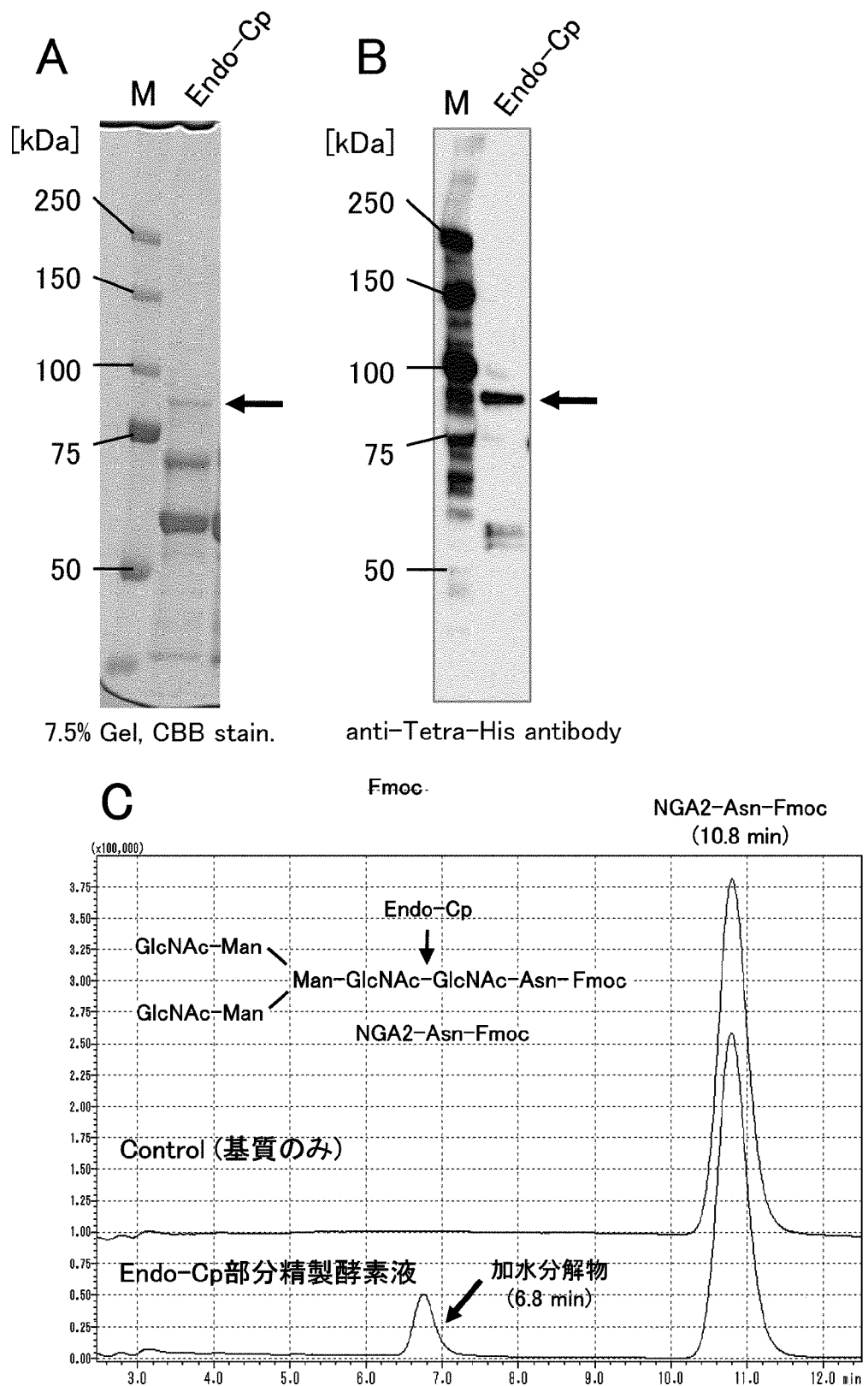


[図7]



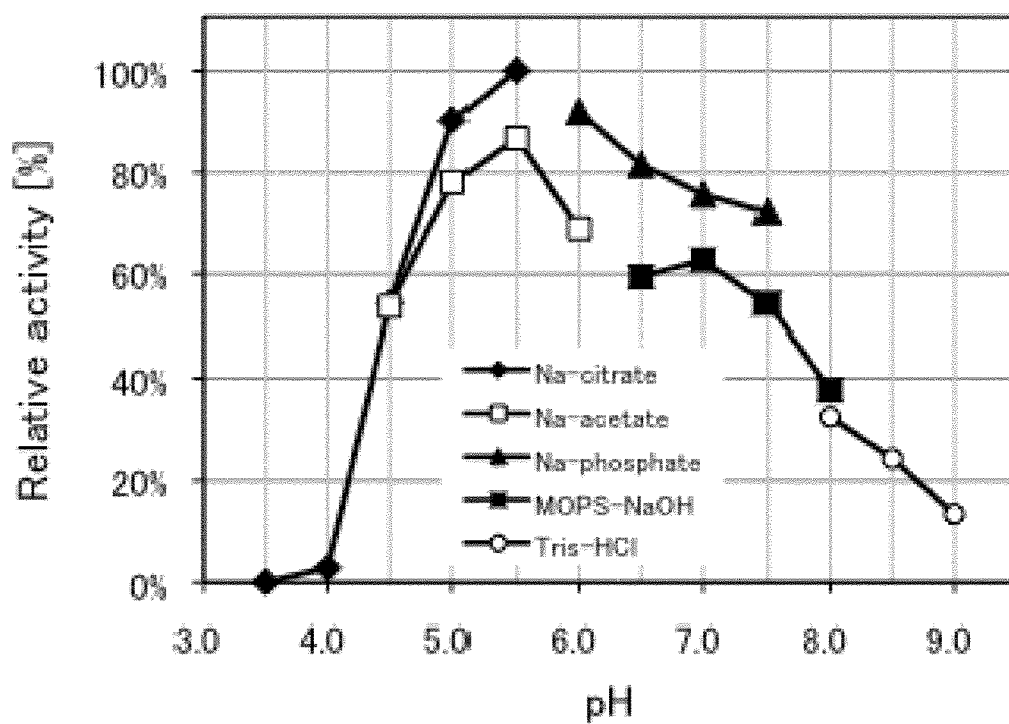
[illegible]

