【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第１部門第１区分
【発行日】令和4年8月1日(2022.8.1)

【公開番号】特開2020-22440(P2020-22440A)
【公開日】令和2年2月13日(2020.2.13)
【年通号数】公開・登録公報2020-006
【出願番号】特願2019-135853(P2019-135853)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｐ 19/28(2006.01)
Ｃ１２Ｎ 9/24(2006.01)
Ｃ１２Ｐ 21/02(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｐ 19/28 ＺＮＡ
Ｃ１２Ｎ 9/24
Ｃ１２Ｐ 21/02 Ｂ

【手続補正書】
【提出日】令和4年7月22日(2022.7.22)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
糖タンパク質、糖ペプチド、または糖鎖から複合型糖鎖を遊離する方法であって、糖鎖の非還元末端側の糖の相違を認識する微生物由来のエンドグリコシダーゼを用いて非変性条件で複合型糖鎖を遊離する方法。
【請求項２】
前記複合型糖鎖が２本鎖複合型糖鎖、あるいは３本鎖以上の多分岐複合型糖鎖、もしくはｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ構造を含む複合型糖鎖であり、糖鎖の非還元末端にα２，６シアル酸が存在する複合型糖鎖であることを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記複合型糖鎖が２本鎖複合型糖鎖、あるいは３本鎖以上の多分岐複合型糖鎖、もしくはｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ構造を含む複合型糖鎖であり、糖鎖の非還元末端にガラクトースが存在する複合型糖鎖であることを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記複合型糖鎖が２本鎖複合型糖鎖、あるいは３本鎖以上の多分岐複合型糖鎖、もしくはｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ構造を含む複合型糖鎖であり、糖鎖の非還元末端にＮ－アセチルグルコサミンが存在する複合型糖鎖であることを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項５】
前記エンドグリコシダーゼがＴａｎｎｅｒｅｌｌａ属細菌由来のエンド－β－Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼであるＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６であって、以下の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）のタンパク質であることを特徴とする請求項２または請求項３に記載の方法。
（ａ）配列表配列番号３のアミノ酸配列からなるタンパク質
（ｂ）配列表配列番号３のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６酵素活性を有

するタンパク質
（ｃ）配列表配列番号３のアミノ酸配列と相同性が９０％以上のアミノ酸配列からなり、かつＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６酵素活性を有するタンパク質
【請求項６】
前記エンドグリコシダーゼがＭｕｒｉｂａｃｕｌｕｍ属細菌由来のエンド－β－Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼであるＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８であって、以下の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）のタンパク質であることを特徴とする請求項２または請求項３に記載の方法。
（ａ）配列表配列番号７のアミノ酸配列からなるタンパク質
（ｂ）配列表配列番号７のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８酵素活性を有するタンパク質
（ｃ）配列表配列番号７のアミノ酸配列と相同性が９０％以上のアミノ酸配列からなり、かつＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８酵素活性を有するタンパク質
【請求項７】
前記エンドグリコシダーゼがＴａｎｎｅｒｅｌｌａ属細菌由来のエンド－β－Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼであるＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３であって、以下の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）のタンパク質であることを特徴とする請求項４に記載の方法。
（ａ）配列表配列番号１のアミノ酸配列からなるタンパク質
（ｂ）配列表配列番号１のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３酵素活性を有するタンパク質
（ｃ）配列表配列番号１のアミノ酸配列と相同性が９０％以上のアミノ酸配列からなり、かつＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３酵素活性を有するタンパク質
【請求項８】
前記エンドグリコシダーゼがＢａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ属細菌由来のエンド－β－Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼであるＥｎｄｏ－Ｂｎｏ１２６３であって、以下の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）のタンパク質であることを特徴とする請求項２または請求項３に記載の方法。
（ａ）配列表配列番号９のアミノ酸配列からなるタンパク質
（ｂ）配列表配列番号９のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつＥｎｄｏ－Ｂｎｏ１２６３酵素活性を有するタンパク質
（ｃ）配列表配列番号９のアミノ酸配列と相同性が９０％以上のアミノ酸配列からなり、かつＥｎｄｏ－Ｂｎｏ１２６３酵素活性を有するタンパク質
【請求項９】
糖タンパク質、糖ペプチドまたは糖鎖から糖鎖を遊離する方法であって、非還元末端側の糖の相違を認識する複数のエンドグリコシダーゼを用いて非変性条件で糖鎖を遊離する方法。
【請求項１０】
前記複数のエンドグリコシダーゼがＴａｎｎｅｒｅｌｌａ属細菌由来のエンド－β－Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼであるＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１４５７、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１６０３、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６、Ｍｕｒｉｂａｃｕｌｕｍ属細菌由来のエンド－β－Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼであるＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８、およびＢａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ属細菌由来のエンド－β－Ｎ－アセチルグルコサミニダーゼであるＥｎｄｏ－Ｂｎｏ１２６３のいずれかの組合せ、あるいはすべてであることを特徴とする請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
請求項１から請求項８のいずれかに記載の方法を用いて複合型糖鎖を切断させた糖タンパク質、糖ペプチドまたは糖鎖を製造する方法。

