

## 均質なバイオ医薬品の生産を志向したエンドグリコシダーゼの改変

加藤 紀彦

(京都大学大学院生命科学研究科)

### はじめに

抗体医薬をはじめとしたバイオ医薬品は、「糖鎖」を持った糖タンパク質性の製剤が多数を占める。これらバイオ医薬品の糖鎖部分の構造的不均質性は医薬品の生物活性や薬物動態に大きく影響することが知られている。例えば、抗体 IgG 分子の Asparagine-297 に結合している N-結合型糖鎖に対するコアフコース残基付加は、ADCC (Antibody-Dependent-Cellular-Cytotoxicity : 抗体依存性細胞傷害) 活性を著しく低下させるため、コアフコースの付加が無いように糖鎖を改変して高い活性を維持する抗体医薬品を作り出すことが求められている。このように、バイオ医薬品の糖鎖構造を均質かつ求められる構造を持つように制御する技術はこれからのバイオ医薬品生産において非常に重要な技術になると目されている。

糸状菌 *Mucor hiemalis* 由来のエンドグリコシダーゼ (Endo-M) は N-結合型糖鎖を加水分解するとともに、適切なアクセプター分子の存在下では切断した糖鎖を転移付加する活性を示す<sup>1</sup>。さらに、Endo-M の変異型酵素 N175Q (グライコシターゼ) は糖オキサズリンを基質とした際に高い転移活性を示し、均質な糖鎖を持った糖ペプチド・糖タンパク質の合成に応用されている<sup>2</sup>。我々は、これらの酵素を使って不均質な糖鎖を持った糖タンパク質を、均質な糖鎖を持った糖タンパク質に改変する化学-酵素合成法の技術開発に従事してきた。本酵素の潜在的な性質を活用すればバイオ医薬品の不均質な糖鎖を均一なヒト複合型糖鎖にすげ替えることが可能であり、バイオ医薬品として必須なヒト型糖鎖を含む糖タンパク質の合成が可能である。我々はすでに部位特異的変異を本酵素に導入することで基質特異性を改変し、コアフコース付加された糖鎖に作用する変異体酵素 (W251N) を得ることに成功している<sup>3</sup>。そこで、本研究ではさらなる変異の導入によって本酵素の基質特異性を広げ、バイオ医薬品に対する本糖鎖改変技術の応用範囲をさらに拡充させることを目指した。Endo-M はシアル酸を含有する二本鎖複合型糖鎖に作用するが、三本鎖複合型糖鎖には作用しない。また上述の W251N 変異体は抗体分子に結合したコアフコース含有糖鎖に対しては活性が低い。そこで、これらの糖鎖に対しても加水分解活性を示す新規の変異型酵素の取得を試みることにした。

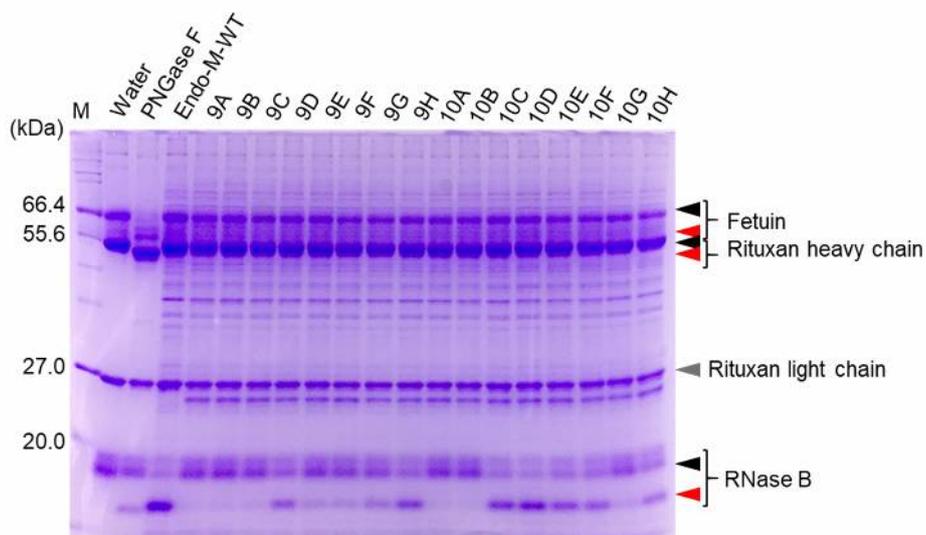
### Endo-M ランダム変異導入ライブラリの作製

基質特異性を改変するために、基質と相互作用すると予想される部位に変異を導入したライブラリを作製し、三本鎖複合型糖鎖あるいはコアフコース含有糖鎖を持つ各種糖タンパク質基質に対する加水分解活性スクリーニングによって新規活性を示す変異型酵素の取

