

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7684216号
(P7684216)

(45)発行日 令和7年5月27日(2025.5.27)

(24)登録日 令和7年5月19日(2025.5.19)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 9/24 (2006.01)	C 1 2 N 9/24 Z N A
C 1 2 N 5/071(2010.01)	C 1 2 N 5/071
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12

請求項の数 15 (全68頁)

(21)出願番号	特願2021-532503(P2021-532503)	(73)特許権者	300066874
(86)(22)出願日	令和1年8月16日(2019.8.16)		ザ・ユニバーシティ・オブ・ブリティッシュ・コロンビア
(65)公表番号	特表2021-532838(P2021-532838 A)		カナダ国 V 6 T 1 Z 3 プリティッシュ・コロンビア、バンクーバー、アグロノミー・ロード 1 0 3 - 6 1 9 0、ユニバーシティ・インダストリー・リエゾン・オフィス
(43)公表日	令和3年12月2日(2021.12.2)	(73)特許権者	510171793
(86)国際出願番号	PCT/CA2019/051121		ユニバーシティ・ヘルス・ネットワーク UNIVERSITY HEALTH NETWORK
(87)国際公開番号	WO2020/034043		カナダ国、オンタリオ エム5ジー 2 シー 4、トロント、エリザベス・ストリート 1 9 0
(87)国際公開日	令和2年2月20日(2020.2.20)		
審査請求日	令和4年8月15日(2022.8.15)		
(31)優先権主張番号	62/719,272		
(32)優先日	平成30年8月17日(2018.8.17)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ドナー臓器における糖鎖抗原除去のための酵素組成物、それに関連する方法および使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ドナー臓器から A 抗原を酵素的に切断するための灌流流体であって、前記灌流流体は、
 (a) 配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 5 から選択される 1 つ以上の精製フラボニフラクター・プラウティ G a l N A c デアセチラーゼと、
 (b) 配列番号 7、配列番号 9、および配列番号 1 0 から選択される 1 つ以上の精製フラボニフラクター・プラウティガラクトサミニダーゼと、
 を含む灌流流体。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の灌流流体であって、前記灌流流体は、配列番号 2、4、および 5 のうちの 1 つの配列と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列から本質的になる G a l N A c デアセチラーゼ活性を有する精製酵素と、配列番号 7、9、および 1 0 のうちの 1 つの配列と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列から本質的になるガラクトサミニダーゼ活性を有する精製酵素とを含む、灌流流体。

10

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の灌流流体であって、前記灌流流体は、
 (a) 配列番号 2、配列番号 4 および配列番号 5 の精製フラボニフラクター・プラウティ G a l N A c デアセチラーゼタンパク質から選択される 1 つ以上の前記精製 G a l N A c デアセチラーゼタンパク質と、
 (b) 配列番号 7、配列番号 9 および配列番号 1 0 の精製フラボニフラクター・プラウテ

20

ィガラクトサミニダーゼタンパク質から選択される1つ以上の前記精製ガラクトサミニダーゼタンパク質と、
を含む、灌流流体。

【請求項4】

前記灌流流体が、下記(i)~(iii)

(i) 1 μg/ml以下の濃度でA抗原を切断することができる、

(ii) 6.5と7.5との間のpHでA抗原切断活性を有する、

(iii) 4 と 37 との間の温度でA抗原切断活性を有する、

の少なくとも1つを満たす、請求項1~3のいずれか1つに記載の灌流流体。

【請求項5】

前記灌流流体が、Steen(商標)、Perfadex(商標)、Perfadex Plus(商標)、EuroCollins溶液、ヒスチジン-トリプトファン-ケトグルタル酸(HTK)溶液、 Wisconsin大学溶液(UW)、Celsior溶液、腎臓灌流溶液(KPS-1)、京都大学溶液、IGL-1溶液、およびクエン酸塩溶液から選択される、緩衝細胞外溶液をさらに含む、請求項1~4のいずれか1つに記載の灌流流体。

【請求項6】

ドナー臓器からex vivoでA抗原を酵素的に切断する方法であって、

(a) A型抗原を提示するドナー臓器を、フラボニフラクター・ブラウティGalNAcデアセチラーゼタンパク質およびフラボニフラクター・ブラウティガラクトサミニダーゼタンパク質を含む流体で、酵素がドナー臓器からA型抗原の切断を可能にするのに十分な時間灌流する工程、または、

(b) A型抗原を提示するドナー臓器を、フラボニフラクター・ブラウティGalNAcデアセチラーゼタンパク質およびフラボニフラクター・ブラウティガラクトサミニダーゼタンパク質を含む流体と、酵素がドナー臓器からA抗原の切断を可能にするのに十分な時間インキュベートする工程を含む、方法であって、前記フラボニフラクター・ブラウティGalNAcデアセチラーゼタンパク質が、配列番号2、配列番号4、および配列番号5から選択される1つ以上であり、前記フラボニフラクター・ブラウティガラクトサミニダーゼタンパク質が、配列番号7、配列番号9、および配列番号10から選択される1つ以上である、方法。

【請求項7】

前記流体が、配列番号2、4、および5のうちの1つの配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列から本質的になるGalNAcデアセチラーゼ活性を有する精製酵素と、配列番号7、9、および10のうちの1つの配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列から本質的になるガラクトサミニダーゼ活性を有する精製酵素とを含む、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記フラボニフラクター・ブラウティGalNAcデアセチラーゼが配列番号4または配列番号5の精製フラボニフラクター・ブラウティGalNAcデアセチラーゼタンパク質であり、前記フラボニフラクター・ブラウティガラクトサミニダーゼが配列番号9または配列番号10の精製フラボニフラクター・ブラウティガラクトサミニダーゼタンパク質である、請求項6に記載の方法。

【請求項9】

前記フラボニフラクター・ブラウティGalNAcデアセチラーゼタンパク質および前記フラボニフラクター・ブラウティガラクトサミニダーゼタンパク質が、Steen(商標)、Perfadex(商標)、Perfadex Plus(商標)、EuroCollins溶液、ヒスチジン-トリプトファン-ケトグルタル酸(HTK)溶液、 Wisconsin大学溶液(UW)、Celsior溶液、腎臓灌流溶液(KPS-1)、京都大学溶液、IGL-1溶液、およびクエン酸塩溶液から選択される、緩衝細胞外溶液中に存在する、請求項6~8のいずれか1つに記載の方法。

【請求項10】

10

20

30

40

50

前記ドナー臓器が固形臓器である、請求項 6 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 1 1】

前記固形臓器が、肺、腎臓、肝臓、心臓、膵臓、および腸から選択される、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記固形臓器が肺であり、

前記フラボニフラクター・プラウティGalNAcデアセチラーゼタンパク質および前記フラボニフラクター・プラウティガラクトサミニダーゼタンパク質は、*ex vivo*で前記肺を含む緩衝細胞外溶液と混合され、前記肺を通して循環され、それによって、前記GalNAcデアセチラーゼタンパク質および前記ガラクトサミニダーゼタンパク質は、前記肺の血管系からA抗原を実質的に除去するのに十分な時間、前記肺の血管系と接触する、請求項 1 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 3】

前記肺の血管系からA抗原を除去する時間は、1時間以内である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記方法はさらに、前記ドナー臓器を洗浄して、フラボニフラクター・プラウティGalNAcデアセチラーゼ、フラボニフラクター・プラウティガラクトサミニダーゼおよび切断されたA抗原を除去する工程を含む、請求項 6 ~ 1 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 1 5】

前記流体が、下記(i)~(iii)

(i) $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下でA抗原を切断することができる

(ii) 6.5と7.5との間のpHでA抗原切断活性を有する、

(iii) 4 と 37 との間の温度でA抗原切断活性を有する、

の少なくとも1つを満たす、請求項 6 ~ 1 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願への相互参照)

本出願は、2018年8月17日に出願された米国仮特許出願第62/719,272号「糖鎖抗原切断のための酵素組成物、それに関連する方法、使用、装置およびシステム」の利益を主張する。

30

【0002】

本発明は、酵素組成物の分野に関する。特に、本発明は、ドナー臓器において抗原を切断するための酵素組成物、ならびに当該組成物を用いて抗原を切断するための方法および使用に関する。

【背景技術】

【0003】

血液型Aの人の血漿がB抗原に対する抗体を含み、逆もまた同様であり、それによって不適合な輸血により補体の活性化と赤血球(RBC)溶解を生じ得る(Daniels 2010)ため、血液型の正確な適合は、輸血医学における中心的な要件である。これらの細胞表面抗原は、A型血液およびB型血液それぞれに対して、1,3結合Nアセチルガラクトサミン(GalNAc)またはガラクトース(Gal)で終端する糖鎖構造である。一方、O型赤血球はこれらの末端糖を含まず、全般的に輸血され得る(Garratty 2008)。したがって、患者の血液型が不明または不明確な場合である緊急時に備えて、O型赤血球を血液バンクに十分に供給する必要がある。しかし、供給は限られていることが多い。

40

【0004】

AまたはB RBCをOに変換する手段としてAまたはB RBCからGalNAcまたはGal構造を酵素により除去する概念がGoldstein(Goldstein 19

50

82 ; US 4609627 および CA 2272925) によって最初に提案され、実証された。グリーンコーヒー豆由来の ガラクトシダーゼを用いて、B型RBCをO型に変換し、続いて輸血を行い、成功した (Kruskal 2000)。しかしながら、必要とされた酵素量から、このアプローチは非実用的なものであった。A型の変換はより困難であるが、これは主にA型の血液型は内部結合が異なる多くのサブタイプが存在するためである (Clausen 1989)。同様に、 ガラクトシダーゼはB型抗原の除去に用いられている (例えば、EP 2243793 参照)。A型の変換を含む実用的な変換への大きな進歩は、四糖類基質を用いて、AおよびB変換活性の両方に関する細菌のライブラリのスクリーニングによってなされた。中性pH値で高い抗原切断活性を示すグリコシダーゼの二つの新しいファミリーが発見された (CA Zy GH 109 N アセチルガラクトサミニダーゼおよび GH 110 ガラクトシダーゼ (Liu 2007))。両酵素はそれぞれの抗原を完全に除去して対応するRBCを変換した。しかしながら、特にA型の変換には相当量の酵素が必要であり (60 mg 酵素 / 血液単位)、さらなる発展を制限している。細胞から糖鎖抗原をより効率的に除去する酵素は有用であろう。

【発明の概要】

【0005】

本発明は、部分的には、本明細書中に記載されるような、ガラクトサミニダーゼおよび GalNAcデアセチラーゼの組合せが、以前に同定されたA抗原切断酵素よりも桁違いに効率的であるという驚くべき発見に基づく。例えば、ある条件下では、いくつかのGalNAcデアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼ酵素は、 $1 \mu / \text{ml}$ 以下でA抗原を切断でき得る。さらに、酵素の組み合わせによる切断効率は、赤血球の生存能力を維持するのに適したpH (すなわち、約6.5と約7.5との間のpH)において維持される。さらに、酵素は、 4°C と 37°C との間の温度で活性を有することが見出され、これはまた、血液の採取、洗浄および保存プロトコルに適している。さらに、酵素の効率は、クラウディング剤 (例えばデキストラン) の添加によってさらに向上する。また、同じ2段階除去プロセスがドナー臓器に適用され得ることも理解されている。

【0006】

しかしながら、ドナー臓器がより長く灌流される場合、より多くの酵素を使用してドナー臓器が灌流され得る時間を短縮することができ、またはより少ない酵素を使用することができるが、当業者によって理解されるであろう。

【0007】

ある実施形態によれば、(a)精製GalNAcデアセチラーゼタンパク質と、(b)精製ガラクトサミニダーゼタンパク質と、を含む、ドナー臓器からA抗原を酵素的に切断するための灌流流体が提供される。

【0008】

さらなる実施形態によれば、灌流流体が提供され、当該灌流流体は、(a)配列番号2、配列番号4、配列番号5、配列番号17、配列番号23、配列番号29、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、および配列番号35のうちの一つ以上から選択される精製GalNAcデアセチラーゼタンパク質と、(b)配列番号7、配列番号9、配列番号10、配列番号19、配列番号21、配列番号36および配列番号37のうちの一つ以上から選択される精製ガラクトサミニダーゼタンパク質とを含む。

【0009】

さらなる実施態様によれば、灌流流体が提供され、当該灌流流体は、配列番号2、4、5、17、23、29、31および32~35のうちの一つの配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列から本質的になるGalNAcデアセチラーゼ活性を有する精製酵素と、配列番号7、9、10、19、21、36および37のうちの一つの配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列から本質的になるガラクトサミニダーゼ活性を有する精製酵素とを含む。

【0010】

酵素は、(a)配列番号2、配列番号4および配列番号5の精製フラボニフラクター・ブ

10

20

30

40

50

ラウティ (*Flavonifractor plautii*) GalNAcデアセチラーゼタンパク質である、精製GalNAcデアセチラーゼタンパク質と、(b)配列番号7、配列番号9および配列番号10の精製フラボニフラクター・ブラウティガラクトサミニダーゼタンパク質である、精製ガラクトサミニダーゼタンパク質との1つ以上から選択することができる。酵素は、(a)配列番号17および配列番号32の精製クロストリジウム・テルチウム (*Clostridium tertium*) GalNAcデアセチラーゼタンパク質である精製GalNAcデアセチラーゼタンパク質と、(b)配列番号19および配列番号36の精製クロストリジウム・テルチウムガラクトサミニダーゼタンパク質である精製ガラクトサミニダーゼタンパク質との1つ以上から選択することができる。GalNAcデアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、 $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下でA抗原を切断でき得る。GalNAcデアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、約6.5と約7.5との間のpHでA抗原切断活性を有し得る。GalNAcデアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、 $4\ ^\circ\text{C}$ と $37\ ^\circ\text{C}$ との間の温度でA抗原切断活性を有し得る。灌流流体は、緩衝細胞外溶液をさらに含み得る。緩衝細胞外溶液は、Steen (商標)、Perfadex (商標)、Perfadex Plus (商標)、EuroCollins溶液、ヒスチジン-トリプトファン-ケトグルタル酸 (HTK) 溶液、ウィスコンシン大学 (University of Wisconsin) 溶液 (UW)、Celsior溶液、腎臓灌流溶液 (KPS-1)、京都大学 (Kyoto University) 溶液、IGL-1溶液、およびクエン酸塩溶液から選択することができる。

10

【0011】

20

さらなる実施形態によれば、(a)A型抗原を提示するドナー臓器を、GalNAcデアセチラーゼタンパク質およびガラクトサミニダーゼタンパク質を含む流体で、酵素がドナー臓器からA型抗原の切断を可能にするのに十分な時間灌流する工程、または、(b)A型抗原を提示するドナー臓器を、GalNAcデアセチラーゼタンパク質およびガラクトサミニダーゼタンパク質を含む流体と、酵素がドナー臓器からA抗原の切断を可能にするのに十分な時間インキュベートする工程を含む、ドナー臓器からex vivoでA型抗原を酵素的に切断する方法が提供される。

【0012】

GalNAcデアセチラーゼは、配列番号2、配列番号4、配列番号5、配列番号17、配列番号23、配列番号29、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34および配列番号35の1つ以上から選択される精製タンパク質であり得る。ガラクトサミニダーゼは、配列番号7、配列番号9、配列番号10、配列番号19、配列番号21、配列番号36および配列番号37の1つ以上から選択される精製タンパク質であり得る。

30

【0013】

GalNAcデアセチラーゼ活性を有する精製酵素は、配列番号2、4、5、17、23、29、31および32~35のうちの1つの配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を本質的に含むことができ、ガラクトサミニダーゼ活性を有する精製酵素は、配列番号7、9、10、19、21、36および37のうちの1つの配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を本質的に含むことができる。

【0014】

40

GalNAcデアセチラーゼは、配列番号4または配列番号5の精製フラボニフラクター・ブラウティ (*Flavonifractor plautii*) GalNAcデアセチラーゼタンパク質であってもよく、ガラクトサミニダーゼは、配列番号9または配列番号10の精製フラボニフラクター・ブラウティガラクトサミニダーゼタンパク質であってもよい。

【0015】

GalNAcデアセチラーゼタンパク質およびガラクトサミニダーゼタンパク質は、緩衝細胞外溶液中に存在し得る。緩衝細胞外溶液は、Steen (商標)、Perfadex (商標)、Perfadex Plus (商標)、EuroCollins溶液、ヒスチジン-トリプトファン-ケトグルタル酸 (HTK) 溶液、ウィスコンシン大学 (Univ

50

ersity of Wisconsin) 溶液 (UW)、Celsior 溶液、腎臓灌流溶液 (KPS-1)、京都大学 (Kyoto University) 溶液、IGL-1 溶液、およびクエン酸塩溶液から選択することができる。ドナー臓器は固形臓器であり得る。固形臓器は、肺、腎臓、肝臓、心臓、膵臓、および腸のうちの 1 つから選択することができる。固形臓器は肺であり得る。

【0016】

GalNAc デアセチラーゼタンパク質およびガラクトサミニダーゼタンパク質は、*ex vivo* 緩衝細胞外肺溶液と混合され、肺を通して循環され得、それによって、GalNAc デアセチラーゼタンパク質およびガラクトサミニダーゼタンパク質は、肺の血管系から A 抗原を実質的に除去するのに十分な時間、ドナー臓器の血管系と接触する。GalNAc デアセチラーゼタンパク質およびガラクトサミニダーゼタンパク質は、*ex vivo* 緩衝細胞外腎臓溶液と混合され、腎臓を通して循環され得、それによって、GalNAc デアセチラーゼタンパク質およびガラクトサミニダーゼタンパク質は、腎臓の血管系から A 抗原を実質的に除去するのに十分な時間、ドナー臓器の血管系と接触する。GalNAc デアセチラーゼタンパク質およびガラクトサミニダーゼタンパク質は、*ex vivo* 緩衝細胞外肝臓溶液と混合され、肝臓を通して循環され得、それによって、GalNAc デアセチラーゼタンパク質およびガラクトサミニダーゼタンパク質は、肝臓の血管系から A 抗原を実質的に除去するのに十分な時間、ドナー臓器の血管系と接触する。GalNAc デアセチラーゼタンパク質およびガラクトサミニダーゼタンパク質は、*ex vivo* で緩衝細胞外心臓溶液と混合され、心臓を通して循環され得、それにより、GalNAc デアセチラーゼタンパク質およびガラクトサミニダーゼタンパク質は、心臓の血管系から A 抗原を実質的に除去するのに十分な時間、ドナー臓器の血管系と接触する。GalNAc デアセチラーゼタンパク質およびガラクトサミニダーゼタンパク質は、*ex vivo* で緩衝細胞外膵臓溶液と混合され、膵臓を通して循環され得、それにより、GalNAc デアセチラーゼタンパク質およびガラクトサミニダーゼタンパク質は、膵臓の血管系から A 抗原を実質的に除去するのに十分な時間、ドナー臓器の血管系と接触する。GalNAc デアセチラーゼタンパク質およびガラクトサミニダーゼタンパク質は、*ex vivo* 緩衝細胞外腸溶液と混合され、腸を通して循環され得、それによって、GalNAc デアセチラーゼタンパク質およびガラクトサミニダーゼタンパク質は、腸の血管系から A 抗原を実質的に除去するのに十分な時間、ドナー臓器の血管系と接触する。

【0017】

血管系から A 抗原を除去する時間は、約 1 時間であり得る。血管から A 抗原を除去する時間は、1 時間未満であり得る。血管系から A 抗原を除去する時間は約 2 時間である。

【0018】

本方法は、ドナー臓器を洗浄して、GalNAc デアセチラーゼ、ガラクトサミニダーゼおよび切断された A 抗原を除去することをさらに含み得る。GalNAc デアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で A 抗原を切断し得る。GalNAc デアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、約 6.5 と約 7.5 との間の pH で A 抗原切断活性を有し得る。GalNAc デアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、 4°C と 37°C との間の温度で A 抗原切断活性を有し得る。

【0019】

さらなる実施態様によれば、組成物が提供され、当該組成物は、配列番号 2、4、5、17、23、29、31 および 32 ~ 35 のうちの 1 つの配列と少なくとも 85% 同一のアミノ酸配列から本質的になる GalNAc デアセチラーゼ活性を有する精製酵素と、配列番号 7、9、10、19、21、36 及び 37 のうちの 1 つに記載の配列と少なくとも 85% 同一のアミノ酸配列から本質的になるガラクトサミニダーゼ活性を有する精製酵素とを含む。

【0020】

さらなる実施態様によれば、組成物が提供され、当該組成物は、配列番号 2、4、5、17、23、29、31 および 32 ~ 35 のうちの 1 つの配列と少なくとも 80% 同一のア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列から本質的になるGalNAcデアセチラーゼ活性を有する精製酵素と、配列番号7、9、10、19、21、36および37のうちの1つの配列と少なくとも80%同一のアミノ酸配列から本質的になるガラクトサミニダーゼ活性を有する精製酵素とを含む。

【0021】

さらなる実施態様によれば、組成物が提供され、当該組成物は、配列番号2、4、5、17、23、29、31および32~35のうちの1つの配列と少なくとも75%同一のアミノ酸配列から本質的になるGalNAcデアセチラーゼ活性を有する精製酵素と、配列番号7、9、10、19、21、36及び37のうちの1つの配列と少なくとも75%同一のアミノ酸配列から本質的になるガラクトサミニダーゼ活性を有する精製酵素とを含む。

10

【0022】

前記組成物は、(a)前記精製GalNAcデアセチラーゼおよび前記精製ガラクトサミニダーゼが固定化されていてもよいか、(b)精製GalNAcデアセチラーゼが固定化されてもよいか、または(c)精製ガラクトサミニダーゼが固定化されてもよい、ことを含んでもよい。

【0023】

固定化酵素は、表面に結合されてもよく、当該表面は、以下の1つ以上から選択されてもよい：(a)ビーズまたはマイクロスフェア、(b)容器、(c)管、(d)カラム、および(e)マトリックス。組成物は、さらに、クラウディング剤を含めてもよい。クラウディング剤は、デキストラン、硫酸デキストラン、デキストリン、プルラン、ポリ(エチレングリコール)、Ficoll(商標)、および不活性タンパク質のうちの1つ以上から選択されてもよい。

20

【0024】

さらなる実施態様によれば、配列番号2、配列番号4または配列番号5のフラボニフラクター・プラウティGalNAcデアセチラーゼを含む精製酵素が提供される。

【0025】

さらなる実施態様によれば、配列番号7、配列番号9または配列番号10のフラボニフラクター・プラウティガラクトサミニダーゼを含む精製酵素が提供される。

【0026】

さらなる実施態様によれば、配列番号17または配列番号32のクロストリジウム・テルチウムGalNAcデアセチラーゼを含む精製酵素が提供される。

30

【0027】

さらなる実施態様によれば、配列番号19または配列番号36のクロストリジウム・テルチウムガラクトサミニダーゼを含む精製酵素が提供される。

【0028】

タンパク質タグは、アルブミン結合タンパク質(ABP)、アルカリホスファターゼ(AP)、AU1エピトープ、AU5エピトープ、AviTag、バクテリオファージT7エピトープ(T7-タグ)、バクテリオファージV5エピトープ(V5-タグ)、ピオチン-カルボキシ担体タンパク質(BCCP)、ブルータングウイルスタグ(B-タグ)、単一ドメインのラクダ抗体(C-タグ)、カルモジュリン結合ペプチド(CBPまたはカルモジュリン-タグ)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、セルロース結合ドメイン(CBP)、キチン結合ドメイン(CBD)、コリン結合ドメイン(CBD)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)、DogTag、E2エピトープ、E-タグ、FLAGエピトープ(FLAG-タグ)、ガラクトース結合タンパク質(GBP)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、Glu-Glu(EE-タグ)、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、ヒトインフルエンザヘマグルチニン(HA)、HaloTag(商標)、交互ヒスチジンおよびグルタミントグ(HQタグ)、交互ヒスチジンおよびアスパラギンタグ(HNタグ)、ヒスチジンアフィニティタグ(HAT)、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)、HSVエピトープ、イソペプチド(Isopet-タグ)、ケトステロイドイソメラーゼ(KSI)、KT3エピトープ、LacZ、

40

50

ルシフェラーゼ、マルトース結合タンパク質(MBP)、Mycエピトープ(Myc-タグ)、NE-タグ、NusA、PDZドメイン、PDZリガンド、ポリアルギニン(Arg-タグ)、ポリアスパラギン酸(Asp-タグ)、ポリシステイン(Cys-タグ)、ポリグルタミン酸(Glu-タグ)、ポリヒスチジン(His-タグ)、ポリフェニアラニン(Phe-タグ)、プロフィニティExact、プロテインC、Rho1D4タグ、S1-タグ、S-タグ、ソフトタグ1、ソフトタグ3、スヌーブタグJr、スヌーブタグ、スポットタグ、SpyTag(Spy-タグ)、ストレプトアビジン結合ペプチド(SBP)、ブドウ球菌タンパク質A(プロテインA)、ブドウ球菌タンパク質G(プロテインG)、ストレプトタグ、ストレプトアビジン(SBP-タグ)、ストレプトタグII、Sdy-タグ、低分子ユビキチン様修飾因子(SUMO)、タンデムアフィニティ精製(TAP)、T7エピトープ、テトラシステインタグ(TCタグ)、チオレドキシン(Trx)、TrpE、Tyタグ、ユビキチン、ユニバーサル、V5タグ、VSV-GまたはVSV-タグおよびXpressタグのうちの1つ以上から選択されてもよい。

10

【0029】

さらなる実施態様によれば、ドナー臓器からA抗原を酵素的に切断する方法であって、(a)GalNAcデアセチラーゼタンパク質およびガラクトサミニダーゼタンパク質と、A型抗原を提示するドナー臓器とを混合する工程と、(b)酵素がドナー臓器の血管内腔からA抗原を切断するのに十分な時間、酵素を、ドナー臓器血管に灌流する工程とを含む方法が提供される。

【0030】

前記方法は、さらに、クラウディング剤を添加することを含み得る。クラウディング剤は、デキストラン、硫酸デキストラン、デキストリン、プルラン、ポリ(エチレングリコール)、Ficoll(商標)、超分岐グリセロール、および不活性タンパク質のうちの1つ以上から選択されてもよい。前記方法は、本明細書に記載の酵素組成物を含む臓器灌流溶液または臓器保存溶液でドナー臓器を灌流することを含み得る。

20

【0031】

前記方法は、ドナー臓器を洗浄し、GalNAcデアセチラーゼ、ガラクトサミニダーゼおよび/またはクラウディング剤を除去することをさらに含んでもよい。

【0032】

GalNAcデアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、A抗原を $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で切断でき得る。GalNAcデアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、約6.5と約7.5との間のpHでA抗原切断活性を有してもよい。GalNAcデアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、 4°C と 37°C との間の温度でA抗原切断活性を有してもよい。

30

【0033】

GalNAcデアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、A抗原を $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で切断でき得る。GalNAcデアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、 $90\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下でA抗原を切断でき得る。GalNAcデアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、A抗原を $80\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で切断でき得る。GalNAcデアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、 $70\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下でA抗原を切断でき得る。GalNAcデアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、 $60\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下でA抗原を切断でき得る。GalNAcデアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、A抗原を $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で切断でき得る。GalNAcデアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、A抗原を $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で切断でき得る。GalNAcデアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、A抗原を $30\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で切断でき得る。GalNAcデアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、A抗原を $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で切断でき得る。GalNAcデアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、A抗原を $15\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で切断でき得る。GalNAcデアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、A抗原を $14\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で切断でき得る。GalNAcデアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、A抗原を $13\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で切断でき得る。GalNAcデアセチラ

40

50

G a l N A cデアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、4 ° Cと40 ° Cとの間の温度でA抗原切断活性を有していてもよい。G a l N A cデアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、4 ° Cと37 ° Cとの間の温度でA抗原切断活性を有していてもよい。G a l N A cデアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼは、5 ° Cと37 ° Cとの間の温度でA抗原切断活性を有していてもよい。

