

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4781851号  
(P4781851)

(45) 発行日 平成23年9月28日(2011.9.28)

(24) 登録日 平成23年7月15日(2011.7.15)

(51) Int.Cl.		F I		
<b>C 1 2 N</b>	<b>9/26</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	9/26 Z N A Z
<b>C O 7 K</b>	<b>14/33</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K	14/33
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 A
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02 C

請求項の数 2 (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願2006-58718 (P2006-58718)  
 (22) 出願日 平成18年3月3日(2006.3.3)  
 (65) 公開番号 特開2007-236208 (P2007-236208A)  
 (43) 公開日 平成19年9月20日(2007.9.20)  
 審査請求日 平成20年8月28日(2008.8.28)

(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 1-8-1  
 (72) 発明者 藤田 雅也  
 東京都小金井市東町 5丁目 23-10  
 (72) 発明者 山ノ井 孝  
 神奈川県磯子区栗木 1-26-14  
 審査官 中村 正展

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】  $\alpha$  N-アセチルグルコサミニル結合を加水分解する新規な糖質加水分解酵素

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a) ~ (d) のいずれかに記載の組換えタンパク質。

(a) 配列番号 1 の 23 番目から 1133 番目までのアミノ酸配列からなる組換えタンパク質。

(b) 配列番号 1 の 1 番目から 1133 番目までのアミノ酸配列からなる組換えタンパク質。

(c) 配列番号 1 の 23 番目から 1133 番目まで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、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ下記 [化 1] の化合物に作用して、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を遊離する活性を有する組換えタンパク質。

[化 1] GlcNAc 1-4Gal-R (I)

( [化 1] 中、RはOH、糖鎖、タンパク質もしくは脂質を、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、Galはガラクトースを表す。 )

(d) 配列番号 1 の 1 番目から 1133 番目まで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、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ上記 [化 1] の化合物に作用して、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を遊離する活性を有する組換えタンパク質。

【請求項 2】

下記の理化学的性質を有することを特徴とする請求項 1 記載の組換えタンパク質からな

る糖質加水分解酵素。

(1) 上記【化1】の化合物に作用して、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を遊離する。

(2) 4-ニトロフェニルN-アセチル-β-D-グルコサミン(GlcNAc-pNP)に作用して、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)および4-ニトロフェノール(pNP)を生成するが、4-ニトロフェニルN-アセチル-β-D-ガラクトサミン(GalNAc-pNP)、4-ニトロフェニルN-アセチル-β-D-グルコサミン(GlcNAc-pNP)には作用しない。

(3) 中性付近pH(7-8)、および37℃で活性を持ち、分子量は約165000または167000である。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は組換えタンパク質に関するものであり、さらに詳しくは糖質の構造解析および医療診断分野に有用な新規エキソ型糖質加水分解酵素に関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、高等生物の胃や十二指腸腺粘液中のムチン型糖タンパク質糖鎖の非還元末端にN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)がβ-D-ガラクトース(Gal)に結合したオリゴ糖鎖、GlcNAc-β-1-4Gal-が存在することが報告されている(例えば非特許文献1等参照。)。この糖鎖は最近、胃癌や胃潰瘍の原因とされるヘリコバクターピロリ菌を殺菌もしくは増殖抑制する物質として注目されている(例えば非特許文献2等参照。)。この研究開発分野においては、上記糖鎖の組織上における分布などの視覚的情報に加え、その化学構造などの解析結果などからの情報が重要な役割を果たす。この場合、末端のβ-D-ガラクトースに結合したGlcNAcに特異性の高い糖加水分解酵素の取得が不可欠である。

20

一方、広義的にGlcNAcのβ-D-グリコシド結合を加水分解する酵素は、ヒトのヘパリンオリゴ糖(-GlcNAc-β-1-4GlcA-β-1-3-)を加水分解するものと蜂由来酵素の合成基質メチルウンベリフェリルN-アセチル-β-D-グルコサミン(GlcNAc-β-1-4MEU)に対するもの以外には報告例がない(例えば非特許文献3、4等参照。)。しかもこれらの糖加水分解酵素は、上記二糖(GlcNAc-β-1-4Gal)に対する分解活性は示されておらず、かつこれらは天然から抽出されたものであるため、大量調製手法とは成り得ない。

