



Title	Functional study of O-GalNAc modification for the induction of antifreeze activity by utilizing series of newly synthesized antifreeze glycoproteins
Author(s)	折井, 亮
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72652
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、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

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 (折 井 亮)

論文題名

Functional study of *O*-GalNAc modification for the induction of antifreeze activity by utilizing series of newly synthesized antifreeze glycoproteins
 新規に化学合成した不凍糖タンパク質誘導体を用いた抗凍結活性発現に対する*O*-GalNAc型糖修飾の機能解明研究

論文内容の要旨

不凍活性を有する不凍糖タンパク質(AFGP)は、Ala-Thr-AlaのThr側鎖の水酸基にGal-β1-3-GalNAcがα結合で連結した、糖トリペプチドを単位とした繰り返し構造を有している(Figure 1)。AFGPのもつ不凍活性は、分子が氷表面に物理吸着することで、凝固点のみ下げる活性として定義される。AFGPのもつ糖鎖は不凍活性に必須であるとともに、コアのGalNAcが活性発現に直接寄与していることがすでに示唆されていた。しかしこれまでに、GalNAc単糖による修飾と不凍活性の相関関係は、短いAFGPペプチドを利用した機能解析しか行われていなかった。このため、未だGalNAcのもつ分子レベルでの機能は明らかになっていなかった。これを明らかにするべく本研究では、新規なAFGP全合成法を確立し、GalNAcのみ付加したAFGP誘導体(AFGP(GalNAc))、および、種々の非天然型AFGP誘導体の合成と、体系的な構造活性相関研究を行った。

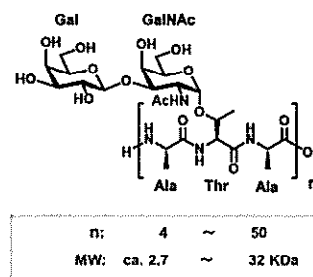


Figure 1. AFGPの一次構造

GalNAc修飾の基盤的な機能を明らかにするために、ペプチド-N-ピバロイルグアニジド体を鍵とする連続的ペプチド連結反応を利用したAFGP(GalNAc)の化学合成法の開発を行った(Figure 2)。ペプチド-N-ピバロイルグアニジド体は、ペプチド連結反応の条件下では不活性なペプチド誘導体である。このため、ペプチド連結反応の際に一般的に用いられる活性誘導体であるペプチド-チオエステル体との間で、位置選択的なペプチド連結反応を行うことができる。一方で、ペプチド-N-ピバロイルグアニジド体とペプチドチオエステル体は、チオールを含む中性の緩衝溶液あるいは、N-ピバロイルグアニジンを含む中性の緩衝溶液で処理することにより、相互変換が可能である。この特異的な性質を利用することで、連続的ペプチド連結反応が可能となり、15、30、60および120残基からなる種々のAFGP(GalNAc)の全合成を達成した(Figure 2)。これらの機能解析を行ったところ、GalNAcの付加のみでAFGPの活性構造だと考えられているポリプロリントタイプII(PPII)ヘリックス様の構造が誘起され、アミノ酸30残基以上で不凍活性を示した。この結果から、GalNAcは、AFGPのもつ基盤的構造及び活性を誘起する最小の糖修飾構造であることを明らかにした。

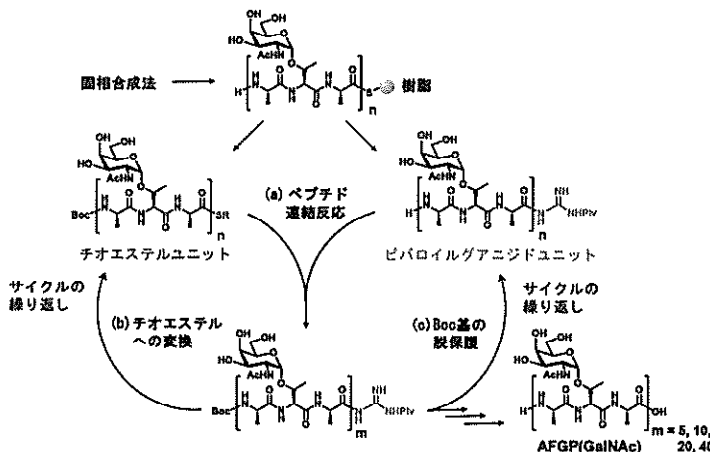


Figure 2. ペプチド-N-ピバロイルグアニジド体を用いたAFGP(GalNAc)の効率的な合成法

GalNAcによる修飾が果たす役割を分子レベルで明らかにするために、確立した合成基盤を利用しGalNAcの付加する数を変えたAFGP誘導体(AFGP ΔGalNAc)の合成を行った。これらを用いた機能解析の結果、GalNAcの欠損数に伴いPPIIヘリックス様の構造が崩れ、活性が低下することが明らかとなった(Figure 3 (a-ii))。これらの現象と、AFGPの氷への吸着能との相関関係を調べるために、氷を固定相としたアフィニティー精製と質量分析を組み合わせた新しいアッセイ法(ice fishing実験)を考案した。この結果、GalNAcの欠損は、氷への吸着能も低下させることが確認できた。このことよりGalNAcは、精密にペプチド鎖の運動性を制御することでPPIIヘリックス様の構造を誘起し、その疎水面を氷へ吸着させることで不凍活性を発現していることが示唆された。

