

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5917913号
(P5917913)

(45) 発行日 平成28年5月18日(2016.5.18)

(24) 登録日 平成28年4月15日(2016.4.15)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 9/26 (2006.01)	C 1 2 N 9/26 Z N A Z
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00
C 0 7 K 14/33 (2006.01)	C 0 7 K 14/33
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
A 6 1 K 38/43 (2006.01)	A 6 1 K 37/48

請求項の数 4 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-290148 (P2011-290148)
 (22) 出願日 平成23年12月28日(2011.12.28)
 (65) 公開番号 特開2013-138640 (P2013-138640A)
 (43) 公開日 平成25年7月18日(2013.7.18)
 審査請求日 平成26年12月26日(2014.12.26)

特許法第30条第1項適用 第30回日本糖質学会年会
 要旨集(平成23年6月28日)日本糖質学会発行第1
 12ページに発表

特許法第30条第1項適用 GlycoTOKYO 2
 011 シンポジウム要旨集(平成23年12月9日)
 東京糖鎖研究会(GlycoTOKYO)発行第21ペ
 ージに発表

(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8番1号
 (72) 発明者 藤田 雅也
 東京都板橋区加賀一丁目8番1号 公益財
 団法人野口研究所内
 (72) 発明者 土田 明子
 東京都板橋区加賀一丁目8番1号 公益財
 団法人野口研究所内
 (72) 発明者 森 昌子
 東京都板橋区加賀一丁目8番1号 公益財
 団法人野口研究所内
 審査官 小金井 悟

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖質関連酵素の改良法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

糖蛋白質糖鎖に結合する糖結合モジュール(CBM)領域を、他の糖質関連酵素またはその触媒領域のC末端に融合させてキメラ型ポリペプチドにすることによって、その糖質関連酵素またはその触媒領域の機能を向上させ、または新たな機能を付与する方法であって、

糖蛋白質糖鎖に結合する糖結合モジュール(CBM)領域が、グリコシルヒドロラーゼファミリー89(GH89)に属する - N - アセチルグルコサミニダーゼに付随するCBM領域であり、

他の糖質関連酵素が、グリコシルヒドロラーゼファミリー89(GH89)に属する - N - アセチルグルコサミニダーゼであり、

その糖質関連酵素またはその触媒領域の機能または新たな機能が、(1)糖供与体を用いて目的とするオリゴ糖、多糖または糖蛋白質糖鎖に糖を導入する糖転移活性、(2)オリゴ糖、多糖または糖蛋白質糖鎖に対する加水分解活性、もしくは(3)有機溶剤耐性である方法。

【請求項2】

融合の際にスパーサーとして、糖蛋白質糖鎖に結合する糖結合モジュール(CBM)領域の元の酵素においてそのCBM領域のN末端に隣接する10アミノ酸残基以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドを用いる請求項1に記載の方法。

【請求項3】

糖蛋白質糖鎖に結合する糖結合モジュール（CBM）領域を、他の糖質関連酵素またはその触媒領域のC末端に融合させたキメラ型ポリペプチドであって、

糖蛋白質糖鎖に結合する糖結合モジュール（CBM）領域が、グリコシルハイドロラーゼファミリー89（GH89）に属する - N - アセチルグルコサミニダーゼに付随するCBM領域であり、

他の糖質関連酵素が、グリコシルハイドロラーゼファミリー89（GH89）に属する - N - アセチルグルコサミニダーゼであるキメラ型ポリペプチド。

【請求項4】

融合のスペーサーとして、糖蛋白質糖鎖に結合する糖結合モジュール（CBM）領域の元の酵素においてそのCBM領域のN末端に隣接する10アミノ酸残基以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドを有する請求項3に記載のキメラ型ポリペプチド。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、糖質関連酵素またはその触媒領域の機能を改良する方法に関する。具体的には、糖蛋白質糖鎖に結合する糖結合モジュール（CBM）領域を、他の糖質関連酵素またはその触媒領域に融合させてキメラ型ポリペプチドにすることによって、その糖質関連酵素またはその触媒領域の機能を向上させ、または新たな機能を付与する方法、およびそのキメラ型ポリペプチドに関するものである。

20

【背景技術】

【0002】

ピロリ菌(*Helicobacter pylori*)は全世界の人口の約半数が感染しており、いまだに胃癌や胃悪性腫瘍および胃潰瘍の原因菌とされている。現在、ピロリ菌の検査体制はほぼ充足しつつあり、除菌治療においても健康保険の適用が相次いで認可されるなど、ピロリ菌感染によるリスクからの低減効果が高まりつつある。しかし、除菌治療においては、抗生物質の使用は新たな耐性菌の発生リスクを誘発することとなり、実際、抗生物質の種類を2剤、3剤併用して行われている近年でも、新たな耐性菌の発生率が増加傾向にある（非特許文献1）。さらにこのような抗生物質の多用は人体へダメージを与え、腸内細菌類を死滅させてしまうなど、結果として保菌者に悪影響を及ぼす可能性がある。一方、ピロリ菌の人体へのリスクは、胃内に定着するピロリ菌の数によって変動すると考えられるが、動物実験ではネズミの胃内のピロリ菌平均存在数が1/10程度になると、極端に胃潰瘍が発症しなくなることが報告されている（非特許文献2）。このことはピロリ菌の数をある程度までに抑え込めばリスクを大幅に減らすことができることを意味する。この状況から、現在いくつかの乳業メーカーから、ピロリ菌に対して効果のある乳酸菌やビフィズス菌入りのヨーグルトなどが販売されリスク低減効果が説明されている。しかし、乳酸菌やビフィズス菌類は胃内の厳しい環境（強酸性条件）での生存は難しいので、それだけでは効果は限定的である。

30

【0003】

ピロリ菌は、胃粘膜の表層から分泌される表層粘液内に棲息するが、粘膜中ないし粘膜深層から分泌される腺粘液中には棲息していない。この腺粘液は特異的な構造を有する胃ムチンからなり、胃ムチン（ムチン型糖タンパク質）は、結合型N - アセチルグルコサミン残基（GlcNAc残基）とガラクトース残基（Gal残基）が結合したGlcNAc 1 4 Gal 残基を非還元末端に有するO結合型糖蛋白質糖鎖（O - グリカン）を特徴的に含んでいる。また、これらの糖鎖は、近年、胆嚢癌、膵臓癌、子宮頸癌その他の新生物出現に伴って現れることも報告されている（非特許文献3）。

40

【0004】

中山らは、GlcNAc残基を非還元末端に有するコア2分岐型O - グリカン（主にGal 1 4 GlcNAc 1 6 (Gal 1 3) GalNAc 1 Rの構造を有する糖鎖のGal末端（下線部で示した糖残基）にGlcNAcが で結合したもの）

50

が結合した糖蛋白質糖鎖がピロリ菌の増殖を抑制することを見出し、さらに、この増殖抑制が、ヘリコバクター類(ピロリ菌を含む)のみが有するグルコシルコレステロール合成酵素(CHL G c T)(非特許文献4、非特許文献5)の酵素活性阻害であることを明らかにしている(非特許文献4)。ピロリ菌は、自己の増殖のためにグリコシルコレステロール成分(CGL)を必須とするが、自らCGLを合成できないため、外界からコレステロールを摂取し、菌の細胞膜付近でグルコースを付加して細胞壁を構築していると考えられている。従って、GlcNAc残基を含有するO-グリカンを持つ糖蛋白質糖鎖は、ピロリ菌の細胞壁の構築を阻害する性質があると推察されるから、ピロリ菌特異的な増殖抑制剤としての応用が期待できる。GlcNAcを含有する胃ムチンは豚などの家畜も有しているため、それらからの抽出による調製も考えられる。しかし、分離抽出には多段階の複雑な抽出過程を経なければならない上、原料となる動物の胃ムチンの供給量に問題がある。これに対し、GlcNAcに特異的な分離剤(抗体やレクチン)を用いて行う方法も考えられる。GlcNAcを含む胃ムチンに特異的に結合するタンパク質については、これまで堀田らにより見出されたモノクローナル抗体(HIK1083(非特許文献6); IgM、とHGM504(関東化学); IgM、HGM507(関東化学); IgM)を挙げることができる。HIK1083はGlcNAc残基を認識するモノクローナル抗体であり、HGM504はGlcNAc-1-4Gal-1-4GlcNAc残基を認識するモノクローナル抗体であり、かつHGM507はGlcNAc-1-4Gal残基を認識するモノクローナル抗体であり、それぞれ病理検査などに利用されている。しかしながら、機能性物質としての胃ムチンの調製を考えた場合、高価な抗体の利用は現実的ではない(しかも上述の抗体はIgMであるので費用対効果はかなり低い)。また、GlcNAcに対するレクチンの開発については報告例(非特許文献7)はあるが、遺伝子工学的応用や大量生産性に関しては課題が多い。