30

【0003】

したがって、上記の目的を達成するためには、上記二糖に特異的な水解活性を持ち、かつ大量調製が可能な、新たな酵素の調製方法が求められていた。

ここでGlcAはグルクロン酸の略である。

【非特許文献1】Ishihara, K. et al., Biochem. J., 318(1996), 409-416.

【非特許文献2】Kawakubo, M. et al., Science, 305(2004), 1003-1006.

【非特許文献3】Zhao, G. H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(1996), 6101-6105.

【非特許文献4】Nok, J. A. et al., J. Biochem Mol. Toxicol., 15(2001), 221-227.

【発明の開示】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の課題は、非還元末端にN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)がβ-D-ガラクトース(Gal)に結合したオリゴ糖鎖(GlcNAc-β-1-4Gal-)からGlcNAcを遊離する酵素を大量に提供できるようにすることにある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、上記現状にかんがみ、GlcNAc-β-1-4Gal-部位を持つ糖鎖からGlcNAcを遊離する酵素を探索する目的で、該酵素遺伝子と考えられるいくつかのDNA配列情報を基にいくつかの組換えタンパク質を作製したところ、あるアミノ酸配列を持つタンパク質が

50

GlcNAc 1-4Gal-糖鎖からGlcNAcを遊離する活性を持つことを見出し、本発明に到達した。

【0006】

すなわち本発明は、配列番号1の23番目から1133番目までのアミノ酸配列を有し、オリゴ糖鎖(GlcNAc 1-4Gal-R; RはOH、糖鎖、タンパク質もしくは脂質を、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、Galはガラクトースを表す。)を非還元末端に含む糖タンパク質糖鎖等から、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を遊離する組換え型糖質加水分解酵素であり、下記の性質を有する。

(1) GlcNAc 1-4Gal-Rに作用して、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を遊離する。

(2) 4-ニトロフェニルN-アセチル-D-グルコサミン(GlcNAc-pNP)に作用して、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)および4-ニトロフェノール(pNP)を生成するが、4-ニトロフェニルN-アセチル-D-ガラクトサミン(GalNAc-pNP)、4-ニトロフェニルN-アセチル-D-グルコサミン(GlcNAc-pNP)には作用しない。

(3) 中性付近pH(7-8)、および37で活性を持ち、分子量は約165000または167000である。

【発明の効果】

【0007】

本発明の酵素は、ムチン型糖質中に存在するGlcNAc 1-4Gal-オリゴ糖部位からGlcNAcを特異的に遊離する新規の酵素であり、ムチン型糖タンパク質糖鎖のような複雑な糖鎖構造の解明に有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

以下、本発明について詳細に説明する。本発明のタンパク質はウェルシェ菌(*Clostridium perfringens* strain13)株が有する遺伝子の一部から作製された組み換え型タンパク質であり、N末端から1133番目までの配列を有するものが水解活性を持つ(配列番号1)。特に望ましくは、N末端23番目までを欠損させたアミノ酸配列を有するタンパク質が強い活性を有し、かつこのアミノ酸配列を有することが活性に必要である。

尚、本発明の組換え型タンパク質のアミノ酸配列においては、上記酵素学的性質に実質的に影響しない数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入または転移があってもよく、このようなアミノ酸配列を有するものも本発明酵素に含まれる。本明細書における「アミノ酸の数個」とは該酵素の酵素学的性質が変化しない程度の変異を起こしてもよいアミノ酸の数を示し、通常には全アミノ酸数の5%以下である。

