(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7510249号
(P7510249)

(45)発行日　令和6年7月3日(2024.7.3)

(24)登録日　令和6年6月25日(2024.6.25)

(51)国際特許分類

Ｃ１２Ｐ　19/28　(2006.01)		Ｃ１２Ｐ	19/28	ＺＮＡ	
Ｃ１２Ｐ　21/02　(2006.01)		Ｃ１２Ｐ	21/02	Ｂ	
Ｃ１２Ｎ　9/24　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	9/24		

ＦＩ

請求項の数　8　（全23頁）

(21)出願番号　特願2019-135853(P2019-135853)
(22)出願日　令和1年7月24日(2019.7.24)
(65)公開番号　特開2020-22440(P2020-22440A)
(43)公開日　令和2年2月13日(2020.2.13)
審査請求日　令和4年7月22日(2022.7.22)
(31)優先権主張番号　特願2018-141928(P2018-141928)
(32)優先日　平成30年7月28日(2018.7.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者　000173924
公益財団法人野口研究所
東京都板橋区加賀一丁目９番７号
(74)代理人　100139594
弁理士　山口 健次郎
(74)代理人　100194973
弁理士　尾崎 祐朗
(72)発明者　高島 晶
東京都板橋区加賀一丁目９番７号 公益財団法人野口研究所内
(72)発明者　黒河内 政樹
東京都板橋区加賀一丁目９番７号 公益財団法人野口研究所内
(72)発明者　天野 純子
東京都板橋区加賀一丁目９番７号 公益
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　複合型糖鎖を遊離する方法

(57)【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し、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のアミノ酸配列と同一性が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２】
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し、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のアミノ酸配列と同一性が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３】
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し、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のアミノ酸配列と同一性が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４】
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し、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のアミノ酸配列と同一性が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５】
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し、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り、
前記Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１４５７が、
（ａ）配列表配列番号５のアミノ酸配列からなるタンパク質
（ｂ）配列表配列番号５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－Ｔｓｐ１４５７酵素活性を有するタンパク質
（ｃ）配列表配列番号５のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列からなり、かつＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１４５７酵素活性を有するタンパク質、であり、
前記Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１６０３が、
（ａ）配列表配列番号１１のアミノ酸配列からなるタンパク質
（ｂ）配列表配列番号１１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－Ｔｓｐ１６０３酵素活性を有するタンパク質

（ｃ）配列表配列番号１１のアミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列からなり、かつＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１６０３酵素活性を有するタンパク質、であり、
前記Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３が、
（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のアミノ酸配列と同一性が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、であり、
前記Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６が、
（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のアミノ酸配列と同一性が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、であり、
前記Ｅｎｄｏ－Ｂａｃ１００８が、
（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のアミノ酸配列と同一性が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、であり、そして
前記Ｅｎｄｏ－Ｂｎｏ１２６３が、
（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のアミノ酸配列と同一性が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、であることを特徴とする方法。

【請求項６】
請求項１～４のいずれか一項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７】
請求項５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８】
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み、前記エンドグリコシダーゼが、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６、Ｅｎｄｏ－Ｂａｃ１００８、又はＥｎｄｏ－Ｂｎｏ１２６３であり、
前記Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３が、
（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、又は
（ｃ）配列表配列番号１のアミノ酸配列と同一性が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、であるＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３、であり、

前記Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６が、
（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、又は
（ｃ）配列表配列番号３のアミノ酸配列と同一性が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、であるＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６、であり、
前記Ｅｎｄｏ－Ｂａｃ１００８が、
（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、又は
（ｃ）配列表配列番号７のアミノ酸配列と同一性が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、であり、そして
前記Ｅｎｄｏ－Ｂｎｏ１２６３が、
（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、又は
（ｃ）配列表配列番号９のアミノ酸配列と同一性が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、である、
前記組成物。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、複合型糖鎖を非変性条件で糖タンパク質、糖ペプチド、または糖鎖から遊離する方法、および該糖鎖が切断された糖タンパク質、糖ペプチド、または糖鎖の製造方法に関する。Ｎ結合型糖鎖は、還元末端側にあるジアセチルキトビオース（ＧｌｃＮＡｃ－ＧｌｃＮＡｃ）ユニットにβ１－４結合したマンノース（Ｍａｎ）があり、それに対してα１－３およびα１－６の結合様式でマンノースが結合している、コア５糖を形成している。以下に説明する複合型糖鎖は、これら両マンノースにβ１－２の結合様式でＮ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）が結合している。３本鎖以上の多分岐型の複合型糖鎖とは、上記両マンノースのいずれかあるいは両方に、β１－２の結合様式で結合したＮ－アセチルグルコサミンに加えて、β１－４あるいはβ１－６、もしくは両方の結合様式でＮ－アセチルグルコサミンが結合している糖鎖である。ｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃとは、ジアセチルキトビオースユニットにβ１－４結合したマンノースに対してβ１－４の結合様式で結合したＮ－アセチルグルコサミンのことであり、これを含む糖鎖がｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ糖鎖である。非変性条件とは、界面活性剤、尿素、グアニジン塩酸塩などのタンパク質変性剤を添加することなく、タンパク質が本来とるべき立体構造を保持した状態にある条件のことである。

【背景技術】
【０００２】
糖タンパク質の糖鎖には、セリン、スレオニン残基の側鎖部分の水酸基を介して糖鎖が結合したＯ結合型糖鎖とアスパラギン残基のアミド基を介して糖鎖が結合したＮ結合型糖鎖が存在する。Ｎ結合型糖鎖は、高マンノース型糖鎖（ジアセチルキトビオースにマンノースのオリゴマーが結合している糖鎖）；複合型糖鎖（ジアセチルキトビオースにマンノースおよびＮ－アセチルグルコサミン、ガラクトース（Ｇａｌ）、シアル酸（ＮｅｕＡｃ）の少なくとも１つが結合した糖鎖）；並びに混合（ｈｙｂｒｉｄ）型糖鎖（ジアセチルキトビオースに高マンノース型糖鎖と複合型糖鎖が混成している糖鎖）に大別される。構

成糖、鎖長、結合様式等の違いによって様々な種類の糖鎖が存在し得る。

【０００３】

ｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ糖鎖はヒトやマウスではＮ－アセチルグルコサミン転移酵素の一種であるＧｎＴ－ＩＩＩという酵素によって形成される。また３本鎖以上の多分岐型の複合型糖鎖は、ヒトやマウスではＮ－アセチルグルコサミン転移酵素の一種であるＧｎＴ－ＩＶ、ＧｎＴ－Ｖ、ＧｎＴ－ＩＸ、ニワトリではＧｎＴ－ＶＩといった酵素によって形成される（図１）。本明細書において、「多分岐型糖鎖」とは、３本鎖以上の複合型糖鎖並びにｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃを有する２本鎖以上の複合型糖鎖を意味する。

【０００４】

Ｎ結合型糖鎖にｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃが導入されると、αマンノシダーゼＩＩやＮ－アセチルグルコサミン転移酵素であるＧｎＴ－ＩＩ、ＧｎＴ－ＩＶ、ＧｎＴ－Ｖといった酵素の反応が阻害され、複合型糖鎖の形成阻害や側鎖の伸長低下が起こる（非特許文献１）。がん細胞においては、ＧｎＴ－Ｖによって細胞表面に露出したＮ結合型糖鎖にβ１，６結合で付加したＧｌｃＮＡｃが導入されると転移能が増大するが、ＧｎＴ－ＩＩＩの過剰発現によってｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃを導入し、ＧｎＴ－ＶによるＧｌｃＮＡｃ転移を阻害すると、がん細胞の転移が抑制されることが報告されている（非特許文献２）。また、アルツハイマー病の原因物質の一つであるアミロイドβの産生に関わるＢＡＣＥ１プロテアーゼがｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ糖鎖の修飾をうけており、この糖鎖修飾を欠損させるとＢＡＣＥ１プロテアーゼの細胞内局在が変化して、アミロイドβの産生が抑制されるとの報告もある（非特許文献３）。

【０００５】

Ｎ結合型糖鎖の構造解析や、糖タンパク質から糖鎖試料を調製するためには、糖タンパク質から糖鎖を遊離させる必要がある。糖タンパク質から糖鎖を遊離させる化学的な方法としては、糖鎖のアルデヒド基と特異的に結合するヒドラジド基を有する物質を用いる方法があるが、この方法ではタンパク質部分が分解されてしまい、又遊離した糖鎖の構造が部分的に変化する脱アセチル化並びにエピマー化が起こってしまう（特許文献１）。

