



Title	Development of a novel strategy for semisynthesis of triantennary complex-type oligosaccharides and its application for glycopeptide synthesis
Author(s)	真木, 勇太
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61471
rights	
Note	

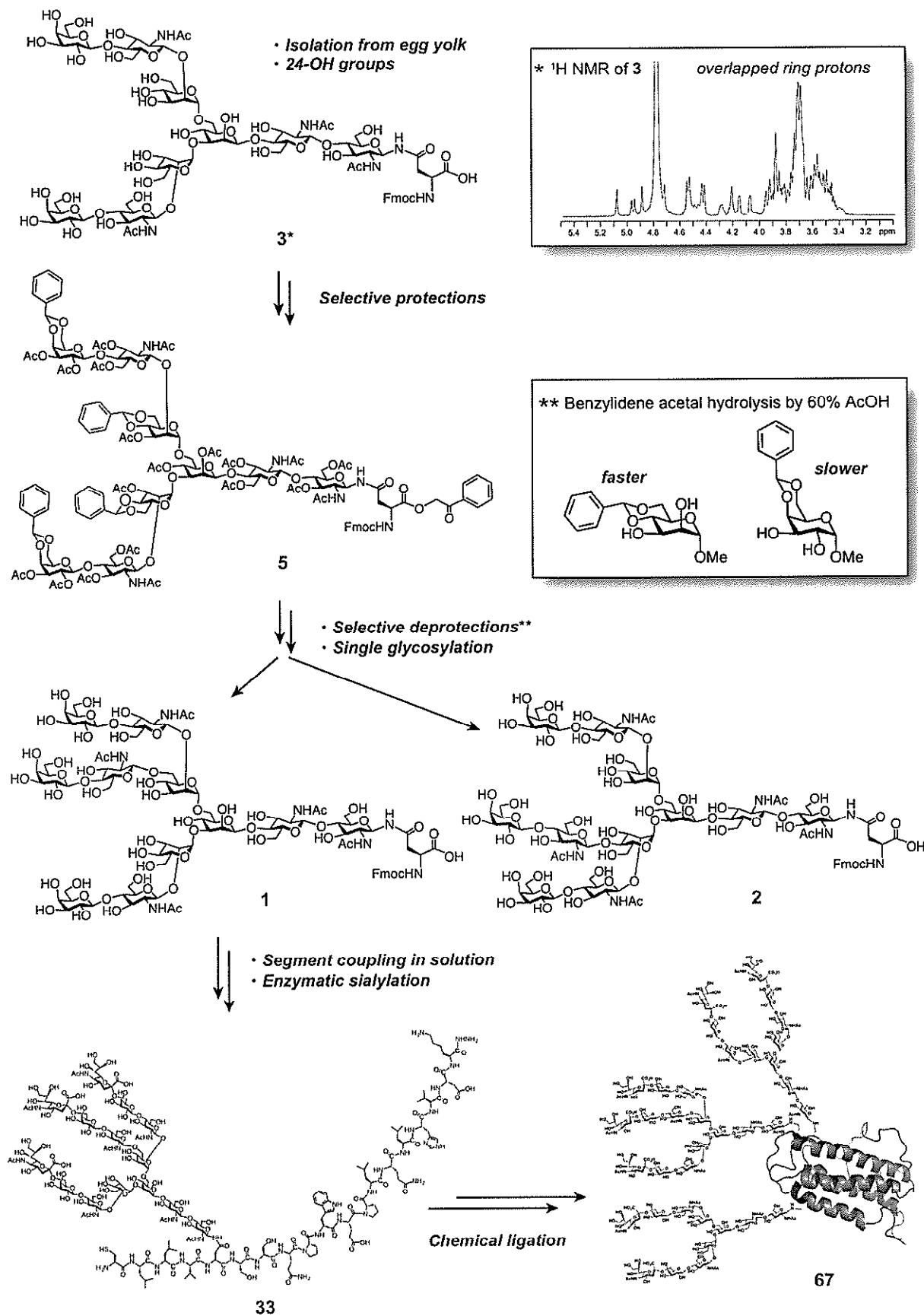
The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

