



Title	Chemical Synthesis of Homogeneous Erythropoietin Analogs Bearing High-mannose Type Oligosaccharides for the Elucidation of Endoplasmic Reticulum Glycoprotein Quality Control System
Author(s)	木内, 達人
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56053
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 (木内 達人)

論文題名

Chemical Synthesis of Homogeneous Erythropoietin Analogs Bearing High-mannose Type Oligosaccharides for the Elucidation of Endoplasmic Reticulum Glycoprotein Quality Control System
(ハイマンノース型糖鎖を持つエリスロポエチンの精密化学合成とそれらを用いた小胞体糖タンパク質品質管理機構の解明研究)

本研究では、小胞体内で実施されている糖タンパク質のフォールディング (Figure 1) がどのように制御されているのか、化学合成によって得られた均一な構造を持つ糖タンパク質プローブを用いて調べた。小胞体内の糖タンパク質フォールディングは、まずリボソームによって翻訳されたペプチドに、グルコースを3つ、マンノースを9つ、N-アセチルグルコサミンを2つ持つハイマンノース型糖鎖 (G3M9糖鎖) が付加され開始される (Fig. 1, ①)。この糖鎖は、次にグルコシダーゼI, IIによってグルコースが二つ刈り取られ、G1M9糖鎖を持つ糖タンパク質 (G1M9糖タンパク質) に変換される (Fig. 1, ②)。そして、カルネキシン (CNX)、カルレティキュリン (CRT) と呼ばれるG1M9糖鎖を特異的に認識するシャペロンが、この糖タンパク質と相互作用し、そのタンパク質部分のフォールディングをおこなう (Fig. 1, ③)。フォールディング終了後、最後のグルコースがグルコシダーゼIIによって刈り取られ、M9-糖タンパク質となり (Fig. 1, ④)、正しくフォールディングした糖タンパク質は次のステップであるゴルジ体へと送られる (Fig. 1, ⑤)。一方、ミスフォールドした糖タンパク質は、UDP-glucose:

glycoprotein glucosyltransferase (UGGT) と呼ばれるフォールディングセンサー酵素によって、特異的に認識され、不良品であるというタグとしてグルコースが1つ転移される (Fig. 1, ⑥)。このG1M9-糖タンパク質は再びCNX/CRTと相互作用して、リフォールディングがおこなわれる (Fig. 1, ⑦)。このような機構を糖タンパク質の品質管理といい、不良品の蓄積を防ぎ、糖タンパク質の生産の効率を最大限高めている。これらのシャペロン類のそれぞれの機能は分かっている部分も多くある一方、これらの分子がいつ、どのようなタイミングで基質である糖タンパク質に相互作用するのか明らかになっていない。