【０００６】

一方、Ｐｅｐｔｉｄｅ－Ｎ－Ｇｌｙｃｏｓｉｄａｓｅ Ｆ（ＰＮＧａｓｅ Ｆ）やＥｎｄｏ－β－Ｎ－Ａｃｅｔｙｌｇｌｕｃｏｓａｍｉｎｉｄａｓｅ（ＥＮＧａｓｅ）といった酵素を用いて糖タンパク質から糖鎖を遊離させる方法もある。ＰＮＧａｓｅ ＦはＮ結合型糖鎖（高マンノース型糖鎖、混合型糖鎖、複合型糖鎖）とタンパク質との結合部位（ＧｌｃＮＡｃ－Ａｓｎ結合）を、糖鎖の構造にかかわらず特異的に切断する。この際、糖鎖が結合していたＡｓｎ残基はＡｓｐに変換されるため、タンパク質のアミノ酸配列が変化し、タンパク質機能に影響を及ぼす可能性がある。またＰＮＧａｓｅ Ｆによる糖鎖切断では、糖鎖を効率よく除去するためにタンパク質を変性させることがあるため、糖鎖除去後のタンパク質の機能解析には向かない場合がある。

【０００７】

ＥＮＧａｓｅはＮ結合型糖鎖の還元末端側にあるジアセチルキトビオースユニット間を特異的に切断するが、この切断反応は各ＥＮＧａｓｅの基質特異性に依存する。例えば、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｐｌｉｃａｔｕｓ由来のＥｎｄｏＨは、高マンノース型糖鎖と一部の混合型糖鎖を切断できるＥＮＧａｓｅであるが、複合型糖鎖は切断できない。切断反応後は、糖鎖が結合していたＡｓｎ残基に１残基のＧｌｃＮＡｃが残留している為、ＰＮＧａｓｅ Ｆによる糖鎖切断反応時にみられるＡｓｎ残基のＡｓｐへの変換は起こらず、タンパク質のアミノ酸配列は変化しない。またＥＮＧａｓｅによる糖鎖切断では、タンパク質を変性させなくても糖鎖を効率よく除去できる場合が多く、糖鎖除去後のタンパク質の機能解析が可能である。

【０００８】

近年、糖タンパク質に結合している不均一な糖鎖を均一構造の糖鎖に置換する糖鎖リモデリング法が開発されている（非特許文献４，５、特許文献２）。この方法では、まずＥ

ＮＧａｓｅで糖タンパク質の糖鎖を切断し、その結果生じるＧｌｃＮＡｃ残基（コアフコースが結合している場合もある）のみを持つ、糖鎖構造的にバリエーションのない均一な糖タンパク質をアクセプター分子とする。つぎに、ＥＮＧａｓｅの糖鎖切断活性を抑制し、かつ糖転移活性を発揮させたＥＮＧａｓｅ変異体（グライコシンターゼ）を用いて、化学合成等により調製した均一な糖鎖をアクセプター分子上のＧｌｃＮＡｃ残基に転移させる。すると、均一な糖鎖構造をもつ糖タンパク質が調製できる。

【０００９】

前述したように、ｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ糖鎖には様々な役割があり、該糖鎖を含む各種の糖タンパク質が存在する。また３本鎖以上の多分岐型糖鎖を含む糖タンパク質も各種存在するが、多分岐型糖鎖にはその占有領域が大きいことや多価結合性といった特徴があり、それらが糖タンパク質の機能、構造、安定性、および糖鎖を介した相互作用などに影響を与える可能性がある。糖タンパク質からこれらの糖鎖を遊離させる場合、ＰＮＧａｓｅ Ｆを用いることができるが、多くの場合、糖タンパク質を変性させる必要がある。また、ＰＮＧａｓｅ Ｆを用いて糖鎖を除去したタンパク質は、糖鎖付加部位であるＡｓｎ残基（糖鎖切断後はＡｓｐに変換される）上にＧｌｃＮＡｃが残留しないため、上記糖鎖リモデリング法の糖タンパク質のアクセプター分子として利用できない。

【００１０】

一方、既存のＥＮＧａｓｅの中には、様々な糖タンパク質からｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ糖鎖を効率よく遊離できる酵素が見出されていない。また既存のＥＮＧａｓｅの中には、糖タンパク質から一部の多分岐型糖鎖を遊離する活性を有する酵素が存在しているが、その基質特異性によって遊離できる糖鎖の構造が限定されていた。そのため従来技術では、ｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ糖鎖や多分岐型糖鎖を含む様々な糖タンパク質から、タンパク質を変性させることなく該糖鎖を効率よく遊離させることや、上記糖鎖リモデリング法に用いるための糖タンパク質のアクセプター分子を調製することは困難であった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１１】

【文献】特開２００９－１４２２３８号公報
【文献】国際特許公開公報ＷＯ２０１３／１２００６６号

【非特許文献】

【００１２】

【文献】Ｅｌｌｅｎ Ｗ. Ｅａｓｔｏｎ ｅｔ ａｌ., Ｊ. Ｂｉｏｌ. Ｃｈｅｍ. ２６６, ２１６７４－２１６８０ （１９９１）
【文献】Ｍａｓａｆｕｍｉ Ｙｏｓｈｉｍｕｒａ ｅｔ ａｌ., Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. ＵＳＡ ９２, ８７５４－８７５８ （１９９５）
【文献】Ｙａｓｕｈｉｋｏ Ｋｉｚｕｋａ ｅｔ ａｌ., ＥＭＢＯ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ７, １７５－１８９ （２０１５）
【文献】Ｗｅｉ Ｈｕａｎｇ ｅｔ ａｌ., Ｊ. Ａｍ. Ｃｈｅｍ. Ｓｏｃ. １３４, １２３０８－１２３１８ （２０１２）
【文献】Ｍａｓａｋｉ Ｋｕｒｏｇｏｃｈｉ ｅｔ ａｌ., ＰＬｏＳ Ｏｎｅ １０, ｅ０１３２８４８ （２０１５）
【文献】Ｄａｏｔｉａｎ Ｆｕ ｅｔ ａｌ., Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ Ｒｅｓ. ２６１, １７３－１８６ （１９９４）
【文献】Ｍｉｃｈａｅｌ Ｊ. Ｔｒｅｕｈｅｉｔ ｅｔ ａｌ., Ｂｉｏｃｈｅｍ. Ｊ. ２８３, １０５－１１２ （１９９２）
【文献】Ｓｈｉｎｊｉ Ｈａｓｈｉｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ., Ｃａｎｃｅｒ １０１, ２８２５－２８３６ （２００４）
【文献】Ｋｒｉｓｔａ Ｙ. Ｗｈｉｔｅ ｅｔ ａｌ., Ｊ. Ｐｒｏｔｅｏｍｅ Ｒｅｓ. ８, ６２０－６３０ （２００９）

【文献】Ｋａｔｓｕｋｏ Ｙａｍａｓｈｉｔａ ｅｔ ａｌ．, Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５８，３０９９－３１０６（１９８３）
【文献】Ｍｉｄｏｒｉ Ｕｍｅｋａｗａ ｅｔ ａｌ．, Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２８５，５１１－５２１（２０１０）
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１３】
本発明は上記背景技術に鑑みてなされたものであり、その課題は、前記問題点を解決し、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を、非変性条件で、該糖鎖を含む糖タンパク質、糖ペプチド、または糖鎖からエンドグリコシダーゼを用いて遊離する方法を提供することである。
【課題を解決するための手段】
【００１４】
本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、驚くべきことに、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および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が、糖鎖の非還元末端にα２，６シアル酸あるいはガラクトースが存在する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を、非変性条件で、糖タンパク質から遊離する活性を有することを見出した。さらに、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が、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を、非変性条件で、糖タンパク質から遊離する活性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。
【００１５】
本発明において、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とは、以下の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）の組換えタンパク質である。
（ａ）配列表配列番号３に記載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に記載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に記載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。
【００１６】
本発明において、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とは、以下の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）の組換えタンパク質である。
（ａ）配列表配列番号７に記載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に記載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に記載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。
【００１７】
本発明において、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とは、以下の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）

の組換えタンパク質である。
（ａ）配列表配列番号１に記載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に記載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に記載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。
【００１８】
本発明において、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とは、以下の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）の組換えタンパク質である。
（ａ）配列表配列番号９に記載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に記載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に記載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。
【００１９】
なお、糖鎖の非還元末端にα２，６シアル酸、ガラクトース、あるいはＮ－アセチルグルコサミンが混在する複合型糖鎖も、各糖鎖成分の数、結合位置、結合様式などによって、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６、Ｅｎｄｏ－Ｂａｃ１００８、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３あるいはＥｎｄｏ－Ｂｎｏ１２６３のいずれか、またはすべての酵素、あるいはこれらの酵素を組み合わせて用いることにより、切断されると考えられる。
【００２０】
すなわち本発明は、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を、非変性条件で、該糖鎖を含む糖タンパク質、糖ペプチド、または糖鎖から、非還元末端側の糖の相違を認識するエンドグリコシダーゼであるＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６、Ｅｎｄｏ－Ｂａｃ１００８、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３あるいはＥｎｄｏ－Ｂｎｏ１２６３のいずれか、あるいはこれらの酵素を組み合わせて用いることにより遊離させる方法を提供するものである。
【００２１】
また、本発明は、高マンノース型糖鎖を切断する活性を有する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あるいはＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１６０３、およびＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６、Ｅｎｄｏ－Ｂａｃ１００８、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３などのエンドグリコシダーゼを組み合わせて用いることにより、糖タンパク質、糖ペプチド、または糖鎖から、非変性条件で特定構造の糖鎖を遊離する方法、およびそのようにして特定構造の糖鎖が切断された糖タンパク質、糖ペプチド、または糖鎖の製造方法、あるいは特定構造の糖鎖のみが残存した糖タンパク質、糖ペプチド、または糖鎖の製造方法を提供するものである。
【発明の効果】
【００２２】
本発明によれば、前記問題点を解決し、試料を変性させることなく酵素処理という簡単なステップにより、効率的かつ低コストで、糖タンパク質、糖ペプチド、または糖鎖から、特定構造の糖鎖を遊離させることができる。また、このようにして遊離された糖鎖は、糖鎖構造解析の試料や、特定構造を有する糖鎖の原料として利用できる。さらに糖鎖が切断された糖タンパク質、糖ペプチドは、ＥＮＧａｓｅおよびグライコシンターゼを用いた糖鎖リモデリング法のアクセプター基質として利用することができる。
【図面の簡単な説明】
【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。
【発明を実施するための形態】
【００２４】
以下、本発明の実施態様および実施方法について詳細に説明するが、本発明は、以下の具体的形態に限定されるものでなく、技術的思想の範囲内で任意に変形することができる。
【００２５】
図１に代表的なｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ糖鎖（Ｇ０Ｂ糖鎖）を含む多分岐型糖鎖を示すが、本明細書中における「ｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ糖鎖」とは、Ｇ０Ｂ型糖鎖にさらにガラクトースやシアル酸による修飾が施された糖鎖を含み、また本明細書中における「多分岐型糖鎖」とは、図１に示す各種糖鎖にさらにＮ－アセチルグルコサミン、Ｎ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）、ガラクトース、フコース（Ｆｕ