[図9]

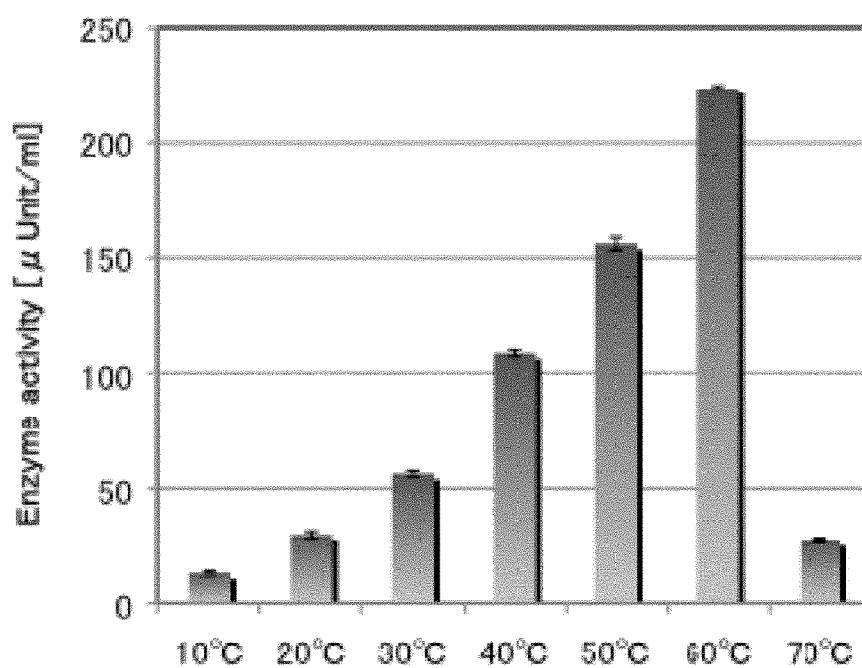


[図10]

