

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質であって、対応する野生型 PNGase F タンパク質と比べて複数のアミノ酸突然変異を有し、前記複数の突然変異が、

(a) 前記 PNGase F タンパク質の触媒活性を低下又は消失させる少なくとも 1 つの第 1 の突然変異；及び

(b) 結合親和性又は結合特異性に影響を与える少なくとも 1 つの第 2 の突然変異を含む、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質。

【請求項 2】

前記第 2 の突然変異が、

(i) N 結合型グリカンに対する結合親和性を高め；かつ/又は

(ii) O 結合型グリカンに対する結合特異性及び親和性を増加させる

突然変異を含む、請求項 2 に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質。

【請求項 3】

前記 O 結合型グリカンが O 結合型 GlcNAc を含む、請求項 2 に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質。

【請求項 4】

前記 O 結合型グリカンが O 結合型 GalNAc を含む、請求項 2 に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質。

【請求項 5】

前記対応する野生型タンパク質が、F. メニンゴセプチカム (F. meningosepticum) からの PNGase F (配列番号 1)、F. メニンゴセプチカム (F. meningosepticum) からの PNGase F - II (配列番号 3)、バクテロイデス・フラジリス (Bacteroides fragilis) からの PNGase F (配列番号 4)、及びフラボバクテリウム・ミリコラ (Flavobacterium miricola) からの PNGase F (配列番号 5) からなる群から選択されるタンパク質を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質。

【請求項 6】

前記対応する野生型タンパク質が、フラボバクテリウム・メニンゴセプチカム (Flavobacterium meningosepticum) PNGase F (配列番号 1) を含む、請求項 5 に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質。

【請求項 7】

前記第 1 の突然変異が、F. メニンゴセプチカム (F. meningosepticum) PNGase F (配列番号 1) におけるアミノ酸位置 60、118、206、若しくは 248、又は相同 PNGase F 配列における対応する位置に突然変異を含む、前記の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質。

【請求項 8】

前記第 2 の突然変異が、F. メニンゴセプチカム (F. meningosepticum) PNGase F (配列番号 1) におけるアミノ酸位置 57、60、62、118、119、120、123、125、153、154、155、156、157、192、206、若しくは 248、又は相同 PNGase F 配列における対応する位置に突然変異を含む、前記の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質。

【請求項 9】

配列番号 1 の D57 位、又は相同 PNGase F 配列の対応する位置にロイシン、アラニン、メチオニン、アルギニン、リジン、システイン、若しくはトリプトファンでのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合

10

20

30

40

50

P N G a s e F タンパク質。

【請求項 10】

配列番号 1 の D 6 0 位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にアラニン、システイン、バリン、セリン、グリシン、若しくはトリプトファンでのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

【請求項 11】

配列番号 1 の Y 6 2 位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にグリシン、トリプトファン、セリン、若しくはトレオニンでのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

10

【請求項 12】

配列番号 1 の E 1 1 8 位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にアラニン、グルタミン、トレオニン、若しくはシステインでのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

【請求項 13】

配列番号 1 の T 1 1 9 位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にアラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、若しくはバリンでのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

【請求項 14】

配列番号 1 の W 1 2 0 位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にチロシン、ヒスチジン、グルタミン、アスパラギン、トレオニン、若しくはセリンでのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

20

【請求項 15】

配列番号 1 の K 1 2 3 位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にアスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、若しくはトリプトファンでのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

【請求項 16】

配列番号 1 の R 1 2 5 位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にチロシン、アラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、若しくはトリプトファンでのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

30

【請求項 17】

配列番号 1 の K 1 5 3 位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にヒスチジン、アルギニン、グルタミン、トリプトファン、若しくはチロシンでのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

【請求項 18】

配列番号 1 の S 1 5 4 位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にトレオニン、アスパラギン、リジン、グルタミン、トリプトファン、若しくはチロシンでのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

40

【請求項 19】

配列番号 1 の S 1 5 5 位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にアルギニン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン、トリプトファン、若しくはチロシンでのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

【請求項 20】

50

配列番号1のI156位、又は相同PNGase F配列の対応する位置にロイシン、トレオニン、メチオニン、グリシン、トリプトファン、若しくはヒスチジンでのアミノ酸置換を含む、請求項1～19のいずれか1項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質。

【請求項21】

配列番号1のD157位、又は相同PNGase F配列の対応する位置にアスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、リジン、トリプトファン、若しくはチロシンでのアミノ酸置換を含む、請求項1～20のいずれか1項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質。

【請求項22】

配列番号1のG192位、又は相同PNGase F配列の対応する位置にイソロイシン、トリプトファン、アラニン、ヒスチジン、トレオニン、システイン、若しくはセリンでのアミノ酸置換を含む、請求項1～21のいずれか1項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質。

【請求項23】

配列番号1のE206位、又は相同PNGase F配列の対応する位置にセリン、トリプトファン、ヒスチジン、システイン、若しくはアルギニンでのアミノ酸置換を含む、請求項1～22のいずれか1項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質。

【請求項24】

配列番号1のR248位、又は相同PNGase F配列の対応する位置にトリプトファン、セリン、プロリン、バリン、アスパラギン酸、チロシン、フェニルアラニン、若しくはリジンでのアミノ酸置換を含む、請求項1～23のいずれか1項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質。

【請求項25】

D57位、D60位、I156位、G192位、及びE206位に突然変異を含む、請求項1～24のいずれか1項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質。

【請求項26】

Y62位、E118位、S155位、R248W位、又はこれらの任意の組合せの位置に突然変異をさらに含む、請求項25に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質。

【請求項27】

(a) D57R、D60A、Y62G、E118A、S155D、I156T、G192C、及びE206S

(b) D57C、D60A、Y62W、E118A、S155Q、I156T、G192T、及びE206R

(c) D57L、D60C、I156L、G192I、E206S、及びR248W

(d) D57W、D60C、I156M、G192I、E206W、及びR248S

(e) D60C、I156L、G192I、E206S、及びR248W

(f) D57L、D60A、I156L、G192I、E206S、及びR248W

(g) D57L、I156L、G192I、E206S、及びR248W

(h) D57L、D60C、E118Q、I156L、G192I、E206S、及びR248W

(i) D57L、D60C、W120X、I156L、G192I、E206S、及びR248W

(j) D57L、D60C、W120X、S155X、I156L、G192I、E206S、及びR248W

(k) D57L、D60C、K153X、I156L、G192I、E206S、及びR248W

10

20

30

40

50

(l) D 5 7 L、D 6 0 C、S 1 5 4 X、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(m) D 5 7 L、D 6 0 C、S 1 5 5 X、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(n) D 5 7 L、D 6 0 C、I 1 5 6 X、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(o) D 5 7 L、D 6 0 C、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(p) D 5 7 L、D 6 0 C、G 1 9 2 I、及び R 2 4 8 W

(q) D 5 7 L、D 6 0 C、I 1 5 6 L、D 1 5 7 X、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(r) D 5 7 L、D 6 0 C、I 1 5 6 L、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(s) D 5 7 L、D 6 0 C、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、及び R 2 4 8 W

(t) D 5 7 L、D 6 0 C、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、及び E 2 0 6 S

10

から選択される複数の突然変異を含む、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

【請求項 2 8】

クローン D 6 0 A、R 6 1 7、R 6 1 1 3、R 9 1 1、R 9 1 1 3、又は R 9 1 1 C 6 0 A によって発現される、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

【請求項 2 9】

O 結合型 G l c N A c、O 結合型 G a l N A c、又は O 結合型 G l c N A c 及び O 結合型 G a l N A c の両方に対する結合特異性及び親和性を増加させる第 2 の突然変異を含む、請求項 1 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

20

【請求項 3 0】

N 結合型グリカン、N 結合型複合糖質、N 結合型糖ペプチド、N 結合型糖タンパク質、又は遊離 N - グリカンに結合する、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

【請求項 3 1】

O 結合型グリカン、O 結合型複合糖質、O 結合型糖ペプチド、O 結合型糖タンパク質、又は遊離 O - グリカンに結合する、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

30

【請求項 3 2】

第 2 の成分に共有結合する、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質を含む第 1 の成分を含むコンジュゲート。

【請求項 3 3】

前記第 2 の成分がタンパク様成分である、請求項 3 2 に記載のコンジュゲート。

【請求項 3 4】

前記第 2 の成分が非タンパク様成分である、請求項 3 2 に記載のコンジュゲート。

【請求項 3 5】

前記第 2 の成分が治療薬又は診断薬である、請求項 3 2 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲート。

40

【請求項 3 6】

請求項 1 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質を含む融合タンパク質。

【請求項 3 7】

請求項 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質を含むアフィニティマトリックス。

【請求項 3 8】

固形支持体、表面、カラム、樹脂、ビーズ、粒子、及びナノ粒子からなる群から選択さ

50

れる、請求項 37 に記載のアフィニティマトリックス。

【請求項 39】

請求項 1 ~ 38 のいずれか 1 項に記載の、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、融合タンパク質、又はアフィニティマトリックスと、使用説明書とを含むキット。

【請求項 40】

請求項 1 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質又はコンジュゲート、又は請求項 36 に記載の融合タンパク質をコードする単離ポリヌクレオチド。

【請求項 41】

請求項 40 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 42】

発現ベクターである、請求項 41 に記載のベクター。

【請求項 43】

請求項 41 又は 42 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 44】

細菌細胞である、請求項 43 に記載の宿主細胞。

【請求項 45】

大腸菌 (*Escherichia coli*) 細胞又は酵母細胞である、請求項 43 に記載の宿主細胞。

【請求項 46】

触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質を作製するための方法であって、請求項 1 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質又はコンジュゲート、又は請求項 36 に記載の融合タンパク質を、単離ポリヌクレオチド、発現ベクター、又は宿主細胞から発現させるステップを含む、方法。

【請求項 47】

N 結合型グリカンを検出するための方法であって：

生物学的又は実験室サンプルを、PNGase F タンパク質の N - グリカンへの結合を可能にする条件下で請求項 1 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させるステップ；及び

前記 N 結合型グリカンを検出するステップを含む、方法。

【請求項 48】

前記検出された N 結合型グリカンの特徴付けるステップをさらに含む、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

前記 N 結合型グリカンの特徴付けるステップが、
前記グリカンの構成糖を特定すること、
前記グリカンの糖組成を決定すること、
前記グリカン内の結合位置を決定すること、又は
前記グリカンの立体化学を決定すること

を含む、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

O 結合型グリカンを検出するための方法であって：

生物学的又は実験室サンプルを、PNGase F タンパク質の O 結合型グリカンへの結合を可能にする条件下で請求項 1 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させるステップ；及び

O 結合型グリカンを検出するステップ

10

20

30

40

50

を含む、方法。

【請求項 5 1】

前記検出された O 結合型グリカンの特徴付けるステップをさらに含む、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記 O 結合型グリカンの特徴付けるステップが、
前記グリカンの構成糖を特定すること、
前記グリカンの糖組成を決定すること、
前記グリカン内の結合位置を決定すること、又は
前記グリカンの立体化学を決定すること

を含む、請求項 5 1 に記載の方法。

10

【請求項 5 3】

前記 O 結合型グリカンが、O 結合型 G l c N A c 又は O 結合型 G a l N A c を含む、請求項 5 0 ~ 5 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 4】

遊離 N - グリカンを検出するための方法であって：

生物学的又は実験室サンプルを、P N G a s e F タンパク質の遊離 N - グリカンへの結合を可能にする条件下で請求項 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させるステップ；及び

前記遊離 N - グリカンを検出するステップ

を含む、方法。

20

【請求項 5 5】

遊離 O - グリカンを検出するための方法であって：

生物学的又は実験室サンプルを、P N G a s e F タンパク質の遊離 O - グリカンへの結合を可能にする条件下で請求項 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させるステップ；及び

前記遊離 O - グリカンを検出するステップ

を含む、方法。

30

【請求項 5 6】

前記遊離 O - グリカンが、O - G l c N A c 又は O - G a l N A c を含む、請求項 5 5 項に記載の方法。

【請求項 5 7】

N 結合型グリカン又は遊離 N - グリカンを濃縮する、単離する、又は精製するための方法であって：

生物学的又は実験室サンプルを、P N G a s e F タンパク質の N - グリカンへの結合を可能にする条件下で請求項 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させて、濃縮された、単離された、又は精製された N 結合型グリカン又は遊離 N - グリカンを得る

ステップ

40

【請求項 5 8】

O 結合型グリカン又は遊離 O - グリカンを濃縮する、単離する、又は精製するための方法であって：

生物学的又は実験室サンプルを、P N G a s e F タンパク質の N - グリカンへの結合を可能にする条件下で請求項 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させて、濃縮された、単離された、又は精製された O 結合型グリカン又は遊離 O - グリカンを得る

50

を含む、方法。

【請求項 59】

請求項 1 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質を含む診断組成物又は治療組成物。

【請求項 60】

前記 PNGase F タンパク質、前記コンジュゲート、又は前記融合タンパク質が検出可能に標識される、請求項 59 に記載の診断組成物又は治療組成物。

【請求項 61】

前記検出可能な標識が、放射性標識、蛍光標識、りん光標識、比色標識、酵素標識、免疫標識、磁気標識、常磁性標識、反磁性標識、又は電磁標識を含む、請求項 60 に記載の診断組成物又は治療組成物。 10

【請求項 62】

請求項 1 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質の、治療薬としての使用。

【請求項 63】

請求項 1 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質の、診断薬としての使用。

【請求項 64】

標的薬物送達のための、請求項 1 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質の使用。 20

【請求項 65】

生物学的又は実験室サンプル中の N 結合型グリカン又は遊離 N - グリカンの存在又は量の検出のための、請求項 1 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質の使用。

【請求項 66】

生物学的又は実験室サンプル中の O 結合型グリカン又は遊離 O - グリカンの存在又は量の検出のための、請求項 1 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質の使用。

【請求項 67】

前記 O 結合型グリカンが、O 結合型 GlcNAc 又は O 結合型 GalNAc を含む、請求項 66 に記載の使用。 30

【請求項 68】

前記遊離 O - グリカンが、O - GlcNAc 又は O - GalNAc を含む、請求項 66 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、参照によりその全開示内容が本明細書に組み入れられる 2014 年 4 月 18 日出願の米国仮特許出願第 61 / 981 , 335 号明細書の利益を請求する。

【背景技術】

【0002】

背景

グリコシル化及び炭水化物認識は、真核生物学の欠くことのできない必須の特徴である。生物中に存在する多数のグリカン（グリコーム）は、細胞局在及び一時的状態を含む多くの特徴に依存する動的特徴であり、かつ疾患状態、例えば、癌で不安定になる、又は病原体による接着に利用され得る。グリコシル化の変化は、疾患バイオマーカーとして機能し得るだけでなく、組換え治療用生物製剤の薬理学的特性に影響を与え得る。グリカンの不均質性は、ロット間の一貫性、免疫原性、薬物動態、活性、及びクリアランスに影響を与え得る。タンパク質及び核酸の場合とは異なり、グリカンの配列決定及び構造の特徴付けは、骨の折れる多段階プロセスであり、典型的には、サンプルの濃縮、酵素消化、 40

10

20

30

40

50

及び質量分光分析、リアルタイム監視ができないプロセスを必要とする。3分の2を超える治療用生物製剤が、グリコシル化されており、バッチの許容には、グリコシル化パターンが設定範囲内である必要がある。

【0003】

診断及び治療用途におけるグリカンのバイオマーカーとしての利用は、高度に特異的な検出試薬の製造における困難さによって妨げられ (Kuzmanov et al., BMC medicine 11, 31 (2013) (非特許文献1))、これは、グリカン構造が広範な多様性を有することから想定外ではない (Cumplings, Molecular BioSystems 5, 1087 - 1104 (2009) (非特許文献2))。グリカンは、レクチン、抗体、及び酵素を含むタンパク質のいくつかのクラスによって認識される。レクチンは、典型的には、低い親和性 (mM ~ μM) 及び広範な又はコンテキスト依存性グリカン認識を示すが (Debray et al., Eur J Biochem 117, 41 - 55 (1981) (非特許文献3); Liener et al., The Lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine (Academic Press, Orlando; 1986) (非特許文献4); Bertozzi & Kiessling, Science (New York, N.Y.) 291, 2357 - 2364 (2001) (非特許文献5))、これらの問題にもかかわらず、レクチンアフィニティークロマトグラフィーは、グリカン及び複合糖質の分離及び濃縮において最も広く適用されている技術である。抗炭水化物抗体は、レクチンと比較して改善された親和性を示し、かつ特定のグリカンに対して高度に特異的であり得るが、炭水化物が一般に免疫原性が低いことから、製造が困難であり得る。グリカンプロセシング酵素は、多くの場合、基質構造に関して非常に選択的であり、グリカン処理における不可欠の役割を反映している。部位特異的突然変異誘発法が、不活性な突然変異体の作製に利用され、基質特異性の特徴付けを容易である (Rao et al., Protein Sci 8, 2338 - 2346 (1999) (非特許文献6))。

10

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Kuzmanov et al., BMC medicine 11, 31 (2013)

30

【非特許文献2】Cumplings, Molecular BioSystems 5, 1087 - 1104 (2009)

【非特許文献3】Debray et al., Eur J Biochem 117, 41 - 55 (1981)

【非特許文献4】Liener et al., The Lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine (Academic Press, Orlando; 1986)

【非特許文献5】Bertozzi & Kiessling, Science (New York, N.Y.) 291, 2357 - 2364 (2001)

40

【非特許文献6】Rao et al., Protein Sci 8, 2338 - 2346 (1999)

【発明の概要】

【0005】

概要

本発明は、グリカン特異的な分析、診断、及び治療のツール及び試薬、これらの使用方法、並びにグリカン特異的な分析、診断、及び治療のツール及び試薬の調製プロセスに関する。N-グリカンプロセシング酵素、ペプチド-N₄- (N-アセチル-D-グルコサミンル) アスパラギンアミダーゼ (また、一般的にはペプチド:Nグリカナーゼ又はP

50

NGase Fとして知られている)は、突然変異によって触媒的に不活性化される。さらなる突然変異により、特定のグリカンに対する高い親和性かつ特異性を含むレクチン様の性質を有する触媒的に不活性化炭水化物結合タンパク質が得られる。一実施形態では、触媒的に不活性化炭水化物結合PNGase Fタンパク質は、N結合型グリカンに対する親和性及び特異性を示し；別の実施形態では、触媒的に不活性化炭水化物結合PNGase Fタンパク質は、O結合型グリカン、例えば、O結合型N-アセチルグルコサミン(O結合型GlcNAc)又はO結合型N-アセチルガラクトサミン(O結合型GalNAc)に対する親和性及び特異性を示し；さらに別の実施形態では、触媒的に不活性化炭水化物結合PNGase Fタンパク質は、N結合型グリカン及びO結合型グリカンの両方に対する親和性及び特異性を示す。触媒的に不活性化炭水化物結合PNGase Fタンパク質は、ペプチドまたはタンパク質に共有結合したグリカンに結合する；任意選択的に、触媒的に不活性化炭水化物結合PNGase Fタンパク質は、遊離グリカンにも結合する。

10

【0006】

一態様では、本発明は、対応する野生型PNGase Fタンパク質と比較して複数のアミノ酸突然変異を有する、触媒的に不活性化炭水化物結合PNGase Fタンパク質を提供する。適切な対応する野生型タンパク質の例としては、限定されるものではないが、F.メニンゴセプチカム(F. meningosepticum)からのPNGase F(配列番号1)、F.メニンゴセプチカム(F. meningosepticum)からのPNGase F-II(配列番号3)、バクテロイデス・フラジリス(Bacteroides fragilis)からのPNGase F(配列番号4)、及びフラボバクテリウム・ミリコラ(Flavobacterium miricola)からのPNGase F(配列番号5)が挙げられる。複数の突然変異は、(a)PNGase Fタンパク質の触媒活性を低下又は消失させる少なくとも1つの第1の突然変異；及び(b)結合親和性又は結合特異性に影響を与える少なくとも1つの第2の突然変異を含む。第2の突然変異は、(i)N結合型グリカンに対する結合親和性を高める突然変異；又は(ii)O結合型グリカンに対する結合特異性及び親和性を増加させる突然変異の一方又は両方を含み得る。第2の突然変異は、O結合型GlcNAc、O結合型GalNAc、又はO結合型GlcNAc及びO結合型GalNAcの両方に対する結合特異性及び親和性を増加させることができる。一実施形態では、触媒的に不活性化炭水化物結合PNGase Fタンパク質は、N結合型グリカン、N結合型複合糖質、N結合型糖ペプチド、N結合型糖タンパク質、又は遊離N-グリカンに結合する。これに加えて又は別法では、触媒的に不活性化炭水化物結合PNGase Fタンパク質は、O結合型グリカン、O結合型複合糖質、O結合型糖ペプチド、O結合型糖タンパク質、又は遊離O-グリカンに結合する。

20

30

【0007】

第1の(不活性化させる)突然変異は、例えば、F.メニンゴセプチカム(F. meningosepticum)PNGase F(配列番号1)におけるアミノ酸の60位、118位、206位、若しくは248位の突然変異、又は相同PNGase F配列の対応する位置の突然変異を含み得る。

40

【0008】

(結合親和性及び/又は結合特異性に影響を与える)第2の突然変異は、例えば、F.メニンゴセプチカム(F. meningosepticum)PNGase F(配列番号1)におけるアミノ酸の57位、60位、62位、118位、119位、120位、123位、125位、153位、154位、155位、156位、157位、192位、206位、若しくは248位の突然変異、又は相同PNGase F配列の対応する位置の突然変異を含み得る。一部の突然変異は、触媒活性を低下又は消失させ得ると共に、結合特異性及び/又は結合親和性に影響を与え得るという点で、第1及び第2の突然変異の両方として機能し得る。

【0009】

50

触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質は、配列番号 1 の D 5 7 位又は相同 PNGase F 配列の対応する位置にアミノ酸置換を含み得；この位置における適切な置換の例としては、ロイシン、アラニン、メチオニン、アルギニン、リジン、システイン、又はトリプトファンが挙げられる。

【 0 0 1 0 】

別法又はこれに加えて、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質は、配列番号 1 の D 6 0 位又は相同 PNGase F 配列の対応する位置にアミノ酸置換を含み得；この位置における適切な置換の例としては、アラニン、システイン、バリン、セリン、グリシン、又はトリプトファンが挙げられる。

【 0 0 1 1 】

別法又はこれに加えて、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質は、配列番号 1 の Y 6 2 位又は相同 PNGase F 配列の対応する位置にアミノ酸置換を含み得；この位置における適切な置換の例としては、グリシン、トリプトファン、セリン、又はトレオニンが挙げられる。

【 0 0 1 2 】

別法又はこれに加えて、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質は、配列番号 1 の E 1 1 8 位又は相同 PNGase F 配列の対応する位置にアミノ酸置換を含み得；この位置における適切な置換の例としては、アラニン、グルタミン、トレオニン、又はシステインが挙げられる。

【 0 0 1 3 】

別法又はこれに加えて、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質は、配列番号 1 の T 1 1 9 位又は相同 PNGase F 配列の対応する位置にアミノ酸置換を含み得；この位置における適切な置換の例としては、アラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、又はバリンが挙げられる。

【 0 0 1 4 】

別法又はこれに加えて、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質は、配列番号 1 の W 1 2 0 位又は相同 PNGase F 配列の対応する位置にアミノ酸置換を含み得；この位置における適切な置換の例としては、チロシン、ヒスチジン、グルタミン、アスパラギン、トレオニン、又はセリンが挙げられる。

【 0 0 1 5 】

別法又はこれに加えて、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質は、配列番号 1 の K 1 2 3 位又は相同 PNGase F 配列の対応する位置にアミノ酸置換を含み得；この位置における適切な置換の例としては、アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、又はトリプトファンが挙げられる。

【 0 0 1 6 】

別法又はこれに加えて、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質は、配列番号 1 の R 1 2 5 位又は相同 PNGase F 配列の対応する位置にアミノ酸置換を含み得；この位置における適切な置換の例としては、チロシン、アラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、又はトリプトファンが挙げられる。

【 0 0 1 7 】

別法又はこれに加えて、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質は、配列番号 1 の K 1 5 3 位又は相同 PNGase F 配列の対応する位置にアミノ酸置換を含み得；この位置における適切な置換の例としては、ヒスチジン、アルギニン、グルタミン、トリプトファン、又はチロシンが挙げられる。

【 0 0 1 8 】

別法又はこれに加えて、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質は、配列番号 1 の S 1 5 4 位又は相同 PNGase F 配列の対応する位置にアミノ酸置換を含み得；この位置における適切な置換の例としては、トレオニン、アスパラギン、リジ

10

20

30

40

50

ン、グルタミン、トリプトファン、又はチロシンが挙げられる。

【0019】

別法又はこれに加えて、触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質は、配列番号1のS155位又は相同PNGase F配列の対応する位置にアミノ酸置換を含み得；この位置における適切な置換の例としては、アルギニン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン、トリプトファン、又はチロシンが挙げられる。

【0020】

別法又はこれに加えて、触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質は、配列番号1のI156位又は相同PNGase F配列の対応する位置にアミノ酸置換を含み得；この位置における適切な置換の例としては、ロイシン、トレオニン、メチオニン、グリシン、トリプトファン、又はヒスチジンが挙げられる。

10

【0021】

別法又はこれに加えて、触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質は、配列番号1のD157位又は相同PNGase F配列の対応する位置にアミノ酸置換を含み得；この位置における適切な置換の例としては、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、リジン、トリプトファン、又はチロシンが挙げられる。

【0022】

別法又はこれに加えて、触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質は、配列番号1のG192位又は相同PNGase F配列の対応する位置にアミノ酸置換を含み得；この位置における適切な置換の例としては、イソロイシン、トリプトファン、アラニン、ヒスチジン、トレオニン、システイン、又はセリンが挙げられる。

20

【0023】

別法又はこれに加えて、触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質は、配列番号1のE206位又は相同PNGase F配列の対応する位置にアミノ酸置換を含み得；この位置における適切な置換の例としては、セリン、トリプトファン、ヒスチジン、システイン、又はアルギニンが挙げられる。

【0024】

別法又はこれに加えて、触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質は、配列番号1のR248位又は相同PNGase F配列の対応する位置にアミノ酸置換を含み得；この位置における適切な置換の例としては、トリプトファン、セリン、プロリン、バリン、アスパラギン酸、チロシン、フェニルアラニン、又はリジンが挙げられる。

30

【0025】

一実施形態では、触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質は、D57位、D60位、I156位、G192位、及びE206位に突然変異を有する。任意選択的に、触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質はまた、Y62位、E118位、S155位、R248W位、又はこれらの任意の組合せ位置に突然変異を含む。

【0026】

本発明の例示的な触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質は、限定されるものではないが、野生型PNGase F（配列番号1）に対して複数の突然変異を有する以下のPNGase F突然変異を含む：

40

(a) D57R、D60A、Y62G、E118A、S155D、I156T、G192C、及びE206S

(b) D57C、D60A、Y62W、E118A、S155Q、I156T、G192T、及びE206R

(c) D57L、D60C、I156L、G192I、E206S、及びR248W

(d) D57W、D60C、I156M、G192I、E206W、及びR248S

(e) D60C、I156L、G192I、E206S、及びR248W

(f) D57L、D60A、I156L、G192I、E206S、及びR248W

(g) D57L、I156L、G192I、E206S、及びR248W

50

(h) D 5 7 L、D 6 0 C、E 1 1 8 Q、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(i) D 5 7 L、D 6 0 C、W 1 2 0 X、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(j) D 5 7 L、D 6 0 C、W 1 2 0 X、S 1 5 5 X、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(k) D 5 7 L、D 6 0 C、K 1 5 3 X、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(l) D 5 7 L、D 6 0 C、S 1 5 4 X、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(m) D 5 7 L、D 6 0 C、S 1 5 5 X、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(n) D 5 7 L、D 6 0 C、I 1 5 6 X、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(o) D 5 7 L、D 6 0 C、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(p) D 5 7 L、D 6 0 C、G 1 9 2 I、及び R 2 4 8 W

(q) D 5 7 L、D 6 0 C、I 1 5 6 L、D 1 5 7 X、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(r) D 5 7 L、D 6 0 C、I 1 5 6 L、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(s) D 5 7 L、D 6 0 C、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、及び R 2 4 8 W

(t) D 5 7 L、D 6 0 C、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、及び E 2 0 6 S。

【0027】

一部の実施形態では、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質は、クローン D 6 0 A、R 6 1 7、R 6 1 1 3、R 9 1 1、R 9 1 1 3、又は R 9 1 1 C 6 0 A によって発現される。

【0028】

別の態様では、本発明は、第1の成分として、第2の成分に共有結合する触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質を含むコンジュゲートを提供する。第2の成分は、タンパク様成分又は非タンパク様成分である。第2の成分は、治療用物質、例えば、薬物、又は診断用物質、例えば、検出可能な標識、又は分析試薬であり得る。

【0029】

別の態様では、本発明は、本発明の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質を含む融合タンパク質を提供する。融合タンパク質は、好都合に宿主細胞から発現され得る。

【0030】

別の態様では、本発明は、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質を含むアフィニティーマトリックスを提供する。アフィニティーマトリックスの例としては、限定されるものではないが、固体支持体、表面、カラム、樹脂、ビーズ、粒子、及びナノ粒子が挙げられる。

【0031】

別の態様では、本発明は、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、融合タンパク質、又はアフィニティーマトリックス及び使用説明書を含むキットを提供する。任意選択的に、このキットは、緩衝液、塩、標識若しくは検出試薬、又は他の診断若しくは分析試薬を含み得る。

【0032】

別の態様では、本発明は、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、そのタンパク様コンジュゲート、又は本明細書に記載される融合タンパク質をコードする単離ポリヌクレオチドを提供する。また、このポリヌクレオチドを含む又は取り込んだベクターも提供される。このベクターは、発現ベクター又はクローニングベクターであり得る。本発明は、前記ベクターを含む宿主細胞をさらに提供する。宿主細胞は、細菌細胞、真菌細胞（例えば、酵母）、又は動物細胞、例えば、昆虫細胞若しくは哺乳動物細胞で

10

20

30

40

50

あり得る。適切な宿主細胞の例としては、大腸菌 (*Escherichia coli*) 細胞又は酵母細胞、例えば、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) が挙げられる。

【0033】

別の態様では、本発明は、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質を作製する方法を提供する。触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質又はそのタンパク様コンジュゲート、又は本明細書に記載の融合タンパク質は、*in vitro* 又は *in vivo* で単離ポリヌクレオチド、発現ベクター、又は宿主細胞から発現させることができる。

【0034】

別の態様では、本発明は、N結合型グリカンを検出する方法を提供する。この方法は、PNGase F タンパク質のN-グリカンへの結合を可能にする条件下で、生物学的又は実験室サンプルを触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させるステップ；及びN結合型グリカンを検出するステップを含み得る。任意選択的に、この方法は、検出されたN結合型グリカンを、例えば、このグリカンの構成糖を特定すること、このグリカンの糖組成を決定すること、このグリカン内での結合位置を決定すること、又はこのグリカンの立体化学を決定することによって特徴付けることをさらに含む。

【0035】

別の態様では、本発明は、O結合型グリカンを検出する方法を提供する。この方法は、PNGase F タンパク質のO結合型グリカンへの結合を可能にする条件下で、生物学的又は実験室サンプルを触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させるステップ；及びO結合型グリカンを検出するステップを含み得る。任意選択的に、この方法は、検出されたO結合型グリカンを、例えば、このグリカンの構成糖を特定すること、このグリカンの糖組成を決定すること、このグリカン内での結合位置を決定すること、又はこのグリカンの立体化学を決定することによって特徴付けることをさらに含む。このO結合型グリカンは、例えば、O結合型 GlcNAc 又は O結合型 GalNAc であり得る。

【0036】

別の態様では、本発明は、遊離N-グリカンを検出する方法を提供する。この方法は、PNGase F タンパク質の遊離N-グリカンへの結合を可能にする条件下で、生物学的又は実験室サンプルを触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させるステップ；及び遊離N-グリカンを検出するステップを含み得る。

【0037】

別の態様では、本発明は、遊離O-グリカンを検出する方法を提供する。この方法は、PNGase F タンパク質の遊離O-グリカンへの結合を可能にする条件下で、生物学的又は実験室サンプルを触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させるステップ；及び遊離O-グリカンを検出するステップを含み得る。この遊離O-グリカンは、例えば、O-GlcNAc 又は O-GalNAc であり得る。

【0038】

別の態様では、本発明は、N結合型グリカン又は遊離N-グリカンを濃縮、単離、又は精製する方法を提供する。この方法は、PNGase F タンパク質のN-グリカンへの結合を可能にする条件下で、生物学的又は実験室サンプルを触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させて、濃縮された、単離された、又は精製されたN結合型グリカン又は遊離N-グリカンを得るステップを含み得る。

【0039】

別の態様では、本発明は、O結合型グリカン又は遊離O-グリカンを濃縮、単離、又は

10

20

30

40

50

精製する方法を提供する。この方法は、PNGase Fタンパク質のN-グリカンへの結合を可能にする条件下で、生物学的又は実験室サンプルを触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させて、濃縮された、単離された、又は精製されたO結合型グリカン又は遊離O-グリカンを得るステップを含み得る。

【0040】

別の態様では、本発明は、触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は本明細書に記載の融合タンパク質を含む診断又は治療用組成物を提供する。PNGase Fタンパク質は、任意選択的に、検出可能に標識される。適切な検出可能な標識の例としては、限定されるものではないが、放射性標識、蛍光標識、りん光標識、比色標識、酵素標識、免疫標識、磁気標識、常磁性標識、反磁性標識、及び電磁標識が挙げられる。

10

【0041】

別の態様では、本発明は、治療薬、診断薬、又は分析試薬として、触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質の使用を提供する。また、標的薬物送達用の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質の使用も提供される。また、生物学的又は実験室サンプル中のN結合型グリカン又は遊離N-グリカンの存在又は量の検出のための触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質の使用も提供される。また、生物学的又は実験室サンプル中のO結合型グリカン又は遊離O-グリカンの存在又は量の検出のための触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質の使用も提供される。O結合型グリカンは、O結合型GlcNAc又はO結合型GalNAcであり得；同様に、遊離O-グリカンは、O-GlcNAc又はO-GalNAcであり得る。

20

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】N-グリカンの複雑さの代表的な例を示している。修飾の前に新生ポリペプチドにまとめて付着した14糖N-グリカン構造が中心に示されている。高度に保存された5糖N-グリカンコア構造が破線のボックスで示されている。

【図2】グリカンの化学的多様性を示している。グリカンの表現を均一にするための共同努力として開発された記号命名法におけるグリカンの異なるクラス。方向性は、上部の非還元末端から底部の還元末端へ方向であり、矢印は、非還元末端における延長を示している。単糖間の結合は、単糖のアノマー配置（ α 、 β ）及び酸素原子が結合する還元末端単糖の酸素原子を含む。「/」は、いずれか一方の場合に使用される（3/4は3又は4を意味する）。複合N結合型グリカンの場合、Galに付着した共通末端モチーフは破線のボックスで示されている。省略形HS、CS、及びDSはそれぞれ、ヘパリン又はヘパリン硫酸、コンドロイチン硫酸、及びデルマタン硫酸に一致する。Macmillan Publishers Ltdの許可による再版：Nature Methods, Raman, R., et al., Glycomics: グリカンの構造と機能の関係についての統合システムアプローチ。2, 817-824、著作権、2005。

30

40

【図3】PNGase F脱グリコシル化反応を示している。PNGase Fは、アスパラギン側鎖と近接GlcNAcとの間のN-グリコシド結合（アミド結合）を切断することによってポリペプチド主鎖からのN結合型グリカンの放出を触媒する。遊離アンモニアの放出に加えて、ポリペプチドタンパク質主鎖のアスパラギンがアスパラギン酸に変換される。

【図4a】図4は、PNGase F配列を示している。図4aは、指定アミノ酸配列（配列番号1）を有するフラボバクテリウム・メニンゴセプチカム（Flavobacterium meningosepticum）（エリザベスキングア・メニンゴセプチカム（Elizabethkingia meningosepticum）としても知ら

50

れる)のCDC3552単離物からのPNGase F遺伝子(配列番号2)のコード領域のcDNA配列。アミノ酸数が左側に示され、ヌクレオチド数が右側に示されている(Loo et al., 2002 Protein Expression & Purification 24:90-98で発表された)。

【図4b】314のアミノ酸配列(配列番号1)が示され、注釈が付けられている。2つのドメインには、d1pnfa1及びd1pnfa2の名称が付けられている。残基431は、還元GlcNAcに一致し、残基432は、キトビオースリガンドの第2のGlcNAcに一致する。3つのジスルフィド結合が、51~56、204~208、及び231~252に位置する。PDB ID 1PNFのRCSB PDB(rcsb.org)からの画像(Kuhn et al., 1995 Journal of Biological Chemistry 270, 29493-29497)。

【図4c】F.メニンゴセプチカム(F. meningosepticum)(エリザベスキングア・メニンゴセプチカム(E. meningosepticum)としても知られる)からのPNGase F-IIのアミノ酸配列(配列番号3)。

【図4d】バクテロイデス・フラジリス(Bacteroides fragilis)からのPNGase Fのアミノ酸配列(配列番号4)。

【図4e】F.ミリコラ(F. miricola)(エリザベスキングア・ミリコラ(E. miricola)としても知られる)からのPNGase Fのアミノ酸配列(配列番号5)。

【図4f】pOPH6コード配列(配列番号7)並びにN末端分泌タグ及びC末端ヘキサ-Hisタグを含む発現PNGase F(配列番号6)。矢印は、PNGase F配列の開始を示し、アスタリスクは、停止コドンを示している。

【図4g-1】pOPH6コード配列(配列番号6のアミノ酸4~317)、F.メニンゴセプチカム(F. meningosepticum)からのPNGase F(配列番号1; PDB識別名1PNF)、F.ミリコラ(F. miricola)からのPNGase F(配列番号5)、B.フラジリス(B. fragilis)からのPNGase F(配列番号4; PDB識別名3KS7)、及びF.メニンゴセプチカム(F. meningosepticum)からのPNGase F-II(配列番号3; PDB識別名4R4X)。

【図4g-2】図4g-1の続きである。

【図5】PNGase F、N, N'-ジアセチルキトビオースと水分子との間の分子内水素結合接触部を示す概略図を示している。タンパク質残基は、長方形のボックス内に1文字のアミノ酸コードと配列番号で示され、水分子は、Protein Data Bankに委託されたファイルの番号に一致する番号で示されている。還元末端GlcNAc残基は左側にある。単位の水素結合はイタリック体で示されている。Wat³⁴⁹(349)は2度出現し、一度はO3に接触し、1つはArg-61にあることに留意されたい。この研究は、Journal of Biological Chemistry. Kuhn, P. et al. Active Site and Oligosaccharide Recognition Residues of Peptide-N⁴-(N-acetyl-D-glucosaminyl)asparagine Amidase F. Journal of Biological Chemistry. 1995; 270: 29493-29497で最初に発表された。著作権 the American Society for Biochemistry and Molecular Biology。

【図6】PNGase F:キトビオース複合体の活性部位水素結合ネットワークを示している。キトビオースリガンド(輪郭)とのPNGase Fの結合溝の水素結合ネットワークが、実験X線データ(PDB ID: 1PNF)に基づいて示されている。タンパク質とリガンドとの間の結合溝の水分子は赤い球として示されている: Wat⁷⁵、Wat¹⁴⁶、Wat³⁴⁶、Wat³⁴⁸、Wat³⁴⁹。水素結合に関与する結合溝のアミノ酸: D60、R61、Y85、E118、W120、S155、G190、W1

10

20

30

40

50

91、E206、R248。

【図7】Lectenz（登録商標）設計戦略の概略図を示している。コンピューターによる方法、知識ベースのライブラリー設計、選択、並びに流れに沿った特徴付け及び評価を利用する統合的な戦略が示されている。薄い灰色のボックスは、選択された候補が所望の閾値を満たしているか否かのチェックポイントを示し、選択プロセスを、修正された選択条件で繰り返すことができる。選択された候補が、特異性及び親和性の特徴付け要件を満たしたら、この候補をアフィニティマトリックスに固定して、N-糖ペプチド及びN-糖タンパク質のアフィニティークロマトグラフィーベースの濃縮を評価する。

【図8】PNGase F-キトビオース複合体のC位置にあるRMSDを示している。Woodらによって作成されたMDシミュレーションデータ。

【図9】PNGase Fの結合ポケットを示している。a) PNGase Fの結合部位における二糖キトビオースリガンドの4.5範囲内の残基。b) 結合に重要な残基を有する溶媒が到達可能な表面が標識されている。PDB ID 1PNF。UCSF Chimeraパッケージで作成された分子グラフィックス。

【図10】非増幅GeneScriptライブラリー1の配列（配列番号8）及び制限地図を示している。発現PNGase Fクローンの配列は、下線が引かれ、NheI（太字）及びBamHI（イタリック体）制限部位が隣接している。合計8つの突然変異を、このライブラリー構築物にエンジニアリングした：D57、D60A、Y62、E118、S155、I156、G192、及びE206。単一点A179Cヌクレオチド突然変異（矢印で示されている）が、D60Aアミノ酸突然変異を示すように導入された。この突然変異は、親和性相互作用を高めることが示され、また酵素の触媒活性を不活性化する又は著しく低減する。7つの部位飽和突然変異誘発部位を、NNKコドン（強調表示）縮重を用いてこのライブラリーにエンジニアリングし、Nは、等モルのA、T、C、又はGヌクレオチド混合物を表し、Kは、等モルのG又はTヌクレオチド混合物を表す。M13フォワードプライマー配列（配列番号9）及びM13リバースプライマー配列（配列番号10）が（小文字で）示されている。

【図11】非増幅GeneArtライブラリー2の配列（配列番号11）及び制限地図を示している。発現PNGase Fクローンの配列は、下線が引かれ、NheI（太字）及びBamHI（イタリック体）制限部位が隣接している。合計6つの部位飽和突然変異誘発部位を、このライブラリー構築物にエンジニアリングした：D57、D60（-D）、I156、G192、E206、及びR248。6つの部位飽和突然変異誘発部位の内の5つが、ヌクレオチド混合物で合成され、この混合物は、全てのアミノ酸が等モル分布となる。部位、D60（矢印で示されている）では、アスパラギン酸を除く全てのアミノ酸となる改変ヌクレオチド混合物を利用した。M13フォワードプライマー配列（配列番号12）及びM13リバースプライマー配列（配列番号13）が（小文字で）示されている。

【図12】PNGase F改変pPNL6酵母ディスプレイライブラリープラスミド地図を示している。

【図13】酵母細胞表面ディスプレイを示している。酵母細胞表面のAga1pによって提示されたAga2p-PNGase F融合タンパク質の表現。選択されたPNGase Fクローン（複数可）は、N-グリカン標的と相互作用する。N-グリカン標的は、ビオチン標識され、ストレプトアビジン被覆磁気ビーズに結合された。元のpPNL6構築物は、Aga2pタンパク質と融合タンパク質、この場合はPNGase Fとの間にHAタグを含む。C末端c-mycタグが含められ、このタグを、各回の選択の前に酵母細胞表面の完全長Aga2p-PNGase F融合タンパク質の発現を確認するためにフローサイトメトリーによって抗c-myc蛍光抗体で検出する。通常は、約50,000コピーのAga-2pタンパク質が、酵母細胞表面に提示される。

【図14】リボヌクレアーゼB糖型を示している。RNase Bは、N34に単一N-グリコシル化部位を有し、このグリコシル化部位は、Man₅₋₉GlcNAc₂の9つの糖型からなり得る。これらの糖型のモルパーセンテージは、9つの各グリカン構造の下

10

20

30

40

50

に列記されている。

【図15】酵母細胞の磁気活性化細胞選別(MACS)を示している。磁気ビーズに結合したN-グリカン標的に対する酵母ディスプレイPNGase Fライブラリー選択。ステップ1~2: PNGase Fライブラリーを、最初の回の選択の開始時にビオチン-ストレプトアビジン磁気ビーズに対する陰性選択して(dRNase Bは含まない)、全てのビオチン-ストレプトアビジン磁気ビーズ結合クローンを除去する。ステップ3: ビオチン標識変性RNase Bを、陽性選択を開始する前にストレプトアビジン被覆磁気ビーズ(2.8 μmの直径)と共にプレインキュベートする。ステップ4: 非結合酵母クローンを洗い流す。ステップ5: 結合酵母クローンは保持される。ステップ6: 次の回の選択のために結合クローンを増幅する。ステップ7: 各回のFACS(不図示)の後、クローンを配列決定して濃縮及び収束を監視する。収束クローン(converged clone)(複数可)を、流れに沿った特徴付けのためにLectenz(登録商標)候補(複数可)として選択する。

【図16】GeneArtライブラリー2を用いた酵母ディスプレイPNGase Fクローンの選択及び濃縮を示している。(a) PNGase Fクローンの繰り返される複数回の酵母ディスプレイ選択、増幅、及びパーセント濃縮を示している。各ライブラリーの入力サンプル、陰性選択サンプル、洗浄サンプル、及び出力サンプルのアリコート毎を漸増して、選択及び濃縮の進行を監視する。データは、その回の入力クローンの開始数に対する選択後にビーズ結合サンプルから回収したクローン数を表す出力/入力比として表示されている。MACSベースの選択を1M、2M、4M、5M、7M、及び8Mの回で行った。2回のMACSごとに、FACSベースの選択を3F、6F、及び9Fの回で行った。理想的には、選択の各回は、変性RNase B(dRNase B)又は変性アシアロフェチュイン(dアシアロフェチュイン)の標的N-グリカン構造に結合する機能的に適切なクローンを濃縮し、数回の選択後に収束する。濃縮及び収束は、FACSによるパニングの3回ごとに約50のランダムに選択されたクローンのDNA配列決定で監視する。全てのクローン配列に対するクローンR911の濃縮は、選択の3回ごとにパーセンテージとして示される。(b) 濃縮クローン配列のアミノ酸のアイスコグ。wt PNGase F配列が底部に示されている。6つのランダム化位置の好ましいアミノ酸は、グラフィック表示で示されている。このデータは、3F、6F、及び9Fの選択の回から得られた約150のクローン配列に基づいている。各位置の最上部の残基も、選択されたクローンR911の配列である。

【図17】酵母コロニーPCR及び配列決定プライマーを示している。

【図18】酵母コロニーPCRプログラムを示している。

【図19】酵母ディスプレイによって選択されたPNGase FクローンのPCR増幅プライマーを示している。5'の太字の配列は、PNGase F-pOPH6配列に一致し、3'末端は、PNGase F-pPNL6酵母ディスプレイプラスミドのPNGase F配列に一致している。PNGase F-pOPH6フォワードプライマーの3'末端の小文字「c」は、PNGase F-pOPH6プラスミドの「G」である。完全長PCR産物は、消化産物のPNGase F-pOPH6空ベクターに結合するために使用されるEcoRI及びBamHI制限部位に隣接している。

【図20】PNGase F-pOPH6 ompA-PNGase F-His6配列用のPCR増幅プライマーを示している。

【図21】pOPH6 II及びPNGase FクローニングのDNAゲルを示している。レーン1=1 kbのDNAステップラダー。レーン2=pBluescript I IKS(-) 2921 bp。レーン3=pBluescript I IKS(-) XbaI及びXhoI二重消化2858 bp。レーン4=不正確な配列での挿入/連結の失敗。レーン5~9=正確なPNGase F-pOPH6 II配列で連結されたPNGase F-pOPH6 IIベクター3923 bp(スーパーコイル状及び非コイル状の移動バンドの両方を確認できる)。

【図22】PNGase F-pOPH6 IIベクター地図を示している。大腸菌発現

10

20

30

40

50

(*E. coli*) ベクター、pOPH6 II は、pBluescript II KS (-) ベクターをベースとしたものであり、発現のための pOPH6 から OmpA-PNGase F-His6x 配列を有する。PNGase F-pOPH6 II 発現プラスミドが、D60A 単一点突然変異体、並びに酵母ディスプレイライブラリーから選択される4つの PNGase F クローン：R617、R6113、R911、及び R9113 に使用される。

【図23】D60Aの勾配溶出プロフィールを示している。第1の鋭いピークは、50 mM イミダゾール洗浄である(8.3% B)。第2のピークは、約110 mM イミダゾールで吸収が最大のD60Aの溶出に一致する(20.5% B)。

【図24】IMAC精製D60AクロンのSDS-PAGE及びウェスタンブロット法を示している。a) D60A発現及びIMAC精製サンプルのクマーシー染色変性SDS-PAGE。b) D60A発現及びIMAC精製サンプルの複製ゲルのウェスタンブロット法。1:5000の希釈のマウス抗His6 HRP抗体を使用し、DAB基質で発色させた。発現D60Aに一致する36 kDaバンドは、レーン1~3、5、及び8~9の全てで確認できる。レーン1 = 培養物。レーン2 = 培養上清。レーン3 = 可溶性ペリプラズム画分。レーン4 = 陽性対照PNGase F (300 ng)。レーン5 = 不溶性細胞溶解物。レーン6 = 通過負荷。レーン7 = タンパク質マーカー：250 kDa、150 kDa、100 kDa、75 kDa (プロット上で確認できる)、50 kDa、37 kDa (緑色)、25 kDa、20 kDa (プロット上で確認できる)、15 kDa、10 kDa (緑色)。レーン8 = 50 mM イミダゾール洗浄。レーン9 = イミダゾール勾配(24 µg)からのプールのされた溶出ピーク画分。

【図25】Superdex 75 10/300 GLカラムでのD60A SECクロマトグラムを示している。IMAC溶出画分を、SECに通して高純度D60Aタンパク質を得た。wt PNGase F及びD60Aは共に12 mLの保持容量で溶出した。

【図26】SEC精製D60AクロンのSDS-PAGE及びウェスタンブロット法を示している。a) D60A SEC溶出ピーク画分のクマーシー染色変性SDS-PAGE。b) D60A SEC溶出ピーク画分の複製ゲルのウェスタンブロット法。1:5000の希釈のマウス抗His6 HRP抗体を使用し、DAB基質で発色させた。発現D60Aに一致する36 kDaバンドは、レーン2~7の全てで確認できる。レーン1 = タンパク質マーカー(ウェスタンブロット法では確認できない)：250 kDa、150 kDa、100 kDa、75 kDa、50 kDa、37 kDa (緑色)、25 kDa、20 kDa。レーン2~7 = D60A溶出画分(それぞれ1 µg)。レーン8 = 陽性対照PNGase F (500 ng)。N末端OmpA分泌タグを含まない、OmpA-D60A及びD60Aに一致する約36 kDaの二重バンドを可視化するために、ゲルバンドを意図的に、通常よりも長く移動できるようにした。

【図27】R911 IMAC溶出クロマトグラムを示している。R911の勾配溶出プロフィール。第1の鋭いピークは、50 mM イミダゾール洗浄である(8.3% B)。浅くて広いピークは、R911の溶出に一致し、14.5% B~31% Bである。

【図28】Superose 12 10/300 GLカラムでのR911 SECクロマトグラム。IMAC溶出画分をSECに通した。14.02 mLの保持容量で最大ピークを有する4つ目のピークが、この同じカラムのD60A溶出に一致している。

【図29】IMAC及びSEC精製R911のSDS-PAGE及びウェスタンブロット法を示している。a) R911 IMAC及びSEC溶出画分のクマーシー染色変性SDS-PAGE。b) R911 IMAC及びSEC溶出画分の複製ゲルのウェスタンブロット法。1:5000の希釈のマウス抗His6 HRP抗体を使用し、DAB基質で発色させた。発現R911に一致する36 kDaバンドは、レーン2~9の全てで確認できる。レーン1 = タンパク質マーカー：250 kDa、150 kDa、100 kDa、75 kDa、50 kDa、37 kDa、25 kDa、20 kDa、15 kDa、10 kDa。レーン2 = 培養物。レーン3 = 不溶性細胞溶解物。レーン4 = 可溶性ペリプラズム画分。レーン5 = 50 mM イミダゾール洗浄。レーン6 = プールされたIMAC溶出画分番号

10

20

30

40

50

42 ~ 63。レーン7 = 10.37 mLの保持容量での図28の第2のSEC溶出ピークに一致するSEC画分の15番。レーン8 = 12.41 mLの保持容量での図28の第3のSEC溶出ピークに一致するSEC画分番号23。レーン9 = 14.02 mLの保持容量での図28の第4のSEC溶出ピークに一致するSECプール画分の29 ~ 37番。レーン10 = 陽性対照D60A (1 μ g)。

【図30】RNase B pHスカウティングを示している。10 mM 酢酸pH5.5結合緩衝液により、RNaseリガンドのカルボキシメチルデキストランCM-5センサー表面チップへの最も効率的な結合が得られた。

【図31-1】図31は、wtPNGase F、D60A、R911、及びR911C60AのSPRセンソグラムを示している。約3200RUの最大の応答 (R_{MAX}) を得るために変性RNase Bを固定することによって高密度表面を用意した。a) wtPNGase F: 250 nM ~ 64 μ M 段階希釈、b) D60A: 段階希釈72 nM ~ 20 μ M。得られたデータをScrubber 2.0cによって分析した。

【図31-2】図31-1の続きである。c) R911: 78 nM ~ 5 μ M 段階希釈、及びd) R911C60A: 78 nM ~ 10 μ M 段階希釈。得られたデータをScrubber 2.0cによって分析した。

【図32】RNase A及びRNase Bを用いたD60Aアフィニティークロマトグラフィーを示している。

【図33】RNase AとRNase BとのR911 Lectenz (登録商標) アフィニティークロマトグラフィーの比較を示している。

【図34】脱グリコシル化RNase BのR911 Lectenz (登録商標) アフィニティークロマトグラフィーを示している。

【図35】RNase A及びRNase Bのトリプシン消化のR911 Lectenz (登録商標) アフィニティークロマトグラフィーを示している。

【図36】競合溶出のために遊離キトビオースを用いたRNase BのR911 Lectenz (登録商標) アフィニティークロマトグラフィーを示している。

【図37】競合溶出のために遊離キトビオースを用いたMCF7細胞抽出物のR911 Lectenz (登録商標) アフィニティークロマトグラフィーを示している。

【図38】D60A及びR911クローンのグリカンアレイスクリーニングを示している。

【図39】実験及び理論水素結合を示している。wtPNGase F残基D60、R61、E118、W120、及びW191とキトビオースリガンド (輪郭) との間の7つの水素結合が破線で示されている。a) 実験1PNF X線結晶学データで報告された水素結合。b) 1PNFのMDシミュレーションデータから計算した理論水素結合。

【図40】100ナノ秒の1PNFのMDシミュレーション中の相互作用エネルギーの安定性を示している。

【図41】100ナノ秒のR911 DunのMDシミュレーション中の相互作用エネルギーの安定性を示している。相互作用エネルギーは、シミュレーションの55ナノ秒後まで安定しない。5ナノ秒でのエネルギーデータは、計算ノードのハードウェアの故障によって起きたデータの喪失によって得ることができなかった。

【図42】Chi1及びChi2二面角のD57L回転異性体のヒストグラムを示している。

【図43】Chi1二面角のD60C回転異性体のヒストグラムを示している。

【図44】Chi1二面角のE206S回転異性体のヒストグラムを示している。

【図45】Chi1及びChi2二面角のI156L回転異性体のヒストグラムを示している。

【図46】Chi1及びChi2二面角のG192I回転異性体のヒストグラムを示している。

【図47】Chi1及びChi2二面角のR248W回転異性体のヒストグラムを示している。

10

20

30

40

50

【図48】R911 Dyn MDのシミュレーションの水素結合及び好ましい回転異性体を示している。R911残基D60C、R61、及びW191とキトビオース（輪郭）との間の5つの理論水素結合が破線によって示されている。R911突然変異（オレンジ色）の回転異性体は、73ナノ秒のシミュレーション軌道から抽出された最も頻度の高い向きで示されている。

【図49】糖トリペプチドリガンドを用いた100ナノ秒の1PNF（GLH206）のMDシミュレーション中の相互作用エネルギーの安定性を示している。51～70ナノ秒の間の平均相互作用エネルギーは、約-52.7 kcal/molであり、80～100ナノ秒の間の平均相互作用エネルギーは、-44.0 kcal/molである。

【図50】糖トリペプチドと複合体を形成したwtPNGase Fの還元GlcNAcの椅子型及びスキューポート環コンフォメーションを示している。結合ポケット内に糖トリペプチドを有するwtPNGase Fの表面疎水性の表現。a) MDシミュレーションの最初の約70ナノ秒の間に観察された還元GlcNAcの⁴C₁椅子型コンフォメーション（60ナノ秒のスナップ写真）。挿入画像は、環原子のみを有する⁴C₁コンフォメーションを示している。b) シミュレーションの最後の26ナノ秒の間のスキューポートコンフォメーション（86ナノ秒のスナップ写真）。挿入画像は、環原子のみを有するスキューポートコンフォメーションを示している。

【図51】60ナノ秒の時点での1PNF（GLH206）及び糖トリペプチドのMDシミュレーションの水素結合を示している。水素結合は破線で示されている。糖トリペプチドリガンドは、緑色で輪郭が示されている。触媒活性（D60及びE206）、基質認識、及び相互作用の安定化に重要なアミノ酸残基が示されている。シミュレーションした水素結合D60-O-GlcNAc316NAc及びY85-OH-N316-O（キトビオース結合アスパラギン酸）は中心に向かって描写されている。還元GlcNAcは、⁴C₁コンフォメーションである。

【図52】84ナノ秒の時点での1PNF（GLH206）及び糖トリペプチドのMDシミュレーションの水素結合を示している。水素結合は破線で示されている。糖トリペプチドリガンドは、輪郭が示されている。触媒活性（D60及びE206）、基質認識、及び相互作用の安定化に重要なアミノ酸残基が示されている。シミュレーションしたW207-N-N316-O（キトビオース結合アスパラギン酸）は左上部に向かって描写されている。還元GlcNAcは、スキューポートコンフォメーションである。

【図53】O-GlcNAcペプチドリガンドを用いた50ナノ秒の1PNF（GLH206）のMDシミュレーション中の相互作用エネルギーの安定性を示している。29ナノ秒～39ナノ秒の間の軌道の部分が、MM-GBSA分析のために選択された。

【図54】O-GlcNAcペプチドリガンドを用いた50ナノ秒の1PNFD60A（GLH206）のMDシミュレーション中の相互作用エネルギーの安定性を示している。軌道の最後の部分（39ナノ秒～49ナノ秒）が、MM-GBSA分析のために選択された。

【図55】O-GlcNAcペプチドリガンドを用いた50ナノ秒のR911 DynのMDシミュレーション中の相互作用エネルギーの安定性を示している。軌道の最後の部分（39ナノ秒～49ナノ秒）が、MM-GBSA分析のために選択された。