ｃ）、およびシアル酸などによる修飾が施された糖鎖を含む。これらの糖鎖については、特にことわりのない限り、全体の糖鎖構造に関して、構成糖、鎖長および結合様式の違いは問わない。

【００２６】

本発明の各種多分岐型糖鎖を含む複合型糖鎖を非変性条件で遊離する方法は、該糖鎖を含む糖タンパク質、糖ペプチド、または糖鎖から、糖鎖の非還元末端側の糖の相違を認識するエンドグリコシダーゼを用いて該糖鎖を遊離させることを特徴とする。本発明では、エンドグリコシダーゼのうち、酵素番号ＥＣ３．２．１．９６に分類されるＥｎｄｏ－β－Ｎ－Ａｃｅｔｙｌｇｌｕｃｏｓａｍｉｎｉｄａｓｅ（ＥＮＧａｓｅ）を用いる。好ましくは、本発明で用いるＥＮＧａｓｅは微生物由来の酵素である。微生物は、特に限定されないが、Ｔａｎｎｅｒｅｌｌａ属、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ属、Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ属、Ｍｕｒｉｂａｃｕｌｕｍ属、Ｃｏｐｒｏｂａｃｔｅｒ属、Ａｌｌｏｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ属、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｄａｃｅａｅ属、Ｂａｒｎｅｓｉｅｌｌａ属、Ｐａｌｕｄｉｂａｃｔｅｒ属、Ｍｕｒｉｂａｃｕｌｕｍ属、Ｂｕｔｙｒｉｃｉｍｏｎａｓ属、Ｇａｂｏｎｉａ属、Ｈａｌｌｅｌｌａ属、Ｃｈｌａｍｙｄｉａ属、Ｂａｃｉｌｌｕｓ属、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ属、Ｐａｅｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ属、Ｖｉｒｇｉｂａｃｉｌｌｕｓ属などの脊椎動物の口腔や腸内に生息する微生物が好ましく、Ｔａｎｎｅｒｅｌｌａ属細菌、Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ属細菌とＭｕｒｉｂａｃｕｌｕｍ属細菌が特に好ましい。

【００２７】

Ｔａｎｎｅｒｅｌｌａ属細菌に由来するＥＮＧａｓｅとしては、配列番号２、４、６または１２の塩基配列を有する遺伝子によりそれぞれコードされる配列番号１、３、５または１１のアミノ酸配列を有する酵素が挙げられる。またＭｕｒｉｂａｃｕｌｕｍ属細菌に由来するＥＮＧａｓｅとしては、配列番号８の塩基配列を有する遺伝子によりコードされる配列番号７のアミノ酸配列を有する酵素が挙げられる。Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ属細菌に由来するＥＮＧａｓｅとしては、配列番号１０の塩基配列を有する遺伝子によりコードされる配列番号９のアミノ酸配列を有する酵素が挙げられる。本発明においては、配列番号１のアミノ酸配列を有する酵素をＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３と呼ぶ。また、配列番号３のアミノ酸配列を有する酵素をＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６と呼ぶ。さらに、配列番号５のアミノ酸配列を有する酵素をＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１４５７と呼ぶ。また、配列番号１１のアミノ酸配列を有する酵素をＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１６０３と呼ぶ。さらに、配列番号７のアミノ酸配列を有する酵素をＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８と呼ぶ。また、配列番号９のアミノ酸配列を有する酵素をＥｎｄｏ－Ｂｎｏ１２６３と呼ぶ。これらの酵素は、それぞれアミノ酸配列全長が１２６３残基、１００６残基、１４５７残基、１６０３残基、１００８残基および１２６３残基からなる。

【００２８】

あるいは、本発明で用いるＥＮＧａｓｅのうち、糖タンパク質、糖ペプチド、または糖鎖から、糖鎖の非還元末端にα２，６シアル酸またはガラクトースが存在する複合型糖鎖を遊離する際に用いるＥＮＧａｓｅは、配列番号３または配列番号７のアミノ酸配列のいずれか一つと少なくとも５０％、好ましくは少なくとも６０％、より好ましくは少なくとも７０％の相同性を有するアミノ酸配列を有しており、全長アミノ酸長が１０００アミノ酸残基程度の、ＣＡＺｙ（Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ－Ａｃｔｉｖｅ ｅｎＺｙｍｅｓ Ｄａｔａｂａｓｅ； ｗｗｗ．ｃａｚｙ．ｏｒｇ）データベースの分類でＧＨ８５ファミリーに属する、活性部位にＮｘＥモチーフとよばれるモチーフを有する酵素である。ここで、「相同性」とは、米国の国立生物工学情報センター（ＮＣＢＩ）により提供されるＢＬＡＳＴ解析を標準設定で用いて算出された相同性を意味する。

【００２９】

また、本発明で用いるＥＮＧａｓｅのうち、糖タンパク質、糖ペプチド、または糖鎖から、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を遊離する際に用いるＥＮＧａｓｅは、配列番号１または配列番号９のアミノ酸配列と少なくとも５０％、好ましくは少なくとも６０％、より好ましくは少なくとも７０％の相同性を有するアミ

ノ酸配列を有しており、全長アミノ酸長が１２００～１３００アミノ酸残基程度の、ＣＡＺｙデータベースの分類でＧＨ８５ファミリーに属する、活性部位にＮｘＥモチーフとよばれるモチーフを有する酵素である。

【００３０】

本発明で用いるＥＮＧａｓｅは、いずれも糖タンパク質や糖ペプチドの糖鎖を遊離させる活性を有する。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多分岐型糖鎖を含む複合型糖鎖を非変性条件で遊離する際に用いる酵素としては、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３およびＥｎｄｏ－Ｂｎｏ１２６３が特に好ましく、また、糖鎖の非還元末端にα２，６シアル酸あるいはガラクトースが存在する多分岐型糖鎖を含む複合型糖鎖を非変性条件で遊離する際に用いる酵素としては、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６およびＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８が特に好ましく、さらに、高マンノース型糖鎖を非変性条件で遊離する際に用いる酵素としては、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１４５７およびＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１６０３が特に好ましいが、同様の活性を示す酵素であれば、他のエンドグリコシダーゼを用いても構わない。

【００３１】

このような他のエンドグリコシダーゼとしては、微生物や動植物由来のＥＮＧａｓｅや、該酵素を遺伝子組換え技術により改変した酵素、およびその酵素に各種のタグを付加した酵素などを挙げることができるが、これらはいずれも本発明の範囲に包含されるものである。

【００３２】

遺伝子組換え技術により改変した酵素としては、野生型酵素のアミノ酸配列の一部を改変して、野生型酵素の機能や安定性を向上させた酵素や、糖転移活性などの糖鎖切断活性以外の活性を付与した酵素が含まれる。このうち、糖転移活性を付与した酵素を特にグライコシンターゼとよぶ。

【００３３】

本発明で用いる酵素は、該酵素を生産する微生物の培養上清あるいは菌体から、一般的な酵素精製法に用いられるタンパク質抽出法や分画法および各種クロマトグラフィー操作を組み合わせて精製した酵素を用いてもよいし、該酵素をコードする遺伝子を含む組換えベクターにより形質転換された宿主細胞を培養することにより得られた培養物から、同様に精製した酵素を用いてもよい。

【００３４】

各種クロマトグラフィー操作とは、ジエチルアミノエチル（ＤＥＡＥ）セファロース等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、スルホプロピル（ＳＰ）セファロース等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法のことであり、これらを単独あるいは組み合わせて用い、最終的な酵素精製標品を得ることができる。