【0005】

他方、このような糖蛋白質糖鎖を多段階による合成化学的な方法で調製することも、生産性において解決策にはならない。また、特許文献1にGal-1-3GlcNAcGal-1-4GlcNAc構造を有するオリゴ糖であるヘリコバクターピロリ結合性物質が開示されている。しかしこの物質も構造が複雑なため、多工程を経て調製しなければならないうえ、大量かつ簡便に調製できない。

【0006】

一方、発明者らは、GlcNAcにエチル基などのアルキル基を導入した誘導体もピロリ菌の増殖を抑制する効果を有することを見出している(特許文献1)。しかし、この単純な構造を有する化合物は、調製においては有利であっても、その効果は上述したGlcNAcを有するムチン型糖蛋白質に比べて数十から数百分の一以下であり、費用面においても効果を期待しがたい(非特許文献5)。

したがって、安価なムチン型糖蛋白質を原料とした新たなGlcNAc含有ムチンの調製法が望まれていた。

【0007】

ところで発明者らは、これまでに上述のGlcNAcを含有する胃ムチンから、GlcNAcを特異的に遊離する酵素(AgnC)を、腸内細菌に見出している。この酵素は、加水分解するための触媒機能を有する領域と、胃ムチンが有するO-グリカンの糖残基に特異的に結合する領域からなる。後者は複数の糖結合モジュール(CBM)で構成されており、Muc6型のO-グリカンに特に強く結合し、複数のCBM領域のうち、あるCBMがGlcNAc特異的に、他のいくつかは非還元末端の結合型ガラクトース(Gal)特異的に結合することが示唆されている(非特許文献8および特願2010-173229号を優先権主張した特願2011-167900号を参照)。そこで発明者らは、AgnCが、パラニトロフェニル-Nアセチルグルコサミン(GlcNAc-pNP)や以下に示すような化合物を糖供与体として、ガラクトース(Gal)へ転移するかどうかを調査してきたが、AgnCには糖を転移する機能(転移機能)を全く有しないことがわかった。

【0008】

発明者らは上記の現状を踏まえ、他の宿主由来の酵素に転移機能があるかどうかを調査し、その結果、一部の腸内細菌の酵素に、効率的にGlcNAcを結合型でGalに転移する機能があることを見出している（特許文献2）。当該発明の技術的特徴は、水溶液中で一段階で調製可能な糖供与体（Nアセチルグルコサミニルジメトキシトリアゾール、GlcNAc-DMT）を、バクテロイデスセタイオタオミクロン（*Bacteroides thetaiotaomicron*）由来のNアセチルグルコサミニダーゼ（AgnBT）の作用によって、Galを含む糖受容体にGlcNAcを転移させるというものである。この方法によって、GlcNAc₁₋₄Galを含むオリゴ糖鎖が調製できることが示された。また、これらの方法によって得られたオリゴ糖は、すでに抗ピロリ菌活性があること（非特許文献9）が示唆されている。しかし、それらのオリゴ糖の効果の程度はあくまでも数百μMレベルである上に、そのオリゴ糖の調製において、糖受容体となるオリゴ糖（Galを末端に有する化合物）の調製工程が煩雑となるデメリットが課題となっている。

10

【0009】

そこで発明者らは、GlcNAcを結合で末端に有しないムチン型糖蛋白質糖鎖へ、結合型GlcNAcを導入するために上記の転移手法（特許文献2に記載の方法）を試みたが、ほとんど導入された生成物を得ることはできなかった。この原因として、酵素の触媒領域が、目的とする反応点（すなわちガラクトース）が密集するムチン型糖蛋白質糖鎖に埋もれてしまい、近づけないことにあると考えられた。従って、ムチン型糖蛋白質糖鎖を糖受容体とする上記AgnBTの糖転移反応において、酵素を反応点に近づける工夫をすることで、転移活性を向上させる必要性が生じていた。

20

【0010】

本発明者らは上記の状況に鑑み、糖蛋白質に親和性を有するCBMの利用について検討した。CBMは微生物由来のものが多く、遺伝子工学的にも利用しやすいからである。すなわち、上記のAgnCのCBMが糖蛋白質糖鎖に親和性を有するので、このようなCBMを酵素の転移反応に利用できないかを考えた。

【0011】

CBMはアミノ酸配列の相同性から、現在、64のグループに分類されており（非特許文献10）、糖質関連酵素類に付随して見いだされる。各ファミリーにおいて、それぞれX線結晶構造解析などの3次元構造解析データ等から、糖基質に対し結合するために必須のアミノ酸残基が定義されている。これまでにセルロースやアミロースなどの多糖に親和性を有するCBMが多数報告されてきたが、近年、多くのファミリーに、糖蛋白質糖鎖に対して親和性を持つCBMがあることがわかってきている。

30

【0012】

今までにいくつかのCBMとの融合化酵素が報告されている。例えば古くからセルラーゼにCBM（セルロースの構成単位である結合型グルコースに親和性を有する）を導入し、セルロース粉末をセロオリゴ糖にする試みは報告されている。また、セロデキストリンを加リン酸分解する酵素へセルロースに結合するCBMを導入することで、その酵素の活性を2-3倍に向上させている（非特許文献11）。一方糖蛋白質糖鎖については、近年、N-結合型糖蛋白質糖鎖を加水分解する酵素にセルロースに親和性のあるCBM（非特許文献12）を酵素のN末端領域にCBMを導入し、その活性が一部の融合体において維持されることが報告されているが、活性の向上は報告されていない。

40

【0013】

このように、今までに、セルロースやキチンといったヒトの生体にはない糖鎖（多糖）への応用例は上述のように多数存在するが、ヒトの生体内の糖鎖（糖蛋白質糖鎖）そのものをターゲットにした例はほとんどない。また、上記のセルロースやキチンといった多糖に親和性を有するCBMと、O-結合型グリカンやN-結合型グリカンなどの生体内に多くみられる糖鎖に対して親和性を有するCBMでは、アミノ酸配列においては別のグループに属し（非特許文献13）、性質もかなり異なると考えられる。

50

【0014】

以上の事実から、糖蛋白質糖鎖に親和性を有するCBM（たとえば上述のGlcnAc含有ムチン型糖蛋白質糖鎖）を、適当なリンカーを介して他の機能を有する蛋白質に融合/導入させることで、融合させる前の機能を維持すれば、目的とする糖蛋白質に、目的とする糖を効率的に導入（糖転移）できるような、新規でかつ有効な手法になりうる、という考えに想到した。

【0015】

糖質加水分解酵素（微生物由来）は工業レベルでの生産性は高いが、その糖転移反応によって生産されている目的物が、未だにほとんどがオリゴ糖合成レベルにあるのが現状である。したがって、本発明が、医療分野に有用な“糖蛋白質糖鎖”を工業レベルで調製するための重要な手段になりうるものと考えた。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0016】

【特許文献1】国際公開第2008/084561号パンフレット

【特許文献2】特開2011-244832号公報

【非特許文献】

【0017】

【非特許文献1】パンデー アール (Pandey R) ら、アジア太平洋ジャーナル オブ キャンサー プリベンション (Asian Pacific Journal of Cancer Prevention)、2010年、第11巻、p. 583 - 588 .

20

【非特許文献2】キムラ ケー (Kimura K)、プロバイオティクスとバイオジェニクス、2005年、p. 345 - 356 .

【非特許文献3】ミカミ ワイ (Mikami Y) ら、モダン パソロジー (Modern Pathology)、2004年、第17巻、p. 962 - 972 .

【非特許文献4】ヒライ ワイ (Hirai Y) ら、ジャーナル オヴ バクテリオロジー (Journal of Bacteriology)、1995年、第177巻、p. 5327 - 5333 .

【非特許文献5】カワクボ エム (Kawakubo M) ら、サイエンス (Science)、2004年、第305巻、p. 1003 - 1006 .

