糖タンパク質糖鎖を切断する微生物の エンドグリコシダーゼとその応用†

山 本 憲 二

(京都大学農学部)

糖タンパク質や糖脂質の糖鎖の機能を解析するためには糖鎖を削除した分子を人為的に調製して、もとの分子と比較することが最も有効な方法である。しかし、化学的な方法で糖鎖を外そうとするとタンパク質や脂質の部分が破壊されてしまい、解析が不可能になる。また、最近の遺伝子工学的な手法や糖鎖合成阻害剤を用いて糖鎖を持たない分子を作る方法は限られた場合にしか適用できず、しかも操作が煩雑である。そこで、酵素を用いて温和な条件の下で糖鎖を外す方法が最も簡便で取り扱いやすい。

糖鎖を酵素によって外すためには糖鎖の構造が多様であるゆえに、エキソグリコシダーゼで非還元末端から糖を逐次分解していくことは難しい。一方、糖鎖の結合部を認識して糖鎖を切断し遊離することのできるエンドグリコシダーゼはこのような目的にかなった酵素である。糖鎖を遊離できる酵素が見つかったのは 1971 年に村松が *Diplococcus pneumoniae* (肺炎双球菌) の培養液中にマウス IgG の糖鎖を切断する酵素を見出したのが最初である⁽¹⁾。このエンド型グリコシダーゼはエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ (Endo-β-GlcNAc-ase) と呼ばれ、糖タンパク質のアスパラギン結合糖鎖のタンパクとの結合部のジアセチルキトビオース結合を切断する。以後、微生物の培養液を中心として、動・植物にもその存在が次々と見出された。一方、O-グリコシド結合でタンパクと結合するムチン型糖鎖の二糖ガラクトシル β1→3 N-アセチルガラクトサミン (Galβ1→3GalNAc) をタンパクから切り出すエンド-α-N-アセチルガラクトサミニダーゼ (Endo-α-GalNAc-ase) は *Clostridium*

perfringens の培養液より初めて見出された⁽²⁾。この酵素はいまだ微生物以外にその存在は確認されていない。その他、糖鎖を切り出す酵素としてはエンド-β-ガラクトシダーゼ⁽³⁾ (糖鎖中のガラクトースの還元末端側を切断する) やアスパラギン結合糖鎖をアスパラギンとのアミド結合部で切断遊離するアミダーゼであるグリコペプチダーゼ⁽⁴⁾などがある。スフィンゴ糖脂質についても糖鎖とセラミドを遊離する酵素が見出され、エンドグリコセラミダーゼ⁽⁵⁾と呼ばれている。筆者らは土壌より分離同定した微生物の培養液より、種々のエンドグリコシダーゼを見出している。そこで本稿では、新奇な性質を持った Endo-β-GlcNAc-ase と Endo-α-GalNAc-ase について紹介し、それらの応用についても述べたい。(図1)。

1. 微生物のエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ

筆者らが土壌より単離したさまざまな微生物について調べた結果では約 15% の割合で、その培養液中に Endo-β-GlcNAc-ase が見出され、かなり多くの微生物がこの酵素を有していることがわかった。その役割については栄養源の獲得が考えられるが、微生物において、自ら生産した糖タンパク性酵素を自らの Endo-β-GlcNAc-ase によって糖鎖を遊離するという現象がみられるので⁽⁶⁾、自己消化や調節にも関与していることが十分に考えられる。

土壌より単離同定した *Flavobacterium* sp. は酵母エキスを培地中に添加すると Endo-β-GlcNAc-ase を著しく誘導生産する⁽⁷⁾。その相関性は不明であるが、酵母の細胞壁マンナンはアスパラギン残基にジアセチルキトビオースを介して結合しているので、これが酵素の誘導物質となっている可能性がある。本酵素はマンノースのオリゴマーからなる高マンノース型のアスパラギン結合糖鎖によく作用し、従来よりよく知られている *Streptomyces plicatus* の Endo-β-GlcNAc-ase (Endo-H)⁽⁸⁾ と同様

† Microbial Endoglycosidases Cleaving Sugar Chains of Glycoproteins and Their Applications. Kenji YAMAMOTO (Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606)

図1 糖タンパク質の糖鎖を遊離する酵素の作用部位. Man, マンノース; Gal, ガラクトース; GlcNAc, N-アセチルグルコサミン; GalNAc, N-アセチルガラクトサミン.