【００３５】

このようにして精製した酵素を単独あるいは組み合わせて用いることにより、糖タンパク質、糖ペプチドから非変性条件で多分岐型糖鎖を含む特定構造の糖鎖を遊離することができる。遊離した糖鎖を回収し、分画精製すれば、多分岐型糖鎖を含む様々な構造をした糖鎖の原料として利用可能である。さらに、糖タンパク質、糖ペプチドから非変性条件で特定構造の糖鎖、あるいはすべての糖鎖を遊離した糖タンパク質、糖ペプチドは、上記に記載の各種クロマトグラフィー操作等を経て、精製標品を得ることができ、糖鎖リモデリング法のアクセプター基質として利用可能である。

【実施例】

【００３６】

以下に記載する実施例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はその要旨を超えない限り、これらの実施例に限定されるものではない。

【００３７】
＜実施例１＞多分岐型糖鎖を含む複合型糖鎖を非変性条件で糖タンパク質から遊離するエンドグリコシダーゼの調製方法とその活性測定
ｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ糖鎖は、ヒトやマウスではＧｎＴ－ＩＩＩという酵素によって形成される、図１に示すような特徴的な構造をもった糖鎖で、様々な糖タンパク質上に存在する。近年、ＥＮＧａｓｅおよびその変異体を活用した、不均一な糖鎖を持つ糖タンパク質から均一な糖鎖を持つ糖タンパク質に置き換える糖鎖リモデリング法が開発されたが（非特許文献４，５、特許文献２）、本法を適用するために、糖タンパク質から各種の糖鎖を非変性条件下で遊離させる必要性が生じてきた。一方、様々な糖タンパク質からｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ糖鎖を効率よく遊離させることができるＥＮＧａｓｅはこれまでに報告がなく、非変性条件下で各種糖タンパク質から該糖鎖を遊離させることは困難であった。本発明ではこの課題の克服のため、様々な糖タンパク質からｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ糖鎖を効率よく遊離させることができるＥＮＧａｓｅの探索に取り組んだ。
【００３８】
まず糖質関連酵素のデータベースであるＣＡＺｙ、各種タンパク質のデータベースであるＵｎｉＰｒｏｔ（ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ）および米国の国立生物工学情報センター（ＮＣＢＩ）のデータベース（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｉｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ）などを検索したところ、ＣＡＺｙデータベースの分類でＧＨ８５ファミリーに属する微生物由来ＥＮＧａｓｅによって形成される３つの酵素グループを見出した。
【００３９】
グループ１はアミノ酸数が１０００残基前後である酵素が属しており、グループ２はアミノ酸数が１２５０残基前後である酵素が属しており、グループ３はアミノ酸数が１３００残基以上である酵素が属していた。各グループに属する酵素の基質特異性を調べるため、グループ１からはＴａｎｎｅｒｅｌｌａ属細菌由来の１００６アミノ酸残基の酵素（配列番号３、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６）およびＭｕｒｉｂａｃｕｌｕｍ属細菌由来の１００８アミノ酸残基の酵素（配列番号７、Ｅｎｄｏ－Ｂａｃ１００８）、グループ２からはＴａｎｎｅｒｅｌｌａ属細菌由来の１２６３アミノ酸残基の酵素（配列番号１、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３）およびＢａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ属細菌由来の１２６３アミノ酸残基の酵素（配列番号９、Ｅｎｄｏ－Ｂｎｏ１２６３）、グループ３からはＴａｎｎｅｒｅｌｌａ属細菌由来の１４５７アミノ酸残基の酵素（配列番号５、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１４５７）および１６０３アミノ酸残基の酵素（配列番号１１、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１６０３）について解析することにした。
【００４０】
Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６の遺伝子（配列番号４）、Ｅｎｄｏ－Ｂａｃ１００８の遺伝子（配列番号８）、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３の遺伝子（配列番号２）、Ｅｎｄｏ－Ｂｎｏ１２６３の遺伝子（配列番号１０）、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１４５７の遺伝子（配列番号６）およびＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１６０３の遺伝子（配列番号１２）をそれぞれ人工合成し、これらを各々ｐＧＥＸ６Ｐ－１ベクター（ＧＥヘルスケア）に挿入して、各酵素をグルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）との融合タンパク質として大腸菌にて発現させるための発現ベクターを構築した。この際、各酵素のＣ末端にはヒスチジン６残基で構成されるタグ配列が付加されるようにした。
【００４１】
各発現ベクターを用いて大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）株を形質転換し、これら形質転換体を５０μｇ／ｍＬのアンピシリンが添加された１００ｍＬのＬＢ培地にて、３７℃で３時間培養した。つぎにイソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）を０．１ｍＭになるように添加して、２５℃で３時間培養した。その後、遠心分離にて菌体を回収し、ここにリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）を５ｍＬ加えて懸濁し、超音波破砕器にて菌体を破砕した。ここに界面活性剤のＴｒｉｔｏｎ Ｘ－１００を１％になるように加えて、室温で３０分振盪後、遠心分離にて上清を回収した。この上清に適量のグルタチオン

セファロース（ＧＥヘルスケア）を加えて、４℃で１６時間撹拌し、ＧＳＴ融合タンパク質をグルタチオンセファロースに吸着させた。

【００４２】

上記グルタチオンセファロースを遠心分離にて回収後、ＰＢＳで十分に洗浄し、０．６ｍＬのＰｒｅＳｃｉｓｓｉｏｎ Ｐｒｏｔｅａｓｅ（ＧＥヘルスケア）用の反応液（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１５０ｍＭ ＮａＣｌ，１ｍＭ ＥＤＴＡ，１ ｍＭ ＤＴＴ，ｐＨ７．０）に懸濁して、ここにＰｒｅＳｃｉｓｓｉｏｎ Ｐｒｏｔｅａｓｅを2ユニット（１μＬ）加えて、４℃で１６時間反応させた。この反応により、ＧＳＴ融合タンパク質からＧＳＴが切断除去される。また、反応液に添加したＰｒｅＳｃｉｓｓｉｏｎ Ｐｒｏｔｅａｓｅはグルタチオンセファロースに吸着され、遠心分離にてグルタチオンセファロースごと除去できる。

【００４３】

上記反応により、ＧＳＴ融合タンパク質からＧＳＴを切断除去した後、遠心分離にて反応液を回収した。この反応液を、ＶＩＶＡＳＰＩＮ５００（分画分子量３，０００、ザルトリウス）を用いて限外ろ過濃縮し、精製酵素標品を得た。図２に各精製酵素のＳＤＳ－ポリアクリルアミド電気泳動（ＰＡＧＥ）による泳動パターンを示す。

【００４４】

各酵素の基質特異性を調べるため、酵素０．４μｇと変性処理を施していない各種糖タンパク質１～３μｇを、５０ｍＭクエン酸緩衝液（ｐＨ５．０またはｐＨ６．０［Ｅｎｄｏ－Ｂｎｏ１２６３とＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１６０３］）中で混和し（反応液量１０μＬ）、４０℃（Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１６０３）または４５℃、２０時間反応させた後、ＳＤＳ－ＰＡＧＥに供して糖タンパク質糖鎖の切断状況を解析した。その結果（図３Ａ）、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１４５７は高マンノース型糖鎖が結合したｒｉｂｏｎｕｃｌｅａｓｅ Ｂ（ＲＮａｓｅ Ｂ、非特許文献６）の糖鎖は切断できたが、複合型糖鎖が結合したα１－ａｃｉｄ ｇｌｙｃｏｐｒｏｔｅｉｎ（α１－ＡＧＰ、おもに２～４本鎖複合型糖鎖が結合；非特許文献７，８）、ｐｒｏｓｔａｔｅ ｓｐｅｃｉｆｉｃ ａｎｔｉｇｅｎ （ＰＳＡ、おもに２～３本鎖複合型糖鎖が結合；非特許文献９）およびｏｖｏｍｕｃｏｉｄ（おもにｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ含有複合型糖鎖が結合；非特許文献１０）の糖鎖は切断できなかったことから、高マンノース型糖鎖を好基質とする酵素と考えられた。

【００４５】

一方、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３はＲＮａｓｅ ＢやＰＳＡの糖鎖は一部しか切断できなかったが、ｏｖｏｍｕｃｏｉｄの糖鎖はほぼ切断できたことから、ｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ含有複合型糖鎖を好基質とする酵素と考えられた。また、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６とＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８は、α１－ＡＧＰとＰＳＡの糖鎖の大部分を切断することができたが、ｏｖｏｍｕｃｏｉｄやＲＮａｓｅ Ｂの糖鎖はほとんど切断しなかったことから、多分岐型を含む複合型糖鎖を好基質とする酵素と考えられた。

【００４６】

また、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３と同じグループ２に属するＥｎｄｏ－Ｂｎｏ１２６３も、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３と同様にｏｖｏｍｕｃｏｉｄの糖鎖をほぼ切断できた（図３Ｂ）。さらに、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１４５７と同じグループ３に属するＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１６０３も、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１４５７と同様にＲＮａｓｅ Ｂの糖鎖を切断できた。