30

【非特許文献6】イシハラ ケイ (Ishihara K) ら、バイオケミストリー ジャーナル (Biochemistry Journal)、1966年、第318巻、p. 409 - 416 .

【非特許文献7】モルカノバ (Molchanova V) ら、バイオキミカ バイオフィジカ アクタ (Biochimica et Biophysica Acta)、2005年、第1723巻、p. 82 - 90 .

【非特許文献8】フジタ エム (Fujita M) ら、ジャーナル オヴ バイオロジカル ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)、2011年、第286巻、p. 6479 - 6489 .

40

【非特許文献9】リー エッチ (Lee H) ら、バイオケミカル アンド バイオフィジックス リサーチ コミュニケーション、2006年、第349巻、p. 1235 - 1241 .

【非特許文献10】CAZyサイト、インターネット (URL: <http://www.cazy.org>)

【非特許文献11】シンハオ イー (Xinhao Y) ら、アプライド マイクロバイオロジー アンド バイオテクノロジー (Applied Microbiology and Biotechnology)、2011年、第92巻、p. 551 - 560 .

【非特許文献12】クワン イー エム (Kwan E M) ら、プロテイン エンジニアリング デザイン アンド セレクション (Protein Engineering

50

Design and Selection)、2005年、第18巻、p.497-501.

【非特許文献13】ガイランディー(Guillen D)ら、アプライド マイクロバイオロジー アンド バイオテクノロジー(Applied Microbiology and Biotechnology)、2010年、第85巻、p.1241-9.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

本発明は前記の課題を解決するためになされたもので、糖蛋白質糖鎖に目的とする糖を効率的に導入するために、糖蛋白質糖鎖に親和性を有するCBMと糖質関連酵素との融合蛋白質が、融合前の機能を維持し、かつ糖蛋白質調製にとって有用な機能を新たに付与することにある。具体的にはGlcNAc 1-4Galを含むムチン型糖蛋白質糖鎖に特異的に結合するCBM領域のポリペプチドを、酵素機能を有するポリペプチドに融合させ、その融合前の酵素に比べ酵素機能を向上させる。すなわち結果としてGlcNAcをムチン型糖蛋白質糖鎖に選択的に効率的に導入することである。

10

【課題を解決するための手段】

【0019】

本発明においては、糖質関連酵素そのもの、もしくはその触媒領域のNもしくはC末端に、他の糖蛋白質糖鎖に関する糖質関連酵素のCBM領域(すなわち糖蛋白質に結合するCBM)を融合させたキメラ型ポリペプチド(実施例1)を、糖供与体存在下、糖受容体となる糖蛋白質糖鎖に緩衝溶液中で作用させることにより、糖転移活性を向上させ、目的の糖が導入された糖蛋白質を得ることができる。なお、CBMと触媒領域のリンカーは10アミノ酸残基以上あればよいが、CBMを有する元の酵素の、そのCBMのN末端よりも10アミノ酸残基上流の配列を用いることによって、融合後も、その酵素機能をそれぞれ維持する可能性を高める。

20

【0020】

具体的には、GHファミリー89に属するAgnCのCBM2から6までの領域のうちCBM一つ以上の長さの領域(図1)を、同じGHファミリー89に属するAgNBのC末端にアミノ酸残基数25残基のポリペプチドを介して融合させたポリペプチド(キメラ型蛋白質)を緩衝溶液中、糖供与体(GlcNAc-DMT)存在下、糖受容体(ムチン型糖蛋白質)に作用させることで、効率的にGlcNAc含有ムチン型糖蛋白質を得る(実施例7、実施例9)。なお、この時アミノ酸残基数10残基以上の長さのポリペプチド部位があれば、酵素機能が維持される。また、本発明のポリペプチドは、オリゴ糖だけでなく糖蛋白質糖鎖に対する加水分解活性(GlcNAcを遊離する活性)の向上をもたらす(実施例2、実施例3および実施例6)。以上の方法により、目的とする糖(GlcNAc)を目的とする結合様式(立体選択率100%)で導入することができる。酵素(触媒領域)が厳密な立体選択性を有するからである。

30

【0021】

すなわち、本発明は、以下のポリペプチド(キメラ型ポリペプチド)の使用法、およびそのキメラ型ポリペプチドに関する。

40

(請求項1) 糖蛋白質糖鎖に結合する糖結合モジュール(CBM)領域を、他の糖質関連酵素またはその触媒領域に融合させてキメラ型ポリペプチドにすることによって、その糖質関連酵素またはその触媒領域の機能を向上させ、または新たな機能を付与する方法。

(請求項2) その糖質関連酵素またはその触媒領域の機能または新たな機能が、糖供与体を用いて目的とするオリゴ糖、多糖または糖蛋白質糖鎖に糖を導入する糖転移活性である請求項1に記載の方法。

(請求項3) その糖質関連酵素またはその触媒領域の機能または新たな機能が、オリゴ糖、多糖または糖蛋白質糖鎖に対する加水分解活性である請求項1に記載の方法。

(請求項4) その糖質関連酵素またはその触媒領域の機能または新たな機能が、有機溶剤耐性である請求項1に記載の方法。

50

(請求項5) 糖蛋白質糖鎖に結合する糖結合モジュール(CBM)領域が、CBMファミリー32に属するCBM領域である請求項1に記載の方法。

(請求項6) 糖蛋白質糖鎖に結合する糖結合モジュール(CBM)領域が、グリコシルヒドロラーゼファミリー89(GH89)に属する-N-アセチルグルコサミニダーゼに付随するCBM領域である請求項1に記載の方法。

(請求項7) 他の糖質関連酵素が、グリコシルヒドロラーゼファミリー89(GH89)に属する-N-アセチルグルコサミニダーゼである請求項1に記載の方法。

(請求項8) 融合の際にスペーサーとして、糖蛋白質糖鎖に結合する糖結合モジュール(CBM)領域の元の酵素においてそのCBM領域のN末端に隣接する10アミノ酸残基以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドを用いる請求項1に記載の方法。

10

【0022】

(請求項9) 糖蛋白質糖鎖に結合する糖結合モジュール(CBM)領域を、他の糖質関連酵素またはその触媒領域に融合させたキメラ型ポリペプチド。

(請求項10) 糖蛋白質糖鎖に結合する糖結合モジュール(CBM)領域が、CBMファミリー32に属するCBM領域である請求項9に記載のキメラ型ポリペプチド。

(請求項11) 糖蛋白質糖鎖に結合する糖結合モジュール(CBM)領域が、グリコシルヒドロラーゼファミリー89(GH89)に属する-N-アセチルグルコサミニダーゼに付随するCBM領域である請求項9に記載のキメラ型ポリペプチド。

(請求項12) 他の糖質関連酵素が、グリコシルヒドロラーゼファミリー89(GH89)に属する-N-アセチルグルコサミニダーゼである請求項9に記載のキメラ型ポリペプチド。

20

(請求項13) 融合のスペーサーとして、糖蛋白質糖鎖に結合する糖結合モジュール(CBM)領域の元の酵素においてそのCBM領域のN末端に隣接する10アミノ酸残基以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドを有する請求項9に記載のキメラ型ポリペプチド。

【発明の効果】

【0023】

本発明の様々なCBMを有するキメラ型ポリペプチドによって、目的とする糖蛋白質に目的とする糖をその非還元末端に導入することができる。すなわち、*in vitro*における新たな糖残基の導入においては、糖鎖が密集しているような糖蛋白質に対しては、酵素的糖転移反応による糖の導入が進行しにくかったが、本発明によって、顕著に目的とする糖残基が導入できることになる。

30

【0024】

本発明の請求項5から7に記載の方法によって、結合型GlcNAcをガラクトースが密集した糖鎖(O-グリカン)へ効率的に導入できる(実施例9)。なお、これにより調製後、さらにGlcNAc₁₋₄Gal₁残基含有O-グリカンに親和性を有するCBM(CBM4、特許文献3に記載)を固定化したものなどを用いて結合型GlcNAcを非還元末端に有するO-グリカンを精製(高純度化)することができる。

