Osaka University Knowledge Archive

Title	Chemical Synthesis of Specific and Gradient 15N-labeled Glycoproteins
Author(s)	Hien Minh, Nguyen
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/56078
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

Form 3

Abstract of Thesis

Name (Hien Minh Nguyen)	
Title	**Chemical Synthesis of Specific and Gradient ^{15}N-labeled Glycoproteins** **(^{15}N-安定同位体元素による位置特異的および濃度勾配法を利用する標識糖タンパク質の化学合成)**

Abstract of Thesis

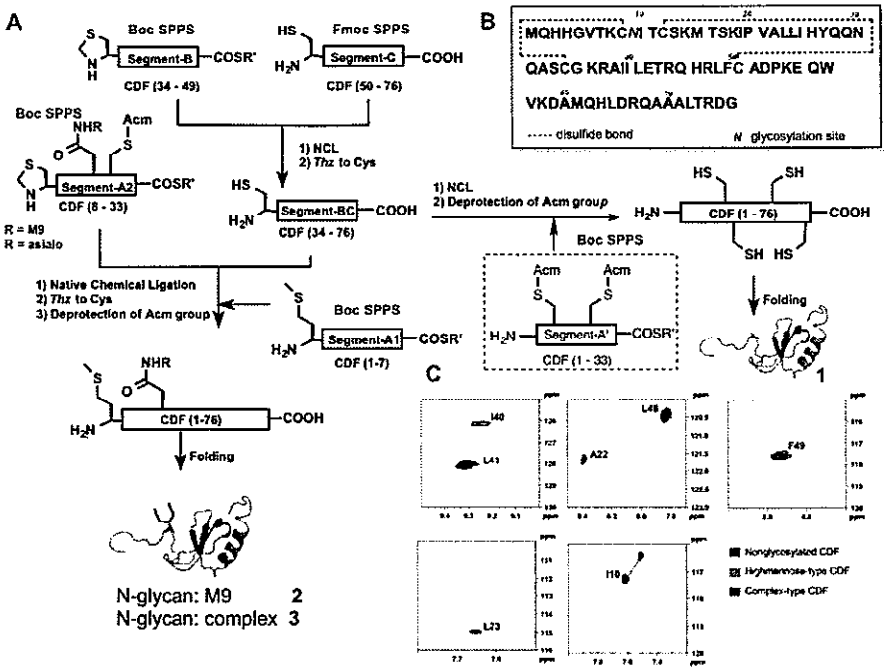
This thesis describes chemical syntheses of glycoproteins of which peptide backbones are specifically labeled with ^{15}N atom in order to investigate how oligosaccharide gives effect to protein. By taking advantage of Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) and Native Chemical Ligation (NCL), we developed the new ^{15}N labeling method for synthetic glycoproteins, that is specific and gradient ^{15}N isotope -labeling (SGI). I chose hydrophobic amino acids for specific ^{15}N labeling because they highly occur in a peptide backbone and also important in many biological events such as folding process, binding with receptor, and aggregation formation.

In order to investigate the function of *N*-glycan, we chose Chemokine Domain of Fractalkine (CDF) as the target for chemical synthesis. The consensus sequence Asn9-Ile10-Thr11 between the two first cysteines forms the unique large bulge loop CNITC. This bulge loop is fixed by the hydrophobic interaction between Leu48, Ile10 and Leu40. The arising question is whether the glycan will affect the protein local conformation, dynamics and stability. At first, I synthesized non-glycosylated CDF and glycosylated CDF having complex-type. Superimposed two ^{1}H-^{15}N HSQC spectra indicated that almost signals between non-glycosylated CDF and glycosylated CDF bearing complex type oligosaccharide overlapped. The results reveal that conformational properties are still maintained, however, there are some differences in the local conformation.

To elucidate the effect of *N*-glycan on protein properties of CDF, based on the scheme **1A** I synthesized ^{15}N-SGI-labeled CDF **1** and glycosylated CDFs having either high-mannose type **2** or complex type **3**. To evaluate protein dynamics, temperature dependent CD spectra of three synthetic CDFs were measured. Surprisingly, non-glycosylated CDF changed their CD spectral pattern during heating. However both glycosylated CDFs did not change CD pattern immediately. CD measurement monitored both heating and cooling process to the room temperature. These processes indicated that oligosaccharide stabilized protein conformation, while inhibited protein dynamics behavior.