の特異性を示す. 糖鎖構造に対する特異性を卵白アルブミンに含まれる高マンノース型および混成型糖鎖について調べてみると, ほぼ糖鎖の分子量が大きくなるに従って作用しにくくなり, この傾向も Endo-H と同じである⁽⁹⁾ (表1). そこで両酵素についてアミノ酸配列を比較してみると約 60% の相同性があり, *Flavobacterium* sp. の酵素の N-末端より 81 番目から 88 番目の KVSLSILG および 120 番目から 127 番目の LDGVLDLD のアミノ酸配列部分は活性に関与する部位であると考えられ⁽¹⁰⁾, Endo-H のみならず¹¹⁾, 植物や微生物由来のキチナーゼについても類似のアミノ酸配列が見出される⁽¹²⁾. キチナーゼも Endo- β -GlcNAc-ase もジアセチルキトビオース結合を切断する作用様式を持つ酵素ではあるが, それぞれの基質に対しては互いにまったく作用しない. 微生物の Endo- β -GlcNAc-ase は上述したように高マンノース型糖鎖に対して強い作用を示すので, カビや酵母などの微生物が生産する, 高マンノース型糖鎖を持つ糖タンパク質性酵素の糖鎖機能を知る手段として有用である. その糖鎖の機能については Endo- β -GlcNAc-ase を用いた多くの研究結果が報告されており, 熱安定性やタンパク分解酵素に対する抵抗性などに関与していることが明らかになっているが⁽¹³⁾, 筆者らは *Flavobacterium* sp. の Endo- β -GlcNAc-ase を用いて, 有機溶媒による酵素タンパクの変性に対する耐性についても糖鎖が関与していることを明らかにした⁽¹⁴⁾. また多くの場合, Endo- β -GlcNAc-ase で糖鎖を除いても, 酵素タンパクに大きなコンフォメーション変化はみられない. このことは糖鎖を除去することによって生じるわずかな立体構造の変化が酵素の熱安定性に大きな影響を与えていることを示すものである.

一方, 動物起源の糖タンパク質の大部分に存在する複合型のアスパラギン結合糖鎖に作用する微生物の Endo- β -GlcNAc-ase が 1982 年に *Flavobacterium meningosepticum* の培養液に初めて見出された⁽¹⁵⁾. Endo-F と名づけられたこの酵素は界面活性剤の存在下でのみ糖鎖をタンパク質から遊離することができる⁽¹⁶⁾. したがって生理活性を有する糖タンパクを処理する場合には困難さが伴う. 筆者らは土壌より単離同定した *Mucor hiemalis* の培養液中に界面活性剤が存在しなくても複合型の糖鎖に作用する酵素を見出した⁽¹⁷⁾. Endo-M と名づけたこの酵素は二本鎖の複合型糖鎖によく作用し, 混成型糖鎖よりもその特異性は高い (表1). しかもシアロ糖鎖に対しても作用する. 他の微生物の Endo- β -GlcNAc-ase と同様に高マンノース型糖鎖に対してよく作用するが, 卵白アルブミン糖鎖の GP-V よりも GP-IV に対する特異性が強いという特徴がみられる. ヒトトランスフェリンの複合型二本鎖をこの酵素によって脱離し, 得られた脱糖鎖トランスフェリンの鉄の結合能について調べたところ, native なトランスフェリンと相違が認められず, 鉄の結合に糖鎖は関与していないことが確かめられた. この種の実験に従来より用いられていた Endo-F は最近, *Cl. perfringens* の酵素 (Endo- C_I , C_{II})¹⁸⁾ と同様にアイソザイムが存在することが認められ (Endo- F_1 , F_2 , F_3), 標品中の大部分を占める Endo- F_1 は高マンノース型糖鎖にしか作用せず, Endo-H とほとんど変わらない酵素であることが報告されている⁽¹⁹⁾.

2. 微生物のエンド- α -N-アセチルガラクトサミンダーゼ

ムチン型糖タンパク質糖鎖は生体内において, 粘液物質ムチンをはじめとして, 生体膜やホルモンなどに広く存在し, 生体内器官の保護や抗原-抗体反応に深く関与している. ムチン型糖鎖はアスパラギン結合糖鎖と異なり構造的な規則性がほとんどみられないが, 大部分の糖鎖の核として $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$ の二糖が存在し, 還元末端の N-アセチルガラクトサミンがタンパク質のセリンまたはスレオニンの水酸基に α 結合している. この結合を切断する Endo- α -GalNAc-ase は嫌気性菌の *Cl. perfringens*⁽²⁾ と *D. pneumoniae*⁽²⁰⁾ の培養液より見出されている. 筆者らは土壌より単離した好気性の *Alicyclopes* 属の一菌株がブタ胃粘膜ムチンを培地として培養すると特異的に本酵素を誘導生産することを見出した⁽²¹⁾. ブタ胃粘膜ムチンにはムチン型糖鎖が豊富に存在