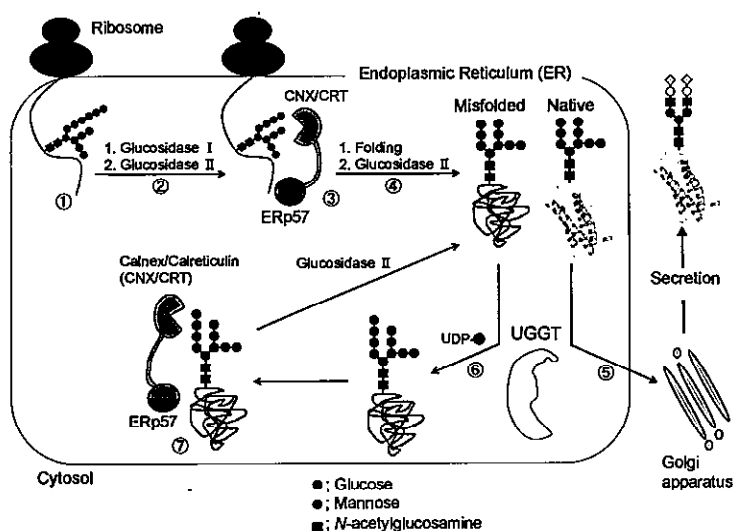


Figure 1. Glycoprotein quality control system

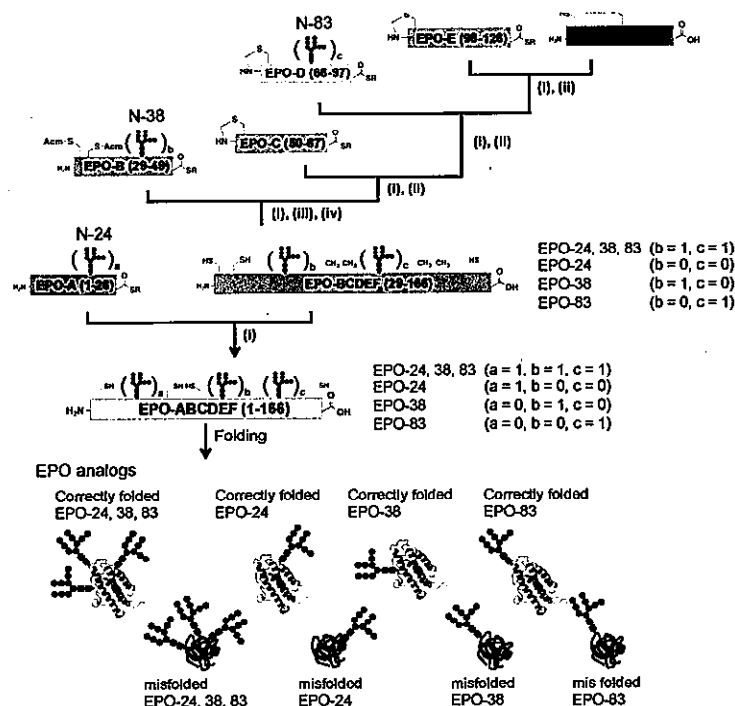


Figure 2. Synthetic strategy of EPO analogs.

(i) Native chemical ligation; (ii) Removal of thiazolidine; (iii) Dsulfurization; (iv) Removal of the Acn groups

そこで本研究では、これらの分子の相互作用を調べるためのプローブとして、ハイマンノース型糖鎖糖鎖 (M9糖鎖) を持つエリスロポエチン (EPO) の化学合成をおこなった。EPOは3本のN-結合型糖鎖を持つ、造血ホルモンである。本研究では糖タンパク質上の糖鎖の数や位置の違いが、シャペロンや酵素群の相互作用にどのような影響があるかを調べるために、それぞれの糖鎖付加位置に1本ずつM9糖鎖を持つEPOおよび3本全ての位置にM9糖鎖を持つEPOの調製をおこなった (Fig. 2)。166アミノ酸残基からなるEPOを6つの短いセグメントに分けてそれぞれを合成後、これらを連結することでEPOの調製をおこなった。合成の鍵中間体となる糖ペプチドチオエステルセグメントは、卵黄から単離したM9糖鎖をBoc固相合成法に用いることで調製した。他のペプチドチオエステルおよびペプチドセグメントもBocおよびFmoc固相合成法によって調製した。こうして得たセグメントをNative chemical ligationというペプチド連結反応によって、C末端から順次連結することで、糖鎖の数、位置の違う4種類のEPOの全長糖ポリペプチド鎖を合成した。最後にこれらに対してフォールディング操作をおこない、正しくフォールディングしたEPOを4種類、およびミスフォールドしたEPOを4種類合成することに成功した。

次に遺伝子組み換えによって得られたUGGTと8種類の合成EPOとのアッセイをおこなった (Fig. 3 (a))。その結果、ミスフォールドしたEPOだけでなく、正しくフォールディングしたEPOもUGGTによってグルコースが転移されるという予想外の結果が得られた。糖鎖を1本のみ持つEPOに関しては、糖鎖が欠損しているために、UGGTの認識に必要とされる疎水性面がタンパク質表面に露出したことが原因と考えられる。しかし、3本全ての糖鎖を持つEPOはタンパク質構造も糖鎖構造も小胞体中での天然型と同じであるため、UGGTがグルコースを転移したという結果はさらに予想外のものであった。

そこで私はこれまでの研究で使われたUGGTの基質が全て、 β シート構造をもつことに着目した (Fig. 4)。これより、UGGTは β シート構造を、正しくフォールディングした糖タンパク質であるというサインとして認識しているため、 α ヘリックス構造しか持たないEPOを不良品と判断してグルコースを転移したと考えた。この仮説を検証するため、同じく α ヘリックス構造のみを持つインターフェロン β (INF- β) を、M9糖鎖を持つ形で化学合成した。これを合成した後、合成INF- β と組換えUGGTとのアッセイをおこなったところ、UGGTは正しくフォールディングしたINF- β にグルコースを転移しないという結果となった。これよりUGGTはタンパク質の二次構造を識別していないことが分かった。EPOはINF- β に比べて、疎水性が高い糖タンパク質である。そこでUGGTは3本の糖鎖でも覆いきれなかったEPOのタンパク質表面の疎水性を認識しているという考えに至った。

さらに合成EPOと、ラットの肝臓から単離した小胞体の抽出物とのアッセイをおこなった (Fig. 3 (b))。この小胞体抽出物には糖タンパク質の品質管理機構で働くすべての酵素、シャペロン群が含まれている。このアッセイの結果、小胞体内ではUGGTとグルコシダーゼIIが常に基質のやり取りをおこなっており、M9糖鎖へのグルコース転移とそのグルコースの加水分解が繰り返されていることが分かった。また、UGGTとグルコシダーゼIIが基質のやり取りをしている間に、GIM9を認識するシャペロンであるCNX/CRTが、いつ、どのようなタイミングで相互作用するのかを、CNX/CRTに対する抗体でこれらの働きを阻害することで調べた。その結果、UGGT、CNX/CRT、グルコシダーゼIIがこの順番に沿って、順序よく相互作用しているということを初めて明らかにすることができた (Fig. 5)。

