

# 微生物エンドグリコシダーゼの機能改変とその糖鎖生物学への応用

## Improvement of Function of Microbial Endoglycosidase and Its Application for Glycobiology

(日本農芸化学会推薦)

代表研究者	石川県立大学	山本 憲二	Ishikawa Prefectural University	Kenji YAMAMOTO
協同研究者	石川県立大学	片山 高嶺	Ishikawa Prefectural University	Takane KATAYAMA

The sugar chains of some glycoproteins play key roles in cellular recognition, the immune response, etc. Glycosidases are useful for elucidating the structure and function of the sugar chains in glycoproteins. Endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase hydrolyzes *N,N'*-diacetylchitobiose moiety in oligosaccharides bound to the asparagine residue of various glycoproteins through an *N*-glycosidic linkage. We identified a fungus isolated from soil that produces novel endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase, which can act to release complex oligosaccharides from glycoproteins. We named the enzyme Endo-M after its source that was identified as *Mucor hiemalis*. Endo-M has a specific transglycosylation activity that transfers intact oligosaccharides from glycopeptides to suitable acceptors containing *N*-acetylglucosamine during the hydrolysis of glycopeptides. To enhance transglycosylation activity, site-directed mutagenesis of various residues in the putative catalytic region of Endo-M was performed, and replacement of Tyr-217 with Phe caused enhanced transglycosylation activity over the wild type. This result suggests that removal of the hydroxyl group at Tyr-217 reduces steric hindrance. Endo-M proceed by a substrate-assisted mechanism which the 2-acetamido substituent acts as a nucleophile to form an oxazolinium ion intermediate, since this enzyme is able to use synthetic sugar oxazolines as donor substrates for transglycosylation. In combination with a sugar oxazoline, various mutants acted as a glycosynthase for glycosidic bond formation, allowing accumulation of the transglycosylation product.

### 研究目的

生体内のほとんどのタンパク質は多様な糖鎖が付加した糖タンパク質として存在し、その糖鎖構造の違いがタンパク質の機能に大きな影響を及ぼすことも知られている。糖鎖は細胞間の認識を初めとして、発生・分化、疾病の発症など、さまざまな生命現象に深く関与しており、核酸、タンパク質と共に生命における「第三の鎖」と呼ばれている。遺伝子を基にして生合成されるタンパク質に糖鎖が付加することはタンパク質の機能を決定付ける大きなイベント

であり、多くの生体内エネルギーが使われ、多くの酵素が関わる。糖鎖の生合成は細胞内の小胞体やゴルジ体で行われるが、それを巧みにコントロールして、目的の糖鎖をタンパク質に付加したり改変したりする技術はタンパク質工学における技術の域に達していない。一方、このような糖タンパク質の糖鎖をタンパク質との結合部より加水分解して糖鎖を遊離するエンド型のグリコシダーゼが糖鎖の構造や機能の解析技術のツールとして用いられている。Endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidaseは糖タンパク

質のN-型糖鎖(アスパラギン結合型糖鎖)の糖鎖とタンパク質の結合部に存在する

*N,N'*-diacetylchitobiose結合を切断し、糖鎖を遊離する酵素である。我々は土壌より単離同定した糸状菌*Mucor hiemalis*よりユニークな

Endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidaseを見出した。本酵素は他の微生物起源の酵素とは異なり、酵母やカビの糖タンパク質が有する比較的単純な構造の糖鎖 (high-mannose type) のみならず、ヒトや動物由来の糖タンパク質が持つ複雑な構造の糖鎖 (complex type) にも作用する新奇な酵素であり、Endo-Mと名付けた。また、本酵素は加水分解活性のみならず、糖転移活性をも有し、水酸基を持つ化合物に供与体から糖鎖を転移付加できることを見出した。すなわち、細胞内で数十にも及ぶ反応を経て行われる糖鎖の付加反応をひとつの酵素のみによって行うことができる。この糖転移活性を利用することによって、これまでにさまざまな生理活性ペプチドに糖鎖を付加した糖ペプチドを化学-酵素合成した。

そこで、本酵素の糖転移活性を促進するために部位特異的の変異を行い、さらに本酵素の反応中間体であるオキサゾリン糖鎖を基質として、糖鎖をタンパク質やペプチドに効率的に付加する方法を確立し、糖鎖生物学における技法として応用することを本研究の目的とした。