【0025】

GlcNAc₁₋₄Gal₁残基を含有するO-グリカンは、ある特定のムチン型糖蛋白質(Muc6)のみに存在するものである。しかし、本発明のポリペプチドは、ガラクトースを末端に有する糖蛋白質糖鎖であれば、そのガラクトースにGlcNAcを転移するものであるため、様々な糖蛋白質(ガラクトースを非還元末端に有するグリカンを有する糖蛋白質)を糖受容体とすることができ、たとえば安価な卵白ムチンなどへも結合型GlcNAc残基を導入することができることになる。また、本発明のポリペプチドと同様の方法で、他の多くの種類の糖蛋白質糖鎖を調製できることになる。なぜなら、糖供与体としては、シアル酸、ガラクトース、フコースやNアセチルガラクトサミンなどの、糖蛋白質糖鎖を構成する糖、もしくはそれらを含むオリゴ糖鎖に脱離基を導入させることによって糖供与体(加水分解酵素や糖転移酵素に対する基質となり、糖転移するための基質(糖供与体)となるもの)へ誘導する合成法は確立されており、これに対応する糖質関

40

50

連酵素は、すでに多くの種類が見いだされ、かつ予想されているからである（上述のC A Z y サイトなど）。

【0026】

また、上述のようなC B Mの融合化は、酵素本来の機能（たとえば加水分解活性）の優位な上昇をもたらすことになる（実勢例2、実施例3、実施例6）。したがって、あるオリゴ糖分子に特異性を有する酵素に対し、そのオリゴ糖を有する糖蛋白質糖鎖に対して機能を上昇させたい場合に、その糖蛋白質糖鎖の非還元末端に位置する糖残基に親和性を有するC B M、特にタンデム型C B Mを上述のような方法によって導入（融合化）させることで、目的を達成させることができる。たとえば、セリンやスレオニンに結合したN - アセチルガラクトサミンを含むオリゴ糖（Gal 1 3 GalNAc - Ser / Thr）をエンド型で加水分解する酵素（エンド N - アセチルガラクトサミニダーゼ）（アシダ エッチ（Ashida H）ら、グライコバイオロジー（Glycobiology）、2008年、第18巻、p. 727 - 734）に、ムチン型糖蛋白質糖鎖の非還元末端に位置するガラクトースやシアル酸に親和性を有するタンデム型C B M（本発明のものに限られない）を酵素に導入することで酵素活性を優位に上昇させることができ、結果的に、加水分解されにくい糖蛋白質糖鎖から、様々なO - グリカンのライブラリーを調製できることになる。

10

【0027】

さらに、本発明のキメラ型ポリペプチド（キメラ型酵素）は、種々の有機溶剤との混合溶媒中でも酵素活性（糖転移反応）において有利な効果をもたらす（実施例8）。すなわち、本発明のように、C B Mを酵素機能を有する蛋白質へ導入することは酵素の有機溶剤耐性化をもたらすと考えられ、結果的に糖脂質類の加水分解活性の向上、および、糖供与体存在下、脂質類への配糖化も可能となる。

20

【0028】

本発明のキメラ型酵素により得られた 結合型O - グリカン含有する糖蛋白質糖鎖は、飲食品として含有させて用いることにより、胃疾患を軽減したり治癒したり予防したりするのに有用である。その物質が強いピロリ菌増殖抑制作用を発現するから、飲食品にピロリ菌増殖抑制剤を少量添加するだけで優れた抗ピロリ菌作用を奏する。

【0029】

本発明のキメラ型酵素により得られた 結合型O - グリカン含有する糖蛋白質糖鎖は、医薬製剤として、もしくは抗生物質（ピロリ菌に効果のある）と併用して服用することにより、ピロリ菌に由来する慢性胃炎や胃潰瘍等の胃疾患の治療・症状緩和・予防に用いられる。また、糖鎖含有物質が強いピロリ菌特異的増殖抑制作用を発現するので、この医薬製剤を少量服用するだけで優れた抗ピロリ菌作用を奏し、副作用が発現せず、内科的治療で胃疾患を治癒するのに有用である。

30

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】 - N - アセチルグルコサミニダーゼホモログのアミノ酸配列の一次構造。C B M：糖結合モジュール、F I V A R：found in various architecture domain、T M：transmembrane domain

40

【図2】 GlcNAc - - Gal - - pMP基質に対する加水分解活性のHPLCによる検出

【図3】 GlcNAc - 含有Class III MucinからのGlcNAcの遊離

【図4】 AgnBT1キメラ酵素のClass III Mucinに対する加水分解活性

【図5】 AgnBT1 - キメラ酵素の GlcNAc 転移活性能（酵素濃度の検討）

【図6】 AgnBT1 - キメラ酵素の GlcNAc 転移活性能（有機溶媒（5% v/v）による影響）

【図7】 Mucinに対するAgnBT1キメラ酵素の GlcNAc 転移活性能

50

【発明を実施するための形態】

【0031】

C B M は、細菌類から哺乳類などの高等生物を宿主とした糖質関連酵素に広く見いだされ、特に腸内細菌や土壌中に見い出される細菌類の糖質加水分解酵素に顕著に見いだされる。請求項1では、糖蛋白質糖鎖に親和性を有するC B M と糖質関連酵素の融合化が酵素活性を向上させ、新たな機能が付与させることが記載されている。ここでターゲットとする糖蛋白質糖鎖があり、そのうちターゲットとする糖部位が決まっているのであれば、その糖部位を含むオリゴ糖部位に作用する酵素を選定し、かつその糖蛋白質糖鎖に親和性を有するC B M を選択すればよい。ここでC B M は、糖蛋白質糖鎖を構成する糖である、ガラクトース(G a l)、フコース(F u c)、シアル酸(S i a、(Nアセチルノイラミン酸(N e u A c)およびNアセチルグリコール酸(G l c A c)を含む)、Nアセチルガラクトサミン(G a l N A c)に親和性を有するもののうち、糖転移反応等のターゲットにしたいものを上述のC A Z y サイト等によって選ぶことができる。この中で、すでに糖蛋白質糖鎖に対して親和性を有する旨の報告のあるものが特に望ましい(C B M ファミリー13、32、40、47、(50)、(51)、57)。なお、同じファミリー内でも親和性を有する糖蛋白質糖鎖の種類にそれぞれ違いがある可能性はある。また、C B M を導入させたい酵素は、糖質関連酵素であれば特に制限はないが、以下に示すように、同じG H (もしくは糖転移酵素(G T))ファミリー間での融合(すなわち、融合される前の酵素ファミリーと、導入させようとするC B M を有する酵素のファミリーが同じものどうしでの融合)は特に好ましい。

10

20

【0032】

請求項2から4までに、上述した請求項1に記載されたポリペプチドによる方法と同様に、糖蛋白質糖鎖に対する糖転移、糖の遊離(加水分解)および有機溶剤耐性化を行う場合に用いられる方法であることが記載されている。また、その時に用いられるポリペプチドがそれぞれ請求項9と請求項10に記載されている。請求項2に記載の糖転移においては、糖供与体となるものと糖受容体となるものの組み合わせであればよく、糖受容体として糖転移したい部位を非還元末端に有している糖蛋白質であれば、どのような糖蛋白質へも当該方法を用いることができる。また、糖供与体および糖受容体ともに緩衝液に溶解していればどのような濃度でも用いることができる。請求項3に記載の加水分解においても同様に、糖供与体非存在下では、糖蛋白質そのものを加水分解する方法として用いることができる。この場合も同様に、糖蛋白質が緩衝液に溶解していればどのような濃度でも用いることができる。請求項4では、請求項1に記載の方法が、目的とする酵素の有機溶剤耐性獲得のために用いられることができることが記載されている。ここで用いることができる有機溶剤とは、実施例8にあるように、テトラヒドロフラン(T H F)、アセトニトリルおよびアセトンなどの非プロトン性溶剤であり、その他、緩衝液と混和する溶剤であればどのようなものも用いることができる。なお、用いる溶剤の濃度は、導入される糖質関連酵素および導入するC B M にもよるが、緩衝液に対し0~80%/V o lまで用いることができ、融合前に有機溶剤耐性が全くなかった酵素に対しては、5~20%/V o lの有機溶剤中で顕著な活性を有する。一方、プロトン性溶剤(アルコール類)は、溶剤そのものが糖受容体となりうるので、目的とする反応を阻害する結果となりうる。また、クロロホルム、ヘキサン、エーテルおよびトルエンなど緩衝液と混和しない溶剤を用いた場合は、糖転移活性は維持されるが、反応効率が低くなるおそれがある。