【図56】45ナノ秒の時点でのR911及びGlcNAc-SerのMDシミュレーションを示している。GlcNAc-Serリガンドは、輪郭が示されている。N-アセチル基が深い疎水性溝の中に延びた結合ポケットのリガンドを示すR911-GlcNAc-Ser複合体の表面疎水性の表現。理論水素結合は破線で示されている。R911突然変異残基が示されている。

【図57】R911突然変異体のL57D、L156I、及びI192GのSDS-PAGE精製を示している。

【図58】L57D精製プロフィールを示している。L57Dは、IMAC分解からの2つの溶出ピークを有する。

【図59】R911とは異なるSEC溶出パターンを示すL57D突然変異体を示してい

10

20

30

40

50

る。

【図60】O-グリカナーゼ活性アッセイを示している。pNP-O-グリカン基質(250 μg/mL)を10ピコモルの試験タンパク質と共に、25 μLの25 mM Tris-Cl緩衝液、pH 7.5、及び100 μg/mL BSAで、37 °Cで60分間インキュベートした。200 μLの0.2 M Na₂CO₃溶液の添加によって反応を停止させた。405 nmでの吸光度を、酵素活性の指標として測定した。基質の省略形：GlcNAc：p-ニトロフェニルN-アセチル-D-グルコサミニダーゼ；キトビオース：p-ニトロフェニルN、N'-ジアセチル-D-キトビオシド；GalNAc：p-ニトロフェニル2-アセトアミド-2-デオキシ-D-ガラクトピラノシド；GalNAc：p-ニトロフェニル2-アセトアミド-2-デオキシ-D-ガラクトピラノシド。

10

【図61】N-グリカナーゼ活性アッセイを示している。N-グリコシル化基質(1 μgの変性RNase B)を10ピコモルの試験タンパク質と共に、15 μLの50 mM EPSS緩衝液、pH 8.0、37 °Cで60分間インキュベートした。陰性対照及びM.W.マーカーとして、変性RNase Aを試験タンパク質と共に並列にインキュベートした。濃縮SDS-Sample緩衝液の添加及び100 °Cで5分間の加熱によって反応を停止させた。最終産物を、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって分析した。

【発明を実施するための形態】

【0043】

例示的な実施形態の詳細な説明

20

本発明は、酵素ペプチド-N₄-(N-アセチル-D-グルコサミニル)アスパラギンアミダーゼ(PNGase F)に由来する触媒的に不活性な炭水化物結合タンパク質、及び本明細書に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質の作製及び使用方法を提供する。好ましいPNGase F酵素及びコード配列は、フラボバクテリウム・メニンゴセプチカム(Flavobacterium meningosepticum)から得られるPNGase Fである。本発明は、F.メニンゴセプチカム(F. meningosepticum)からのPNGase Fについて主に説明するが、PNGase Fの他の供給源も利用できることを理解されたい。

【0044】

ペプチド：N-グリカナーゼ(PNGase F)という名称は、糖ペプチド又は糖タンパク質中に存在するアスパラギンからN結合型グリカンを切断する化学反応を触媒する酵素のファミリーを含む。より具体的には、PNGase F酵素は、ポリペプチドのアスパラギン側鎖とN-グリカンの近接N-アセチル-D-グルコサミン(GlcNAc)との間のアミド結合の切断を触媒して、(置換)N-アセチル-D-グルコサミニルアミン及びアスパラギン酸残基を含むペプチドを生成するN-グリカン放出酵素のクラスである。N結合型グリカンは、グルコサミン残基がさらにグリコシル化され得るN₄-(アセチル-D-グルコサミニル)アスパラギン残基であり得る。加水分解反応により、グリカン及び遊離アンモニアが放出され、アスパラギンがアスパラギン酸に変換されることなる(図3を参照)。本明細書で使用される「N-グリカン」及び「O-グリカン」という語は、一般に、加水分解反応で放出される遊離グリカンを指すが、文脈上、ペプチド又は他の基質に結合したグリカンも指すこともある。

30

40

【0045】

「PNGase F」という名称は、フラボバクテリウム・メニンゴセプチカム(Flavobacterium meningosepticum)から単離された最初に知られたPNGase酵素に付与されたが、「PNGase F」という語は、上記のグリコシド活性を有する酵素のファミリーに関連するようになった。本発明は、突然変異の根拠としてF.メニンゴセプチカム(F. meningosepticum)からのPNGase Fを用いて主に説明されるが、本発明は、このために他のPNGase F酵素の使用も包含する。

【0046】

50

本発明の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質は、野生型 PNGase F に対して複数の突然変異を含み、この突然変異の少なくとも1つは、酵素の触媒活性を低下又は消失させる。PNGase F の触媒活性は、好ましくは、活性部位における少なくとも1つの残基の部位特異的突然変異（「第1の」突然変異）によって低下又は消失される。

【0047】

これに加えて、1つ以上の他のアミノ酸残基が、結合特異性又は結合親和性に影響を与えるように突然変異される（「第2の」突然変異）。一実施形態では、第2の突然変異は、活性を低下させる第1の突然変異のみを有する対応する突然変異体 PNGase F の N 結合型グリカンに対する結合親和性と比較して、N 結合型グリカンに対する触媒的に不活性な PNGase F の結合親和性を高める。別の実施形態では、第2の突然変異は、1つ以上 O 結合型グリカン（非天然基質）に対する結合特異性及び親和性を増加させるように PNGase F の結合特異性を変更する。

10

【0048】

触媒的に不活性な炭水化物結合タンパク質が結合する化合物は、酵素反応が実質的に抑制又は停止されるため、本明細書では「基質」ではなく「リガンド」と呼ばれることがある。

【0049】

従って、一実施形態では、複数の突然変異の一部又は全ての結果として、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質は、対応する野生型酵素よりも、又は活性を低下若しくは消失させる1つ以上の突然変異のみを含む対応する不活性な突然変異体 PNGase F よりも高い親和性で天然基質 N 結合型グリカンに結合する。別の実施形態では、複数の突然変異の一部又は全ての結果として、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質は、O 結合型グリカン、例えば、O 結合型 GlcNAc 又は O 結合型 GalNAc に結合する。O 結合型グリカンは、PNGase F の天然基質ではない。さらに別の実施形態では、複数の突然変異の一部又は全ての結果として、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質は、天然基質 N 結合型グリカン及び O 結合型グリカンの両方、例えば、O 結合型 GlcNAc 又は O 結合型 GalNAc に結合する。O 結合型 GlcNAc 又は O 結合型 GalNAc に結合する実施形態では、O 結合型 GlcNAc は、 α -O 結合型 GlcNAc 又は β -O 結合型 GlcNAc であり得、O 結合型 GalNAc は、 α -O 結合型 GalNAc 又は β -O 結合型 GalNAc であり得る。

20

30

【0050】

本発明の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質は、N 結合型グリカン、O 結合型グリカン、又は両方に結合する。このグリカンが共有結合する化合物は、例えば、生体分子、例えば、それぞれ糖ペプチド、糖タンパク質、若しくは糖脂質を生成するペプチド、タンパク質、若しくは脂質；天然若しくは非天然のポリマー若しくはポリマー足場；人工化合物、例えば、ペプトイド；有機リンカー分子；基質表面、例えば、樹脂又はビーズの表面；又は一般にあらゆる有機基質であり得る。糖ペプチド又は糖タンパク質では、N 結合型グリカンは、典型的には、アスパラギン酸残基に付着し、O 結合型グリカンは、典型的には、セリン又はトレオニン残基に付着する。

40

【0051】

本発明の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質はまた、任意選択的に、加水分解型又は放出型の N 結合型グリカン又は O 結合型グリカンに結合する。本発明は、N 結合型又は O 結合型であるグリカンの別の化合物、例えば、ペプチドアスパラギン又はペプチドセリン又はトレオニンへの結合について主に説明されるが、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質の対応する遊離グリカンへの結合も、本発明によって包含されることを理解されたい。

【0052】

本発明の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質は、グリコシル化

50

化合物、又はN結合型グリカン又はO結合型グリカン（非天然基質）を含む表面に特異的に結合するが、野生型酵素と比較するとかなり遅い速度のこの化合物又は表面からのN結合型グリカンの切断を示す。好ましい一実施形態では、触媒的に不活性な酵素は、化合物又は表面からN結合型グリカンをそれほど切断しない。例えば、切断速度は、以下により詳細に説明されるように、対応する野生型酵素で観察される切断速度の50%以下であり得る。特に好ましい一実施形態では、グリコシド結合の切断は、バックグラウンドレベルを超えては検出されない。

【0053】

本発明の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質は、第1（不活性化させる）及び第2（結合特異性及び/又は結合親和性に影響を与える）の突然変異の両方を含み、本明細書では場合によっては、触媒的に不活性なPNGase F誘導体又は触媒的に不活性なPNGase F突然変異体、又は短縮形の「PNGase F突然変異体」と呼ばれ、これらの語は置き換え可能である。対応する野生型PNGase Fは、本明細書では場合によっては、基準化合物と呼ばれる。しかしながら、使用される専門用語にかかわらず、本発明の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fは、触媒的に不活性なだけでなく；さらに、N結合型グリカンに対する結合親和性を高め、かつ/又はO結合型グリカンに対する結合特異性及び親和性を高める1つ以上の突然変異を含むことを理解されたい。言い換えれば、本発明の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fは、例えば、以下に詳述されるようにPNGase FのD60位の少なくとも1つの第1の突然変異によって触媒的に不活性化され、(i)追加の(第2の)突然変異を含まない対応する触媒的に不活性なPNGase Fと比較して、N結合型グリカンに対する結合親和性を高くし、かつ/又は(ii)O結合型グリカンに対する結合特異性及び親和性を高める、1つ以上の追加の第2の突然変異を含む。(i)と同様にN結合型グリカンに対する高い結合親和性を示す触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fは、典型的には、触媒活性を低下又は消失させる第1の突然変異のみを有する対応するPNGase Fの K_D よりも低い K_D を有する。(ii)と同様のO結合型グリカンに対する結合特異性及び親和性の増加は、野生型PNGase Fに対して新たに獲得した特徴である新規な特異性の導入を意味する。

【0054】

結合親和性及び特異性の評価及び比較の方法、並びに触媒的に活性な型（基準化合物）の酵素（ここではPNGase F）と触媒的に不活性な型（本発明の化合物）の酵素との間のようにこれらの2つの特徴の比較にかかわる特別な考慮が、本明細書、2010年6月17日出願の「グリカン特異的分析ツール(Glycan-Specific Analytical Tools)」という名称のPCT国際公開第2010/068817号パンフレット、及び2012年2月16日に公開された米国特許出願公開第20120040474号明細書に記載されている。

【0055】

PNGase Fの系統名は、N結合型糖ペプチド-(N-アセチル-D-グルコサミン)-L-アスパラギンアミノヒドロラーゼFであり；推奨名は、ペプチド-N4-(N-アセチル-D-グルコサミン)アスパラギンアミダーゼFである。PNGase Fの代替名又はPNGase Fの代替の実施形態は、N-オリゴ糖グリコペプチダーゼ、グリコペプチドN-グリコシダーゼ、グリコアミダーゼ、グリコペプチダーゼ、N-オリゴ糖グリコペプチダーゼ、及びN-グリカナーゼを含む(表2を参照されたい)。PNGase Fファミリーは、酵素の欧州委員会番号EC 3.5.1.52を有する。

【0056】

基準化合物PNGase Fは、突然変異により本発明の触媒的に不活性な炭水化物結合タンパク質を形成し、供給源によって限定されるものではない。触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体を生成する突然変異の基礎又はプラットフォームとして機能するPNGase F酵素(その核酸コード配列を含む)は、任意の好都合の生

10

20

30

40

50

物から得ることができる。PNGase F 酵素は、限定されるものではないが、細菌、植物、酵母、及び動物系に見られる。

【0057】

好ましいPNGase Fは、フラボバクテリウム・メニンゴセプチカム (*Flavobacterium meningosepticum*) から得られる細菌PNGase Fである。フラボバクテリウム・メニンゴセプチカム (*Flavobacterium meningosepticum*) は、クリセオバクテリウム・メニンゴセプチカム (*Chryseobacterium meningosepticum*) 及びエリザベスキングア・メニンゴセプチカム (*Elizabethkingia meningosepticum*) としても知られている。本発明は、F・メニンゴセプチカム (*F. meningosepticum*) からのPNGase Fを用いて主に説明される。従って、本明細書に記載のアミノ酸位置は、F・メニンゴセプチカム (*F. meningosepticum*) PNGase Fのアミノ酸配列 (314のアミノ酸; 配列番号1; 図4A; GenBankアクセッション番号J05449; GenBankアクセッション番号AF165910; Loo et al., 2002 Protein Expression & Purification 24:90-98) に基づいて指定される。図4Aは、8つの部位で異なるF・メニンゴセプチカム (*F. meningosepticum*) の異なる菌株からの2つの相同なF・メニンゴセプチカム (*F. meningosepticum*) PNGase F配列を示し; Protein Data Bank ID 1PNFによって示される、X線結晶構造のために委託されたアミノ酸配列も参照されたい。アミノ酸配列番号1は、これらのアミノ酸配列、及び図4Aに示されているように39 (A/T)、149 (V/I)、168 (A/G)、219 (S/A)、243 (N/I)、245 (T/A)、269 (I/T)、及び/又は281 (N/S) の1つ以上の位置で異なる他のPNGase Fアミノ酸配列を含む。

【0058】

しかしながら、PNGase Fの他の供給源も利用できることを理解されたい。これに関連して、特に有用なPNGase F酵素は、F・メニンゴセプチカム (*F. meningosepticum*) PNGase F (配列番号1) だけではなく、F・メニンゴセプチカム (*F. meningosepticum*) からPNGase F-II型 (配列番号3) (Sun et al., J. Biol. Chem., 2015, 290 (12):7452-62)、バクテロイデス・フラジリス (*Bacteroides fragilis*) から得たPNGase F (配列番号4)、及びフラボバクテリウム・ミリコラ (*Flavobacterium miricola*) からPNGase F (配列番号5) (UniProt P21163、エリザベスキングア・ミリコラ (*Elizabethkingia miricola*) 及びクリセオバクテリウム・ミリコラ (*Chryseobacterium miricola*) としても知られる) も含む。代表的なアミノ酸配列及び核酸配列は、Swiss Prot、UniProt、及びGenBankデータバンクで確認することができる。代表的なアミノ酸配列は、UniProtによる名称: Q9XBM8 (F・メニンゴセプチカム (*F. meningosepticum*) からPNGase F; 配列番号1)、P21163 (F・ミリコラ (*F. miricola*) からPNGase F; 配列番号5)、A0A090KI56-1 (F・メニンゴセプチカム (*F. meningosepticum*) からPNGase F-II型; 配列番号3)、及びQ5LH31 (B・フラジリス (*B. fragilis*) からPNGase F; 配列番号4) を含む。PNGase FのいくつかのX線結晶構造は、フラボバクテリウム・メニンゴセプチカム (*Flavobacterium meningosepticum*) からPNGase F用のPDB識別名1PNG、1PNF (キトピオースリガンドを有する)、1PGS、及び3PMS; フラボバクテリウム・メニンゴセプチカム (*Flavobacterium meningosepticum*) からPNGase F-II用のPDB識別名4R4Z及び4R4X; 及びバクテロイデス・フラジリス (*Bacteroides fragilis*) からの

10

20

30

40

50

PNGase F用のPDB識別名3KS7を含め、Protein Data Bank (PDB) から入手可能である。これらのPNGase F酵素のアミノ酸配列は、PDB委託でも報告されている。

【0059】

PNGase Fと配列が相同の他のタンパク質は、触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体を構成する基準化合物として使用することができ、細菌*Deinococcus radiodurans* (White et al., 1999, Science 286, 1571-1577) 及びプレシオシスチス・パシフィカ (*Plesiocystis pacifica*) SIR-1、並びに真核生物ダニオ・ゼブラ (*Danio rerio*) (ゼブラフィッシュ)、タイセイヨウサケ (*Salmo salar*) (大西洋サケ)、及びカタユレイボヤ (*Ciona intestinalis*) (ホヤ) (Filitcheva, PNGases: A Diverse Family of Enzymes Related by Function Rather Than Catalytic Mechanism, Vol. Ph.D., Massey University, Palmerston North, New Zealand, 2010) から同定されたPNGase F酵素を含む。

10

【0060】

真核生物起源のPNGase Fのさらなる例としては、限定されるものではないが、ハツカネズミ (*Mus musculus*)、ヒト (*Homo sapiens*) (UniProtによる名称: Q96IV0)、シノラブディス・エレガンス (*Caenorhabditis elegans*)、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)、及びサッカロミセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) が挙げられる。

20

【0061】

F. メニンゴセプチカム (*F. meningosepticum*) PNGase F以外のPNGase F酵素が利用される場合は、第1 (不活性化させる) 及び第2 (結合特異性及び/又は結合親和性に影響を与える) の突然変異は、PNGase F配列の対応する部位で生じさせる。対応する部位は、例えば、国際公開第2010/068817号パンフレット及び米国特許出願公開第20120040474号明細書にさらに記載されているように、一次アミノ酸配列を整列させることによって、又はX線結晶構造の比較若しくは相同モデリングの使用によって決定することができる。一部の実施形態では、本発明による突然変異の基礎として利用されるPNGase F酵素は、F. メニンゴセプチカム (*F. meningosepticum*) PNGase Fのアミノ酸配列 (配列番号1) に相同なアミノ酸配列を有する。相同なPNGase F酵素は、N-グリカナーゼ活性を有し、基質結合に関与する1又は複数の領域内で、これらのアミノ酸配列は、F. メニンゴセプチカム (*F. meningosepticum*) PNGase F (配列番号1) の1又は複数の基質結合領域のアミノ酸配列と少なくとも40%の同一性、45%の同一性、50%の同一性、55%の同一性、60%の同一性、65%の同一性、70%の同一性、75%の同一性、80%の同一性、85%の同一性、90%の同一性、95%の同一性、又は98%の同一性を共有し得る。全アミノ酸配列に適用される全体の配列同一性は、かなり低くても良く; 例えば、相同PNGase F配列は、1又は複数の結合領域の同一性のパーセンテージがたとえ高くても、10%の同一性、15%の同一性、20%の同一性、25%の同一性、又は30%以上の同一性しか共有しなくても良い。例えば、4R4X PNGase F-I I (EC 2.7.7.7) は、3KS7とは約37%の配列及び構造相同性を有し、1PNF PNGase Fとの配列及び構造相同性は約26%であるが、結合部位は、著しい類似性を共有する。パーセント同一性は、2つのポリペプチドの残基を、これらの配列の全長に沿って同一のアミノ酸の数が最大となるように整列させることによって決定することができ; 一方又は両方の配列のギャップが、同一のアミノ酸の数を最大にするためにアラインメントの作成で許容されるが、各配列にお

30

40

50

けるアミノ酸はなお、適切な順序に維持しなければならない。例えば、ポリペプチドは、Tatusova et al. (FEMS Microbiol. Lett., 174; 247-250, 1999) によって記載されている、ワールド・ワイド・ウェブ: ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ で入手可能なBLAST2検索アルゴリズムのBlastpプログラムを用いて比較することができる。最近になって、Clustal Omegaプログラムが、配列アライメント用に開発され (Sievers et al., Molecular System Biology, 7: 539, 2011)、ワールド・ワイド・ウェブ: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> で入手可能である。BLAST検索アルゴリズムを用いる2つのアミノ酸配列の比較では、構造類似性は、パーセント「同一性」と呼ばれることもあるし、又はパーセント「類似性」と呼ばれることもある。「同一性」は、同一のアミノ酸の存在を意味し、「類似性」は、同一のアミノ酸の存在を意味するだけでなく、保存的な置換の存在をも意味する。

10

【0062】

野生型PNGase F並びに本明細書に記載される第1及び/又は第2の突然変異を有するPNGase F突然変異を含む、本発明に有用なPNGase Fは、当分野で周知の原核生物及び真核生物発現系、例えば、細菌、原生生物、真菌 (例えば、酵母、例えば、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 又はピチア属菌種 (*Pichia* spp.))、昆虫、及び哺乳動物系を含む、本明細書でより詳細に説明される組換え発現系で好都合に発現され、かつこの系から任意選択的に単離される。

20

【0063】

不活性化させる突然変異

野生型PNGase Fにおける少なくとも1つのアミノ酸は、突然変異体PNGase Fを触媒的に不活性にするために突然変異される。触媒活性を低下又は消失させる1つ以上の突然変異は、本明細書では「第1の」(不活性化させる)突然変異と呼ばれる。一実施形態では、酵素活性は、PNGase Fのアミノ酸残基60、又は別の生物から得たPNGase Fの対応する位置を突然変異させることによって低下又は消失される。F.メニンゴセプチカム (*F. meningosepticum*) PNGase Fのアミノ酸位置を本明細書で言及するときは必ず、このアミノ酸位置が、他の生物から得られるPNGase F酵素の対応する位置を包含することをここで理解されたい。F.メニンゴセプチカム (*F. meningosepticum*) PNGase Fでは、60位の野生型残基はアスパラギン酸 (D) である。この残基は、突然変異が触媒活性を低下又は消失させるのであれば、その他のアミノ酸に突然変異させることができる。60位で利用できるアミノ酸の例としては、限定されるものではないが、アラニン、アルギニン、アスパラギン、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、又はバリン、及び触媒活性を低下又は消失させるその他のアミノ酸、例えば、セレノシステインが挙げられる。PNGase Fの60位の好ましい突然変異としては、アラニン、アスパラギン、システイン、バリン、セリン、又はグリシンが挙げられる。一実施形態では、60位の突然変異は、アラニン、システイン、又はアスパラギン、即ち、D60A、D60C、又はD60Nである。別の実施形態では、60位の突然変異は、アラニン (A)、システイン (C)、又はアスパラギン (N) 以外の、触媒活性を低下又は消失させる任意のアミノ酸である。別の実施形態では、D60を欠失させることができる。

30

40

【0064】

別の実施形態では、酵素活性は、PNGase Fのアミノ酸残基206、又は別の生物から得たPNGase Fの対応する位置の突然変異によって低下又は消失される。F.メニンゴセプチカム (*F. meningosepticum*) PNGase Fでは、206位の野生型残基は、グルタミン酸 (E) である。この残基は、突然変異が触媒活性

50

を低下又は消失させるのであれば、その他のアミノ酸に突然変異させることができる。206位で利用できるアミノ酸の例としては、限定されるものではないが、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、又はバリン、及び触媒活性を低下又は消失させるその他のアミノ酸、例えば、セレノシステインが挙げられる。PNGase Fの206位の好ましい突然変異は、アラニン、セリン、アルギニン、トリプトファン、ヒスチジン、及びシステインが挙げられる(図16)。一実施形態では、206位の突然変異は、アラニン、セリン、アルギニン、又はトリプトファン、即ち、E206A、E206S、E206R、又はE206Wである。別の実施形態では、206位の突然変異は、アラニン(A)、セリン(S)、アルギニン(R)、又はトリプトファン(W)以外の、触媒活性を低下又は消失させる任意のアミノ酸である。別の実施形態では、E206を欠失させることができる。

10

20

30

40

50

【0065】

別の実施形態では、酵素活性は、PNGase Fのアミノ酸残基248、又は別の生物から得たPNGase Fの対応する位置の突然変異によって低下又は消失される。F.メニンゴセプチカム(F. meningosepticum) PNGase Fでは、248位の野生型残基は、アルギニン(R)である。この残基は、突然変異が触媒活性を低下又は消失させるのであれば、その他のアミノ酸に突然変異させることができる。248位で利用できるアミノ酸の例としては、限定されるものではないが、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、又はバリン、及び触媒活性を低下又は消失させるその他のアミノ酸、例えば、セレノシステインが挙げられる。PNGase Fの248位の好ましい突然変異としては、トリプトファン、セリン、プロリン、バリン、アスパラギン酸、チロシン、フェニルアラニン、及びリジンが挙げられる。一実施形態では、248位の突然変異は、トリプトファン又はセリン、即ち、R248W又はR248Sである。別の実施形態では、248位の突然変異は、セリン(S)又はトリプトファン(W)以外の、触媒活性を低下又は消失させる任意のアミノ酸である。別の実施形態では、R248を欠失させることができる。

【0066】

別の実施形態では、酵素活性は、PNGase Fのアミノ酸残基118、又は別の生物から得たPNGase Fの対応する位置の突然変異によって低下又は消失される。この突然変異は、他の不活性化させる突然変異がするようには触媒切断機構を直接的に妨げないが、天然基質、N結合型グリカンの結合を低減又は防止することによって活性に負の影響を与える。F.メニンゴセプチカム(F. meningosepticum) PNGase Fでは、118位の野生型残基は、グルタミン(E)である。この残基は、突然変異がN結合型グリカンの結合を低下又は排除して、触媒活性に負の影響を与えるのであれば、その他のアミノ酸に突然変異させることができる。118位で利用できるアミノ酸の例としては、限定されるものではないが、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、又はバリン、及び触媒活性を低下又は消失させるその他のアミノ酸、例えば、セレノシステインが挙げられる。PNGase Fの118位の好ましい突然変異としては、アラニン又はグルタミンが挙げられる。一実施形態では、118位の突然変異は、アラニン又はグルタミン、即ち、E118A又はE118Qである。別の実施形態では、118位の突然変異は、アラニン(A)又はグルタミン(Q)以外の、触媒活性を低下又は消失させる任意のアミノ酸である。別の実施形態では、E118を欠失させることができる。

【0067】

D 6 0、E 1 1 8、E 2 0 6、又はR 2 4 8の1つ以上における突然変異の任意の組合せを使用して、P N G a s e Fを触媒的に不活性化させることができる。さらに、本発明は、触媒活性を低下又は消失させるこれらの4つの部位のいずれかの突然変異に限定されるものではなく；触媒活性を低下又は消失させるあらゆる突然変異を使用することができる。

【0068】

1 1 8位の突然変異が酵素の不活性化を引き起こすだけでなく、基質の結合、従って特異性に影響を与えることによって、O結合型グリカンに対する結合特異性及び親和性を高めることにさらに留意されたい。従って、1 1 8位における突然変異は、第1（不活性化させる）の突然変異及び第2（結合特異性及び/又は結合親和性に影響を与える）の突然変異の両方として機能し得る。より一般的には、6 0位、2 0 6位、2 4 8位、又は活性に負の影響を与えるその他の位置における突然変異は、N結合型グリカンに対する親和性を高める効果、及び/又はO結合型グリカンに対する結合特異性及び親和性を高める効果をさらに有し得る。従って、あらゆる第1（不活性化させる）の突然変異は、任意選択的に、第2（結合特異性及び/又は結合親和性に影響を与える）の突然変異としても機能し得る。

10

【0069】

N結合型グリカンに対する結合親和性を高めるため、及び/又はO結合型グリカンを含めるためのリガンド特異性を変更するための突然変異

野生型P N G a s e Fにおける少なくとも1つのアミノ酸が、(i)第1の活性を阻害する突然変異のみを有する対応する突然変異体P N G a s e Fの結合親和性と比較して、N結合型グリカンに対する触媒的に不活性な炭水化物結合P N G a s e Fの結合親和性を高めるため、又は(ii)1つ以上の（非天然の基質である）O結合型グリカンに対する結合特異性及び親和性を高めるためにP N G a s e Fの結合特異性を変更するため、又は(i)及び(ii)の両方のために突然変異される。結合特異性又は親和性を高める又は変更する1つ以上の突然変異は、本明細書では「第2の」突然変異と呼ばれる。

20

【0070】

触媒的に不活性な炭水化物結合P N G a s e F突然変異体の一部の実施形態は、N結合型グリカン（天然基質/グリカン）及びO結合型グリカン（新たに獲得した）の両方に対する著しい結合親和性を示す。一例として、P N G a s e F突然変異体R 9 1 1（表1）が挙げられる。これらのP N G a s e F突然変異体を使用して、様々な化合物、例えば、N結合型及び/又はO結合型グリカン、並びに遊離N-グリカン及びO-グリカンを含む糖タンパク質及び糖ペプチドを濃縮する、選択する、又は検出することができる。

30

【0071】

触媒的に不活性な炭水化物結合P N G a s e F突然変異体の他の実施形態は、野生型P N G a s e F、又は不活性化させる突然変異（複数可）のみを有するが、O結合型グリカンに対する著しい結合親和性を示さないP N G a s e Fと比較して、N結合型グリカンに対する高い結合親和性を示す。一例として、P N G a s e F突然変異体R 9 1 1 L 5 7 D（表1）が挙げられる。これらのP N G a s e F突然変異体を使用して、多種多様な化合物、例えば、N結合型グリカン及び遊離N-グリカンを含む糖タンパク質及び糖ペプチドを濃縮する、選択する、又は検出することができる。

40

【0072】

触媒的に不活性な炭水化物結合P N G a s e F突然変異体の他の実施形態は、O結合型グリカンに対する、著しい新たに獲得した結合特異性及び親和性を示すが、野生型P N G a s e F又は不活性化させる突然変異（複数可）のみを有するP N G a s e Fと比較して、N結合型グリカンに対する低い親和性も示す。これらのP N G a s e F突然変異体を使用して、O結合型グリカン及び遊離O-グリカンを濃縮する、選択する、又は検出することができる。

【0073】

O結合型グリカンに対する結合特異性及び親和性を示す触媒的に不活性な炭水化物結合

50

PNGase F突然変異体の一部の実施形態は、O結合型GlcNAcに優先的に結合し；O結合型グリカンに対する結合特異性及び親和性を示す触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体の他の実施形態は、O結合型GalNAcに優先的に結合する。

【0074】

触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体の一部の実施形態がO結合型グリカンに対する結合特異性及び親和性を示すという発見はかなりの驚きであった。当初は、非常に多数のN結合型複合糖質を認識する能力を有する触媒的に不活性な炭水化物結合を設計する目的で、N-グリカンプロセシング酵素、ペプチド-N₄-(N-アセチル-D-グルコサミン)アスパラギンアミダーゼ(PNGase F)が、以下に記載されるLectenz(登録商標)に変換するために選択され；一般的な実験及び計算方法が、2010年6月17日に公開された「グリカント異的分析ツール(Glycan-Specific Analytical Tools)」という名称のPCT国際公開第2010/068817号パンフレットに、そして2012年2月16日に公開された米国特許出願公開第20120040474号明細書にも記載されている。コンピューターガイドライブラリー設計を使用し、次に定方向進化を行って、多数のPNGase Fの有望な候補クローンを作製した。クローンR911(表1)によってコードされる突然変異体タンパク質が、N結合型グリカン(野生型PNGase F又は不活性化されたPNGase F突然変異体、D60Aよりも高い結合親和性を有する)だけではなく、O結合型グリカンにも結合することが予期せず見出された。O結合型グリカンを含む化合物は、PNGase Fの基質として機能するかは不明である。さらに、以下の実施例6に示されているように、PNGase Fは、O-グリコシル化基質に対して酵素的に活性ではなく、観察される全てのO結合型グリカン親和性が、突然変異の結果として獲得された特性であるという強力な証拠を提供する。この予期していなかった特性を十分に利用するために、さらなる触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体を見出すことを目的として(実施例6を参照)、クローンR911をさらなる突然変異の基礎として選択した。このさらなる触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体の一部は、N結合型グリカンに対するより高い結合親和性を示し、他は、O結合型グリカン、例えば、O結合型GlcNAc及びO結合型GalNAcに対するより高い結合親和性を示す。

【0075】

例示的なPNGase Fの突然変異体

N結合型グリカンに対する結合親和性の増加、又はO結合型グリカンに対する結合親和性を高めるためのリガンド特異性の変更は、PNGase Fの57位、60位、62位、118位、119位、120位、123位、125位、153位、154位、155位、156位、157位、192位、206位、及び248位、又は別の生物から得たPNGase Fの対応する位置におけるいずれか1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、又は13全部のアミノ酸残基の突然変異によって達成することができる。好ましい触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質は、これらの位置の少なくとも3つ、これらの位置の少なくとも4つ、これらの位置の少なくとも5つ、又はこれらの位置の少なくとも6つに突然変異を含み得る。好ましくは、残基60、118、又は206の少なくとも1つが突然変異される。

【0076】

列記された位置の一部の残基、例えば、57位、62位、119位、123位、125位、155位、156位、192位、及び248位の残基(表4を参照)は、本明細書では「テピッド(tepid)」残基と呼ばれ、実施例2、PCT国際公開第2010/068817号パンフレット、及び2012年2月16日に公開された米国特許出願公開第20120040474号明細書に記載されているコンピューター支援法を用いて同定された。簡単に述べると、結合に關与する重要な相互作用が、計算により特定され、特異性に直接關与する残基(ホット残基(hot residue))と、結合にほとんど關与

10

20

30

40

50

せず、従ってその突然変異が親和性の増加をもたらし得る残基（テピッド残基）とに分けられた。第1の群（「ホット」残基）は、酵素の特異性の決定に必須と見なされる残基を含む。第2の群（「テピッド」残基）は、基質に近接しているが、特異性の決定に必須とはみなされない残基を含む。基質に近いが、強い相互作用を形成しない残基は、基質結合活性を高め、かつ/又は結合特異性を変更し得る突然変異の候補として本明細書では見なされる。高特異性で高親和性のPNGase F試薬、即ち、本発明の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質のエンジニアリングを目的として、分析の結果が、テピッド残基の飽和突然変異誘発によって、実施例1に記載される突然変異誘発ライブラリーの設計に利用される。

【0077】

列記された位置の一部の残基は、I156を中心とする、PNGase Fの「ループ」領域に存在する。I156の近傍の空間充填又は他の破壊的な突然変異を生じさせて、N結合型グリカンから離れて小さいO結合型グリカンに向かう傾斜結合にする（実施例4を参照されたい）。これに加えて又は別法では、アミノ酸153～157に近接した配列、例えば、154位の両側への1つ、2つ、又は3つのアミノ酸の挿入は、O結合型グリカンに対する結合特異性及び親和性の増加が期待される。

【0078】

適切な突然変異としては、限定されるものではないが：

D57：ロイシン、アラニン、メチオニン、アルギニン、リジン、システイン、トリプトファン

D60：アラニン、システイン、バリン、セリン、グリシン、トリプトファン

Y62：グリシン、トリプトファン、セリン、トレオニン

E118：アラニン、グルタミン、トレオニン、システイン

T119：アラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、バリン

W120：チロシン、ヒスチジン、グルタミン、アスパラギン、トレオニン、セリン

K123：アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン

R125：チロシン、アラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン

K153：ヒスチジン、アルギニン、グルタミン、トリプトファン、チロシン

S154：トレオニン、アスパラギン、リジン、グルタミン、トリプトファン、チロシン

S155：アルギニン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン、トリプトファン、チロシン

I156：ロイシン、トレオニン、メチオニン、グリシン、トリプトファン、ヒスチジン

D157：アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、リジン、トリプトファン、チロシン

G192：イソロイシン、トリプトファン、アラニン、ヒスチジン、トレオニン、システイン、セリン

E206：セリン、トリプトファン、ヒスチジン、システイン、アルギニン

R248：トリプトファン、セリン、プロリン、バリン、アスパラギン酸、チロシン、フェニルアラニン、リジン

【0079】

PNGase Fに誘発できる個々の突然変異の例が、表1に示されている（表示「X」は、その位置の野生型アミノ酸以外の任意のアミノ酸を指す）。表1は、D60、E118、E206、及び/又はR248における第1の不活性化させる突然変異、並びに1つ以上の第2の突然変異の両方を有する例示的な突然変異体を示している。例示的な突然変異体はR911であり、R911は、野生型PNGase Fに対して6つの突然変異（D57L、D60C、I156L、G192I、E206S、R248W）を有する。表1は、R911に基づいた復帰突然変異体も示し、この復帰突然変異体は、野生型PN

10

20

30

40

50

Gase F に対して4つ又は5つの突然変異しか含まない。野生型残基を示すセルは陰影が付けられている。

【0080】

【表1】

wtPNGase F →	D57	D60	Y62	E118	W120	K153	S154	S155	I156	D157	G192	E206	R248
R617 (ライブラリー1)	R	A	G	A	W	K	S	D	T	D	C	S	R
R6113 (ライブラリー1)	C	A	W	A	W	K	S	Q	T	D	T	R	R
R911 (ライブラリー2)	L	C	Y	E	W	K	S	S	L	D	I	S	W
R9113 (ライブラリー2)	W	C	Y	E	W	K	S	S	M	D	I	W	S
R911 L57D	D	C	Y	E	W	K	S	S	L	D	I	S	W
R911 C60A	L	A	Y	E	W	K	S	S	L	D	I	S	W
R911 C60D	L	D	Y	E	W	K	S	S	L	D	I	S	W
R911 E118Q	L	C	Y	Q	W	K	S	S	L	D	I	S	W
R911 W120X	L	C	Y	E	X	K	S	S	L	D	I	S	W
R911 W120X/S155X	L	C	Y	E	X	K	S	X	L	D	I	S	W
R911 K153X	L	C	Y	E	W	X	S	S	L	D	I	S	W
R911 S154X	L	C	Y	E	W	K	X	S	L	D	I	S	W
R911 S155X	L	C	Y	E	W	K	S	X	L	D	I	S	W
R911 L156X	L	C	Y	E	W	K	S	S	X	D	I	S	W
R911 L156I	L	C	Y	E	W	K	S	S	I	D	I	S	W
R911 L156I/S206E	L	C	Y	E	W	K	S	S	I	D	I	E	W
R911 D157X	L	C	Y	E	W	K	S	S	L	X	I	S	W
R911 I192G	L	C	Y	E	W	K	S	S	L	D	G	S	W
R911 S206E	L	C	Y	E	W	K	S	S	L	D	I	E	W
R911 W248R	L	C	Y	E	W	K	S	S	L	D	I	S	R

【0081】

表1に従ったアミノ酸置換を有する20の例示的なPNGase F突然変異体が以下に列記される。これらのPNGase F突然変異体は、以下に列記される以外のアミノ酸位置に配列番号1のように野生型PNGase F配列を有する。

突然変異体1：D57R、D60A、Y62G、E118A、S155D、I156T、G192C、及びE206S

突然変異体2：D57C、D60A、Y62W、E118A、S155Q、I156T、G192T、及びE206R

突然変異体3：D57L、D60C、I156L、G192I、E206S、及びR248W

突然変異体4：D57W、D60C、I156M、G192I、E206W、及びR248S

突然変異体5：D60C、I156L、G192I、E206S、及びR248W

突然変異体 6 : D 5 7 L、D 6 0 A、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

突然変異体 7 : D 5 7 L、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

突然変異体 8 : D 5 7 L、D 6 0 C、E 1 1 8 Q、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

突然変異体 9 : D 5 7 L、D 6 0 C、W 1 2 0 X、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

突然変異体 10 : D 5 7 L、D 6 0 C、W 1 2 0 X、S 1 5 5 X、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

突然変異体 11 : D 5 7 L、D 6 0 C、K 1 5 3 X、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

突然変異体 12 : D 5 7 L、D 6 0 C、S 1 5 4 X、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

突然変異体 13 : D 5 7 L、D 6 0 C、S 1 5 5 X、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

突然変異体 14 : D 5 7 L、D 6 0 C、I 1 5 6 X、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

突然変異体 15 : D 5 7 L、D 6 0 C、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

突然変異体 16 : D 5 7 L、D 6 0 C、G 1 9 2 I、及び R 2 4 8 W

突然変異体 17 : D 5 7 L、D 6 0 C、I 1 5 6 L、D 1 5 7 X、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

突然変異体 18 : D 5 7 L、D 6 0 C、I 1 5 6 L、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

突然変異体 19 : D 5 7 L、D 6 0 C、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、及び R 2 4 8 W

突然変異体 20 : D 5 7 L、D 6 0 C、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、及び E 2 0 6 S。

【 0 0 8 2 】

また、N末端又はC末端のいずれかで切断され得る、触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F の切断型、並びにN結合型グリカン及び/又はO結合型グリカンに対する結合特異性及び親和性が維持されるのであれば、他の誘導体化、修飾、挿入、又は欠失を有する型も本発明に包含される。切断は、N末端又はC末端のいずれか、又は両末端からの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、又は39以上のアミノ酸の切断を含み得る。

【 0 0 8 3 】

本明細書で使用される「触媒的に不活性な」酵素又は化合物は、触媒活性が低下した、好ましくはその触媒活性の少なくとも50%、好ましくはその触媒活性の少なくとも60%又は70%が消失した酵素又は化合物であり、かつ触媒的に活性な酵素のアミノ酸組成とは異なるアミノ酸組成を有する。触媒的に不活性な酵素は、その活性の少なくとも70%、その活性の少なくとも75%、その活性の少なくとも80%、その活性の少なくとも85%、その活性の少なくとも90%、又はその活性の少なくとも95%が消失した酵素であり得る。例えば、切断率は、対応する野生型酵素で観察される切断率の50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、又は5%であり得る。活性が「消失された」酵素又は化合物は、その触媒活性の少なくとも90%又は少なくとも95%が消失した酵素又は化合物であり、かつ触媒的に活性な酵素のアミノ酸組成とは異なるアミノ酸組成を有する。「野生型(WT)酵素」という語は、生物中で自然に発生する遺伝子の配列を有し、かつヒトの介入によって変更されていない遺伝子によってコードされる酵素を指す。もちろん、野生型酵素の天然に存在する多型もこの定義に含まれることを理解されたい。タンパク質の天然の開始コドン又は停止コドンを通常は変更しないタンパク質の精製又は単離に使用される修飾、例えば、標識又は他の修飾は、本発明においてWT酵素の定義の範囲内であることをさらに理解されたい。本明細書で使用される「リガンド」及び「

基質」は、互換的に使用され、WT又は突然変異体酵素が結合できる分子を指す。

【0084】

基質に対して高い結合親和性及び高い特異性を有するが、もはや基質に対して著しい酵素活性を有していない、本発明の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質はLectenz（登録商標）である。Lectenz（登録商標）は、Glycosensors and Diagnostics（G&D）の登録商標である。「Lectenz（登録商標）」は、レクチン様の性質を有するタンパク質であり、かつ最先端の計算方法と実験方法の組み合わせを用いて炭水化物プロセッシング酵素からエンジニアリングされる。Lectenz（登録商標）は、サンプルの濃縮及びグリコシル化部位マッピングを助けるために糖鎖生物学に直接利用することができる。G&Dのウェブサイト（<http://glycosensors.com>）を参照されたい。Lectenz（登録商標）及びその性質、並びに触媒的に不活性な炭水化物結合タンパク質の設計、合成、及びアッセイのための材料及び方法は、国際公開第2010/068817号パンフレット及び2012年2月16日公開の米国特許出願公開第20120040474号明細書、並びに米国仮特許出願第61/900,746号明細書（O結合型N-アセチルグルコサミンに対して特異的な触媒的に不活性な炭水化物結合タンパク質「Catalytically Inactive Carbohydrate-Binding Protein Specific for O-Linked N-Acetylglucosamine」）に記載され、それは、本発明においてこのような目的に有用であり得る。国際公開第2010/068817号パンフレット、2012年2月16日に公開された米国特許出願公開第20120040474号明細書、及び米国仮特許出願第61/900,746号明細書は、それぞれ参照によりそれぞれの全開示内容が本明細書に組み入れられる。PCT国際公開第2010/068817号パンフレット及び米国仮特許出願第61/900,746号明細書は、本明細書で使用される「結合親和性」及び「特異性」という語の意味についてのさらに詳細な情報も提供する。

10

20

【0085】

コンジュゲート

本発明はまた、触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体のコンジュゲートを含む。コンジュゲートは、第1の成分として、触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体を含み、この突然変異体は、少なくとも1つの第2の成分に共有結合し、この第2の成分は、タンパク様成分又は非タンパク様成分であり得る。一部の実施形態では、タンパク様成分を含むコンジュゲートは、周知の組換えDNA法を用いて融合タンパク質として合成することができる。一部の実施形態では、コンジュゲートは、触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体に化学的又は酵素的にコンジュゲートするタンパク様成分又は非タンパク様成分を含む。

30

【0086】

本発明のコンジュゲートの一例は、本明細書では薬物とも呼ばれる治療薬にコンジュゲートした触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体を含む。このコンジュゲートは、PNGase F突然変異体が抗体の代わりに使用されるという点を除いて、周知の抗体-薬物コンジュゲート（ADC）に類似している。触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体にコンジュゲートされ得る薬物としては、限定されるものではないが、細胞毒、代謝拮抗剤、アルキル化剤、抗生物質、及び抗有糸分裂剤が挙げられる。

40

【0087】

抗癌剤、抗炎症薬、炎症誘発剤、及び免疫調節剤は、癌及び前癌状態、並びに炎症及び免疫状態が、多くの場合、タンパク質グリコシル化パターンの変化に関連するため、触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質へのコンジュゲーションに特に適している。例えば、治療又は診断放射性薬品は、癌糖マーカーを標的とすることができる「Lectenz（登録商標）-薬物」コンジュゲートを得るために触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体に結合させる又はこの変異体を組み込むことがで

50

きる。一実施形態では、治療又は診断薬は、例えば、肺又は消化管における粘膜内層又は膜を標的とすることができる。

【0088】

同様に、抗ウイルス薬及び抗細菌薬もまた、標的ウイルス又は細菌グリコシル化生体分子が優れた治療可能性を有するため、「Lectenz（登録商標）-薬物」コンジュゲートに組み込むのに特に適している。

【0089】

本発明のコンジュゲートの別の例としては、診断薬又は検出薬にコンジュゲートした触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体が挙げられる。診断薬又は検出薬は、限定されるものではないが、放射性標識、蛍光標識、りん光標識、比色標識、酵素標識、免疫標識、磁気標識、常磁性標識、反磁性標識、又は電磁標識を含む検出可能な標識を含み得る。触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体は、このPNGase F突然変異体が、例えば、イムノアッセイによって直接的に検出できるため、診断薬又は検出薬として機能するようにコンジュゲートする必要がないことを理解されたい。

10

【0090】

本発明のコンジュゲートの別の例としては、精製を容易にするためにマーカー配列、例えば、ペプチド、例えば、ヘキサ-ヒスチジン又は赤血球凝集素にコンジュゲートされた触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体が挙げられる。本発明には、例えば、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、チオレドキシン、ウシ血清アルブミン、ウシ膵臓トリプシン阻害剤、又は蛍光タンパク質、例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）に共有結合された触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体を含むPNGase F融合タンパク質が含まれる。

20

【0091】

使用方法

触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質のレクチン様の性質のために、このPNGase Fタンパク質の非常に多数の潜在的な用途は、当業者であればすぐに分かるであろう。一般に、触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体又はそのコンジュゲートは、抗グリカン抗体が現在使用されている目的と同じあらゆる目的に使用することができる。従って、本発明の化合物は、有利なことに、診断方法、分析方法、及び治療方法を含む様々な医療方法及び実験方法において、抗グリカン抗体の代用とすることができる。同様に、触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体又はそのコンジュゲートは、レクチンが現在使用されている目的と同じ目的に使用することができる。従って、本発明の化合物は、有利なことに、様々な診断方法及び分析実験方法において、レクチンの代用とすることができる。

30

【0092】

診断方法及び分析方法

触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体又はそのコンジュゲートを使用して、生物学的サンプル又は合成サンプルにおいて、N結合型グリカン、O結合型グリカン、又は両方を検出することができる。例えば、生物学的サンプル、例えば、組織又は体液をPNGase F突然変異体又はそのコンジュゲートに接触させて、生物学的サンプルのグリコシル化及び/又は糖化のレベル又は型を検出し、かつ/又は特徴付けることができる。このグリカンの特徴付けは、このグリカンの構成糖を特定すること、このグリカンの糖組成を決定すること、このグリカン内の連結位置を決定すること、又はこのグリカンの立体化学を決定することを含み得る。別の例として、触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体又はそのコンジュゲートは、グリコシル化のレベル又は型を監視するために、例えば、治療用抗生物質の合成において、治療用生物製剤の合成における品質管理に使用することができる。2012年9月7日に公開されたPCT国際公開第2012/118928号パンフレットを参照されたい。触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体又はそのコンジュゲートは、親和性試薬として、又はア

40

50

フィニティーマトリックスの一部として利用することができ；例えば、固体支持体、例えば、表面、カラム、樹脂、ビーズ、粒子、及びナノ粒子に取り付けて、生物学的サンプル又は合成サンプル中、又はこれらのサンプルからO結合型及び/又はN結合型化合物を検出又は濃縮するための方法で使用することができる。取り付けられたPNGase F突然変異体は、合成グリコシル化化合物の単離及び/又は精製にも使用することができる。

【0093】

診断は、対象から得られた生物学的サンプルに対して行うことができるが、*in vivo*で行うこともできる。*in vivo*での適用例では、触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体又はそのコンジュゲートが対象に投与され、対象内でのこのPNGase F突然変異体の結合が検出される。好ましくは、コンジュゲートは、対象に投与され、このコンジュゲートは、生物医学的イメージングを容易にするために検出可能な標識を含む。適切なコンジュゲートの例としては、放射性標識、常磁性標識、又は反磁性標識にコンジュゲートされた触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体が挙げられる。

10

【0094】

N結合型グリカンに対する結合親和性及び/又はO結合型グリカンに対する新たに獲得された特異性が高められた触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質を使用して、異常なグリコシル化を探すために生物学的サンプルを調べることができる。生物学的サンプルの例としては、限定されるものではないが、あらゆる生体液、組織、又は器官が挙げられる。生体液の例としては、限定されるものではないが、血液、尿、血清、唾液、脳脊髄液、及び精液が挙げられる。他の実施形態では、触媒的に不活性なPNGase F誘導体を、生体液及び組織中の標的分析物の存在又は量の検出に使用することができる。標的の例としては、外部から摂取される種、例えば、植物多糖、炭水化物系薬物、及び病原体が挙げられ、標的の表面は、多くの場合、異なる複合グリカンでコーティングされる。触媒的に不活性なPNGase F誘導体は、薬物の発見及び新規なグリカン系化合物の生物学的活性の評価にも適用される。

20

【0095】

触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質は、異常なグリコシル化が現れる疾患の診断及び/又は治療に使用することができる。触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質を使用して、糖タンパク質、糖脂質、及び/又は様々な炭水化物エピトープを含む特定の腫瘍抗原を検出するために使用することができる。多数のこれらの腫瘍抗原は、腫瘍性疾患状態では上方制御されることが分かっている。腫瘍性疾患の発症及び進行を示すことができ、かつ触媒的に不活性な炭水化物結合タンパク質を検出することができる腫瘍抗原の例としては、限定されるものではないが、大腸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、及び乳癌、並びに発育中の胎児に関連した糖タンパク質である癌胎児抗原(CEA)；膵臓癌患者に見られる糖脂質中に存在する炭水化物抗原19-9(CA19-9)又はシアル化ルイスA抗原；及び乳癌に関連した炭水化物抗原15-3(CA15-3)が挙げられる。

30

【0096】

抗原の存在は、必ずしも癌細胞への転換を示すものではないが；細胞でのその局在化は、CEAの場合は、癌細胞への転換を示唆する。このため、選択制及び親和性の高い分析ツールが必要である。診断試験は現在、多くの場合、糖タンパク質のペプチド部分又は糖脂質の糖部分に対して産生される抗体に依存するが、正確なエピトープは、最近になってようやく特定されたばかりである。グリカンが特徴付けられる例では、複数の糖型が存在する場合が多い(例えば、CEA)。糖型間を区別することができる試薬がないため、現在は、グリコシル化における僅かな相違が、疾患状態、癌型、又は組織局在化に相関する程度を決定することが不可能である。現在、これらの問題は、糖型の混合物として検査される単離糖タンパク質のMS分析によって主に対処することができる。典型的には、行われる糖型集中(*glycoform-focusing*)のレベルだけが、レクチン(コンカナバリンA、(Con A))アフィニティークロマトグラフィーを用いるグリカン

40

50

を含む高マンノースでの濃縮である。より効率的な実験室分析及びルーチンの臨床診断技術は、糖型特異的試薬が存在しないため大幅に制限されたままである。

【0097】

触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質は、生物学的サンプル中の任意の糖タンパク質について、存在する各糖型の相対存在量の定量に有用性を有し得る。本明細書で使用される「糖型」という語は、特定のグリカンが付着したタンパク質を指す。糖タンパク質は、複数の糖型を有し得る。より具体的には、糖型は、付着したグリカンの数又は型のみが異なるタンパク質のアイソフォームであり；アミノ酸配列は、様々な糖型で同じである。糖タンパク質は、多くの場合、付着した糖又はオリゴ糖が異なる多数の異なる糖型を含む。有利なことに、触媒的に不活性な PNGase F 誘導体を使用して、特定の糖型を含む生物学的サンプルを濃縮することができる。触媒的に不活性な PNGase F 誘導体を同様に使用して、グリカンが付着するタンパク質表面の特定のグリコシル化部位を特定することができる。触媒的に不活性な PNGase F 誘導体を使用して、無傷の糖ペプチドを任意の糖タンパク質のタンパク分解消化により分離することもできる。サンプルの目的の分析物を濃縮することは、糖ペプチド画分のさらなる特徴付けに非常に役立つ。特に、濃縮は、ペプチド配列及びグリカン構造の識別を容易にし、これにより、グリコシル化部位の無傷のタンパク質内での識別、及び各グリコシル化部位に存在する特定のグリカンの特徴付けを可能にすることができる。

10

【0098】

触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質を、生体液、組織、器官、又は生細胞中のタンパク質の特定のグリカン修飾の監視に使用することができる。認識が、タンパク質の同一性に依存するものとは考えられず、触媒的に不活性な PNGase F 誘導体は、所与の N 結合型グリカン及び / 又は O 結合型グリカンを含むあらゆるタンパク質を認識することができ、従って所与のグリカン修飾の検出に非常に有用であると考えられる。

20

【0099】

さらに他の実施形態では、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質は、*in vitro* 又は *in vivo* での染色細胞又は組織に使用することができる。

【0100】

触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質を利用して、混合物中の N 結合型及び / 又は O 結合型グリコシル化を監視することができ、このグリコシル化は、製薬産業又は研究の分野で使用される組換え糖タンパク質の製造中に起こり得る。

30

【0101】

前述の実施形態では、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質は、染料又は色素で標識して、目的の細胞、組織、糖タンパク質、糖ペプチド、オリゴ糖、又は多糖を含む生物学的サンプルに適用することができる。

【0102】

本発明の別の態様は、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質の分析の適用例に使用する方法を提供する。本発明の触媒的に不活性な PNGase F 誘導体は、N 結合型又は O 結合型グリカン特異的分析ツールとして使用することができる。グリカン特異的分析ツールは、環境分野、発酵分野、食品分野、及び医療分野を含む様々な分野で検出方法として使用できる可能性があり、かつヒト又は動物における *in vivo* 又は *in vitro* での検出に使用することができる。例えば、本発明の触媒的に不活性な PNGase F 誘導体を、親和性試薬又は組織染色の媒体として使用することができる。別の例として、触媒的に不活性な PNGase F 誘導体を、生物学的サンプルの N 結合型グリカン及び / 又は O 結合型グリカンの濃縮に使用することができる。さらに別の例として、触媒的に不活性な PNGase F 誘導体を使用して、糖タンパク質上の特定のグリコシル化部位を決定することができる。

40

【0103】

50

特定の実施形態では、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質を、例えば、アフィニティークロマトグラフィーを含む親和性分離の試薬として使用することができる。アフィニティークロマトグラフィーは、高度に特異的な生物学的相互作用、例えば、結合しているタンパク質とグリカンとの間の相互作用に基づいた、生化学的混合物を分離する方法である。本発明は、どの特定の設計又はクロマトグラフィーシステムに限定されるものではない。一般に、触媒的に不活性な PNGase F 誘導体は、固体支持体に共有結合で付着するか又は他の結合で固定され、かつ固定相を構成する。特定の実施形態では、触媒的に不活性な PNGase F 誘導体で誘導体化される固定相を、カラムクロマトグラフィーに使用することができる。これらの実施形態では、固体固定相の粒子が、管（充填カラム）の全内容積を満たすために使用される。別法では、固相粒子は、管（開放管カラム）の中間部分にある生物学的サンプル（即ち、移動相）のための開放された管内壁、即ち非制限経路上で、又はこの非制限経路に沿って濃縮される。他の実施形態では、誘導体化固定相を、バッチクロマトグラフィーに使用することができる。これらの実施形態では、固定相を導管に導入して、生物学的サンプルと混合することができる。前述の例は、概ねアフィニティークロマトグラフィーに着目しているが、これらの原理は、他の親和性精製プロトコルに容易に利用されることを理解されたい。

10

【0104】

治療方法

特定の実施形態では、本発明の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質を、治療薬として使用しても良いし、又は活性治療薬の送達のために修飾しても良い。本発明の触媒的に不活性な PNGase F 誘導体は、定義されたグリカン特異性を有しているため、治療薬の送達は、生体分子、例えば、PNGase F によって認識されるグリカン構造を有する糖タンパク質又は糖脂質を提示する細胞、組織、又は器官のみを標的とすることができる。

20

【0105】

従って、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質を、多数の適用例の治療、例えば、標的薬物送達で使用する可能性がある。N結合型グリカン及びO結合型グリカンのレベル及び位置の変化は、癌を含む多数の疾患に関連することが示された。本発明の触媒的に不活性な PNGase F 誘導体は、野生型 PNGase F と比較して、これらのグリカンの一方又は両方に対して高い親和性を有する。従って、本発明は、癌研究の分野で直接的な適用を有することが期待され、特定の型の癌の検出用の製品の開発につながる可能性がある。本発明はまた、糖鎖生物学に使用される試薬としての実用性も期待され、本発明を使用してN結合型グリカン及び/又はO結合型グリカン、例えば、O結合型 GlcNAc 及び/又はO結合型 GalNAc を含むサンプルを濃縮し、これらの重要な炭水化物の検出及び分析を可能にする。触媒的に不活性な PNGase F 誘導体を、治療薬の標的送達用の媒体として使用することができる。

30

【0106】

触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F 突然変異体又はそのコンジュゲートを、感染、疾患、又は障害を治療又は予防するために対象に投与することができる。感染は、例えば、ウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染、又は真菌感染であり得る。疾患又は障害は、外因性の病原体から生じることもあるし、又は自家性又は自己免疫性の場合もある。

40

【0107】

一実施形態では、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F 突然変異体は、治療効果又は予防効果を達成するために対象の体内に存在するN結合型グリカン、O結合型グリカン、又は両方に結合するように対象に投与される。N結合型グリカン又はO結合型グリカンは、対象によって産生される内因性生体分子であることもあるし、又は病原体によって産生される外因性生体分子であることもある。一実施形態では、PNGase F 突然変異体は、内因性生体分子、例えば、対象の癌、前癌状態、又は免疫異常に関連した生体分子に結合する。別の実施形態では、PNGase F 突然変異体は、病原体の宿主細