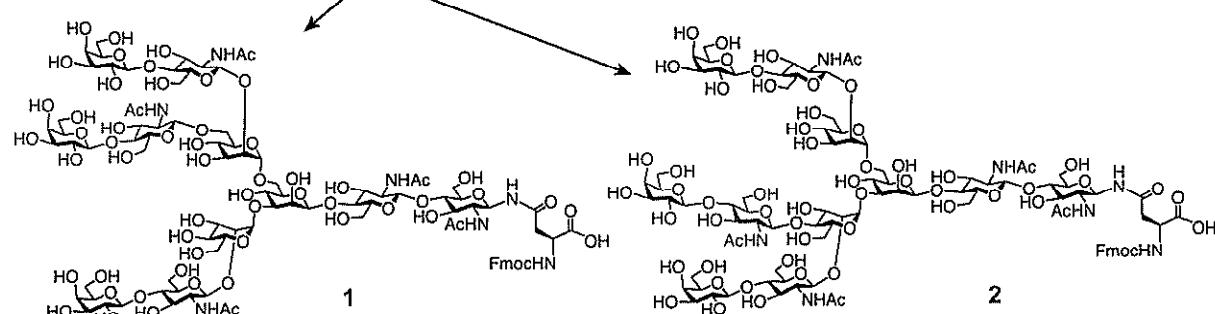
The University of Osaka

論文内容の要旨

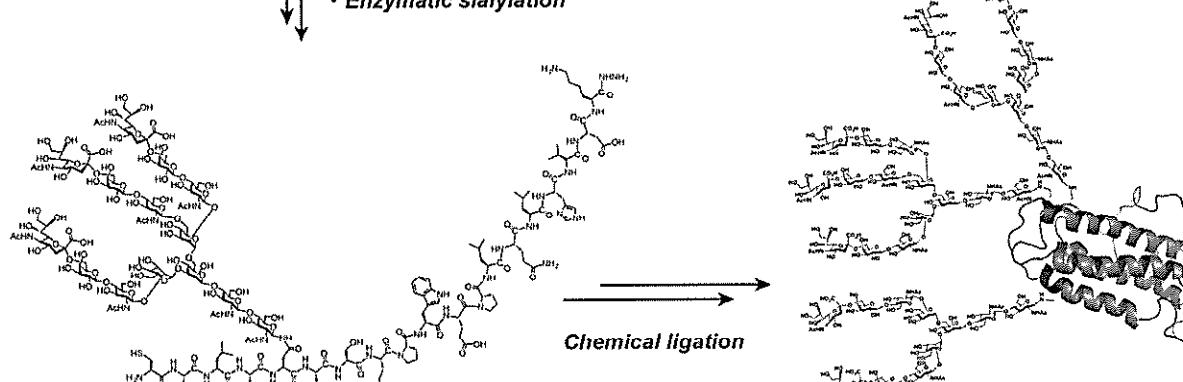
氏名 (真木 勇太)	
論文題名	Development of a novel strategy for semisynthesis of triantennary complex-type oligosaccharides and its application for glycopeptide synthesis (三分枝複合型糖鎖の新規半化学合成法の開発と糖ペプチド合成への展開)
論文内容の要旨	
<p>Glycosylation of proteins is one of the major posttranslational modifications, and more than 50% proteins are estimated to be posttranslationally glycosylated. Complex-type oligosaccharides on proteins show characteristic branching structures including bi-, tri-, and tetra-antennary forms. In the case of erythropoietin (EPO), which is glycoprotein hormone stimulating red blood cell production, tri- and tetra-antennary structures account for more than 90% of complex-type oligosaccharide, and furthermore, it is known that branched structures are often observed on cancer cells. However, relationship between oligosaccharide branching patterns and the behavior of proteins/cells has not yet well understood.</p> <p>Chemical synthesis of oligosaccharides and glycoproteins provides homogenous molecules to understand the functions and necessities of oligosaccharides at molecular level, however syntheses of complex-type oligosaccharides unfortunately necessitate time-consuming protocols due to repetitive protection/deprotection and glycosylation steps. Prompt access to such highly complicated oligosaccharyl molecules would greatly contribute to reveal oligosaccharide functions.</p> <p>Thus, I envisaged developing an unprecedented semisynthetic strategy for the synthesis of triantennary oligosaccharide 1 and 2 from the substrate of biantennary asialononasaccharide 3, which can be isolated from a natural source in gram scale. Twenty-four hydroxy groups of the biantennary oligosaccharide were specifically and precisely manipulated based on rigorous NMR structural analysis. Selective introduction and deprotection of benzylidene acetals produced suitably protected oligosaccharyl acceptors, followed by glycosylation with lactosaminyl donor and stepwise deprotection reactions to give desired triantennary oligosaccharide 1 and 2, respectively. The idea to use biantennary structure as a scaffold of triantennary oligosaccharides was critical for the synthesis, along with a finding of selective benzylidene deprotection in mannosides.</p> <p>The obtained triantennary oligosaccharyl asparagine was converted into EPO-glycopeptide 33 by segment coupling reactions in solution, which was further ligated with (glyco-)peptides in order to synthesize an EPO glycoform having one triantennary sialyltetradecasaccharide and two biantennary sialylundecasaccharide 67.</p> <p>In conclusion, I developed a novel semisynthetic strategy toward triantennary complex-type oligosaccharides and demonstrated robustness and utility of the synthesis by getting access to EPO. The established synthetic protocols can be powerful platform for the insight into oligosaccharide branching on proteins.</p>	