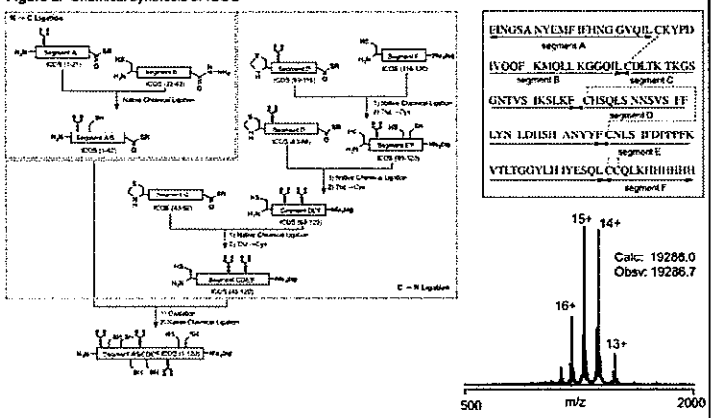
Furthermore, ^{1}H-^{15}N HSQC spectra of SGI CDFs shown the similarity in the chemical shifts of all isotope labeled positions, except for Ile10 at the bulge loop (Figure **1C**). This indicate local protein conformation slightly change at this Ile10 position where is very close to glycosylation position. The spin-lattice relaxation time t1 at the Ile10 and Leu48 were also estimated. Both T1 value increased in case of glycosylated CDF. This changes might due to the flexibility and fluctuation of oligosaccharide incorporated.

Figure 1: A. Scheme for chemical synthesis of SGI non-glycosylated CDF and glycosylated CDF having either high mannose type or complex type oligosaccharide B. Amino acid sequence of CDF. C ^{1}H-^{15}N HSQC of SGI-CDFs



In terms of the second glycoprotein to investigate how glycan regulate properties of glycoprotein, I chemically synthesized membrane-bound glycoproteins ICOS (Inducible Costimulator Molecule). ICOS having one glycan at the Asn69 and ICOS having three glycans at the native glycosylation sites at the Asn3, 69, and 90, according to the method employing SPPS for glycopeptide-α-thioesters and NCL followed by glycoprotein folding experiments as shown in figure 2. All synthesis successfully performed and both ICOSs were obtained.

Figure 2: Chemical synthesis of ICOS



In terms of ICOS bearing a glycan at the Asn69 using SGI method reveals that this glycoform of ICOS tends to aggregate during NMR analysis. Therefore, we decided to synthesize ICOS bearing three glycans at the Asn^{3}, Asn^{69} and Asn^{90} positions. Intriguingly, the increase in the number of oligosaccharides shows the significant effect the solubility but also the prevention of aggregation.

In conclusion, my research revealed that oligosaccharide indeed stabilized glycoprotein conformational properties and increase glycoprotein-solubility, while oligosaccharide inhibited protein dynamic behavior.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　Nguyen Minh Hien　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	梶原　康宏
	副 査	教授	北條　裕信
	副 査	教授	高尾　敏文

論文審査の結果の要旨

申請者は、“Chemical synthesis of Specific and Gradient 15N-labeled Glycoproteins”という研究に取り組み以下の成果を上げた。

NGUYEN 氏は、化学合成した糖タンパク質のタンパク質構造、運動性が糖鎖付加によりどのように変化するか、糖タンパク質を化学合成する際に、特定の位置のアミノ酸の窒素原子を安定同位体 ^{15}N で標識し核磁気共鳴法を中心とする分析方法で調べた。

最初の合成ターゲットは炎症に関与するサイトカインであるフラクタルカインである。フラクタルカインはアスパラギン結合型糖鎖を１本持つが、その周辺はバルジループと呼ばれる構造をとり、そのループは他のドメインの疎水性アミノ酸と疎水性相互作用を形成することで安定化している。

NGUYEN 氏は、このバルジループならびに、疎水性相互作用している部位のアミノ酸に安定同位体原子を位置特異的、そして濃度勾配をつけて導入した糖鎖化フラクタルカイン、ならびに糖鎖がないフラクタルカインをそれぞれ化学合成した。そして ^{15}N の緩和時間、^{1}H-^{15}N HSQC を測定し、糖鎖がタンパク質に与える影響について考察した。この位置特異的に濃度勾配をつけた新規 ^{15}N 標識法を利用することで、タンパク質中の特定の窒素原子のシグナルが核磁気共鳴法で観測できるようになり、タンパク質の動的挙動を容易に追跡できるようになった。

解析の結果、糖鎖付加をしてもタンパク質のバルジループならびに全体構造には影響を与えないが、糖鎖が付加することでタンパク質自体の運動性が制御されているということを緩和時間測定、円二色性スペクトルを測定することで明らかにした。

また、NGUYEN 氏は、T 細胞上の共刺激糖タンパク質 AILIM/ICOS を同様に ^{15}N 濃度勾配標識法を併用しながら複合型糖鎖が１本天然の位置に付加したものの合成に成功し、フォールディング後 ^{1}H-^{15}N HSQC を測定した。また、糖鎖が３本結合した ICOS も非標識体として同様に合成することに成功した。その結果、糖鎖が増えることでタンパク質の水への溶解性が向上することを見出した。

Nguyen 氏は、このように糖鎖機能を調べる研究を系統的に実施し、糖鎖の機能として、糖鎖はタンパク質の３次元構造には影響を与えないが、タンパク質の動的挙動について影響力があることを確認した。また、疎水性が高いタンパク質において、糖鎖付加数が増えることでタンパク質の溶解性が向上するという現象を見いだした。

上記の成果は、生命活動に必要不可欠な糖タンパク質の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。