

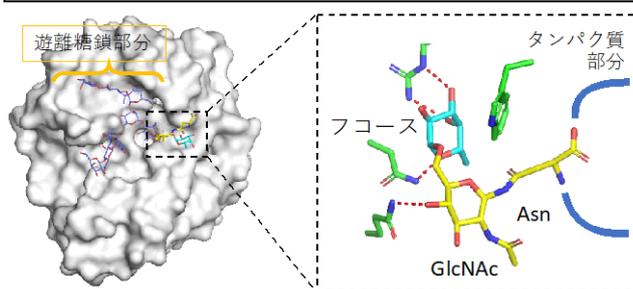


## バイオ医薬品の品質管理に向けた「冬虫夏草」由来の糖鎖切断酵素のメカニズム解明 ～バイオ医薬品の性能向上や品質管理に役立つような研究開発に期待～

ENGase (エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ; 注1) は糖タンパク質の Asn 残基に結合した N-結合型糖鎖 (注2) の根元に近い部分を切断して、糖鎖をタンパク質から切り離す (遊離する) 酵素です。ENGase は糖鎖を切り離すだけでなく、糖転移と呼ばれる反応により効率よく糖鎖をすげ替えることができるため (注3)、均一な糖鎖を持つ糖タンパク質を作ることが可能となります。ENGase は、糖タンパク質である各種抗体 (免疫グロブリン G; IgG) の性能向上にも役立つことから、近年注目が高まるバイオ医薬品 (注4) の品質管理への応用が期待されています。

ヒトなどの哺乳動物の N-結合型糖鎖では、根元の GlcNAc にフコースが α1,6-結合した「コアフコース」が付加しているものが多いことがわかっています。これまで ENGase には①コアフコースが存在する糖鎖には全く作用できないもの、②コアフコースの有無にかかわらず同程度の活性を示すもの、③コアフコースがある場合のみに高い活性を示す「コアフコースに特異的な」もの、があることが知られていました。しかし、それらの酵素の性質の違いがどのような構造的特徴にもとづくのかは、全く不明でした。九州大学大学院生物資源環境科学府博士課程3年の黄一博大学院学生、農学研究院の竹川薫教授らの研究グループは、冬虫夏草として知られるキノコ的一种であるサナギタケ (*Cordyceps militaris*) からコアフコースに特異的な新奇 ENGase (Endo-CoM) を発見しました。また、東京大学大学院農学生命科学研究科の関陽香大学院学生、伏信進矢教授らのグループは高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所の高性能なシンクロトン放射光実験施設 (注5) を利用して Endo-CoM の X 線結晶構造解析を行い (注6)、その立体構造を明らかにしました (下図)。これまで報告されていなかったコアフコース、GlcNAc、Asn が結合した状態の立体構造が得られたことから、ENGase がコアフコースとタンパク質に近い部分をどのように認識しているのか、という長年の疑問にはっきりとした答えが得られました。今後は、コアフコースの認識を変化させた ENGase を作り出すなど、バイオ医薬品の性能向上や品質管理に役立つような研究開発が加速すると期待できます。

本研究成果は「The Journal of Biological Chemistry」に2019年9月23日 (月) (日本時間) に掲載されました。



(左から順に) この研究を行った伏信進矢教授、竹川 薫教授、関 陽香さん

(参考図) Endo-CoM の全体構造を左に、活性中心付近の拡大図を右に示す。本研究では、コアフコース (水色) と、GlcNAc および Asn 残基 (黄色) の結合した立体構造を決定して、それらを認識する Endo-CoM のアミノ酸残基 (緑色) や周囲の様子などを明らかにした。コアフコースはそれをぴったりと囲むポケットにより認識されていた。

