



Title	Efficient approach for semisynthesis of homogenous glycosyl-interferon- β by utilizing bacterial protein expression and chemical synthesis
Author(s)	Chong, Yie Kie
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76389
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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

Abstract of Thesis

Name (Chong Yie Kie)

Title

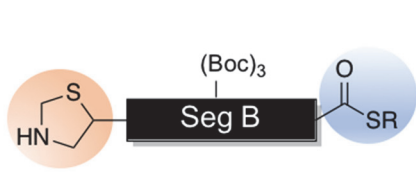
Efficient approach for semisynthesis of homogenous glycosyl-interferon- β by utilizing bacterial protein expression and chemical synthesis(バクテリアによるペプチド発現と化学合成法を利用する高純度なInterferon- β の効率的な半合成)

Abstract of Thesis

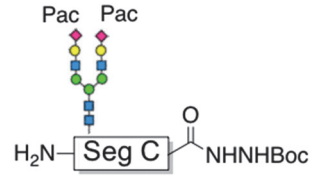
Synthesis of sufficient amount of pure glycoform of glycoprotein is of great interest because the heterogeneity of natural glycoproteins makes the studies of glycan structure-function relationship difficult. To date, we can access glycoprotein by chemical synthesis and recombinant expression, however, isolate sufficient amount of pure glycoform from recombinant expressed by chromatographic methods is still challenging. Total chemical synthesis of glycoprotein plays a vital role to access homogenous glycoprotein, but it is not always the method of choice to synthesis large peptide as it requires tremendous synthetic effort.

Therefore, I envisaged to develop an effective glycoprotein semisynthesis approaches which combine of both chemical synthesis and recombinant expression. We selected Interferon- β to examine the semisynthesis. Interferon- β was designed as a four segments coupling strategy as shown in Figure 1. A short segment C bearing a complex type sialyl biantennary oligosaccharide was synthesized by an improved liquid phase glycopeptide ligation, while other long Segment B and D without oligosaccharide were prepared by *E.coli* expression system. As peptides containing C-terminal thioester are necessary intermediate to perform chemoselective ligation such as, native chemical ligation and thioester ligation. We developed a thioesterification method for *E. Coli* expressed peptide via cys-cyanylation followed by hydrazinolysis condition while retaining the stability of N-terminal thiazolidine.

After obtained all of the segments corresponding to the targeted glycosyl polypeptide by chemically synthesis and *E. Coli* expression, the segments were ligated and a full length interferon- β glycosyl polypeptide was successfully obtained. The semisynthetic strategy proved to be effective compared with chemically synthesis of polypeptide INF- β -(1-166) that has been reported in term of the active labor time, yield and cost. This established semisynthesis protocol can be applied to other homogenous glycoprotein in the future.



Thiazolidine containing peptide thioester modified from
E. coli Expression



Liquid phase glycan and peptide ligation
Chemical Synthesis

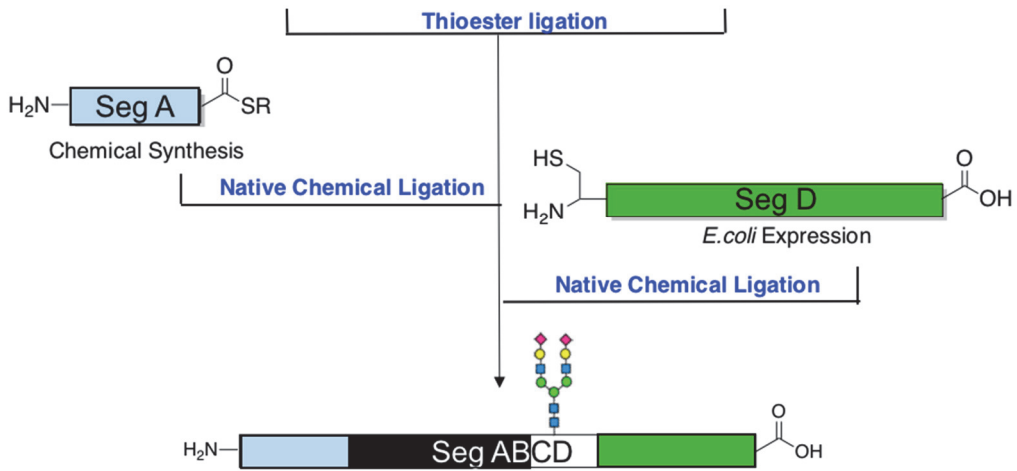


Figure 1: Semisynthetic strategy of Interferon- β

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (Chong Yie Kie)			
	(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	教授	鈴 木 孝禎
論文審査の結果の要旨			
<p>Chong Yie Kie 氏の博士論文「Efficient approach for semisynthesis of homogenous glycosyl-interferon-β by utilizing bacterial protein expression and chemical synthesis (バクテリアによるペプチド発現と化学合成法を利用する高純度な Interferon-β の効率的な半合成)」について審査をおこなった。</p> <p>治療薬としてすでに利用されているインターフェロン β を例に、糖タンパク質の新規化学合成法の確立を目的としている。従来のバイオテクノロジー法を利用した方法で糖タンパク質を調製すると糖鎖構造は不均一となり高純度な糖タンパク質を得ることができなかった。そこで、糖鎖の機能を調べるために、タンパク質の化学合成法が活用されていた。しかし、この方法では、合成工程数がかかるため、少量しか得ることができなかった。本研究で Chong 氏は、化学合成法と遺伝子組み換え技術を組み合わせて行う半合成法を利用した新規糖タンパク質の合成法の開発を目指した。</p> <p>広範な検討の結果、大腸菌で発現させた 50 残基からなる無保護のポリペプチドを出発原料として、目的ペプチド断片を酵素的に切り出すと同時にアミノ末端をチアゾリジンに変換、保護した後に、シアニル化とヒドラジン分解を組み合わせる方法でチオエステル体を高収率で得ることに成功した。更に大腸菌での発現条件を検討し、100mg 以上のペプチド原料を 1L の培養液から得ることに成功した。この検討により実用的なペプチドチオエステルが得られるようになった。</p> <p>また、大量合成が困難であったヒト型糖鎖をもつ糖ペプチドも改良法の確立に成功した。糖鎖が結合したアミノ酸は、鶏卵から単離できるので、糖鎖結合部位の周辺ペプチドをいかに糖鎖アミノ酸に結合させるかが鍵であった。Chong 氏は広範の条件検討を行い実用的な連結条件を見出した。</p> <p>そして、これら調製した糖ペプチド、及び、大腸菌で発現した 2 つのポリペプチド鎖を逐次カップリングしてインターフェロン β 全長の合成に成功した。インターフェロン β の糖鎖ポリペプチドからフォールディング体へは既に条件が確立されているため、Chong 氏は形式全合成を通してより簡便な糖タンパク質の半合成法を確立した。</p> <p>上記の成果は、糖質化学、タンパク質化学の研究分野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。</p>			