表 1 *Flavobacterium* sp. の Endo- β -GlcNAc-ase (Endo-H タイプ) と
Endo-M, Endo-F の基質特異性の比較

DNS-Glycopeptides (33 nmol)	Released DNS-Asn-GlcNAc (nmol)			
	<i>Flavobacterium</i> enzyme	Endo-M	Endo-F	
Ovalbumin				
GP-V		27.6	13.2	10.6
GP-IV		22.6	26.6	8.3
GP-III		13.0	5.6	4.1
GP-II		3.0	3.2	0.6
GP-I		1.5	2.4	Trace
Asialotransferrin GP
	0	6.3	Trace
Sialotransferrin GP
	0	3.0	0

ダンシル化糖ペプチド (33 nmol) を基質として用いて、それぞれの酵素 (3 munits) を 15 分間反応させた。Endo-F は市販の酵素を用い、酵素単位は表示の数値に従った。M, マンノース; G, ガラクトース; GN, *N*-アセチルグルコサミン; NA, *N*-アセチルノイラミン酸。

図2 ムチン型糖鎖が結合するアミノ酸の相違による Endo- α -GalNAc-ase の作用速度の違い。○, △: DNS-Ser-GalNAc-Gal からの GalNAc-Gal の遊離。●, ▲: DNS-Thr-GalNAc-Gal からの GalNAc-Gal の遊離。丸印は *Alcaligenes* sp. の酵素, 三角印は *D. pneumoniae* の酵素による作用を示す。

している。本酵素は Gal β 1 $\rightarrow$ 3 GalNAc の二糖に対して強い特異性を持っている。興味深いことにスレオニン残基に結合した糖鎖よりもセリン残基に結合した糖鎖に対してよく作用する⁽²²⁾。すなわち、神崎病と呼ばれるシアリダーゼ欠損症の患者の尿から見出された、ムチン型糖鎖にセリン残基またはスレオニン残基のみが結合したアミノ酸-O-グリカンをダンシル化して本酵素の作用を調べると Ser-GalNAc-Gal のほうが Thr-GalNAc-Gal に対してよりもよく作用する(図2)。一方、*D. pneumoniae* の酵素は糖タンパク質には作用するにもかかわらず、アミノ酸-O-グリカンについては後者にわずかに作用するだけで、前者にはまったく作用しない。従来より、ムチン型糖鎖が結合するアミノ酸の違いによる糖鎖の特性についてはまったく検討されていなかった。しかし、これらの結果は、糖鎖の生理的な役割を考えるに際して糖鎖が結合するアミノ酸の影響やさらに周辺のペプチド構造をも検討するべきことを示唆している。

Alcaligenes sp. の Endo- α -GalNAc-ase が遊離する Gal β 1 $\rightarrow$ 3 GalNAc 二糖は T-抗原⁽²³⁾と呼ばれ、ヒトの正常細胞にはみられず、胃ガンや大腸ガンなどのガン細胞には多量にみられることから、細胞ガン化のマーカーの1つとして注目されている。そこで本酵素をヒト胃ガン細胞 Kato III に作用した。酵素法による糖鎖の切出しは化学的な方法と異なって糖鎖の還元末端が潰されな

図3 *Alcaligenes* sp. の Endo- α -GlcNAc-ase による Kato III 細胞からの T-抗原の切出し。矢印は標準ピリジリアミノ化 GalNAc-Gal の溶出位置。

いので、前処理することなく糖鎖を蛍光ラベルすることができる。そこで、酵素作用後、ピリジリアミノ化して HPLC で分析したところ、Gal β 1 $\rightarrow$ 3 GalNAc が遊離していることが確認された(図3)⁽²⁴⁾。この結果より、本酵素を用いた新しいガン検査システムの開発が可能であることが示唆された。