【0009】

本発明のタンパク質の作製にあたっては、上記のゲノムを鋳型とする遺伝子増幅を行った後、制限酵素サイト(5'末端側にSacIと3'末端側にXhoI)で消化し、市販のコールドショック発現系ベクター(pcoldTF: Takara)に組み込み、宿主大腸菌へ形質転換後、以下の手法にて発現、精製することができる。尚、本発明のタンパク質は上記ベクターにより、以下のタンパク質との融合タンパク質として得られる。

【0010】

本発明のタンパク質の構造を概説すると、アミノ(NH<sub>2</sub>)末端上流領域から、タンパク質を精製するために必要なアミノ酸配列である6つのヒスチジン部位(His-tagアフィニティー部位)、タンパク質を宿主菌体内で発現する際に可溶化タンパク質となるような構造を形成させるためのトリガーファクター、活性のあるタンパク質を発現・取得後に、融合した部位を切り離すために必要なプロテアーゼが特異的に認識できるためのプロテアーゼ(トロンピン)認識サイト、および本発明のタンパク質部位からなり、カルボキシル末端(COOH)に至る。タンパク質の発現、精製にあたっては、上記ベクターにより形質転換された大腸菌(BL21(DE3))のOD600値で0.6を示す溶液(カルベニシリン濃度50μg/mlを含有するLB培地)へ、目的タンパク質の発現を誘導する物質であるイソプロピルチオガラクトシド(IPTG)を0.1?0.5mMで添加後、さらに24時間、15で震盪培養することで、本発明のタンパク質を発現した菌体を得ることができる。タンパク質の抽出にあたっては、菌体

を超音波破碎し、遠心後に得られる上清を、His-tagアフィニティークロマトグラフィーに供することにより、本発明のタンパク質の部分精製体を、培養液1リットルあたり30-50mgで得ることができる。この画分は、本発明のタンパク質が、SDSポリアクリルアミド電気泳動的にほぼ主要(全タンパク質の70%以上)な構成物であり、部分精製体とすることができる。

#### 【実施例】

##### 【0011】

(タンパク質取得)

ウェルシエ菌(*Clostridium perfringens* strain 13)のゲノムを鋳型として、センスプライマー(cggcgagctcggtagtgcaattaaggaagggcatca)アンチセンスプライマー(ccgctcgagtagaagctctaaaaactcaacatttt)を用い、DNAポリメラーゼPrime Star(Takara製)反応を利用して、サーマルサイクラーPTC100(MJ Research製)で遺伝子増幅(反応条件(順に98 10秒、56 15秒、72 2分30秒で30サイクル行う))を行い、増幅後DNA断片を得た。得られた産物に対して制限酵素(SacIおよびXhoI)処理を行った後、コールドショック系タンパク質発現用ベクター-pcold TF(Takara製)へ、制限酵素サイト(5'末端側にSacIと3'末端側にXhoI)でライゲーション反応を行い、発現宿主である大腸菌(BL21(DE3))へ形質転換操作し、カルベニシリン濃度50 µg/mlを含有するLB寒天培地上で、その形質転換体を得た。これをカルベニシリン濃度50 µg/mlを含有するLB培地中(2ml)で前培養し、さらに同培養液1000mlへ全量植菌し、OD600で0.6になるまで30 3時間、震盪培養した。その後、IPTGを0.25mMで添加し、15、24時間震盪培養することで、本タンパク質を発現した大腸菌を調製できた。遠心後上清を除去した後、集められた菌体へ、1mg/ml濃度でリゾチームを添加し(全量4ml)、さらにPBS溶液を加え全量を20mlとした。この懸濁溶液を氷上で超音波破碎し、20000 xgで10分遠心後、上清をHis-tagアフィニティークロマトグラフィーを使った精製法(Protino-Ni-TED2000、日本ジェネティックス製)により精製した。この溶液を、限外濾過膜(排除分子サイズ100000)を用いることにより、上記精製に用いたイミダゾール等を除き、結果的に目的タンパク質を、中間精製体としてリッター培養あたり30-50mgで得ることができた。

##### 【0012】

酵素活性(4-ニトロフェニルグリコシドに対して)