【0036】

別の実施形態によれば、配列番号2、配列番号4または配列番号5のフラボニフラクター・プラウティG a l N A cデアセチラーゼを含む精製酵素が提供される。

【0037】

別の実施形態によれば、配列番号7、配列番号9または配列番号10のフラボニフラクター・プラウティガラクトサミニダーゼを含む精製酵素が提供される。

10

【0038】

別の実施形態によれば、精製クロストリジウム・テルチウムG a l N A cデアセチラーゼおよび配列番号14のガラクトサミニダーゼ融合タンパク質を含む精製酵素が提供される。

【0039】

別の実施形態によれば、本願明細書に記載される核酸と異種核酸配列とを含むベクターが提供される。

【0040】

別の実施形態によれば、この方法は、*in vitro*または*ex vivo*で実施してもよい。本明細書で使用される*ex vivo*は、この方法が生物の外部で実施されることを意味する。例えば、*ex vivo*は、*ex vivo*肺灌流(EVLP)および提供された血液の処置を包含する。本明細書中で使用される場合、*ex vivo*とは、組織または細胞(例えば赤血球やドナー臓器)が*in vivo*であったときにその組織または細胞が置かれていた状態から最小のまたはいくらかの変化を伴う外部環境における、生物からの組織または細胞の中または上で行われる実験または測定または処置を指す。

20

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】図1は、A型、H型およびB型について、-1,3-結合-N-アセチルガラクトサミン(G a l N A c)またはガラクトース(G a l)で終端する細胞表面抗原糖鎖構造の概略図を示し、ここで三角形は、-アセチル-ガラクトサミニダーゼE m G H 1 0 9および-ガラクトシダーゼB f G a l 1 1 0の切断点を示す。

30

【0042】

【図2】図2は、A抗原切断のデアセチラーゼ経路を、対応する質量分析(MS)とともに示しており、これにより、フラボニフラクター・プラウティ(F p)G a l N A cデアセチラーゼは、A抗原の末端-N-アセチル-ガラクトサミンからアセチル基を切断し(-42 m/z)、次いで、ガラクトサミニド中間体は、フラボニフラクター・プラウティ(F p)ガラクトサミニダーゼにより切断される(-161 m/z)。

【0043】

【図3】図3は、異なる濃度のE m G H 1 0 9またはフラボニフラクター・プラウティG a l N A cデアセチラーゼ(F p G a l N A cデアセチラーゼ)+フラボニフラクター・プラウティガラクトサミニダーゼ(F pガラクトサミニダーゼ)で処理、または37 ° Cで1時間処理したA+RBCのFACS分析を示しており、可視化のために抗H抗体(二次FITC標識を追加)およびAPC標識抗A抗体が使用され、H抗原の出現領域は左上のボックスにある。列A~Dは、5 μ g / m l (A)、10 μ g / m l (B)、50 μ g / m l (C)、50 μ g / m l +デキストラン40k(D)でE m G H 1 0 9およびF p G a l N A c D e A c + F p G a l N a s eを比較する。

40

【0044】

【図4】図4は、E m G H 1 0 9とF p G a l N A c D e A c + F p G a l N a s eを、種々の酵素濃度において、種々の温度(すなわち、4 ° C、室温(RT)および37 ° C)において、デキストランの存在下()および非存在下()で比較したものである。

50

【0045】

【図5】図5は、A + B + および O + 赤血球切断産物の HPAE - PAD 分析、および A + 赤血球における全長フラボニフラクター・ブラウティ GalNAc デアセチラーゼ (FpGalNAcDeAc) + フラボニフラクター・ブラウティガラクトサミニダーゼ (FpGalNase) 酵素と切断された FpGalNAcDeAc + FpGalNase 酵素との比較を示す。

【0046】

【図6】図6は、(A) FpGalNAc デアセチラーゼおよび (B) Fp ガラクトサミニダーゼの各々についての pH プロファイルを示す。

【0047】

【図7】図7は、(A) A + RBC コントロール、(B) フラボニフラクター・ブラウティ GalNAc デアセチラーゼ (FpGalNAcDeAc) + フラボニフラクター・ブラウティガラクトサミニダーゼ (FpGalNase) (10 ug/mL)、(C) FpGalNAcDeAc + クロストリジウム・テルチウム (Ct) Ct5757_GalNase (10 ug/mL)、および (D) FpGalNAcDeAc + ロビンソニエラ・ペオリエンシス (Robinsoniella peoriensis) (Rp) ガラクトサミニダーゼ (Rp1021) GalNase (10 ug/mL) について、FACS を介して分析した A 赤血球上の A 抗原の H 抗原への変換を示す。

【0048】

【図8】図8は、異なる灌流溶液 (つまり、PBS、Steen (商標)、および Perfadex (商標)) 中の A 型ヒト赤血球からの A 抗原除去に対する酵素の用量増加効果を示す。

【0049】

【図9】図9は、STEEN 溶液中の A 型ヒト動脈に対する酵素の用量増加効果を示し、ここで、A 型抗原の割合は、未処理 (コントロール)、処理 (処理 (treatment)) A 型動脈およびネガティブコントロールとしての O 型動脈から採取した生検の免疫組織化学的分析から定量される。

【0050】

【図10】図10は、ex vivo で灌流したヒトドナー肺に対する1時間の酵素処理の効果の検証を示しており、生検したヒトドナー肺の免疫組織化学的染色により、処理前画像を、肺の右上部依存性 (RUD)、右上部非依存性 (RUND)、右中央非依存性 (RMND)、右中央依存性 (RMD)、右下部非依存性 (RLND)、および右下部依存性 (RLD) 領域の処理後画像と比較したところ、A 型抗原は血管に存在しない。

【0051】

【図11】図11は、ex vivo で灌流したヒトドナー肺に対する3時間の酵素処理の効果の検証を示し、生検したヒトドナー肺の免疫組織化学的染色により、処理前画像を、肺の右上部依存性 (RUD)、右上部非依存性 (RUND)、右中部非依存性 (RMND)、右中部依存性 (RMD)、右下部非依存性 (RLND)、および右下部依存性 (RLD) 領域の処理後画像と比較したところ、A 型抗原は血管に存在しない。

【発明を実施するための形態】

【0052】

以下の詳細な説明は、添付の図と併せて読むとよりよく理解されるであろう。本発明を説明するために、図面は本発明の実施形態を示す。しかしながら、本発明は、示される正確な構成、実施例、および手段に限定されない。

【0053】

本明細書において直接定義されない用語は、本発明の技術分野において理解されるように、それらに一般的に関連する意味を有するものと理解されるものとする。

【0054】

本明細書で使用される「固定化酵素」は、不活性の不溶性物質であってもよい表面に付着した酵素である。酵素の固定化は、pH、温度などの条件の変化に対する抵抗性を増大さ

10

20

30

40

50

せ、使用後および酵素再使用のためのそれらの除去を補助することができる。

【0055】

酵素の固定化は、種々の方法（例えば、アフィニティタグ結合、ガラス上の表面吸着、樹脂、アルギン酸塩ビーズまたはマトリックス、ビーズ、繊維またはマイクロスフェアの捕捉、表面または他の酵素への架橋結合および表面への共有結合）によって達成されてもよい。

【0056】

本明細書中で使用する場合、「アフィニティタグ結合」とは、酵素の表面への固定化（例えば、非共有結合性または共有結合性のタンパク質タグを用いる多孔質材料）を指す。アフィニティタグ結合は、タンパク質精製に使用されており、より最近では、Ez i G（商標）（スウェーデンのENGINEZYME AB（商標）（例えば、PCT/US 1992/010113）、およびPCT/SE 2015/050108）によって生物触媒用途に使用されている。活性酵素を表面に付着させるための代替システムが当該技術分野で公知である（例えば、US 4088538、US 4141857、US 4206259、US 4218363、US 4229536、US 4239854、US 4619897、US 4748121、US 4749653、US 4897352、US 4954444、US 4978619、US 5154808、US 5914367、US 5962279、US 6030933、US 6291582、US 6254645、US 10,016,490、およびUS 10,041,055を参照）。

【0057】

タンパク質タグは、組換えタンパク質上に遺伝的にグラフトされたペプチド配列であり、化学剤または酵素的手段によって除去可能であることが多く、種々の目的のためにタンパク質に結合される。表Aに記載されているタンパク質タグは、実施例であることを意図しており、決して限定することを意図していない。ある種類のタンパク質タグはアフィニティタグであり、アフィニティ技術を用いて粗生物学的供給源から（例えば、発現系生物から）精製することができるように、または表面への「タグ付けされた」タンパク質の固定化を容易にするために、タンパク質またはペプチド配列に付加される。アフィニティタグの例としては、キチン結合ドメイン（CBD）、マルトース結合タンパク質（MBP）、ストレプト-タグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、および金属マトリックスに結合するポリヒスチジン（His-タグ）が挙げられる。別のタイプのタンパク質タグはエピトープタグ（例えば、V5-タグ、Myc-タグ、HA-タグ、スポット-タグ、NE-タグ）であり、これは高親和性抗体の産生を容易にするために選択される短いペプチド配列であり、免疫反応性を改善するためのウイルス遺伝子配列に由来することが多い。エピトープタグは、タンパク質の精製および表面への固定にも使用されるが、ウェスタンブロットリング、免疫蛍光および免疫沈降実験に特に有用である。さらに別の種類のタンパク質タグは、クロマトグラフィタグ（例えば、FLAGタグのようなポリアニオン性アミノ酸）であり、これは、タンパク質のクロマトグラフィ特性を変更して、分離および精製または固定化を補助するために使用され得る。さらに別のタンパク質タグは、可溶化タグ（例えば、マルトース結合タンパク質（MBP）、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、チオレドキシニン（TRX）およびポリ（NANP））および蛍光タグ（例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP））である。タンパク質タグは、特定の酵素的修飾、化学的修飾、またはタンパク質を他の成分に結合することを可能にする。しかしながら、タンパク質配列に付加されるタグの種類または数によっては、タンパク質本来の機能、この場合は、酵素機能は、タグによって損なわれ得る。従って、酵素の活性が損なわれないことを確実にするためにタンパク質タグを選択する必要がある、あるいは、使用前にタンパク質タグをタンパク質から切断してもよい。

【0058】

表A：代表的なタンパク質タグ

10

20

30

40

50

タグ名	長さ (配列)	配列番号	位置
アルブミン結合タンパク質 (ABP)	137		N末端またはC末端
アルカリホスファターゼ (AP)	444		第一級アミン (リシン側鎖ε-アミンとN末端α-アミン)
AU1エピトープ	6 (DTYRYI)	59	N末端またはC末端
AU5エピトープ	6 (TDFYLK)	60	N末端またはC末端
AviTag	15 (GLNDIFEAQKIEWHE)	61	
バクテリオファージT7エピトープ (T7-タグ)	11 (MASMTGGQQMG)	62	N末端または内部
バクテリオファージV5エピトープ (V5-タグ)	14 (GKPIPNPLLLGLDST)	63	C末端
ビオチン-カルボキシ担体タンパク質 (BCCP)	100		N末端またはC末端
ブルータングウィルスタグ (B-タグ)	6 (QYPALT)	64	N末端またはC末端
ペプチドタグは単ドメインのラクダ抗体 (C-タグ) に結合する	4 (EPEA)	65	

10

20

30

40

50

カルモジュリン結合ペプチド (CBPまたはカルモジュリン-タグ)	26 (KRRWKKNF IAVSAA NRFKK I S S S G A L)	66	N末端またはC末端
クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)	218		N末端
セルロース結合ドメイン (CBP)	27~189		N末端、C末端、または内部 (ドメイン依存性)
キチン結合ドメイン (CBD)	51		N末端またはC末端
コリン結合ドメイン (CBD)	145		N末端
ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR)	227		N末端またはC末端
D o g T a g	23 (D I P A T Y E F T D G K H Y I T N E P I P P K)	67	
E2エピトープ	10 (S S T S S D F R D R)	68	N末端、C末端または内部
E-タグ	13 (G A P V P Y P D P L E P R)	69	
F L A Gエピトープ (F L A G-タグ)	8 (D Y K D D D K)	70	N末端またはC末端
ガラクトース結合タンパク質 (GBP)	509		N末端またはC末端
緑色蛍光タンパク質 (GFP)	220		N末端またはC末端
G l u - G l u (E E-タグ)	6 (E Y M P M E または E F M P M E)	71 72	N末端、C末端、または内部
グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)	211		N末端またはC末端
ヒトインフルエンザヘマグルチニン (HA)	31		N末端、C末端または内部
抗体によって認識される赤血球凝集素 (HA-タグ)	9 (Y P Y D V P D Y A)	73	
H a l o T a g (登録商標)	312		N末端またはC末端

10

20

30

40

50

ヒスチジンアフィニティタグ (HAT)	19 (KDHLIHNVHKEFHAHAHNK)	74	N末端またはC末端
ヒスチジンとグルタミンは交互ペプチドタグである (HQ-タグ)	6 (HQHQHQ)	75	
ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP)	400		第一級アミン (リシン側鎖ε-アミンとN末端α-アミン)
ヒスチジンとアスパラギンの交互ペプチドタグ (HN-タグ)	12 (HNHNHNHNHNHN)	76	
HSVエピトープ	11 (QPELAPED)	77	C末端
ピリン-Cタンパク質に共有結合するイソペプチド (Isopeptide tag)	16 (TDKDMTITFTNKKDAE)	78	
ケトステロイドイソメラーゼ (KSI)	125		N末端
KT3エピトープ	11 (KPPTPPPEPET)	79	N末端またはC末端
LacZ	1024		N末端またはC末端
ルシフェラーゼ	551		N末端
マルトース結合タンパク質 (MBP)	396		N末端またはC末端
Mycエピトープ	11 (CEQKLISEEDL)	80	N末端、C末端または内部
c-mycペプチドエピトープ (Myc-タグ)	10 (EQKLISEEDL)	81	
合成ペプチド (NE-タグ)	18 (TKENPRSNQEESYDINES)	82	
NusA	495		N末端またはC末端
PDZドメイン	80~90		N末端、C末端、または内部
PDZリガンド	5~7 (変動)		C末端
ポリアルギニン (Arg-タグ)	5~6 (通常5; RRRRR)	83	C末端
ポリアスパラギン酸 (Asp-タグ)	5~16 (DDDDD)	84	C末端

10

20

30

40

50

ポリシステイン (Cys-タグ)	4 (CCCC)	85	N末端
ポリグルタミン酸タグ (Glu-タグ)	6 (EEEEEE)	86	
ポリヒスチジン (His-タグ)	2~10 (通常6 ; HHHHHH)	87	N末端またはC末端
ポリフェニルアラニン (Phe-タグ)	11 (FFFFFFFFFFFFFF)	88	N末端
プロフィニティ e X a c t	75		N末端
プロテインC	12		N末端またはC末端
ロドプシン (ウシ) 細胞内C末端ペプチド (Rh o 1 D 4 - タグ)	9 (TETSQVAPA)	89	
S1-タグ	9 (NANNPDWDF)	90	N末端またはC末端
リボヌクレアーゼA由来 (S-タグ)	15 (KETAAAKFERQHMD S)	91	N末端、C末端または内部
哺乳類発現に対するソフトタグ1	13 (SLAELLNAGLGG S)	92	
原核生物発現に対するソフトタグ3	8 (TQDPSRVG)	93	
SpyTag ペプチドはSpyCatcherタンパク質と共有結合する (Spy-タグ)	13 (AHIVMVDAYKPTK)	94	
ストレプトアビジン結合タグ (SBP-タグまたはSBP)	38 (MDEKTTGWRGGHVV E L G L A G E L E Q L R A R L E H H P Q G Q R E P)	95	C末端
ブドウ球菌タンパク質A (プロテインA)	280		N末端
ブドウ球菌タンパク質G (プロテインG)	280		N末端またはC末端
ストレプ-タグ	8~9 (WSHPQFEK) または (AWAHPQPGG)	96 97	N末端またはC末端
ストレプトアビジン (ストレプ-タグ)	159		N末端またはC末端

10

20

30

40

50

ストレプトアビジンまたはストレプトクチン結合ストレプトタグペプチド (ストレプータグ I I)	8 (WSHPQFEK)	98	
S d y T a g (S d y - タグ)	1 3 (D P I V M I D N D K P I T)	99	
低分子ユビキチン様修飾因子 (SUMO)	100		N末端
スヌープタグ	1 2 (K L G D I E F I K V N K)	100	
スヌープタグ J r	1 2 (K L G S I E F I K V N K)	101	
スポットタグ	1 2 (P D R V R A V S H W S S)	102	
タンデムアフィニティ精製 (TAP)	可変		N末端またはC末端
T7エピトープ	260		N末端
テトラシステインタグ (TC-タグ)	6 (C C P G C C)	103	
チオレドキシシン (T r x)	109		N末端またはC末端
T r p E	2 5 ~ 3 3 6		N末端またはC末端
T y - タグ	1 0 (E V H T N Q D P L D)	104	
ユビキチン	76		N末端
ユニバーサル	6 (H T T P H H)	105	N末端、C末端または内部
V S V - G または V S V - タグ	1 1 (Y T D I E M N R L G K)	106	C末端
V 5 - タグ	1 4 (G K P I P N P L L G L D S T)	107	
X p r e s s タグ	8 (D L Y D D D D K)	108	

【 0 0 5 9 】

タンパク質タグの使用は、本出願において、配列番号 5、10、15、17、19、21、23、25、27、29 および 31 に示されるようなポリヒスチジンプロテインタグ (H i s - タグ) の使用を介して例示されているが、当業者であれば、使用される精製方法および/または酵素が結合される表面に応じて、任意の数の他のタンパク質タグを使用し、酵素を精製し、および/または本明細書に記載されるように酵素を表面に結合することができることを容易に理解するであろう。そのようなタンパク質タグは、表 A に列挙されたタンパク質タグのいずれか 1 つ以上から選択され得るが、他のそのようなタンパク質タグは、当該技術分野において公知である。

【 0 0 6 0 】

さらに、一つ以上の切断部位 (例えば、配列番号 15、17、19、21、23、25、27、29 および 31 で使用されるトロンピン切断部位) は、酵素からタンパク質タグを分離するために、またはそうでなければ酵素を切断するために使用され得る。切断部位は、N末端メチオニン、シグナルペプチドの除去、および/または不活性もしくは非機能性タンパク質の活性タンパク質への変換 (すなわち、チモーゲンまたはプロ酵素) に使用され得る。あるいは、切断部位を用いて、同じ読み枠で発現された 2 つ以上の酵素を分離してもよい。タンパク質またはペプチドを切断することができ、配列特異的切断部位を有するであろう酵素の例は、以下の 1 つ以上から選択され得る: A r g - C プロテイナーゼ、

A s p - Nエンドペプチダーゼ、A s p - Nエンドペプチダーゼ + N末端G l u B N P S - スカトール、カスパーゼ1、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ4、カスパーゼ5、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9、カスパーゼ10、キモトリプシン高特異性（Pの前ではなく、[F Y W]のC末端）、キモトリプシン低特異性（Pの前ではなく、[F Y W M L]のC末端）、クロストリパイン（クロストリジオペプチダーゼB）、C N B r、エンテロキナーゼ、X a因子、ギ酸、グルタミルエンドペプチダーゼ、グランザイムB、ヒドロキシルアミン、ヨード安息香酸、L v s C、L v s N、N T C B（2 - ニトロ - 5 - チオシアン安息香酸）、好中球エラスターゼ、ペプシン（p H 1 . 3）、ペプシン（p H > 2）、プロリンエンドペプチダーゼ、プロテイナーゼK、ブドウ球菌ペプチダーゼI、タバコエッチウイルスプロテアーゼ、サーモリシン、トロンプイン、トリプシン。

10

【0061】

当業者は、A抗原を効率的に切断することができる、本明細書に記載される活性ガラクトサミニダーゼ酵素および活性G a l N A cデアセチラーゼ酵素の組み合わせが重要であることを理解し、当業者はまた、1つ以上の切断部位および/または1つ以上のタンパク質タグの付加が任意であり、そのような改変が特定の発現系、精製系および可能な表面付着戦略に基づいて選択され得ることを理解するであろう。さらに、ガラクトサミニダーゼ配列およびG a l N A cデアセチラーゼ配列に対する他の修飾も、A抗原の切断活性が有意に損なわれない限り可能である。さらに、A抗原切断活性が有意に損なわれない限り、ガラクトサミニダーゼおよびG a l N A cデアセチラーゼの修飾が可能である。ガラクトサミニダーゼおよびG a l N A cデアセチラーゼ配列に対する修飾は、欠失、挿入および/または置換であり得る。置換は、保存的置換または中立的置換であり得る。例えば、ガラクトサミニダーゼ配列およびG a l N A cデアセチラーゼ配列は、成熟酵素と90%以上の配列同一性を共有し得る。例えば、ガラクトサミニダーゼ配列およびG a l N A cデアセチラーゼ配列は、成熟酵素と85%以上の配列同一性を共有し得る。例えば、ガラクトサミニダーゼ配列およびG a l N A cデアセチラーゼ配列は、成熟酵素と75%以上の配列同一性を共有し得る。あるいは、ガラクトサミニダーゼおよびG a l N A cデアセチラーゼ配列は、アミノ酸の5、10、13、15、20、または25%までの改変を有し得る。

20

【0062】

本明細書中で使用される場合、「ガラス、アルギン酸ビーズまたはマトリックスへの吸着」とは、不活性物質の外側への酵素の付着を指す。一般的に、このタイプの固定化は化学反応によっては生じず、固定化された酵素の活性部位はそれが吸着された表面によってブロックされ得、これは吸着される酵素の活性を低下させ得る。

30

【0063】

本明細書中で使用される場合、「捕捉」とは、不溶性ビーズまたはマイクロスフェア内での酵素の捕捉を指す。しかしながら、捕捉は、基質の到達および生成物の流出を妨げることがある。一例としては、アルギン酸ナトリウム溶液および酵素溶液の混合物を塩化カルシウムと反応させることによって製造することができるアルギン酸カルシウムビーズとしての使用が挙げられる。

40

【0064】

本明細書中で使用される場合、「架橋」とは、ほぼ酵素のみからなるマトリックスを作製するための、酵素の相互への共有結合を指す。架橋酵素反応を設計する場合、理想的には、酵素の活性は酵素の活性部位の閉塞ではなく固定化によってのみ影響されるように結合部位は酵素の活性部位をカバーしない。それにもかかわらず、ポリ（エチレングリコール）のようなスペーサ分子は、基質による立体障害を低減するために使用され得る。

【0065】

本明細書中で使用される場合、「共有結合」とは、共有結合を介した不溶性支持体または表面（例えばシリカゲル）への酵素の結合を指す。酵素と支持体または表面との間の共有結合の強度のために、酵素が支持体または表面から剥離する可能性は非常に低い。

50

【0066】

本明細書中で使用される場合、「クラウディング剤 (crowding agent)」とは、酵素の活性を改善するために酵素を細胞表面上に集結させることによって高分子の凝集を促進する任意のポリマーまたはタンパク質を指す。クラウディング剤は、例えば、デキストラン、デキストラン硫酸、デキストリン、プルラン、ポリ(エチレングリコール)、Ficoll (商標)、超分岐グリセロールおよび不活性タンパク質であり得る (Kuznetsova, I. Met al. Int J Mol Sci. (2014) 「What Macromolecular Crowding Can Do to a Protein」15(12):23090-23140)。

【0067】

本明細書中で使用される場合、「デキストラン」とは、1,000ダルトン以上の分子量を有し、 α -結合d-グルコピラノシル反復単位の直鎖骨格を有する多糖類を指す。デキストランは、五つの炭素原子と一つの酸素原子を含むピラノース環構造に基づいて3つの構造クラス(つまり、クラス1~3)に分けられる。クラス1のデキストランは(12)、(13)及び(14)結合を持つd-グルコース分枝の小さな側鎖で修飾された(16)-結合d-グルコピラノシル骨格を含む。クラス1のデキストランは、その分子量、空間配置、分岐のタイプと程度、および分枝鎖の長さが微生物産生株と培養条件に依存して3~5変化する。イソマルトースおよびイソマルトトリオースは、クラス1のデキストラン骨格構造を有するオリゴ糖である。クラス2のデキストラン(オルタナンス(alternans))は(13)及び(16)結合d-グルコピラノシル単位と(13)結合分枝の交互骨格構造を含む。クラス3のデキストラン(ムタンス(mutans))は(16)結合分枝を有する連続(13)結合d-グルコピラノシル単位の骨格構造を有する。

【0068】

本明細書で使用される場合、「プルランス(pullulans)」は、真菌アウレオバシジウム プルランス(Aureobasidium pullulans)によってデンプンから主に産生される構造多糖であり、(16)結合マルトトリオース(D-グルコピラノシル-(14)-D-グルコピラノシル-(14)-D-グルコース)単位の繰り返しからなり、時折マルトテトラオース単位を含む。

【0069】

本明細書で使用される場合、「デキストリン」とは、単一の(16)結合で始まり、(14)結合D-グルコピラノシル単位で直線的に続く、デキストランより短い鎖長を有するD-グルコピラノシル単位を指す。

【0070】

本明細書中で使用される場合、「Ficoll (商標)」は、中性で、高度に分岐し、高質量の親水性多糖であり、水溶液中で容易に溶解する。

【0071】

本明細書で使用される場合、「灌流(perfusion)」または「灌流(perfusing)」とは、血管を通して流体を循環させることによって流体を臓器に浸透させることを指す。

【0072】

臓器保存における重要な目標は、利用できる移植可能な臓器の数を増やすことである。典型的には、臓器は冷蔵保存されていたが、これには拡散限界の可能性があり、したがって低温灌流システムが開発されている。さらに、正常体温に近いシステムは、肝臓、肺、心臓および腎臓を含む固形臓器の機能的保存を強化するためにも使用されている。多数の緩衝細胞外溶液が灌流溶液または保存溶液として使用される。多くの緩衝細胞外溶液が知られている。例えば、Steen (商標)、Perfadex (商標)、Perfadex Plus (商標)、EuroCollins 溶液、ヒスチジン-トリプトファン-ケトグルタル酸(HTK)溶液、ウィスコンシン大学(University of Wisconsin)溶液(UW)、Celsior 溶液、腎臓灌流溶液(KPS-1)、京都大学

10

20

30

40

50

(Kyoto University) 溶液、IGL-1 溶液、およびクエン酸塩溶液 (Guibert, E. E. et al. (2011))。これらの多くは市販されており、これらの溶液の変形は当業者には明らかであろう。

【0073】

様々な代替実施形態および実施例が本明細書に記載される。これらの実施形態および実施例は例示的なものであり、本発明の範囲を限定するものと解釈すべきではない。

【0074】

(材料および方法)

本試験で使用した化学物質および市販の酵素は、特に断りのない限り Sigma-Aldrich (商標) から購入した。単糖メチルウンベリフェリルグリコシドは Hongming Chen 博士からの寛大な贈り物であり、A 抗原サブタイプ 1 penta-MU は David Kwan 博士 (Kwan et al. 2015) からの寛大な贈り物であった。

【0075】

ヒト糞便メタゲノムライブラリ

【0076】

ヒトメタゲノミクスフォスミドライブラリの生成のために、血液型 AB⁺ を有する健康なアジア人男性ボランティアからヒト新鮮糞便試料を採取した。MoE プロトコル (Armstrong et al. 2017) に記述された手順に従って、直接 DNA 抽出とフォスミドライブラリ作成を行った。

【0077】

フォスミドライブラリスクリーニング

【0078】

51 × 384 ウェルの AB⁺ 血液フォスミドライブラリプレート室温で解凍し、50 μL のスクリーニング用 LB 培地 (12.5 μg/mL クロラムフェニコール、25 μg/mL カナマイシン、100 μg/mL アラビノース、0.2% (v/v) マルトース、10 mM MgSO₄) を含有する 384 ウェルプレート中に複製した。プレートを、過剰な蒸発を防ぐために、水のリザーバを含む密閉容器中で 37 °C で 18 時間インキュベートした。45 μL の反応混合物 (100 mM NaH₂PO₄、pH 7.4、2% (v/v) Triton-X100、100 μM GalNAc-MU、100 μM Gal-MU) を、QFill (商標) 装置 [Genetix (商標)] を用いて、成長したスクリーニングプレート上に添加した。次いで、プレートを密封容器中で 37 °C で 24 時間インキュベートし、各プレートの蛍光 (例: 365 nm Em: 435 nm、sweep モード、gain 80) を、Synergy H1 プレートリーダー [BioTek (商標)] を介して 1、2、4、8 および 24 時間で測定した。全てのウェルについて、Z スコアを計算し、これは式: Z スコア = (蛍光中央値) / 標準偏差によって与えられる。