50

胞への結合を防止し；別の実施形態では、PNGase F 突然変異体は、病原体の宿主細胞への取り込みを防止する。

【0108】

別の実施形態では、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F 突然変異体のコンジュゲートが対象に投与され、このコンジュゲートは、上で例示された治療薬を含む。この治療薬は、抗生物質、例えば、微生物病原体を標的とする薬剤であり得る。治療薬は、自己疾患又は自己免疫疾患を標的とする薬剤、例えば、抗癌剤、例えば、細胞毒、又は免疫活性剤であり得る。部位特異的送達に使用できる治療薬の例としては、限定されるものではないが、様々な化学療法薬、抗生物質、及び抗ウイルス薬、毒素、ラジオアイソトープ、サイトカインなどが挙げられる。

10

【0109】

治療的使用のための触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F 突然変異体又はそのコンジュゲートを、適切な動物モデル系、例えば、ラット、マウス、サル、又はウサギで毒性について試験することができる。ウイルス感染を治療又は予防する際の PNGase F 突然変異体又はそのコンジュゲートの有用性を、ウイルスの複製を抑制する、ウイルス伝播を抑制する、又はウイルス感染に関連した症状を治療若しくは予防する能力を調べることによって評価することができる。同様に、細菌感染を治療又は予防する際の PNGase F 突然変異体又はそのコンジュゲートの有用性を、細菌の複製を抑制する、又は細菌感染に関連した症状を治療若しくは予防する能力を調べることによって評価することができる。癌治療における有用性は、PNGase F 突然変異体又はそのコンジュゲートの、癌細胞の増殖又は転位を抑制する能力、血管形成を抑制する能力、又は細胞死を引き起こす能力を評価することによって判断することができる。

20

【0110】

作製方法

本発明の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質は、遺伝子エンジニアリング技術を用いて宿主細胞で発現させることができる。「細胞」という語は、あらゆる型の生物細胞を包含する。宿主細胞は、真核細胞又は原核細胞であり得る。好ましくは、宿主細胞は、原核細胞、例えば、細菌細胞であるが：単細胞真核生物、例えば、原生生物又は酵母も、宿主細胞として有用である。好ましい宿主細胞は、微生物細胞、好ましくは、単細胞微生物の細胞、例えば、細菌細胞又は酵母細胞である。細菌及び/又は微生物細胞の上記の選択にもかかわらず、PNGase 突然変異体を、動物、植物、昆虫、酵母、原生生物、細菌、又は古細菌の細胞に限定されずに発現させることができることを理解されたい。本発明の触媒的に不活性な PNGase F 誘導体を発現するようにエンジニアリングすることができる微生物細胞の例としては、大腸菌 (*E. coli*) に加えて、広範な細菌及び酵母が挙げられ、このような細菌及び酵母には、エシェリキア属 (*Escherichia*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、クロストリジウム属 (*Clostridium*)、ザイモナス属 (*Zymomonas*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、バシラス属 (*Bacillus*)、ロドコッカス属 (*Rhodococcus*)、アルカリゲネス属 (*Alcaligenes*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、パエニバシラス属 (*Paenibacillus*)、ラクトバシラス属 (*Lactobacillus*)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus*)、アルスロバクター属 (*Arthrobacter*)、ブレビバクテリウム属 (*Brevibacterium*)、コリネバクテリウム・カンジダ属 (*Corynebacterium Candida*)、ハンゼヌラ属 (*Hansenula*)、ピチア属 (*Pichia*)、及びサッカロミセス属 (*Saccharomyces*) のメンバーが挙げられる。好ましい微生物細胞としては、限定されるものではないが、大腸菌 (*Escherichia coli*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、バシラス・リシェニフォルミス (*Bacillus licheniformis*)、アルカリゲネス・ユートロフス (*Alcaligenes eutrophus*)、ロドコッカス・エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*)、パエニバチ

30

40

50

ルス・マセランス (*Paenibacillus macerans*)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、サッカロミセス・セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、ラクトバシラス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、エンテロコッカス・ガリナラム (*Enterococcus gallinarum*)、及びエンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) 挙げられる。

【0111】

本発明の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質を発現するように遺伝子エンジニアリングされた細胞は、「宿主」細胞、「組換え」細胞、「遺伝子エンジニアリングされた」細胞、又は単純に「エンジニアリングされた」細胞と呼ばれることもある。これらの語及び同様の語は、互換的に使用される。遺伝子エンジニアリングされた細胞は、天然では一緒に見られない遺伝物質を1つにする標準的な分子クローニング技術によって作製された1つ以上の人工のヌクレオチド配列を含む。組換えDNA分子の構築に使用されるDNA配列は、任意の種を起源とし得る。例えば、植物DNAを細菌DNAにつないでも良いし、又はヒトDNAを真菌DNAにつないでも良い。別法では、天然ではどこにも存在しないDNA配列を、DNAの化学合成によって、又はDNAの定方向突然変異によって作製し、組換え分子に組み入れることができる。組換えDNAの発現から得られるタンパク質は、多くの場合、組換えタンパク質と呼ばれる。組換えの例は、以下により詳細に説明され、かつ(細胞の別の種から得られた)外来ポリヌクレオチドを細胞に挿入すること、合成ポリヌクレオチドを細胞に挿入すること、又はポリヌクレオチドを細胞内で転位又は再配置することを含み得る。どの形態の組換えも、遺伝子エンジニアリングと見なすことができ、従ってどの組み換え細胞も、遺伝子エンジニアリングされた細胞と見なすことができる。

10

20

【0112】

当業者には理解されるように、タンパク質、例えば、本発明の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質の発現は、多数の分子生物学技術によって達成することができる。例えば、発現は、所望のタンパク質をコードするポリヌクレオチドの1つ以上のコピーを宿主細胞に導入することによって達成することができる。所望のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、宿主細胞に対して内因性又は異種であり得る。好ましくは、このポリヌクレオチドは、ベクターを用いて細胞に導入されるが、裸DNAを使用することもできる。このポリヌクレオチドは、環状又は線状、一本鎖又は二本鎖であり得、かつDNA、RNA、又はこれらの任意の変更形態又は組み合わせであり得る。ベクターは、遺伝物質を細胞に導入する媒体として使用できるあらゆる分子とすることができる。ベクターの例としては、限定されるものではないが、プラスミド、ウイルスベクター、コスミド、及び人工染色体が挙げられる。ヌクレオチド配列を微生物に導入するために使用される分子生物学技術の例としては、限定されるものではないが、トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、及び形質転換が挙げられる。これらの方法は、当分野で周知である。ベクターの標的細胞への挿入は、通常は、細菌細胞では形質転換と呼ばれ、真核細胞ではトランスフェクションと呼ばれるが、ウイルスベクターの挿入は、多くの場合、形質導入と呼ばれる。本発明における形質転換、トランスフェクション、及び形質導入という語は、本明細書では互換的に使用される。ベクターを使用して細胞に導入されたポリヌクレオチドは、多くの場合、導入遺伝子と呼ばれる。

30

40

【0113】

好ましくは、ベクターは、発現ベクターである。「発現ベクター」又は「発現構築物」は、特定のポリヌクレオチドを標的細胞に導入するために使用されるあらゆるベクターであり、発現ベクターが細胞内に導入されると、このポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質は、細胞転写及び翻訳機構によって産生される。典型的には、発現ベクターは、所望のタンパク質をコードするポリヌクレオチドに機能的に連結された調節配列を含む。調節配列は、当業者には一般的な知識であり、例えば、複製起点、プロモーター配列

50

、及び/又はエンハンサー配列を含み得る。所望のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、染色体外に存在しても良いし、又は宿主細胞の染色体DNAに組み込まれても良い。

【0114】

染色体外DNAは、細胞小器官、例えば、(殆どの真核細胞では)ミトコンドリア、並びに(植物では)葉緑体及び色素体に含まれ得る。より典型的には、染色体外DNAは、宿主細胞に導入されたベクター内に維持される。多くの場合、タンパク質の発現を最大化するために高いコピー数のベクターを選択することが有利であろう。任意選択的に、ベクターは、選択マーカーをさらに含み得る。特定の選択マーカーを使用して、ベクターが標的細胞内に存在するかを確認することができる。他の選択マーカーを使用して、ベクター及び/又は導入遺伝子が宿主細胞の染色体DNAに組み込まれたかをさらに確認することができる。選択マーカーの使用は、当分野では一般的であり、技術者であれば、選択マーカーの様々な使用を理解し、認識するであろう。任意選択的に、ベクターは、レポーター遺伝子をさらに含み得る。レポーター遺伝子は、ベクターが標的細胞内で発現していることを確認するために使用することができ、かつベクターからの発現を監視するためにも使用することができる。レポーター遺伝子の使用は、当分野では一般的であり、技術者であれば、レポーター遺伝子の様々な使用を理解し、認識するであろう。

10

【0115】

本発明の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質は、本明細書に記載のあらゆる遺伝子エンジニアリングされた細胞から単離し、任意選択的に精製することができる。この触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質は、例えば、好気性又は嫌気性発酵プロセス中に、細胞又は培養培地から直接単離することができる。単離及び/又は精製は、既知の方法を用いて達成することができる。

20

【0116】

また、前記請求項のいずれか1項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase F突然変異体、コンジュゲート、融合タンパク質、又はアフィニティマトリックス、及び使用説明書を含むキットも本発明によって提供される。

【0117】

本発明の以上の説明は、本発明の全ての開示される実施形態又は全ての実施を説明するものではない。以下の実施例は、例示的な実施形態をより具体的に例示する。本出願におけるいくつかの箇所では、ガイダンスが、実施例のリストによって示され、この実施例は、様々な組み合わせで使用することができる。いずれの場合も、記載されるリストは、代表的な群として役割を果たすだけであり、限定的なリストと解釈するべきではない。

30

【0118】

「及び/又は」という語は、列記された要素の1つ若しくは全て、又は列記された要素の2つ以上の組み合わせを意味する。

【0119】

「好ましい」及び「好ましくは」という語は、特定の状況下で、特定の利益を提供し得る本発明の実施形態について述べる。しかしながら、同じ又は他の状況下で、他の実施形態も好ましいであろう。さらに、1つ以上の好ましい実施形態の記述は、他の実施形態が有用ではないことを示唆するものではなく、他の実施形態を本発明の範囲から排除するものではない。

40

【0120】

「含む」という語及びその変形は、これらの語が本説明及び特許請求の範囲で使用される場合は限定の意味を有するものではない。

【0121】

特段の記載がない限り、「1つの(a)」、「1つの(an)」、「その(the)」、及び「少なくとも1つの(at least one)」は、互換的に使用され、かつ1つ又は2つ以上を意味する。

【0122】

50

また、本明細書では、終点による数値範囲の記述は、その範囲内に含まれる全ての数を含む（例えば、1～5は、1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5などを含む）。

【0123】

個別のステップを含む本明細書に開示されるいずれの方法でも、ステップは、任意の実施可能な順序で行うことができる。そして、適宜、2つ以上のステップの任意の組合せを同時に行うことができる。

【0124】

特段の記載がない限り、本明細書及び特許請求の範囲で使用される成分及び分子量などの量を表す全ての数字は、「約」という語によってどんな場合にも変更されるものであることを理解されたい。従って、反対の記載がなければ、本明細書及び特許請求の範囲に記載される数値パラメーターは、本発明によって獲得することが望まれる所望の性質によって異なり得る近似値である。少なくとも、均等論を特許請求の範囲に限定しようとするものではなく、各数値パラメーターは、少なくとも、記載の有効桁数を考慮して、そして通常の丸めの手法を適用することによって解釈されるべきである。

10

【0125】

本発明の広い範囲を示す数値範囲及びパラメーターは近似値であるが、特定の実施例に記載される数値は、可能な限り正確に報告される。しかしながら、全ての数値は、それぞれの試験測定で見られる標準偏差から必然的に生じる範囲を本質的に含む。

【0126】

全ての見出しは、読者に分かりやすくするためのものであり、特段の記載がない限り、見出しに続く文章の意味を限定するために使用されるものではない。

20

【0127】

本発明は、以下の実施例によって例示される。特定の実施例、材料、量、及び手順は、本明細書に記載の本発明の範囲及び精神に従って広く解釈されるものであることを理解されたい。

【実施例】

【0128】

実施例1

コンピューターガイド定方向進化によってエンジニアリングされた炭水化物認識バイオセンサー

30

この実施例では、全てのN結合型グリカンに共通のコア糖ペプチド成分を検出するための新規な試薬が開発された。コンピューターガイドバイオコンビナトリアル設計及び*in vitro*定方向進化の組み合わせによって、N-グリカンプロセシング酵素、フラボバクテリウム・メニングセプチカム (*Flavobacterium meningosepticum*)からのPNGase Fが、野生型酵素の基質に対する親和性が高い触媒的に不活性なタンパク質に変換された。レクチン様炭水化物認識生体分子の炭水化物プロセシング酵素 (LECTENZ)からのエンジニアリングが、分子動力学シミュレーションを用いて最適な炭水化物-酵素相互作用を決定するためにコンピューター内で開始された。コンピューター内での構造/機能分析を、LECTENZ候補の*in vitro*定方向進化、選択、及び下流特徴付け (*downstream characterization*)のための集中的なバイオコンビナトリアルライブラリーを作製することによって検証した。表面プラズモン共鳴を利用して結合反応速度を決定した。さらに、N-グリカン保持糖タンパク質、リボヌクレアーゼB、及びN-糖ペプチドの濃縮をアフィニティークロマトグラフィーによって実証した。MCF7細胞抽出物からのN-糖タンパク質の濃縮を実証した。

40

【0129】

炭水化物認識は、通常の生物学的プロセスの不可欠な部分である。炭水化物認識は、宿主-病原体相互作用、生物学的発達に重要であり、疾患状態バイオマーカー検出にとって益々重要になっている。炭水化物認識の重要性及び宿主グリコシル化の多様性により、グ

50

リカン、検出、診断、及び治療への応用のための明確な標的である。グリカンは、重要な疾患バイオマーカーとして機能するだけでなく、治療用生物製剤の薬理学的特性にも影響を与える。例えば、グリカンの不均質性は、ロット間の一貫性、免疫原性、薬物動態、活性、及び組換え糖タンパク質の生物学的クリアランスに影響を与え得る。3分の2を超える治療用生物製剤がグリコシル化組換えタンパク質であるとする、バイオプロセス監視中のグリコシル化分析の新たなツールが必要である。

【0130】

全てのN結合型グリカんに共通のコアキトビオース成分を検出するための新規な試薬の開発が本明細書で報告される。コンピューターガイドバイオコンビナトリアルライブラリー設計及び *in vitro* 定方向進化の組み合わせによって、N-グリカンプロセッシング酵素、フラボバクテリウム・メニンゴセプトリウム (*Flavobacterium meningosepticum*) からの PNGase F が、野生型酵素の基質に対する親和性が高い触媒的に不活性なタンパク質にエンジニアリングされた。炭水化物プロセッシング酵素 (Lectenz (登録商標)) からのレクチン様炭水化物認識生体分子のエンジニアリングが、分子動力学シミュレーションを用いて最適な炭水化物-酵素相互作用を決定するためにコンピューター内で開始された。コンピューター内での構造/機能分析が、Lectenz (登録商標) 候補の酵母表示選択による *in vitro* 定方向進化のための集中的なバイオコンビナトリアルライブラリーの設計を導いた。選択されたクローン R911 は、非親和性強化対照クローン (D60A) に対して10倍の親和性強化 ($K_D = 0.26 \mu M$) を有することが観察された。加えて、N-グリカン保持糖タンパク質、リボヌクレアーゼB、及びN-糖ペプチドの濃縮を Lectenz (登録商標) アフィニティークロマトグラフィーによって実証した。さらに、ヒト乳癌細胞株、MCF7の細胞抽出物からの糖タンパク質の濃縮の成功により、複合混合物からの糖タンパク質の濃縮用の捕捉試薬としての R911 Lectenz (登録商標) の有用性を実証した。R911の分子モデリングが、親和性及び特異性に重要な突然変異についての洞察を提供し、従って実験的観察が合理化される。

【0131】

R911 Lectenz (登録商標) 試薬の調製の成功は、糖ペプチド及び糖タンパク質サンプルの濃縮の課題に対するユニークな解決策を示すだけでなく、グリカン及び複合糖質の生物学的関連性のためのグリカン標的試薬のエンジニアリングの新たな戦略も実証する。

【0132】

重要性

炭水化物認識は、生物学的プロセスの重要な部分である。炭水化物認識は、宿主-病原体相互作用、生物学的発達に不可欠であり、疾患状態バイオマーカー検出にとって益々重要になっている^{8,2}。多くの腫瘍抗原は、糖タンパク質又は糖脂質であり、疾患状態で上方制御される様々な炭水化物エピトープが同定された^{8,3}。現在承認されている炭水化物腫瘍マーカーとして^{8,4}、以下が挙げられる：癌胎児性抗原 (CEA)、大腸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、及び乳癌、並びに発育中の胎児に関連した、50~80%の炭水化物を含む糖タンパク質^{8,5}；膵臓癌患者に見られる糖脂質中に存在する炭水化物抗原 19-9 (CA19-9) 又はシアル化ルイスA抗原；及び炭水化物抗原 15-3 (CA15-3)、乳癌に最も広く使用される血清マーカーであり、ムチンタンパク質 1 (MUC1) に由来の糖タンパク質断片である^{8,6}。炭水化物認識の重要性及び宿主グリコシル化の多様性により、グリカンは、検出、診断、及び治療への応用のための明確な標的である^{8,7-9}。

【0133】

細胞表面上の多数のグリカンの位置により、これらのグリカンは、細胞間相互作用に重要であり、かつ正常な代謝プロセスの制御に参与する。グリカンの構造及び存在量は、細胞内プロセスの状態によって変動し得る動的性質であり、生物学的プロセスが正常状態と疾患状態との間で変動するため不均質となる。さらに、DNA及びタンパク質合成とは異

10

20

30

40

50

なり、グリカン合成は、多数の酵素によって動的に管理される非鋳型駆動酵素プロセスである。グリカン合成における複雑さが、生物学的プロセスにおけるグリカンの複雑な役割の要因であり得るが；グリコシル化機構及び活性における変動が、グリコシル化タンパク質の存在量にかかわらず、グリコシル化タンパク質に対して系統的な影響をもたらし得る。

【0134】

グリカンはまた、組換え治療用生物製剤の薬理学的特性に影響を与える。グリカンの不均質性は、ロット間の一貫性、免疫原性、薬物動態、活性、及びクリアランスに影響を与え得る^{9 3}。タンパク質及び核酸の場合とは異なり、グリカンの配列決定及び構造の特徴付けは、骨の折れる多段階プロセスであり、典型的には、サンプルの濃縮、酵素消化、及び質量分光分析、リアルタイム監視ができないプロセスを必要とする。3分の2を超える治療用生物製剤がグリコシル化組換えタンパク質であるとすると、バイオプロセス監視中のグリコシル化分析の新たなツールも必要である^{9 4}。

10

【0135】

グリカンの重要性にもかかわらず、グリカン及び複合糖質の発見及びルーチンの実験室分析は、入手可能な単離及び分析技術によって限定され^{8 2}、これは、グリカン構造の広範な多様性を考えると想定外ではない^{9 5}。従って、生物学的サンプルを調べて癌の異常なグリコシル化状態を確認するために使用することができる炭水化物特異性が明確なグリカンバイオセンサー、及びグリコシル化治療用生物製剤の製造が緊急に必要である^{8 1}。

20

【0136】

グリカンの生合成及び多様性

グリカンの新生タンパク質への共有結合は、非鋳型駆動プロセスであり、かつ約1,000の遺伝子産物を必要とし、従って、オリゴ糖の生合成には、細胞資源の莫大な投資が必要であり、グリコシル化に必要な細胞機構の欠陥は致命的であり得る^{9 1}、^{9 6} ~ ^{9 9}。哺乳動物タンパク質のグリコシル化の主な型は、N結合型及びO結合型グリコシル化である。

【0137】

N-グリカン構造の生合成は、小胞体膜で起こり、酵素の新生タンパク質へのひとまとまりの共翻訳的な付着の前に、ヒトでは20を超える酵素が必要である^{1 0 0} ~ ^{1 0 4}。合成は、ドリキルピロリン酸(dolichyl pyrophosphate)担体で開始され、個々の単糖は、14糖N-グリカン構造が完了するまで連続的に付着する^{1 0 2} ~ ^{1 0 4}。それぞれの異なるグリコシド結合は、特有の酵素を必要とする。タンパク質複合体、オリゴサッカリルトランスフェラーゼは、Asn残基の側鎖へのN-グリコシド結合による新生ペプチド鎖のAsn-X-Ser/Thr sequone (XはPro以外の任意のアミノ酸であり得る)への14糖N-グリカン構造のひとまとまりの付着に参与する^{1 0 1}、^{1 0 3}。小胞体シャペロンは、高マンノース含有未成熟糖タンパク質のゴルジへの移送の前の、N-グリカン構造との直接的な相互作用による新生ポリペプチドの適切な折り畳みを制御する。

30

【0138】

糖タンパク質として付着したN-グリカン構造のさらなる修飾及び末端合成に別の酵素が関与する、ハイブリッド及び複合グリコシル化タンパク質ゴルジ複合体の生合成は、シスゴルジ、メディアルゴルジ、及びトランスゴルジプロセスを経る。様々な糖型のグリコシル化タンパク質がこのように産生される。グリカン構造の非鋳型駆動酵素生合成は、広範なグリカン多様性をもたらす。

40

【0139】

(14糖構造由来の)コア5糖N-グリカン構造が、保存され、かつ高等真核生物で次第に末端が修飾されるようになり、これにより非常に多様なN-グリコシル化が生じている(図1)。酵母は、高マンノース型のN-グリコシル化を示す^{1 0 5}。植物は、高マンノース型のN-グリコシル化及びより複雑な型のN-グリコシル化の両方を示す^{1 0 6}。動物は、末端修飾の最大の多様性によって反映される最も複雑なN-グリカン構造に進化

50

させた⁹⁹。

【0140】

O結合型グリコシル化は、セリン及びトレオニン残基のヒドロキシル基へのコア糖（複数可）の共有結合によって定義される¹⁰⁷、¹⁰⁸。O-グリカンの2つの主なクラスは、ムチン及びプロテオグリカンからなる。切り取られて末端が修飾された大きいコアN-グリカン構造からなるN-グリコシル化とは異なり、ムチン型O-グリカンは、広範なO-グリカン多様性をもたらす小さい8コア構造からなる。これらのコア構造は、N-グリカンに見られる末端修飾に類似し、かつゴルジ複合体内のタンパク質のみに酵素的に付着している。

【0141】

ムチンは、コアO-グリカン構造の付着部位として機能するSer/Thr反復配列を有する長いポリペプチドからなる。ジスルフィド結合オリゴマーの形成により、1MDaよりも大きいムチンが形成され得る。ムチンとは異なり、プロテオグリカンは、ポリペプチド主鎖に付着した長い反復オリゴ糖鎖（100の単糖残基を超える）からなる。オリゴマーは、多くの場合、反復アミノ由来二糖ヘキソースからなり、この二糖ヘキソースは、主にグリコサミノグリカン（GAG）として知られている。反復二糖単位に従って分類されるGAGの3つの型は：（1）デルマタン硫酸/コンドロイチン硫酸、（2）ヘパリン硫酸/ヘパリン、及び（3）ケラチン硫酸である。プロテオグリカンは、細胞外マトリックス及び結合組織の主成分である。ムチン及びプロテオグリカンに加えて、O-グリカンの他の型として、 α -結合O-フコース、 α -結合O-キシロース、 α -結合O-マンノース、 α -結合O-GlcNAc、若しくは β -結合O-ガラクトース、若しくは β -結合O-GalNAc、及び若しくは β -結合O-グルコースグリカンが挙げられる¹⁰⁸。

【0142】

N及びO-グリカンの酵素生合成の非鋳型駆動プロセスは、グリコシル化による翻訳後修飾によってタンパク質の構造及び機能に広範な多様性を付与する。O及びN結合型グリカンの化学的及び構造的な多様性の例が、図2に示される⁹⁶。グリカン合成における多様性により、各タンパク質の変異糖型の形態にさらなる複雑さを付与する。タンパク質が、複数のグリコシル化部位を高頻度に有し、かつ各部位が様々な糖型を有し得ることを考えると、グリカン生合成の複雑さ及び糖タンパク質及びその糖型の下流の役割を解明することは、大きな課題である。

【0143】

グリカン認識

グリカンは、レクチン、抗体、及び酵素を含むタンパク質のいくつかのクラスによって認識される。レクチン、グリカン結合タンパク質（その多くが、機能のために金属イオンを必要とする）は、多価相互作用が親和性を高めるため、ミリモルからマイクロモルの親和性及び高い結合活性効果を高頻度で有する⁸⁰、¹⁰⁹。一部のレクチンは、異なる構造間で区別することができるが、殆どのレクチンは、類似の炭水化物構造に対して非常に広範な特異性を示す¹¹⁰~¹¹²。従来、レクチンは、植物起源又は真菌起源から同定されているが、動物で同定される数も増加している。レクチンアフィニティークロマトグラフィーは、最も広く適用されるグリカン、糖ペプチド、又は糖タンパク質単離技術である。しかしながら、全グリコプロテオーム（whole glycoproteome）の研究では、このアプローチの制限は、グリカンの検出を、レクチンカラム（複数可）の選択に基づいて糖タンパク質のサブセットに偏らせることである⁸⁰。

【0144】

グリカンは、分岐することができ、かつ連結構造間の相違を示すことができるため、グリカンの認識が、グリカンの組成及び3D構造の両方によって強く影響されることに留意することが重要である¹¹³。加えて、単糖の構造類似性を考慮すると、生物学的に無関係のグリカンでは、同じレクチン又は抗体と濃度依存性に交差反応するのが一般的である。従って、十分なグリカン又はタンパク質が存在すると、弱いながらも特異的な相互作用を

10

20

30

40

50

検出することができ、間違っ て解釈される可能性がある^{8 2、1 1 4、1 1 5}。例えば、コムギ胚芽凝集素及びセイヨウイラクサ (*Urtica dioica*) 凝集素 (UDA) は、これらの単糖が、共通 3 D 結合モチーフを提示するように配向され得るという事実から、同じ結合部位の末端 N - アセチルグルコサミン (GlcNAc) 及びノイラミン酸 (Neu5Ac) の両方を認識することが分かっている^{1 1 6、1 1 7}。加えて、UDA は、真菌細胞の表面に関連したキトトリオース (GlcNAc 1 - 4 GlcNAc 1 - 4 GlcNAc)、及び N 結合型グリカンに共通のマンノース (Man) 含有三糖 Man 1 - 4 GlcNAc 1 - 4 GlcNAc の両方を認識する^{1 1 8、1 1 9}。このような交差反応性は、分離できないため、グリカン組成を特徴付けるための試薬の調製又は適用に重大な課題を提示する。従って、サンプルの濃縮又は単離に使用される試薬の選択は、グリコミック分析 (glycomics analysis) の結果をレクチン又は抗体の結合特性に基づいて複合糖質のサブセットに偏らせ得る^{8 0}。

10

【0145】

抗体は、レクチンよりも高い親和性及び特異性でグリカン構造を認識するが：抗体は、炭水化物が一般に弱い免疫原であることを考えると、作製が困難である。従って、抗炭水化物抗体の限られた選択肢しか利用可能でなく、抗炭水化物抗体の多くは、類似のグリカン構造に対して交差反応性を示す^{8 2、1 1 4}。

【0146】

レクチン又は抗体とは対照的に、グリカンプロセシング酵素は、多くの場合、基質構造に関して極めて選択的であり、グリカンプロセシングにおけるその必須の役割を反映している。グリコシルヒドロラーゼは、一般に、グリコシド結合を含む単糖残基の両方を認識し、多くの場合、この結合の位置及び構造に特異的である。例えば、様々な供給源からの酵素 Endo - N - アセチルグルコサミニダーゼ H (Endo H) 及びキチナーゼは、グリコヒドロラーゼのファミリー 1 8 の全てのメンバーであり、かつ類似の三次構造を有する。これらの類似性にもかかわらず、Endo H は、N - グリカンコア配列は Man 1 - 4 GlcNAc 1 - 4 GlcNAc 配列に存在する場合は、GlcNAc 1 - 4 GlcNAc 結合に対してのみ活性であり；キチン中の同じ結合を加水分解しない^{1 2 0}。この特異性は、レクチン UDA に見られる特異性とは対照的である。加えて、多くの炭水化物プロセシング酵素は、非触媒炭水化物結合分子を有し、この分子は、酵素 - 基質相互作用の特異性を高める働きをする^{1 2 1}。部位特異的突然変異は、多くの場合、不活性突然変異体を作製するために利用され、基質特異性の特徴付けを容易にする^{1 2 0}。

20

30

【0147】

従って、基質を検出するために試薬として炭水化物プロセシング酵素の不活性な突然変異体を利用する興味深い機会が存在する。このようなレクチン様酵素由来 (Lectenz (登録商標)) 試薬は、原則として、野生型酵素の固有の特異性を維持するという利点を有するであろう。実際、酵素の単一点突然変異が、アフィニティーカラムに使用して特定のグリカン (ポリシアル酸) 又はペプチド (アンヒドロトリプシン) を捕捉できる試薬をもたらし得る例が存在する^{1 2 2、1 2 3}。しかしながら、酵素は、代謝回転のために進化されてきたため、単純な不活性点突然変異体は、一般に、実用的な試薬として十分に高い親和性は有していない。

40

【0148】

PNGase F

ペプチド：N - グリカナーゼ (PNGase) 酵素 (表 2) は、ポリペプチドのアスパラギン側鎖と N - グリカンの近接 N - アセチル - D - グリコサミン (GlcNAc) との間のアミド結合の切断を触媒する N - グリカン放出酵素のクラスである。加水分解反応により、グリカン及び遊離アンモニアが放出され、アスパラギンがアスパラギン酸に変換される (図 3)。

【0149】

【表 2】

ペプチド:*N*-グリカナーゼの命名

系統名	<i>N</i> 結合型-糖ペプチド-(<i>N</i> -アセチル-β-D-グリコサミニル)-L-アスパラギン アミノヒドロラーゼ
推奨名	ペプチド- <i>N</i> ⁴ -(<i>N</i> -アセチル-β-D-グリコサミニル)アスパラギンアミダーゼ
同義語	PNGaseF, <i>N</i> -オリゴ糖グリコペプチダーゼ, グリコペプチダーゼ, グリコ アミダーゼ, <i>N</i> -グリカナーゼ
酵素番号	EC 3.5.1.52

10

【0150】

PNGase F の発見

N-グリカンプロセシング酵素、ペプチド-*N*⁴-(*N*-アセチル-β-D-グルコサミニル)アスパラギンアミダーゼ (PNGase F) は、1984年にPlummerらによってグラム陰性土壌細菌フラボバクテリウム・メニンゴセプチカム (*Flavobacterium meningosepticum*) (以前は、クリセオバクテリウム・メニンゴセプチカム (*Chryseobacterium meningosepticum*) 及びエリザベスキングア・メニンゴセプチカム (*Elizabethkingia meningosepticum*) として知られていた) から同定された^{1 2 4}。PNGase 酵素は、植物、動物、及び真菌の全ての様々な種から同定されたが; PNGase F は、その最初の発見から30年経過しても確認された唯一の細菌PNGase 酵素であるため、これらの他のPNGase 酵素とは対照的である。近年、*N*-グリカナーゼ活性が変更された新規なPNGase F - II が、同じ生物、*F*.メニンゴセプチカム (*F. meningosepticum*) から同定された。

20

【0151】

PNGase F の初期の研究により、この酵素が全ての*N*-グリカンの放出を触媒し得ることが示された^{1 2 4}。しかしながら、これは、*F*.メニンゴセプチカム (*F. meningosepticum*) からのPNGase F とEndo-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼF (Endo F) との混合物を含む酵素製剤によるものであった^{1 2 5}。Endo F は、キトビオース部分のグリコシド結合を切断する一方、PNGase F は、グリコシルアミニル (glycosylaminy l) 接合部でアミド結合を切断する^{1 2 6}。これらの結果により、PNGase F が実際にペプチド:*N*-グリコシダーゼであり、エンドグリコシダーゼではないことが確認され、PNGase F が再分類されることになった。チャイニーズハムスター卵巣細胞からのフェチュイン糖ペプチド及びエリスロポエチンを用いた追加の実験により、酵素の活性が、洗剤で前処理された変性糖タンパク質で大幅に改善されることが示され、脱グリコシル化には著しく少ない酵素で済む^{1 2 5}。しかしながら、緩衝液の組成を含む最適な反応条件は、ある洗剤及び金属イオンの存在下でのPNGase F 活性の低下を実証した最近の研究まで確立されなかった。これらの研究はまた、pH 8.0での最適な酵素活性を確認し、塩化ナトリウムを含まないトリス緩衝液を使用するために緩衝液組成が最適化された^{1 2 6}、^{1 2 7}。

30

40

【0152】

1989年の大腸菌 (*E. coli*) でのPNGase F のクローニング及び異種発現により、継続的な研究のための高純度の調製物が得られ、この調製物が、全*N*-糖タンパク質の脱グリコシル化のために急速に普及することになった^{1 2 8}。しかしながら、Tretterらは、1991年に、PNGase A とは対照的に、アスパラギン (asparagine) 結合GlcNAcのコア 1, 3フコシル化が、PNGase F に対する糖ペプチド又は糖タンパク質の耐性を付与したことを実証した^{1 2 9}。1994年の初めに、PNGase F の2つの3次元X線結晶構造 (PDB IDs 1PNG & 1

50

P G S) が (リガンドなしで) 得られ、活性部位を特定することへの関心が高まり、¹、³ フコシル化が耐性を付与する理由が、アスパラギン結合 G l c N A c の C 3 位が結合溝の疎水性溝に埋もれることによる可能性が高いという仮説を立てた^{1 3 0 ~ 1 3 2}。この仮説は、X 線結晶学的データが共結晶化 P N G a s e F : キトビオース複合体で得られたときに確認された。

【 0 1 5 3 】

P N G a s e F の X 線結晶構造

キトビオースリガンド、N , N' - ジアセチルキトビオース、(P B D I D 1 P N F) と共結晶化された P N G a s e F の第 1 の構造が、1995 年に K u h n らによって^{2 . 0} の解像度で公表された^{1 3 3}。結晶化 P N G a s e F 酵素の注釈付き配列が図 4 に示されている。非複合体化構造 (P D B I D s 1 P N G & 1 P G S) に一致して、複合体化 P N G a s e F のコンフォメーション: キトビオース構造に著しい変化が見られず、このコンフォメーションがキトビオースリガンドの結合による影響を受けていないことを示している。折り畳まれたタンパク質は、2 つのドメインからなり、これらのドメインはそれぞれ、残基 1 ~ 1 3 7 及び 1 4 3 ~ 3 1 4 から構成される。両方のドメインは、境界面が広範な水素結合接触部を有するシート¹の全長に延びるように、互いに近接して位置する 8 本鎖逆平行 サンドイッチを有する。非複合体化構造の 3 つの溝に基づいて、3 つの結合部位が可能であると仮定した^{1 3 2}。分子の一面にあるボウル上の第 1 の溝が、L - アスパラギナーゼの活性部位に類似した残基を含んでいた^{1 3 2}。多数の酸性残基及びトレオニン残基を含む反対面にある浅い S 字状の溝が、第 2 の可能な結合部位として仮定された^{1 3 2}。分子の一端における 2 つのドメイン間の境界の深い溝が、第 3 の結合部位として仮定された。いくつかの酸性残基及びセリンを含むこの溝は、5 つのトリプトファン残基を有するというユニークな特性を有していた^{1 3 2}。

【 0 1 5 4 】

1 P N F 構造モデルは、2 つのドメインの境界面の深い溝をキトビオースリガンドの結合溝であると裏付ける。結合溝における - キトビオースリガンドの向きは、深い疎水性ポケットに延びた還元 G l c N A c N - アセチル基を示す (データは不図示)。5 つの水分子が、タンパク質とキトビオース境界面との間に位置している。第 2 の G l c N A c の N - アセチル基が、結合溝の溶媒到達側に面している。還元 G l c N A c の C 3 位は、結合溝に面しており、グリカンが 1 , 3 フコシル化されている場合は、このグリカンがこの溝に適合する空間が存在しないであろうことを裏付ける。C 3 位とは異なり、C 6 位は、溝の溶媒に暴露される側に向かって外側を向き、この位置の 1 , 6 フコシル化が、結合溝へのアクセスを立体的に妨げないことを示唆している。

【 0 1 5 5 】

タンパク質とリガンドとの間の水素結合相互作用の広範なネットワークも証拠であり、その多くが、タンパク質とリガンドとの間の境界に位置する 5 つの水分子 (W a t ^{7 5}、W a t ^{1 4 6}、W a t ^{3 4 6}、W a t ^{3 4 8}、W a t ^{3 4 9}) によって促進される。これらの水分子の内 3 つ (W a t ^{7 5}、W a t ^{1 4 6}、W a t ^{3 4 6}) は、非複合体化構造のほぼ同じ位置にも存在する^{1 3 0、1 3 2}。合計 10 残基 (D 6 0、R 6 1、Y 8 5、E 1 1 8、W 1 2 0、S 1 5 5、G 1 9 0、W 1 9 1、E 2 0 6、R 2 4 8) が、水分子とリガンドの水素結合のネットワークに関与する。K u h n らによって最初に公表された分子間水素結合接触部を示す概略図が、図 5 に再現されている^{1 3 3}。この概略的な水素結合接触部のネットワークの 3 次元表現が図 6 に示されている。

【 0 1 5 6 】

P N G a s e F の活性部位の残基

P N G a s e F の活性部位の残基の点突然変異試験により、D 6 0 が最初の触媒残基として確認され、E 2 0 6 が、反応中間状態の安定性に関与する可能性が高いことが確認された^{1 3 3}。キトビオースリガンドの位置に基づくと、D 6 0 及び E 2 0 6 は、酵素が切断し得るアミン結合の両側に亘るであろう。しかしながら、糖ペプチドと複合体を形成した P N G a s e F の構造は委託されておらず、従って機構は未だ確認されていない。

E 1 1 8 の突然変異試験は、第 2 の G 1 c N A c の O 6 と相互作用するリガンドの反対側の末端にあり、E 1 1 8 が、D 6 0 及び E 2 0 6 によって媒介される可能性が高い触媒活性に必要な基質認識に重要であることを示している。D 6 0 A、E 2 0 6、及び R 2 4 8 によって促進される反応機構のモデルが提案され、D 6 0 が最初の触媒残基である^{1 3 2}、^{1 3 4}。このモデルでは、R 2 4 8 は、N - グリコシド結合のカルボニル酸素と水素結合を形成すると仮定され、従って水酸化イオンによって A s n - カルボニル炭素が求核攻撃を受けやすくなる。この求核攻撃は、W a t^{3 4 6} (P D B I D 1 P G S では W a t^{4 2 2}) によって促進される可能性があり、この W a t^{3 4 6} は、複合体化構造及び非複合体化構造の両方に存在し、かつ D 6 0、E 2 0 6、及び R 2 4 8 に近接して位置する。水酸化イオンは、W a t^{3 4 6} から D 6 0 へのプロトンの移動によって形成され得る。A s n - カルボニル炭素は、水酸化イオンから求核攻撃を受ける可能性があり、遷移中間状態を形成する。D 6 0 は、そのプロトンをアミン結合の窒素に供与し、アミド結合の切断が完了する。この提案されるモデルでは、D 6 0 の p K_a を、反応の最適 pH である 4 . 5 から 8 . 0 に引き上げる必要がある。このような活性部位の局所環境の変化は、E 2 0 6 及び D 6 0 を取り囲む近傍の芳香族残基 (Y 8 5、W 2 5 1、W 2 0 7、及び W 1 9 1) によって引き起こされる疎水性環境によって実現可能であろう。

10

【 0 1 5 7 】

P N G a s e F の重要性

30 年前の P N G a s e F の発見以来、特徴付けの前に N 結合型グリカンを放出するための標準的なツールになった。P N G a s e F は、キトビオースコア及び N - グリカンペプチドとタンパク質のコンジュゲートに共通のアスパラギン結合ペプチドモチーフの両方を認識するため、N - グリカン保持糖タンパク質に対して広範な特異性を有する。基質特異性試験により、触媒活性に必要な最小グリカンモチーフがキトビオースコアであることが確認された^{1 3 5}。加えて、認識される最小ペプチドモチーフは、全ての N 結合型グリカンに共通の A s n - X - S e r / T h r グリコシル化モチーフである^{1 3 5}。興味深いことに、最適な酵素活性は、キトビオース結合ペプチド、T y r - I l e - A s n - A l a - S e r で観察され、酵素が、グリカン結合アスパラギンの上流及び下流の両方の残基を認識することを示唆している^{1 3 5}。

20

【 0 1 5 8 】

全ての N - グリカン保持糖タンパク質に共通の N - 糖ペプチドコアに対する P N G a s e F の広範な特異性を考えると、この酵素は、N - 糖ペプチド認識試薬をエンジニアリングするための理想的な候補であろう。現在、N - 糖ペプチドを認識して濃縮できる単一検出試薬は存在しない。このような試薬は、糖質科学界にとってかなり興味深いものであり得、これをエンジニアリングすることがこの実施例の焦点である。

30

【 0 1 5 9 】

概要

理論的アプローチ及び実験的アプローチの両方における近年の進展は、糖鎖生物学の分野を進展させる特有の機会を提供する。具体的には、高スループット定方向進化戦略を用いる計算化学及び構造生物学ツールを利用することにより、所望の機能を有するクローンの同定に集中した新規なタンパク質ライブラリーの合理的なコンピューター内での設計を実現可能にする^{8 ~ 1 5}。計算によるドッキング及び分子動力学は、非常に複雑かつ柔軟な性質のタンパク質 - グリカン相互作用を調べるための不可欠なツールとなってきた^{9、7 0}。さらに、結合相互作用を駆動する熱力学的寄与を評価するための結合自由エネルギーの決定は、その他の方法では決定することができない、アミノ酸によって破壊されるタンパク質 - リガンド相互作用の洞察を提供する強力な計算技術である^{8、1 0、1 2}。これらの計算ツールは、生体分子の相互作用の理解を深める役割を果たし、かつ新規な機能を有する生体分子の進展をガイドする。コンピューター内での結合の構造分析、分子動力学 (M D)、及び i n v i t r o 定方向進化を用いる結合自由エネルギーの分解戦略は、両方の分野を進展させるだけでなく、糖鎖生物学の分野に関連した新規な生体分子の進展も促進する知識ベースのタンパク質エンジニアリングを可能にする^{3、3 1、4}

40

50

0。

【0160】

コンピューター内及び *in vitro*でのタンパク質エンジニアリング法の進展並びに新規なグリカン検出試薬の要望を考慮して、この実施例は、グリカンプロセシング酵素 (enzymeのenz) からエンジニアリングされた新規なレクチン (lectinのlect) 様グリカン認識生体分子を説明し、この生体分子は Lectenz (登録商標) と呼ばれる (Lectenz (登録商標) は、Glycosensors & Diagnostics, LLC. の連邦政府による登録商標である)。グリカンプロセシング酵素は、そのグリカン基質に対して優れた特異性を有するため、親和性が高い触媒的に不活性な変異体を作製するための理想的な出発点として役立つ。具体的には、F. メニンゴセプチカム (F. meningosepticum) N-グリカンプロセシング酵素、PNGase F を、全てのN結合型グリカンに共通のコア糖ペプチド成分を検出するための触媒的に不活性な親和性の高い変異体にエンジニアリングした。

10

【0161】

Lectenz (登録商標) 設計戦略の概略図が図7に示されている。野生型 PNGase F 酵素は既に、2.0 の解像度、活性部位でN, N'-ジアセチルキトビオース二糖と共結晶化されている (PDB ID: 1PNF) ¹³³。この構造モデルを使用して、分子動力学シミュレーション及び結合自由エネルギー分解分析を行ってキトビオースリガンドの近接必須テピッドアミノ酸残基を特定する。重要な残基は、飽和突然変異誘発のために選択されるのではないが、リガンド結合相互作用エネルギーが弱いテピッド残基は、定方向進化による飽和突然変異誘発のために選択される。定方向進化を酵母ディスプレイ系を用いて行って、標的N-グリカン保持糖タンパク質、リボヌクレアーゼB (RNase B) に対して親和性を有する突然変異 PNGase F クローンを選択する。選択された Lectenz (登録商標)、R911 は、速度論的分析用の表面プラズモン共鳴、特性決定用のグリカンアレイスクリーニングによって特徴付けられ、そしてN-糖ペプチド及びN-糖タンパク質サンプルの濃縮用の Lectenz (登録商標) アフィニティークロマトグラフィーに利用される。

20

【0162】

炭水化物プロセシング酵素 (Lectenz (登録商標)) からのレクチン様試薬の調製の成功は、N-糖ペプチド及びN-糖タンパク質サンプルの濃縮の課題に対するユニークな解決策を提供するだけでなく、グリカン及び複合糖質の生物学的関連性についてのグリカン標的試薬のエンジニアリングの新規な戦略も実証する。

30

【0163】

参考文献

1. Wijma, H.J. et al. Computationally designed libraries for rapid enzyme stabilization. *Protein Eng Des Sel* 27, 49-58 (2014).
2. Wijma, H.J. & Janssen, D.B. Computational design gains momentum in enzyme catalysis engineering. *Febs J* 280, 2948-2960 (2013).
3. Feldmeier, K. & Höcker, B. Computational protein design of ligand binding and catalysis. *Current Opinion in Chemical Biology* 17, 929-933 (2013).
4. Tinberg, C.E. et al. Computational design of ligand-binding proteins with high affinity and selectivity. *Nature* 501, 212-216 (2013). 10
5. Jiang, L. et al. De novo computational design of retro-aldol enzymes. *Science* 319, 1387-1391 (2008).
6. Patrick, W.M. & Firth, A.E. Strategies and computational tools for improving randomized protein libraries. *Biomolecular Engineering* 22, 105-112 (2005).
7. Chica, R.A., Doucet, N. & Pelletier, J.N. Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design. *Current Opinion in Biotechnology* 16, 378-384 (2005). 20
8. Hou, T., Wang, J., Li, Y. & Wang, W. Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 1. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations. *Journal of chemical information and modeling* 51, 69-82 (2011).
9. Woods, R.J. & Tessier, M.B. Computational glycoscience: characterizing the spatial and temporal properties of glycans and glycan-protein complexes. *Current Opinion in Structural Biology* 20, 575-583 (2010). 30
10. Steinbrecher, T. & Labahn, A. Towards accurate free energy calculations in ligand protein-binding studies. *Curr Med Chem* 17, 767-785 (2010).
11. D.A. Case, T.A.D., T.E. Cheatham, III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, R.C. Walker, W. Zhang, K.M. Merz, B. Roberts, B. Wang, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, I. Kolossvai, K.F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, J. Liu, X. Wu, S.R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M.-J. Hsieh, G. Cui, D.R. Roe, D.H. Mathews, M.G. Seetin, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, and P.A. Kollman (University of California, San Francisco, 2010). 40

12. Carrascal, N. & Green, D.F. Energetic decomposition with the generalized-born and Poisson-Boltzmann solvent models: lessons from association of G-protein components. *The journal of physical chemistry. B* 114, 5096-5116 (2010).
13. Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D. & Lindahl, E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation* 4, 435-447 (2008).
14. Okimoto, N. et al. High-performance drug discovery: computational screening by combining docking and molecular dynamics simulations. *PLoS Comput Biol* 5, e1000528 (2009). 10
15. Berman, H.M. et al. The Protein Data Bank. *Nucl. Acids Res.* 28, 235-242 (2000).
16. Karanicolas, J. et al. A De Novo Protein Binding Pair By Computational Design and Directed Evolution. *Mol Cell* 42, 250-260 (2011).
17. Lutz, S. Beyond directed evolution--semi-rational protein engineering and design. *Current Opinion in Biotechnology* 21, 734-743 (2010). 20
18. Grove, T.Z., Hands, M. & Regan, L. Creating novel proteins by combining design and selection. *Protein Eng Des Sel* 23, 449-455 (2010).
19. Brannigan, J.A. & Wilkinson, A.J. Protein engineering 20 years on. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 3, 964-970 (2002).
20. Winter, G., Fersht, A.R., Wilkinson, A.J., Zoller, M. & Smith, M. Redesigning enzyme structure by site-directed mutagenesis: tyrosyl tRNA synthetase and ATP binding. *Nature* 299, 756-758 (1982). 30
21. Sigal, I.S., Harwood, B.G. & Arentzen, R. Thiol-beta-lactamase: replacement of the active-site serine of RTEM beta-lactamase by a cysteine residue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7157-7160 (1982).
22. Hutchison, C.A., 3rd et al. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J Biol Chem* 253, 6551-6560 (1978).
23. Leatherbarrow, R.J., Fersht, A.R. & Winter, G. Transition-state stabilization in the mechanism of tyrosyl-tRNA synthetase revealed by protein engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7840-7844 (1985). 40
24. Graf, L. et al. Selective alteration of substrate specificity by replacement of aspartic acid-189 with lysine in the binding pocket of trypsin. *Biochemistry* 26, 2616-2623 (1987).

25. Perona, J.J., Hedstrom, L., Rutter, W.J. & Fletterick, R.J. Structural origins of substrate discrimination in trypsin and chymotrypsin. *Biochemistry* 34, 1489-1499 (1995).
26. Venekei, I., Szilagyi, L., Graf, L. & Rutter, W.J. Attempts to convert chymotrypsin to trypsin. *FEBS Lett* 379, 143-147 (1996).
27. Lerner, S.A., Wu, T.T. & Lin, E.C. Evolution of a Catabolic Pathway in Bacteria. *Science* 146, 1313-1315 (1964).
28. Mills, D.R., Peterson, R.L. & Spiegelman, S. An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58, 217-224 (1967). 10
29. Smith, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317 (1985).
30. Tobin, M.B., Gustafsson, C. & Huisman, G.W. Directed evolution: the 'rational' basis for 'irrational' design. *Curr Opin Struct Biol* 10, 421-427 (2000).
31. Bonsor, D.A. & Sundberg, E.J. Dissecting protein-protein interactions using directed evolution. *Biochemistry* 50, 2394-2402 (2011). 20
32. Cobb, R.E., Chao, R. & Zhao, H. Directed evolution: Past, present, and future. *AIChE Journal* 59, 1432-1440 (2013).
33. Socha, R.D. & Tokuriki, N. Modulating protein stability - directed evolution strategies for improved protein function. *Febs J* 280, 5582-5595 (2013).
34. Stone, J.D., Chervin, A.S., Aggen, D.H. & Kranz, D.M. T cell receptor engineering. *Methods Enzymol* 503, 189-222 (2012).
35. Shim, J.H., Chen, H.M., Rich, J.R., Goddard-Borger, E.D. & Withers, S.G. Directed evolution of a beta-glycosidase from *Agrobacterium* sp. to enhance its glycosynthase activity toward C3-modified donor sugars. *Protein Eng Des Sel* 25, 465-472 (2012). 30
36. Patel, S.C. & Hecht, M.H. Directed evolution of the peroxidase activity of a de novo-designed protein. *Protein Eng Des Sel* 25, 445-452 (2012).
37. Yip, S.H. et al. Directed evolution combined with rational design increases activity of GpdQ toward a non-physiological substrate and alters the oligomeric structure of the enzyme. *Protein Eng Des Sel* (2011). 40
38. Jakeman, D.L. & Sadeghi-Khomami, A. A beta-(1,2)-glycosynthase and an attempted selection method for the directed evolution of glycosynthases. *Biochemistry* 50, 10359-10366 (2011).

39. Cobucci-Ponzano, B., Perugino, G., Rossi, M. & Moracci, M. Engineering the stability and the activity of a glycoside hydrolase. *Protein Eng Des Sel* 24, 21-26 (2011).
40. Brustad, E.M. & Arnold, F.H. Optimizing non-natural protein function with directed evolution. *Current Opinion in Chemical Biology* 15, 201-210 (2011).
41. Lopes, A., Schmidt Am Busch, M. & Simonson, T. Computational design of protein-ligand binding: modifying the specificity of asparaginyl-tRNA synthetase. *Journal of computational chemistry* 31, 1273-1286 (2010). 10
42. Kittl, R. & Withers, S.G. New approaches to enzymatic glycoside synthesis through directed evolution. *Carbohydrate Research* 345, 1272-1279 (2010).
43. Yu, L. et al. Phage display screening against a set of targets to establish peptide-based sugar mimetics and molecular docking to predict binding site. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17, 4825-4832 (2009).
44. Thompson, S.M. et al. Heparan sulfate phage display antibodies identify distinct epitopes with complex binding characteristics: insights into protein binding specificities. *The Journal of biological chemistry* 284, 35621-35631 (2009). 20
45. Hancock, S.M., Rich, J.R., Caines, M.E., Strynadka, N.C. & Withers, S.G. Designer enzymes for glycosphingolipid synthesis by directed evolution. *Nature chemical biology* 5, 508-514 (2009).
46. Belien, T., Verjans, P., Courtin, C.M. & Delcour, J.A. Phage display based identification of novel stabilizing mutations in glycosyl hydrolase family 11 B. subtilis endoxylanase XynA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 368, 74-80 (2008). 30
47. Chao, G. et al. Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. *Nat. Protocols* 1, 755-768 (2006).
48. Gera, N., Hussain, M. & Rao, B.M. Protein selection using yeast surface display. *Methods* 60, 15-26 (2013).
49. Tohidkia, M.R., Barar, J., Asadi, F. & Omid, Y. Molecular considerations for development of phage antibody libraries. *Journal of drug targeting* 20, 195-208 (2012).
50. Kenrick, S.A. & Daugherty, P.S. Bacterial display enables efficient and quantitative peptide affinity maturation. *Protein Eng Des Sel* 23, 9-17 (2010). 40
51. Dreier, B. & Pluckthun, A. Ribosome display: a technology for selecting and evolving proteins from large libraries. *Methods in molecular biology* 687, 283-306 (2011).

52. Stoltenburg, R., Reinemann, C. & Strehlitz, B. SELEX--A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering* 24, 381-403 (2007).
53. Bornscheuer, U. & Kazlauskas, R.J. Survey of protein engineering strategies. *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 26, Unit26 27 (2011).
54. Leach, A.R. *Molecular modelling : principles and applications*, Edn. 2nd. (Prentice Hall, Harlow, England ; New York; 2001). 10
55. Groenhof, G. Introduction to QM/MM simulations. *Methods Mol Biol* 924, 43-66 (2013).
56. Karplus, M. & McCammon, J.A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat Struct Biol* 9, 646-652 (2002).
57. Karplus, M. & Kuriyan, J. Molecular dynamics and protein function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6679-6685 (2005).
58. Baker, D. & Sali, A. Protein Structure Prediction and Structural Genomics. *Science* 294, 93-96 (2001). 20
59. Mackerell, A.D., Jr. Empirical force fields for biological macromolecules: overview and issues. *J Comput Chem* 25, 1584-1604 (2004).
60. Stortz, C.A., Johnson, G.P., French, A.D. & Csonka, G.I. Comparison of different force fields for the study of disaccharides. *Carbohydrate Research* 344, 2217-2228 (2009).
61. Fadda, E. & Woods, R.J. Molecular simulations of carbohydrates and protein-carbohydrate interactions: motivation, issues and prospects. *Drug Discovery Today* 15, 596-609 (2010). 30
62. Genheden, S. & Ryde, U. A comparison of different initialization protocols to obtain statistically independent molecular dynamics simulations. *J Comput Chem* 32, 187-195 (2011).
63. Kirschner, K.N. et al. GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field. *Carbohydrates. J Comput Chem* 29, 622-655 (2008).
64. Guvench, O. & MacKerell, A.D., Jr. Comparison of protein force fields for molecular dynamics simulations. *Methods Mol Biol* 443, 63-88 (2008). 40
65. Benz, R.W., Castro-Roman, F., Tobias, D.J. & White, S.H. Experimental validation of molecular dynamics simulations of lipid bilayers: a new approach. *Biophysical journal* 88, 805-817 (2005).

66. Showalter, S.A. & Brüschweiler, R. Validation of Molecular Dynamics Simulations of Biomolecules Using NMR Spin Relaxation as Benchmarks: Application to the AMBER99SB Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation* 3, 961-975 (2007).
67. McCammon, J.A., Gelin, B.R. & Karplus, M. Dynamics of folded proteins. *Nature* 267, 585-590 (1977).
68. de Ruiter, A. & Oostenbrink, C. Free energy calculations of protein-ligand interactions. *Current Opinion in Chemical Biology* 15, 547-552 (2011). 10
69. Christ, C.D., Mark, A.E. & van Gunsteren, W.F. Basic ingredients of free energy calculations: A review. *Journal of Computational Chemistry*, NA-NA (2009).
70. DeMarco, M.L. & Woods, R.J. Structural glycobiology: a game of snakes and ladders. *Glycobiology* 18, 426-440 (2008).
71. Wang, J., Tan, C., Tan, Y.-H., Lu, Q. & Luo, R. Poisson-Boltzmann Solvents in Molecular Dynamics Simulations. *Communications in computational physics* 3, 22 (2008). 20
72. Jorgensen, W.L. Efficient Drug Lead Discovery and Optimization. *Accounts of Chemical Research* 42, 724-733 (2009).
73. Jorgensen, W.L. The many roles of computation in drug discovery. *Science* 303, 1813-1818 (2004).
74. McCammon, J.A. Theory of biomolecular recognition. *Current Opinion in Structural Biology* 8, 245-249 (1998). 30
75. Hummer, G. & Szabo, A. Calculation of free-energy differences from computer simulations of initial and final states. *Journal of Chemical Physics* 105, 2004 (1996).
76. van Gunsteren, W.F. et al. *Computation of Free Energy in Practice: Choice of Approximations and Accuracy Limiting Factors*, Vol. 2. (ESCOM, Leiden; 1993).
77. Beveridge, D.L. & DiCapua, F.M. Free energy via molecular simulation: applications to chemical and biomolecular systems. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 18, 431-492 (1989). 40
78. Zoete, V., Irving, M.B. & Michielin, O. MM-GBSA binding free energy decomposition and T cell receptor engineering. *Journal of molecular recognition : JMR* 23, 142-152 (2010).