【００４７】

Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１４５７で切断したＲＮａｓｅ Ｂの糖鎖、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３で切断したｏｖｏｍｕｃｏｉｄの糖鎖、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６あるいはＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８で切断したα１－ＡＧＰの糖鎖を質量分析により解析した結果を図４Ａ～Ｄに示す。なお反応は、酵素７μｇと変性処理を施していない各種糖タンパク質６０μｇを、５０ｍＭクエン酸緩衝液（ｐＨ５．０）中で混和し（反応液量１０μＬ）、４５℃、１８時間反応させた。

【００４８】

図４Ａには、ＲＮａｓｅ Ｂに結合していた糖鎖のうち、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１４５７に

よって遊離されたＭ５型（マンノースを５個含む）からＭ９型（マンノースを９個含む）の高マンノース型糖鎖と考えられる糖鎖由来のシグナルが検出されている。また図４Ｂには、ｏｖｏｍｕｃｏｉｄに結合していた糖鎖のうち、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３によって遊離されたｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ構造を含む２本鎖から５本鎖の複合型糖鎖と考えられる糖鎖由来のシグナルが検出されている。このことは、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３はｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ含有の多分岐型糖鎖の切断活性を有することを示唆する。なおこれらの糖鎖には、糖鎖の非還元末端に露出したＮ－アセチルグルコサミンが存在する。また図４Ｃ，Ｄには、α１－ＡＧＰに結合していた糖鎖のうち、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６あるいはＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８によって遊離されたシアル酸を含有した多分岐型糖鎖である２本鎖から４本鎖の複合型糖鎖と考えられる糖鎖由来のシグナルが検出されている。

【００４９】

＜実施例２＞各種糖ペプチドを基質としてＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６およびＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８のエンドグリコシダーゼの基質特異性を調査する方法

Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６およびＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８については、基質特異性をより詳細に調べるため、各種糖ペプチドを基質として、それらの糖鎖の切断活性を測定した。なお、各種糖ペプチドは以下のようにして調製した（図５）。まず鶏卵由来のシアリルグリコペプチド（Ｓｉａｌｙｌｇｌｙｃｏｐｅｐｔｉｄｅ，ＳＧＰ，α２，６Ａ２－ｐｅｐｔｉｄｅ；伏見製薬所）を原料として、これに酸処理を施してシアル酸を除去し、Ｇ２－ｐｅｐｔｉｄｅとした後に、ガラクトシダーゼを作用させてＧ０－ｐｅｐｔｉｄｅを調製した。これに対し、ＨＥＫ２９３細胞に生産させたヒトのＮ－アセチルグルコサミン転移酵素ＧｎＴ－ＩＶまたはＧｎＴ－Ｖの組換え酵素を作用させて、それぞれＧＮ３ｂ－ｐｅｐｔｉｄｅ、ＧＮ３ａ－ｐｅｐｔｉｄｅを調製した。これらにＨＥＫ２９３細胞に生産させたヒトのガラクトース転移酵素Ｂ４ＧａｌＴ１を作用させて、それぞれＧ３ＧＮ３ｂ－ｐｅｐｔｉｄｅ、Ｇ３ＧＮ３ａ－ｐｅｐｔｉｄｅを調製した。

【００５０】

また、ＧＮ３ａ－ｐｅｐｔｉｄｅにＧｎＴ－ＩＶを作用させて、ＧＮ４－ｐｅｐｔｉｄｅを調製した。さらに、ＧＮ４－ｐｅｐｔｉｄｅにＢ４ＧａｌＴ１を作用させて、Ｇ４ＧＮ４－ｐｅｐｔｉｄｅを調製した。このＧ４ＧＮ４－ｐｅｐｔｉｄｅに対し、ＨＥＫ２９３細胞に生産させたヒトのα２，３シアル酸転移酵素ＳＴ３Ｇａｌ－ＩＶまたはα２，６シアル酸転移酵素ＳＴ６Ｇａｌ－Ｉの組換え酵素を作用させて、それぞれα２，３A_{2-4}Ｇ４－ｐｅｐｔｉｄｅ、α２，６A_{2-4}Ｇ４－ｐｅｐｔｉｄｅを調製した。

【００５１】

また、Ｇ０－ｐｅｐｔｉｄｅにＢ４ＧａｌＴ１を作用させて、Ｇ２－ｐｅｐｔｉｄｅを調製した。ここにα２，３シアル酸転移酵素ＳＴ３Ｇａｌ－ＩＶを作用させて、α２，３Ａ２－ｐｅｐｔｉｄｅを調製した。さらに、Ｇ０－ｐｅｐｔｉｄｅにＨＥＫ２９３細胞に生産させたヒトのＮ－アセチルグルコサミン転移酵素ＧｎＴ－ＩＩＩを作用させて、Ｇ０Ｂ－ｐｅｐｔｉｄｅを調製した。これにＢ４ＧａｌＴ１を作用させて、Ｇ２Ｂ－ｐｅｐｔｉｄｅを調製した。また、Ｇ０－ｐｅｐｔｉｄｅにＮ－アセチルグルコサミニダーゼＳ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）を作用させて、Ｍ３－ｐｅｐｔｉｄｅを調製した。

【００５２】

また、Ｇ０－ｐｅｐｔｉｄｅにＨＥＫ２９３細胞に生産させたヒトのα１，６フコース転移酵素ＦＵＴ８を作用させて、Ｇ０Ｆ－ｐｅｐｔｉｄｅを調製した。ここにＢ４ＧａｌＴ１を作用させて、Ｇ２Ｆ－ｐｅｐｔｉｄｅを調製した。また、ＳＧＰに酸処理を施して部分的にシアル酸を除去し、Ａ１ａＧ２－ｐｅｐｔｉｄｅおよびＡ１ｂＧ２－ｐｅｐｔｉｄｅとした後に、シアリダーゼとガラクトシダーゼを作用させてＧ１ａ－ｐｅｐｔｉｄｅとＧ１ｂ－ｐｅｐｔｉｄｅを調製した。

【００５３】
各酵素の基質特異性を調べるため、酵素０．２５μｇと０．２５ｍＭの各糖ペプチドを、５０ｍＭクエン酸緩衝液（ｐＨ５．０）中で混和し（反応液量１０μＬ）、４５℃、３０分間反応させた後、質量分析にて糖ペプチド糖鎖の切断状況を解析し、比活性（ｍＵ／ｍｇ）をもとめた結果を図６に示す。その結果、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６およびＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８は、糖鎖の非還元末端にα２，６シアル酸またはガラクトースが存在する複合型糖鎖を効率よく切断すると考えられた。なお、両酵素とも非還元末端にガラクトースが存在するｂｉｓｅｃｔｉｎｇ　ＧｌｃＮＡｃ糖鎖であるＧ２Ｂ型糖鎖の切断活性も有していた。一方、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３は、ｂｉｓｅｃｔｉｎｇ　ＧｌｃＮＡｃ糖鎖であるＧ０Ｂ型糖鎖とＧ２Ｂ型糖鎖に対して切断活性があると考えられていたが、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を効率よく切断する事が分かった。よって、この酵素は、非還元末端にガラクトースが存在するｂｉｓｅｃｔｉｎｇ　ＧｌｃＮＡｃ糖鎖であるＧ２Ｂ型糖鎖の切断活性はとても低かった。

【００５４】
＜実施例３＞各種糖タンパク質を基質として各種エンドグリコシダーゼの基質特異性を比較する方法
Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６およびＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８の上記の基質特異性をふまえ、図７には基質としてＲＮａｓｅ　Ｂ、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た結果を示す。なお反応は、酵素０．２～０．５μｇと変性処理を施していない各種糖タンパク質１～３μｇを、各酵素の反応用推奨緩衝液中で混和し（反応液量１０μＬ）、それぞれの酵素反応に適した温度にて１８時間反応させた。すなわち、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１４５７、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６、およびＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８は５０ｍＭクエン酸緩衝液（ｐＨ５．０）中で、４５℃で反応させた。Ｅｎｄｏ－Ｍ、Ｅｎｄｏ－ＣＣ、ＥｎｄｏＨ、およびＥｎｄｏＦ１は５０ｍＭクエン酸緩衝液（ｐＨ６．０）中で、３７℃で反応させた。ＥｎｄｏＦ２およびＥｎｄｏＦ３は５０ｍＭクエン酸緩衝液（ｐＨ４．５）中で、３７℃で反応させた。なお、ＰＮＧａｓｅ　Ｆ（Ｇｌｙｃｏｐｅｐｔｉｄａｓｅ　Ｆ、タカラバイオ）については、製品の添付説明書に従い、非変性条件と変性条件とで反応を行った。反応終了後、ＳＤＳ－ＰＡＧＥに供して糖タンパク質糖鎖の切断状況を解析した。