【0079】

ある閾値を超えるすべてのポジティブヒットを、新しい 384 ウェルプレートに再配列し、「単純基質ヒット」プレートと命名し、-70 °C で保存した。二つのスクリーニングプレートを「単純基質ヒット」プレートから複製し、GalNAc-MU または Gal-MU 活性のいずれかについて再スクリーニングして、以前に検出された活性を確認し、デコンポリュートした。

【0080】

ヒットのどれが A 抗原または B 抗原構造を切断し得るかを決定するために、結合酵素アッセイを用いて、50 μM の A 抗原サブタイプ 1 tetra-MU または 50 μM の B 抗原サブタイプ 1 tetra-MU に対するそれらの活性を測定した。この結合アッセイのバージョンは、Kwan (Kwan et al. 2015) によって以前に記載された。結合酵素として BgaA (Singh 2014) の代わりに BgaC (Jeong 2009) を用いて、サブタイプ 1 A 抗原の切断も検出できるようにアッセイを改良した。N-アセチルガラクトサミニダーゼや -ガラクトシダーゼは末端の糖を切断し、H 抗原サブタイプ Itri-MU を遊離させる。その後、-フコシダーゼ (AfcA (Katay

10

20

30

40

50

arna 2004))、 α -ガラクトシダーゼ (BgaC (Jeong 2009))、 α -ヘキソサミニダーゼ (SpHex (Williams 2002))は、4-メチルウンベリフェリルアルコールが遊離するまで、残存する糖をエキソ型で切断する。これは、蛍光の増加として検出できる。これを達成するために、各酵素50 μ g/mLを反応混合物に添加した。ある閾値を超えるすべてのポジティブヒットを3回再スクリーニングし、挿入物を欠くベクターを含む宿主細胞株をネガティブコントロールとして使用した。全ての確認されたヒットは、70°CでLB培地(12.5 μ g/mLクロラムフェニコール、25 μ g/mLカナマイシン、15% (v/v)グリセロール、0.2% (v/v)マルトース、10 mM MgSO₄)中に別々に保存した。

【0081】

フォスミドヒットシークエンシング

【0082】

配列決定のためのフォスミドDNAを単離するために、ポジティブヒットフォスミドグリセロールストックを用いて、5 mLのTB培地(12.5 μ g/mLクロラムフェニコール、25 μ g/mLカナマイシン、100 μ g/mLアラビノース、0.2% (v/v)マルトース、10 mM MgSO₄)に接種し、37°C、220 rpmで一晩インキュベートした。フォスミド単離は、GeneJet (商標)プラスミドミニプレップキット (Thermo Fisher (商標))を用いて行った。Plasmid-Safe (商標)ATP-依存性DNアーゼ (Epicentre (商標))を用いて、単離したプラスミドをコンタミネーション線状大腸菌 (E. coli) DNAから精製し、続いてGeneJet (商標)PCR精製キット (Thermo Fisher (商標))を用いて別の精製を行った。濃度は、Quant-iT (商標)dsDNA HSアッセイキット (Invitrogen (商標))を用いて、Qbit (商標)蛍光光度計 (Thermo Fisher (商標))上で計算した。予想されるDNAサイズを1%アガロースゲルで確認した。完全なフォスミドシークエンシングのために、各フォスミド2 ngをUBCシークエンシングセンタ(バンクーバー、BC、カナダ)に送った。各フォスミドは、Illumina MiSeq (商標)システムを用いて個別にバーコード化し、配列決定した。

【0083】

Illumina MiSeq (商標)の未加工のシークエンスデータはすべてトリミングされ、<https://github.com/hallamlab/FabFos>においてGitHub (商標)で入手できるPythonスクリプトを使ってアセンブルされた。簡単に述べれば、Trimmomaticを用いて、リード(reads)からアダプタ(adapters)および低品質の配列を除去した(Bolger 2014)。これらのリードを、BWA (Li 2013)を用いてベクターおよび宿主配列についてスクリーニングし、次いでSamtools (商標)およびbam2fastqスクリプトを用いて濾過して汚染物質を除去した。これらの高品質で精製されたリードは、10の増分によって増加する、71と241との間の範囲のk-mer値を有するMEGAHITによってアセンブルされた(Li 2015)。これらのライブラリは、2万倍を超えるカバー率(coverage)を有することが多く、適切な配列アセンブリを妨害する配列決定エラーの蓄積を防ぐため、最小k-mer多重度は、フォスミドの推定カバー率の1%によって計算された。複数のコンティグを生成するPythonスクリプトアセンブリの外部で、minimus2を使ってスキャフォールドを行った(Treangen 2011)。パラメータ化されたコマンドは、GitHub (商標)ページのドキュメントとPythonスクリプト自体の両方に見出し得る。

【0084】

フォスミドORF予測とヒット検証

【0085】

フォスミドORFをProdigal (商標) (Hyatt 2010)のメタゲノム版を用いて同定し、MetaPathways (商標) v2.5ソフトウェアパッケージの

10

20

30

40

50

一部としてBLASTP (商標) を用いたCAZy (商標) データベースと比較した (Konwar 2015)。MetaPathways (商標) パラメータは、長さ (length) > 60, BLASTスコア > 20, blastスコア比 > 0.4, Evaluate < 1×10^{-6} である。

【0086】

GHまたはCBMファミリー (既知または疑われる - ガラクトシダーゼおよび/または - N - アセチルガラクトサミニダーゼ活性とともに) のメンバーに対する注釈を有するすべての予測ORFを、Golden Gate (商標) クローニング戦略 (Engler 2008) を用いてpET16bプラスミドにクローニングし、プライマー配列を表Bに設定した。タンパク質をBL21 (DE3) で発現させ、10 mLのZY5052自動誘導培地 (Studier 2005) 中で37°C、220 rpmで20時間培養した。細胞を遠心分離 (4000 × g、4°C、10分) によって回収し、1 mLの溶解緩衝液 (100 mM NaH₂PO₄、pH 7.4、2% (v/v) Triton-X (商標) 100、1 × プロテアーゼインヒビターEDTAフリー (Protease Inhibitor EDTA-free) [Pierce (商標)]) に再懸濁した。連結アッセイ (Kwan 2015) を、候補からの粗細胞溶解物50 μlを用いて行い、アッセイ緩衝液50 μl (100 mM NaH₂PO₄、pH 7.4、50 μg/mL SpHex、50 μg/mL AfcA、50 μg/mL BgaC、100 μM A抗原サブタイプ1 tetra-MU又は100 μM B抗原サブタイプ1 tetra-MU) と混合し、37°Cでインキュベートした。すべての反応を、黒色の96ウェルプレート中で3通りに行った。蛍光 (365 / 435 nm) をSynergy (商標) H1プレートリーダー [BioTek (商標)] を用いて4時間連続的にモニタした。AまたはB抗原に対する切断活性を示す粗抽出物からのアッセイを、今回は結合酵素なしで繰り返し、反応生成物をHF Bond Elut C18カラムを介して単離し、LC-MSおよび/またはTLCで分析した。TLCは、TLCシリカゲル60 F254 TLCプレート [EMD Millipore Corp. (商標)、Billerica, MA, USA] を用いて実施した。

【0087】

表B：プライマー配列

10

20

30

40

50

プライマー	配列	配列番号
<i>FpGalNAcDeAc</i> — シグナルPなし_fw	ATGGTCTCGCCATGCAGACTCCAGCGAGTCCCG	38
<i>FpGalNAcDeAc</i> — D1_min_rv	ATGGTCTCGATTCTTACGTGCGTGTAGCCGGGGTC	39
<i>FpGalNAcDeAc</i> — D1_ext_rv	ATGGTCTCGATTCTTAATCACTGGAGGTATATTTTCACGACC	40
<i>FpGalNAcDeAc</i> — D1+2_rv	ATGGTCTCGATTCTTACGCAGGCTCGATTGGACCATAC	41
<i>FpGalNAcDeAc</i> — D2_ext_fw	ATGGTCTCGCCATGATGTGGCGACGGTGGATGAG	42
<i>FpGalNAcDeAc</i> — rv	ATGGTCTCGATTCTTATTTCTCCACATACGAAAAAATAGTCCG	43
<i>FpGalNase</i> —シグナルPなし_fw	ATGGTCTCGCCATCGTGGTAAAAAGTTCATATCACTCAC	44
<i>FpGalNase</i> —truncA_rv	ATGGTCTCGATTCTTATGCGTTAGTGGTATAAGTCAAAATAGTC	45
<i>FpGalNase</i> —rv	ATGGTCTCGATTCTTATTTCCGAAAAATTTCCACCGCTTTAAC	46
Ct5757_fw	ATGGTCTCGccattATAATTAAATGATAATAATTAGTGTGAAAAATTAG	47
Ct5757_rv	ATGGTCTCGattctTTATTGTGTTAAACCCTCAATAAAAC	48
Ct5757_GalNase_rv	ATGGTCTCGattctTTAATGAGTACTTTGATTTAATCCATCATAAAG	49
Ct5757_DeAcase_fw	ATGGTCTCGccattTCAGGGCAATA TTGGTTAGTTTTTC	50
Rp1021_fw	ATGGTCTCGccattGGAAACGGATTAGAGGTGAAAAG	51
Rp1021_rv	ATGGTCTCGattctTCATAAATACCA TTTTGTATTTCTTTATATTGG	52
R18755_fw	ATGGTCTCGccattGAAAGAAAACCGATTGTGCTTGTAAAAC	53
R18755_rv	ATGGTCTCGattctTTAGCGTTCCAATATTTTCATAAAATTCAG	54
Rp3671_fw	ATGGTCTCGccattCACCAATGAGCGCTGCCGG	55
Rp3671_rv	ATGGTCTCGattctTTATGACTTTTGTTTTAAACATTTACAGACTTG	56
Rp3672_fw	ATGGTCTCGccattGCTGAGACTGCAACAGAAAGAAAATG	57
Rp3672_rv	ATGGTCTCGattctTTATTTCTGAA TTTTTCCTTGCCCTTGCCAG	58

10

20

30

40

【0088】

HPAE - PADアッセイ

【0089】

ガラクトサミンの酵素的放出の分析をHPAE - PAD (Dionex (商標)) HPLCシステムで行った。以下の基質について、種々のタンパク質の切断活性を試験した：7.5 μg / μLのブタ胃タイプII由来ムチンを100 mM NaH₂PO₄ pH 7.4に溶解したものの、5 mM A抗原サブタイプ1 penta - MUを100 mM NaH₂PO₄ pH 7.4中に存在させたもの、および、A +、B +およびO - 型ドナーからのRBC (ヘマトクリット50%)を1 x PBS pH 7.4中に存在させたもの。10 μg /

50

mLの酵素を含む試料を、37°Cで二時間インキュベートし、その後、さらなる分析のために-80°Cで保存した。少量の反応物(10 μ l)をH₂O(100 μ l)中に希釈し、HPAE-PAD装置で分析した。ガードカラムを有するCarboPACPA200(商標)(150mm)カラムで分離を行い、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)電極上の使い捨て金及び四電位波形を用いて検出を行った。分離条件は次の通りであった: 100mM水酸化ナトリウムおよび70から300mMまでの酢酸ナトリウム勾配を分離の最初の10分間にわたって与えた。溶離液を最終勾配条件で1分間保持し、次の1分間にわたって初期条件に戻した。流速は1.0ml/分で、インジェクションは27分毎に行った。遊離糖GalNAc、GalおよびGalN(10 μ M)の基準をHPAE-PADに適用し、参照のためピーク溶出時間を決定した。

10

【0090】

動態アッセイ

【0091】

脱離基として4-メチルウンベリフェロンを用いた全ての動態アッセイを蛍光の測定により行った。内部フィルタ効果(Palmier 2007)に基づく測定誤差を避けるために、標準曲線を用いて蛍光色素の線形範囲を検証した。

【0092】

Fpガラクトサミニダーゼ

【0093】

Michaelis-MentenパラメータをGalN抗原サブタイプ1penta-MUおよびA抗原サブタイプ1penta-MUについて100mM NaH₂PO₄, pH 7.4, 37°Cで測定した。100 μ l中で3.4nMのFpガラクトサミニダーゼ(5.31nM FpGalNase_truncA)および0.1mg/mLのSpHex, AfcA, 0.2mg/mLのBgacおよび種々の濃度の基質(5 μ M~2mM)と反応させた。複製物としてコントロール(Fpガラクトサミニダーゼなし)を伴う一連の四つの反応を行った。加水分解によるMU放出から生じる蛍光シグナル(365/435nm)を、Synergy H1(商標)プレートリーダー[BioTek(商標)]によってモニタし、同一の反応条件下で測定したMU標準濃度曲線を用いて濃度に変換した。初期速度(μ M/s)を測定し、Grafit 7.0(商標)でプロットして動態パラメータを決定した。

20

【0094】

k_{cat}/K_M パラメータを、GalN抗原サブタイプ1/2/4tetra-MUおよびB抗原サブタイプ1tetra-MUについて、pH 7.4および37°Cで測定した。反応(全容量100 μ L)を、黒色の96プレートウェル中で行い、結合アッセイとして、8.63nM Fpガラクトサミニダーゼ、0.1mg/mL SpHex, Bgac(サブタイプ2に対してBgacA)、AfcA、様々な濃度の基質(25 μ M、20 μ M、15 μ M、10 μ M、7.5 μ M、5 μ M)を伴う100mM NaH₂PO₄(pH 7.4)において実施した。複製物としてコントロール(Fpガラクトサミニダーゼなし)を伴う一連の四つの反応を行った。加水分解によるMU放出から生じる蛍光シグナル(365/435nm)を、Synergy H1(商標)プレートリーダー[BioTek(商標)]によってモニタし、同一の反応条件下で測定したMU標準濃度曲線を用いて濃度に変換した。初期速度(μ M/s)を決定し、Grafit 7.0(商標)でプロットして、 k_{cat}/K_M (s⁻¹*mM⁻¹)パラメータを決定した。

30

40

【0095】

863.2nMのFpガラクトサミニダーゼ(100mM NaH₂PO₄, pH 7.4において)または体積100 μ lにおいて様々な基質濃度(10 μ M~5mM)を有する369.9nMのFpGH4(50mM Tris/HCl, pH 7.4, 100 μ M NaD⁺, 1mM MnCl₂において)を伴う透明な96プレート中のGalN-pNPについて、37°CでMichaelis-Mentenパラメータを測定した。反応は、二つのコントロール(無酵素)を伴う一連の3つの反応として行った。加水分解による

50

pNP放出から生じる吸収(405nmで)を、Synergy H1(商標)プレートリーダー[BioTek(商標)]によってモニタし、同一の反応条件下で測定したp-ニトロフェノール標準濃度曲線を用いて濃度に変換した。初期速度($\mu\text{M}/\text{s}$)を測定し、Grafit 7.0(商標)でプロットして動態パラメータを決定した。

【0096】

FpGalNacデアセチラーゼ

【0097】

100mM NaH_2PO_4 、pH7.4、37°CにおけるA抗原サブタイプ1penta-MUについて、前述の結合アッセイ(Kwan 2015)を用いて、Michaelis-Mentenパラメータを測定した。サブタイプ1(後に4)の切断を検出できるように、 β -ガラクトシダーゼとして、BgaA(Singh 2014)の代わりにBgaC(Jeong 2009)を用いた。また、A抗原サブタイプ1penta-MUはガラクトースをさらに含むため、Gal-1,3-GlcNAc-1,3-Gal-MUおよびGal-MUの両方を切断する必要性を補うために、BgaCの濃度を0.2mg/mLに上昇させた。さらに、ガラクトサミン含有中間体の切断を可能にするために、Fpガラクトサミニダーゼを含めた。100 μl での反応セットアップは、3nMのFpGalNacデアセチラーゼ(4.52nM FpGalNacDeAc__D1ext、3.55nM FpGalNacDeAc__D1+2)および0.01mg/mLのFpガラクトサミニダーゼ、0.1mg/mLのSpHex、AfcA、0.2mg/mLのBgaCおよび種々の濃度の基質(5 μM ~2.5mM)であった。複製物としてコントロール(FpGalNacデアセチラーゼなし)を伴う一連の四つの反応を行った。加水分解によるMU放出から生じる蛍光シグナル(365/435nm)をSynergy H1(商標)プレートリーダー(BioTek(商標))でモニタし、同一の反応条件下で測定したMU標準濃度曲線を用いて濃度に変換した。初期速度($\mu\text{M}/\text{s}$)を決定し、Grafit 7.0でプロットして、動態パラメータを決定した。

【0098】

k_{cat}/K_M パラメータを、A抗原サブタイプ1/2/4tetra-MUについて、pH7.4、37°Cで決定した。反応(全容量100 μL)を、黒色の96プレートウェル中で行い、結合アッセイとして、12nM FpGalNacデアセチラーゼ0.1mg/mL SpHex、BgaC(サブタイプIIに対してBgaA)、AfcAとの、様々な濃度の基質(25 μM 、20 μM 、15 μM 、10 μM 、7.5 μM 、5 μM)を伴う100mM NaH_2PO_4 (pH 7.4)において実施した。複製物としてコントロール(FpGalNacデアセチラーゼなし)を伴う一連の四つの反応を行った。加水分解によるMU放出から生じる蛍光シグナル(365/435nm)をSynergy H1(商標)プレートリーダー(BioTek(商標))でモニタし、同一の反応条件下で測定したMU標準濃度曲線を用いて濃度に変換した。初期速度($\mu\text{M}/\text{s}$)を決定し、そしてGrafit(商標)7.0でプロットして、 k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1} * \text{mM}^{-1}$)パラメータを決定した。

【0099】

GH109サブタイプ動態

【0100】

A抗原サブタイプ1/2/4tetra-MUについて、pH7.4および37°Cで k_{cat}/K_M パラメータを測定した。反応(全容量100 μL)を黒色96プレートウェルで実施し、結合アッセイとして、86.02nM BvGH109__1/100.49nM EmGH109/80.52nM BvGH109__2/87.4nM BsGH109および5 μM NAD^+ 、各SpHex、BgaC(サブタイプ2に対してBgaA)、AfcAについて0.1mg/mL、種々の濃度の基質(25 μM 、20 μM 、15 μM 、10 μM 、7.5 μM 、5 μM)を伴う100mM NaH_2PO_4 、pH7.4で実施した。複製物としてコントロール(β -N-アセチルガラクトサミニダーゼなし)を伴う一連の四つの反応を行った。加水分解によるMU放出から生じる蛍光シグナル(365/4

10

20

30

40

50

35 nm) を、Synergy H1 (商標) プレートリーダー [BioTek (商標)] によってモニタし、同一の反応条件下で測定した MU 標準濃度曲線を用いて濃度に変換した。初期速度 ($\mu\text{M}/\text{s}$) を決定し、 k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1} * \text{mM}^{-1}$) パラメータを決定するために Grafit 7.0 (商標) でプロットした。

【0101】

結晶解析

【0102】

結晶化の前に、FpGalNAcDeAc_D1ext を トロンピン (Novagen (商標)) で $1\text{ mg}/\text{mL}$ の濃度で一晩、製造業者の提案プロトコルを用いて消化した。次いで、タンパク質を HisTrap FF カラムによって精製し、流出分を回収し、 $10\text{ mM Tris pH } 8.0 + 75\text{ mM NaCl}$ に緩衝液交換し、 $12\text{ mg}/\text{mL}$ に濃縮した。

10

【0103】

結晶化

【0104】

FpGalNAcDeAc_D1ext ($12\text{ mg}/\text{mL}$) を、 0.2 M CaCl_2 、 $0.1\text{ M MES pH } 6$ 、 18% PEG 4000、および 20 mM MnCl_2 からなるリザーバ溶液を用いた懸滴拡散蒸着法を用いて、1:1 のタンパク質:リザーバ比で結晶化した。フェージングのために結晶を誘導体化するために迅速な臭化物浸漬を使用し、 1 M NaBr 、 25% グリセロール、 18% PEG 4000、 20 mM CaCl_2 、および 0.1 M Mes pH の溶液に 30 秒間結晶を移し、液体窒素中で瞬間凍結することによって調製した。血液型 B 抗原三糖類 (B__tri) との結晶複合体を、タンパク質 ($12\text{ mg}/\text{mL}$) を 10 mM B__tri と 2 時間プレインキュベーションすることによって調製し、その後、上記と同じ条件下で滴を設定したが、 MnCl_2 は省いた。結晶を、 25% グリセロールを補充したリザーバ溶液で凍結保護した。

20

【0105】

データ収集、フェージング (phasing)、構造決定

【0106】

データセットは Canadian Light Source (商標) で収集した。データは XDS (Kabsch 2010) を用いて統合し、Aimless (商標) (Evans 2013) でスケール化した。フェージングおよび自動化構造ソリューションは、CRANK 2 (商標) (Skubak 2013) を CCP4 I2 (商標) プログラムスイート (Potterton 2018) で使用して実施した。Coot (商標) (Emsley 2004) と Refmac (商標) (Vagin 2004) の交互サイクルを用いて構造をチェックし、精密化した。B__tri 構造複合体を差分 Fourier によって解き、配位子を水及び金属イオンと同様に Coot (商標) 中に手動で構築した。差密度マップにより、アポ構造に Mn^{2+} 、配位構造に Ca^{2+} の存在が確認された。モデルは Coot (商標) および Molprobity (商標) (Chen 2010) によって検証された。アポおよび B__tri 複合体の原子座標および構造因子は、以下のアクセッション番号 (accession number) とともにタンパク質データバンク (PDB) に寄託されている:

30

フラボニフラクター・プラウティ GalNAcデアセチラーゼタンパク質配列番号: WP__009260926.1、およびフラボニフラクター・プラウティガラクトサミニダーゼタンパク質配列番号: WP__044942952.1。

40

【0107】

活性部位変異誘発

【0108】

構造情報 (表示しない) および配列アラインメント (表示しない) に基づいて、FpGalNAcDeAc_D1min および FpGalNase__truncA を、Quick Change (商標) プロトコル (Zhang 2004) を用いて、表 B に記載されて

50

いるプライマーを利用して変異させた。変異体は、上記のようにNiNTAおよびHiCカラムを介して精製された。全ての変異体の構造的完全性はCD分光法によって確認された。それによると、すべての試験酵素は野生型と構造的に類似していた。活性が比較的低い変異体については、完全な動態決定に用いたのと同じ条件下で反応を行った。しかし、 k_{cat}/K_M 値の測定には前述のように基質消費法を用いた(Vocadlo 2002)。簡単に説明すると、[基質] $< K_M$ (K_M の $\sim 1/5 - 1/10$ に相当)である低濃度の基質において、 k_{cat}/K_M 値は、反応時間経過を一次曲線に非線形に当てはめ、酵素濃度で割ることによって近似することができる。

【0109】

GH36系統発生マッピング

10

【0110】

GH36の参照配列をSACCHARIS(商標)cazy_extract.plスクリプト(Jones 2018)を用いてCAZY(商標)データベースからダウンロードした。系統発生ベースのタンパク質プロファイリングソフトウェア、TreeSAPP(商標)(<https://github.com/hallamlab/TreeSAPP>、において入手可能)を用いて、参照ツリーを構築し、これらのツリーに配列をマッピングした。簡単に述べれば、dbCANからのHMMsを用いて、CAZY(商標)(Yin 2012)からダウンロードした全ての全長配列からタンパク質ファミリードメインを抽出した。次いで、これらの配列をUCRUST(商標)を用いて70%の配列類似性でクラスター化し、冗長な配列空間を除去し、ツリーのサイズを減少させた(Edgar 2010)。RAxML(商標)バージョン8.2.0を使用して参照ツリーを構築し、「-autoMRE」によって1000回の複製が実行される前にブートストラップを終了する時期を決定し、PROTGAMMAAUTO(商標)によって最適なタンパク質モデルを選択した(Stamatakis 2006およびStamatakis 2008)。

20

【0111】

次に、TreeSAPP(商標)を用いて、クエリー配列をこれらの参照ツリーにマッピングした。簡単に述べれば、タンパク質配列をhmmsearch(商標)を用いてHMMsに整列させ、整列させた領域を抽出した(Eddy 1998)。hmmalign(商標)を使用して、新しいクエリー配列を参照マルチプルアラインメントに含め、TrimAl(商標)は保存されていない位置をアラインメントファイルから削除した(Capella-Gutierrez 2009)。RAxML(商標)を用いて、挿入により参照ツリー中のクエリー配列を分類した。各クエリー配列の配置はフィルタリングされ、単一に連結された。iTOL(商標)(Matsen 2012およびLetunic 2016)で表示する前のJplace(商標)ファイル。

30

【0112】

RBCアッセイ

【0113】

ブリティッシュ・コロンビア大学の臨床倫理委員会によって承認されたプロトコルを用いて、健康な同意ドナーからの全血をクエン酸Vacutainerに採取した。チューブを1000xgで4分間、室温において回転させ、RBCを分離し、1xPBS pH7.4で3回洗浄した。デキストラン40kの存在下でのアッセイのために、洗浄されたRBC(200 μ L、10%ヘマトクリット)をチューブに入れ、上清を部分的に除去し、デキストラン40kの存在下および非存在下で1xPBS pH7.4で置き換えた(最終濃度300mg/mL)。さらに、いくつかのアッセイを1xPBS pH7.4+25%血漿または100%血漿中で実施した。RBCを注意深く混合し、30秒間オービタルシェーカ上に置いた。次に、希釈した酵素溶液を加え、200 μ Lの最終容量にした。チューブを非常に穏やかにボルテックスし、設定温度で所定の時間、オービタルシェーカ上に置いた。

40

【0114】

50

M T Sカード

【0115】

反応後、RBCを過剰の1xPBS pH7.4で3回洗浄し、Micro Typing System (商標) (M T S)カード [M T S (商標)、フロリダ、アメリカ] を使用して分析した。希釈剤中に懸濁されたRBC (12 μ l、5%ヘマトクリット) [M T S、フロリダ、アメリカ] を、血液とミニゲルの内容物との間に空間を残して、ミニゲルのカラムに注意深く添加した。M T Sカードを、推奨されるように改変された試料ホルダーを有するBeckman Coulter Allegra X-22R (商標) 遠心機を用いて、室温で156 x gで6分間遠心した。RBC表面からの抗原除去の程度は、製造業者の指示に従って、回転後のミニゲル中のRBCの位置から評価した。表面抗原濃度の高いRBCはゲルカラムに存在するモノクローナル抗体との相互作用で凝集し、浸透できなかった (M T S (商標) スコア4)。表面抗原のないRBCは凝集せず、ミニゲルの底に移動した (M T Sスコア0)。表面抗原の部分的除去を受けたRBCは、これらの間の位置に移動し、製造業者の指示に従って0 (存在しない) と4 (存在する) との間のスコアが割り当てられた。

10

【0116】

H抗原の凝集アッセイ

【0117】

酵素処理後のA抗原のH抗原への変換を分析するために、洗浄したA-ECO-RBCsを2 μ g/mLの抗H抗体 (抗血液型Hab抗原抗体 [97-I]: cat no. ab 24213 (Abcam (商標))) と等量混合し、30分の時間枠内での凝集の出現をモニタした。抗H抗体で凝集したRBCは、0 (1800秒以内に凝集しない) と5 (120秒以内に凝集する) の間のスコアを割り当てた。