得を試みた。Endo-M の結晶構造は解かれていないため、同じ Glycoside hydrolase family 85 に属する Endo-A の糖鎖チアズリン複合体の結晶構造 (PDB: 3FHQ) を用いて Endo-M 酵素の糖鎖と相互作用する範囲を予測した。Endo-A は 2-350 aa の範囲で糖鎖基質との相互作用に関わると予想されたため、Endo-M でアミノ酸相同性の存在する 15-369 aa の領域 (Endo-M ORF の 43-1107 bp) に error-prone PCR 法によってランダム変異を導入することとした。Diversify PCR Random Mutagenesis Kit (Clontech/TaKaRa) を用い、特定の条件にて PCR を行うことにより、該当範囲において平均 3.6 の point mutation を持つ遺伝子断片を作製し、それを残りの Endo-M 遺伝子 ORF (大腸菌発現ベクター含む) と In-Fusion 法によって連結することで変異型 Endo-M 発現ベクター (pET23b-Endo-M mutant) を得て、それら大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入し Endo-M ランダム変異ライブラリを作製した。最終的に、957 株分 (約 3,400 の点変異を有する) のライブラリを構築した。

### 基質特異性改変型酵素のスクリーニング

大腸菌 DH5 $\alpha$  において培養・発現誘導を行ったところ抽出液中に Endo-M の加水分解活性は確認されなかったため、ライブラリの 12 株ごとにプラスミド混合液の抽出を行ってそれを大腸菌 BL21(DE3)株に導入した。プラスミド導入株を培養したプレート上の多数の形質転換体をそのまま 2 日間培養して菌体内にて Endo-M 変異体をそれぞれ発現させた。発現後、BugBuster (Novagen)を用いてタンパク質を抽出し Endo-M 変異体酵素溶液を調製した。



**Fig. 1, Endo-M 変異体ライブラリの糖タンパク質分解活性スクリーニング**

例としてライブラリ番号 9A~10H の結果を示す。各ライブラリから調製した変異体酵素溶液 (各 12 株分) と糖タンパク質混合液 (Fetuin、Rituxan、および RNaseB) との反応液を SDS-PAGE にて分析した。PNGase F はすべての N-結合型糖鎖を根元から切断するためバンドシフトが起こる (ポジティブコントロール)。一方、Endo-M-WT (野生型酵素) は fetuin および Rituxan IgG 分子の heavy chain の糖鎖には作用できないが、RNaseB の糖鎖には作用してバンドシフトを起こす。黒三角は糖タンパク質基質を、赤三角は糖鎖の切断によって分子サイズの減少したタンパク質をそれぞれ示している。

加水分解に対する糖鎖基質の特異性を調べるため、高マンノース型糖鎖を持つウシ臍臓由来 Ribonuclease B (Sigma)、三本鎖複合型糖鎖を持つウシ血清由来フェツイン (Sigma)、およびコアフコース糖鎖を持つ抗体分子リツキサン (各 5  $\mu$ g) と、Endo-M 変異体酵素溶液 (5  $\mu$ g protein) を混合し、50 mM リン酸バッファー (pH6.0) 中にて 30°C で一晚反応させ、それらを SDS-PAGE/CBB 染色にて分析し、バンドシフトの有無から糖タンパク質の分解を検出した (Fig. 1)。変異体ライブラリすべてに対して活性スクリーニングを行った。しかしながら、RNaseB のバンドシフトが起こらなくなるもの、すなわち不活性化変異が起きたものが散見されたものの、フェツインやリツキサンに作用する活性を持つ変異体を見出すことはできなかった。

### おわりに

今回、作製したライブラリからフェツイン糖鎖、あるいはリツキサンの糖鎖に作用して加水分解することが可能な新規変異体 Endo-M を見出すことは出来なかった。しかしながら本 Endo-M 変異体ライブラリを活用して今後違った変異をスクリーニングによって見つけ出すことは可能である。例えば、RNaseB に作用しなくなった変異体の本ライブラリ中に多数存在することは明らかであるが、それらの変異について詳細に調べることで、Endo-M の高マンノース型糖鎖に対する認識に関わる残基の特定が出来る。これは今後の課題としたい。また該当遺伝子範囲のアミノ酸の組み合わせを考慮するとさらなるライブラリの拡幅も必要と思われる。さらにまた、Endo-M の結晶構造が明らかにされることで、より基質特異性に関わる残基が明らかにされ、より応用性の拡大した酵素の作出が期待される。

### 謝辞

本研究の遂行にあたりご支援いただきました一般財団法人杉山産業化学研究所ならびに関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

### 参考文献

- 1) Yamamoto K, Kadowaki S, Watanabe J, Kumagai H. (1994) Transglycosylation activity of *Mucor hiemalis* endo-beta-N-acetyl-glucosaminidase which transfers complex oligosaccharides to the N-acetylglucosamine moieties of peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203(1):244-52.
- 2) Umekawa M, Li C, Higashiyama T, Huang W, Ashida H, Yamamoto K, Wang LX. (2010) Efficient glycosynthase mutant derived from *Mucor hiemalis* endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase capable of transferring oligosaccharide from both sugar oxazoline and natural N-glycan. *J. Biol. Chem.* 285(1):511-21.
- 3) Katoh T, Katayama T, Tomabechi Y, Nishikawa Y, Kumada J, Matsuzaki Y, and Yamamoto K. (2016) Generation of a Mutant *Mucor hiemalis* Endoglycosidase that Acts on Core-fucosylated N-Glycans. *J. Biol. Chem.* 291(44):23305-23317.