79. Pierdominici-Sottile, G., Palma, J. & Roitberg, A.E. Free-energy computations identify the mutations required to confer trans-sialidase activity into *Trypanosoma rangeli* sialidase. *Proteins* 82, 424-435 (2014).
80. Krishnamoorthy, L. & Mahal, L.K. Glycomic analysis: an array of technologies. *ACS chemical biology* 4, 715-732 (2009).
81. Arnaud, J., Audfray, A. & Imberty, A. Binding sugars: from natural lectins to synthetic receptors and engineered neolectins. *Chem Soc Rev* 42, 4798-4813 (2013). 10
82. Kuzmanov, U., Kosanam, H. & Diamandis, E.P. The sweet and sour of serological glycoprotein tumor biomarker quantification. *BMC medicine* 11, 31 (2013).
83. Hakomori, S. Tumor-associated carbohydrate antigens. *Annu Rev Immunol* 2, 103-126 (1984).
84. Porcel, J.M. et al. Use of a panel of tumor markers (carcinoembryonic antigen, cancer antigen 125, carbohydrate antigen 15-3, and cytokeratin 19 fragments) in pleural fluid for the differential diagnosis of benign and malignant effusions. *Chest* 126, 1757-1763 (2004). 20
85. Goonetilleke, K.S. & Siriwardena, A.K. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol* 33, 266-270 (2007).
86. Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J., Miles, D.W. & Dalziel, M. MUC1 and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1455, 301-313 (1999).
87. Ghazarian, H., Idoni, B. & Oppenheimer, S.B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta histochemica* 113, 236-247 (2011). 30
88. Hart, G.W. & Copeland, R.J. Glycomics hits the big time. *Cell* 143, 672-676 (2010).
89. Taniguchi, N., Hancock, W., Lubman, D.M. & Rudd, P.M. The Second Golden Age of Glycomics: From Functional Glycomics to Clinical Applications. *Journal of Proteome Research* 8, 425-426 (2009).
90. An, H.J., Kronewitter, S.R., de Leoz, M.L. & Lebrilla, C.B. Glycomics and disease markers. *Current Opinion in Chemical Biology* 13, 601-607 (2009). 40
91. Freeze, H.H. Update and perspectives on congenital disorders of glycosylation. *Glycobiology* 11, 129R-143R (2001).

92. Haltiwanger, R.S. & Lowe, J.B. Role of glycosylation in development. *Annu Rev Biochem* 73, 491-537 (2004).
93. Li, H. & d'Anjou, M. Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology* 20, 678-684 (2009).
94. Dance, A. From pond scum to pharmacy shelf. *Nat Med* 16, 146-149 (2010).
95. Cummings, R.D. The repertoire of glycan determinants in the human glycome. *Molecular BioSystems* 5, 1087-1104 (2009). 10
96. Raman, R., Raguram, S., Venkataraman, G., Paulson, J.C. & Sasisekharan, R. Glycomics: an integrated systems approach to structure-function relationships of glycans. *Nat Methods* 2, 817-824 (2005).
97. Murrell, M.P., Yarema, K.J. & Levchenko, A. The systems biology of glycosylation. *Chembiochem* 5, 1334-1347 (2004).
98. Helenius, A. & Aebi, M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291, 2364-2369 (2001). 20
99. Drickamer, K. & Taylor, M.E. Evolving views of protein glycosylation. *Trends in Biochemical Sciences* 23, 321-324 (1998).
100. Kornfeld, R. & Kornfeld, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54, 631-664 (1985).
101. Knauer, R. & Lehle, L. The oligosaccharyltransferase complex from yeast. *Biochim Biophys Acta* 1426, 259-273 (1999).
102. Burda, P. & Aebi, M. The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 1426, 239-257 (1999). 30
103. Hashimoto, K. et al. KEGG as a glycome informatics resource. *Glycobiology* 16, 63R-70R (2006).
104. Weerapana, E. & Imperiali, B. Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology* 16, 91R-101 (2006).
105. Kukuruzinska, M.A., Bergh, M.L. & Jackson, B.J. Protein glycosylation in yeast. *Annu Rev Biochem* 56, 915-944 (1987). 40
106. Rayon, C., Lerouge, P. & Faye, L. The protein N-glycosylation in plants. *J. Exp. Bot.* 49, 1463-1472 (1998).

107. Taylor, M.E. & Drickamer, K. Introduction to glycobiology, Edn. 2nd. (Oxford University Press, Oxford ; New York; 2006).
108. Cylwik, B., Lipartowska, K., Chrostek, L. & Gruszewska, E. Congenital disorders of glycosylation. Part II. Defects of protein O-glycosylation. *Acta Biochimica Polonica* 60, 361-368 (2013).
109. Lundquist, J.J. & Toone, E.J. The Cluster Glycoside Effect. *Chemical Reviews* 102, 555-578 (2002). 10
110. Debray, H., Decout, D., Strecker, G., Spik, G. & Montreuil, J. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *Eur J Biochem* 117, 41-55 (1981).
111. Liener, I.E., Sharon, N. & Goldstein, I.J. The Lectins : properties, functions, and applications in biology and medicine. (Academic Press, Orlando; 1986).
112. Bertozzi, C.R. & Kiessling, L.L. Chemical glycobiology. *Science (New York, N.Y.)* 291, 2357-2364 (2001). 20
113. Meier, S. & Duus, J. Carbohydrate dynamics: Antibody glycans wiggle and jiggle. *Nature chemical biology* 7, 131-132 (2011).
114. Cunningham, S., Gerlach, J.Q., Kane, M. & Joshi, L. Glyco-biosensors: Recent advances and applications for the detection of free and bound carbohydrates. *Analyst* 135, 2471-2480 (2010).
115. Manimala, J.C., Roach, T.A., Li, Z. & Gildersleeve, J.C. High-throughput carbohydrate microarray profiling of 27 antibodies demonstrates widespread specificity problems. *Glycobiology* 17, 17C-23C (2007). 30
116. Wright, C.S. 2.2 A resolution structure analysis of two refined N-acetylneuraminyl-lactose--wheat germ agglutinin isolectin complexes. *J Mol Biol* 215, 635-651 (1990).
117. Saul, F.A. et al. Crystal structure of *Urtica dioica* agglutinin, a superantigen presented by MHC molecules of class I and class II. *Structure* 8, 593-603 (2000).
118. Harata, K. & Muraki, M. Crystal structures of *Urtica dioica* agglutinin and its complex with tri-N-acetylchitotriose. *J Mol Biol* 297, 673-681 (2000). 40
119. Huang, W., Wang, D., Yamada, M. & Wang, L.X. Chemoenzymatic synthesis and lectin array characterization of a class of N-glycan clusters. *J Am Chem Soc* 131, 17963-17971 (2009).

120. Rao, V., Cui, T., Guan, C. & Van Roey, P. Mutations of endo-beta-N-acetylglucosaminidase H active site residue Asp130 and Glu132: activities and conformations. *Protein Sci* 8, 2338-2346 (1999).
121. Guillén, D., Sánchez, S. & Rodríguez-Sanoja, R. Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. *Applied Microbiology & Biotechnology* 85, 1241-1249 (2010).
122. Jakobsson, E., Schwarzer, D., Jokilampi, A. & Finne, J. Endosialidases: Versatile Tools for the Study of Polysialic Acid. *Topics in current chemistry* (2012). 10
123. Korecka, L. et al. Bioaffinity magnetic reactor for peptide digestion followed by analysis using bottom-up shotgun proteomics strategy. *J Sep Sci* 31, 507-515 (2008).
124. Plummer, T.H., Elder, J.H., Alexander, S., Phelan, A.W. & Tarentino, A.L. Demonstration of peptide:N-glycosidase F activity in endo-beta-N-acetylglucosaminidase F preparations. *Journal of Biological Chemistry* 259, 10700-10704 (1984).
125. Tarentino, A.L., Gomez, C.M. & Plummer, T.H., Jr. Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. *Biochemistry* 24, 4665-4671 (1985). 20
126. Mussar, K.J., Murray, G.J., Martin, B.M. & Viswanatha, T. Peptide: N-glycosidase F: studies on the glycoprotein aminoglycan amidase from *Flavobacterium meningosepticum*. *Journal of biochemical and biophysical methods* 20, 53-68 (1989).
127. Haselbeck, A. & Hosel, W. Studies on the effect of the incubation conditions, various detergents and protein concentration on the enzymatic activity of N-glycosidase F (Glycopeptidase F) and endoglycosidase F. *Topics in Biochemistry* 8, 1-4 (1988). 30
128. Lemp, D., Haselbeck, A. & Klebl, F. Molecular cloning and heterologous expression of N-glycosidase F from *Flavobacterium meningosepticum*. *J Biol Chem* 265, 15606-15610 (1990).
129. Tretter, V., Altmann, F. & März, L. Peptide-N₄-(N-acetyl-β-glucosaminyl)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached α₁ → 3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue. *European Journal of Biochemistry* 199, 647-652 (1991).
130. Norris, G.E., Stillman, T.J., Anderson, B.F. & Baker, E.N. The three-dimensional structure of PNGase F, a glycosylasparaginase from *Flavobacterium meningosepticum*. *Structure* 2, 1049-1059 (1994). 40

131. Norris, G.E., Flaus, A.J., Moore, C.H. & Baker, E.N. Purification and crystallization of the endoglycosidase PNGase F, a peptide:N-glycosidase from *Flavobacterium meningosepticum*. *J Mol Biol* 241, 624-626 (1994).
132. Kuhn, P., Tarentino, A.L., Plummer, T.H., Jr. & Van Roey, P. Crystal structure of peptide-N4-(N-acetyl-beta-D-glucosaminyl)asparagine amidase F at 2.2-A resolution. *Biochemistry* 33, 11699-11706 (1994).
133. Kuhn, P. et al. Active Site and Oligosaccharide Recognition Residues of Peptide-N4-(N-acetyl-β-D-glucosaminyl)asparagine Amidase F. *Journal of Biological Chemistry* 270, 29493-29497 (1995). 10
134. Filitcheva, J. PNGases: A Diverse Family of Enzymes Related by Function Rather Than Catalytic Mechanism, Vol. Ph.D. (Massey University, Palmerston North; 2010).
135. Fan, J.Q. Detailed Studies on Substrate Structure Requirements of Glycoamidases A and F. *Journal of Biological Chemistry* 272, 27058-27064 (1997).

【 0 1 6 4 】

実施例 2 20

バイオコンピナトリアルライブラリーのコンピューターガイド設計
コンピューターガイドライブラリー設計

野生型 F . メニンゴセプチカム (*F . meningosepticum*) N - グリカンプロセシング酵素、 *w t P N G a s e F* は既に、 2 . 0 の解像度で、活性部位でキトビオース二糖と共結晶化されている (*P D B I D : 1 P N F*) ¹ 。この *1 P N F* X 線結晶構造モデルを用いて、 *P N G a s e F - N , N ' -* ジアセチルキトビオース (*G l c N A c 1 - 4 G l c N A c*) 複合体の 5 ナノ秒の完全溶媒和 MD シミュレーションを、 *A M B E R - G L Y C A M* タンパク質 - 炭水化物力場を利用する圧力及び室温で、水中で行った ^{2 ~ 4} 。実験的構造に対する、 C 原子の位置における二乗平均差 (*R M S D*) を、シミュレーション時間の関数として決定し、比較的低い 1 . 5 の平均 (*R M S D*) (図 8) は、このシミュレーションにより実験的構造が再現されたことを示した。加えて、複合体は、二糖リガンドとタンパク質との間の実験的に観察された水素結合相互作用を維持した (表 3) 。複合体のシミュレーションが安定であり、かつ実験的構造データに一致しているようであることを考慮して、相互作用エネルギーを計算した。加熱及び平衡前の期間 (1 ナノ秒) からのデータは、次の分析には含めなかった。 *A M B E R* で実施される *M M - G B S A* プロトコルを用いて、結合エネルギーに対する残基当たりの分子力学的 (*M M*) 寄与を、 2 ~ 5 ナノ秒の間、 *P N G a s e F* の 3 1 4 の各アミノ酸に対して計算した ; 一般化 *B o r n (G B)* 連続溶媒モデルを利用して、脱溶媒和エネルギーを推定した ⁵ 。加えて、MD データを、コンピューターアラニンスキャニングに利用した。図 9 は、リガンドの 4 . 5 の範囲の残基を示している。 30

【 0 1 6 5 】 40

【表 3】

キトビオースと PNGase F との間で観察された実験及び理論水素結合長。

Woodsらによって作成されたデータ。

水素結合	1PNF X 線データ (Å)	MD シミュレーションの平均 (Å)
D60-Oδ – GlcNAc316 O1	3.02	2.76 ± 0.1
D60-O – GlcNAc316 NAc	2.97	2.84 ± 0.1
R61-NH – GlcNAc317 OAc	2.84	2.91 ± 0.1
R61-NH – GlcNAc316-O4	2.92	2.90 ± 0.1
R61-NH2 – GlcNAc317 OAc	3.03	2.90 ± 0.1
W120-Nε – GlcNAc317-O6	2.93	2.98 ± 0.1
W191-Nε – GlcNAc316-O3	2.96	3.06 ± 0.1

10

【0166】

全分子力学的 (ファンデルワールス、 E_{VDW} 、及び静電気、 E_{ELE} の合計) 相互作用エネルギー (E_{MM}) 又は結合自由エネルギーのいずれかに対して少なくとも 0.5 kcal / モル寄与したその他の残基に加えて、リガンドの近接 (4.5 の範囲) 残基の推定相互作用エネルギーが表 4 に列記される。残基当たりの結合自由エネルギー ($G_{BINDING}$) を、分子力学的相互作用エネルギー (E_{MM}) と残基の脱溶媒和エネルギー (G_{GB+SA}) の和として計算した。残基当たりのエネルギー分析により、結合部位の近接残基 (図 9) を、残基当たりの結合自由エネルギーに基づいて重要残基とテピッド残基に分類することができた。

20

【0167】

重要な残基は、基質とやや不利な相互作用をすることが示された 3 つの残基 (D60、E206、及び E118) を除いて、相互作用を著しく安定させた。これらの 3 つの残基はそれぞれ、PNGase F の触媒機能に関連し、基質の不安定化におけるその役割を説明し得る¹。点突然変異体の研究に基づいて、D60 は、最初の触媒残基として同定され、E206 及び E118 は、高エネルギー反応中間体の安定化を助けると提唱される¹。複合体における水素結合及び芳香族スタッキングの実験的観察に一致して、エネルギー分解分析により、R61、W120、W58、W191、及び W251 がリガンド結合に重要であることが確認された¹。

30

【0168】

【表 4】

基質、キトビオースに結合した wtPNGase F の結合自由エネルギーに対する概算の残基寄与(kcal/モル)。列記された残基は、リガンドの 4.5 オングストローム(4.5×10^{-10} m)の範囲である、又は全分子力学的(ファンデルワールス及び静電気)相互作用エネルギー(ΔE_{MM})若しくは全結合自由エネルギー($\Delta G_{BINDING}$)のいずれかに少なくとも 0.5kcal/モル寄与する。触媒活性に必要な残基は太字で示されている¹。ライブラリーの列は、知識ベースのライブラリー設計の最適化のために選択された残基を示している:A=アラニン、X=全 20 のアミノ酸、X(-D)=19 のアミノ酸(アスパラギン酸を含まない)。Woods らによって作成された MM-GBSA データ。

重要な接触ゾーン残基	ΔE_{VDW}	ΔE_{ELE}	ΔE_{MM}	ΔG_{GB+SA}	$\Delta G_{BINDING}$	ライブラリー1	ライブラリー2
R61	-1.5	-15.1	-16.7	12.3	-4.4		
W120	-3.1	-2.3	-5.4	1.9	-3.5		
W59	-3.1	-0.2	-3.3	0.3	-3.0		
W191	-1.3	-1.6	-2.9	1.3	-1.6		
W251	-0.7	-0.3	-1.0	0.1	-0.9		
E118	-0.5	-0.1	-0.5	0.6	0.1	X	
D60 (求核試薬)	-0.9	-3.9	-4.8	5.2	0.4	A	X(-D)
E206	-0.3	2.1	1.8	-1.1	0.7	X	X
僅かにしか寄与しない近接残基	ΔE_{VDW}	ΔE_{ELE}	ΔE_{MM}	ΔG_{GB+SA}	$\Delta G_{BINDING}$	ライブラリー1	ライブラリー2
Y62	-0.6	-0.1	-0.6	0.0	-0.6	X	
D57	-0.1	3.0	2.9	-3.5	-0.6	X	X
I156	-0.2	0.1	-0.2	-0.1	-0.3	X	X
S155	-0.3	0.2	-0.1	-0.1	-0.1	X	
R248	-0.1	-1.2	-1.4	1.2	-0.1		X
G192	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	X	X
T119	-0.2	-0.6	-0.7	0.8	0.1		
K123	0.0	-0.5	-0.5	0.6	0.1		
R125	0.0	-0.4	-0.4	0.6	0.1		
小計相互作用エネルギー	-12.9	-20.8	-33.7	20.1	-13.6		
$\Delta G_{BINDING}$							

【 0 1 6 9 】

リガンドに近接した等しく重要な 9 つの追加の残基が、結合にそれほどエネルギー寄与

10

20

30

40

50

しないことが確認された。これらの9つの寄与度の低い残基又はデピッド残基は、定方向進化に部位飽和突然変異誘発ライブラリーを利用することによって親和性の向上に最高の機会を提供する。加えて、野生型 PNGase F に対して、D60又はE206のアラニン(D60A、E206A)での計算上の置換が、これらの突然変異体が有利な相互作用エネルギーを有するべきであることを示している(表5)。特に、D60A相互作用エネルギーは、野生型(wt) PNGase F に対して著しく改善された基質親和性を示し、従ってD60A突然変異体が、発現及びさらなる実験的分析のために選択された。

【0170】

【表5】

キトピオースに結合した PNGase F のコンピューターアラニンスキャニング。有利な突然変異体の相互作用エネルギー(kcal/モル)を、wtPNGase F に対して確認する。Woodsらによって作成されたデータ。

接触ゾーン残基	$\Delta\Delta E_{MM}$	$\Delta\Delta G_{GB+SA}$	$\Delta\Delta G_{BINDING}$
D60A	1.8	-4.0	-2.2
E206A	-1.9	1.2	-0.7

【0171】

酵母ディスプレイライブラリーの構築

2つの酵母表面ディスプレイ・バイオコンビナトリアル・ライブラリーが設計され、これらのライブラリーは、表4に示されている最適化のためのいくつかの計算上の予測残基を含む。ライブラリー1(GenScript, Piscataway, NJ)が、NNKコドン縮重を用いて合成され、このライブラリー1は、全てのクローンに固定D60A突然変異体を含めた。NNKコドン縮重は、ランダム停止コドンの導入の可能性を低下させると共に、NNNコドン縮重に対するコドンバイアスも最小限にする⁶。GenScriptライブラリー1の配列及び突然変異部位が図10に示されている。ライブラリー2(GeneArt AG, Regensburg, Germany)が、全てのアミノ酸を等モル分布させるカセット突然変異誘発を用いて合成され、このライブラリー2は、19のアミノ酸(即ち、Dを除く)を用いてランダム化D60位を含めた。GeneArtライブラリー2の配列及び突然変異の部位は、図11に示されている。

【0172】

合成縮重オリゴヌクレオチドを、既定のアミノ酸サブセットが既定の位置に含められるように構築した(図10及び図11)。これらのオリゴヌクレオチドを用いてPCR産物を得て、完全長断片をゲル精製した。両方のライブラリーの完全長産物を、NheI及びBamHI制限部位を用いてpPNL6ベクターにクローニングした。Pacific Northwest National Laboratoryが、ヒト抗体scFv断片(pPNL6)の酵母細胞表面ディスプレイ非免疫ライブラリーのアリコートを提供した⁷。このライブラリーを、図12に示されているようにscFv断片をPNGase F酵素(PNGase F-pPNL6)で置換するために改変した(Dr. Loretta Yang)。EBY100酵母細胞を、表面ディスプレイのためにPNGase F-pPNL6ライブラリーで形質転換した(図13)⁸。クローンの漸増及びランダム配列決定を行って、ライブラリーの質、形質転換の効率、及びカバーされるパーセント配列スペースを評価した。両方のライブラリーの配列カバレッジの推定値の要約が表6に示されている。ライブラリー1を、部位飽和突然変異誘発の7つの部位を用いて設計した。ユニークなクローンの数の理論上の多様性は 1.28×10^9 である。しかしながら、配列同一性及び形質転換体の総数に基づいて、推定合成多様性は、僅か 2.40×10^6 クローンである。これは、ライブラリー1の構築及び形質転換の両方での非効率性を示す約0.18%の配列カバレッジを表す。ライブラリー2は、部位飽和突然変異誘発の6つの部位を用いて設計し、 6.08×10^7 のユニークなクローンの理論上の多様性となる。

ライブラリー 2 の推定合成多様性は、 1.36×10^7 のユニークなクローンであると決定された。ライブラリー 2 は、約 22.3% の配列カバレッジを有し、クローンの数に基づくと、ライブラリー 1 よりも 5.7 倍広い合成多様性となる。

【0173】

【表 6】

理論及び推定合成ライブラリーの多様性及び配列スペースのカバレッジの比較

	アミノ酸ランダム化	理論上の多様性	合成多様性	カバレッジ (%)
ライブラリー 1	7 (20^7)	1.28×10^9	約 2.40×10^6	約 0.18%
ライブラリー 2	6 ($20^5 \times 19^1$)	6.08×10^7	約 1.36×10^7	約 22.3%

10

【0174】

酵母表面ディスプレイによる PNGase F クローンの定方向進化

構築した酵母ディスプレイ PNGase F ライブラリーを、標的 N-グリカンに対する親和性が高いクローンの選択に利用した。酵母ライブラリーを、約 24 時間、30 の振盪インキュベーターで、選択増殖培地で一晚増殖させた。酵母細胞表面上の Aga2p-PNGase F 融合タンパク質の発現及びディスプレイが、Gal1-10 プロモーターの下であり (図 12 及び図 13)、従って酵母ライブラリーを、20 の振盪インキュベーターで、ガラクトース含有培地で一晚誘導した。誘導効率を、一次抗 c-myc 抗体を用いたフローサイトメトリーによって、完全に発現された Aga-2p-PNGase F 融合タンパク質の C 末端 c-myc タグを検出して決定した (データは不図示)。少なくとも 60% の誘導クローンを含む誘導酵母ディスプレイライブラリーを、N-グリカン標的に対する親和性の高いクローンの選択に使用した。

20

【0175】

2 つの N-グリカン標的を、N-グリカン構造に対する wt PNGase F 酵素の広範な特異性を維持するクローンを濃縮する選択戦略に利用した。一次 N-グリカン標的は、ウシ腭リボヌクレアーゼ B (RNase B) であり、ウシ腭リボヌクレアーゼは、アスパラギン 34 (N34) に単一 N-グリコシル化部位を含み、かつ 9 つの高マンノース糖型を有する (図 14)⁹⁻¹¹。報告された RNase B の平均分子量は、グリコシル化種のそれぞれの相対存在量から得られた 15,095 Da である¹²。RNase B 及びその非グリコシル化型 RNase A (13,680 Da の報告された平均分子量) は、十分に特徴付けられた酵素であり、かつ炭水化物分析技術を検証するための標準として頻繁に使用される¹¹⁻¹⁶。興味深いことに、RNase A の NMR スペクトルと RNase B の NMR スペクトルとの比較に基づくと、RNase B の N-グリコシル化は、その構造に対して認識できる影響を有していない¹⁷。しかしながら、RNase B は、RNase A よりも優れた安定性を示し、これは、グリコシル化が、タンパク質のコアに埋没した基の優先的な水和によって促進される変性傾向を緩和するという観察に一致している^{14, 15}。二次 N-グリカン標的は、フェチュインをノイラミニダーゼで酵素的に脱シアル化することによって形成されるアシアロフェチュインであり、0.5% 未満の N-アセチルノイラミン酸を含む。ウシ胎仔血清から単離されたフェチュインは、3 つの N-グリコシル化部位及び 5 つの O-グリコシル化部位を有する 48.4 kDa の糖タンパク質であり、かつ RNase B に見られる高マンノース構造と比較して、相対的に複雑な N-グリカン構造を有する¹⁸。フェチュインのパーセント重量組成比は、ポリペプチドが 74%、ヘキソースが 8.3%、ヘキソサミンが 5.5%、及びシアル酸が 8.7% である。両方の N-グリカン標的糖タンパク質を変性させて、N-グリカ

30

40

50

ンが酵母表面ディスプレイPNGase Fクローンに十分に到達可能にした。さらに、変性糖タンパク質を、FACS用の蛍光標識ストレプトアビジンでの選択及び検出のためのDynabeads (登録商標) Biotin Binder、ストレプトアビジンで被覆された2.8 μmの磁気ビーズに提示するために、この変性糖タンパク質をビオチン標識した。

【0176】

この選択戦略は、ストレプトアビジンで被覆された2.8 μmの磁気ビーズ (Dynabeads (登録商標) Biotin Binder) を用いる2回の磁気活性化細胞選別 (MACS) (図15) 及びこれに続く、標的N-グリカンとして変性RNase B及びアシアロフェチュインを用いる3回の蛍光活性化細胞選別 (FACS) を含んでいた^{19、20}。目的のN-グリカン標的に対する陽性選択の前に、ライブラリーを、第1回の選択の開始時に非被覆磁気ビーズに対して陰性選択して、ライブラリーから全てのビーズ結合クローンを除去した。

10

【0177】

2回のMACSと1回のFACSの選択のセットを繰り返し、合計で9回行った (図16a)。標的N-グリカン含有RNase Bのみを、ライブラリー1での9回全ての選択に使用した。しかしながら、N-グリカン含有RNase B及びアシアロフェチュイン糖タンパク質の両方を、並列の選択の回でライブラリー2の標的として同時に使用した。RNase Bでの3回目の選択により増幅されたライブラリー出力の一部を、4回目~6回目の間にアシアロフェチュインに対して同時に選択した。標的RNase B及びアシアロフェチュイン選択の両方からの出力を、6回目の後にプールした。前述のように、この組み合わせ出力プールの一部を、並列の7回目~9回目の間に標的RNase B及びアシアロフェチュインの両方に対して再び同時に選択した。9回目の選択の最後に、RNase B及びアシアロフェチュイン選択出力プールの両方をもう一度組み合わせた。

20

【0178】

9回の反復選択及び増幅 (約50クローンを各3回目の終了時に配列決定した) の間に、クローンの濃縮を観察した。高レベルで濃縮されたクローン、指定R911は、wt PNGase Fに対して次の突然変異を有していた: D57L、D60C、I156L、G192I、E206S、及びR248W。6つの計算により選択された突然変異誘発部位における優勢なアミノ酸のグラフィック表示を、図16bで確認することができる。

30

【0179】

【表 7】

ライブラリー1 及びライブラリー2 の選択からの濃縮クローンの配列。部位飽和突然変異誘発のために選択された残基における好ましいアミノ酸の同一性が列記されている。比較のために、wtPNGase F 配列が含まれている。クローン R617 及び R6113 を、標的N-グリカン含有 RNase B 糖タンパク質に対してライブラリー1 のみから選択した。クローン R911 及び R9113 を、標的N-グリカン含有 RNase B 及びアシアロフェチュイン糖タンパク質の両方に対してライブラリー3 から選択した。青塗りのセルは、部位飽和突然変異誘発のために選択されなかった部位を表している。

10

wtPNGase F	D57	D60	Y62	E118	S155	I156	G192	E206	R248
R617 (ライブラリー1)	R	A	G	A	D	T	C	S	R
R6113 (ライブラリー1)	C	A	W	A	Q	T	T	R	R
R911 (ライブラリー2)	L	C	Y	E	S	L	I	S	W
R9113 (ライブラリー2)	W	C	Y	E	S	M	I	W	S

20

【0180】

ライブラリー1 及びライブラリー2 の両方から選択された上2つの濃縮クローンの配列同一性が表7に要約されている。複数の部位におけるトリプトファンの選択は、芳香族側鎖が単糖の疎水面と相互作用することが知られているため重要である^{2 1}。ライブラリー2のD60位は、19のアミノ酸(Dを除く)に対する部位飽和突然変異誘発を受けやすく、両方のR9クローンで同じD60A突然変異を示した。これは、この位置のシステインが結合相互作用に非常に有利であることを示唆し得る。しかしながら、4つ全ての濃縮クローンにおけるシステインの存在は、1つのシステインの追加により、PNGase Fの51~56、204~208、及び231~252にある3つの既存のジスルフィド結合を破壊する可能性があるため、懸念材料でもあり得る。他の興味深い観察は、ライブラリー1からの両方のR6クローンでE118A及びI156Tの突然変異が優先されることを含む。同様に、ライブラリー2からの両方のR9クローンは、D60C及びG192Iの突然変異が優先されることを示している。G192I突然変異は、比較的小さいグリカン残基が大きい疎水性イソロイシン側鎖で置換されているため重要である。結合ポケットの疎水性の増加は、タンパク質-炭水化物相互作用を促進し得るが、大きい側鎖の存在はまた、結合ポケットへのアクセスを部分的にブロックし得る。選択されたR6及びR9クローンのLectenz(登録商標)親和性試薬としての実用性を調べてその特性を特徴付けるために、選択されたPNGase Fクローンを、大腸菌(E.coli)での発現及び精製のための細菌発現ベクターにクローニングした。

30

【0181】

方法

分子動力学及び残基当たりの結合自由エネルギー分解

PNGase F-N, N'-ジアセチルキトビオース(GlcNAc 1-4GlcNAc)複合体の5ナノ秒の完全溶媒和MDシミュレーションを、AMBER-GLYCAMタンパク質-炭水化物力場を利用する圧力及び室温で、水中で行った。AMBERで実施される一般化Born(GB)連続溶媒モデルを利用して、結合エネルギーに対する残基当たりの寄与を、PNGase Fの313の各アミノ酸について計算した⁵。典型的なMM-GB/PB計算では、MD軌道から抽出された各構造「スナップ写真」のタンパク質(GPROTEIN)、リガンド(GLIGAND)、及び複合体(GCOMPLEX)について自由エネルギーを計算する。5ナノ秒の軌道から、最初の1ナノ秒

40

50

を捨て、分子力学的 (MM) 結合エネルギー分析のために残りの 4 ナノ秒から 2000 のスナップ写真を (2 ピコ秒の間隔で) 選択した。次いで、結合自由エネルギー (G_{BINDING}) を減算によって求めた。式 1 に示されているように、全軌道の平均化により、最終的な平均相互作用エネルギー ($\langle G_{\text{BINDING}} \rangle$) が得られ、この平均化は MD スナップ写真に対してである。

式 1

$$\langle G_{\text{BINDING}} \rangle = \langle G_{\text{COMPLEX}} \rangle - \langle G_{\text{PROTEIN}} \rangle - \langle G_{\text{LIGAND}} \rangle$$

【0182】

成分の自由エネルギーは、エネルギーを 3 つの範疇、即ち、分子力学 (E_{MM} 、静電気及びファンデルワールス)、エントロピー (S_{MM})、及び溶媒和 ($G_{\text{SOLVATION}}$) に分類することによって計算する (式 2)。

式 2

$$\langle G \rangle = \langle E_{\text{MM}} \rangle - T \langle S_{\text{MM}} \rangle + \langle G_{\text{SOLVATION}} \rangle$$

【0183】

コンピューターアラニンスキャニング及び静電気スキャニング

Kollman group で提案され、AMBER で実施される単一軌道突然変異プロトコルに従って、野生型複合体のスナップ写真のセットを、式 1 及び 2 のエネルギー項のそれぞれの突然変異体の計算に利用した⁹。突然変異体の側鎖を切断し、C を水素原子で置換し、そして C-H 結合の長さ及び方向を野生型 C-C の残基の長さ及び方向に合わせる。単一軌道突然変異プロトコルの基本的な近似は、突然変異体及び野生型が、非結合状態から結合状態への類似のコンフォメーション変化を受けること、及び局所側鎖の再編成が、アラニン突然変異自体に対する小さい摂動であることである⁹。野生型及び突然変異体種の別の軌道を移動することができるが、これは、(内部エネルギー成分が取り消されないため) かなりのノイズを導入し、かつ計算負荷が高い。別個のシミュレーションは、大きい残基又は荷電残基への突然変異の場合には妥当であろう。

【0184】

特定の位置におけるイオン化残基の影響を調べるために、アラニンスキャニングを変更して、理論上の正味の正電荷 (Ala⁺) 又は負電荷 (Ala⁻) を有するアラニンを利用した。アラニンの全ての原子が、標準部分電荷を有し、残基の全電荷を、C 原子の電荷に調整することによって +1 又は -1 に合わせた。

【0185】

酵母ディスプレイ PNGase F クローンライブラリーの合成

GenScript ライブラリーを、NNK コドン縮重を用いて合成した (GenScript, Piscataway, NJ)。このライブラリーは、表 3 のライブラリー 1 の下に示されている突然変異誘発部位を含む。GeneArt ライブラリーを、ヌクレオチド混合物を用いて合成し (Life Technologies, Carlsbad, CA)、全てのアミノ酸の等モル分布が得られ、このライブラリーは、表 3 のライブラリー 2 の下に示されている 19 のアミノ酸 (即ち、D を除く) を用いるランダム化 D60 位を含む。合成ライブラリーを、pPNL6 ベクターにクローニングした (図 12)。

【0186】

酵母ディスプレイライブラリーによる EBY100 の形質転換

PNGase F-pPNL6 ベクターのクローンライブラリーにより、推奨プロコルに従って表面ディスプレイ (図 13 及び表 6) のために EBY100 酵母細胞を形質転換した⁸。

【0187】

酵母ディスプレイライブラリーの誘導

酵母ライブラリーを、Pacific Northwest National Laboratory (Richland, WA) によって提供される酵母ディスプレイ scFv 抗体ライブラリーのユーザーマニュアル (Rev: MF031112) (sysb

10

20

30

40

50

io.org/datarresources/index.stm)の推奨プロトコルに従って導入した。E BY 100形質転換酵母ライブラリーを、ガラクトース含有培地に導入して、表面ディスプレイされたAga2p-PNGase Fクローンを発現させる(図13)。酵母細胞の少なくとも60%がC末端c-mycタグを確実に発現するように、誘導効率をフローサイトメトリーによって決定する(データは不図示)。

【0188】

PNGase Fクローンライブラリーの酵母表面ディスプレイによる定方向進化

N-グリカン保持糖タンパク質、RNase B (Sigma R7884)、及びアシアロフェチュイン (Sigma A4781)を選択標的として使用した⁹、¹⁸。両方の糖タンパク質を変性させて、N-グリカン及び糖ペプチド領域が酵母表面ディスプレイPNGase Fクローンに最大限暴露されるようにした。

10

【0189】

選択戦略は、2回の磁気活性化細胞選別(MACS; 図15)及びこれに続く、標的N-グリカンとして変性RNase Bと変性アシアロフェチュインの混合物を用いる3回の蛍光活性化細胞選別(FACS)を含む¹⁹、²⁰。2回のMACSと1回のFACSの選択のセットを、図16aに示されているように繰り返し、合計9回行った。

【0190】

配列決定のための酵母コロニーのPCR

各3回目の選択からの約50コロニーを取り出して、20µLの分子生物学グレードの水(Thermo Scientific SH30538.02)中、0.1% SDSで混合し、95℃で5分間加熱し、そして氷温で保管した。2µLの溶解酵母細胞混合物を使用して、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による増幅のための鋳型DNAを提供した。PCRマスターミックスを、製造者の推奨プロトコルに従って、1反応当たり50µLの最終量で、Taq DNAポリメラーゼ(Life Technologies 10966-034)及びdNTPミックス(Life Technologies 18427-013)を用いて調製した。フォワードプライマー及びリバースプライマー(図17)を、0.2µMの最終濃度でPCRマスターミックスで混合した。PCRを、図18に示されているようにプログラムされた熱サイクルで、Mastercycler EP (Eppendorf)を用いて行った。PCR産物(1163塩基対長)を、0.7%アガロースゲルを用いて検証し、Multiimage Light Cabinet (Alpha Innotech, Inc.)を用いて画像化し、そしてフォワード配列決定プライマー(図17)を用いて配列決定するためにMWG Operonに提出した。

20

30

【0191】

参考文献

1. Kuhn, P. et al. Active Site and Oligosaccharide Recognition Residues of Peptide-N4-(N-acetyl-β-D-glucosaminyl)asparagine Amidase F. *Journal of Biological Chemistry* 270, 29493-29497 (1995).
2. Woods, R.J., Dwek, R.A., Edge, C.J. & Fraser-Reid, B. *Molecular Mechanical and Molecular Dynamic Simulations of Glycoproteins and Oligosaccharides*. 1.

40

- GLYCAM_93 Parameter Development. *The Journal of Physical Chemistry* 99, 3832-3846 (1995).
3. Case, D.A. et al. The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem* 26, 1668-1688 (2005).
 4. Kirschner, K.N. et al. GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field. *Carbohydrates*. *J Comput Chem* 29, 622-655 (2008).
 5. Tsui, V. & Case, D.A. Theory and applications of the generalized Born solvation model in macromolecular simulations. *Biopolymers* 56, 275-291 (2001). 10
 6. Patrick, W.M. & Firth, A.E. Strategies and computational tools for improving randomized protein libraries. *Biomolecular Engineering* 22, 105-112 (2005).
 7. Miller, K.D., Pefaur, N.B. & Baird, C.L. Construction and screening of antigen targeted immune yeast surface display antibody libraries. *Curr Protoc Cytom Chapter 4, Unit 4 7* (2008).
 8. Benatuil, L., Perez, J.M., Belk, J. & Hsieh, C.M. An improved yeast transformation method for the generation of very large human antibody libraries. *Protein Eng Des Sel* 23, 155-159 (2010). 20
 9. Morris, T.A., Peterson, A.W. & Tarlov, M.J. Selective binding of RNase B glycoforms by polydopamine-immobilized concanavalin A. *Analytical chemistry* 81, 5413-5420 (2009).
 10. Mega, T., Oku, H. & Hase, S. Characterization of Carbohydrate-Binding Specificity of Concanavalin A by Competitive Binding of Pyridylamino Sugar Chains. *J Biochemistry* 111, 396-340 (1992). 30
 11. Fu, D., Chen, L. & O'Neill, R.A. A detailed structural characterization of ribonuclease B oligosaccharides by ¹H NMR spectroscopy and mass spectrometry. *Carbohydr Res* 261, 173-186 (1994).
 12. Noble, J.E., Knight, A.E., Reason, A.J., Di Matola, A. & Bailey, M.J. A comparison of protein quantitation assays for biopharmaceutical applications. *Mol Biotechnol* 37, 99-111 (2007). 40
 13. Prien, J.M., Prater, B.D. & Cockrill, S.L. A multi-method approach toward de novo glycan characterization: a Man-5 case study. *Glycobiology* 20, 629-647 (2010).

14. Giancola, C. et al. Thermodynamic stability of the two isoforms of bovine seminal ribonuclease. *Biochemistry* 39, 7964-7972 (2000).
15. Del Vecchio, P., Catanzano, F., de Paola, B. & Barone, G. Thermodynamic Stability of Ribonuclease B. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 61, 363-368 (2000).
16. Rudd, P.M., Scragg, I.G., Coghill, E. & Dwek, R.A. Separation and analysis of the glycoform populations of ribonuclease B using capillary electrophoresis. *Glycoconj J* 9, 86-91 (1992). 10
17. Joao, H.C., Scragg, I.G. & Dwek, R.A. Effects of glycosylation on protein conformation and amide proton exchange rates in RNase B. *FEBS Lett* 307, 343-346 (1992).
18. Zauner, G., Koeleman, C.A., Deelder, A.M. & Wuhrer, M. Protein glycosylation analysis by HILIC-LC-MS of Proteinase K-generated N- and O-glycopeptides. *J Sep Sci* 33, 903-910 (2010).
19. Chao, G. et al. Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. *Nat. Protocols* 1, 755-768 (2006). 20
20. Ackerman, M. et al. Highly avid magnetic bead capture: An efficient selection method for de novo protein engineering utilizing yeast surface display. *Biotechnology Progress* 25, 774-783 (2009).
21. Asensio, J.L., Ardá, A., Cañada, F.J. & Jiménez-Barbero, J. Carbohydrate–Aromatic Interactions. *Accounts of Chemical Research* 46, 946-954 (2012).

【 0 1 9 2 】

実施例 3

L e c t e n z (登録商標) 候補の実験的特徴付け 30

コンピューターガイド酵母ディスプレイライブラリー選択から選択された4つの L e c t e n z (登録商標) 候補 (R 6 1 7、R 6 1 1 3、R 9 1 1、及び R 9 1 1 3) を、大腸菌 (E . c o l i) 発現系で発現させて、固定金属アフィニティークロマトグラフィー (I M A C) によって精製し、続くサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) によって純タンパク質を得た。精製タンパク質を使用して、その N - 糖ペプチド親和性試薬としての実用性を、表面プラズモン共鳴 (S P R)、グリカンアレイスクリーニング、及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて調べた。

【 0 1 9 3 】

P N G a s e F クローンの細菌発現ベクターへのクローニング

p O P H 6 細菌発現ベクターを用いた大腸菌 (E . c o l i) でのフラボバクテリウム ・ メニンゴセプチカム (F l a v o b a c t e r i u m m e n i n g o s e p t i c u m) P N G a s e F の高い収率及び可溶性の発現が、L o o r a によって報告された¹。p O P H 6 ベクターは、P N G a s e F をペリプラズムに誘導するために N 末端 O m p A ペリプラズム分泌タグを含む。この構築物はまた、発現 P N G a s e F の I M A C 精製のための C 末端ヒスチジンタグも含む。このベクターを用いて、部位特異的突然変異誘発によって D 6 0 A 点突然変異体を作製した (D r . L o r e t t a Y a n g)。 40

【 0 1 9 4 】

加えて、酵母ディスプレイ選択 P N G a s e F クローン (R 6 1 7、R 6 1 1 3、R 9 1 1、及び R 9 1 1 3) も、オリゴヌクレオチドプライマー (図 1 9) を用いて p O P H 6 ベクターにクローニングした。これらのプライマーは、P N G a s e F - p P N L 50

6 ベクターの PNGase F クローン配列を PCR 増幅して、隣接 EcoRI 及び BamHI 制限部位を完全長 PCR 産物に導入するように設計した。PCR 産物を EcoRI 及び BamHI 制限酵素で二重消化して、既に二重消化された pOPH6 空ベクターに結合した。DNA 配列決定により、R617、R6113、R911、及び R9113 の pOPH6 ベクターへのクローニングの成功を確認した。しかしながら、発現タンパク質は、マウス抗 His6x HRP 結合抗体を用いたウェスタンブロット法では検出できなかった。従って、新たな発現ベクター、pOPH6 II ベクターを設計した。

【0195】

pOPH6 II 細菌発現ベクターは、pBluescript II KS(-) ベクターをベースとした。カスタムオリゴヌクレオチドプライマーは、pOPH6 ベクター (図20) の ompA - PNGase F - His6x 配列を PCR 増幅するように設計した。目的の全配列が確実に含まれるように、OmpA 配列の上流に XbaI 制限部位を含む T7 フォワードプライマーを使用した。加えて、リバースプライマーは、XhoI 制限部位を停止コドンのすぐ下流に導入するように設計した。これらの制限部位を使用して PCR 産物を二重消化して、遺伝子を XbaI 及び XhoI 二重消化 pBluescript II KS(-) ベクター (図21) にクローニングした。OmpA - PNGase F - His6 発現配列クローンを含む結合プラスミドを PNGase F - pOPH6 II として同定し、ベクター地図が図22に示されている。5つの pOPH6 II プラスミドを構築し、それぞれは、目的の5つの PNGase F クローン: D60A、R617、R6113、R911、及び R9113 の内の1つを含んでいた。元の pOPH6 ベクターとは異なり、発現及び精製が、pOPH6 II ベクターを用いて無事達成された。

10

20

【0196】

PNGase F クローンの発現及び精製

元の pOPH6 ベクターを用いた酵母ディスプレイ選択 PNGase F クローンの発現に、既に公表されたプロトコルを用いて成功した¹、²。しかしながら、発現及び精製は、Filitchevaらによって開発されたプロトコルを用いて PNGase F - pOPH6 II ベクターで無事成功した²。このプロトコルは、PNGase F クローンの発現及び精製を最適化するために採用した。

30

【0197】

5つ全ての PNGase F - pOPH6 II (D60A、R617、R6113、R911、及び R9113) プラスミドで、発現のために大腸菌 (*E. coli*) BL21-Gold (DE3) コンピテント細胞を形質転換した。目的のタンパク質の発現は、イソプロピル-1-チオ-D-ガラクトピラノシド (IPTG) 誘導性 T7 プロモーターの制御下にある。要約すると、100 µg/mL のカルベニシリンを含む 50 mL の開始 LB 培地を、LB - カルベニシリン寒天プレートから選択された単一形質転換コロニーで接種し、37 °C の振盪インキュベーターで一晩増殖させた。培養物を、37 °C に予熱された 1 L のカルベニシリンを含む LB で増殖させた。温度を、OD₆₀₀ が 0.4 ~ 0.5 の間で 22 °C に低下させ、培養物を IPTG で誘導し、約 22 時間のインキュベーションを続けた。培養物を、細胞ペレットを収集することによって回収し、これをフレンチプレスによって機械的細胞溶解物にした。この細胞溶解物を遠心分離機にかけて、不溶性細胞デブリを、ペリプラズム画分を含む上清から分離した。このペリプラズム画分を IMAC カラムにかけて、PNGase F クローンをイミダゾール勾配で溶出させた。溶出ピークの画分をプールし、10 kDa カットオフ VivaSpin 濃縮器を用いて濃縮し、そして純度を高めるためにサイズ排除クロマトグラフィーにかけた。PNGase F クローンの溶出ピーク画分をプールし、濃縮し、そして UV 280 吸光度 (A²⁸⁰) によってタンパク質収量を決定した。

40

【0198】

発現 wt PNGase F 及び D60A クローンの IMAC 及び SEC クロマトグラム溶出プロフィールは類似していた。図23は、D60A の IMAC 溶出クロマトグラムを

50

示している。発現及び I M A C 精製サンプルを、変性 S D S - P A G E 及びウェスタンブロット法によって分析し、ゲル及びプロット画像が図 2 4 に示されている。同様に図 2 5 及び図 2 6 は、対応する D 6 0 A の S E C 溶出クロマトグラムを示し、S D S - P A G E 及びウェスタンブロット画像が図 2 6 に示されている。可溶性ペリプラズム画分サンプル（図 2 4 a のレーン 3）と不溶性細胞溶解物（図 2 4 a のレーン 5）の S D S - P A G E ゲル比較により、D 6 0 A の移動に一致するかなり大きい 3 6 k D a タンパク質バンドが不溶性細胞溶解物中に存在することが示されている。しかしながら、このタンパク質バンドの僅か部分しか、ウェスタンブロット法では検出されなかった（図 2 4 b のレーン 5）。これらのデータを総合すると、ウェスタンブロット法により、発現 D 6 0 A タンパク質の殆どが、可溶性ペリプラズム画分中であり（図 2 4 のレーン 3）、最小限の量が不溶性細胞溶解物中であり（図 2 4 b のレーン 5）、不溶性細胞溶解物のクマーシー染色ゲルで観察されたかなり大きい 3 6 k D a のバンドが D 6 0 A ではなかった（図 2 4 a のレーン 5）ことが示される。サンプルを通過する負荷の分析により、D 6 0 A タンパク質がウェスタンブロット法で検出されなかったため（図 2 4 のレーン 6）、h i s 標識 D 6 0 A タンパク質が特に I M A C カラムに保持されたことが示唆される。かなりの量の非特異的タンパク質が、サンプルを通過する同じ負荷の S D S - P A G E ゲルで確認された（図 2 4 のレーン 6）。図 2 4 のレーン 8 に示されているように、5 0 m M イミダゾール洗浄ステップより、D 6 0 A タンパク質の僅かな減少で非特異的タンパク質の殆どが除去された。従って、I M A C 溶出 D 6 0 A プールサンプルは、たとえゲル及び二重プロットが 2 4 μ g の総タンパク質で過剰負荷されたとしても、非特異的タンパク質での汚染が最小限であることが図 2 4 のレーン 9 に示されている。D 6 0 A の S E C 精製は、非特異的タンパク質溶出ピーク（図 2 5）もタンパク質バンドも、個々の溶出画分の S D S - P A G E 及びウェスタンブロット分析（図 2 6）によって検出されなかったため、純度をより一層改善する。野生型 P N G a s e F 及び D 6 0 A クローンは共に、それぞれ 1 L の発現培養物から約 3 . 0 m g の高純度タンパク質の収量で、発現及び精製に成功した。精製 P N G a s e F 及び D 6 0 A の同一性を M A L D I によって確認した。加えて、D 6 0 A の配列同一性も、L C - M S / M S によって確認した。

【 0 1 9 9 】

R 9 1 1 の I M A C 及び S E C クロマトグラム溶出プロファイルは、図 2 7 及び図 2 8 に示されているように、w t P N G a s e F 及び D 6 0 A の溶出プロファイルとは大幅に異なっていた。しかしながら、R 9 1 1 発現及び精製サンプルの変性 S D S - P A G E 及びウェスタンブロット分析は、P N G a s e F 及び D 6 0 A の結果と同様の結果を示し、R 9 1 1 の溶出プロファイルにおける差異が、変性ゲルの比較では区別できない天然 P N G a s e F 及び D 6 0 A に対する天然 R 9 1 1 の構造の変化によるものであり得ることを示唆している。R 9 1 1 の I M A C 溶出プロファイルにおける著しい差異は、2 0 . 5 % B での比較的鋭い D 6 0 A I M A C 溶出ピーク（図 2 3）と比較して 1 4 . 5 % B ~ 3 1 % B の勾配の幅広いピーク（図 2 7）の溶出であった。同様に、R 9 1 1 S E C 溶出プロファイルは、4 つの異なる溶出ピークを示し（図 2 8）、この内の後半の 3 つの溶出ピークは、変性 S D S - P A G E 及びウェスタンブロット分析による比較的純度の高い R 9 1 1 溶出サンプルに一致する（図 2 9 のレーン 7、8、及び 9）。これらのデータ、及びサイズ排除クロマトグラフィーがサイズ及び形状に基づいてタンパク質を分けることから、変性ゲル分析では区別できない R 9 1 1 構造異性体（折り畳まれた R 9 1 1 と誤って折り畳まれた R 9 1 1 との混合物の可能性が高い）が存在した可能性が高い。さらに、1 4 . 0 2 m L の保持容量で最大のピークである、これらの 3 つの R 9 1 1 溶出ピークの中の第 3 の溶出ピークのみが、同じ S u p e r o s e 1 2 1 0 / 3 0 0 G L カラムの D 6 0 A 溶出（同様に約 1 4 m L で最大のピーク）に一致していた。これは、1 4 . 0 2 m L の保持容量での第 3 の R 9 1 1 溶出ピークが、正しく折り畳まれた R 9 1 1 異性体であったことを示唆している。2 L の L B 培養物からの全 R 9 1 1 タンパク質収量は、約 2 . 0 m g であり、S E C 溶出ピーク 1 からの約 1 . 3 1 m g（6 5 %）、S E C 溶出ピーク 2 からの約 0 . 3 m g（1 5 %）、及び S E C 溶出ピーク 3 からの約 0 . 4 m g

10

20

30

40

50

(20%) に一致する。正しく折り畳まれた全 R911 が僅か 20% の場合は、有効収量が僅か約 0.4 mg であった。円偏光二色性又は NMR 実験が、これらの仮定の 3 つの折り畳まれた R911 異性体と誤って折り畳まれた R911 異性体との間の一般的な構造上の差異の確認に役立ち得る。

【0200】

R617、R113、及び R9113 クローンを発現させて精製するためにいくつかの試みを行ったが；IMAC 溶出プロフィールは常に、R911 に対してより浅い溶出プロフィールであるが同様のボード (board) を有し、ウェスタンブロット法による検出にはタンパク質の量が不十分であった。野生型 PNGase F は、適切な折り畳みに必要な 3 つのジスルフィド結合を有し、4 つ全ての酵母ディスプレイ選択クローンが、突然変異誘発の 1 つの部位にシステイン残基を誘導したため (表 6)、さらなるシステインの追加が、誤って折り畳まれた疑いのある R911 並びに研究のための his 標識 R617、R6113、及び R9113 の精製ができないことに寄与したとしても驚きではない。従って、点突然変異体 R617 C57D、R6113 C192G、R911 C60A、及び R9113 C60A を構築し、これらの点突然変異体では、R617 及び R6113 システイン残基が野生型に戻り、D60 が触媒活性に必要であることから、R911 及び R9113 システイン残基が、野生型アスパラギン酸の代わりにアラニンに突然変異した。表 8 は、目的の PNGase F クローンの物理的及び化学的性質を列記している。

10

【0201】

20

【表 8】

PNGase F クローンの物理的及び化学的性質。アミノ酸配列に基づいた ExPASy

ProtParam 計算特性が報告された³。分子量、等電点、及び吸光係数(ϵ)値が列記されている。

PNGase F クローン (326 のアミノ酸)	分子量	等電点	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)	ϵ ($L g^{-1} cm^{-1}$)	$\epsilon^{1\%}$
wtPNGase F	36251.6	7.75	73715	2.0334	20.334
D60A	36207.6	8.14	73715	2.0359	20.359
R617	36104.5	8.70	72225	2.0004	20.004
R617 C192G	36058.4	8.74	72225	2.0030	20.030
R6113	36260.7	8.82	77725	2.1435	21.435
R6113 C57D	36272.7	8.74	77725	2.1428	21.428
R911	36281.8	8.36	79215	2.1833	21.833
R911 C60A	36249.7	8.40	79215	2.1853	21.853
R9113	36372.9	8.36	84715	2.3291	23.291
R9113 C60A	36340.8	8.40	84715	2.3311	23.311

30

40

【0202】

システイン点突然変異体の発現の成功は、IMAC 精製 R617 C57D、R6113 C192G、R911 C60A、及び R9113 C60A のウェスタンブロット分析によって確認された (データは不図示)。しかしながら、R911 C60A しか実験要件に十分な量を産生することができなかつたため、R911 及び R911 C60A のみをさらに調べた。システイン点突然変異体により、追加のシステインの存在が、R911 の変更された溶出プロフィール及び提案された構造的異性体に対して部分的にしか関

50

与していないことが確認された。興味深いことに、R 9 1 1 C 6 0 A の溶出プロフィール（データは不図示）は、R 9 1 1 の溶出プロフィールに一致し（図 2 7、図 2 8、図 2 9）、他の 5 つの突然変異残基が、R 9 1 1 の変更された I M A C 及び S E C 溶出プロフィールに寄与するはずであることを示唆している。

【 0 2 0 3 】

活性及び動態の研究

w t P N G a s e F 酵素を高親和性 L e c t e n z（登録商標）試薬に変換するために、触媒活性を無くし、同時に親和性を高める必要がある。P N G a s e F D 6 0 A 単一点突然変異体は、3 つの理由から特に興味深かった：（1）残基 D 6 0 は、この突然変異が酵素を触媒的に不活性することを実証した D 6 0 N 点突然変異体の研究に基づくと触媒活性を必要とする⁴、（2）コンピューターアラニンスキャニングデータ（表 5）が、基質親和性に有利な相互作用エネルギーを予測した、及び（3）D 6 0 A 単一点突然変異体が、定方向進化によって親和性が向上しなかったことから、D 6 0 A を、親和性が向上した R 9 1 1 クローンとの比較のための触媒的に不活性な親和性が向上しない対照として使用することが適切であった。

【 0 2 0 4 】

【表 9】

ウシ膵臓 RNase の性質。RNase A 及び RNase B を Sigma から入手した。RNase A 及び RNase B の報告された純度が、SDS-PAGE により決定され、それぞれ 90% 及び 80% である。RNase B は RNase A のグリコシル化変異体である。N34 のグリコシル化部位は、9 つの糖型を有することが報告され、従って報告された質量は、グリコシル化種^a のそれぞれの相対存在量から得られる平均値である⁵。分子量、等電点、及び吸光係数(ϵ)値が列記されている。

RNase (124 のアミノ酸)	分子量 (Da)	等電点	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)	ϵ ($L g^{-1} cm^{-1}$)	$\epsilon^{1\%}$
RNase A	13,700	9.6	8,640	0.71	7.1
RNase B	15,095 ^a	-	8,213	0.80	8.0

【 0 2 0 5 】

クローン D 6 0 A 及び R 9 1 1 の酵素活性の両方を調べた。グリコシル化基質、R N a s e B、及び非グリコシル化型、R N a s e A の性質が表 9 に示されている。ゲルシフトアッセイを用いて、w t P N G a s e F 酵素に対する変性 R N a s e B におけるクローンの N - 脱グリコシル化触媒活性を決定した（表 1 0）。D 6 0 A 単一点突然変異体は、著しく低下した触媒活性（w t P N G a s e F に対して約 1 3 %）を有し、R 9 1 1 クローンは、一晚の反応ではサンプル中で検出可能な触媒活性を示さなかった。R N a s e B の脱グリコシル化は、A B S C I E X 5 8 0 0 T O F - T O F を用いるマトリックス支援レーザー脱離 / イオン化（M A L D I）質量分析（M S）によってさらに確認された。脱グリコシル化 R N a s e B 産物の質量は、R N a s e A と一致することが確認され、相違は、N - グリカン切断反応中に P N G a s e F による脱アミノ反応により N 3 4 が D 3 4 になることである⁶。

【 0 2 0 6 】

【表 10】

PNGase F クローンの脱グリコシル化活性。ゲルシフトアッセイを用いて、wtPNGase F に対する PNGase F クローンの脱グリコシル化活性を決定した。50ng の wtPNGase F、D60A、及び R911 をそれぞれ、50mM EPPS 中、50 μ g の変性 RNase B と共に、pH 8.0、50 μ L の反応容量、37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。サンプルを SDS-PAGE ゲル上で分析し、RNase B に対する脱グリコシル化 RNase B 産物の移動の変化を観察した。スキャンしたゲル画像を ImageJ ソフトウェアによって分析して、RNase B 基質に対する脱グリコシル化産物を定量した⁷。脱グリコシル化産物は、MALDI TOF-TOF 質量分析によって確認した。

	wtPNGase F	D60A	R911
RNase B における 脱グリコシル化活性	100%	13.4%	非検出

10

【0207】

生体分子相互作用の速度実験を、表面プラズモン共鳴 (SPR) によって Biacore 3000 装置で行った。SPR は、平面偏光入射光が、電子の振動を刺激するとき生じる現象、又は金属 (導電性) / 誘電体界面に平行な電磁波 (プラズモン) の伝播である。プラズモン波は、金属と約 300 nm に亘って広がる液体 (又は空気) 媒体との界面を伝播し、分子の表面への吸着による界面での変化により、全反射の条件下での反射入射光の角度のずれを引き起こす波動伝播が起こる。全反射は、プラズモンが励起される金表面にガラスプリズムを直接配置することによって達成される。質量の移動に対する SPR の高い感度により、SPR が、生体分子の相互作用の測定に利用されている⁸。カルボキシ修飾デキストラン金表面を使用することにより、目的の標的リガンドを、アミン結合を用いてデキストラン誘導体化 (dextran-derivitized) 金表面に共有結合により固定することができる。

