

ヒト由来コアフコース転移酵素固定化ナノ微粒子の開発

成地 健太郎 [医化学創薬株式会社／主任研究員]
比能 洋 [北海道大学大学院先端生命科学研究院／准教授]

背景・目的

アスパラギン結合型糖鎖の根元に存在するコアフコースと呼ばれる糖は、その有無によって癌の病態に影響を与えるほどの機能を有している。重要な生物活性を有するコアフコースの形成にはコアフコース転移酵素(FUT8)が関与しており、生命現象を解き明かすためには、コアフコースを付与した糖タンパク質を高純度かつ大量に調製する必要がある。近年、我々は膜接着配列(MAP)を介して、生体分子を固定化する技術を確立している。そこで本研究では、MAPを融合したFUT8を固定化したナノ磁性微粒子の開発を目的とした。

内容・方法

(1) FUT8-MAPの生産と精製

ヒト小腸cDNAをテンプレートにして調製したFUT8遺伝子と*H. pylori* α1,3-FucTの膜接着配列遺伝子を融合させた遺伝子を調製した。大腸菌を宿主として当該遺伝子を大量生産し、アフィニティー精製をおこなった。

(2) FUT8-MAPの遊離酵素としての活性評価

卵黄由来糖ペプチド(SGP)より誘導したagalacto-SGPとGDP-fucoseを使用して最適条件を検討した。また、SGP誘導体を使用して基質特異性を評価した。

(3) FUT8-MAPのナノ磁性微粒子上への固定化とその評価

FUT8-MAPの固定化条件を検討し、固定化の有無をSDS-PAGE、活性測定によって確認した。

(4) 固定化FUT8-MAPを利用した機能性糖ペプチドのフコシル化

FUT8-MAP固定化ナノ磁性微粒子を使用して、疾患関連タンパクに由来する糖ペプチドに使用することで有用性を検討した。

結果・成果

(1) FUT8-MAPの生産と精製

FUT8遺伝子とMAP遺伝子の融合したベクターの調製に成功し、FUT8-MAP生産大腸菌を得た。培養条件を検討したところ、誘導剤濃度0.2 mMで16°C、20時間で最も生産量が多かった。誘導剤濃度が0.2 mMより濃い条件や20°C以上の温度では、当該酵素の分解、凝集が生じることがわかった。大量培養したFUT8-MAPをアフィニティーカラムに供した結果、吸着を確認し、1ステップで精製を達成した。

(2) FUT8-MAPの遊離酵素としての活性評価

SGPにシリカリダーゼ、ガラクトシダーゼを作用させることで2ステップ90%の収率で、活性測定に使用するagalacto-SGPを調製した。得られたagalacto-SGPを基質としてGDP-fucose存在下、FUT8-MAPを作用させHPLCで解析した結果、出発原料の減少と新規ピークの生成を確認した。活性を算出した結果、150 mU/mLの活性を確認した(1 U = μmol/min)。SGP誘導体を用いて基質特異性を検討したところ、FUT8-MAPの活性には非還元末端側にGlcNAcの表出が必要であることがわかった。

(3) FUT8-MAPのナノ磁性微粒子上への固定化とその評価

FUT8-MAP混合後のナノ磁性微粒子をSDS-PAGE分析した結果、微粒子上への濃縮(固定化)を確認することができた。固定化に必要な時間は2時間で問題ないことがわかった。このFUT8-MAP固定化ナノ磁性微粒子をagalacto-SGPに対するフコース転移反応に供したところ、反応が100%進行した(図1)。活性の強さは、1 mg ナノ磁性微粒子あたり10 mUを保持していた。また、FUT8-MAP固定化ナノ磁性微粒子を界面活性剤で洗浄しても脱離が起きず、pH 11で洗浄した時のみに脱離が生じたことから、塩基性アミノ酸リッチなMAP配列を介して磁性微粒子に固定化されていることを確認できた。

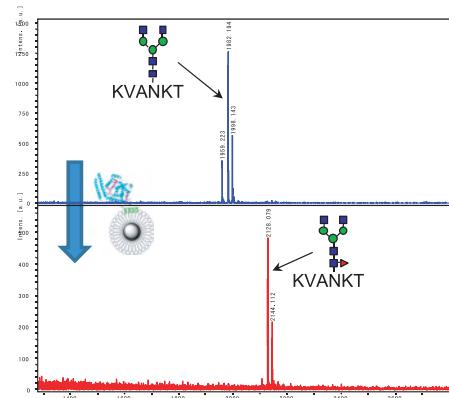


図1 FUT8-MAP固定化ナノ磁性微粒子の活性

(4) 固定化FUT8-MAPを利用した機能性糖ペプチドのフコシル化

疾患関連タンパク質由来の糖ペプチドを固相合成し(収率22%)、2種の糖加水分解酵素反応により非還元末端にGlcNAcが表出した糖ペプチドを得ることができた(2ステップ収率85%)。この糖ペプチドを基質として固定化FUT8-MAPを反応させた結果、収率95%で目的とするフコースが結合した機能性糖ペプチドへと誘導することができた(図2)。

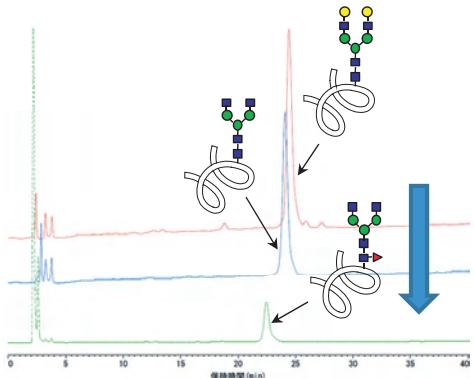


図2 機能性糖ペプチドの糖鎖トリミング

今後の展望

本研究によりヒト由来コアフコース転移酵素固定化ナノ微粒子の有用性を実証した。当該固定化酵素によって、任意の疾患に合わせた多種多様なフコシル化糖ペプチドライブリを構築が可能となった。これら糖ペプチドライブリは、質量分析における標準物質として利用できるだけでなく、新規バイオマーカーなどの創薬探索に直接利用可能である。糖ペプチドを提示するプラットフォームとしてマイクロアレイ、ナノ微粒子などを使用することで、疾患特異的糖鎖の同定、さらには疾患特異的診断システムなどの機器開発へと展開していきたい。