

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2014年3月6日(06.03.2014)



(10) 国際公開番号  
WO 2014/034274 A1

- (51) 国際特許分類:  
*C12N 9/10* (2006.01) *C12P 19/00* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/068549
- (22) 国際出願日: 2013年7月5日(05.07.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2012-190474 2012年8月30日(30.08.2012) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人新潟大学(NIIGATA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9502181 新潟県新潟市西区五十嵐二の町8050番地 Niigata (JP).
- (72) 発明者: 中井 博之(NAKAI, Hiroyuki); 〒9502181 新潟県新潟市西区五十嵐二の町8050番地 新潟大学農学部内 Niigata (JP). 仁平 高則(NIHIRA, Takanori); 〒9502181 新潟県新潟市西区五十嵐二の町8050番地 新潟大学農学部内 Niigata (JP). 鈴木 絵里香(SUZUKI, Erika); 〒9502181 新潟県新潟市西区五十嵐二の町8050番地 新潟大学農学部内 Niigata (JP). 大坪 研一(OHTSUBO, Kenichi); 〒9502181 新潟県新潟市西区五十嵐二の町8050番地 新潟大学農学部内 Niigata (JP). 北岡 本光(KITAOKA, Motomitsu); 〒3058642 茨城県つくば市観音台2-1-12 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 牛木 護(USHIKI, Mamoru); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目14番1号 郵政福祉琴平ビル3階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第21条(3))  
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: OLIGOSACCHARIDE SYNTHETASE MANNOSYL-B-1,4-N-ACETYLGLUCOSAMINE PHOSPHORYLASE AND METHOD FOR PRODUCING CORE SUGAR CHAIN STRUCTURE OF ASPARAGINE-LINKED GLYCOPROTEIN

(54) 発明の名称: オリゴ糖合成酵素マンノシル-β-1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼおよびアスパラギン結合型糖タンパク質のコア糖鎖構造の製造方法

(57) Abstract: [Problem] To efficiently produce a core sugar chain structure of an asparagine-linked glycoprotein. [Solution] A method for easily producing in a single step a core sugar chain structure of an asparagine-linked glycoprotein, said core sugar chain structure being mannosyl-β-1,4-N-acetylglucosamine or mannosyl-β-1,4-kitobiose, through an oligosaccharide synthesis reaction that is catalyzed by mannosyl-β-1,4-N-acetylglucosamine phosphorylase with the use of, as the starting materials, α-mannose 1-phosphate together with N-acetylglucosamine or kitobiose.

(57) 要約: 【課題】効率的にアスパラギン結合型糖タンパク質のコア糖鎖構造を製造することを目的とする。【解決手段】本発明は、マンノシル-β-1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼが触媒するオリゴ糖合成反応により、α-マンノース1-リン酸と、N-アセチルグルコサミンまたはキトビオースとを出発材料として、アスパラギン結合型糖タンパク質のコア糖鎖構造マンノシル-β-1, 4-N-アセチルグルコサミンまたはマンノシル-β-1, 4-キトビオースをワンステップで簡便に製造する方法を提供する。



WO 2014/034274 A1

## 明 細 書

発明の名称：

オリゴ糖合成酵素マンノシルー $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼおよびアスパラギン結合型糖タンパク質のコア糖鎖構造の製造方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、新規に発見したオリゴ糖合成酵素マンノシルー $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼおよび前記酵素が触媒するオリゴ糖合成反応を用いた、アスパラギン結合型糖タンパク質のコア糖鎖構造マンノシルー $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンおよびマンノシルー $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミノシルー $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミン（以下、マンノシルー $\beta$ -1, 4-キトビオースという）の製造方法に関する。

### 背景技術

[0002] 糖タンパク質が有する糖鎖の生体認識（細胞接着・抗原抗体反応・情報伝達・ウイルス感染など）への重要性については近年注目が集まるところである。糖鎖は、核酸、タンパク質に次ぐ第三の鎖といわれ、近年急速にその機能解明が進められている。その中で、アスパラギン結合型糖鎖は、タンパク質などに結合し、細胞分化、老化、免疫応答といった生命現象や、癌、ウイルス感染、炎症などの疾患に深く関与していることが知られている。さらに、分子レベルでの糖鎖機能の解明、さらには糖鎖を利用した創薬への応用が期待されている。

[0003] しかし、生体内での発現量が微量な糖鎖試料の調製は現在有機合成法に頼らざるを得ず、その困難さが糖鎖工学研究分野や糖鎖再生医療の進展を妨げている。例えば、アスパラギン結合型3糖は、従来は、有機合成法による煩雑な多段階反応で製造されており（特許文献1）、効率的な大量調製が困難であるため、非常に高額であるという問題点があった。そのため、糖鎖の簡

便な製造法の確立は急務となっている。

## 先行技術文献

## 特許文献

[0004] 特許文献1：特許第4778315号明細書

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0005] そこで、本発明は上記問題点に鑑み、効率的にアスパラギン結合型糖タンパク質のコア糖鎖構造を製造することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0006] 上記課題を達成するため鋭意検討した結果、新規にマンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼを発見した。そしてマンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼが触媒するオリゴ糖合成反応を用いて、高価なアスパラギン結合型糖タンパク質のコア糖鎖構造マンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンおよびマンノシル- $\beta$ -1, 4-キトビオースをワンステップで製造することができ、反応系のスケールアップによる大量調製も可能であることを見出し、本発明を完成させた。