【００５５】
ＲＮａｓｅ　Ｂの糖鎖（高マンノース型糖鎖）は、Ｅｎｄｏ－Ｍ、Ｅｎｄｏ－ＣＣ、ＥｎｄｏＨ、ＥｎｄｏＦ１、ＥｎｄｏＦ２、ＥｎｄｏＦ３、およびＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１４５７を用いた反応では完全に切断されていた。ＰＳＡの糖鎖（おもに２～３本鎖の複合型糖鎖）は、Ｅｎｄｏ－Ｍ、Ｅｎｄｏ－ＣＣ、およびＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３を用いた反応では一部の糖鎖が切断されただけであったが、ＥｎｄｏＦ２、ＥｎｄｏＦ３、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６、およびＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８を用いた反応ではほぼ完全に切断されていた。また、α１－ＡＧＰの糖鎖（おもに２～４本鎖複合型糖鎖）は、Ｅｎｄｏ－Ｍ、Ｅｎｄｏ－ＣＣ、ＥｎｄｏＦ２、およびＥｎｄｏＦ３を用いた反応では一部の糖鎖が切断されただけであったが、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６およびＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８を用いた反応ではほぼ完全に切断されていた。非特許文献８，９によれば、ＰＳＡおよびα１－ＡＧＰの糖鎖の非還元末端の大部分にはシアル酸またはガラクトースが存在することが示唆されており、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６およびＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８が効率よく切断できる糖鎖構造をしていると考えられる。

【００５６】
既存のＥＮＧａｓｅの中には、様々な糖タンパク質からｂｉｓｅｃｔｉｎｇ　ＧｌｃＮＡｃ糖鎖を効率よく遊離できる酵素はこれまで見出されていない。図７においても既存のＥＮＧａｓｅあるいはＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６、Ｅｎｄｏ－Ｂａｃ１００８を用いた酵素反応では、おもにｂｉｓｅｃｔｉｎｇ　ＧｌｃＮＡｃ含有複合型糖鎖が結合しているｏｖｏｍｕｃｏｉｄの糖鎖はほとんど切断されなかった。しかしながら、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ

１２６３を用いた場合では、基質糖タンパク質であるｏｖｏｍｕｃｏｉｄに変性処理を施すことなく、その糖鎖の大部分を効率よく遊離させることができた。非特許文献１０によれば、ｏｖｏｍｕｃｏｉｄの多分岐複合型糖鎖の大部分には、ｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ構造を含めて、非還元末端に露出したＮ－アセチルグルコサミンが存在しており、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３が効率よく切断できる糖鎖構造をしている。

【００５７】

＜実施例４＞ｇａｌａｃｔｏｓｙｌａｔｅｄ ｏｖｏｍｕｃｏｉｄを基質としてＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６およびＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８のエンドグリコシダーゼの基質特異性を調査する方法

図６によれば、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６およびＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８は、糖鎖の非還元末端にガラクトースが結合していないＧ０Ｂ型のｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ糖鎖に対する切断活性は低いが、この糖鎖の非還元末端にガラクトースが２分子結合しているＧ２Ｂ型のｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ糖鎖に対する切断活性は高い。これに対し、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３はＧ０Ｂ型のｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ糖鎖に対する切断活性は高いが、Ｇ２Ｂ型のｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ糖鎖に対する切断活性は低い。そこで、ｏｖｏｍｕｃｏｉｄにヒトガラクトース転移酵素のＢ４ＧａｌＴ１を作用させて、ｏｖｏｍｕｃｏｉｄの糖鎖の非還元末端にガラクトースを付加したｇａｌａｃｔｏｓｙｌａｔｅｄ ｏｖｏｍｕｃｏｉｄを調製し、これに対するＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６、およびＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８の切断活性を調べてみた。

【００５８】

酵素反応は、ｏｖｏｍｕｃｏｉｄまたはｇａｌａｃｔｏｓｙｌａｔｅｄ ｏｖｏｍｕｃｏｉｄを２．４μｇと酵素０．２５μｇを、５０ｍＭクエン酸緩衝液（ｐＨ５．０）中で混和し（反応液量１０μＬ）、４５℃、２３時間反応させた後、ＳＤＳ－ＰＡＧＥに供して糖タンパク質糖鎖の切断状況を解析した。なお、ＰＮＧａｓｅ Ｆ（Ｇｌｙｃｏｐｅｐｔｉｄａｓｅ Ｆ、タカラバイオ）については、製品の添付説明書に従い、変性条件で反応を行った。その結果、ｏｖｏｍｕｃｏｉｄの糖鎖は、図７同様、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３では大部分切断されたが、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６およびＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８ではほとんど切断されなかった（図８）。一方、ｇａｌａｃｔｏｓｙｌａｔｅｄ ｏｖｏｍｕｃｏｉｄの糖鎖は、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１２６３ではほとんど切断されなかったが、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６およびＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８では大部分が切断された。すなわち、糖鎖の非還元末端にガラクトースが存在しているｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ含有多分岐複合型糖鎖に対しては、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６およびＥｎｄｏ－Ｂａｃ１００８を用いれば、変性処理を施すことなく、その糖鎖の大部分を効率よく遊離させることができるといえる。

【００５９】

＜実施例５＞複数のエンドグリコシダーゼを用いて非変性条件でｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ糖鎖を含む特定構造の糖鎖を遊離する方法

一般に、糖タンパク質には様々な構造の糖鎖が結合し得る。ＥＮＧａｓｅを用いて各種の糖タンパク質から糖鎖を遊離させようとする場合、該糖タンパク質に結合している糖鎖の種類や切断反応に用いるＥＮＧａｓｅの種類によっては、酵素の基質特異性の影響を受けて切断できない糖鎖が生じ、特定構造の糖鎖が結合したままの糖タンパク質や糖ペプチドが生成することになる。従って、様々な構造の糖鎖が結合した糖タンパク質からＥＮＧａｓｅを用いて完全に糖鎖を遊離させたい場合や、特定構造の糖鎖のみを遊離させたい場合は、切断反応に用いるＥＮＧａｓｅの基質特異性を考慮して、単独あるいは複数の酵素を組み合わせて用い、切断反応を実施する必要がある。本実施例ではそのような状況を想定し、複数のエンドグリコシダーゼを用いて非変性条件でｂｉｓｅｃｔｉｎｇ ＧｌｃＮＡｃ糖鎖を含む特定構造の糖鎖を遊離する方法について検討した。

【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。

【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。

【００６２】

上記のようにして基質特異性の異なるＥＮＧａｓｅを単独あるいは複数組み合わせて用いることにより、糖タンパク質からｂｉｓｅｃｔｉｎｇ　ＧｌｃＮＡｃ糖鎖を含む特定構造の糖鎖を遊離させることや、特定構造の糖鎖のみを糖タンパク質上に残存させることが可能である。

【００６３】

＜実施例６＞Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６　Ｎ２２０Ｑ変異体の糖転移活性を調査する方法

ＣＡＺｙデータベースの分類でＧＨ８５ファミリーに属するＥＮＧａｓｅについては、その活性部位にあるＮｘＥモチーフなどに対してアミノ酸置換を導入した変異体が糖転移活性を発揮する場合があることが知られている（非特許文献１１）。これは、ＥＮＧａｓｅの活性部位などへの変異導入で、糖鎖切断活性が抑制されるとともに、ＥＮＧａｓｅに元来備わっている糖転移活性が顕在化した結果と考えられる。そこで、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６について、このような糖転移活性を発揮する変異体が作製できるのかを検討することにした。

【００６４】

Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６のＮｘＥモチーフのアスパラギンはＮ２２０である。そこで、このアスパラギンをグルタミンに置換したＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６　Ｎ２２０Ｑ変異体を作製することにした。変異導入用プライマー５'－ＡＡＣＴＡＣＣＡＧＴＧＧＧＡＡＧＡＴＡＧＣＧＧＴＴＡＴ－３'と５'－ＴＴＣＣＣＡＣＴＧＧＴＡＧＴＴＡＡＴＧＣＣＡＴＣＡＣＴ－３'を用いて、ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ　ｃｈａｉｎ　ｒｅａｃｔｉｏｎによりＴｓｐ１００６遺伝子に変異導入を行った。この遺伝子をｐＧＥＸ６Ｐ－１ベクター（ＧＥヘルスケア）に挿入して、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６　Ｎ２２０Ｑ変異体の発現ベクターを構築した。そして、上述した野生型Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６の調製方法と同様にして、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６　Ｎ２２０Ｑ変異体を取得した。

【００６５】

つぎに、糖転移反応に必要なドナー基質の調製を行った。α１－ＡＧＰの糖鎖をＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６で切断し、シアリダーゼ処理を行って、非還元末端がガラクトースである２～４本鎖複合型糖鎖の混合物を調製した。この糖鎖混合物にはＧ２型糖鎖、Ｇ３ＧＮ３ｂ型糖鎖、Ｇ４ＧＮ４型糖鎖、Ｇ３ＧＮ３ｂ型糖鎖のいずれかのＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合したＧ３Ｆ型糖鎖、およびＧ４ＧＮ４型糖鎖のいずれかのＮ－アセチルグルコサミンにフコースが結合したＧ４Ｆ型糖鎖が含まれる。この糖鎖混合物をオ

キサゾリン体化した糖鎖をドナー基質とした。また、糖転移反応のアクセプター基質には、Ｆｍｏｃ基が導入されたアスパラギンにコアフコース付きのＮ－アセチルグルコサミンが結合したＦｍｏｃ－Ａｓｎ（ＧｎＦ）－ＯＨを用いた。