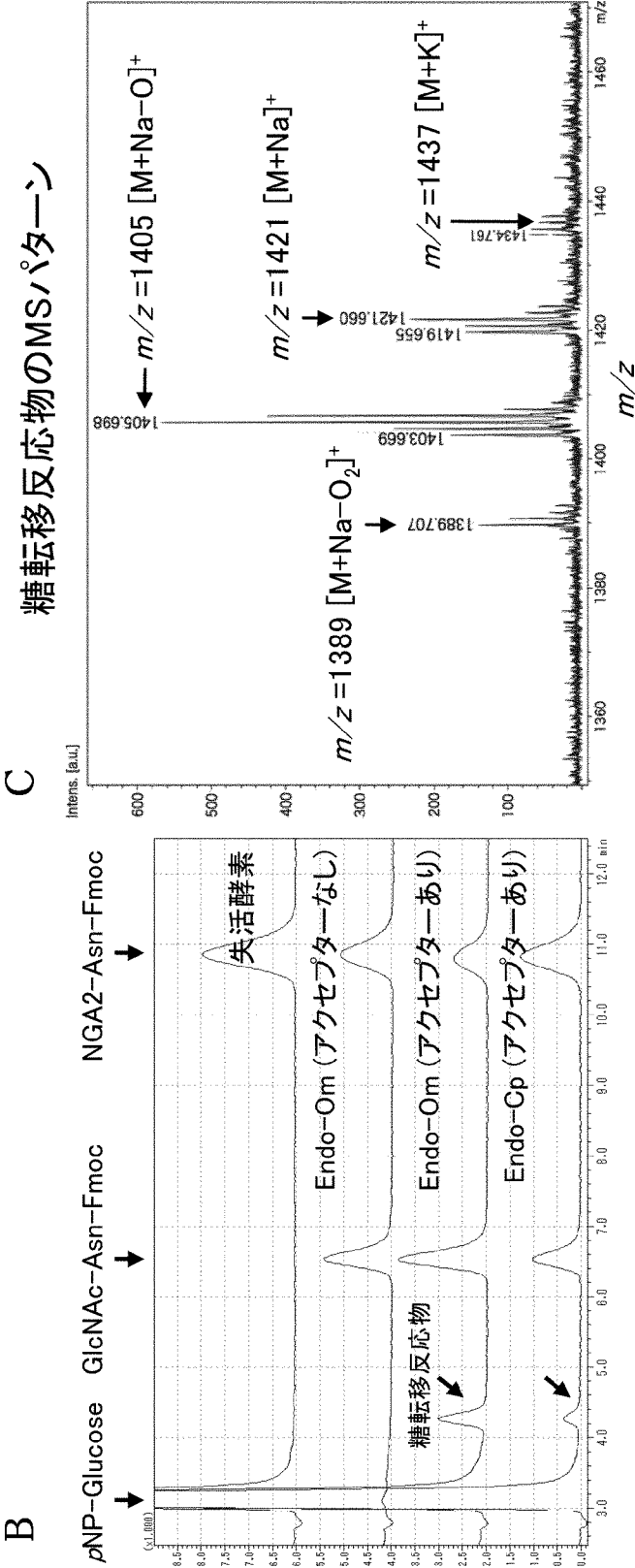
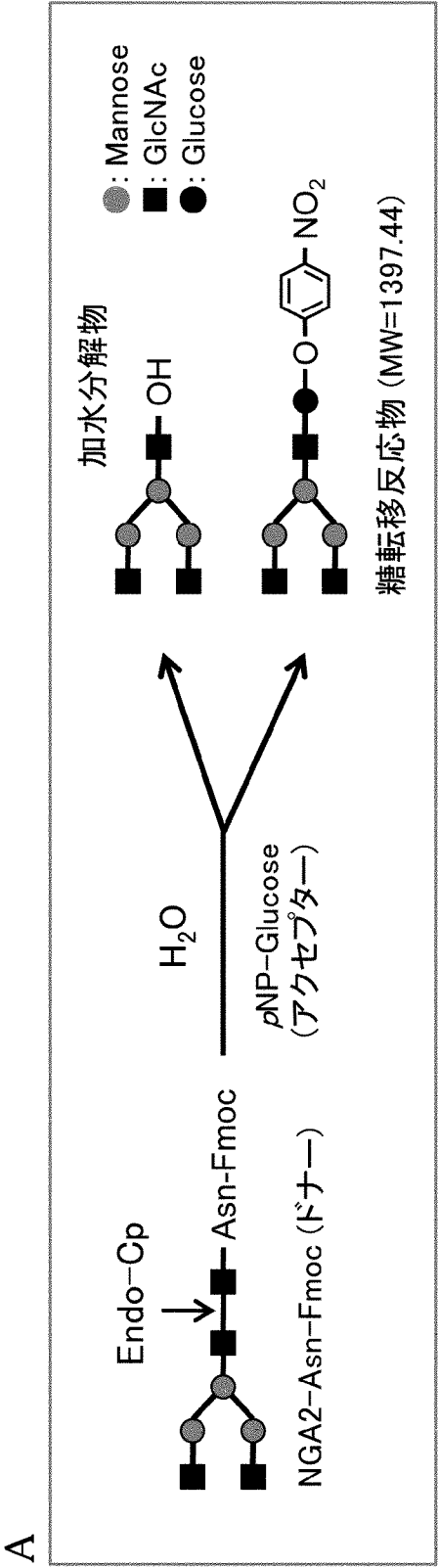
A. 至適pH