20

【0118】

FACS

【0119】

酵素処理したRBCを1xPBS pH7.4で2回洗浄し、1%ヘマトクリットECO-RBCsを1/100 APC-抗A抗体 (Alexa Fluor (商標) 647マウス抗ヒト血液型A: cat no. 565384 (BD Pharmingen (商標))) および/または抗H抗体 (抗血液型Hab抗原抗体 [97-I]: cat no. ab 24213 (Abcam (商標))) で、室温において30分間処理し、次いで1xPBS pH7.4で2回洗浄した。抗H抗体の検出には、二次FITC標識抗体 (ヤギFab) 2抗マウスIgM μ 鎖 (FITC): cat no. ab5926 (Abcam (商標))) を1/500濃度で使用した。データは、フローサイトメータ (Cyto FLEX (商標) (Beckman Coulter (商標))) を用いて1xPBS pH7.4 (ヘマトクリット1%) に再構成した後に評価した。

30

【0120】

酵素吸着と抗原性

【0121】

処理後のRBCから酵素を容易に除去できるかどうかを試験するために、吸着可能性を評価した。パシフィックブルーで標識したFpGalNAcデアセチラーゼ及びFpGalNase (F/P=1) をRBCとともに37°Cで1時間インキュベートし、数回の洗浄後、フローサイトメータ (Cyto FLEX (商標) (Beckman Coulter (商標))) で残留蛍光を測定した。

40

【0122】

RBCを各酵素50 μ g/mLとインキュベートし、酵素処理したRBCを同種または自家血清と混合し、凝集の可能性を観察することによって、抗原性を試験した。加えて、潜在的な抗-IgG, -C3d曝露を評価するために、処理したRBCを抗-IgG, -C3d M T S (商標) カード [M T S (商標)、フロリダ、アメリカ] で試験した。インキュベーション時間は37°Cにおいて30分であった。

50

【0123】

抗原サブタイプの合成

【0124】

AおよびB抗原サブタイプ1/2/4 tetra - MUの合成は、Kwan (Kwan et al. 2015)に記載された修正プロトコルを用いて行った。

【0125】

二段階H抗原サブタイプ1/2/4 tri - MU合成

【0126】

20 mgのGalNAc - - MU / GlcNAc - - MUのスケールにおいて、10 mLの50 mM Tris / HCl, 200 mM NaCl, pH 7.4, 10 mM MnCl₂, 50 Uアルカリホスホリラーゼ、1.5当量UDP - Gal, 1.2当量GDP - Fuc (LacNAc - MU生成物でスケールされる) 中で3つの合成の全てを行った。100 μg/mLの濃度で種々のグリコシルトランスフェラーゼを添加した。つまり、サブタイプIに対して、CgtBS42およびTe2FT、サブタイプIIに対して、HP0826およびWbgL、サブタイプIVに対してLgtDおよびTe2FTである。反応を37°Cで実施し、進行をTLC (移動相EtAc : MeOH : H₂Oの比が、6 : 2 : 1) によって制御し、4 - メチルウンベリフェロンを10% H₂SO₄を介して化合物から加水分解し、UV (360 nm) によって検出した。さらなる生成物の増加が観察されなくなった後、反応をHF Bond Elut C18カラムに適用し、数カラム容量の5%メタノールで洗浄し、生成物を25%メタノールで溶出した。次いで、溶媒を減圧下で除去した。

10

20

【0127】

A抗原サブタイプ1/2/4 tetra - MU合成

【0128】

最終合成工程は、10 mg H抗原サブタイプ1/2/4 tri - MUのスケールで、5 mL 50 mM Tris / HCl, 200 mM NaCl, pH 7.4, 10 mM MnCl₂, 25 Uアルカリホスホリラーゼ、1.5当量UDP - GalNAcおよび100 μg/mL BgtA中、37°Cで行われた。さらなる生成物の増加が観察されなかった後、TLCを介して、反応をHF Bond Elut C18カラムに適用し、数カラム容量の5%メタノールで洗浄し、生成物を25%メタノールで溶出した。次いで、溶媒を減圧下で除去した。最終生成物を1.5 x 46 cm HW - 40 Fサイズ排出カラムでさらに精製し、次いで凍結乾燥した。

30

【0129】

B抗原サブタイプ1/2/4 tetra - MU合成

【0130】

最終合成工程は、10 mg H抗原サブタイプ1/2/4 tri - MUのスケールで、5 mL 50 mM Tris / HCl, 200 mM NaCl, pH 7.4, 25 Uアルカリホスホリラーゼ、1.5当量UDP - Galおよび100 μg/mL BoGT6a中、37°Cで実施した。さらなる生成物の増加が観察されなかった後、TLCを介して進行を追跡し、反応をHF Bond Elut C18カラムに適用し、数カラム容量の5%メタノールで洗浄し、生成物を25%メタノールで溶出した。次いで、溶媒を減圧下で除去した。最終生成物を1.5 x 46 cm HW - 40 Fサイズ排除カラムでさらに精製し、次いで凍結乾燥した。

40

【0131】

GalN抗原サブタイプ1 penta - MU合成

【0132】

10 mgのA抗原サブタイプ1 penta - MUを1 μg/mLのFpGalNAcデアセチラーゼと5 mLの100 mM NaH₂PO₄中で37°Cで30分間インキュベートした後、1 mMのEDTAを加えて反応を停止させ、基質の完全な変換をTLCで確認し、反応物をHF Bond Elut C18カラムに適用し、数カラム容量の2%メタノール

50

ルで洗浄し、生成物を10%メタノールで溶出させた。次いで、溶媒を減圧下で除去した。

【0133】

タンパク質精製

【0134】

すべてのタンパク質およびその切断は、Golden Gate (商標) クローニング (Engler 2008) またはPIPEクローニング (Klock 2008) を介してpET16bまたはpET28aにクローニングされた。プライマー配列は表Bに記載する。

【0135】

拡張された特性評価のためのタンパク質の産生は、BL21 (DE3) 細胞中で行い、20時間、37°C、220rpmで、200mLのZY5052自動誘導培地 (Studier 2005) 中で培養され、100μLの一晩置いたLB培養物に接種した。細胞を遠心分離 (4000xg、40°C、10分) によって回収し、10mLの溶解緩衝液 (50mM Tris/HCl、150mM NaCl、1% (v/v) グリセロール、40mMイミダゾール、pH7.4、2mM DTT、1xプロテアーゼインヒビターEDTAフリー (Pierce (商標))、2Uベンゾナーゼ (Novagen (商標))、0.3mg/mLリゾチーム、10mM MgCl₂) に再懸濁し、次いで氷上で音波処理 (3分間のパルス時間; 5秒パルス、10秒休止、35%振幅) した。遠心分離 (14000xg、4°C、30分) による細胞残渣の除去後、上清を回収し、蠕動ポンプを用いてニッケルアフィニティクロマトグラフィカラム (5mL HisTrap HP (商標) カラム (GE (商標))) に負荷した。溶出はAEKTA purifier (商標) システム (GE (商標)) 上で行い、SDS-PAGEを介して50mM Tris/HCl、400mMイミダゾール、pH7.4、2mM DTTの10~75%勾配でモニタし、タンパク質を含有する画分を同定し、次いでプールのした。50mM Tris/HCl、150mM NaCl、pH7.4、2mM DTTへの緩衝液交換および濃縮をAmicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (商標) MWCO 10kDa (Millipore (商標)) 中に行った。

10

20

【0136】

FpGalNAcデアセチラーゼ、Fpガラクトサミニダーゼおよびその切断は精製の第二ラウンドを行う必要があり、Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units MWCO 10kDa (Millipore (商標)) を用いて、疎水性相互作用クロマトグラフィカラム (フェニルセファロース高性能カラム10mL (Pharmacia Biotech (商標))) にタンパク質を負荷する前に緩衝液を交換した。カラムの負荷、洗浄および溶出 (勾配0~100%) は、以下の緩衝液条件を利用して、AEKTA purifier (GE (商標)) を通して処理された: FpGalNAcデアセチラーゼ、結合1xPBS、800mM NH₂PO₄、pH7.4および溶出1xPBS、pH7.4およびFpガラクトサミニダーゼ、結合25mM Tris/HCl、1M NaCl、pH7.4、溶出25mM Tris/HCl pH7.4。SDS-PAGEにより、タンパク質を含有する画分を同定し、次いでプールのした。50mM Tris/HCl、150mM NaCl、pH7.4への緩衝液交換および濃縮をAmicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (商標) MWCO 10kDa (Millipore (商標)) 中に行った。

30

40

【0137】

タンパク質の特性解析

【0138】

最適pH値

【0139】

A抗原サブタイプ1penta-MUおよびGalN抗原サブタイプ1penta-MUに対するFpGalNAcデアセチラーゼおよびFpガラクトサミニダーゼの活性の一般的なpH範囲を、それぞれ異なるpH値に対するTLCプレート上の生成物の出現によって決

50

定した。反応は100 µlスケール、37 °C、50 µM基質および1 µg/mL酵素を適切な緩衝系中で行った。pH 4 ~ 6の緩衝液は、50 mMクエン酸/クエン酸ナトリウム緩衝液、pH 6 ~ 8の場合は50 mMリン酸ナトリウム緩衝液およびpH 8 ~ 10の場合は50 mMグリシン/水酸化ナトリウム緩衝液に基づいた。

【0140】

最適pH値を決定するために、5 µg/mLのFpガラクトサミニダーゼを100 µlの50 mMリン酸ナトリウム緩衝液中でpH範囲(5.8 ~ 8.0)および200 µMのGalN - pNPとともにインキュベートし、pNP放出から生じる(405 nmにおける)吸収をSynergy H1(商標)プレートリーダー(BioTek(商標))により37 °Cで1時間モニタした。

10

【0141】

5 µg/mLのFpGalNAcデアセチラーゼおよび50 µMのA抗原サブタイプI penta - MUを、10分間、37 °C、25 mMのリン酸ナトリウム緩衝液中で、種々のpH範囲(5.8 ~ 10.0)でプレインキュベートした。反応を、100 mMリン酸ナトリウム緩衝液pH 7.5、100 µM EDTA、5 µg/mL Fpガラクトサミニダーゼ、50 µg/mL SpHex、50 µg/mL AfcAおよび50 µg/mL BgaC、最終容量100 µlでクエンチした。加水分解によるMU放出から生じる蛍光シグナル(365 / 435 nm)を、Synergy H1(商標)プレートリーダー(BioTek(商標))によって30分間、37 °Cでモニタした。

20

【0142】

タンパク質の安定性

【0143】

FpGalNAcデアセチラーゼ及びFpGalNaseを1xPBS緩衝液pH 7.4、4 °Cで保存した。2週間後及び12週間後に、A抗原サブタイプI penta - MUに対する最適pHについて記載したように、FpGalNAcデアセチラーゼとFpGalNaseに対するGalN - pNPとの結合酵素反応で酵素活性を試験した。

【0144】

FpGalNAcデアセチラーゼ阻害

【0145】

FpGalNAcデアセチラーゼを、結合アッセイとして、96ウェルプレートフォーマットにおいて、異なる可能性のある阻害剤に対して試験した。100 µLスケールで、37 °Cにおいて、50 µMのA抗原サブタイプI penta - MUおよび5 µg/mLのFpGalNAcデアセチラーゼを用いて、100 mMのNaH₂PO₄ pH 7.4において、10 µg/mLのFpガラクトサミニダーゼ、50 µg/mLのSpHex、50 µg/mLのAfcA、50 µg/mLのBgaCと反応を行った。阻害剤として、EDTA(1、10、100 µM)、Marimastat(1、10、100、1000 µM)、DMSO(2%、4%)、プロテアーゼインヒビターカクテルEDTAフリー(Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free)(Pierce(商標))(1x、2x、および4x)を試験した。蛍光(365 / 435 nm)を、Synergy H1(商標)プレートリーダー(BioTek(商標))を用いて1時間連続的にモニタした。強い効果を示す添加剤を結合酵素なしで再試験し、生成物形成をTLCで分析した。

30

40

【0146】

限定分解

【0147】

Fpガラクトサミニダーゼのより小さく安定なサブドメインがあるかどうかを調べるために、限定的なタンパク質分解を行った。Fpガラクトサミニダーゼをサーモリシン(タンパク質:プロテアーゼ質量比10:1)で種々の温度(20 °C、37 °C、42 °C、50 °C、および65 °C)で1.5時間処理した。次いで、試料をSDS-PAGEゲル上で泳動し、安定な断片を(最初の118 kDaから)約70 kDaで泳動して同定し

50

、ほぼ完全な分解が50°Cのインキュベーション温度で達成された。この断片はペプチド同定のためにUBCプロテオミクスコア施設に送られ、アミノ酸690~700間の切断部位を有する全長タンパク質のC末端切断型であると決定された。

【0148】

グリカンアレイスクリーニング

【0149】

グリカンアレイスクリーニングのために、500µgのFpGalNAcDeAc₂Nextを、Fluorotag(商標)FITC結合キット(Sigma(商標))を用いてフルオレセインイソチオシアネート(FITC)でF/P比1で標識した。スクリーニングは、5および50µg/mLのタンパク質濃度に対して6回の反復で600個のグリカンから構成されたCFGのProtein-Glycan Interaction Core Facility(商標)バージョン5.3の印刷されたアレイで実施された。結合モチーフの分析は、エモリー大学(<https://glycopattern.emory.edu/>)のウェブツールを用いて行った。

10

【0150】

緩衝細胞外溶液中での酵素試験

【0151】

精製GalNAcデアセチラーゼ酵素(配列番号5)および精製ガラクトサミニダーゼ酵素(配列番号10)を含む組成物を用いて、緩衝細胞外溶液PBS、Steen(商標)、およびPerfadex(商標)との適合性をそれぞれ37°C、37°Cおよび4°Cで試験した。ヒトA型赤血球(RBC)を、PBS、Steen(商標)、およびPerfadex(商標)中において様々な酵素組成物の用量でインキュベートして、赤血球からA抗原を切断する酵素の能力を測定した。1% RBC溶液を、PBS、Steen(商標)、およびPerfadex(商標)溶液中において様々な用量の酵素で処理し、処理終了時の抗原除去のレベルをフローサイトメトリーによって分析した。

20

【0152】

動脈生検の免疫組織化学的分析

【0153】

精製GalNAcデアセチラーゼ酵素(配列番号5)および精製ガラクトサミニダーゼ酵素(配列番号10)を含む酵素組成物の用量増加効果を試験するために、STEEN(商標)溶液中のA型ヒト動脈を試験するために使用し、未処理(コントロール)、処理(処理)A型動脈およびネガティブコントロールとしてのO型動脈から採取した生検の免疫組織化学的分析によって、A型抗原の割合を定量した。面積定量ソフトウェアを使用し、下記式を使用してコントロール群に対して正規化した。

30

$$\% \text{ Normalized Antigen} = \frac{\text{Area}_{\text{btA}}(\text{Treatment}) * \frac{\text{Area}_{\text{total}}(\text{Treatment})}{\text{Area}_{\text{total}}(\text{Control})}}{\text{Area}_{\text{btA}}(\text{Control})}$$

O型群で定量化されたA型抗原の残存陽性レベルにより、プロセス中に生じたアーティファクトが説明される。

40

【0154】

ヒト動脈に対する酵素処理をヒト肺動脈において試験した(静的処理)。この場合の用量は、STEEN(商標)溶液の体積に対する酵素の重量の単位として調製された。動脈を生検し、処理し、CD31(内皮細胞を染める)とBTA(血液型A抗原を染める)とによる二重染色による免疫組織化学により分析した。ヒト動脈に対して4時間の酵素処理を1µg/mLおよび10µg/mLの両方で行った。酵素を用いずに処理した動脈(コントロール)および酵素を用いて処理した動脈(処理)の20倍の倍率での動脈生検の免疫組織化学的染色を画像化する。CD31は内皮細胞(血管)の位置を示し、BTAは血液型A抗原の位置を示した。未処理動脈のBTAは内皮細胞(CD31陽性)と共に存在し

50

、 B T A は処理動脈には存在しなかった。

【 0 1 5 5 】

ヒトドナー肺試験

【 0 1 5 6 】

e x v i v o で灌流したヒトドナー肺に対する 1 時間の酵素処理の効果に対して、A 型抗原の発現レベルは、肺組織生検の免疫組織化学的分析および、以下の式を使用して処理前生検に対して正規化された面積定量ソフトウェアを使用して定量化された。

$$\% \text{ Normalized Antigen} = \frac{\text{Area}_{\text{btA}}(\text{Post}) * \frac{\text{Area}_{\text{total}}(\text{Post})}{\text{Area}_{\text{total}}(\text{Pre})}}{\text{Area}_{\text{btA}}(\text{Pre})} \quad 10$$

【 0 1 5 7 】

e x v i v o 灌流ヒトドナー肺に対する 1 時間および 3 時間の酵素処理（すなわち、精製 G a l N A c デアセチラーゼ酵素（配列番号 5）および精製ガラクトサミニダーゼ酵素（配列番号 10）を含む酵素組成物）の効果を試験した。生検したヒトドナー肺の免疫組織化学的染色を 20 倍で画像化し、酵素組成で処理した肺の影響を測定した。C D 3 1 は内皮細胞（血管）の位置を示す。B T A は血液型 A 抗原の位置を示す。処理前画像により、血液型抗原が血管と気道の両方に局在することが示された。肺の右上部依存性（R U D）、右上部非依存性（R U N D）、右中央非依存性（R M N D）、右中央依存性（R M D）、右下部非依存性（R L N D）、右下部依存性（R L D）領域の処理後画像では、血液型 A 抗原は血管に存在しない。

【 0 1 5 8 】

本研究では、2つの別々の e x v i v o で灌流したヒトドナー肺を試験し、その結果を、それぞれ 1 時間および 3 時間に対応して図 10 および図 11 に示す。

【 0 1 5 9 】

（実施例）

実施例 1：メタゲノムライブラリの構築およびスクリーニング

【 0 1 6 0 】

A B + 血液型の男性ドナーが提供した糞便試料から抽出した D N A の大きな（35 ~ 65 k b）フラグメントを含むメタゲノムライブラリを構築した。このようなライブラリは、細菌当たり複数の遺伝子を含み、これらの遺伝子の少なくともいくつかの発現の確率を高め、複数の遺伝子の小さな「経路」の発現を可能にする。本発明者らのライブラリは、約 19,500 クローンを 51 x 384 ウェルプレートに含み、約 80 万遺伝子である可能性があり、従って、高価な A 抗原基質を用いたそのようなライブラリの初期スクリーニングは実用的ではなかった。むしろ、単純で高感度の蛍光発生基質であるガラクトースと N - アセチル - ガラクトサミンのメチルウンベリフェリル - グリコシド（G a l - - M U および G a l N A c - - M U）を用いてスクリーニングした。この二つの基質を混合した最初のスクリーニングでは、226 ヒットのサブセットが得られた。これらを各々の個々の基質に対して再スクリーニングし、44 を G a l N A c a s e で、166 をガラクトシダーゼ活性で同定した。第二ラウンドのスクリーニングは、図 1 に示される A 抗原および B 抗原四糖グリコシド基質を用いて、基質が存在しないコントロール群と共に、結合酵素アッセイ（K w a n 2015）を用いて、これらのヒットについて実施した：最初の G a l または G a l N A c が切断された場合にのみ、結合酵素が作用し、M U を放出することができる。これらのヒットのうち 11 個は、A 抗原切断活性を含み、そのうちの 1 つは、B 抗原も切断したが、一方で基質の非存在下で、6 個は蛍光を生成し、したがって、無関係な蛍光産物を生成する経路をコードする。

【 0 1 6 1 】

10

20

30

40

50

実施例 2 : ヒットのシーケンスおよび初期分析

【0162】

11個のプラスミドをIllumina MiSeq (商標) 上で配列決定し、CAZy (商標) データベース (<http://www.cazy.org/>) (Lombard 2014) に存在するORFsをMetapathways (商標) ソフトウェア (Konwar 2015) を用いて同定した。現在利用可能なヒトマイクロバイーム配列決定のかなりの深さのために、すべてのフォスミドが由来する生物を同定することができた。Bacteroides 属の二種のゲノムの重複断片に由来する11種のうちの8種から、それらの配列は5つのクラスターに分類できた。クラスターBのすべてのフォスミドに共通な唯一の遺伝子はGH109 酵素 (B. vulgatus) である。クラスターAはGH109 (B. stercoris) も含んでいるが、GH109は他のバクテロイデス由来のフォスミド (B. vulgatus) に見られる唯一のCAZy 遺伝子である。偏性嫌気性菌フラボニフラクター・プラウティ (Li 2015) 由来のフォスミドN08はCAZy 内に見られる三つのORF, すなわち見かけの糖鎖結合モジュールCBM32と二つの潜在的グリコシドヒドロラーゼGH36とGH4を含む。最後にコリンゼラ (CollinSELLa) sp., おそらくCollinSELLa tanakaei 由来のフォスミドK05はCAZy 関連ORFを含まない。ここでは、フォスミドK05のサブライブラリの生成により、A切断活性を有するORFの同定が可能となり、後にGH36 (表示しない) として同定された。

10

【0163】

実施例 3 : GH109 酵素の分析

【0164】

GH109ファミリーは、そのメンバーのうちのいくつかのA抗原切断活性に基づいて見出された。これらの酵素は、通常とは異なるNAD⁺依存性機構を用いるものであるが、この機構は、当該機構を示したGH4 Add Yip Ref (2004) J. Amer. Chem. Soc. 126, 8354-8355における酵素で最初に発見された (Varrot 2005 および Liu 2007)。ここで同定した3つのGH109 遺伝子をシグナルペプチドの除去後にHisタグを付してクローニングし、大腸菌 (Escherichia coli) BL21 (DE3) において発現させた。これら三つのタンパク質、BsGH109、BvGH109__1 および BvGH109__2 (表示しない) を、標準としてのElizabethkingia meningosepticum 由来の標準的なGH109 (EmGH109) (Liu 2007) と共に精製し、それぞれについて動態パラメータを決定した。3つの新規酵素は、試験した3つのAサブタイプ基質のそれぞれと同様の触媒効率を示し、主にEmGH109 標準の動態パラメータを反映した。対照的に、承認されたMTSカードを用いてA⁺RBCでそれらのA抗原切断活性が試験されたとき、残念ながらEmGH109のみが有意な活性を示した。試験は、クラウディング剤としてのデキストラン40Kの存在下で行ったが、当該クラウディング剤は細胞表面に酵素を集結させることにより活性を増加させることが示されている (Chapman 2014)。それが存在しない場合、150 μg/mLのEmGH109であっても効果を示さなかったが、300 mg/mLのデキストラン40Kの存在下では、15 μg/mLの酵素で十分であった (図3 および 4 参照)。以前の研究においては、低イオン強度もまた細胞上のEmGH109の活性を高めることを示している (Liu 2007)。したがって、EmGH109は血液全体においては効果的ではない。

20

30

40

【0165】

実施例 4 : CollinSELLa sp. 由来のフォスミドK05 由来のGH36の分析

【0166】

フォスミドK05中に同定されたGH36タンパク質 (K05GH36 という名前) はGalNAc - - MUとA抗原四糖に対して活性を示した。これは、主に - ガラクトシダーゼと - N - アセチルガラクトサミニダーゼを含み、共有結合 - グリコシル酵素中間体を含む二重置換機構により加水分解を行う (comfort 2007) GH36フ

50

ファミリーの一員であることと一致する。系統発生解析により、その配列はGH36サブファミリーのクラスター4内に配置された(Fredslund 2011)。興味深いことに、このクラスターは、A抗原構造を切断することも知られているClostridium perfringens由来の特徴づけられたGH36も近接して含んでいる(Calcutt 2002)。しかし、赤血球からA抗原を除去するK05GH36の能力を試験したところ、その活性は期待外れであり、クラウディング剤と併用した場合でも3しかスコア付けされなかった。

【0167】

実施例5：フラボニフラクター・プラウティ由来のフォスミドN08の分析

【0168】

これらの新規酵素は利点を提供しないので、F・プラウティ由来のN08フォスミドに注目したが、それは、特にその遺伝子産物がA抗原とB抗原の両方を切断するためである。三つのCAZ関連遺伝子を複製し、それらのシグナルペプチド配列を除去し、E.coli BL21(DE3)で発現させ、得られた酵素を140mg/Lまでの収率で精製した。驚くべきことに、AおよびB四糖類基質に対して個々の精製タンパク質を試験したとき、観察された唯一の切断はN08GH36によるB抗原の切断のみであり、それらのいずれによるA抗原の切断もなかった。このため、これらの酵素の対の組み合わせを試験し、N08CBM32とN08GH36の混合物がA抗原四糖類を迅速に切断することを発見したことに驚いた。個々の酵素との反応混合物のTLC分析により、N08CBM32が、より極性を有するが、依然としてUV活性を有する生成物へのA抗原の変換を触媒することが明らかにされ、一方で、その後のN08GH36の添加により、H抗原三糖類と共にガラクトサミンと共移動する糖生成物が放出された。反応混合物のMS分析により、N08CBM32がA抗原デアセチラーゼであることが示され、従って42m/zおよび、より極性を有する生成物の減少であり、一方で、N08GH36はガラクトサミニダーゼであり、このファミリーにおける新しい活性を有することが示された(図2)。これは反応の高速陰イオン交換クロマトグラフィ(HPAE-PAD)分析(図5)によってさらに確認され、両酵素によるA抗原の処理はガラクトサミンを放出するが、個々の酵素によっては放出しないことを示した。同様の結果は胃粘素基質でも得られたが、この酵素はおそらくこの基質に対して進化したと思われる。したがって、この2つの酵素は、以後、FpGalNAcデアセチラーゼ(FpGalNAcDeAc)およびFpガラクトサミニダーゼ(FpGalNase)と呼ばれる。

【0169】

A抗原分解のこの経路は、これまで特徴づけられていなかったが、興味深いことに、50年以上前にいわゆる「後天性」B現象の説明として示唆されていた。この現象では、クロストリジウム・テルチウムに感染したA型患者は、テムズ川に沈められたヒト組織の法医学的サンプルと同様に(Ref Judd and Annesley [https://doi.org/10.1016/S0887-7963\(96\)80087-3](https://doi.org/10.1016/S0887-7963(96)80087-3), Transfusion medicine reviews (1996) 10, 111-117)、血液型がB型に明らかに変化した(Gerbal 1975)。これはおそらく、タイピングに用いた抗B抗体が末端のGalとGalNを区別できなかったためであろう。

【0170】

フォスミドの3番目の酵素であるGH4を調べたところ、それはGal-pNP、GalN-pNPおよびGlcN-pNPを加水分解するが、A抗原に基づく基質を切断しないことがわかった。したがって、それはA抗原の変換に直接関与していないようである。しかしながら、これらのグリコサミニダーゼはGH4ファミリー内において新しい活性を示す。

【0171】

実施例6：FpGalNAcデアセチラーゼの特性評価

【0172】

Phyre2(商標)(Kelly 2015)によるこの遺伝子のより詳細な生物情報

10

20

30

40

50

学的分析により、N末端においてこれまで機能が未知であった約308アミノ酸ドメインおよびC末端近くの約145アミノ酸CBM32、そしてその間にリンカー領域を有することが示された。未加工のデアセチラーゼドメインを含む全ての構築物が実際に触媒活性を示したことから(表2)、切断分析により、この基本構造が確認された。従って、このタンパク質は、新しい糖鎖エステラーゼファミリー、CExxの創始メンバーとして分類される。

【0173】

アセトアミド糖デアセチラーゼはすべて二価金属イオンを必要とする金属酵素であることが証明されている(Blair 2005)。このことと一致して、100 μ MのEDTAで処理すると、酵素活性はほとんど消失したが、Mn²⁺、Co²⁺、Ni²⁺またはZn²⁺の添加では増加した。(非金属)アミダーゼの他の阻害剤は効果がなかった。本酵素の最適pHは8付近(図6)で、基質特異性は狭く、異なるAサブタイプとそれより短いバージョンに限定されていた。しかし、これらのサブタイプの中では、それはあまり区別できず、これらのサブタイプのすべての間で、比活性に約2倍の差があるにすぎない(表2)。このようなpH依存性および特異性プロファイルは、Aのすべてのサブタイプが脱アセチル化されているが、それ以外のものはないため、RBC変換に理想的である。