- Selective deprotections**
- Single glycosylation



- Segment coupling in solution
- Enzymatic sialylation



33

Figure. Outline of semisynthesis and its application in this study

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (真木 勇太)	
	(職)
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

申請者は、「三分枝複合型糖鎖の新規半化学合成法の開発と糖ペプチド合成への展開」という題目で、研究に取り組み以下の成果を上げた。

本研究では、鶏卵から単離できるヒト型2分枝糖鎖を原料に全ての糖水酸基を選択的に保護、脱保護し、糖鎖をグリコシル化反応を介して追加することで3分枝の糖鎖骨格を構築した。そして、その糖鎖末端にはシアル酸という糖を酵素で付加し、ヒト型の3分枝シアリル糖鎖2種類を9、ならびに10工程程度で合成できるというこれまで報告例のない効率的な糖鎖合成法を示した。本研究が成功したきっかけは、2分枝糖鎖がもつ24個の水酸基を選択的に保護脱保護する方法を見いだし、3分枝目の糖鎖導入位置の水酸基を遊離にできたことである。また、その際、保護基であるベンジリデンアセタールがガラクトースとマンノース間で酸加水分解速度に差があるため、マンノースのみ選択的に脱保護できる条件を見いだした事が、特に本研究の成果につながった。この脱保護の選択性を理解するために、真木氏は反応の熱力学的パラメーターをもとめ、エントロピー効果が強く選択性に影響していることを見いだし考察した。従来の糖鎖合成方法では、このような3分枝糖鎖合成は、50-70工程必要であったが、真木氏の新規半化学合成により簡便に合成できることが証明された。

また、得られた糖鎖を用いて糖ペプチドに変換する方法の検討についても述べた。従来の糖ペプチドは固相合成において糖鎖アスパラギンを導入し合成していた。しかし、固相での低反応性の問題から糖ペプチドを得る収率は低かった。今回、真木氏は貴重な3分枝糖鎖を利用して糖ペプチドを合成するため、効率的な合成法が必要であった。そこで、糖鎖アスパラギンのN,C末端側でペプチドを液相で連結する検討を実施した。その結果、従来法では数パーセントの単離収率であった糖ペプチドが、20-30%に向上し、貴重なため少量しか利用できない糖鎖でも糖ペプチドに変換できる方法を確立した。そして、真木氏は、この3分枝糖鎖をもつ糖ペプチドを用いて、糖タンパク質の合成を検討した。標的糖タンパク質には、アスパラギン結合型糖鎖を3本もつエリスロポエチンを選んだ。そして、全長アミノ酸が166残基のポリペプチドを6つのセグメントにわけ、それぞれ糖ペプチド、ペプチドとして連結することでエリスロポエチンの全長糖ポリペプチドを得た。そしてタンパク質フォールディングを実施することで、2本の2分枝糖鎖、1本の3分枝糖鎖を持つエリスロポエチン化学合成に成功した。

上記の成果は、糖質化学、タンパク質化学において非常に有用で、今後様々な応用研究に貢献できる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。