20

【0208】

SPR によるレクチン - 炭水化物相互作用の評価は、速度論的分析のための十分に確立された技術である^{9、10}。CM-5 カルボキシメチルデキストランセンサーチップは、目的のリガンドのアミン結合に利用される。しかしながら、このアプローチは、リガンドの向きがランダムとなり、リガンドの向きが目的の分析物との相互作用に特に重要である場合、又はリガンドの向きの影響が特定の利益である場合は適切ではないであろう。リガンドの向きは、Ni-NTA 誘導体化デキストラン表面を用いてヒスチジン標識タンパク質を捕捉することによって達成することができる¹¹。このアプローチは、捕捉分子が共有結合しないため捕捉分子が表面に吸着するという重大な難点を有する。近年、吸着に勝るヒスチジン標識タンパク質の共有結合固定化が実証された¹²。マイクロ流体を使用して、目的の分析物を、生体分子 (固定されたリガンドと分析物) 間の相互作用が起こり得る、固定されたリガンドを含むフローセルを通過させる。同時に、センサー表面の反対側において、反射光の角度の変化の程度が質量の変化に比例する。

30

【0209】

変性 RNase B、及び RNase B と同じペプチド配列を有するが N-グリコシル化を有していない変性 RNase A は、アミン結合化学を用いて CM-5 チップに共有結合させた。RNase リガンドを、CM-5 センサーチップのカルボキシメチルデキストラン表面に固定する前に、pH スカウティング実験により、効率的な結合に最適な pH 5.5 が示された (図 30)。約 3000 RU の理論 R_{MAX} を得るために十分なりガンド結合で高密度表面を用意した。wtPNGase F に対する R911 の D60C 突然変異の影響を評価するために、R911 C60A 突然変異体も評価した。生体分子相互作用モデルを用いる定常状態結合反応速度を、Biacore 3000 装置を用いて決定した。

40

【0210】

50

RNase Bと酵母PNGase酵素との間及びRNase Bと突然変異体酵素との間の結合反応速度を測定するためのSPRの使用を実証した¹⁻³。同様の戦略を用いて、変性RNase BをCM-5センサーチップに固定し、段階希釈濃度のwtPNGase F、D60A、R911、及びR911 C60Aを、結合反応速度を測定しながらセンサー表面を通過させた。反応速度の要約が表11に示され、センソグラムが図31に示されている。wtPNGase Fは、 $6.4 \mu\text{M}$ の K_D 及び 0.1×10^{-1} /秒の解離速度(k_{off})を有する。D60A対照クローン($K_D = 2.7 \mu\text{M}$)に対して、選択されたR911クローンは、10倍増加した親和性($K_D = 0.26 \mu\text{M}$)を有する。さらに、選択されたR911クローンは、D60A対照クローン($k_{off} = 4.3 \times 10^{-1}$ /秒)に対して、84分の1の解離速度($k_{off} = 5.1 \times 10^{-3}$ /秒)を有する。R911 C60A変異体クローンは、D60A対照クローンに対して、僅か1.3倍増加した親和性($K_D = 2.0 \mu\text{M}$)及び35分の1の解離速度($k_{off} = 1.2 \times 10^{-2}$ /秒)を示した。変性リボヌクレアーゼA(dRNase A)はRNase Bの非グリコシル化型であるため、この変性リボヌクレアーゼAも陰性対照リガンドとして利用したが；当然、RNase Aが、PNGase Fによって認識されるN-グリカン部分を有していないことから、特定の反応速度測定は行うことができなかった。具体的には、約1800RUの理論上最大の反応(R_{MAX})を得るために、dRNase Aが固定された高密度表面を用意したが；wtPNGase F、D60A、R911、及びR911 C60Aで測定された反応は R_{MAX} を超えており、相互作用が非特異的であったことを示唆している。

10

20

【0211】

【表11】

PNGase F クローンの表面プラズモン共鳴反応速度データ。表面プラズモン共鳴によって決定された、変性糖タンパク質RNase B(dRNase B)とPNGase F突然変異クローンとの間の相互作用の解離定数(K_D)及び解離速度定数(k_{off})。CM5 センサーチップに固定されたりガンドとしてのdRNase B 及び分析物としてのPNGase F クローンで決定された反応速度データ。実験による $\Delta G_{BIND-EXP}$ 結合相互作用エネルギー($\Delta G_{BIND-EXP}$)を K_D から計算した。

PNGase F クローン	$\Delta G_{BIND-EXP}$ (kcal/mol)	K_D (M)	相対親和性の向上	k_{off} (s^{-1})	相対解離速度の向上
wtPNGase F	-7.103	6.4×10^{-6}	-	0.1×10^{-1}	-
D60A	-7.609	2.7×10^{-6}	1x	4.3×10^{-1}	1x
R911	-8.990	2.6×10^{-7}	10x	5.1×10^{-3}	84x
R911 C60A	-7.768	2.0×10^{-6}	1.3x	1.2×10^{-2}	35x

30

40

【0212】

活性アッセイ及び反応速度データは、選択されたR911クローンが、触媒的に不活性であり、かつ親和性が向上していないPNGase F D60A対照クローンに対して著しく向上した親和性を有することを示している。加えて、産物を放出する速い代謝回転を一般に有する酵素とは異なり、遅い解離速度が、標的グリカンを濃縮する有用な親和性試薬にとって極めて重要であるため、R911の解離速度の向上は、大きな影響を与える。R911 C60Aクローンの速度論的分析は、60位のシステイン残基の重要性についてのさらなる洞察を提供する。親和性及び解離速度の両方は、C60A突然変異によって悪影響を受ける。これは、情報の2つの極めて重要な点を示す：(1) R911のD60C突然変異は、高い親和性にとって重要である、及び(2) その改善された親和性もまた、R911の遅い解離速度に直接影響を与える。これらの結果に基づいて、R911は、Lectenz (登録商標) 候補の速度論的基準を満たす。wtPNGase Fに対するR911突然変異のエネルギー寄与のコンピューターモデリングベースの分析が実施例4で説明される。

【0213】

50

Lectenz (登録商標) アフィニティークロマトグラフィー

レクチンアフィニティークロマトグラフィーは、グリカン及び複合糖質の単離及び濃縮に最も広く利用されている技術である¹⁴。抗体及びレクチンのような現在の炭水化物検出試薬の固有の制限にもかかわらず、多数の親和性ベースのグリカン及び複合糖質の濃縮方式が開発され、この適用例の強い必要性を示している。一般的な濃縮技術は、遠心分離機、スピン又は低圧LCカラム、及び高圧/高流量レクチンクロマトグラフィーを可能にするHPLC互換性マトリックスに詰め込まれたアガロース/セファロースに結合したレクチン、並びにピペット先端部に埋め込まれたレクチン修飾金ナノ粒子を含む¹⁴、¹⁵。近年、連続レクチンアフィニティークロマトグラフィーが、血清及び癌細胞溶解物のような複合サンプルから目的の糖タンパク質を濃縮するために利用されている¹⁶、¹⁷。しかしながら、このため、サンプルの濃縮又は単離に使用される試薬の選択は、糖鎖生物学的分析の結果を、レクチン又は抗体の結合特性に基づいて複合糖質のサブセットに偏らせ得る¹⁸。

10

20

30

40

50

【0214】

アフィニティークロマトグラフィー形式での複合糖質の濃縮へのR911 Lectenz (登録商標) 候補の適用を調べた。HiTrap N-hydroxysuccinamide (NHS) 活性化HPカラムを用いて、精製PNGase F D60A及びR911クローンをカラムのマトリックスに共有結合させて、N-糖ペプチド及びN-糖タンパク質のアフィニティークロマトグラフィーベースの濃縮を評価した。クローンのNHS活性化カラムへの結合効率は、全てのNHS活性化カラム結合反応に対して一貫して80%~87%の範囲である。結合緩衝液は、10mM HEPES、10mM NaCl、pH7.4で構成され、溶出緩衝液は、10mM HEPES、150mM NaCl、pH7.4で構成され、クロマトグラフィーにかけるときは常に0.4mL/分の一定流量とした。

【0215】

RNase BとRNase Aの濃縮の比較

対照D60Aのアフィニティークロマトグラフィーの結果は、N-グリコシル化RNase BがRNase Aに対して濃縮されないことを示している(図32)。1.25mLの保持容量での通過ピークは、最初のロード(0~5mLの保持容量)の際にRNase B及びRNase Aの両方がカラムを通過し、D60Aとの相互作用によって保持されなかったことを示している。溶出緩衝液(5~10mLの保持容量)を通したときにRNase Bでは溶出ピークが観察されなかった。小さい溶出ピークが、7.22mLの保持容量で、RNase Aで見られる。これは、RNase Aサンプルが90%の純度であるためこのサンプル中の不純物によるものであり得、そして混入物としていくらかのRNase Bを含む可能性がある。加えて、wtPNGase Fは、キトビオースコア、及びペプチド主鎖のペプチドグリコシル化配列sequone (Asn-X(-Pro)-Ser/Thr)の両方を認識することが知られ、従って、RNase AのAsn-Leu-Thrグリコシル化sequoneが、D60A単一点突然変異体によってなんとか認識される可能性がある。しかしながら、RNase Aから観察される小さい溶出ピークの相対量は最小限である。

【0216】

D60Aとは異なり、R911のアフィニティークロマトグラフィーのロード及び溶出プロフィールは、RNase Aと比較したN-グリコシル化RNase Bの濃縮を示している(図33)。特異的なR911:RNase Bグリカン相互作用を確認するために、RNase BをPNGase Fで脱グリコシル化した。脱グリコシル化RNase Bを、R911アフィニティークロマトグラフィーカラムに通した(図34)。クロマトグラムは、脱グリコシル化RNase BがR911によって保持されずにカラムを通過したことを示している。総合すると、これらの結果は、R911とRNase Bグリカンとの間の特異的な相互作用を裏付ける。

【0217】

R N a s e A 及び R N a s e B トリプシン消化のアフィニティークロマトグラフィー R 9 1 1 を用いて N - 糖ペプチドからのペプチドの分離を調べるために、R N a s e A 及び R N a s e B をトリプシンで消化した。トリプシン消化物を R 9 1 1 カラムにロードした。R N a s e A トリプシン消化ペプチドをカラムに通すと、R N a s e B トリプシン消化サンプルの一部がカラムに保持され、これを溶出緩衝液で溶出させた (図 3 5) 。通過及び溶出サンプルを L C - M S / M S によって分析して、一部の N - 糖ペプチドが濃縮されたことを確認した。

【 0 2 1 8 】

R N a s e B の遊離キトビオースでの競合溶出

R 9 1 1 結合 R N a s e B のキトビオースでの競合溶出を行って、N - グリカン構造のキトビオースコアの R 9 1 1 との特異的な相互作用をさらに確認した。まず、R N a s e B を R 9 1 1 アフィニティマトリックスにロードし、次いで、標準溶出緩衝液の代わりの結合緩衝液中、遊離キトビオースで競合的に溶出させた (図 3 6) 。溶出サンプルの L C - M S / M S 分析により、R N a s e B がキトビオースで競合的に溶出されたことを確認した。

10

【 0 2 1 9 】

キトビオースでの競合溶出を用いた M C F 7 全細胞抽出物からの N - 糖タンパク質の濃縮

R 9 1 1 の N - 糖タンパク質親和性濃縮試薬としての適用を、M C F 7 全細胞抽出物を用いて実証した。細胞抽出物 (1 0 0 μ g) を、R 9 1 1 アフィニティークロマトグラフィーにロードし、次いで、標準溶出緩衝液の代わりの結合緩衝液中、遊離キトビオースで競合的に溶出させた (図 3 7) 。1 . 1 9 m L の保持容量で観察されたピークに一致する細胞抽出タンパク質の大部分をカラムに通し、約 6 . 6 μ g のタンパク質がカラムに保持され、これを、6 . 6 3 m L の保持容量でのピークに一致する遊離キトビオースで競合的に溶出させた。

20

【 0 2 2 0 】

ストック M C F 7 細胞抽出物サンプル及び競合的に溶出されたサンプルを L C - M S / M S によって分析し、タンパク質を UniProt 及び UniPeptide データベースで同定した^{19、20}。R 9 1 1 Lectenz (登録商標) アフィニティークロマトグラフィー (L A C) の結果を、Jac、ConA、及び WGA レクチンを用いて同様に M C F 7 細胞抽出物で行われた、報告されたマルチレクチンアフィニティークロマトグラフィー (M L A C) 実験と比較し、表 1 2 に要約されている¹⁷。M C F 7 細胞抽出物での M L A C により、溶出された 8 8 のタンパク質の内の 8 4 % が糖タンパク質であるという結果になる。R 9 1 1 Lectenz (登録商標) アフィニティークロマトグラフィーにより、溶出された 7 3 のタンパク質の内の 7 1 . 2 % が糖タンパク質であるという結果になる。R 9 1 1 L A C で溶出された糖タンパク質は、M L A C で溶出された糖タンパク質と大部分が異なっている。さらに、M L A C によって同定された 1 1 の糖タンパク質は、M C F 7 細胞抽出物中には存在したが、R 9 1 1 L A C によって濃縮されなかった。これらの相違は、濃縮のために利用された捕捉試薬の異なる特異性を考えると驚くべきことではない。

30

【 0 2 2 1 】

R 9 1 1 L A C による糖タンパク質濃縮の要約が表 1 3 に示されている。M C F 7 細胞抽出物ストックサンプルに対して、R 9 1 1 L A C 溶出糖タンパク質サンプルは、3 . 4 倍の糖タンパク質の濃縮を示している。さらに、溶出された糖タンパク質は、4 2 . 5 % の (3 1) N - 糖タンパク質及び 2 8 . 8 % の (2 1) O - 糖タンパク質からなり、2 . 0 倍の N - 糖タンパク質の濃縮及び 5 . 2 倍の O - 糖タンパク質の濃縮を表している。

40

【 0 2 2 2 】

【表 1 2】

MCF7 細胞抽出物での MLAC と R911 Lectenz®アフィニティークロマトグラフィーとの比較

クロマトグラフィー	マルチレクチンアフィニティークロマトグラフィー ¹⁷	Lectenz® アフィニティークロマトグラフィー
捕捉試薬	Jac, Con A, WGA レクチン	R911 Lectenz®
捕捉試薬(mg)	3.4 mg の全レクチン	0.22 mg の R911 Lectenz®
MCF7細胞抽出物(mg)	0.7 mg	0.1 mg
捕捉条件	4 °C での O/N インキュベーション	4 °C で 0.4 mL/分の流量
溶出された糖タンパク質	86.5%	71.2%
差異	11 の糖タンパク質が共通して検出され、MLACでは溶出されたが、Lectenz®では溶出されなかった	溶出された糖タンパク質の大部分が MLAC とは異なっている

10

【 0 2 2 3】

R 9 1 1 L A C による O - 糖タンパク質の濃縮は、R 9 1 1 が N - グリカンプロセシング酵素 PNGase F に由来するため予想外であり、N - 糖ペプチド及びキトビオースコアに対する酵素の基質特異性は十分に確立されている^{4、21~24}。O - 糖タンパク質の濃縮の洞察が、溶出された O - 糖タンパク質の 76% (16) が O - GlcN アシル化されているという観察から得られ、R 9 1 1 の認識される共通の構造モチーフが、N - 糖タンパク質及び O - GlcN アシル化糖タンパク質の両方の GlcNAc を還元する可能性が高いことを示唆している^{25、26}。従って、N - 糖タンパク質及び O - GlcN アシル化糖タンパク質の両方の濃縮は、R 9 1 1 Lectenz (登録商標) によって達成することができ、この濃縮物が、N - 糖タンパク質及び O - GlcN アシル化糖タンパク質の両方に共通のコアモチーフを認識することができるユニークな捕捉試薬となる。濃縮 N - 糖タンパク質及び O - 糖タンパク質はそれぞれ、表 1 4 及び表 1 5 に列記されている。

20

【 0 2 2 4】

【表 1 3】

MCF7 細胞抽出物糖タンパク質の R911 Lectenz®アフィニティークロマトグラフィー濃縮

	ストック MCF7細胞抽出物サンプル	R911Lectenz®溶出 MCF7 サンプル	濃縮
総糖タンパク質 (%)	26.9%	71.2%	3.4x
N-糖タンパク質 (%)	21.2%	42.5%	2.0x
O-糖タンパク質 (%)	5.5%	28.8%	5.2x
		(76% が O-GlcN アシル化されている)	

30

40

【 0 2 2 5】

【表 1 4】
LC-MS/MS によって同定された溶出 MCF7 N-糖タンパク質

アクセッション	遺伝子 記号	細胞内位置	N-糖タンパク質	分子量 (kDa)	
8WZ42-2	TITIN	ゴルジ, 細胞質, 核	チチンのアイソフォーム 2	3803.48	
P21333-2	FLNA	trans-ゴルジ, 細胞質, 細胞骨格	フィラミン-A のアイソフォーム 2	279.83	
P19835-2	CEL	分泌	胆汁塩活性化リパーゼが足りない アイソフォーム	71.77	10
P02768	ALBU	分泌	血清アルブミン前駆体	69.30	
P29401	TKT	細胞外小胞エキソソ ーム, 核, ペルオキ シソーム, サイトゾル	トランスケトラーゼ	67.82	
P04264	KRT1	細胞外空間	ケラチン, II 型細胞骨格 1	65.98	
P35908	KRT2A	ゴルジ, 細胞外空間	ケラチン, II 型細胞骨格 2 表皮性	65.38	
P33527	Z29074	細胞外空間	ケラチン 9, 細胞骨格, (サイトケラ チン 9)	62.07	20
P48669	K2CF	細胞外小胞エキソソ ーム	ケラチン, II 型細胞骨格 6F (サイト ケラチン 6F) (CK6F) (K6F ケラ チン)	60.01	
P13645	K1CJ	細胞外小胞エキソソ ーム, 細胞質	ケラチン, I 型細胞骨格 10 (サイトケ ラチン 10) (K10) (CK 10)	59.46	
P04745	AMY1A	分泌	α -アミラーゼ 1	57.71	
P19013	K2C4	細胞骨格	ケラチン, II 型細胞骨格 4 (サイトケ ラチン 4) (K4) (CK4)	57.21	30
P01008	SERPINC1	分泌, 細胞外空間	抗トロンピン-III	52.55	
P08729	K2C7	ゴルジ装置, 細胞質, 細胞骨格	ケラチン, II 型細胞骨格 7 (サイトケ ラチン 7) (K7) (CK 7)	51.29	
P16233	PNLIP	分泌	膵臓トリアシルグリセロールリパーゼ	51.11	
P15086	CBPB1	分泌	カルボキシペプチダーゼ B	47.32	
P15085	CBPA1	分泌	カルボキシペプチダーゼ A1	47.09	40
O60664	PLIN3	ゴルジ, エンドソーム 膜	ペリリピン-3	47.03	
P48052	CBPA2	分泌	カルボキシペプチダーゼ A2	46.98	
P28799-2	GRN	分泌	グラニューリンのアイソフォーム 2	46.94	

Q9H8S1	Q9H8S1	分泌	cDNA FLJ13286 fis, クローン OVARC1001154, ホモサピエンス クローン 24720 エピセリン 1 及び 2 mRNA に酷似	44.08	
P55259-2	GP2	分泌	隣分泌顆粒膜主要糖タンパク質 GP2 のアイソフォーム β	43.35	
P09467	FBP1	細胞外 小胞エキソ ソーム, サイトゾル	フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ1	36.80	
Q9NP79	VTA1	細胞質, エンドソーム 膜	液胞タンパク質ソーティング関連 タンパク質 VTA1 ホモログ	33.84	10
Q01105	SET	ER, 細胞質, 核	タンパク質 SET	33.45	
P09493-3	TPM1	細胞外小胞 エキソ ソーム, 細胞質, 細胞 骨格	トロポミオシン α -1鎖のアイソフォーム 3	32.84	
P06753	TPM3	細胞外小胞 エキソ ソーム, 細胞質, 細胞 骨格	トロポミオシン α -3 鎖	32.78	20
P09093	CEL3A	分泌	キモトリプシン様エラスターゼ ファミリーメンバー3A	29.45	
P17538	CTRB1	分泌	キモトリプシノーゲン B	27.83	
F5H7S3	TPM1	細胞質, 細胞骨格	トロポミオシン α -1 鎖	27.51	
P62158	CALM1	エキソソーム小胞, 原形質膜, 細胞質, 細胞骨格	カルモジュリン	16.81	

【表 15】

LC-MS/MS によって同定された溶出 MCF7 O-糖タンパク質。21 の O-糖タンパク質の内の 16 が、O-GlcN アシル化されていることが確認された^{25,26}。

アクセッション	遺伝子記号	細胞内位置	O-糖タンパク質	分子量 (kDa)	
O60271-7	JIP4	膜, サイトゾル, 細胞外空間	C-Jun-アミノ末端キナーゼ相互作用タンパク質 4 のアイソフォーム 7	54.35	
A34720	KRT8	細胞質, 核,	* サイトケラチン 8 (2 型) - ヒト (P05787)	53.70	10
P45379-10	TNNT2	サイトゾル	*トロポニン T のアイソフォーム 10, 心筋	35.56	
P35030-2	TRY3	分泌	トリプシン-3 のアイソフォーム B	28.12	
P10412	HIST1H1E	核, 染色体	*ヒストン H1.4	21.83	
P55145	MANF	分泌	中脳星状膠細胞由来神経栄養因子	20.67	
P05451	REG1A	分泌, 細胞外空間	*リスタチン-1- α	18.70	
A6ND86	CELA2A	分泌	キモトリプシン様エラスターゼ様ファミリーメンバー2A (P08217)	15.55	20
Q5TEC6	Q5TEC6	核, 染色体	*ヒストン H3	15.40	
P68431	H31	核, 染色体	*ヒストン H3.1	15.38	
Q71DI3	H32	核, 染色体	*ヒストン H3.2	15.36	
P84243	H33	核, 染色体, 細胞外小胞エキソソーム	*ヒストン H3.3	15.30	
Q6NXT2	H3C	核, 染色体	*ヒストン H3.3C	15.19	
P16104	H2AX	核, 染色体	*ヒストン H2A.x	15.12	
Q0VAF6	SYCN	分泌顆粒膜, 輸送小囊膜	Syncollin	14.38	30
P04908	H2A1B	核, 染色体	*ヒストン H2A 1-B/E 型	14.11	
Q16777	H2A2C	核, 染色体	*ヒストン H2A 2-C 型	13.96	
P06899	H2B1J	核, 染色体	*ヒストン H2B 1-J 型	13.88	
O60814	H2B1K	核, 染色体	*ヒストン H2B 1-K 型	13.86	
P0C0S5	H2AZ	核, 染色体	*ヒストン H2A.Z	13.53	
P62805	H4	核, 染色体	*ヒストン H4	11.34	

【0227】

グリカンアレイスクリーニング

Consortium for Functional Glycomics (CFG) によって開発されたグリカンアレイは、610のユニークな哺乳動物グリカンからなり (バージョン 5.1)、かつグリカン結合タンパク質の特異性の決定における非常に貴重なツールであることが証明された^{27, 28}。天然及び合成グリカンのライブラリーは、スパーサーを含むアミノリンカーで修飾される。グリカンは、アミノ修飾スパーサーリンカーによって NHS 活性化ガラス表面に共有結合する。各グリカンは、アレイに 6 つの複製でプリントされる。表面に固定されたグリカンは殆どが、ペプチドグリコシル化 sequence (Asn-X(-Pro)-Ser/Thr) を含まない; ただし、2 つのリンカー Sp22 (ペプチド NST) 及び Sp24 (ペプチド KVANKT) を除く。ペプチ

40

50

ドsequoneの欠如は、グリカン相互作用の正常な生物学的背景から逸脱している。末端グリカン構造を認識する多くの炭水化物認識タンパク質では、これは、大きな問題ではない(例えば:末端シアル酸を認識するレクチン)。しかしながら、これは、様々なトランスフェラーゼの場合のように、グリカンが提示される又はグリカンが移送されるタンパク質の関連でグリカン構造を認識する炭水化物プロセッシング酵素では大きな問題である。wtPNGase F酵素が、sequone及びアスパラギン結合キトビオースコアからなる糖ペプチドを認識することが知られていることから、固定されたグリカンにおけるペプチドsequoneの欠如は制限である。

【0228】

PNGase F D60A及びR911クローンを、グリカンアレイスクリーニングのためにCFG's Protein-Glycan Interaction Core (旧名Core H)に提出した。精製タンパク質を、DyLight 488で標識し、そして色素:タンパク質標識比を、D60Aでは2.1:1、R911では8.2:1に決定した。標識タンパク質を、0.1% BSAを含む、10mM HEPES、10mM NaCl、pH7.4からなる緩衝液中、200µg/mLの最終濃度で、アレイでインキュベートした。インキュベーション後、0.1% BSAを含まない同じ緩衝液でアレイを洗浄した。乾燥させたアレイを、マイクロアレイスキャナーでスキャンし、個々のグリカンの特徴/スポットのシグナル強度を定量化した。

【0229】

図38は、D60A及びR911クローンのグリカンアレイスキャンニングの結果の対照比較を示している。要約すると、報告されたwtPNGase F酵素の特異性に一致する、(1,6コアフコシル化を含む、及び1,6コアフコシル化を含まない)表面固定N-グリカンとの結合相互作用を示す、高いシグナル強度が、標識D60Aで観察された。さらに、1,3コアフコシル化グリカンとのD60Aの相互作用のシグナル強度の不足も観察された。これは、wtPNGase Fが、アスパラギン結合N-アセチルグルコサミンに1,3結合フコースを有するグリカンを放出できないが、1,6コアフコシル化N-グリカンが放出され得ることに一致している。

【0230】

標識R911クローンの場合は、著しく低いバックグラウンドよりも高い、類似の表面固定N-グリカン構造のシグナル強度が、標識R911で観察された。R911のデータセットの低いSN比は、R911クローンの特異性が選択された突然変異によって変更された可能性によるものであり得る。しかしながら、これは、SPRアフィニティーデータ及びR911 Lectenz (登録商標)アフィニティークロマトグラフィーの両方の結果に一致していない。従って、低いSN比及び一見して低下したD60Aに対する特異性のより可能性の高い原因は、8.2:1の高い色素:R911タンパク質標識の比である。高い色素-標識比は、色素分子が結合ポケット内の利用可能なアミン基と相互作用する高い可能性により結合部位を破壊し得る。理想的な標識比は、D60Aの場合と同様に2:1である。よりロバスタなグリカンアレイを用いる特異性の結果を得るために、R911グリカンアレイスクリーニングを、低い色素とタンパク質標識の比で繰り返す必要がある。残念ながら、低い発現収量の結果としての精製R911の利用可能性の限定、及び複数の技術を用いたR911の特徴付けの必要性により、すぐには実験を繰り返し行うことができない。

【0231】

方法

PNGase Fクローンの発現

PNGase F-pOPH6 II (D60A、R617、R6113、R911、及びR9113)プラスミドで、発現のためにAgilent Technologies (230132)から入手した大腸菌(E. coli)BL21-Gold (DE3)コンピテント細胞を形質転換した。各クローンに対して、Luria Bertani (LB)寒天プレート(100µg/mLカルベニシリン)から採取した単一コロニーを

10

20

30

40

50

、シェーカー（250～300RPM）で、100μg/ml カルベニシリンを含む50mLのLB培地で、37℃で一晩培養した。翌日、培養物を、100μg/ml カルベニシリンを含む37℃に予熱された1LのLB培地で増殖させた。OD₆₀₀が0.4～0.5の間に、温度が37℃から22℃に低下し、1mM IPTGで誘導し、培養物を一晩誘導した（約20時間）。4℃のAvanti JA10ローターを用いて4500×g（30分間）で細胞ペレットを回収した。R911の培養では、1LのLB培地から約8gの細胞ペレットが得られた。この細胞ペレットを、20mLの氷冷IMAC結合緩衝液（0.1M EPPS、0.5M NaCl、0.01M イミダゾール、pH 8.50）で再懸濁した。RocheのEDTA-フリープロテアーゼ阻害剤タブレット（05892791001）を1mLの結合緩衝液又は分子グレードの水に溶解し、混合して再懸濁細胞ペレットにした。フレンチプレスを用いて6,000psiで細胞を3回、機械的に溶解した。細胞溶解物を、4℃のAvanti JA10ローターで、30,000×g（45分間）で遠心分離して、ペリプラズム画分を含む上清から不溶性細胞デブリを分離した。上清を収集して、0.8μmのフィルターで上清を5mLずつろ過した。

【0232】

PNGase Fクローンの固定金属アフィニティークロマトグラフィー

濾過したペリプラズム画分をIMACカラムにロードして、AKTA Purifier UPC 10を用いてPNGase Fクローンをイミダゾール勾配で溶出させた。IMAC結合緩衝液（A）は、0.1M EPPS、0.5M NaCl、0.01M イミダゾール、pH 8.50から構成され、IMAC溶出緩衝液（B）は、0.1M EPPS、0.5M NaCl、0.5M イミダゾール、pH 8.50から構成された。製造者の推奨プロコルに従って、GE Healthcare HisTrap HPカラム（17-5247-01）を洗浄し、Ni²⁺で帯電させ、そして平衡化した。プログラムされた方法（Unicorn 5.1）を、全ての精製で使用した。要約すると、ニッケル荷電HisTrapカラムを、5CVの結合緩衝液、3.5mL/分の流量で平衡化した。ペリプラズム画分（約20mL）を、P-960サンプルポンプを用いて2mL/分の流量でカラムにロードした。ロードされたカラムを、2mL/分の流量で、9CVの結合緩衝液（100%A）で洗浄した。非特異的に結合したタンパク質を、2mL/分の流量で、8.3%B（50mM イミダゾールに等しい）の10CVの段階溶出で溶出させた。2mL/分の流量で、18CVを超える43%B勾配溶出を使用して、Ni結合ヒスチジン標識PNGase Fクローンを溶出させ、溶出タンパク質の2.5mL画分を収集した。カラムを、2mL/分の流量で、100%Bの8CVの段階溶出で洗浄し、続いて、3.5mL/分の流量で、5CVを超える100%Aで再平衡化した。Vivaspin 20（10kDaカットオフ）濃縮器を用いて、溶出タンパク質含有画分をプールし、SECによるさらなる精製のために約250μLの最終容量まで濃縮した。

【0233】

PNGase Fクローンのサイズ排除クロマトグラフィー

約250μLの濃縮IMACサンプルを、SuperDex 75 10/300 GL又はSuperose 12 10/300 GLカラムを用いてSEC精製のために500μL注入ループにロードした。Superose 12カラムは、SuperDex 75カラムに対してR911の精製を向上させた。従来通り、自動化法（Unicorn 5.1）を、AKTA Purifier UPC 10での精製のために使用した。カラムを、0.4mL/分の流量で、1.5CVの泳動緩衝液（50mM EPPS、pH 8.00）で平衡化した。0.5mLのループを2.5mLの泳動緩衝液でフラッシュしてサンプルをカラムに注入し、次いで流量を0.2mL/分に下げた。画分収集（0.5mL）を6.75mLの保持容量で開始した。溶出ピークに一致する画分をプールし、10kDaカットオフVivaspin 20濃縮器を用いて濃縮し、UV280吸光度（A₂₈₀）によってタンパク質収量を決定した。0.5LのLB培地からのD60A対照クローンのSEC精製後の典型的な収量は約3.0mgであった。比較として、2LのLB培地からのR911及びR911 C60Aクローンの典型的な収量は約0.3

10

20

30

40

50

mgであった。

【0234】

SDS-PAGE及びクマーシー染色

Bio-Rad 4-20% TGXゲル(456-1093及び456-1094)及び推奨緩衝液を、タンパク質サンプルのSDS-PAGEに使用した。全てのサンプルを、製造者の推奨するLaemmliサンプル緩衝液レシピを用いて、 β -メルカプトエタノールを含む6倍のストック濃度で変性し、ゲルに移す前に95℃で5分間インキュベートした。ゲルを200V(最大150mA)で35分間泳動させた。推奨される高速マイクロ波染色及び脱染手順によって、Life Technologies' Simply Blue SafeStain(LC6060)を用いてゲルをクマーシー染色した。

10

【0235】

ウェスタンブロット法

以下の緩衝液、試薬、及び溶液を、修正された製造者のプロトコルを用いてウェスタンブロット法に使用した：

1. 10倍の転写緩衝液(1L)：250mM Tris(30.28g/L)、1.92M グリシン(144.1g/L)、0.05% SDS(5g/L)、HClによってpH8.3に調整

2. 10倍のTBS(1L)：1.4M NaCl(81.82g/L)、250mM Tris系(30.28g/L)、HClによってpH7.4に調整

3. 10倍のBLOTTING(100mL)：Bio-Radの10% 脱脂粉乳(10g)

20

(170-6404XTU)、90% NANOpure water(90mL)

4. 1倍のブロッキング緩衝液(500mL)：0.5mL(500 μ L) Tween 20、50mLの10倍のBLOTTING、50mLの10倍のTBS、400mLのNANOpure water

5. 5% ブロッキング緩衝液(2つの膜に100mL)：5% 脱脂粉乳(4g)、96mLの1倍のブロッキング緩衝液

6. 1倍のTBS(100mL)：10mLの10倍のTBS、90mLのNANOpure water

7. メタノールを含む1倍の転写緩衝液(1L) pH8.3：100mLの10倍の転写緩衝液、150mLのメタノール、750mLのNANOpure water

30

8. GE HealthcareのPVDF Hybond-P膜(RPN303F)

9. Alpha Diagnosticの西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合マウス抗ヒスチジン抗体(HISP12-HRP)

10. Thermo Scientific Pierce Metal Enhanced DAB基質溶液(34065)。

【0236】

TGXゲル及びPVDF膜を用いるタンパク質の転写を、氷上に維持した転写装置で、100V(最大350mA)で30分間行った。磁気攪拌バーを使用して、転写プロセス中に転写緩衝液を循環させた。転写後、膜を20mLのNANOpure waterで3回洗浄し、振盪台で、20mLの5% ブロッキング緩衝液で45分間ブロックし、続いて10mLの1倍のブロッキング緩衝液中、抗ヒスチジンHRP結合抗体(1:5000)と共にシェーカーで、4℃で一晩インキュベーションした。翌日、膜を20mLの1倍のブロッキング緩衝液でそれぞれ5分間洗浄し、続いてシェーカーで、20mLの1倍のTBSで同様にそれぞれ5分間、3回洗浄した。発色のためのDAB基質の添加の前に、膜を20mLのNANOpure waterですすいだ。ゲルにロードされて膜に転写されるタンパク質の量によって、膜を1~10分間発色させた。この膜を、標準卓上型スキャナーを用いるスキャンの前に、20mLのNANOpure waterで最後に1回すすぎ、次いで乾燥させた。

40

【0237】

PNGase Fクローンの脱グリコシル化活性

50

ゲルシフトアッセイを用いて、wtPNGase F 酵素に対するPNGase F クローンの脱グリコシル化活性を決定した。それぞれ50 ngのwtPNGase F、D60A、及びR911を、50 µLの反応容量で、50 mM EPPS、pH 8.0中、50 µgの変性RNase Bと共に37 °Cで一晩インキュベートした。サンプルを、SDS-PAGEゲルで分析し、脱グリコシル化RNase B産物のRNase Bに対する移動の変化を観察した。スキャンしたゲル画像をImage Jソフトウェアで分析して、RNase B基質に対する脱グリコシル化産物を定量化した(附表4)⁷。脱グリコシル化産物を、MALDI TOF-TOF質量分析によって確認した。

【0238】

タンパク質の変性

Sigmaから購入した5 mgの0.113 µmol アシアロフェチュイン(44,189 g/mol)(A4781-50MG)を、6 M グアニジンHCl(95.53 g/mol)(1 mL中、573 mg)を含む1 mLの0.1 M Tris-HCl(pH 8.0)で溶解し、28 mgの182 µmol DTT(154.25 g/mol)の添加によって55 °Cで1時間還元し、続いて128 mgの692 µmol ヨードアセトアミド(184.96 g/mol)を添加して室温で30分間維持した。0.5 mLの混合物をThermo Scientific Pierce D-Salt Polyacrylamide Desalting Columnsで脱塩し、1.75 mLの移動相体積(void volume)の後に0.5 mLの画分を収集した。

【0239】

MALDI質量分析

質量分析を、ABI 5800 MALDI TOF-TOF高解像度質量分析計を用いて行った。1 mLの容量の30% アセトニトリル(ACN)及び0.3% TFA中に約10 mgのシナピン酸を再懸濁することによってシナピン酸マトリックスを用意した。マトリックスとタンパク質サンプルを30:1の比率で混合して、合計4ピコモルのタンパク質にした。サンプルをMALDIプレートにスポットし(1 µL)、このプレートをABI 5800にロードする前に空気乾燥させた。

【0240】

LC-MS/MS D60A配列の同定

8 µLの40 mM NH₄HCO₃を10 µLのD60Aサンプル(10 µg)に添加して18 µLの総容量にしてタンパク質サンプルを用意した。このサンプルを、2 µLの1 M DTTを用いて56 °Cで1時間還元し、暗所で45分間、20 µLの55 mM ヨードアセトアミドでカルボキシアミドメチル化した。トリプシン(20 µg)を80 µLの40 mM NH₄HCO₃に溶解し、10 µL(2.5 µg)をサンプルに添加してタンパク質を37 °Cで一晩消化した。消化後、ペプチドを、5 µLの1% トリフルオロ酢酸(TFA)で酸性化した。C18スピンカラムで脱塩を行い、そしてサンプルを真空遠心分離機で乾燥させた。ペプチドを、19 µLの移動相A(水中、0.1% ギ酸)及び1 µLの移動相B(水中、80% アセトニトリル及び0.1% ギ酸)で再懸濁した。サンプルを、各回1000 psiで10分間、高圧窒素ポンベによってC18逆相樹脂が自己充填されたナノスプレーター型キャピラリーカラム/エミッターにロードした。各回は、1分当たり約200 nLの流量での、160分間の増加する移動相Bの勾配から構成された。最初のタンパク質の同定では、LC-MS/MS分析を、ナノエレクトロスプレーイオン源を備えたFinnigan LTQ-XLで行った。機器による方法を用いて全MSスペクトルを収集し、30秒間隔の動的排除セットを用いる衝突誘起解離(38%正規化衝突エネルギー)で8つの最も強いピークのMS/MSスペクトルを作製した。得られたデータを、Sequest Algorithmを用いて、D60A配列を含む大腸菌(E.coli)データベース、及び標的のみのデータベースを検索した。Sequestパラメーターを変更して、メチオニンの酸化及びシステインのアルキル化を可能にする修飾について調べた。ペプチドの質量の許容量を1000 ppmに設定し、断片イオンの許容量を1ダルトンに設定した。結果を、1%の擬陽性率(FDR)でフィルタリ

10

20

30

40

50

ングした。

【0241】

表面プラズモン共鳴

リガンド、変性RNase B、天然RNase B、及びRNase Bと同じペプチド配列を有するがN-グリコシル化を有していない変性RNase Aを、アミン結合化学を用いてCM-5チップに共有結合させた。最適な結合条件を、Biacoreの推奨プロトコルに従って酢酸緩衝液のpHスカウティングによって決定した(図31)。3000RUの計算 R_{MAX} を得るために十分なリガンド結合で高密度表面領域を用意した。リガンド固定のために、10mM 酢酸緩衝液、pH5.5から構成される結合緩衝液を使用した。分析物として使用するPNGase Fクローンは、10 μ M~72.5nMの範囲の段階希釈濃度のD60A、R911、及びR911 C60Aとした。泳動緩衝液は、10mM HEPES、10mM NaCl、pH7.4から構成されていた。生体分子相互作用モデルを用いる定常状態の結合反応速度を、Scrubber 2.0cを用いて決定した(表10及び図32)。

10

【0242】

グリカンアレイスクリーニング

D60A及びR911クローンを、グリカンアレイスクリーニングのためにConsortium for Functional Glycomics' Protein-Glycan Interaction Core (旧名Core H)に提出した²⁹。精製D60Aを、DyLight 488で標識し、そして色素:タンパク質標識比を2.1:1に決定した。精製R911も同様に標識し、そして色素:タンパク質標識比を8.2:1に決定した。クローンを、0.1% BSAを含む10mM HEPES、10mM NaCl、pH7.4からなる緩衝液中、200 μ g/mLの最終濃度で、アレイでインキュベートした。インキュベーションの1時間後に、アレイを、0.1% BSAを含まない同じ緩衝液で4回洗浄した。スライドを、窒素気流で乾燥させ、そして標準グリカンアレイデータ収集及び分析プロトコルを用いて処理した。最後の洗浄後にスライドを乾燥させたら、スライドをPerkinElmer ScanArrayスキャナーに配置し、そして検出に使用した波長ごとにデータを取得する(DyLight 488)。使用したPMT設定は70%であり、使用したレーザー出力は90%である。保存後、画像をImage softwareで開き、グリッドを使用して、ビオチン対照スポットを用いてスライドのスポットに整合させる。整合したら、各スポットに結合した量を定量化する。マイクロソフト社のエクセルでデータを分析し、この分析では、6つの複製内の最も高いスポットと最も低いスポットが除去され、残りの4つのスポットの平均が、適切な統計資料と共に図及び表に示される。

20

30

【0243】

Lectenz (登録商標) クロマトグラフィー

GE Healthcareによって製造された1mL HiTrap NHS活性化HPカラム(17-0716-01)を用いて、精製PNGase F D60A及びR911クローンをカラムマトリックスに共有結合させて、アフィニティークロマトグラフィーを用いるN-糖ペプチド及びN-糖タンパク質の濃縮を評価した。製造者の推奨プロトコルを用いて、PNGase FクローンのNHS活性化カラムへの結合効率は、全てのNHS活性化カラム結合反応で一貫して80%~87%の範囲であった。標準結合緩衝液は、10mM HEPES、10mM NaCl、pH7.4から構成され、標準溶出緩衝液は、10mM HEPES、150mM NaCl、pH7.4から構成されていた。競合溶出実験では、溶出緩衝液は、10mM HEPES、10mM NaCl、235.6 μ M(100 μ g/mL) キトビオース、pH7.4から構成されていた。キトビオースは、Sigmaから入手した(D1523-10)。再生緩衝液は、10mM HEPES、500mM NaCl、pH7.4から構成されていた。AKTA Purifier UPC 10(GE Healthcare)を、100 μ Lサンプル注入ループ、1mL HiTrap NHS活性化カラム、UV₂₈₀検出で構成された全

40

50

てのクロマトグラフィー実験に使用した。全てのクロマトグラフィーの実験では、0.4 mL / 分の一定の流量とした。カラムを、10 mL 又は10カラム容量 (CV) の結合緩衝液で平衡化し、続いて100 µL のサンプルを注入した。5 CV を超える結合緩衝液を用いてサンプルをカラムに通して、非結合サンプルを洗浄した。結合サンプルを5 CV を超える溶出緩衝液で溶出させた。結合及び溶出の際に、0.5 mL の画分を収集した。5 CV の再生緩衝液でカラムを再生し、5 CV の結合緩衝液で再平衡化した。

【0244】

MCF7細胞抽出物の調製

ヒト乳癌MCF7細胞を、10%ウシ胎仔血清が添加されたDMEM培地で培養した。細胞を継代し、トリプシンフリー細胞遊離を用いて回収した。約 2.3×10^7 の細胞を回収し、5分間の1000 × gでの遠心分離によって4の10 mLのリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄した。細胞ペレットを、EDTAフリープロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を含む1.5 mLのフィルター滅菌された細胞溶解緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 7.5、150 mM NaCl、1% v/v Nonidet P-40) で再懸濁し、そして氷上で30分間インキュベートした¹⁷。この細胞を、処理間に15秒間の停止 (30%の振幅) がある、15秒の間隔で合計2分間超音波処理 (Misonix Ultrasonic Liquid Processor Model S-4000) した。溶解した細胞を、4のEppendorf 5430Rで17,000 × gで1時間遠心分離した。MCF7細胞抽出物を含む上清を、50 µLのアリコートにして-80で保管した。MCF7細胞抽出物のタンパク質濃度を、Thermo Scientific Pierce BCAタンパク質アッセイキット (23277) を用いて10.67 mg/mLと決定した。アリコートにしたMCF7細胞抽出物ストックを氷上で解凍し、10 mM HEPES、10 mM NaCl、pH 7.4を用いて1 mg/mLに希釈した。100 µLサンプルループを用いて、100 µgの1 mg/mL MCF7細胞抽出物を、糖タンパク質濃縮用のR911 Lectenz (登録商標) アフィニティーカラムに注入した。

10

20

【0245】

R911 Lectenz (登録商標) アフィニティークロマトグラフィー溶出サンプルのLC-MS/MSによるタンパク質の同定

30

R911 Lectenz (登録商標) アフィニティーカラムから溶出されたMCF7細胞抽出物及びタンパク質を、標準の溶液中消化プロトコルを用いて還元し、アルキル化し、そして配列グレードトリプシン (sequence grade trypsin) (Promega) で消化した³⁰。サンプルを1% トリフルオロ酢酸で酸性化し、そしてC18スピンカラム (Silica C18, The Nest Group, Inc.) を用いて脱塩を行った。ペプチドを乾燥させ、そして39 µLの緩衝液A (0.1% ギ酸) 及び1 µLの緩衝液B (80% アセトニトリル及び0.1% ギ酸) で再懸濁した。サンプルを、オートサンプラーチューブにロードしてUltimate 3000 LC System (Thermo Scientific-Dionex) に入れる前に、0.2 µmフィルター (Nanosep, Pall Corp) によって回転濾過した。

40

【0246】

LC-MS/MS分析を、ナノスプレーイオン化源を利用するOrbitrap Fusion Tribrid (Thermo Scientific) で行った。各サンプルについて、10 µLを注入し、1分当たり約200 nLの流量での増加する緩衝液Bの180分間の勾配によって分離した。機器による方法を用いて、3秒ごとに全質量スペクトルを収集し、最も強いイオンを連続的に捕捉して、38%衝突誘起解離 (CID) で断片化し、そして得られたMS/MSスペクトルを記録した。動的排除を利用して、10秒の枠内の第2の選択の後の60秒の選択プロセスから前駆イオンを排除した。

【0247】

50

全てのMS/MSスペクトルを、SEAQUESTアルゴリズム(Proteome Discoverer 1.4, Thermo Scientific)を利用してUniProtヒトデータベースを検索した。SEAQUESTパラメーターを、最大2つの内部切断ミス(internal missed cleavage)を有するトリプシンペプチドを許容するように設定した。質量許容差は、前駆イオンを20 ppm、そして断片イオンを0.5 Daに設定した。動的な質量の増加は、メチオニンの酸化及びシステイン残基のアルキル化が原因と認められる。またスペクトルを、ヒトデータベースの反転によって作成されたランダムデータベースを検索して、同定の擬陽性率(FDR)を決定した。ProteoIQは、全てのSEAQUEST検索結果のファイル及びデータベースを利用して、ペプチドの一致をフィルタリングして正確なタンパク質の同定を達成した³¹。20% FDRを通過したペプチドは、タンパク質同定と見なされ、2% FDRを通過したタンパク質のみが報告された。

10

【0248】

UniPep及びUniProtデータベースを用いるMCF7細胞抽出物糖タンパク質の同定

UniProtは、ストックMCF7サンプルのLC-MS/MS分析から作成されたタンパク質同定リストを検証し、R911 Lectenz(登録商標)アフィニティークロマトグラフィー溶出MCF7サンプルをUniPepデータベースで処理して、実験的に確認されたN-糖ペプチドを有するタンパク質を同定した²⁰。加えて、N結合型糖化部位(N-linked glycosite)を有する潜在的な糖タンパク質も、N-グリコシル化sequone(Asn-X-Ser/Thr)の存在に基づいてUniPepによって同定した。N-及O-糖タンパク質の最終リストには、UniPep、UniProt、及び文献報告によって糖タンパク質として確認されたタンパク質のみを含めた^{19、20、25、26、32}。加えて、N-グリコシル化部位を有すると推定されたタンパク質は、UniProt細胞内局在化の記述が、グリコシル化タンパク質で予想される細胞内局在化(ゴルジ、分泌、小胞エキソソーム、細胞外空間、及びヒストン)に一致する場合にのみ最終リストに含めた。

20

【0249】

参考文献

1. Loo, T., Patchett, M.L., Norris, G.E. & Lott, J.S. Using Secretion to Solve a Solubility Problem: High-Yield Expression in *Escherichia coli* and Purification of the Bacterial Glycoamidase PNGase F. *Protein Expression and Purification* 24, 90-98 (2002).
2. Filitcheva, J. PNGases: A Diverse Family of Enzymes Related by Function Rather Than Catalytic Mechanism, Vol. Ph.D. (Massey University, Palmerston North; 2010).
3. Gasteiger E., H.C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. in *The Proteomics Protocols Handbook* (ed. J.M. Walker) 571-607 (Copyright Humana Press, 2005). 10
4. Kuhn, P. et al. Active Site and Oligosaccharide Recognition Residues of Peptide-N4-(N-acetyl- β -D-glucosaminyl)asparagine Amidase F. *Journal of Biological Chemistry* 270, 29493-29497 (1995).
5. Noble, J.E., Knight, A.E., Reason, A.J., Di Matola, A. & Bailey, M.J. A comparison of protein quantitation assays for biopharmaceutical applications. *Mol Biotechnol* 37, 99-111 (2007). 20
6. Kuhn, P., Tarentino, A.L., Plummer, T.H., Jr. & Van Roey, P. Crystal structure of peptide-N4-(N-acetyl-beta-D-glucosaminyl)asparagine amidase F at 2.2-A resolution. *Biochemistry* 33, 11699-11706 (1994).
7. Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Meth* 9, 671-675 (2012).
8. Cooper, M.A. Optical biosensors in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 1, 515-528 (2002). 30

9. Schlick, K.H. & Cloninger, M.J. Inhibition binding studies of glycodendrimer-lectin interactions using surface plasmon resonance. *Tetrahedron* 66, 5305-5310 (2010).
10. Haseley, S.R., Kamerling, J.P. & Vliegthart, J.F.G. Unravelling carbohydrate interactions with Biosensors using surface plasmon resonance (SPR) detection. *Host-Guest Chemistry* 218, 93-114 (2002).
11. Nieba, L. et al. BIACORE analysis of histidine-tagged proteins using a chelating NTA sensor chip. *Analytical Biochemistry* 252, 217-228 (1997). 10
12. Willard, F.S. & Siderovski, D.P. Covalent immobilization of histidine-tagged proteins for surface plasmon resonance. *Analytical Biochemistry* 353, 147-149 (2006).
13. Wang, S. et al. N-Terminal Deletion of Peptide:N-Glycanase Results in Enhanced Deglycosylation Activity. *PLoS ONE* 4, e8335 (2009).
14. Ongay, S., Boichenko, A., Govorukhina, N. & Bischoff, R. Glycopeptide enrichment and separation for protein glycosylation analysis. *J Sep Sci* 35, 2341-2372 (2012).
15. Alwael, H. et al. Pipette-tip selective extraction of glycoproteins with lectin modified gold nano-particles on a polymer monolithic phase. *Analyst* 136, 2619-2628 (2011). 20
16. Jung, K. & Cho, W. Serial affinity chromatography as a selection tool in glycoproteomics. *Anal Chem* 85, 7125-7132 (2013).
17. Lee, L.Y. et al. An optimized approach for enrichment of glycoproteins from cell culture lysates using native multi-lectin affinity chromatography. *J Sep Sci* 35, 2445-2452 (2012).
18. Krishnamoorthy, L. & Mahal, L.K. Glycomic analysis: an array of technologies. *ACS chemical biology* 4, 715-732 (2009). 30
19. Consortium, T.U. Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Research* 42, D191-D198 (2014).
20. Zhang, H. et al. UniPep--a database for human N-linked glycosites: a resource for biomarker discovery. *Genome biology* 7, R73 (2006).
21. Fan, J.Q. Detailed Studies on Substrate Structure Requirements of Glycoamidases A and F. *Journal of Biological Chemistry* 272, 27058-27064 (1997). 40
22. Tretter, V., Altmann, F. & MÄRz, L. Peptide-N4-(N-acetyl- β -glucosaminyl)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached $\alpha 1 \rightarrow 3$ to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue. *European Journal of Biochemistry* 199, 647-652 (1991).

23. Mussar, K.J., Murray, G.J., Martin, B.M. & Viswanatha, T. Peptide: N-glycosidase F: studies on the glycoprotein aminoglycan amidase from *Flavobacterium meningosepticum*. *Journal of biochemical and biophysical methods* 20, 53-68 (1989).
24. Tarentino, A.L., Gomez, C.M. & Plummer, T.H., Jr. Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. *Biochemistry* 24, 4665-4671 (1985).
25. Zhang, S., Roche, K., Nasheuer, H.P. & Lowndes, N.F. Modification of histones by sugar beta-N-acetylglucosamine (GlcNAc) occurs on multiple residues, including histone H3 serine 10, and is cell cycle-regulated. *J Biol Chem* 286, 37483-37495 (2011). 10
26. Ahmad, W. et al. Human linker histones: interplay between phosphorylation and O-beta-GlcNAc to mediate chromatin structural modifications. *Cell division* 6, 15 (2011).
27. Taylor, M.E. & Drickamer, K. Structural insights into what glycan arrays tell us about how glycan-binding proteins interact with their ligands. *Glycobiology* 19, 1155-1162 (2009).
28. Adams, G.B. & Scadden, D.T. The hematopoietic stem cell in its place. *Nat Immunol* 7, 333-337 (2006). 20
29. Heimburg-Molinaro, J., Song, X., Smith, D.F. & Cummings, R.D. Preparation and analysis of glycan microarrays. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 12, Unit12* 10 (2011).
30. Lim, J.M. et al. Defining the regulated secreted proteome of rodent adipocytes upon the induction of insulin resistance. *J Proteome Res* 7, 1251-1263 (2008).
31. Weatherly, D.B. et al. A Heuristic method for assigning a false-discovery rate for protein identifications from Mascot database search results. *Mol Cell Proteomics* 4, 762-772 (2005). 30
32. Takashima, S. Glycosylation and secretion of human α -amylases. *Advances in Biological Chemistry* 02, 10-19 (2012).