各4-ニトロフェニル基質(GlcNAc-pNP、GlcNAc-pNP、GalNAc-pNP) 30mM溶液をそれぞれ別の容器に10 µlとり、上記に調製したタンパク溶液0.5 µg/µlを50 µl、10倍濃縮PBS(pH7.4)溶液を10 µl添加し、全量を100 µlとした。これを攪半しながら、37 でインキュベートした。一定時間反応後、遊離したpNP量を吸光高度計で測定することから算出し、各基質に対する反応性を比較した。24時間のインキュベート後、GlcNAc-pNPは100%水解されたが、GlcNAc-pNPおよびGalNAc-pNPは2%以下であった。

##### 【0013】

酵素活性(糖タンパク質に対する活性評価)

上記に調製したタンパク溶液0.5 µg/µlを10 µl(もしくは95 で10分間熱失活した上記のタンパク溶液)、10倍濃縮PBS(pH7.4)溶液を10 µl、ブタ胃ムチン糖タンパク質(関東化学、部分精製品)の3%溶液50 µlをそれぞれ添加し、全量を100 µlにして、攪半しながら、37 で20時間インキュベートした。反応後は以下のそれぞれの方法で測定した。

##### 【0014】

(1) 上記反応後溶液をマイクロチューブサイズの限外濾過膜で、ムチン糖タンパク質を濾別、除去した溶液をHPLC(HPLC装置; GL7400(島津製)、分析用カラム; Shodex NH2P-50E(昭和電工製))に供したところ、遊離したGlcNAcを明確に確認した。一方、熱失活したタンパク溶液のものでは、全く確認できなかった。

##### 【0015】

(2) 上記反応後溶液を、二糖(GlcNAc 1-4Gal)に対するモノクローナル抗体HIK1083を利用した胃腺粘液ムチン検出キット(関東化学製)を用いて、その結合したGlcNAc量を検出した。反応後溶液を100分の1(0.03%)に希釈(全量100 µl)し、そのまま、付属のHIK1083

10

20

30

40

50

(GlcNAc 1-4Galを認識するモノクローナル抗体)をコートしたマイクロタイタープレートのウェルへ注入し、室温で2時間静置した。ウェルを400  $\mu$ lのPBS溶液で洗浄し、付属の西洋ワサビ由来のヒドロキシペルオキシダーゼが融合したHIK1083抗体を添加し、室温で1時間静置した。その後、ウェルを400  $\mu$ lの50mMリン酸緩衝液水溶液で洗浄し、付属の発色キットで発色および停止させ、イムノプレートリーダー、immuno mini NJ-2300(SICシステムインスツルメンツ)で、450nmにて吸光度を定量した。得られた結果から、熱失活した上記のタンパク溶液のものは、そうでないものに比べて10倍以上の吸光度を示した。このことにより、本発明の酵素がブタ胃ムチン中に存在するGlcNAc 1-4Gal糖鎖からエキソ型でGlcNAcを遊離し、HIK1083抗体への結合が低下したことが示された。

【産業上の利用可能性】

10

【0016】

本発明の加水分解酵素は、胃や十二指腸に特異的に発現するGlcNAc結合を加水分解することから、未だ未解明な胃のムチン型糖鎖の構造決定に重要な役割をはたす。この構造決定により、胃かいようや胃癌に影響を与えるピロリ菌の増殖を抑制するための物質構造の情報がより明確となり、薬品業や食品業にとっての有益な知見となりうる。

【配列表】

0004781851000001.app

---

フロントページの続き

(56)参考文献 GenBank Accession Q8XM24, 2005年11月11日, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/81767660?sat=CAGE&satkey=1849530>, URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/81767660?sat=CAGE&satkey=1849530>  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002年, vol. 99, 996-1001

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 9/26

C07K 14/33

C12N 1/00 - 1/38

C12N 15/00 - 15/90

C12P 21/02

PubMed

JSTPlus(JDreamII)

WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq

UniProt/GenSeq