[0007] すなわち、本発明の請求項1に記載のオリゴ糖合成酵素マンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼは、 $\alpha$ -マンノース1-リン酸と、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルグルコサミノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミン（以下、キトビオースという）とに作用して、アスパラギン結合型糖タンパク質のコア糖鎖構造マンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンまたはマンノシル- $\beta$ -1, 4-キトビオースを生成することを特徴とする。

[0008] また、本発明の請求項2に記載のオリゴ糖合成酵素マンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼは、  
以下の酵素学的性質を有することを特徴とする

## a) 作用

$\alpha$ -マンノース 1-リン酸と、N-アセチルグルコサミンまたはキトビオースとに作用して、アスパラギン結合型糖タンパク質のコア糖鎖構造マンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンまたはマンノシル- $\beta$ -1, 4-キトビオースを生成する；

## b) 基質特異性

$\alpha$ -マンノース 1-リン酸と、N-アセチルグルコサミンまたはキトビオースとに作用する；

## c) 至適 pH

30°Cの条件下で、pH 5.5；

## d) 温度安定性

pH 5.5の条件下で、60°Cまで安定；

## e) pH安定性

4°C、24時間の条件下で、pH 4.5-10.5で安定。

[0009] また、本発明の請求項3に記載のオリゴ糖合成酵素マンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼは、配列番号1記載のアミノ酸配列、または配列番号1記載のアミノ酸配列において、1つ若しくは数個のアミノ酸残基が、欠失、置換、付加、または挿入された配列を有することを特徴とする。

[0010] また、本発明の請求項4に記載のオリゴ糖合成酵素マンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼは、バクテロイデス・シータイオタオミクロン由来であることを特徴とする。

[0011] また、本発明の請求項5に記載のベクターは、請求項3または4に記載のオリゴ糖合成酵素マンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼをコードするベクターまたは配列番号2記載のDNAを含むことを特徴とする。

[0012] また、本発明の請求項6に記載の形質転換体は、請求項5記載のベクターにより形質転換されたことを特徴とする。

- [0013] また、本発明の請求項 7 に記載のオリゴ糖合成酵素マンノシルーβ-1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼの製造方法は、  
請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のオリゴ糖合成酵素マンノシルーβ-1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼの製造方法であって、請求項 6 記載の形質転換体を培養する工程と、前記培養する工程において生産されたマンノシルーβ-1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼを回収する工程を含むことを特徴とする。
- [0014] また、本発明の請求項 8 に記載のアスパラギン結合型糖タンパク質のコア糖鎖構造の製造方法は、α-マンノース 1-リン酸と、N-アセチルグルコサミンと、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のオリゴ糖合成酵素マンノシルーβ-1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼを含む溶液中でオリゴ糖合成反応を行う工程と、マンノシルーβ-1, 4-N-アセチルグルコサミンを回収する工程を含むことを特徴とする。
- [0015] また、本発明の請求項 9 に記載のアスパラギン結合型糖タンパク質のコア糖鎖構造の製造方法は、α-マンノース 1-リン酸と、キトビオースと、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のオリゴ糖合成酵素マンノシルーβ-1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼを含む溶液中でオリゴ糖合成反応を行うステップと、マンノシルーβ-1, 4-キトビオースを回収するステップを含むことを特徴とする。
- [0016] また、本発明の請求項 10 に記載のアスパラギン結合型糖タンパク質のコア糖鎖構造の製造方法は、前記溶液が、pH 5.0～7.0であることを特徴とする。

### 発明の効果

- [0017] 本発明によれば、マンノシルーβ-1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼが触媒するオリゴ糖合成反応により、α-マンノース 1-リン酸と、N-アセチルグルコサミンまたはキトビオースを出発材料として、アスパラギン結合型糖タンパク質のコア糖鎖構造マンノシルーβ-1, 4-N-アセチルグルコサミンまたはマンノシルーβ-1, 4-キトビオースをワ

ンステップで簡便に製造することができる。

**図面の簡単な説明**

[0018] [図1A]実施例2のマンノシル-β-1,4-N-アセチルグルコサミンのクロマトグラムである。

[図1B]実施例2のマンノシル-β-1,4-N-アセチルグルコサミンの収率を示す図である。

[図2A]実施例2のマンノシル-β-1,4-キトビオースのクロマトグラムである。

[図2B]実施例2のマンノシル-β-1,4-キトビオースの収率を示す図である。

[図3A]実施例1で調製したマンノシル-β-1,4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼの至適pHを示す図である。

[図3B]実施例1で調製したマンノシル-β-1,4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼのpH安定性を示す図である。

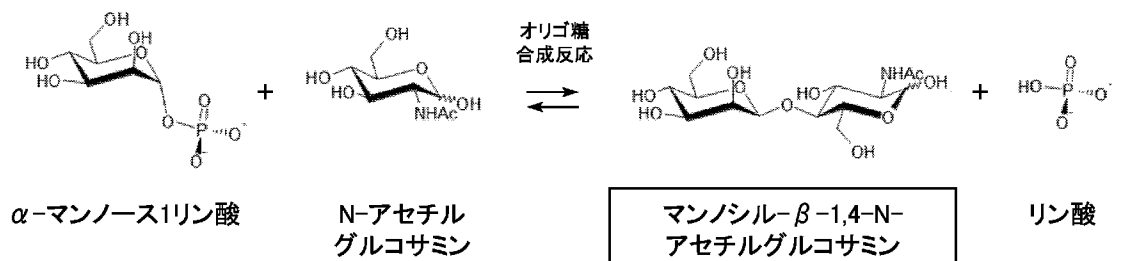
[図3C]実施例1で調製したマンノシル-β-1,4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼの温度安定性を示す図である。