【００６６】

糖転移反応は、０．５ｍＭ　Ｆｍｏｃ－Ａｓｎ（ＧｎＦ）－ＯＨ、３．０ｍＭオキサゾリン化糖鎖（４本鎖糖鎖４５％、３本鎖糖鎖４５％、２本鎖糖鎖１０％）、２μｇのＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６またはＥｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６　Ｎ２２０Ｑ変異体を５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）中で混和し（反応液量８μＬ）、２５℃で６０時間まで反応させた。その後、反応産物を高速液体クロマトグラフィーに供して解析し、各糖転移産物の割合を求めた。

【００６７】

図１０にその結果を示す。野生型Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６の場合、微量の糖転移産物が検出されただけで、大部分は未反応のＦｍｏｃ－Ａｓｎ（ＧｎＦ）－ＯＨ（Ｆｍｏｃ－ＧＮＦと略記）が残存していた。これは、野生型酵素では糖転移活性がほとんど発揮されていないのか、あるいは、糖転移産物が生じても、糖鎖切断活性によって糖転移産物の糖鎖が切断されている可能性が考えられる。一方、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６　Ｎ２２０Ｑ変異体の場合では、Ｇ３ＧＮ３ｂ型糖鎖の糖転移産物であるＦｍｏｃ－Ａｓｎ（ＧｎＦ）－Ｇ３（Ｇ３と略記）の割合が２２．６％、Ｇ４ＧＮ４型糖鎖の糖転移産物であるＦｍｏｃ－Ａｓｎ（ＧｎＦ）－Ｇ４（Ｇ４と略記）の割合が１９．３％、Ｇ２型糖鎖の糖転移産物であるＦｍｏｃ－Ａｓｎ（ＧｎＦ）－Ｇ２（Ｇ２と略記）の割合が１２．１％、Ｇ３Ｆ型糖鎖の糖転移産物であるＦｍｏｃ－Ａｓｎ（ＧｎＦ）－Ｇ３Ｆ（Ｇ３Ｆと略記）の割合が７．２％、およびＧ４Ｆ型糖鎖の糖転移産物であるＦｍｏｃ－Ａｓｎ（ＧｎＦ）－Ｇ４Ｆ（Ｇ４Ｆと略記）の割合が５．２％となり、本変異体の糖転移活性が確認できた。従って、Ｅｎｄｏ－Ｔｓｐ１００６は、変異導入することにより糖転移酵素（グライコシンターゼ）としても利用できるといえる。

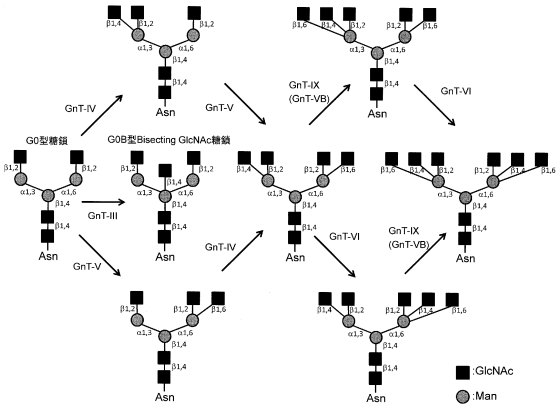
【産業上の利用可能性】

【００６８】

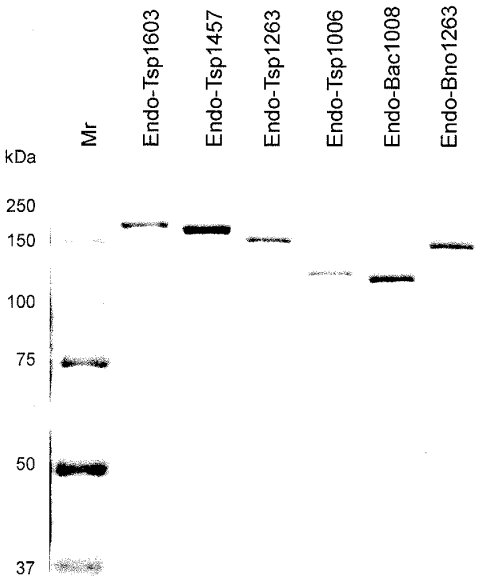
本発明は、糖タンパク質、糖ペプチド、または糖鎖からエンドグリコシダーゼを用いて非変性条件で各種の多分岐型糖鎖を含む複合型糖鎖を遊離することができる。また糖タンパク質や糖ペプチドから、すべての糖鎖あるいは特定構造の糖鎖のみを遊離させた糖タンパク質や糖ペプチドを調製することができる。したがって本発明は、多分岐型糖鎖やｂｉｓｅｃｔｉｎｇ　ＧｌｃＮＡｃ糖鎖などの糖鎖試料の調製や、糖鎖リモデリングに用いるアクセプター分子としての糖タンパク質の調製、および各種糖鎖の機能解析などに適用でき、医薬品業界等においても利用可能である。

【図面】

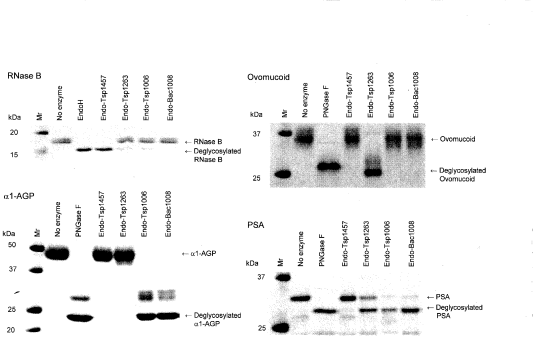
【図１】



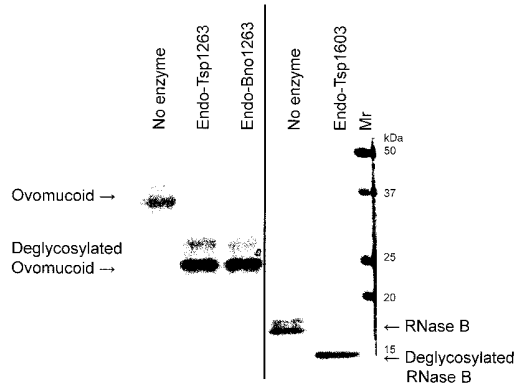
【図２】



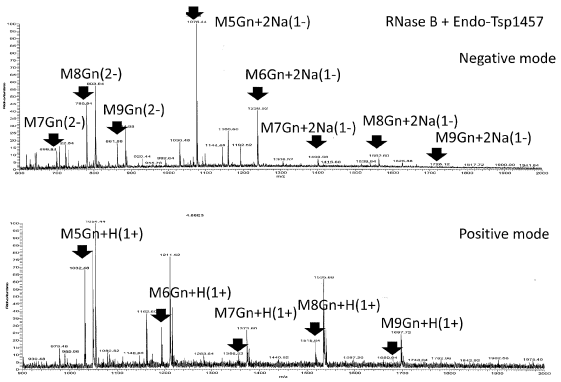
【図３Ａ】



【図３Ｂ】

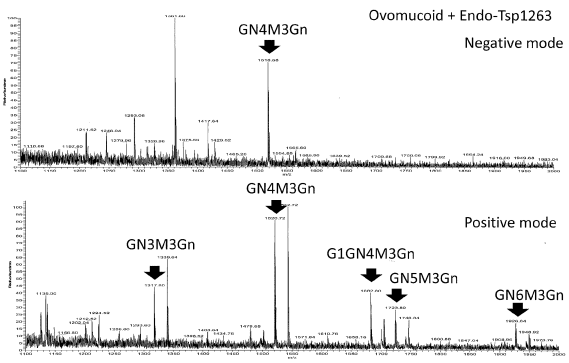


【図４Ａ】



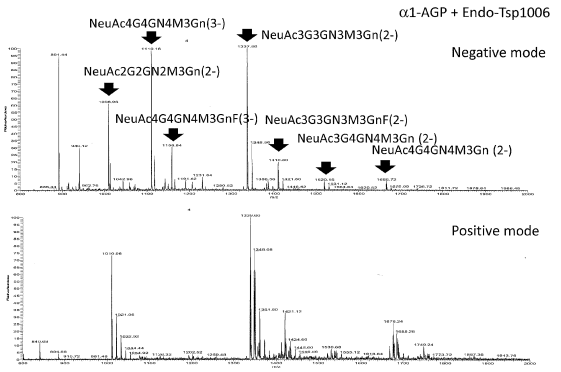
M=Man, Gn=GlcNAc（還元末端）

【図４Ｂ】



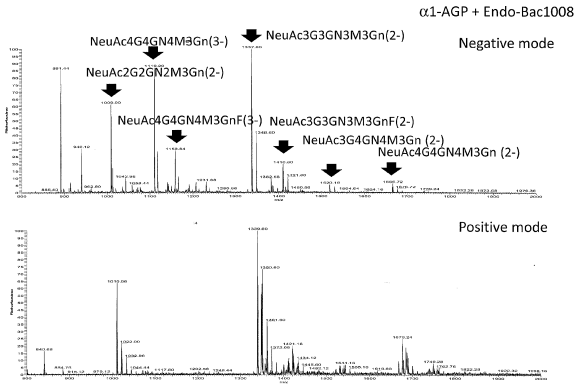
G=Gal, GN=GlcNAc, M=Man, Gn=GlcNAc（還元末端）