さらにGalNAcの役割を明らかにするために、その4位の立体のみが異なるGlcNAcで修飾されたAFGP誘導体

(AFGP(GlcNAc))の合成と機能解析を行った。その結果、GlcNAcによる修飾は、不凍活性に必要なとされるPPIIヘリックス様の構造を誘起するものの、不凍活性は低下するという結果が得られた(Figure 3 (a-iii))。また、AFGP(GlcNAc)のice fishingでの吸着量は、AFGP(GalNAc)とほぼ同等であった。これらのことは、糖骨格の構造が直接的にAFGPの不凍活性に関与していることを明らかにした。

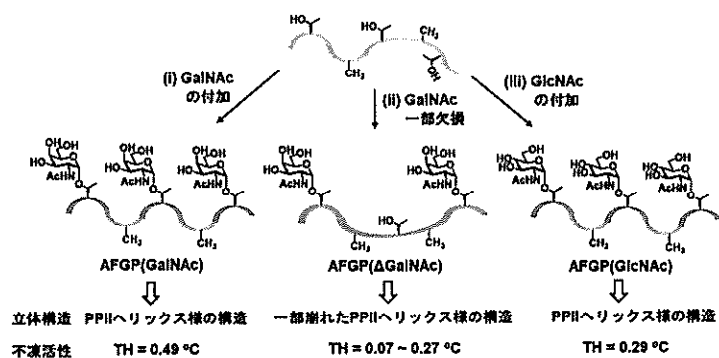


Figure 3. 糖修飾の違いによる構造と活性の変化。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (折井 亮)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	梶 原 康 宏
	副 査	教 授	高 尾 敏 文
	副 査	特任教授	島 本 啓 子
	副 査	講 師	岡 本 亮

論文審査の結果の要旨

折井氏は、「新規に化学合成した不凍糖タンパク質誘導体を用いた抗凍結活性発現に対する *O*-GalNAc 型糖修飾の機能解明研究」という題目で研究成果を発表した。

南極などの魚類は体液を凍らせないようにする不凍糖タンパク質をもっている。折井氏は、新規な不凍糖タンパク質(AFGP)の全合成法を確立し、種々の天然型、および非天然型 AFGP 誘導体の合成をおこなった。そして、系統的な構造活性相関研究を行い、どのような作用機序で不凍活性が発現するか調べた。折井氏は、ペプチド-*N*-ピバロイルグアニジド体を鍵とする連続的ペプチド連結反応を利用した AFGP(GalNAc)の化学合成法の開発を行った。ペプチド-*N*-ピバロイルグアニジド体は、ペプチド連結反応においては不活性な誘導体であるが、チオールを含む中性の緩衝溶液で、ペプチド連結反応の活性型であるチオエステルに変換が可能である。この特異な性質を利用することで、連続的なペプチド連結反応が可能となり、15、30、60 および 120 残基からなる種々の AFGP(GalNAc)の全合成を達成した。これらの機能解析を行ったところ、GalNAc の付加のみで AFGP の活性構造だと考えられているポリプロリントタイプ II(PPII)ヘリックス様の構造が誘起され、アミノ酸 30 残基以上で不凍活性を示すことを明らかにした。この結果から、GalNAc は、AFGP のもつ基盤的構造及び活性を誘起する最小の糖修飾構造であることを明らかにした。

次に、折井氏は、この確立した合成法を利用し GalNAc の付加する数を変えた AFGP 誘導体、さらには GalNAc の 4 位の立体のみが異なる *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) で修飾された AFGP 誘導体の合成と機能解析を行った。その結果、GlcNAc による修飾は、不凍活性に必要とされる PPII ヘリックス様の構造を誘起するものの、不凍活性は低下するということを明らかにした。

折井氏は、本研究で合成した均一な構造の糖ペプチドの熱ヒステリシス (TH) 値をもとに、不凍活性が発現する理由について考察している。まず、不凍活性に必要なヘリックス構造を誘起するには、すべての Thr 残基に対して *O*-グリコシル化されることが必要であることを述べている。次に、糖の機能については、水との相互作用を推定している。すなわち、グルコースは、ガラクトースよりも水に溶けやすいことから、グルコースの 3, 4 位水酸基は、ガラクトースの 3, 4 位水酸基よりもバルクの水の水素結合ネットワークに適合しやすいと考えた。その結果、AFGP(GlcNAc)が吸着している氷と水溶液の界面においては、水分子は比較的自由に動くことができ、氷の結晶成長は強く阻害されないと考えている。一方、GalNAc の水酸基はバルクの水との親和性が GlcNAc よりも低いため、溶液中の水分子の自由な運動を阻害しうる糖骨格であると考えている。その結果、AFGP(GalNAc)が吸着した氷と溶液の界面では、水分子が氷表面へアクセスしにくくなり氷の結晶成長が阻害されるのではないかという結論を導き、不凍活性の発現機構を考察した。

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。