**発明を実施するための形態**

[0019] 本発明の方法によれば、加リン酸分解反応の逆反応であるオリゴ糖合成反応により、アスパラギン結合型糖鎖のコア構造を選択的に製造できる。

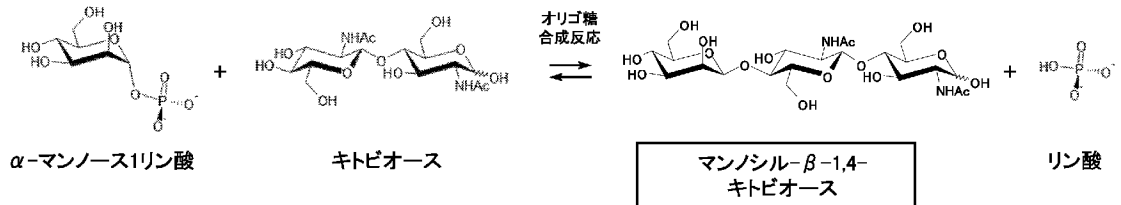
[0020] 具体的には、α-マンノース1-リン酸と、N-アセチルグルコサミンと、マンノシル-β-1,4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼを含む溶液中でオリゴ糖合成反応を行うことにより、マンノシル-β-1,4-N-アセチルグルコサミンを製造することができる。

[化1]



[0021] また、 $\alpha$ -マンノース1-リン酸と、キトビオースと、マンノシル- $\beta$ -1,4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼを含む溶液中でオリゴ糖合成反応を行うことにより、マンノシル- $\beta$ -1,4-キトビオースを製造することができる。

[化2]



[0022] 本発明のマンノシル- $\beta$ -1,4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼは、配列番号1に示すアミノ酸配列で規定される化学構造を持つものでもよい。なお、本発明のマンノシル- $\beta$ -1,4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼは、 $\alpha$ -マンノース1-リン酸と、N-アセチルグルコサミンまたはキトビオースとに作用してアスパラギン結合型糖タンパク質のコア糖鎖構造マンノシル- $\beta$ -1,4-N-アセチルグルコサミンまたはマンノシル- $\beta$ -1,4-キトビオースを生成する酵素であれば、配列番号1のアミノ酸配列において、一つ若しくは数個のアミノ酸残基が、欠質、置換、付加若しくは挿入されていてもよい。このアミノ酸配列における「アミノ酸の欠失、置換、付加若しくは挿入」は、当業者に公知の方法（例えば、突然変異誘発法や遺伝子組み換え法）に従って実施できる。

[0023] 本発明のマンノシル- $\beta$ -1,4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼは、微生物、動物、植物等のような生物に由来するものでも良いが、好ましくはバクテロイデス属、アリストティペス属、ブラウティア属、カルジセルロシルプトル属、カプノサイトファーガ属、クロストリジウム属、コプロコッカス属、ディクチオグロムス属、ユーバクテリウム属、ファエカリバクテリウム属、フラボバクテリウム属、ヘルペトシフォン属、マリノモナス属、マリプロフンドゥス属、マルビンブリヤンティア属、オリバクテリウム属、パエニバチスル属、パラバクテロイデス属、プレボテラ属、ロゼブリア

属、ルミノコッカス属、テルモトガ属、テルモシフォ属、ウェルコミクロビア属、ビブリオ属に属する微生物、とりわけ好ましくはバクテロイデス・シータイオタオミクロン由来の酵素を用いる。

[0024] 本発明のベクターは、 $\alpha$ -マンノース1-リン酸と、N-アセチルグルコサミンまたはキトビオースとに作用してアスパラギン結合型糖タンパク質のコア糖鎖構造マンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンまたはマンノシル- $\beta$ -1, 4-キトビオースを生成するマンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼをコードするDNAを含むベクターであればよく、配列番号1記載のマンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼ、または配列番号1のアミノ酸配列において、一つ若しくは数個のアミノ酸残基が、欠質、置換、付加若しくは挿入されているマンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼをコードするDNAを含むベクターが好ましく、配列番号2記載のDNAを含むベクターがとりわけ好ましい。

[0025] 本発明の発現ベクターは、前記遺伝子もしくは配列番号2のDNAまたはその修飾体を適当なベクターに挿入することによって得ることができる。本発明の発現ベクターは、宿主中で複製可能なものであれば、特に制限されるものではなく、例えば、プラスミドDNA、ファージDNA、AcMNPVなどのバキュロウイルス等のいずれであってもよい。プラスミドDNAとしては、大腸菌由来のプラスミド（例えばpBR322、pUC118等）、枯草菌由来のプラスミド（例えばpUB110、pTP5等）、酵母由来のプラスミド（例えばYEp13、YEp24、YEp50等）などが挙げられ、ファージDNAとしては $\lambda$ ファージ等が挙げられる。さらに、レトロウイルスまたはワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクター等を用いることもできる。また、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の機能が発揮されるように、本発明の発現ベクターには本発明のタンパク質をコードする遺伝子のほか、例えば、複製開始点、選択マーカー、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、リボソーム