【 0 2 5 0 】

実施例 4

PNGase F クローンの分子動力学シミュレーション

PNGase F クローン D60A、R911、及び R911 C60A の wt PNGase F 酵素に対するコンフォメーション分析を MD シミュレーションによって研究して、この研究から残基当たりの相互作用エネルギーを計算した。2.0 の解像度での、活性部位に N, N'-ジアセチルキトピオース二糖を有する wt PNGase F 酵素の X 線結晶学ベースの構造モデルは、既に報告されている (PDB ID: 1PNF)¹。1PNF モデルを使用して、D60A、R911、及び R911 C60A クローンの突然変異モデルを構築した。加えて、wt PNGase F の結合ポケットの共結晶化 N, N'-ジアセチルキトピオース二糖リガンドは、修飾 N-グリカン構造を PNGase F クローンの構造モデルの結合ポケットに配置するガイドとして機能する。 40

【 0 2 5 1 】

D60A、R911、及び R911 C60A の構造モデル

結合モデルのための回転異性体の選択

wt PNGase F モデル、1PNF を鋳型として使用して、PNGase クローン 50

D60A、R911、及びR911 C60Aのモデルを構築した。2つの回転異性体ライブラリーを使用して、R911突然変異の側鎖回転異性体を選択した。X線結晶学ベースの主鎖依存性Dunbrackライブラリーを使用して回転異性体を選択し、モデルR911 Dun及びR911 C60A Dunを構築した²。加えて、MDベースの主鎖依存性Dynamomicsライブラリーを使用して、モデルR911 Dyn及びR911 C60A Dynも構築した³。立体衝突の最も少ない、可能性が最も高い回転異性体を選択した。R911 Dun及びR911 C60A Dunモデルの構築のために評価されて選択されたDunbrack回転異性体が表16に列記されている。同様に、R911 Dyn及びR911 C60A DynのDynamomics回転異性体が表17に列記されている。D57L、D60C、I156L、G192I、及びR248W突然変異の回転異性体が、隣接残基との関連で示されている。E206Sの回転異性体は、衝突が予測されなかったとしては示されていない。MDシミュレーション及び遊離エネルギー分解を計算して、どの回転異性体が実験相互作用エネルギーを最良に近似したかを評価した。最良に近似した回転異性体モデルは、全ての後のコンピューターでの研究に有用である。

【0252】

【表16】

Dunbrack ライブラリー回転異性体の選択。選択された回転異性体は陰影が付けられている。可能性が最も高く立体衝突回数が最も少ない回転異性体が、R911 Dun 及び R911 C60A Dun モデル(影付き)のために選択された。

R911 回転 異性体	回転異性体 の可能性 (%)	平均角度		衝突 回数	選択された Dunbrack 回転異性体の 衝突の記述及び向き
		Chi1	Chi2		
1. D57L	64.4334	-173	61.4	4	
2. D57L	28.6281	-64.6	175.9	7	
3. D57L	4.2279	-165.4	171.3	1	衝突 w/ T119; D57と同様の向き
1. D60C	74.2327	179.8		1	
2. D60C	25.3616	-62.4		3	
3. D60C	0.4057	63.4		0	D60と同様の向き
1. I156L	93.2665	-63.1	175.6	5	
2. I156L	4.0482	-87.2	49.8	0	
1. G192I	39.1625	62.1	170.9	21	
2. G192I	34.202	-65.1	169.6	17	
3. G192I	10.5124	-169.1	167.9	17	
4. G192I	8.6498	-59.8	-60	16	
5. G192I	4.5635	-166.8	66.7	14	C204, D290, W191, H193 と衝突
1. E206S	41.8529	-65.9		0	
2. E206S	31.6039	65.4		0	
3. E206S	26.5433	179.2		0	E206と同じ向き
1. R248W	40.4783	-63.5	100.4	9	E206, W207 と衝突
2. R248W	29.7865	-70.3	0.4	22	
3. R248W	10.8433	-59.8	-87.2	7	P253 と衝突

【0253】

【表 17】

Dynameomics ライブラリー回転異性体の選択。選択された回転異性体に陰影が付けられている。可能性が最も高く立体衝突の回数が最も少ない回転異性体が、R911 Dyn 及び R911 C60A Dyn モデル(影付き)のために選択された。

R911 回転 異性体	回転異性体 の可能性		平均角度		立体 衝突 回数	選択された Dynameomic 回転異性体の 衝突の記述及び向き
	(%)	Chi1	Chi2			
1. D57L	65.1945	292	168.5		9	
2. D57L	24.054	183	66.6		4	衝突: R61, L121; D57 と同じ向き
3. D57L	4.5273	275.1	79.8		9	
1. D60C	56.2557	298.5			3	
2. D60C	28.6878	183.7			3	
3. D60C	15.0565	54.8			0	D60 と同じ向き
1. I156L	65.1945	292	168.5		4	衝突: F292, GlcNAc
2. I156L	24.054	183	66.6		7	
3. I156L	4.5273	275.1	79.8		1	
1. G192I	42.5492	53.3	167.1		19	
2. G192I	28.2902	300.9	176.6		18	
3. G192I	22.6888	301.9	299		15	
4. G192I	3.7004	187.2	165.7		16	
5. G192I	1.4194	184.1	68.3		13	衝突: C204, D290, A291, W191
1. E206S	73.0609	310.9			0	
2. E206S	24.8453	40.7			0	
3. E206S	2.0938	189.4			2	衝突: W248
1. R248W	28.2145	294.7	98.5		7	衝突: W207
2. R248W	16.4889	291.4	348.1		20	
3. R248W	13.8124	181.8	259.2		24	

10

20

30

【0254】

回転異性体の評価のためのMDシミュレーション

w t P N G a s e F、D 6 0 A、及び4つ全ての回転異性体モデルのMDシミュレーション(100ナノ秒)を、N, N' - ジアセチルキトビオース二糖(G l c N A c 1 - 4 G l c N A c - O H)で行った。w t P N G a s e F 実験的構造(1 P N F)に対する、C 原子の位置における二乗平均平方根差(R M S D)を、シミュレーション時間の関数として決定した。100ナノ秒のシミュレーションの間の6つのモデルのそれぞれの平均R M S Dは、低く安定し、1.2 ~ 1.3 の範囲であり、構造的平衡性を示している。回転異性体の分析に使用される6つの構造モデル及び各MDシミュレーションの平均R M S D値のリストが表18に列記されている。

40

【0255】

【表 18】

回転異性体の選択のための wtPNGase F 及びクローンの構造モデル。100 ナノ秒の MD シミュレーションを各モデルに対して行った。共結晶化 α -キトビオースリガンドを有する 1PNF X 線構造は wtPNGase F を表す。残りの 5 つのモデルは、1PNF 基準構造から構成された。各シミュレーションの平均 RMSD 値が列記されている。

構造モデル	リガンド	平均 RMSD (Å)
1PNF	GlcNAc β 1-4GlcNAc- α OH	1.2404
D60A	GlcNAc β 1-4GlcNAc- α OH	1.2369
R911 Dun	GlcNAc β 1-4GlcNAc- α OH	1.2908
R911 C60A Dun	GlcNAc β 1-4GlcNAc- α OH	1.3090
R911 Dyn	GlcNAc β 1-4GlcNAc- α OH	1.3377
R911 C60A Dyn	GlcNAc β 1-4GlcNAc- α OH	1.3061

【0256】

シミュレーションの安定性を確認することに加えて、1PNF X 線データにおける実験的に観察された水素結合長の再現性を確認した。1PNF (wtPNGase F) の MD シミュレーションにおけるタンパク質と N, N' - ジアセチルキトビオース二糖 (GlcNAc β 1-4GlcNAc- α OH) リガンドとの間の理論上の水素結合長を、表 19 の実験により決定された水素結合長と比較し、これが図 39 に示されている。1PNF モデルの MD シミュレーションは、実験水素結合長を正確に再現した。他のモデルは、1PNF に由来し、全てのモデルに亘って一貫した RMSD 値が構造的安定性を示したため、モデルの残りは、R911 及び R911 C60A クローンの実験水素結合長のデータが存在しなかったため構造的に有効であると思われる。

【0257】

【表 19】

キトビオースと PNGase F との間で観察された実験及び理論上の水素結合長。*1PNF X 線結晶モデルのアノマーヒドロキシルの 316 O1 原子は、1PNF MD シミュレーションにおいて 315 O1 に再付番される。

水素結合	1PNF X 線データ (Å) ¹	1PNF MD シミュレーションの平均 (Å)
D60-O δ - GlcNAc316 O1*	2.64	2.64 \pm 0.11
D60-O - GlcNAc316 NAc	2.86	3.03 \pm 0.17
R61-NH - GlcNAc317 OAc	2.84	2.85 \pm 0.14
R61-NH - GlcNAc316-O4	2.81	2.97 \pm 0.16
R61-NH2 - GlcNAc317OAc	2.99	3.11 \pm 0.21
E118-O ϵ - GlcNAc317-O6	2.57	2.75 \pm 0.18
W120-N ϵ - GlcNAc317-O6	2.90	3.10 \pm 0.19
W191-N ϵ - GlcNAc316-O3	2.80	3.00 \pm 0.15

【0258】

回転異性体モデルのエネルギー収束及び MM - GBSA

複合体の MD シミュレーションが安定して、実験構造データに一致していることを確認してから、相互作用エネルギーを、100 ナノ秒の MD 軌道期間に亘って 1 ナノ秒の間隔で計算した。図 40 は、100 ナノ秒の MD シミュレーション中の 1PNF の MD シミュ

レーションのエネルギー収束を示す、軌道時間に亘る安定した相互作用エネルギーを示している。これに対して、図41は、R911 DunのMDシミュレーションの最初の54ナノ秒間のエネルギー収束の欠如を示している。R911 DunのMDシミュレーションとは異なり、R911 DynのMDシミュレーションは、100ナノ秒のシミュレーションの間中、安定した相互作用エネルギーを有していた。54ナノ秒での10 kcal /モルの相互作用エネルギー遷移の前後のR911 Dunのコンフォメーション分析は、シミュレーションの後半のコンフォメーションが、R911 Dynのシミュレーションに類似していることを示唆した。これは、R61の第2のGlcNAcのN-アセチル基との水素結合を不安定化させるR911 D57L突然変異の向きで特に観察される。R911 Dynamomicsモデルは、エネルギーの最小化及び平衡化の間、このコンフォメーションをとり、100ナノ秒の工程中、このコンフォメーションで安定したままである。しかしながら、R911 Dunbrackモデルは、シミュレーションの広範の変更されたR61の向きのみをとる。これは、Dunbrackモデルが、R911 dynamomicsモデルに対して変更されたR61の向きを長時間とることを示唆すると考えられる。従って、分子力学一般化Born表面積(MM-GBSA)分析のためのR911 DunのMDシミュレーションの後半の選択は、R911 Dunbrack及びR911 Dynamomics軌道の両方の軌道に一致したR61の変更されたコンフォメーションによってある程度合理的に説明される。これはまた、エネルギー収束に到達させるサンプリング要件に適合した、この試験で利用される長いシミュレーションの重要性も実証する。キトビオース(GlcNAc 1-4GlcNAc-OH)リガンドを用いる他のMDシミュレーションのエネルギー収束分析は、全てのシミュレーションが、最初の60ナノ秒後に構造が集束したことを示唆した。従って、軌道の収束部分(最後の40ナノ秒)からのMD工程データを、MM-GBSAエネルギー分析した。

10

20

【0259】

結合エネルギーを、MM-GBSA法を利用して、直接的な静電相互作用、極性及び非極性脱溶媒和、並びにファンデルワールス接触からの寄与に分解した⁴。このMM-GBSA法により、wtPNGase F(1PNF)に対して-35.1 kcal /モルの全相互作用エネルギーが生じた。この値は、wtPNGase Fの-7.1 kcal /モルの実験結合自由エネルギー(表10)を過大評価し、これは、リガンド結合に関連したエントロピーペナルティを省略するMM-GBSA計算の典型的な特徴である⁴。コンフォメーション柔軟性の変化から生じるエントロピー効果を推定することができるが、収束を達成するために非常に長いMDシミュレーションを必要とし得る⁵。しかしながら、タンパク質の側鎖の柔軟性の低下から生じるエントロピー効果は、リガンドと強く相互作用する残基で最大であり、テピッド残基及びコールド残基(cold residue)で最小であると予想され得る。これらの理由から、エントロピー寄与は計算されなかった。さらに、保存水分子(conserved water molecule)が、これらのMM-GBSAエネルギー推定に含まれず、保存水の欠如は、E206S、D60C、及びR248Wの不正確な推定エネルギーを生じさせる可能性があり、これらの部位は、野生型PNGase F複合体実験X線データにおいて保存水分子と相互作用することが知られている¹。加えて、分解された残基当たりの寄与の推定で行われる近似により、計算結合エネルギーは、比較的大きい誤差を有し得、従って定量的評価を許容することができない。従って、MM-GBSAデータの定量分析が適切である⁶。

30

40

【0260】

1PNFは、wtPNGase F酵素の構造を表すため、非親和性最適化実験対照として使用したD60A単一点突然変異体を、R911及びR911 C60A Dunbrack及びDynamomics回転異性体モデルに対する比較用の対照構造モデルとして同様に使用した。キトビオース(GlcNAc 1-4GlcNAc-OH)リガンドを用いるこれら6つのMDシミュレーションからの突然変異残基の残基当たりの推定GBINDING(kcal /モル)エネルギーが表20に示されている。

50

【 0 2 6 1 】

【 表 2 0 】

回転異性体モデルの推定 MM-GBSA の相互作用エネルギー。突然変異残基の小計

$\Delta G_{\text{BINDING}}$ (kcal/モル)を、キトビオース(GlcNAc β 1-4GlcNAc- α OH)リガンドと複合体を形成した 1PNF (wtPNGase F)、D60A、及び 4 つ全ての回転異性体モデルの全てで比較した。D60A 対照クローンに対する小計 $\Delta\Delta G_{\text{BINDING}}$ (kcal/モル)エネルギーは、R911 及び R911 C60A の Dynameomics 回転異性体モデルが、Dunbrack モデル(イタリック体)とは異なり、実験結合自由エネルギー($\Delta\Delta G_{\text{BIND-EXP}}$)動向(太字)を最も良く近似したことを示した。

残基	1PNF		R911 C60A		R911 C60A	
	wtPNGaseF	D60A	R911 Dun	Dun	R911 Dyn	Dyn
D57/-/L	-0.3 ± 0.7	-0.3 ± 0.7	-0.1 ± 0.0	-0.1 ± 0.0	-0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0
D60/A/C/A	-1.8 ± 1.7	-2.1 ± 1.2	-1.5 ± 0.5	-0.8 ± 1.1	-4.5 ± 0.5	-0.1 ± 0.2
I156/-/L	-1.1 ± 0.2	-1.0 ± 0.3	-0.2 ± 0.1	-0.9 ± 0.2	-0.1 ± 0.0	-0.1 ± 0.1
G192/-/I	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.1	-0.9 ± 0.3	-0.9 ± 0.3	-0.8 ± 0.2	-2.9 ± 0.5
E206/-/S	0.7 ± 0.9	0.7 ± 0.9	-0.1 ± 0.3	-0.1 ± 0.3	-0.1 ± 0.0	-1.1 ± 0.9
R248/-/W	-0.1 ± 0.5	-0.1 ± 0.5	-0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	-0.6 ± 0.1	-0.5 ± 0.2
小 計						
$\Delta G_{\text{BINDING}}$	-2.7 ± 1.0	-2.8 ± 0.8	-2.9 ± 0.3	-2.6 ± 0.5	-6.1 ± 0.2	-4.6 ± 0.5
小 計						
$\Delta\Delta G_{\text{BINDING}}$	-0.0 ± 1.2	-	-0.2 ± 0.8	0.2 ± 0.9	-3.4 ± 0.8	-1.9 ± 0.9
$\Delta\Delta G_{\text{BIND-EXP}}$	0.5	-	-1.9	-0.7	-1.9	-0.7

【 0 2 6 2 】

1PNF (-2.7 kcal/モル)とD60A (-2.8 kcal/モル)の合計 G_{BINDING} は、類似しており、D60A突然変異が、前の分析(表4)に一致して、僅かにエネルギー的に有利であることを示唆している。1PNFのD60Aモデルに対する実験 $G_{\text{BIND-EXP}}$ は、D60A突然変異が、エネルギー的に-0.5 kcal/モル有利であることを示している。Dunbrack回転異性体モデル、R911 Dun、及びR911 C60A DunのD60Aに対する比較は、推定 G_{BINDING} 相互作用エネルギーが1PNFと著しくは異なっていないことを示している。Dunbrackモデルの結果は、実験データに一致している。しかしながら、Dynameomics回転異性体モデル、R911 Dyn、及びR911 C60A DynのD60Aに対する比較は、相互作用エネルギー動向が実験データに一致していることを裏付ける。具体的には、R911に対するR911 C60Aの突然変異は、比較的不利な相互作用エネルギーを有するが、1PNF程悪くない。このデータもまた、1PNF及びD60Aに対する親和性の向上のためのR911のD60C突然変異の重要性を裏付ける。実験相互作用エネルギーの再現性に基づいて、突然変異残基の回転異性体のコンフォメーションをMDシミュレーションから決定した。さらに、Dynameomic回転異性体モデル、R911 Dyn、及びR911 C60A Dynを、追加のグリカン及び糖ペプチドグリカンを用いるMDシミュレーションのために選択した。

【 0 2 6 3 】

R911 DynのMDシミュレーションからの回転異性体のコンフォメーション

R911 DynのMDシミュレーションからの突然変異残基の回転異性体の二面角を、軌道のエネルギー的に収束した部分(最後の40ナノ秒)から導出した。二面角頻度ヒ

10

20

30

40

50

ストグラムをプロットして、6つ全ての突然変異残基の好ましい二面角を同定した(図42~図47)。好ましい回転異性体のコンフォメーションが特定され、表21に列記されている。4つの回転異性体は、複数の好ましいコンフォメーション(D57L Chi2、E206S Chi1、G192I Chi1、及びG192I Chi2)を有していた。従って、回転異性体の最も好ましい組み合わせが、収束軌道の最後の40ナノ秒から抽出されたフレームにおける発生頻度に基づいて特定された(表22)。回転異性体の組み合わせの最も高頻度のセットが、リガンド相互作用の最も好ましい向きを表すと考えられた。R911 DynのMDシミュレーションからの回転異性体のコンフォメーションの最も好ましいセットを示す軌道からのスナップ写真が図48に示されている。

【0264】

【表21】

R911 DynのMDシミュレーションからの回転異性体のコンフォメーション。6つ全ての突然

変異残基(影付き)に好ましい回転異性体の二面角が列記されている。MDシミュレーションの

開始時の初期コンフォメーションを表す選択されたDynamomics回転異性体(Dyn)が、比較のために含まれている。

R911 残基	回転 異性体源	コンフォメーション		可能性 (%)	平均角度		衝突
		Chi1	Chi2		Chi1	Chi2	
D57L	Dyn	t	g+	24.05	183.0	66.6	4
D57L	MD	t	g-	41.80	178.0	-46.0	
D57L	MD	t	g+	22.59	178.0	36.0	
D57L	MD	t	g+	35.60	178.0	85.0	
D60C	Dyn	g+		15.05	54.8		0
D60C	MD	g+		99.00	75.0		
I156L	Dyn	g-	t	65.19	292.0	168.5	4
I156L	MD	t	g+	99.00	-180.0	59.0	
G192I	Dyn	t	g+	1.41	184.1	68.3	13
G192I	MD	g-	g-	84.06	-55.0	-61.0	
G192I	MD	g-	g-	15.94	-86.0	-61.0	
E206S	Dyn	g-		73.06	310.9		0
E206S	MD	g+		54.65	69.0		
E206S	MD	g-		45.35	-77.0		
R248W	Dyn	g-	g-	28.21	294.7	98.5	7
R248W	MD	g-	g-	99.00	-54.0	66.0	

【0265】

10

20

30

40

【表 2 2】

R911 Dyn の MD シミュレーションにおける好ましい回転異性体の組み合わせの頻度。回転異性体の二面角の好ましいセットの頻度が列記されている。回転異性体のコンフォメーションの最も高頻度のセットが、太字で示され、図 48 に示されている。

頻度	D57L Chi2	G192I Chi1	G192I Chi2	E206S Chi1	可能性 (%)
1570	-46	-55	-61	-77	22.52
1477	85	-55	-61	69	21.19
949	-46	-55	-61	69	13.61
868	36	-55	-61	69	12.45
565	85	-55	-61	77	8.11
431	36	-55	-61	-77	6.18
303	-46	-86	-61	-77	4.35
287	85	-86	-61	69	4.12
153	85	-86	-61	77	2.19
139	36	-86	-61	-77	1.99
137	36	-86	-61	69	1.97
92	-46	-86	-61	69	1.32

10

20

【0266】

N - グリカン及び N - 糖ペプチドリガンドを用いた PNGase F クローンの MD シミュレーション及び結合自由エネルギー分解 (MM - GBSA)

既に評価した R911 及び R911 C60A の Dynamics 構造モデル及び 1PNF 及び D60A モデルを用いて、100 ナノ秒の MD シミュレーションを修飾リガンドで行った。オリゴ糖部分のアスパラギンの N への付着が - 配置中に存在すると考えて、1つのセットの4つのシミュレーションを、- キトビオースリガンド (GlcNAc 1 - 4 GlcNAc - OH) を用いて行った。たとえ溶液中で、還元末端の O₁ ヒドロキシル基の - 及び - アノマー配置の両方の混合物を含む平衡状態が存在しても、wt PNGase F 酵素の 1PNF 構造は、キトビオースリガンドと共結晶化した¹。第2のセットの4つのシミュレーションを、wt PNGase F によって認識される、アスパラギン結合糖ペプチドモチーフ、GlcNAc 1 - 4 GlcNAc - Asn - X [- P] - Thr を用いて行った。PNGase F を用いた基質要求性試験により、これが最適な触媒活性に必要な必須モチーフであることが裏付けられた⁷。RNase B を、実験的研究の N - グリカン含有タンパク質標的として使用したため、RNase B ペプチド配列を、必須糖ペプチドリガンド (GlcNAc 1 - 4 GlcNAc - Asn - Leu - Thr) に使用した。加えて、1PNF 及び D60A モデルの残基 E206 は、カルボキシル基のプロトン化状態を反映するように修飾された (GLH206)。wt PNGase F の最適な触媒活性は、約 pH 8.0 ~ 8.5 と報告され、従ってグルタミン酸のプロトン化 (pK_a が約 4.1) は、通常は起きないであろう。しかしながら、隣接疎水性トリプトファン残基 207 及び 251 の点突然変異の研究は、疎水性環境が触媒活性に重要であり、そしてこの疎水性環境が E206 の pK_a を約 8.5 に上昇させる可能性があることを示している^{8、9}。

30

40

【0267】

- キトビオースリガンドと複合体を形成した PNGase F クローンの分析

全てのモデルの安定したシミュレーション軌道が、RMSD 分析によって確認され、続いてエネルギー収束分析によって安定した相互作用エネルギーが確認された。従来の回転異性体モデルの研究と同様に、軌道の収束部分からのデータを、MM - GBSA エネルギー

50

ー分析した。表 2 3 は、MDシミュレーションに使用される β -キトビオースリガンドと複合体を形成した PNGase F クローンのモデル、計算した平均 RMSD、及び推定相対結合エネルギーの要約である。

【0268】

全てのクローンの推定総理論結合自由エネルギー（合計 G_{BINDING} ）は、既に説明したエントロピーペナルティの排除により実験結合自由エネルギー（ $G_{\text{BIND-EXP}}$ ）を過大評価する^{4、5}。 β -キトビオースリガンドシミュレーション用の6つの突然変異残基の相対 G_{BINDING} 相互作用エネルギーが、実験で観察された相互作用エネルギー動向を再現した。wtPNGase F 酵素は、D60A に対してそれほど有利ではない総相互作用エネルギー（ 0.1 kcal/mol ）を有し、R911（ -1.8 kcal/mol ）及び R911 C60A（ -0.5 kcal/mol ）の両方は、D60A に対して有利な相互作用エネルギーを有し、R911 が R911 C60A よりも有利である。

【0269】

【表 2 3】

MDシミュレーション及び MM-GBSA に使用される wtPNGase F 及びクローンの構造モデル。

結合ポケットに β -キトビオースリガンドを有する構造モデルを、100 ナノ秒の MD シミュレーションを行うために作成した。シミュレーション安定性が、シミュレーション時間に亘る RMSD 分析によって確認され、平均 RMSD 値が列記されている。各クローンの 314 全てのアミノ酸の推定総理論結合エネルギー（合計 $\Delta G_{\text{BINDING}}$ ）が列記されている(kcal/mol)。D60A に対する全てのクローンの内の 6 つの突然変異残基のみから構成される推定総理論結合相互作用エネルギー（小計 $\Delta \Delta G_{\text{BINDING}}$ ）が列記されている(kcal/mol)。比較のために、D60A に対する全てのクローンの実験結合自由エネルギー（ $\Delta \Delta G_{\text{BIND-EXP}}$ ）も列記されている(kcal/mol)。

構造モデル	リガンド	RMSD (Å)	合計 $\Delta G_{\text{BINDING}}$	小計 $\Delta \Delta G_{\text{BINDING}}$	$\Delta \Delta G_{\text{BIND-EXP}}$
1PNF	GlcNAc β 1-4GlcNAc- β OH	1.2440	-39.1	0.1 ± 1.3	0.5
D60A	GlcNAc β 1-4GlcNAc- β OH	1.2674	-31.5	-	-
R911 Dyn	GlcNAc β 1-4GlcNAc- β OH	1.2944	-17.9	-1.8 ± 1.1	-1.9
R911 C60A Dyn	GlcNAc β 1-4GlcNAc- β OH	1.2890	-18.3	-0.5 ± 1.0	-0.7

【0270】

MM-GBSA エネルギー分析及び残基当たりの寄与を計算して、 β -キトビオースリガンド軌道（最後の 40 ナノ秒）の収束部分が、D60A に対する G_{BINDING} に使用されたかを決定した。分解エネルギー寄与は、ファンデルワールス成分（ E_{VDW} ）と静電気成分（ E_{ELE} ）との和から構成される総分子力学的相互作用エネルギー（ E_{MM} ）からなる。総結合自由エネルギー（ G_{BINDING} ）は、極性及び非極性脱溶媒和（ $G_{\text{GB+SA}}$ ）と E_{MM} の一般化 Born 近似から構成される。 β -キトビオースと複合体を形成した 4 つ全てのモデル（1PNF、D60A、R911 Dyn、R911 C60A Dyn）の（wtPNGase F における突然変異した 6 つの残基の）相互作用エネルギーが表 2 4 ~ 表 2 7 に要約されている。

【0271】

【表 2 4】

β -キトビオースと複合体を形成した 1PNF の MM-GBSA。 β -キトビオースと複合体を形成した wtPNase F の結合自由エネルギー(kcal/モル)への推定の残基当たりの寄与が示されている。相互作用エネルギーは、R911 クローンの定方向進化による突然変異のために選択された僅か6つの残基からなる。触媒活性に必要な残基は太字で示されている。

重要な接触ゾーン残基	ΔE_{VDW}	ΔE_{ELE}	ΔE_{MM}	ΔG_{GB+SA}	$\Delta G_{BINDING}$
D57	-0.1	1.9	1.8	-2.2	-0.4 \pm 0.5
D60 (求核試薬)	-0.8	-14.7	-15.6	13.5	-2.1 \pm 1.4
I156	-0.9	0.2	-0.7	-0.4	-1.1 \pm 0.2
G192	-0.1	-0.2	-0.3	0.2	0.0 \pm 0.1
E206	-0.6	5.3	4.7	-3.7	1.0 \pm 0.9
R248	-0.1	-0.7	-0.8	0.7	-0.1 \pm 0.4
小計相互作用エネルギー$\Delta G_{BINDING}$	-2.7	-8.2	-10.9	8.2	-2.7 \pm 0.8

10

【 0 2 7 2】

【表 2 5】

β -キトビオースと複合体を形成した D60A の MM-GBSA。 β -キトビオースと複合体を形成した D60A の結合自由エネルギー(kcal/モル)への推定の残基当たりの寄与が示されている。相互作用エネルギーは、R911 クローンの定方向進化による突然変異のために選択された僅か6つの残基からなる。

重要な接触ゾーン残基	ΔE_{VDW}	ΔE_{ELE}	ΔE_{MM}	ΔG_{GB+SA}	$\Delta G_{BINDING}$
D57	-0.1	2.3	2.2	-2.5	-0.3 \pm 0.5
D60A	-1.0	-2.5	-3.5	1.7	-1.8 \pm 0.4
I156	-0.9	0.2	-0.7	-0.4	-1.1 \pm 0.2
G192	-0.1	0.0	-0.1	0.1	0.0 \pm 0.1
E206	-0.6	2.6	1.9	-1.2	0.7 \pm 2.0
R248	-0.1	-1.9	-2.1	1.9	-0.2 \pm 0.5
小計相互作用エネルギー$\Delta G_{BINDING}$	-3.0	0.7	-2.3	-0.2	-2.7 \pm 1.0

30

【 0 2 7 3】

【表 2 6】

β -キトビオースと複合体を形成した R911 Dyn の MM-GBSA。 β -キトビオースと複合体を形成した R911 の結合自由エネルギー(kcal/モル)への推定の残基当たりの寄与が示されている。相互作用エネルギーは、R911 クローンの定方向進化による突然変異のために選択された僅か6つの残基からなる。

重要な接触ゾーン残基	ΔE_{VDW}	ΔE_{ELE}	ΔE_{MM}	ΔG_{GB+SA}	$\Delta G_{BINDING}$
D57L	-0.1	-0.1	-0.1	0.1	-0.1 \pm 0.1
D60C	-0.2	0.2	0.0	-0.2	-0.2 \pm 0.2
I156L	-0.3	0.2	-0.1	-0.2	-0.3 \pm 0.2
G192I	-1.8	-2.3	-4.1	1.0	-3.1 \pm 0.6
E206S	-0.5	-0.9	-1.4	1.0	-0.4 \pm 0.4
R248W	-0.4	-0.1	-0.6	0.2	-0.4 \pm 0.2
小計相互作用エネルギー $\Delta G_{BINDING}$	-3.4	-2.9	-6.3	1.8	-4.5 \pm 0.4

10

【 0 2 7 4 】

【表 2 7】

β -キトビオースと複合体を形成した R911 C60A Dyn の MM-GBSA。 β -キトビオースと複合体を形成した R911 C60A の結合自由エネルギー(kcal/モル)への推定の残基当たりの寄与が示されている。相互作用エネルギーは、R911 クローンの定方向進化による突然変異のために選択された僅か6つの残基からなる。

20

重要な接触ゾーン残基	ΔE_{VDW}	ΔE_{ELE}	ΔE_{MM}	ΔG_{GB+SA}	$\Delta G_{BINDING}$
D57L	-0.1	-0.1	-0.2	0.1	-0.1 \pm 0.0
D60A	-1.0	-2.5	-3.4	1.9	-1.6 \pm 0.2
I156L	-0.1	0.0	-0.1	0.0	-0.1 \pm 0.0
G192I	-0.9	-0.2	-1.1	0.1	-1.0 \pm 0.3
E206S	-0.2	-0.6	-0.7	0.6	-0.1 \pm 0.0
R248W	-0.6	0.3	-0.3	0.0	-0.3 \pm 0.1
小計相互作用エネルギー $\Delta G_{BINDING}$	-2.9	-3.0	-5.9	2.7	-3.2 \pm 0.2

30

【 0 2 7 5 】

分解エネルギーの分析は、wtPNGase F及びD60AクローンのG192及びE206の両方が、ライブラリー設計のためのテピッド残基及びホット残基を特定するために使用される5ナノ秒のMDシミュレーションのエネルギー分解の結果に一致する、不利な $G_{BINDING}$ 相互作用エネルギーを有することを示している(表3)。酵母ディスプレイ選択突然変異G192I及びE206Sは、R911及びR911 C60Aの推定相互作用エネルギーに有利に寄与する。加えて、D57L、I156L、及びR248W突然変異もまた、やや有利な相互作用エネルギーを有すると推定される。

40

【 0 2 7 6 】

【表 28】

β -キトピオースと複合体を形成したモデルの推定 MM-GBSA 理論相互作用エネルギー。

突然変異残基の小計 $\Delta G_{\text{BINDING}}$ (kcal/モル)を、1PNF (wtPNGase F)、D60A、R911 Dyn、及び R911 C60A Dyn の全てで比較した。D60A 対照クローンに対する小計 $\Delta\Delta G_{\text{BINDING}}$ (kcal/モル)エネルギーが示されている。比較のために、D60A に対するクローンの実験により決定された結合相互作用エネルギー($\Delta\Delta G_{\text{BIND-EXP}}$)も列記されている。

残基	1PNF (GLH206)	D60A (GLH206)	R911 Dyn	R911 C60A Dyn	
D57/-/L	-0.4 ± 0.5	-0.3 ± 0.5	-0.1 ± 0.1	-0.1 ± 0.0	10
D60/A/C/A	-2.1 ± 1.4	-1.8 ± 0.4	-0.2 ± 0.2	-1.6 ± 0.2	
I156/-/L	-1.1 ± 0.2	-1.1 ± 0.2	-0.3 ± 0.2	-0.1 ± 0.0	
G192/-/I	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.1	-3.1 ± 0.6	-1.0 ± 0.3	
E206/-/S	1.0 ± 0.9	0.7 ± 2.0	-0.4 ± 0.4	-0.1 ± 0.0	
R248/-/W	-0.1 ± 0.4	-0.2 ± 0.5	-0.4 ± 0.2	-0.3 ± 0.1	
小計 $\Delta G_{\text{BINDING}}$	-2.7 ± 0.8	-2.7 ± 1.0	-4.5 ± 0.4	-3.2 ± 0.2	
小計 $\Delta\Delta G_{\text{BINDING}}$	0.1 ± 1.3	-	-1.8 ± 1.1	-0.5 ± 1.0	20
$\Delta\Delta G_{\text{BIND-EXP}}$	0.5	-	-1.9	-0.7	

【0277】

-キトピオースリガンドを用いた全てのクローンの理論 G_{BINDING} 相互作用エネルギーの比較が表 28 に示されている。D60A に対するクローンの実験結合エネルギー ($G_{\text{BIND-EXP}}$) も含まれている。D60、即ち触媒活性に必要な残基が特に重要である。D60 及び D60A の両方は、かなり有利な相互作用をもたらし、D60C は、あまり有利ではない 0.2 kcal/モルの寄与を有すると推定される。この理論データは、R911 及び R911 C60A クローンの実験データに反し、D60C の突然変異が、R911 C60A に対する全 R911 結合エネルギーに対して -1.2 kcal/モル大きい寄与 ($G_{\text{BIND-EXP}}$) をすることを示している (表 10)。

この矛盾は、実験データが、MDシミュレーションでのように -キトピオースではなく、変性 RNase B を N-グルカン含有標的リガンドとして使用して作成されたことによる可能性が高い。これは、D60N、D60E、及び D60C を用いる点突然変異体の研究の報告として重要であり、全てが、D60 が触媒活性に必要なことを示している^{1, 8}。これらの報告は、D60A 点突然変異体で観察された触媒活性の著しい減少に一致している (表 10)。D60 の重要な役割は、結合キトピオースリガンドの還元 GlcNAc のアノマーヒドロキシルと D60 が直接相互作用することを示す 1PNF 結晶構造データによっても立証されている¹。糖ペプチドの場合には、アノマーヒドロキシルは、酵素で加水分解されるグリコシド結合で置き換えられるであろう。さらに、wtPNGase F 酵素を用いた基質特異性要件の研究により、酵素が、アスパラギン結合炭水化物部分及び N-X T グリコシル化 sequone からなるペプチド部分の両方を認識することが実証されている⁷。従って、-キトピオースリガンドを用いた MDシミュレーションは、N-グリカンのグリコシド結合の部位に D60 が有する実験相互作用も、N-結合型グリカンに共通のペプチド sequone との wtPNGase F 酵素の相互作用も十分にシミュレーションすることができない。

【0278】

糖トリペプチドリガンドと複合体を形成した PNGase F クローンの分析

一般的な N-結合糖トリペプチド (GlcNAc 1-4GlcNAc - -Asn - Leu - Thr) と複合体を形成したクローンを用いた MDシミュレーションを行って、

30

40

50

結合相互作用をより正確にモデル化し、かつ相互作用エネルギーを推定した。末端電荷（N末端ではNH³⁺及びC末端ではCOO⁻）を中和するために、糖トリペプチドリガンドのペプチド部分を、AMBER Tools 13の構成要素であるxleapで定義される、N末端ACE[-C(=O)-CH₃]保護基及びC末端NME[-C(=O)-NH-CH₃]保護基を用いてモデル化した¹⁰。表29は、MDシミュレーションに使用される糖トリペプチドリガンドと複合体を形成したPNGase Fクローンのモデル、計算平均RMSD、及び推定相対結合エネルギーの要約である。

【0279】

【表29】

MDシミュレーション及びMM-GBSAに使用されるwtPNGase F及びクローンの構造モデル。 10

結合ポケットに糖トリペプチドリガンドを有する構造モデルを、100ナノ秒のMDシミュレーションを行うために作成した。シミュレーション安定性が、シミュレーション時間の間中RMSDを分析することによって確認され、平均RMSD値が列記されている。各クローンの314全てのアミノ酸の推定総理論結合エネルギー(合計 $\Delta G_{\text{BINDING}}$)が列記されている(kcal/モル)。D60Aに対する全てのクローンの内の6つの突然変異残基のみから構成される推定理論結合相互作用エネルギー(小計 $\Delta\Delta G_{\text{BINDING}}$)が列記されている(kcal/モル)。比較のために、D60Aに対する全てのクローンの実験結合自由エネルギー($\Delta\Delta G_{\text{BIND-EXP}}$)も列記されている(kcal/モル)。 20

構造モデル	リガンド	RMSD (Å)	合計 $\Delta G_{\text{BINDING}}$	小計 $\Delta\Delta G_{\text{BINDING}}$	$\Delta\Delta G_{\text{BIND-EXP}}$
1PNF (GLH206)	GlcNAc β 1-4GlcNAc- β -Asn-Leu-Thr	1.2238	-44.0	1.6 \pm 1.2	0.5
D60A (GLH206)	GlcNAc β 1-4GlcNAc- β -Asn-Leu-Thr	1.1916	-48.4	-	-
R911 Dyn	GlcNAc β 1-4GlcNAc- β -Asn-Leu-Thr	1.2705	-54.4	-1.4 \pm 0.8	-1.9
R911 C60A Dyn	GlcNAc β 1-4GlcNAc- β -Asn-Leu-Thr	1.2618	-51.3	-1.9 \pm 0.8	-0.7

【0280】

D60A (GLH206)、R911 Dyn、及びR911 C60A Dyn糖トリペプチド複合モデルは全て、シミュレーション全体で安定した相互作用エネルギーを有していた。しかしながら、1PNF (GLH206)の軌道は、シミュレーション中に相互作用エネルギーの変動を示した(図49)。

【0281】

1PNF (GLH206)糖トリペプチドの軌道の視覚化により、相互作用エネルギーの変動に一致する、71~74ナノ秒の間のコンフォメーションの変化が示された。シミュレーションの最初の70ナノ秒の間に、還元GlcNAcは、Asn-Leu-Thrトリペプチド部分が比較的安定している正常な⁴C₁椅子型コンフォメーション(図50a及び図51)を有していた。Leu及びThr残基の動的運動は、比較的制限されないが安定であり、Asn残基は、全シミュレーションの間、付着したキトビオースが結合ポケットに保持されるため、比較的制限される。還元GlcNAcのN-アセチル基は、1PNF X線結晶学データに一致して、疎水性ポケットの中に及んでいた¹。しかしながら、71~74ナノ秒の間に、Asn残基のペプチド主鎖が、キトビオース結合ポケットから斜め上方に延びた溝に亘って整合しているタンパク質面に向かって回転した(図50 40 50

b)。D60-O-GlcNAc316 NAcとY85-OH-N316-O (キトビオース結合アスパラギン)との間で観察されたシミュレーションされた水素結合が、このコンフォメーション変化の間に消失する(図51)。従って、キトビオース結合アスパラギンのリガンド主鎖の酸素原子(N316-O)が、延びている溝にあるW207に近づく。この向きにより、シミュレーションされたW207-N-N316-O水素結合が形成される(図52)。このコンフォメーションの変化は、アスパラギン側鎖のグリコシド結合を変形させて、より軸方向に向かって移動させ、これにより、既に観察された還元GlcNAcの⁴C₁椅子型コンフォメーションがスキューポートコンフォメーションに移行する(図50b及び図52)。観察されたスキューポートコンフォメーションは、グリコシド機構のミカエリス複合体に類似している¹¹、¹²。シミュレーションされたW207-N-N316-O水素結合及び還元GlcNAcのスキューポートコンフォメーションは、残りのシミュレーションの間(26ナノ秒)、維持される。

【0282】

還元GlcNAcのスキューポートコンフォメーションの変化は、糖トリペプチドリガンドと複合体を形成した1PNF(GLH206)でのみ観察され、他の1PNFリガンド複合体では観察されなかった。同様に、同様のコンフォメーション変化は、安定した相互作用エネルギーに一致した、糖トリペプチドリガンドを用いたD60A(GLH206)、R911 Dyn、及びR911 C60A Dynの軌道で観察された。観察されたスキューポートコンフォメーションは、糖トリペプチドとwtPNGase F酵素との間のユニークな相互作用を示している。このため、最後の20ナノ秒の1PNF(GLH206)の軌道及び他の3つのシミュレーションを、MM-GBSA分析に使用した。

【0283】

糖トリペプチドと複合体を形成した4つ全てのモデル(1PNF(GLH206)、D60A(GLH206)、R911 Dyn、R911 C60A Dyn)の(wtPNGase Fの突然変異した6つの残基の)相互作用エネルギーが表30~表33に要約されている。

【0284】

【表30】

糖トリペプチドリガンドと複合体を形成した1PNF(GLH206)のMM-GBSA。糖トリペプチド(GlcNAcβ1-4GlcNAc-β-Asn-Leu-Thr)と複合体を形成した wtPNGase Fの結合自由エネルギー(kcal/モル)への推定の残基当たりの寄与が示されている。相互作用エネルギーは、R911クローンの定方向進化による突然変異のために選択される6つの残基のみからなる。触媒活性に必要な残基は太線で示されている。

重要な接触ゾーン残基	ΔE_{VDW}	ΔE_{ELE}	ΔE_{MM}	ΔG_{GB+SA}	$\Delta G_{BINDING}$
D57	-0.1	1.8	1.6	-1.9	-0.3 ± 0.7
D60 (求核試薬)	-2.1	-1.8	-3.9	4.7	0.9 ± 1.5
I156	-0.8	0.2	-0.6	-0.4	-0.9 ± 0.2
G192	-0.3	0.7	0.4	-0.5	-0.1 ± 0.3
E206	-1.6	-1.2	-2.7	2.0	-0.7 ± 0.5
R248	-0.3	-3.1	-3.5	3.3	-0.2 ± 1.2
小計相互作用エネルギー$\Delta G_{BINDING}$	-5.2	-3.3	-8.6	7.2	-1.4 ± 0.9

【0285】

10

20

30

40

【表 3 1】

糖トリペプチドリガンドと複合体を形成した D60A (GLH206)の MM-GBSA。糖トリペプチド (GlcNAc β 1-4GlcNAc- β -Asn-Leu-Thr)と複合体を形成した D60A (GLH206)の結合自由エネルギー(kcal/モル)への推定の残基当たりの寄与が示されている。相互作用エネルギーは、R911 クローンの定方向進化による突然変異のために選択される 6 つの残基のみからなる。

重要な接触ゾーン残基	ΔE_{VDW}	ΔE_{ELE}	ΔE_{MM}	ΔG_{GB+SA}	$\Delta G_{BINDING}$
D57	-0.1	1.9	1.8	-2.1	-0.3 \pm 0.5
D60A	-1.0	-2.8	-3.8	2.3	-1.5 \pm 0.4
I156	-0.9	0.0	-0.8	-0.2	-1.0 \pm 0.2
G192	-0.2	0.3	0.1	-0.2	-0.1 \pm 0.1
E206	-1.3	0.3	-1.0	1.1	0.1 \pm 1.1
R248	-0.6	-5.9	-6.5	6.3	-0.2 \pm 1.2
小計相互作用エネルギー$\Delta G_{BINDING}$	-4.1	-6.1	-10.2	7.2	-3.0 \pm 0.8

10

【 0 2 8 6 】

【表 3 2】

糖トリペプチドリガンドと複合体を形成した R911 Dyn の MM-GBSA。糖トリペプチド (GlcNAc β 1-4GlcNAc- β -Asn-Leu-Thr)と複合体を形成した R911 Dyn の結合自由エネルギー(kcal/モル)への推定の残基当たりの寄与が示されている。相互作用エネルギーは、R911 クローンの定方向進化による突然変異のために選択される 6 つの残基のみからなる。

20

重要な接触ゾーン残基	ΔE_{VDW}	ΔE_{ELE}	ΔE_{MM}	ΔG_{GB+SA}	$\Delta G_{BINDING}$
D57L	-0.1	0.0	-0.2	0.1	-0.1 \pm 0.1
D60C	-1.6	-2.2	-3.8	2.0	-1.8 \pm 0.7
I156L	-1.0	-0.1	-1.1	0.1	-1.0 \pm 0.2
G192I	-0.7	0.0	-0.6	0.0	-0.7 \pm 0.2
E206S	-0.2	-0.2	-0.4	0.4	0.0 \pm 0.1
R248W	-1.1	-0.1	-1.2	0.4	-0.8 \pm 0.2
小計相互作用エネルギー$\Delta G_{BINDING}$	-4.6	-2.7	-7.3	2.9	-4.5 \pm 0.4

30

【 0 2 8 7 】

【表 3 3】

糖トリペプチドリガンドと複合体を形成した R911 C60A Dyn の MM-GBSA。糖トリペプチド (GlcNAc β 1-4GlcNAc- β -Asn-Leu-Thr)と複合体を形成した R911 C60A Dyn の結合自由エネルギー(kcal/モル)への推定の残基当たりの寄与が示されている。相互作用エネルギーは、R911 クローンの定方向進化による突然変異のために選択される 6 つの残基のみからなる。

重要な接触ゾーン残基	ΔE_{VDW}	ΔE_{ELE}	ΔE_{MM}	ΔG_{GB+SA}	$\Delta G_{BINDING}$
D57L	-0.1	0.0	-0.1	0.0	-0.1 \pm 0.0
D60A	-1.2	-2.8	-4.0	2.3	-1.7 \pm 0.3
I156L	-1.0	-0.1	-1.1	0.0	-1.1 \pm 0.1
G192I	-0.9	0.2	-0.7	-0.2	-0.9 \pm 0.1
E206S	-0.4	-0.3	-0.7	0.6	-0.1 \pm 0.1
R248W	-1.3	-0.4	-1.7	0.6	-1.1 \pm 0.2
小計相互作用エネルギー$\Delta G_{BINDING}$	-4.9	-3.4	-8.3	3.4	-4.9 \pm 0.2

10

【0288】

糖トリペプチドリガンドを用いた全てのクローンの理論 $G_{BINDING}$ 相互作用エネルギーの比較が表 3 4 に示されている。1PNF (GLH206) 及び D60A (GLH206) の相互作用エネルギー分析の推定値は、D60A 突然変異が、wtPNGase F に対する有利な相互作用エネルギーを有することを示している。これは主に、D60A に対する D60A のより有利な溶媒和エネルギー (G_{GB+SA}) 寄与による。これらのデータは、計算アラニンスキャニングの結果に一致している (表 4)。wtPNGase F 酵素に対して、D60A 単一点突然変異体は、1PNF (GLH206) に対して -1.6 kcal/モル ($G_{BINDING}$) 有利な (示された 6 つの残基の) 総相互作用エネルギーをもたらす。これは、いくつかの他のデータによって立証される: (1) シミュレーション中の D60A の 1PNF に対する安定した相互作用エネルギー、(2) 1PNF (GLH206) のシミュレーションデータで観察されたような糖ペプチドコンフォメーション変化の欠如、及び (3) D60A の実験結合エネルギーが、wtPNGase F 酵素よりも -0.5 kcal/モル有利である。

20

30

【0289】

【表34】

糖トリペプチドリガンドと複合体を形成したモデルの推定 MM-GBSA 理論相互作用エネルギー。

突然変異残基の小計 $\Delta G_{\text{BINDING}}$ (kcal/モル) を、(GlcNAc β 1-4GlcNAc- β -Asn-Leu-Thr)と複合体を形成した 1PNF (GLH206)、D60A (GLH206)、R911 Dyn、及び

R911 C60A Dyn の全てで比較した。D60A 対照クローンに対する小計 $\Delta\Delta G_{\text{BINDING}}$ (kcal/モル) エネルギーが示されている。比較のために、D60A に対するクローンの実験により決定された

結合相互作用エネルギー($\Delta\Delta G_{\text{BIND-EXP}}$)も D60A 列記されている。

10

残基	1PNF (GLH206)	D60A (GLH206)	R911 Dyn	R911 C60A Dyn
D57/-/L	-0.3 ± 0.7	-0.3 ± 0.5	-0.1 ± 0.1	-0.1 ± 0.0
D60/A/C/A	0.9 ± 1.5	-1.5 ± 0.4	-1.8 ± 0.7	-1.7 ± 0.3
I156/-/L	-0.9 ± 0.2	-1.0 ± 0.2	-1.0 ± 0.2	-1.1 ± 0.1
G192/-/I	-0.1 ± 0.3	-0.1 ± 0.1	-0.7 ± 0.2	-0.9 ± 0.1
E206/-/S	-0.7 ± 0.5	0.1 ± 1.1	0.0 ± 0.1	-0.1 ± 0.1
R248/-/W	-0.2 ± 1.2	-0.2 ± 1.2	-0.8 ± 0.2	-1.1 ± 0.2
小計 $\Delta G_{\text{BINDING}}$	-1.4 ± 0.9	-3.0 ± 0.8	-4.5 ± 0.4	-4.9 ± 0.2
小計 $\Delta\Delta G_{\text{BINDING}}$	1.6 ± 1.2	-	-1.4 ± 0.8	-1.9 ± 0.8
$\Delta\Delta G_{\text{BIND-EXP}}$	0.5	-	-1.9	-0.7
β -キトビオース	-16.6 ± 1.2	-14.4 ± 1.1	-16.8 ± 1.5	-16.5 ± 1.3
還元 GlcNAc	-10.6 ± 1.3	-7.9 ± 1.1	-11.7 ± 1.7	-11.5 ± 1.3
末端 GlcNAc	-6.0 ± 1.1	-6.5 ± 1.1	-5.1 ± 1.2	-5.1 ± 1.2
ペプチド	-4.9 ± 1.3	-6.5 ± 1.6	-4.3 ± 0.9	-4.0 ± 0.9

20

【0290】

30

R911 Dynのデータは、D60Cの突然変異が、D60A (GLH206) よりも -0.3 kcal/モル有利であることを示している。しかしながら、D60A (GLH206) に対する G_{BINDING} は、R911が -1.4 kcal/モル有利であることを示している。主な有利な寄与は、G192I及びR248Wからであり、結合ポケットの疎水性を高める。他方、D57L及びE206Sは、有利な相互作用エネルギー寄与を殆どしないと推定される。この結果は、これらの2つの残基が野生型に戻るとより有利であり得ることを示唆するものであろう。D57の場合は、この観察は、D57がR61との水素結合の安定化に関与し、第2のGlcNAcとの水素結合を認識する直接基質を形成する有利な向きにR61を維持することを示唆するシミュレーションデータによって立証され得る(図51及び図52)。同様に、1PNF X線結晶モデルからのE206相互作用データは、E206が、結合ポケットの保存水分子(Wat³⁴⁶及びWat³⁴⁸)との水素結合に関与し、かつ基質認識に直接は関与していないことを示している(図5及び図6)¹。Wat³⁴⁶及びWat³⁴⁸の両方は、還元GlcNAcと直接的な水素結合を形成する。さらに、R911のE206Sの突然変異は、酸性残基から極性残基への変化であり、この変化は、タンパク質-炭水化物相互作用に有利である。しかしながら、これらのMDシミュレーションが、結合ポケットの保存水分子で行われなかったため、E206Sの推定理論相互作用エネルギーは、このシミュレーションで得られる推定値とは異なる可能性が高い。

40

【0291】

R911 (-1.4 kcal/モル) の G_{BINDING} 相対相互作用エネルギー

50

の推定は、D60A (GLH206) モデルに対して、R911 C60A (-1.9 kcal/mol) ほど有利ではなかった。これは、実験データ (GBIND-EXP) と対照的である。しかしながら、これらの理論推定値は、計算誤差の範囲内であり、この差異が統計的に有意でないことを示唆している。分解計算が、エネルギー寄与を近似することを考えると、比較的誤差の大きい MM-GBSA 推定値を得ることは珍しいことではなく、従ってデータの定性的評価が適切となる。

【0292】

- キトビオース及び糖トリペプチドリガンドのトリペプチド部分のエネルギー寄与も、MM-GBSA 分析で決定した (表34)。有利な相互作用の大部分は、タンパク質とペプチド (-4 kcal/mol ~ -6 kcal/mol) に対する糖トリペプチドの炭水化物部分 (-14 kcal/mol ~ -16 kcal/mol) との間である。1PNF X 線モデルからの実験データは、結合ポケットの残基とキトビオースリガンドとの間の水素結合のネットワークを示している (図5及び図6)¹。PNGase F の基質特異性の研究は、PNGase F の触媒活性が、糖トリペプチド基質 (キトビオース-Asn-Ala-Thr) では83%であり、糖ジペプチド基質 (キトビオース-Asn-Ala) では、活性が1.8%であることを示し、100%の活性は、ペントペプチド基質 (キトビオース-Trp-Ile-Asn-Ala-Ser) で得られる⁷。従って、基質特異性の研究は、ペプチド部分が重要であることが示している。これらのシミュレーションは、既に述べた実験データに基づいて糖トリペプチドリガンドを利用したため、より決定的な相互作用エネルギーの結果は、糖ペントペプチドリガンドで得られるであろうと予想され得る。

10

20

【0293】

【表35】

R911の突然変異の理論及び実験特性の要約。wtPNGase F に対するR911の突然変異

の特性が列記されている。糖トリペプチド(GlcNAcβ1-4GlcNAc-β-Asn-Leu-Thr)と複合体

を形成したD60A (GLH206)に対する推定理論相互作用エネルギー(kcal/mol)が含まれる。比

較のために、D60A に対するクローンの実験により決定された結合相互作用エネルギー

($\Delta\Delta G_{\text{BIND-EXP}}$)も列記されている。

30

wtPNGase F に対する R911 の突然変異	アミノ酸突然変異の特性	$\Delta\Delta G_{\text{BINDING}}$
D57L	酸性から疎水性	-0.1 ± 0.1
D60C	酸性から極性	-1.8 ± 0.7
I156L	疎水性が維持された	-1.0 ± 0.2
G192I	非極性から疎水性	-0.7 ± 0.2
E206S	酸性から極性	0.0 ± 0.1
R248W	塩基性から疎水性	-0.8 ± 0.2
小計 $\Delta\Delta G_{\text{BINDING}}$		-1.4 ± 0.8
$\Delta\Delta G_{\text{BIND-EXP}}$		-1.9

40

【0294】

R911の突然変異、特性、及び相対結合相互作用エネルギーの要約が表35に示されている。MM-GBSA データは、6つの突然変異残基の内の4つ (D60C、I156L、G192I、及びR248W) が、wtPNGase F (G_{BINDING}) に対して有利な相互作用エネルギーを有し、D57Lが僅かに寄与している。

【0295】

1PNF (GLH206) のMD軌道は、D57が、シミュレーションの間中、R61との水素結合に関与することを示し、この水素結合は、図51及び図52で可視化されて

50

いる。この相互作用は、当初は報告されておらず¹ (図5)、1PNF実験データの再分析により、D57のR61との水素結合が立証される。この水素結合は、キトビオースリガンドの第2の半分を所定の位置に維持する、第2のGlcNAcのN-アセチル基の溶媒露出面との水素結合に關与するため、R61をキトビオースリガンドの下側の位置に保持するために重要である(図6)。R61はまた、Wat³⁴⁹と水素結合し、これにより、キトビオースリガンドのタンパク質界面側の大きい水素結合ネットワークの一部が促進される(図6)。これらのデータは、まだ報告されていない、wtPNGase Fにおいて基質を安定させるD57の重要な役割を示している。従って、R911におけるこの残基のD57Lへの突然変異は、基質認識に悪影響を及ぼし得る。これは、結合溝から外側に揺動して溶媒により露出される位置をとる第2のGlcNAcを示す、キトビオースリガンドを用いたR911のMD軌道データによって立証される。R61は、D57Lの突然変異により、もはやD57水素結合によって所定の位置に保持されておらず、結合溝に戻り、第2のGlcNAcのタンパク質面側との水素結合を促進する。これらの観察はまた、相互作用エネルギー(-0.1±0.1 kcal/モル)に対してごく僅かに有利に寄与するR911 D57Lの突然変異のMM-GBSA相互作用エネルギーの推定によって立証される。従って、D57Lが野生型に戻されると、基質の認識及び親和性の向上が当然予想され得る。

10

【0296】

R911 E206Sの場合は、野生型E206の実験データは、保存水分子との水素結合相互作用を示し、これは、理論エネルギーの推定では説明がつかなかった。これは、E206S突然変異で推定された中立相互作用エネルギー(0.0±0.1 kcal/モル)に寄与した可能性がある。全体として、R911の理論小計 G B I N D I N G 相互作用エネルギー(-1.4±0.8 kcal/モル)は、実験により決定された値(-1.9 kcal/モル)を再現した。

20

【0297】

Ser-O-GlcNAcリガンドを用いたPNGase FクローンのMDシミュレーション及び結合自由エネルギー分解

R911 Lectenz(登録商標)アフィニティークロマトグラフィーによるO-GlcNAcアセチル化糖タンパク質の濃縮は、R911が、コアN-糖ペプチドに対して明確な基質特異性を有するN-グリカンプロセシング酵素PNGase Fに由来することを考えると予想外であった^{1, 7, 13-15}。1PNF、D60A、及びR911の構造モデルを、結合ポケットにおける共通O-GlcNAcモチーフ(GlcNAc-Ser)を用いて作成し、50ナノ秒のMDシミュレーション及びMM-GBSA分析に利用した(表36)。末端電荷(N末端ではNH₃⁺、C末端ではCOO⁻)を中和するために、GlcNAc-Serリガンドのセリン残基を、AMBER Tools 13の構成要素であるxleapで定義される、N末端ACE[-C(=O)-CH₃]保護基及びC末端NME[-C(=O)-NH-CH₃]保護基を用いてモデル化した¹⁰。

30

【0298】

【表 3 6】

MD シミュレーション及び MM-GBSA に使用される wtPNGase F 及びクローンの構造モデル。結合ポケットの Ser-O-GlcNAc リガンドを用いた構造モデルを作成して、50 ナノ秒の MD シミュレーションを行った。シミュレーション安定性が、シミュレーション時間に亘って RMSD 分析することによって確認され、平均 RMSD 値が列記されている。各クローンの 314 全てのアミノ酸の推定総理論結合エネルギー(合計 $\Delta G_{\text{BINDING}}$)が列記されている(kcal/モル)。

構造モデル	リガンド	RMSD (Å)	合計 $\Delta G_{\text{BINDING}}$
1PNF (GLH206)	GlcNAc- β -Ser	1.2584	-47.2
D60A (GLH206)	GlcNAc- β -Ser	1.2090	-46.0
R911 Dyn	GlcNAc- β -Ser	1.3029	-42.6

10

【0299】

構造平衡を、この研究に使用した以前のモデルに一致した、50 ナノ秒の MD シミュレーション中に計算した低い平均 RMSD によって確認した。相互作用エネルギーを、各モデルについて 50 ナノ秒の MD 軌道の期間に亘って 1 ナノ秒間隔で計算した(図 5 3 ~ 図 5 5)。当然、O-GlcNAc 糖ペプチドとの 1PNF (GLH206) 複合体の相互作用エネルギーは、全 50 ナノ秒の軌道中、不安定のみであった(図 5 3)。観察された不安定性は、N-糖ペプチドに対する wtPNGase F の特異性を示す実験データの立証である可能性が高い。しかしながら、リガンドが、軌道中に結合部位に維持され、この維持が、wtPNGase F 実験構造で観察されるように同じ疎水性ポケットへの N-アセチル基の伸長によって助けられ、野生型キトビオース及び O-GlcNAc リガンドの両方における共通 N-アセチル基が認識に重要であることを示唆していることに留意することが重要である。加えて、不安定性の大部分は、残基 D60 の近傍での、50 ナノ秒の軌道中に視覚的に観察される急速なコンフォメーションの変化に基づいて、O-GlcNAc 糖ペプチドリガンドの ACE-Ser-NME ペプチド部分からくるようである。1PNF (GLH206) モデルとは異なり、D60A (GLH206) モデルは、50 ナノ秒の MD 軌道の間中、安定した相互作用エネルギーを有し(図 5 4)、D60 残基が、この残基の D60A への突然変異が安定した相互作用エネルギーをもたらしたため、1PNF (GLH206) の MD シミュレーション中に観察される相互作用エネルギーの不安定性(図 5 3)の原因であることを示唆している。

20

30

【0300】

複合体の R911 Dyn モデルは、図 5 5 に示されているように、17 ナノ秒 ~ 30 ナノ秒、及び 39 ナノ秒 ~ 50 ナノ秒に最も顕著な様々な安定した相互作用エネルギーの領域を有していた。これらの 2 つの領域間の重要な相違は、R61 と GlcNAc-O4 との間の水素結合相互作用の欠如により変更された前の時点のリガンドのコンフォメーション (confirmation) である。R61 と GlcNAc-O4 との水素結合が、39 ナノ秒で形成され始めると、複合体は、MD シミュレーションの最後の 11 ナノ秒の間の有利な相互作用エネルギー及び軌道の視覚分析によって証明されるようにより安定したコンフォメーションをとる(図 5 6)。R911 と O-GlcNAc リガンドとの間の理論水素結合のリストが、表 3 7 に示され、図 5 6 b に描写されている。これらの観察により、R911 Dyn 及び D60A (GLH206) の軌道の 39 ナノ秒 ~ 49 ナノ秒の時点間の 10 ナノ秒の軌道が、MM-GBSA 分析のために選択された。1PNF (GLH206) 複合体の場合は、軌道の最も安定した領域が MM-GBSA 分析のために選択された(29 ナノ秒 ~ 39 ナノ秒)。しかしながら、たとえ軌道のこの領域が比較的不安定であっても、MM-GBSA データは、最善ではないと見なされるべきである。長い 100 ナノ秒の MD シミュレーションでは、よりエネルギー的に安定したコンフォメーションをとる 1PNF (GLH206) - O-GlcNAc 複合体にならなかった。同様