30

40

【0033】

請求項5に記載のC B M 32ファミリーとは、上述のC A Z y サイトに記載のC B M 32ファミリーに属するC B M であり、この中から特に糖蛋白質糖鎖に結合するという報告のあるもの(あるいは推定されているもの)を利用することが好ましい。

【0034】

請求項6(方法)および11(請求項6に用いられる物)に記載のC B M は、G H 89ファミリーに付随するC B M であることが記載されている。以下の実施例には、G H 89ファミリーに属する、腸内細菌のクロストリジウム パーフリンジェンス(C l o s t r

50

idium perfringens strain 13)由来の - N - アセチルグルコサミニダーゼ (AgnC) の C 末端に付随するタンデム型の C B M が有効であることが記載されている。ここで、このようなタンデム型 C B M については、それらのうち 1 つ以上の C B M が目的とする酵素に導入されれば、機能の向上等が期待できる。AgnC と同様に、ビフィドバクテリウム ビフィダム (Bifidobacterium bifidum)、ユーバクテリウム ドリカム (Eubacterium dolichum) やコリンセラ スターコリス (Collinsella stercoris) にも、同様にタンデム型 C B M が見られる (図 1) が、同様に用いることができる。なお、この時、導入する C B M の数が増えるほど、糖蛋白質に対する親和性の向上が期待できるので、加水分解活性や糖転移活性の向上等がさらに期待できることになる。

10

【 0 0 3 5 】

請求項 7 (方法) および 1 2 (請求項 7 に用いられる物) には、導入させようとする糖質関連酵素が、グリコシルヒドロラーゼファミリー 8 9 (GH 8 9) に属する - N - アセチルグルコサミニダーゼの触媒領域であることが記載されている。なお、GH 8 9 とは、アシドバクテリウム カプスラタム (Acidobacterium capsulatum)、アカルマンシア ムシニフィリア (Akkermansia muciniphila)、アリスチペス シャヒー (Alistipes shahii)、アステカコーリス エクセントリカス (Asticcacaulis excentricus)、バクテロイデス キシラニソルベンツ (Bacteroides xylosohlvents)、バクテロイデス フラジリス (Bacteroides fragilis)、バクテロイデス ヘルコジェネス (Bacteroides helcoqenes)、バクテロイデス サラニトロニス (Bacteroides salanitronis)、バクテロイデス セタイオタオミクロン (Bacteroides thetaiotaomicron)、バクテロイデス バルガタス (Bacteroides vulgatus)、ビューテンバルジア カバルナエ (Beutenbergia cavernae)、ビフィドバクテリウム ビフィダム (Bifidobacterium bifidum)、ブラキバクテリウム ファシウム (Brachybacterium faecium)、カンジダタス アルスロミタス (Candidatus Arthromitus)、カウロバクター クレッセントス (Caulobacter crescentus)、カウロバクター セグニス (Caulobacter segnis)、キチノファーガ ピネンシス (Chitinophaga pinennsis)、クロストリジウム パーフリンジェンス (Clostridium perfringens)、クロストリジウム スピロフォルメ (Clostridium spiriforme)、フラボバクテリウム ジョンソニー (Flavobacterium johnsoniae)、グラニューリセラ マレンシス (Granulicella mallensis)、ニアステラ コリーンシス (Niastella koreensis)、ボルジバクター プロピオニシジェネス (Paludibacter propionici genes)、ペドバクター ヘパリナス (Pedobacter heparinus)、ペドバクター サルトランス (Pedobacter saltans)、プレボテラ ルミニコーラ (Prevotella ruminicola)、サルモネラ エンテリカ (Salmonella enterica)、スタックブランジア ナツソエンシス (Stackebrandtia nassauensis)、ストレプトミセス アンボファシエンス (Streptomyces ambofaciens)、ストレプトミセス アベルミチリス (Streptomyces avermitilis)、ストレプトミセス ビンケンジェンシス (Streptomyces bincenggenis)、ストレプトミセス スカビー (Streptomyces scabiei)、ストレプトミセス ベネズエラエ (Streptomyces venezuelae)、ストレプトミセス ビオラセウスニガー (Streptomyces violaceus niger)、テリグロバス サーネンシス (Terriglobus saanensis)、キサントモナス アクソノポディス (Xanthomona

20

30

40

50

s axonopodis)、キサントモナス オリゼー (Xanthomonas oryzae)、ゾベリア ガラクタニボランス (Zobellia galactanivorans)、ズノンワンジア プロファンダ (Zunongwangia profunda)、アノフェレス ガンビア (Anopheles gambiae)、アラビドプシス タリアーナ (Arabidopsis thaliana)、アスパルギルス オリゼー (Aspergillus oryzae)、ボス タウロス (Bos taurus)、カエノラブディティス ブリグサエ (Caenorhabditis briggsae)、カエノラブディティスエレガンス (Caenorhabditis elegans)、チェロナス イナニタス (Chelonus inanitus)、ドロマイウス ノバホランディー (Dromaius Novaehollandiae)、ドロソフィラ メラノガスター (Drosophila melanogaster)、ホモサピエンス (Homo sapiens)、マイクロモナス (Micromonas)、マス マスキュラス (Mus musculus)、ニコチアナ タバカム (Nicotiana tabacum)、オリザ サティバ インディカ (Oryza sativa Indica)、オリザ サティバ ジャポニカ (Oryza sativa Japonica)、ビティス ビニフェラ (Vitis vinifera)、ジーマイス (Zea mays)、由来の -N-アセチルグルコサミニダーゼであることを示す (CAZYサイト参照)。

10

【0036】

また、請求項8 (方法) および13 (請求項8に用いられる物) に記載の、融合しようとするCBMと、融合される糖質関連酵素の触媒部位とのリンカー用のポリペプチドとしては、CBMの方のN末端側から上流の10~25残基程度 (CBMを付随していた酵素において、そのCBMのN末端アミノ酸部位から10~25残基程度N末端側にあるポリペプチド部位) を用いることで、融合されたポリペプチドが酵素活性を維持もしくは向上しやすくなる。本発明のAgnCのCBMにおいては、AgnCのN末端側から2番目のCBM (触媒領域のC末端側へ1番目のCBM) のN末端からN末端方向に20残基の領域と、それを導入するために用いた制限酵素部位の追加による2残基のアミノ酸配列によって、以下の実施例のように酵素活性が維持されている。

20

【0037】

AgnCのC末端に付随する複数のCBM領域のN末端側から2番目から6番目までのポリペプチドとAgnBTとのキメラ蛋白は、特許文献3を参照し、以下の実施例1のように調製することができる。また、その他GH89のホモログからのCBMと他のGH89の触媒領域との組み合わせについても同様にキメラ型として調製することができる。

30

【0038】

さらにこれらのキメラ型ポリペプチドは、担体へ固定化して用いることもできる。担体への固定化においては、ヒスチジンタグ (His) やグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) などのタグを、N末端およびC末端のどちらの方向へもキメラ型ポリペプチドへ導入が可能である。

【0039】

本発明 (請求項6および11に記載) において調製したポリペプチドの、糖転移反応の場合におけるGal 残基含有O-グリカン、および糖加水分解反応時におけるGlcNAc 1-4Gal 残基含有O-グリカンに対する親和性を発揮する条件は、pH4から9の緩衝溶液中であれば用いることができるが、具体的には以下ようになる。

40

【0040】

溶液は、リン酸緩衝液、炭酸緩衝液、トリス緩衝液などの例を挙げることができ、特にリン酸緩衝化生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) が好ましい。溶液のpHは、中性付近が好ましく、pH6.0からpH8.0が特に好ましい。反応の温度は、15 から40 が好ましく、25 が特に好ましい。基質であるオリゴ糖の濃度は、加水分解および糖転移反応のいずれにおいても、反応させるための条件においては、基質が緩衝溶液に溶解していればよく、数十ミリM程度まで用いるこ

50

とができる。なお、糖転移反応において、糖受容体となる糖蛋白質の濃度および糖供与体の濃度においても、それらが溶解していればよく、数十 μM から数百 μM まで用いることができる。用いるべき糖供与体としては、糖転移反応の基質となるものであれば何でもよい。なお、糖供与体においては、O-結合型グリカンでは糖蛋白質糖鎖の多くの非還元末端に糖を転移させるので、糖受容体の数十から数百倍以上の濃度で糖転移収率は向上する。反応の時間は、加水分解反応や糖転移反応のいずれも本発明のポリペプチド(キメラ蛋白)濃度が数 μM から数百 μM で数十分から10時間が好ましく、30分~5時間程度が特に好ましい。しかしながら糖転移反応ではポリペプチド濃度が数十 nM 以下では5時間以上で比較的反応率が高くなる傾向にある。反応容器においては、系内の温度を制御でき、かつ溶解しているタンパク質や糖質化合物を特に吸着させるものでないかぎり、どのようなものを用いてもよい。また、反応においては、攪拌や振とうを行えば、反応時間を短縮することができる。