【0174】

タンパク質のCBM部分の特異性は、Consortium for Functional Glycomics(CFG)のグリカンアレイを用いて検討した。好ましい標的は、CBM32ファミリーの創設メンバー、つまりクロストリジウム・パーFRINGENS(Clostridium perfringens)由来のN-アセチルグルコサミンダーゼ(Ficko-Blean 2006)についても見られるように、反復N-アセチルラクトサミン(LacNAc)構造を有するグリカンであった。しかし、CBMとは異なり、我々の組成物は血液抗原構造に高親和性結合を示さない。反復LacNAc構造は、いくつかのO-グリカンおよび糖脂質と同様に、複合体およびハイブリッドNグリカンの一般的成分として細胞表面の共通成分である(Cohen 2009)。われわれの場合、これらはおそらくデアセチラーゼドメインが結合するためのアンカーポイントとして働いている。これにより、その触媒ドメインは、それ自身の基質と競合することなく、A抗原に近接するようになる。このモデルを支持するように、ドメインを除去すると、可溶性基質の切断速度に影響することなくRBCの活性が低下した(表2)。

【0175】

実施例7：FpGalNAcデアセチラーゼの結晶解析

【0176】

この新規酵素活性に対する構造的洞察を提供するために、切断されたタンパク質を結晶化試験に供し、FpGalNAcDeAc_D1extが最良の分解能に回折する結晶を生成することを見出した。この構造の溶液により、D100とH252により配位結合した二価金属イオンを含む活性部位を有する5回のプロペラ構造を採用する触媒ドメインが明らかになった。反応生成物の類似体としてのB抗原三糖類と酵素の共結晶化により、その結合様式が明らかになった。活性部位ポケットの基部で、A抗原とB抗原の区別基である非還元末端ガラクトシル部分は、H97、E64および2つの金属配位水と水素結合相互作用をする。残りの配位子は表面露出し、フコシル基とS61及びD121側鎖間の極性相互作用が同定される。還元末端ガラクトシル部分のC1-OH基は溶媒にさらされているので、基質への伸長(すなわちG1cNAcにおいて)は酵素によって容易に調節される。A-三糖類のN-アセチル基をこの構造上にモデル化することにより、基質の脱アセチル化に参与する可能性のある近傍アミノ酸の合理的な変異を作ることができた。残基E64は両変異体が不活性であることから活性に重要であることが判明し、おそらく求核性水分子の活性化において直接的役割を示すことが示唆される(表1)。二価金属D100、Y315およびH252を配位する残基も重要であることが判明し、約5000倍の速度低下をもたらすいずれの変異も、二価金属イオンの結合におけるそれらの見かけの役割と一致している。他のアセトアミド糖デアセチラーゼから類推して、FpGalNAc

10

20

30

40

50

デアセチラーゼがカルボニルを分極し、カルボニルへの求核攻撃のための水分子を活性化して四面体中間体を形成する機構により加水分解を行うことを我々は提案する。この中間体の分解はHis 100による糖窒素原子へのプロトン供与によって促進される。

【0177】

表1 | A抗原Type 2 tetra-MUの切断に対するFpGalNAcDeAc__D1minのその変異体の比活性

変異部位	k_{cat}/K_M [$\text{min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$]	
WT	492.751 ±	124.002
E64A	N. D.	
E64L	N. D.	
C99A	140.680 ±	5.798
C99S	75.595 ±	2.491
D100N	0.073 ±	0.005
H252A	0.084 ±	0.012
H252F	0.030 ±	0.002
Y315F	0.167 ±	0.039

N. D. = 検出可能な活性なし

【0178】

実施例8 : FpGalNAcDeAcおよびFpGalNaseの特性評価

【0179】

配列の系統発生的解析において、FpGalNaseはGH36ファミリーの新しいサブグループ(5)に配置された(Fredslund 2011)。390のアミノ酸触媒ドメインは、この大きな(1079のアミノ酸)タンパク質の中心に位置し、C末端に潜在的な糖鎖結合ドメインを有する。このC末端ドメインの除去は、可溶性基質による酵素の動態パラメータに影響を及ぼさなかったが(表2)、脱アセチル化A⁺RBCの切断効率を低下させた。この酵素はガラクトサミン含有糖に特異的であり、試験されたどのような状況でもGalNAc残基を切断しない。しかしながら、それは単純なアリアルグリコシドGalN-pNPから高次のものにわたる脱N-アセチル化ガラクトサミニドの切断に対してかなり広い特異性を有する。実際、(表2)試験した三つのAサブタイプの k_{cat}/K_M 値は、すべて互いに類似しており、またデアセチラーゼの値と類似していた。B抗原の切断に対する k_{cat}/K_M の値は、対応するGalN抗原に対する値よりも2000倍以上低かったが、それにもかかわらず、元のスクリーン上でポジティブヒットを生じさせるには十分であった。脱アセチル化ガラクトース構成基質に対するこの特異性は、その最適pHが約6.5~7.0であることと相まって、デアセチラーゼとともに血液型変換に用いるのに適している(図6)。

【0180】

表2 | 異なる抗原基質に対するFpGalNAcDeAcおよびFpGalNase構築物の動態パラメータ

10

20

30

40

50

		基質	K_M [μM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$s^{-1} * mM^{-1}$]
FpGalNAcDeAc	全長	A抗原タイプ1 _{penta} -MU	340 ± 35	4.86	14.28
	— <i>D1ext</i>	A抗原タイプ1 _{penta} -MU	212 ± 37	5.37	25.23
	— <i>D1+2</i>	A抗原タイプ1 _{penta} -MU	265 ± 43	9.99	37.59
	全長	A抗原タイプ1 _{tetra} -MU	—	—	23.49 ± 0.63
	全長	A抗原タイプ2 _{tetra} -MU	—	—	23.37 ± 0.71
	全長	A抗原タイプ4 _{tetra} -MU	—	—	33.27 ± 2.08
	FpGalNase	全長	GalN抗原タイプ1 _{penta} -MU	64.5 ± 7.6	2.35
— <i>truncA</i>		GalN抗原タイプ1 _{penta} -MU	54.7 ± 3.1	1.86	34.08
全長		GalN抗原タイプ1 _{tetra} -MU	—	—	45.70 ± 3.57
全長		GalN抗原タイプ2 _{tetra} -MU	—	—	47.27 ± 7.49
全長		GalN抗原タイプ4 _{tetra} -MU	—	—	30.05 ± 2.33
全長		B抗原タイプ1 _{tetra} -MU	—	—	0.02
全長		GalN- α -pNP	700 ± 51	0.029	0.04

10

20

30

【0181】

実施例9：RBCからのA抗原の切断

【0182】

A⁺、B⁺及びO⁺型RBCをFpGalNAcDeAc及びFpGalNaseそれぞれと及び混合物としてインキュベートし、放出された糖をHPAE-PADイオンクロマトグラムで分析した。個々に使用した酵素はいずれも糖生成物を放出しなかった。しかし、両者の混合物を用いると、ガラクトサミンはタイプA⁺RBCからは明らかに放出されたが、B⁺またはO⁺からは放出されず、A抗原に対してのみ高い特異性を示した。他の状況ではGalNAcがRBC表面から放出されないことを示すため、これは非常に重要である。FpGalNaseの切断型も有効であったが、活性はやや低かった。

40

【0183】

次に、業界標準のMTS（商標）カードを使用して、RBCから抗原を除去する試験を行った。これらの抗体結合カラムにRBCを負荷し、遠心機で遠心する。抗原を含まないRBCはカラムの底部に移動して0としてスコア化されるが、対応する抗原を含む未処理のRBCは上部に付着して4としてスコア化され、その中間スコアで抗原除去の程度がランク付けされる。FpGalNase単独処理では、（表3）の濃度で、AまたはB抗原性を除去しなかったが、これは、GalNAc基質に対する不活性およびGalに対する低活性と一致する。FpGalNAcDeAcとのインキュベーションは、アセトアミドのアミンへの変換による抗原性を除去し、使用される抗A抗体の結合を弱める。完全な抗原

50

脱アセチル化に必要な最小量の酵素を、 F p G a l N A c D e A c 単独および F p G a l N a s e との併用で、クラウディング剤としてデキストラン 300 mg / ml の有無の両方で評価した。3 μ g / ml までの F p G a l N a s e の量はデキストランなしで十分であったが、300 mg / ml のデキストランを含有することで、必要な負荷は 0.5 μ g / ml まで減少した(表3)。従来の最良の酵素 EmGH109 は、低塩緩衝液を使用しない限り、デキストランの非存在下では効果がなかったが、デキストランの存在下では最小有効濃度は 15 μ g / ml であり、これは 30 倍高い負荷であった。C B M を欠く F p G a l N A c D e A c のバージョンは、はるかに効果が低かった。

【0184】

表3 | A⁺、B⁺およびAB⁺RBCをEmGH109、FpGalNAcDeAcおよびFpGalNaseで処理した場合のMTSカードの結果

酵素	血液型	デキストラン 40k	酵素濃度 [μ g / ml]	抗A TS	M	抗B MTS
なし	A ⁺			4		
なし	B ⁺					4
なし	AB ⁺			4		4
EmGH109	A ⁺	300 mg / mL	15	0		
FpGalNAcDeAc	A ⁺		3	0		
FpGalNAcDeAc	A ⁺		2	1		
FpGalNAcDeAc	A ⁺	300 mg / mL	0.5	0		
FpGalNAcDeAc	A ⁺	300 mg / mL	0.4	2		
FpGalNase	B ⁺		100			4
FpGalNase	B ⁺	300 mg / mL	100			4
FpGalNase	AB ⁺		100	4		4
FpGalNase	AB ⁺	300 mg / mL	100	4		4

【0185】

MTS (商標) カードテストはA抗原の完全な変換を評価しないため、またGalN抗原を検出するための抗体が利用できなかったため、処理したRBC上で新たに形成されたH抗原の検出に焦点を当てた。FpGalNaseはわずか5 μ g / ml の濃度で機能的であり、図3に見られるFACS分析によって確認されるように、A抗原の損失と同時にH抗原レベルの増加をもたらした。抗H抗体の存在下での凝集時間を測定することにより、数名のA⁺RBCドナーに対する両酵素の機能性、また全血反応条件において、他の血液変換酵素では達成できなかった能力を実証した。このように、この酵素対は、従来の最良の酵素に必要とされるよりもはるかに低い酵素負荷量で、A⁺RBCをO型「全般的ドナー」RBCに変換する。しかしながら、これらのRBCを患者に輸血する前に、遠心分離

後に細胞の洗浄によることが最もあり得るが、変換に使用される微量の酵素を有害な免疫反応を回避するために全て除去することが推奨される。これが達成され得ることを確認するために、F p G a l N A c D e A c 及び F p G a l N a s e の蛍光標識試料で A + R B C を処理し、次いで、F A C S 分析を用いて、実際に単純な洗浄が有効であることを確認した(図3)。

【0186】

産生された A - E C O R B C のさらなる特性評価は、輸血医学において使用するためのそれらの完全な実行可能性を評価するために有用であるかもしれないが、献血を収集する間を可能性として、血漿に直接酵素を含める可能性は、プロセスを離れて、血液採取保存の既存の自動化ルーチンへの容易かつコスト効率的な実装を可能にするかもしれない。特に、表4に示すように、酵素の安定性を試験した。

10

表4：ガラクトサミニダーゼおよびG a l N A c デアセチラーゼの保存安定性

タンパク質	時間	サンプル [mU]		
F p G a l N a s e	フレッシュサンプル1	0.492	0.49	0.50
	フレッシュサンプル2	0.425	0.43	0.43
	4°Cで2週間保存	0.480	0.45	0.46
	4°Cで12週間保存	0.494	0.49	0.49

20

基質：100 μMのG a l N - α - p N P

タンパク質	時間	サンプル [mU]		
F p G a l N A c D e A c	フレッシュサンプル1	888	840	888
	4°Cで2週間保存	864	840	936
	4°Cで12週間保存	864	840	888

基質：100 uMのA抗原 T I t e t r a - M U

30

【0187】

実施例10：クロストリジウム・テルチウム由来のG a l N A c デアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼ融合体

【0188】

類似酵素の探索において、C B M (G H 3 6 ドメイン - C B M - 脱アセチル化ドメイン) で連結したガラクトサミニダーゼとG a l N A c デアセチラーゼの新規なクロストリジウム・テルチウム自然融合体を同定した。最初の試験では、この酵素が赤血球のA抗原を切断することが示されたが(最初に脱アセチル化、次にガラクトサミン切断という同じ機構)、それほど効率的ではなかった(つまり、E m G H 1 0 9 と同様)。クロストリジウム・テルチウム脱アセチル化ドメインは、F . プラウティG a l N A c デアセチラーゼほど効率的ではないが、F . プラウティG a l N A c デアセチラーゼで補助すると、クロストリジウム・テルチウムガラクトサミニダーゼドメインは、赤血球上でF . プラウティガラクトサミニダーゼと同様の活性を示す。

40

【0189】

実施例11：代替G a l N A c デアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼ酵素

【0190】

データは、クロストリジウム・テルチウム、ガラクトサミニダーゼ(C t 5 7 5 7 __ G a l N A s e) およびR p 1 0 2 1 が、G a l N 抗原のH抗原への変換(第2の反応段階)

50

に対して同等の酵素活性を有することを示す。

【0191】

また、代替 GalNAcデアセチラーゼおよびガラクトサミニダーゼ酵素のデータも収集し、代替酵素をフラボニフラクター・プラウティのGalNAcデアセチラーゼおよびフラボニフラクター・プラウティのガラクトサミニダーゼと比較した。表5に示されるように、処理されたA RBC上の抗A抗体についてのMTSスコアは、ガラクトサミニダーゼとGalNAcデアセチラーゼとのクロストリジウム・テルチウム自然融合体について示され、これは、A抗原を効果的に切断するためにデキストランの存在を必要とし、また、フラボニフラクター・プラウティガラクトサミニダーゼ(FpGalNase)と組み合わせると、良好な活性(Ct5757_DeAcase)を示す。また、表6において、データは、ロビンソニエラ・ペオリエンシス(Rp)Rp3672およびRp3671が、RBC上のA抗原を脱アセチル化することができるが、FpGalNAcDeAcaseよりも効率が低く、活性がクラウディング剤(すなわち、デキストラン40k)の存在下でのみ達成されたことを示す。

10

【0192】

表5：処理されたA RBC上の抗A抗体のMTSスコア

サンプル	抗A MTSスコア
A RBCコントロール	4
FpGalNAcDeAcase+FpGalNase (10 μg/mL)	0
Ct5757 (10 μg/mL)	4
Ct5757 (50 μg/mL) +デキストラン40k	0
Ct5757_DeAcase+FpGalNase (10 μg/mL)	0

20

【0193】

表6：ロビンソニエラ・ペオリエンシス(Rp)3671および3672のMTSスコア

サンプル	抗A MTSスコア
A RBCコントロール	4
Rp3671 (50 μg/mL) +デキストラン40k	3
Rp3672 (50 μg/mL) +デキストラン40k	1

30

【0194】

図7は、(A)A+RBCコントロール、(B)フラボニフラクター・プラウティGalNAcデアセチラーゼ(FpGalNAcDeAc)+フラボニフラクター・プラウティガラクトサミニダーゼ(FpGalNase)(10 μg/mL)、(C)FpGalNAcDeAc+クロストリジウム・テルチウム(Ct)Ct5757_DeAcase(10 μg/mL)、および(D)FpGalNAcDeAc+ロビンソニエラ・ペオリエンシス(Rp)ガラクトサミニダーゼ(Rp1021)GalNase(10 μg/mL)について、FACS選別によって分析されたA抗原のA RBCs上のH抗原への変換を示す。データは、クロストリジウム・テルチウム(Ct)Ct5757_DeAcaseおよびロビンソニエラ・ペオリエンシス(Rp)ガラクトサミニダーゼ(Rp1021)GalNaseは、GalN抗原のH抗原への変換に対して(第2の反応段階)フラボニフラクター・プラウティガラクトサミニダーゼと同程度の酵素活性を示す。

40

50

【 0 1 9 5 】

実施例 1 2 : 酵素組成物と灌流 / 保存流体との適合性

【 0 1 9 6 】

酵素組成物が E V L P 系と適合することを確認するために、最初に臓器灌流 / 保存流体 (S T E E N (商標) および P e r f a d e x (商標)、X V I V O 灌流) 中の酵素 (配列番号 5 の精製フラボニフラクター・プラウティ G a l N A c デアセチラーゼタンパク質および配列番号 1 0 の精製フラボニフラクター・プラウティガラクトサミニダーゼタンパク質) の機能を試験した。適合性は、37 ° C の S T E E N (商標) または 4 ° C の P e r f a d e x (商標) 中における赤血球上の血液型 A 抗原を除去する酵素組成物の能力に基づいて評価された。P B S が血液処理に使用される標準溶液の一つであるため、37 ° C のリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) が比較群として使用された。S T E E N (商標) および P e r f a d e x (商標) について検討した温度は、臨床診療における作業温度を基にした。抗原除去レベルはフローサイトメトリーにより分析した。臓器における適切な用量の予測に役立てるため、S T E E N (商標) および P e r f a d e x (商標) における用量増加試験が実施された (図 8 参照)。試験全体を通して用いられる用量の単位は、溶液の体積 (m L) に対する酵素の重量 (μ g) として定義される。

10

【 0 1 9 7 】

酵素組成物は、S T E E N (商標) および P e r f a d e x (商標) 灌流 / 保存流体に完全に適合し、灌流 / 保存流体は、P B S に比べて酵素組成物の効率を高めることが示された。酵素組成物は、総酵素濃度 1 μ g / m L で S T E E N (商標) および P e r f a d e x (商標) 中の抗原の 9 0 % 以上を除去することができたが、P B S 中では同じ効果が 4 μ g / m L の用量で達成された (図 8)。

20

【 0 1 9 8 】

実施例 1 3 : ヒト動脈の静的処理

【 0 1 9 9 】

組織レベルでの酵素 (配列番号 5 の精製フラボニフラクター・プラウティ G a l N A c デアセチラーゼタンパク質および配列番号 1 0 の精製フラボニフラクター・プラウティガラクトサミニダーゼタンパク質) の有効性を試験するために、ヒト動脈の *i n v i t r o* モデルを用いた。同じヒトドナーの肺動脈をコントロール群 (S T E E N (商標) 溶液) と処理群 (酵素組成物 + S T E E N (商標) 溶液) に分け、37 ° C で 4 時間静的にインキュベートした。両群ともインキュベーション終了時に生検を行った。酵素組成物を 1 μ g / m L および 1 0 μ g / m L 投与した。血液型抗原の変化を免疫組織化学的に分析した。生検の連続切片を C D 3 1 (内皮細胞のマーカー) で二重染色して血管内面の位置を示し、B T A で血液型抗原の発現を示した。

30

【 0 2 0 0 】

処理群の血液型 A 抗原の発現レベルはコントロール群に比べて有意に低下した。1 μ g / m L と 1 0 μ g / m L の用量効果は処理動脈と同様であった。酵素の総濃度 (用量) が 1 μ g / m L よりも低ければ、酵素も作用する可能性がある。B T A の染色画像を C D 3 1 と比較したところ、血液型抗原の消失を確認した (図 9)。

【 0 2 0 1 】

実施例 1 4 : ヒト肺の *e x v i v o* 灌流

【 0 2 0 2 】

ヒト臓器 (例えば肺) における組織血液型抗原の除去における酵素含有 S T E E N (商標) 溶液の有効性を T o r o n t o E V L P 設定で試験した。ヒトドナーの肺を臨床的 *e x v i v o* 肺灌流 (E V L P) で評価し、移植に不相当であり、従って酵素組成物の試験に適していると決定された。肺が低下した後、酵素組成物 (配列番号 5 の精製フラボニフラクター・プラウティ G a l N A c デアセチラーゼタンパク質および配列番号 1 0 の精製フラボニフラクター・プラウティガラクトサミニダーゼタンパク質) を S T E E N (商標) 灌流流体に添加して処理を開始した。用量は 1 μ g / m L とした。処理前後に生検を行った。血液型抗原の発現変化を免疫組織化学的に解析した。肺の機能と生理も実験期間中 1 時

40

50

間ごとにモニタし、処理による急性の副作用がないことを確認した。

【0203】

ヒト肺では、単肺EVL Pで1.5L、両肺EVL Pで2Lの灌流液が必要である。右単肺EVL Pの最初の試験(図10)では、酵素組成物1.5mgを灌流流体に加えて1μg/mLとした。肺を1時間処理した。免疫組織化学的分析により、処理後の血液型A抗原量の著しい低下が示された(図10)。血液型抗原と血管を二重染色した処理前生検の切片を比較すると、肺の抗原は血管壁の表面だけでなく気道にも局在していた。二重染色した処理後生検の比較により、血管内抗原が効果的に除去されたことが示される。

【0204】

第2の試験(図11)では、右単肺EVL PをSTEEN(商標)灌流流体中1.5mgの酵素組成物で処理して1μg/mLの濃度とした。肺を3時間処理した。免疫組織化学的分析により、血液型A抗原の発現レベルが著しく低下していることが示された。血液型抗原と血管を二重染色した処理前生検を比較すると、肺の血液型抗原は血管表面だけでなく気道にも局在していた(図11)。二重染色した処理後生検の比較により、血管内抗原が効果的に除去されたことが示される(図11)。酵素処理開始後の肺の生理および機能に急性の副作用は観察されなかった。

10

【0205】

結果により、1μg/mLの用量で、灌流したヒト肺において酵素が1時間以内に効果を示すことが示される。

【0206】

本明細書では、本発明の様々な実施形態が開示されているが、本発明の範囲内で、当業者の一般的な知識に従って、多くの適応および修正を行うことができ、そのような修正は、実質的に同じ方法で同じ結果を達成するために、本発明の任意の態様に対する既知の等価物の置換を含む。数値範囲は、当該範囲を規定する数値を包括する。本明細書では、「含む(comprising)」という用語は、「含む(including)」が、これに限定されない」という語句と実質的に等価な、非限定的用語として使用し、「含む(contains)」という語は対応する意味を有する。本明細書で使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈において明確に断らない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「物(a thing)」への言及は、複数のそのようなものを含む。本明細書における参考文献の引用は、そのような参考文献が本発明の実施形態の先行技術であることを認めるものではない。本発明は、実施例および図面を参照して、実質的に前述したように、すべての実施形態および変形形態を含む。

20

30

【0207】

(配列)

フラボニフラクター・ブラウティDNA配列を天然に存在するDNA配列(GalNAcデアセチラーゼ2311/2319nt/ガラクトサミニダーゼ3228/3237nt)から改変した。特に、タンパク質精製に使用される配列の長さに差があり、それによってシグナルペプチドが除去され、N末端Hisタグがベクター骨格を介して付加された。

【0208】

インフォーマル配列リスト

40

【0209】

配列番号2

【0210】

説明：フラボニフラクター・ブラウティGalNAcデアセチラーゼ(タンパク質配列)
 MRNRRKAVSLLTGLLVTAQLFPTAALAADSSSESALNKAPG
 YQDFPAYYSDSAHAADDQVTHPDVVVLEEPWNGYRYWAVYT
 PNVMRISIIYENPSIVASSDGVHWVEPEGLSNPIEPQPPST
 RYHNCDAADMVYNAEYDAMMAYWNWADDQGGGVGAEVRLRI
 SYDGVHWGVPVITYDEMTRVWSKPTSDAERQVADGEDDFIT
 AIASPDRYDMLSPITIVYDDFRDVFILWANNTGDVGYQNGQ

50

ANFVEMRYSDDGITWGE PVRVNGFLGLDENGQQ LAPWHQD
 VQYVPDLKEFVCISQCFAGRNPDGSVLHLTT SKDGVNWEQ
 VGTKPLLSPPDGSWDDFQIYRSSFYEPGSSAGDGTMRV
 WYSALQKDTNNKMVADSSGNLTIQAKSEDDR IWRIGYAEN
 SFVEMMRVLLDDPGYTTPALVSGNSLMLSAETTS LPTGDV
 MKLET SFAPVDTSDQVVKYTS SDPDVATVDEFGTITGVS V
 GSARIMAETREGLSDDLEIAVVENPYTLIPQSNMTATATS
 VYGGTTEGPASNVL DGNVRTIWHNTNYAPKDEL PQSITVSF
 DQPYTVGRFVYTPRQNGTNGI ISEYEL YAIHQDGSKDLVA
 SGSDWALDAKDKTVSFAPVEAVGLELKA IAGAGGFGTAAE
 LNVYAYGPIEPAPVYVPVDDRDASLVFTGAWNSDSNGSFY
 EGTARYTNEIGASVEFTFVGT AIRWYGQNDVNF GA AEVYV
 DGVLAGEVNVYGPAAAQQLLFEADGLAYGKHTIRIVCVSP
 VVDFDYFSYVGE

10

【0211】

配列番号4

【0212】

説明：フラボニフラクター・ブラウティGalNAcデアセチラーゼ（除去シグナルペプチドタンパク質配列）

ADSSSESALNKAPGYQDFPAYYS DSAHADDDQVTHP DVVVLE
 EPWNGYRYWAVYTPNVMRISIYENPSIVASSDGVHWVEPE
 GLSNPIEPQPPSTRYHNCDADMVYNAEYDAMMAYWNWADD
 QGGGVGA EVRLRISYDGVHWGV PVTYDEMTRVWSKPTSDA
 ERQVADGEDDFITAIASPD RYDMLSPTIVYDDFRDVFILW
 ANNTGDVGYQNGQANFVEMRYSDDGITWGE PVRVNGFLGL
 DENGQQ LAPWHQDVQYVPDLKEFVCISQCFAGRNPDGSVL
 HLTT SKDGVNWEQVGTKPLLSPPDGSWDDFQIYRSSFYEPGSSAGDGTMRVWYSALQKDTNNKMVADSSGNLTIQAKS
 EDDR IWRIGYAENSFVEMMRVLLDDPGYTTPALVSGNSLM
 LSAETTS LPTGDV MKLET SFAPVDTSDQVVKYTS SDPDVA
 TVDEFGTITGVS VGSARIMAETREGLSDDLEIAVVENPYT
 LIPQSNMTATATS VYGGTTEGPASNVL DGNVRTIWHNTNYA
 PKDEL PQSITVSFDQPYTVGRFVYTPRQNGTNGI ISEYEL
 YAIHQDGSKDLV ASGSWALDAKDKTVSFAPVEAVGLELKA
 IAGAGGFGTAAELNVYAYGPIEPAPVYVPVDDRDASLVF
 TGAWNSDSNGSFYEGTARYTNEIGASVEFTFVGT AIRWYG
 QNDVNF GA AEVYV DGVLAGEVNVYGPAAAQQLLFEADGLA
 YGKHTIRIVCVSPVVDFDYFSYVGE

20

30

【0213】

配列番号5

【0214】

説明：His タグを有するフラボニフラクター・ブラウティGalNAcデアセチラーゼ（pET16a - タンパク質配列）

MGHHHHHHHHSSGADSSSESALNKAPGYQDFPAYYS DSA
 HADDDQVTHP DVVVLEEPWNGYRYWAVYTPNVMRISIYENP
 SIVASSDGVHWVEPEGLSNPIEPQPPSTRYHNCDADMVYN
 AEYDAMMAYWNWADDQGGGVGA EVRLRISYDGVHWGV PVT
 YDEMTRVWSKPTSDA ERQVADGEDDFITAIASPD RYDMLS
 PTIVYDDFRDVFILWANNTGDVGYQNGQANFVEMRYSDDG
 ITWGE PVRVNGFLGLDENGQQ LAPWHQDVQYVPDLKEFVC