結合部位、ポリアデニル化シグナル等を組み込んでいてもよい。複製開始点としては、大腸菌用ベクターには、例えばC o l E 1, R 因子, F 因子由来のものが、酵母用ベクターには、例えば2  $\mu$  m DNA, A R S 1 由来のものが、動物細胞用ベクターには、S V 4 0, アデノウイルス由来のものが用いることができる。プロモーターとしては、大腸菌用ベクターには、t r p プロモーター、l a c プロモーター、P L プロモーター、P R プロモーター等が、酵母用ベクターには、g a l 1 プロモーター、P H O 5 プロモーター、P G K プロモーター、G A P プロモーター、A D H プロモーター、A O X 1 プロモーター等が、動物細胞用ベクターには、S R  $\alpha$  プロモーター、S V 4 0 プロモーター、L T R プロモーター、C M V プロモーター等が用いることができる。選択マーカーとしては、大腸菌用ベクターには、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子等が、酵母用ベクターには、L e u 2, T r p 1, U r a 3 遺伝子等が、動物細胞用ベクターには、ネオマイシン耐性遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等が用いることができる。また、前記遺伝子もしくは配列番号2のDNAまたはその修飾体を挿入するベクターとして、商業的に入手可能なものを使用することができるが、そのようなベクターには、宿主が大腸菌である場合は、例えばp E T ベクター ( N o v a g e n 社製)、p T r x F U S ベクター ( I n v i t r o g e n 社製)、p C Y B ベクター ( N e w E n g l a n d B i o L a b s 社製) p C o l d ベクター (タカラバイオ社製) 等が、宿主が酵母である場合は、例えばp E P - 1 発現ベクター ( S t r a t a g e n e 社製)、p A U R 1 2 3 ベクター (タカラバイオ社製)、p P I C ベクター ( I n v i t r o g e n 社製) 等が、また宿主が動物細胞である場合は、例えばp M A M - n e o 発現ベクター ( C L O N T E C H 社製)、p C D N A 3. 1 ベクター ( I n v i t r o g e n 社製)、p B K - C M V ベクター ( S t r a t a g e n e 社製) 等が、宿主が昆虫細胞である場合は、例えばp B a c P A K ベクター ( C L O N T E C H 社製)、p A c U W 3 1 ベクター ( C L O N T E C H 社製)、p A c P (+) I

E1ベクター（Novagen社製）等がそれぞれ挙げられる。また、本発明の発現ベクターには、発現されるタンパク質の検出および精製を容易にするためにタグを組み込んでもよい。タグの例としては、例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、マルトース結合プロテイン、ヒスチジン（His6）等が挙げられる。これらのタグに親和性のある担体（ヒスチジンであればニッケルをキレートした担体）を用いることにより、アフィニティー精製が可能となる。

[0026] ベクターへの遺伝子等の挿入は、例えば、精製された遺伝子の塩基配列を適当な制限酵素で切断し、適当なベクターDNAの制限酵素部位またはマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などを用いることができるが、これらに限定されない。また、本発明のタンパク質をコードする遺伝子と他のタンパク質のコードする配列を融合したものを挿入してもよい。これら発現ベクターは、大腸菌やアグロバクテリウムからアルカリ抽出法またはその変法等により調製できる。

[0027] 本発明の形質転換体は、前記本発明の発現ベクターを宿主に組み込むことにより形質転換された形質転換体であれば良い。なお、宿主としては、本発明のタンパク質をコードする遺伝子を発現できるものであれば、特に制限されるものではない。例えば、大腸菌（*Escherichia coli*）等のエシェリヒア属、バチルス・ズブチリス（*Bacillus subtilis*）等のバチルス属、シュードモナス・プチダ（*Pseudomonas putida*）等のシュードモナス属に属する細菌、サッカロミセス・セレビスエ（*Saccharomyces cerevisiae*）およびピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）等の酵母、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）、マウスL細胞、ヒトGH3、ヒトFL細胞等の動物細胞、あるいはSf9、Sf21等の昆虫細胞が挙げられる。

[0028] 宿主への発現ベクターの導入は、宿主の種類に応じて公知の方法で行うことができ、例えば、塩化カルシウム法、リン酸カルシウム法、エレクトロポ

レーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リポフェクション法等が挙げられる。また、上記の各宿主細胞への遺伝子導入は、組換えベクターによらない方法、例えばパーティクルガン法等も用いることができる。

[0029] 本発明のマンノシルーβ-1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼの製造方法は、前記形質転換体を培養する工程と、前記培養する工程において発現した前記マンノシルーβ-1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼを回収する工程とを含む製造方法である。前記培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。大腸菌等の微生物を宿主とした形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類などを含有し、形質転換体の培養を効率的に行えるものであれば、天然培地、合成培地などのいずれを用いてもよい。本発明のマンノシルーβ-1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼの回収は、特に制限されない。前記マンノシルーβ-1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼが菌体内または細胞内に生産される場合には、菌体または細胞を破碎することによって前記マンノシルーβ-1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼを回収する。また、本発明のマンノシルーβ-1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼが菌体外または細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離などにより菌体または細胞を除去した後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどを単独でまたは適宜組み合わせて用いることにより、培養物中から本発明のマンノシルーβ-1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼを単離精製できる。なお、培養液をそのまま使用する場合、熱処理などにより他のタンパク質が失活するので、実質上、本発明のマンノシルーβ-1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼ酵素液として使用できる。