## 研究経過

Endo-Mは本来、加水分解酵素であるため、その糖転移活性によって反応生成物を得ようとする際に問題となるのは、糖鎖を有する糖転移生成物がEndo-Mの加水分解活性の基質となって分解されるためにその生成収率が低下することである。そこで、加水分解活性が抑制され、糖転移活性が促進されるようなEndo-Mの変異酵素を作成することを試みた。Endo-Mの活性中心(グルタミン酸-177)付近のさまざまなアミノ酸残基を部位特異的の変異させた酵素を作成して調べたところ、加水分解活性が抑制され、糖転移活性が促進されるような変異酵素Y217Fを得た。この変異酵素はチ

ロシン残基をフェニールアラニン残基に置換したために、加水分解活性が低下する一方、チロシンの水酸基が除かれたことにより、糖転移反応の基質が活性中心に入り込み易くなって、糖転移活性が上昇したものと考えられる。本変異酵素の加水分解活性の基質に対する $K_m$ 値はもとの酵素に比較して1/10以下に低下していた。しかし、Y217Fは未だ加水分解活性が残存しており、そのために長時間反応すると糖転移生成物は加水分解されて消失する (Fig.1)。

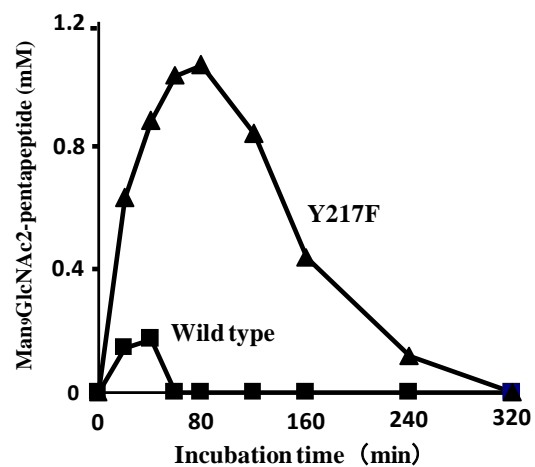


Fig.1 Enhanced transglycosylation activity of Endo-M mutant Y217F

Transglycosylation reaction using GlcNAc-pentapeptide as an acceptor, and Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Asn as a donor

Endo-Mの酵素反応はオキサゾリン中間体を経由する substrate-assisted catalytic mechanism と呼ばれるユニークな機構によって進行することが見出されている。すなわち、酵素タンパク質には Acid/Base として機能する酸塩基触媒残基のみが存在し、基質の *N*-アセチルグルコサミン残基の部分の 2-アセトアミド基が Nucleophile として機能する求核残基となる。すなわち、糖-酵素反応中間体の代わりにオキサゾリン化合物の中間体が形成され、この中間体が水と結合すれば加水分解物が生成し、アクセプターと結合すれば糖転移反応産物が生成する (Fig.2)。同様に Substrate-assisted catalytic mechanism によって反応が進行することが知られている $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ (Glycoside hydrolase (GH) family 20)、キチナーゼ (GH family 18) は触媒残基であるグルタミン酸残基の周辺に存在するアスパラギン酸残基が高度に保存され、

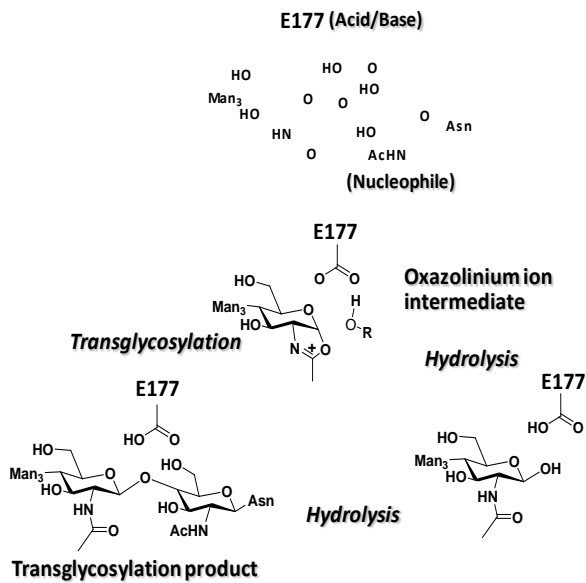


Fig.2 Substrate-assisted catalytic mechanism of Endo-M オキサゾリン化合物中間体の形成とその安定化を担うことが示唆されている。一方、Endo-M と同じファミリーに属する酵素 (GH family 85) の触媒残基付近のアミノ酸配列を比較したところ、相同性があることが見出され、いずれの酵素も Substrate-assisted catalytic mechanism によって反応が進行すると推察される。さらに、触媒残基であるグルタミン酸残基の N-末端へ 2 残基前にアスパラギン残基が完全に保存されており、その Endo-M におけるアラニン置換体 N175A は著しく加水分解活性が低下することから、このアスパラギン残基が反応中間体形成のカギ残基である可能性が示唆された。そこで、ニワトリ卵黄より抽出単離して得られた N-型糖鎖を

