



Title	Chemical synthesis of erythropoietin glycoforms bearing biantennary complex type sialyloligosaccharides and evaluation of their biological activities
Author(s)	村上, 真淑
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52312
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (村 上 真 淑)

論文題名

Chemical synthesis of erythropoietin glycoforms bearing biantennary complex type sialyloligosaccharides and evaluation of their biological activities

(2分枝複合型シアリル糖鎖を有する糖タンパク質エリスロポエチンの化学合成およびそれらを用いた生理活性評価)

論文内容の要旨

【研究の背景と目的】

EPOは貧血治療薬として用いられる糖タンパク質である。EPOは24位、38位、83位に複合型シアリル糖鎖を3本持ち、その末端に存在するシアリ酸は、赤血球増殖活性に深く関与していることが知られている。しかし、これら糖鎖は、2-4分枝に枝分かれし、さらには、その末端に酸性のシアリ酸が付加している。糖鎖の機能解明をするために、糖タンパク質を得、糖鎖構造と活性の相関を調べる研究が必要であった。糖タンパク質を得る手法として最も一般的な動物細胞による発現法があるが、タンパク質構造は同じでも糖鎖構造や数に不均一性が生じたグライコフォームしか得られず、どの糖鎖構造がタンパク質活性に必要なか調べるのが困難であった。また、糖鎖の数が増えるほどEPOの活性が増加すると言われていたが、当研究室で、24位、30位、32位に非天然型の位置に、非天然型の結合様式によって2分枝シアリル糖鎖を3本結合させたEPOを合成してもこのEPOは生理活性をほとんど有していなかった。このように糖鎖の数だけ揃えば、タンパク質活性がでるわけではなく糖鎖とタンパク質活性発現の関係は明確化されていなかった。このような背景の中、糖鎖構造・糖鎖付加位置を自在に可変し高純度の糖タンパク質を得るには、化学合成が期待されていたが、3本の複合型シアリル糖鎖をもつ天然型のEPOの化学合成は確立されていなかった。

そこで、本研究では、天然の位置に天然の結合様式で2分枝複合型シアリル糖鎖を有するEPOの合成し、3本の糖鎖の機能解明をおこなうことを目的とした。そのためには、合成の鍵中間体であるシアリル糖ペプチドチオエステルの効率的な合成法、およびそれを用いた糖鎖の数や位置の異なるEPOの網羅的な化学合成ルートを確立する必要があった。

【実験結果】

シアリル糖ペプチドチオエステルの簡便な合成：

鍵中間体であるシアリル糖ペプチドチオエステルの合成法を確立するために、まずは酸性条件で不安定な性質を持つシアリ酸を安定化する手法を検討した。この合成では、シアリ酸が酸性条件下で容易に加水分解されることが一番の問題であったが、これはシアリ酸のカルボキシル基が分子内酸触媒として働くことが原因と仮説をたて、解決策を研究した。基質に鶏卵から単離した2分枝複合型シアリル糖鎖を用い、シアリ酸のカルボキシル基に対し、酸で容易に脱保護されないフェナシル基を導入した (Figure A)。得られたフェナシル-シアリル糖鎖の加水分解の割合を塩酸中で評価した結果、24時間後も安定に存在していることがわかった。さらに、Bocペプチド固相合成法に用いるトリフルオロメタンスルホン酸 (TfOH) などの強酸性条件下でも安定性を示した。以上の結果から、分子内触媒反応がシアリ酸の不安定性を決める要因と確信した。次に、このフェナシル-シアリル糖鎖を用いるBocペプチド固相合成法を検討し、目的とするシアリル糖ペプチドチオエステルの合成に成功した。

シアリル糖タンパク質EPOの網羅的合成：

確立したシアリル糖ペプチドチオエステル合成法を利用して、天然の位置である24位、38位、83位に2分枝シアリル糖鎖を有するEPO (EPO-24,38,83) の化学合成をおこなった。その際、糖鎖の本数を変えたEPO誘導体の合成も考慮に入れた合成ルートを考案し、EPO全長を6つのセグメントに分けて調製した。各ペプチド・糖ペプチドセグメントをそれぞれ固相合成により調製後、ペプチド連結反応により、EPO全長糖ポリペプチド鎖を構築した。続く酸化的フォールディング操作により、シアリル糖鎖をもつEPO-24,38,83 (1)の化学合成を達成した。また、同様の合成スキームを用いて2本糖鎖を有するEPO誘導体EPO-38,83 (2)、EPO-24,83 (3)、EPO-24,38 (4)、1本糖鎖を有するEPO誘導体EPO-83 (5)の合成に成功した (Figure B)。

EPO誘導体を用いた生理活性評価：

得られた5種のEPO誘導体を用いて、ジスルフィド結合位置の特定、CD測定による解析、細胞やマウスを用いた生理活性を比較した。糖鎖の本数や位置はタンパク質部分の立体構造形成に影響を与えないことがわかったが、EPOの疎水性やマウスを用いたヘマトクリット活性の結果に違いが生じた。天然の位置に3本シリアル糖鎖を有するEPO-24,38,83 (1)が最も高い生理活性を示した。また、糖鎖の本数は同じで付加位置の異なるEPO誘導体EPO-38,83 (2)、EPO-24,83 (3)、EPO-24,38 (4)の間で活性の高さに違いが生じた。