[0030] マンノシルーβ-1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼは特

に限定されるものではなく、いかなる起源の酵素を用いることも可能である。この酵素の使用形態は特に限定されるものではなく、菌体抽出液、精製酵素、固定化酵素など種々のものを利用することができる。本発明の好適な実施形態によれば、上記反応に関わる酵素を固定化したバイオリクターカラムを用いて、固定化酵素リアクターとして反応を行うことも可能である。

[0031] 出発原料として用いる糖質はいかなる起源のものであっても良い。反応系に加える糖質濃度は特に限定されるものではないが、好ましくは約0.1～約1000 g/Lであり、より好ましくは約0.1～約200 g/Lである。

[0032] 反応液中でのマンノシル-β-1,4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼの濃度は特に限定されないが、0.76～76 μM、好ましくは、1.5～3.8 μMで使用し得る。

[0033] マンノシル-β-1,4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼの30℃における至適pHは5.5付近であることから、前記溶液は、pH5.0～7.0であることが好ましく、特にpH5.5が好ましい。前記溶液としては、特に限定されるものではないが、酢酸緩衝溶液が好適である。

[0034] また、マンノシル-β-1,4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼのpH5.5における温度安定性は60℃までであることから、オリゴ糖合成反応は、30～60℃で行うことが好ましく、特に、30℃が好ましい。

[0035] また、反応時間は、特に限定されるものではないが、30～60分が好ましく、特に、60分が好ましい。

[0036] 上記オリゴ糖合成反応により製造されたアスパラギン結合型糖タンパク質のコア糖鎖構造マンノシル-β-1,4-N-アセチルグルコサミンおよびマンノシル-β-1,4-キトビオースは、カラムクロマトグラフィーや結晶化等の公知の方法により単離することが可能である。カラムクロマトグラフィーとして、これに限定されるものではないが、サイズ排除クロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフ

イー、限外濾過膜分離、逆浸透膜分離が含まれる。結晶化方法としては、これに限定されるものではないが、濃縮、温度低下、溶媒添加（エタノール、メタノール、アセトンなど）が含まれる。

[0037] なお、本発明は上記実施形態に限定されるものではなく、本発明の思想を逸脱しない範囲で種々の変形実施が可能である。

[0038] 次に、本発明を実施例により詳しく説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

### 実施例 1

[0039] バクテロイデス・シータイオタオミクロン (*Bacteroides thetaiotaomicron*) のゲノム情報を基に、BT1033 遺伝子に対するフォワードプライマー (配列番号3) およびリバースプライマー (配列番号4) を設計し、合成した。BT1033 遺伝子の塩基配列を配列番号2に、またこの塩基配列にコードされているアミノ酸配列を配列番号1に示す。

[0040] バクテロイデス・シータイオタオミクロンのゲノムDNAを鋳型とし、上記のプライマー及びKOD plus polymerase (TOYOBO社製) を用い、95℃に2分間保持したのち、95℃で30秒間、58℃で30秒間、68℃で1分30秒間のサイクルを45回繰り返してPCR反応を行い、最後に68℃に5分間保持した。その結果、985bpの増幅断片が得られた。このPCRで増幅されるDNA断片は、5'末端にNdeIサイトを、3'末端にXhoIサイトをそれぞれ有するBT1033をコードするDNAである。

[0041] 得られた増幅断片を制限酵素NdeI及びXhoIで消化後、同様に処理した市販の遺伝子発現用プラスミドpET-24a (ノバジェン社製) に高効率ライゲーション試薬Ligation high (TOYOBO社製) を用いて連結した。さらに、ライゲーション反応液を用いて大腸菌コンピテントセルDH5 $\alpha$  (TOYOBO製) を形質転換し、C末端に6残基のヒスチジンからなるHisタグが付加されたBT1033をコードするDNAを

含む発現ベクター pET-24a を回収した。

- [0042] この発現ベクター pET-24a を用いて、大腸菌 BL21 (DE3) を Hanahanらの方法 (J. Mol. Biol.、1983年、第166巻、第557-580頁) に従って形質転換した。形質転換体を  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  のカナマイシンを含む LB 培地  $200 \text{ mL}$  に植菌し、IPTG 濃度を  $0.1 \text{ mM}$  として誘導培養を  $18^\circ\text{C}$  で 24 時間行った。培養液から遠心分離で回収した菌体を  $10 \text{ mL}$  の  $500 \text{ mM}$  塩化ナトリウムおよび  $10\%$  グリセロールを含む  $20 \text{ mM}$  HEPES-NaOH 緩衝液  $\text{pH} 7.5$  に懸濁し、超音波処理により破碎した後、遠心分離後によって粗酵素液を得た。組換えタンパク質の精製は、His タグタンパク質精製用カラム His Trap FF (GEヘルスケア社製) を用いたカラムクロマトグラフィーにより行った。得られた精製酵素溶液を、 $10 \text{ mM}$  HEPES-NaOH 緩衝液  $\text{pH} 7.0$  に対して透析を行い、遠心式フィルターユニットアミコンウルトラ-15 (ミリポア社製) を用いた限外濾過によって濃縮することで、 $3.6 \text{ mL}$  の精製酵素標品を調製した。