B. 至適温度

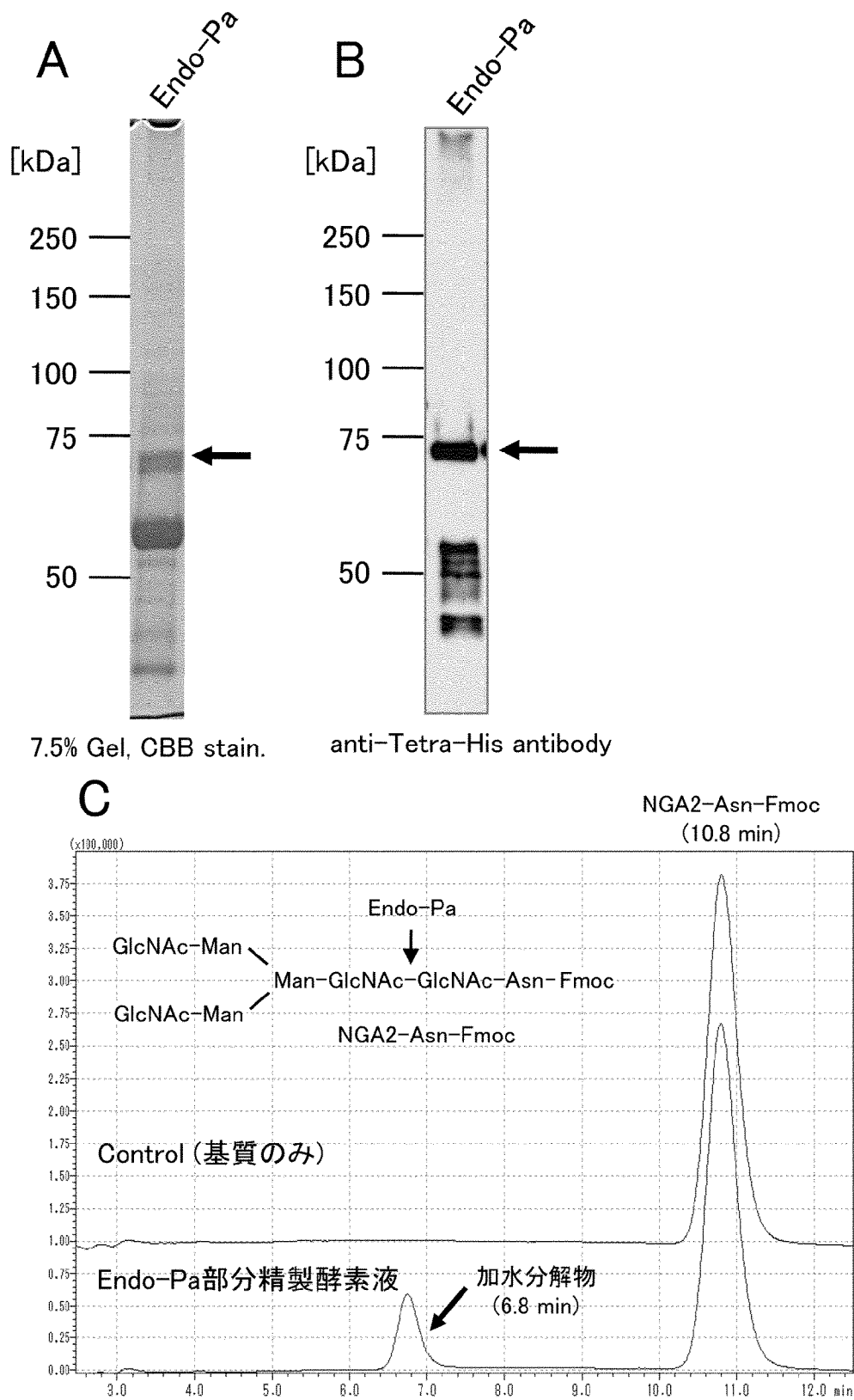


[図11]



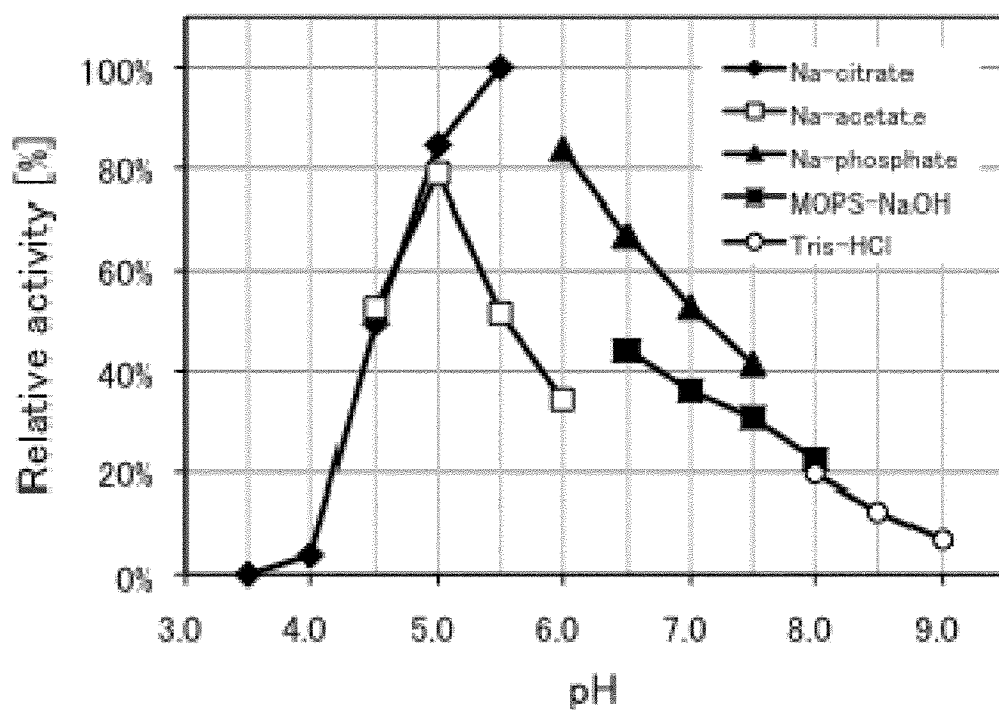
[illegible]

[図13]

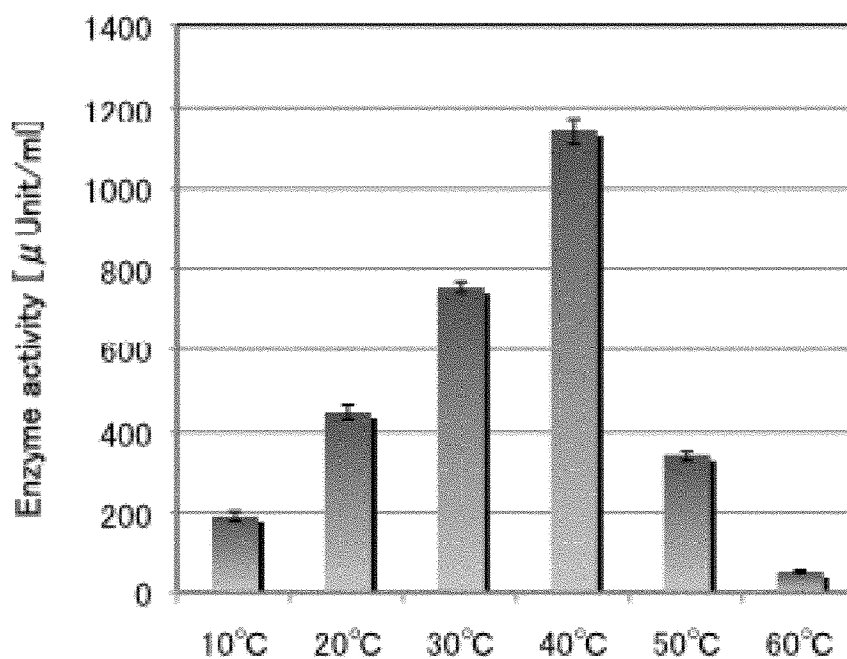


[図14]

