

Studies on the Enzymatic Characterization of Microbial Endo- β -N-acetylglucosaminidases

黄, 一博

<https://hdl.handle.net/2324/2236311>

出版情報：九州大学, 2018, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）



氏 名	黄 一博			
論 文 名	Studies on Enzymatic Characterization of Microbial Endo- β -N-acetylglucosaminidase (微生物由来エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの酵素学的特性 解析に関する研究)			
論文調査委員	主 査	九州大学	教授	竹川 薫
	副 査	九州大学	教授	松岡 健
	副 査	九州大学	准教授	沖野 望

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

真核生物において、糖タンパク質の糖鎖部分は細胞間認識、タンパク質の安定性や分解・代謝など広く重要な役割を果たしている。タンパク質の *N*-結合型糖鎖の根元部分に存在するキトビオース間をエンド型に切断する酵素は、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(ENGase)と呼ばれ、本酵素はこれまでに糖タンパク質の糖鎖部分の構造や糖鎖の機能を解析するために広く用いられている。ENGase はアミノ酸配列の類似性から GH18 と GH85 という 2 つの GH(Glycoside Hydrolase)ファミリーに分類されている。また、ENGase は糖鎖をエンド型に遊離する加水分解活性と、水酸基を有する他の化合物へ糖鎖を転移する糖転移活性を有する。そこで、本酵素の糖転移活性を利用して、不均一な糖鎖を有する天然の糖タンパク質の糖鎖構造を、均一な構造へと変換する研究が行われている。本研究では、微生物ゲノムや土壌サンプルから推定 ENGase の検索を行い、担子菌およびバクテリアから基質特異性の異なる ENGase を同定することに成功した。これらの酵素を用いることで糖タンパク質から *N*-結合型糖鎖を効率的に脱糖鎖する条件と、均一な構造を有する糖タンパク質の酵素合成法について検討を行った。

まず、担子菌 *Coprinopsis cinerea* のゲノム塩基配列を検索した結果、GH85 に属する ENGase (Endo-CC)をコードする推定遺伝子が存在することがわかった。そこで大腸菌で本遺伝子の発現・精製を行い、酵素活性を調べたところ、二本鎖複合型の *N*-結合型糖鎖をエンド型に遊離する ENGase 活性を持つことがわかった。そこで、モデル糖タンパク質として、ウシ腭臓のリボヌクレアーゼ B(RNaseB)を用いて、Endo-CC の加水分解活性を抑制した種々の Endo-CC 変異体の糖転移活性を測定した。その結果、Endo-CC(N180H)変異体が、最も RNaseB へ糖鎖を転移する活性が高いことがわかった。さらに糖鎖構造解析の結果、天然の RNaseB が有する不均一な構造の高マンノース型 *N*-結合型糖鎖が、Endo-CC(N180H)変異体によりすべて均一な二本鎖複合型糖鎖へと変換していることを確認した。以上の結果から、Endo-CC(N180H)変異体は、天然糖タンパク質の不均一な *N*-結合型糖鎖を、構造が既知の均一糖鎖へと変換する有用な酵素であることを明らかにした。

現在市販されているバイオ医薬品糖タンパク質は、主に CHO 動物細胞を宿主として生産された遺伝子組換え体であり、その *N*-結合型糖鎖には根元の *N*-アセチルグルコサミンにフコース残基が付加されている。これまでフコース含有 *N*-結合型糖鎖に作用できる ENGase はほとんど報告がない。そこで土壌サンプルよりフコース含有糖鎖にも作用できる ENGase の検索を行った。その結果、16S rRNA 遺伝子配列から *Sphingobacterium* 属と同定された土壌細菌(HMA12 株)の培養液に、目的の酵素活性が検出された。本菌の染色体 DNA を調製して、次世代シーケンサーにより全ゲノム塩基配

列の決定を行った。ドラフトゲノム解析の結果、HMA12 株は 6.47 Mbp のゲノム配列中に約 5,770 の推定遺伝子がコードされていることがわかった。

さらに、得られた HMA12 株の全ゲノム配列の中から、推定 ENGase 遺伝子の検索を行った結果、本菌のゲノムには 5 つの候補遺伝子が存在した。これらの候補遺伝子を実験室で発現・精製を行い、酵素活性を測定したところ、ORF1188 と名付けた遺伝子産物が最も高い酵素活性を示した。そこで本酵素の諸性質についてさらに解析を行った。本酵素は既知の ENGase が作用できる高マンノース型糖鎖や二本鎖複合型糖鎖にはほとんど作用することができなかった。しかしながら、糖鎖の根元にフコースを有する複合型糖鎖には高い分解活性を示す新規な基質特異性を有することがわかった。データベース検索の結果、ORF1188 産物と相同性の高い遺伝子が *Beauveria* 属および *Cordyceps* 属糸状菌ゲノムにも存在することをみいだした。そこで両遺伝子を同様に大腸菌で発現・精製して調べたところ、両酵素とも ORF1188 と同様にフコース含有糖鎖に特異的に作用する酵素であった。また、ORF1188、*Beauveria* と *Cordyceps* 由来の ENGase は、市販されているバイオ医薬品抗体であるリツキシマブのフコース含有 N-結合型糖鎖を遊離できることがわかった。

以上、本研究はタンパク質へ 2 本鎖複合型糖鎖を転移可能な ENGase と、フコース含有糖鎖を糖タンパク質から遊離可能な ENGase を新たに得ることで、市販されているバイオ医薬品抗体の糖鎖部分を効率よく均一糖鎖へと変換できることを明らかにした。これらの研究内容は応用微生物学および糖鎖工学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士(農学)の学位を得る資格を有するものと認める。