10

【実施例】

【0041】

以下に、本発明のキメラ型ポリペプチドを調製し、その機能を調査した実施例を挙げて具体的に説明するが、本発明を何ら限定するものではない。

[実施例1]

(1.1) CBM結合キメラタンパクの触媒部位となるHis-tag融合タンパク質(AgnBT1)の取得

バクテロイデス菌(*Bacteroides thetaiotaomicron* VPI 5482)のゲノムを鋳型として、センスプライマーBamHI-BT1 32(下線は制限酵素BamHIサイトを示す)(GCG GAT CCC GAT CCC CAA TCG ATT CAT TG)(配列表配列番号1)と、アンチセンスプライマーBT1 32-SacI(下線はSacIサイト)(GTG AGC TCC TTT GCT TCA ATC GC)(配列表配列番号2)を用い、DNAポリメラーゼPrimeStar(Takara製)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 30秒、63.5 30秒、72 33秒で30サイクル行なう))を行ない、増幅後AgnBT1-DNA断片(2,149bp)を得た。得られた産物に対して制限酵素(BamHIおよびSacI)処理を行なった後、タンパク質発現用ベクターpET32a(+)へ、制限酵素サイト(5'末端側にBamHIと3'末端側にSacI)でライゲーション反応を行ない、発現宿主である大腸菌(*E. coli* (BL21(DE3)株)へ形質転換操作し、アンピシリン濃度50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含有するLB寒天培地上で、その形質転換操作体を得た。これをアンピシリン濃度50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含有するLB培地中(2ml)で前培養し、さらに同培養液400mlへ全量植菌し、OD600で0.7になるまで37で震盪培養した後、IPTGを0.1mMになるように添加し、室温で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した。遠心後上清を除去したのち、集められた菌体へPBS溶液(50mM PBS, 300mM NaCl)を4ml加えて懸濁した後、リゾチーム(10mg/ml)を0.75mg/mlとなるよう添加し、さらにPBS溶液を加え全量を4mlとした。この懸濁溶液を氷上で超音波破碎し、20000 $\times g$ 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(TALON Metal affinity resins, clontech社製)により精製した。この溶液を、限外濾過膜(排除分子サイズ 30000)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、精製体として、1000ml培養当たり約20mgで得ることができた(図1)。得られたタンパクはHis-tag融合タンパクのまま、後の解析に用いた。また、調製したAgnBTタンパク発現ベクターは、キメラタンパク発現ベクターの調製のために引き続き用いた。

20

30

40

【0042】

(1.2) His-tag融合CBM2-キメラタンパク質の取得(AgnBT1-CBM2)

50

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens* strain 13) のゲノムを鋳型として、CBM2とその前後領域 (N末端側からアミノ酸912番目~1090番目) の遺伝子配列を、センスプライマー SacI - CBM2 (下線は制限酵素 SacI サイトを示す) (CGG AGC TCA TGG ATA AAA TAT TAG G) (配列表配列番号3) と、アンチセンスプライマー CBM2 - XhoI (下線は XhoI サイト) (AAC TCG AGT TCC TTT TCT TTT C C) (配列表配列番号4) を用い、DNAポリメラーゼ PrimeStar (Takara 製) 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 5秒、58.1 30秒、72 1分で30サイクル行なう)) を行ない、増幅後 CBM2 - DNA断片 (487bp) を得た。得られた産物に対して制限酵素 (SacI および XhoI) 処理を行なった後、上記で作製した AgnBT1 タンパク発現 pET32a (+) ベクターへ、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ない、発現宿主である大腸菌 (*E. coli* (BL21 (DE3) 株) へ形質転換操作し、アンピシリン濃度 50 µg/ml を含有する LB 寒天培地上で、その形質転換操作体を得た。これをアンピシリン濃度 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 400ml へ全量植菌し、OD600 で 0.7 になるまで 37 で震盪培養した後、IPTG を 0.1 mM になるように添加し、室温で 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した。遠心後上清を除去したのち、集められた菌体へ PBS 溶液 (50 mM PBS, 300 mM NaCl) を 4ml 加えて懸濁した後、リゾチーム (10 mg/ml) を 0.75 mg/ml となるよう添加し、さらに PBS 溶液を加え全量を 4ml とした。この懸濁溶液を氷上で超音波破碎し、20000 × g 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 (TALON Metal affinity resins, clontech 社製) により精製した。この溶液を、限外濾過膜 (排除分子サイズ 30000) 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、精製体として、1000ml 培養当たり約 21 mg で得ることができた (図1)。His-tag 融合タンパクのまま、後の解析に用いた。

【0043】

(1.3) His-tag 融合 CBM2 - 6 - キメラタンパク質の取得 (AgnBT1 - CBM2 - 6)

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens* strain 13) のゲノムを鋳型として、CBM2~6とその前後領域 (N末端側からアミノ酸912~1640) の遺伝子配列を、センスプライマー SacI - CBM2 (下線は制限酵素 SacI サイトを示す) (CGG AGC TCA TGG ATA AAA TAT TAG G) (配列表配列番号5) と、アンチセンスプライマー CBM26 - XhoI (下線は XhoI サイト) (ATC TCG AGT GAA GTG GAA TCT C) (配列表配列番号6) を用い、DNAポリメラーゼ PrimeStar (Takara 製) 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 5秒、59.7 30秒、72 33秒で28サイクル行なう)) を行ない、増幅後 CBM2 - 6 - DNA断片 (2,173bp) を得た。得られた産物に対して制限酵素 (SacI および XhoI) 処理を行なった後、上記で作製した AgnBT1 タンパク発現 pET32a (+) ベクターへ、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ない、発現宿主である大腸菌 (*E. coli* (BL21 (DE3) 株) へ形質転換操作し、アンピシリン濃度 50 µg/ml を含有する LB 寒天培地上で、その形質転換操作体を得た。これをアンピシリン濃度 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 400ml へ全量植菌し、OD600 で 0.7 になるまで 37 で震盪培養した後、IPTG を 0.1 mM になるように添加し、室温で 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した。遠心後上清を除去したのち、集められた菌体へ PBS 溶液 (5

10

20

30

40

50

0 mM PBS, 300 mM NaCl) を 4 ml 加えて懸濁した後、リゾチーム (10 mg/ml) を 0.75 mg/ml となるよう添加し、さらに PBS 溶液を加え全量を 4 ml とした。この懸濁溶液を氷上で超音波破碎し、20000 × g 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 (TALON Metal affinity resins, clontech 社製) により精製した。この溶液を、限外濾過膜 (排除分子サイズ 30000) 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、精製体として 1000 ml 培養当たり約 19 mg で得ることができた (図 1)。His-tag 融合タンパクのまま、後の解析に用いた。

【0044】

[実施例 2]

4-ニトロフェニル誘導体 (GlcNAc - - pNP) に対する酵素活性

上記で調製した各タンパク溶液 (31 - 34 μg/μl) を 3 - 5 μl、15 mM GlcNAc - - pNP 溶液を 20 μl、10 倍濃縮 PBS (pH 7.4) 溶液を 10 μl 添加し、滅菌水により全量を 100 μl とした。これを攪拌しながら、37 °C でインキュベートした。一定時間反応後、遊離した pNP 量を吸光度計で測定することで比活性および反応速度を算出し、各タンパク質の GlcNAc - - pNP 基質に対する反応性を比較した。(表 1) CBM2 を付与したキメラタンパク (AgnBT1 - CBM2) では、野生型の AgnBT1 タンパクよりも Vmax 値が約 1.3 倍、比活性が約 1.2 倍向上した。一方、CBM2 - 6 を付与したキメラタンパク (AgnBT1 - CBM2 - 6) では、有意な活性の向上は見られなかった。