本研究では化学合成を用いることで、小胞体で一時的にのみ発現するハイマンノース型糖鎖を持つEPOを初めて調製できた。このプローブを用いることでUGGTが天然の構造を持つ糖タンパク質にグルコースを転移する初めての例を見だし、その認識機構を考察できた。また均一な構造のプローブを用いることで、これまでの不均一なプローブでは実証することができなかった、UGGT、CNX/CRT、グルコシダーゼIIの相互作用の順番を初めて示すことができた。

Biological Assay

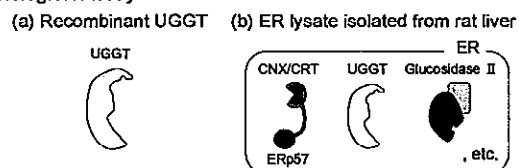


Figure 3. Biological assay with synthetic EPO

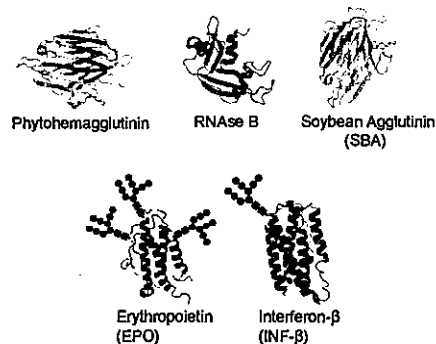


Figure 4. Previously used UGGT substrates, EPO and INF- β

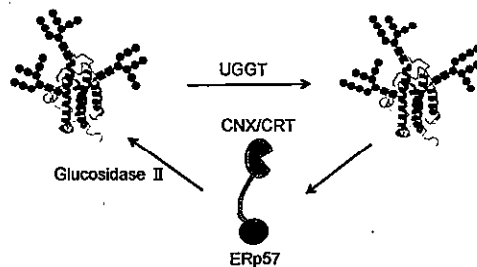


Figure 5. Ordered cycle between UGGT, CNX/CRT and glucosidase II

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (木 内 達 人)			
	(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	高尾 敏文

論文審査の結果の要旨

申請者は、“ハイマンノース型糖鎖をもつエリスロポエチンの精密合成とそれらを用いた小胞体内糖タンパク質品質管理機構の解明研究”に取り組み以下の成果を上げた。

この研究は、糖タンパク質が細胞内の小胞体で生合成される過程で、糖タンパク質フォールディングセンサー酵素、シャペロン、糖加水分解酵素がどのようにミスフォールドした糖タンパク質を正しい構造にリフォールドさせるのか、その作用機構について、化学合成した均一な糖タンパク質を用いて調べることを目的としている。

木内氏は、アスパラギン結合型糖鎖を3本もつエリスロポエチン (EPO) を選び、ハイマンノース糖鎖が3本ならびに1本づつ糖鎖付加部位についた EPO、計4種類をペプチド化学合成、糖ペプチド化学合成、ならびに native chemical ligation を利用して精密に化学合成した。

また、フォールディングの際に生じた EPO のミスフォールド体も精製し、ラット肝臓細胞から単離した小胞体画分に加え反応させた。その結果、正しい構造ならびにミスフォールド体ともにグルコシダーゼ阻害剤存在下では UGGT によるグルコース付加を受けることを明らかにした。この実験では、グリコシダーゼ阻害剤非存在下では、UGGT によるグルコース付加は観測できないことも確認した。これは、UGGT とグルコシダーゼが緻密にリンクし、グルコースの付加、除去を繰り返していることを示唆していた。更に、小胞体画分での実験に CNX/CRN の抗体を加えると、このグルコシダーゼによるグルコースの除去が抑制されたことから、UGGT、CNX/CRN、ならびに、グリコシダーゼは決まった順に EPO に相互作用し、リフォールディングを促進しているということがはじめてわかった。また、その相互作用が1秒間にどの程度起こるか明らかにした。

これまでの実験では、UGGT は正しい構造をした糖タンパク質には、不良品を意味するグルコースは付加させないという解釈があった。また、ミスフォールドした糖タンパク質を小胞体画分に投与するとリフォールドされ正しい構造となり、それ以上、グルコースが付加されることがなくなり、糖タンパク質品質管理機構における UGGT、シャペロン、グルコシダーゼ II の相互作用を追跡することが困難であった。しかし、木内氏が合成した EPO は、ミスフォールド糖タンパク質が特徴として示すタンパク質表面の疎水性が、ちょうど正しい構造の EPO と類似していることが幸いし、正しい3次元構造を形成した EPO が安定に小胞内に存在することで、このような糖タンパク質品質管理機構の相互作用が持続し解析することができた。

上記の成果は、生命活動に必要な糖タンパク質フォールディングにおける糖鎖機能を化学的にはじめて調べたもので、高く評価できる。よって本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。