40

50

ISQCFAGRNP DGSVLHLTT SKDGVNWEQVGTKPLLS PGPD
 GSWDDFQIYRSSFY YEPGSSAGDGTMRVWYSALQKDTNNK
 MVADSSGNLTIQAKSEDDRIWRIGYAENSFVEMMRVLLDD
 PGYTTPALVSGNSLMLS AETTS LPTGDVMKLETSFAPVDT
 SDQVVKYTSSDPDVATVDEFGTITGVSVGSARIMAETREG
 LSDDLEIAVVENPYTLIPQSNMTATATSVYGGTTEGPASN
 VLDGNVRTIWHNTNYAPKDEL PQSITVSFDQPYTVGRFVYT
 PRQNGTNGIISEYELYA I HQD GSKDLV ASGSDWALDAKDK
 TVSFAPVEAVGLELKA IAGAGGFGTAAELNVYAYGPIEPA
 PVYVPVDDR DASLVFTGAWNSDSNGSFYEGTARYTNEIGA
 SVEFTFVGTAIRWYGQNDVNF GAAEVYVDGVLAGEVNVYG
 PAAAQQLLFEADGLAYGKHTIRIVCVSPVVDFDYFSYVGE

10

【0215】

配列番号7

【0216】

説明：フラボニフラクター・ブラウティガラクトサミニダーゼ

MRGKKFISLTLSTMLCLQLLPTASFAAAPATDTGNAGLIA
 EGDYAIAGNGVRVTYDADGQTITLYRTEGSGLIQMSKPS
 LGGPVI GGQEVQDFSHISCDVEQSTS GVMGSGQRMTITSQ
 SMSTGLIRTYVLETSDIEEGVVY TATS YEAGASDVEVSWF
 IGSVYELYGAE DRIWSYNGGGEGPMHYD TLQKIDLTDSG
 KFSRENKQDDTAASIPVSDIYIADGGITVGDASATRREVH
 TPVQETS DSAQV SIGWPGKVIAAGSVIEIGESFAVVHPGD
 YYNGLRGYKNAMDHLGVIMPAPGDI PDSSYDLRWE SWGWG
 FNWTIDLIIIGKLDLQAAGVKQITLDDGWYTNAGDWALNP
 EKFPNGASDALRLTDAIHEHGMTALLWWRPCDGGIDSILY
 QQHPEYFVMDADGRPARLPTPGGGTNPSLGYALCPMADGA
 IASQVDFVNRAMNDWGFDFGFKGDYVWSMPECYNPAHNHAS
 PEESTEKQSEIYRVSYEAMVANDPNVFNLLCNCGTPQDY
 SLPYMTQIATADPTSVDQTRRRVKAYKALMGDYFPVTADH
 NNIWYPSAVGTGSV LIEKRDLSGTAKEEYEKWLGIADTVQ
 LQKGRFIGDLYSYGFDPYETYVVEKDGVMYYAFYKDGSKY
 SPTGYPDIELKGLDPNKMYRIVDYVNDRVVATNLMGDNAV
 FNTRFSDYLLVKAVEISEPDPEPVPDPDYGFTSVDDRDEAL
 IYTGTHDDNNASFSEGTARYTNSTDASVVF SFTGTSIRW
 YGQRDTNFGTAEVYLDDELKTTVDANGAAEAGVCLFEALD
 LPAAEHTIKIVCKSGVIDIDRFAYEAATLEPIYEKVDALS
 DRITYVGNWEEYHNSEFYMGNAMRTDEAGAYAELTFRGTA
 VRLYAEMS FNFGTADVYLDGELVENIILYGQEATGQLMFE
 RTGLEEGEHTIRLVQNAWNINLDYISYLPEQDQPTPETT
 VTVDAMDAQLVYTG VWNDDYHDFVFEQEGTARYASSAGASVE
 FEFTGSEIRWYGQND SNFGVASVYIDNEFVQQVNVNGAAA
 VGKLLFQKADLPAGSHTIRIVCDTPVIDLDYLYTTNA

20

30

40

【0217】

配列番号9

【0218】

説明：フラボニフラクター・ブラウティガラクトサミニダーゼ（除去シグナルペプチドタンパク質配列）

AAPATDTGNAGLIAEGDYAIAGNGVRVTYDADGQTITLYR
 TEGSGLIQMSKPSPLGGPVI GGQEVQDFSHISCDVEQSTS

50

GVMGSGQRMTITTSQSMSTGLIRTYVLETSDIEEGVVYTAT
 SYEAGASDVEVSWFIGSVYELYGAE DRIWSYNGGGEGPMH
 YYDTLQKIDLTDSGKFSRENKQDDTAASIPVSDIYIADGG
 ITVGDASATRREVHTPVQETS DSAQV SIGWPGKVI AAGSV
 IEIGESFAVVHPGDYYNGLRGYKNAMDHLGVIMPAPGDIP
 DSSYDLRWESWGWGFNWTIDLIIIGKLDLQAAAGVKQITLD
 DGWYTNAAGDWALNPEKFPNGASDALRLTDAIHEHGMTALL
 WWRPCDGGIDSILYQQHPEYFVMDADGRPARLPTPGGGTN
 PSLGYALCPMADGAIASQVDFVNRAMNDWGFDFGFKGDYVW
 SMPECYNPAHNHASPEESTEKQSEIYRVSYEAMVANDPNV
 FNLLCNCGTPQDYYS LPYMTQIATADPTSVDQTRRRVKAY
 KALMGDYFPV TADHNNIWYPSAVGTGSV LIEKRDLSGTAK
 EYEKWLGIADTVQLQKGRFIGDLYSYGFDPYETYVVEKD
 GVMYYAFYKDGSKYSPTGYPDIELKGLDPNKMYRIVDYVN
 DRVVATNLMGDNAVFNTRFSDYLLVKAVEISEPDPEPVD
 PDYGF TSVDDRDEAL IYTG TWHDDNNASFSEGTARYTNSTD
 ASVVFSFTGTSIRWYGQRDTNFGTAEVYLDDELKTTVDAN
 GAAEAGVCLFEALDLPAAEHTIKIVCKSGVIDIDRFAYEA
 ATLEPIYEKVDALSDRITYVGNWEEYHNSEFYMGNAMRTD
 EAGAYAELTFRGTAVRLYAEMSFNFGTADVYLDGELVENI
 ILYGQEATGQLMFER TGLEEGEHTIRLVQNAWNINLDYIS
 YLPEQDQPTPPETT VTDAMD AQLVYTG VWNDDYHDFQE
 GTARYASSAGASVEFEFTGSEIRWYGQND SNFGVASVYID
 NEFVQQVNVNGAAAVGKLLFQKADLPAGSHTIRIVCDTPV
 IDLDYLT YTTNA

10

20

【0219】

配列番号10

【0220】

説明：Hisタグを有するフラボニフラクター・ブラウティガラクトサミニダーゼ（pET16a-タンパク質配列）

30

MGHHHHHHHHHS SGAAPATDTGNAGLIAEGDYAIAAGNGV
 RVTYDADGQTITLYRTEGSSGLIQMSKPSPLGGPVIGGQEV
 QDFSHISCDVEQSTSGVMGSGQRMTITTSQSMSTGLIRTYV
 LETSDIEEGVVYTATS YEAGASDVEVSWFIGSVYELYGAE
 DRIWSYNGGGEGPMHY YDTLQKIDLTDSGKFSRENKQDDT
 AASIPVSDIYIADGGITVGDASATRREVHTPVQETS DSAQ
 V SIGWPGKVI AAGSV IEIGESFAVVHPGDYYNGLRGYKNA
 MDHLGVIMPAPGDIPDSSYDLRWESWGWGFNWTIDLIIIGK
 LDELQAAAGVKQITLDDGWYTNAAGDWALNPEKFPNGASDAL
 RLTD A IHEHGMTALLWWRPCDGGIDSILYQQHPEYFVMDA
 DGRPARLPTPGGGTNPS LGYALCPMADGAIASQVDFVNRA
 MNDWGFDFGFKGDYVWSMPECYNPAHNHASPEESTEKQSEI
 YRVSYEAMVANDPNVFNLLCNCGTPQDYYS LPYMTQIATA
 DPTSVDQTRRRRVKAYKALMGDYFPV TADHNNIWYPSAVGT
 GSVLIEKRDLSGTAK EYEKWLGIADTVQLQKGRFIGDL
 SYGFDPYETYVVEKDGVMYYAFYKDGSKYSPTGYPDIELK
 GLDPNKMYRIVDYVNDRVVATNLMGDNAVFNTRFSDYLLV
 KAVEISEPDPEPVD PDYGF TSVDDRDEAL IYTG TWHDDNN
 ASFSEGTARYTNSTDASVVFSFTGTSIRWYGQRDTNFGTA
 EVYLDDELKTTVDANGAAEAGVCLFEALDLPAAEHTIKIV

40

50

CKSGVIDIDRFAYEAATLEPIYEKVDALSDRITYVGNWEE
 YHNSEFYMGNAMRTDEAGAYAELTFRGTAVRLYAEMSFNF
 GTADVYLDGELVENIILYGQEATGQLMFER TGLEEGEHTI
 RLVQNAWNINLDYISYLP EQDQPTPETTVTVDAMDAQLV
 YTG VWNDDYHDVFQEGTARYASSAGASVEFEFTGSEIRWY
 GQNDSNFGVASVYIDNEFVQQVNVNGAAAVGKLLFQKADL
 PAGSHTIRIVCDTPVIDLDYLYTTNA

【0221】

配列番号12

【0222】

説明：クロストリジウム・テルチウム単離タンパク質配列099345757.1-Ct
 5757(CBM(元のタンパク質配列)で連結したガラクトサミニダーゼとGalNAc
 デアセチラーゼとの融合物)

MKKRILATFITAMCGLGFFSNWTS SNAYNLIDNISVEKLD
 TDISQANENVFLNGNGIALEVDNRGATCIYLVDENGVKTK
 ATTS LDTADFSGYPIIGGQKIRDFVIISKLEENINSILG
 VGNRLTIISKSSSTNLIRKIVFETSNSNPGAIYSTVSYKA
 ESNDLLVDSFHENEY TMSLGQGPFLAYQGCADQQGANTIV
 NVTNGYNHNSGQNNYSVGV PFSYVYNSVGGIGIGDASTSR
 REFKLPIIGKDNTVSLGMEWNGQTLKKGAETAIGTSVITT
 TNGDYYSGLKSYAEVMKDKGISAPASIPDIA YDSRWESWG
 FEFDF TIEKIVNKLDELKAMGIKQITLDDGWYTYAGDWKL
 SPQKFPNGNADMKYLTDEIHKRGM TAILWWRPVDGGINSK
 LVSEHP EWF I KNSQGNMVR L PGPGGGNGGTAGYALCPNSE
 GSIQH HKDFVTVALEEWGFDGFKEDYVWGIPKCYDSSHKH
 SSLSDTLENQYKFYEA IYEQSIAINPDTFIELCNCGTPQD
 FYSTPYVN HAPTADPISR VQTRTRVKAFK AIFGDDFPVTT
 DHNSVWLP S ALGTGSVMITKHTT LSSSDREQYNKYFGLAR
 DLELAKGEFIGNLYKYGIDPLESYVIRKGED IYYSFYKDN
 SSYSGNIEIKGLDSNATYRIEDYVNNRVIARGVKGP TATI
 NTSFTDNL L VRAIPDDTPAEVTTFDVGNNTILSSTDSGNS
 KYLNAVSTTLEKTATIDSLSIYIGNNSENGKLQIAIYDDN
 NGKPGTKKAYVEEFVPTKNSWNTKKVVNSVTLPSGQYWL V
 FQPDNDVLQTKTNPSSMKQSANNPNYNYN ILPNSFPIGTG
 YNAYKGDVSFYATFKEASSQAIPQNSWALKYVDSEETTGE
 NGRATNAFDGNNNTIWHTKYSGGNAAPMPHEIQIDL RGVY
 NINQINYLPRQDGGTNGTIKDYEYVLSLDG VNWGQPI SKG
 TFESNSTEKIVKFNETKSRYVKL KALSEINN KQFTTVADL
 KVFGWEISKIEKPLQNAETYLNIP TYDGLNQSTHPDVKYF
 KNGWNGYKYWMIMTPNRTGSSVAENPSILASDDGINWEVP
 AGVTNPIAPMPQVGHNC D VDMIYNEATDELWVYWVESDDI
 TKGWVKLIKSKDGVNWS SQQVVVDNRAKYSTLSPSIIFK
 DNKY YMWSVNTGNSGWNNQSNKVELRES SDGVNWSNPTVV
 NTLA QDGSQIWHVNVEYIPSKNEYWAIYPAYKNGTGS DKT
 ELYYAKSSDGVNWT TYKNPILSKGTS GKWDDMEIYRSCFV
 YDED TNMIK V WYGA VSQNPQIWKIGFTENDYDKFIEGLTQ

【0223】

配列番号14

【0224】

説明：シグナルペプチドを除いたクロストリジウム・テルチウム5757(Ct5757

10

20

30

40

50

) 単離タンパク質配列 (識別番号 0 9 9 3 4 5 7 5 7 . 1 - C t 5 7 5 7)

Y N L I D N I S V E K L D T D I S Q A N E N V F L N G N G I A L E V D N R G A T
C I Y L V D E N G V K T K A T T S L D T A D F S G Y P I I G G Q K I R D F V I I
S K N L E E N I N S I L G V G N R L T I I S K S S S T N L I R K I V F E T S N S
N P G A I Y S T V S Y K A E S N D L L V D S F H E N E Y T M S L G Q G P F L A Y
Q G C A D Q Q G A N T I V N V T N G Y N H N S G Q N N Y S V G V P F S Y V Y N S
V G G I G I G D A S T S R R E F K L P I I G K D N T V S L G M E W N G Q T L K K
G A E T A I G T S V I T T T N G D Y Y S G L K S Y A E V M K D K G I S A P A S I
P D I A Y D S R W E S W G F E F D F T I E K I V N K L D E L K A M G I K Q I T L
D D G W Y T Y A G D W K L S P Q K F P N G N A D M K Y L T D E I H K R G M T A I
L W W R P V D G G I N S K L V S E H P E W F I K N S Q G N M V R L P G P G G G N
G G T A G Y A L C P N S E G S I Q H H K D F V T V A L E E W G F D G F K E D Y V
W G I P K C Y D S S H K H S S L S D T L E N Q Y K F Y E A I Y E Q S I A I N P D
T F I E L C N C G T P Q D F Y S T P Y V N H A P T A D P I S R V Q T R T R V K A
F K A I F G D D F P V T T D H N S V W L P S A L G T G S V M I T K H T T L S S S
D R E Q Y N K Y F G L A R D L E L A K G E F I G N L Y K Y G I D P L E S Y V I R
K G E D I Y Y S F Y K D N S S Y S G N I E I K G L D S N A T Y R I E D Y V N N R
V I A R G V K G P T A T I N T S F T D N L L V R A I P D D T P A E V T T F D V G
N N T I L S S T D S G N S K Y L N A V S T T L E K T A T I D S L S I Y I G N N S
E N G K L Q I A I Y D D N N G K P G T K K A Y V E E F V P T K N S W N T K K V V
N S V T L P S G Q Y W L V F Q P D N D V L Q T K T N P S S M K Q S A N N N P Y N
Y N I L P N S F P I G T G Y N A Y K G D V S F Y A T F K E A S S Q A I P Q N S W
A L K Y V D S E E T T G E N G R A T N A F D G N N N T I W H T K Y S G G N A A P
M P H E I Q I D L R G V Y N I N Q I N Y L P R Q D G G T N G T I K D Y E V Y L S
L D G V N W G Q P I S K G T F E S N S T E K I V K F N E T K S R Y V K L K A L S
E I N N K Q F T T V A D L K V F G W E I S K I E K P L Q N A E T Y L N I P T Y D
G L N Q S T H P D V K Y F K N G W N G Y K Y W M I M T P N R T G S S V A E N P S
I L A S D D G I N W E V P A G V T N P I A P M P Q V G H N C D V D M I Y N E A T
D E L W V Y W V E S D D I T K G W V K L I K S K D G V N W S S Q Q V V D D N R
A K Y S T L S P S I I F K D N K Y Y M W S V N T G N S G W N N Q S N K V E L R E
S S D G V N W S N P T V V N T L A Q D G S Q I W H V N V E Y I P S K N E Y W A I
Y P A Y K N G T G S D K T E L Y Y A K S S D G V N W T T Y K N P I L S K G T S G
K W D D M E I Y R S C F V Y D E D T N M I K V W Y G A V S Q N P Q I W K I G F T
E N D Y D K F I E G L T Q

10

20

30

【 0 2 2 5 】

配列番号 1 5

【 0 2 2 6 】

説明 : H i s タグおよびトロンピン切断部位を有するクロストリジウム・テルチウム 5 7
5 7 (C t 5 7 5 7) 融合タンパク質配列発現構築物 (p E T 2 8 a ベクターにおける)

M G S S H H H H H H S S G L V P R G S H Y N L I D N I S V E K L D T D I S Q A N
E N V F L N G N G I A L E V D N R G A T C I Y L V D E N G V K T K A T T S L D T
A D F S G Y P I I G G Q K I R D F V I I S K N L E E N I N S I L G V G N R L T I
I S K S S S T N L I R K I V F E T S N S N P G A I Y S T V S Y K A E S N D L L V
D S F H E N E Y T M S L G Q G P F L A Y Q G C A D Q Q G A N T I V N V T N G Y N
H N S G Q N N Y S V G V P F S Y V Y N S V G G I G I G D A S T S R R E F K L P I
I G K D N T V S L G M E W N G Q T L K K G A E T A I G T S V I T T T N G D Y Y S
G L K S Y A E V M K D K G I S A P A S I P D I A Y D S R W E S W G F E F D F T I
E K I V N K L D E L K A M G I K Q I T L D D G W Y T Y A G D W K L S P Q K F P N
G N A D M K Y L T D E I H K R G M T A I L W W R P V D G G I N S K L V S E H P E
W F I K N S Q G N M V R L P G P G G G N G G T A G Y A L C P N S E G S I Q H H K

40

50

DFVTVALEEWGFDGFKEDYVWGI PKCYDSSSHKHSSLSDTL
 ENQYKFYEAIYEQSI AINPDTFIELCNCGTPQDFYSTPYV
 NHAPTADPISRVRQTRTRVKAFKAI FGDDFPVTTDHNSVWL
 PSALGTGSVMITKHTTLLSSSDREQYNKYFGLARDLELAKG
 EFIGNLYKYGIDPLESYVIRKGEDIIYYSFYKDNSSYSGNI
 EIKGLDSNATYRIEDYVNNRVIARGVKGPTATINTSFTDN
 LLVRAIPDDTPAEVTTFDVGNNTILSSTDSGNSKYLNAV S
 TTLEKTATIDSLSIYIGNNSENGKLQIAIYDDNNGKPGTK
 KAYVEEFVPTKNSWNTKKVVNSVTLPSGQYWL VFPDNDV
 LQTKTNPSSMKQSANNPNYNYNILPNSFPIGTGYNAYKGD
 VSFYATFKEASSQAIPQNSWALKYVDSEETTGENGRATNA
 FDGNNNTIWHTKYSGGNAAPMPHEIQIDL RGVYNINQINY
 LPRQDGGTNGTIKDYEYVLSLDGVNWGQPISKGTFESNST
 EKIVKFNETKSRVVKL KALSEINN KQFTTVADLKVFGWEI
 SKIEKPLQNAETYLNIP TYDGLNQSTHPDV KYFKNGWNGY
 KYWMIMTPNRTGSSVAENPSILASDDGINWEVPAGVTNPI
 APMPQVGHNC DVDMIYNEATDELWVYWVESDDITKGWVKL
 IKSKDGVNWSSQQVVDDNRAKYSTLSPSIIFKDNKY YMW
 SVNTGNSGWNNQSNKVELRESSDGVNWSNPTVVNTLAQDG
 SQIWHVNVEYIPSKNEYWAIYPAYKNGTGSDKTELYYAKS
 SDGVNWTTYKNPILSKGTS GKWDDMEIYRSCFVYDEDTNM
 IKVWYGAVSQNPQIWKIGFTENDYDKFIEGLTQ

10

20

【0227】

配列番号17

【0228】

説明：Hisタグおよびトロンピン切断部位を有するクロストリジウム・テルチウム5757 (Ct5757) GalNAcデアセチラーゼタンパク質配列発現構築物 (pET28aベクターにおける)

MGSSSHHHHHHS SGLVPRGSHSGQYWL VFPDNDV LQTKTN
 PSSMKQSANNPNYNYNILPNSFPIGTGYNAYKGDV SFYAT
 FKEASSQAIPQNSWALKYVDSEETTGENGRATNAFDGNNN
 TIWHTKYSGGNAAPMPHEIQIDL RGVYNINQINY LPRQDG
 GTNGTIKDYEYVLSLDGVNWGQPISKGTFESNSTEKIVKF
 NETKSRVVKL KALSEINN KQFTTVADLKVFGWEISKIEKP
 LQNAETYLNIP TYDGLNQSTHPDV KYFKNGWNGYKYWMIM
 TPNRTGSSVAENPSILASDDGINWEVPAGVTNPIAPMPQV
 GHNC DVDMIYNEATDELWVYWVESDDITKGWVKLIKSKDG
 VNWSSQQVVDDNRAKYSTLSPSIIFKDNKY YMW SVNTGN
 SGWNNQSNKVELRESSDGVNWSNPTVVNTLAQDGSQIWHV
 NVEYIPSKNEYWAIYPAYKNGTGSDKTELYYAKSSDGVNW
 TTYKNPILSKGTS GKWDDMEIYRSCFVYDEDTNMIKVWYG
 AVSQNPQIWKIGFTENDYDKFIEGLTQ

30

40

【0229】

配列番号19

【0230】

説明：Hisタグおよびトロンピン切断部位を有するクロストリジウム・テルチウム5757 (Ct5757) タンパク質配列ガラクトサミニダーゼ発現構築物 (pET28aベクターにおいて)

MGSSSHHHHHHS SGLVPRGSHYNLIDNISVEKLDTDISQAN
 ENVFLNGNGIALEVDNRGATCIYLVDENGVKTKATTS LDT

50

A D F S G Y P I I G G Q K I R D F V I I S K N L E E N I N S I L G V G N R L T I
 I S K S S S T N L I R K I V F E T S N S N P G A I Y S T V S Y K A E S N D L L V
 D S F H E N E Y T M S L G Q G P F L A Y Q G C A D Q Q G A N T I V N V T N G Y N
 H N S G Q N N Y S V G V P F S Y V Y N S V G G I G I G D A S T S R R E F K L P I
 I G K D N T V S L G M E W N G Q T L K K G A E T A I G T S V I T T T N G D Y Y S
 G L K S Y A E V M K D K G I S A P A S I P D I A Y D S R W E S W G F E F D F T I
 E K I V N K L D E L K A M G I K Q I T L D D G W Y T Y A G D W K L S P Q K F P N
 G N A D M K Y L T D E I H K R G M T A I L W W R P V D G G I N S K L V S E H P E
 W F I K N S Q G N M V R L P G P G G G N G G T A G Y A L C P N S E G S I Q H H K
 D F V T V A L E E W G F D G F K E D Y V W G I P K C Y D S S H K H S S L S D T L
 E N Q Y K F Y E A I Y E Q S I A I N P D T F I E L C N C G T P Q D F Y S T P Y V
 N H A P T A D P I S R V Q T R T R V K A F K A I F G D D F P V T T D H N S V W L
 P S A L G T G S V M I T K H T T L S S S D R E Q Y N K Y F G L A R D L E L A K G
 E F I G N L Y K Y G I D P L E S Y V I R K G E D I Y Y S F Y K D N S S Y S G N I
 E I K G L D S N A T Y R I E D Y V N N R V I A R G V K G P T A T I N T S F T D N
 L L V R A I P D D T P A E V T T F D V G N N T I L S S T D S G N S K Y L N A V S
 T T L E K T A T I D S L S I Y I G N N S E N G K L Q I A I Y D D N N G K P G T K
 K A Y V E E F V P T K N S W N T K K V V N S V T L P S G Q Y W L V F Q P D N D V
 L Q T K T N P S S M K Q S A N N N P Y N Y N I L P N S F P I G T G Y N A Y K G D
 V S F Y A T F K E A S S Q A I P Q N S W A L K Y V D S E E T T G E N G R A T N A
 F D G N N N T I W H T K Y S G G N A A P M P H E I Q I D L R G V Y N I N Q I N Y
 L P R Q D G G T N G T I K D Y E V Y L S L D G V N W G Q P I S K G T F E S N S T
 E K I V K F N E T K S R Y V K L K A L S E I N N K Q F T T V A D L K V F G W E I
 S K I E K

10

20

【0231】

配列番号21

【0232】

説明：H i s タグおよびトロンピン切断部位を有するロビンソニエラ・ペオリエンシス R
 p 1 0 2 1 ガラクトサミニダーゼタンパク質発現構築物 (p E T 2 8 a ベクターにおいて)

M G S S H H H H H H H S S G L V P R G S H G N G L E V K A S P R E V A Q I T G N G
 V S V T F F Q E D G T V Q L S C I E D D G N T A F M T R N S E V S Y P V V G G E
 E V T D F S D F Q C E V Q E N V T G A A G A G S R M T I T S I S S G R G I Q R S
 V V I E T V D E V K G L L H I S S S Y R A E E E V D A D E F I D S R F S L D N P
 S D T V W S Y N G G G E G A Q S R Y D T L Q K I D L S D G E S F Y R E N L Q N Q
 T A A G I P V A D I Y G K D G G I T V G D A S V T R R Q L S T P V N E R N G T A
 Y V S V K H P G A V I T Q R E T E I S Q S F V N V H R G D Y Y S G L R G Y A D G
 M K Q I G F T T L S R E Q I P E S S Y D L R W E S W G W E F D W T V E L I I N K
 L D E L K E M G I K Q I T L D D G W Y N A A G E W G L N N W K L P N G A L D M R
 H L T D A I H E R G M T A V L W W R P C D G G R E D S A L F K E H P E Y F I K N
 Q D G S F G K L A G P G Q W N S F L G S C G Y A L C P L S E G A V Q S Q V D F I
 N R A M N E W G F D G F K S D Y V W S L P K C Y S Q D H H H E Y P E E S T E Q Q
 A V F Y R A V Y E A M T D N D P N A F H L L C N C G T P Q D Y Y S L P Y V T Q V
 P T A D P T S V D Q T R R R V K A Y K A L C G D Y F P V T T D H N E V W Y P S T
 I G T G A I L I E K R D L S G W E E E E Y A K W L K I A Q E N Q L H K G T F I G
 D L Y S Y G Y D P Y E T Y T V Y K D G I M Y Y A F Y K D G N R Y R P S G N P D I
 E L K G L E D G K L Y R I V D Y V N N Q V V A T N V T S S N A V F S Y P F S D Y
 L L V K A V E I S E P D T D G P G P V P D P E G A V T V E E N D P E L V Y T G D
 W V R E E N D G Y H G G G A R Y T K E A E A S V E L A F Y G T G A A W Y G Q H D
 V N F G S A R I Y I D G T Y V K T V S C M G E P G I N I K L F E I S G L D L A S
 H R I K I E C E T P V I D I D R L T Y I K G E E V P A K V M T A D L R A L T V I

30

40

50

ANQYDMNSFADGNYKDQLGVSLVRANQLLAADDVTQGAVN
 EEQKYL LNAMLKIRKKVDKSWIGLPGPIPQDIQTENISRDN
 NLAKVISYTGQLDRDEIIPAIKEQLNDSYDKAVSIAERQD
 ASQPEIDRAWAELMNAVQYSSYIRGSKEELLSLLDEYGVK
 DTTVYKDAALFIESLEAAKKVYQDENAMDGEISDCIKQLR
 DAKDQLQLKDPVDPKPDPPDPDPDPDPDPDPDPDPDPDP
 PDPTPDPKPNPTPTPDPTPEPALKKPEQVSGLKSKAETDY
 LTVSWKKLNNAESYKVYIYKSGKWRLAGKTTKTSIKIKKL
 VSGTKYTVKVA AVNKAGQGKYSSQVYTA AKPKKVKLKSVS
 RYRTSKVKLN YGKVKAGGYE IWMKNGKGSYKKAATSTKTT
 AIKSGLKKGKTY YFKV RAYVKNKNQVIYGSFSNIKKYKMVL
 【0233】