<表 1> GlcNAc - - pNP に対する加水分解活性の速度論的解析

【0045】

【表 1】

Kinetic parameters	GlcNAc α pNP		
	V _{max} U/mg	K _m mM	Specific activity* μmol/min/mg
AgnC	0.14 (K _{cat} =0.68/s)	4.3 (K _{cat} /K _m =0.16)	0.1
AgnBT1	0.06 (K _{cat} =0.54/s)	50.4 (K _{cat} =0.01)	0.29
AgnBT1-CBM2	7.7 (K _{cat} =2.23/s)	21.3 (K _{cat} /K _m =0.11)	3.54
AgnBT1-CBM2-6	0.08 (K _{cat} =1.44/s)	36.1 (K _{cat} /K _m =0.04)	0.38

【0046】

[実施例 3]

4-メトキシフェニル誘導体 (GlcNAc - - Gal - - pMP) に対する酵素活性

15 mM GlcNAc - - Gal - - pMP を 2 μl、上記で調製した各タンパク溶液 (3.1 - 3.4 μg/μl) を 1 μl、10 倍濃縮 PBS (pH 7.4) 溶液を 1 μl 添加し、滅菌水により全量を 10 μl とした。反応溶液を攪拌しながら、37 °C で 3 時間インキュベートした後、GlcNAc 切断後に遊離すると考えられる Gal - - pMP 量を HPLC (HPLC 装置; GL7400 (島津製)、分析用カラム; ODS-3 (4.6 × 250 mm)、検出; UV 283 nm) にて測定した。すべてのタンパクにおいて、Gal - - pMP のピークが確認され、とくに AgnBT1 - CBM2 - 6 キメラタンパクにおいて加水分解活性が高いことが分かった。(図 2)

10

20

30

40

50

【 0 0 4 7 】

GlcNAc - Gal - pMPは0.05 - 3 mMの溶液となるように希釈し、上記で調製した各タンパク溶液(3.1 - 3.4 μg / μl)を0.4 - 0.5 μl、10倍濃縮PBS(pH7.4)溶液を3 μl添加し、滅菌水により全量を30 μlとした。一定時間反応させたのち、Gal - pMP量をHPLCにより測定し、比活性および反応速度を算出し、各タンパク質のGlcNAc - Gal - pMP基質に対する反応性を比較した。(表2) AgnBT1 - CBM2 - 6タンパクでは、野生型のAgnBT1タンパクよりもVmax値が約5倍、kcat値が約9倍向上した。一方、AgnBT1 - CBM2キメラタンパクでは、Vmax値、kcat値ともに約2~3倍程度の向上が認められた。

10

<表2> GlcNAc - Gal - pMP基質に対する加水分解活性の速度論的解析

【 0 0 4 8 】

【表2】

Kinetic parameters	GlcNAcα1,4GalβpMP		
	V _{max} U/mg	K _m mM	Specific activity* μmol/min/mg
AgnC	3.1 (K _{cat} =3.26/s)	0.28 (K _{cat} /K _m =22.1)	2.82
AgnBT1	0.19 (K _{cat} =6.06/s)	0.48 (K _{cat} /K _m =12.6)	0.16
AgnBT1-CBM2	0.42 (K _{cat} =16.7/s)	0.89 (K _{cat} /K _m =18.7)	1.11
AgnBT1-CBM2-6	0.91 (K _{cat} =52.7/s)	2.38 (K _{cat} /K _m =22.1)	0.54

20

【 0 0 4 9 】

【実施例4】

末端に GlcNAc 残基を有する糖タンパク質に対する加水分解活性の評価

ブタ胃ムチン糖タンパク質 Porcin Gastric Mucin (PGM) もしくは Class II Mucin (SIGMA - Aldrich製) の2%溶液50 μl, 10倍濃縮PBS(pH7.4)溶液を10 μl、上記に調製した各タンパク約3.1 - 3.4 μgをそれぞれ添加し、全量を500 μlにして、撹拌しながら37℃で5時間インキュベートした。反応後、溶液を遠心濾過し、ろ液を遠心濃縮した後、所定量の蒸留水で溶解させ、以下のそれぞれの方法で測定した。

30

【 0 0 5 0 】

【実施例5】

後処理をした濾液をHPLC(HPLC装置; GL7400(島津製)、分析用カラム; Asahipak NH2P-50(4.6×250mm)、検出; UV210nm)に供して、酵素反応後にPGMから遊離すると考えられるGlcNAcの検出を行なった。溶出時間約10~12分にGlcNAcと思われるピークの増大が確認できた。野生型のAgnBT1タンパクやAgnBT1 - CBM2キメラタンパクより、AgnBT1 - CBM2 - 6キメラタンパクを酵素源に用いた場合に、もっともGlcNAcの検出量が多かった(図3)。

40

【 0 0 5 1 】

【実施例6】

Mucin上の非還元末端の GlcNAc 残基量に変化が見られるかどうかを、GlcNAc - 残基を認識するHIK1083抗体(関東化学)を用いたドットプロットに

50

より確認した。一次抗体HIK1083(500倍希釈)により37℃一時間処理し、二次抗体として抗IgM-HRP(2000倍希釈)(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)を使用した。非還元末端のGlcNAcの切断により新たに出現するGal-残基の変化量について、RCA₁₂₀レクチン(生化学バイオビジネス株式会社)を用い、VECTASTAIN ABC systems(Vector Laboratories社)により検出した。AgnBT1-CBM2-6キメラタンパクで処理したMucinは、野生型のAgnBT1タンパクやAgnBT1-CBM2キメラタンパクで処理したムチンに比べ、HIK1083抗体に対する反応性が低下し、逆にRCA₁₂₀レクチンに対する反応性が上がった。(図4)

【0052】

10

[実施例7]

AgnBT1キメラタンパクのGlcNAc転移活性の有無について確認するため、Gal-pMPをアクセプターに、DMT-GlcNAcを糖供与体として用い、糖転移反応を行なった。具体的には、250mM Gal-pMPを12μl、250mM DMT-GlcNAcを4μl、10倍濃縮PBS(pH7.0)溶液を2μl添加し、上記で調製した各タンパク溶液を最終濃度0.4-1.2μlになるように、滅菌水により全量を20μlとした。反応溶液を攪拌しながら、37℃で30min、1h、5h、16時間インキュベートした。反応産物をHPLCに供し、GlcNAc転移後に生成するGlcNAc-Gal-pMPのピークを(HPLC装置;GL7400(島津製)、分析用カラム;ODS-3(4.6×250mm)、検出;UV283nm)にて検出した。野生型AgnBT1だけでなくAgnBT1キメラ酵素にも糖転移活性があることを確認し、AgnBT1-CBM2タンパクおよびAgnBT1-CBM2-6タンパクは、野生型AgnBT1タンパクよりも低濃度(0.4μM)であっても十分に糖転移活性を示すことが分かった。(図5)

20

【0053】

[実施例8]

有機溶媒含有条件下での糖転移活性を確認した。250mM Gal-pMPを12μl、250mM DMT-GlcNAcを4μl、10倍濃縮PBS(pH7.0)溶液を2μl添加し、上記で調製した各タンパク溶液を最終濃度0.4-1.2μlになるように加え、さらに最終濃度5%(v/v)になるようアセトニトリルを1μl添加し、滅菌水により全量を20μlとした。他にアセトン、テトラヒドロフランについても同様に反応させた。反応溶液を攪拌しながら、37℃で30min、1h、1.5h、16時間インキュベートし、反応終了後に反応産物をHPLCに供した。その結果、アセトニトリル、テトラヒドロフランを用いた場合には、野生型AgnBT1タンパクの活性は失われ転移反応が進行しないが、キメラタンパクでは活性を保持していることが明らかとなった。とくにアセトニトリル中で、その反応性が高く保持されていた。また、アセトン中においては、とくにAgnBT1-CBM2タンパクが高い活性を保持していることが分かった。(図6)

30

【0054】

[実施例9]

40

Mucin上のGal残基に対するAgnBT1キメラ酵素のGlcNAc転移活性について検討した。あらかじめAgnCタンパクにより末端GlcNAc-残基を切断したMucinを準備し、アクセプターとして用いた。AgnC処理した0.2%Mucin溶液あるいは0.5%PGM溶液を0.5μl、250mM DMT-GlcNAcを8μl、10倍濃縮PBS(pH7.0)溶液を2μl添加し、上記で調製した各タンパク溶液を最終濃度0.4-1.2μlになるように、滅菌水により全量を20μlとした。反応溶液を攪拌しながら、37℃で1h、5hインキュベートした。反応溶液をニトロセルロース膜上へスポットし、上記の方法を用い、Mucin上のGlcNAc-残基およびGal-残基をそれぞれHIK1083抗体、RCA₁₂₀レクチン用いたドットプロットにより確認した。AgnBT1-CBM2-6キメラタンパクで処理し