A. 至適pH

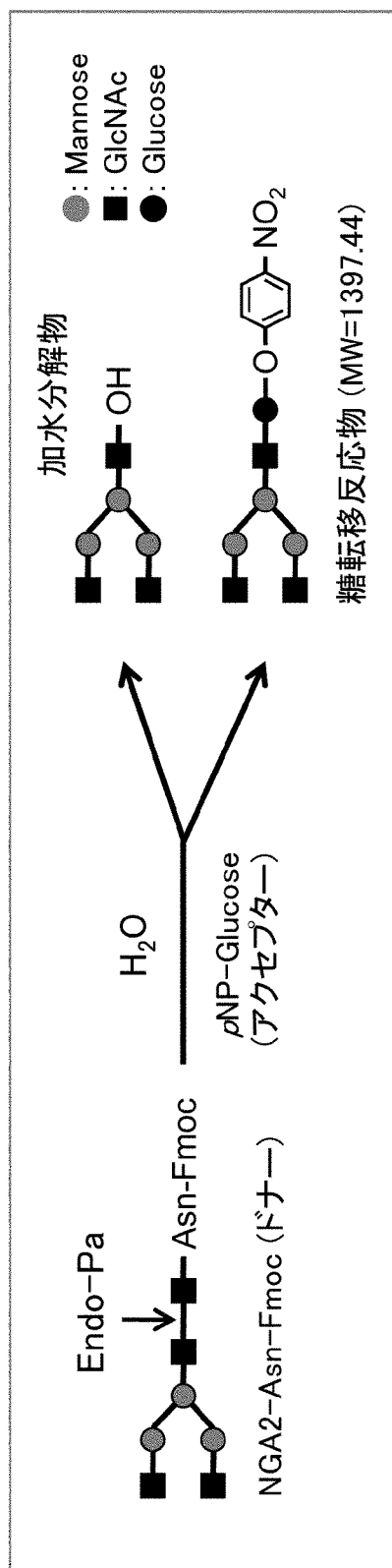


B. 至適温度

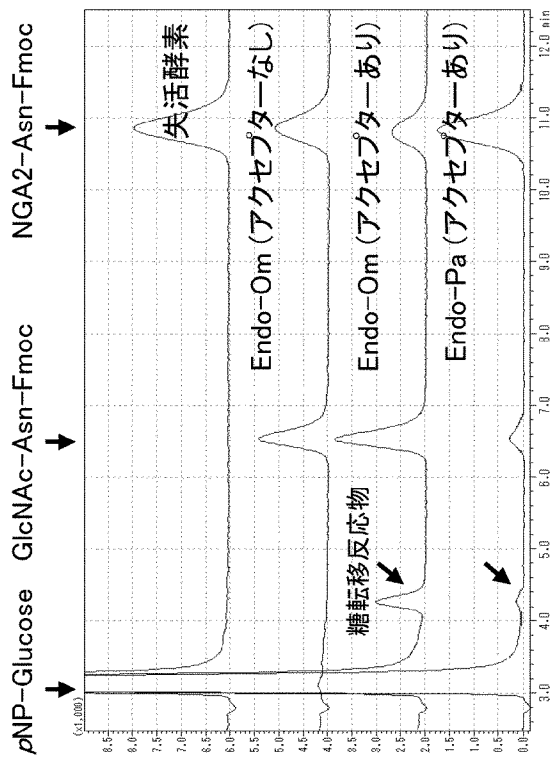


[図15]