## 実施例 2

- [0043] 得られた精製酵素標品を用い、以下に示す方法によって本タンパク質を新規酵素マンノシル- $\beta$ -1,4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼと同定し、アスパラギン結合型糖タンパク質のコア糖鎖構造マンノシル- $\beta$ -1,4-N-アセチルグルコサミンおよびマンノシル- $\beta$ -1,4-キトビオースを生成した。
- [0044]  $50 \text{ mM}$  糖供与体 ( $\alpha$ -マンノース 1-リン酸)、 $50 \text{ mM}$  糖受容体 (N-アセチルグルコサミンまたはキトビオース)、精製酵素 (それぞれ  $1.5$ 、 $3.8 \mu\text{M}$ ) を含む  $40 \text{ mM}$  酢酸緩衝液 ( $\text{pH} 5.5$ ) 中で酵素反応を  $30^\circ\text{C}$ 、1 時間行った。各反応液をアンバーライト MB3 (オルガノ社製) で脱塩後、ショウデックスアサヒパック NH2P-50 4E カラムによる  $75\%$  アセトニトリルを溶媒とした高速液体クロマトグラフィーにより、それぞれ二糖画分 (図 1 A) および三糖画分 (図 2 A) を単離した。精製後の

収量は共に 2 mg であった。それぞれの生成物を NMR により分析したところ、マンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンおよびマンノシル- $\beta$ -1, 4-キトビオースであることを確認した。

[0045] 40 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 中、2 mM の  $\alpha$ -マンノース 1-リン酸および糖受容体を用いて、合成反応時に生成するリン酸をモリブデンブルー法 (J. Biol. Chem. 1946, 162, 421-428) により定量した。上記条件下に毎分 1  $\mu$ モルのリン酸を生成する活性を 1 ユニットと定義した。その結果、N-アセチルグルコサミンおよびキトビオースを糖受容体としたときの活性はそれぞれ 20 および 1.9 ユニット/mg であった。

[0046] マンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼの 30°C における至適 pH は 5.5 付近であり (図 3A)、安定 pH 範囲は 4°C, 24 時間の条件下で pH 4.5-10.5 であった (図 3B)。本酵素の pH 5.5 における安定性は 60°C までであった (図 3C)。本酵素を用いたオリゴ糖合成反応は、pH 5.0~7.0、30~60°C が好ましいことがわかった。

### 産業上の利用可能性

[0047] 以上のように本発明は、医療創薬産業およびオリゴ糖製造業で利用できる。

## 請求の範囲

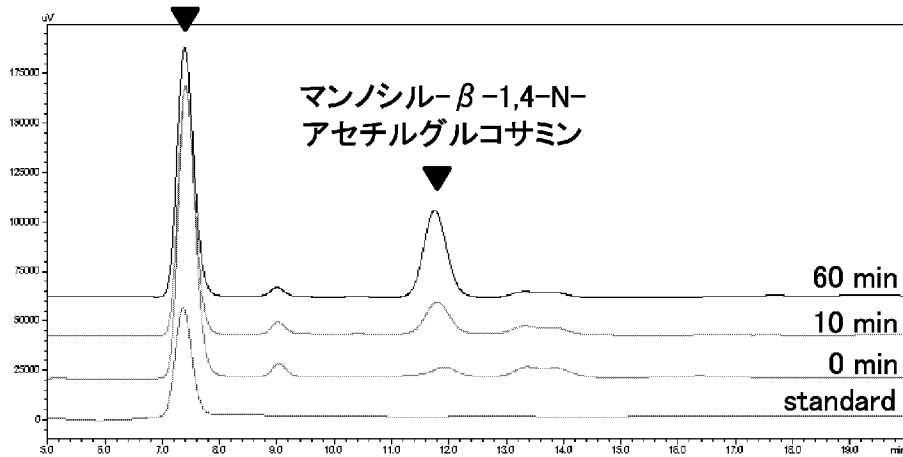
- [請求項1]  $\alpha$ -マンノース1-リン酸と、N-アセチルグルコサミンまたはキトビオースとに作用して、アスパラギン結合型糖タンパク質のコア糖鎖構造マンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンまたはマンノシル- $\beta$ -1, 4-キトビオースを生成することを特徴とするオリゴ糖合成酵素マンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼ。
- [請求項2] 以下の酵素学的性質を有する請求項1記載のオリゴ糖合成酵素マンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼ：
- a) 作用  
 $\alpha$ -マンノース1-リン酸と、N-アセチルグルコサミンまたはキトビオースとに作用して、アスパラギン結合型糖タンパク質のコア糖鎖構造マンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンまたはマンノシル- $\beta$ -1, 4-キトビオースを生成する；
  - b) 基質特異性  
 $\alpha$ -マンノース1-リン酸と、N-アセチルグルコサミンまたはキトビオースとに作用する；
  - c) 至適pH  
30°Cの条件下で、pH5.5；
  - d) 温度安定性  
pH5.5の条件下で、60°Cまで安定；
  - e) pH安定性  
4°C、24時間の条件下で、pH4.5-10.5で安定。
- [請求項3] 配列番号1記載のアミノ酸配列、または配列番号1記載のアミノ酸配列において、1つ若しくは数個のアミノ酸残基が、欠失、置換、付加、または挿入された配列を有する請求項1または2に記載のオリゴ糖合成酵素マンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼ。