### 研究者からひとこと：

冬虫夏草は昆虫の中に侵入するため進化の過程で独特の ENGase を手に入れたと考えており、微生物には無限の可能性ががあります。

【お問い合わせ】 大学院農学研究院生命機能科学分野 教授 竹川 薫

TEL:092-802-4732 FAX:092-802-4732 Mail:takegawa@agr.kyushu-u.ac.jp

## 【用語解説】

### 注1 ENGase (エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ)

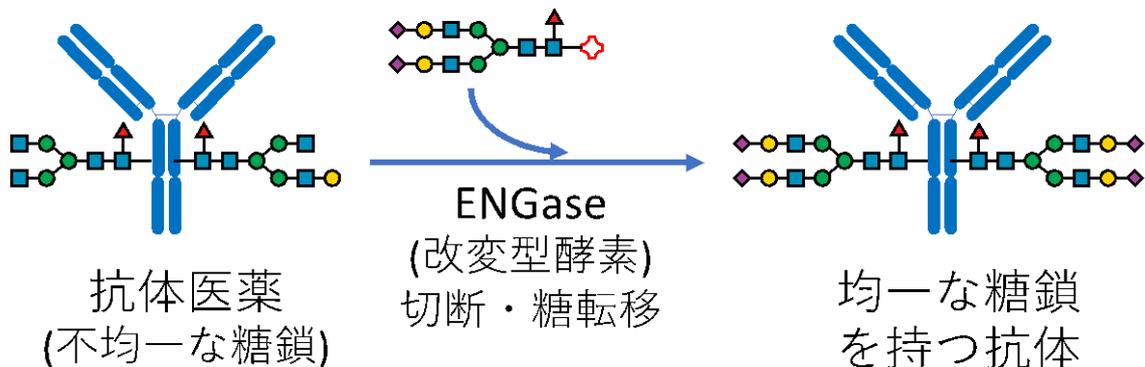
N結合型糖鎖は、Asnに結合した根元部分に、2つのGlcNAcと3つのマンノースからなるコア構造を持つが、ENGaseはその2つのGlcNAcの間の結合を切断する(図2参照)。結果的に、タンパク質に1つのGlcNAc(およびコアフコース)を残して、糖鎖の大部分がタンパク質から遊離する。

### 注2 N結合型糖鎖

タンパク質に結合した糖鎖はAsn残基の窒素原子に結合するN結合型糖鎖と、セリン(Ser)またはスレオニン(Thr)残基の酸素原子に結合するO結合型糖鎖に大別される。N結合型糖鎖は、Man<sub>3</sub>-GlcNAc-GlcNAcの5糖からなるコア構造の先の糖鎖構造の違いにより、ハイマンノース型、複合(コンプレックス)型、混合(ハイブリッド)型、などに分類される。

### 注3 糖転移反応とグライコシターゼ

糖鎖を切断する酵素(糖質加水分解酵素)には、もともと、他の糖鎖が存在する場合に、それを転移してもとの糖鎖とすげ替える、糖転移反応という活性を持つものがある。グライコシターゼは、そのような酵素の反応中心に改変を加えた酵素であり、オキサゾリンなどの活性化修飾を施した糖鎖を用いると100%近い高収率で糖転移反応を行うことができる(下図参照)。



### 注4 バイオ医薬品

以前からの主流な医薬品であった低分子薬とは異なり、生物を用いて作られた医薬品。近年、その市場は急増しており、モノクローナル抗体である抗体医薬品が多数承認されている。これまでに承認されている抗体医薬品はすべて免疫グロブリン(IgG)由来の配列を持つ。ENGaseにより均一な糖鎖が付加された抗体は、抗体依存性細胞障害作用(ADCC)や補体依存性細胞毒性(CDC)が向上することが示されている。また、Endo-CoMはIgG由来の抗体医薬品であるリツキシマブに対して活性を持つことが確かめられている。

### 注5 シンクロトロン放射光実験施設

光速近くまで加速した陽電子などの荷電粒子の進行方向を磁石により変えると発生する、極めて「明るい」電磁波(高輝度な放射光)をさまざまな実験に利用する施設。本研究では、茨城県つくば市の高エネルギー加速器研究機構(KEK)物質構造科学研究所(IMSS)の放射光施設(Photon Factory, PF)の構造生物学専用ビームライン(実験施設)を用いた。特に、Endo-CoMの立体構造を解くにあたり、S-SAD法という手法を用いており、同手法のために独自に設計・開発されたビームラインであるBL-1Aを用いた。また、兵庫県佐用郡佐用町の大型放射光施設SPring-8も予備的データ測定に用いた。

### 注6 X線結晶構造解析

酵素などのタンパク質の立体構造を明らかにするための最も一般的な解析方法の一つ。目的物質の結晶にX線を照射し、回折データを測定することにより、微細な三次元構造を知ることができる。

【論文情報】

論文名 : Structural basis for the specific cleavage of core-fucosylated *N*-glycans by endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase from the fungus *Cordyceps militaris*

著者名 : Haruka Seki, Yibo Huang, Takatoshi Arakawa, Chihaya Yamada, Takashi Kinoshita, Shogo Iwamoto, Yujiro Higuchi, Kaoru Takegawa and Shinya Fushinobu

掲載誌 : The Journal of Biological Chemistry