3. これからの展望

アスバラギン結合糖鎖をタンパクとの結合部で切断する *Fl. meningosepticum* のグリコペプチダーゼ (N-グリカナーゼ) は低分子の糖ペプチドを除く広い基質特異性を有しているアミダーゼで、糖鎖を外す手段として広く用いられている。この酵素と比較すると特異性が狭い Endo- β -GlcNAc-ase は使途が限られる。しかしながら、異なった特異性を持つ種々の Endo- β -GlcNAc-ase を巧みに使い分けることによって、ある程度の糖鎖構造を類推することができるという利点がある。またグリコシダーゼが本来の加水分解活性とともに併せ持つ糖転移活性を利用して、タンパクに糖鎖をつけることも不可能ではない。すなわち、Endo- β -GlcNAc-ase によって糖鎖が遊離された後にタンパク側に残された一残基の GlcNAc を目印(受容体)として異なる特異性を持つ Endo- β -GlcNAc-ase の糖転移活性を利用することにより別の構造を持つ糖鎖をタンパクにくっつけることも不可能ではない。Endo- β -GlcNAc-ase のみならず Endo- α -GalNAc-ase も含めて、まだまだ多様な特異性を持つエンドグリコシダーゼが見出され、糖鎖解析のみならず医療分野に

においても有用なツールとなることが期待される。

- (1) T. Muramatsu : *J. Biol. Chem.*, **246**, 5535—5537 (1971).
- (2) C. C. Huang and D. Aminoff : *J. Bio. Chem.*, **247**, 6737—6742 (1972).
- (3) M. Fukuda and G. Matsumura : *J. Biol. Chem.*, **251**, 6218—6225 (1976).
- (4) T. H. Plummer, J. H. Elder, S. Alexander, A. W. Phelan, and A. L. Tarentino : *J. Biol. Chem.*, **259**, 10700—10704 (1984).
- (5) M. Ito and T. Yamagata : *J. Biol. Chem.*, **261**, 14278—14282 (1986).
- (6) Y. Tsuji, K. Yamamoto, and T. Tochikura : *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 928—933 (1990).
- (7) S. Kadowaki, K. Takegawa, K. Yamamoto, H. Kumagai, and T. Tochikura : *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2105—2106 (1988).
- (8) A. L. Tarentino and F. Maley : *J. Biol. Chem.*, **249**, 811—817 (1974).
- (9) K. Yamamoto, S. Kadowaki, K. Takegawa, H. Kumagai, and T. Tochikura : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 421—429 (1986).
- (10) K. Takegawa, B. Mikami, S. Iwahara, Y. Morita, K. Yamamoto, and T. Tochikura : *Eur. J. Biochem.*, **202**, 175—180 (1991).
- (11) P. W. Robbins, R. B. Trimble, D. F. Wirth, C. Hering, F. Maley, G. F. Maley, R. Das, B. W. Gibson, N. Royal, and K. Biemann : *J. Biol. Chem.*, **259**, 7577—7583 (1984).
- (12) T. Watanabe, W. Oyanagi, K. Suzuki, K. Ohnishi and H. Tanaka : *J. Bacteriol.*, **174**, 408—414 (1992).
- (13) K. Takegawa, M. Inami, K. Yamamoto, H. Kumagai, T. Tochikura, B. Mikami, and Y. Morita : *Biochim. Biophys. Acta*, **955**, 187—193 (1988).
- (14) 山本憲二, 板倉辰六郎 : 農化, **64**, 1475—1478 (1990).
- (15) J. H. Elder and S. Alexander : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4540—4544 (1982).
- (16) A. L. Tarentino, C. M. Gomez, and T. H. Plummer : *Biochemistry*, **24**, 4665—4671 (1984).
- (17) S. Kadowaki, K. Yamamoto, M. Fujisaki, K. Izumi, T. Tochikura, and T. Yokoyama : *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 97—106 (1990).
- (18) S. Ito, T. Muramatsu, and A. Kobata : *Arch. Biochem. Biophys.*, **171**, 78—86 (1975).
- (19) R. B. Trimble and A. L. Tarentino : *J. Biol. Chem.*, **266**, 1646—1651 (1991).
- (20) Y. Endo and A. Kobata : *J. Biochem.*, **80**, 1—8 (1976).
- (21) J.-Q. Fan, S. Kadowaki, K. Yamamoto, H. Kumagai, and T. Tochikura : *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1715—1723 (1988).
- (22) J.-Q. Fan, K. Yamamoto, Y. Matsumoto, Y. Hirabayashi, H. Kumagai, and T. Tochikura : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **169**, 751—757 (1990).
- (23) G. F. Springer : *Science*, **224**, 1198—1206 (1984).
- (24) J.-Q. Fan, K. Kanatani, S. Andoh, K. Yamamoto, H. Kumagai, and T. Tochikura : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **172**, 341—347 (1990).