- [請求項4] バクテロイデス・シータイオタオミクロン由来の請求項1～3のいずれか1項に記載のオリゴ糖合成酵素マンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼ。
- [請求項5] 請求項3または4に記載のオリゴ糖合成酵素マンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼをコードするベクターまたは配列番号2記載のDNAを含むベクター。
- [請求項6] 請求項5記載のベクターにより形質転換された形質転換体。
- [請求項7] 請求項1～4のいずれか1項に記載のオリゴ糖合成酵素マンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼの製造方法であって、請求項6記載の形質転換体を培養する工程と、前記培養する工程において生産されたマンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼを回収する工程を含む製造方法。
- [請求項8]  $\alpha$ -マンノース1-リン酸と、N-アセチルグルコサミンと、請求項1～4のいずれか1項に記載のオリゴ糖合成酵素マンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼを含む溶液中でオリゴ糖合成反応を行う工程と、マンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンを回収する工程を含むアスパラギン結合型糖タンパク質のコア糖鎖構造の製造方法。
- [請求項9]  $\alpha$ -マンノース1-リン酸と、キトビオースと、請求項1～4のいずれか1項に記載のオリゴ糖合成酵素マンノシル- $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミンホスホリラーゼを含む溶液中でオリゴ糖合成反応を行う工程と、マンノシル- $\beta$ -1, 4-キトビオースを回収する工程を含むアスパラギン結合型糖タンパク質のコア糖鎖構造の製造方法。
- [請求項10] 前記溶液がpH5.0～7.0である請求項8または9に記載のアスパラギン結合型糖タンパク質のコア糖鎖構造の製造方法。

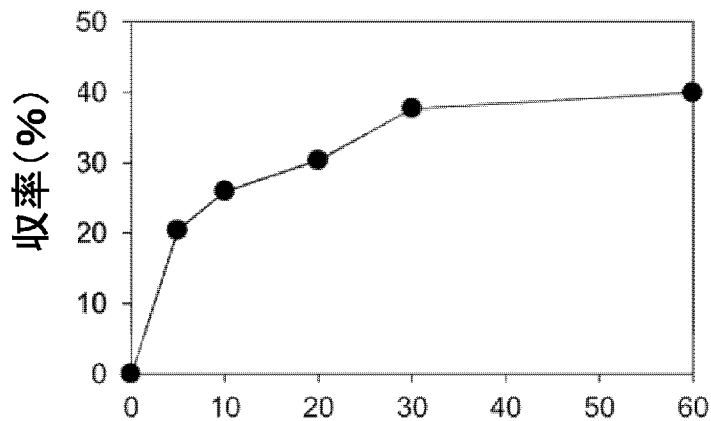
[図1A]

N-アセチルグルコサミン



保持時間(分)

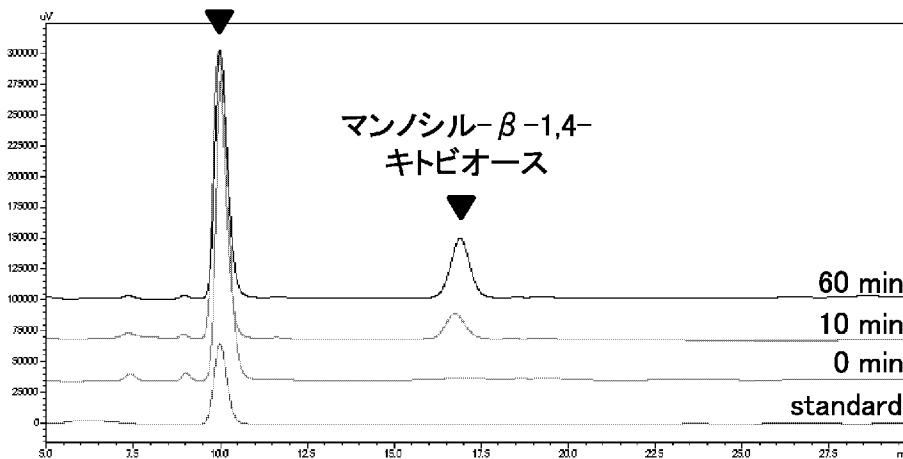
[図1B]



反応時間(分)

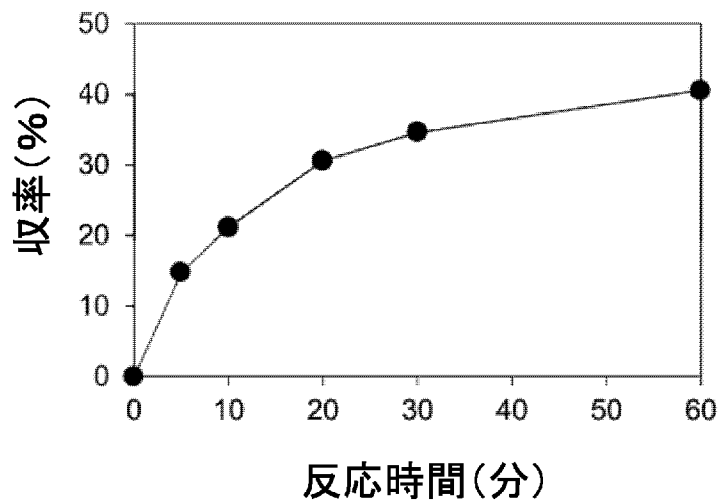
[図2A]