【請求項１２】
請求項９または請求項１０に記載の方法を用いて特定構造の複合型糖鎖を切断させた糖タンパク質、糖ペプチドまたは糖鎖を製造する方法。
【請求項１３】
非変性条件で、糖タンパク質、糖ペプチド、または糖鎖から複合型糖鎖を遊離させるための組成物であって、糖鎖の非還元末端側の糖の相違を認識する微生物由来のエンドグリコシダーゼを含む、前記組成物。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２３】
【図１】代表的なｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ糖鎖（Ｇ０Ｂ糖鎖）を含む多分岐型糖鎖の各種Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素による生合成経路を示す。
【図２】Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１６０３、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１４５７、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６、Ｅｎｄｏ－Ｂａｃ１００８およびＥｎｄｏ－Ｂｎｏ１２６３の各精製酵素のＳＤＳ－ＰＡＧＥによる泳動パターンを示す。
【図３Ａ】精製酵素を用いて各種糖タンパク質を基質とした糖鎖切断反応を実施し、その反応産物をＳＤＳ－ＰＡＧＥに供した結果を示す。糖鎖が切断されたタンパク質は「Ｄｅｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｅｄ」を冠して示している。
【図３Ｂ】精製酵素を用いてｏｖｏｍｕｃｏｉｄまたはｒｉｂｏｎｕｃｌｅａｓｅ Ｂ（ＲＮａｓｅ Ｂ）を基質とした糖鎖切断反応を実施し、その反応産物をＳＤＳ－ＰＡＧＥに供した結果を示す。糖鎖が切断されたタンパク質は「Ｄｅｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｅｄ」を冠して示している。
【図４Ａ】Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１４５７で切断したＲＮａｓｅ Ｂの糖鎖を質量分析解析した結果を示した図である。
【図４Ｂ】Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３で切断したｏｖｏｍｕｃｏｉｄの糖鎖を質量分析解析した結果を示した図である。
【図４Ｃ】Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６で切断したα１－ａｃｉｄ ｇｌｙｃｏｐｒｏｔｅｉｎ（α１－ＡＧＰ）の糖鎖を質量分析解析した結果を示した図である。
【図４Ｄ】Ｅｎｄｏ－Ｂａｃ１００８で切断したα１－ＡＧＰの糖鎖を質量分析解析した結果を示した図である。
【図５】Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６およびＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８の基質特異性を調べるために用いた各種糖ペプチドの調製法を示す。
【図６】Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６およびＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８の各種糖ペプチドに対する切断活性をまとめた図である。
【図７】基質としてＲＮａｓｅ Ｂ、Ｐｒｏｓｔａｔｅ ｓｐｅｃｉｆｉｃ ａｎｔｉｇｅｎ（ＰＳＡ）、ｏｖｏｍｕｃｏｉｄおよびα１－ＡＧＰを用いて、各種ＥＮＧａｓｅによる糖鎖切断反応を実施し、その反応産物をＳＤＳ－ＰＡＧＥに供した結果を示す。糖鎖が切断されたタンパク質は「Ｄｅｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｅｄ」を冠して示している。酵素溶液由来のバンドにはアスタリスク（＊）を付している。
【図８】基質としてｏｖｏｍｕｃｏｉｄおよびｇａｌａｃｔｏｓｙｌａｔｅｄ ｏｖｏｍｕｃｏｉｄを用いて、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６およびＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８の各酵素による糖鎖切断反応を実施し、その反応産物をＳＤＳ－ＰＡＧＥに供した結果を示す。糖鎖が切断されたタンパク質は「Ｄｅｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｅｄ」を冠して示している。
【図９】ＲＮａｓｅ Ｂ、α１－ＡＧＰ、およびｏｖｏｍｕｃｏｉｄの混合溶液に対し、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１４５７、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６およびＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８の各酵素を単独あるいは組み合わせて作用させて糖鎖切断反

応を実施し、その反応産物をＳＤＳ－ＰＡＧＥに供した結果を示す。糖鎖が切断されたタンパク質は「Ｄｅｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｅｄ」を冠して示している。
【図１０】野生型Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６およびＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６　Ｎ２２０Ｑ変異体の糖転移活性を測定した結果をまとめた図である。
【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００６０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００６０】
　高マンノース型糖鎖が結合しているＲＮａｓｅ　Ｂ、おもに２～４本鎖複合型糖鎖が結合しているα１－ＡＧＰ、および糖鎖の非還元末端にＮ－アセチルグルコサミンが露出しているｂｉｓｅｃｔｉｎｇ　ＧｌｃＮＡｃ含有複合型糖鎖がおもに結合しているｏｖｏｍｕｃｏｉｄ（各１μｇ）の混合溶液（５０ｍＭクエン酸緩衝液、ｐＨ５．０）に対し、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１４５７、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６およびＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８の各酵素（各０．６μｇ）を単独あるいは組み合わせて用い、糖鎖切断反応を実施した（４５℃、２０時間）。反応産物をＳＤＳ－ＰＡＧＥに供した結果を図９に示す。
【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００６１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００６１】
　図９の結果より、例えばこれらの糖タンパク質から糖鎖の非還元末端にＮ－アセチルグルコサミンが露出しているｂｉｓｅｃｔｉｎｇ　ＧｌｃＮＡｃ含有複合型糖鎖を含むすべての糖鎖を遊離させるためには、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１４５７、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６の組合せ、あるいはＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１４５７、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３、Ｅｎｄｏ－Ｂａｃ１００８の組合せ、もしくはＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１４５７、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６、Ｅｎｄｏ－Ｂａｃ１００８のすべての酵素を用いて糖鎖切断反応を実施すればよい。また、これらの糖タンパク質から糖鎖の非還元末端にＮ－アセチルグルコサミンが露出しているｂｉｓｅｃｔｉｎｇ　ＧｌｃＮＡｃ含有複合型糖鎖以外の糖鎖を遊離させるためには、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１４５７とＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６の組合せ、あるいはＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１４５７とＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８の組合せの酵素を用いて糖鎖切断反応を実施すればよい。