40

50

に、コンフォメーションの著しい変化は、MDシミュレーションが100ナノ秒まで延長されたときには、O-GlcNAcと複合体を形成したD60A (GLH206)又はR911 Dynモデルでは全く観察されなかった。

【0301】

【表37】

GlcNAc-β-SerとR911との間の理論水素結合長。

水素結合	R911 Ser-O-GlcNAc MD シミュレーションの平均(Å)
D60-O – GlcNAc316-H2N	3.09 ± 0.22
R61-HH11 – GlcNAc318-O4	2.84 ± 0.11
E118-Oε – GlcNAc318-H3O	2.69 ± 0.12
W191-NH – GlcNAc318-O6	3.02 ± 0.20
Y85-OH – S316-H	3.06 ± 0.16

10

【0302】

GlcNAc - Ser複合体を用いたモデルの推定結合自由エネルギーが表38に示されている。相互作用エネルギー及び軌道の視覚化で観察されるように、MM-GBSAデータはまた、D60A (GLH206)複合体 (-1.6 ± 0.4 kcal / モル) に対する1PNF (GLH206)複合体 (-0.5 ± 1.6 kcal / モル)のD60の相対的に不利な相互作用エネルギーを示している。これは、1PNF (GLH206)複合体のD60残基について計算した大きい推定誤差によっても裏付けられる。R911 Dyn複合体のD60Cの突然変異の推定相互作用エネルギーは比較的有利である (-3.2 ± 0.7)。D60Cの突然変異とは異なり、E206Sの突然変異は、著しく不利であるが：これは、この部位で相互作用することが観察される保存水分子が、MM-GBSAの残基当たりの推定に含まれていないため、不正確な過小評価が一因であり得る。それでも、E206のD60A (GLH206)で推定される著しく有利な相互作用エネルギー (-1.6 ± 0.7 kcal / モル)により、E206Sが野生型に戻されると、GlcNAc - Serに特異的なリガンド認識も向上し得ると考えられる。

20

【0303】

30

【表 3 8】

O-GlcNAc リガンドと複合体を形成したモデルの推定 MM-GBSA 理論相互作用エネルギー。

突然変異残基の小計 $\Delta G_{\text{BINDING}}$ (kcal/モル)を、(GlcNAc- β -Ser)と複合体を形成した 1PNF (GLH206)、D60A (GLH206)、及び R911 Dyn の全てで比較した。D60A 対照クローンに対する小計 $\Delta\Delta G_{\text{BINDING}}$ (kcal/モル)エネルギーが示されている。

残基	1PNF (GLH206)	D60A (GLH206)	R911 Dyn
D57/-/L	-0.3 \pm 0.8	-0.4 \pm 0.5	-0.1 \pm 0.0
D60/A/C	-0.5 \pm 1.6	-1.6 \pm 0.4	-3.2 \pm 0.7
I156/-/L	-0.1 \pm 0.1	-0.2 \pm 0.0	-0.1 \pm 0.0
G192/-/I	-0.1 \pm 0.2	-0.1 \pm 0.1	-0.4 \pm 0.2
E206/-/S	-1.7 \pm 1.1	-1.6 \pm 0.7	-0.1 \pm 0.2
R248/-/W	-0.1 \pm 1.2	-2.3 \pm 0.8	-0.9 \pm 0.2
小計 $\Delta G_{\text{BINDING}}$	-3.0 \pm 1.1	-6.2 \pm 0.6	-4.9 \pm 0.4
小計 $\Delta\Delta G_{\text{BINDING}}$	3.2 \pm 1.2	-	1.3 \pm 0.7
β -GlcNAc	-17.6 \pm 1.8	-14.7 \pm 1.6	-16.4 \pm 1.5
セリン	-4.9 \pm 1.2	-5.7 \pm 0.8	-2.9 \pm 0.6

10

20

30

40

50

【0304】

I 1 5 6 部位は、最小限の有利な相互作用寄与をすると推定される。これは、G l c N A c - - S e r リガンドには存在しない、野生型キトビオースリガンドの第 2 の G l c N A c との相互作用にこの部位がより重要であるため驚きではない。しかしながら、I 1 5 6 部位のタンパク質ループ領域は、キトビオースの第 2 の G l c N A c の結合部位へのアクセスを遮断することによって G l c N A c - - S e r リガンドに対する特異性を改善する伸長による修飾に重要であり得る。D 5 7 L の突然変異がまた、極僅かに有利な相互作用をもたらし、かつ R 9 1 1 キトビオース複合体で既に観察されたように R 6 1 水素結合相互作用を不安定化させる。既に述べたように、実験及びデータのモデル化は、R 6 1 が、キトビオースの第 2 の G l c N A c 残基の N - アセチル基との水素結合によって媒介される基質認識にとって重要であることを示している。O - G l c N A c 糖ペプチド (G l c N A c - - S e r) との R 9 1 1 D y n 複合体では、R 6 1 が、軌道の最後の部分に向かって G l c N A c - O 4 と水素結合する。これらの観察は、D 5 7 L が野生型に戻されると、基質認識及び特異性を高める可能性があることを示唆している。

【0305】

O - G l c N A c 糖ペプチド (G l c N A c - - S e r) を用いたデータのモデル化は、実験により観察された O - G l c N アセチル化糖タンパク質の濃縮の合理化を提供する。さらに、O - G l c N アセチル化糖タンパク質に対する特異性は、E 2 0 6 S を野生型に戻し、そして I 1 5 6 L のループ領域を伸長させて大きいキトビオースリガンドを結合ポケットから遮断することによって高めることができる。加えて、R 9 1 1 による O - G l c N A c の認識の方法は、セリン残基 (- 2 . 9 \pm 0 . 6 k c a l / モル) に対する還元 G l c N A c (- 1 6 . 4 \pm 1 . 5 k c a l / モル) との非常に有利な相互作用によって行われるようであり、これは、表 3 4 に記載され、w t P N G a s e F 複合体の実験データに示されている、野生型キトビオースリガンドの相互作用における還元 G l c N A c との有利な相互作用の観察に一致している¹。

【0306】

方法

1 P N F からの D 6 0 A 及び R 9 1 1 構造の構築

1 P N F X 線構造モデルをベースモデルとして使用し、このベースモデルから、他の

全ての突然変異 PNGase Fモデルを USCF Chimera v1.8.1を用いて構築した¹、¹⁶。Dunbrack及びDynamomics回転異性体のライブラリーを利用して、USCF Chimeraの回転異性体の選択及びねじれ角ツールを用いたモデル化及びモデルへの編集に好ましい回転異性体を選択した²、³。表18に列記されている、 α -キトビオースリガンド (GlcNAc 1-4GlcNAc-OH)を用いたPNGase Fの6つのモデルを構築した。表23に列記されている、 β -キトビオースリガンド (GlcNAc 1-4GlcNAc-OH)を用いたPNGase Fの4つのモデルを構築した。表29に列記されている、糖トリペプチドリガンド (GlcNAc 1-4GlcNAc-Asn-Leu-Thr)を用いたPNGase Fの4つのモデルを構築した。表36に列記されている、GlcNAc-Serリガンドを用いた3つのモデルを作製した。末端電荷 (N末端ではNH₃⁺、C末端ではCOO⁻)を中和するために、全ての糖ペプチドリガンドのペプチド部分を、AMBER Tools 13の構成要素であるxleapで定義される、N末端ACE[-C(=O)-CH₃]保護基及びC末端NME[-C(=O)-NH-CH₃]保護基を用いてモデル化した¹⁰。

【0307】

MDシミュレーション

PNGase F-リガンド複合体の100ナノ秒の十分に溶媒和されたMDシミュレーションを、AMBER-GLYCAMタンパク質-炭水化物力場を利用する圧力(NPT)及び室温で、水中で行った。系は、全てのモデル化回転異性体がエネルギー最小化コンフォメーションとなるように系制限マスク(system restraint mask)(タンパク質C及びリガンド環原子)を用いる陰溶媒(5000ステップ)で最小化した。tleapを用いて、系を、TIP3P水モデルで陽溶媒和した。次いで、陽溶媒和系を、系制限マスクを用いてエネルギーを最小化した(2000ステップ、NVT)。同様に系制限マスクを用いて30ピコ秒の加熱ステップを行い(NVT)、続いてリガンド制限のみ(リガンド環原子)を用いて1ナノ秒の平衡化(NPT)を行った。100ナノ秒の生産工程を行い(50,000,000ステップ、NPT)、データを0.002ピコ秒ごとに保存し、これは、データのナノ秒ごとの500フレームの保存に一致する。軌道分析を、AMBER Tools 13で実施されるtleap、ptraj、及びcpptrajを用いて行った¹⁰、¹⁷。USCF Chimera 1.8.1を用いてデータを視覚化した¹⁶。

【0308】

結合自由エネルギーの分解

結合エネルギーへの残基当たりの寄与を、軌道のエネルギー収束部分に対して実施例2で既に説明された、AMBERで実施される一般化Born(GB)連続溶媒モデルを利用して、PNGase Fの314の各アミノ酸に対して計算した¹⁸。

【0309】

参考文献

1. Kuhn, P. et al. Active Site and Oligosaccharide Recognition Residues of Peptide-N4-(N-acetyl- β -D-glucosaminyl)asparagine Amidase F. *Journal of Biological Chemistry* 270, 29493-29497 (1995).
2. Dunbrack, R.L., Jr. Rotamer libraries in the 21st century. *Current Opinion in Structural Biology* 12, 431-440 (2002).

10

20

30

40

3. Scouras, A.D. & Daggett, V. The dynamomeomics rotamer library: Amino acid side chain conformations and dynamics from comprehensive molecular dynamics simulations in water. *Protein Science* 20, 341-352 (2011).
4. Woods, R.J. & Tessier, M.B. Computational glycoscience: characterizing the spatial and temporal properties of glycans and glycan-protein complexes. *Current Opinion in Structural Biology* 20, 575-583 (2010).
5. Genheden, S. & Ryde, U. Will molecular dynamics simulations of proteins ever reach equilibrium? *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14, 8662-8677 (2012). 10
6. Hadden, J.A., Tessier, M.B., Fadda, E. & Woods, R.J. Calculating binding free energies for protein-carbohydrate complexes. (2012).
7. Fan, J.Q. Detailed Studies on Substrate Structure Requirements of Glycoamidases A and F. *Journal of Biological Chemistry* 272, 27058-27064 (1997).
8. Filitcheva, J. PNGases: A Diverse Family of Enzymes Related by Function Rather Than Catalytic Mechanism, Vol. Ph.D. (Massey University, Palmerston North; 2010). 20
9. Isom, D.G., Castaneda, C.A., Cannon, B.R., Velu, P.D. & Garcia-Moreno, E.B. Charges in the hydrophobic interior of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16096-16100 (2010).
10. D.A. Case, T.A.D., T.E. Cheatham, III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, R.C. Walker, W. Zhang, K.M. Merz, B. Roberts, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, J. Swails, A.W. Götz, I. Kolossváry, K.F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, R.M. Wolf, J. Liu, X. Wu, S.R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M.-J. Hsieh, G. Cui, D.R. Roe, D.H. Mathews, M.G. Seetin, R. Salomon-Ferrer, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, and P.A. Kollman (University of California, San Francisco, 2012). 30
11. Rye, C.S. & Withers, S.G. Glycosidase mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 4, 573-580 (2000).
12. Kozmon, S. & Tvaroška, I. Catalytic Mechanism of Glycosyltransferases: Hybrid Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Study of the Inverting N-Acetylglucosaminyltransferase I. *Journal of the American Chemical Society* 128, 16921-16927 (2006). 40

13. Tretter, V., Altmann, F. & MÄRz, L. Peptide-N4-(N-acetyl-β-glucosaminyl)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached α1 → 3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue. *European Journal of Biochemistry* 199, 647-652 (1991).
14. Mussar, K.J., Murray, G.J., Martin, B.M. & Viswanatha, T. Peptide: N-glycosidase F: studies on the glycoprotein aminoglycan amidase from *Flavobacterium meningosepticum*. *Journal of biochemical and biophysical methods* 20, 53-68 (1989).
15. Tarentino, A.L., Gomez, C.M. & Plummer, T.H., Jr. Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. *Biochemistry* 24, 4665-4671 (1985). 10
16. Pettersen, E.F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25, 1605-1612 (2004).
17. Roe, D.R. & Cheatham, T.E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *Journal of Chemical Theory and Computation* 9, 3084-3095 (2013).
18. Tsui, V. & Case, D.A. Theory and applications of the generalized Born solvation model in macromolecular simulations. *Biopolymers* 56, 275-291 (2001). 20

【 0 3 1 0 】

実施例 5

バイオコンピナトリアルライブラリーの構築及びスクリーニング

バイオコンピナトリアルライブラリーの効率的な構築及びスクリーニングのためには、ライブラリーを約 10^9 クローンに制限することが重要であり¹、これは、7つのランダム化位置 ($20^7 = 1 \times 10^9$ クローン) に一致する。どの残基が変化すべきかが即座にわからない場合は、ライブラリーの設計は困難であり得る。ここで、計算シミュレーションからの入力、適切なアミノ酸の特定に役立ち、これによりライブラリーの設計に集中できる。計算ガイドス、特に潜在的なクローンの数の削減に関する利点が記載されている²。Barakat及びLoveによる近年の再考察での観察されたように³、*in vivo*でのスクリーンと一体化された計算アルゴリズムは、タンパク質の設計の分野において卓越した迅速な成功もたらす。 30

【 0 3 1 1 】

ここで、計算を中心とした酵母ディスプレイ Gene Art ライブラリー (ライブラリー-2) は、約 1.36×10^7 のクローンの多様性を有し、約 22% の理論多様性の推定配列カバレッジを表している (表 6)。FACS の前の MACS による選択は、ライブラリーが、機能的に適切なクローンの実用的な選別のための厳格な選択圧力として FACS を用いる前に十分に濃縮されるようにする役割を果たす (図 15 及び図 16 a)。ライブラリーを、RNase B 及びアシアロフェチュインの代表的な N-グリカン標的の混合物に対して選択して、PNGase F 酵素の同族特異性を保持したクローンを濃縮した。 40

【 0 3 1 2 】

R911 タンパク質配列の検査は、タンパク質-グリカン相互作用で一般に見られる残基の濃縮を示した。炭水化物の疎水性面は、芳香族アミノ酸とのスタッキング相互作用に頻繁に関与し、これは、 1.5 kcal/mol 寄与すると推定される⁴。次いで、選択が、MM-GBSA 分析に基づいて $-0.8 \pm 0.2 \text{ kcal/mol}$ の有利な寄与と推定される 248 位での Trp の導入をもたらすことに留意されたい。加えて、いくつかの他の突然変異は、wt 配列 (D57L、G192I、D60C、及び E206S) に対する全疎水性を高めた (表 35)。

【0313】

R248Wの突然変異は、炭水化物-芳香族相互作用の促進におけるその既知の重要性のためだけではなく、wtPNGase Fの触媒機構(A_{sn}-カルボニル原子を求核攻撃されやすくする)及び触媒部位でのWat³⁴⁶との相互作用(図5及び図6)におけるR248の提唱された役割のために特に興味深い^{5, 6}。R248Aの点突然変異は、wtPNGase F酵素に対して0.1%の触媒活性を有する⁵。R911の触媒活性の欠如(表10)は、R248Wの突然変異が一因であり得る。従って、R248Wの突然変異は、親和性を高めるだけではなく、R911の触媒活性に寄与し得る。

【0314】

アスパラギンと還元GlcNAcとの間のグリコシド結合に跨る野生型E206及びD60は、X線結晶構造1PNFにおける保存水(Wat³⁴⁶及びWat³⁴⁸)との水素結合相互作用(図5及び図6)に関与し、かつ触媒活性に寄与することが知られている⁶。従って、R911における触媒残基(D60C及びE206S)の極性突然変異が、触媒不活性にも寄与する可能性が高いが、基質認識に重要な水素結合ネットワークを保護する可能性が高いことにも留意することが重要である。保存水分子を用いたMM-GBSAエネルギー相互作用分析は、R911におけるE206S及びD60Cの役割のさらなる洞察を提供し得る。

【0315】

糖トリペプチドと複合体を形成したwtPNGase FのMD分析は、D57が、水素結合相互作用によるR61の安定化、従ってR61と第2のGlcNAcとの間の基質認識の向上に重要であることを示した。このタイプの安定化相互作用は、1PNF X線結晶構造におけるS155残基とE118残基との間で報告されている(図5及び図6)⁶。R61のように、E118は、結合溝の保存水分子及び第2のGlcNAcと直接相互作用する。E118の向きは、S155との水素結合相互作用によって安定化される。R911におけるD57Lを野生型に戻すことにより、R61による基質認識を改善し、かつ親和性を高めることができる。

【0316】

自由エネルギー分解分析は、他に同等の実験方法が存在しないため、残基当たりの相互作用エネルギーを調べる強力なツールを提供する。-44.0 kcal/molの総相互作用エネルギーを、糖トリペプチドリガンドを用いた1PNF(GLH206)のMDシミュレーションのために計算した(表29)。この値は、wtPNGase Fの-7.103 kcal/molの実験結合自由エネルギーを過大評価し(表11)、これは、リガンド結合に関連したエントロピーペナルティを省略するMM-GBSA計算の典型的な特徴である⁷。コンフォメーション柔軟性の変化から生じるエントロピー効果を推定することができるが、収束を達成するために非常に長いMDシミュレーションを必要とし得る⁸。しかしながら、タンパク質の側鎖の柔軟性の低下から生じるエントロピー効果は、リガンドと強く相互作用する残基で最も高く、テピッド残基及びコールド残基(cold residue)で最も低いと予想され得る。これらの理由から、エントロピー寄与は計算しなかった。

【0317】

wtPNGase F及びD60Aとは異なり、R911及びR911 C60Aクローンの発現及び精製は低い収量(約150 µg/L)となった。これらのクローンのIMAC及びSEC溶出プロフィールは、wtPNGase F及びD60Aとは異なっていた。さらに、複数のR911 SEC溶出ピークのウェスタンブロット分析により、R911クローンの構造異性体の存在が示唆され、その一部は、誤って折り畳まれたR911クローンであり得る。タンパク質突然変異許容、複数の突然変異がタンパク質安定性を低下させるリスクは、タンパク質ライブラリーの設計の共通の問題であり、これは、特に酵素の熱安定性及び活性を高めるために選択される場合は、適切な選択パラメータの使用によって補償することができる⁹。しかしながら、親和性を高める上で、これらの課題は根強く存在し、突然変異の不安定化を最小限にする近年の試みが、安定効果のために配列

10

20

30

40

50

スペースを事前にスクリーニングするタンパク質折り畳みアルゴリズムの開発につながった⁹。

【0318】

S P R動的データは、R 9 1 1が、N - グリカン保持糖タンパク質 R N a s e B に対してマイクロモル以下の親和性 ($K_D = 0.26 \mu M$) を有し、非親和性最適化 D 6 0 A 対照に対して親和性が10倍高いことを実証している。R 9 1 1はまた、84分の1の解離速度 ($k_{off} = 5.1 \times 10^{-3} / \text{秒}$) を有する。R 9 1 1 C 6 0 Aは、比較的低い親和性及び低い解離速度を示す場合は、D 6 0 C R 9 1 1の突然変異が、結合相互作用に重要な寄与を果たすことを示唆し、これは、他の突然変異からの全体的な相乗効果によってさらに強められる。重要なことに、動的データは、設計戦略に示されている高い親和性と低い解離速度関連の L e c t e n z (登録商標) 選択閾値を満たす(図5)。

10

【0319】

R 9 1 1 L e c t e n z (登録商標) をアフィニティークロマトグラフィー (L A C) にかけて、N - グリカン保持糖タンパク質 R N a s e B 及び R N a s e B 由来の N - 糖ペプチドの濃縮が実証された。さらに、脱グリコシル化 R N a s e B の濃縮の不足及びキトピオースを用いた競合溶出により、R 9 1 1がN - グリカン構造の共通キトピオース糖ペプチドコアを認識することが実証されている。これは、w t P N G a s e F 酵素の観察された特異性及び D 6 0 A グリカンアレイスクリーニングの結果に一致している。それでもなお、R 9 1 1のグリカン特異性が、グリカンアレイスクリーニングによってさらに調べられる。

20

【0320】

競合溶出による M C F 7 細胞抽出物からの天然糖タンパク質の濃縮のために R 9 1 1 L e c t e n z (登録商標) をアフィニティークロマトグラフィー (L A C) にかけることにより、R 9 1 1によって認識される共通還元 G l c N A c を共有する N - 糖タンパク質及び O - G l c N アセチル化 O - 糖タンパク質の両方が3.4倍に濃縮された。これは、R 9 1 1 L e c t e n z (登録商標) が、N - グリカンの共通キトピオースコア、及び共通コア O - G l c N アセチル化モチーフ含有 O - 糖タンパク質の両方を認識する唯一の既知の試薬であるため重要であり、単一親和性試薬を用いる糖タンパク質の2つの主要クラスの濃縮を可能にする。さらに、J a c、C o n A、及び W G A レクチンを用いるマルチレクチンアフィニティークロマトグラフィー (M L A C) と比較すると、R 9 1 1 L A C では、M L A C では濃縮されない糖タンパク質が濃縮された¹⁰。糖タンパク質濃縮プロファイルの差異は、グリカンの検出として利用される捕捉試薬の異なる特異性がアフィニティークロマトグラフに利用されるレクチンのタイプによって変動することを考えると驚きではない¹¹。当然、一部の非糖タンパク質も、R 9 1 1 L A C からの溶出サンプルで確認された。アフィニティークロマトグラフィーによるサンプル濃縮の別の弱点は、標的リガンドの直接親和性選択以外の非特異的タンパク質 - タンパク質相互作用によって捕捉されるタンパク質から生じる擬陽性である¹²。

30

【0321】

炭水化物プロセッシング酵素の触媒的に不活性な高親和性捕捉試薬へのエンジニアリングのための自由エネルギー分解に基づいたバイオコンビナトリアルライブラリーの設計のこの種類の最初の適用により、L e c t e n z (登録商標) 設計戦略が全体として承認され、タンパク質エンジニアリングに関連した課題が顕著になる。これらの研究は、R 9 1 1 L e c t e n z (登録商標) を選択突然変異によってさらに強めて、2つの別の L e c t e n z (登録商標) 試薬を調製することができることを示唆し、この2つの別の L e c t e n z (登録商標) 試薬の一方は、N - 糖ペプチド及び N - 糖タンパク質に特異的であり、第2の L e c t e n z (登録商標) 試薬は、O - G l c N アセチル化糖タンパク質及び糖ペプチドに特異的である。重要な次のステップは、D 5 7 L 突然変異を野生型に戻すことであり得、これは、N - 糖タンパク質に対する基質特性を高めるための最も効果的な方法である可能性が高いためである。O - G l c N A c 特異的 L e c t e n z (登録商標) は、E 2 0 6 S 及び D 5 7 L の両方を野生型に戻して、I 1 5 6 L のループ領域を伸長

40

50

させて大きいキトビオースリガンドを結合ポケットから遮断することによってエンジニアリングすることができる。

【0322】

ここに示される研究はまた、Lectenz（登録商標）の調製用の代替の配列スペースの調査のための第2世代のバイオコンビナトリアルライブラリーの開発の基礎となる。文献報告及び本明細書で報告されるデータに基づいて、表39は、wtPNGase Fの結合溝で同定された重要な残基の提唱される役割を列記する。このリストは、別のLectenz（登録商標）候補の開発をガイドするためにPNGase Fによる基質認識の理解の向上に役立つ。開発を進展させ得る別の重要な因子は、PNGase Fと複合体を形成した糖トリペプチド又は糖ペンタペプチドの実験構造データの作成であろう。D60A単一点突然変異体との複合体をこの研究で開発し、この複合体は、著しく低い触媒活性を有し、Lectenz（登録商標）エンジニアリングに使用するのに等しく有用な構造であろう。しかしながら、過去20年間に亘るこのようなデータ取得における成果不足は、実験構造データの取得の困難さの表れである。

【0323】

【表 3 9】

PNGase F 活性部位の残基の提唱される機能。点突然変異体の研究に基づいた触媒活性に影響を与え、かつ触媒機構の一部と提唱される残基は太字で示されている。

IPNF 残基	提唱される機能	相互作用	アミノ酸又は リガンドとの接触
D57	安定化	R61 との水素結合(MD)	R61
W59	触媒活性に影響 を与える ⁵	疎水性環境	D60
D60	触媒機構 ^{5,6}	Wat ³⁴⁶ 及びリガンドとの水素結合	1 st GlcNAc
R61	基質の結合/認識 ^{5,6}	リガンドとの水素結合	2 nd GlcNAc
Y62	安定化 ^{6,13}	Wat ¹⁴⁶ 及び N152 との水素結合	N152
I82	触媒活性に影響 を与える ⁵	疎水性環境	D60
Y85	安定化 ⁶	Wat ³⁴⁶ との水素結合	1 st GlcNAc
E118	基質の結合/認識 ⁶	Wat ³⁴⁹ 及びリガンドとの水素結合	2 nd GlcNAc
W120	基質の結合/認識 ⁵	Wat ³⁴⁹ 及びリガンドとの水素結合、 及び 1 st マンノースとの予測される 潜在的な疎水性相互作用	2 nd GlcNAc 及び 1 st マンノース?
S155	安定化 ⁶	E118 との水素結合	E118
I156	安定化	1 st マンノースとの予測される潜在的 な疎水性相互作用(MD)	1 st マンノース?
W191	基質の結合/認識 ⁶	リガンドとの水素結合	1 st GlcNAc
G190	安定化 ⁶	Wat ⁷⁵ 及び Wat ³⁴⁸ との水素結合	1 st GlcNAc
H193	基質の結合/認識 ⁵	-	-
E206	触媒機構 ^{5,6}	Wat ³⁴⁶ 及び Wat ³⁴⁸ との水素結合	1 st GlcNAc
W207	触媒活性に影響 を与える ⁵	疎水性環境及び Asn-O との 水素結合 (MD)	E206 及び Asn-O
R248	触媒機構に潜在 的に関与する ⁵	Wat ³⁴⁶ との静電的及び水素結合	1 st GlcNAc
W251	触媒活性に影響 を与える ⁵	疎水性環境	E206

【 0 3 2 4 】

R 9 1 1 L e c t e n z (登録商標)を、酵母表面ディスプレイ PNGase F バイオコンビナトリアルライブラリーのコンピューターガイド設計を用いて選択した。R 9 1 1 L e c t e n z (登録商標)は、全ての N 結合型グリカン及びコア O - G l c N アセチル化糖タンパク質に共通のコア糖ペプチド成分を検出するための新規の汎特異的 (p a n - s p e c i f i c) 試薬である。L e c t e n z (登録商標)設計戦略のこの適用は、グリカン特異性及び高い親和性を有する炭水化物プロセッシング酵素から別の L e c t e n z (登録商標)試薬をエンジニアリングする機会を提供する。従って、L e c t e n z (登録商標)試薬は、既存の炭水化物認識レクチン及び抗体の使用を補完し、そしてアフニティークロマトグラフィーのようなサンプル濃縮適用例に利用することができる。他の適用例、例えば、グリカン検出アレイ、F A C S 及び M u l t i p l e x e d S u

40

50

s p e n s i o n A r r a y s、免疫組織化学、及びバイオプロセスモニタリングでの
L e c t e n z (登録商標) 試薬の有用性をさらに調べる。

【 0 3 2 5 】

参考文献

1. Bonsor, D.A. & Sundberg, E.J. Dissecting protein-protein interactions using directed evolution. *Biochemistry* 50, 2394-2402 (2011).
2. Voigt, C.A., Mayo, S.L., Arnold, F.H. & Wang, Z.G. Computationally focusing the directed evolution of proteins. *J Cell Biochem Suppl* 37, 58-63 (2001). 10
3. Barakat, N. & Love, J. Molecular Diversity in Engineered Protein Libraries. *Curr Opin Chem Biol* 11, 335-341 (2007).
4. Asensio, J.L., Ardá, A., Cañada, F.J. & Jiménez-Barbero, J. Carbohydrate–Aromatic Interactions. *Accounts of Chemical Research* 46, 946-954 (2012).
5. Filitcheva, J. PNGases: A Diverse Family of Enzymes Related by Function Rather Than Catalytic Mechanism, Vol. Ph.D. (Massey University, Palmerston North; 2010).
6. Kuhn, P. et al. Active Site and Oligosaccharide Recognition Residues of Peptide-N4-(N-acetyl-β-D-glucosaminyl)asparagine Amidase F. *Journal of Biological Chemistry* 270, 29493-29497 (1995). 20
7. Woods, R.J. & Tessier, M.B. Computational glycoscience: characterizing the spatial and temporal properties of glycans and glycan-protein complexes. *Current Opinion in Structural Biology* 20, 575-583 (2010).
8. Genheden, S. & Ryde, U. Will molecular dynamics simulations of proteins ever reach equilibrium? *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14, 8662-8677 (2012). 30
9. Socha, R.D. & Tokuriki, N. Modulating protein stability - directed evolution strategies for improved protein function. *Febs J* 280, 5582-5595 (2013).
10. Lee, L.Y. et al. An optimized approach for enrichment of glycoproteins from cell culture lysates using native multi-lectin affinity chromatography. *J Sep Sci* 35, 2445-2452 (2012).
11. Krishnamoorthy, L. & Mahal, L.K. Glycomic analysis: an array of technologies. *ACS chemical biology* 4, 715-732 (2009). 40
12. Jung, K. & Cho, W. Serial affinity chromatography as a selection tool in glycoproteomics. *Anal Chem* 85, 7125-7132 (2013).
13. Kuhn, P., Tarentino, A.L., Plummer, T.H., Jr. & Van Roey, P. Crystal structure of peptide-N4-(N-acetyl-beta-D-glucosaminyl)asparagine amidase F at 2.2-A resolution. *Biochemistry* 33, 11699-11706 (1994).

【 0 3 2 6 】

実施例 6

O - G 1 c N アセチル化糖タンパク質及び糖ペプチドの濃縮のためのエンジニアリングさ 50

れたLECTENZバイオセンサー

エンジニアリングされたR911 Lectenzの特徴付けは、N-グリコシル化及びO-GlcNAcアセチル化糖タンパク質及び糖ペプチドの両方に対する特異性を示した。この二重特異性は、N-グリコシル化及びO-GlcNAcアセチル化の両方に共通の還元GlcNAc構造モチーフの認識に基づいている(実施例4)。本明細書に提示される研究は、変異R911 Lectenzの調査及び開発を継続する：1つは、N-糖ペプチド及びN-糖タンパク質に対するさらに高められた特異性を有し、第2のLectenz変異体は、O-GlcNAcアセチル化糖ペプチド及びN-糖タンパク質に特異的である(実施例5)。さらに、O-GalNAcアセチル化に対して特異的な第3のLectenz変異体も調べられる。O-GalNAc特異性の原理は、GalNAcがGlcNAcのC4エピマー(wtPNGase F及びエンジニアリングされたR911 Lectenzによって認識される重要な構造モチーフ)であるという観察に基づいている。

10

【0327】

R911の点突然変異誘発の研究

R911の8つの突然変異体を作製した(表40)。これらの突然変異体の内の7つは、R911アミノ酸をwtPNGase F配列に戻す。グルタミン酸118をグルタミン(E118Q)に変換する8番目の突然変異体を作製し、これは、PNGase F及びそのD60A突然変異体にも存在する。これらの突然変異のそれぞれは、特定のグリコシル化部位とのユニークな相互作用を調整することができる重要な課題に対応する。

【0328】

20

【表 4 0】

	R911 突然変異	論理的根拠
1.	L57D	R61 によるキトビオースの第 2 の GlcNAc 認識を回復し、N-グリカン構造に対する特異性を誘導する
2.	C60D	グリコシド結合の認識を向上させる
3.	L156I	タンパク質安定性を高める
4.	I192G	タンパク質安定性を高める
5.	S206E	グリコシド結合の認識を向上させる
6.	W248R	N-グリカン結合の認識を安定させる
7.	L156I/S206E	O-GlcNAc 認識を安定させて向上させる
8.	E118Q	第 2 の GlcNAc 認識を不安定化させ、O-GlcNAc 構造に対する特異性を誘導する
9.	T119	D57 によって第 2 の GlcNAc 認識を不安定化させ、O-GlcNAc 構造に対する特異性を誘導する
10.	K123	D57 によって第 2 の GlcNAc 認識を不安定化させ、O-GlcNAc 構造に対する特異性を誘導する
11.	R125	R61 によって第 2 の GlcNAc 認識を不安定化させ、O-GlcNAc 構造に対する特異性を誘導する

10

20

30

【 0 3 2 9】

従来の *in vitro* データに基づくと、R911 は、N-グリカン及び O-GlcNAc の両方と相互作用する。様々なグリカン及び糖ペプチドを用いた R911 の分子動力学及び結合自由エネルギーの推定は、上に列記された復帰突然変異が、特定のグリコシル化を用いて相互作用に対する R911 の親和性を調整し得ることを示唆している。例えば、R911 の分子動力学データは、D57L の突然変異が、キトビオースコアの末端 GlcNAc 認識に重要な隣接 R61 残基との水素結合相互作用を不安定化させることを予測する（図 5 1 及び図 5 6 b）。従って、L57D の復帰突然変異は、N-グリカン認識及び親和性を向上させることが予想される。同様に、L156I/S206E の復帰は、これらの導入突然変異の最小限又は不利な推定結合自由エネルギーにより、O-GlcNAc 認識を向上させることができる（表 3 8）。R911、PNGase F、及び D60A に存在する E118 は、キトビオースコアの第 2 の GlcNAc との相互作用を安定化させることが予想される。E118Q 突然変異は、この突然変異が基質の結合及び認識を不安定化させるため触媒活性を消失させると報告され、従って、O-GlcNAc アセチル化糖タンパク質に対する特異性が変化するであろう（表 3 9）。T119 は、水素結合相互作用によって D57 を不安定化させ、従って、この水素結合相互作用を破壊するこの部位の突然変異が D57、及び R61 とのその水素結合相互作用を不安定化させ得、これにより N-グリカン構造に対する特異性が低下し、O-GlcNAc 認識に対する特異性が

40

50

高まる。K 1 2 3 は、T 5 5、C 5 6、及び D 5 7 との主鎖相互作用を安定化させる。これらの相互作用の破壊は、D 5 7 を不安定化させ得、従って R 6 1 は、O - G l c N A c に対する特異性が同様に变化する。同様に、R 1 2 5 は、水素結合相互作用によって R 6 1 を安定化させ、従って、この水素結合相互作用を破壊するこの部位の突然変異が、R 6 1 の末端 G l c N A c との相互作用を不安定化させ得、O - G l c N A c に対する特異性が同様に变化する。

【0330】

上に列記された7つ全ての R 9 1 1 の復帰突然変異で、タンパク質発現に成功した。E 1 1 8 Q 突然変異体を、すぐに得られる発現データを用いて作製した。ウェスタンブロット法により、SEC から精製された I 1 9 2 G と一緒に、固定金属イオンアフィニティークロマトグラフィー (I M A C) 及びサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) から精製された 6 x H i s 標識 L 5 7 D 及び L 1 5 6 I の検出が実証される (図 5 7)。L 5 7 D は、R 9 1 1 から定性的にユニークな精製プロフィールを有し：L 5 7 D は、I M A C 溶液からの2つの溶出ピークを有し、R 9 1 1 は、3つの溶出ピークを示す (図 5 8 の UV トレースを参照されたい)。加えて、各突然変異体は、UV トレースのオーバーレイで示されているように、R 9 1 1 とは異なる SEC 溶出パターンを示す (図 5 9)。溶出パターンにおけるこれらの差異は、これらの突然変異体が、R 9 1 1 とは異なる特性、例えば、タンパク質コンフォメーションを有することが示唆し得る。しかしながら、L 5 7 D は、精製されるタンパク質の量及び 3 6 k D a での S D S - P A G E 電気泳動において R 9 1 1 と同様に挙動する (図 5 7 を参照されたい)。グリカンアレイスクリーニングを用いる L 5 7 D 及び R 9 1 1 結合プロフィールの特異性の比較 (図 3 8) を含め、これらの突然変異体のそれぞれのさらなる機能分析が進行中である。P N G a s e F 突然変異体のマトリックリストが表 1 に例示されている。

10

20

【0331】

p N P - - G l c N A c、p N P - キトビオース、p N P - - G a l N A c、及び p N P - - G a l N A c 基質に対する P N G a s e F 及び o g O G A 活性の調査

R 9 1 1 の O - グリカン親和性が野生型 P N G a s e F から「引き継がれる」可能性を明確に排除するために、本出願人は、サイズは同様であるが構造及び / 又はコンフォメーションが異なる4つの O - グリカン基質に対して酵素活性アッセイを行った。これらは：O - グリカナーゼの基質として知られる p - ニトロフェニル N - アセチル - - D - グルコサミニダーゼ (- G l c N A c)、オセアニコラ・グラヌローサス (O c e a n i c o l a g r a n u l o s u s) (o g O G A) からの - N - アセチルグルコサミニダーゼ、p - ニトロフェニル N , N ' - ジアセチル - - D - キトビオース (キトビオース)、p - ニトロフェニル 2 - アセトアミド - 2 - デオキシ - - D - ガラクトピラノシド (- G a l N A c)、及び p - ニトロフェニル 2 - アセトアミド - 2 - デオキシ - - D - ガラクトピラノシド (- G a l N A c) である。

30

【0332】

この結果は、- G l c N A c (陽性対照) に対する o g O G A の活性を裏付けるが、キトビオース、- G a l N A c、又は - G a l N A c 基質のいずれに対する o g O G A の活性も裏付けない (図 6 0)。より重要なことに、この実験は、P N G a s e F 及びその誘導体、D 6 0 A、及び R 9 1 1 の全ての残存 O - グリカナーゼ活性を排除する。

40

【0333】

加えて、P N G a s e F の陽性 N - グリカナーゼ活性が、標準的なゲルシフトアッセイによって再確認された (表 1 0)。図 6 1 は、P N G a s e F が、記載されるアッセイ条件下で 1 μ g の R N a s e B を完全に脱グリコシル化し、R N a s e B が、グリコシル化されていない R N a s e A のサイズに類似した位置に移動することになることを示している。対照的に、R 9 1 1 及び D 6 0 A は、脱グリコシル化 R N a s e B (R N a s e A に等しい) を示すバンドが観察されなかったため、グリコシル化 R N a s e B に対して不活性である。陰性対照として、o g O G A が実験に含められた。

【0334】

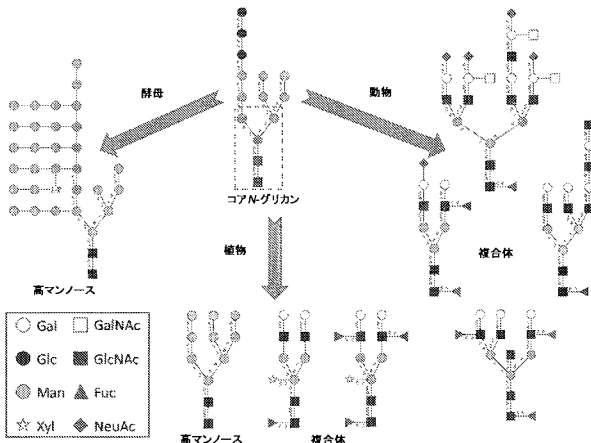
50

結論として、活性アッセイは、R 9 1 1のO - グリカン親和性が、wt PNGase FのLectenz（登録商標）へのエンジニアリングの結果として獲得された新たな特性であることを明確に実証している。加えて、これらのデータは、wt PNGase Fも、- GalNAc又は - GalNAcに対して触媒活性を有していないことも実証し、PNGase FのGalNAc認識Lectenz（登録商標）へのエンジニアリングも獲得された新たな特性であり得ることを示唆している。

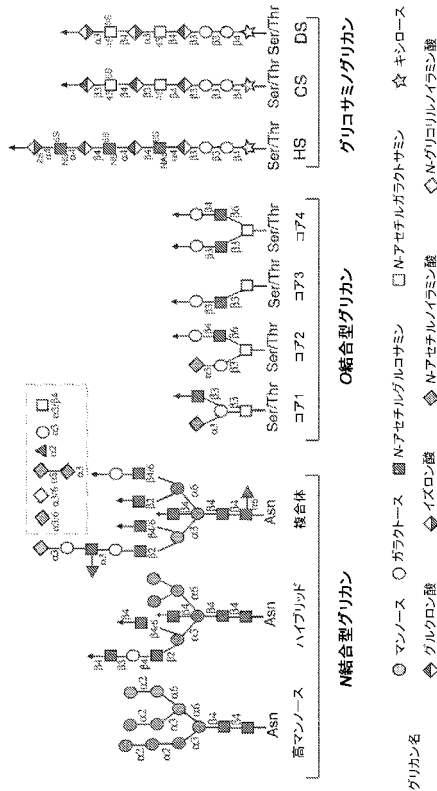
【 0 3 3 5 】

全ての特許、特許出願、及び刊行物の完全な開示、並びに本明細書で言及される電子的に利用可能な資料（例えば、GenBank及びRefSeqに寄託されたヌクレオチド配列、並びに、例えば、SwissProt、PIR、PRF、PDBに寄託されたアミノ酸配列、並びにGenBank及びRefSeqの注釈付きコード配列からの翻訳を含む）が、参照により本明細書に組み入れられる。本出願の開示と参照により本明細書に組み入れられるあらゆる文献の開示（複数可）との間にどんな矛盾が存在する場合も、本出願の開示が優先される。上記の詳細な説明及び実施例は、理解を明確にするためだけに記載されている。これらの説明及び実施例から不必要な限定が生じるものではない。本発明は、図示され説明された詳細に限定されるものではなく、当業者に明らかな変更形態については、特許請求の範囲によって規定される本発明の範囲内に含まれるものとする。

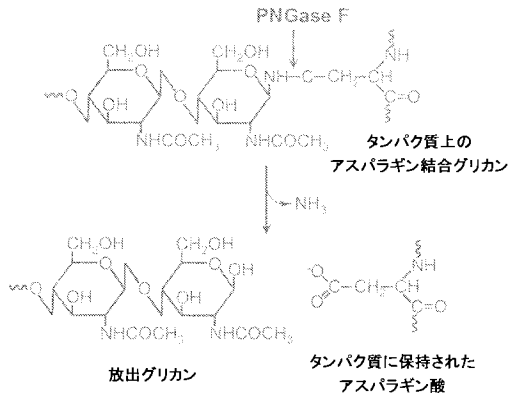
【 図 1 】



【 図 2 】



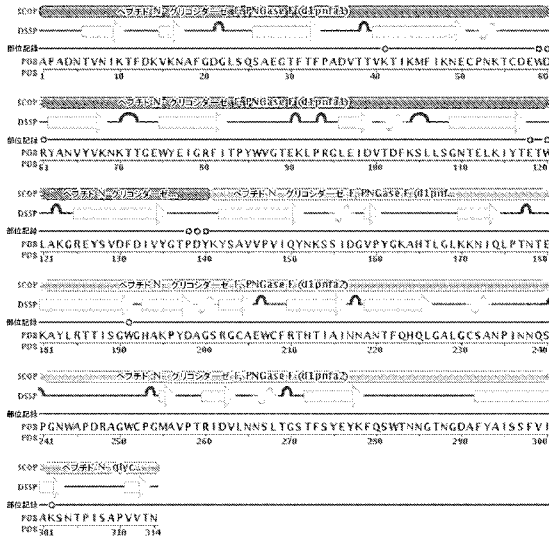
【図3】



【図4a】

1	GCCTCCGCGAGATAATACGGPAAATATTAAACATTCGACAAAGTAAAAAATKCTCTT	57
	A P A D N T V N I K T F D K V R N A P	
20	GCTGACGFMFTTCTCCAAAGTGGGAGGAGCTTACATTTCCGGGCGHATGTAAACACC	117
	G D G L S Q S A E G T F P P A D V T A	
40	GTA AAAAGATTAGAGTGTTCATTA AAAAATCAATGTCTAATTA AAACTTGTGATGAATGG	177
	V K T I K N F I K N E C P N K T C D E W	
60	GATCGTATGCCAATGTTTATGTAA AAAAATAAAAACACACTGATGTGACCAAAATAGGA	237
	D R Y A N V Y V K N K T T G E W Y E I G	
80	CCCTTATTACTCCATATATGGGTGGGACGGAAAATTAACCTGCGACGGCAAAATGAT	297
	R F I E P Y W V G T E K L P R G L E I D	
100	GFTACAGATTTCAAGCTTACTACTCCGGAAATGCAAACTAAAATTTATACGGAGACA	357
	V T E F K S L L S G H T E L K I Y T E T	
120	TGGTGGCCAAAGGAGACAGTCCAGTGTAGCTTCCGEMTGTGATTTGATTTCCCGACCGGAF	417
	W L A R G R E Y S V D F D I V Y G T P D	
140	TATAAATATTCGGCTGTAGTACCTGTAGTTCGATATACCAATCATCTATGACGGAGTC	477
	Y R Y S R V V F V Y Q Y R K S S I D G V	
160	CCTTATGTTAAAGCATACATTTGGCTTTGAAAAGAAATATCCAGTTACCAACAACACA	537
	P Y G K A H T L A L K K N I Q L F T N T	
180	GAAAAGCTTATCTTGAAGACTACTATTCCGGATGGGACATGCTTAGCCATATGATGG	597
	E K A Y L R T T I S G W G H A K F Y D A	
200	GGAGCAGAGTCTTTCAGAAATGGTGTTCAGAACACACACTATACAAATAAATAATCG	657
	G S R G C A E W C F R T H T I A I N N S	
220	ATGACTTCCAGCATCAGCTGGGTTCTTTAGGATGTTCCAGCAACCCCTATCAATAATCAG	717
	N T F Q H Q L G A L G C S A N P I N N Q	
240	ATCTCGKAAATTCGACCTCCCGACGGCCCGTTCGGTCCCGGAAATGCGAGTTCGACAG	777
	S E G N W T P D R A G W C F G H A V E T	
260	CFTATGATGTACTGAAATAATCTTAAATAGCCAGTACTTTAGTATATTAATAAATTC	837
	R I E V L N H S L X G D T F S Y E R K F	
280	CAGAACTGACAAATACGGAAACCAATGGAGATGCTTTTATGCAATTTCCAGTTTGTG	897
	Q N W T N N G T H G D A E Y A I S S F Y	
300	ATTCGAAAAGTAAATACCTATATAGTCCCGCTAGTACCAACTAA	945
	I A K S N T P I S A P V V T N *	

【図4b】



部位記号説明文

- 糖基化部位(アスパラギン)
- 糖基化部位(シリン)
- 糖基化部位(セリン)
- 糖基化部位(チロシン)
- 糖基化部位(グルタミン)
- 糖基化部位(アスパラギン)

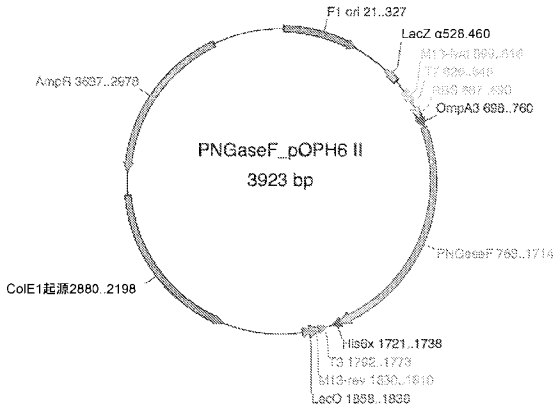
DSSP説明文

- T-回転
- E-回転
- 空 二次構造が決定されていない
- G310-ヘリックス
- S-結合

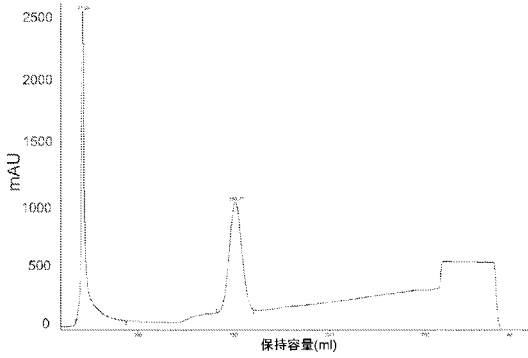
【図4c】

10	20	30	40	50
MLFFFLPLLKT	NLMQKILLCS	LITGAQMIFA	QTVEITFYQNS	FEGKINPNQN
60	70	80	90	100
HIISITNSDK	TLEFNEKIKN	KKADFPPEVN	EINKKNNEVS	QFAPLNNNEI
110	120	130	140	150
VKTSNDTILA	KQEFKPTSET	GKILGYNVKK	AVTSVNSNTI	EVWYTNDLKV
160	170	180	190	200
KGGPSILGQD	LGLVLKTVRN	GSSVVEATSV	KKIKALDDQS	LFNGKNITEK
210	220	230	240	250
DALTYKDMIW	KSRFITIPVF	ENETINPDA	SKSDQVIQRF	NGTIIILKV
260	270	280	290	300
KIPEIKQONT	IFVELKQKSN	GDAYDRGTV	FIIIPQERALS	YYTGLTQGVK
310	320	330	340	350
SLPVYQNGNG	KSYQVALTP	DYLPFIELMR	FFTFPGIGHF	NEKIQLKGN
360	370	380	390	400
WHNNTPYRQD	ITELRPQLSG	KEILIGAFIG	NYDKGGHQS	LELSIHPDQQ
410	420	430	440	450
KIVNNNFVLP	VFNNTNVMEM	AGQDYPTMFN	SDKGVEVEFI	LTKDLKNAQL
460	470	480	490	500
RYITTGHGQW	GAGDEFVPKE	NSIYLDGKLA	HAFTPWRTDC	GSYRLFNPAS
510	520	530	540	550
GNFEDGLSSS	DLSRSNWCPG	TITNPVYINL	GNLNAGKHTI	QVKIPQGAPE
560				
GSSQSFNVNS	GVLLGQE			

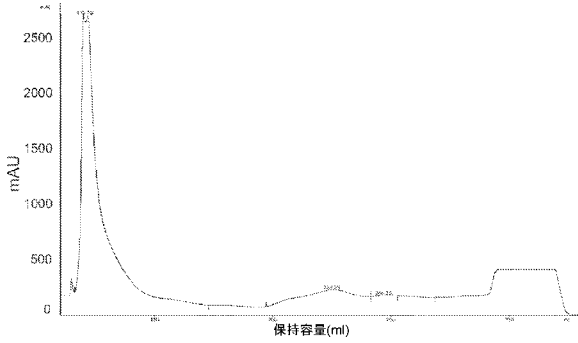
【 図 2 2 】



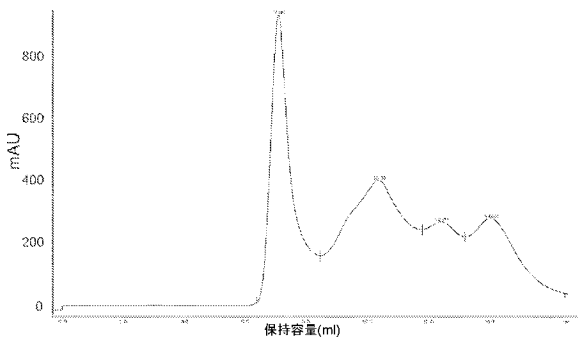
【 図 2 3 】



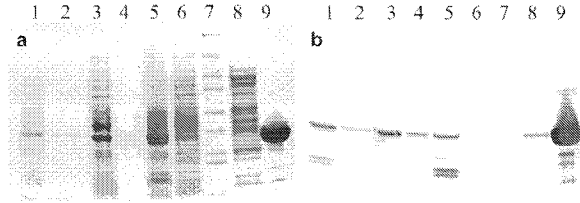
【 図 2 7 】



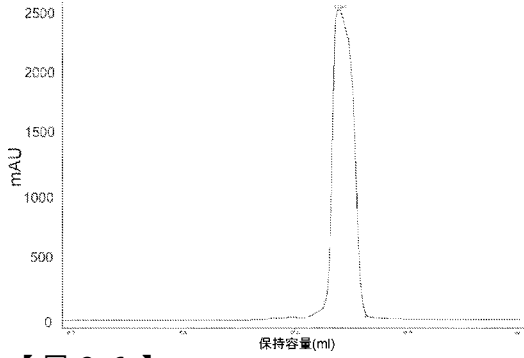
【 図 2 8 】



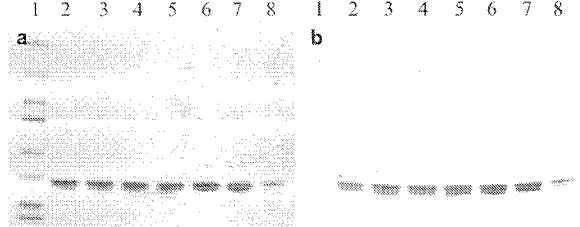
【 図 2 4 】



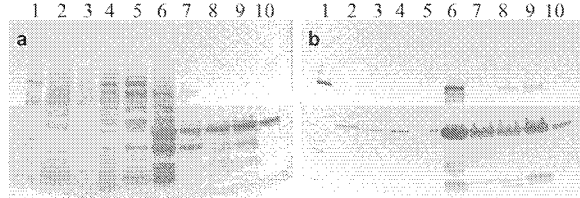
【 図 2 5 】



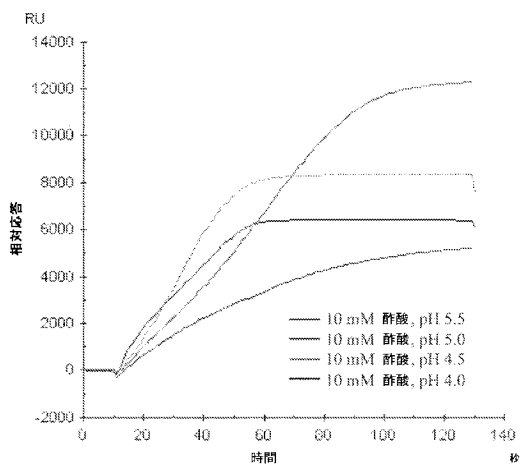
【 図 2 6 】



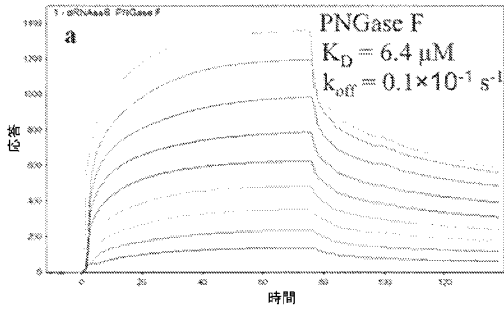
【 図 2 9 】



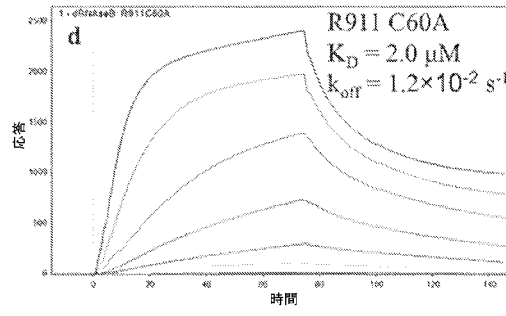
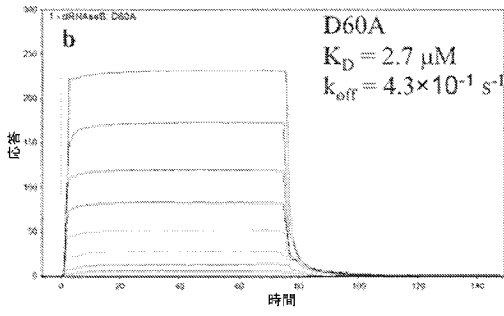
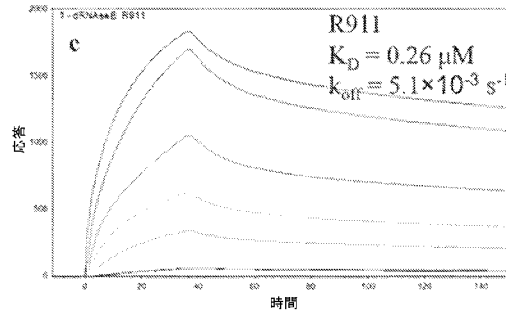
【 図 3 0 】