キトビオース

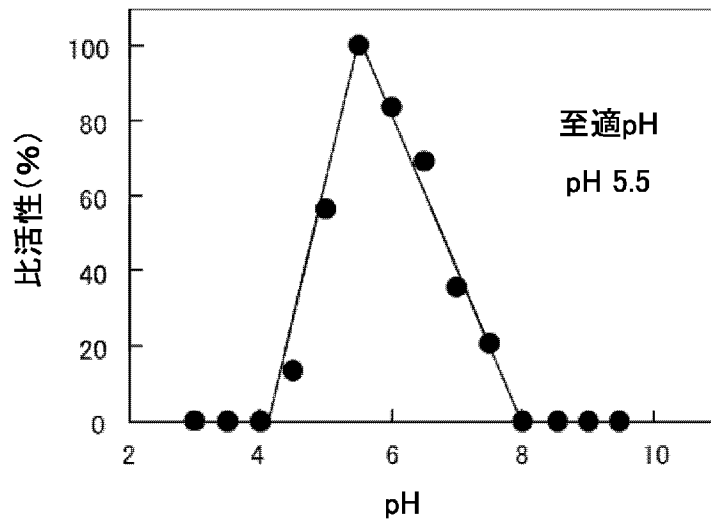


保持時間(分)

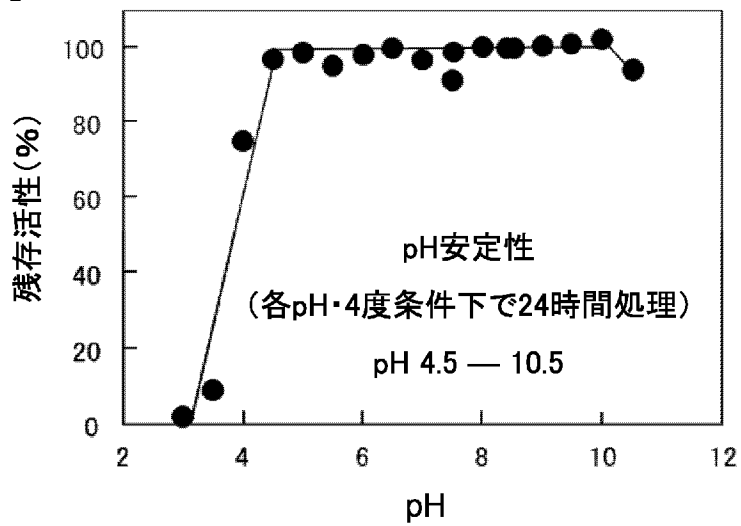
[図2B]



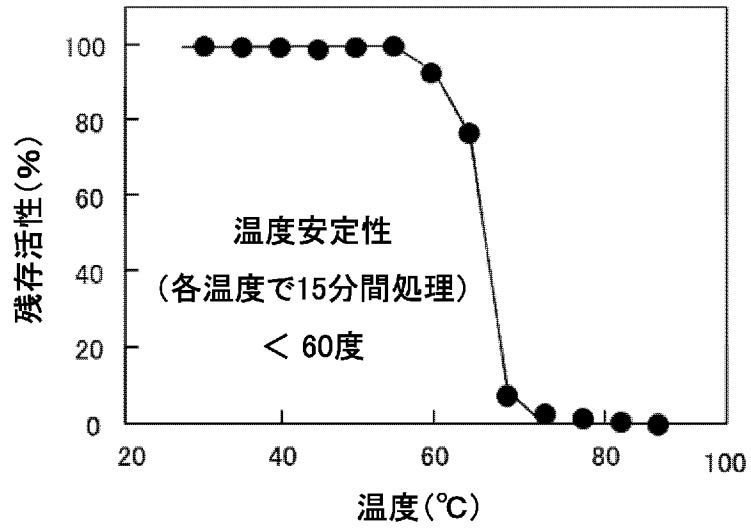
[図3A]



[図3B]



[図3C]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2013/068549

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
C12N9/10(2006.01) i, C12P19/00(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12N9/10, C12P19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDREAMIII), PubMed, UniProt/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online] Accession No. AA076140 < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AA076140">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AA076140</a> > 08-FEB-2011 uploaded, [retrieved on 2013-07-25] Xu, J., et al., Definition: Glycosidase, PH117-related [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]	1-7/8-10
A	WO 2005/063782 A1 (SHIONOGI & CO., LTD.), 14 July 2005 (14.07.2005), entire text & JP 4778315 B & US 2007/0166783 A1 & EP 1698634 A1	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 25 July, 2013 (25.07.13)	Date of mailing of the international search report 06 August, 2013 (06.08.13)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N9/10(2006.01)i, C12P19/00(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N9/10, C12P19/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2013年 日本国実用新案登録公報 1996-2013年 日本国登録実用新案公報 1994-2013年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed, UniProt/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X / A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online] Accession No. AAO76140 < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAO76140">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAO76140</a> > 08-FEB-2011 uploaded, [retrieved on 2013-07-25] Xu, J., et al., Definition: Glycosidase, PH117-related [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]	1 - 7 / 8 - 1 0
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 25.07.2013	国際調査報告の発送日 06.08.2013	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 福澤 洋光 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3963

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2005/063782 A1 (SHIONOGI & CO., LTD.) 2005.07.14, 全文 & JP 4778315 B & US 2007/0166783 A1 & EP 1698634 A1	1 - 1 0