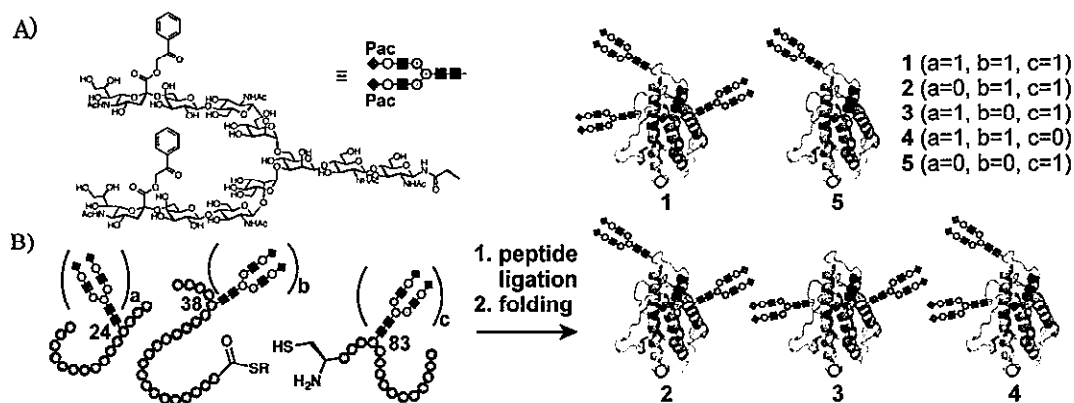


Figure. A) 部分保護された2分枝複合型シアリル糖鎖の構造、B) EPO誘導体の合成スキームの概略図

【結論】

本研究では、糖タンパク質の糖鎖機能解明に必要なシアリル糖タンパク質の化学合成をおこなうために、酸に不安定なシアリル結合の安定化をはかることを検討し、実験結果からシアル酸自身がつカルボキシル基が分子内酸触媒であることが原因であることを見出した。この分子内触媒反応を抑制することで、シアリル結合の安定化に成功し、簡便にシアリル糖ペプチドチオエステルを合成する手法を確立した。これにより、糖鎖の数や位置の異なるシアリル糖タンパク質EPOの合成を達成した。

また、5種のEPO誘導体の特徴の違いやそれらを用いた生理活性評価から、EPOの持つ3本の複合型シアリル糖鎖の内、38位、83位に結合した糖鎖の重要性が示唆された。これら糖鎖は、EPOタンパク質部位の疎水性面を覆うことでEPOの溶解性を高めたり、タンパク質タンパク質の非特異的相互作用、アグリゲーションを抑えるとともに、疎水性面を認識するプロテアーゼによる分解から保護することで、EPOの安定性を向上させ、生理活性を初めて発現できるものと推論した。また、糖タンパク質が生体内で正しく機能するために、糖鎖付加位置は偶然ではなく、分子進化の過程で必然的に糖鎖付加の位置が決定されているのではないかと考察するに至った。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (村 上 真 淑)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	梶原 康宏
	副 査	教授	村田 道雄
	副 査	教授	深瀬 浩一

論文審査の結果の要旨

タンパク質上の糖鎖は、タンパク質の機能発現に関与しているといわれているが、生体から単離したタンパク質がもつ糖鎖の構造は、不均一で、どのような構造の糖鎖がタンパク質機能を調整しているか調べることは困難であった。

本研究は、単一構造の糖鎖をもつタンパク質、エリスロポエチンを化学合成すること、ならびに糖鎖がエリスロポエチンの血球増殖活性に与える影響を調べることを目的として実施された。

糖鎖は鶏卵から単離したヒト型と同じ2分枝型のシアル酸をもつシアリル糖鎖を精製して用いた。そして、ペプチド固相合成によりシアリル糖ペプチドチオエステルに変換後、それらを連結することでエリスロポエチンの全長ポリペプチドを合成した。この合成では、エリスロポエチンの活性に必須なシアル酸という糖が、酸処理の工程で容易に脱離しやすいという理由を解明するとともにその問題を解決する方法を見だし、簡便にシアリル糖ペプチドを合成できるようにした。そして、エリスロポエチンのフォールディングの実施ならびにその過程を解析した。このフォールディングでは、一部タンパク質が多量化する問題があったが、条件検討をすることで効率よく天然型の3次元構造をもつエリスロポエチンの合成に成功した。また、フォールディングの際、エリスロポエチンがもつ糖鎖の数、位置によってフォールディングの収率が影響をうけることを考察した。そして、エリスロポエチンの天然型の糖鎖付加部位を変えて幾つかの誘導体も合成した。

合成したエリスロポエチンは、動物実験により赤血球増殖活性を調べ、糖鎖の数、糖鎖付加位置とタンパク質活性の相関関係を調べるとともに、エリスロポエチンの糖鎖の必要性、役割について糖タンパク質モデルをもとに考察した。その結果、酸性を示すシアリル糖鎖を天然の3カ所の位置にもつエリスロポエチンが最も高い赤血球増殖活性を示し、そして糖鎖の数が減るとともに、その活性が減少することを均一なシアリル糖鎖をもつエリスロポエチンを用いて初めて確認した。

また、考察では、酸性を示すシアリル糖鎖は、タンパク質の疎水性面周辺に付加するようタンパク質の生合成経路で制御されている可能性を指摘している。

これらの結果は、糖質化学、タンパク質化学、糖鎖生物学にまたがる重要な研究成果である。

以上のように、本論文は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。