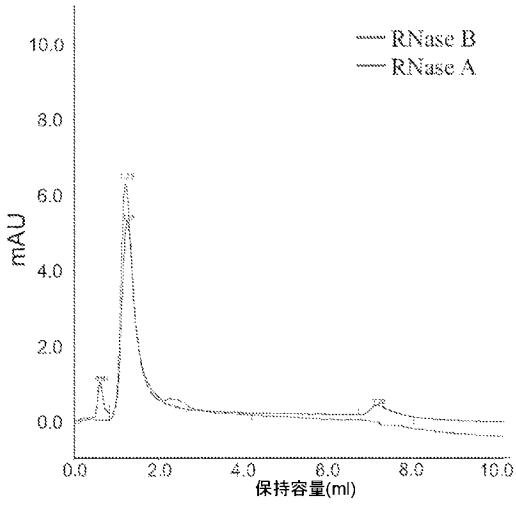
【 図 3 1 - 1 】



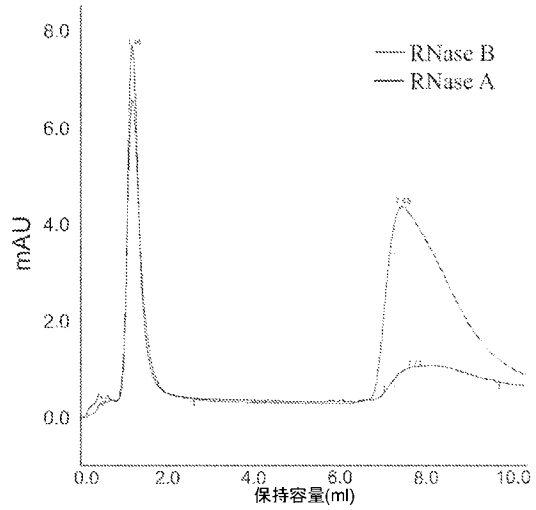
【 図 3 1 - 2 】

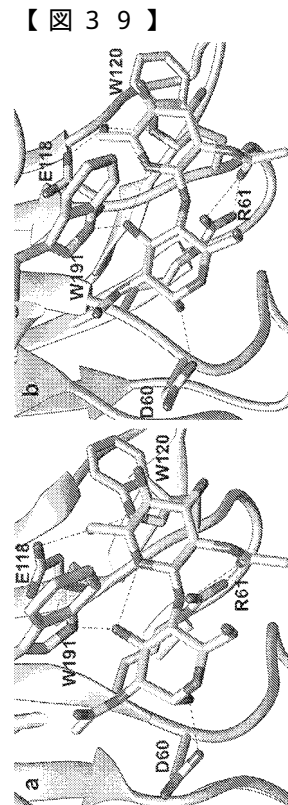
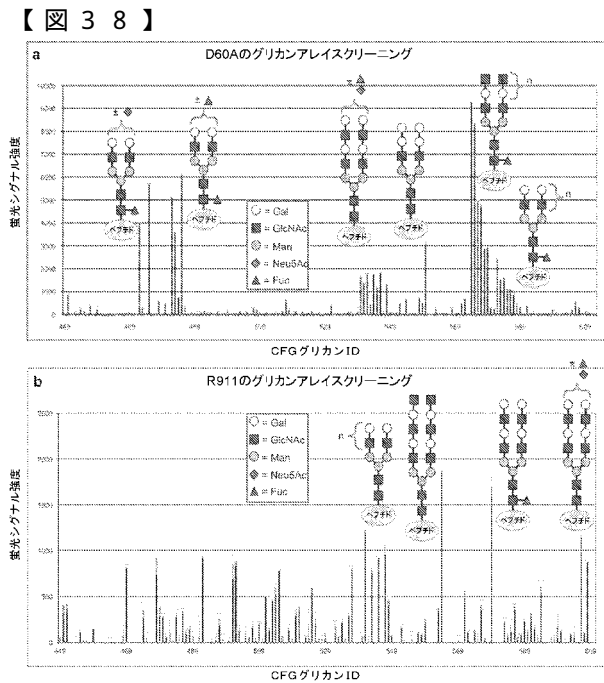
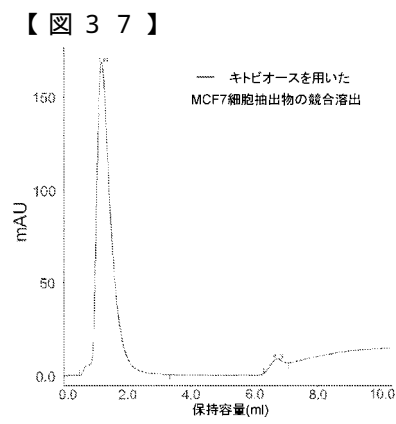
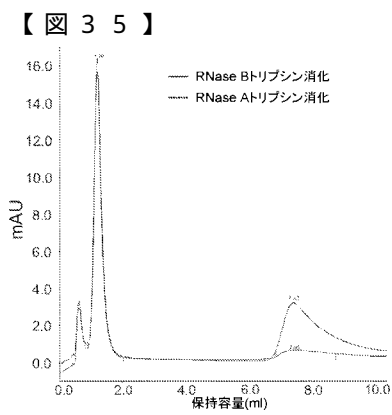
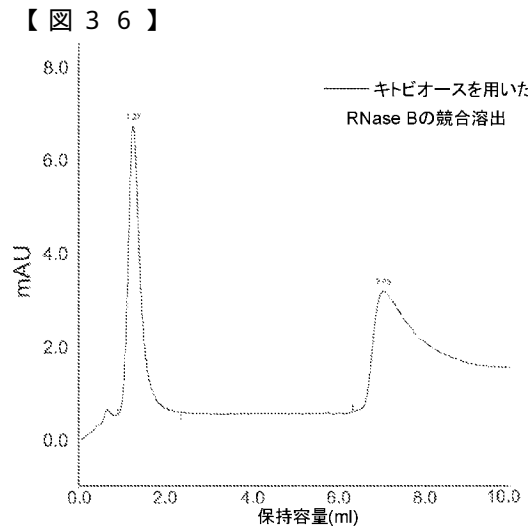
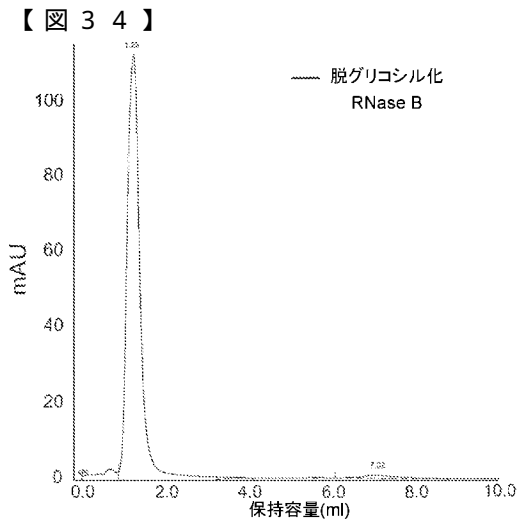


【 図 3 2 】

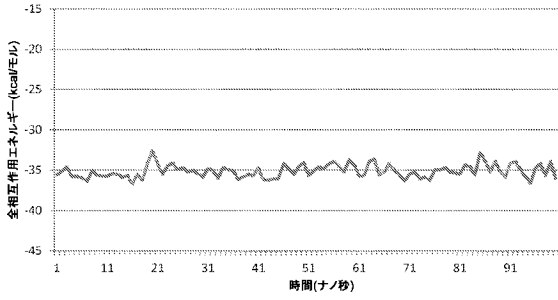


【 図 3 3 】

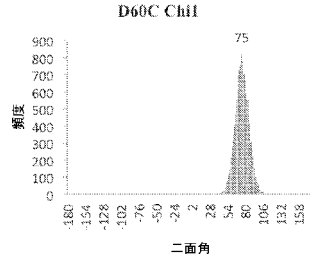




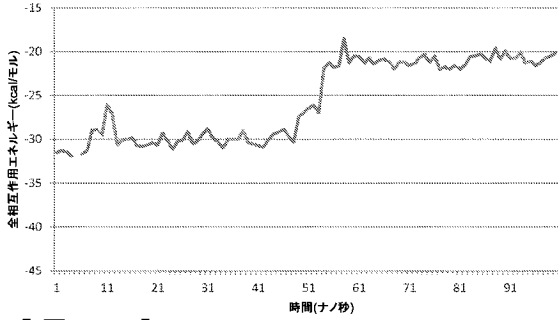
【 図 4 0 】



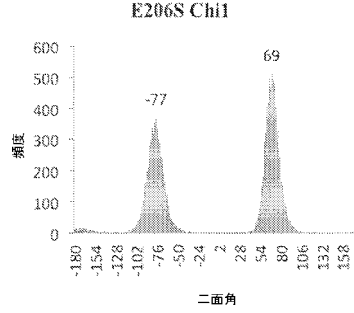
【 図 4 3 】



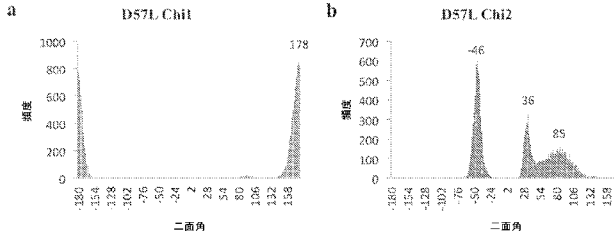
【 図 4 1 】



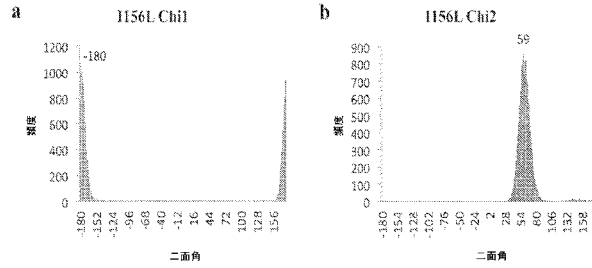
【 図 4 4 】



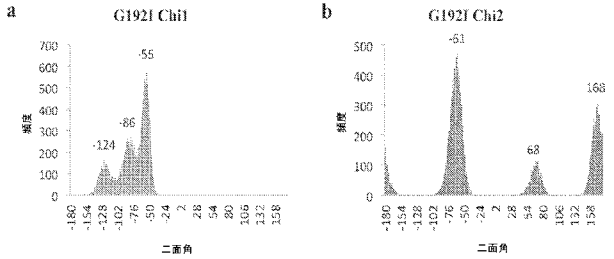
【 図 4 2 】



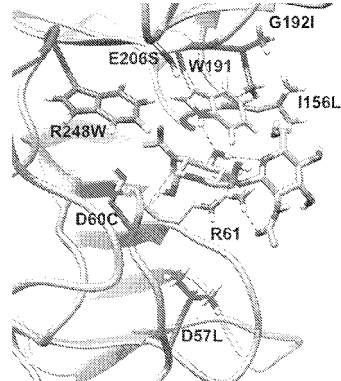
【 図 4 5 】



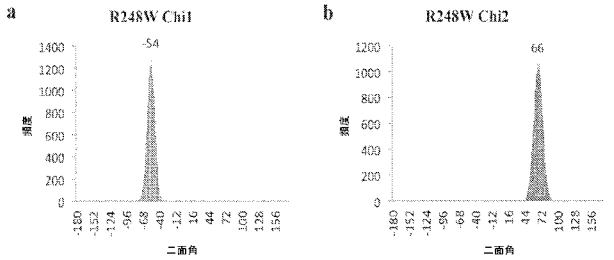
【 図 4 6 】



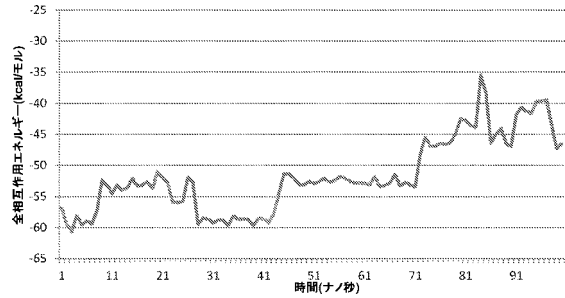
【 図 4 8 】



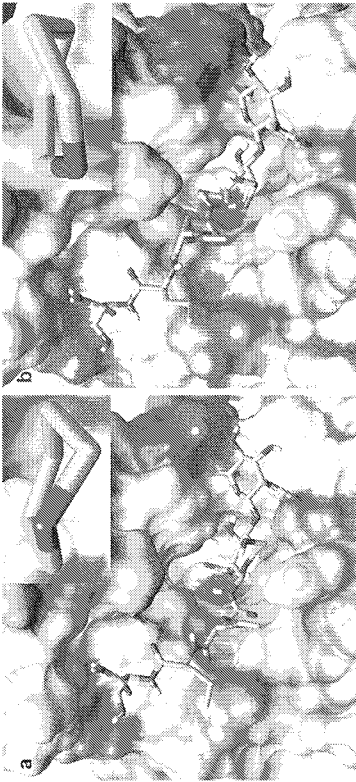
【 図 4 7 】



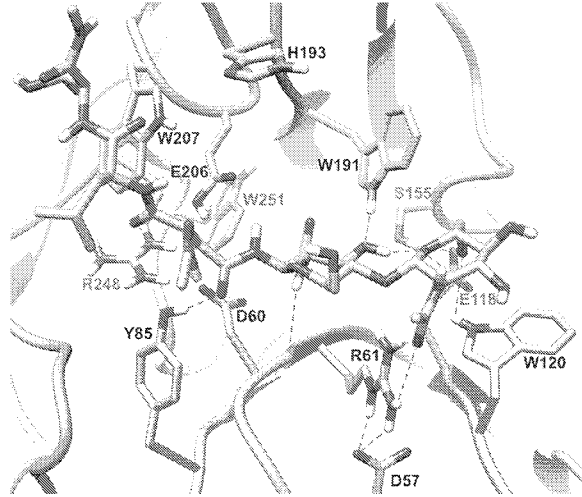
【 図 4 9 】



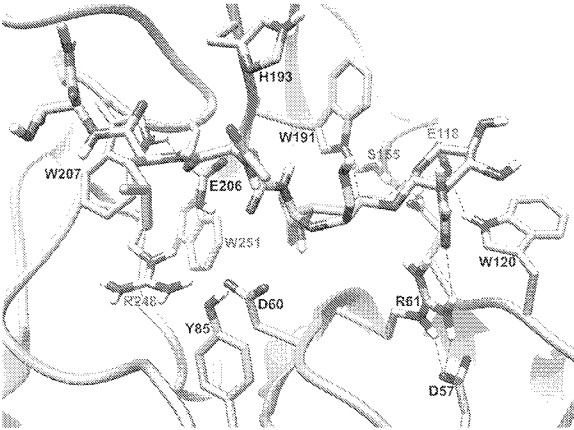
【 図 5 0 】



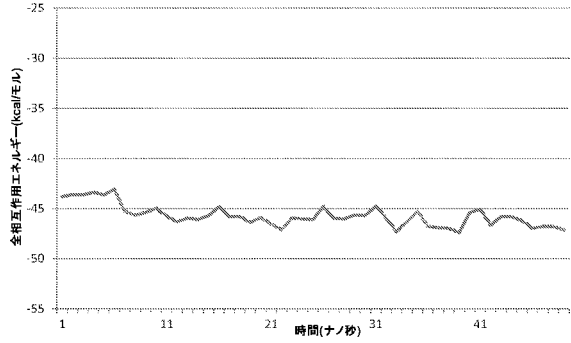
【 図 5 1 】



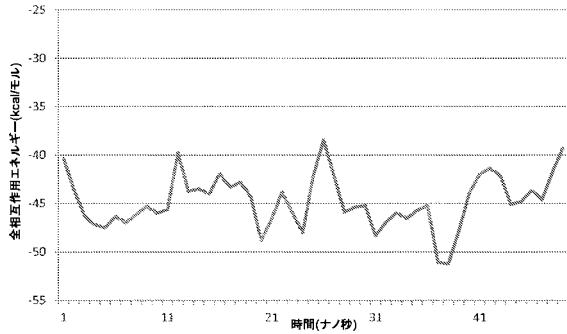
【 図 5 2 】



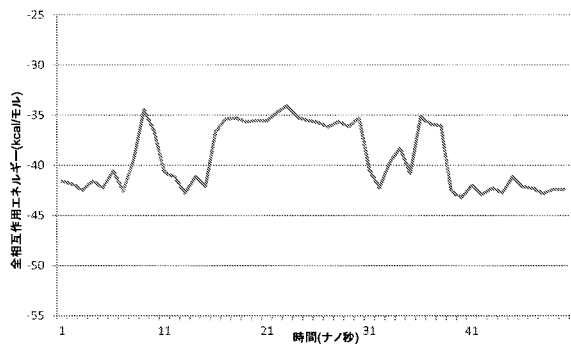
【 図 5 4 】



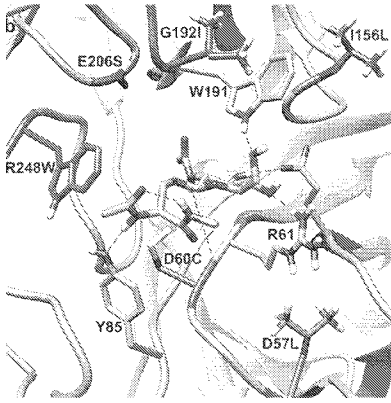
【 図 5 3 】



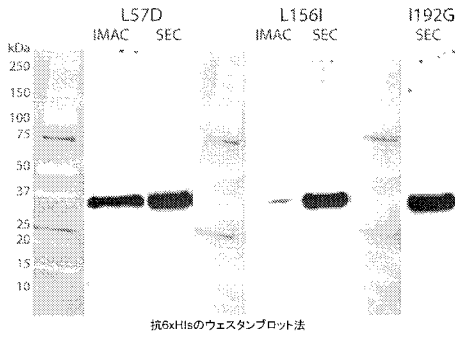
【 図 5 5 】



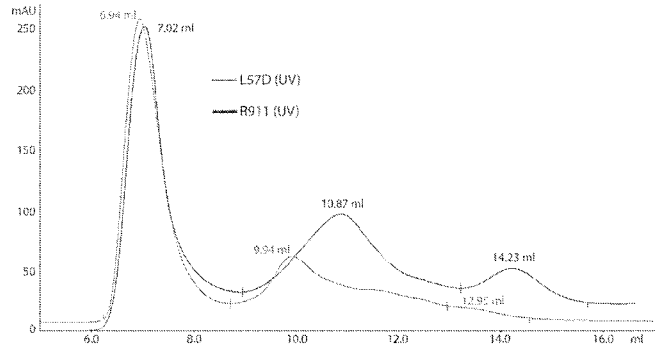
【 図 5 6 】



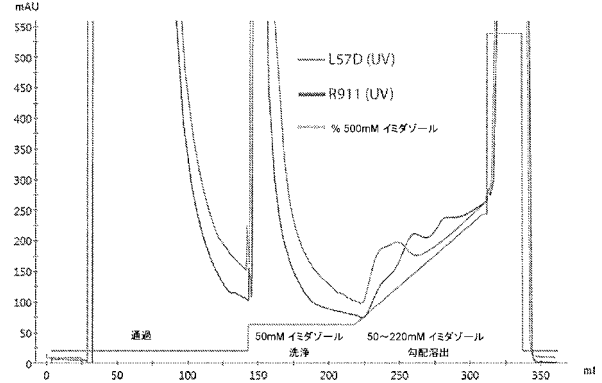
【 図 5 7 】



【 図 5 8 】



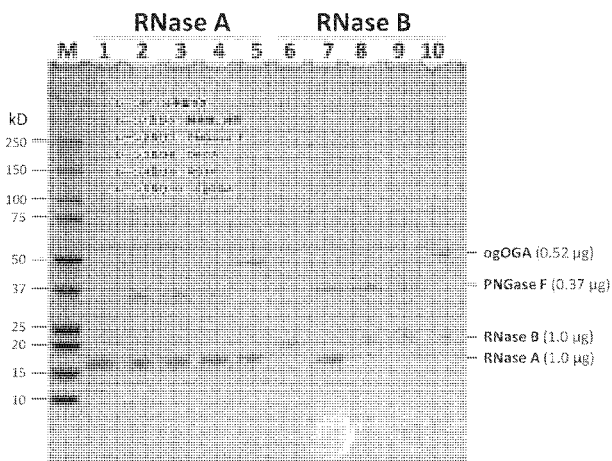
【 図 5 9 】



【 図 6 0 】



【 図 6 1 】



【手続補正書】

【提出日】平成29年2月17日(2017.2.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase Fタンパク質であって、対応する野生型 PNGase Fタンパク質と比べて複数のアミノ酸突然変異を有し、前記複数の突然変異が、

(a) 前記 PNGase Fタンパク質の触媒活性を低下又は消失させる少なくとも1つの第1の突然変異；及び

(b) 結合親和性又は結合特異性に影響を与える少なくとも1つの第2の突然変異を含む、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase Fタンパク質。

【請求項2】

前記第2の突然変異が、

(i) N結合型グリカンに対する結合親和性を高め；かつ/又は

(ii) O結合型グリカンに対する結合特異性及び親和性を増加させる

突然変異を含む、請求項1に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase Fタンパク質。

【請求項3】

前記O結合型グリカンがO結合型 GlcNAcを含む、請求項2に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase Fタンパク質。

【請求項4】

前記O結合型グリカンがO結合型 GalNAcを含む、請求項2に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase Fタンパク質。

【請求項5】

前記対応する野生型タンパク質が、F・メニンゴセプチカム(F. meningosepticum)からのPNGase F(配列番号1)、F・メニンゴセプチカム(F. meningosepticum)からのPNGase F-II(配列番号3)、バクテロイデス・フラジリス(Bacteroides fragilis)からのPNGase F(配列番号4)、及びフラボバクテリウム・ミリコラ(Flavobacterium miricola)からのPNGase F(配列番号5)からなる群から選択されるタンパク質を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase Fタンパク質。

【請求項6】

前記対応する野生型タンパク質が、フラボバクテリウム・メニンゴセプチカム(Flavobacterium meningosepticum) PNGase F(配列番号1)を含む、請求項5に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase Fタンパク質。

【請求項7】

前記第1の突然変異が、F・メニンゴセプチカム(F. meningosepticum) PNGase F(配列番号1)におけるアミノ酸位置60、118、206、若しくは248、又は相同 PNGase F配列における対応する位置に突然変異を含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase Fタンパク質。

【請求項8】

前記第2の突然変異が、F・メニンゴセプチカム(F. meningosepticum)

m) PNGase F (配列番号1)におけるアミノ酸位置57、60、62、118、119、120、123、125、153、154、155、156、157、192、206、若しくは248、又は相同PNGase F配列における対応する位置に突然変異を含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質。

【請求項9】

配列番号1のD57位、又は相同PNGase F配列の対応する位置にロイシン、アラニン、メチオニン、アルギニン、リジン、システイン、若しくはトリプトファンでのアミノ酸置換を含む、請求項1～8のいずれか1項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質。

【請求項10】

配列番号1のD60位、又は相同PNGase F配列の対応する位置にアラニン、システイン、バリン、セリン、グリシン、若しくはトリプトファンでのアミノ酸置換を含む、請求項1～9のいずれか1項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質。

【請求項11】

配列番号1のY62位、又は相同PNGase F配列の対応する位置にグリシン、トリプトファン、セリン、若しくはトレオニンでのアミノ酸置換を含む、請求項1～10のいずれか1項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質。

【請求項12】

配列番号1のE118位、又は相同PNGase F配列の対応する位置にアラニン、グルタミン、トレオニン、若しくはシステインでのアミノ酸置換を含む、請求項1～11のいずれか1項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質。

【請求項13】

配列番号1のT119位、又は相同PNGase F配列の対応する位置にアラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、若しくはバリンでのアミノ酸置換を含む、請求項1～12のいずれか1項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質。

【請求項14】

配列番号1のW120位、又は相同PNGase F配列の対応する位置にチロシン、ヒスチジン、グルタミン、アスパラギン、トレオニン、若しくはセリンでのアミノ酸置換を含む、請求項1～13のいずれか1項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質。

【請求項15】

配列番号1のK123位、又は相同PNGase F配列の対応する位置にアスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、若しくはトリプトファンでのアミノ酸置換を含む、請求項1～14のいずれか1項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質。

【請求項16】

配列番号1のR125位、又は相同PNGase F配列の対応する位置にチロシン、アラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、若しくはトリプトファンでのアミノ酸置換を含む、請求項1～15のいずれか1項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質。

【請求項17】

配列番号1のK153位、又は相同PNGase F配列の対応する位置にヒスチジン、アルギニン、グルタミン、トリプトファン、若しくはチロシンでのアミノ酸置換を含む、請求項1～16のいずれか1項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質。

【請求項18】

配列番号1のS154位、又は相同PNGase F配列の対応する位置にトレオニン

、アスパラギン、リジン、グルタミン、トリプトファン、若しくはチロシンでのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質。

【請求項 19】

配列番号 1 の S 1 5 5 位、又は相同 PNGase F 配列の対応する位置にアルギニン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン、トリプトファン、若しくはチロシンでのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質。

【請求項 20】

配列番号 1 の I 1 5 6 位、又は相同 PNGase F 配列の対応する位置にロイシン、トレオニン、メチオニン、グリシン、トリプトファン、若しくはヒスチジンでのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質。

【請求項 21】

配列番号 1 の D 1 5 7 位、又は相同 PNGase F 配列の対応する位置にアスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、リジン、トリプトファン、若しくはチロシンでのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質。

【請求項 22】

配列番号 1 の G 1 9 2 位、又は相同 PNGase F 配列の対応する位置にイソロイシン、トリプトファン、アラニン、ヒスチジン、トレオニン、システイン、若しくはセリンでのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質。

【請求項 23】

配列番号 1 の E 2 0 6 位、又は相同 PNGase F 配列の対応する位置にセリン、トリプトファン、ヒスチジン、システイン、若しくはアルギニンでのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質。

【請求項 24】

配列番号 1 の R 2 4 8 位、又は相同 PNGase F 配列の対応する位置にトリプトファン、セリン、プロリン、バリン、アスパラギン酸、チロシン、フェニルアラニン、若しくはリジンでのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質。

【請求項 25】

D 5 7 位、D 6 0 位、I 1 5 6 位、G 1 9 2 位、及び E 2 0 6 位に突然変異を含む、請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質。

【請求項 26】

Y 6 2 位、E 1 1 8 位、S 1 5 5 位、R 2 4 8 位、又はこれらの任意の組合せの位置に突然変異をさらに含む、請求項 25 に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質。

【請求項 27】

(a) D 5 7 R、D 6 0 A、Y 6 2 G、E 1 1 8 A、S 1 5 5 D、I 1 5 6 T、G 1 9 2 C、及び E 2 0 6 S

(b) D 5 7 C、D 6 0 A、Y 6 2 W、E 1 1 8 A、S 1 5 5 Q、I 1 5 6 T、G 1 9 2 T、及び E 2 0 6 R

(c) D 5 7 L、D 6 0 C、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(d) D 5 7 W、D 6 0 C、I 1 5 6 M、G 1 9 2 I、E 2 0 6 W、及び R 2 4 8 S

(e) D 6 0 C、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(f) D 5 7 L、D 6 0 A、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(g) D 5 7 L、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(h) D 5 7 L、D 6 0 C、E 1 1 8 Q、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(i) D 5 7 L、D 6 0 C、W 1 2 0 X、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(j) D 5 7 L、D 6 0 C、W 1 2 0 X、S 1 5 5 X、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(k) D 5 7 L、D 6 0 C、K 1 5 3 X、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(l) D 5 7 L、D 6 0 C、S 1 5 4 X、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(m) D 5 7 L、D 6 0 C、S 1 5 5 X、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(n) D 5 7 L、D 6 0 C、I 1 5 6 X、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(o) D 5 7 L、D 6 0 C、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(p) D 5 7 L、D 6 0 C、G 1 9 2 I、及び R 2 4 8 W

(q) D 5 7 L、D 6 0 C、I 1 5 6 L、D 1 5 7 X、G 1 9 2 I、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(r) D 5 7 L、D 6 0 C、I 1 5 6 L、E 2 0 6 S、及び R 2 4 8 W

(s) D 5 7 L、D 6 0 C、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、及び R 2 4 8 W

(t) D 5 7 L、D 6 0 C、I 1 5 6 L、G 1 9 2 I、及び E 2 0 6 S

から選択される複数の突然変異を含む、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性化炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

【請求項 2 8】

クローン D 6 0 A、R 6 1 7、R 6 1 1 3、R 9 1 1、R 9 1 1 3、又は R 9 1 1 C 6 0 A によって発現される、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性化炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

【請求項 2 9】

O 結合型 G l c N A c、O 結合型 G a l N A c、又は O 結合型 G l c N A c 及び O 結合型 G a l N A c の両方に対する結合特異性及び親和性を増加させる第 2 の突然変異を含む、請求項 1 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性化炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

【請求項 3 0】

N 結合型グリカン、N 結合型複合糖質、N 結合型糖ペプチド、N 結合型糖タンパク質、又は遊離 N - グリカンに結合する、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性化炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

【請求項 3 1】

O 結合型グリカン、O 結合型複合糖質、O 結合型糖ペプチド、O 結合型糖タンパク質、又は遊離 O - グリカンに結合する、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性化炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

【請求項 3 2】

第 2 の成分に共有結合する、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性化炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質を含む第 1 の成分を含むコンジュゲート。

【請求項 3 3】

前記第 2 の成分がタンパク様成分である、請求項 3 2 に記載のコンジュゲート。

【請求項 3 4】

前記第 2 の成分が非タンパク様成分である、請求項 3 2 に記載のコンジュゲート。

【請求項 3 5】

前記第 2 の成分が治療薬又は診断薬である、請求項 3 2 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲート。

【請求項 36】

請求項 1 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質を含む融合タンパク質。

【請求項 37】

請求項 1 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質を含むアフィニティマトリックス。

【請求項 38】

固形支持体、表面、カラム、樹脂、ビーズ、粒子、及びナノ粒子からなる群から選択される、請求項 37 に記載のアフィニティマトリックス。

【請求項 39】

請求項 1 ~ 38 のいずれか 1 項に記載の、触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、融合タンパク質、又はアフィニティマトリックスと、使用説明書とを含むキット。

【請求項 40】

請求項 1 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質又はコンジュゲート、又は請求項 36 に記載の融合タンパク質をコードする単離ポリヌクレオチド。

【請求項 41】

請求項 40 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 42】

発現ベクターである、請求項 41 に記載のベクター。

【請求項 43】

請求項 41 又は 42 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 44】

細菌細胞である、請求項 43 に記載の宿主細胞。

【請求項 45】

大腸菌 (*Escherichia coli*) 細胞又は酵母細胞である、請求項 43 に記載の宿主細胞。

【請求項 46】

触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質を作製するための方法であって、請求項 1 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質又はコンジュゲート、又は請求項 36 に記載の融合タンパク質を、単離ポリヌクレオチド、発現ベクター、又は宿主細胞から発現させるステップを含む、方法。

【請求項 47】

N 結合型グリカンを検出するための方法であって：

生物学的又は実験室サンプルを、PNGase F タンパク質の N - グリカンへの結合を可能にする条件下で請求項 1 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させるステップ；及び

前記 N 結合型グリカンを検出するステップを含む、方法。

【請求項 48】

前記検出された N 結合型グリカンの特徴付けるステップをさらに含む、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

前記 N 結合型グリカンの特徴付けるステップが、
前記グリカンの構成糖を特定すること、
前記グリカンの糖組成を決定すること、
前記グリカン内の結合位置を決定すること、又は

前記グリカンの立体化学を決定することを含む、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

〇結合型グリカンを検出するための方法であって：

生物学的又は実験室サンプルを、PNGase Fタンパク質の〇結合型グリカンへの結合を可能にする条件下で請求項 1～36 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させるステップ；及び

〇結合型グリカンを検出するステップ

を含む、方法。

【請求項 51】

前記検出された〇結合型グリカンの特徴付けるステップをさらに含む、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

前記〇結合型グリカンの特徴付けるステップが、

前記グリカンの構成糖を特定すること、

前記グリカンの糖組成を決定すること、

前記グリカン内の結合位置を決定すること、又は

前記グリカンの立体化学を決定すること

を含む、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 53】

前記〇結合型グリカンが、〇結合型 GlcNAc 又は〇結合型 GalNAc を含む、請求項 50～52 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 54】

遊離 N - グリカンを検出するための方法であって：

生物学的又は実験室サンプルを、PNGase Fタンパク質の遊離 N - グリカンへの結合を可能にする条件下で請求項 1～36 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させるステップ；及び

前記遊離 N - グリカンを検出するステップ

を含む、方法。

【請求項 55】

遊離 O - グリカンを検出するための方法であって：

生物学的又は実験室サンプルを、PNGase Fタンパク質の遊離 O - グリカンへの結合を可能にする条件下で請求項 1～36 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させるステップ；及び

前記遊離 O - グリカンを検出するステップ

を含む、方法。

【請求項 56】

前記遊離 O - グリカンが、O - GlcNAc 又は O - GalNAc を含む、請求項 55 項に記載の方法。

【請求項 57】

N結合型グリカン又は遊離 N - グリカンを濃縮する、単離する、又は精製するための方法であって：

生物学的又は実験室サンプルを、PNGase Fタンパク質の N - グリカンへの結合を可能にする条件下で請求項 1～36 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させて、濃縮された、単離された、又は精製された N結合型グリカン又は遊離 N - グリカンを得るステップ

を含む、方法。

【請求項 58】

O 結合型グリカン又は遊離 O - グリカンを濃縮する、単離する、又は精製するための方法であって：

生物学的又は実験室サンプルを、PNGase F タンパク質の O - グリカンへの結合を可能にする条件下で請求項 1 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させて、濃縮された、単離された、又は精製された O 結合型グリカン又は遊離 O - グリカンを得るステップ

を含む、方法。

【請求項 59】

請求項 1 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質を含む診断組成物又は治療組成物。

【請求項 60】

前記 PNGase F タンパク質、前記コンジュゲート、又は前記融合タンパク質が検出可能に標識される、請求項 59 に記載の診断組成物又は治療組成物。

【請求項 61】

前記検出可能な標識が、放射性標識、蛍光標識、りん光標識、比色標識、酵素標識、免疫標識、磁気標識、常磁性標識、反磁性標識、又は電磁標識を含む、請求項 60 に記載の診断組成物又は治療組成物。

【請求項 62】

請求項 1 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質の、治療薬としての使用。

【請求項 63】

請求項 1 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質の、診断薬としての使用。

【請求項 64】

標的薬物送達のための、請求項 1 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質の使用。

【請求項 65】

生物学的又は実験室サンプル中の N 結合型グリカン又は遊離 N - グリカンの存在又は量の検出のための、請求項 1 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質の使用。

【請求項 66】

生物学的又は実験室サンプル中の O 結合型グリカン又は遊離 O - グリカンの存在又は量の検出のための、請求項 1 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の触媒的に不活性な炭水化物結合 PNGase F タンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質の使用。

【請求項 67】

前記 O 結合型グリカンが、O 結合型 GlcNAc 又は O 結合型 GalNAc を含む、請求項 66 に記載の使用。

【請求項 68】

前記遊離 O - グリカンが、O - GlcNAc 又は O - GalNAc を含む、請求項 66 に記載の使用。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0039】

別の態様では、本発明は、O 結合型グリカン又は遊離 O - グリカンを濃縮、単離、又は

精製する方法を提供する。この方法は、PNGase Fタンパク質のO-グリカンへの結合を可能にする条件下で、生物学的又は実験室サンプルを触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させて、濃縮された、単離された、又は精製されたO結合型グリカン又は遊離O-グリカンを得るステップを含み得る。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0041

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0041】

別の態様では、本発明は、治療薬、診断薬、又は分析試薬として、触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質の使用を提供する。また、標的薬物送達用の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質の使用も提供される。また、生物学的又は実験室サンプル中のN結合型グリカン又は遊離N-グリカンの存在又は量の検出のための触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質の使用も提供される。また、生物学的又は実験室サンプル中のO結合型グリカン又は遊離O-グリカンの存在又は量の検出のための触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質の使用も提供される。O結合型グリカンは、O結合型GlcNAc又はO結合型GalNAcであり得；同様に、遊離O-グリカンは、O-GlcNAc又はO-GalNAcであり得る。

[本発明1001]

触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質であって、対応する野生型PNGase Fタンパク質と比べて複数のアミノ酸突然変異を有し、前記複数の突然変異が、

(a) 前記PNGase Fタンパク質の触媒活性を低下又は消失させる少なくとも1つの第1の突然変異；及び

(b) 結合親和性又は結合特異性に影響を与える少なくとも1つの第2の突然変異を含む、触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質。

[本発明1002]

前記第2の突然変異が、

(i) N結合型グリカンに対する結合親和性を高め；かつ/又は

(ii) O結合型グリカンに対する結合特異性及び親和性を増加させる

突然変異を含む、本発明1002の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質。

[本発明1003]

前記O結合型グリカンがO結合型GlcNAcを含む、本発明1002の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質。

[本発明1004]

前記O結合型グリカンがO結合型GalNAcを含む、本発明1002の触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質。

[本発明1005]

前記対応する野生型タンパク質が、F.メニンゴセプチカム(F. meningosepticum)からのPNGase F(配列番号1)、F.メニンゴセプチカム(F. meningosepticum)からのPNGase F-II(配列番号3)、バクテロイデス・フラジリス(Bacteroides fragilis)からのPNGase F(配列番号4)、及びフラボバクテリウム・ミリコラ(Flavobacterium miricola)からのPNGase F(配列番号5)からなる群から選択されるタンパク質を含む、本発明1001~1004のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合

P N G a s e F タンパク質。

[本発明1006]

前記対応する野生型タンパク質が、フラボバクテリウム・メニンゴセプチカム (F l a v o b a c t e r i u m m e n i n g o s e p t i c u m) P N G a s e F (配列番号1) を含む、本発明1005の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1007]

前記第1の突然変異が、F・メニンゴセプチカム (F . m e n i n g o s e p t i c u m) P N G a s e F (配列番号1) におけるアミノ酸位置60、118、206、若しくは248、又は相同 P N G a s e F 配列における対応する位置に突然変異を含む、前記の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1008]

前記第2の突然変異が、F・メニンゴセプチカム (F . m e n i n g o s e p t i c u m) P N G a s e F (配列番号1) におけるアミノ酸位置57、60、62、118、119、120、123、125、153、154、155、156、157、192、206、若しくは248、又は相同 P N G a s e F 配列における対応する位置に突然変異を含む、前記の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1009]

配列番号1の D57位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にロイシン、アラニン、メチオニン、アルギニン、リジン、システイン、若しくはトリプトファンでのアミノ酸置換を含む、本発明1001～1008のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1010]

配列番号1の D60位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にアラニン、システイン、バリン、セリン、グリシン、若しくはトリプトファンでのアミノ酸置換を含む、本発明1001～1009のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1011]

配列番号1の Y62位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にグリシン、トリプトファン、セリン、若しくはトレオニンでのアミノ酸置換を含む、本発明1001～1010のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1012]

配列番号1の E118位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にアラニン、グルタミン、トレオニン、若しくはシステインでのアミノ酸置換を含む、本発明1001～1011のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1013]

配列番号1の T119位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にアラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、若しくはバリンでのアミノ酸置換を含む、本発明1001～1012のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1014]

配列番号1の W120位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にチロシン、ヒスチジン、グルタミン、アスパラギン、トレオニン、若しくはセリンでのアミノ酸置換を含む、本発明1001～1013のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1015]

配列番号1の K123位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にアスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、若しくはトリプトファンでのアミノ酸置換を含む、本発明1001～1014のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1016]

配列番号1の R 125位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にチロシン、アラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、若しくはトリプトファンでのアミノ酸置換を含む、本発明1001～1015のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1017]

配列番号1の K 153位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にヒスチジン、アルギニン、グルタミン、トリプトファン、若しくはチロシンでのアミノ酸置換を含む、本発明1001～1016のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1018]

配列番号1の S 154位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にトレオニン、アスパラギン、リジン、グルタミン、トリプトファン、若しくはチロシンでのアミノ酸置換を含む、本発明1001～1017のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1019]

配列番号1の S 155位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にアルギニン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン、トリプトファン、若しくはチロシンでのアミノ酸置換を含む、本発明1001～1018のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1020]

配列番号1の I 156位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にロイシン、トレオニン、メチオニン、グリシン、トリプトファン、若しくはヒスチジンでのアミノ酸置換を含む、本発明1001～1019のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1021]

配列番号1の D 157位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にアスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、リジン、トリプトファン、若しくはチロシンでのアミノ酸置換を含む、本発明1001～1020のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1022]

配列番号1の G 192位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にイソロイシン、トリプトファン、アラニン、ヒスチジン、トレオニン、システイン、若しくはセリンでのアミノ酸置換を含む、本発明1001～1021のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1023]

配列番号1の E 206位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にセリン、トリプトファン、ヒスチジン、システイン、若しくはアルギニンでのアミノ酸置換を含む、本発明1001～1022のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1024]

配列番号1の R 248位、又は相同 P N G a s e F 配列の対応する位置にトリプトファン、セリン、プロリン、バリン、アスパラギン酸、チロシン、フェニルアラニン、若しくはリジンでのアミノ酸置換を含む、本発明1001～1023のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1025]

D 57位、D 60位、I 156位、G 192位、及び E 206位に突然変異を含む、本発明1001～1024のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1026]

Y 62位、E 118位、S 155位、R 248W位、又はこれらの任意の組合せの位置に突然変異をさらに含む、本発明1025の触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

。

[本発明1027](a) D 57 R、 D 60 A、 Y 62 G、 E 118 A、 S 155 D、 I 156 T、 G 192 C、 及び E 206 S(b) D 57 C、 D 60 A、 Y 62 W、 E 118 A、 S 155 Q、 I 156 T、 G 192 T、 及び E 206 R(c) D 57 L、 D 60 C、 I 156 L、 G 192 I、 E 206 S、 及び R 248 W(d) D 57 W、 D 60 C、 I 156 M、 G 192 I、 E 206 W、 及び R 248 S(e) D 60 C、 I 156 L、 G 192 I、 E 206 S、 及び R 248 W(f) D 57 L、 D 60 A、 I 156 L、 G 192 I、 E 206 S、 及び R 248 W(g) D 57 L、 I 156 L、 G 192 I、 E 206 S、 及び R 248 W(h) D 57 L、 D 60 C、 E 118 Q、 I 156 L、 G 192 I、 E 206 S、 及び R 248 W(i) D 57 L、 D 60 C、 W 120 X、 I 156 L、 G 192 I、 E 206 S、 及び R 248 W(j) D 57 L、 D 60 C、 W 120 X、 S 155 X、 I 156 L、 G 192 I、 E 206 S、 及び R 248 W(k) D 57 L、 D 60 C、 K 153 X、 I 156 L、 G 192 I、 E 206 S、 及び R 248 W(l) D 57 L、 D 60 C、 S 154 X、 I 156 L、 G 192 I、 E 206 S、 及び R 248 W(m) D 57 L、 D 60 C、 S 155 X、 I 156 L、 G 192 I、 E 206 S、 及び R 248 W(n) D 57 L、 D 60 C、 I 156 X、 G 192 I、 E 206 S、 及び R 248 W(o) D 57 L、 D 60 C、 G 192 I、 E 206 S、 及び R 248 W(p) D 57 L、 D 60 C、 G 192 I、 及び R 248 W(q) D 57 L、 D 60 C、 I 156 L、 D 157 X、 G 192 I、 E 206 S、 及び R 248 W(r) D 57 L、 D 60 C、 I 156 L、 E 206 S、 及び R 248 W(s) D 57 L、 D 60 C、 I 156 L、 G 192 I、 及び R 248 W(t) D 57 L、 D 60 C、 I 156 L、 G 192 I、 及び E 206 S

から選択される複数の突然変異を含む、本発明1001～1026のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1028]

クローン D 60 A、 R 617、 R 6113、 R 911、 R 9113、又は R 911 C 60 A によって発現される、本発明1001～1027のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1029]

O 結合型 G l c N A c、 O 結合型 G a l N A c、又は O 結合型 G l c N A c 及び O 結合型 G a l N A c の両方に対する結合特異性及び親和性を増加させる第2の突然変異を含む、本発明1001～1028のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1030]

N 結合型グリカン、 N 結合型複合糖質、 N 結合型糖ペプチド、 N 結合型糖タンパク質、又は遊離 N - グリカンに結合する、本発明1001～1029のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1031]

O 結合型グリカン、 O 結合型複合糖質、 O 結合型糖ペプチド、 O 結合型糖タンパク質、又は遊離 O - グリカンに結合する、本発明1001～1030のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質。

[本発明1032]

第2の成分に共有結合する、本発明1001～1031のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合 P N G a s e F タンパク質を含む第1の成分を含むコンジュゲート。

[本発明1033]

前記第2の成分がタンパク様成分である、本発明1032のコンジュゲート。

[本発明1034]

前記第2の成分が非タンパク様成分である、本発明1032のコンジュゲート。

[本発明1035]

前記第2の成分が治療薬又は診断薬である、本発明1032～1034のいずれかのコンジュゲート。

[本発明1036]

本発明1001～1031のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質を含む融合タンパク質。

[本発明1037]

本発明1001～1036のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質を含むアフィニティマトリックス。

[本発明1038]

固形支持体、表面、カラム、樹脂、ビーズ、粒子、及びナノ粒子からなる群から選択される、本発明1037のアフィニティマトリックス。

[本発明1039]

本発明1001～1038のいずれかの、触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、融合タンパク質、又はアフィニティマトリックスと、使用説明書とを含むキット。

[本発明1040]

本発明1001～1033のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質又はコンジュゲート、又は本発明1036の融合タンパク質をコードする単離ポリヌクレオチド。

[本発明1041]

本発明1040のポリヌクレオチドを含むベクター。

[本発明1042]

発現ベクターである、本発明1041のベクター。

[本発明1043]

本発明1041又は1042のベクターを含む宿主細胞。

[本発明1044]

細菌細胞である、本発明1043の宿主細胞。

[本発明1045]

大腸菌(Escherichia coli)細胞又は酵母細胞である、本発明1043の宿主細胞。

[本発明1046]

触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質を作製するための方法であって、本発明1001～1033のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質又はコンジュゲート、又は本発明1036の融合タンパク質を、単離ポリヌクレオチド、発現ベクター、又は宿主細胞から発現させるステップを含む、方法。

[本発明1047]

N結合型グリカンを検出するための方法であって：

生物学的又は実験室サンプルを、PNGase Fタンパク質のN-グリカンへの結合を可能にする条件下で本発明1001～1036のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させるステップ；及び

前記N結合型グリカンを検出するステップを含む、方法。

[本発明1048]

前記検出されたN結合型グリカンの特徴付けるステップをさらに含む、本発明1047の方法。

[本発明1049]

前記N結合型グリカンの特徴付けるステップが、
前記グリカンの構成糖を特定すること、
前記グリカンの糖組成を決定すること、
前記グリカン内の結合位置を決定すること、又は
前記グリカンの立体化学を決定すること

を含む、本発明1048の方法。

[本発明1050]

○ 結合型グリカンを検出するための方法であって：

生物学的又は実験室サンプルを、PNGas e Fタンパク質の○結合型グリカンへの結合を可能にする条件下で本発明1001～1036のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合PNGas e Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させるステップ；及び

○ 結合型グリカンを検出するステップ

を含む、方法。

[本発明1051]

前記検出された○結合型グリカンの特徴付けるステップをさらに含む、本発明1050の方法。

[本発明1052]

前記○結合型グリカンの特徴付けるステップが、

前記グリカンの構成糖を特定すること、

前記グリカンの糖組成を決定すること、

前記グリカン内の結合位置を決定すること、又は

前記グリカンの立体化学を決定すること

を含む、本発明1051の方法。

[本発明1053]

前記○結合型グリカンが、○結合型G l c N A c又は○結合型G a l N A cを含む、本発明1050～1052のいずれかの方法。

[本発明1054]

遊離N - グリカンを検出するための方法であって：

生物学的又は実験室サンプルを、PNGas e Fタンパク質の遊離N - グリカンへの結合を可能にする条件下で本発明1001～1036のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合PNGas e Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させるステップ；及び

前記遊離N - グリカンを検出するステップ

を含む、方法。

[本発明1055]

遊離○ - グリカンを検出するための方法であって：

生物学的又は実験室サンプルを、PNGas e Fタンパク質の遊離○ - グリカンへの結合を可能にする条件下で本発明1001～1036のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合PNGas e Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させるステップ；及び

前記遊離○ - グリカンを検出するステップ

を含む、方法。

[本発明1056]

前記遊離○ - グリカンが、○ - G l c N A c又は○ - G a l N A cを含む、本発明1055項の方法。

[本発明1057]

N結合型グリカン又は遊離N - グリカンを濃縮する、単離する、又は精製するための方法であって：

生物学的又は実験室サンプルを、PNGas e Fタンパク質のN - グリカンへの結合を可能にする条件下で本発明1001～1036のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合PNGas e Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させて、濃縮された、単離された、又は精製されたN結合型グリカン又は遊離N - グリカンを得るステップを含む、方法。

[本発明1058]

○結合型グリカン又は遊離○-グリカンを濃縮する、単離する、又は精製するための方法であって：

生物学的又は実験室サンプルを、PNGase Fタンパク質のN-グリカンへの結合を可能にする条件下で本発明1001～1036のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質に接触させて、濃縮された、単離された、又は精製された○結合型グリカン又は遊離○-グリカンを得るステップを含む、方法。

[本発明1059]

本発明1001～1036のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質を含む診断組成物又は治療組成物。

[本発明1060]

前記PNGase Fタンパク質、前記コンジュゲート、又は前記融合タンパク質が検出可能に標識される、本発明1059の診断組成物又は治療組成物。

[本発明1061]

前記検出可能な標識が、放射性標識、蛍光標識、りん光標識、比色標識、酵素標識、免疫標識、磁気標識、常磁性標識、反磁性標識、又は電磁標識を含む、本発明1060の診断組成物又は治療組成物。

[本発明1062]

本発明1001～1036のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質の、治療薬としての使用。

[本発明1063]

本発明1001～1036のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質の、診断薬としての使用。

[本発明1064]

標的薬物送達のための、本発明1001～1036のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質の使用。

[本発明1065]

生物学的又は実験室サンプル中のN結合型グリカン又は遊離N-グリカンの存在又は量の検出のための、本発明1001～1036のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質の使用。

[本発明1066]

生物学的又は実験室サンプル中の○結合型グリカン又は遊離○-グリカンの存在又は量の検出のための、本発明1001～1036のいずれかの触媒的に不活性な炭水化物結合PNGase Fタンパク質、コンジュゲート、又は融合タンパク質の使用。

[本発明1067]

前記○結合型グリカンが、○結合型GlcNAc又は○結合型GalNAcを含む、本発明1066の使用。

[本発明1068]

前記遊離○-グリカンが、○-GlcNAc又は○-GalNAcを含む、本発明1066の使用。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0157

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0157】

PNGase Fの重要性

30年前のPNGase Fの発見以来、特徴付けの前にN結合型グリカンを放出するための標準的なツールになった。PNGase Fは、キトビオースコア及びN-グリカンペプチドとタンパク質のコンジュゲートに共通のアスパラギン結合ペプチドモチーフの

両方を認識するため、N-グリカン保持糖タンパク質に対して広範な特異性を有する。基質特異性試験により、触媒活性に必要な最小グリカンモチーフがキトビオースコアであることが確認された^{1 3 5}。加えて、認識される最小ペプチドモチーフは、全てのN結合型グリカンに共通のAsn-X-Ser/Thrグリコシル化モチーフである^{1 3 5}。興味深いことに、最適な酵素活性は、キトビオース結合ペプチド、Tyr-Ile-Asn-Ala-Ser(配列番号21)で観察され、酵素が、グリカン結合アスパラギンの上流及び下流の両方の残基を認識することを示唆している^{1 3 5}。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0185

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0185】

酵母ディスプレイPNGase Fクローンライブラリーの合成

GenScriptライブラリーを、NNKコドン縮重を用いて合成した(GenScript, Piscataway, NJ)。このライブラリーは、表4のライブラリー1の下に示されている突然変異誘発部位を含む。GeneArtライブラリーを、ヌクレオチド混合物を用いて合成し(Life Technologies, Carlsbad, CA)、全てのアミノ酸の等モル分布が得られ、このライブラリーは、表4のライブラリー2の下に示されている19のアミノ酸(即ち、Dを除く)を用いるランダム化D60位を含む。合成ライブラリーを、pPNL6ベクターにクローニングした(図12)。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0227

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0227】

グリカンアレイスクリーニング

Consortium for Functional Glycomics(CFG)によって開発されたグリカンアレイは、610のユニークな哺乳動物グリカンからなり(バージョン5.1)、かつグリカン結合タンパク質の特異性の決定における非常に貴重なツールであることが証明された^{27, 28}。天然及び合成グリカンのライブラリーは、スペーサーを含むアミノリンカーで修飾される。グリカンは、アミノ修飾スペーサーリンカーによってNH₂活性化ガラス表面に共有結合する。各グリカンは、アレイに6つの複製でプリントされる。表面に固定されたグリカンは殆どが、ペプチドグリコシル化sequone(Asn-X(-Pro)-Ser/Thr)を含まない;ただし、2つのリンカーSp22(ペプチドNST)及びSp24(ペプチドKVANKT(配列番号22))を除く。ペプチドsequoneの欠如は、グリカン相互作用の正常な生物学的背景から逸脱している。末端グリカン構造を認識する多くの炭水化物認識タンパク質では、これは、大きな問題ではない(例えば:末端シアル酸を認識するレクチン)。しかしながら、これは、様々なトランスフェラーゼの場合のように、グリカンが提示される又はグリカンが移送されるタンパク質の関連でグリカン構造を認識する炭水化物プロセッシング酵素では大きな問題である。wtPNGase F酵素が、sequone及びアスパラギン結合キトビオースコアからなる糖ペプチドを認識することが知られていることから、固定されたグリカンにおけるペプチドsequoneの欠如は制限である。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0292

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0292】

- キトビオース及び糖トリペプチドリガンドのトリペプチド部分のエネルギー寄与も、MM-GBSA分析で決定した(表34)。有利な相互作用の大部分は、タンパク質と、ペプチド(-4 kcal/モル~-6 kcal/モル)に対する糖トリペプチドの炭水化物部分(-14 kcal/モル~-16 kcal/モル)との間である。1PNF X線モデルからの実験データは、結合ポケットの残基とキトビオースリガンドとの間の水素結合のネットワークを示している(図5及び図6)¹。PNGase Fの基質特異性の研究は、PNGase Fの触媒活性が、糖トリペプチド基質(キトビオース-Asn-Ala-Thr)では83%であり、糖ジペプチド基質(キトビオース-Asn-Ala)では、活性が1.8%であることを示し、100%の活性は、ペンタペプチド基質(キトビオース-Tyr-Ile-Asn-Ala-Ser(配列番号23))で得られる⁷。従って、基質特異性の研究は、ペプチド部分が重要であることが示している。これらのシミュレーションは、既に述べた実験データに基づいて糖トリペプチドリガンドを利用したため、より決定的な相互作用エネルギーの結果は、糖ペンタペプチドリガンドで得られるであろうと予想され得る。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2017513488000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 15/26374

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(B) - C12N 9/24, C12N 15/56 (2015.01) CPC - C12N 9/24, C12N 15/52 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) IPC(B): C12N 9/24, C12N 15/56 (2015.01) CPC: C12N 9/24, C12N 15/52 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC: C12N 15/09, C12N 9/2402 (keyword limited; terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar, Google Web, search terms: PNGase F or "Peptide-N4-(N-acetyl-beta-D-glucosaminyl)asparagine amidase" or Peptide:N glycanase, inactive, reduce catalytic activity, mutations, change specificity, binding activity, mutation, O-linked GalNA, F. meningosepticum, linked GlcNAc, O-linked GalNAc										
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT										
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X — Y</td> <td>US 2012/0040474 A1 (WOODS et al.) 16 February 2012 (16.02.1012) claims 1, 15, 16, para [0040]-[0043], [0054], [0086], [0100], [0113], [0114], [0120], Tables 1, 5, 7</td> <td>1-4 ----- 5-8</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 7,368,108 B2 (DEFREES et al.) 6 May 2008 (06.05.2008) col 19, ln 31-34, col 20, ln 29-35, col 21 ln 4-8, SEQ ID NO:1</td> <td>5-8</td> </tr> </tbody> </table>	Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X — Y	US 2012/0040474 A1 (WOODS et al.) 16 February 2012 (16.02.1012) claims 1, 15, 16, para [0040]-[0043], [0054], [0086], [0100], [0113], [0114], [0120], Tables 1, 5, 7	1-4 ----- 5-8	Y	US 7,368,108 B2 (DEFREES et al.) 6 May 2008 (06.05.2008) col 19, ln 31-34, col 20, ln 29-35, col 21 ln 4-8, SEQ ID NO:1	5-8	<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.								
X — Y	US 2012/0040474 A1 (WOODS et al.) 16 February 2012 (16.02.1012) claims 1, 15, 16, para [0040]-[0043], [0054], [0086], [0100], [0113], [0114], [0120], Tables 1, 5, 7	1-4 ----- 5-8								
Y	US 7,368,108 B2 (DEFREES et al.) 6 May 2008 (06.05.2008) col 19, ln 31-34, col 20, ln 29-35, col 21 ln 4-8, SEQ ID NO:1	5-8								
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"@" document member of the same patent family</p>									
Date of the actual completion of the international search 13 July 2015 (13.07.2015)	Date of mailing of the international search report 10 AUG 2015									
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/26374

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/26374

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 9-68
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees:
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int. Cl.			F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	4 C 0 8 5
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
C 0 7 K	14/195	(2006.01)	C 0 7 K	14/195	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	S
A 6 1 K	47/50	(2017.01)	A 6 1 K	47/48	
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 K	49/00	(2006.01)	A 6 1 K	49/00	A
A 6 1 K	51/00	(2006.01)	A 6 1 K	49/02	A
C 1 2 N	9/24	(2006.01)	C 1 2 N	9/24	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74) 代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74) 代理人 100102118

弁理士 春名 雅夫

(74) 代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74) 代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74) 代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 サムリ カウサー エヌ .

アメリカ合衆国 3 0 6 0 6 ジョージア州 アセンズ ティモシー ロード 2 6 0

(72) 発明者 ウッズ ロバート ジェイ .

アメリカ合衆国 3 0 6 0 6 ジョージア州 アセンズ グレイストーン テラス 2 5 0

(72)発明者 ヤン ロレッタ

アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州 サンディエゴ ノベル ドライブ 3 9 3 7
ユニット 1 3 0

Fターム(参考) 4B050 CC02 CC04 DD01 GG10 LL03

4B064 AG01 CA19 CC24 DA13

4B065 AA26X AA27Y AA72X AB01 AC14 BA01 CA24 CA33 CA46

4C076 CC41 EE59 FF70

4C084 AA02 BA34 CA53 NA14

4C085 HH03 HH07 HH11 KA27 KA28 KA29 KA40 KB82

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 BA53 CA11 DA89 EA50 FA74

专利名称(译)	碳水化合物结合蛋白		
公开(公告)号	JP2017513488A	公开(公告)日	2017-06-01
申请号	JP2016563071	申请日	2015-04-17
[标]申请(专利权)人(译)	格力高传感器和诊断有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	格鲁吉亚研究的基础上，公司的大学 格力高传感器和诊断有限责任公司		
[标]发明人	サムリカウサーエヌ ウッズロバートジェイ ヤンロレッタ		
发明人	サムリ カウサー エヌ. ウッズ ロバート ジェイ. ヤン ロレッタ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/00 C07K19/00 C07K17/00 C12N11/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02 C07K14/195 G01N33/53 A61K47/50 A61K38/00 A61K49/00 A61K51/00 C12N9/24		
CPC分类号	C12N9/80 C07K11/14 C12Y305/01052 G01N33/6803 G01N2333/978 G01N2400/00 G01N2440/38		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/00 C07K19/00 C07K17/00 C12N11/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C07K14/195 G01N33/53.S A61K47/48 A61K37/02 A61K49/00.A A61K49/02.A C12N9/24		
F-TERM分类号	4B050/CC02 4B050/CC04 4B050/DD01 4B050/GG10 4B050/LL03 4B064/AG01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA27Y 4B065/AA72X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA33 4B065/CA46 4C076/CC41 4C076/EE59 4C076/FF70 4C084/AA02 4C084/BA34 4C084/CA53 4C084/NA14 4C085/HH03 4C085/HH07 4C085/HH11 4C085/KA27 4C085/KA28 4C085/KA29 4C085/KA40 4C085/KB82 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/BA53 4H045/CA11 4H045/DA89 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/981335 2014-04-18 US		
其他公开文献	JP2017513488A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

碳水化合物加工酶PNGase F通过突变被催化失活。 额外的突变导致具有催化活性的碳水化合物结合蛋白具有凝集素样特性，包括高亲和力和特异性N-连接聚糖，O-连接聚糖或两者。

Fig. 5