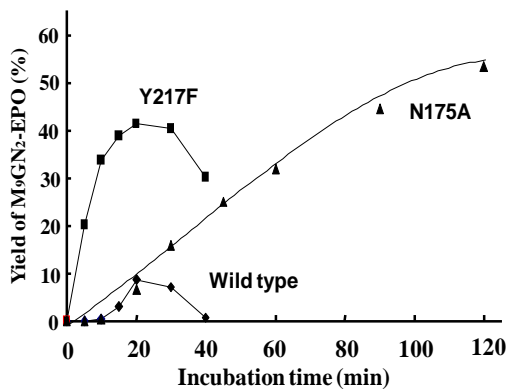


Fig.3 Transglycosylation reactions using sugar oxazolines as the donor substrate by the wild-type and two mutant Endo-M The reaction were carried out using Man<sub>3</sub>GlcNAc-oxazoline as donor substrate and GlcNAc-pentapeptide as an acceptor

2-chloro-1,3-dimethylimidazolium chloride (DMC) によって処理して調製した N-型糖鎖のオキサゾリン化合物を供与体基質として用いて、N175A 変異酵素により糖転移反応を行ったところ、糖転移生成物が加水分解されずに蓄積されることが見出された (Fig.3)。さらに、アスパラギン残基をグルタミン残基に置換した変異酵素 N175Q については糖鎖が付加された糖転移生成物を 70%以上の高い収率で得ることができ、本酵素が機能性糖鎖複合体の合成に実用的な酵素となり得る可能性が示された。

また、N175Q は N-型糖鎖のオキサゾリン化合物のみならず N-型糖鎖をも糖鎖供与体基質となることを見出し、さらに N175H は N175Q よりも効率的に機能性糖鎖複合体を酵素合成することを明らかにした。

## 考察

化合物への糖や糖鎖の付加反応に糖加水分解酵素の糖転移活性を利用することに対しては克服しなければならない大きな問題点がある。それは糖転移反応により生成した糖転移生成物が糖加水分解酵素自身の基質にもなって分解され、目的の生成物の収率が大きく減少することである。そこで、酵素の触媒残基を改変し、酵素反応中間体をミミックした基質を用いて糖転移反応を行うことにより、加水分解活性が抑制され、一度生成された糖転移産物は加水分解されずに蓄積される“グライコシンターゼ化”の技法が開発された。すなわち、多くの糖加水分解酵素は触媒反応に関わる酸塩基触媒残基 (Acid/Base) と求核残基 (Nucleophile) を有するが、その求核残基を部位特異的変異によって不活性化し、反応中間体をミミックしたフッ化糖を基質として用いて糖転移反応を行うことにより、生成した糖転移産物は加水分解されずに蓄積され、効率的に糖転移生成物を得ることができる。Endo-M はユニークな substrate-assisted catalytic mechanism によって反応が進行し、求核残基が存在せず、オキサゾリン化合物が反応中間体である。

従って、上記のようなグライコシターゼ化を行うことはできない。そこで、酸塩基触媒残基周辺のアミノ酸残基について網羅的に部位特異的変異を行い、糖転移活性は上昇し、加水分解活性は低下するような変異酵素を探索した。その結果、Y217Fを見出したが、本変異酵素は加水分解活性を完全に消失していない。そこで、反応中間体であるオキサゾリン化合物に着目し、これを基質として糖転移反応を行うことを検討した結果、N175残基が重要な残基であることを見出し、その部位特異的変異酵素がグライコシターゼ様の酵素になることを見出した。なかでもN175QおよびN175Hは非常に有用なグライコシターゼ様に働く酵素であることが明らかになり、生理活性糖ペプチドやバイオ医薬品などの実用的な機能性糖鎖複合体の合成に利用できる可能性が示された。

## 研究の発表

### 口頭発表

1. 山本憲二：エンド-M酵素を用いた糖鎖の付加技術、研究産業・産業技術協会第5回先導技術交流会「次世代バイオ医薬品への挑戦」2012年1月
2. 梅川碧里、芦田久、L.-X. Wang、山本憲二：糸状菌由来エンドグリコシターゼ (Endo-M) のグライコシターゼ様変異体酵素を活用したシアロ糖タンパク質の化学・酵素合成、日本応用糖質科学会大会、2012年9月

### 紙上発表

1. 梅川碧里、芦田久、山本憲二. 2011. エンドM酵素による糖鎖の効率的な転移付加と均一化. バイオ医薬品開発における糖鎖技術 (早川堯夫、掛樋一晃、平林淳 監修). シーエムシー出版. 68-76 頁.