50

たMucinは、野生型のAgnBT1タンパクやAgnBT1-CBM2キメラタンパクで処理したMucinに比べ、HIK1083抗体に対する反応性が上がり、逆にRCA₁₂₀レクチンに対する反応性が下がった。(図7)

【産業上の利用可能性】

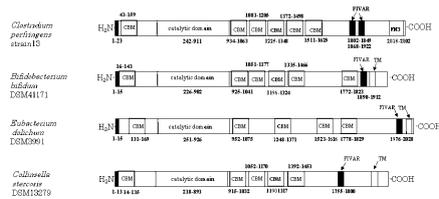
【0055】

本発明により提供されたポリペプチドは、腸内細菌類が有する糖鎖結合ツールを利用する全く新しい方法であり、用いるタンパク質は植物由来のレクチン類とは異なり、糖鎖に対する高い結合力、遺伝子工学的な利便性、および大量調製の潜在性を兼ね備えるために、産業上の利用可能性は高い。

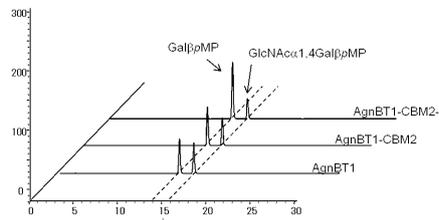
【0056】

また、本発明により提供されるポリペプチドによって得られる結合型GlcNAc含有O-グリカン、胃疾患の治療としての医薬製剤としてだけでなく、ビフィズス菌などの善玉菌の増殖ファクター、すなわち整腸剤としても利用可能性がある。

【図1】

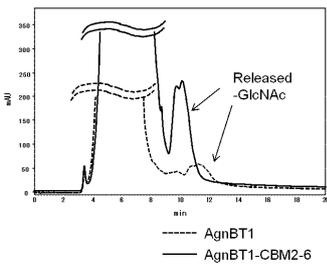


【図2】



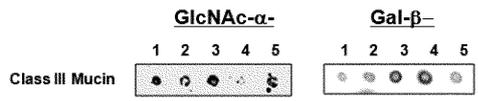
反応条件
Substrate 3mMGlcNAcα1.4GalβpMP. Enzyme: 0.31-0.34μg
Reaction volume: 10μl, PBS (pH7.0), 3h, at 37°C
HPLC条件
Inertsil column (ODS-3).
MeCN/H2O=5/95→20/8 (0→30 min), 0.5ml/min, UV 280 nm

【図3】



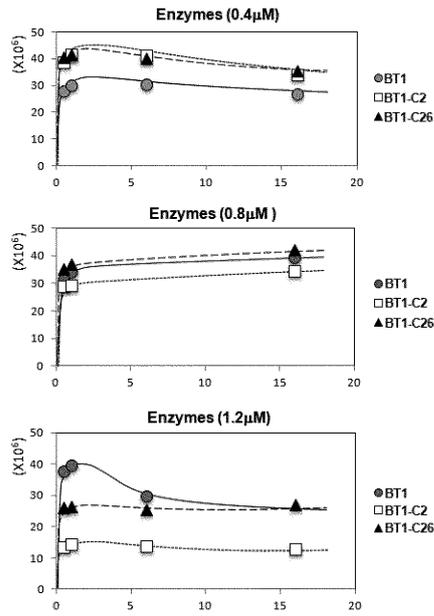
反応条件
Substrate: 0.2% Mucin.
Enzyme: AgnBT1 (34μg), AgnBT1-CBM2-6 (31μg)
Reaction volume: 500μl, PBS (pH7.0), 16h, at 37°C
HPLC条件
Normal phase column (NH2P50).
MeCN/H2O=70/30 (0→30 min), 0.5ml/min,
UV 210 nm

【図4】



反応条件
Acceptor: 0.2% ClassIII Mucin,
Enzyme: 0.4~1.2μM
Reaction volume: 20μl,
PBS (pH7.0), at 37°C, for 16h
検出条件
For GlcNAcα-
1st Ab: HIK1083 (1:500),
2nd Ab: anti-Mouse-IgM-HRP (1:2000)
For Galβ-
1st Ab: RCA120-biotin (1:2000),
2nd Ab: ABC complex

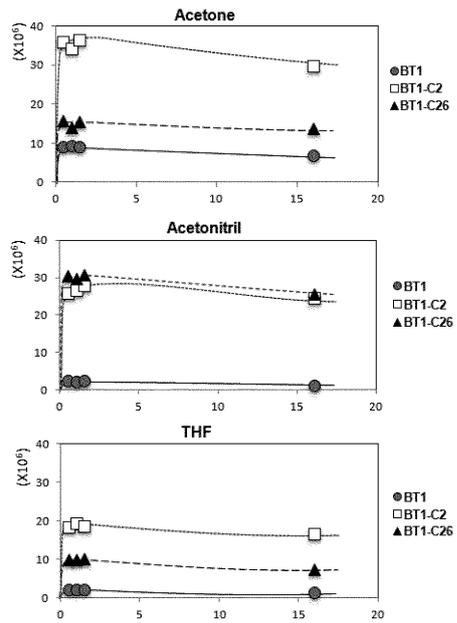
【 図 5 】



反応条件
 Acceptor: 150mM GalβpMP,
 Donor: 50mM DMT-αGlcNAc
 Enzyme: 0.4~1.2μM
 Reaction volume: 20μl,
 PBS (pH7.0), at 37°C

HPLC条件
 Inertsil column (ODS-3),
 MeCN/H₂O=5/95⇒20/8 (0⇒30 min),
 0.5ml/min,
 UV 280 nm

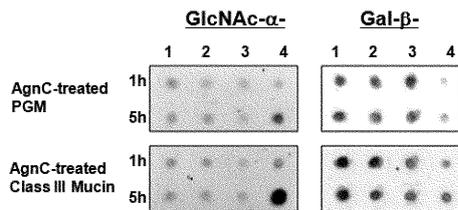
【 図 6 】



反応条件
 Acceptor: 150mM GalβpMP,
 Donor: 50mM DMT-αGlcNAc
 Enzyme: 0.8μM
 Reaction volume: 20μl,
 PBS (pH7.0), at 37°C

HPLC条件
 Inertsil column (ODS-3),
 MeCN/H₂O=5/95⇒20/8 (0⇒30 min),
 0.5ml/min,
 UV 280 nm

【 図 7 】



Lane
 1 **Control**
 2 **BT1**
 3 **BT1-CBM2**
 4 **BT1-CBM2-6**

反応条件
 Acceptor: AgnC-treated 0.012% PGM
 or AgnC-treated 0.06% Class III Mucin,
 Donor: 50mM DMT-αGlcNAc
 Enzyme: 0.4~1.2μM
 Reaction volume: 20μl,
 PBS (pH7.0), at 37°C
 For 1h and 5h

検出条件
 For GlcNAcα-
 1stAb: HIK1083 (1:500),
 2ndAb: anti-Mouse-IgM-HRP (1:2000)
 For Galβ-
 1stAb: RCA₁₂₀-biotin (1:2000),
 2ndAb: ABC complex

【配列表】

0005917913000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	

(56)参考文献 Process Biochemistry, 2011年 1月, Vol.46, No.1, p.395-398
Biotechnol. Bioeng., 2010年11月 1日, Vol.107, No.4, p.601-611
FEBS Lett., 2003年 8月14日, Vol.549, No.1-3, p.147-151
前田聖恵, 外6名, 種々のCBMファミリー-5キチン結合ドメインを付加した好アルカリ性放線菌GH
ファミリー-18キチナーゼの性質, キチン・キトサン研究, 2008年 7月 1日, Vol.14, No
.2, p.231
J. Biol. Chem., 2011年 2月25日, Vol.286, No.8, p.6479-6489
Appl. Environ. Microbiol., 2005年12月, Vol.71, No.12, p.8132-8140
Appl. Environ. Microbiol., 2010年12月, Vol.76, No.24, p.8071-8075

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12N 9/00 - 9/99

PubMed

Google Scholar

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)