

学 位 論 文 の 要 旨

エンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ活性測定のための糖鎖分子プローブの合成研究
(Synthetic studies on glycan-based molecular probes for measurement of endo- β -*N*-acetylglucosaminidase activity)

氏 名 石井 希実 印
(Nozomi Ishii)

本学位論文は、エンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase) の糖転移活性と糖加水分解活性を、糖鎖合成化学を基盤として合成した糖鎖分子プローブにより簡便且つ高感度に検出する新規酵素活性測定系の開発に関する成果をまとめたものである。

第1章では、ENGase に関するこれまでの研究および ENGase 研究における課題を踏まえ、本研究の目的を示した。ENGase はタンパク質のアスパラギン残基に結合したアスパラギン結合 (*N*-) 型糖鎖をタンパク質上に GlcNAc 残基を1つ残して遊離する糖加水分解酵素であるが、糖加水分解活性に加えて、GlcNAc 残基に対して糖鎖を付加する糖転移活性も有する。ENGase の糖転移活性を利用した糖ペプチドや糖タンパク質の糖鎖修飾研究が行われている。また、ENGase は患者数 50 名ほどの希少疾患 *NGLY1* 欠損症との関連が示唆され、ENGase の糖加水分解活性阻害剤が *NGLY1* 欠損症治療薬となる可能性が示されている。しかし、ENGase 研究を効率よく進める上で必要な、簡便で多サンプル解析に対応した ENGase の糖転移活性と糖加水分解活性の評価法が共になく ENGase 研究の律速となっている。このような状況を踏まえ、本研究では蛍光標識化した糖鎖分子プローブを設計、合成することで ENGase の糖転移活性と糖加水分解活性の簡便な検出系の構築を行った。

第2章では ENGase が許容する基質構造を明らかにするために、*N*-型糖鎖のコア4糖構造に着目して非天然型糖鎖構造を系統的に合成した。そして、これらを基質とした糖転移活性を測定することにより、ENGase は *N*-型糖鎖コア4糖構造の β -マンノース残基 C-2 位が基質認識に必須であること、C-4 位は認識に関与しないことを明らかにした。得られた結果をもとに C-4 位に蛍光性置換基などの化学修飾を施した4糖誘導体を合成し、これらの化学修飾糖鎖が ENGase の糖転移反応の基質となることを示した。

第3章ではフェルスター型共鳴エネルギー移動 (FRET) を基盤とした ENGase の糖転移活性検出系の開発についてまとめた。第2章で合成した蛍光修飾4糖供与体と FRET ペア一となる蛍光性置換基を導入した糖受容体を合成、HPLC により ENGase の糖転移活性を追跡した。その結果、FRET により糖転移反応の追跡ができることを確認した。しかし、プレートアッセイによる糖転移反応のリアルタイム追跡は、蛍光性置換基のバックグラウンド蛍光によりできなかつた。そこで、蛍光性置換基を有する4糖と消光基を有する糖受容体の組み合わせにより、蛍光強度の減少を測定することで糖転移活性のリアルタイム追跡が可能であることを示した。

第4章では、ENGase の糖加水分解活性を FRET クエンチングの解消による蛍光強度の増加を測定することで追跡するアッセイ系の開発についてまとめた。非還元末端部分に蛍光性置換基、還元末端部分に消光基を導入した5糖分子プローブを合成した。5糖分子プローブを用いることで由来の異なる ENGase の糖加水分解活性を蛍光強度の増加で検出できることを明らかにした。そして、マイクロプレートリーダーを利用することで、多サンプルの糖加水分解反応を同時に追跡できることを示した。さらに、高マンノース型糖鎖特異的な ENGase (Endo-H) の糖加水分解活性を検出するために糖鎖構造の異なる7糖分子プローブを合成した。その結果、7糖分子プローブを用いることで異なる基質特異性を示す ENGase の糖加水分解活性も検出できることを示した。

第5章では、第4章で確立した糖加水分解活性の検出系を用いた ENGase 阻害剤探索の可能性について検討した結果についてまとめた。ENGase の糖加水分解活性を阻害することが報告されているチアゾリン誘導体を合成し、酵素阻害実験を行った。その結果、ENGase の糖加水分解反応の阻害活性が検出できることを示した。さらに反応条件を精査した結果、化合物ライブラリを用いた糖加水分解活性阻害剤のハイスループットスクリーニングにも利用できることを確認した。

以上、糖鎖合成を基盤として得られる合成糖鎖基質を利用することで、ENGase の基質特異性を明らかとし、その結果をもとにデザインした蛍光修飾糖鎖分子プローブにより ENGase 活性の新たな解析手法を確立した。糖転移活性検出系はタンパク質工学的手法によって作り出される糖転移活性の高い ENGase の選別を容易にし、糖加水分解活性検出系は、新規の ENGase 探索研究や *NGLY1* 欠損症治療薬となる ENGase 阻害剤探索の効率化を可能にした。本研究で開発した ENGase の酵素活性解析法は ENGase 研究の進展に広く貢献するものと期待される。

Synthetic studies on glycan-based molecular probes for measurement of endo- β -*N*-acetylglucosaminidase activity

Nozomi Ishii

This thesis entitled as “Synthetic studies on glycan-based molecular probes for measurement of endo- β -*N*-acetylglucosaminidase activity” describes mainly two subjects. One is the specificity of donor structures for endo- β -*N*-acetylglucosaminidase (ENGase) catalyzed transglycosylation reactions. The other is the development of a fluorescence-quenching-based assay system to determine the hydrolysis activity of ENGases.