A

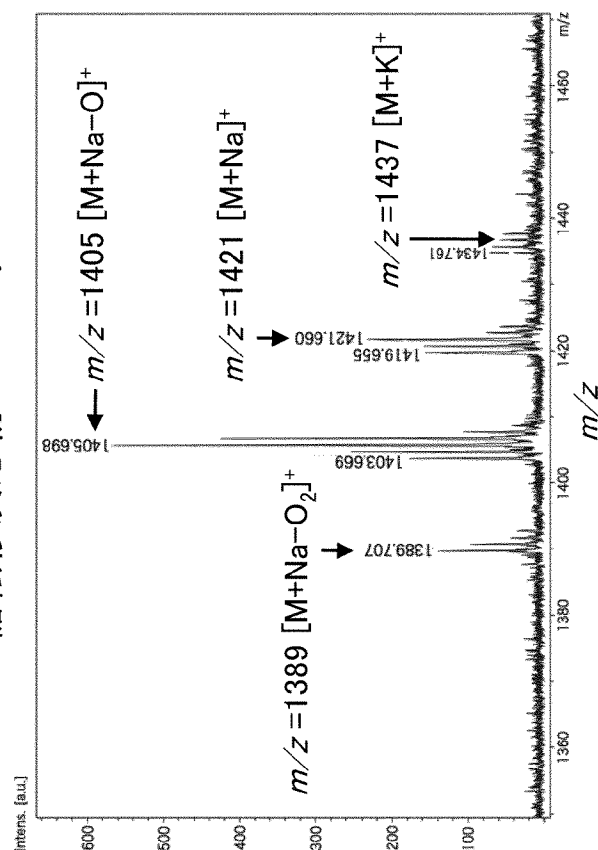


B



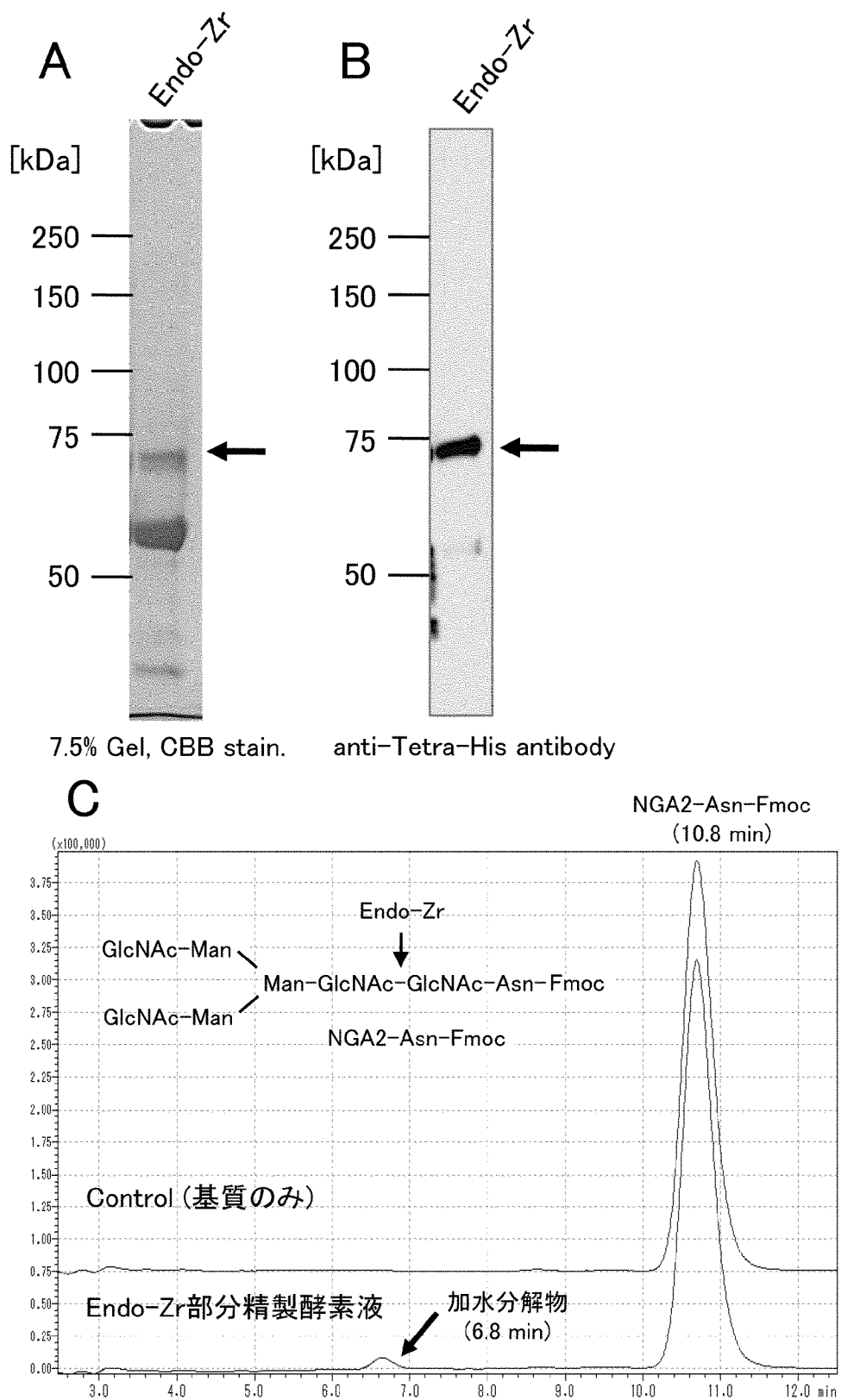
C

糖転移反応物のMSパターン



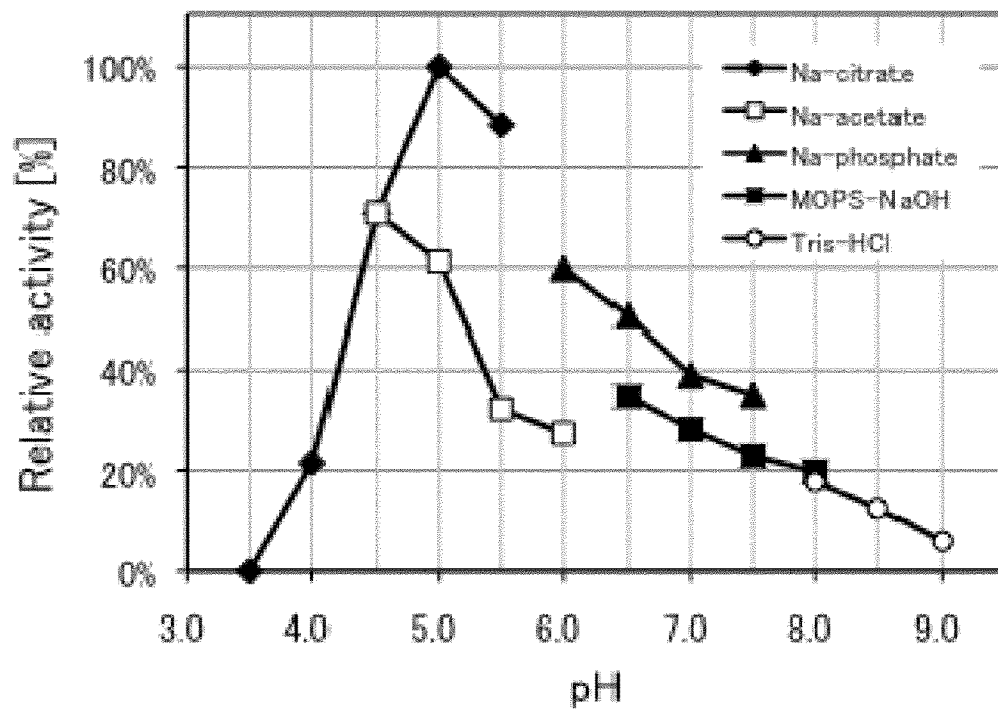
[illegible]

[図17]

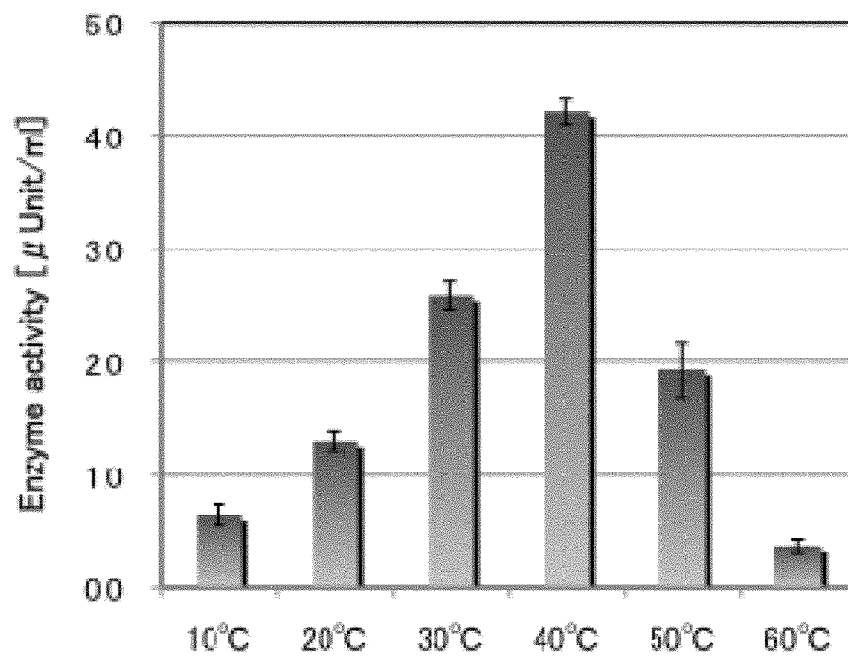


[図18]

A. 至適pH



B. 至適温度



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/075650

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/24(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/24, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Database UniProtKB/TrEMBL [online], Accession No. E7RB23, < http://www.uniprot.org/uniprot/E7RB23.txt?version=2 >, 31-May-2011 uploaded, [retrieved on 2012-10-22]	1-8/1-9
X/Y	Database GenBank [online], Accession No. AJ306295, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AJ306295 >, 14-Nov-2006 uploaded, [retrieved on 2012-10-22]	1-7/1-9
X/Y	Database UniProtKB/TrEMBL [online], Accession No. Q96TW7, < http://www.uniprot.org/uniprot/Q96TW7.txt?version=39 >, 28-Jun-2011 uploaded, [retrieved on 2012-10-22]	1-8/1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
23 October, 2012 (23.10.12)

Date of mailing of the international search report
30 October, 2012 (30.10.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/075650