10

配列番号23

【0234】

説明：His タグおよびトロンピン切断部位を有する *Ruthenibacterium lactatiformans* R18755 GalNAc デアセチラーゼタンパク質配列発現構築物 (pET28aベクターにおいて)

MGSS HHHHHHS SGLVPRGSH EETDLLVNGGFETGDSTGWN
 WFNNAVVDSAA PHSGNYCAKVAKNSSYEQVVTVSPDTKYV
 LTGWAKSEGSSVMTLGVKNYGGQETF SATLSADYQQLAVT
 FTTGPNAQTATIYGYRQNSGSGAGYFDDVELTAVQDFAPY
 QPLANAIA PQA IPTYDGANQP THPSVVKFEQPWNGYLYWM
 AMTPYPFNDGSYENPSIVASNDGENWIVPEGVSNPLAGTP
 SPGHNC DVDLVYVPA SDELRMYVVEADDI ISSRVKMIS SR
 DGVHWSE PQVVMQDLVRKYSILSPSIEILPDGTYMMWYVD
 TGNAGWNSQNNQVKYRTSADGIKWSGAVTCTDFVQPGYQI
 WHIDVHYDTSSGAYYAVYPAYPNGTDCDHCNLF FAVNRTG
 KQWETF SRPILK PSTEGGWDDFCIYRSSMLIDDGMLKVWY
 GAKKQEDSSWHTGLTMRDFSEFMKILER

20

【0235】

30

配列番号25

【0236】

説明：His タグおよびトロンピン切断部位を有するロビンソニエラ・ペオリエンシス R p 3671 GalNAc デアセチラーゼタンパク質発現構築物 (pET28aベクターにおいて)

MGSS HHHHHHS SGLVPRGSHSPLSAAAESGTGTRLVKGQT
 GYLTEEQAIRNQEQTTEEREQKLTGEEETA EVLMEGTKDSG
 IVQTEEEVQTKEMQTE DAQTEEVQTEEMQTE DAQTK EVQTE
 EMQTE DAQTEEVQTK EEP AEETHMKEIQ TQGTKKASDRNG
 KARVTEILEDAQDPANRIVYLSDLQWKSENHTVDSEL PTR
 KDKSFGGKITLKV DGTVTEFDKGI GTQTDSTIVYDLEGK
 GYTKFETYVGV DYSQKENIPGEVCDVKFRVKIDDKIVSET
 GVLDPLSNAVKISVNI PDTAKTLTLYADKV TETWSDHANW
 ADAKFYQALPEPENVA FKKTVVTRKTS DNSEAPVNPDSAV
 NSSKAVDGVIDS SSYFDFGDQANS GAVRESLYMEVDLKG S
 YLLSDIQLWRYWKDGR TYAATAIVVA EDENFENA AVIYNS
 DTTGEIHHLGAGSDMLYAETESGKTF PVPENTKARYIRVY
 TYGVNGTSGVTNHIVELKV NAYVFGDEILPEK PDDSKIFP
 NAVNPLKLQGGPTNDQVTHP DVTVFDEPWNGYKYWMAYTP
 NKPGSSYFENPCIAASNDGVNWEFPAQN PVQPRYDSEIEN

40

50

QNEHNCDDIVYDPVNDRLIMYWEWAQDEAVNGKTHRSEI
 RYRVSYDGINWGVEDKTGVLMTGPTDHGCAIATEGERYS
 LSPTVVYDKTEKIYKMWANDAGDVGYENKQNNKVVYRTSQ
 DGISNWSDKTYVENFLGVNEDGLQMPWHQDIQWVEEFQE
 YWALQQAFFPAGSGPDNSSLRFSKSKDGLHWEVSEKALIT
 VGAPGTWDAGQIYRSTFWYEPGGAKGNGTFHIWYAALAE
 QSHWDIGYTSANYADAMYKLTGSRPEVEKRIEVNNENPLL
 IMPLYGKSYSSESGSTLDWGDLDVSRWKQVPEDLKENAVIE
 IHLGGKIGLNESSHTAKAFYEQQLAIAQENNI P VMMVVA
 TAGQQNYWTGTANLDAEWIDRMFKQHSVLKGI MSTENYWT
 DYNKVATMGADYLRVAAENGGYFVWSEHQEGVIENVIANE
 KFNEALKLYGNFI FTWKNTPAGTNSNAGTASYMQGLWLT
 GICAQWGG LADTWKWEKGFGLFDGQYSYNP GGEEARPV
 ATEPEALLGIEMMSIYTNGGC VYNFEHPAYVYGSYNQNSP
 CFENVIAEFMRYAIKNPAPGKEEVLADTKAVFYGKLSLKLK
 SAGNLLQKGLNWEDATLPTQT TGRYGLIPAVPEAVDEKTV
 KAVFGDIEILNQSSAQLANKDAKKAYFEEKYPEQYTGTA
 F GQLLNDTWYLYNSNVNVDG VQNAKLPLEGNKSV DITMTPH
 TYVILDDQDGE LQIKLNNYRVDKDSI WEGYGT T V TDRWDT
 DHNTK LQDWIRDEYIPNPDDDTFRD TTFELVGLESEPEVN
 VTNGLK DQYQEPVVEYDAAAGTAMITVSGNGWVDLTIDTN
 TAEVPQVDKAKLNSKIAEAKGIRQGN YTD ESYKALQEEIG
 KSQAVSNKTDATQEEVNAQLSRLES A IARLKEKPAVVS
 K T ALNAKIAEAKGIRQGN YTD ESYKALQNAIVKAQEL
 SNKTD ATQQQVNDLVSAL TNAIKNLKIDADKLA AESAK
 KVA AVKV AVKAVSYKSKEIKLSWKT VADADGYVIRV
 KT GKKWSTEKT IKNNRIITYTYKKGTPGKKYVFEV
 KAFKKVNGKTTYSKYK TATKKVVPQTVTAKAKAS
 KNNVVVKWNKVSGASGYVVMKK KGKTWVKA AQVNA
 KKL YFTDKKVKKGKVYSYKV KAYKVYK GKKVYGS
 YSKSVNVKTKS

10

20

30

【0237】

配列番号27

【0238】

説明：Hisタグおよびトロンピン切断部位を有するロピンソニエラ・ペオリエンシスR
 p 3672GalNAcデアセチラーゼタンパク質発現構築物（pET28aベクター
 において）

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHAETATEENAALEKTVTLHK
 SDGTELPEDYRNPQRPATMAVDGIIDDTGEYNYCDFGKDG
 D KAALYMQVDLGGLYDLSRVNMWRYWKDSRTYDATVIT
 TSE SGDF TDEAVIYNSDRSNVHGF GAGGDERYAETAS
 GHEFPV PDGTKAQA VRVYVFGSQNGTTNHINELQVW
 GTPHTENPDV NSYQVTIPQGNQYQVIPYENDPTTVEE
 GGSFRFQVLIDSD NGYSATS AVKANGV SLEAVDSVY
 TIENTEDQVITIEGVH KAQYEVKFPENPQGY SVEIQ
 NEGSTTVDYNGSVSFKLIID EAYNESVPVVKANGGA
 ALGKDELGVYTIANIQDDITV TVE GIQENTVVKT
 KTMYLSDMDWKS AANAVGATGEKDTPTKDL NHLQ
 QMKLLVNGAEKSF DKGIGVQTDSSIVYDLEDKGYT
 SFHTLAGVDYSAMEYVDGEGCDIQFKVYLLDDVVV
 FDSGVV DASDEAQEVNVAITSENKELKLEAKMVKE
 PYNDWGNWADAS FEMAYPEPSNVALNKTVTVKKT
 ADNSDSEVNSSRPGSMA

40

50

VDGIIGPTSDSNYCDFGGQDGDNTSRYLQVDLGDVYELTQI
 NMFYRWADGRVYNGTVIAVSENADFSNPTFIYNSDKADKH
 GLGAGSDDTYGETQSGKLFEPAGTMGQYVRVYMAGSNKG
 TTNHIAELQVMGYNFNTEPKPYEANAFAEVEYLDMPTHF
 QDLDSNKNDDGSLKHIGGQVTHPDIQVFDQPWNGYKYWMI
 YTPNTMITSQYENPYIVASEDGGQTVVEPEGISNPIEPEPP
 STRFHNCADADLLYDSVNDRLLAYWNWADDGGGIDDELKDQ
 NCQIRLRISYDGINWGVYPYDKDGNIAATTADTVVRMETGDK
 DFIPAISEKDRYGMLSPTFTYDDFRGIYTMWAQNSGDAGY
 NQSGKFIEMRWS EDGINWSE P QKVNNFLGKDENG RQLWPW
 HQDIQYIPELQEYWGLSQC FSTSNPDG SVLYLTKSRDGVN
 WEQAGTQPVL RAGKSGTWD DFQIYRSTFY YDNQSDSPTGG
 KFRIWYSALQANTS GKTV LAPDGTVSLQVGSQDTRIWRIG
 YTENDYMEVMKAL TQNKNYEEPELVD AVSLNLSMDKTSIS
 VGEEATVSTAFVPENATDRIVKYTSQDPEIAVIDPTGIVT
 GVKDGT TTI VAETKSGAKGELSVTVGELQRGEIRFEVSND
 HPMYLENYYSWSD DAPKKDGLDANKNY YGDERVDS PVMLYN
 TVPEELKDNTVILLIAERS LNSTD AVRDWIKKNVELCNEN
 KIPCAVQIANGETNVNTTIPLSFWNELATNNEYLVGFNA
 EMYNRFAGDNRSYVMDMIRLGVSHGVCMMWTD TNIFGTNG
 VLYDWLTQDEKLSGLMREYKEYISLMTKESYGSEAAANTDA
 LFKGLWMTDYCENWG IASDWWHWQLDSNGALFDAGSGGDA
 WKQCLTWPENMYTQD VVRAVSQGATCFKSEAQWYSNATKG
 MRTPTYQYSMIPFLEKLVSK E VKIPTKEEMLERTKAI VVG
 AENWNNFN YNTTYSNLYPSTGQYGI VPYVPSNCP EEELAG
 YDLVVREN LGKAGLKSALDTVYPVQKSEGTAYCETFGDTW
 YWMNSS EDKNVSQYTEFTTAINGAESVKIAGEPHVFGIIK
 ENPGSLNVYLSNYRLDKTELDWGTIPGGLSDQGCYNYVWQ
 MCERMKNGTGLDTQLRDTVITVKNAVEPKVNFVTE SPADR
 SFAEDNYVRPYKYTV AQKEGTTDEWVITVSHNGIVEFNIV
 TGDEKVPATSVELSTDKVDVIRNR TAVVKATVLPQNAGNK
 QLTWTIADPEIASVDNKGTVTGLKEGKTVLRAAISG SVYK
 ECEVNVIDRKVTEVN LNKTELSLSAGDS AKLEASIAPEDP
 SDSSITWTSTNENVATVASNGTVTAHKAGVAQIIAQSA YQ
 AKGIATVTVNYAASVKLDR TGMTATANSEQSKSGGEGPAS
 NVLDGKQDTMWHTSWTDKPELHPHWIKIDLNGTKTINKFA
 YTPRTGASNGTIYNYVLIITDLEGN EKQVAKGVWAANADV
 KYAEFD AVEATAIKLQVDGND DKASKGGYGSAAEINIFEV
 AQKPSANELAENIKVIA PVKAEDTKVSIPVITGFDIVISN
 SSNPDVIGIDG SITRPENDTVVTLTLKVKETDAKSVKAAG
 TEATTNV DVLVTGKTSDVEAESVTL DQTSADLTVGGELL
 LNAVVKPDIATNKAVTWS SDKPGTATVENGRVKALAA GEA
 RITAATANGKTADCVINVKEKEEPEVILPAEVRLNIPSAE
 FTVGDQIQLTASVLPANAADKTITWKS DKPEVATVANGWV
 KGIAAGTAKITATS VNGKTAVCVITVKAQPQNLPTGVS LN
 KKTASVKLNKTLTLSAVVQPSNADNKTVKWTSDNTYVATV
 ENGVVKAVNAGTARITAATVNGHKATCTITVPGTKISKAK
 VSLASSKTHTGKALKPSVKVTY GKNLTKKNTDYTVSYKNN
 INPGTASVTITGKGKYYGTINKTF AIKAAEGKTYTVGK GK
 YKVTDASAKNKTVTFMAPVKKTYSSFSVPSKVKI GNDTYK

10

20

30

40

50

VTAVAKNAFKKNTKLTKLTIGSNVKTIGSYAFYGASQLKT
LTLKTTGLNSVGKNAFKKTNAKLTVKVPKSKLADYKLLK
GKGLSGKAKIQK

【0239】

配列番号29

【0240】

説明：Hisタグおよびトロンピン切断部位を有するロビンソニエラ・ペオリエンシスRp 3671GalNAcデアセチラーゼタンパク質Rp3671__発現構築物(pET28aベクターにおいて)

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHSPLSAAAESGTGTRLVKGQT
GYLTEEQAIRNQEQTTEEREQKLTGEETAEVLMEGTKDSG
IVQTEEVQTKEMQTEDAQTEEVQTEEMQTEDAQTKVQTE
EMQTEDAQTEEVQTKEEPAAETHMKEIQTQGTKKASDRNG
KARVTEILEDAPANRIVYLSDLQWKSENHTVDSLEPTR
KDKSFGGGKITLKV DGTVTEFDKGI GTQTDSTIVYDLEGK
GYTKFETYVGV DYSQKENIPGEVCDVKFRVKIDDKIVSET
GVL DPLSNAVKISVNI PDTAKTLTLYADKVTETWSDHANW
ADAKFYQALPEPENVAFAFKKT VVTRKTS DNSEAPVNPDSAV
NSSKAVDGVIDS SSYFDFGDQANS GAVRESLYMEVDLKG S
YLLSDIQLWRYWKDGR TYAATAIVVAEDENFENA AVIYNS
DTTGEIHHLGAGSDMLYAETESGKTFPVPENTKARYIRVY
TYGVNGTSGVTNHIVELKVNA YVFGDEILPEK PDDSKIFP
NAVNPLKLQGGP GTNDQVTHP DVTVFDEPWNGYKYWMAYTP
NKP GSSYFENPCIAASNDGVNWEFPAQNPVQPRYDSEIEN
QNEHNC DTDIVYDPVNDRLIMYWEWAQDEAVNGKTHRSEI
R YRVS YDGINWGV EDK TGV LMTGPTDHGCAIATEGERYS D
LSPTVVYDKTEKIYKMWANDAGDVGYENKQNNKVWYRTSQ
DGISNWSDKTYVENFLGVNEDGLQMPWHQDIQWVEEFQE
YWALQQA FPA GSGPDNSSLRFSKSKDGLHWE PVSEKALIT
VGAPGTWDAGQIYRSTFWYEPGGAKGNGTFHIWYAAALAE G
QSHWDIGYTSANYADAMYKLTGSR

10

20

30

【0241】

配列番号31

【0242】

説明：Hisタグおよびトロンピン切断部位を有するロビンソニエラ・ペオリエンシスRp 3672__GalNAcデアセチラーゼ__タンパク質発現構築物(pET28aベクターにおいて)

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHAETATEENAALEKTVTLHKS
DGTELPEDYRNPQR PATMAVDGIIDDTGEYNYCDFGKDG D
KAALYMQVDLGGLYDLSRVNMWRYWKDSRTYDATVIT TSE
SGDFTDEAVIYNSDRSNVHGF GAGGDERYAETASGHEFPV
PDGTKAQA VRVYVFGS QNGTTNHINELQVWGTPHTENPDV
NSYQVTIPQGN GYQVIPYENDPTTVEEGGSFRFQVLIDSD
NGYSATS AVKANGV SLEAVDSVYTTIENIT EDQVITIEGVH
KAQYEVKFPENPQGY SVEIQNEGSTTVDYNGSVSFKLIID
EAYNESVPVVKANGGAALGKDELGVYTIANI QDDITV TVE
GIQENTVVKTKTMYLS DMDWKS AANAVGATGEKDTPTKDL
NHLQQQM KLLVNGAEKSF DKGIGVQTDSSIVYDLEDKGYT
SFHTLAGVDYSAMEYVDGEGCDIQFKVYLDDVVVFD SGVV
DASDEAQEVNVAITSENKELKLEAKMVKEPYNDWGNWADA

40

50

S F E M A Y P E P S N V A L N K T V T V K K T A D N S D S E V N S S R P G S M A
V D G I I G P T S D S N Y C D F G Q D G D N T S R Y L Q V D L G D V Y E L T Q I
N M F R Y W A D G R V Y N G T V I A V S E N A D F S N P T F I Y N S D K A D K H
G L G A G S D D T Y G E T Q S G K L F E V P A G T M G Q Y V R V Y M A G S N K G
T T N H I A E L Q V M G Y N F N T E P K P Y E A N A F E N A E V Y L D M P T H F
Q D L D S N K N D D G S L K H I G G Q V T H P D I Q V F D Q P W N G Y K Y W M I
Y T P N T M I T S Q Y E N P Y I V A S E D G Q T W V E P E G I S N P I E P E P P
S T R F H N C D A D L L Y D S V N D R L L A Y W N W A D D G G G I D D E L K D Q
N C Q I R L R I S Y D G I N W G V P Y D K D G N I A T T A D T V V R M E T G D K
D F I P A I S E K D R Y G M L S P T F T Y D D F R G I Y T M W A Q N S G D A G Y
N Q S G K F I E M R W S E D G I N W S E P Q K V N N F L G K D E N G R Q L W P W
H Q D I Q Y I P E L Q E Y W G L S Q C F S T S N P D G S V L Y L T K S R D G V N
W E Q A G T Q P V L R A G K S G T W D D F Q I Y R S T F Y Y D N Q S D S P T G G
K F R I W Y S A L Q A N T S G K T V L A P D G T V S L Q V G S Q D T R I W R I G
Y T E N D Y M E V M K A L T Q N K N Y E E

10

【0243】

配列番号32

【0244】

説明：クロストリジウム・テルチウム5757 (Ct5757) GalNAcデアセチラ
ーゼタンパク質配列

20

H S G Q Y W L V F Q P D N D V L Q T K T N P S S M K Q S A N N N P Y N Y N I L P
N S F P I G T G Y N A Y K G D V S F Y A T F K E A S S Q A I P Q N S W A L K Y V
D S E E T T G E N G R A T N A F D G N N N T I W H T K Y S G G N A A P M P H E I
Q I D L R G V Y N I N Q I N Y L P R Q D G G T N G T I K D Y E V Y L S L D G V N
W G Q P I S K G T F E S N S T E K I V K F N E T K S R Y V K L K A L S E I N N K
Q F T T V A D L K V F G W E I S K I E K P L Q N A E T Y L N I P T Y D G L N Q S
T H P D V K Y F K N G W N G Y K Y W M I M T P N R T G S S V A E N P S I L A S D
D G I N W E V P A G V T N P I A P M P Q V G H N C D V D M I Y N E A T D E L W V
Y W V E S D D I T K G W V K L I K S K D G V N W S S Q Q V V V D D N R A K Y S T
L S P S I I F K D N K Y Y M W S V N T G N S G W N N Q S N K V E L R E S S D G V
N W S N P T V V N T L A Q D G S Q I W H V N V E Y I P S K N E Y W A I Y P A Y K
N G T G S D K T E L Y Y A K S S D G V N W T T Y K N P I L S K G T S G K W D D M
E I Y R S C F V Y D E D T N M I K V W Y G A V S Q N P Q I W K I G F T E N D Y D
K F I E G L T Q

30

【0245】

配列番号33

【0246】

説明：Ruthenibacterium lactatiformans R18755
GalNAcデアセチラーゼタンパク質配列

40

H E E T D L L V N G G F E T G D S T G W N W F N N A V V D S A A P H S G N Y C A
K V A K N S S Y E Q V V T V S P D T K Y V L T G W A K S E G S S V M T L G V K N
Y G G Q E T F S A T L S A D Y Q Q L A V T F T T G P N A Q T A T I Y G Y R Q N S
G S G A G Y F D D V E L T A V Q D F A P Y Q P L A N A I A P Q A I P T Y D G A N
Q P T H P S V V K F E Q P W N G Y L Y W M A M T P Y P F N D G S Y E N P S I V A
S N D G E N W I V P E G V S N P L A G T P S P G H N C D V D L V Y V P A S D E L
R M Y Y V E A D D I I S S R V K M I S S R D G V H W S E P Q V V M Q D L V R K Y
S I L S P S I E I L P D G T Y M M W Y V D T G N A G W N S Q N N Q V K Y R T S A
D G I K W S G A V T C T D F V Q P G Y Q I W H I D V H Y D T S S G A Y Y A V Y P
A Y P N G T D C D H C N L F F A V N R T G K Q W E T F S R P I L K P S T E G G W
D D F C I Y R S S M L I D D G M L K V W Y G A K K Q E D S S W H T G L T M R D F

50

SEFMKILER

【0247】

配列番号34

【0248】

説明：ロビンソニエラ・ペオリエンシスRp3671GalNAcデアセチラーゼタンパク質

H S P L S A A A E S G T G T R L V K G Q T G Y L T E E Q A I R N Q E Q T T E E R
 E Q K L T G E E T A E V L M E G T K D S G I V Q T E E V Q T K E M Q T E D A Q T
 E E V Q T E E M Q T E D A Q T K E V Q T E E M Q T E D A Q T E E V Q T K E E P A
 E E T H M K E I Q T Q G T K K A S D R N G K A R V T E I L E D A Q D P A N R I V
 Y L S D L Q W K S E N H T V D S E L P T R K D K S F G G G K I T L K V D G T V T
 E F D K G I G T Q T D S T I V Y D L E G K G Y T K F E T Y V G V D Y S Q K E N I
 P G E V C D V K F R V K I D D K I V S E T G V L D P L S N A V K I S V N I P D T
 A K T L T L Y A D K V T E T W S D H A N W A D A K F Y Q A L P E P E N V A F K K
 T V V T R K T S D N S E A P V N P D S A V N S S K A V D G V I D S S S Y F D F G
 D Q A N S G A V R E S L Y M E V D L K G S Y L L S D I Q L W R Y W K D G R T Y A
 A T A I V V A E D E N F E N A A V I Y N S D T T G E I H H L G A G S D M L Y A E
 T E S G K T F P V P E N T K A R Y I R V Y T Y G V N G T S G V T N H I V E L K V
 N A Y V F G D E I L P E K P D D S K I F P N A V N P L K L Q G P G T N D Q V T H
 P D V T V F D E P W N G Y K Y W M A Y T P N K P G S S Y F E N P C I A A S N D G
 V N W E F P A Q N P V Q P R Y D S E I E N Q N E H N C D T D I V Y D P V N D R L
 I M Y W E W A Q D E A V N G K T H R S E I R Y R V S Y D G I N W G V E D K T G V
 L M T G P T D H G C A I A T E G E R Y S D L S P T V V Y D K T E K I Y K M W A N
 D A G D V G Y E N K Q N N K V W Y R T S Q D G I S N W S D K T Y V E N F L G V N
 E D G L Q M Y P W H Q D I Q W V E E F Q E Y W A L Q Q A F P A G S G P D N S S L
 R F S K S K D G L H W E P V S E K A L I T V G A P G T W D A G Q I Y R S T F W Y
 E P G G A K G N G T F H I W Y A A L A E G Q S H W D I G Y T S A N Y A D A M Y K
 L T G S R

10

20

【0249】

配列番号35

【0250】

説明：ロビンソニエラ・ペオリエンシスRp3672__GalNAcデアセチラーゼ__タンパク質

H A E T A T E E N A A L E K T V T L H K S D G T E L P E D Y R N P Q R P A T M A
 V D G I I D D T G E Y N Y C D F G K D G D K A A L Y M Q V D L G G L Y D L S R V
 N M W R Y W K D S R T Y D A T V I T T S E S G D F T D E A V I Y N S D R S N V H
 G F G A G G D E R Y A E T A S G H E F P V P D G T K A Q A V R V Y V F G S Q N G
 T T N H I N E L Q V W G T P H T E N P D V N S Y Q V T I P Q G N G Y Q V I P Y E
 N D P T T V E E G G S F R F Q V L I D S D N G Y S A T S A V K A N G V S L E A V
 D S V Y T I E N I T E D Q V I T I E G V H K A Q Y E V K F P E N P Q G Y S V E I
 Q N E G S T T V D Y N G S V S F K L I I D E A Y N E S V P V V K A N G G A A L G
 K D E L G V Y T I A N I Q D D I T V T V E G I Q E N T V V K T K T M Y L S D M D
 W K S A A N A V G A T G E K D T P T K D L N H L Q Q Q M K L L V N G A E K S F D
 K G I G V Q T D S S I V Y D L E D K G Y T S F H T L A G V D Y S A M E Y V D G E
 G C D I Q F K V Y L D D V V V F D S G V V D A S D E A Q E V N V A I T S E N K E
 L K L E A K M V K E P Y N D W G N W A D A S F E M A Y P E P S N V A L N K T V T
 V K K T A D N S D S E V N S S R P G S M A V D G I I G P T S D S N Y C D F G Q D
 G D N T S R Y L Q V D L G D V Y E L T Q I N M F R Y W A D G R V Y N G T V I A V
 S E N A D F S N P T F I Y N S D K A D K H G L G A G S D D T Y G E T Q S G K L F
 E V P A G T M G Q Y V R V Y M A G S N K G T T N H I A E L Q V M G Y N F N T E P

30

40

50

K P Y E A N A F E N A E V Y L D M P T H F Q D L D S N K N D D G S L K H I G G Q
V T H P D I Q V F D Q P W N G Y K Y W M I Y T P N T M I T S Q Y E N P Y I V A S
E D G Q T W V E P E G I S N P I E P E P P S T R F H N C D A D L L Y D S V N D R
L L A Y W N W A D D G G G I D D E L K D Q N C Q I R L R I S Y D G I N W G V P Y
D K D G N I A T T A D T V V R M E T G D K D F I P A I S E K D R Y G M L S P T F
T Y D D F R G I Y T M W A Q N S G D A G Y N Q S G K F I E M R W S E D G I N W S
E P Q K V N N F L G K D E N G R Q L W P W H Q D I Q Y I P E L Q E Y W G L S Q C
F S T S N P D G S V L Y L T K S R D G V N W E Q A G T Q P V L R A G K S G T W D
D F Q I Y R S T F Y Y D N Q S D S P T G G K F R I W Y S A L Q A N T S G K T V L
A P D G T V S L Q V G S Q D T R I W R I G Y T E N D Y M E V M K A L T Q N K N Y
E E

10

【0251】

配列番号36

【0252】

説明：クロストリジウム・テルチウム5757 (Ct5757) ガラクトサミニダーゼタンパク質配列

H Y N L I D N I S V E K L D T D I S Q A N E N V F L N G N G I A L E V D N R G A
T C I Y L V D E N G V K T K A T T S L D T A D F S G Y P I I G G Q K I R D F V I
I S K N L E E N I N S I L G V G N R L T I I S K S S S T N L I R K I V F E T S N
S N P G A I Y S T V S Y K A E S N D L L V D S F H E N E Y T M S L G Q G P F L A
Y Q G C A D Q Q G A N T I V N V T N G Y N H N S G Q N N Y S V G V P F S Y V Y N
S V G G I G I G D A S T S R R E F K L P I I G K D N T V S L G M E W N G Q T L K
K G A E T A I G T S V I T T T N G D Y Y S G L K S Y A E V M K D K G I S A P A S
I P D I A Y D S R W E S W G F E F D F T I E K I V N K L D E L K A M G I K Q I T
L D D G W Y T Y A G D W K L S P Q K F P N G N A D M K Y L T D E I H K R G M T A
I L W W R P V D G G I N S K L V S E H P E W F I K N S Q G N M V R L P G P G G G
N G G T A G Y A L C P N S E G S I Q H H K D F V T V A L E E W G F D G F K E D Y
V W G I P K C Y D S S H K H S S L S D T L E N Q Y K F Y E A I Y E Q S I A I N P
D T F I E L C N C G T P Q D F Y S T P Y V N H A P T A D P I S R V Q T R T R V K
A F K A I F G D D F P V T T D H N S V W L P S A L G T G S V M I T K H T T L S S
S D R E Q Y N K Y F G L A R D L E L A K G E F I G N L Y K Y G I D P L E S Y V I
R K G E D I Y Y S F Y K D N S S Y S G N I E I K G L D S N A T Y R I E D Y V N N
R V I A R G V K G P T A T I N T S F T D N L L V R A I P D D T P A E V T T F D V
G N N T I L S S T D S G N S K Y L N A V S T T L E K T A T I D S L S I Y I G N N
S E N G K L Q I A I Y D D N N G K P G T K K A Y V E E F V P T K N S W N T K K V
V N S V T L P S G Q Y W L V F Q P D N D V L Q T K T N P S S M K Q S A N N N P Y
N Y N I L P N S F P I G T G Y N A Y K G D V S F Y A T F K E A S S Q A I P Q N S
W A L K Y V D S E E T T G E N G R A T N A F D G N N N T I W H T K Y S G G N A A
P M P H E I Q I D L R G V Y N I N Q I N Y L P R Q D G G T N G T I K D Y E V Y L
S L D G V N W G Q P I S K G T F E S N S T E K I V K F N E T K S R Y V K L K A L
S E I N N K Q F T T V A D L K V F G W E I S K I E K