【図４Ｃ】



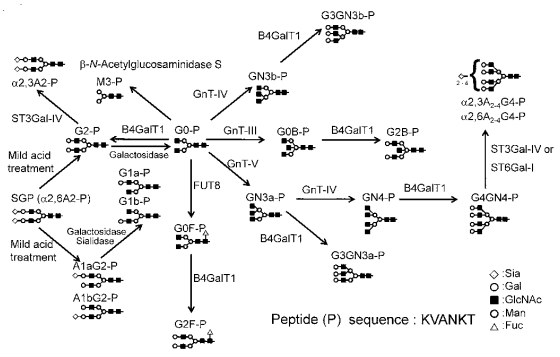
G=Gal, GN=GlcNAc, M=Man, F=Fuc, Gn=GlcNAc（還元末端）

【図４Ｄ】

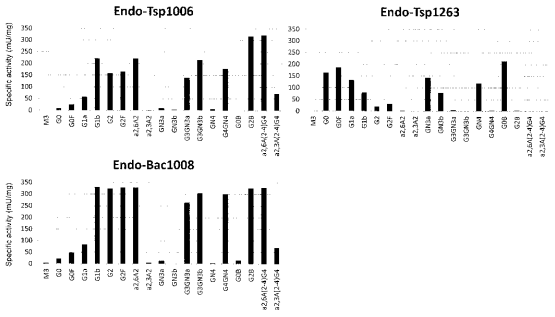


G=Gal, GN=GlcNAc, M=Man, F=Fuc, Gn=GlcNAc（還元末端）

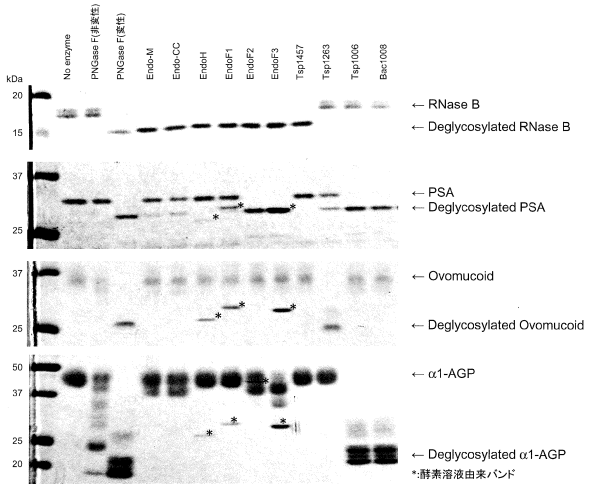
【図５】



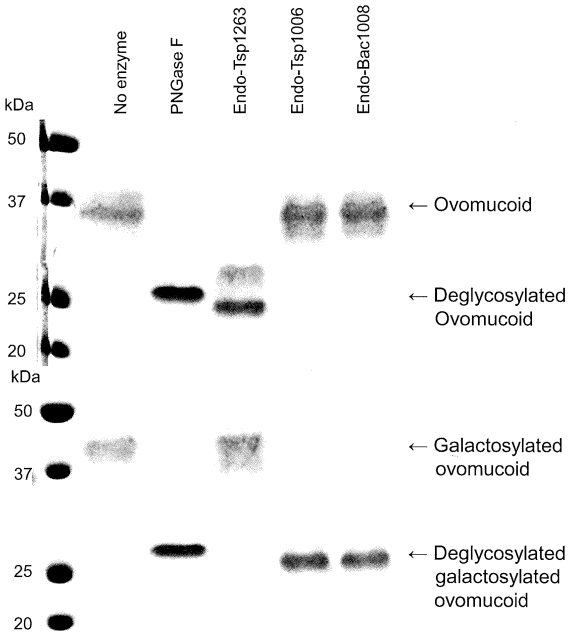
【図６】



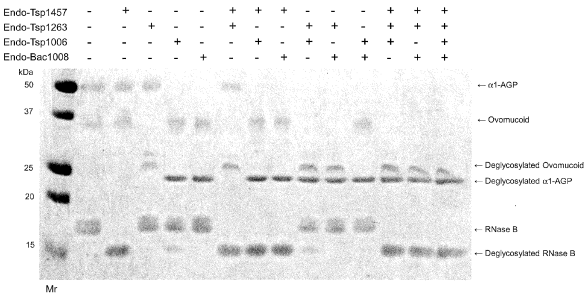
【図７】


No enzyme
PNGase F(非変性)
PNGase F(変性)
Endo-M
Endo-CC
EndoH
EndoF1
EndoF2
EndoF3
Tsp1457
Tsp1263
Tsp1006
Bac1008
kDa
← RNase B
← Deglycosylated RNase B
← PSA
← Deglycosylated PSA
← Ovomucoid
← Deglycosylated Ovomucoid
← α1-AGP
← Deglycosylated α1-AGP
*:酵素溶液由来バンド

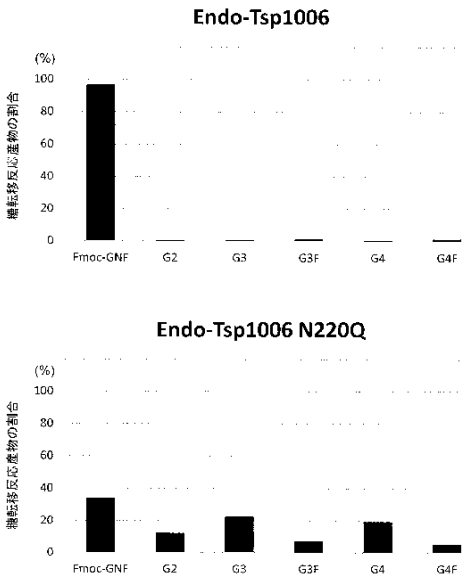
【図８】


No enzyme
PNGase F
Endo-Tsp1263
Endo-Tsp1006
Endo-Bac1008
kDa
← Ovomucoid
← Deglycosylated Ovomucoid
← Galactosylated ovomucoid
← Deglycosylated galactosylated ovomucoid

【図９】


Endo-Tsp1457
Endo-Tsp1263
Endo-Tsp1006
Endo-Bac1008
kDa
← α1-AGP
← Ovomucoid
← Deglycosylated Ovomucoid
← Deglycosylated α1-AGP
← RNase B
← Deglycosylated RNase B
Mr

【図１０】


Endo-Tsp1006
(%)
糖転移反応産物の割合
Fmoc-GNF
G2
G3
G3F
G4
G4F
Endo-Tsp1006 N220Q
(%)
糖転移反応産物の割合
Fmoc-GNF
G2
G3
G3F
G4
G4F

【配列表】
0007510249000001.app

フロントページの続き

財団法人野口研究所内
(72)発明者　松田 昭生
東京都板橋区加賀一丁目９番７号 公益財団法人野口研究所内
審査官　中野 あい
(56)参考文献　特開２０１５－０８０４５３（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１３／０５１６０８（WO，Ａ１）
"ACCESSION: R7DEW3 (entry version 20), ORFNames=BN686_01484 [Tannerella sp. CAG:51]"，2018年02月28日，UniProt Entry history [online], 28-FEB-2018 uploaded , UniProt, 〈URL: https://rest.uniprot.org/unisave/R7DEW3?format=txt&versions=20 〉, [24-MAY-2023 retrieved] ，which retrieved from the internet: 〈URL: https://www.uniprot.org/uniprotkb/R7DEW3/history 〉
"ACCESSION: R5IK23 (entry version 18), ORFNames=BN472_01808 [Tannerella sp. CAG:118]"，2017年11月22日，UniProt Entry history [online], 22-NOV-2017 uploaded , UniProt, 〈URL: https://rest.uniprot.org/unisave/R5IK23?format=txt&versions=18 〉, [24-MAY-2023 retrieved] ，which retrieved from the internet: 〈URL: https://www.uniprot.org/uniprotkb/R5IK23/history 〉
"ACCESSION: A0A1B1S6C5 (entry version 11), ORFNames=A4V02_00305 [Parabacteroides sp. YL27(Muribaculum intestinale YL27)]"，UniProt Entry history [online], 22-NOV-2017 uploaded , UniProt, 〈URL: https://rest.uniprot.org/unisave/A0A1B1S6C5?format=txt&versions=11 〉, [24-MAY-2023 retrieved] ，which retrieved from the internet: 〈URL: https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A1B1S6C5/history 〉
"ACCESSION: A0A1Q6GL14 (entry version 6), ORFNames=BHV75_07725 [Bacteroides oleiciplenus]"，2018年01月31日，UniProt Entry history [online], 31-JAN-2018 uploaded , UniProt, 〈URL: https://rest.uniprot.org/unisave/A0A1Q6GL14?format=txt&versions=6 〉, [24-MAY-2023 retrieved]，which retrieved from the internet: 〈URL: https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A1Q6GL14/history 〉
(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｐ　１／００－４１／００
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