In Chapter I, the background, purpose and value of this study are described. ENGase (EC 3.2.1.96) hydrolyzes the *N,N'*-diacetylchitobiose core of the asparagine-linked oligosaccharides (*N*-glycan) of glycoproteins. According to amino acid sequence similarity, this enzyme belongs to the glycoside hydrolase families GH18 and GH85. Several ENGases have been known to exhibit transglycosylation activity, and this characteristic makes them a potential tool for bioengineering of glycoproteins such as therapeutic antibodies. In addition, cytosolic ENGases have been reported to be associated with *N*-glycanase 1 (*NGLY1*) deficiency, and ENGase inhibitors are promising drug candidates for the treatment of *NGLY1*-deficiency. However, current assays for ENGase activity involve the laborious separation and quantification of hydrolysis products by either high-performance liquid chromatography (HPLC) or sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis. In order to screen for novel ENGases with high glycosyltransferase activity, or inhibitors of ENGase, it is necessary to establish a simple assay method for the both of transglycosylation activity and hydrolysis activity. Thus, for this study has carried out the construction of a new assay system for the measurement of ENGase activity based on the fluorescence-quenching system was carried out.

In Chapter II, in order to clarify the structural specificity of the glycosyl donor for the transglycosylation reaction by using ENGase from *Mucor hiemalis* (Endo-M), the focus was on the branching point of the sugar residue with different hydroxy group configurations and for this purpose a series of tetrasaccharide donors were synthesized. Using these oligosaccharides, the precise structure–activity relationship was demonstrated for Endo- M and its mutants. The results showed that the C-4 position of the β -mannose residue was suitable for chemical modification. The transglycosylation reaction of Endo-M N175Q was investigated by using donors chemically modified at the C-4 position of the β -mannose residue, and the transglycosylation products were successfully formed.

In Chapter III, in order to develop an assay system for detecting the transglycosylation activity of ENGase based on Förster resonance energy transfer (FRET), the fluorescence (tetramethylrhodamine: TAMRA group) labeled tetrasaccharide derivative and the GlcNAc derivative having a fluorescein (FAM) group were synthesized, and the measurement of the transglycosylation reaction by the Endo-M N175Q mutant was examined. As a result, the transglycosylation activity of ENGase was detected by increasing the fluorescence intensity of TAMRA caused by FRET from FAM to TAMRA. Further, the transglycosylation activity of ENGase was detected by measuring the decrease in fluorescence intensity of FAM. Based on the FRET quenching system, substrates having FRET pairs of *N*-methylanthraniloyl (Nma) group and 2,4-dinitrophenyl (Dnp) group were also synthesized. This assay system provided a real-time monitoring of transglycosylation activity of ENGase by decreasing the fluorescence signal.

In Chapter IV, in order to develop a fluorescence-quenching-based assay system to determine the hydrolysis activity of ENGases, the pentasaccharide derivative was labeled with an Nma group as a reporter dye at the non-reducing end and a Dnp group as a quencher molecule at the reducing end. This derivative was hydrolyzed by ENGase, resulting in an increase in fluorescence intensity. Thus, the fluorescence signal is directly proportional to the amount of the tetrasaccharide derivative, allowing ENGase activity to be evaluated easily and quantitatively. Using this dual-labeled pentasaccharide FRET probe, we succeeded in measuring the hydrolysis activities of ENGases.

In Chapter V, the results of the screening of ENGase inhibitors applied to the pentasaccharide probe are described. In order to evaluate the inhibitory activity by the hydrolysis assay system, known inhibitors were synthesized. Using this system, measurement of the inhibitory activities of known inhibitors was shown to be possible. As a result of optimizing the reaction conditions, it was confirmed that this assay system is suitable for high-throughput screening for potential inhibitors of ENGase.

In conclusion, analysis of the substrate specificity of ENGases by using the synthetic substrates, and revealed the C-4 position of the β -mannose residue to be suitable for chemical modification. Based on these results, new assay systems were established for monitoring of transglycosylation activity and hydrolysis activity for ENGases using fluorescent modified sugar chain molecular probe, respectively. This assay system is suitable for the screening of novel ENGases from natural sources and also for screening potential inhibitors of human ENGase, which could serve as therapeutic agents in the treatment of *NGLY1*-deficiency.