20

30

40

【0253】

配列番号37

【0254】

説明：ロビンソニエラ・ペオリエンシスRp1021ガラクトサミニダーゼタンパク質配列

H G N G L E V K A S P R E V A Q I T G N G V S V T F F Q E D G T V Q L S C I E D
D G N T A F M T R N S E V S Y P V V G G E E V T D F S D F Q C E V Q E N V T G A
A G A G S R M T I T S I S S G R G I Q R S V V I E T V D E V K G L L H I S S S Y
R A E E E V D A D E F I D S R F S L D N P S D T V W S Y N G G G E G A Q S R Y D
T L Q K I D L S D G E S F Y R E N L Q N Q T A A G I P V A D I Y G K D G G I T V

50

GDASVTRRQLSTPVNERNGTAYVSVKHPGAVITQRETEIS
 QSFVNVHRGDYYSGLRGYADGMKQIGFTTLSREQIPESY
 DLRWESWGWEFDWTVELIINKLDELKEMGIKQITLDDGWY
 NAAGEWGLNNWKL PNGALDMRHLLTDAIHERGMTAVLWWRP
 CDGGREDSALFKEHPEYFIKNQDGSFGKLAGPGQWNSFLG
 SCGYALCPLSEGA VQSQVDFINRAMNEWGFDGFKSDYVWS
 LPKCYSDHHHEYPEESTEQQAVFYRAVYEAMTDNDPNAF
 HLLCNCGTPQDYYS LPYVTQVPTADPTSVDQTRRRVKAYK
 ALCGDYFPVTTDHNEVWYPSTIGTGAILIEKRDL SGWEEE
 EYAKWLKIAQENQLHKGTFIGDLYSYGYDPYETYTVYKDG
 IMYYAFYKDGNRYPSPGNPDIELKGLE DGKLYRIVDYVNN
 QVVATNVTSSNAVFSYPFSDYLLVKAVEISEPDTDGP GPV
 PDPEGAVTVEENDPELVYTG DWVREENDGYHGGGARYTKE
 AEASVELAFYGTGA AWYGHQHDVNFSGSARIYIDGTYVKTVS
 CMGEPGINIKLFEISGLDLASHRIKIECETPVIDIDRLTY
 IKGEEVPAKVM TADLRALTVIANQYDMNSFADGNYKDQLG
 VSLVRANQLLAADDVTQGAVNEEQKYL LNAMLKIRKKVVK
 SWIGLPGPIPQDIQTENISRDNLAKVISYTGQLDRDEIIP
 AIKEQLNDSYDKAVSIAERQDASQPEIDRAWAELMNAVQY
 SSIYIRGSKEELLSLLDEY GKVDTTVYKDAALFIESLEAAK
 KVVYQDENAMDGEISDCIKQLRDAKDQLQLKDPVDPK PDP
 DPDPKPDPTPDPGDPKPDPTPDPTPDPKPNPTPTPDPTP
 EPALKKPEQVSGLKSKAETDYLT VSWKKLNNAESYKVYIY
 KSGKWRLAGKTTKTSIKIKKLVSGTKYTVKVA AVNKAGQG
 KYSSQVYTAAPKPKVKLKS VSRYSRTSKVKLNYGKVKAGGY
 EIWMKNGKGSYKKAATSTKT TAIKSGLKKGKTY YFKV RAY
 VKNKNQVIYGSFSNIKKYKMVL

10

20

【0255】

<参考文献>

Kuznetsova, I.M et al. Int J Mol Sci. (2014) 30
 "What Macromolecular Crowding Can Do to a
 Protein" 15(12):23090-23140.
 Marcus, D.M. et al. Biochem (1964) "Immuno
 chemical Studies on Blood Groups. XXXI. De
 struction of Blood Group A Activity by an
 Enzyme from Clostridium tertium Which Dea
 cetylates N-Acetylgalactosamine in Intact
 Blood Group Substances" (4)437-443.
 Daniels, G. and Reid M.E. Transfusion (201
 0) "Blood groups: the past 50 years." 50(2) 40
 :281-9. doi:10.1111/j.1537-2995.2009.024
 56.x. Epub 2009 Nov 9
 Vox Sang. 2011 Nov;101(4):327-32. doi:10.
 1111/j.1423-0410.2011.01540.x. Epub 2011
 Sep 6.
 Garratty, G. Vox Sang. (2008) "Modulating t
 he red cell membrane to produce universal/
 stealth donor red cells suitable for trans
 fusion." 94(2):87-95. Epub 2007 Nov 22.
 Goldstein et al. Science (1982) "Group B e 50

rythrocytes enzymatically converted to group O survive normally in A, B, and O individuals." 215(4529):168-70.

US4609627; and CA2272925

Kruskall M.S. et al. Transfusion (2000) "Transfusion to blood group A and O patients of group B RBCs that have been enzymatically converted to group O." 40(11):1290-8.

Clausen, H and Hakomori, S. Vox Sang. (1989) "ABH and related histo-blood group antigens; immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution." 56(1):1-20.

10

EP2243793

Liu, Q.P. et al. J Biol Chem. (2008) "Identification of a GH110 subfamily of alpha 1,3-galactosidases: novel enzymes for removal of the alpha 3Gal xenotransplantation antigen." 283(13):8545-54. doi:10.1074/jbc.M709020200. Epub 2008 Jan 28.

20

PCT/US1992/010113; and PCT/SE2015/050108
US4088538; US4141857; US4206259; US4218363; US4229536; US4239854; US4619897; US4748121; US4749653; US4897352; US4954444; US4978619; US5154808; US5914367; US5962279; US6030933; US6291582; US6254645; US10,016,490; and US10,041,055

Jeong, J.K. et al. J Bacteriol. (2009) "Characterization of the Streptococcus pneumoniae BgaC protein as a novel surface beta-galactosidase with specific hydrolysis activity for the Galbeta1-3GlcNAc moiety of oligosaccharides." 191(9):3011-23. doi:10.1128/JB.01601-08. Epub 2009 Mar 6.

30

Singh, A.K. et al. PLoS Pathog. (2014) "Unravelling the multiple functions of the architecturally intricate Streptococcus pneumoniae -galactosidase, BgaA." 10(9):e1004364. doi:10.1371/journal.ppat.1004364. eCollection 2014 Sep.

40

Katayarna, T. et al. J Bacteriol. (2004) "Molecular cloning and characterization of Bifidobacterium bifidum 1,2-alpha-L-fucosidase (AfcA), a novel inverting glycosidase (glycoside hydrolase family 95)." 186(15):4885-93.

Williams, S.J. et al. J Biol Chem. (2002) "Aspartate 313 in the Streptomyces plicatus hexosaminidase plays a critical role in substrate-assisted catalysis by orienting t

50

- he 2-acetamido group and stabilizing the transition state." 277(42):40055-65. Epub 2002 Aug 8.
- Bolger, A.M. et al. *Bioinformatics*. (2014) "Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data." 30(15):2114-20. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170. Epub 2014 Apr 1.
Li 2013
- Treangen, T.J. et al. *Curr Protoc Bioinformatics* (2011) "Next generation sequence assembly with AMOS." Chapter 11:Unit 11.8. doi: 10.1002/0471250953.bi1108s33. 10
- Hyatt, D. et al. *BMC Bioinformatics*. (2010) "Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification." 11:119. doi:10.1186/1471-2105-11-119.
- Konwar, K.M. et al. *Bioinformatics*. (2015) "MetaPathways v2.5: quantitative functional, taxonomic and usability improvements." 31(20):3345-7. doi:10.1093/bioinformatics/btv361. Epub 2015 Jun 15. 20
- Studier, F.W. *Protein Expr Purif*. (2005) "Protein production by auto-induction in high density shaking cultures." 41(1):207-34.
- Palmier M.O. and Van Doren S.R. *Anal Biochem*. (2007) "Rapid determination of enzyme kinetics from fluorescence: overcoming the inner filter effect." 371(1):43-51. Epub 2007 Jul 18. 30
- Kabsch, W. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. (2010) "XDS" 66(Pt 2):125-32. doi: 10.1107/S0907444909047337. Epub 2010 Jan 22.
- Evans, P.R. and Murshudov, G.N. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. (2013) "How good are my data and what is the resolution?" 69(Pt 7):1204-14. doi: 10.1107/S0907444913000061. Epub 2013 Jun 13.
- Skubak, P. and Pannu, N.S. *Nat Commun*. (2013) "Automatic protein structure solution from weak X-ray data." 4:2777. doi: 10.1038/ncomms3777. 40
- Potterton, L. et al. *Acta Crystallogr D Struct Biol*. (2018) "CCP4i2: the new graphical user interface to the CCP4 program suite." 74(Pt 2):68-84. doi: 10.1107/S2059798317016035. Epub 2018 Feb 1.
- Emsley, P. and Cowtan, K. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. (2004) "Coot: model-bui 50

- lding tools for molecular graphics." 60 (Pt 12 Pt 1): 2126-32. Epub 2004 Nov 26.
- Vagin, A.A. et al. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. (2004) "REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use." 60 (Pt 12 Pt 1): 2184-95. Epub 2004 Nov 26.
- Chen, V.B. et al. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. (2010) "MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography." 66 (Pt 1): 12-21. doi: 10.1107/S0907444909042073. Epub 2009 Dec 21. Zhang 2004
- Vocadlo, D.J. et al. Biochemistry. (2002) "A case for reverse protonation: identification of Glu160 as an acid/base catalyst in Thermoanaerobacterium saccharolyticum beta-xylosidase and detailed kinetic analysis of a site-directed mutant." 41 (31): 9736-46.
- Jones, D.R. et al. Biotechnol Biofuels. (2018) "SACCHARIS: an automated pipeline to streamline discovery of carbohydrate active enzyme activities within polyspecific families and de novo sequence datasets." 11: 27. doi: 10.1186/s13068-018-1027-x. eCollection 2018.
- Yin, Y. et al. Nucleic Acids Res. (2012) "dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation." 40 (Web Server issue): W445-51. doi: 10.1093/nar/gks479. Epub 2012 May 29.
- Edgar, R.C. Bioinformatics. (2010) "Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST." 26 (19): 2460-1. doi: 10.1093/bioinformatics/btq461. Epub 2010 Aug 12.
- Stamatakis, A. Bioinformatics. (2006) "RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models." 22: 2688-2690. doi: 10.1093/bioinformatics/btl446.
- Stamatakis, A. and Ott, M. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. (2008) "Efficient computation of the phylogenetic likelihood function on multi-gene alignments and multi-core architectures." 363 (1512): 3977-84. doi: 10.1098/rstb.2008.0163.
- Eddy, S.R. Bioinformatics. (1998) "Profile hidden Markov models." 14 (9): 755-63. Review.
- Capella-Gutierrez, S. et al. Bioinformati

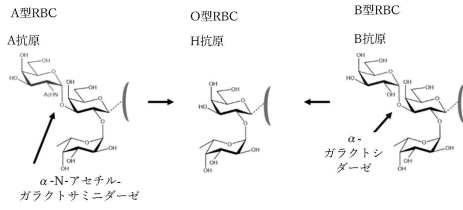
- cs. (2009) "trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses." 25(15):1972-3. doi: 10.1093/bioinformatics/btp348. Epub 2009 Jun 8.
- Matsen, F.A. et al. PLoS One. (2012) "A format for phylogenetic placements." 7(2):e31009. doi: 10.1371/journal.pone.0031009. Epub 2012 Feb 22.
- Letunic, I. and Bork, P. Nucleic Acids Res. (2016) "Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees." 44(W1):W242-5. doi: 10.1093/nar/gkw290. Epub 2016 Apr 19. 10
- Engler, C. et al. PLoS One. (2008) "A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability." 3(11):e3647. doi: 10.1371/journal.pone.0003647. Epub 2008 Nov 5.
- Kwan, D.H. et al. J Am Chem Soc. (2015) "Toward Efficient Enzymes for the Generation of Universal Blood through Structure-Guided Directed Evolution." 137(17):5695-705. doi: 10.1021/ja5116088. Epub 2015 Apr 24. The eleven fosmids were sequenced on an Illumina MiSeqTM and ORFs therein that are present in the CAZyTM database (<http://www.cazy.org/>) (Lombard 2014) 20
- Konwar, K.M. et al. Bioinformatics. (2015) "MetaPathways v2.5: quantitative functional, taxonomic and usability improvements." 31(20):3345-7. doi: 10.1093/bioinformatics/btv361. Epub 2015 Jun 15. 30
- Li, D. et al. Bioinformatics. (2015) "MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph." 31(10):1674-6. doi: 10.1093/bioinformatics/btv033. Epub 2015 Jan 20.
- enzymes from GH4 Add Yip, V.L. and Withers, S.G. J. Amer. Chem. Soc. (2006) "Mechanistic analysis of the unusual redox-elimination sequence employed by *Thermotoga maritima* BglT: a 6-phospho-beta-glucosidase from glycoside hydrolase family 4." 126, 8354-8355 40
- Chapanian, R. et al. Nat Commun. (2014) "Enhancement of biological reactions on cell surfaces via macromolecular crowding." 5:4683. doi: 10.1038/ncomms5683. 50

- Varrot, A. et al. *J Mol Biol.* (2005) "NAD⁺ and metal-ion dependent hydrolysis by family 4 glycosidases: structural insight into specificity for phospho-beta-D-glucosides." 346(2):423-35. Epub 2005 Jan 7.
- Liu, Q.P. et al. *Nat Biotechnol.* (2007) "Bacterial glycosidases for the production of universal red blood cells." 25(4):454-64. Epub 2007 Apr 1.
- Comfort, D.A. et al. *Biochemistry* (2007) "Biochemical analysis of *Thermotoga maritima* GH36 alpha-galactosidase (TmGalA) confirms the mechanistic commonality of clan GH-D glycoside hydrolases." 46(11):3319-30. Epub 2007 Feb 27. 10
- Calcutt, M.J. et al. *FEMS Microbiol Lett.* (2002) "Identification, molecular cloning and expression of an alpha-N-acetylgalactosaminidase gene from *Clostridium perfringens*." 214(1):77-80. 20
- Gerbil, A. Maslet, C. and Salmon, C. *Vox Sang.* (1975) "Immunological aspects of the acquired B antigen." 28(5):398-403.
- Judd, W.J. and Annesley, T.M. *Transfusion medicine reviews* (1996) "The acquired-B phenomenon." 10, 111-117.
- Kelley, L.A. et al. *Nat Protoc.* (2015) "The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis." 10(6):845-58. doi: 10.1038/nprot.2015.053. Epub 2015 May 7. 30
- Ficko-Blean, E. and Boraston, AB. *J Biol Chem.* (2006) "The interaction of a carbohydrate-binding module from a *Clostridium perfringens* N-acetyl-beta-hexosaminidase with its carbohydrate receptor." 281(49):37748-57. Epub 2006 Sep 21.
- Cohen, M. et al. *Blood.* (2009) "ABO blood group glycans modulate sialic acid recognition on erythrocytes." 114(17):3668-76. doi: 10.1182/blood-2009-06-227041. Epub 2009 Aug 24. 40
- Fredslund, F. et al. *J Mol Biol.* (2011) "Crystal structure of -galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* NCFM: insight into tetramer formation and substrate binding." 412(3):466-80. doi: 10.1016/j.jmb.2011.07.057. Epub 2011 Jul 30.
- Guibert, E. E. et al. *Transfus Med Hemother.* (2011) "Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Deca 50

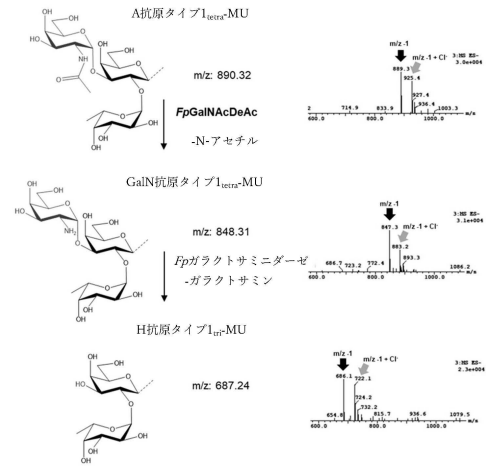
d e ” 3 8 (2) : 1 2 5 - 1 4 2 .

【 図 面 】

【 図 1 】



【 図 2 】



10

20

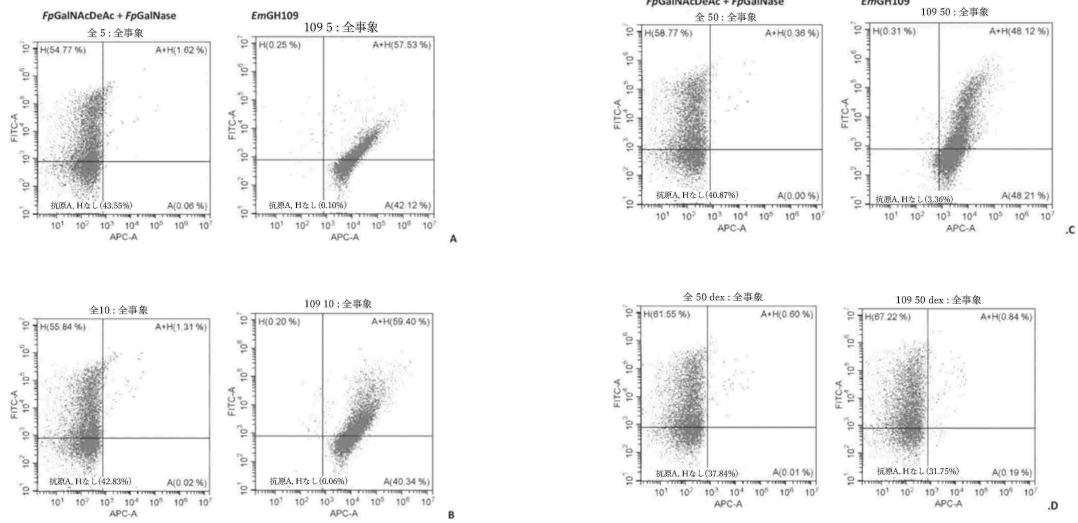
30

40

50

【 図 3 】

【 図 3 (continued) 】

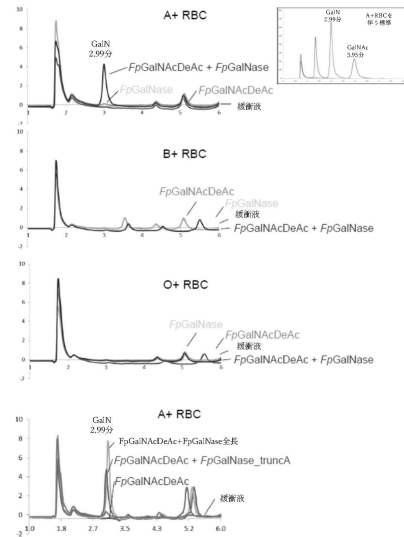
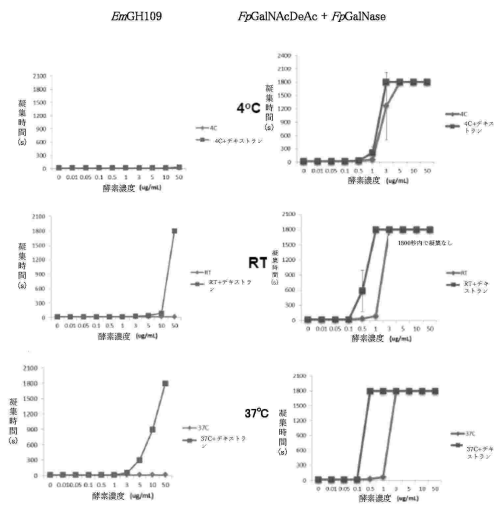


10

20

【 図 4 】

【 図 5 】

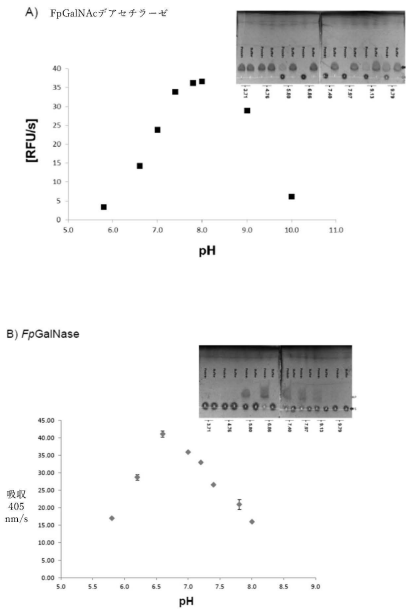


30

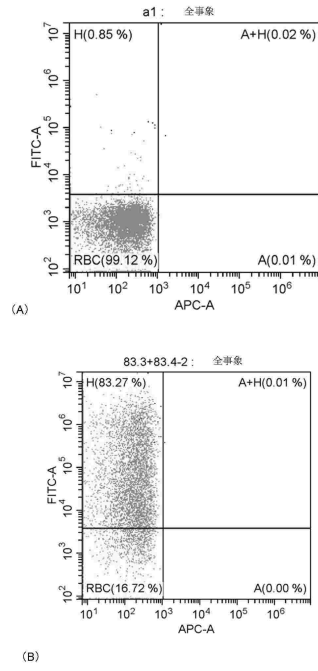
40

50

【 図 6 】



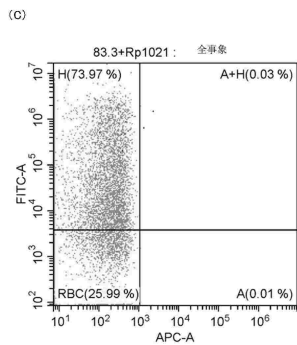
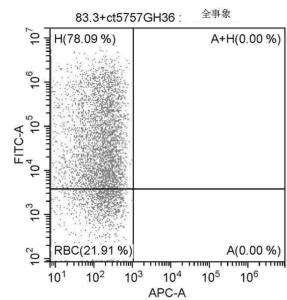
【 図 7 】



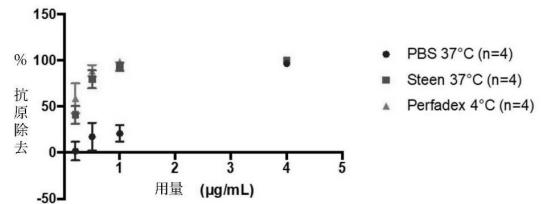
10

20

【 図 7 (continued) 】



【 図 8 】

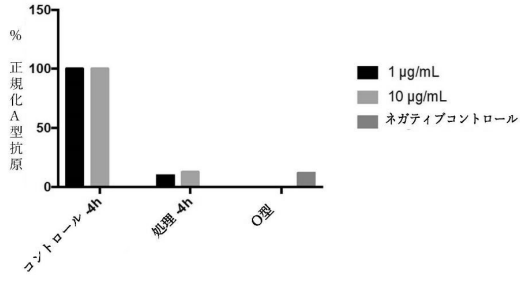


30

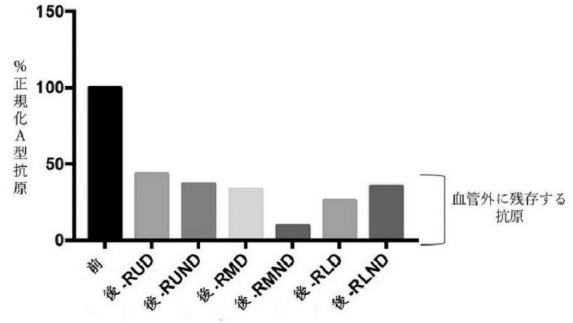
40

50

【図 9】

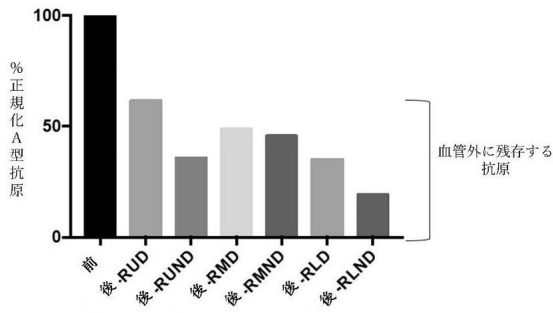


【図 10】



10

【図 11】



20

【配列表】

0007684216000001.app

30

40

50

フロントページの続き

- (74)代理人 100109634
弁理士 舛谷 威志
- (74)代理人 100129263
弁理士 中尾 洋之
- (72)発明者 サイベル, マルセロ
カナダ エム4ジー 2エス8 オンタリオ州, トロント, ブロードウェイ アベニュー 655
- (72)発明者 ワン, アイシュー
カナダ エム5ブイ 0エイチ4 オンタリオ州, トロント, リッチモンド ストリート ウェスト
199, スイート 212
- (72)発明者 ケシャブジェ, シャフィク
カナダ エム4エヌ 3シー6 オンタリオ州, トロント, リバービュー ドライブ 29
- (72)発明者 ウィザーズ, スティーブン ジー.
カナダ ブイ6エス 1ダブリュー9 ブリティッシュコロンビア州, バンクーバー, ウェスト サ
ーティエス アベニュー 3835
- (72)発明者 ラフェルド, ピーター
カナダ ブイ6ティー 1ゼット1 ブリティッシュコロンビア州, バンクーバー, メイン モール
2036, ルーム ディー223, ザ・ユニバーシティ・オブ・ブリティッシュ・コロンビア, 化
学学科内
- (72)発明者 キザツケダズ, ジャヤチャンドラン
カナダ ブイ3エム 0ビー2 ブリティッシュコロンビア州, ニュー ウェストミンスター, ドッ
クサイド クレセント 177
- 審査官 小倉 梢
- (56)参考文献 米国特許出願公開第2015/0087061 (US, A1)
特表2016-531910 (JP, A)
国際公開第2014/038473 (WO, A1)
Database UniProtKB, Accession No. A0A174W0P5, [online], 2017年11月22日, [2024年1
0月21日検索], インターネット URL: [https://rest.uniprot.org/unisave/A0A174W0P5?form
at=txt&versions=9](https://rest.uniprot.org/unisave/A0A174W0P5?format=txt&versions=9)
Database UniProtKB, Accession No. A0A096B2Z8, [online], 2017年11月22日, [2024年10
月21日検索], インターネット URL: [https://rest.uniprot.org/unisave/A0A096B2Z8?format
=txt&versions=12](https://rest.uniprot.org/unisave/A0A096B2Z8?format=txt&versions=12)
Proc. Japan Acad., 1968年, Vol. 44, p. 263-268
Nat. Microbiol., 2019年, Vol. 4, p. 1475-1485, Epub 2019 Jun 10
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N 9/00 - 9/99
C12N 5/00 - 5/28
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)