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YAMAGISHI, H. et al., Differentiation between brewing and non-brewing yeasts using a combination of PCR and RFLP, J. Appl. Microbiol., 1999, Vol.86, Issue 3, p.505-513, Table 1	1-9
X/Y	Database GenBank [online], Accession No. CU928174, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CU928174 >, 14-Jan-2010 uploaded, [retrieved on 2012-10-22]	1-7/8, 9
X/Y	Database UniProtKB/TrEMBL [online], Accession No. C5DRB8, < http://www.uniprot.org/uniprot/C5DRB8.txt?version=17 >, 28-Jun-2011 uploaded, [retrieved on 2012-10-22]	1-8/1-9
Y	WO 2003/091431 A1 (Kirin Brewery Co., Ltd., National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 06 November 2003 (06.11.2003), examples & JP 4464269 B & US 2006/0148039 A1 & EP 1505149 A1 & DE 60325720 D & AT 420198 T	1-9
Y	HANEDA, Katsuji et al., Transglycosylation of intact sialo complex-type oligosaccharides to the N-acetylglucosamine moieties of glycopeptides by Mucor hiemalis endo-beta-N-acetylglucosaminidase, Carbohydr. Res., 1996, Vol.292, p.61-70, Fig.6.	9
Y	FAN, Jian-Qiang et al., Enhanced transglycosylation activity of Arthrobacter protophormiae endo-beta-N-acetylglucosaminidase in media containing organic solvents, J. Biol. Chem., 1995, Vol.270, No.30, p.17723-17729, TABLE II	9
Y	FUJITA, Kiyotaka et al., Characterization of endo-beta-N-acetylglucosaminidase from alkaliphilic Bacillus halodurans C-125., Biosci. Biotechnol. Biochem., 2004, Vol.68, No.5, p.1059-1066, Fig.3, 4.	9
A	KURODA, Kousuke et al., Production of Man5GlcNAc2-type sugar chain by the methylotrophic yeast Ogataea minuta, FEMS Yeast Res., 2006, Vol.6, Issue 7, p.1052-1062	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/075650

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(Invention 1) Parts of the inventions described in claims 1-9, which relate to an endo- β -N-acetylglucosaminidase comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1.

(Invention 2) Parts of the inventions described in claims 1-9, which relate to an endo- β -N-acetylglucosaminidase comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 5.

(Invention 3) Parts of the inventions described in claims 1-9, which relate to an endo- β -N-acetylglucosaminidase comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 9.

(Continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/075650

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

(Invention 4) Parts of the inventions described in claims 1-9, which relate to an endo- β -N-acetylglucosaminidase comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 13.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i,
C12N5/10(2006.01)i, C12N9/24(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/24, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, WPI

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	Database UniProtKB/TrEMBL[online], Accession No. E7RB23, < http://www.uniprot.org/uniprot/E7RB23.txt?version=2 >, 31-May-2011 uploaded, [retrieved on 2012-10-22]	1 - 8 / 1 - 9
X/Y	Database GenBank [online], Accession No. AJ306295, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AJ306295 >, 14-Nov-2006 uploaded, [retrieved on 2012-10-22]	1 - 7 / 1 - 9

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 3 . 1 0 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

3 0 . 1 0 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小倉 梢

4 B

4 5 0 4

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	Database UniProtKB/TrEMBL [online], Accession No. Q96TW7, < http://www.uniprot.org/uniprot/Q96TW7.txt?version=39 >, 28-Jun-2011 uploaded, [retrieved on 2012-10-22]	1 - 8 / 1 - 9
Y	YAMAGISHI, H. et al., Differentiation between brewing and non-brewing yeasts using a combination of PCR and RFLP, J. Appl. Microbiol., 1999, Vol. 86, Issue 3, p. 505-513, Table 1	1 - 9
X/Y	Database GenBank [online], Accession No. CU928174, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/CU928174 >, 14-Jan-2010 uploaded, [retrieved on 2012-10-22]	1 - 7 / 8、 9
X/Y	Database UniProtKB/TrEMBL [online], Accession No. C5DRB8, < http://www.uniprot.org/uniprot/C5DRB8.txt?version=17 >, 28-Jun-2011 uploaded, [retrieved on 2012-10-22]	1 - 8 / 1 - 9
Y	WO 2003/091431 A1 (麒麟麦酒株式会社、独立行政法人産業技術総合 研究所) 2003.11.06, 実施例 & JP 4464269 B & US 2006/0148039 A1 & EP 1505149 A1 & DE 60325720 D & AT 420198 T	1 - 9
Y	HANEDA, Katsuji et al., Transglycosylation of intact sialo complex-type oligosaccharides to the N-acetylglucosamine moieties of glycopeptides by <i>Mucor hiemalis</i> endo-beta-N-acetylglucosaminidase, Carbohydr. Res., 1996, Vol. 292, p. 61-70, Fig. 6.	9
Y	FAN, Jian-Qiang et al., Enhanced transglycosylation activity of <i>Arthrobacter protophormiae</i> endo-beta-N-acetylglucosaminidase in media containing organic solvents, J. Biol. Chem., 1995, Vol. 270, No. 30, p. 17723-17729, TABLE II	9
Y	FUJITA, Kiyotaka et al., Characterization of endo-beta-N-acetylglucosaminidase from alkaliphilic <i>Bacillus</i> <i>halodurans</i> C-125., Biosci. Biotechnol. Biochem., 2004, Vol. 68, No. 5, p. 1059-1066, Fig. 3, 4.	9
A	KURODA, Kousuke et al., Production of Man5GlcNAc2-type sugar chain by the methylotrophic yeast <i>Ogataea minuta</i> , FEMS Yeast Res., 2006, Vol. 6, Issue 7, p. 1052-1062	1 - 9

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

（発明1）請求項1－9に係る発明のうち、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼに関するもの

（発明2）請求項1－9に係る発明のうち、配列番号5に示されるアミノ酸配列を含むエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼに関するもの

（発明3）請求項1－9に係る発明のうち、配列番号9に示されるアミノ酸配列を含むエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼに関するもの

（発明4）請求項1－9に係る発明のうち、配列番号13に示されるアミノ酸配列を含むエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼに関するもの

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。